20142001 4A・B

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26年度 総括・研究分担報告書
及び
平成24～26年度　総合研究報告書

（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

（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

研究代表者　　　泉谷　秀昌

国立感染症研究所　細菌第一部

平成27(2015)年 3月

目 次

1. 平成 24～26 年度総合研究報告書
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・169
研究代表者　泉谷　秀昌　国立感染症研究所

2. 平成 24～26 年度分担研究総合報告書
<u>グループ1： 細菌</u>
（Ⅰ）国立医薬品食品衛生研究所・国立感染症研究所
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・186
研究分担者　寺嶋　淳　国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者　石原　朋子　国立感染症研究所
伊豫田　淳　国立感染症研究所
泉谷　秀昌　国立感染症研究所
地方衛生研究所

b) 腸管出血性大腸菌の血清診断、DNA 型別、系統に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・190
研究分担者　伊豫田　淳　国立感染症研究所
研究協力者　勢戸　和子　大阪府公衆衛生研究所
清水　俊一　北海道立衛生研究所
甲斐　明美　東京都健康安全研究センター
松本　昌門　愛知県衛生研究所
中嶋　洋　岡山県環境保健センター
堀川　和美　福岡県保健環境研究所
江藤　良樹　福岡県保健環境研究所
市原　祥子　福岡県保健環境研究所
世良　暢之　福岡県保健環境研究所
木全　恵子　富山県衛生研究所
磯部　順子　富山県衛生研究所
右田　雄二　長崎県環境保健研究センター
緒方喜久代　大分県衛生環境研究センター
本田己喜子　福岡市保健環境研究所
久保田　勉　北九州市環境科学研究所
河野喜美子　宮崎県衛生環境研究所
松本　一俊　熊本県食肉衛生検査所
久高　潤　沖縄県衛生環境研究所
浅井　紀夫　京都府保健環境研究所

矢端　順子　　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
寺嶋　　淳　　国立医薬品食品衛生研究所
小椋　義俊　　宮崎大学
井口　　純　　宮崎大学
小林　秀樹　　動物衛生研究所
工藤由起子　　国立医薬品食品衛生研究所
石原　朋子　　国立感染症研究所
泉谷　秀昌　　国立感染症研究所
齊藤　剛仁　　国立感染症研究所
大西　　真　　国立感染症研究所
EHEC ワーキンググループ（詳細略）

（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……………………………199
研究分担者　八柳　　潤　　秋田県健康環境センター
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
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
千葉　久子　　仙台市衛生研究所
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
坂本　宣子　　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
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··········206

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
	山城　彩花	茨城県衛生研究所
	内藤　秀樹	栃木県保健環境センター
	桐谷　礼子	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
	松井　重憲	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
	上田ひろみ	長野県環境保全研究所
	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
	松橋　平太	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
	貞升　健志	東京都健康安全研究センター

（Ⅳ）東海・北陸ブロック
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データーベースへの登録及び
パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）等活用状況調査（平成24年度から26年度）······213

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
	野田万希子	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

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･････････････････････････････266

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
	福島　敬介	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
	木澤　正人	京都市衛生環境研究所
	荻田　堅一	兵庫県立健康生活科学研究所
	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
	宮本　園子	神戸市環境保健研究所
	高澤木綿子	姫路市環境衛生研究所
	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
	中村　寛海	大阪市立環境科学研究所
	小笠原　準	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
	阿部　剛士	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
	松井恵梨子	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
	金澤　祐子	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
	原田　哲也	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

(Ⅵ) 中国・四国ブロック
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……………………………277

研究分担者	中嶋　　洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	花原悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	黒崎　守人	島根県保健環境科学研究所
	樫本　孝史	島根県保健環境科学研究所
	川上　優太	島根県保健環境科学研究所
	川瀬　　遵	島根県保健環境科学研究所
	大畠　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
	檀上　博子	岡山県環境保健センター
	竹田　義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	山田　裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	河村美登里	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田加奈子	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
	千神　彩香	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
	児玉　　実	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
	亀山　光博	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
	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
	小山絵理子	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
	宮本　孝子	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
	松本　純子	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
金山　知代　　高知県衛生研究所
藤戸　亜紀　　高知県衛生研究所
鍋島　　民　　高知県衛生研究所

