

- Nakayama, Satoru Kuhara, Eric Oswald, Haruo Watanabe and Tetsuya Hayashi. Extensive Genomic Diversity and Selective Conservation of Virulence-Determinants in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biology*. 2007;8(7):R138
- Fumihiko Kawamori, Midori Hiroi, Tetsuya Harada, Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Takashi Masuda and Norio Ohashi ; Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE, *J Med Microbiol*. 57, 58-63, 2008
- Ichiro Tatsuno, Jun Sawai, Akira Okamoto, Masakado Matsumoto, Masaaki Minami, Masanori Isaka, Michio Ohta and Tadao Hasegawa Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains. *Microbiology* 153 (2007), 4253-4260
- Seto, K., Taguchi, M., Kobayashi, K., Kozaki, S. : Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1215-1222, 2007.
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Tsukamoto, T. : Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.*, 56:1467-1473, 2007.
- Shimosako, J., Onaka, T., Yamanouchi, M., Yokota, M., Nakamura, T., Fujii, F., Matsumoto, E., Shibata, H., Fukuda, M., Tanaka, T. : An Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Shigella sonnei* at a Day Care Nursery in Sakai City, 2006., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:408-409, 2007.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 152: 457-61.
- Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS, 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 3996-4005.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N, 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.
- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-5.

- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N, 2007. An outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus. *J Clin Microbiol* 45:1247-1349
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N, 2007. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 13: 1519-1525.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, 2007. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 620-2.
- Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N, 2007. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis*: 786-788.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N, 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17: 133-41.
- Susana Guix, Miyuki Asanaka, Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford, Frederick H. Neill, Robert L. Atmar, and Mary K. Estes Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *J Virol*, 81: 12238-12248.
- 片山和彦 NoV 複製系における最近の知見 IASR Vol. 28 p 293-294 : 2007 年 10 月号
- 片山和彦 養護教諭のなんでも質問箱 NoV について 心と体の健康」, Vol. 11 No. 117 Nov. p86-88, 2007 株式会社 健学社
- 田中智之、武田直和 ノロウイルスの現状と院内感染対策。感染症 37(3): 94-104, 2007
- 田中智之、奥田真珠美 ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。小児科診療 70(6): 985-990, 2007
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 院内発生時における感染拡大防止対策—ノロウイルス 月刊薬事 49(11): 37-42, 2007
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒 食と健康 10: 6-14, 2007
- 田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和 ノロウイルス迅速抗原検査 検査と技術 36(3): 235-239, 2007
2. 学会発表
- 寺嶋 淳: 腸管出血性大腸菌感染症の動向と分離菌株の分子疫学解析。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京
- 杉本典彦、寺嶋 淳、伊豫田 淳、嶋 謙介、呉 育羅、日野根谷淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二: 我が国で分離した様々な血清型の腸管出血性大腸菌を用いた志賀毒素ファージを標的とした PCR-RFLP 法の評価。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京
- 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄: 2006 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 11 回腸管出血性大腸菌感染症シ

- ンポジウム、2007年8月、安曇野市
- 伊豫田 淳、山本章治、佐藤人美、寺嶋 淳、渡邊治雄：LEEの発現制御因子 Gr1A による病原性遺伝子群グローバル発現制御機構。第11回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007年8月、安曇野市
- 齋藤 剛仁、伊豫田 淳、陸 彦、志牟田 健、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌におけるエンテロヘモリシンの発現制御機構。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 伊豫田 淳、齋藤 剛仁、石原 朋子、小泉 信夫、志牟田 健、陸 彦、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌の Gr1R-Gr1A 制御システムによる病原性関連遺伝子群の協調発現機構。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 大岡唯祐、小椋義俊、井口 純、Asadulghani、中山啓介、戸邊 亨、寺嶋 淳、渡邊治雄、林 哲也：non-0157 EHEC ゲノムにおける IS 分布の解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 三浦雅史、伊豫田 淳、大西 真、安部 裕順、戸邊 亨、林 哲也、泉谷秀昌、寺嶋 淳、渡邊治雄：感染宿主細胞の形態維持に關与する病原性因子の機能解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 泉谷秀昌、大西 真、伊豫田 淳、寺嶋 淳、山崎伸二、石原朋子、渡邊治雄：サチラーゼ様プロテアーゼをコードする subA 遺伝子の志賀毒素産生性大腸菌株における分布状況。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 陸 彦、伊豫田 淳、トウマ クラウディア、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：LEE非保有型 STEC に存在する接着因子 EibG の機能解析と保有株の系統解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、田村和満、渡邊治雄：2006年における 0157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
- 松本昌門、鈴木匡弘、高橋正夫、皆川洋子、太田美智男：愛知県で検出された腸管出血性大腸菌 0157 の志賀毒素産生性に関する検討。第11回腸管出血性大腸菌シンポジウム、安曇野市 2007 8.23.
- 小笠原 準、和田崇之、梅田 薫、北瀬照代、長谷 篤、石井營次：平成19年に大阪市内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌感染症集団事例について、第34回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会、2007年11月、和歌山市
- 下迫純子、横田正春、大中隆史、田中智之、柴田仙子：保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例、第50回日本感染症学会 中日本地方会学術集会、2007年10月、神戸市
- 下迫純子、山内昌弘、横田正春、大中隆史、田中智之、藤井史敏、松本恵美子、柴田仙子、福田雅一：保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例、第34回地方衛生研究所全国協議会 近畿支部細菌部会研究会、2007年11月、和歌山市
- 西海弘城、山岡政興：パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出、兵庫県立健康環境

- 科学研究センター紀要(in press)、2008年
- 江藤 良樹、中村 祥子、濱崎 光宏、村上光一、竹中 重幸、堀川 和美、大岡 唯祐、林 哲也、楠本 正博、寺嶋 淳：腸管出血性大腸菌 0157 の IS-printing 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動の比較。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008. 3. 7-8
- 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上光一、竹中 重幸、堀川 和美：福岡県で分離された稀な O 群血清型の腸管出血性大腸菌について。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008. 3. 7-8
- Shirato H, Takeda N, 2007. 10. Interaction between norovirus and histo-blood group antigens. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand.
- Oka T, Okamoto R, Arita T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki U, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, Hansman GS, 2007. 9. Detection of Human Sapovirus from clams in brackish water. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.
- Hansman GS, Sano D, Ueki U, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007. 9. Sapovirus in Water, Japan. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.
- Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2007. 5. Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- Oka T, Hansman G, Ishida S, Saito H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Shibata C, Ishizuka S, Takeda N, 2007. 5. Viral Loads of Sapovirus. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- Hansman G, Oka T, Takeda N, 2007. 5. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.
- 本村和嗣, 岡智一郎, Hansman GS, 横山勝, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007. 10. 2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 北元憲利, 三好龍也, 内野清子, Hansman GS, 武田直和, 田中智之, 2007. 10. サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2007. 10. ノロウイルス 3C 様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, Hansman GS, 岡智一郎, 武田直和, 2007. 10. サポウイルスによる胃腸炎集団発生事例- 北海道-. 第 55 回日本ウ

