

201517011A

食品由来感染症の病原体情報の解析及び

共有化システムの構築に関する研究

(課題番号：H27－新興行政－一般－002)

平成 27 年度 総括・研究分担報告書

(厚生労働科学研究費補助金

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 28 (2016) 年 3 月

目次

1. 平成 27 年度総括研究報告書

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化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

2. 平成 27 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

a) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究	13		
研究代表者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
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
	李 謙一	国立感染症研究所	細菌第一部
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
	寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所	
		地方衛生研究所	

b) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究	20		
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
		地方衛生研究所等	

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究	28	
研究分担者	熊谷 優子	秋田県健康環境センター
研究協力者	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
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	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
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	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
	菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

関東ブロックにおける腸管出血性大腸菌の疫学解析及び

共有化システムの構築に関する研究 38

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	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	桐谷 礼子	栃木県保健環境センター
	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
	関口 真紀	長野県環境保全研究所
	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
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター

(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等活用状況調査および情報共有に関する研究 50

研究分担者	鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	松本 昌門	愛知県衛生研究所
	山田 和弘	愛知県衛生研究所
	木全 恵子	富山県衛生研究所
	北川恵美子	石川県保健環境センター
	東方 美保	福井県衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	野田万希子	岐阜県保健環境研究所
	田中 保知	岐阜市衛生試験所
	永井 佑樹	三重県保健環境研究所
	山本 新也	豊橋市保健所衛生試験所
	中根 邦彦	岡崎市総合検査センター
	多和田光紀	豊田市衛生試験所

(V) 近畿ブロック

a) 近畿ブロックにおける

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究…………… 58

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
	平田 佐知	京都府保健環境研究所
	木上 照子	京都府保健環境研究所
	北野 隆一	京都府保健環境研究所
	清水 麻衣	京都市衛生環境研究所
	齋藤 悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	荻田 堅一	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
	野本 竜平	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
	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
	福田 弘美	堺市衛生研究所
	下迫 純子	堺市衛生研究所
	田邊 純子	奈良県保健研究センター
	阿部 剛士	奈良県保健研究センター
	西山 貴士	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
	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) 飲食チェーン店で発生した腸管出血性大腸菌 0157 食中毒疑い事例…………… 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	田邊 純子	奈良県保健研究センター
	福田 弘美	堺市衛生研究所
	中村 寛海	大阪市立環境科学研究所
	松原 弘明	仙台市衛生研究所
	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	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
	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所

c) 堺市内保育施設における無症状病原体保有者を主とした
腸管出血性大腸菌 0157 (VT2) 感染症の集団発生事例…………… 73

研究協力者	下迫 純子	堺市衛生研究所
	福田 弘美	堺市衛生研究所
	岩崎 直昭	堺市衛生研究所
	横田 正春	堺市衛生研究所
	杉本 光伸	堺市衛生研究所
	小林 和夫	堺市衛生研究所

d) 市内宿泊施設で発生した
食中毒事件における腸管毒素原性大腸菌の分子疫学的検討について…………… 79

研究協力者	西山 貴士	和歌山市衛生研究所
	金澤 祐子	和歌山市衛生研究所
	太田 裕元	和歌山市衛生研究所
	廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
	江川 秀信	和歌山市衛生研究所
	森野 吉晴	和歌山市衛生研究所

(VI) 中国・四国ブロック

a) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究…………… 87

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	竹内 功二	鳥取県衛生環境研究所
	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
	秋田 裕子	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
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	千神 彩香	広島市衛生研究所
	青田 達明	広島市衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	坂本 綾	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

尾羽根紀子	山口県環境保健センター
大塚 仁	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
内田 順子	香川県環境保健研究センター
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
安藤 友美	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
園部 祥代	愛媛県立衛生環境研究所
金山 知代	高知県衛生研究所
高橋とみよ	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O157の分子疫学解析の有用性の検討…………… 116

