

international conference caliciviruses. Beijing, China, 2013

7. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013

8. Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4\_2006b. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

9. Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

10. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

11. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel

norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. Japan-Taiwan joint meeting. Shinjuku, Tokyo, JAPAN.

12. Kazuhiko Katayama, Reiko Takai-Todaka, Akira Nakanishi, Kosuke Murakami, Tomoichiro Oka, Susana Guix, Tyler M. Sharp, Robert L. Atmar, Sue E. Crawford, and Mary K. Estes A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

13. Kosuke Murakami, YoungBin Park, Chie Kurihara, Tomoichiro Oka, Takashi Shimoike, Reiko Takai-Todaka, Takaji Wakita, Tsukasa Matsuda, Ryota Hokari and Katayama Kazuhiko Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

14. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

15. Suzuki Y. Detecting natural selection from the comparison of

- synonymous and nonsynonymous substitutions. NIG Workshop: Evolution of Junk DNAs, National Institute of Genetics, Mishima, Japan, June, 2013.
16. 藤井克樹、村上耕介、戸高玲子、中込とよ子、中込治、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷
  17. 西村直子、野口篤子、伊藤陽里、辰巳正純、大場邦弘、中込治、中込とよ子、藤井克樹、片山和彦：我が国で流行したロタウイルスの遺伝子型の全国分布(2012 年) 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷
  18. 伊藤陽里、中込とよ子、中込治、藤井克樹、片山和彦：京都府南丹地区におけるロタウイルス胃腸炎入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷
  19. 三浦忍、野口篤子、藤井克樹、中込治、片山和彦、中込とよ子、高橋勉：秋田県由利地区におけるロタウイルス胃腸炎による入院率 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷
  20. 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦：ノロウイルス小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013 年 6 月、倉敷
  21. 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 25 回学術集会、2013 年 11 月、神戸
  22. 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦：ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究(2012 年) 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
  23. 高木弘隆、藤井克樹、小林宣道、棚林清、片山和彦：多様な A 群ロタウイルス株に対応する感受性 MA104 細胞クローン樹立の試み 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
  24. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦：カリシウイルスのリバーシジェネティクスシステムを用いた感染性粒子の研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
  25. 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂刈量太、松田幹、片山和彦：ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズム 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
  26. 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦：マウスノロウイルス感染細胞内のウイルス蛋白質間とそのゲノム RNA との相互作用 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸
  27. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之：ノロウイルス GII.4\_2006b のカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約。 第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10-12 日、神戸。
  28. 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤裕徳。分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析。 第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10-12 日、神戸。
  29. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中

村浩美、佐藤彩、岡智一郎、片山和彦、野田衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳。ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 10-12 日、神戸。

30. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013

31. 長井 誠、南-福田 藤子、小原潤子、小池新平、赤松裕久、土赤 忍、片山幸枝、大場真己、佐々悠木子、大松 勉、古谷哲也、片山和彦、白井淳資、水谷哲也、糞便を材料とした次世代シーケンスによるウシ A 群ロタウイルスの遺伝子型別、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月、岐阜

32. 片山和彦 レファレンスセンター会議 ノロウイルス 衛生微生物技術協議会 平成 25 年 7 月 11 日、12 日

33. 鈴木善幸：教育講演「病原体の遺伝子解析-解析からわかること-」。衛生微生物技術協議会第 34 回研究会、名古屋市中企業振興会館（吹上ホール）、名古屋、2013 年 7 月

34. 鈴木善幸：How can we predict the future? 国立遺伝学研究所研究会「新機能獲得の分子進化」、三島、2013 年 8 月

### 3). その他

(講演会・シンポジウムなど)

1. 片山和彦 平成 25 年 12 月 9 日月曜日 第 42 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイル

ス薬開発への取り組み-ウイルス感染症に挑む-」ノロウイルスたんぱく質構造と抗ウイルス薬

2. 片山和彦 平成 26 年 1 月 18 日土曜日 第 13 回東北臨床感染症研究会 勝山館 4 階「貴賓室」宮城県仙台市青葉区上杉 2 丁目 1-50 「腸管感染症」“ノロウイルス”