- イルス学会学術集会. 札幌.
- 小澤一弘, 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 武田直和, 2007. 10. 調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 山本真民, 岡智一郎, Hansman GS, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. サポウイルス粒子形成機構の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 斎藤博之, Hansman GS, 岡智一郎, 武田直和, 2007. 10. 保育園で流行したサポウイルスの解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, Hansman GS, 武田直和, 2007. 10. サポウイルスによる乳幼児散発性胃腸炎の分子疫学解析- 熊本県-. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman GS, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス組換え粒子の発現. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和, 2007. 10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007. 10. サポウイルスプロテアーゼ・基質複合体の構造解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- Hansman GS, Oka T, Takeda N, 2007. 10. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 武田直和, 2007. 9. 食品媒介ウイルス感染症. 第 28 回日本食品微生物学会学術総会 教育講演. 東京.
- 武田直和, 2007. 6. ノロウイルスの大流行: 特徴と原因. 第 48 回 日本臨床ウイルス学会 シンポジウム. 富山.
- 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2007. 10. NoV3C様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.
- 染谷雄一 第 8 回プラス鎖 RNA ウイルス国際シンポジウムの報告 第 19 回ウイルス性下痢症研究会、2007 年 10 月、札幌
- 片山和彦 他 4 名 片山和彦, Sharp T, Ling W, Guix S, Estes M K. Complete reverse genetics system of the human norovirus 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌
- 片山和彦 NoV の新知見 ウイルス性下痢症研究会第 19 回学術集会、2007 年 10 月、札幌
- 片山和彦 10 月 26 日(新宿) NoV 感染症(食中毒)と予防対策」 株式会社中部衛生検査センター 食品衛生研修会
- 福田伸治、三好龍也、内野清子、中村 武、吉田永祥、田中智之、28 回衛生微生物技術協議会第研究 岡山市 2007 年 7 月
- 田中智之 ノロウイルス食中毒と二次感染

第 28 回日本食品微生物学会学術総会 ラ
ンチオンセミナー 2007 年 9 月 東京都
田中智之、田尻 仁 ノロウイルス迅速検査
キットの開発 第 56 回日本感染症学会東
日本地方会 東京都 2007 年 10 月
中村 武、三好龍也、内野清子、福田伸治、
田中智之 市販ノロウイルス検査キット
の評価 第 55 回日本ウイルス学会学術集
会 札幌市 2007 年 10 月
北元憲利、三好龍也、内野清子、Grant
S. Hansman、武田直和、田中智之
サポウイルスに対する単クローン抗体の
樹立とその交叉性 第 55 回日本ウイルス
学会学術集会 札幌市 2007 年 10 月
太田真紀子、中長摩利子、木村定美、最上友
紀子、鈴木保宏、中山雅弘、田中智之、位
田 忍 ノロウイルス腸炎に関連した Rey
症候群を発症した乳児クローン病の一例
第 34 回日本小児栄養消化器肝臓学会 仙
台市 2007 年 10 月
黒木俊郎、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎：
クリプトスポリジウムおよびジアルジア
感染症の感染経路の検討、第 67 回日本寄
生虫学会東日本支部大会、2007 年 10 月 6
日 東京
Morita, S., Ishii, T., Akiba, M., Yagita,
K., Kuroki, T., Katayama, H., Haramoto,
E. and Hirata, T., Quantifying the
removal of pathogenic protozoa during
activated sludge processing,
International Water Association ASPIRE
Conference and Exhibition, Parth (2007)
Morita, S., Nakashima, T., Urakami, I.,
Iwasaki, T. and Hirata, T.,

Inactivation of *Cryptosporidium* by a
combination of UV irradiation and
chlorination, International Water
Association ASPIRE Conference and
Exhibition, Parth (2007)

西澤博, 金志勲, 秋葉道宏, 浅見真理, 国包
章一. 利根川水系におけるクリプトスポリ
ジウムとジアルジア汚染の実態調査. 第
58 回全国水道研究発表会 ; 2007 年 5 月 ;
釧路. 第 58 回全国水道研究発表会講演集.
p. 610-611.

Kyungju Kim, Hiroyuki Katayama and
Shinichiro Ohgaki (2007) Development of
a concentration system for
Cryptosporidium oocysts and
bacteriophage Q β for single sample by
using hydroxylapatite, Proc. Of 14th
International Symposium on
Health-Related Water Microbiology, Sep
9-15, 2007, Tokyo, Japan

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

「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」

分担研究報告書

主任研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
分担研究者	渡辺治雄	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	大岡 唯祐、林 哲也	宮崎大学・医学部・医学科
協力研究者	楠本 正博	東洋紡・バイオフィロンティアプロジェクト推進室

研究要旨 2007年に分離された腸管出血性大腸菌(EHEC)について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。PFGE解析結果は、BioNumericsによる系統樹作成に基づきサブタイプ名の付与とPFGEパターンのデータベース構築に使用した。EHEC O157では、2150株に対して2007年に分離された新しいサブタイプとして790種類、2006年に分離されたことのあるサブタイプが58種類、その他が22種類見いだされた。また、EHEC O26では、306株に対して164種類のサブタイプが見出された。一方、広域共通パターンを示すEHEC株については、XbaI消化でのパターンが同一と考えられるO157では、3ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが37種類存在したが、そのうち5箇所以上の都道府県で分離されかつBlnI消化でも一致するパターンは6種類存在していた。特に、22都府県から119株が分離されたType No c47の株では、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)でも大部分の株が同一リピート数を示し、これらの株の遺伝学的関連性が高いことが示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症の発生では、特に広域に及ぶ同時多発的な散発事例を早期に探知し、その拡大を未然に防ぐことが重要である。本研究では、腸管出血性大腸菌のPFGEによる解析から国内分離株の遺伝子型に基づく動向を把握し、広域発生事例等の拡大防止対策に貢献すること

を目的とした。特にEHEC O157については、広域分離株を中心にPFGE及びMLVAによる解析を行い、株間の遺伝学的な関連性を調べることでこれらの方法の実用性について検討した。また、一部の広域分離株では、IS-printing systemを同時に使用することにより本システムのO157株識別能について検討した。

B. 研究方法

平成 19 年度に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析を行った。結果については、E-mail により菌株送付機関に返信するとともに、感染研のサーバー上で全国の地研の担当者に対して ID とパスワードの組合せによる限定公開を行った。MLVA については、米国 CDC が使用している 9 組の primer を用いて行った。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社) で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国) を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130xl Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社) を用いた。PFGE 及び MLVA の結果は BioNumerics (Applied Maths 社) を用いて解析を行った。IS-printing system (東洋紡) では、昨年度版に新たな検出項目が加わった改訂版を用いて解析を行った。方法は、添付のプロトコールに準じた。

+

C. 研究結果

1. PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイプピング

EHEC O157 については、2007 年に分離・送付された 2150 株が、2007 年に分離された新しいサブタイプとして 790 種類、2006 年に分離されたことのあるサブタイプが 58 種類見いだされ、集団発生由来株等がクラスターを形成した(図 1)。EHEC O26 についても同様に、集団発生由来株がクラスターを形成した(図 2)。後述するように、EHEC O157 では散发事例由来株においても *Xba*I 消化による PFGE 解析結果において同一クラスターに属する分離株が検出された。O157 以外の血清群の株については、このようなクラスター形成をする散发事