(Ⅶ) 九州ブロック
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、精度管理（ISPS、PFGE）及び
集団発生事例の解析（平成 24-26 年度まとめ）— ………………………………293
研究分担者　世良　暢之　　福岡県保健環境研究所
研究協力者　堀川　和美　　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
藤田　景清　　北九州市環境科学研究所
世戸　伸一　　北九州市環境科学研究所
寺西　泰司　　北九州市環境科学研究所
吉武　俊一　　佐賀県衛生薬業センター
成瀬佳菜子　　佐賀県衛生薬業センター
浦山みどり　　長崎県環境保健研究センター
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
古川　真斗　　熊本県保健環境科学研究所
福司山郁恵　　熊本県保健環境科学研究所
徳岡　英亮　　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
吉野　修司　　宮崎県衛生環境研究所
穂積　和佳　　鹿児島県環境保健センター
濵田まどか　　鹿児島県環境保健センター
髙良　武俊　　沖縄県衛生環境研究所
久高　　潤　　沖縄県衛生環境研究所
村上　光一　　福岡県保健環境研究所
西田　雅博　　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

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…………………………………316

研究分担者　片山　和彦　国立感染症研究所
鈴木　善幸　名古屋市立大学大学院
三瀬　敬治　札幌医科大学
芳賀　慧　国立感染症研究所
研究協力者　デニス フランシス・エコー　ガーナ野口研究所

（Ⅱ）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…………327

研究分担者　藤井　克樹　国立感染症研究所
片山　和彦　国立感染症研究所

（Ⅲ）ノロウイルスタンパク質の構造解析………………………………………335

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

3. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成 24～26 年度）…………………………343

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24-26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。腸管出血性大腸菌（EHEC）のクレード解析ならびに病原因子の解析から、溶血性尿毒症症候群の発症リスクが高いクレードと毒素型の組み合わせが示唆された。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、パルスネットの構築を進めた。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。腸管出血性大腸菌(EHEC)O157の解析では、IS-printing system(IS法)のオンラインデータベース化を行った。6ブロック研究分担者からのデータ登録ができるシステムを構築し、運営にあたっての問題点を改修した。EHEC O157、O26、O111 に関しては multilocus variable-number tandem-repeat analysis（MLVA）による本格的な解析を開始した。

一方、ウイルスでは、前期厚生労働科学研究事業で構築したカリシウェブの運用を継続しているが、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。構造のデータとしては、ヒトノロウイルス（HuNoV）GII.3 U201 株の RNA dependent RNA polymerase (RdRp)の構造解析に初めて成功した。ロタウイルス RNA-PAGE のバンドパターンの蓄積から、泳動パターンのフィッティング解析によって算出される相関係数を用いた株分類法の開発を行った。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

グループ１：

八柳　潤（秋田県健康環境センター）

甲斐明美（東京都健康安全研究センター）

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）

世良暢之　（福岡県保健環境研究所）

伊豫田淳　（国立感染症研究所）

寺嶋　淳　（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者　：石原朋子（感染研）、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）

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)日本全国の地方衛生研究所（地研）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O157等）に対するPFGE解析及びO157についてはIS-pringint system（IS法）の精度管理を継続した。b）平成22年度に立ち上げたBioNumericsサーバーの環境整備を継続した。クライアントPCのOSアップグレードなど、PFGE画像の解析ソフトウエアであるBioNumerics(BN)を介した、全国6ブロックの研究分担者によるオンラインでBNサーバーアクセス体制を整備した。c）EHEC O157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改修した。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）EHEC O157、O26、O111に関してmultilocus variable-number tandem-repeat analysis（MLVA）による解析の運用を開始した。f）それに伴い、地研でMLVAを実施するためのプロトコールおよびコントロールDNAの調製などを行った。g）PFGE、IS法等の得られた結果を迅速に共有するため、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。h）EHEC O157分離株のうち、HUS患者由来株および無症状保菌者由来株を選定し、mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCRによりクレード8型別を行った。それ以外のクレードについては32カ所のSNPを調べた。統計解析はカイ二乗検定またはフィッシャーの正確性検定を使用した。

