

平成 29 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 29 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：

食品由来感染症における原因物質である細菌やウイルスが保有する病原体情報、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、流行株を把握し、感染源を究明し、感染拡大を阻止する上で重要である。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 (ISPS) 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。現在地方衛生研究所 (地衛研) において最も活用されている方法は ISPS であった。精度管理の実施から判定に影響するエキストラバンドの存在が明らかとなった。判定補助のため、エキストラバンド泳動像に係る情報をハンドブックとしてとりまとめた。MLVA については、3 年前に比べて実施する地衛研が多少増加傾向にあった。上記 3 手法からの病原体情報は、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 掲示板など活用した。

ウイルスでは、CaliciWeb 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、安定稼働を推し進めた。これまでに約 10 万件超のデータを収集、DDBJ 等データバンクからのサブデータバンクを構築した。NoroNet へのリンクを通じて Norovirus typing tool の活用を可能とした。ロタウイルス RNA-PAGE による新規解析法、自動判定ソフトウェアを開発した。同システムをウェブ上で稼働させる MultiNAWeb を構築した。

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)

平井昭彦 (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 (大阪健康安全基盤研究所)

河合央博 (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) 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 (北里大学)

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 (ISPS) の精度管理を継続した。b) 平成 21 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 ISPS オンラインデータベースに関しては、平成 23 年度

より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、サーバーの改修、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。平成 29 年度はさらに 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群を追加した。f) PFGE、ISPS、MLVA 法で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 ;

研究協力者の所有するロタウイルス陽性便検体を用いて MultiNA とバンドパターンによる流行株分類法を検証した。検体は、A 地域より 22 検体、B 地域より 9 検体、C 地域より 20 検体の合計 51 検体を用いて β テストランを行った。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の画像を昨年度構築したソフトウェアに転送し、型判別を行った。

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。世界 3 大遺伝子データベース (NCBI、EMBL、DDBJ) 上に登録された下痢症ウイルスの塩基配列に関するサブデータバンクをサーバー内部に構築し、システムの改善を図る。新規に開発されるロタウイルス遺伝子型分類ソフトウェアを搭載する。

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。2017 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 1581 株、026 686 株、0111 122 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、581、243、49 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 201 (35%)、026 で 92 (38%)、0111 で 16 (33%) であった。本年は上記 3 血清群のほか 0103、0121、0145、0165、091 の 5 血清群 303 株を解析し 132 のタイプが同定された。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 714 株であった。当該コンプレックスは 0157 11 種類、026 2 種類、0121 2 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 7 種類、0103、0121、0145 で各 1 種類であった。PFGE は 313 株を解析し、0146、0115 などにおいて一部集団事例を含むクラスターが観察された。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。広域株には集団事例に関連するものも含まれたが、一方で疫学的な関連性が不明の株もあり、今後も引き続き病原体情報の迅速な提供、共有について検討の必要があると考えられた。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックでは、分子疫学的解析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、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いた IS-Printing System (TOYOBO) について、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設の精度管理を実施した。平成 29 年度は関東を中心とする EHEC 0157 VT2 タイプによる事例が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システム構築のための基礎的検討として、平成 29 年度に各県で分離された EHEC 0157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System の結果を集積し、発生パターンを調査した。また、秋田県内で発生した EHEC 0157 事例について、ISPS による解析結果の情報共有により、行政関係機関との連携体制が構築できた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 共通菌株を用いて PFGE 法、ISPS の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。いずれの施設も良好な成績ではあったが、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、ISPS ではエキストラバンドの報告が無いものがあつた。今年度から希望参加の形で MLVA 法の精度管理も実施し、8 施設の参加があつた。結果はいずれも良好な成績であつた。

地方衛生研究所全国協議会で作成した腸

管出血性大腸菌 MLVA ハンドブックについて、執筆協力を行った。また、当該協議会で実施した MLVA 法技術研修会へ、講師あるいは研修生として参加し、MLVA 法の普及を目指した。

アンケート調査を実施した結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

【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）：横浜市、千葉県、埼玉県】

4. 東海・北陸ブロック

東海・北陸地方 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. ISPS 精度管理、2. 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) ISPS 精度管理