例由来株はみられなかった。

2. EHEC における広域共通パターンを示す株の解析

2007 年に分離された 2150 株の EHEC O157 は、870 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 37 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されていた。このうち、2007 年に出ているパターンである、Type No.(TN) c47 のパターンについては、22 都道府県から 119 株が分離されており、ほとんどが散发事例由来株であるが大学における集団発生由来株も含まれていた。これらの株の分離期間は 4 月から 10 月の長期に及んでいた(図 3)。また、TN c47 のパターンとはわずかに異なる類似のパターン(TN c64, c68, c79 を示す株)が TN c47 の株とともに 4 つの異なる家族内事例からも分離されていた。これらの TN c47 及びその類似株は、BlnI による PFGE の結果においても 112 株が同一パターンを示した。その他に、5 箇所以上の異なる都道府県において分離される広域共通パターンとして、2005 年に引き続いて分離されていたパターンである TN a829 及び TN a259、また、2006 年に引き続いて分離されたパターンである TN b142, b293, b705 が見いだされた(図 4 及び 5)。これらの 6 種類のパターンを示す株はその大部分が *Xba*I の結果だけではなく BlnI の結果においても同一パターンを示していることから、極めて clonality の高い株であることが示唆された。また、TN b142 については、散发事例だけでなく複数の集団発生(OB)をも引き起こしており、いずれも焼肉店における集団発生であるが、両者の関連性を示唆するような疫学的情報は得られていない。

広域に及ぶ分離株である TN c47 及びその類似のパターンを示す株、計 119 株について MLVA

を行った結果、83 株はすべての遺伝子座においてリピート数が一致し(A型)、1 遺伝子座において 1 ないし 2 だけリピート数が異なる変異株(Single Locus Variant; SLV1 ないし SLV2)は 31 株、その他に複数の遺伝子座においてリピート数の異なる株が 5 株存在していた(表1)。PFGE において XbaI あるいは BlnI 消化のパターンが異なる株でも、MLVA のタイプは A 型となり、すべての遺伝子座でのリピート数が TN c47 株と同じであった。

IS-printing system による解析には TN c47 を示す 21 株の EHEC O157 を用いたが、MLVA で違いがでる株においても IS-printing system ではすべて同一パターンとなった。

3. PulseNet Japan による解析結果の公開

平成 18 年度途中から解析結果について感染研のサーバーによる地研への限定公開を開始した。複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等について、感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部を公開し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。デンドログラムによるサブタイピングでは、2007 年分離株に対しては番号に“c”を付加したサブタイプ名を付与した。また、PulseNet Japan で閲覧できるデンドログラムでは、分離株全てを含むデンドログラムではなく各々のサブタイプの代表株についてのみ作成した。したがって、一部には、異なるサブタイプである株が同一クラスターに属する場合が出ている。現在解析結果が PDF での閲覧という形式になっているが、個々の機関においても全国的な発生動向を把握するためには、全国的な集計が可能となるようなファイル抽出機能も今後検討が必要と考えられる。

D. 考察

XbaI 消化による PFGE の結果から、EHEC O157 においては同一パターンと考えられる株が広域から分離されていた。広域分離株のうち特に多くの異なる地域から分離されている株には 6 種類のパターンがあり、2005 年及び 2006 年に観察されていたパターン(TN a259, a829, b142, b293, b705)があることから、これらの株については MLVA ではリピート数の異なる変異株も含まれることが考えられた。O26 を含めて O157 以外の血清群についてはこのような広域分離株は探知されず、食品・食材における菌の生残性についての差を反映している可能性も考えられた。TN c47 の株では、一部ではあるが IS-printing system においても PFGE 及び MLVA と同様、同一パターンであることが示されていることからこれらの株の遺伝子構成が極めて類似していることが明らかであり、その関連性が高い可能性が示唆された。なお、TN c47 株が分離された事例においては、焼肉、生レバー等の食肉が原因食品として疑われた事例が複数確認された。

E. 結論

2005 年及び 2006 年に続いて 2007 年の EHEC O157 においても PFGE で共通パターンを示す広域分離株が存在していることが明らかになった。特に 2007 年に初めて出現したパターンである TN c47 を示す O157 では、MLVA 及び IS-printing system においても遺伝子構成が極めて類似していることが明らかとなり、集発由来株のみならず散発事例由来株においてもお互いの関連性が高い可能性が示唆された。このような分離株の解析情報を迅速に共有し疫学調査に活用することで感染源の探知・感染拡大の阻止に結びつくことが

期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Jan;61(1):58-64.

2. Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Asadulghani, Jun Terajima, Jean-Philippe Nougayrede, Ken Kurokawa, Kousuke Tashiro, Toru Tobe, Keisuke Nakayama, Satoru Kuhara, Eric Oswald, Haruo Watanabe and Tetsuya Hayashi. Extensive Genomic Diversity and Selective Conservation of Virulence-Determinants in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biology.* 2007;8(7):R138

2) 学会発表

1. 寺嶋 淳:腸管出血性大腸菌感染症の動向と分離菌株の分子疫学解析。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

2. 江藤良樹、中村祥子、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、堀川和美、大岡唯祐、林哲也、楠本正博、寺嶋 淳:腸管出血性大腸菌 O157 の

IS-printing 法とパルスフィールドゲル電気泳動法の比較。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

3. 杉本典彦、寺嶋 淳、伊豫田 淳、嶋 謙介、呉 育羅、日野根谷淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二:我が国で分離した様々な血清型の腸管出血性大腸菌を用いた志賀毒素ファージを標的とした PCR-RFLP 法の評価。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

4. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄:2006 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 11 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007 年 8 月、安曇野市

5. 伊豫田 淳、山本章治、佐藤人美、寺嶋 淳、渡邊治雄:LEE の発現制御因子 GrIA による病原性遺伝子群グローバル発現制御機構。第 11 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007 年 8 月、安曇野市

6. 齋藤 剛仁、伊豫田 淳、陸 彦、志牟田 健、大西 真、寺嶋 淳、渡辺治雄:腸管出血性大腸菌におけるエンテロヘモリシンの発現制御機構。第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪

7. 伊豫田 淳、齋藤 剛仁、石原 朋子、小泉信夫、志牟田 健、陸 彦、大西 真、寺嶋 淳、渡辺治雄:腸管出血性大腸菌の GrIR-GrIA 制御システムによる病原性関連遺伝子群の協調発現機構。第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪

8. 大岡唯祐、小椋義俊、井口 純、Asadulghani、中山啓介、戸邊 亨、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:non-O157 EHEC ゲノムにおける IS 分布の解析。第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪

9. 三浦雅史、伊豫田 淳、大西 真、安部 裕順、戸邊 亨、林 哲也、泉谷秀昌、寺嶋 淳、渡辺治雄：感染宿主細胞の形態維持に關与する病原性因子の機能解析。第 80 回日本細菌学会総会、2007年 3 月、大阪