2)ウイルスグループ；

ノロウイルスについては、GII.4変異株などの検出に対応したLongRT-PCRシステムの構築とそれに合わせたWeb登録システ

ムの充実を行った。Genotyping system は、Norovirus Scientific Committee（NSC）の運営する NoroNet に搭載し、分子系統解析に対応した。IASR にノロウイルスの遺伝子型分類法として新規 genotyping system のガイドを執筆した。

ロタウイルスについては、11 本の全ゲノムセグメントを対象とした解析手法であるシマズ製作所製 MultiNa アナライザーを用いた RNA-PAGE パターン解析の開発が進行中である。本手法は、ロタウイルスのゲノムリアソータントに対応している。本研究班細菌グループの O157 パルスネットを参考としたパターンライブラリー構築を目標に、システム構築を行った。モビリティシフト値を基準にしたパターン解析は、アッセイ間変動、ラボ間変動の影響を受け、シマズ製作所製 MultiNa アナライザーを持ってしても 2SD 値のコントロールが十分にできなかった。しかし、electrophoregram を基盤にしたパターンフィッティングの技法を用いて算出する相関係数による解析は、株分類精度 95％以上を実現し、十分に実用に足る結果が得られた。現在、上記解析方法によるロタウイルス株自動照合、分類ソフトウエアの開発が進行している。

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 21 年度から開始した BioNumerics (BN) server による PFGE オンラインデータベースの継続的な運用を行った。平成 23 年度から構築を始めた IS-printing system（IS 法もしくは IS-PS）データベースについてはオンラインシステムの改修を進めながら、データベースの拡充を行った。平成 26 年度から Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）の活用を開始し、腸管出血性大腸菌 O157、O26 および O111 については本法ならびに PFGE による解析を行った。上記システムを活用し、ブロック代表を通じた電子メールによる回覧、食中毒調査支援システム（NESFD）における情報共有を推進した。菌株の解析から、集団発生事例関連株のクラスター、ならびに共通の感染源が示唆される同一もしくは類似の遺伝子型を示す菌株のクラスターが多数明らかとなった。MLVA 法については、希望する地研に対しプロトコールおよびコントロール DNA を配布し、技術支援を行った。

国内で原因菌が分離されないものの、EHEC 感染が原因と考えられる重篤な症例（溶血性尿毒症症候群：HUS）において、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価を測定することで EHEC 感染症の確定診断が可能である。しかし、その測定法についてはこれまで国内で統一したプロトコールが存在しなかった。本研究では、2011 年に発生した焼き肉チェーン店における O111 による集団発生事例を受け、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価のプロトコールを策定し、本研究班の分担研究者を通じて全国に伝達した。

分離された EHEC O157 菌株間の相同性を解析する手法として、MLVA 法または PFGE 法が使用されている。PFGE より解像度は劣るものの、迅速性に優れる IS 法はすでに多くの地方衛生研究所等で分子疫学的解析に使用されている。本研究では IS 法による解析結果の評価を行うことを目的に、IS 法と PFGE 法による解析結果を比較した。その結果、集団発生事例だけではなく、散在的集

団発生事例として複数の異なる地域で散在的に分離された O157 株間の解析に使用可能であることも判明した。さらに、PFGE 型が同じであるが IS-PS 型が異なる菌株が存在することが明らかとなった。

EHEC 感染による重症例である溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome：HUS）発症例の 80%以上は血清型 O157:H7/H-によるものである。国内で分離される O157 株の系統解析を行う目的で、塩基配列ベースによる系統解析法（clade 1-9 型別法）を用いて 1999-2011 年までに分離された計 656 株（PFGE 型がそれぞれ異なる無症状保菌者由来株 387 株と HUS 患者由来株 269 株）について clade 型および *stx* 遺伝子亜型の分布解析を行った。その結果、1) clade 3, 6, 8 は HUS 患者由来株に有意に多いこと，2) clade 7 は無症状保菌者由来株に有意に多いこと，3) *stx2a* 保有株は clade 8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いこと，4) *stx2a stx2c* 保有株は clade 6/8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いことが明らかとなった。以上の結果から、HUS 発症リスクの高い clade と *stx* 型の組み合わせは、clade 8 + *stx2a* または clade 6/8 + *stx2a stx2c* であることが明らかとなった。

