

報告されている SubAB に関与する *subA* 遺伝子について保有状況を調べた。

C. 研究結果

1) EHEC の分離状況

2008 年から 2012 年の 5 年間に都内で分離された EHEC 株は 1,465 株であった(表 1)。そのうち 0157 が 1,104 株 (75.4%) で最も多く、次いで 026 が 172 株 (11.7%)、0111 が 62 株 (4.2%) であった。これら上位 3 血清群以外の血清群菌は 127 株 (8.7%) であった。

血清群 0157, 026, 0111 以外の 127 株を対象に血清型別試験を実施したところ、13 種類の血清群に分類された。最も多く分離されたのは 0103 で 34 株 (26.8%)、次いで 0145 (27 株, 21.3%)、0121 (15 株, 11.8%)、0165 (11 株, 8.7%)、091 (10 株, 7.9%)、0128 および 0146 が各 3 株 (2.4%)、055 および 0115 が各 2 株 (1.6%)、063, 074, 0119, 0183 が各 1 株 (0.8%)、血清型別不能 (OUT) が 16 株であった。

2) 血清型と症状について

分離された EHEC について、その由来を症状の有無によって比較した(表 2)。その結果、有症者から高率に検出された血清群は 0103 (有症: 14, 無症: 5)、0145 (有症: 13, 無症: 2)、0121 (有症: 12, 無症: 1)、0165 (有症: 8, 無症: 0) であった。特に血清群 0121 (発症率 80%)、0165 (発症率 72.7%)、0128 (発症率 66.7%) では発症者からの検出割合が高かった。一方、無症状者からの検出率が高かったのは 091 (有症: 2, 無症: 6)、0146 (有症: 0, 無症: 2) であった。

HUS 発症が確認されたのは血清群 0103, 0145, 0165, 0183, OUT (表 3) であった。

3) 遺伝子保有状況

病原因子である *eae*, *saa*, *hlyA*, *aggR*, *subA* 遺伝子の保有状況を表 4 に示した。

(1) インチミン遺伝子 (*eae*)

供試した 127 株中 95 株が陽性であった。

血清群 0103, 0145, 0121 および 0165 は分離された全ての株で *eae* 陽性であった。その他, 055, 063 (各 1 株で陽性), OUT 株 (16 株中 6 株で陽性) で *eae* を保有していた。

(2) STEC アドヘシン遺伝子 (*saa*)

供試した 127 株中 7 株が陽性になった。陽性株の血清群は 0146 (2 株), 074, 091, 0119, 0183, OUT (各 1 株) であった。

(3) 凝集接着性遺伝子 (*aggR*)

aggR を保有している株は認められなかった。

(4) ヘモリシン遺伝子 (*hlyA*)

hlyA の保有率は血清型によって異なっていた。すなわち, 074, 0165, 0183 では 100% 陽性であった。この他, 0103 (97.1%), 0121 (93.3%), 0145 (92.9%), 0128 (66.6%), 091 (50%) で高率に検出された。

(5) SubAB 毒素関連遺伝子 (*subA*)

新しい毒素として報告されている SubAB 保有状況について泉谷らのプライマーおよび Paton らのプライマーを用いて調べた。その結果, 泉谷らのプライマーを用いた場合は 11 株が, Paton らのプライマーでは 4 株が陽性となった。Paton らのプライマーで陽性となった 4 株は, いずれも泉谷らのプライマーでも陽性を示した。泉谷らのプライマーで陽性となった株の血清型は 091 (10 株中 1 株), 0128 (3 株中 3 株), 0146 (3 株中 3 株), 074 (1 株中 1 株), 0183 (1 株中 1 株), OUT (16 株中 2 株) であった。詳細については, 今後の検討が必要である。

D. 考察

2008 年から 2012 年に東京都内で分離された 1,465 株のうち 1,338 株 (91.3%) が血清群 0157, 026, 0111 であった。上位 3 血清群以外の株は, 13 種類の血清群および OUT に型別された。今回実施した血清型別試験は, 市販されている病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて型別を行なったため, 血清型別不能となった株が 16 株あった。これらの株については今後, 自家血清等を用いて詳細に検討する予定である。

付着因子等の病原遺伝子保有状況につい

て血清群別にまとめた結果、*eae* は 0103, 0145, 0121, 0165 の全ての株が保有していたが、これ以外では 055, 063 の各 1 株のみが保有していた。*eae* 非保有株 32 株中 *saa* 保有株は 7 株 (21.9%) で、25 株は付着因子関連遺伝子を保有していない株であった。

eae 保有状況と臨床症状の有無を合わせてみると、*eae* 保有株 95 株中 49 株 (51.6%) は有症者からの分離であった。一方 *saa* 保有株 7 株では有症者由来は 2 株 (28.6%)、無症状者由来は 3 株 (42.9%)、不明 2 株 (28.6%) で、臨床症状との関連性を明らかにすることはできなかった。

subA 陽性の 11 株中、有症者由来株は 4 株 (36.4%)、無症状者由来株は 4 株 (36.4%)、不明 3 株 (27.3%) であった。有症者由来株の 1 株 (0183) は HUS 発症者からの分離であった。このことから *subA* は重症化因子の 1 つである可能性も考えられるが、今後は他の病原因子等との関連性も含めた詳細な検討が必要であると考えられた。

E. 結論

2008 年から 2012 年に東京都内で分離された EHEC のうち 0157, 026, 0111 以外の血清群菌は、127 株 (8.7%) であり、13 種類の血清群および OUT に型別された。付着因子等の病原遺伝子保有状況について調べた結果、*eae* 保有株 95 株中 49 株 (51.6%) は有症者からの分離であり、血清群 0103, 0145, 0121, 0165 の全ての株が保有していたが、これ以外では 055, 063 の各 1 株のみであった。

saa 陽性株は 7 株 (21.9%) で、陽性株の血清群は 0146 (2 株), 074, 091, 0119, 0183, OUT (各 1 株) であった。*saa* 保有株 7 株では有症者由来は 2 株 (28.6%)、無症状者由来は 3 株 (42.9%)、不明 2 株 (28.6%) で、臨床症状との関連性を明らかにすることはできなかった。

subA 陽性の 11 株中 1 株 (0183) は HUS 発症者からの分離であった。*subA* は重症化因子の 1 つである可能性が考えられるが、今後、詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

