

国内流行が危惧される感染症の検査および分子疫学解析に関する研究

新開 敬行^a, 長谷川 道弥^a, 井口 智義^b, 畠山 薫^{dg}, 河村 真保^d, 千葉 隆司^{ce}, 岡崎 輝江^e, 齊木 大^{de},
鈴木 愛^a, 村田 理恵^{ce}, 吉田 勲^a, 長島 真美^a, 大久保 智子^b, 田部井 由紀子^b, 武藤 千恵子^f,
山本 和興^b, 小杉 有希^b, 高橋 久美子^b, 五十嵐 剛^b, 石上 武^f, 辻 麻美^f, 渡邊 喜美代^b,
播田實 千恵子^b, 高橋 佳代子^j, 小林 巧^j, 大川 将司^j, 神門 幸大^e, 日向 綾子^g, 岩本 百合子^k,
鈴木 良^k, 山梨 敬子^d, 小西 典子^d, 森 功次^{ah}, 門間 千枝^d, 尾畑 浩魅^d, 赤瀬 悟^d, 原田 幸子^d,
奥野 ルミ^e, 内谷 友美^e, 久保田 寛顕^e, 加藤 玲^d, 上原 さとみ^d, 鈴木 康規^d, 小林 真紀子^d,
高橋 由美^d, 石塚 理恵^d, 井田 美樹^d, 下島 優香子^d, 栗田 さや子^e, 小西 浩之^b, 秋場 哲哉^j,
横山 敬子^e, 平井 昭彦^d, 守安 貴子^l, 貞升 健志^m

東京都健康安全研究センターの重点研究の一つとして2015年度から2017年度の3箇年で実施した、「国内流行が危惧される感染症の検査および分子疫学解析に関する研究」の概要を報告する。本研究では、国内発生事例の病原体を含めた特徴の解析、モニタリング調査（デングウイルス、蚊、狂犬病ウイルス）の実施と、そのための効率的な検査手法の開発・検討、次世代シーケンス（NGS）解析を用いた大規模遺伝子データの解析を中心に検討を行った。

主な成果として、蚊媒介性疾患の患者検体からデングウイルスを中心としたウイルスを検出する手法の開発と解析法を確立した。衛生昆虫の調査では、遺伝子配列を解析する手法と種特異プライマーによるPCR法を用い、同定法を確立した。狂犬病ウイルスRNAの安定化剤入りチューブによる輸送法と新たに構築したリアルタイムPCR試薬の有用性を確認した。三類感染症起因菌である赤痢菌は高頻度に薬剤耐性を持っており、赤痢菌の反復配列多型解析法（MLVA）による解析はパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）より詳細に分類された。NGSを用いた病原性細菌の網羅的探索法により新たな食中毒起因菌種を同定し、食中毒事例では臨床検体から検出した原因ノロウイルスのほぼ全長の塩基配列を明らかにした。

キーワード：デングウイルス、衛生昆虫、狂犬病ウイルス、三類感染症起因菌、次世代シーケンサー、リアルタイムPCR、蚊の調査、モニタリング、MLVA、網羅的解析

はじめに

東京健康安全研究センター（以降、当センター）の重点研究として、2015年度から2017年度までの3箇年で「国内流行が危惧される感染症の検査および分子疫学解析に関する研究」を実施した。本研究では、国内発生事例の病原体を含めた特徴の解析、モニタリング調査（デングウイルス、蚊、狂犬病ウイルス）の実施とそのための効率的な検査手法の開発・検討、新たな手法（次世代シーケンサー等）を用いた大規模な遺伝子データの解析を中心に検討を行った。

本研究は5つの個別研究課題で構成され、それぞれの個別研究担当者は以下のとおりである。

1. 国内流行が危惧されるデングウイルス等の性状および検査法に関する研究（長谷川道弥）
2. 衛生昆虫の分子生物学的手法を用いた同定の検討及び生息調査（井口智義）
3. 狂犬病検査法の検討ならびに遺伝子解析に関する研究（畠山 薫）
4. 三類感染症起因菌を中心とした検査法および菌株情報

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
^c 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
^d 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
^e（当時）東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
^f（当時）東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
^g（当時）東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
^h（当時）東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
ⁱ 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
^j 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課
^k 東京都健康安全研究センター福祉保健局健康安全部環境保健衛生課
163-8001 東京都新宿区西新宿2-8-1
^l 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
^m 東京都健康安全研究センター微生物部

の解析に関する研究（河村真保）

5. 微生物検査における大規模遺伝子データ利用に関する研究（千葉隆司）

個別課題ごとの研究内容と成果の概要

1. 国内流行が危惧されるデングウイルス等の性状および検査法に関する研究

デング熱は、フラビウイルスに属するデングウイルス(DENV)を保有する蚊（主にネッタイシマカとヒトスジシマカ）が媒介する急性熱性疾患で、熱帯・亜熱帯地域（東南アジア等）を中心として流行している。日本では、戦中・戦後の時期に国内流行が発生して以降は輸入感染事例の発生のみであった。しかし、2014年に都内代々木公園を中心とした約70年ぶりとなる国内流行があり、大きな社会問題となった。当センターでは、この国内発生例について患者血清や蚊を対象としたDENVの検査・解析を実施した。本研究では、DENVを中心に、他の蚊媒介感染症の検査法・解析法の評価、改良、開発を行い、発生を迅速・確実に探知し、流行状況を正確に把握することを目的として実施した。

1) 2014年に採取した蚊からのDENVの遺伝子量と解析

2014年に代々木公園で採取したヒトスジシマカ（シマカ亜属）のうち、DENVが検出された14検体について、ウイルスRNA量（コピー数）の推定と遺伝子解析を行った。供試した14検体から検出されたDENVは、国内感染事例と同じ1型（DENV-1）、同じ塩基配列であり、各検体中のDENVコピー数は、蚊1匹あたり $10^4 \sim 10^8$ コピーであると推定された。また、DENV-1の遺伝子解析では、DENVの分子系統解析に広く利用されるエンベロープ領域（env）に加え、その上流にあるPreM領域の一部についても塩基配列を既存のPCRダイレクトシーケンスにより解析した。その結果、蚊から分離された株の一部にアミノ酸変異を伴う塩基置換が認められた。これらの塩基置換は患者由来のウイルスでは認められなかった。

2) 2014年に検出したヒトおよび蚊のDENVの網羅的遺伝子解析

2014年にヒトおよびヒトスジシマカから分離したDENVについて、次世代シーケンサー（NGS）を用いた解析を行った結果、既存法により認められた蚊由来のDENVのPreM領域のアミノ酸変異は、NGS解析でも同じ変異が認められた（図1）。

また、NGSを用いたDENVゲノムの全長解析では患者由来株と代々木公園で捕集された蚊由来株が99.9～100%一致した。このことから、代々木公園で採取された蚊が2014年の国内感染例において感染拡大の一因となったことが改めて示唆された。しかしながら、蚊から分離した株と患者由来分離株において、Mix塩基が複数の部位で認められた。臨床材料からの遺伝子解析ではアミノ酸変異を伴う塩基置換は認められなかったことから、培養中に変異を起こした可能性が考えられた。