研究協力者	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

c) 腸管出血性大腸菌O26集団感染事例における分子疫学的解析…………… 119

研究協力者	秋田 裕子	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
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター

d) 広島市で分離されたサルモネラのパルスフィールドゲル電気泳動解析結果…………… 124

研究協力者	千神 彩香	広島市衛生研究所
	青田 達明	広島市衛生研究所
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	坂本 綾	広島市衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所

e) 2015年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌O157感染症の分子疫学的解析…………… 133

研究協力者	亀山 光博	山口県環境保健センター
	尾羽根紀子	山口県環境保健センター
	大塚 仁	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

f) 香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例	138
研究協力者	内田 順子 香川県環境保健研究センター
	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
	安藤 友美 香川県環境保健研究センター

(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、精度管理（ISPS、PFGE）及び 集団発生事例の解析—	142
--	-----

研究分担者	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
研究協力者	岩佐奈津美	福岡市保健環境研究所
	中村 悦子	北九州市環境科学研究所
	塘 由香	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
	江原 裕子	長崎市保健環境試験所
	成松 浩志	大分県衛生環境研究センター
	原田 誠也	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
	水流 奈己	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
	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
	西田 雅博	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
	重村 洋明	福岡県保健環境研究所
	江藤 良樹	福岡県保健医療介護総務課

b) 炙り鶏レバーが原因と疑われた食中毒事例	157
------------------------	-----

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
	島田 美香	長崎市保健所生活衛生課
	松下 明嗣	長崎市保健所生活衛生課

グループ2：ウイルス

(I) ロタウイルスのRNA-PAGE泳動パターンによる流行株分類ウェブサイトの構築…………… 160
研究分担者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部

(II) “GatVirusWeb” ウェブサイトの構築…………… 167
研究分担者 三瀬 敬治 札幌医科大学

3. 研究成果の刊行に関する一覧表（平成27年度）…………… 170

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
平成 27 年度総括研究報告書

「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化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：

食品由来感染症の原因物質である細菌やウイルスの持つ病原体情報、すなわち分子疫学解析から得られる遺伝子情報は、疫学情報とともに、流行株の把握ならびに感染原因の究明および感染拡大を阻止する上で重要な要素である。実際の感染症対策および施策にあたっては当該病原体情報を効率よく効果的に共有することが肝要である。腸管出血性大腸菌（EHEC）に関し、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）、IS-printing system および multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) の各解析法について検討、データベースの構築、精度評価などを行った。IS 法は現在地方衛生研究所（地衛研）において最も精力的に活用されている方法であることが示唆された。精度管理の実施からエキストラバント等の判定に関して、なんらかのガイドブックの整備の必要性が考えられた。PFGE は感染研および各地衛研で、MLVA は主として感染研で実施されており、各地域もしくは全国的な広域株の把握、集団事例への対応などに活用された。広域株に関する情報共有は電子メールによる回覧および食中毒調査システム NESFD 掲示板などの活用を検討した。

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から発展させた下痢症ウイルス分子疫学データベースツールである、GatVirusWeb (GVW) の改良、安定稼働を進めている。これまでに 8 万件以上のデータを収集格納しており、膨大なデータからの検索ツールの改善を図った。ロタウイルス RNA-PAGE のバンドパターン蓄積から、泳動パターンの分類アルゴリズムを構築し、GVW への実装の準備を進めている。

研究分担者

グループ 1：

熊谷優子（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）
鈴木匡弘（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）

研究協力者：大西 真、石原朋子、李謙一
（国立感染症研究所）、寺嶋淳（国立医薬品
食品衛生研究所）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)
三瀬敬治 (札幌医科大学)

A. 研究目的

食品由来感染症において、細菌では腸管出血性大腸菌 (EHEC) などが、ウイルスではノロウイルスなどが毎年流行を繰り返している。これらの病原体には多様なバリエーションが存在し、その流行型は毎年変化している。本研究では分子疫学解析の開発・評価・精度管理、当該解析法に基づく病原体情報の収集およびデータベース化、ならびに当該病原体情報の効率的、効果的な共有化を行うためのシステムの開発を柱としている。本研究によって流行株の把握、ならびに広域事例における感染源の究明及び感染拡大の防止に貢献することを目指している。

