

201318027A

病原体解析手法の高度化による効率的な
食品由来感染症探知システムの構築に関する研究
(課題番号：H24-新興-一般-005)

平成 25 年度 総括・研究分担報告書

(厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

研究代表者 泉谷 秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 26(2014)年 4 月

目次

1. 平成 25 年度総括研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究……………	1	
研究代表者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 25 年度分担研究報告書

グループ 1：細菌

(I) 国立感染症研究所・国立医薬品食品衛生研究所

a) 病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究……………	16
---------------------------------	----

研究分担者	寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
-------	------	---------------------

研究協力者	石原 朋子	国立感染症研究所 細菌第一部
-------	-------	----------------

	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
--	-------	----------------

		地方衛生研究所
--	--	---------

b) 腸管出血性大腸菌0157 のIS-printing system 解析結果の評価……………	25
--	----

研究分担者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
-------	-------	----------------

研究協力者	石原 朋子	国立感染症研究所 細菌第一部
-------	-------	----------------

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究……………	33
---------------------------------	----

研究分担者	八柳 潤	秋田県健康環境センター
-------	------	-------------

研究協力者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
-------	-------	-----------

	池田 徹也	北海道立衛生研究所
--	-------	-----------

	坂本 裕美子	札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課
--	--------	--------------------

	武沼 浩子	青森県環境保健センター
--	-------	-------------

	福田 理	青森県環境保健センター
--	------	-------------

	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
--	-------	---------------

	梶田 弘子	岩手県環境保健研究センター
--	-------	---------------

	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
--	-------	----------

	鈴木 裕	山形県衛生研究所
--	------	----------

	山口 友美	宮城県保健環境センター
--	-------	-------------

	松原 弘明	仙台市衛生研究所
--	-------	----------

牛水真紀子	仙台市衛生研究所
千葉 一樹	福島県衛生研究所
菊地 理慧	福島県衛生研究所
川瀬 雅雄	新潟県保健環境科学研究所
足立 玲子	新潟市衛生環境研究所

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

a) 関東ブロックで分離された

食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と PFGE 法の精度管理…………… 43

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山本 和則	茨城県衛生研究所
	内藤 秀樹	栃木県保健環境センター
	河合 優子	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	平井晋一郎	千葉県衛生研究所
	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	関口 真紀	長野県環境保全研究所
	柴田 真也	静岡県環境衛生科学研究所
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	齊木 大	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター

b) PFGE 解析およびIS 解析が有効に活用された事例

「事例1」 G居酒屋で発生した腸管出血性大腸菌O157食中毒事例…………… 49

東京都健康安全研究センター

c) PFGE 解析およびIS 解析が有効に活用された事例

「事例2」 保育所における腸管病原性大腸菌O55:H7による食中毒事例…………… 51

長野県環境保全研究所

(IV) 東海・北陸ブロック

研究分担 東海・北陸地方11施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による

IS printing Systemの実施とデータベースへの登録、

及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）活用状況調査…………… 52

研究分担者	松本 昌門	愛知県衛生研究所
研究協力者	鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	北川恵美子	石川県保健環境センター
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	土屋美智代	岐阜市衛生試験所
	木全 恵子	富山県衛生研究所
	中根 邦彦	岡崎市総合検査センター
	新名由季子	福井県衛生研究所
	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
	藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
	多和田光紀	豊田市衛生試験所
	山本 新也	豊橋市保健所衛生試験所

(V) 近畿ブロック

a) 近畿ブロックにおける病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究…………… 69

研究分担者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	梅原 成子	滋賀県衛生科学センター
	河野 智美	滋賀県衛生科学センター
	浅井 紀夫	京都府保健環境研究所
	平田 佐知	京都府保健環境研究所
	杉浦 伸明	京都府保健環境研究所
	清水 麻衣	京都市衛生環境研究所
	秋山 由美	兵庫県立健康生活科学研究所
	齋藤 悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹	神戸市環境保健研究所
	横山 北斗	姫路市環境衛生研究所
	村山隆太郎	尼崎市衛生研究所
	小笠原 準	大阪市立環境科学研究所
	中村 寛海	大阪市立環境科学研究所
	下迫 純子	堺市衛生研究所
	岩崎 直昭	堺市衛生研究所
	田辺 純子	奈良県保健環境研究センター

辻本 真弓	奈良県保健環境研究センター
琴原 優輝	奈良県保健環境研究センター
廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
河原 隆二	大阪府立公衆衛生研究所
原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所

b) 腸管出血性大腸菌の新規MLVA法実施のための基礎的検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 82

研究協力者	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所

c) 保育施設における腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例・・・・・・・・・・・・・・・・ 89