Saitama 株			患者						蚊									
領域		位置	塩基	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7		
構造蛋白	preM	484	T							C								
		870	G							T						T		
	E	1263	C											N				
		1396	T												A			
		1520	G												R			
		1722	T											N				
1987		C	Y															
	2216	T											C					
非構造蛋白	NS1	2491	A														G	
	NS2A	4090	T							C								
	NS2B	4305	A	C														
	NS3	5917	C														Y	
	NS4B	6988	G											A				
		7131	C											Y				
		7135	G												Y	Y		
		7151	G											R				
		7152	T	Y										Y	N	C	Y	
		7163	G															R
		7164	C	Y														
	NS5	7557	C	Y														
7667		A														T		
8287		T																
8380		T	A															
9289		A	Y															
10187		C	T															
	変異数			1	1	2	5	2	1	3	2	2	4	0	6	3		

図1. 患者と蚊の検体から分離したデングウイルス全領域のアミノ酸変異箇所

3) 蚊のDENV検査法検討と実態調査

多数の蚊検体のDENV検査に必要な遺伝子抽出法について、チクングニアウイルス（CHIKV）の検出法を参考に、RNA抽出法を検討した。フィルター式の核酸抽出キット（QIAamp Viral RNA Mini-kit：QIAGEN）を用いる方法について検討した結果、効率的に抽出ができ、さらに多検体を短時間で処理することが可能となった。この検討結果を2015年度から拡充された都内の感染症媒介蚊サーベイランスに活用し、従来から行ってきた広域サーベイランスに加え、重点サーベイランスとして都内9か所の定点で1,367検体の成虫・幼虫のウイルス検査を行った。2016年度はCHIKV検査を加えて984検体を検査し、2017年度はさらにジカウイルス（ZIKV）検査を加えて813検体の検査を行った。その結果、全ての検体でウイルス遺伝子は検出されなかった。

4) 検体からのDENVの分離

DENV-1陽性シマカ亜属からのDENVの分離には、ヒトスジシマカ由来の株化細胞（C6/36）の使用が推奨されてきたが、実際にはヒト検体においてウイルス分離率が低下することが判明し、蚊を対象にした場合ではDENVが分離できなかった。そこで、数種の株化細胞を用いて検討を行った結果、ヒトおよび蚊からのDENV分離においてはアフリカミドリザル由来の株化細胞（VeroE6）を用いることでウイルス分離が可能となった（図2）。これにより患者検体から2015年は33株、2016年は29株、2017年は4月から12月末までに14株のDENVを分離した。

5) 2015年から2017年に検出した患者由来DENVの遺伝子検査とデータベース化

2015年4月から2016年1月までに当センターに搬入された92件の患者検体（疑い例を含む）についてDENV検査（リアルタイムPCR及びNS1抗原検査）を行った結果、海外感染疑いの52件がDENV陽性と判定された。また、臨床診断によるデング熱確定例34件のうち、リアルタイムPCR検査

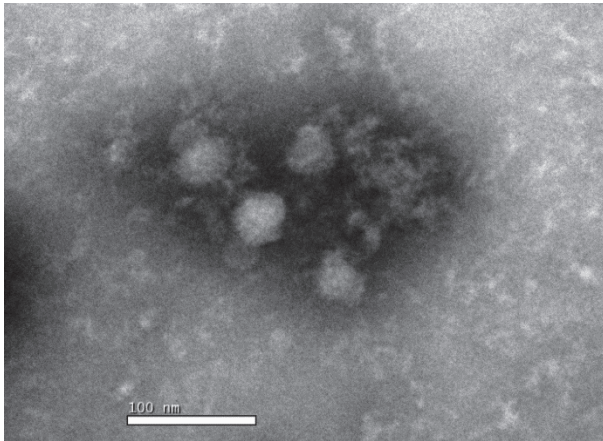


図2. 患者検体から分離したDENVの電子顕微鏡像

で陰性となった検体が8件あり、それらの検体について発病から検体採取までの期間を比較した結果、推定発症日から6～17日後に採取された検体であった。この結果から、リアルタイムPCR検査に用いるデング熱診断例の検査には、発症から1週間以内に検体採取することが有用と考えられた。

これらの検討と並行して、遺伝子検査によって血清型が判明した検体についてenv領域の全長解析（約1.5kb）を行い、データベース化した。2015年度（4月から翌年1月）は41検体（1型18件、2型13件、3型4件、4型6件）、2016年度（4月から12月末）は36検体（1型9件、2型12件、3型10件、4型5件）について解析したが、2014年国内流行株

（D1/Hu/Saitama/NIID100/2014）と100%一致する株は認められなかった（図3）。さらに、これら解析を行った検体のうち、国内流行株と同系のDENV-1型について詳細な解析を行った。その結果、同型ウイルスは大きく2つの系統に分かれ、それぞれ推定感染地域との間に関連性が見られた。

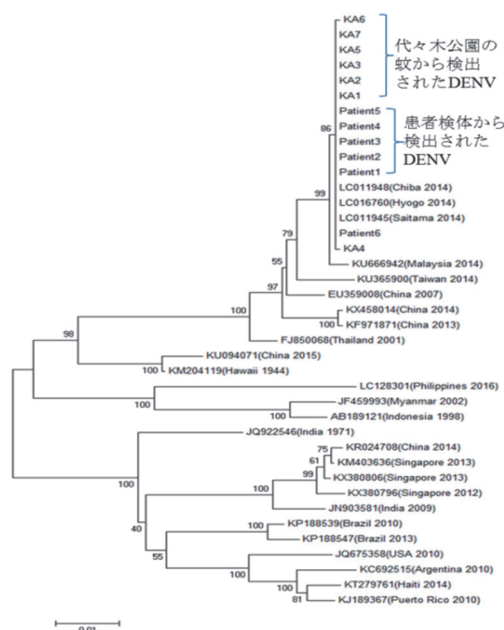


図3. 1型のDENVエンベロープ領域における分子系統樹

6) デング熱の類症疾患鑑別のための検査法の検討

2015年5月からDENVの類似感染症であるCHIKV、2016年1月からZIKVについて、DENVと並行して遺伝子検査を実施した。この結果、2016年3月にCHIKVを1件、2016年9月以降ZIKVを3件検出した（いずれも海外感染例）。

また、これら4事例についてDENVの分離で検討した方法を参考にウイルス分離を試みた。その結果、CHIKV（図4）、ZIKV共にアフリカミドリザル由来の株化細胞（Vero9013）を用いることでウイルス分離が可能であった。