3. 片山和彦 平成 25 年 5 月 23 日 日本食品工業クラブ講演会 ノロウイルス感染症

4. 片山和彦 平成 25 年 6 月 4 日 関東労災病院主催 講演会（川崎市）ノロウイルス感染症

5. 片山和彦 平成 25 年 6 月 18 日 シラバス・知の広場（感染研戸山庁舎共用第一会議室）ウイルス性食中毒

6. 片山和彦 平成 25 年 7 月 6 日 武田薬品工業主催 ノロウイルスセミナー（東京メトロポリタン丸の内）ノロウイルスの基礎

7. 片山和彦 平成 25 年 7 月 13 日 北里セミナー（北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール）ノロウイルス感染症

8. 片山和彦 平成 25 年 10 月 18 日 「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域専門家会議の講師（秋田県秋田市中通 6-1-3 イヤタカ）下痢症ウイルスの基礎と分子疫学

9. 片山和彦 平成 25 年 11 月 5 日 郡山市主催講演会 ノロウイルス食中毒発生防止対策及び感染症発生防止対策について（福島県産業交流館 ビッグパレットふくしま）

10. 片山和彦 平成 25 年 12 月 4 日

- 社団法人福島県食品衛生協会主催 講習会  
ノロウイルス食中毒の予防と対策 (福島  
県福島市三河南町 1-20 コラッセ福島 4  
階ホール)  
(新聞) 指導、監修
11. 週間 ホテルレストラン 猛威を  
ふるったノロウイルスを検証 p57-60, 2月  
8日号, 2013.
  12. 日経メディカル ニュース追跡  
ノロウイルス変異株が猛威 p33, 1月号,  
2013.
  13. 片山和彦 冬の食中毒、ノロウイ  
ルスの感染予防対策 健康ふしぎ発見ニュ  
ース からだの不思議 12月号, p12-6,  
2013. 健学社.
  14. 片山和彦 しっかり手洗いで防ぐ  
ノロウイルス 健康の広場 第1775号  
平成24年1月11日号 4面 株式会社 法  
研
  15. 片山和彦 ノロウイルス対策 心  
と体 保険総合大百科 保険ニュース・心  
の健康ニュース 縮刷活用版 2011年 少  
年写真新聞社 ISBN978-4-87981-361-9
  16. 医薬品の品質管理とウイルス安全  
性 第7章 新しいウイルス検出法、ウイ  
ルス診断法、ウイルス試験 総論 (執筆;  
片山和彦) 日本医薬品等ウイルス安全性  
研究会 ISBN978-4-8306-0331-0
  17. 朝日新聞 2014年2月22日土曜  
日 夕刊 1面「ノロ感染まだ要警戒・寒  
い首都圏 続く発生」
  18. 朝日小学生新聞 2013年12月20  
日金曜日 日刊 1面「手洗いで予防ノロ  
ウイルス」
  19. 朝日新聞 2013年11月27日水曜  
日 日刊 37面 「ノロウイルス流行の兆  
し」
  20. 読売新聞 2014年1月22日水曜  
日 日刊 25面 ノロウイルス食中毒 全  
国流行 トイレで飛散、感染に注意
  21. 朝日新聞 2013年12月1日日曜  
日 日刊 16面 ノロウイルス手洗いで撃  
退
  22. 少年写真新聞社 ほけん通信  
2014年1月18日号 ノロウイルスの性質  
を知って、流行の広がりを防ごう
  23. 少年写真新聞 2014年1月18日  
号 知っていますか?ノロウイルスの通り  
道
  24. 朝日小学生新聞 2014年1月18  
日土曜日 日刊 1面「ノロウイルス?905  
人欠席・静岡・浜松の14項 下痢やはき気」
  25. AERA 2014年2月3日 #5 ノロ  
ウイルスを無自覚でまき散らす脅威「激し  
い突然変異で拡散」 p58-59
  26. 朝日新聞 2014年1月28日火曜  
日 夕刊 10面 ノロ流行続く
  27. 共同通信社 2014年2月4日 あ  
なたも感染源に? ノロウイルス、意識変え  
て 経路多く、症状ない人も
  28. 時事通信社 ノロウイルス流行拡  
大=自覚症状無くても感染源に-手洗い徹  
底を
  29. 日本経済新聞 2014年2月25日  
火曜日 日刊 18面 ノロウイルス攻略に  
道
  30. (テレビ放送) 出演、指導、監修
  31. 2013年11月25日 ワイド!スク  
ランブル
  32. 2014年1月28日 NHK ニュース  
セブン ノロウイルス見えない感染を防げ
  33. 2014年1月17日 NHK ノロ対策