研究協力者	小笠原 準	大阪市立環境科学研究所
	中村 寛海	大阪市立環境科学研究所
	調査研究課	大阪市立環境科学研究所

d) *Staphylococcus aureus* による食中毒事例・・・・・・・・・・・・・・・・ 92

研究協力者	横山 北斗	姫路市環境衛生研究所
	黒田久美子	姫路市環境衛生研究所
	井上 香織	姫路市環境衛生研究所
	瀧 泰明	姫路市環境衛生研究所
	辻安 由美	姫路市保健所衛生課

(VI) 中国・四国ブロック

a) 病原体解析手法の高度化による

効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	樫本 孝史	島根県保健環境科学研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	岡山県環境保健センター
	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	今井 佳積	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	東久保 靖	広島県立総合技術研究所保健環境センター

田内 敦子	広島市衛生研究所
児玉 実	広島市衛生研究所
築地 裕美	広島市衛生研究所
佐多 俊子	広島市衛生研究所
石村 勝之	広島市衛生研究所
野村 恭晴	山口県環境保健センター
矢端 順子	山口県環境保健センター
亀山 光博	山口県環境保健センター
富永 潔	山口県環境保健センター
石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
下野 生世	徳島県立保健製薬環境センター
嶋田 啓司	徳島県立保健製薬環境センター
福田 千恵美	香川県環境保健研究センター
岩下 陽子	香川県環境保健研究センター
有塚 真弓	香川県環境保健研究センター
内田 順子	香川県環境保健研究センター
仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
木村 千鶴子	愛媛県立衛生環境研究所
藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
金山 知代	高知県衛生研究所

b) 島根県におけるIS-printing 法による腸管出血性大腸菌026 の
分子疫学解析の有用性の検討…………… 123

研究協力者	樫本 孝史	島根県保健環境科学研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所

c) 広島県で分離された腸管出血性大腸菌0157 における分子疫学的解析法の検討…………… 127

研究協力者	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	今井 佳積	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	東久保 靖	広島県立総合技術研究所保健環境センター

d) 2013 年に広島市で分離した腸管出血性大腸菌026 (VT1 産生) 株の
分子疫学的解析による検討…………… 133

研究協力者	田内 敦子	広島市衛生研究所
	児玉 実	広島市衛生研究所
	築地 裕美	広島市衛生研究所
	佐多 俊子	広島市衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所

e) 2013(平成25)年の山口県における腸管出血性大腸菌感染症集団感染事例の IS-Printing 法及びMLVA 法による解析結果.....	138
研究協力者	矢端 順子 山口県環境保健センター
	亀山 光博 山口県環境保健センター
	野村 恭晴 山口県環境保健センター
	富永 潔 山口県環境保健センター
f) 徳島県で発生したウェルシュ菌食中毒事例における分子疫学解析について.....	144
研究協力者	石田 弘子 徳島県立保健製薬環境センター
	下野 生世 徳島県立保健製薬環境センター
	嶋田 啓司 徳島県立保健製薬環境センター
g) 香川県で分離された下痢原性大腸菌の分子疫学解析.....	147
研究協力者	福田 千恵美 香川県環境保健研究センター
	岩下 陽子 香川県環境保健研究センター
	有塚 真弓 香川県環境保健研究センター
	内田 順子 香川県環境保健研究センター
h) 香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例.....	153
研究協力者	福田 千恵美 香川県環境保健研究センター
	岩下 陽子 香川県環境保健研究センター
	有塚 真弓 香川県環境保健研究センター
	内田 順子 香川県環境保健研究センター
i) 愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析について.....	155
研究協力者	仙波 敬子 愛媛県立衛生環境研究所
	木村 千鶴子 愛媛県立衛生環境研究所

(VII) 九州ブロック

a) 九州地区における効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究

— IS 型別データベースの運用、EHEC 検出状況及び集団発生事例の解析 —…………… 161

研究分担者	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	世戸 伸一	北九州市環境科学研究所
	成瀬佳菜子	佐賀県衛生薬業センター
	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原 裕子	長崎市保健環境試験所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	福司山郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	黒木真理子	宮崎県衛生環境研究所
	濱田 まどか	鹿児島県環境保健センター
	高良 武俊	沖縄県衛生環境研究所
	村上 光一	福岡県保健環境研究所
	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	大石 明	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	岡元 冬樹	福岡県保健環境研究所

b) 九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

— IS-printing System の精度管理 —…………… 171

研究協力者	江藤 良樹	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	世戸 伸一	北九州市環境科学研究所
	成瀬佳菜子	佐賀県衛生薬業センター
	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原 裕子	長崎市保健環境試験所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	福司山郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	黒木真理子	宮崎県衛生環境研究所
	濱田 まどか	鹿児島県環境保健センター
	高良 武俊	沖縄県衛生環境研究所