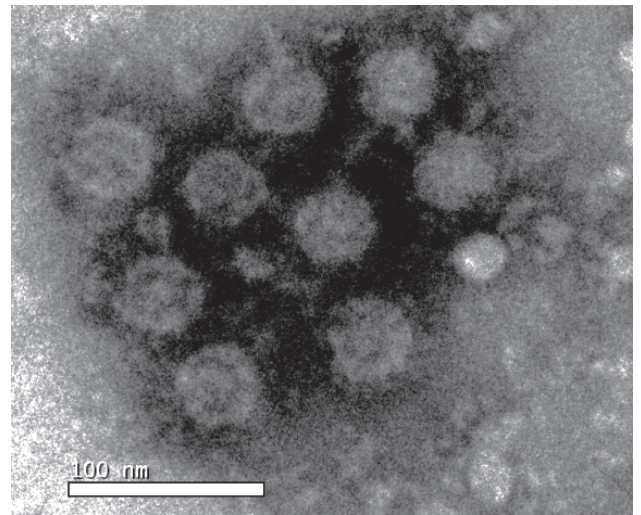


図4. 患者材料から分離したCHIKVの電子顕微鏡像

発表実績

- 1) 吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 他: 2014年に都内の公園で感染拡大の原因となったデング熱について, 小児科, 57, 395-400, 2016.
- 2) デングウイルス検査チーム, 健康安全研究センターにおけるデング熱検査第11回東京都福祉保健医療学会誌, 43-45, 2016.
- 3) 齊木 大, 日向 綾子, 千葉 隆司, 他: 東京健安研セ年報, 68, 901-905, 2017.
- 4) 吉田 勲, 長島真美, 新開敬行, 他: 2014年に東京都内の公園で採取されたヒトスジシマカからのデングウイルスの検出, 第56回日本臨床ウイルス学会 (岡山), 2015.
- 5) 吉田 勲, 長島真美, 原田幸子, 他: 2014年都内公園で採取されたヒトスジシマカからのデングウイルスの検出と解析, 第30回関東甲信静支部ウイルス研究部会 (さいたま市), 2015.
- 6) 齊木 大, 日向綾子, 千葉隆司, 他: 国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析, 第64会 日本ウイルス学会学術集会 (札幌), 2016.
- 7) 千葉隆司, 秋場哲哉, 貞升健志: 東京都内におけるデング熱患者のウイルス検査と解析(2015年度), 第75回日本公衆衛生学会総会 (大阪), 2016.

2. 衛生昆虫の分子生物学的手法を用いた同定の検討及び生息調査

DENVを媒介する蚊を含む衛生昆虫の同定は、従来、形態学的手法により行われている。しかし、昆虫には種類が多く、現在までに100万種が知られており、すべてを形態同定のみで行うことは困難である。また、昆虫の同定は、成虫による形態同定が中心であり、その他の发育段階（卵、幼虫、蛹）は同定出来るものが限られている。また、雌雄、採集地域及び採集季節による形態の変異なども知られている。捕集の方法や気象条件により、体の一部位のみしかない場合や破損が著しい場合も多いため、形態同定のみでは正確な同定が困難になっている。このような状況から、衛生昆虫の同定をより正確に行うために、補助的検査として分子生物学的手法を用いた同定の導入を検討した。

1) 衛生昆虫の捕集と遺伝子解析の検討

形態同定に必要な斑紋が剥離したり、脚等の体の一部が欠損している蚊に対して、蚊のミトコンドリアCOIの塩基配列を解析して種の同定が行えるように、Tairaら

(2012)¹⁾と前川ら (2016)²⁾の方法を参考にDNA抽出、PCR法及びシーケンス条件について検討を行った。他研究機関で飼育されている既知の蚊と都内に生息する19種類の蚊に適用し、正しく同定できるかを確認したところ、遺伝子解析結果と形態同定結果は一致した。

また、Higaら (2010)³⁾が用いた、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ及び外来種のネッタシマカの種特異プライマーについても、DNA抽出、PCR法の条件検討を行い、既知の3種の蚊で試行したところ、形態同定結果と一致し有用性が確認できた。

蚊の同定の補助的検査として、ミトコンドリアCOIの解析法とシマカ亜属の種特異プライマーを用いた同定手法の条件を確立した。この結果、蚊を形態同定する際に必要な斑紋が剥離したとしても形態同定と遺伝子同定を併用することにより、今まで同定できなかった個体の同定が行えるようになり、各蚊に有効な殺虫剤の選定やネッタシマカの同定も正確に実施でき、早期に侵入確認ができるようになった。

2) 都内に生息する衛生昆虫の分布と消長

(1) 都内に生息する蚊の分布状況 都府施設27箇所ドライアイスを用いたライトトラップを用いて、19種類の蚊を捕集した。27箇所の内、ヒトスジシマカ、アカイエカ群及びコガタアカイエカはすべての箇所で捕集された。その他の蚊はカラツイエカ、ハマダラナガスネカ、オオクロヤブカ、キンバラナガハシカ、ヤマトヤブカ、シロカタヤブカ、コガタクロウスカ、ヤマダシマカとフタクロホシチビカ、トラフカクイカとハマダライエカ、シナハマダラカ群、クシヒゲカ亜属、ヤマトハマダラカ、エセシナハマダラカ、キンイロヤブカが捕集された。調査を実施した施設においては、発生する種類、時期、初見日、捕集最終日などのデータが取れたことから、各蚊の発生時期の推測が可能となり感染症発生時あるいは平常時における蚊の防除に

についての検討が可能となった。

(2) 都立公園の雨水ますにおけるピリプロキシフェン検出状況と幼虫、蛹の羽化について 幼虫駆除用のピリプロキシフェンを散布している9施設の雨水ます50箇所に使用されている濃度を測定した。その結果、ほとんどの雨水ますでピリプロキシフェンが検出されないか、検出されても有効成分濃度を満たしていなかった。調査箇所から捕集した蛹の飼育試験を行った結果、成虫に羽化する個体が見られ、ピリプロキシフェンの散布方法および薬剤濃度と抵抗性への検討が必要となった。

そこで、施設の雨水ますにおいて、水と泥の同殺虫剤の濃度を測定したところ、ほとんどの雨水ますで水からは検出されないか、検出されても有効成分濃度を満たしていなかったが、泥からは高濃度に同殺虫剤が検出された。この殺虫剤が高濃度で検出された泥を入れた容器で幼虫を飼育したところ、羽化する個体はほとんどなく、殺虫剤の濃度保持による有用性が確認できた（表1）。

表1. ピリプロキシフェンの効力試験

シマカ幼虫 10匹	1	2	3	4	5
蒸留水	●	●	●	●	●
餌	●	●	●	●	●
ピリプロキシフェン(薬剤)			●		
ピリプロキシフェンを含む泥 (公園雨水樹内の泥) (底泥中濃度 $\mu\text{g/kg}$ 乾土 / 水中濃度 $\mu\text{g/L}$)				● (18000 / 0.13)	● (16300 / 0.28)
ピリプロキシフェンを含まない泥 (当センター雨水樹内の泥)		●			
羽化した幼虫数	9	6	0	0	0
羽化しなかった幼虫数	1	4	10	10	10

イエカ幼虫 10匹	1	2	3	4
蒸留水	●	●	●	●
餌	●	●	●	●
ピリプロキシフェン(薬剤)			●	
ピリプロキシフェンを含む泥 (公園雨水樹内の泥) (底泥中濃度 $\mu\text{g/kg}$ 乾土 / 水中濃度 $\mu\text{g/L}$)				● (14300 / 0.38)
ピリプロキシフェンを含まない泥 (当センター雨水樹内の泥)		●		
羽化した幼虫数	9	6	0	1
羽化しなかった幼虫数	1	4	10	9

(3) 生きた動物を用いない蚊の飼育方法の検討 都内各所での殺虫剤散布に伴う、蚊の殺虫剤抵抗性の獲得を確認するためには、蚊を継代飼育する必要がある。このために、従来、生きた動物が用いられてきたが、今回は人工吸血装置を用いた飼育法を検討した。今回、改良した簡便な人工吸血装置を用いることにより、アカイエカならびにヒトスジシマカの2種について継代飼育に成功した。

(4) 都内に生息するマダニの分布状況と遺伝子解析の検討 都内2箇所旗擦り法を用いて、2属6種のマダニを捕集した。マダニの幼虫と若虫の形態同定は困難なことから、Takanoら (2014)⁴⁾の方法を参考にミトコンドリア16SRNAの塩基配列を解析して、都内に生息するマダニについても種の同定が行えるように、DNA抽出、PCR法およびシーケンス条件について検討した。各捕集地点で捕集した成虫を用いた形態同定と遺伝子解析による同定は一致し、有用性を確認できた。

文 献

- 1) Tira, K., Toma, T., Tamashiro, M., et al.: Med. Entomol. Zool., 63, 209-306, 2012.
- 2) 前川芳秀, 小川浩平, 駒形 修, 他: 衛生動物, 67,

183-198, 2016.

