

18. 藤井克樹：ロタウイルスの新知見
ウイルス性下痢症研究会第24回学術集会
(大阪) 2012年11月12日
19. 藤井克樹：ロタウイルスゲノム解析
と分子疫学 衛生微生物技術協議会第33
回研究会(横浜) 2012年6月28-29日
20. Yoshiyuki Suzuki and Yuki
Kobayashi: Positive selection for
gains of N-linked glycosylation sites
in hemagglutinin during evolution of
H3N2 human influenza A virus. SMBE 2012,
Dublin, Ireland, June, 2012.
21. Yoshiyuki Suzuki and Yuki
Kobayashi: Positive selection for
gains of N-linked glycosylation sites
in hemagglutinin during evolution of
H3N2 human influenza A virus.
Influenza2012: One Influenza, One
World, Oxford, UK, September, 2012.
22. Yoshiyuki Suzuki: Roles of N-linked
glycosylation and net-charge of
hemagglutinin in influenza virus
evolution. The 1628th Biological
Symposium, National Institute of
Genetics, Mishima, Japan, November,
2012.
23. 鈴木 善幸: ウイルスの進化学的研
究. 名古屋大学、名古屋、2012. 5.
24. 鈴木 善幸: Evolution of
endogenous Borna-like nucleoprotein
elements. 日本進化学会第14回大会ワー
クショップ「ゲノム構造進化の分子機構」、
南大沢、2012. 8.
25. 鈴木 善幸: Reassortment in
evolution of viruses with segmented
genomes. ウイルス性下痢症研究会第24
回学術集会、中之島、2012. 11.
26. 鈴木 善幸: Roles of N-linked
glycosylation and net-charge of
hemagglutinin in influenza virus
evolution. 京都懇談会、京都大学、
2012. 11.
27. 鈴木 善幸: Roles of N-linked
glycosylation and net-charge of
hemagglutinin in influenza virus
evolution. 第35回日本分子生物学会年
会ワークショップ「ウイルス進化の統合
生物学的研究」、福岡国際会議場・マリ
ンメッセ福岡、福岡、2012. 12.
28. 鈴木 善幸: Roles of N-linked
glycosylation and net-charge of
hemagglutinin in influenza virus
evolution. 第22回生物多様性研究セン
ターセミナー、名古屋市立大学、名古屋、
2013. 1.
29. 村上耕介、岡智一郎、下池貴志、脇
田隆字、松田幹、片山和彦
Immunofluorescence microscopic
analysis of human norovirus VLP bound
to differentiated Caco-2 cells
日本農芸化学会2012年度大会、平成24
年3月22-26日 京都
30. Naoyuki Miyazaki、David Taylor、
Grant Houseman、Kosuke Murakami、
Kuniaki Nagayama、Kazuhiko Katayama、
Kazuyoshi Murata
単粒子クライオ電子顕微鏡解析によるサ
ポウイルスキャプシドの8-Å構造
第50回日本生物物理学会年会、平成24
年9月22-24日 名古屋
- 3). その他
(新聞) 指導、監修
1. 日経メディカル2013年1月号p33「ノ
ロウイルス変異株が猛威」

- | | |
|--|---|
| 2. HOTERES2013年2月8日号 p57-60
「猛威をふるったノロウイルスを検証」 | 日 モーニングバード! |
| 3. 徳洲新聞 2013年1月14日号 緊急特別企画 「ノロウイルス感染対策;今冬は過去10年で2番目の高水準 感染ピークは12-1月で警戒厳重に」 | 6. 2012年12月21日 22時 NHK 情報LIVE ただいま! |
| 4. 日本経済新聞 2013年1月13日号夕刊7面 「遺伝子変異、感染しやすく ノロウイルスなお警戒」 | 7. 2012年12月24日 23時 日本テレビ NEWS ZERO |
| 5. 朝日新聞 2012年11月27日号夕刊14面 「ノロウイルス流行の兆し」 | 8. 2012年12月25日 4時 日本テレビ Oha!4NEWS LIVE |
| 6. 毎日新聞 2012年12月8日号夕刊1面 「ノロウイルス06年に次ぐ流行 変異型猛威」 | 9. 2012年12月14日 4時 日本テレビ Oha!4NEWS LIVE |
| 7. 読売新聞 2012年12月15日号夕刊14面 「ノロウイルス患者急増 感染研 遺伝子変異流行の恐れ」 | 10. 2012年12月13日 16時53分 日本テレビ news every |
| 8. 朝日新聞 2012年12月24日 37面 「ノロウイルス 院内 6人死亡」 | (ラジオ番組) 出演 |
| 9. 朝日新聞 2013年1月12日号夕刊14面 ノロウイルス流行ピーク過ぎる インフルは患者数急増 | 2013年2月1日 17時 NHK ラジオ 私も一言 「ここに注目 感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの正体」 片山和彦 |

(ラジオ番組) 出演

2013年2月1日 17時 NHK ラジオ 私も一言 「ここに注目 感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの正体」 片山和彦

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

(テレビ放送) 出演、指導、監修

1. 2012年12月2日 18時 日本テレビ; バンキシャ!
2. 2012年12月4日 11時 TBS; ひるおび!
3. 2012年2月19日 8時 フジテレビ とくダネ!
4. 2012年2月19日 14時 フジテレビ 知りたがり!
5. 2012年12月21日 8時 テレビ朝

「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究」

研究分担報告書

研究代表者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者		地方衛生研究所

研究要旨 平成 21～23 年度の厚生労働科学研究事業において構築した、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。腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、最も分離頻度の高い血清群 0157 の迅速な遺伝子型別に資する目的で、IS-printing system (ISPS) のデータベース構築を進めた。2012 年に分離された 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。2012 年に分離された EHEC 0157 の PFGE 解析結果は、BN による系統樹作成に基づく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 0157 では、1422 株に対して 2012 年に分離された新しいサブタイプとして 628 種類、2011 年に分離されたことのあるサブタイプが 35 種類、その他が 28 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、388 株に対して 188 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 0157 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 32 種類存在したが、そのうち 6ヶ所以上の都道府県で分離されたパターンは 6 種類存在していた。同様に 026 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 2 種類あり、うち 1 種類では 7 府県の散発事例から同一 XbaI パターンを示す株が分離されていた。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症の調査において、食品或いは患者由来株の解析から得られた科学的データが迅速に共有されることが重要である。また、日進月歩の解析手法を検証しながら、迅速高解像度の解析