10. 泉谷秀昌、大西 真、伊豫田 淳、寺嶋 淳、山崎伸二、石原朋子、渡辺治雄：サチラーゼ様プロテアーゼをコードする subA 遺伝子の志賀毒素産生性大腸菌株における分布状況。第 80 回日本細菌学会総会、2007年 3 月、大阪

11. 陸 彦、伊豫田 淳、トウマ クラウディア、大西 真、寺嶋 淳、渡辺治雄：LEE 非保有型 STEC に存在する接着因子 EibG の機能解析と保有株の系統解析。第 80 回日本細菌学会総会、2007年 3 月、大阪

12. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2006 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 80 回日本細菌学会総会、2007年 3 月、大阪

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

図1 Dendrogram of EHEC O157:H/-isolates in Japan (1986 entries)
 (2007/1/1-12/31) Tol: 1.2%

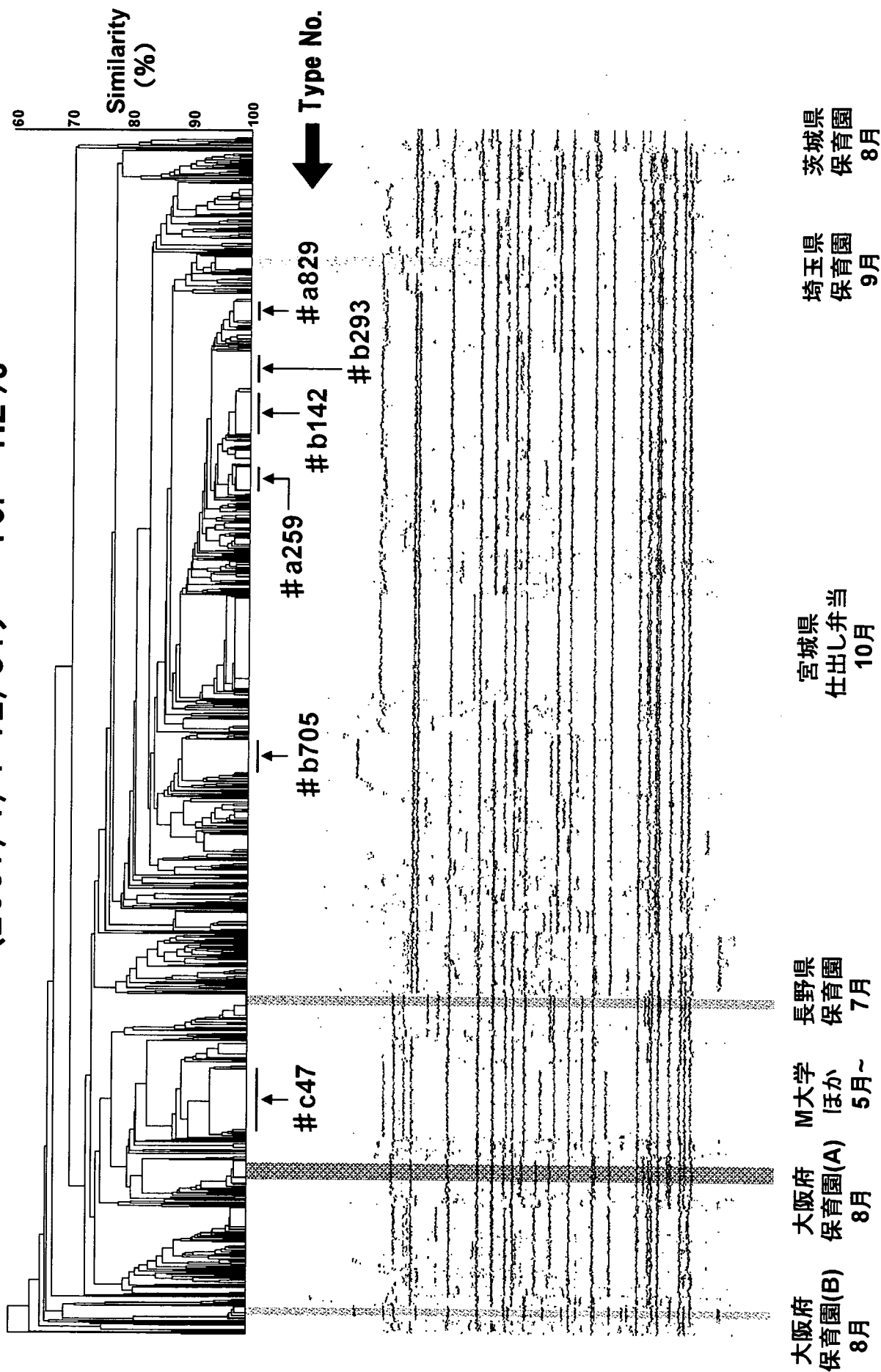


図2 Dendrogram of EHEC O26 isolates in Japan (285 entries)
 (2007/1/1-12/31) Tol: 1.2%