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 0157 等) に対する PFGE 解析及び 0157 については IS-printing 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。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、データの拡充を行った。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検討もしくは継続した。さらに、データベースを活用して集団発生事例等に対応した。e) EHEC 0157、026、0111 に関して multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析の運用を検討した。f) 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。g) EHEC 分子疫学解析の手法について、地衛研における実施状況を把握するためのアンケートを実施した。

2) ウイルスグループ ;

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。共同研究者より提供されたユニークな RNA-PAGE パターンを示したロタウイルス陽性便検体を用いた。便検体から 10%PBS 懸濁液を調製し、TRIzol® LS Reagent (Life technologies) および Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZYMO Research) を使用してウイルス RNA の抽出を行った。マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA における泳動は、DNA500 ポリマーキットを用いて行った。得られたバンドパターンは、相対移動度だけでは無く、画像と electrophoregram (泳動波形とピーク位置が示されたグラフ) の蓄積を行った。すべての検体について、次世代シーケンスシステムを用いたウイルスゲノムの塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定してパターンライブラリーに蓄積した。

オンライン下痢症ウイルスデータベース (GatVirusWeb) の構築、改良及び維持管理を行う。ユーザーから提案される改良案等の案件に関して、データベースウェブサイトに掲載を行い、テストドライブにてパブリックベータ版をユーザーに評価させる。実際のユーザーからのリクエストをウェブサイトに併設している掲示板を通じて入手し、リクエストを反映させつつウェブサイトの実装を図る。さらに、現状のユーザーを把握するため、アクセスモニターを施行し、利用状況に応じたウェブ管理、改良を実施する。

C. 研究結果

細菌グループ；

1. 感染研における研究

BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムのデータベースの継続的な運用を行った。2015年に分離された EHEC について MLVA および PFGE 解析を行い、その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 1404 株、026 602 株、0111 69 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、514、192、42 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 181 (35%)、026 (40%) で 76、0111 で 15 (36%) であった。解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 749 株であった。当該コンプレックスは 0157 13 種類、026 2 種類、0111 1 種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 5 種類、026 で 2 種類であった。複数の地研で同一の MLVA 型を示す株、もしくはコンプレックス

に含まれる株が検出された場合には関係機関、もしくは研究分担者を介して情報を提供し注意喚起を行った。コンプレックスの中には 10 を超える MLVA 型を含むものもあり、より分かりやすい情報提供の仕方について検討の必要があると考えられた。

2015 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行い、そのパターンに基づいて各血清群における分離株の動向について調べた。EHEC 0157 の 447 株、026 の 199 株については、それぞれ 274、144 種類のサブタイプが付与された。0157、026、0111 以外の血清群の EHEC のうち、検出頻度の高い血清群として、0103 は 48 種類、0121 は 32 種類、0145 は 19 種類、076 は 6 種類、091 は 18 種類、0146 は 8 種類の PFGE パターンが確認された。これらの PFGE パターンのうち、4 血清群 (05、0103、0121、0146) において、2 ヶ所以上の都道府県で検出された同一 PFGE パターンが 8 種類 (サブタイプ名：TN5L1、TN103i1、TN103L1、TN103L2、TN121k6、TN121k9、TN121L1、TN146k1) 確認された。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロック内の分子疫学的解析手法の検査精度向上と病原体情報の共有化システム構築を目的として、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設の参加のもと IS-Printing System (IS 法) の精度管理を実施した。検体としては、平成 27 年度に秋田県で検出された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 4 株を用いた。病原体情報をブロック内で迅速に共有化するための

基礎的検討として行い、精度管理時に調査したアンケート結果から各施設の IS 法の検査実施条件設定やエキストラバンドの判断基準など日頃抱えている問題点を集約し、今後の情報共有化システムの構築に向けてブロック内地方衛生研究所における課題を明らかにした。また、秋田県の EHEC 感染症流行期における集団感染のサーベイランスへの IS 法の有用性を検証した。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