c) 同一保育園における腸管出血性大腸菌 (EHEC) 026 の続発事例について.....			182
研究協力者	石原 雅行	長崎県環境保健研究センター	保健科
	西村 隼人	長崎県環境保健研究センター	保健科
	右田 雄二	長崎県環境保健研究センター	保健科
d) 長崎市で発生した黄色ブドウ球菌による集団感染事例.....			184
研究協力者	江原 裕子	長崎市保健環境試験所	
	植木 信介	長崎市保健環境試験所	
	貞光 恵子	長崎市保健環境試験所	
	森本コヤノ	長崎市保健環境試験所	
	島崎 裕子	長崎市保健環境試験所	
	飯田 國洋	長崎市保健環境試験所	
	尾田千恵子	長崎市保健所生活衛生課	
	山口 洋子	長崎市保健所生活衛生課	
	平山 満	長崎市保健所生活衛生課	
e) ナグビブリオによる食中毒事例について.....			187
研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	
	佐々木麻里	大分県衛生環境研究センター	
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター	
f) 特定の地域において同時期に多発したEHEC (O157) 感染症事例について.....			191
研究協力者	福司山郁恵	熊本県保健環境科学研究所	
	古川 真斗	熊本県保健環境科学研究所	
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	

グループ2：ウイルス

(I) 下痢症ウイルスの総合データベース構築総括	197
研究分担者	片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部
	鈴木 善幸 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科
	三瀬 敬治 札幌医科大学医学部衛生学人材育成センター
研究協力者	芳賀 慧 国立感染症研究所ウイルス第二部
	デニス フランシス・エコー ガーナ野口研究所
(II) ノロウイルスタンパク質の構造解析	208
研究分担者	朴 三用 横浜市立大学
	朴 英斌 国立感染症研究所 ウイルス第二部
(III) PAGE によるロタウイルスゲノムのバンドパターン解析	212
研究分担者	村上 耕介 国立感染症研究所 ウイルス第二部
(IV) ロタウイルスのRNA-PAGE 泳動パターンによる流行株分類法の検討	219
研究分担者	藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第二部
(V) ノロウイルス全長ゲノムの進化と流行のメカニズム解析	224
研究分担者	佐藤 裕徳 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	本村 和嗣 大阪大学微生物病研究所
	日本・タイ感染症共同研究センター
3. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成 25 年度)	228

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 25 年度総括研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システム
の構築に関する研究

研究代表者 泉谷秀昌 国立感染症研究所細菌第一部第二室長

研究要旨：

食品由来感染症に由来するウイルスや細菌の解析情報は、疫学情報とともに、原因究明や事例拡大を阻止するうえで重要な因子である。また、解析情報を共有化することにより、効率的に情報を利用することが可能となる。平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で、ネットワーク上で病原体のデータベースを利用するシステム、すなわちウイルスではカリシウェブ、細菌ではパルスネットの構築を進めてきた。パルスネットのシステムを有効に機能させるため継続的な精度管理を実施するとともに、BioNumerics server を利用したパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) のデータベース構築を継続した。さらに、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 の解析では、IS-printing system (IS 法) のオンラインデータベースを改修し、実用に向けた試験運用を行っている。一方、ウイルスでは、構造生物学とウイルスタンパク質の機能解析と分子疫学を融合させ、単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能データも加味した分子疫学データベースツールである、GatVirusWeb (GVW) の構築を目指している。今年度はノロウイルス RdRP のタンパク質の発現、精製、解析に成功した。また、流行時におけるノロウイルスのゲノム多様性変化、リアソータントの情報収集を進めている。ロタウイルスの RNA-PAGE を用いた分子疫学解析手法については、MultiNA をベースに解析手法を確立しつつあり、データベースの拡充を図っている。GVW はこうした腸管系ウイルスに関する統合データベース機能とともに、フォーラムを通じた情報共有ツールとしてカリシウェブにかわる機能を目指している。

研究分担者	世良暢之 (福岡県保健環境研究所)
グループ 1 :	伊豫田淳 (国立感染症研究所)
八柳 潤 (秋田県健康環境センター)	寺嶋 淳 (国立医薬品食品衛生研究所)
甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)	研究協力者 : 石原朋子、および各地方衛生研究所等関係者 (各研究分担報告書を参照)
松本昌門 (愛知県衛生研究所)	
勢戸和子 (大阪府公衆衛生研究所)	
中嶋 洋 (岡山県環境保健センター)	グループ 2 :

片山和彦 (国立感染症研究所)
村上耕介 (国立感染症研究所)
藤井克樹 (国立感染症研究所)
朴英斌 (国立感染症研究所)
三瀬敬治 (札幌医科大学)
鈴木善幸 (名古屋市立大学)
朴三用 (横浜市立大学)
佐藤裕徳 (国立感染症研究所)