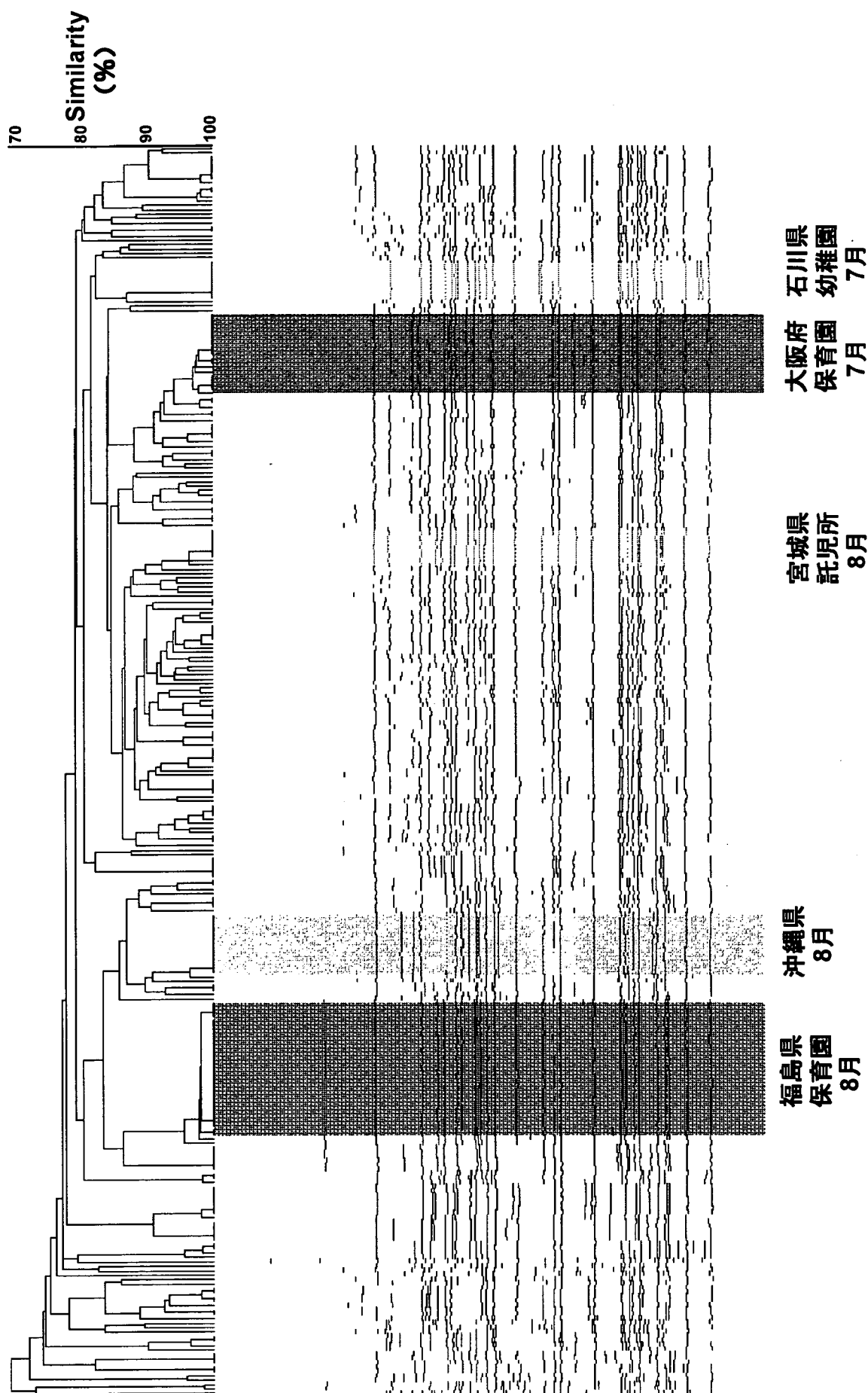


図3 2007年に分離されたEHEC O157:H7でPFGEパターン的一致している事例の分布図(1)

- ☆ Type No. c47 (M大学関連) May-Jun
- ★ Type No. c47 (その他) Apr-Oct
- Type No. c64 Jun
- ◎ Type No. c68 Jun-Aug
- ▲ Type No. c79 Jul

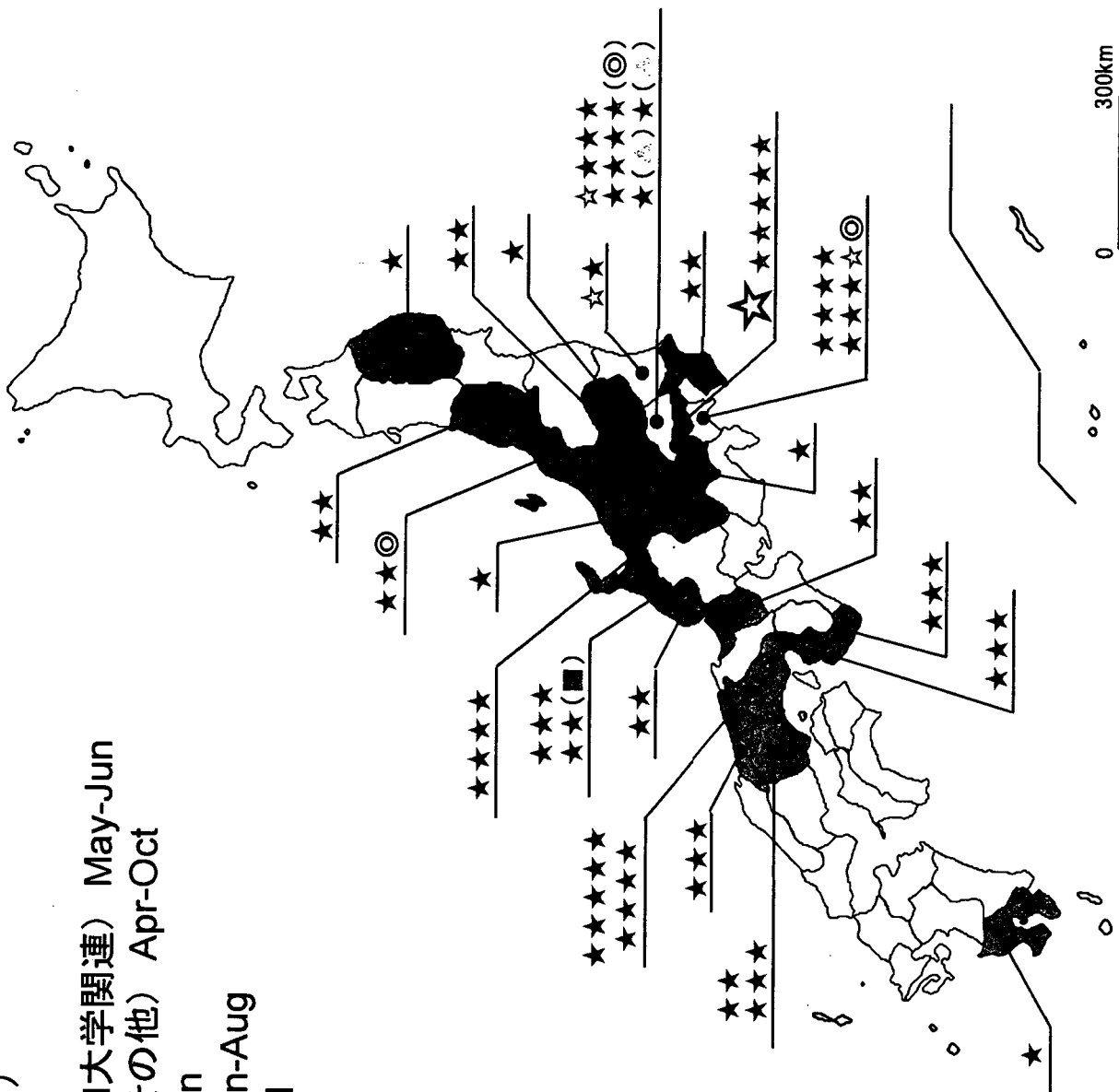
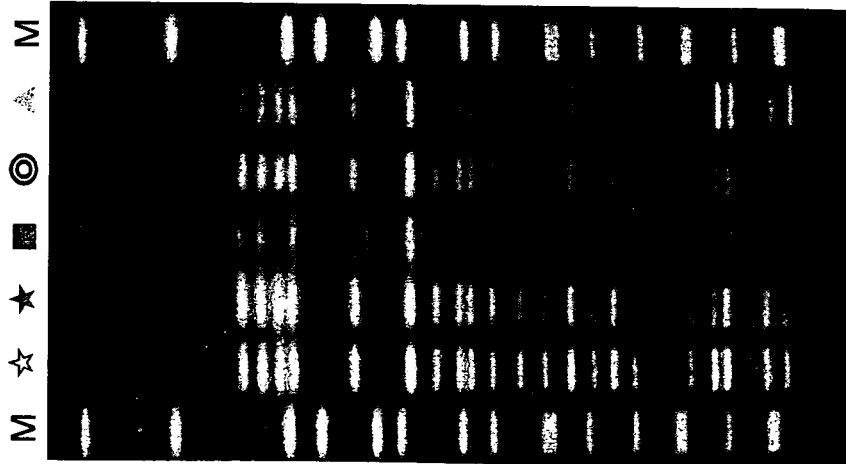
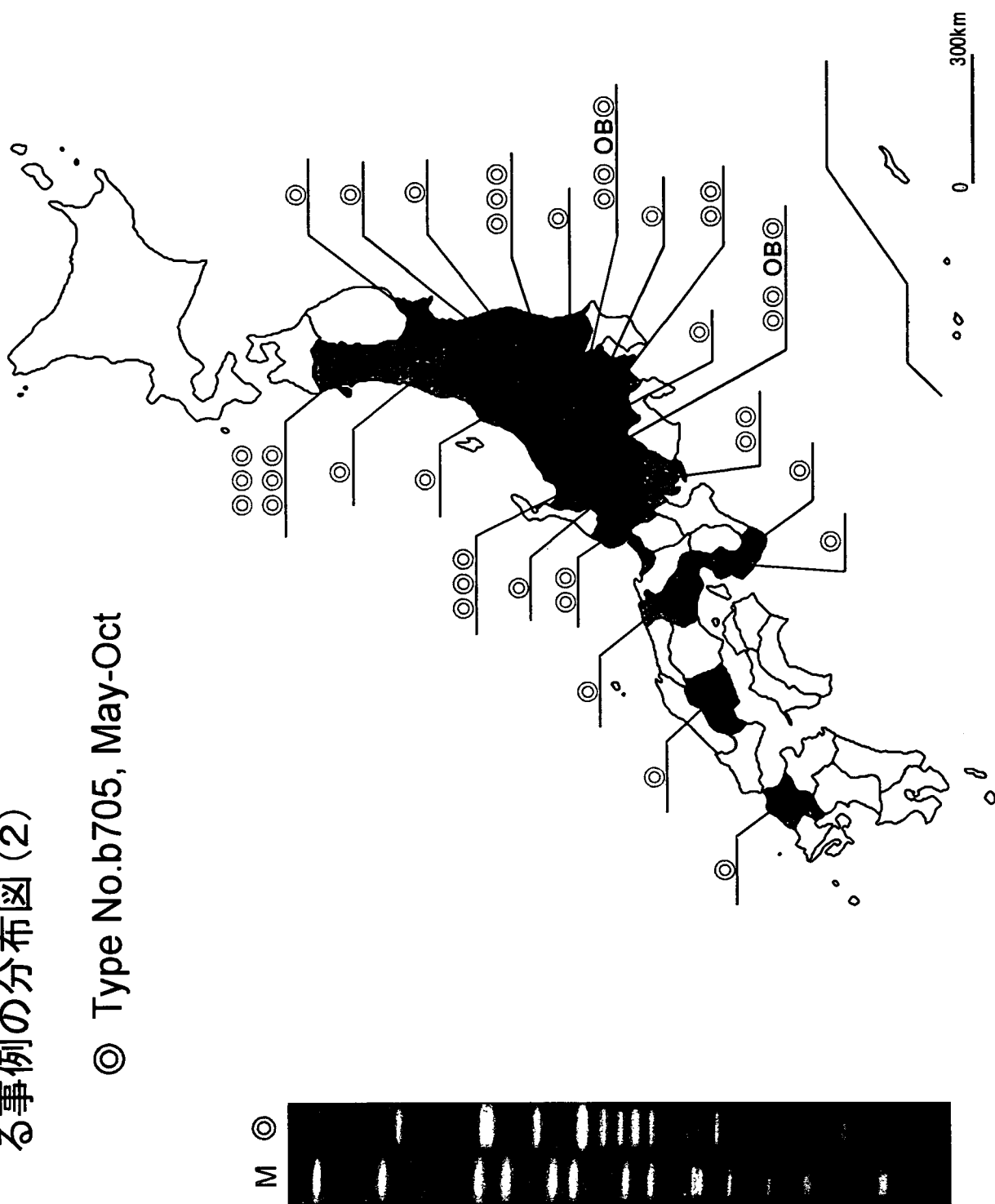