２．北海道・東北・新潟ブロック

平成 24 年度から 26 年度に全国地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックの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。平成 24 年度に本研究を開始した際、参加 10 機関のうち、5 機関の担当者が IS 法を行うのが初めてという状況であった。EHEC O157 計 13 株を供試し、QIAamp DNA Mini Kit により抽出した DNA 溶液を参加機関に配布して IS 法を実施し、結果を比較した。その結果、反応系に加える DNA 量が結果の再現性に大きな影響を及ぼすことが示された。また、菌株の種類によっては、正規のバンドと同等の輝度を呈するエキストラバンドが出現し、判定の不一致が発生することも経験された。このように、IS 法の精度管理には未だに課題が存在することが浮き彫りとなり、今後もブロック内における IS 法の精度管理の取り組みを継続し、問題点を洗い出しながらブロック内地方衛生研究所の IS 法の精度向上を目指す必要があると考えられた。

３．関東・甲・信・静岡ブロック

EHEC の分子疫学的解析を、関東ブロックの地方衛生研究所間で相互に行うために、PFGE 法及び IS 法の精度管理を実施した。

O157 株の共通菌株を用いた精度管理では、いずれの施設も全体的には良好な泳動像が得られた。しかし染色が薄く、バンドがはっきりしない写真も一部に認められた。本研究班を通じて精度管理を実施することは各地研の PFGE 解析技術の向上に非常に重要であった。

IS 法は PFGE 法と比較して、やや分解能が劣る場合もあるが、ほぼ同等の識別が可能であることが確認できた。簡便で短時間に結果を得ることができ、結果の比較がしやすいことがメリットである。しかし IS 法は 18 本のバンドを判定するマルチプレックス PCR 法なので、泳動時間や染色法によっては、判定を誤ってしまう可能性があることが示唆された。各地研では、実際の

行政検体に PFGE 法や IS 法が活用された事例を多く経験し、非常に有用であった。

４．東海・北陸ブロック

１）各施設の IS 法の型別結果と他の都県市分離株との関連：東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）において各施設で検出された O157 について IS 法を実施した。平成 24 年度は 10 施設由来 112 株について IS-PS データベースへの登録を行った。10 施設中９施設で他の都県市と同一の IS 型が検出された。さらに東海・北陸地方以外の東京都、岡山県から検出された O157 と同一の IS 型も検出された。最も多くの都県市から検出された IS 型は AA039 であった。この型は東海・北陸、東京都を含む６都県市から検出され、その期間は６月から 10 月であった。平成 25 年度は 141 株について IS-PS データベースへの登録を行った。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。平成 26 年度は 119 株の O157 についてデータベースを用いて解析を行った。119 株は 57 の異なった IS 型に型別され、11 の IS 型は 2 施設以上から検出されていた。このうち 7 つの IS 型は東海地方の市県から検出されていたが、残りの 4 つの IS 型は東海・北陸両地方の市県から検出されていた。今回の解析から最も多くの市県から検出された IS 型は AA047 型で東海・北陸両地方にまたがる 5 市県で 15 株検出された。２）PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査：平成 24 年度は４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。病原菌は O157、O121 等の腸管出血性大腸菌であった。また、１施設では病院から分与された O157 を含めた集団事例の解析を PFGE を用いて実施していた。平成 25 年度は 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。病原菌は 4 施設で O157、O121、O26 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。３）PFGE 等疫学解析に活用された事例に関する調査等：平成 26 年度は２施設で PFGE の結果が疫学解析に活用されていた。対象とした病原菌は腸管出血性大腸菌 O157 であった。また、1 施設で O157 の MLVA の結果が集団事例の疫学解析に活用されていた。４）O111 の MLVA 解析に基づく食品関係従事者検便の実施：国立感染症研究所で実施した O111 の MLVA 解析の結果、複数の市県から検出された患者由来株の MLVA Type が一致した。患者はいずれも同一チェーン店の焼肉店を利用していたことから、食材を加工している施設従業員 98 名の検便を実施したが、O111 は検出されなかった。今後も国立感染症研究所からの情報を活用して腸管出血性大腸菌感染症の防止に努めたい。