非定型的 EHEC と重症化因子について早急に調べる必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表

1) 坂口隼人, 小野恵美, 長谷川雄基, 小西典子, 甲斐明美: 血液および胆汁からの Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O183:H18 の検出と分離菌株の性状、第 24 回日本臨床微生物学会総会、2012 年 2 月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

表1. 東京都内で分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌

	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	合計
O157	232	260	262	185	165	1,104 (75.4%)
O26	73	18	23	22	36	172 (11.7%)
O111	44	2	3	6	7	62 (4.2%)
O103	6	4	14	3	7	34
O145	6	7	2	5	7	27
O121	5	3	4	1	2	15
O165	1	2	5	2	1	11
O91	1	1	5	2	1	10
O128	1	1	1			3
O146			3			3
O55	2					2
O115	2					2
O63	1					1
O74		1				1
O119	1					1
O183					1	1
OUT	3	4	2	5	2	16
合計	378	303	324	231	229	1,465

1338株
(91.3%)

表2. 血清群別発症状況

血清群	供試数	症状		
		有	無	不明
O103	34	14	5	15
O145	27	13	1	13
O121	15	12	1	2
O165	11	8	0	3
O91	10	2	6	2
O128	3	2	1	0
O146	3	0	2	1
O55	2	0	0	2
O115	2	1	1	0
O63	1	0	1	0
O74	1	0	0	1
O119	1	1	0	0
O183	1	1	0	0
OUT	16	6	4	6
合計	127	60	22	45

表3. 血清群別HUS発症状況

血清群	供試数	HUS発症		
		有	無	不明
O103	34	1	17	16
O145	27	1	13	13
O121	15	0	13	2
O165	11	2	6	3
O91	10	0	8	2
O128	3	0	3	0
O146	3	0	1	2
O55	2	0	0	2
O115	2	0	2	0
O63	1	0	1	0
O74	1	0	0	1
O119	1	0	1	0
O183	1	1	0	0
OUT	16	1	9	6
合計	127	6	74	47

表4. ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清型別遺伝子保有状況

血清群	供試数	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>subA</i> (Izumiya)	<i>subA</i> (Paton)
O103	34	34		33		
O145	27	27		25		
O121	15	15		14		
O165	11	11		11		
O91	10		1	5	1	1
O128	3			2	3	
O146	3		2		3	
O55	2	1				
O115	2					
O63	1	1				
O74	1		1	1	1	1
O119	1		1			
O183	1		1	1	1	1
OUT	16	6	1	7	2	1
合計	127	95	7	99	11	4

aggR は全て陰性

大腸菌 O 血清群の核酸検出法に関する研究

研究分担者 井口 純（宮崎大学・I R 推進機構・特任助教）

研究要旨

大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列情報を基に、O 血清群判定を補助する核酸検出法を開発し、実用化に向けた評価を行う。

A. 研究目的

大腸菌の O 血清群判定を補助する核酸検出法を開発し、その実用化に向けた評価を行う。

B. 研究方法

大腸菌全 184 種類の O 血清群株から、O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列情報を収集する。比較解析の結果を基に各 O 血清群に特異的な PCR プライマーセットを設計する。大腸菌 O 血清群標準株（全 184 種類）の精製 DNA を用いて、各プライマーセットによる PCR の特異的な増幅を確認する。

倫理面への配慮 該当しない

C. 研究結果

これまでに塩基配列情報が発表されていない 98 種類の大腸菌 O 血清群について、デンマーク国立血清研究所由来大腸菌 O 血清群標準株より O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列を決定した。既知配列情報を含む全 184 種類の O 抗原合成遺伝子領域塩基配列情報を基に比較解析を行い、147 種類の個別判定用プライマーセットおよび 15 種類のグループ判定用プライマーセット（35 種類の O 血清群を含む）を設計した。それぞれのプライマーセットについて全 184 種類の大腸菌 O 血清群標準株精製 DNA を用いて特異的な増幅を確認した。さらに全 162 種類のプ

ライマーセットを基に、1 反応チューブに 6 から 9 種類のプライマーセットを混和させた 20 種類のマルチプレックス PCR 法をデザインし、その特異的な増幅も確認した。加えて、粗抽出 DNA 検体（培養液を遠心して上清を除去し、TE バッファーで菌塊を再浮遊させた後に、100℃-10 分間の熱処理）をテンプレート DNA として用いた場合でも十分に判定出来ることを確認した。

D. 考察

本研究で開発したマルチプレックス PCR 法は、ほぼ全ての大腸菌 O 血清群（182 種類）の遺伝学的判定（グループ判定を含む）を可能にした。本法は検体 DNA の準備から判定結果が出るまでに最短で 2 時間半を要し（同時に 4 検体の処理が可能）、消耗品も 1 検体あたり 600 円程度と、迅速で安価な手法であることから、O 血清群判定を補助する手法になると十分に期待された。今後は臨床株や環境株を用いて血清学的判定結果と本法との整合性評価を行う必要があると考える。

E. 結論

182 種類の大腸菌 O 血清群を判定出来る核酸検出法を開発した。本法は多様な O 血清群を呈する腸管出血性大腸菌を含めた病原大腸菌のクローン性を予測する為の有効な手法になると期待された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group. Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serogroup O103. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2894-2900, 2012.

2. 学会発表

- 1) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O174-O-187 の O 抗原合成遺伝子群の構造解析と PCR 検出法、第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012. 7. 19 (秋田市)、プログラム・抄録集 p. 14
- 2) 井口純、伊豫田淳、秋吉充子、大西真、大腸菌の O 抗原合成遺伝子領域の網羅的解析と菌株分類法への利用の検討、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10. 26 (福岡市)、要旨集 p. 90
- 3) 秋吉充子、井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌の O 抗原合成遺伝子を標的とした PCR 法と LAMP 法の開発、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10. 26 (福岡市)、要旨集 p. 91
- 4) 井口純、すべての大腸菌 O 血清群を判別する遺伝学的手法の開発、第 24 回日本臨床微生物学会総会、2013. 2. 2-3 (横浜市)、プログラム・抄録集 p. 146
- 5) 井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O 抗原合成遺伝子の網羅的解析と感染症対策に向けた利用、第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013. 3. 8-10 (滋賀県長浜市)
- 6) 井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O 血清群を判定するマルチプレックス PCR 法の開発、第 86 回日本細菌学会総会、2013. 3. 18-20 (千葉市)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

出願特許：1 件

「LAMP 法を用いた大腸菌 O 抗原型の検査方法および検査キット」発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学、特願 2012-091273、出願日 2012/4/12

特許出願予定：1 件

「PCR 法を用いた大腸菌の広域 O 血清群判定方法」発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学 (2013 年 3 月末出願予定)

2. 実用新案登録

3. その他

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）
分担研究報告書

抗大腸菌抗体検出系の開発に関する研究

研究分担者 勢戸和子（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 田口真澄（大阪府立公衆衛生研究所・主任研究員）
原田哲也（大阪府立公衆衛生研究所・研究員）

研究要旨

腸管出血性大腸菌感染症の診断の一助として、318 症例 662 検体の血清について O157、O26 および O111 に対する凝集抗体価を試験管法で測定した。149 症例でいずれかの O 抗原にのみ 160 倍以上の抗体価を示し、その内訳は O157 146 症例、O26 2 症例、O111 1 症例であった。HUS 非発症例においても高い抗体価を示す症例があり、菌分離陰性患者の診断に有用であると考えられた。抗体価は概ね発症 5～6 日後に 160 倍以上を示したが、遅れて上昇していた症例もあり、できるだけ多くの検体で測定することが望ましい。62 症例 92 検体については、市販のラテックス凝集反応試薬を用いて O157 抗体を検出したが、試験管法に比べて感度が低く、偽陰性と判定される場合があった。O157 以外の血清群による感染も増加していることから、EHEC 感染が疑われる場合は、試験管法の併用や再試験が必要である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の確定診断は、便からのベロ毒素（VT）産生性または VT 遺伝子を保有する大腸菌の分離が必要であるが、溶血性尿毒症症候群（HUS）症例に限っては、血清中の O 抗原凝集抗体の検出での届出が可能である。当研究所では、1989 年より試験管凝集反応法（試験管法）による抗体価測定を実施し、EHEC 感染症診断の一助としてきた。試験管法は、特別な試薬を必要とせず、定量性に優れてい

るが、判定が翌日になることが難点である。一方で、HUS の起因菌として最も多い血清群 O157 に対する抗体検出には、ラテックス凝集反応を利用した試薬（ラテックス凝集法）が市販されており、迅速な診断が可能である。そこで、これまでの抗体価測定成績をまとめるとともに、試験管法による O157 抗原凝集抗体価とラテックス凝集法の判定を比較して、その有用性を評価した。

B. 研究方法

1. 血清

診断のため O 抗原凝集抗体価測定を依頼され、その後匿名化して保存していた血清を使用した。

2. O 抗原凝集抗体価測定法

抗原液は、当所保存の EHEC O157、O26、O111 を用い、「EHEC 診断・検査マニュアル」（国立感染症研究所ホームページ）の方法で作製した。血清は、56℃で 30 分間加熱して非働化し、生理食塩水で 2 倍階段希釈系列を作製した。希釈した血清および抗原液を等量（0.2ml）混合し、50℃で一夜反応させた後、凝集の有無を確認した。陽性対照として病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を、陰性対照として生理食塩水を抗原液と等量混合した。抗体価は、凝集を示した血清の最高希釈倍数で示した。

3. ラテックス凝集法

O157 チェック「LPS 抗体」（三菱化学メディアエンス）を添付の説明書にしたがって使用した。すなわち、血清 20μL を検体希釈液 400μL に加えて攪拌後、100μL をスライド板上に滴下してラテックス試薬 1 滴とよく混合し、3 分後に凝集の有無を判定した。判定は強陽性、陽性、弱陽性、陰性の 4 段階で行った。

倫理面への配慮

保存血清は、採血時に診断以外の目的で使用することについて同意を得ていないが、新しい診断法が開発された場合の評価や新規の病原体が報告された際の「さかのぼり

調査」に使用するため保存することを、当所倫理審査委員会に申請し承認されている。

C. 研究結果

1. 試験管法による抗体価測定

これまでに 318 症例 662 検体について、3 種類の O 抗原に対する抗体価を測定し、160 症例で 160 倍以上の抗体価を示した。149 症例では、いずれか 1 種類の O 抗原に対して 160 倍以上、それ以外には 40 倍以下の抗体価で、その内訳は O157 146 症例、O26 2 症例、O111 1 症例であった。8 症例では、O26 抗体価や O111 抗体価が 80 倍または 160 倍であったものの、O157 抗体価はその 4 倍以上を示していた。

症例ごとの最高抗体価を表 1 に示したが、O157 が分離された 53 症例では、HUS を発症した 8 症例を含む 44 症例で抗 O157 抗体価のみが 160 倍以上を示した。HUS 発症の 1 症例は、採血日の早い検体で O157 抗体価が 80 倍、O111 抗体価が 160 倍を示し、約 3 週間後の検体で O157 抗体が 160 倍、O111 抗体が 40 倍であった。また、HUS 非発症例では、同一検体で O157 抗体価と O26 抗体価がともに 160 倍を示した症例と、O157 抗体価が 640 倍、O26 抗体価が 160 倍の症例が 1 症例ずつみられた。O157 分離陽性で抗体価 40 倍以下の 6 症例は、無症状または症状不明であった。

菌分離陰性で HUS を発症した 83 症例のうち 47 症例はペア血清による O157 抗体価の上昇または持続が確認され、15 症例は 1 検体のみの測定であったが、160 倍以上の O157 抗体価を示した。O26 抗体価の上昇が

確認された症例および O111 抗体価が 320 倍を示した症例が 1 例ずつみられた。

EHEC 感染が疑われたが EHEC は分離されず、HUS 発症に至らなかった症例においても、30 症例でペア血清による O157 抗体価の上昇または持続が確認され、1 検体のみの測定で、18 症例は O157 抗体価 160 倍以上を、1 症例は O26 抗体価 320 倍を示した。

サルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオなど EHEC 以外の病原菌が分離された 5 症例 11 検体は、いずれの O 抗原に対しても 20 倍以下の値であった。

2. 病日による抗体価の変動

HUS 発症例および O157 分離症例で採血病日の明らかな 77 人 196 検体について、病日ごとの抗体価を図に示した。早い例では第 3 病日に、多くは 5～6 病日に抗体価が上昇し、3 週間以上維持されていた。第 5 病日に 80 倍以下であった 5 検体、第 6 病日に 80 倍であった 1 検体、および第 8 病日に 10 倍以下であった 1 検体は、その後に採血された検体で 160 倍または 320 倍に上昇していた。

3. ラテックス凝集法と試験管法の比較

ラテックス凝集法を実施した 62 症例 92 検体のうち、強陽性または陽性と判定された検体は 52 検体、弱陽性は 7 検体で、いずれも抗体価は 160 倍以上を示していた(表 2)。しかしながら、抗体価 160 倍あるいは 320 倍で陰性と判定された検体も 8 検体みられた。抗体価 80 倍以下の 25 検体は、いずれもラテックス凝集法陰性であった。

D. 考察

試験管法による抗体価測定では 160 倍以上を陽性と判断してきたが、今回の成績はそれを裏付ける結果であった。HUS 非発症例であっても高い抗体価を示す症例があり、感染症法の届出基準には該当しないが、菌分離陰性患者の診断に有用であると考えられた。O157 とともに O111 または O26 に対する抗体価が 160 倍を示した症例はいずれも O157 が分離されていたが、分離培養の詳細は不明であり混合感染の可能性は否定できない。

抗体価が 160 倍以上に上昇するのは概ね第 5～6 病日であるが、遅れて上昇していた症例もあり、できるだけ多くの検体を入手して測定することが望ましい。第 14～18 病日に抗体価が 20～40 倍で推移した症例は、1996 年の HUS 患者で、第 11 病日に 160 倍であったが、第 13 病日は 80 倍で、他の症例に比べ抗体価の低下が早く、血漿交換など治療の影響が推察されたが詳細は不明である。

ラテックス凝集法は迅速性が長所であるが、試験管法に比べて感度は低いと考えられた。抗体価 320 倍でラテックス凝集法陰性の 2 検体は菌分離陰性の HUS 症例で、1 例は採血日の早い検体(抗体価 640 倍)では陽性を示し、もう 1 例はペア血清で 80 倍から 320 倍に抗体価が上昇したことを確認しており、O157 感染患者であったと考えられる。抗体価 160 倍でラテックス凝集法陰性の 6 検体についても、2 例は O157 の分離によって、HUS の 3 例は採血日の異なる検

体で 320 倍以上の抗体価を確認している。

したがって、HUS 症例や EHEC 感染が疑わしい症例では、ラテックス凝集法陰性であっても試験管法の併用や採血日の異なる検体での再試験が必要であると考えられた。

E. 結論

○ 抗原凝集抗体価の測定は、HUS 患者だけでなく HUS 非発症患者においても EHEC 感染症の診断に有用である。

抗体価が陽性と判断される 160 倍以上に上昇するのは、概ね発症から 5～6 日後であるが、発症日が明確でない症例や遅れて上昇する場合もあるので、できるだけ複数の検体で測定することが望ましい。

ラテックス凝集法による O157 抗体検出は、迅速性および簡便性に優れるが、試験管法に比べて検出感度が低いため偽陰性と判定される場合がある。O157 以外の血清群による EHEC 感染症も考えられることから、疑わしい症例では試験管法の併用や、採血日の異なる検体での再試験が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 勢戸和子. O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性. FFI ジャーナル 217:67-75, 2012.

2) 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳. 腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断. 小児科臨床 65: 2583-2587, 2012.

2. 学会発表

1) 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也. 大阪府における STEC 感染症への抗菌薬治療の現状. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2012 年 7 月, 秋田)

2) 伊豫田淳, 石原朋子, 勢戸和子, 泉谷秀昌, 小西典子, 甲斐明美, 中嶋洋, 木全恵子, 磯部順子, 大西真. 重症者由来 LEE 非保有型 EHEC の病原性因子の解析. 第 86 回日本細菌学会 (2013 年 3 月, 千葉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 症例ごとの最高抗体価

EHEC O157 分離	HUS	症例数	最高抗体価 ^{a)}				
			≤40	80	160	320	640≤
陽性	発症	9			3 ^{b)}	3	3
	非発症	44	6		4 ^{c)}	12	22 ^{d)}
陰性	発症	83	16	3	7	24 ^{e)}	33 ^{f)}
	非発症	182	113	20	10	23 ^{d)}	16

a) e), f)の3症例以外はO157抗体価.

b) 1症例は採血日の異なる検体でO111抗体価が160倍を示した.

c) 1症例はO157抗体価とO26抗体価がともに160倍を示した.

d) 1症例はO157抗体価が640倍, O26抗体価が160倍を示した.

e) 1症例はO111抗体価.

f) 1症例はO26抗体価.

表2 ラテックス凝集法と試験管法の比較

ラテックス 凝集法	試験管法抗体価				
	≤40	80	160	320	640≤
強陽性			1	16	13
陽性			8	9	5
弱陽性			6	1	
陰性	19	6	6	2	

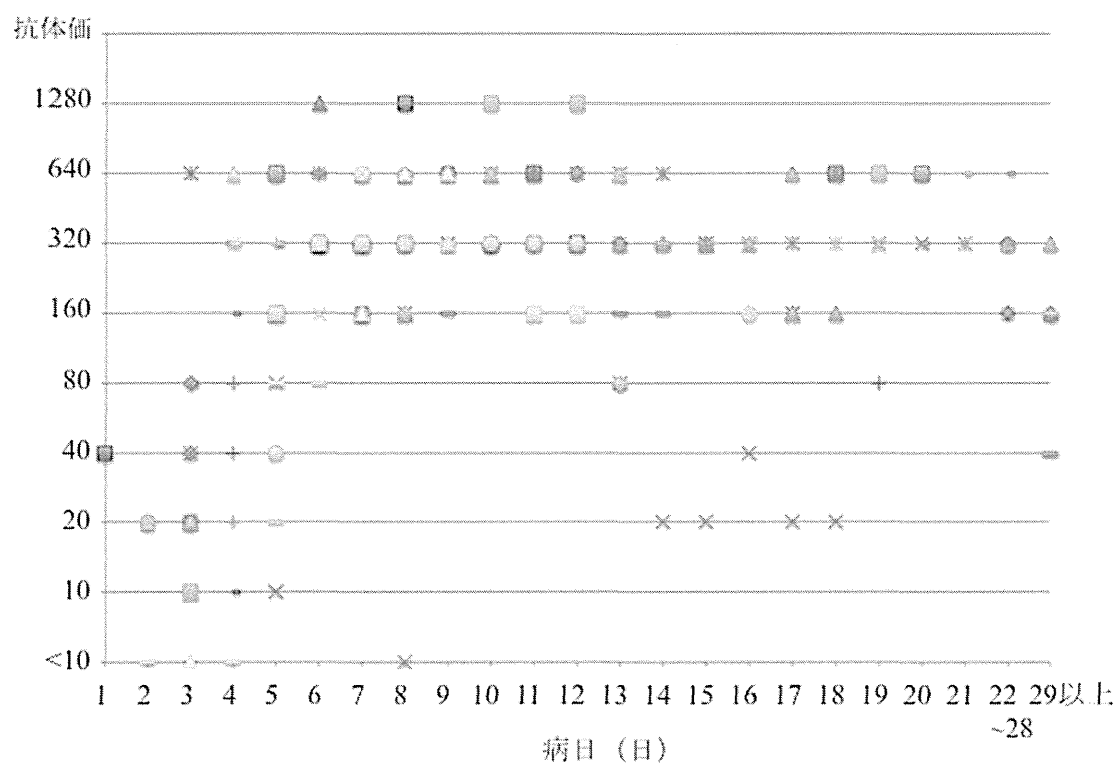


図 病日による抗体価の変動

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）
分担研究報告書

non-O157 EHEC のゲノム配列決定

研究分担者	林 哲也	宮崎大学 教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学 助教
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学 助教

研究要旨：

代表的な腸管出血性大腸菌（EHEC）は O157 であるが、EHEC には O157 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。これらは、基本的には O157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、行政的にも O157 EHEC と同様に扱われるが、基礎的研究や分子疫学解析など、幅広い研究を推進するために必要な全ゲノム情報の整備は遅れている。本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定し、そのゲノム情報基盤を整備することを目標とする。最近 Shiga toxin（Stx）産生株が存在することが明らかになった *Escherichia albertii* も解析対象に含める。本年度は、3 種類の non-O157 EHEC（O121:H19, O145:HUT, O165:H-）のゲノム解析を進め、O121:H19 のプラスミド上に 2 つのギャップが残っているものの、3 株の完全配列の取得がほぼ終了したといえる段階に到達した。*E. albertii* についても 4 株の全ゲノム配列を取得することに成功し、予備的な比較解析から、菌株間あるいは大腸菌との間でのゲノム構造の高い保存性や配列相同性のレベルが明らかになり、さらに本菌の *stx2f* 遺伝子も EHEC と同様にラムダ様プロファージにコードされていることも明らかとなった。また、世界初の *E. albertii* による集団感染事例を同定し、本菌がヒトにおいて集団感染を起こしうる腸管病原体であることを明確にすることができた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 以下 EHEC）としては O157 の血清型をもつ菌株が代表的であり、患者から分離される頻度が最も高い。しかし、EHEC には O157 EHEC 以外にも様々な血清型を有する菌株（non-O157 EHEC）が存在する。それらは、基本的には O157 EHEC と同様の病原性を有すると考えられ、我が国の感染症法でも O157 EHEC と non-O157

EHEC は区別無く扱われている（3 類感染症）。2011 年に富山県を中心に発生した O111 EHEC による集団感染や、ほぼ同時期にドイツを中心に発生した O104 による大規模な集団感染の発生により、non-O157 EHEC の危険性、さらにはこれらの菌株に対する基礎研究の推進や種々の対策の必要性が再認識されることとなった。

non-O157 EHEC に関して、病原性の分子機構などに関する基礎的研究から分子疫学

解析などに至まで、様々な角度から幅広い研究を進めていくためには、non-O157 EHEC の生物学的特性や遺伝学的特性を十分に理解することが必要である。そのためには、全ゲノム配列の決定と基本的な配列解析を行うことにより全ゲノム情報を整備し、種々に解析のための情報基盤を確立しなければならない。

O157 EHEC のゲノム配列決定に関しては、2001 年に我々のグループにより O157:H7 Sakai 株の全ゲノム配列が決定され、また同年に米国のグループにより一部不完全ではあるが O157:H7 EDL933 株のゲノム配列が決定され、その後の O157 EHEC 研究の重要な情報基盤となり、ゲノム情報を基盤とした様々な研究の推進に貢献している。また、最近になって、米国の‘Spinach Outbreak’ 関連株 2 株の全ゲノム配列も決定されている。

一方、non-O157 EHEC のゲノム解析に関しては、2009 年に我々のグループが non-O157 EHEC の中では最も分離頻度の高い O26:H11, O111:H-, O103:H2 の全ゲノム配列（それぞれ 1 株）を決定している。しかし、海外では重要な non-O157 EHEC とされ、我が国でもある程度の分離頻度がある O121 や O145 等の血清型をもつ菌株については、未だにレファランスとなる全ゲノム情報が存在しないのが現状である。その 1 つの要因としては、次世代シーケンサ（NGS）の登場によってゲノム配列のスピードやコストは大幅に向上しているものの、フィニッシング技術の進歩は遅れており、完全長配列の決定には多大な労力と経験・技術を要することが挙げられる。

そこで、本研究では、まだ全ゲノム情報が整備されていない non-O157 EHEC の全ゲ

ノム配列を決定し、その基本的な配列解析（遺伝子のアノテーション等）に加えて、ある程度の比較ゲノム解析を行うことにより、これらの non-O157 EHEC に関するゲノム情報基盤を整備することを目標とする。また、最近の我々の研究によって、大腸菌の近縁種で新興腸管病原菌である *Escherichia albertii* の中にも、EHEC の最も主要な病原因子である Shiga toxin (Stx) を産生する株が存在することが明らかになっている。このことは、*E. albertii* も EHEC と同様な潜在的病原性をもつ可能性があることを示唆しており、*E. albertii* に対する行政的な対応を明確にしていく必要があることから、*E. albertii* のゲノム解析も実施することとした。

B.研究方法

① 解析対象：本年度の解析対象として、3 種類の non-O157 EHEC（O121:H19, O145:HUT, O165:H-）から 1 株ずつを選定した。それぞれの分離年、分離場所、Stx タイプ、分離患者の症状、集団感染例・弧発例の別についての情報を Table（本稿の末尾に添付）に示す。また、*E. albertii* に関しては、既に MLST 解析の結果から確実に *E. albertii* であることが確認できている 26 株（国外株や動物由来株も含む）の中から、4 株（2 株は下痢患者由来株、1 株はトリ由来株、1 株は下痢患者由来の Stx2f 産生株；最初の下痢患者由来 2 株のうちの 1 株はドイツ分離株であるが、他は国内分離菌株）をゲノム解析の対象として選定した。

② ゲノム解析：菌の培養と DNA の抽出は定法に従って行った。QIAGEN 社のカラムを用いて DNA 精製を行った後、ネブラライザ

ーを用いて DNA の断片化を行い、NGS (Roche 454 GS-FLX+と Illumina MiSeq) 用のライブラリーを作成した。ライブラリー作成 (shotgun library と mate pair/paired end library) および NGS を用いたシーケンス作業は、基本的には Roche および Illumina 社のプロトコールに従って行った。また、必要に応じて、40 kb 前後の DNA を分取し、pCC1 ベクターを用いて fosmid ライブラリーを作成した。

ゲノム配列決定の基本的パイプラインは、(i) ドラフト配列の取得、(ii) フィニッシング、(iii) 配列の高精度化の 3 つの行程からなる。(i) のについては、Roche 454 を用いて shotgun library および 8 kb の mate pair library の配列決定 (重複度は通常 x30 以上) を行い、得られた配列を Newbler でアッセンブルすることにより、ドラフト配列を取得した。(ii) の完全配列取得のためのフィニッシング作業は、短いギャップについては、まず GenoFinisher を用いた情報学的な gap filling を行った後、contig 末端に設計したプライマーを用いた PCR と PCR 産物の配列決定により行った。長いギャップについては、酷似した配列をもつ複数のプロファージの領域等、長い繰り返す配列に由来するため、fosmid ライブラリーの中から、ギャップあるいは contig 末端をカバーするクローンを PCR スクリーニングで検索し、選定したクローンの配列を決定することによってフィニッシングを行った。(iii) については、Illumina MiSeq を用いて pair end sequence (250 bp x2) を取得し、Bwa と samtools を用いて Illumina リード配列のマッピングと SNP の抽出 (配列修正) を行い、ゲノム配列の高精度化を行った。

なお、高精度ドラフト配列を取得する場合には、(i) と (iii) のステップのみを行うか、Illumina MiSeq のリード配列のみを取得して Platanus を用いてアッセンブリを行った。③ 配列解析：オートアノテーション等の基本的な配列解析には MiGAP および Imc-ge ソフトウェアを用いた。相同性解析には各種の blast プログラム、また genome synteny の解析や相同領域の可視化等には GenomeMatcher 等のプログラムを用いた。(倫理面への配慮)

全ての実験について、「宮崎大学病原体等安全管理規定」および「宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り、宮崎大学病原体等安全管理委員会および宮崎大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受けた後に実施した。

C. D. 研究結果と考察

① 3 種類の non-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の解析：末尾の Table にまとめたように、各血清型について、それぞれ 1 株 (いずれも国内分離株) の解析対象を選定し、全ゲノム配列決定を行った。並行して作業を進めたために時間を要したが、O121:H19 のプラスミド上に 2 つのギャップが残っているものの、3 株の完全配列が取得はほぼ終了したといえる段階に到達した。現在、上記のギャップ処理の他、Illumina リード配列を使ったゲノム配列の高精度化を行っている段階である。したがって、細かな配列解析はまだ行っていないが、いずれの non-O157 EHEC の染色体上にも、O157, O26, O111, O103 と同様に多数のプロファージが存在することが確認できており、これが大腸菌としては比較的サイズ

の大きな染色体をもつことに大きく寄与していると考えられる。また、いずれの菌株にも大型の病原プラスミドが存在しており、この点も O157, O26, O111, O103 と同様であることが確認された。

② *E. albertii* の解析：本菌に関しては、国内外において分離された *eae* 遺伝子保有菌株 275 株の MLS 解析（先行研究の成果）によって *E. albertii* として同定された 26 株の中で、比較的系統関係の離れた 4 株をゲノム解析対象株として選定してゲノム解析を行い、全ての株の全ゲノム配列を取得することに成功した。また、他の 22 菌株についても高精度ドラフト配列（Illumina 配列のみ）を取得した。

これらの 4 株の配列については、Illumina リード配列を使ったゲノム配列の高精度化を行っている段階であるが、*E. albertii* 菌株間および大腸菌との予備的なゲノム比較を行い、以下の結果を得ている。

(i) *E. albertii* のゲノムサイズ：4 株のゲノムサイズは、それぞれ 4.60 Mb、4.66 Mb、5.14 Mb [200 kb と 100 kb のプラスミドを含む]、4.56 Mb であり、*stx2f* 遺伝子保有株のみがプラスミドを保有していた。

(ii) *E. albertii* 菌株間での比較：ゲノム構造（シンテニー）は 4 株間で非常によく保存されており、塩基配列の相同性も 98-99% という高い identity を示した。

(iii) 大腸菌との比較：大腸菌 K-12 MG1655 株とのゲノム比較では、*E. albertii* と大腸菌との間で大きなゲノムの再編は検出されず、ゲノムシンテニーは 2 菌株間で高度に保存されていることが明らかになった。しかし、2 菌株間で保存されている配列の相同性（nucleotide identity）は 90% 程度であり、ゲ

ノム配列相同性の面からも本菌は大腸菌とは別菌種といえることが確認された。

(iv) *stx2f* 遺伝子：*stx2f* 遺伝子保有株のゲノム配列からは、*stx2f* 遺伝子をコードするプロフェージが同定でき、このプロフェージも多くの EHEC の Stx フェージと同様に lambda-like phage であること、また同じプロフェージが細胞膨化致死毒素（Cytotolethal dystending toxin, CDT）遺伝子をコードしていることも明らかになった。

また、ゲノム解析と平行して、熊本県保健環境科学研究所との共同研究で、2011 年に熊本県で発生した LEE 陽性で非典型的な性状を示す大腸菌による集団食中毒事例の再解析を行い、これが *E. albertii* による集団感染事例であることを明らかにし、論文発表を行った。これは、世界初の *E. albertii* による集団感染事例であり、本菌がヒトにおいて集団感染を起こしうる腸管病原体であることが明確となった。

E. 結論

3 種類の non-O157 EHEC（O121:H19, O145:HUT, O165:H-）のゲノム解析について、完全配列の取得がほぼ終了したといえる段階に到達した。現在、2 カ所のギャップ処理とゲノム配列の高精度化を行っている段階であるが、今後、各血清型の他の菌株の高精度ドラフト配列取得し、今回得られた配列をレファランスとして用いた解析を行うことにより、それぞれの血清型の基本的なゲノム特性を明らかにすることができる。*E. albertii* についても 4 株の全ゲノム配列を取得することに成功した。これらについてもゲノム配列の高精度化を行う必要があるが、菌株間および大腸菌との間でのゲノム

構造の高い保存性や塩基配列相同性のレベルが明らかになった。また、本菌の *stx2f* 遺伝子も EHEC と同様にラムダ用プロファージにコードされていることが明らかになった。さらに、世界初の *E. albertii* による集団感染事例を同定し、本菌がヒトにおいて集団感染を起こしうる腸管病原体であることを明確にすることができた。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

1. 論文発表

1) T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 19(1):144-146, 2013.

2) 林哲也: 同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる: 病原性大腸菌を例として. *Neuroinfection* 17(1):26-34, 2012.

3) 小椋義俊, 林哲也: 腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化. *感染・炎症・免疫* 42:182-195, 2012.

4) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性. *神経内科* 76(2):155-163, 2012.

2. 学会発表

1) T. Hayashi (Invited Speaker): Complete genome sequencing of non-O157 EHEC and other Stx-producing bacterial species. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga

Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

2) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J.G. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Significant prevalence of *Escherichia albertii* among the strains identified as enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* and the presence of Shiga toxin-producing *E. albertii* strains. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

3) Y. Ogura, T. Mako, T. Ooka, M. Ohnishi, T. Hayashi: Comparative genomics of Stx2 prophages in O157:H7. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

4) Md. Asadulghani, T. Ooka, Md R. Islam, K. Murase, Y. Ogura, A. Iguchi, MA. Islam, T. Hayashi: Origination of new Stx phages by recombination between Stx1 and Stx2 phage genomes in *Escherichia coli* O157. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

5) 小椋義俊, Md. Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也: O157 Stx2 phage の包括的ゲノム比較・機能解析により明らかとなった Stx2 高産生型 phagen の存在第

- 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.
- 6) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 瀬戸順次, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.
- 7) 楠本正博, 深水大, 吉田英二, 山本史子, Francis Shahada, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 小椋義俊, 秋庭正人, 林哲也: 動物由来病原性大腸菌における IS-excision enhancer の分布. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.
- 8) 楠本正博, 深水大, 吉田英二, 山本史子, Francis Shahada, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 小椋義俊, 秋庭正人, 林哲也: ブタから分離された毒素原性大腸菌における IS-excision enhancer の分布. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 9/14-16, 2012, 岩手県盛岡市.
- 9) 徳岡英亮, 大岡唯祐, 古川真斗, 浴永圭吾, 徳永晴樹, 東竜生, 林哲也, 原田誠也: *Escherichia albertii* が主因と推定された食中毒事例について. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 10/25-26, 2012, 福岡市.
- 10) 林哲也 (特別講演): ゲノム解析技術の急速な進化がもたらすゲノム研究の新たな展開. 日本科学哲学会第 45 回 (2012 年) 大会, 11/10-11, 2012, 宮崎市.
- 11) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O26 におけるゲノムアダプテーション解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.
- 12) 大岡唯祐, 桂啓介, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: *Escherichia* 属の新菌種 *E. albertii* のゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.
- 13) 小椋義俊, Md Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也: 高解像度系統解析による腸管出血性大腸菌 O157 の Stx2 高産生性系統の同定. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.
- 14) 大岡唯祐, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.
- 15) 楠本正博, 小椋義俊, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 秋庭正人, 林哲也: ブタから分離された大腸菌における腸管出血性大腸菌 O157 プロフェージ様エレメントの分布. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.

Table Sequenced O157 and non-O157 EHEC strains and their genomic features.

serotype	O157:H7	O26:H11	O111:H-	O103:H2	O121:H19	O145:HUT	O165:H-
strain name	Sakai	11368	11128	12009	51104	11190	72951
year of isolation	1996	2001	2001	2001	2005	2011	2007
isolated in	Osaka	Hiroshima	Shizuoka	Chiba city	Yokohama city	Miyazaki	Yamagata
stx type	Stx1 & Stx2	Stx1	Stx1 & Stx2	Stx1 & Stx2	Stx2	Stx1 & Stx2	Stx2
symptoms of patient		diarrhea	diarrhea, bloody stool	diarrhea, bloody stool	diarrhea, HUS	diarrhea, bloody stool	HUS
case	outbreak	outbreak	sporadic	sporadic	sporadic	sporadic	sporadic
chromosome (kb)	5,498	5,697	5,371	5,449	5,256	5,375	5,159
plasmid (kb)	93* 3	85* 63 6 4	205 98 78* 8 7	72*	1 plasmid (2 gaps)	92* 71	77* 33
	Hayashi et al., 2001	Ogura et al., 2009	Ogura et al., 2009	Ogura et al., 2009	This study	This study	This study

*virulence plasmids encoding enterohemolysin and other virulence factors

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究
— Stx ファージの多様性についての解析 —

研究分担者 綿引 正則（富山県衛生研究所・主幹研究員）
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）
研究協力者 木全 恵子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 嶋 智子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所・主任研究員）
研究協力者 金谷 潤一（富山県衛生研究所・研究員）

研究要旨 平成23年4月に発生した焼肉チェーン店を原因施設とした腸管出血性大腸菌の集団食中毒事例では、細菌学的な特徴として、原因菌が分離されなかった患者群に重症患者が含まれていること、血清群 O111 には安定な Stx2 プロファージと不安定な Stx2 プロファージが存在することなど、これまでの事例とは異なる特徴を示していた。今回、臨床検体および分離株から Stx2 ファージを複数分離し、その構造を明らかにした。その結果、ファージ間の構造は極めて類似していること、Stx2 ファージの免疫に関する遺伝子の一つである cI 遺伝子の下流に II 型制限修飾遺伝子単位が挿入されていることなどが明らかになった。また、今回解析した Stx2 ファージの一つである 395 ファージの一部には組換えが起こっていることが推定された。このような特徴は、本食中毒の特徴である原因菌が分離されなかった患者群の存在と不安定なプロファージ現象との関連性について示唆するものであるが、今後、さらに検討が必要である。

A. 研究目的

富山県を中心に発生した腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O111:H8 (以下、O111) 及び O157:H7 (O157) の混合感染型集団発生事例では、溶血性尿毒症候群 (HUS) や急性脳症を呈した多数の患者とともに、5 名が亡くなった。集団食中毒の症例定義に合致する患者の中で、便培養において EHEC が全く検出出来なかった患者や Stx2 を産生しない O111 (O111stx-) が検出された重症患者が多数存在していること、患者血清中の O 抗原に対する抗体価は主に O111 に対するものが上昇し、さらに分離菌を用いた毒素産生性に関する解析から、この重症化症例の原因は主に Stx2 を産生する O111 (O111stx2) であると考えられており、重症化の原因として O157 の関与は低かったと考えている。従来、EHEC 感染症は O157 に因るものが多かったが、最近、O157 以外の血清群 (non-O157) による EHEC 感染症で、しかも重症となる集団あるいは散発事例が世界的に報告されている。従って、本事例の分離株の特徴を解析することは、non-O157 の EHEC 感染症の解明や本事例のような感染症が発生したときの対応に役立つとともに、細菌学的にも重要と考える。

EHEC が産生する志賀毒素 (Stx) が本感染症の主要な病原因子の一つであり、特に Stx2 は Stx1 と比べて重症化と関連することが知られている。

また、EHEC に存在する λ 様ファージゲノム中に Stx 遺伝子が存在し、通常は宿主大腸菌ゲノム中に組込まれた状態のプロファージ (特に、Stx 遺伝子を持つものを Stx プロファージと呼ぶ) として存在する。毒素産生様式は、溶原菌のファージの増殖及び溶菌によるファージ粒子の放出というファージの生活環に連動して Stx が産生されることが知られている。特に今回の食中毒では、これまでの EHEC 感染症や食中毒事例と比較すると、Stx2 ファージが異なっている可能性が示唆されている。本研究では、この食中毒事例で分離された O111 や O157 で特に重症化と関連する O111 株のファージの役割を解明することを目的とする。

今年度は、食中毒事例関連の分離株及び患者検体から Stx2 ファージを分離し、その構造を解析することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 検体

Stx2 ファージの分離源は、O111stx2 分離株と患者由来血便検体を用いた。

分離株は、食中毒関連検体から分離された O111stx2 株で、検体番号 TIH395, TIH451 を用いた。便検体は、いずれも血便検体で TIH004, TIH 010, TIH017, TIH019, TIH034, TIH036, TIH039, TIH050, TIH092 を用いた。