図4 2007年に分離されたEHEC O157:H7でPFGEパターン的一致している事例の分布図(2)



© Type No.b.705, May-Oct

図5 2007年に分離されたEHEC O157:H7でPFGEパターンの一致している事例の分布図(3)

- ◆ Type No.a259, Jun-Oct
- Type No.a829, Mar-Dec
- ▲ Type No.b142, Apr-Nov
- ☆ Type No.b293, Apr-Nov

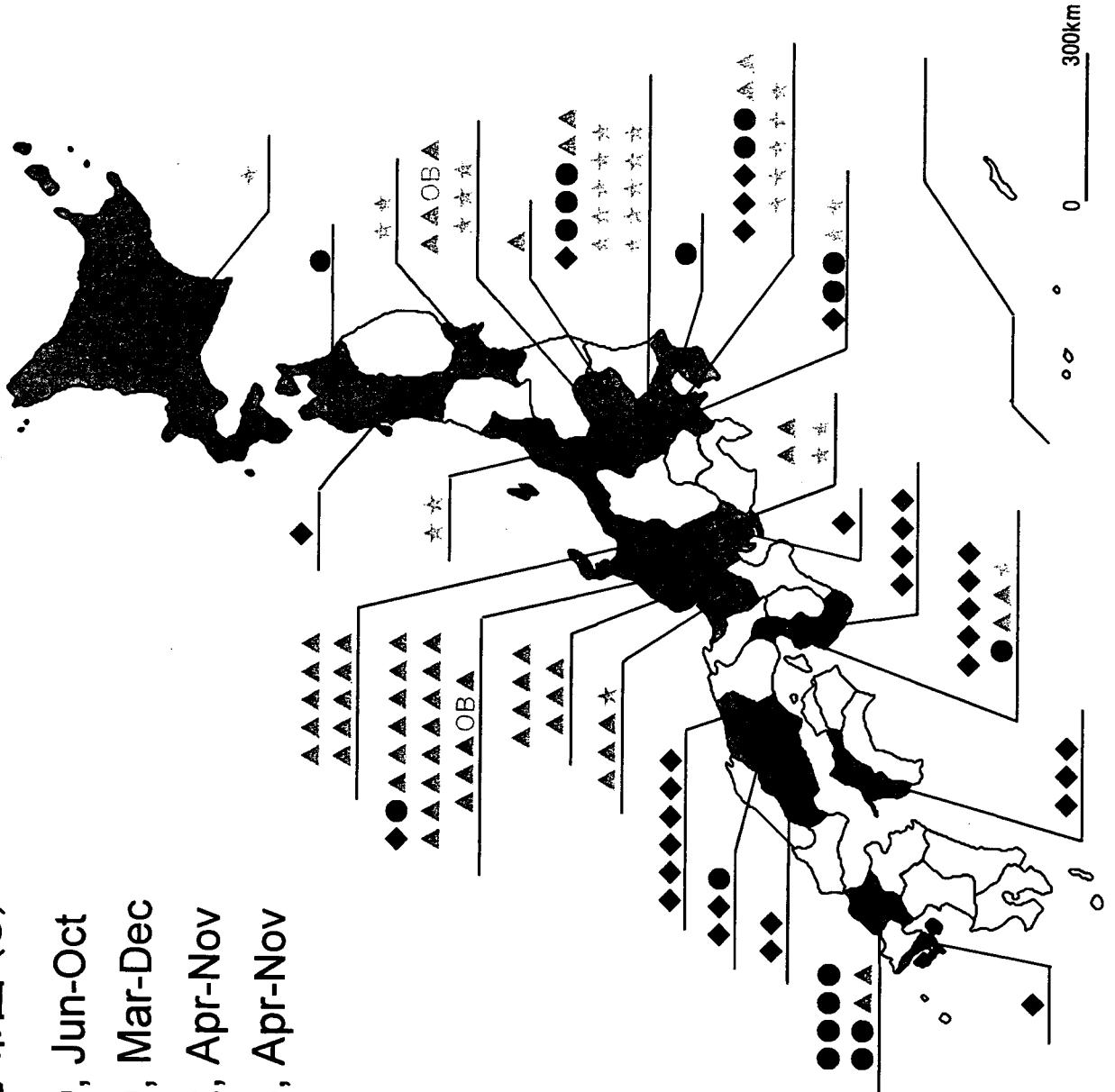
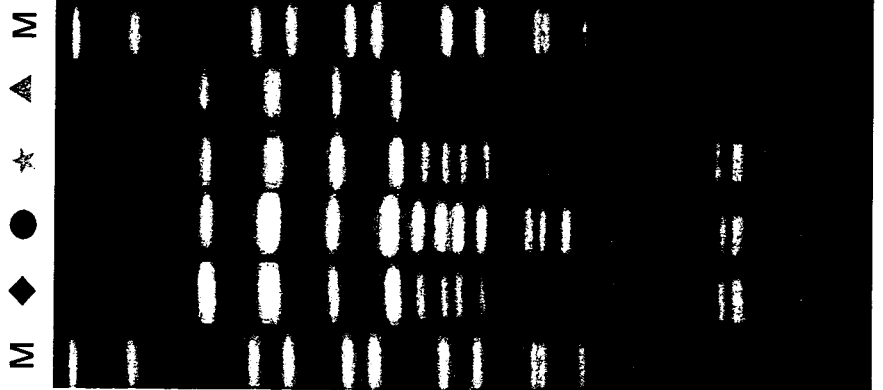