手法に基づく結果を関係機関で共有することで、当該事例の早期探知、拡大阻止に結びつけることを目的とした。

B. 研究方法

平成 24 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。

PFGE 解析結果のデータベース化を BioNumerics (Applied Maths 社)により行うとともに、結果については、E-mail により菌株送付機関に返信し、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う (URL; <http://www0.nih.go.jp/~terajima/opn/index.html>) とともに、「感染症サーベイランスシステム」(NESID)で公開した。BN server 内のデータベースで、EHEC 0157 の代表的な遺伝子型のデータを追加し、全国 6 ブロックの研究分担者からの直接アクセスに対応した。EHEC 0157 の ISPS のデータベースに関しては、福岡県及び大阪府で稼働している同システムを基盤として、全国に対応することを目的として細菌第一部のサーバー内にデータベースの設置を行った。いずれのアクセスも、分担研究者の ID とパスワードが必要となっている。MLVA については、米国 CDC が使用している 0157 に対する 9 組の primer、及び 0157, 026, 0111 に対する 20 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 を用いて解析した。

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ピング

EHEC 0157 については、2012 年に分離・送付された 1422 株が、2012 年に分離された新しいサブタイプとして 628 種類、2011 年に分離されたことのあるサブタイプが 35 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 026 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 0157 及び 026 では散発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。

2. EHEC0157 及び 026 における広域共通パターンを示す株の解析

2012 年に分離された 1422 株の EHEC 0157 は、628 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 32 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、特に分離地域数の多いパターンについて、6 ヶ所以上の異なる都府県から分離されデンドログラム上でクラスターを形成している株を、そのパターン名である Type No. (TN) で表示した (図 3~6)。TN e807 は、2009 年に初めて分離されたパターンであるが 2012 年には 19 ヶ所の広域にわたって分離された (図 3)。TN g255 についても、2011 年に初めて分離されたパターンであるが、2012 年には 12 ヶ所の広域から分離された (図 4)。TN e807, g255 いずれも 2012 年においては長期間にわたって分離されており、MLVA の結果では変異株があることが明らかになった。026 については、すべてが散発事例由来株であり、分離時期が 6 月に集中していた (図 7)。

3. ISPS を利用したデータベースの構築

EHEC 報告数の7割程度を占める血清群 0157 の発生動向を迅速に把握する目的で ISPS による解析とその精度管理が本研究班でも行われてきた。九州ブロック及び近畿ブロックでそれぞれ稼働している ISPS データベースを基盤として、全国の地研が利用できるデータベースを感染研細菌第一部のサーバー内に構築し、分担研究者からのデータ受信を開始した。血清群 0157 に限られているとはいえ、操作の容易さとデータ共有の迅速性には優れており、今後もデータ共有の重要性が増すものと考えられる。

D. 考察

同一 PFGE パターンを示す EHEC 0157 が広域の散発事例から分離されることがあり、2012 年においても、6 ヶ所以上の都道府県における散発事例から分離されるパターンが 6 種類あった。これらのパターンを示す株は比較的長期にわたって分離されたおり、2011 年に発生した TN f93 を示す EHEC 0157 のような一峰性の分離状況ではなかった。MLVA の結果から、これらの株には複数の変異株が含まれていることが示され、感染源中に存在した EHEC 0157 の様々な環境下での複雑な生存状況が推定された。特に広域から分離された TN e807 及び TN g255 については変異株も多く、時間経過とともにこれらの株が多様化したこと可能性も考えられる。6 種類の広域分離株の感染源は不明である。IS データベースは H23 年度までの厚生労働科学研究事業を発展させる形で構築した。全国 6 ブロックの分担研究者から試験的なデータ入力等を試行した。2012 年に発生した北海道における漬物を原因とした EHEC 0157 の集団発生では、迅速性・データ共有の容易さから効果的な情報共有が

可能であった。データの精度管理と共に、全国的なアクセスに対応する機能更新が必要である。

E. 結論

広域発生事例を迅速に探知するために、ISPS の迅速性を生かすとともに、BN server による PFGE データベースの継続的な更新が必要である。さらに、正確な情報蓄積に向けて、MLVA の活用が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 寺嶋 淳;肉の生食と消化管感染症 特集 感染症：診断と治療の進歩。日本内科学会雑誌、101、3154-61、2012
2. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、齊藤剛仁、三戸部治郎、石原明子、大西 真；最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 日本食品微生物学会雑誌 29、88-93、2012
3. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、齊藤剛仁、三戸部治郎、石原明子、大西 真；腸管出血性大腸菌感染症：分子疫学的現状 特集 問題となる食中毒の up-to-date。化学療法領域、28、1232-40、2012 年

2) 学会発表

1. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Hidemasa Izumiya, Takehito Saitoh, Jiro Mitobe, Tomoko Morita-Ishihara, Makoto Ohnishi, Haruo Watanabe; Molecular Epidemiological Investigation of Enterohemorrhagic *E. coli* Isolates in Japan. 8th International Symposium on Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*

Infections, 2012

2. Chinen, I., Stroika, S.G., Terajima, J., Zolezzi, G., Iyoda, S., D´Astek, B., Ohnishi, M., Watanabe, H., Gerner-Smidt, P., Rivas, M. International clones of STEC 0157 studied by PFGE and virulence profile in three Pulsenet countries : USA, Japan and Argentina. 8th International Symposium on Shiga Toxin Producing Escherihia coli Infections, 2012

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 (1423 entries)
(2012/1/10 - 12/8) Tol : 1.5%