最も多く認められた誤りは検体①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエキストラバンドを 5 施設で 1-3 (+) と解釈していた。今回の検体は DNA 量が通常の倍量であったため、全体にバンドが太くスメアーとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった施設があった。また、*hlyA* のバンドが確認できなかった施設があった。これは試薬のロットによる増幅効率の違いが強く示唆された。今後、ブロック内の研修会等でフィードバックを行いたい。

2) 地域共有データベース

4 月から運用開始され、腸管出血性大腸菌シーズンをカバーすることができた。平成

29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

5. 近畿ブロック

腸管出血性大腸菌 0157 の遺伝子型別法である ISPS および PFGE 法について精度管理を実施するとともに、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る事例の解析を行った。ISPS の精度管理では全 12 施設が正確な判定を行ったが、1 施設は 5 株中 3 株でエキストラバンドを検出した。結果には影響しなかったものの、誤判定につながる可能性が考えられた。PFGE 法の精度管理については 1 施設を除き概ね良好な結果であった。画像によっては解析困難な部分があり、分離されたバンドの位置が不明瞭な点を解消することが課題である。近畿 IS データベースへの登録は 2 年続けて減少したが、5 月には感染研 IS パターン番号 AA831 が、8 月には AA756 が集中して分離された。ブロック内の情報交換により、それぞれ全株または多くの株で MLVA complex の一致が確認され、いずれも同一の感染源が疑われた。一方で、AA023、AA063 および AA031 は分離時期が長期にわたっており、複数の MLVA 型が含まれることが判明した。

6. 中国四国ブロック

食品由来感染症の広域発生事例が発生した場合、各地域の事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解

析結果等を共有し、比較・解析を行うことが有用となる。その際、各地域の施設が実施した分子疫学解析結果を用いて解析等を行うため、各施設における分子疫学解析手法の技術維持や解析精度の向上が不可欠かつ重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 菌株を用いた ISPS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。その結果、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では検査法の改良や判定方法を含めた技術の習熟が必要と思われた。

平成 29 年度に中四国地域で発生した EHEC による感染事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し解析した結果、同一の分子疫学解析結果である感染事例が複数の県で確認されたが、いずれの事例間でも関連は不明であった。

分子疫学解析結果を用いた広域な菌株データベースの構築は、広域事例発生の迅速な探知、さらには感染源の究明、感染拡大防止対策の構築等、事例への対応に有益なものとなると考えられる。データベースをさらに有意義に活用するためには、分子疫学解析技術の維持や精度の向上はもちろんであるが、疫学情報をいかに収集し、データベースに組み込むかが今後の課題と思われる。

【追加事例報告等：島根県、広島県、広島市、山口県】

7. 九州ブロック

九州地区では、1. ISPS による IS 型別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及び 4. 精度管理 (PFGE 及び ISPS) の 4 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」という。) の IS 型別の登録数は平成 30 年 2 月 14 日現在で 1731 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件、平成 28 年度 199 件及び平成 29 年度 128 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移していたが、平成 29 年度は 0157EHEC の検出数が少なかったため減少した。九州地区で平成 29 年度に収集された EHEC は 397 株であった。その内訳は、0157EHEC が 156 株、026 EHEC が 119 株、0111 EHEC が 40 株、0103 EHEC が 32 株、0121 EHEC が 13 株、091 EHEC が 7 株、0115 EHEC が 7 株、その他の血清型が 11 株及び血清型別不能が 12 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率 60.7% 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 29 年度の 0157EHEC 及び非 0157EHEC による集団発生事例は 13 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 4 事例で、026EHEC によるものが 6 事例であった。精度管理では昨年度に引き続き PFGE 及び ISPS について実施した。PFGE の精度管理において、泳動は概ね良好に行われており、対象菌株の関連性は参加した 11 地研全てにおいて一致した。ISPS の精度管理では、エキストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。また、PFGE 及び ISPS の両方において、菌株を輸送中又は保存中に変異したと考えられる事案が発生した。今後、精度管理に使用する菌株をより慎重に選定する必要があると考えられた。

8. ブロックアンケート結果

EHEC の分子疫学解析手法 PFGE、ISPS 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 83%で、このうち（ほぼ）全株試験している地衛研は 15%であった。同様に、ISPS 実施率は 83%（うち全株試験は 61%）、MLVA 実施率は 20%（うち全株試験は 38%）であった。回答総数が 68 から 81 となり、各手法において若干の増減が見られた。MLVA 法は実施率でも実施機関数でも若干の増加が見られた（それぞれ 15→20%、10→16 機関）。