５．近畿ブロック

近畿ブロック内の 13 か所の地方衛生研究所（地研）で、IS 法および PFGE 法を EHEC O157 の共通の遺伝子型別法として使用するため、精度管理を実施するとともに、発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、近畿 IS-PS データベースの充実と活用を図っ

た。IS 法では毎年少ないながらも誤判定があり、精度管理により間違いやすい非特異バンドやテンプレートの調製に注意を促すことができた。PFGE 法では一部で未消化バンドやレーンの歪みなどもみられたが、画像解析で自動バンド認識を手動で補正することにより、近似度の高い結果が得られた。近畿 IS-PS データベースには約 2,300 株の登録があり、それまでにないタイプが分離された場合や、一時期に集中して同じタイプが分離された場合は、関連性が強く示唆された。しかし、毎年 10 株以上登録されるような高頻度の IS-PS 型については、分離時期が集中していても PFGE タイプが異なることがあり、あくまでも IS 法はスクリーニング法であると考えられた。今後も近畿 IS データベースを活用するために、迅速な菌株収集とデータ登録が望まれる。さらに、MLVA 法については、O157 だけでなく O26 や O111 にも使用可能な国立感染症研究所（感染研）プロトコールについて、地研での実施が可能か検討した。感染研から配布された 24 サンプルの MLVA コントロール DNA について解析したところ、サンプルによっては増幅効率の悪い遺伝子座がみられた。また、蛍光漏れや非特異増幅も測定され、これらの問題点を改善するプロトコールの検討が必要であると考えられた。

６．中国四国ブロック

中四国地域の分子疫学的手法の維持・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、平成 24 年度～26 年度の 3 年間に EHEC O157 菌株を用いて、PFGE 法及び IS 法による精度管理を実施した。PFGE 法では、どの施設の泳動像も比較的クリアであったが、一部スメアになって判定しにくいケースも見られた。デンドログラム解析は、バンド位置の認識に個人差が生じ、個々の類似度は多少異なっていたが、全体としてはおおよそ一致した結果であった。IS 法は、2nd set primer で増幅される高分子量のバンド領域において、各バンドの間隔が狭くなっているため、異なった判定をしたケースが見受けられた。このため、長めのゲルを用いて長時間泳動することによりバンド間隔が広がり、判定が容易になった。本法の結果は、どの施設も概ね良好であった。

本研究班では、以前より PFGE 法による型別結果を用いたデータベースの構築を試行してきた。平成 24 年度からは、IS 法による解析結果を用いたデータベースの構築に向けた試行を実施している。中四国地域でも、地域内で発生した EHEC O157 の患者情報と、PFGE 型及び IS 法解析結果などの分子疫学情報を収集し、解析した結果を各県に還元して、複数県に広がる同一菌による流行状況の把握や感染源の究明に役立てている。IS 法による解析は、操作の簡便性や結果の迅速性から、事例発生時のスクリーニング的な利用が、有用であると思われた。本法は、PFGE 法のような操作の煩雑さや個人差による解析結果への影響が少なく、結果がコード化表記されるため菌株間の比較が容易で、解析結果は疫学情報とよく一致していた。一方、PFGE 法は IS-printing system に比べてより詳細な解析が可能であり、MLVA 法はさらに検査の迅速性や、コード表記により結果の比較が容易である。各解析法の長所を生かして、状況に応じた効率的な疫学解析に使用することが、重要である。

７．九州ブロック

九州地区では、1. IS 法による IS-PS データベースの運用、2. EHEC 検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理(IS-PS、PFGE)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 EHEC O157 の IS-PS データベースの登録数は平成 26 年 12 月現在で 1194 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件及び平成 26 年度 203 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州地区で平成 24～26 年度に収集された EHEC は 1753 株であった。その内訳は、EHEC O157 が 729 株、非 O157 EHEC が 989 株及び血清型別不能が 35 株であった。九州地区は非 O157EHEC の占める比率が 56.4%であり、本研究で EHEC O157 に加えて非 O157EHEC 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 24～26 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 65 事例であった。その内訳は、EHEC O157 によるものが 28 事例で、非 O157EHEC によるものは 37 事例であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。精度管理では例年行っている IS 法と併せて、PFGE についても今回初めて実施した。IS 法では、エキストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地研の各担当者が判定したバンド数で、全 4 株一致した地衛研はなかった。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