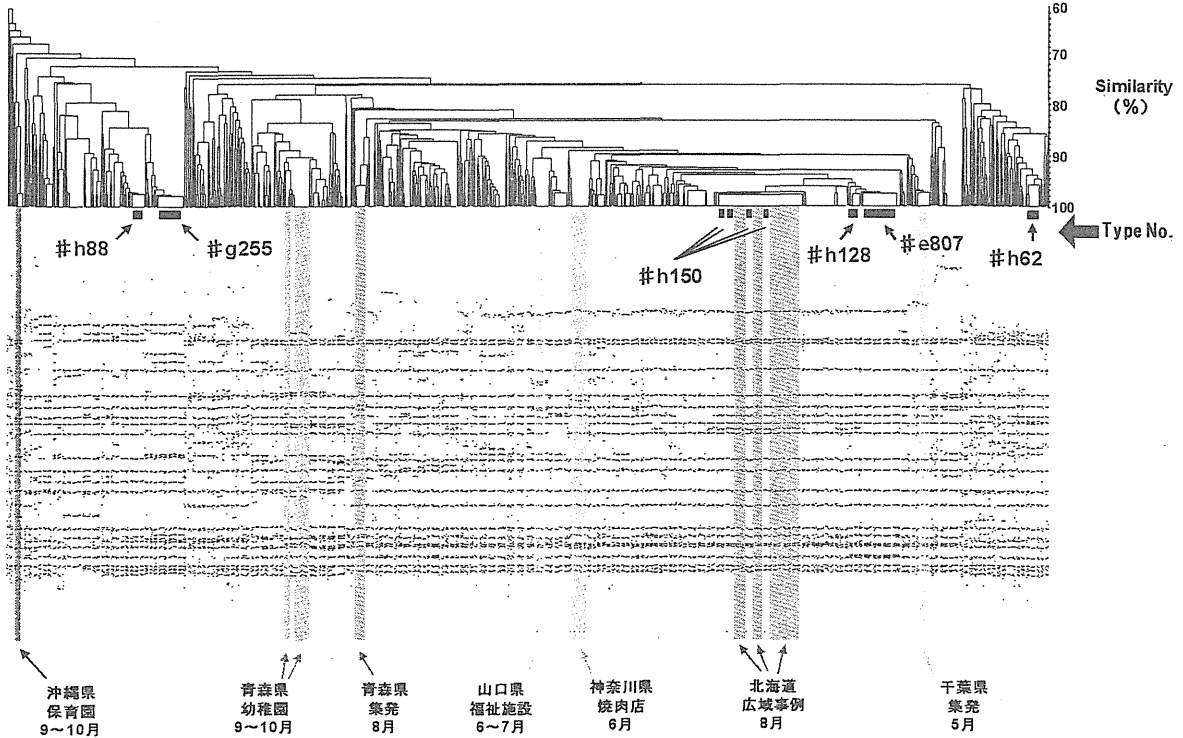


図 2

Dendrogram of EHEC O26:H/-isolates in Japan (503 entries)
(2012/1/11 - 12/6) Tol : 1.2%

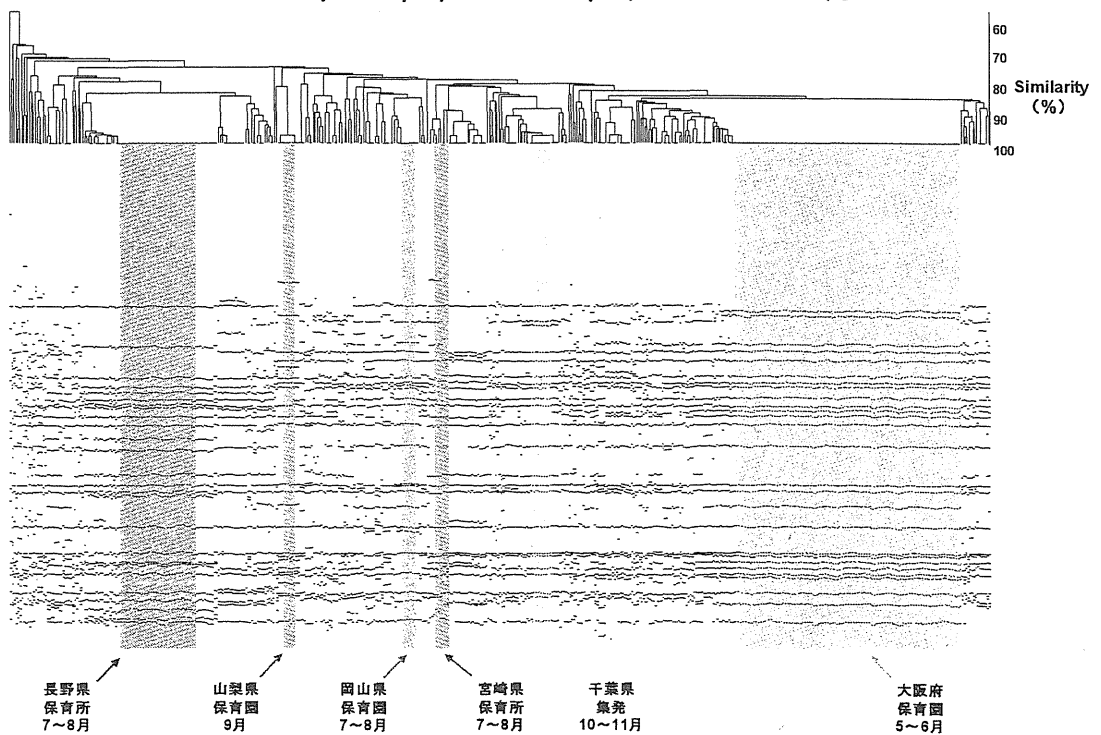


図 3

2012年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

▲ Type No.e807 Jul.- Oct.