- 3) Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y., et al.: Jpn. J. Infect. Dis., 63, 312-316, 2010.
- 4) Takano, A., Fujita, H., Kadosaka, T., et al.: Med. Entomol. Zool., 65, 13-21, 2014.

発 表 実 績

- 1) 井口智義, 高橋久美子, 辻 麻美, 他: 平成26年に都内で発生したデング熱に関するデングウイルス媒介蚊ならびにデングウイルス検査対応 (平成26年度及び27年度の結果), 東京健安研七 年 報第67号, 2016.
- 2) 高橋久美子, 井口智義, 石上 武, 他: 東京都感染症媒介蚊サーベイランスにおける捕集蚊の調査結果について (平成27年度), 東京健安研七 年 報第67号, 2016.
- 3) 高橋久美子, 井口智義, 石上 武, 他: 東京都における2015年度デング熱等媒介蚊サーベイランス結果 (その1 成虫結果), 第68回日本衛生動物学会本大会 (宇都宮市), 2016.
- 4) 井口智義, 高橋久美子, 田部井由紀子, 他: 東京都における2015年度デング熱等媒介蚊サーベイランス結果 (その2 幼虫結果), 第68回日本衛生動物学会本大会 (栃木県宇都宮市), 2016.
- 5) 渡邊喜美代, 小杉有希, 高橋久美子, 他: 公園雨水ます中の昆虫成長抑制剤ピリプロキシフェンの分析法およびモニタリング, 第25回環境化学討論会 (新潟), 2016.
- 6) 渡邊喜美代, 小杉有希, 播田實千恵子, 他: 公園雨水ますの水および底泥中の昆虫成長抑制剤のLC/MS/MS分析法, 第53回全国衛生化学技術協議会年会 (青森), 2016.
- 7) 渡邊喜美代, 小杉有希, 播田實千恵子, 他: 公園内雨水ます中の昆虫成長抑制剤ピリプロキシフェンの存在実態, 日本薬学会第137年会 (仙台), 2017.
- 8) 小杉有希, 渡邊喜美代, 高橋久美子, 他: デング熱対策で使用した昆虫成長抑制剤ピリプロキシフェンの都内公園雨水ます中の存在実態調査, 第12回東京都福祉保健医療学会 (2016年度) (東京), 2016.

3. 狂犬病検査法の検討ならびに遺伝子解析に関する研究

狂犬病は, 日本では輸入症例3例を除き50年以上発生報告はない. しかしながら, 世界では毎年約55,000人が狂犬病に感染し死亡しており, その約56%は日本を取り巻くアジア諸国で発生している. 日本同様に50年以上発生報告が無かった台湾では, イタチアナグマの狂犬病が発生し, その遺伝子解析により, 近年台湾に侵入したものではなく, 山間部の野生動物間で伝播していたことが推測されている.

日本では咬傷犬の疑似狂犬病診断は行われているが, それ以外の動物を対象とした検査等は行われていない. 狂犬病は日本への侵入が危惧されている感染症であることから, 犬以外の動物を含めた狂犬病の実験室診断法の整備等の検

討を行うことを本研究の目的とする.

1) 狂犬病検体処理方法の検討

脳材料等の前処理方法の検討ならびにRNA抽出方法の検討を行った.

(1) 検体前処理法の検討 犬脳組織100 mgにリン酸緩衝液 (PBS (一)) 1 mLを加えて, 前処理法について検討を行った. その結果, 遠心分離機で破碎を行う機器 (バイオマッシャー I, バイオマッシャー III) と手もみ式簡易破碎容器 (フィンガーマッシャー) は, 器具に試料が詰まり, 均一に乳化化できなかった. このため, 前処理方法としてはバイオマッシャー II, ジルコニアビーズ破碎 (破碎チューブ (1 mm入り)) とジルコミニプレップ (5 mm, 砂状) の3法による処理が処理工程として適していた.

(2) RNA抽出方法の検討 100 mg脳組織を上記の方法で前処理後, TRIZOLを添加処理し, フェノール処理の後, 水層を採取した. この水層500 µLをエタノール沈殿した処理法のRNA濃度が最も高かった. また, 水層140 µLをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QVR)で抽出した試料 (表2, B ②QVR) は, 供試水層量が140 µLにもかかわらず, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (RLT)で抽出, EBbufferで各RNAを溶出した試料 (表2, B ③RLT) と同程度のRNAが回収され, 抽出効率の良さが確認できた (表2).

表2. 脳組織から抽出されたtotalRNA濃度

	A 10%脳乳剤		B 100mg脳+TRIZOL→フェノール処理		
	—	QVR	① エタノール沈殿	②QVR	③RLT
バイオマッシャー II	27. 4	19. 6	384	131	147
破碎チューブ	32. 8	29. 6	406	220	149
ジルコミニプレップ	23. 2	22. 2	672	199	129

QVR:QIAamp Viral RNA Mini Kit RLT:RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

*検体量: A, BのQVRは140 µL, Bの①, ③は500 µl使用

(3) RNA安定化剤入りチューブの簡易ドライアップ法の検討 国内外に生体試料の送付を行う場合, 様々な制約があることから, 抽出したRNAをRNA安定化剤入りチューブを使用し送付した方が安全かつ安価である. この際にドライアップが十分でないとRNAが失活する場合がある. しかも, デシケーターやエバポレーター等の機器を持っていない施設も多い. そこで, 真空調理器具を用いて, 簡易デシケーターを作製し, ドライアップ方法の検討を行った.

この簡易デシケーターを利用すると100 µLの溶液まで一晩でドライアップが可能であり, 有用であった. これにより, 専用機器が無くてもRNA安定化剤入りチューブを用いた輸送を問題なく行うことができた.