ウイルスグループ；

CaliciWeb では、NoV、SaV などヒト腸管感性カリシウイルスを対象とした、ゲノム情報を疫学情報と共に蓄積し、構造タンパク質領域を標的としたバイオインフォマティックスによる解析を行ってきた。ロタウイルス遺伝子データベースを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用を開始した。

国際標準となる Norovirus の新規 genotyping 法を確立しノロウイルスサイエンティフィックコミッティー（本部オランダ）によって運用を開始した。Web page 上の解析ツールが公開され、誰でも株分類ができるようになった。

急性胃腸炎の原因ウイルスであるサポウイルスはノロウイルス同様、塩基配列の多様性に富む。国内外におけるサポウイルスの検出例増加に伴い、検出されたサポウイルス株のタイピング手法を確立した。

ロタウイルス（RV）は二本鎖 RNA で構成される 11 本の遺伝子分節をゲノムとして有する。我々は、ロタウイルス遺伝子 11 分節の long RT-PCR 法の構築に成功した。また、ロタウイルスの全遺伝子セグメントの網羅的解析並びに分子疫学に次世代シーケンサーを導入し、ハイスループットな全遺伝子配列解析システムの構築に成功した。しかし、迅速かつ高精度なロタウイルスサーベイランスには、簡便な株分類法が必須である。

RV 感染患者の便検体から抽出した RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動（RNA-PAGE）し、分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することで株鑑別が可能である。我々は、ロタウイルスの

RNA-PAGEパターンに基づく簡易株鑑別法として、electrophoregramを基盤にしたパターンフィッティングの技法を用いて算出する相関係数による解析方法を開発した。現在、ロタウイルス株自動照合、分類ソフトウエアの開発が進行している。

本研究で構築を目指すGatVirusWebは、構造生物学的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、から単なる直鎖状の配列ばかりでなく、立体構造のデータ、タンパク質の機能も加味した分子疫学ツールの構築を目指す。ノロウイルスにおいて、ORF1にコードされるRNA dependent RNA polymerase (RdRp)のX線結晶構造解析を行うため、大腸菌でRdRpを発現し結晶化を試みたところ、ヒトノロウイルス(HuNoV)GII.3 U201株のRdRp、マウスノロウイルス（MNV）S7株のRdRpの結晶化に成功し、立体構造を解明した。構築に成功した構造と、データベース上に報告されている他の遺伝子型に由来する構造を比較したところ全てのRdRpはクローズドコンフィグレーションであった。RdRp以外のVP2, VPgをprotease, GFP等、結晶構造が解析され、熱力学的に安定した構造を持つタンパク質と組み合わせた融合タンパク質として発現させ、可溶化並びに、結晶化する試みは失敗した。現在、VP2はeIF4E, Gとの共結晶化、VPgはVP1との共結晶化を試みている。

RdRpの形状、アミノ酸残基とRNAの結合様式を明らかにし、遺伝子型によって異なるRdRpのアミノ酸多様性、構造変化がウイルスの病原性変化に影響を与えるか否か、分子疫学の標的領域になり得るか否かを解析するためには、RNAと結合したクローズドコンフィグレーションのRdRpの構造を決定する必要がある。構造解析に成功したRdRpのインビトロ活性測定システムを構築し、異なる遺伝子型のRdRpの活性差を評価可能とした。

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要素である。また、解析情報を共有化することにより、広域株の検出や広域で発生している事例の探知にもつながる。EHEC系統および病原因子の解析から、重症化、すなわちHUS発症に伴う菌側のリスク要因が明らかとなり、流行の注意喚起を行う上で一つの指標になると考えられる。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。近年EHEC O157においてはIS法が普及しており、本年度は各ブロックにおいて精度管理が実施された。両方法とも多くの地研で活用されており、地研間および地研－感染研間で情報共有を進めていくために、こうした精度管理の継続が必要である。MVLAについては、今年度感染研で本格的な運用が始められた。少数ながらも既にいくつかの地研ではMLVAが導入されていたが、今後、本法の導入を検討・開始する地研が増えてくることが予想され、導入時の問