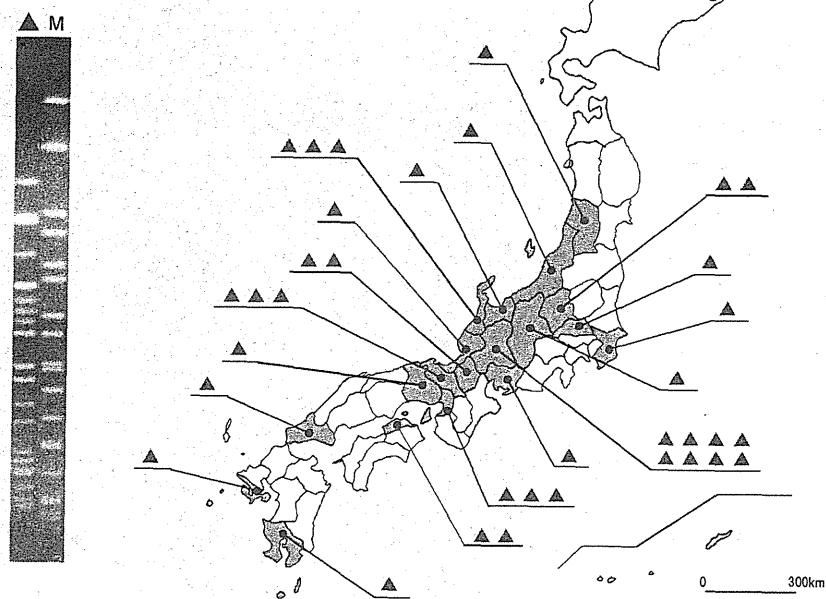


図 4

2012年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

★ Type No.g255, May - Nov.