2) 狂犬病ウイルス検出用リアルタイムPCRの検証

(1) リアルタイムPCRの検証 東南アジアで発生している狂犬病のうち, 2つのクラスター (Sea1, Sea2)を検出するリアルタイムPCRプライマー, プローブを作製し, この2つのクラスターが発生している共同研究先 (ベトナム)で検証を行った. Sea1の検出にはイヌ脳6検体を, Sea2の検出にはイヌ脳2検体, ヒト唾液2検体, ヒト髄液2検体の

計6検体を用いてリアルタイムPCRとRT-PCRによる検査を実施した。Sea1クラスター株の検出は、イヌ脳6検体すべてでリアルタイムPCRとRT-PCRがともに陽性となった。Sea2クラスター株の検出では、イヌ脳2検体はどちらも陽性、ヒト髄液はどちらも陰性であったが、ヒト唾液2検体は、リアルタイムPCR陰性、RT-PCR陽性となった。

Sea1およびSea2のクラスター検出用リアルタイムPCRについて追加の検証を行うため、ベトナムで2012～2015年に狂犬病を疑ったイヌ8検体、ネコ1検体の脳から抽出したRNAを用いた。リアルタイムPCRでは、Sea1はすべて陰性、Sea2は9検体中6検体で陽性であった。リアルタイムPCRで陰性だった3検体は、RT-PCRでも陰性であった（表3）。

表3. リアルタイムPCRとRT-PCR検出結果（2016年）

Name of Sample	specimen	real-time PCR *		RT-PCR *	year	Geographical area
		Sea1	Sea2			
D170	Dog brain	—	+	+	2012	North
D171	Dog brain	—	+	+	2012	North
D173	Dog brain	—	+	+	2012	North
D183	Cat brain	—	—	—	2013	North
D189	Dog brain	—	—	—	2013	North
D191	Dog brain	—	—	—	2014	North
D192	Dog brain	—	+	+	2014	North
D193	Dog brain	—	+	+	2014	North
D194	Dog brain	—	+	+	2015	North

*簡易ドライアップ法で処理後、ベトナムから運搬してきたRNAを使用

(2) リアルタイムPCRの検証 2015年度に作製プライマー、プローブで2つのクラスター（Sea1, Sea2）を同時に検出できるように改変し、国立感染症研究所（感染研）を通じてベトナムの研究機関で実際に臨床検体の検査を行った。2017年に犬の咬傷等により狂犬病を疑う患者23事例から採取された唾液21検体、髄液10検体の計31検体を用いた。リアルタイムPCR、RT-PCRともに陰性だったのは12事例18検体（唾液11検体、髄液7検体）であった。リアルタイムPCR、RT-PCRともに陽性となったのは、6事例8検体（唾液6検体、髄液2検体）であった。リアルタイムPCR、RT-PCR結果が不一致だったのは5事例でリアルタイムPCRのみ陽性が4事例4検体（唾液4検体）、RT-PCRのみ陽性が1事例1検体（髄液1検体）であった。リアルタイムPCRが陰性となった検体についてウイルスのN遺伝子配列の解析を行ったが原因究明には至らなかった。

3) 狂犬病ウイルスNタンパク遺伝子ならびに全領域の解析

(1) 1950年代に都内で分離された狂犬病ウイルスの全領域解析 (Tokyo1group) Tokyo 1 groupの2株を感染研に依頼し、解析精度の高いNGSでの解析を試みた。得られた配列をリファレンス株（Lep-Flury株）と比較したところ、Leader, tailer, Pタンパク遺伝子など欠損している箇所が17箇所あり、狂犬病ウイルス全領域の配列を得ることができなかった。

(2) ベトナム狂犬病ウイルスNタンパク遺伝子配列解析

リアルタイムPCRによりSea2（+）となった6検体のNタンパク遺伝子配列の解析を行った。その結果、6検体は

すべてベトナム狂犬病Group 1のsubgroup 1Bで、ベトナム北部で流行しているウイルスであることが判明した。

発表実績

- 1) Hatakeyama, K.: Workshop for Molecular Diagnosis of Rabies and Technical Training at NIID (2017.1.10)
- 2) 水越文徳, 井上 智, 野口 章, 他: 狂犬病ウイルスのリアルタイムPCRの精度向上に関する検討, 平成29年度関東・東京地区獣医師大会三学会 日本獣医公衆衛生学会（東京）, 2017., 平成29年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（大分）, 2018.

4. 三類感染症起因菌を中心とした検査法および菌株情報の解析に関する研究

三類感染症の中でも腸チフス、パラチフス、コレラ、細菌性赤痢の多くは、輸入感染症であるとされている。しかしながら、近年、発症前に明らかな海外渡航歴のない、国内事例が度々報告されている。海外旅行者の数は減少していないことから、輸入例としての三類感染症の多くは国内に侵淫し、国内発生例の一因となっていることが考えられる。さらに、三類感染症の起因菌は発症に必要な感染菌量も少なく、また、食品等からの分離が困難であるため、国内例は感染源がほとんど特定できないのが現状である。

本研究では、赤痢菌およびチフス菌を中心とした三類感染症菌について、届出された原因菌のうち当センターに搬入された分離菌株から得られる情報を解析し、菌株の特徴等から、国内での発生状況の把握と、感染経路の推定・解明を目的とした。さらに、より効率的、高感度、簡便な検査法の検討、検査体制の見直しを行った。

1) 三類感染症の菌株について、血清型、薬剤耐性パターン、分子疫学的情報の収集・解析

(1) 赤痢菌をはじめとした三類感染症起因菌の疫学解析

2015年から2017年に分離・搬入された三類感染症菌は、コレラ菌3株（海外由来）、チフス菌36株（海外由来34株、国内由来2株）、パラチフスA菌20株（海外由来19株、国内由来1株）、腸管出血性大腸菌501株（感染症関連株；海外由来17株、国内由来484株）、赤痢菌114株（海外由来74株、国内由来40株）であった（表4）。

2017年に分離・搬入された腸管出血性大腸菌株の主な血清型のVT産生性は、O157ではVT2単独産生：109株

（64.9%）、VT1+VT2産生：59株（35.1%）、O26ではVT1単独産生：22株（88.0%）、VT1+VT2産生：3株（12.0%）であった。

(2) 赤痢菌の薬剤耐性に関する解析 2015年から2017年に分離・搬入された赤痢菌114株の菌種別内訳は、ソネネ赤痢菌89株、フレキシネル赤痢菌21株、ボイド赤痢菌4株であった。これらの赤痢菌について11薬剤を用いた薬剤感受性試験の結果、供試薬剤のいずれかに耐性であった菌株は107株（93.9%）であった。耐性菌の薬剤別検出頻度と耐性パターンを菌種別にみると、2015年のフレキシネル赤

痢菌では、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) , テトラサイクリン (TC) , ストレプトマイシン (SM) , アンピシリン (ABPC) の4薬剤に対する耐性率が高かったが, 2016年, 2017年に分離・搬入された菌ではクロラムフェニコール (CP) を加えた5薬剤に対する耐性率が高く, 特徴的な耐性パターンは認められなかった. ソンネ赤痢菌では, 2015年から2017年まで全てST, TC, SMの3薬剤に対する耐性率が高く, 耐性パターンとしてはTC・SM・ST・ナリジクス酸 (NA) ・ノルフロキサシン (NFLX) が最も多かった. 海外由来株ではTC・SM・STの耐性パターンが, 国内由来株ではTC・SM・ST・NA・NFLXの耐性パターンが多く認められた. さらに, 2016年, 2017年に分離・搬入されたソンネ赤痢菌9株 (海外由来8株, 国内由来1株) はセフトキシム (CTX) に耐性を示した. この9株についてDouble disk synergy test およびEtestを実施した結果, ペニシリンやセフェム系等の臨床的に汎用される抗菌剤に耐性となる, 基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生性が認められた. 更にPCR法によりESBL遺伝子型を調べた結果, TEMおよびCTX-M1グループ (1株), CTX-M1グループ (3株), CTX-M9グループ (5株) であることが確認された.