2015年に東京都で分離された 0157 の 233 株について PFGE 解析を行った結果、86 パターンに分類された。また PFGE 解析を実施した 230 株について IS 法を実施した結果、75 パターンに分類された。いずれも、ほぼ同等の型別能であることが確認された。

IS 法による解析は、マルチプレックス PCR 法を用いた解析であるため、バンドの有無を判定しやすい写真を撮影することが重要である。そこで、判定しやすい泳動条件について検討した結果、分子量マーカーの先端がアガロースゲルの下から 2 cm の位置まで泳動することで判定しやすい写真が得られることが判明した。

共通菌株を用いた精度管理は、PFGE 法、IS 法いずれも良好な成績を得ることができた。しかし、一部の施設で染色が薄く判定が困難である写真があった。

各地研では PFGE 法や IS 法による解析が行政に活用された事例を数多く経験した。パルスネットを通じた情報共有は、食中毒・感染症の早期解明に繋がるものと考えられた。【病原体情報の疫学調査への活用例の報告（以下、追加事例報告等）：東京都など】

4. 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、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

1. 分子疫学解析の実施状況調査にかんして、PFGE 及び IS 法は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS 法によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。2. IS 法の精度管理に関して、過半数の地研で非特異バンドの誤判定または *hly* の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。3. 地域共有データベースに関して、クラウド型データベースを用いた IS 法の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓発活動が必要である。

5. 近畿ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 について、IS-printing System (IS) 法およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法の精度管理を実施して遺伝子型別法の信頼性を確保するとともに、近畿 IS データベースを活用して、流行株の探知や複数の自治体にまたがった事例の解析を行った。IS 法の精度管理では、特定のバンドで増幅が弱い傾向がみられ、施設によっては陰性と判定された。実施にあたっては、試薬キットに添付の Template Mix で明瞭に 18 本のバンドが増幅されるこ

とを確認する必要がある。近畿 IS データベースには、12 施設から 323 株が登録され、IS 法で 91 タイプに型別された。最も多く登録されたタイプは、8 施設から 41 株登録された感染研 IS パターン番号 AA063 で、24～26 週分離株の一部は PFGE 型も一致しており、関連性が強く疑われた。PFGE 法の精度管理では、小さいサイズのバンドが不明瞭な画像もあり、菌株ごとの近似度は 85.5～95.0%と低いものもあったが、概ね良好な結果であった。精度管理株以外に実施機会のなかった施設もあり、経験豊富な施設のノウハウを情報共有することが課題である。【追加事例報告：大阪府等広域、堺市、和歌山市】

6. 中国四国ブロック

中四国地域で食品由来感染症の広域事例が発生した場合等においては、各施設の分子疫学解析結果等を共有する必要がある。このため、各施設における分子疫学解析手法の維持と解析精度の向上、さらにこのデータを用いた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 菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）及び IS 法による精度管理を、実施した。その結果、ほとんどの施設は良好な解析結果であったが、一部施設では解析法の習熟が必要と思われた。

中四国地域の EHEC 0157 による感染事例について、IS 法等による解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7 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。このうち、疫学的に関連のある株については、MLVA 法による結果も一致していた。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・向上が重要になるものと思われる。【追加事例報告等：島根県、広島県、広島市、山口県、香川県】

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）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 法、PFGE 法）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）の IS 型別の登録数は平成 27 年 12 月現在で 1376 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、平成 26 年度 206 件及び平成 27 年度 179 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 27 年度に収集された EHEC は 456 株であった。その内訳は、0157EHEC が 214 株、0103 EHEC が 86 株、026 EHEC が 73 株、0111 EHEC が 25 株、0121 EHEC が 14 株、0145 EHEC が 10 株、091 EHEC が 10 株、その他の血清型が 13 株及び血清型別不能が 11 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率 50.7%であり、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 27 年度の 0157EHEC 及び 非 0157EHEC による集団発生事例は 9 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 6 事例で、非 0157EHEC によるものは 3 事例で、026EHEC によるものが 1 事例、0121EHEC によるものが 1 事例、0103EHEC によるものが 1 事例であった。精度管理では昨年度に引き続き IS 法、