9. ISPS エキストラバンド集

EHEC 0157 の ISPS においてはエキストラバンドが判定に影響を与えることがある。各ブロックでの精度管理試験においてもエキストラバンドによって異なる判定結果を得ることが明らかとなった。各ブロック研究分担者および研究協力者からエキストラバンドに係る泳動像を収集し、「腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集」を作成した。本ハンドブックは 113 の泳動像を含む。

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。我々の保有する検体を用いて、RNA-PAGE のバンドパターンとそれらの遺伝子型との関連性について検討を行ったところ、VP2、VP3、

VP6、VP7、NSP1、NSP2、NSP3、NSP5 の各遺伝子分節において遺伝子型とバンドパターンに明確な関連性が認められた。本研究では、島津社製マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA の RNA-PAGE によるパターン分類プログラムを開発して、RV 流行株を広範かつ簡便に調査するシステムを構築する。本年度は、昨年度に完成を見たマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA によるロタウイルス遺伝子型判定プログラムの β テストを実施した。

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&配列検索システムを新サーバーシステムに移行した。これにより、NoroNet norovirus genotyping system へのリンク追加後の、データ量の急増と操作速度向上を実現した。さらにロタウイルスでは、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ソフトの搭載を実現し、本システムの β テストを開始した。

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。

本研究班においては closed network 上に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た。今後もこれらの情報共有システムを継続的に運用し、システムの向上につなげることが重要である。

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。報告には焼肉店や飲食店による事例等も含まれた。また 8 月に O157 VT2 株 (17c013) の流行が見られ、ポテトサラダに関連した集団事例もこれに含まれた。事例対応については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の整備があつて初めて可能となるため、継続的な運用が必要である。

解析手法のアンケートから、現在 EHEC O157 の解析において ISPS 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、問題点も指摘された。ISPS について泳動像の判定精度を向上・維持するため、エキストラバンド集を作成した。今後本ハンドブックが活用されエキストラバンドに関する理解と結果判定の安定化につながることが期待される。

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。

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 ISPS と同様、結果がデジタル形式なので情報共有がしやすい。平成 29 年 11 月の食品衛生分科会では EHEC 解析手法として MLVA が取り上げられた。本研究のアンケートでも MLVA の実施率には上昇が見られた。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った。地域別、型別の検出状況の整理を行ったが、情報提供の仕方については今後も検討の余地があると考ええる。

ロタウイルス RNA-PAGE は迅速かつ簡便な新規解析システムである。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。MultiNA を用いることで泳動パターンの安定化およびラボ間アッセイを可能にした。泳動パターンの解析ソフトウェアを開発し、基準泳動パターンをデータベースに登録することで実用レベルの正答率を実現した。

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 の構築を進めた。世界 3 大データベースから下痢症ウイルスに関する塩基配列データを

自動取得し、サブデータベースを構築するシステムを開発した。2017年12月現在10万以上のデータを収集した。NoroNetとのリンクを通じて収集した遺伝子配列の解析も可能とした。

上記ロタウイルスRNA-PAGE法による解析システムをウェブ上に構築しMiltiNA Webとしてβテストを行った。本システムの稼働により、ロタウイルスワクチン導入による流行型の変化等の調査に資することが期待される。

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、ISPS、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することは、病原体情報の事例対応へ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、データベースの環境整備、操作性の向上、データキャパシティの大幅な上昇を達成した。NoroNetとのリンクにより、Norovirus typing toolの利用が可能となった。

ロタウイルス解析システムを実装し、

MultiNA Webとしてβテストを開始した。当該ロタウイルス株分別法は、異なる施設間における結果も安定している。異なる地域で流行しているロタウイルスが同じか異なるかを、泳動パターンをサーバーに送るだけである程度判別可能となった。ハードルの高かったロタウイルスの全ゲノムセグメントを対象とした分子疫学の底上げにつながる。また、今まで検出不可能であった食中毒事件の原因に成り得るC群ロタウイルスの検出と鑑別にも対応可能な本システムの有用性は高い。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1. Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Taku Wakui, Taichiro Ishige, Masaki Nakamura : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades. PLOS ONE. 2018. 13(1): e0191834.
2. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T: Population structure of *Escherichia coli* 026 : H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple

- lineages. *Microbial Genomics* 2017, 3.
3. 泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、伊豫田淳、大西真：2016年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA法による解析。IASR、第38巻、100-101、2017年5月
 4. 石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真：腸管出血性大腸菌 non-0157/026/0111広域感染事例の分子疫学解析、2016年。IASR、第38巻、101-102、2017年5月
 5. 李謙一、石原朋子、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真：全ゲノム配列解析を用いた腸管出血性大腸菌の分子疫学解析。化学療法の領域、第33巻第7号、1467-1471、2017年7月
 6. 上野詩歩子、黒岩祥子、若松倫子、熊本サチ子、永岡貴美子、長岡章次、寺松孝二、畔野征子、梅崎みどり、吉田まり子、松尾美智代、濱崎光宏、中山志幸、世良暢之；保育所で発生した腸管出血性大腸菌026：H11による集団感染事例-福岡県。病原微生物検出情報 2017, 38: 148-149.
 7. 吉田弘、高橋雅輝、濱崎光宏、山下育孝、四宮博人、山下照夫、皆川洋子、岸本剛、調恒明；エンテロウイルス検査の信頼性確保について。病原微生物検出情報 2017, 38: 199-200.
 8. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Suzuki Y, Ryo A, Fujita K, Onishi K, Katayama K, Kimura H. Genetic Analysis of Human Norovirus Strains in Japan in 2016-2017. *Front. Microbiol.*, 18 January 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.00001. eCollection 2018.
 9. Motoya T, Nagasawa K, Matsushima Y, Nagata N, Ryo A, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Morita Y, Suzuki Y, Sasaki N, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII. 4 Variants in 1974-2015. *Front Microbiol.* 2017 Dec 5;8:2399.
 10. Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N, Shirabe K, Shinomiya H, Suzuki W, Kuroda M, Sekizuka T, Ryo A, Fujita K, Oishi K, Katayama K, Kimura H. Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 2018 Jan;24(1):144-148.
 11. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* 2017 Nov;55:209-217.

12. Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, Katayama K, Shoji I. Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol.* 2017 Nov;55:1-7.
 13. Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, Katayama K. Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* 2017 Oct;54:417-428.
 14. Kitamoto T, Takai-Todaka R, Kato A, Kanamori K, Takagi H, Yoshida K, Katayama K, Nakanishi A. Viral population changes during murine norovirus propagation in RAW 264.7 cells *Front Microbiol.* 2017 Jun 15;8:1091.
 15. Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, Katayama K, Yoto Y, Tsutsumi H. Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jun;23(6):968-972.
 16. Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol.* 2017 Apr 25;8:705.
- 2) 学会発表等**
1. Hiroaki Shigemura, Koichi Murakami, Tamie Noda, Mari Matsui, Satowa, Suzuki, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Nobuyuki Sera; Decrease in extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* from chicken meats in Japan. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2017)、15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore)
 2. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2016年における腸管出血性大腸菌 0157・026・0111 の分子疫学解析。第38回日本食品微生物学会学術総会、2017年10月、徳島県徳島市。
 3. 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の MLVA 解析について。平成29年度 地域保健総合推進事業 腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研修会、2017年10月、東京都。
 4. 平井晋一郎、横山栄二、涌井拓、石毛太一郎、中村正樹、蜂巢友嗣、遠藤幸男、村上覚史：腸管出血性大腸菌 0157 の subclade 8b における高病原性菌株について。第38回 日本食品微生物学会学術総会 (2017)
 5. 小西典子、畠山薫、原田幸子、神門幸