表1 2007年に広域から分離された腸管出血性大腸菌O157:H7で、TN c47を示す、119株のMLVAによる解析
 (9遺伝子座におけるリポート数の比較)

各VNTR lociにおけるリポート数											株数	
	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA	株数
	5	16	7	15	3	7	5	4	c47	07BL001	A	83
5	16	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	B	9
5	17	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	C	1
5	16	7	15	3	7	5	8	4	c47	07BL001	D	1
5	16	7	16	3	7	5	7	4	c47	07BL001	E	10
5	16	7	14	3	7	5	7	4	c47	07BL001	F	2
5	16	8	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	G	1
5	16	7	15	3	7	5	6	4	c47	07BL001	H	2
5	16	7	15	3	7	5	7	6	c47	07BL001	I	2
5	14	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	J	3
5	15	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	K	3
5	13	9	16	7	4	10	6	21	c47	07BL001	L	5
5	6	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	M	5
5	16	7	9	3	7	5	7	4	c47	07BL001	N	5
5	16	7	16	3	7	5	7	5	c47	07BL001	O	5

「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」

北海道・東北・新潟ブロック内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例を用いたパルスフィールドゲル電気泳動システム（PFGE）と IS-Printing system の比較検討

分担研究者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
協力研究者	山口 敬治、森本 洋、駒込 理佳	北海道立衛生研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター
	八柳 潤	秋田県健康環境センター
	藤井 伸一郎、高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
	谷津 壽郎	宮城県保健環境センター
	金子 紀子	山形県衛生研究所
	渡邊 奈々子、小澤 奈美	福島県衛生研究所
	細谷 美佳子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	小関奈那美、沼田 昇	仙台市衛生研究所

研究要旨：北海道・東北・新潟ブロック内の各地研管内で発生した 88 事例 133 株の腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例について、PFGE と IS-Printing system について比較検討を行った。それぞれの施設において PFGE のタイプ分けと IS-Printing System によるタイプ分けを行った結果、集団事例における PFGE と IS-Printing System でのタイプ分けは良く一致した。IS-Printing System による分子疫学的分析は、PFGE に比べ菌分離後の分子疫学的分析までの時間が短く済み、4 時間ほどで分析結果を得られるという利点があり、事件発生時の初期の段階で集団事例の可能性を確認する有効な手段であると思われる。また、PCR ベースで分析が行えるため、高額な装置を用意する必要がなく、試験検査機能を持つ保健所や食肉衛生検査所においても分析が行えるなど、PFGE の補助的な分析方法として利用価値が高いことが示唆された。しかし、散発事例については、PFGE の結果と IS-Printing System の結果が一致しない事例もあり、また、感染研によるタイプ分けで、同一のタイプに分類された菌株が IS-Printing System では施設間で異なったパターンを示す場合もあり、Diffuse Outbreak における分析能は更に検討をする必要があると思われる。IS-Printing System では、1stセット、2ndセットそれぞれ 18 のバンドの有無を比較するため、比較する菌株数が多くなると、大変見づらく比較検討しづらいと言う欠点がある。そこで、今回、このデータのコード化を試み、スムーズな比較検討が行えた。今後、更により良いコード化を検討することで、施設間でのデータの共有等に役立つものと考えられる。

A. 研究目的

食中毒事件発生時に行う疫学調査は、食品由来感染症の拡大を防ぐと共に、再発防止のために大変重要なものである。近年、腸管出血性大腸菌 O157

やカンピロバクター等の原因菌の DNA を用いた分子疫学的分析が感染源究明に利用され、その有用性が報告されている。その中でパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法は、特に優れた分子疫

学的解析法であり、国立感染症研究所を中心にデータベースの構築が進んでいる。しかしながら、PFGE による分子疫学分析は、菌の分離後、プラグの作成、制限酵素処理、電気泳動とやや迅速性に欠ける部分がある。

腸管出血性大腸菌 O157 について、PCR ベースで遺伝子型別が可能な IS-Printing System のキットが開発され、菌株分離後の分子疫学的分析までの時間が大幅に短縮された。また、PCR ベースであり、高額な PFGE 装置を必要としないことで、PFGE 装置が配備されていないところでも利用可能である。そこで、今回このキットを利用し、PFGE と IS-Printing System を比較しその有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 菌株：ブロック内各地研の管内で発生があった腸管出血性大腸菌 O157 菌株について、88 事例 133 株（施設 A：18 事例 61 株、施設 F：7 事例 18 株、施設 E：17 事例 26 株、施設 D：6 事例 10 株、施設 C：5 事例 5 株、施設 B：9 事例 11 株、施設 H：8 事例 11 株、施設 G：9 事例 10 株、施設 I：9 事例 9 株）を用いた（表 1-1～表 1-3）。

2. PFGE：

感染研にて PFGE タイプ分けを行ったものについてはそれを用い、そうでないものについては感染研ニュープロトコールに準拠した。

3. IS-Printing system

IS-Printing system (Version2) (TOYOBO) の取扱説明書に従った。

バンドの有無により有を 1、無を 0 とし、表を作成しそれぞれの菌株について類似性を比較した。また、IS-Printing System のパターンコード化について検討を行うため、表をもとにして病原性関連遺伝子 (hlyA、eae、Stx1、Stx2) と 1stセットの 1～16、2ndセットの 1～16 を 4 バンドごとに 16 進数に変換し、最初に病原性関連遺伝子の 1 文字を付け、1stセットの IS エリア 4 文字、2ndセットの 4 文字の順に記載して各菌株の比較を行った。