PFGE 法について実施した。IS 法では、エキストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛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。ほとんどの地衛研が正解目安と 0~3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。一致しなかったのは、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、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。【追加事例報告等：長崎市】

8. ブロックアンケート結果

EHEC の分子疫学解析手法 PFGE、IS 法および MLVA について各地衛研での実施状況をアンケート形式で情報収集した。PFGE 実施率は 74%で、このうち（ほぼ）全株試験している地衛研は 34%であった。同様に、IS 法実施率は 88%（うち全株試験は 68%）、MLVA 実施率は 15%（うち全株試験は 80%）であった。

ウイルスグループ；

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。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）すると、その分子量や二次構造の違いにより各分節を分離・検出することが可能である。この泳動パターンは遺伝子型や株によって異なるため、検体間のウイルスの類似性を推定する事も可能である。我々は、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターン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進めている。本

研究班では、このパターンフィッティングソフトウェアと標準株のパターンをウェブページ上に公開し、全国の地方衛生研究所からアクセスしてオンラインでロタウイルスの遺伝子型分類、株分類が可能なシステム構築を進めた。

ロタウイルス遺伝子データベースおよび遺伝子型判定システムを CaliciWeb に加え、新たに GatVirusWeb として運用するべく Web site の構築、維持、開発を行う。具体的には、これまで運用してきたカリシウイルスデータベース&配列検索システムに、NoroNet norovirus genotyping system へのリンクを加え、さらにロタウイルスでは、RNA-PAGE によるパターン分類をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA に適応させ、MultiNA 泳動パターン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搭載準備を進めた。ウイルス遺伝子の検索機能に関し検索条件での最小塩基配列数と最大塩基配列数による絞り込み条件の検討を実施した。さらに、系統樹作成支援サービスの検討を実施した。

D. 考察

食品由来感染症の病因物質である細菌やウイルスの病原体情報、すなわち分子疫学解析によって得られる遺伝子等の情報は、患者の疫学情報とともに、感染原因究の明や感染拡大の阻止などの感染症対策を講じるために重要な要素である。

分子疫学解析による得られた病原体情報を具体的な対策に結び付けるために、当該病原体情報を共有化することも重要な工程の一つである。

平成 26 年度までの厚生労働科学研究事業において、closed network 上にて病原体情報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 GatVirusWeb、細菌ではパルスネットの構築および運用を進めてきた。また、細菌グループではより迅速かつ積極的に病原体情報を共有すべく、電子メールおよび NESFD 掲示板等などのルートも情報共有のあり方の一つとして推し進めている。

本年度も病原体情報から全国および各ブロックならびに各自治体において流行把握ならびに食中毒および行政指導などの行政対応に結び付いた事例報告がなされた。事例は大規模なものもあれば小規模なものもあったが、いずれも日頃からの検査体制および病原体情報の共有化システムがあつてこそである。

解析手法のアンケートから、現在 EHEC 0157 の解析において IS 法が重要な位置を占めていることが示唆された。一方で、各ブロックにおける精度管理の結果から泳動像の判定、エキストラバンドの取り扱いなどに関して、問題点も浮かび上がってきた。IS 法は市販キット化されているが、電気泳動等の使用機器によって結果の判定に影響が出ることも示唆されている。地衛研では担当者の交代も頻繁にあるため、解析技術の精度維持は病原体情報ネットワークの構築に不可欠な要素である。そのためには、本研究のような継続した精度管理の運用が必要と考えられる。また、IS 法について泳動像の判定精度を向上・維持するために何らかのガイドブックが必要であると考えられる。

MVLA を導入したことでよりリアルタイム

に近いサーベイランスが可能になりつつある。MLVA は IS 法と同様結果がデジタル形式なので情報共有がしやすいことが考えられる。いくつかの地衛研においては MLVA が実施されており、今後感染研の結果と照合するとともに、データをやり取りすることで病原体情報の収集ならびに共有化が一層早められることが期待される。