- 大, 尾畑浩魅, 赤瀬悟, 森功次, 門間千枝, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: 遡り調査で明らかとなった VT2f 産生 *Escherichia albertii* による集団事例と散発事例からの検出状況, 第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2017, 鹿児島県
6. 勢戸和子, 原田哲也, 若林友騎, 伊豫田淳: EHEC 0165 選択分離培地の検討. 第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2017 年 11 月, 鹿児島)
 7. 濱崎光宏, 市原祥子, 中山志幸, 世良暢之, 吉田弘; 環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業における患者報告数との関連について. 第 76 回日本公衆衛生学会総会 (2018 年 10 月, 鹿児島県)
 8. 吉田弘, 滝澤剛則, 小澤広規, 高橋雅輝, 筒井理華, 中田恵子, 濱崎光宏, 世良暢之, 堀田千恵美; 環境サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題. 第 76 回日本公衆衛生学会総会 (2018 年 10 月, 鹿児島県)
 9. 江藤良樹, 重村洋明, 世良暢之; 原因不明食中毒疑い事例の患者糞便からの多殻目粘液胞子虫遺伝子の検出状況について. 第 38 回日本食品微生物学会学術総会 (2017 年 10 月, 徳島県)
 10. カール由起, 重村洋明, 中山志幸, 村上光一, 世良暢之; 肉用鶏、鶏肉及びヒトから分離した *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性状況について 第 10 回日本カンピロバクター研究会総会 (2017 年 11 月, 宮崎県)
 11. 濱崎光宏, 中山志幸, 世良暢之, 上野詩歩子, 梅崎みどり; 保育所で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11 による集団感染事例-福岡県. 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)
 12. 藤良樹, 濱崎光宏, 世良暢之; 福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する志賀毒素遺伝子の亜型について. 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)
 13. カール由起, 重村洋明, 中山志幸, 大石明, 村上光一, 世良暢之; 福岡県における鶏肉及びヒトから分離した *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性状況について 第 91 回日本細菌学会総会 (2018 年 3 月, 福岡県)

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

腸管出血性大腸菌 0157 IS-printing system エキストラバンド集 (2018 年 3 月作成)

【本体ファイルについてはお問い合わせください】

腸管出血性大腸菌 O157 IS-printing system エキストラバンド集

厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
(平成 27-29 年度)

「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」班作成

はじめに

本資料は腸管出血性大腸菌 O157 菌株を IS-printing system で解析するにあたり、その判定に影響を与える可能性があるエキストラバンドにかかる泳動像をまとめたものです。

IS-printing system は、O157 ゲノム上にある IS 629 の分布を 2 種類のマルチプレックス PCR を用いて調べる試験です。上記 2 種類のプライマーセット (Set1 と Set2) を用い、下表に示す各セット 18 本のバンドが出るか (1) 出ないか (0) を判定します。

予想される大きさのバンド以外のものをエキストラバンドと称し、これらを真のバンドと誤って判定しないことは本試験にとって重要です。また、エキストラバンドによっては特定の株に特徴的なものもあり、泳動パターンから菌株の類似性を見るための指標となることもあります。

Set 1-	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
判定*	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
Set 2-	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

(*判定欄は一例です。)

さまざまな泳動条件におけるエキストラバンドの泳動像を集めましたので、各機関での試験の際の参考にしていただければ幸いです。

本資料は、厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「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」の一環として作成されました。泳動像の収集及び提供にご協力いただきました地方衛生研究所の諸先生方に深謝いたします。

平成 30 年 3 月 研究代表者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所)
細菌グループ研究分担者 熊谷優子 (秋田県健康環境センター)
平井昭彦・甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)
松本昌門・鈴木匡弘 (愛知県衛生研究所)
勢戸和子 (大阪健康安全基盤研究所)
河合央博・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)

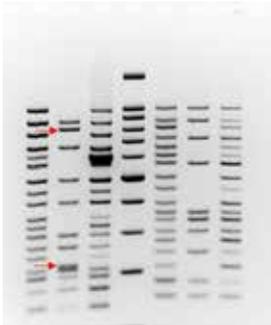
本資料の見方

エキストラバンドの出現位置に従って泳動像を並べてあります。

各ページの左上に出現位置

左に泳動像（矢印等でエキストラバンドを示してあります）

右には【方法】使用した機器、泳動条件、【結果】エキストラバンドの位置、感染研データベースによる IS パターンの型名（AA 番号）、判定結果（1/0 表記、エキストラバンドの示されたレーンの株。対となるセットの泳動像は示されておられません。）【備考】を示してあります。

タイトル（エキストラバンドの出現位置）	
（泳動像） 	方法 使用機器 泳動条件 結果 エキストラバンドの位置 IS パターンの型名 判定結果表 備考