A. 研究目的

食品由来感染症の原因病原体となるウイルスや細菌の遺伝学的解析方法について検討し、高度な解析能を有する手法に基づく病原体対解析を行い、原因解明のために解析結果を共有して当該感染症の予防や制御に資する情報ネットワークを構築することを目的とする。原因病原体の解析データと疫学情報を含むデータベースをオンラインで利用することにより、食品由来感染症の発生に即応できる情報を提供できる体制を構築する。

B. 研究方法

対象となる病原体別に本研究班を 1) 細菌、2) ウイルスの二グループに分け、それぞれの班を中心に病原体検査法の開発、評価及びネットワークの構築を行う。各グループでの研究方法について以下に述べる。

1) 細菌グループ ; a) 日本全国 (75 の地研 ; 地方衛生研究所) を 6 ブロックに分け、各ブロック内の地研で分離菌株 (腸管出血性大腸菌 0157 等) に対する PFGE 解析及び 0157 については IS 法の精度管理を継続した。b) 画像等の解析ソフトウェアである BioNumerics (BN) 及び BN server を利用し、全国 6 ブロックの研究分担者がオンラインでデータベースにアクセスできる体制を整

えた。c) EHEC 0157 の IS 法オンラインデータベースに関しては、平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で構築してきたデータベースを基盤に、より実用に向けた改修を行い、分担研究者からのデータ収集が行いやすいようにした。d) 分担研究者の統括ブロックにおいて、発生事例に応用した PFGE 或いは IS 法によるデータベース構築を継続した。e) IS 法データベース内のデータを基に、PFGE と比較した場合の IS 法の評価を行った。f) PFGE、IS 法等の得られた結果を迅速に共有するため、BN サーバ掲示板、電子メール配信および食中毒調査システム (NESFD) 掲示板を使用した。2) ウイルスグループ ; ノロウイルスにおいて、ヒトノロウイルス HuNoV U201 株およびマウスノロウイルス MNV-S7 株の RdRp コード領域を大腸菌のコドンに最適化して、人工合成し、pCold-TF、pCold に InFusion cloning system によってクローニングした。これら大腸菌 BL-21 に導入し、発現・精製を行った。精製した。溶出にはイミダゾールを用いた。精製タンパク質を結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。

ロタウイルスのゲノムは 11 本の分節二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) から成り、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (RNA-PAGE) により分節ごとに分離される。RNA-PAGE の泳動パターンは、群および遺伝子型ごとに特徴があることから、泳動パターンから大まかな分類が可能である。RNA-PAGE は安価で多検体を処理できる方法として有用であるが、泳動条件の違いにより泳動パターンに差が生じることから、異なる施設間での比較が容易でない。この問題点を解決するため、マイクロチップ電気

泳動装置の利用を検討した。本年度は、異なる機種を用いてバンドの分解能の向上、アッセイ間変動、施設間変動等の検討を行った。

地方衛生研究所と国立感染症研究所を主体とする国内サーベイランス組織

(Norovirus Surveillance Group of Japan) と共同してノロウイルスの全長ゲノム配列を収集した。2006-2011年の間に収集したノロウイルスパンデミック株 GII.4_2006b の全長ゲノム (n=251) を解析した。配列の多様度は、配列の平均遺伝距離、ハミング距離、エントロピーを算出して定量的に評価した。

昨年度までのインフルエンザウイルスのゲノム解析から、ゲノム分節の両末端における塩基対形成が確認され、株間の遺伝子組み換え、すなわちリアソータントの発生が示唆された。本年度は、これを基に、ロタウイルスのリアソータント解析を行った。

ノーウォークウイルス（ノロウイルス、NoV）、サッポロウイルス（サポウイルス、SaV）等のカリシウイルスを対象としたデータベース、疫学情報サイト CaliciWeb を引き継ぐだけでなく、ロタウイルスなどの下痢症ウイルスを新たに加えて GatVirus Web を中心として拡大整備し、流行予測プログラムの開発・ページへの組み込みを行いつつさらなる充実を図る。

C. 研究結果

細菌グループ；

1. 感染研・国衛研における研究

平成 25 年度も引き続き、感染研の PFGE データベースを BN サーバー上にアップデートし、6 分担研究者に利用できる状況とした。2013 年に分離された腸管出血性大腸

菌（EHEC）について、PFGE 解析による遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 では、1295 株に対して 2013 年に新たに付与されたサブタイプが 591 種類、2012 年に分離されたことのあるサブタイプが 37 種類、その他が 41 種類であった。また、EHEC 026 では、517 株に対して 210 種類のサブタイプが見出された。