表4. 三類感染症の発生数と原因菌の菌株確保状況
(2015-17年, 東京都)

	届出数	菌株確保数 (%)
コレラ	5	3 (60.0)
細菌性赤痢	127	114(89.8)
腸管出血性大腸菌感染症	1,256	501(39.9)
腸チフス	40	36(90.0)
パラチフス	23	20(87.0)

2) 赤痢菌の分子疫学的解析に関する検討

2015~2016年に検出されたソンネ赤痢菌21株についてパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; PFGE) 及び反復配列多型解析法 (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis;

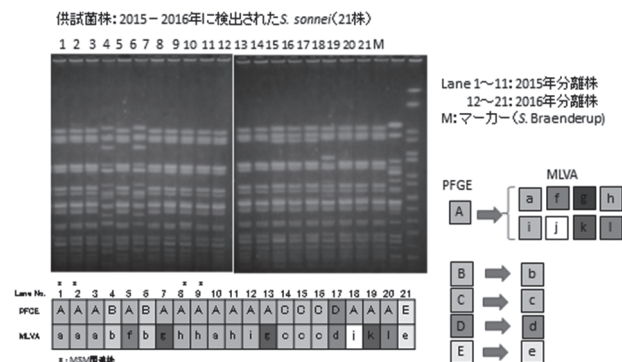


図5. PFGE法およびMLVA法による赤痢菌解析の比較

MLVA) で解析を行い, 比較を行った. PFGEによる泳動パターンは5種類, MLVAでは12種類に分かれ, 互いに相関性が見られた. PFGE法により同一パターンを示した14株については, MLVA解析により更に8グループに分けられた (図5). 従来, 赤痢菌の疫学的解析手法としては主に薬剤耐性パターンやPFGE等が用いられているが, これら菌株解析方法にMLVA解析も併用することで, 国内散发集団例等の早期探知や感染源特定につながる事が示唆された.

発表実績

- 1) 河村真保: 東京都において分離された赤痢菌の菌種, 血清型及び薬剤感受性について (2014~2015年), 東京都微生物検査情報, 37, 1-2, 2016
- 2) 河村真保, 小西典子, 貞升健志, 他: 国内事例由来赤痢菌株の疫学的性状解析からみえてくること (東京都), 第88回日本細菌学会総会 (岐阜), 2015.
- 3) 河村真保, 高橋正樹, 山梨敬子, 他: 2014年分離赤痢菌の菌種および血清型と薬剤耐性, 第55回日本感染性腸炎学会 (東京), 2016.

5. 微生物検査における大規模遺伝子データ利用に関する研究

分析機器や解析技術の進展により大量の遺伝子データを取得・解析することが可能になった. このような大規模データ解析の手法は網羅的解析と呼ばれ, 微生物分野では特に感染症などの鑑別, 同定等による健康危機管理に係る部分において, その活用が期待されている.

本研究では, 当センターで実施している様々な微生物の検査・解析において, NGSの利用推進と大規模遺伝子解析手法の導入を図り, 新たな検査法への応用等を目指した. 個別には, 分離・保存菌株や臨床検体, 食品, 環境等の各種試料を対象に, 従来のキャピラリーシーケンス解析 (サンガー法) のみでは難しかった網羅的な遺伝子データ解析を中心に検討し, 感染症診断に資する新たな基盤技術整備を図った.

1) 細菌を対象としたNGSによる遺伝子データ解析

(1) DNAサンプルの前処理 (ライブラリー調製) に関する検討 細菌の全ゲノムと長鎖PCR増幅産物 (約20kbp) を対象とした場合, 抽出・精製には市販のシリカベスラムを用いた後, 磁性ビーズを用いて夾雑物を除去することがデータ取得のための前処理として有効であった. また, 解析に必要なDNAの最適濃度がサンプル (菌種等) ごとに異なり, これらの最適濃度はサンプルのGC含量から予測できることが判明した.

(2) 赤痢菌 (*Shigella sonnei*) のNGSによる解析 既存の方法では識別が困難なソンネ赤痢菌について, NGSによる網羅的なゲノム解析を行った. 患者から分離・搬入された13株を対象にde novo アセンブリ解析からcontigを作成し, GenBank 参照配列 (Ss046株) にマッピングを行っ

た後、各株のゲノム全体を比較した。その結果、供試株には参照配列と明確に異なるゲノム構造が認められた。また、供試13株で参照配列に対する一塩基多型 (SNPs) を抽出し、代表的なハウスキープング遺伝子上のSNPs配列97個を基に系統解析を行った。その結果、供試13株は大きく2系統に識別できることが判明し、感染経路推定等への応用が期待できると考えられた。

(3) *Mycoplasma pneumoniae* の全ゲノムSNPs解析を用いた当センターのNGS分析精度確認 当センターでNGS解析により取得した全ゲノム配列の精度を確認するため、GenBank参照配列との比較解析を実施した。 *M. pneumoniae* 3株 (都内患者由来2株およびATCC-M129株) の全ゲノム配列を取得した後、GenBankに登録されていたATCC-M129株の参照配列と合わせて比較解析した。参照配列に対するSNPs数を利用して解析した結果、分離株では241/216個、ATCC-M129株は7個であった。当センターでの解析と参照配列の差異が許容範囲内であったことから、十分な解析精度が得られていると考えられた。

(4) 新たな食中毒起因菌種 (*Staphylococcus argenteus*) の同定 新たな食中毒起因菌を解明する方法として、NGSの利用を検討した。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* ではない非定型ブドウ球菌食中毒事例 (2010年に発生) から分離した2株 (Tokyo13064株及びTokyo13069株) について、NGSにより全塩基配列を解読した。NGSにより全塩基配列を解読した。全塩基配列を対象とした系統樹解析を行った結果、分離株は *S. argenteus* の標準株 (MSHR1132株) に最も類似していることが判明したが、嘔吐毒素エンテロトキシンB (SEB) を伝播する

SaPIshikawa11については分離株にのみ存在していた (図6)。加えて、分離株はSEB遺伝子及びSEBタンパク質に関して食中毒を起こすために十分な量を発現していたことから、食中毒原性を持つことが示された。以上の結果から、解析した分離株は *S. argenteus* であることに加え、*S. aureus* と同様に食中毒を含むブドウ球菌性疾患を引き起こすことが示唆された。

(5) 細菌感染症検査への適用 感染症の原因究明において、分離培養を経ずに臨床材料から病原体の直接検索が求められる場合の基礎実験として、既知の臨床検体を用いた呼吸器系病原細菌の網羅的探索法の検討を実施した。臨床材料から呼吸器系の病原性細菌を網羅的に探索する方法を検討した。咽頭スワブの塗擦物を生理食塩水に懸濁した試料からDNAを抽出し、NGSの分析に供試した。得られた塩基配列データについてオンライン情報ツール (MePIC) を利用した解析を行った結果、54菌種の口腔内細菌の塩基配列情報を得ることが可能であった。この結果から、本法は口腔内に存在する細菌を網羅的に検索することが可能であると考えられ、特定の病原体の検出を目的とする現行の方法 (培養法、PCR法等) では原因究明が困難な事例にも利用できる可能性が示された。

2) ウイルスを対象としたNGSによる遺伝子データ解析

(1) ライブラリー作成に関する検討 RNAウイルスのNGS解析では、DNAを対象とする細菌とは異なる前処理方法が必要である。そこで昨年、全国で流行したエンテロウイルスD68(EV-D68)を対象に、NGS解析に必要な核酸抽出、ライブラリー作成等について検討した。この結果、臨床検体から直接RNAを抽出する場合、通常とは異なるキ