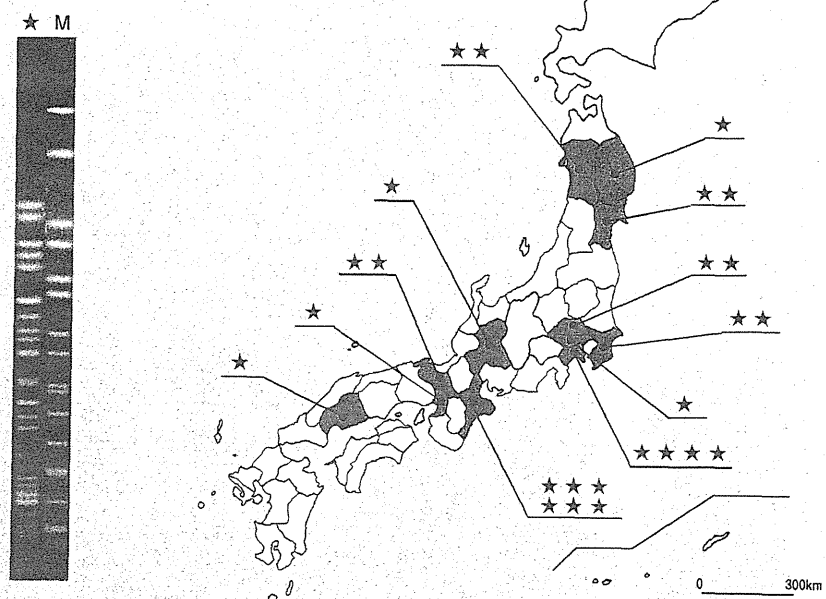


図 5

2012年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

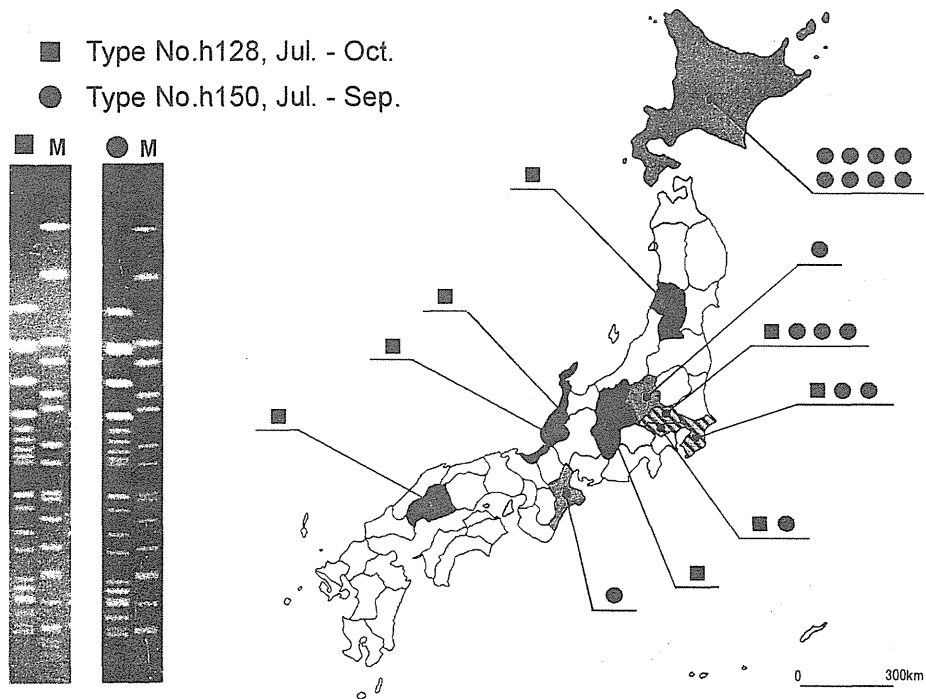


図 6

2012年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

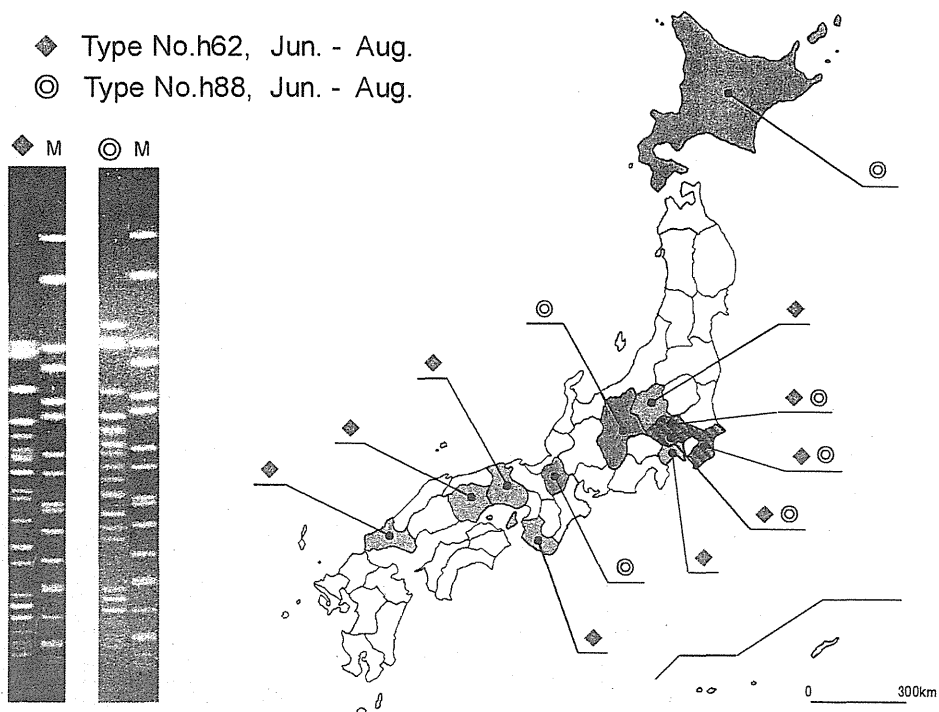
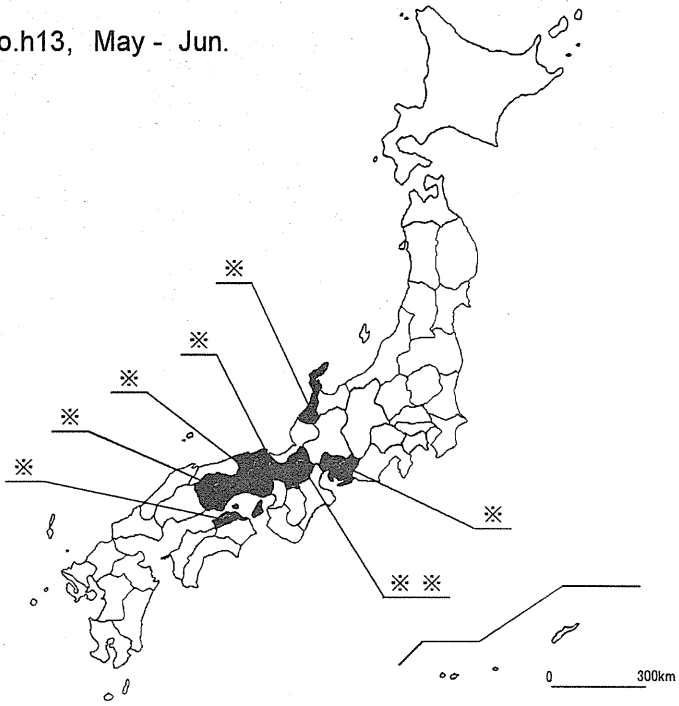


図 7

2012年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

※ O26 Type No.h13, May - Jun.

※ M



厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
研究課題名(課題番号):病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの
構築に関する研究(H24-新興-一般-005)

平成24年度 分担研究報告書

分担研究課題名: 「腸管出血性大腸菌の血清型、DNA型の分布解析
およびHUS患者の血清診断に関する研究」

研究分担者: 伊豫田淳(国立感染症研究所・細菌第一部)

研究協力者: 小嶋由香(川崎市健康安全研究所), 瀬戸順次(山形県衛生研究所), 甲斐明美、小西典子(東京都健康安全研究センター), 奈良県保健環境研究センター, 松本裕子(横浜市衛生研究所), 勢戸和子(大阪府立公衆衛生研究所), 中嶋洋(岡山県環境保健センター), 木澤正人(京都市衛生環境研究所), 黒崎守人(島根県保健環境科学研究所), 小笠原準(大阪市立環境科学研究所) 今野貴之、八柳潤(秋田県健康環境センター), 田邊純一(新潟市衛生研究所), 増本久人(佐賀県衛生薬業センター), 泉谷秀昌, 寺嶋淳, 大西真(国立感染症研究所・細菌第一部)

研究要旨

国内で2012年にヒトから分離され、感染研・細菌第一部に送付された腸管出血性大腸菌(EHEC, n=2,650)のうち、最も分離頻度の高い血清群は依然としてO157で全体の約63%を占めた。2012年8月に北海道で発生したO157による集団事例は150名以上の患者、8名の死者を数えたが、この事例では分離株間の相同性解析に当初IS-printingが用いられた。北海道以外で発生し、関連が疑われた事例のうち、5事例のIS-printingパターンが集団発生由来株のものと一致した。これらの株にはプライマーセット1の陽性コントロールには存在しない、100bp付近にエキストラバンドが共通してみられることが判明し、北海道での集団発生関連株に特異的なマーカーとなることが示唆された。

HUS発症患者でEHECが分離されないケース(n=12)について患者血清中の抗大腸菌抗体価を解析したところ、8件でO157陽性が確認された(陽性率66%)。O157抗体価が陽性となった1事例については便検体からの菌分離と血清診断の依頼が同時にあり、検体到着日に血清診断によってO157陽性と判定されたため、直ちに便検体からO157をビーズ法で分離することが可能となった。

A. 研究目的

1) 散在的集団発生探知のためのIS-printing

解析: 国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*;

EHEC) の約 80%以上は血清群 O157, O26 または O111 の O 血清群に分類され、依然として O157 の分離頻度は最も多く、全体の約 63%を占めている。2012 年 8 月に北海道で発生した EHEC O157 による集団発生事例は 150 名以上の患者、8 名の死者を数えた。同時期に北海道以外で散在的に発生し、関連が疑われたいくつかの事例について菌株相互の関係を迅速に解析するため、IS-printing system による型別を行った。得られた結果から、IS-printing の有用性の評価を行うことを目的とした。

原因菌が分離されないが、EHEC 感染が疑われる重篤な症例（溶血性尿毒症症候群：hemolytic uremic syndrome [HUS]）において、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価を測定することで EHEC 感染症の確定診断が可能である。本研究班の前身の研究班で策定したプロトコルを用いて 2012 年の事例について解析を行い、菌不分離の HUS 症例について EHEC 感染症の確定診断を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 血清型別