一方で、類似株をまとめた MLVA コンプレックスが複雑なものもあり、情報提供の仕方については今後検討の余地があると考えられる。

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本研究班の前身より検討を始めた新規システムである。本解析法は糞便から直接かつ迅速に泳動パターンを取得し、細菌の分子疫学解析における PFGE 法のように泳動パターンを比較することでデータベース化を図れる手法である。DNA とは異なり、RNA の泳動は二次構造に左右されやすい等の特徴がある。これまでの研究から安定した泳動パターンを得ることに成功し泳動パターンを蓄積することができるようになってきている。蓄積した泳動パターンを基に、泳動パターンを分類化するための解析アルゴリズムならびにツールの基本がほぼ完成した。

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 の構築を進めている。上記ロタウイルス RNA-PAGE 法の実装に向けて準備を始めた。ウイルス遺伝子データベースは年々増加の一途をたどっている。GVW でも同様であり、病原体情報を収集するオートパイロットプログラムにより、データベ

ス上にはこれまでに8万以上のデータが収集されている。より効率よく目的とする遺伝子を検索できるようにするためのプログラムの改善を図っている。今後も国内外の下痢症ウイルス情報共有の重要な場として機能を充実させていく予定である。

E. 結論

病原体情報取得のための技術開発、データの蓄積ならびに情報の共有は感染症対策において必須である。

EHEC 感染症においては病原体の解析手法も主要な3種類の技術 (PFGE、IS、MLVA法) を含めて多様化してきており、それぞれの分解能、利便性、迅速性等の特徴を把握し事例対応に利用することは、病原体情報の活用に重要である。

よりリアルタイムに近い事例探知および解析に向けて、その精度を確保すべく精度管理およびそれに基づくデータベースの構築、さらに効果的な情報共有が重要である。情報共有のあり方も含め、各々の解析手法に係る各工程において検討および改善を図っていくことが重要である。

ウイルスの GatVirusWeb (前 CaliciWeb) では、広範なウイルスを対象に病原体情報の収集及び解析プログラムの実装などが進められている。新たな機能として RNA-PAGE 法によるロタウイルスデータベースの搭載が視野に入ってきた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC,

Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2015 Nov 11:1-7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26554547.

2. Kayali AY, Escalante-Maldonado O, Vuddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y, Nishibuchi M: Development of a method for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Immunol. Immunother.* 2015, 2:1.
3. Harada T, Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Multiplex real-time PCR assays for screening of Shiga toxin 1 and 2 genes, including all known subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-specific genes in beef and sprout enrichment cultures. *J. Food Prot.* 2015, 78: 1800-1811.
4. Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y: Characterization of third-generation-cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan.

- J. Clin. Microbiol. 2015, 53:3035-3038.
5. Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Whole genome analysis of Japanese bovine toroviruses reveals natural recombination between porcine and bovine toroviruses. *Infect Genet Evol.* 2016 Mar;38:90-5. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.013. Epub 2015 Dec 18.
 6. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015 Nov 5;10(11):e0141739. doi: 10.1371/journal.pone.0141739. eCollection 2015.
 7. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-
Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. *PLoS One.* 2015 Sep 30;10(9):e0139381. doi: 10.1371/journal.pone.0139381. eCollection 2015.
 8. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
 9. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology.* 2016 In press.
 10. Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* 2015 Sep 4;5:13806. doi: 10.1038/srep13806.
 11. Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N,

- Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol*. 2015 Aug 14. doi: 10.1111/1348-0421.12317. [Epub ahead of print]
12. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res*. 2015 Aug 7;210:205-212. doi:10.1016/j.virusres.2015.08.001. [Epub ahead of print]
 13. Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci*. 2015 Sep 11. [Epub ahead of print]
 14. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan HY, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Eurosurveillance* July 2, 1-6, 2015.
 15. Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS. Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012-December 2013. *J Med Virol*. 2015 May 6. doi: 10.1002/jmv.24208. [Epub ahead of print]
 16. Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One*. 2015 May 4;10(5):e0124965. doi: 10.1371/journal.pone.0124965. eCollection 2015.
 17. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):32-53. doi: 10.1128/CMR.00011-14. PMID: 25567221.
 18. Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus

- Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01553-14. doi: 10.1128/genomeA.01553-14.
19. Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Yamakawa M, Shirai J. Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP. *Genome Announc.* 2015 Feb 12;3(1). pii: e01573-14. doi: 10.1128/genomeA.01573-14.
 20. Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, Kondo T, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009–2010. *Arch Virol.* 2015 Feb 25. [Epub ahead of print]
 21. Nagai M, Shimada S, Fujii Y, Moriyama H, Oba M, Katayama Y, Tsuchiaka S, Okazaki S, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 2015 Feb 9. pii: S0378-1135(15)00055-3. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.002. [Epub ahead of print]
 22. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2014年に分離された腸管出血性大腸菌 0157、026 および 0111 株の MLVA 解析について。IASR、第 36 巻、83–84、2015 年 5 月
 23. 四宮博人、勢戸和子、川瀬遵、有川健太郎、船渡川圭次、鈴木匡弘、久保田寛顕、調恒明：地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情。日本細菌学雑誌 2015、70:309–318
 24. 市川健介、小西典子、甲斐明美他：生サラダが原因と推定されたチフス菌による食中毒事例—東京都、病原微生物検出情報（国立感染症研究所）、36、162–163、2015.
 25. 片山和彦 木村博一 ノーウォークウイルス(ノロウイルス)の遺伝子型 2015 年改訂版 IASR ノロウイルス特集号 Sep 8, 2015.
 26. 松島勇紀 石川真理子 清水智美 駒根綾子 清水英明 松尾千秋 三崎貴子 岡部信彦 篠原美千代 峯岸俊貴 小川泰卓 粕尾しず子 中沢春幸 水越文徳 鈴木尚子 船渡川圭次 梁 明秀 木村博一 長澤耕男 芳賀慧 Doan Hai Yen 片山和彦 新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17 の流行 IASR Vol. 36, No.9 (No. 427) Sep 2015.
 27. 片山和彦 *Medical Practice ノロウイルス* vol.33, no.1 p41–46, 2016
 28. 片山和彦 *メディカル朝日 ノロウイルス* Jan p24–25, 2016
 29. 片山和彦 *キューピーニュース ノロウイルス予防と対策* 499 号 9 月 2015
 30. 片山和彦 *月刊 HACCP ノロウイルス*

予防と対策 12月 vol.21 p20-27,
2015

31. 片山和彦 BIO Clinica 新興・再興感染症-感染予防ワクチン ノロウイルス最新の研究動向
32. 三木元博、片山和彦 臨床とウイルス ディープシーケンス方を用いたノロウイルスの分子疫学、進化の研究 vol. 43, 3 p92-99, 2015
33. 片山和彦 最新医学 ノロウイルスのウイルス学的基礎研究・最近のトピックス vol. 70., 11月号増刊号 p88-96, 2015
34. 片山和彦 ウイルス性胃腸炎 SRL 社宝函 vol. 35, No. 4, p23-34, 2015.

2) 学会発表

1. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真:腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について(血清群 0157、026、0111を中心に)。第36回日本食品微生物学会学術総会、2015年11月、神奈川県川崎市。
2. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真 ;最近のEHECの発生動向について 衛生微生物技術協議会第36回研究会、2015年7月、宮城県仙台市。
3. 関口真紀、笠原ひとみ、粕尾しず子、中沢春幸:知的障害者施設においてインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌による重複感染が認められた集団事例、第28回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016年2月、静岡県静岡市。
4. 松下明子、倉園貴至、砂押克彦、青木敦子:2015年に発生した腸管出血性大腸

菌026について、第28回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016年2月、静岡県静岡市。

5. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら:志賀毒素産生性大腸菌 PCR-based ORF Typing (STEC-POT) 法の開発 第19回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会平成27年7月、東京都
6. 勢戸和子、河原隆二、原田哲也、田口真澄: EHEC 0157 流行株探知のための近畿 IS データベース活用状況 第19回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2015年7月、東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし