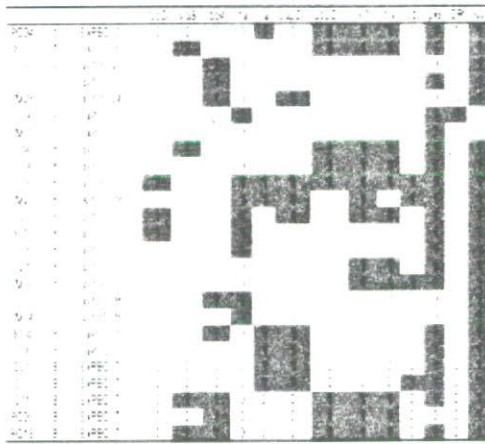


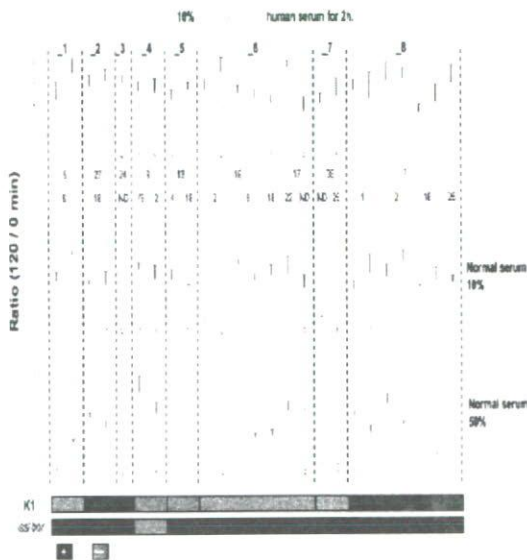
選定株の病原因子プロファイルを以下の図に示した。



腸管外病原性大腸菌感染症の中には、尿路感染症から敗血症に進展する病態が存在する (urosepsis)。そこで、選定した菌株のヒト血清耐性能を実際に検討した。

その結果、10%ヒト血清耐性株は80% (25株中20株)で認められた。B2_3, B2_7に属する菌株は血清感受性であり、B2_6に属する菌株の一部に認められた。

Resistance to complement-mediated Killing (human serum)



サブグループ B2_6 は病原因子プロファイルからも非常に多様な菌株の集団である

ことが認められているが、血清耐性能においてもサブグループ内に多様性が存在することが明らかとなった。50%血清を用いた実験からは、B2_8に属する菌株の中に感受性株が混在することが明らかとなった。サブグループ B2_8 もサブグループ B2_6 同様に多様な菌株が混在していることと関連している可能性があった。

ここで示した血清耐性能が未知の耐性因子によるものか否かは明らかでないが、サブグループ B2_4 のように、K1 莢膜非産生株であり、さらにこれまで報告されてきた血清耐性因子 iss (borA) を保持しない株であっても耐性を示す株が存在することから、K1 莢膜および Iss (BorA) 以外の耐性因子が存在することが示唆された。

E. 結論

主に尿路感染症を引き起こす腸管外病原性大腸菌の系統解析に MLST 法が有効であった。解析の結果、その約90%は系統B2に属することを示すことができた。さらに、MLST法による系統解析で系統B2大腸菌は8つのサブグループに細分類された。非常に多彩な病原因子プロファイルを示す系統B2大腸菌であっても、この細分類を用いることで、限定的ではあるが大腸菌の分類を客観的に行う際に有効であることが示せた。

腸管外病原性大腸菌感染症は、非常に多くの症例が存在する。その大部分は比較的軽度の膀胱炎であるが、膀胱炎を感染巣として腎盂腎炎、敗血症と進展することが知られている。大腸菌による敗血症は日本国

内のみならず、アジア諸国においても十分な対策が検討されてこなかった。今回の解析から腸管外病原性大腸菌の分類に MLST 型別が有効であることが示されたことから、国内の現状の解析を基盤として、アジア諸国の現状を把握する出発点となると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

腸管外病原性大腸菌の系統解析：大西真他
第 81 回感染症学会総会。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

分担研究者 森田昌知 国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 研究員

研究協力者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長

研究要旨

腸チフス・パラチフスはチフス菌・パラチフス A 菌によって起こる局所の腸管病変と菌血症による全身性疾患を特徴とする感染症であり、そのほとんどは海外からの輸入事例である。本研究では、チフス菌・パラチフス A 菌における耐性菌の侵入を監視するため、日本国内で分離された全ての分離株の各種薬剤に対する感受性試験を行った。

2005～2007 年における分離株数は、チフス菌 120 株（うち輸入例 91 株）、パラチフス A 菌 44 株（うち輸入例 41 株）であったが、その中にニューキノロン剤に耐性を示すチフス菌が 3 株存在した。パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析の結果、この 3 株は極めて類似した特有の泳動パターンを示し、全ての耐性菌において DNA ジャイレース GyrA サブユニットに S83F 及び D87N、トポイソメラーゼ IV ParC サブユニットに S80I の変異が確認された。今後もニューキノロン耐性菌だけでなく新型薬剤耐性菌の日本への侵入をいち早く見つけるため、常に分離株の薬剤感受性を調べる必要がある。

A. 研究目的

腸チフス・パラチフスはチフス菌・パラチフス A 菌によって起こる局所の腸管病変と細網内皮系での菌の増殖による菌血症を特徴とする感染症であり、日本を除く東アジア、東南アジア、インド亜大陸、中東、東欧、中南米、アフリカなどで現在も流行を繰り返している。日本においてはほとんどが海外からの輸入事例として報告されているが、近年、ニューキノロン低感受性菌が増加し治療上の問題となっている。また海外の一部の地域ではすでにニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の発生が確認されており、日本国内に入ってくるのは時間の問題である。そこで本研究では、

これまで日本国内に存在しないこれらの耐性菌の侵入を監視するため、日本国内で分離された全ての分離株の薬剤感受性試験を行うとともに、ファージ型別による疫学的解析を行った。

B. 研究方法

2005～2007 年に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌を保健所・地方衛生研究所を経て国立感染症研究所細菌第一部に送付してもらい、これらの菌株のファージ型別と薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験は、腸チフス・パラチフスの治療に有効と考えられている薬剤を含む 15 薬剤について、CLSI 法に従って行った。薬剤

は、アンピシリン、セフトキシム、セフトリアキソン、イミペネム、アズトレオナム、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、ホスホマイシン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、ST 合剤の 15 薬剤である。ファージ型別は従来の方法に従って行った。

C. 研究結果

チフス菌の分離株数は 2005 年 31 株（うち輸入例 21 株）、2006 年 56 株（うち輸入例 46 株）、2007 年 35 株（うち輸入例 26 株）であり、計 122 株（うち輸入例 93 株）であり、パラチフス A 菌分離株数は 2005 年 12 株（うち輸入例 12 株）、2006 年 17 株（うち輸入例 16 株）、2007 年 18 株（うち輸入例 15 株）であり、計 47 株（うち輸入例 43 株）であった。腸チフス・パラチフスの治療上の問題となっているナリジクス酸耐性菌（ニューキノロン低感受性菌）の割合はチフス菌で 50.0%、パラチフス A 菌で 78.7% であった。ナリジクス酸耐性チフス菌は、インド、パキスタン、ネパール、ペルー等への渡航者から分離され、ファージ型 E1、E9、UVS4 に分類された菌株において高い分離頻度を示した。またナリジクス酸耐性パラチフス A 菌は、インド、バングラデシュ、中国等への渡航者から分離され、全ての菌株はファージ型 1、2、4、6 及び UT のいずれかに属した。

ナリジクス酸耐性菌の中でニューキノロン剤に耐性を示すチフス菌が 2006 年に 2 株、2007 年に 1 株、計 3 株存在した。XbaI 消化によるパルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析の結果、この 3 株は極め

て類似した特有の泳動パターンを示した（図 1）。キノロン耐性決定領域の遺伝子配列を決定したところ、DNA ジャイレース GyrA サブユニット遺伝子 (*gyrA*) の 249 番目のシトシンがチミンに、260 番目のグアニンがアデニンに変異していた。またトポイソメラーゼ IV ParC サブユニット遺伝子 (*parC*) においても 239 番目のグアニンがチミンに変異していた。これらの変異は 3 株に共通であった。これより、DNA ジャイレース GyrA サブユニットでは S83F 及び D87N、トポイソメラーゼ IV ParC サブユニットでは S80I のアミノ酸変異が起き、ニューキノロン剤に対する耐性を獲得したと考えられる。

D. 考察

1998 年頃よりニューキノロン低感受性菌が増加しつつあるチフス菌・パラチフス A 菌は、本研究期間中で分離株の約 60% がニューキノロン低感受性菌であった。さらに、本邦で初めてニューキノロン耐性チフス菌が分離された。未だ報告されていないが、治療に使用されている第 3 世代セフェム系抗菌薬に耐性を持つチフス菌・パラチフス A 菌の発生も考えられる。新型薬耐性菌の発生及びそれらの日本への侵入をいち早く見つけるため、今後も全ての分離株の薬剤感受性を調べる必要があると考えられる。

E. 結論

得られた薬剤感受性試験、ファージ型別試験の結果、渡航先等の情報を整理し、世界中のどの地方でどんな薬剤に対する耐性菌が流行しているかを常に把握することで、新型薬耐性菌の日本国内への侵入の予防に役立てることが重要である。

F.健康危機情報

ファージ型別及び薬剤耐性の結果を病原微生物検出情報（IASR）に報告し、公表している。

G.研究発表

1) M. Morita, K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe, and H. Izumiya: Development of a real-time PCR assay for detection of *gyrA* mutations associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A. Microbiol. Immunol. 50: 707-711. 2006.

2) 森田昌知・廣瀬健二・泉谷秀昌・渡辺治雄・相楽裕子：日本国内で分離されたチフス菌、パラチフス A 菌の薬剤感受性動向、第 45 回感染性腸炎研究会総会、東京、2006 年 3 月

3) 森田昌知・泉谷秀昌・渡辺治雄・相楽裕子：2006 年に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の各種薬剤感受性の検討、第 46 回感染性腸炎研究会総会、東京、2007 年 3 月

4) 森田昌知・泉谷秀昌・渡辺治雄・相楽裕子・大西健児：2007 年に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の各種薬剤感受性の検討、第 47 回感染性腸炎研究会総会、東京、2008 年 3 月

表 1. 2005 年から 2007 年に分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の薬剤感受性試験の結果

Drug (breakpoint [$\mu\text{g/mL}$])	MIC [$\mu\text{g/mL}$] for <i>S. Typhi</i>			MIC [$\mu\text{g/mL}$] for <i>S. Paratyphi A</i>			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀ resistant [%]	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀ resistant [%]	
Ampicillin (≥ 32)	0.25 - >256	1	>256	23.3	4	8	0
Cefotaxime (≥ 64)	0.032 - 1	0	0	0	0	0	0
		25	.25		25	.5	
Ceftriaxone (≥ 64)	0.032 - 0.5	0	0	0	0	0	0
		125	.25		25	.25	
Imipenem (≥ 16)	0.032 - 1	0	0	0	0	1	0
		25	.5		5		
Aztreonam (≥ 32)	<0.016 - 0.25	0	0	0	0	0	0
		032	.25		125	.25	
Kanamycin (≥ 64)	1 - >256	4	4	0.8	2	4	0
Gentamicin (≥ 16)	0.125 - 16	0	0	0.8	0	0	0
		5	.5		5	.5	
Tetracycline (≥ 16)	0.5 - >64	2	>25	15.6	4	8	2.1
		6	6				
Fosfomycin (≥ 256)	1 - >256	8	32	2.5	256	>2	51.1
					56		
Chloramphenicol (≥ 32)	2 - >256	4	>25	23.0	8	16	0
		6	6				
Nalidixic acid (≥ 32)	0.5 - >128	8	>12	50.0	>128	>12	78.7
		8	8		8		
Norfloxacin (≥ 16)	0.064 - 128	1	2	2.5	4	4	0
Ofloxacin (≥ 8)	0.064 - >32	0	1	2.5	4	4	0

	5									
Ciprofloxacin (≥ 4)	0.016 - >32	0.	0	2.5	0.032 - 2	1	1	1	0	0
		25	.5							
Trimethoprim/Sulfamethoxazole ($\geq 4/76$)	0.032 - >160	0.	>16	23.0	0.125 - 4	0.	4	4	0	0
		25	0			5				

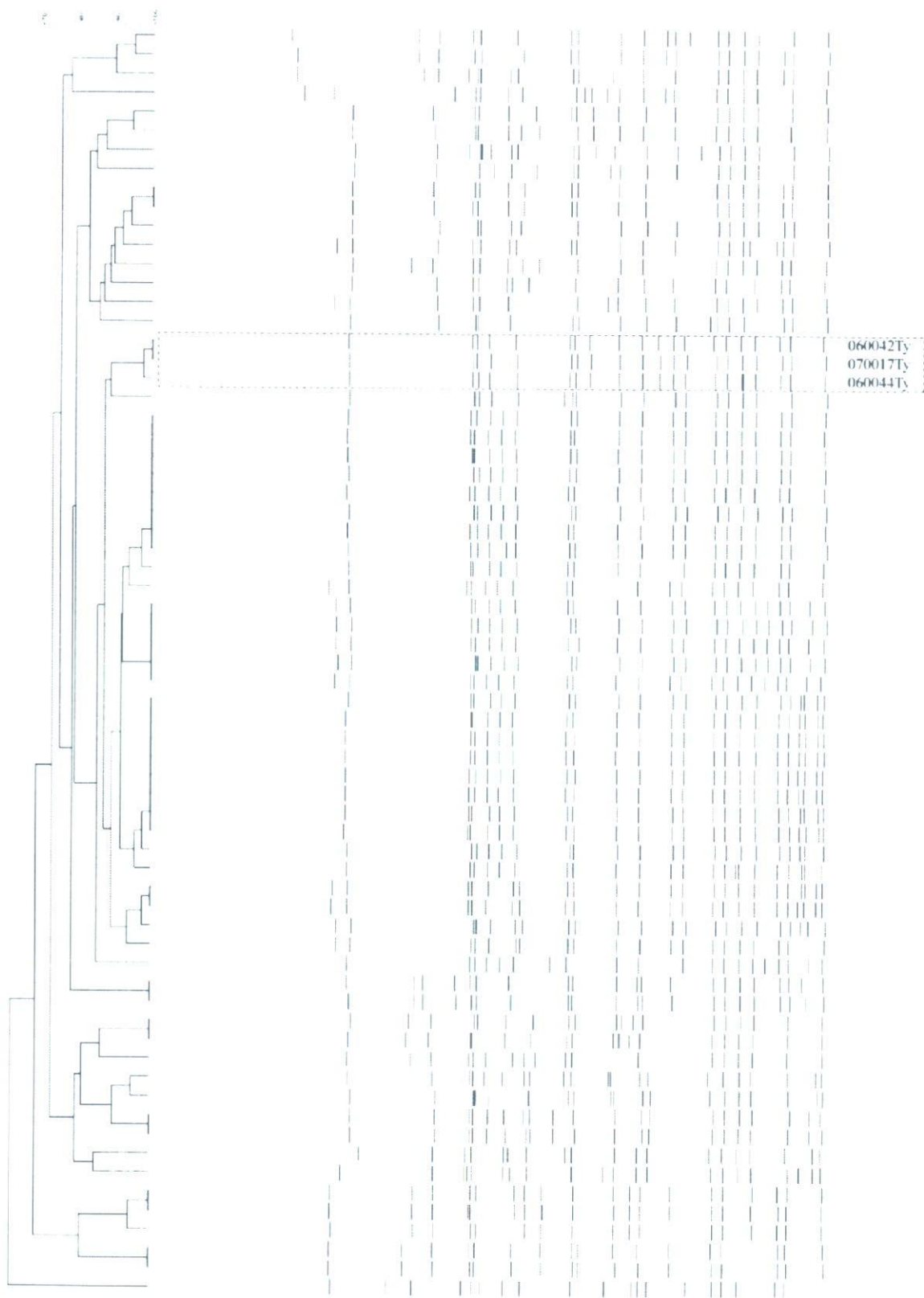


図 1. パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）
平成 17～19 年度 総合分担研究報告書報告書

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」
分担研究報告書

分担研究者 大澤 朗（神戸大学 農学研究科）

研究要旨：3年間の研究まとめ

研究 1) 新興型腸炎ビブリオの流行要因に関する研究：

- ・ 新興型株 (NIID K7) と 1980 年代に分離された新興型株に近縁な O3:K6 株株間でゲノムサブトラクションを行った結果、新興型株に特異的に挿入した 16-kb の DNA 配列を特定した。また、この配列は DNA 結合タンパクの一つであるヒストン様タンパク HU- α をエンコードする ORF の末端に挿入しており、それにより HU- α のアミノ酸配列の N 末端に置換および付加が起っていた。これらの挿入配列あるいは挿入による HU- α の変異が新興型腸炎ビブリオ流行要因に関連している可能性が示された。
- ・ 新興型腸炎ビブリオの O:K 抗原変換メカニズムを明らかにするため、新興型腸炎ビブリオ O4:K68 において *Vibrio cholerae* の表層抗原合成に関連する遺伝子群と相同と思われる遺伝子領域の塩基配列を決定し、これを新興型腸炎ビブリオ O3:K6 株と比較した。その結果 O4:K68 株は O3:K6 株この遺伝子領域が全く異なっていることが明らかになった。新興型腸炎ビブリオはこの遺伝子領域が外来性の遺伝子領域と大規模に入れ替わる事により異なる血清型となることが示唆された。

研究 2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の PFGE パターン多様化の要因解明と本菌に特異的な遺伝子マーカーの検索：

- ・ EHEC O157 分離菌株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) パターンの多様性がどのようにして起こるのかを解明するべく、全塩基配列が報告されている EHEC O157 EDL933 株およびその長期継代培養によって得られた派生株を用い、PFGE パターンの変化に影響を及ぼした変異の解析を行った。その結果、変異の一部は DNA 複製軸に対してほぼ対称な位置に存在する 2 つのファージ DNA 間での逆位により起こったことが明らかとなった。ゲノム上に存在するファージ DNA を介した逆位が O157 における PFGE パターンの多様化に関与していることが示唆された。
- ・ Amplified Fragment Length Polymorphism 解析にて EHEC O157 とその他の血清型大腸菌の遺伝子プロファイルを比較した結果、EHEC O157 に特異的な DNA 断片が認められた。この DNA 断片のシーケンスの調べた結果、EHEC O157 に特異的に存在する *tox B* 遺伝子 (*tox B*) の DNA 配列であることが判明した。我々はこの DNA 配列を疫学分子マーカーとした EHEC O157 同定用 PCR 法を開発した。他方、EHEC O26 の *tox B* の DNA 配列が EHEC O157 の *tox B* と近似していることより、その共通配列部分を標的とした EHEC O157 と O26 を暫定的に一括スクリーニングする PCR 法を開発した。

研究 1)

A. 研究目的

新興型腸炎ビブリオはアジアを中心に世界的な拡大を起こしているが、その流行の要因は依然として解明されていない。新興型腸炎ビブリオの特徴は単一のクローンを起源としながらも、多くの血清型が出現していることである。そこで、本研究では新興型腸炎ビブリオに特異的に存在する遺伝子の検索並びに血清型変換のメカニズムの解明を目的とした。

B. 研究方法

1) 新興型株 (NIID K7) と 1980 年代に分離された新興型株に近縁な 03:K6 株 (KE10491) 株間でゲノムサブトラクション法を行い、得られた新興型に特異的に存在すると思われる DNA 断片のシーケンスおよびアノテーションを行った。アノテーションによって特定された遺伝子を標的とする PCR を行い、新興型とその他の菌株における遺伝子の分布を調べた。

2) 新興型腸炎ビブリオ 04:K68 において *Vibrio cholerae* の表層抗原合成に関連する遺伝子群と相同と思われる遺伝子領域の塩基配列を決定し、これを新興型腸炎ビブリオ 03:K6 株の相同領域と比較した。

C. 研究結果

1) 新興型株に特異的に挿入した 16-kb の DNA 配列を特定した。また、この配列は DNA 結合タンパクの一つであるヒストン様タンパク HU- α をエンコードする ORF の末端に挿入しており、それにより HU- α のアミノ酸配列の N 末端に置換および付加が起こっていた。

2) 新興型 04:K68 株の O 抗原 K 抗原に関連する約 50kbp の大きさの遺伝子領域は新興型 03:K6 株のそれと全く異なっていた。

D. 考察

新興型株に特異的に挿入した 16-kb の DNA

配列を特定したこの挿入配列には機能不明のタンパクがコードされていることから、このタンパクの機能を解明することによって新興型に特異的な病原因子が特定できるかもしれない。この遺伝子配列は新興型腸炎ビブリオに特異的であるため本菌を同定する上で有用な分子マーカーとなりえることが示唆された。他方、新興型腸炎ビブリオは O 抗原が K 抗原と関連していると考えられる領域が水平伝播を介して相同組み替えにより変換する事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオ株が出現していると考えられる。

E. 結論

- ・新興型株に特異的に挿入した 16-kb の DNA 配列を特定し、この DNA 配列にコードされている機能未知のタンパクと新興型に特異的な病原性との関連が示唆された。
- ・新興型腸炎ビブリオ 04:K68 の O : K 抗原に関連すると思われる遺伝子領域の DNA 配列を決定し、この領域が入れ替わる事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオが出現していることが示唆された。

F. 健康危機情報

- ・新興型腸炎ビブリオを同定する上で有用な新規の分子マーカーを発見した。
- ・新興型腸炎ビブリオは今後も新たな血清型の出現が予想される。

G. 研究発表

1) 論文発表

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arakawa, E., and Watanabe, H.: Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiology and Immunology (印刷中)

Okura, M., Osawa, R., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H.: Identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* specific DNA sequence by genomic subtraction. Journal of Clinical Microbiology 43(7): 3533-3536 (2005).

2) 学会発表

大倉正稔、徳永暁彦、大澤朗：「新興型 04:K68 株の抗原性に関連する遺伝子群の解析」第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)

大倉正稔、大澤朗、徳永暁彦、森田昌知、荒川英二、渡邊治雄：「新興型腸炎ビブリオ 03:K6 株と 04:K68 株の O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群の比較解析」第 41 腸炎ビブリオシンポジウム (2007. 11)

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arakawa, E., and Watanabe, H.: Comparative and genetic analyses of the putative O and K-antigen gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group 03:K6 and 04:K68 strain, 42th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, at Hyatt Regency Hotel Austin, Abstract p. 62-65 (2007. 12).

研究 2)

A. 研究目的

1996 年に日本各地で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 株の制限酵素 XbaI 消化によるパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 解析では、集団感染事例を中心に大きく 6 つの型に分類されたが、家族内感染事例や散発感染事例から分離された EHEC 0157 株の多くは上記の 6 型には属さず、細かく分類すると 200 種類以上にも分類された。またそれ以後に分離された EHEC 0157 についても PFGE 解析が行われたが、新しく分離される株のほとんどが過去の株とは異なる PFGE パターンを示したことから、EHEC 0157 の染色体 DNA の構造は非常に多様であることが明らかとなった。しかし、そのような多様性がどのようにして起こるかはこれまでにほとんど解明されておらず、PFGE パターンの結果を正しく理解するためにはそれらを知ることが必要であると考えた。そこで本研究は EHEC 0157 ゲノム多様化のメカニズムを解明することを第一の目的とした。

一方、EHEC 感染症には 026 や 0103、0111 などの血清型株による事例も存在するが、0157 による事例はヒトに重篤な病原性を示しており、また集団事例が最も多い。このことに関し、EHEC 0157 が志賀毒素以外の特定の病原因子を有しているという仮説が立てられるが、現在のところその因子については明らかになっていない。そこで本研究では、様々な血清型の EHEC 並びに EHEC 0157 と系統的に近縁であると考えられている Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) 055 血清型株を用いて Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 解析を行い、EHEC 0157 と他の血清型株群との比較において EHEC 0157 に特異的な病原因子関連遺伝子の検索するとともに、その遺伝子を標的とした同定用 PCR 法の開発を第 2 の目的とした。

過去数年間、EHEC による食中毒事例は大部分が EHEC 0157 によるものであった。しかしながら、近年になって EHEC 026 による事例が増加傾向にあり、まだまだ EHEC 0157 による事例が多いものの、EHEC 026 による被害も軽視できないものとなっている。これらの背景を受け、平成 18 年 11 月に厚生労働省より EHEC 026 を検査対象に含めた新たな衛生管理法 (厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長発行第 1102004 号) が制定されたが、現在のところ EHEC 0157 と 026 を同時に検出する簡便で迅速な検出法は確立されていない。この状況を鑑み、本研究では、下記研究結果で報告されるごとく、EHEC 0157 と 026 に保有される *tox B* 遺伝子 (*tox B* または「*efal*」と呼称) において両血清型で相同性の高い特徴的な遺伝子領域があることが認められたことから、この共有遺伝子領域を標的とした EHEC 0157 と 026 を一括検出できる PCR 法の開発を第 3 の目的とした。

B. 研究方法

1) XbaI 処理による PFGE パターンの比較をおこなった。また、EDL933 株全ゲノム配列より XbaI サイトマップを作製し、比較する 2 株間で変化したパターン (フラ

グメント) のゲノム上での位置を特定した。さらに、サイズが変化したフラグメントの多くは、その内部に構造多型領域として知られるプロフェージを含んでいたことからこれらの領域に注目し、ラムダ型ファージ DNA とファージ様 DNA の両端を標的としたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、およびプロフェージとその周辺領域を標的とした PCR により PFGE パターンの変化に関与した変異の解析をおこなった。

2) EHEC 株 63 株、並びに EHEC 0157 と系統的に近い血清型とされる EPEC 055 株 6 株の計 69 株のゲノム DNA を Xba I 及び Hind III で処理した切断断片について DNALigationKit (Takara) を用いてアダプターをライゲーションさせた後に 1 塩基を付加した選択的プライマー XbaI+T, (5'-GATGAGTCCTGACCTAGA/T-3') 並びに HindIII+T, (5'-GACTGCGTACCAGCTT/T-3') を用いた AFLP を行った。AFLP によって得られた 0157 に特異的な DNA 断片をゲルから抽出し、この断片の DNA 塩基配列を決定し、既知の遺伝子配列との照会に基づき遺伝子 (*tox*B 遺伝子 [*tox*B]) を特定した。さらに特定された遺伝子を標的とした PCR を行い EHEC 0157 に特異的であることを確認した。

3) PCR による *tox*B の分布解析: GenBank に登録されている *E. coli* 0157:H7 str. Sakai の塩基配列データ (accession no. AB011549) を参考に、大きさ約 9.5kb の *tox*B を約 1kb ごとに分割した。次に、それら各々の領域におけるプライマーを製作し、67 株病原性大腸菌について PCR を行い本遺伝子の分布を調べた。次に *E. coli* 026:H11 str. HW1 (961244) より抽出した DNA をテンプレートとし、*tox*B のシーケンス解析を行った。この結果をもとに EHEC 0157 と 026 を一括検出する PCR プライマーを作成しその特異性を検証した。

C. 研究結果

1) 長期継代による EHEC 0157 株の PFGE パターン変異の多くは *stx*2 遺伝子をもつ 933W ファージの欠落、Insertion Sequence (IS) を介した欠失に加え、複製軸にほぼ対称に存在する 2 つのファージ間での逆位により起こったことが分かった。逆位は 7 つのファージを介した 5 つの組み合わせでみられ、その大きさは 250 kbp から 1.4 Mbp と多様であった。PFGE パターンの変化としては 1 回の逆位で 4 バンドが変化することが分かった。

2) AFLP の結果、約 1,100bp の位置に EHEC 0157 に特異的であると考えられる DNA 断片が確認された。得られた DNA 断片のシーケンスを決定した結果、EHEC 0157 が安定して保有しているとされるプラスミド、p0157 上に存在する *tox*B と一致した。本領域において設計したプライマーを用いたところ、0157 においてのみ増幅が見られたことから、本 PCR は EHEC 0157 の同定に有用なツールとなることが示唆された。

3) EHEC 026 の *tox*B の塩基配列を決定結果、0157 の *tox*B と同等の大きさ (9501bp) であり、相同性は塩基配列レベルで 91%、アミノ酸レベルで 89% と非常に高いことが示された。本遺伝子を利用した EHEC 0157・026 の *tox*B の共通 DNA 配列を標的としたプライマーを用いて、供試菌株 67 株における増幅の有無を調べたところ、目的としている EHEC 0157・026 全株と他の血清型の数株のみ産物が確認された。

D. 考察

PFGE パターンの変化に関与した変異の一部は、複製軸にほぼ対称に存在する 2 つのプロフェージまたはファージ様 DNA 間での逆位であった。逆位は 7 つのプロフェージまたはファージ様 DNA を介した 5 つの組み合わせでみられ、その大きさは 250 kbp から 1.4 Mbp であった。以上の結果から、大規模な逆位は相同性の極めて高いファージ DNA 領域を介して起こり、0157 ゲノムの多様化に関与していること

が示唆された。一般に細菌ゲノムの多様化は外来性 DNA (ファージ DNA、IS) が欠失・挿入することに起因するとされていたが、本研究ではそれらが挿入される部位を起点として逆位することによっても引き起こされるといふ新知見が得られた。

本研究では EHEC 0157 と他の EHEC 血清型株 *toxB* の分布解析より、EHEC 0157 に特異的な DNA 配列が明らかとなり、さらに EHEC 026 の *toxB* は EHEC 0157 のそれと相同性が非常に高いことも明らかとなった。現在、我が国における EHEC 感染症の大部分は、0157 と 026 の 2 つの血清型によって引き起こされているが、この原因については未だ解明されていない。他方、*toxB* は、EHEC の宿主細胞への接着性に関与していることが過去に他の研究者らによって示唆されている (Tatsuno et al., *Infection and Immunity*, 68:5943-5952 [2000])。これらのことから、*toxB* は EHEC の接着性を増強される機能を有しており、それ故 EHEC 0157 や 026 は他の EHEC 血清型よりも強い病原性を引き起こしているのではないか? という可能性が考えられる。今後我々は *toxB* の詳細な機能を解明するための研究へ展開させてゆく予定である。

F. 結論

EHEC 0157 の *toxB* おいて本菌に特異的な遺伝子配列、またこれと相同性が高い EHEC 026 の *toxB* の遺伝子配列を標的とした EHEC 0157 を同定する PCR 法と EHEC 0157 と 026 を暫定的ではあるが一括検出できる PCR 法を開発した。

F. 健康危機情報

本研究で開発された PCR 法は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長発行第 1102004 号の定めるところの EHEC 0157 と 026 の検出において有用な一次スクリーニング手法であると考えられる。

G. 研究発表

1) 論文発表

Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M., Iyoda, S., Watanabe, H., and Osawa, R.: Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157-specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiology and Immunology*, 51(9):883-888(2007)

Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J., Watanabe, H., and Osawa, R.: Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* 0157:H7 chromosome. *Gene* 10(372): 199-207(2006).

2) 学会発表

徳永 暁彦、川野 雅典、大倉 正稔、大澤 朗: AFLP 解析より検出された腸管出血性大腸菌 0157 に特異的な DNA 断片の同定、第 80 回日本細菌学会総会、日本細菌学会誌 62 巻 1 号、p. 182(大阪 ATC ホール) (2007. 3)

Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M. and Osawa, R.: Identification of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157-specific DNA sequence obtained from an amplified fragment length polymorphism, 41th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, at Gifu University, Abstract p.42-45 (2006. 11)

Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J., Watanabe, H., and Osawa, R.: Genetic basis for the genomic plasticity of *Escherichia coli* 0157:H7, 40th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, at Boston University, Abstract p.16-18 (2005. 12)

研究課題名：「コレラ菌の多様性、新しい疫学マーカーの開発研究」

分担研究者：山崎伸二（大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 感染症制御学講座）

研究要旨 コレラ菌の新しい疫学マーカーを見つけ出すことを目的として、コレラ菌のスーパーインテグロン（SI）の多様性を解析し、PCR ベースでの簡便で迅速なコレラ菌の分子疫学的解析法を開発を試みた。コレラ菌の SI 領域は、複数の血清型の集合体である NAG ビブリオのみならず同じ生物型の 01 エルトール型間や 01 古典型間で、さらに 0139 コレラ菌間でも多様性があることを明らかにした。コレラ菌の SI 領域を標的とした Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法や PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法を開発し、01 エルトール型コレラ菌 94 株、01 古典型コレラ菌 28 株、0139 コレラ菌 54 株と NAG ビブリオ 50 株について解析し、その結果を Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) の結果と比較した。RAPD あるいは PCR-RFLP 単独でも PFGE よりも高い解像度を示す場合があり、さらに両方を組み合わせた結果は、PFGE にも勝るとも劣らない高い解像度を有していた。以上の結果より SI 領域を標的とした PCR 法による分子疫学的解析法は、PFGE と比べより簡便・迅速に行うことができ、我が国の防疫対策に大きく貢献することが期待できる。

A. 研究目的

アジアやアフリカにおいては、今日なお、コレラは致死率の高い疾病であり、乳幼児を中心に多数の散発事例や集団事例が発生し大きな問題となっている。我が国においても、海外渡航者のみならず海外渡航歴のない人においてもコレラが発生し、その対策が求められている。菌の分子疫学的解析法として PFGE が繁用されているが、高価な機器を要することや熟練が必要なこと等いくつかの問題点が指摘されており、PFGE の問題点を克服できる簡便で迅速な分子疫学的解析法が開発が望まれている。

一方、コレラ菌に見いだされたスーパーインテグロン (SI) は、インテグラーゼ (*intI*)

遺伝子の下流のビブリオコレラリピート (VCR) と呼ばれる反復繰り返し配列を持つ特徴的な配列に特定の遺伝子カセットが順次取り込まれ、01 エルトール型コレラ菌 N16961 株では約 126 kb の領域に 179 個の遺伝子カセットが見つかっている。すなわち、菌にとっての年輪のようなものであり、コレラ菌の多様性を担っている可能性が考えられる。本研究では、コレラ菌の新しい疫学マーカーを見つけ出し、新たな分子疫学的解析法を開発を目的として、コレラ菌の SI 領域の多様性を解析した。SI 領域の塩基配列を解析し、VCR の保存性の高い領域と低い領域からいくつかの PCR プライマー設計し、RAPD 法や *intI* 遺伝子と VCR を標的とした

PCR-RFLP 法を開発し、様々なコレラ菌を用いて型別を行った。得られた結果は PFGE による結果と比較し、これらの方法の有用性について評価した。

B. 研究方法

1. コレラ菌 SI 領域の多様性の解析

インドのコルカタにある西ベンガル州立伝染病病院に入院した重症下痢症患者から分離した 01 コレラ菌 44 株、0139 コレラ菌 45 株、non-01, non-0139 コレラ菌 (NAG ビブリオ) 44 株について、*intI4* 遺伝子をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い SI の存在を確認した。また、SI の多様性の解析は 1948 年から 2000 年までにインド、バングラデシュ、オーストラリアの患者及び環境から分離した 01 エルトール型コレラ菌 5 株 (VC2, CRC148, AI091, AL30457, GP156)、01 古典型コレラ菌 5 株 (569B, CL504, CL614, L362, C19385)、0139 コレラ菌 2 株 (VC406, AP32549)、non-01, non-139 コレラ菌 4 株 (SG6, CRC24, SCE4, X79) を用いた。126 kb の SI 領域を 11 個の領域に分けて増幅できる PCR プライマーを全ゲノム配列が明らかとされている 01 エルトール型コレラ菌 N16961 株を基に設計し、上記の株を用いて PCR Scanning を行った。陽性コントロールとして、N16961 株を用いた。

2. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

PCR Scanning で得られた PCR 産物の一部と PCR Scanning で PCR 産物が得られなかった領域は N16961 株で報告されている ORF から設計した PCR プライマーで得られた PCR 産物に

ついて、また NAG X79 株については *intI4* 遺伝子又は PCR scanning で得られた PCR 産物を遺伝子プローブとして陽性となった 30~40 kb の遺伝子断片をコスミドクローニングして、塩基配列の解析を行った。

3. RAPD の開発とコレラ菌の型別

得られた塩基配列を基に、VCR のアライメントを作成し、相同性解析を行った。VCR の保存性の高い領域および低い領域からそれぞれから約 20 個の PCR プライマーを設計し、それらを様々に組み合わせて PCR を行った。菌株は、先に記した 01 エルトール型コレラ菌、01 古典型コレラ菌、0139 コレラ菌、NAG をそれぞれ 94 株、28 株、54 株及び 50 株を用いた。得られた PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動で解析した。

4. PCR-RFLP 法の開発とコレラ菌の型別

得られた塩基配列及び既に報告されている 01 エルトール型コレラ菌 N16961 株と 01 古典型コレラ菌 0395 株の SI 領域を比較し、約 7~14 kb を増幅できる PCR プライマーを 21 組設計した。この 21 組の PCR プライマーを用いて、先に記した各種コレラ菌を 5~50 株選び PCR プライマーの予備的な評価を行った。最も増幅率の高かった PCR プライマーの組み合わせ (IntU-312R) を用いて、01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株と NAG、50 株について本 PCR-RFLP 法にて解析した。得られた PCR 産物を *BgII* で消化し、切断パターン (RFLP) を解析し、コレラ菌を型別した。得られた PCR 産物及び酵素消化物は 2%アガロースゲル電気泳動で

解析した。

5. PFGEによるコレラ菌の型別

01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株と NAG、50 株について PFGE による解析を行った。CDC が推奨している簡便法によりアガロースプラグを作製し、得られたアガロースプラグを *NotI* で消化後、CHEF Mapper を用いて解析をした。PFGE の条件はオートアルゴリズムモード 20~300 kb の条件で解析した。得られた RFLP は Tenover の定義に基づき解析し、パルソタイプを型別した。

C. 研究結果

1. コレラ菌 SI 領域の多様性の解析

126 kb の SI 領域を 11 個の領域に分けて増幅できる PCR プライマーを用い、各種コレラ菌について PCR Scanning を行った。その結果、01 エルトール型や 0139 コレラ菌ではほとんどの領域で N16961 株と同じ大きさの PCR 産物が得られたが、01 古典型や NAG では、ほとんどの領域で PCR 産物が得られなかった。また、PCR 産物が得られても N16961 株と比べて大きなものや小さなものが得られる場合もあり、コレラ菌の SI 領域にはかなり多様性があることがわかった。

2. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

PCR Scanning あるいは遺伝子カセットや VCR から設計した PCR プライマーを用いた PCR で予想より小さな PCR 産物が得られたものについて塩基配列を解析した。予想より小さな増幅断片しか得られなかったのは、類似

の ORF あるいは、VCR の相同組換えによって特定の遺伝子が欠損していることがわかった。一方、NAG、X79 株の PCR 産物の塩基配列の解析から N16961 株に見つからなかった新たな ORF、すなわち、トリメトプリム耐性をコードした *dfrA* 遺伝子、トランスポゼースをコードした遺伝子および機能未知の ORF が見つかった。また、コスミドクローニングで得られた遺伝子断片上には、領域 5、7 及び 9 の ORF が混在したモザイク様構造が見つかり、さらに、*V. metschnikovii* の *intI* 遺伝子と相同性のある遺伝子も見つかった。

3. RAPD の開発とコレラ菌の型別

01 エルトール型コレラ菌 N16961 株の SI 領域 126 kb 中に存在する 178 個の VCR、01 古典型コレラ菌 569B 株の SI 領域から 22 個の VCR、そして NAG、CRC24 株及び X79 株の SI 領域から得られた 8 個の VCR の配列を比較し、相同性の高い領域と低い領域の検索を行った。その結果、18 個の相同性の低い VCR が見付き、この中の相同性の比較的高い領域と低い領域からそれぞれ 20 個の PCR プライマーを設計し、様々な組み合わせで PCR 行った。その結果、相同性の低い領域のプライマーを組み合わせた場合、01 エルトール型コレラ菌、01 古典型コレラ菌、0139 コレラ菌および NAG を識別できるだけでなく、01 エルトール型コレラ菌、01 古典型コレラ菌、0139 コレラ菌および NAG のそれぞれの中で様々な菌株を識別できるプライマーが見つかった。中でも最も識別度の高かった PCR プライマーは VCRU1 と VCRR1 であり、この組み合わせで 01 エルトール型コレラ菌 94 株が 5 つに、01

古典型コレラ菌 28 株が 9 に、0139 コレラ菌 54 株が 2 つに、NAG、50 株が 37 に型別された。また、同じ PCR プライマーを用いても Taq ポリメラーゼの種類によって異なるパターンが得られ、Ex Taq ポリメラーゼが最も高い識別度を有していた。

4. PCR-RFLP 法の開発とコレラ菌の型別

01 エルトール型コレラ菌 N16961 株と 01 古典型コレラ菌 0395 株の SI 領域を比較し、*intI4* 遺伝子から VCR まで、あるいは VCR 間の約 7~14 kb の SI 領域を増幅できる PCR プライマーを 21 組設計し、01 エルトール型、01 古典型及び 0139 コレラ菌について、5 株から 50 株を選び PCR を行った。その結果、01 エルトール型コレラ菌で高率に増幅断片が得られたもの、あるいは 01 古典型コレラ菌で比較的高率に増幅断片が得られたプライマーが存在したが、両方で高率に増幅断片が得られたものは、IntU と 312R の PCR プライマー 1 組しかなかった。この PCR プライマーで合計 226 株のコレラ菌について PCR-RFLP 法による解析を行ったところ、94 株の 01 エルトール型から 86 株で PCR 産物が得られ、PCR-RFLP では 9 タイプに分類された。01 古典型では、28 株中 24 株で PCR 産物が得られ、3 タイプに分類された。0139 コレラ菌では、54 株中、39 株で増幅断片が得られて、6 タイプに分類することができた。NAG では、50 株中 25 株で増幅断片が得られて、7 タイプに分類することができた。

5. PFGE によるコレラ菌の型別

本実験に供した全てのコレラ菌 226 株 (01

エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株、NAG、50 株) について、PFGE による解析を行った。その結果、*NotI* 消化で、94 株の 01 エルトール型は 11 タイプと 15 サブタイプに、28 株の 01 古典型は 3 タイプと 18 サブタイプに、0139 コレラ菌は、2 タイプと 20 サブタイプに、NAG は、47 タイプと 1 サブタイプに分類することができた。

D. 考察

本研究において、コレラ菌の SI 領域はコレラ菌に普遍的に存在しており、しかも PCR Scanning や塩基配列の解析からかなり多様性があることが明らかとなった。この多様性は、異なる遺伝子カセットの挿入や VCR や相同性の高い遺伝子カセットが複数取り込まれた結果起こった、相同組み換えによる遺伝子の欠損が関わっていた。よって、PFGE に依存しなくともコレラ菌の SI 領域を標的とした PCR 法で簡便・迅速な分子疫学的解析法の開発が可能であると考えられた。実際、遺伝子カセットの前後に必ず存在する VCR の相同性の低い領域から PCR プライマーを設計し、ランダムに増幅された PCR 産物の多系について解析したところ、01 古典型コレラ菌や 01 エルトール型コレラ菌では、PFGE よりも解像度の高い場合があることがわかった。一方、PCR-RFLP 法においても、PCR-RFLP 法単独でも、01 エルトール型コレラ菌や 0139 コレラ菌において PFGE よりも解像度の高い場合が存在することがわかった。このことは、PFGE では検出することのできないゲノムの多様性がコレラ菌の SI 領域に存在することを示している。しかも、PCR-RFLP 法と RAPD 法を

組み合わせた場合、01 エルトール型で 11 タイプに、01 古典型で 10 タイプに、0139 コレラ菌で 7 タイプに、NAG では 41 タイプに分類された。PFGE での解析では、それぞれ 11 タイプと 15 サブタイプ、3 タイプと 18 サブタイプ、2 タイプと 20 サブタイプそして 47 サブタイプと 1 サブタイプで、RAPD 法と PCR-RFLP 法を組み合わせた場合、全ての種類のコレラ菌に対して PFGE に勝るとも劣らない高い解像度を示した。今後さらに多くのコレラ菌を解析し、本 RAPD 法や PCR-RFLP 法の有用性を評価していくことが重要であると考える。

E. 結論

コレラ菌の SI 領域は、NAG 間のみならず 01 エルトール型コレラ菌間、01 古典型コレラ菌間や 0139 コレラ菌間においても多様性があり、SI 領域を標的とした PCR-RFLP 法と RAPD を組み合わせることで、コレラ菌の解析において PFGE に勝るとも劣らない解像度が得られることがわかった。これらの方法は、PFGE のような特殊な機器を必要とせず、PCR と電気泳動装置を有する研究室であれば簡便・迅速にコレラ菌の分子疫学的解析を行うことができる。よって、我が国のみならず設備の充実していない開発途上国の研究室においても遂行することが可能であり、コレラ菌の流行株を簡便・迅速に同定することが期待される。よって、本研究は我が国の厚生行政のみならず国際的にも大きく役立つことが期待できる。

F. 健康危害情報

特に該当なし

G. 研究発表

1) L. Shi, K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakrabarty, T. Ramamurthy, G.B. Nair, Y. Takeda and S. Yamasaki. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrheal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol.*, 55: 573-583, 2006.

2) P. Tapchaisri, M. Na-Ubol, W. Tiyasuttipan, S.C. Chaiyaroj, S. Yamasaki, T. Wongsaroj, H. Hayashi, G.B. Nair, M. Chomgsa-Nguan, H. Kurazono and W. Chaicumpa. Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Health Popul. Nutr.*, in press.

表 各種コレラ菌の分子疫学的解析結果

	El Tor (94*)	古典型 (28*)	0139 (54*)	NAG (50*)
RAPD	5	9	2	37
RFLP	9	3	6	7
Both**	11	10	7	41
PFGE	11/15***	3/18***	2/20***	47/1***

*解析した菌株数を示す。

**RAPD と RFLP を組み合わせた結果を示す。

***タイプ/サブタイプを示す。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）
平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

「O157 および non-O157 EHEC のゲノム多様性解析とそれに基づく新規疫学ツール・マーカーの検索」

林 哲也（宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター・生命環境科学分野）
小椋義俊（宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター・生命環境科学分野）
大岡唯祐（宮崎大学 医学部・感染症学講座・微生物学分野）

研究要旨

O157 マイクロアレイと WGPS 法を用いて、O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) のゲノム多様性解析を行い、O157 EHEC 株間には予想以上に大きなゲノムの多様性が存在すること、それがプロフェージおよび IS によって生じていることを明らかにした、また、O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノムが O157 と大きく異なることが明らかになったため、O26・O111・O103 EHEC (各 1 株) の全ゲノム配列を決定した。O157 EHEC のゲノム多様性解析では、疫学マーカーとなりうる多数の **variable gene** を同定し、さらにそのデータを基に、IS629 の多様性を利用した O157 EHEC の迅速菌株識別システムの開発に成功した。本システムはキット化も終了し、検査機関での試験運用が開始された。また、O26・O111・O103 EHEC のゲノム解読により、これらの主要 non-O157 EHEC に対する有力な疫学マーカー候補も同定できた。このほか、O157 の TTSS エフェクター、RTX 様遺伝子、O 抗原合成遺伝子群などの解析からも、O157 の病原性等に関する種々の新知見を得た。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は国内的にも世界的にも大きな問題となっている病原体であり、病原性の全体像の解明、迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。また、EHEC には主要な血清型である O157 以外にも、多数の血清型が存在する (non-O157 EHEC)。我が国では、O157 EHEC が主に分離されてきたが、O26・O111・O103 などの non-O157 EHEC の分離頻度も徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となって

いる。本研究では、ゲノム解析を基盤として、それぞれの血清型の EHEC の遺伝学的・細菌学的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC に特異的な病原遺伝子の検索や解析を行い、疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

使用した菌株の大部分は国立感染症研究所から分与を受けた。このうち、8 株の O157、

9株の O26、6株の O111、6株の O103 について、O157 堺株のゲノム配列を基にした前ゲノム PCR スキャンニング (WGPS) 解析と O157 マイクロアレイを用いた Comparative Genomic Hybridization (CGH) 解析によって大規模なゲノム多様性解析を行った。O26・O111・O103 EHEC (それぞれ1株) の全ゲノム配列の決定は全ゲノムランダムショットガン法によって行った。また、O157 株間における IS629 存在部位の多様性を利用して O157 迅速菌株識別システムの開発を行った。その他の個別的な遺伝子解析 (O157 の TTSS エフェクターや RTX 様遺伝子の解析など) は一般的な遺伝的・分子生物学的な研究方法によって行った。

C. 研究結果

O157 EHEC のゲノム多様性解析では、O157 株間には予想以上のゲノム多様性が存在していることが明らかとなり、大きなサイズの構造多型はプロファージのバリエーション、また小さな構造多型の大部分は IS629 と ISEc8 が関与した変化であることを明らかにした。さらに、疫学マーカーとなりうる約 400 の variable 遺伝子を同定した (IS629 を用いた疫学ツールについては後述)。

O26・O111・O103 EHEC のゲノム多様性解析では、O157 堺株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていること、O157 特異的ゲノム領域や O157 特異的遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約 3分の2は全く存在しないことが明らかとなった。そこで、O26・O111・O103 EHEC

から、それぞれ1株を選定し、全ゲノム解析を行った。

O26・O111・O103 EHEC のゲノム解読により、O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド (85, 63, 5.6, 4.1 kb)、O111 のゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド (201, 98, 78, 8.1, 6.7 kb)、O103 のゲノムは、5.5 Mb の染色体と 1 種類のプラスミド (71 kb) からなることを明らかにした。さらに、3 株のゲノムの遺伝子探索とアノテーション等の作業を行い、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロファージと IS が存在することが明らかにするとともに、多数の菌株特異的遺伝子を同定した。また、各 non-O157 EHEC のゲノム配列は、国立感染症研究所の寺嶋らによる MLVA 解析用リポートの検索にも利用された。

O157 迅速菌株識別システムの開発に関しては、32 箇所の IS629 挿入部位を標的とした 2 組のプライマーセットからなる multiplex PCR 系を構築した。さらに、O157 の主要な病原遺伝子マーカーである 4 種類の遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *e-hly* 遺伝子) の検出系を組み込んだ。識別解像度の検定では、PFGE 型が異なる 200 株の O157 を 129 パターンに分類でき、集団感染事例株の検出も可能であった。そこで、TOYOBO (株) と共同で O157 IS-printing system としてキット化を行った。既に、マーケティング販売が始まっており、国立感染症研究所及び全国の地方衛生研究所の協力を得て、実際の検査機関でのシステムの有効性について検討を進めている段階にある。

その他、個別的な解析として、O157 EHEC の III 型分泌系 (TTSS) エフェクターの網羅的な検索を行い、39 種類のエフェクター蛋