デンマーク血清学研究所から購入した抗大腸菌 O 血清 (O1-O187) および H 血清 (H1-H56) を用いて血清型別を行った。

2) IS-printing

東洋紡から販売されている IS-printing system を用いて解析を行った。

3) 使用菌株

血清型別には日本全国の地方衛生研究所からの分与株を、IS-printing には山形県衛生研究所、川崎市健康安全研究所、奈良県保健環

境研究センター、横浜市衛生研究所および北海道立衛生研究所由来の株を用いた。

4) 血中抗体価測定

本研究班の前身である厚生労働科学研究費補助金研究班（主任：寺嶋淳）の H23 年度に策定したプロトコル（プレート法）に従って HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価（抗原として、O157, O26, O111, O103, O145, O165, O121）を測定した。

C. 研究結果

1) 血清型別

2012 年に感染研・細菌第一部に送付されたヒト由来の EHEC は計 2,650 株で、O157 が全体の 62.6%、次いで O26 (15%), O111 (5.6%), O103 (4.3%), O145 (3.4%), O121 (3.2%) の順に多かった（図 1）。

2) 北海道における集団発生事例における IS-printing によるサブタイピング

① 北海道以外での集団発生関連株の同定：2012 年 8 月、北海道内 11 カ所の老人ホームを中心とした O157:H7 による集団食中毒事例が発生し、白菜の浅漬け（白菜きりづけ）が原因食品と断定された。患者数は 169 名、死者は 8 名にのぼった。北海道以外での関連事例の一つとして、川崎市健康安全研究所において北海道への旅行者由来の患者から EHEC O157:H7 が分離された。北海道への電話問い合わせによって、集団事例由来株と同じ IS-printing パターン（図 2）が川崎市の事例由来株のものと一致することが判明した。これらとほぼ同時期に山形県衛生研究所から、県内で分離された 2 株が北海道関連疑い事例であったため、感染研・細菌第一部に菌

株の送付があった。川崎市からも菌株を供与していただき、計3株について感染研・細菌第一部で IS-printing を実施した。その結果、山形県からの2株のうち、1株は北海道の集団発生由来株および川崎市由来の株と IS-printing パターンが一致したため、北海道における集団発生事例の関連事例であることが明らかとなった（図3）。得られた IS-printing パターンの結果を大阪府公衆衛生研究所内の IS データベースで検索したが、完全に一致するものは見つからなかった。

②北海道集団発生由来株に特異的な 100 bp 付近の増幅産物について：①で明らかとなった北海道関連事例由来株の IS-printing プライマーセット 1 のパターンをよく観察すると、プライマーセット 1 のスタンダードには存在しない、約 100 bp の増幅産物が川崎市由来株および山形由来株のうちの 1 株に存在することが判明した。通常、IS-printing ではスタンダードに存在するバンドに対してのみバンドの有無を検定するが、100 bp 付近のバンドは北海道関連事例株に特異的なマーカーであることが予想されたため、本研究班の各分担研究者を通じて全国の地方衛生研究所に情報を伝達した。その後、東京都、横浜市、奈良県で分離され、北海道集団発生関連事例と考えられた3つの O157:H7 株がいずれも同一 IS-printing パターンを示し、100 bp 付近のバンドも共通に見られたことから、今回の集団事例関連株に特異的なマーカーであることが明らかとなった。以上の結果は、PFGE および MLVA による型別解析によって確認された。

3) HUS 患者血清中における抗大腸菌抗体価

測定による EHEC 感染症の確定診断例

①解析結果のまとめ

昨年度、本研究班の前身である H23 年度厚生労働科学研究費（寺嶋班）の分担研究者を通じて配布した血清診断プロトコールを用いて、2012年に発生した EHEC 不分離の HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価の測定を12件（34検体）について実施した。このうち8件が陽性となり、すべて O157 陽性であった（陽性率 66%）。このうちの2事例については市販の O157 抗体検出キット（O157 チェック「LPS 抗体」[三菱化学メディエンス]）でも陽性となった（残りの事例についてはデータ無し）。O157 陽性となった患者血清は 96 穴プレートを用いた場合に 320 倍から 2,560 倍までの抗体価であることが明らかとなった。

②血清診断と菌分離の同時依頼例

上記のうちの1例は4歳男児の HUS 症例で、入院先の大学病院内の検査室では O74 の大腸菌(VT 陰性)のみが分離されていた。7月14日に発症、17日に HUS と診断され、血清5検体（採取日は7月18, 21, 29日、8月4, 11日）と血便吸収オムツ（7月16日採取）が同時に細菌第一部に送付された（8月13日検体受領）。血清診断の結果、O157 抗体価が7月18日（5病日）の血清で160倍、7月21日（8病日）の血清で640倍、7月29日（16病日）の血清で320倍まで陽性となったが、その後に採取された血清（22病日および29病日）ではいずれも陰性となった。血清診断による O157 陽性の結果が検体搬入当日に判明したため、翌日（8月14日）に血便吸収オムツの増菌培養液（増菌液体培地

として TSB を使用) から O157 感作免疫磁気ビーズ (Dynal 社製) を用いて濃縮を行うと同時に、増菌液からの精製 DNA を用いて VT1 および VT2 を PCR 法で検出した。O157 免疫磁気ビーズによる濃縮液は S-MAC プレートに分離し、ソルビトール非発酵性の典型的なコロニーを釣菌し、生化学的性状から大腸菌であることを確認した。血清型および毒素型の確認から、分離株は O157:H7 (VT1+, VT2+) であることが確認され、本事例は O157:H7 による HUS 散発事例と断定した(図 4 の経過参照)。

D. 考察

IS-printing は菌株が分離されていれば数時間後には結果が判定でき、迅速性に優れているが、型別判定の解像度は PFGE や MLVA 等に比較すると低い。今回の事例では、スタンダードに含まれていない増幅産物が集団発生株に特異的であったことで、関連事例株を識別する上で重要なマーカーとなった。スタンダードに含まれていない増幅産物が確認された場合には、それらが集団発生事例由来株に共通の特徴であるかどうかをよく見極めた上で型別の判定基準とすることが必要である。現在、感染研で構築されている IS printing のデータベースを構築する上においても、菌株に特徴的なエキストラバンドの情報があれば今後のデータベース検索にも有効であるかもしれない。

2012 年に解析を行った血清診断の解析から、約 66% の事例で O157 陽性 (12 例中 8 例) となった。これらの検査数には含まれていないが、EHEC O165 が分離された事例に