広域事例を疑う EHEC 株、すなわち複数地域から同一と考えられる PFGE パターンを示す菌株について、本年度の分離状況は以下の通りであった。EHEC 0157 については、3ヶ所以上の都道府県で検知されたパターンが 38 種類、そのうち 5ヶ所以上の都道府県で検知されたパターンは 6 種類であった。同様に 026 では、3ヶ所以上の都道府県で検知されたパターンが 5 種類あり、うち 1 種類では 5 県の散発事例から同一 XbaI パターンを示す株が分離されていた。

上記のうち、TN h406 等 3 地研以上で検知されたパターンについては NESFD、電子メール回覧等で 6 ブロック研究分担者を含めた迅速な情報共有を図った。

EHEC 0157 の迅速な分子疫学解析法として有力視されている IS 法については、今後の活用にあたって、PFGE と IS 法の比較を行うことで IS 法の評価を行った。その結果、PFGE に比べて分解能は劣るものの、集発事例の解析に加え、複数地域にまたがる散発事例、所謂広域事例に関しても一定の解析能力があることが示唆された。

IS 法のオンラインデータベース（IS-DB）を改修し、より実用的なものとした。なお、DB 上で PFGE 型と IS 型の両方が利用可能な株 724 について分解能をまとめると以下のようになった：型数 PFGE（347）、IS 法

(137) ; Simpson' s Index of Diversity PFGE (0.991) 、 IS 法 (0.975) ; adjusted Wallace PFGE→IS 法 (0.908) 、 IS 法→PFGE (0.302) 。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所に IS-printing system を普及させると共に、国立感染症研究所に構築された

IS-printing system データベースへの参画を可能とすることを目的として、ブロック内地方衛生研究所における IS-printing system の基礎的な精度管理に関する共同研究を実施した。秋田県で分離された EHEC 0157 分離株 4 株と米国で 1982 年に発生した集団事例の原因菌である EHEC 0157:H7 EDL933 株から抽出した DNA 溶液を供試し、キット付属のプロトコールに従い

IS-printing を実施した。今年度は参加 11 機関の結果がほぼ一致したが、参加 11 機関中 1 機関が牛由来株の 1st Set 1-10 の位置の近傍に出現したエキストラバンドと思われるバンドの判定において 10 機関と異なる判定となった。エキストラバンドについては実験条件や供試株によっては判定に苦慮する場合も発生することを今後念頭に入れる必要があり、エキストラバンドか否か判断がつかない場合の報告方法について一定のルールを策定する必要があると考えられる。今後もブロック内における IS-printing system の精度管理を継続し、各機関が所属する自治体での EHEC 0157 感染症対策における実用化を目指すと共に、国立感染症研究所で構築している IS プリンティングデータシステムへのデータ登録を行う基盤を構築する必要がある。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

食中毒等で分離された EHEC 0157 菌株を対象として、IS 法と PFGE 法を比較検討した。IS 法においても、PFGE 法と同様に、鮮明な電気泳動像を得ることが重要であると考えられた。また、IS 型が一致した株について PFGE パターンを比較した結果、同一 IS 型の中で PFGE パターンは 2~9 種類に分類される場合もあった。

本法は、PCR 法を原理としており、デジタルデータとして結果が出るため、異なる施設間でのデータ共有が PFGE データに比べ格段に容易である。実施状況に関するアンケートの結果、既に多くの地研で IS 法を導入し、多くの株の解析が行われている現状も明らかとなった。今後は IS 法の長所・短所を十分に把握し、データベースの積極的活用や実際の行政に反映できるように整備する必要がある。

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 11 施設において今年度に検出された 143 株の 0157 について IS printing System を実施した。このうち 141 株について IS printing System データベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、141 株は 49 の異なった IS 型に型別された。これら IS 型のうち 13 の IS 型は 2 施設以上から検出されていた。このうち 6 つの IS 型は東海と北陸地方両方の県から検出されていたが、残りの 7 つの IS 型は東海地方のみから検出されていた。今回の解析から最も多くの都県市から検出された IS 型は AA091 であった。AA091 型は東海・北陸地方を含め、全国では九州、近畿、関東・甲信越から検出されていた。従って、平成 25 年には AA091 型が食品等を介して全国的に流行していたこと

を示唆していた。

平成 25 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 5 施設で PFGE の結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。行政に還元された集団事例由来病原菌は 4 施設で 0157、0121、026 の腸管出血性大腸菌であり、残り 1 施設では A 群溶血性レンサ球菌であった。