C. 研究結果

1. 施設 A

PFGE によるタイプ分け（類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トレランス設定：1.0%、クラスター範囲：90.0～100.0%）の結果、AA～AK までの 11 クラスターに分類された。集団事例 1 はタイプ AA、事例 2 はタイプ AJ、事例 3 はタイプ AD、事例 4 はタイプ AI、事例 5、事例 6、事例 7 はタイプ AK、事例 8 はタイプ AH に分類された。散発事例 11、事例 13、事例 14、事例 15 がタイプ AC に、事例 12、事例 17、事例 18 がタイプ AE に分類され、事例 10 はタイプ AB、事例 9 はタイプ AF、事例 16 はタイプ AG にそれぞれ分類された（図 1）。

IS-Printing System では、16 パターンに分かれた。集団事例 1 が D-C69BD23A、事例 2 が F-F35F783B、事例 3 が F-D3DF727B、事例 4 が F-19CB4282、事例 5 が 7-10884000、事例 7 が F-93529904、事例 8 が F-93CB447B で事例内菌株はそれぞれ同一のパターンを示したが、事例 6 については F-10929904 と 7-00929904 の異なったパターンとなった。散発事例 11 と事例 14 が F-D3DF527B、事例 12 と事例 17 が F-D3DF527A とそれぞれ同一のパターンとなり、事例 13 が F-729BD23A、事例 16 が F-D3DF727A、事例 18 が F-D3CF727A となった（表 2）。また、PFGE のクラスター分けでタイプ AD に分類された集団事例 3 とタイプ AC に分類された散発事例 15 が同一のパターンを示した。

MUG (+) の事例 5、事例 6、事例 7 は PFGE でタイプ AK に分類されたが、IS-Printing System では、3 事例とも異なったパターンを示した。また、同様にタイプ AC の事例 11、事例 14 と事例 13 と事例 15 では 3 パターン、タイプ AE の事例 12、事例 17 と事例 18 が 2 パターンに IS-Printing System でそれぞれ分類された（表 3）。

2. 施設 B

PFGE によるタイプ分け（類似係数：Dice、トレランス設定：1.2%、クラスター範囲：90.0～100.0%）の結果、BA～BE の 5 クラスターに分類された。集団事例 9 と散発事例 5、事例 7、事例 8

がタイプ BA、事例 1 がタイプ BB、事例 3 がタイプ BC、事例 2 と事例 4 がタイプ BD、事例 6 がタイプ BE に分類された (図 2)。また、感染研タイプ分けでは、事例 1 が c167、事例 2 が c163、事例 3 が c162、事例 4 が c160 に、また、事例 9 の菌株 9 と菌株 11 が b143、菌株 10 が b189 であった。

IS-Printing System では、9 パターンに分かれた。散発事例 1 から事例 8 については、F-C3DB521B、F-1683C203、D-429B62A3、F-9EA3C313、E-D3DB727A、D-110A5093、F-D3DF727B、F-D3DF727B とそれぞれ異なるパターンを示し、事例 9 については、3 菌株とも E-D3DF727B と同一のパターンを示した (表 4)。

PFGE のクラスター分類では、タイプ BA になった散発事例 5、事例 7、事例 8、集団事例 9 は IS-Printing System では、全て異なるパターンを示した。また、タイプ BD の事例 2 と事例 4 についても同様に異なるパターンとなった。(表 5)

3. 施設 C

PFGE によるタイプ分け (類似係数: Dice、トレランス設定: 1.2%、クラスター範囲: 90.0~100.0%) の結果、CA~CC の 3 クラスターに分類された (図 3)。菌株 S1 と S2 は 100% の一致を示したが、感染研による詳細な試験では、デンドログラム上では同一とされたもののバンド 2 本が異なると判定された。

IS-Printing System では、全ての菌株で F-01DF007A、F-01DB007B、3-015F0033、3-009B003A、1-010B0013 と異なるパターンを示した (表 6)。PFGE のクラスター分類では、タイプ CA に分類された事例 1、事例 2、事例 3 は感染研のタイプ分けでは、c466、c179、c465、と異なるタイプに分類され、IS-Printing System においても、それぞれ異なるパターンを示した。(表 7)

4. 施設 D

PFGE によるタイプ分け (感染研) では、事例 1 及び事例 2 と事例 3 の菌株 3 が c179 に、事例 3 の菌株 4 が c214 にタイプ分けされた。また、事例 4 及び事例 5 が c221 に、事例 6 については、c442、

c494、c522、c523 にタイプ分けされた。

IS-Printing System では、事例 1~事例 3 は 4 株とも F-C3DB527B と同一のパターンを示し、事例 4 と事例 5 が F-C3DF725B と同一パターンを示した。事例 6 では、菌株 7、菌株 8、が F-C3DF527B と同一パターンを示したが、菌株 9 は E-C3DF527B、事例 10 が F-C3DE527B と異なるパターンを示した (表 8)。

PFGE のタイプ分け (感染研) で異なるタイプに分類された事例 1、事例 2 及び事例 3 の菌株 3 と事例 3 の菌株 4 は、IS-Printing System において同一のパターンを示した。また、感染研のタイプ分けで全てことなるタイプに分類された事例 6 の菌株 7、菌株 8 が、IS-Printing System で同一パターンを示し、菌株 9、菌株 10 がそれぞれ異なるパターンを示した。(表 9)。

5. 施設 E

PFGE によるタイプ分け (類似係数: Dice、トレランス設定: 1.0%、クラスター範囲: 90.0~100.0%) の結果、集団感染事例由来株、家族内感染事例由来株はそれぞれ同一クラスターを形成し、散発事例も含め EA~EK の 11 クラスターに分類された。事例 1 はタイプ EJ、事例 2、事例 4、事例 8 と集団事例 5、家族内事例 17 はタイプ ED、事例 3 はタイプ EH、事例 6 はタイプ EB、事例 7 はタイプ EE、事例 9、事例 11 と家族内事例 13 はタイプ EA、家族内事例 12 はタイプ EF、家族内事例 14 はタイプ EC、事例 15 はタイプ EK、事例 16 はタイプ EI であった (図 4)。

IS-Printing System では、12 パターンに分類された。事例 1 の 2 菌株及び事例 2 は、IS 領域のパターンは一致したものの、菌株 2509 で Stx2 のバンドが無いため E-D3DE527B となり、事例 1 の 2511 と事例 2 が F-D3DE527B となった。事例 3 は F-729BD23A で単独のパターンを示し、事例 4、事例 5、事例 8、事例 15 が F-C3DB527B、事例 6、事例 9、事例 13 が D-C29B7232 でそれぞれ同一のパターンを示した。また、家族内事例 12 は F-F3DF723B、事例 13 は D-C29B7232、事例 14 は D-110B5093、事例 17 は F-D3DF727B で、それぞ