において、HUS 患者から得られた血清でも O165 抗体価が陽性となった例が存在した。一方、EHEC O174 が分離された HUS 症例では、患者血清中の O174 抗体価を検出することは出来なかった。しかしながら、これら希な血清群による散発 HUS 症例または複数の O 血清群による混合感染事例 (例えば 2011 年に富山県で発生した O111 の集団事例では O157 との混合感染が確認された患者が確認されている) などでは、原因菌を確定するためには血清診断は重要な診断手法であると考えられる。

4 歳男児の HUS 散発事例においては、患者の入院先の大学病院では当所 EHEC が分離されなかったため、当所において血清診断を行ったところ、O157 抗体が陽性と判定された。この結果を基に、患者血清と同時に当所に搬入された患者血便を吸収した紙おむつから、EHEC O157 の分離が効率よく行えた。すなわち、今回のケースでは血清診断の結果から菌分離の情報が得られたことになる。大腸菌血中抗体価は発症から数日後には高い抗体価の上昇が確認できる場合があることから、血清診断が迅速診断の一助となりうる場合が存在すると考えられる。

E. 結論

- ・ 2012 年に分離されたヒト由来の EHEC のうち、最も多い血清群は依然として O157 であり、全体の約 63% を占めた。

- ・ IS-printing system による北海道関連事例株の解析から、北海道を訪問した川崎市、山形県、奈良県、横浜市、東京都の患者から分離された EHEC O157:H7 が関連事例株である

ことが明らかとなった。

- ・ 上記の北海道関連事例に特異的な IS-printing プライマーセット1の増幅産物として、100 bp 付近に現れたバンドが特異的なマーカーとなることが示された。

- ・ O157 分離株の IS-printing による型別を行う際には、スタンダードに存在するバンドの有無だけではなく、それ以外に出現する増幅産物（明瞭なバンドに限定される）の分布にも注意することが必要である。

- ・ 菌不分離の HUS 症例における患者血清中の抗大腸菌抗体価測定を行い、12 例中 8 例で O157 陽性であることが明らかとなった。

- ・ 4 歳男児の HUS 症例では血清診断依頼と EHEC 分離依頼が同時にあり、血清診断から O157 陽性であることが判明したため、EHEC 株（O157）分離を効率よく行うことが可能となった。

F.健康危機情報

なし

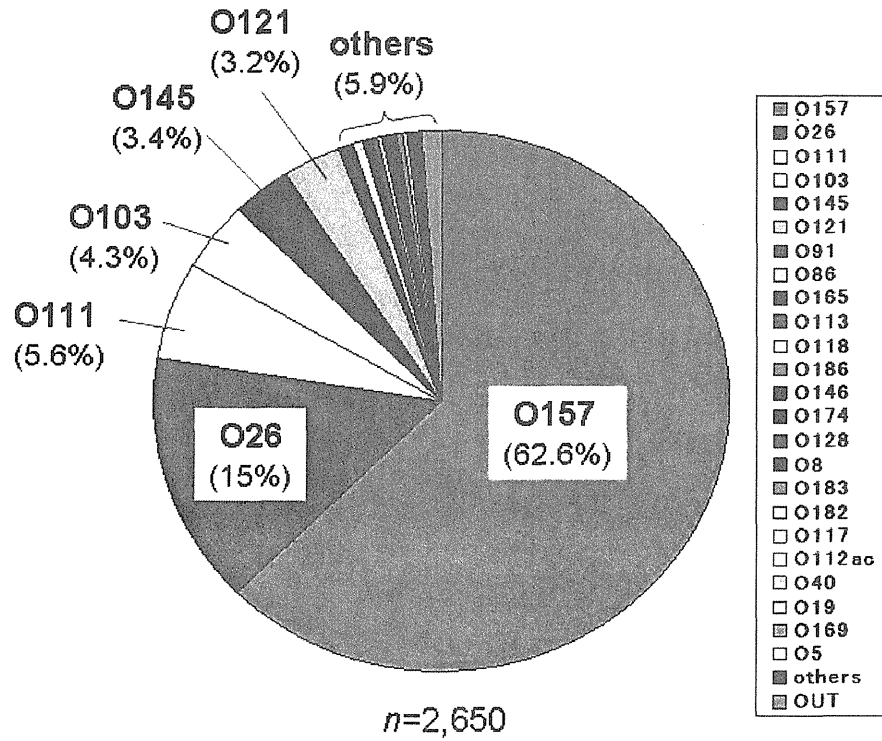
G.研究発表

- ・ Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M; Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O103.

J Clin Microbiol. 2012. 50: 2894-2900.

- ・ Lee K, French NP, Jones G, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, Tsubone H, Kumagai S; Variation in stress resistance patterns among *stx* genotypes and genetic lineages of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157.

Serogroup of EHEC isolates from human (2012)