題点・精度管理の手法などについて検討していく必要がある。

さらに、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。

国際標準となるNorovirusの新規genotyping法を確立しノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって運用が開始された。本法はリアソータントにも対応可能なため、流行の実態がより詳細に解明されることが期待される。

ノロウイルスGII.3タイプのRdRPの結晶構造を初めて解くことに成功し、de novo RNA合成活性があることを示した。今後、RNA-RdRp複合体についても解析を行い、バリアント間のRNA合成活性との関係が明らかになることが期待される。

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、今年度は泳動パターンの蓄積を行った。泳動像の領域を区分し各区分のパターンフィッティングを行うことで、パターン分類を可能とした。

ノロウイルス、サポウイルスなどのカリシウイルスに特化したCaliciWebから、他の下痢症ウイルス情報も統合したGatVirusWebの構築を始めた。CaliciWebは従来から流行の注意喚起などに役割を果たしてきた。GatVirusWebでもその流れを汲みつつ、流行予測プログラムなどの開発も進めており、国内外の重要な情報共有の場として機能させていく予定である。

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）では、広範なウイルスを対象に遺伝子情報、タンパク質の構造情報、解析プログラムの実装などが進められている。細菌のパルスネットにおいては、リアルタイムな広域事例の探知に向けて、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だと考えられる。また、効果的な情報発信、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. Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, and Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular *stx* subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Forum Infectious Diseases, 1 (2): first published online July 18, 2014.
4. Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki1, Yoshio Miwa, Mitsutaka Yabutani, Yuhki Nagai, Michiyo Tsuchiya, Makiko Noda, Akihiro Nagata, Keiko Kawakami, Tomoko Shima, Norio Tatsumi and Hiroko Minagawa. Phenotypic and Genetic Analyses of *Campylobacter jejuni* Lior Serotype 76 Isolated from Chicken Meat and Clinical Specimens. Jpn. J. Infect. Dis., 66, 72-75, 2013.
5. Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended-Spectrum β-Lactamase- and AmpC β-Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. Jpn. J. Infect. Dis. 2012, 65: 555-557.
6. Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T: Clinical Significance of *Escherichia albertii*. Emerg. Infect. Dis. 2012, 18: 488-492.
7. 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.
8. 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 IS*1203* variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013, 77: 176-178.
9. 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.

10. 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.

11. Themphachana M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Seto K, Rattanachuay P, Singkhamanan K, Sukhumungoon P: First report in Thailand of a *stx*-negative *Escherichia coli* O157 strain from a patient with diarrhea. Southeast Asian J Trop. Med. Public Health 2014, 45:881-889.

12. Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T and Sera N. A foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):321-2

13. Maeda E, Murakami K, Etoh Y, Onozuka D, Sera N, Asoshima N, Honda M, Narimatsu H, Iyoda S, Watahiki M and Fujimoto S. Does Sequence Type 33 of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O91 cause only mild symptoms? *J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):362-4.

14. Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T and Fujimoto S. Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One* 2015 in press.

15. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. Journal of virology vol. 86, 284-92, 2012.

16. Hansman, GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JRH, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, and Kwong PD. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle Journal of virology vol. 86, 3635-3646, 2012.

17. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. Exp Anim. vol. 61, 35-40, 2012.

18. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, and Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol. Vol.157, 349-52, 2012.

19. Sharp TM, Crawford SE, Ajami NJ, Neill F, Atmar RL, Katayama K, Utama B, Estes MK. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012) doi:10.1186/1743-422X-9-181
20. Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park YB and Katayama K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. Microbiol Immunol. 56: 630-638, Sep, 2012.
21. Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T and Sato H. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. Frontiers in Microbiology 3: Article 312, 1-10, 2012.
22. Miki M and Katayama K. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. Frontiers in Microbiology 3: Article 387, 1-6, 2012
23. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. Microbiol Immunol. 56(11):760-770, 2012.
24. Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, and Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. Arch Virol DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, Dec. 2013.
25. 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. 66(5):454-7., 2013.
26. 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 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.
27. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R,