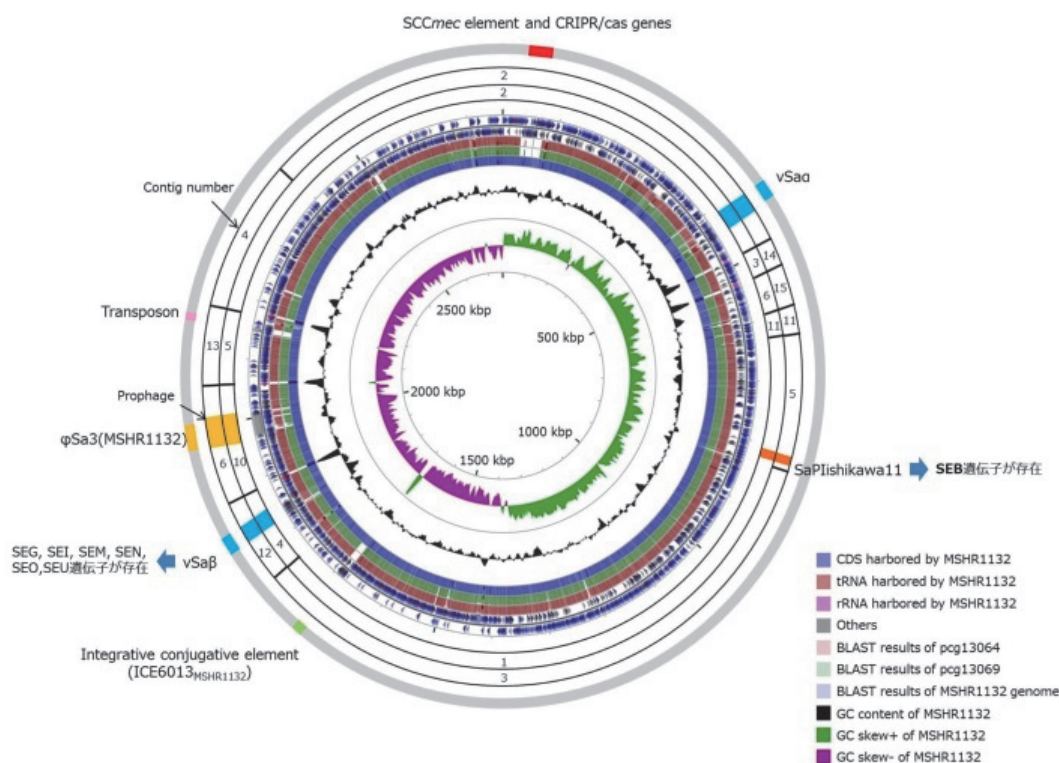


図6. *S. argenteus* 標準株 (MSHR1132) と食中毒事例分離株 (Tokyo13064, Tokyo13069) のゲノム構造の違い

ヤリアRNAを添加しない方法により検出感度が向上することが判明した。また、ゲノムライブラリーの精製では、アガロースゲル電気泳動により精製する方法が有効であった。これらの結果を基に現在、EV-D68の検出とゲノム全長の塩基配列解析（約7kb）を行った。

(2) リアルタイムPCRを用いた遺伝子量の推定 分離培養が確立していないウイルス種をNGSで解析するには臨床検体中にある解析対象以外の様々なゲノムが標的ウイルスの解析を阻害する場合がある。このような検体をNGS解析に供するために検体の質をリアルタイムPCRによってスクリーニングする方法を検討した。リアルタイムPCRでEV-D68が陽性となった5検体を対象にNGS解析を実施した結果、リアルタイムPCRのサイクル数(Ct値)が30前後の検体ではNGSのリード数が数本であったのに対し、Ct値20前後の検体ではリード数が1万以上得られ、EV-D68の全長塩基配列（約7 kb）を取得することが可能であった。この結果から、リアルタイムPCRによりNGSで得られるリード数を推定できることが示唆され、ウイルスを対象にしたNGS検査を効率よく実施できると考えられた。

3) 感染症の迅速診断に向けた病原体検出法の検討

(1) 呼吸器感染症起因菌の網羅的探索 病原性細菌の網羅的探索法（メタゲノム解析）を用い、原因不明疾患の検体（感染症発生動向調査事業等の残余検体）を対象に解析を行った（図7）。従来の培養検査、遺伝子検査ともにレジオネラ陽性であった喀痰3検体のうち、2検体では網羅的探索法によってもレジオネラ菌の存在を確認できた。また、肺炎マイコプラズマ陽性検体からも、同菌の存在を検出できた。さらに、レジオネラ、マイコプラズマ陰性検体からはこれらの菌は検出されなかったことから、病原菌の検出に有用であると考えられた。その一方で、大腸菌や黄色ブドウ球菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌、肺炎桿菌などはほぼすべての検体から検出されており、このような常在菌としても存在しうる病原菌については不明疾患の原因として特定することは困難であると考えられた。

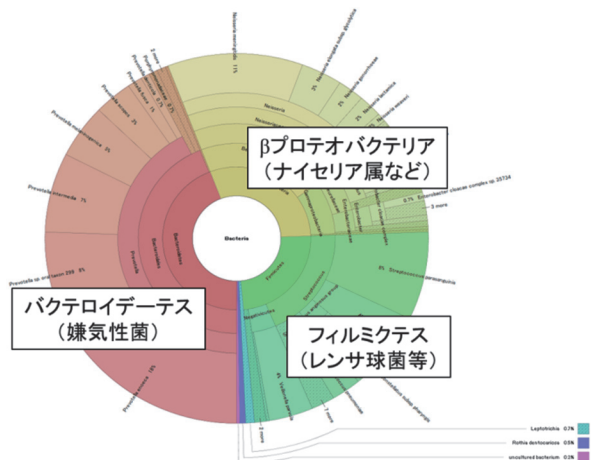


図7. 網羅的検索により検出された細菌種

(2) DENVの一斉解析 RNAウイルスを対象にNGSで解析する場合、ウイルスゲノムを直接解析する方法と、

RNAをDNAに逆転写してからPCR法を用いて増幅させる「アンプリコンシーケンス法」がある。本法は、主な解析対象が既知遺伝子に限定されるが、一度に多数の試料を解析することが可能でコスト面で有利になる。そこで、2015年から2016年にかけて搬入されたDENV検体を対象に、アンプリコンシーケンス法による一斉解析を行った。DENV各血清型について全ゲノム約10kbを増幅できるプライマーセットを作製し、PCR法で増幅させた後、NGSによる一斉解析を行った。その結果、供試64株について、ほぼ全長の配列を1回の解析で取得することが可能であった。

(3) インフルエンザウイルスの解析 2015/16シーズンに東京都内で分離されたA(H1N1)pdm09について、オセルタミビル（タミフル）等の耐性マーカーであるH275Y変異を解析した。その結果、135株中3株（2.2%）でH275Y変異を検出し、うち1株はNGS解析により耐性／感受性変異がおおよそ1：4の割合でミックスしていることが判明した。