平成 24年 8月 17日

IS-Printing結果

サンプル①菌株No	川崎由来株
サンプル②菌株No	北海道由来株
サンプル③菌株No	山形県由来株 1
サンプル④菌株No	山形県由来株 2

感築研番号 I21145
 川崎市の電話問い合わせ情報による
 感築研番号 I21143
 感築研番号 I21144

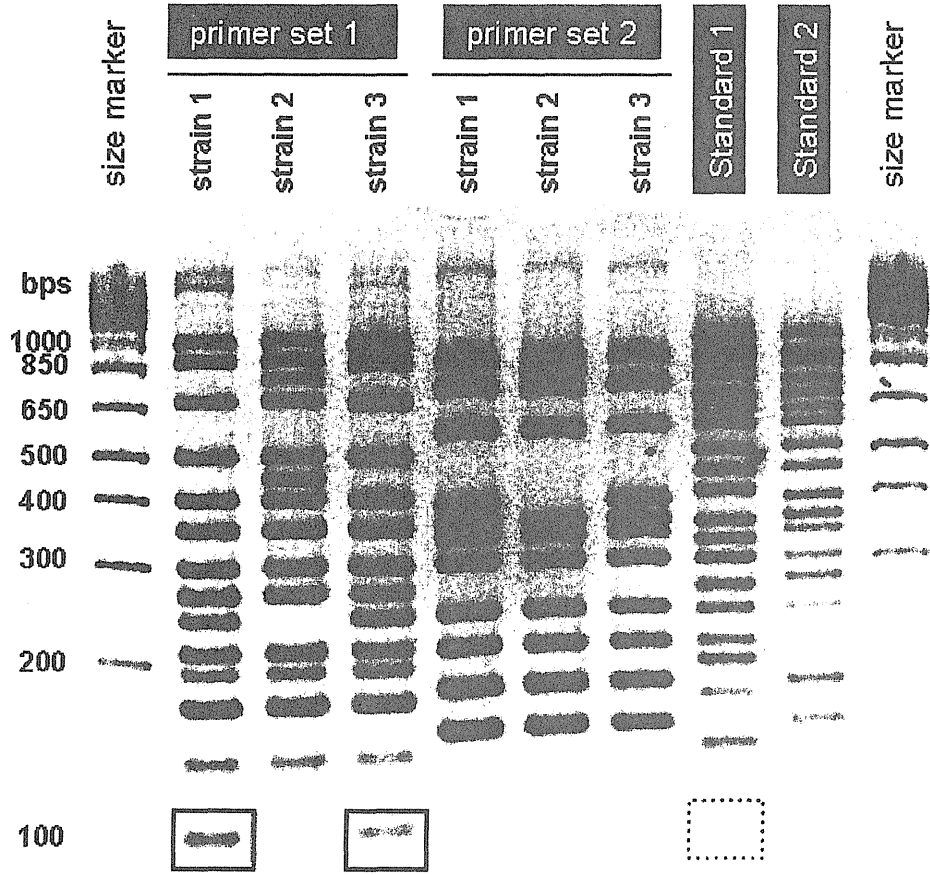
菌株		1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
サンプル①	primer No.1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	amp	16	hly
	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
	判定	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	primer No.2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	sb1	sb2
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	1	1	1	1	0	1	1	1	1	

菌株		1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
サンプル②	primer No.1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	amp	16	hly
	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
	判定	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	primer No.2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	sb1	sb2
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	1	1	1	1	0	1	1	1	1	

菌株		1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
サンプル③	primer No.1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	amp	16	hly
	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
	判定	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	primer No.2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	sb1	sb2
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	1	1	1	1	0	1	1	1	1	

菌株		1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
サンプル④	primer No.1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	amp	16	hly
	size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
	判定	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
	primer No.2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	sb1	sb2
size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151	
判定	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	

IS-printing pattern of O157 from Hokkaido outbreak



strain 1: Yamagata 1
 strain 2: Yamagata 2
 (unrelated strain)
 strain 3: Kawasaki-city

- Strain 1 and 3 have the same IS-pattern (outbreak-related).
- Extra band (which is not included in the standard for primer set 1) was found to be an important marker for the outbreak-related strains.

: extra band

HUS患者血清中の抗大腸菌抗体価解析例

HUS患者：4歳 男児
EHEC不分離
(病院の検査室で大腸菌 O74(VT陰性)のみ分離)

発症日：7月14日 腸炎発症, 7月17日 HUS発症

血清1：(7月18日) O157陽性(×160)
血清2：(7月21日) O157陽性(×640)
血清3：(7月29日) O157陽性(×320)
血清4：(8月 4日) 非凝集
血清5：(8月11日) 非凝集

同時に、同じ患者の血便吸収紙オムツ(7月16日採取)からの菌分離依頼あり:

- ・ 上記の血清診断の結果から、O157感染が疑われたため、免疫磁気ビーズ(O157)を用いた菌の濃縮、菌分離を実施。
- ・ O157:H7 VT1+,VT2+ を分離した。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究
研究分担報告書

研究分担者	八柳 潤	(秋田県健康環境センター)
研究協力者	清水 俊一	(北海道立衛生研究所)
	坂本 裕美子	(札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課)
	武沼 浩子	(青森県環境保健センター)
	岩渕 香織	(岩手県環境保健研究センター)
	瀬戸 順次、鈴木 裕	(山形県衛生研究所)
	山口 友美	(宮城県保健環境センター)
	千葉 久子	(仙台市衛生研究所)
	千葉 一樹	(福島県衛生研究所)
	川瀬 雅雄	(新潟県保健環境科学研究所)
	足立 玲子	(新潟市衛生環境研究所)
	今野 貴之	(秋田県健康環境センター)

研究要旨

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所に IS-printing system を普及させると共に、国立感染症研究所に構築された IS-printing データベースシステムへの参画を可能とすることを目的として、ブロック内地方衛生研究所における IS-printing system の基礎的な精度管理に関する共同研究を実施した。秋田県で分離された EHEC O157 分離株 4 株から抽出した DNA 溶液を供試し、キット付属のプロトコールに従い IS-printing を実施した結果、高分子側のバンドで増幅断片の量が過剰となり、判定が困難となる傾向がみられた。また、条件により hly が陰性と判定される問題も確認された。各 set の電気泳動に 2 枚のゲルを使用し、ゲル濃度、アプライ量、泳動時間を最適化することにより、高分子側と低分子側どちらの断片の判定も容易となることが山形県の検討により示され、判定困難な場合はこの条件を試行することが推奨される。今後もブロック内における IS-printing system の条件検討と精度管理を継続する必要がある。

A. 研究目的

食中毒・感染症原因細菌の分子疫学解析は、感染経路や感染源の特定に有用である。1996 年に国内で、世界的にも稀な腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 による大規模食中毒が発生したことを契機として、EHEC の分子疫学解析手法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が全国の地方衛生研究所に普及し、国立感染症研究所が PFGE パターンデータベースを構築してきた。PFGE は EHEC O157 のみならず、サルモネラやカンピロバクターなど多くの細菌

の分子疫学解析に応用され、病原細菌分子疫学解析の「ゴールドスタンダード」といえる位置にある。しかし、PFGE には結果が得られるまでの時間が長く、行政対応支援に際して迅速性に欠けること、そして得られる結果がアナログデータの泳動像であるため、データベース化が難しく、異なる実験室で異なる時に得られたデータを比較することも困難であるという問題が存在する。

PFGE が持つこれらの問題を克服する方法として、EHEC O157 の解析用に VNTR、