5. 近畿ブロック

IS-printing System (IS) 法を EHEC 0157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009 年から各施設で実施した IS タイプをデータベース化して情報を共有している。2013 年 6 月には、これまでになかった IS タイプの株が 2 施設から登録され、原因施設の判明につながった。データベースには、2014 年 2 月 10 日現在で 2,064 株が登録されているが、毎年複数の施設から登録される高頻度の IS タイプがあり、最も多い IS タイプ Ad は 11 施設から 159 株が登録されていた。このうちの 53 株について 9 施設で PFGE 法を実施して画像解析をおこなったところ、PFGE パターンは多様で、同時期に分離された株でも PFGE タイプが一致しない株がみられた。しかし、登録施設や感染研 PFGE タイプ名が異なっても、ほぼ同一の PFGE パターンを示す株もあり、IS 法は遺伝子型別スクリーニング法として役割は果たしていると考えられた。一方で、感染研 PFGE タイプ名が同じであるのに IS タイプが一致しない場合もある。家族事例や保育園集団事例で IS 法の判定が 1 本異なることはしばしばみられるが、感染研 PFGE タイプ d483 は IS タイプが 9 タイプに分かれていた。このような株では、その流行が IS 法だけでは探知できない。IS データベー

スにより情報交換や精査が必要と判断された場合には、型別能力に優れた PFGE 法や Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の実施が必要となる。それぞれの解析手法について、近畿ブロックで共通の疫学指標として使用するため、精度管理の継続やプロトコールの最適化が必要であると考えられた。

6. 中国四国ブロック

中四国ブロックの分子疫学解析手法の維持・向上と、より精度の高いデータベースの構築を目的として、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) および IS-printing System による精度管理を実施した。その結果、PFGE 法による解析では、目視による泳動パターンはどの施設の結果もほぼ一致していたが、デンドログラム解析におけるバンド位置の認識の差により、解析結果が多少異なっていた。IS-printing system による解析では、2nd set primer による 4 本目の増幅産物の扱いで、解析結果が 2 グループに分かれたが、それ以外の結果は一致しており、両解析方法とも概ね良好な結果を示した。中四国地域の EHEC 0157 による感染事例について、IS-printing system による解析データを収集し解析した結果、9 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。広域発生事例の疫学解析に重要な分子疫学情報等のデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になってくるものと思われる。

7. 九州ブロック

九州地区では、1. IS-printing System (以下、IS 法とする) による IS 型別データ

ベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌（以下 EHEC とする）検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. IS 法の精度管理及び 5. 集団発生事例の詳細な解析の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157（以下 0157EHEC とする）の IS 型別の登録数は平成 25 年 12 月現在で 956 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 220 件、平成 24 年度 212 件及び平成 25 年度 212 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。956 株の 0157EHEC の IS 型は 217 型に分類された、毎年登録数の多い IS 型別があり、4 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 10 型（4.6%）で、それに属する株は合計 396 株（41.4%）であった。IS 法の実施状況についてのアンケート集約の結果、12 地衛研中 6 地衛研が全株について実施、4 地衛研が一部の株について実施及び 2 地衛研が必要時のみ実施であった。九州地区で平成 25 年度に収集された EHEC は 603 株であった。その内訳は、0157EHEC が 216 株、026 EHEC が 174 株、0111 EHEC が 89 株、0103 EHEC が 54 株、0121 EHEC が 20 株、091 EHEC が 10 株、0145 EHEC が 7 株、その他の血清型が 19 株及び血清型別不能が 14 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率が 63.3%と全国の 46.2%よりも高く、本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成 25 年度の 0157EHEC 及び非 0157EHEC による集団発生事例は 27 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 14 事例で、そのうち 9 事例（5 事例（家庭での発生事例）、2 事例（保育園及び家庭での発生事例）、1 事例（高齢者福祉施設での発

生事例）及び 1 事例（バーベキュー関連事例）が 1 地衛研から報告された。非 0157EHEC によるものは 13 事例で、026EHEC によるものが 6 事例、0103EHEC、0111EHEC 及び 0121 EHEC によるものが各 2 事例、026 と 0103 による混合感染事例が 1 事例であった。

集団発生事例の詳細な解析については、(1) 同一保育園における腸管出血性大腸菌 026 の続発事例について（長崎県環境保健研究センター）、(2) 長崎市で発生した黄色ブドウ球菌による集団感染事例（長崎市保健環境試験所）、(3) ナグビブリオ食中毒事例に関する話題提供（大分県衛生環境研究センター）及び(4) 特定の地域において同時期に多発した EHEC(0157)感染症事例について（熊本県保健環境科学研究所）の 4 事例があった。

全国的な IS 法の実施状況のアンケート結果は、全株試験している地研が 46%、一部の菌株および必要な時だけ実施している地研がそれぞれ 11%、29%で、9 割近い地研で実施されていた。