4) 食品苦情・食中毒事例における原因究明

(1) 食品苦情事例への利用 2016年に都内小学校の給食で発生した異臭苦情に関して、NGS解析を基にした原因物質の特定を行った。苦情食品（さつまいもご飯）の残品から分離した株（S1674）の全ゲノム配列解析を実施し、*Anoxybacillus*属と同定した。本属菌は温泉等から分離される好熱菌と報告されているが詳細な性状については不明であったことから、分離株の網羅的な遺伝子発現量解析（RNA-Seq）等を実施し、苦情原因物質の推定を行った。その結果、S1674株は可溶性デンプンを添加した基礎培地中で酢酸形成に関連する酵素の遺伝子発現上昇を認めた。また、これらの結果に基づきS1674株の食品への接種（再現試験）を実施した結果、37-60℃で一晩保温した際に、残品と同様の酢酸産生を認めた。以上の結果から、本苦情は*Anoxybacillus*属菌の産生した酢酸が原因であり、本菌は食中毒起因菌が増殖できない高温条件であっても食品異臭の原因になることが示唆された。

(2) 食中毒検査への利用 2017年2月に発生した国内でのノロウイルス大規模食中毒の原因究明において、患者糞便にNGS解析を適用した。この結果、都内の患者糞便検体からほぼ全長のウイルスゲノムを検出し、患者と刻みのりから検出した株が和歌山での発生事例と同じ配列のウイルスであったことを見出した。また、ヒスタミン食中毒の解析ではメタゲノム解析を行い、原因食品の菌叢の把握を行った。なお、サルモネラ属菌については、感染研と地研ネットワークで収集・解析を行うことになり、菌株等の提供を通じて協力することとした。

発表実績

- 1) デングウイルス検査チーム、健康安全研究センターにおけるデング熱検査、第11回東京都福祉保健医療学会誌、43-45, 2016.
- 2) 齊木 大, 日向綾子, 千葉隆司, 他：東京健安研セ年報, 68, 901-905, 2017.

- 3) 鈴木康規, 久保田寛顕, 小林真紀子, 他: 食中毒事例由来 *Staphylococcus argenteus* のゲノム解析と食中毒原性, 第159回日本獣医学会学術集会 (神奈川), 2016.
- 4) 齊木大, 日向綾子, 千葉隆司, 他: 国内感染事例より分離されたデングウイルスの次世代シーケンサーを用いた分子疫学解析, 第64回日本ウイルス学会学術集会 (札幌), 2016.
- 5) 千葉隆司, 秋場哲哉, 貞升健志: 東京都内におけるデング熱患者のウイルス検査と解析 (2015年度), 第75回日本公衆衛生学会総会 (大阪), 2016.
- 6) 長島真美, 吉田 勲, 根岸あかね, 他: 2015/16シーズンに東京都内で分離された A(H1N1)pdm09・H275Y 変異株の解析, 第58回日本臨床ウイルス学会学術集会 (長崎), 2017.
- 7) 小林真紀子, 加藤玲, 鈴木康規, 他: 高熱性細菌 (*Anoxybacillus*) による炊飯米の異臭発生事例, 第38回日本食品微生物学会学術総会 (徳島), 2017.
- 8) Suzuki Y., Kubota H., Ono H.K., et al.; Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*, *Int J Food Microbiol.* 262:31-37. 2017.
- 9) Suzuki Y, Kobayashi M, Saito I, et al.: Association of *Anoxybacillus* sp. with acid off-flavor development in a spoiled, boiled, rice dish., *Int J Food Microbiol.*, 286, 111-119, 2018.

総 括

2015年から2017年の3年間の研究期間内で, 「国内流行が危惧される感染症の検査および分子疫学解析に関する研究」を実施した. 本研究では, 病原体の特徴の解析, 検査手法の開発・検討, NGS等の新たな手法を用いた大規模遺伝子データの解析を中心に各研究課題を検討した.

各研究課題の成果によって国内発生事例や海外での感染事例によりもたらされる感染症をいち早く検知, または原因不明疾患を明らかにし, 従来法による検出では見えてこなかった感染事例や感染症の特定が可能となり, 積極的疫学調査や食中毒検査ならびに汚染経路の推定等について有用な情報を示すことが可能となった. しかし, NGS等による解析が容易な病原体と困難な病原体に対する技術的課題や解析対象となる病原体の拡大等が本研究課題の実施に伴って明らかとなった. これらについては今後も検討を重ね, より多くの病原体の解析を迅速に実施可能となるように研究を継続していく必要がある.

**Study of the examination of infectious diseases, concerning domestic epidemics,
and molecular epidemiological analysis**

Takayuki SHINKAI^a, Michiya HASEGAWA^a, Tomoyoshi IGUCHI^a, Kaoru HATAKEYAMA^a, Maho KAWAMURA^a,
Takashi CHIBA^a, Terue OKAZAKI^a, Dai SAIKI^a, Ai SUZUKI^a, Rie MURATA^a, Isao YOSHIDA^a, Mami NAGASHIMA^a,
Tomoko OHKUBO^a, Yukiko TABEL^a, Chieko MUTO^a, Kazuoki YAMAMOTO^a, Yuki KOSUGI^a, Kumiko TAKAHASHI^a,
Tsuyoshi IGARASHI^a, Takeshi ISHIKAMI^a, Asami TSUJI^a, Kimiyo WATANABE^a, Chieko HATAMI^a, Kayoko TAKAHASHI^a,
Takumi KOBAYASHI^a, Masashi OHKAWA^a, Yukihiro KOUDO^a, Ayako HYUGA^a, Yuriko IWAMOTO^b, Ryo SUZUKI^b,
Keiko YAMANASHI^a, Noriko KONISHI^a, Kohji MORI^a, Chie MONMA^a, Hiromi OBATA^a, Satoru AKASE^a,
Sachiko HARADA^a, Rumi OKUNO^a, Yumi UCHITANI^a, Hiroaki KUBOTA^a, Rei KATOU^a, Satomi UEHARA^a,
Yasunori SUZUKI^a, Makiko KOBAYASHI^a, Yumi TAKAHASHI^a, Rie ISHIZUKA^a, Miki IDA^a, Yukako SHIMOJIMA^a,
Sayako KURITA^a, Hiroyuki KONISHI^a, Tetsuya AKIBA^a, Keiko YOKOYAMA^a, Akihiko HIRAI^a,
Takako MORIYASU^a and Kenji SADAMASU^a

The present study was conducted at the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health over three years (from 2015 to 2017). We analyzed characteristics of domestic infections including pathogens, developed and studied effective investigation methods for monitoring surveys (dengue mosquitoes and rabies) and conducted a new study analyzed large-scale genetic data using next-generation sequencer (NGS).

We developed methods for the detection and analysis of dengue virus and other viruses involved in mosquito-borne diseases from patients' samples. In addition, we established an identification method using gene sequence analysis method and species-specific primers to screen for viruses in insects. We confirmed the usefulness of the rabies virus RNA transportation method a stabilizer-containing tube and a newly constructed real-time PCR reagent. *Shigella* which is a Class III pathogen is highly resistant to drugs. Our analysis by multilocus variable-number tandem-repeat analysis for *Shigella* allowed us to classify the isolates in more details than achieved with pulsed-field gel electrophoresis. We used NGS to identify new foodborne pathogenic bacteria by comprehensive exploration and obtained a nearly full-length nucleotide sequence of Norovirus detected from clinical specimens in food poisoning cases.

Keywords: dengue virus, pest insect, rabies virus, Class III pathogens, next-generation sequencer, real-time PCR, mosquito investigation, monitoring, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, comprehensive search method

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Government Bureau of Social Welfare and Public Health
2-8-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 163-8001, Japan