ウイルスグループ；

GatVirusWeb データベースの柱の一つである、ウイルスタンパク質の構造と機能解析に関して、ヒトノロウイルス（HuNoV）GII.3 U201 株の VPg、VP2 および RNA dependent RNA polymerase (RdRP)、ならびにマウスノロウイルス（MNV）S7 株の VPg、VP2 および RdRP を標的として研究を進めており、発現宿主に最適な人工合成遺伝子コンストラクトを pCold ベクターに構築し、HuNoV および MNV の RdRP 結晶化に成功した。現在までに HuNoV の RdRP の構造を 2.2Å の精度で明らかにできている。

ノロウイルス流行株のゲノム解析では、2012/13 秋冬季に流行した GII.4 および GII.2 の ORF2-3 全長の塩基配列情報を収集した。また、パンデミック株 GII.4_2006b については、2006-2011 年の間に収集したウイルス 251 株についてゲノム全長の多様性を解析した。その結果、ゲノム配列は年々多様性が増大する一方で、一般には高度可変領域とされるカプシド蛋白質のコード領域については流行の間にほとんど変化しないことを見出した。

ロタウイルス RNA-PAGE は、糞便から直接 RNA ゲノムを調製し分析する手法で、ロタウイルスの群別および遺伝子型別の有力な解析法の一つであるが、精度管理に課題がある。それを解消するためにマイクロチップ電気泳動装置を検討しており、主要な泳動装置の 1 つである QIAxcel について検討した。その結果、dsRNA の分離能力は優れているが、アッセイ間、ゲルカセット間の変動を制御しにくいことが示唆された。一方、MultiNA では上記制御に問題は見られず、微細なバンドパターン変化も再現可能であることが示された。

ロタウイルスの遺伝子セグメントの次世代シーケンサー (NGS) データの解析から NGS データに数〜数十塩基に及ぶオーバーハングがある可能性が見いだされ、インフルエンザウイルスと異なる機序でリアソータントが生じている可能性が示唆された。

GatVirus Web の構築に関して、本年度は、英語でのフォーラム運用、ノロウイルスの分子疫学プログラム、時系列系統解析への取り組みを行った。

D. 考察

食品由来感染症に由来するウイルスや細

菌の解析情報は、疫学情報とともに、原因究明や事例拡大を阻止するうえで重要な因子である。また、解析情報を共有化することにより、効率的に情報を利用することが可能となる。平成 23 年度までの厚生労働科学研究事業で、ネットワーク上で病原体のデータベースを利用するシステム、すなわちウイルスではカリシウェブ、細菌ではパルスネットの構築を進めてきた。システム担当者の交代等があるため、本システムを有効に機能させるためには継続的な精度管理が必須である。パルスネットでは、主たる解析方法である PFGE の精度管理が各地方衛生研究所で継続的に実施されており、技術の継承・標準化が行われている。PFGE 解析以外の手法として、EHEC 0157 においては IS 法があり、本研究においてそのスクリーニング法としての有用性が示された。アンケート調査の結果、9 割近くの地研で実施されており、全株試験している地研が 5 割近くにのぼっている状況が明らかとなった。また、ブロック内で IS 法のデータベース化も進んできている。感染研でもオンラインデータベース (IS-DB) を設置し、より迅速に情報共有が進められる体制を整えつつある。今後 IS-DB の実用に向けた精度管理等が課題となる。さらに、Multilocus Variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) もいくつかの地研で稼働しており、PFGE、IS 法との比較が行われている。

こうした解析結果の迅速な共有の経路として感染研 BN サーバー・電子メールによる回覧・NESFD を介した情報発信等を活用し、効果的な方法について検討していく必要がある。

ノロウイルスタンパク質の構造解析においては、RdRP の発現、結晶化ならびに X 線

結晶解析に成功した。今後、アミノ酸配列との照合、比較などを通じた構造予測、機能予測解析等への応用が期待される。

ロタウイルス RNA-PAGE は迅速かつ簡便なロタウイルスの解析法として実用化が期待されており、今年度の成果においてマイクロチップ電気泳動装置としては MultiNA の方が再現性が高いことが示された。泳動条件の検討により泳動時の分解能も向上し、今後、さらに多検体を解析することで、パターンライブラリーを構築していくことが望まれる。

GatVirusWeb の構築に関して、腸管系ウイルスの統合データベースならびに、国際的な情報共有の場としても活用していく予定である。

E. 結論

病原体解析情報のデータベースをネットワーク上で共有・利用することにより、食品由来感染症の探知・感染源究明に利用できるシステムが構築されてきた。ウイルスの GatVirusWeb (前 CaliciWeb)、細菌のパルスネットにおいて、解析情報の正確さを保持するための精度管理と解析情報の更新が継続されている。今後も、分子遺伝学的手法に基づいた病原体解析手法を継続的に評価して利用することが、有用なデータベース構築に必要なと考えられる。また、効果的な情報共有の仕方についても考慮していく必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group (Izumiya H), Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for

successful inter-laboratory comparison of MLVA results. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20566.

2. Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization Working Group (Izumiya H). Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20565.

3. Osawa K, Shigematsu K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T: Modulation of O-antigen chain length by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influences its sensitivities to serum complement. *Microbiol. Immunol.* 2013, 57: 616-623.

4. Harada T, Hirai Y, Itou T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an IS1203 variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 77: 176-178.

5. Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of Gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66: 530-533.

6. Kanki M, Seto K, Kumeda Y: Simultaneous immunomagnetic separation

- method for the detection of *Escherichia coli* O26, O111, and O157 from food samples. *J. Food Protect.* 2014, 77: 15-22.
7. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R: Immune-Related Gene Expression Profile in Laboratory Common Marmosets Assessed by an Accurate Quantitative Real-Time PCR Using Selected Reference Genes. *PLoS ONE* 2013, 8(2): e56296.
 8. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S and Katayama K: Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS ONE* 2013, 8(6): e66534.
 9. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T.: Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci.* 2013, 75(12): 1651-5
 10. Sato H, Yokoyama M, Toh H. Genomics and computational science for virus research. *Front Microbiol.* 4:42, 2013.
 11. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(5):454-7
 12. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 2013 Oct;158(10):2059-68.
 13. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol.* 2013 Jun;5(2):119-25.
 14. Suzuki Y, Kobayashi Y. Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:175-9.
 15. Suzuki Y. Detection of positive selection eliminating effects of structural constraints in hemagglutinin of H3N2 human influenza A virus. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:93-8.
 16. 川津健太郎, 勢戸和子, 久米田裕子: 食中毒細菌の簡易迅速検査法. 微生物の簡易迅速検査法 (株式会社テクノシステム) 2013, 521-530.
 17. 小嶋由香, 佐藤弘康, 池田徹也,

瀬戸順次、鈴木裕、小西典子、齊木大、松本裕子、田辺純子、坂本裕美子、勢戸和子、伊豫田淳、寺嶋淳、大西真：白菜浅漬による 0157 食中毒事例における IS-printing system 解析例について。IASR 34:127-128、2013

18. 小林直樹、工藤由起子、寺嶋 淳：腸管出血性大腸菌感染症 特集 話題の新興・再興感染症。臨床と微生物 41:27-31、2014

19. 小嶋由香、平井有紀、松葉友美、石井圭、平井晋一郎、横山栄二、他：中国北京ツアー参加者における複数の腸管出血性大腸菌感染症事例、病原微生物検出情報（国立感染症研究所）34, 5, 137-139, 2013.

20. 笠原ひとみ、上田ひろみ、宮坂たつ子、藤田暁、小野諭子、関映子、他：プール水が原因と推定された腸管出血性大腸菌 O28 集団感染事例—長野県、病原微生物検出情報（国立感染症研究所）34, 5, 132-133, 2013.

21. 片山和彦 ノーウォークウイルスの特徴と予防対策 食品機械装置 vol. 50, p52-59, 2013.

22. 片山和彦 ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム 感染症 vol. 253, p12-13, p19-21, 2013.

23. 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム 食と健康 10月号 p9-17, 2013.

24. 片山和彦 増加傾向にあるサポウイルス食中毒 食と健康 11月号 p16-19, 2013.

25. 片山和彦 ノロウイルスの感染予防 小学保険ニュース p1, 2014年1月18日号

2) 学会発表

1. 鈴木匡弘、松本昌門ら：臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析 第 87 回日本感染症学会学術講演会 平成 25 年 6 月 5 日～6 日、横浜市

2. 鈴木匡弘：遺伝子タイピングと感染管理 第 29 回日本環境感染学会総会・学術集会 平成 26 年 2 月 15 日 東京都

3. 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄：大阪府で分離された 0157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-0157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2013 年 7 月、つくば)

4. 前田詠里子、村上光一、江藤良樹、市原祥子、大石明、濱崎光宏、堀川和美、麻生嶋七美、本田己喜子：Antimicrobial resistance and lineage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates from humans in Fukuoka Prefecture, Japan、28th International Congress of Chemotherapy and Infection (2013 年 6 月、横浜)

5. 江藤良樹、市原祥子、前田詠里子、平井晋一郎、横山栄二、世良暢之、堀川和美：福岡県で分離された腸管出血性大腸菌 0157 の clade 解析と志賀毒素産生量の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2013 年 7 月、つくば市)

6. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 5th