「塩素系漂白剤で消毒を」

34. 2013年12月6日 日本テレビ ニュースエブリイ

35. 2014年1月14日 読売テレビ 朝生ワイドす・またん！

36. 2014年1月20日 日本テレビ NEWS ZERO

37. 2014年1月20日 NHK NEWSWEB

38. 2014年1月23日 日本テレビ スッキリ！！

39. 2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノロウイルスの流行状況

40. (ラジオ番組) 出演

41. 2014年1月23日 垣花正あなたとハッピー “ノロウイルスの流行について”

42. 2014年1月28日 NHK ラジオ第一 NHK ジャーナル (その他)

43. 厚生労働省ロタウイルスワクチンファクトシート著述

44. 厚生労働省ロタウイルスワクチン作業チームメンバー・報告書作成

45. WHO poliovirus meeting in Beijing, China. Dec17, 2013

46. WHO poliovirus meeting in Geneva, Switzerland May14-16, 2013

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

「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	寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究協力者	石原 朋子	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		地方衛生研究所

研究要旨 平成 24 年度の本研究においてデータの蓄積を行った、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。2013 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。2013 年に分離された EHEC O157 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 O157 では、1295 株に対して 2013 年に分離された新しいサブタイプとして 591 種類、2012 年に分離されたことのあるサブタイプが 37 種類、その他が 41 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、517 株に対して 210 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 38 種類存在したが、そのうち 5 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 O26 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 5 種類あり、うち 1 種類では 5 県の散発事例および集発事例から同一 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 25 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、「感染症サーベイランスシステム」(NESFD) で公開した。また、同システム内に設置された掲示板に

において、広域共通パターンを示す株についての情報を公開するとともに、全国 6 ブロックの研究分担者を介した各ブロックの地方衛生研究所(地研)への情報提供を行った。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、2013 年に分離・送付された 1295 株が、2013 年に分離された新しいサブタイプとして 591 種類、2012 年に分離されたことのあるサブタイプが 37 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

2013 年に分離された 1295 株の EHEC 0157 は、669 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 38 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、5 ヶ所以上の異なる都道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 d483 は、2008 年に初めて分離されたパターンであるが 2013 年には 15 ヶ所の広域にわたって分離された(図 3)。2013 年においては長期間にわたって分離されており、MLVA の結果では複数の変異株があることが明らかになった。TN h406 は 2012 年に初めて分離されたパターンであり、散発 1 事例のみであったが、2013 年には 9 ヶ所の広域から分離された(図 4)。分離時期は約 3 ヶ月にわたっていたが、関東地域周辺においては 7 月に集中していた。026 では、3 ヶ所以上の異なる府県で分離されたパターンが 5 種類あり、5 ヶ所以上の異なる府県から分離されパターンは 1 パターンであった。TN i69 は、2013 年に初めて分離されたパターンであり、分離時期は約 4 ヶ月に渡っていた(図 7)。散発事例および集発事例由来株を含み、集発事例については、8 月に発生した埼玉県における 2 事例であった。

#### 3. 広域共通パターンを示す株についての情報提供

3 地研以上で共通パターンを示す株について、共通パターンの TN および泳動像、分離された地研数および株数などの情報をまとめ、NESFD 内掲示板で公開するとともに、全国 6 ブロックの研究分担者を介した各ブロックの地研への情報提供を行った(図 8-11)。

### 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、2013 年においても、5 ヶ所以上の都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。特に、TN d483 を示す株は長期にわたって分離されており、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、時間経過とともに多様化した可能性も考えられる。TN g307 と i253 はデンドログラムにおいて同一クラスター内に存在する類似パターンであった。前者を示す株が約 9 ヶ月にわたって分離されたのに対し、後者の株は約 2 ヶ月であったことから、感染源中に存在した TN g307 を示す株の様々な環境下での複雑な生存状況が推定された。

広域共通パターンを示す株のうち、h406 を示す EHEC 0157 については、7 月に集中的に分離されたことをきっかけとして、当該株の情報提供を開始した。その際、IS-printing system (ISPS) による解析結果を同時に情報提供し、ISPS データベースの活用および当該株の効率的な探知が可能となった。

#### 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. 小林直樹、工藤由起子、寺嶋 淳；腸管出血性大腸菌感染症 特集 話題の新興・

再興感染症 臨床と微生物、41、27-31、2014

##### 2) 学会発表

1. なし

#### 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 (1295 entries)  
(2013/1/1 - 12/6) Tol : 1.5%

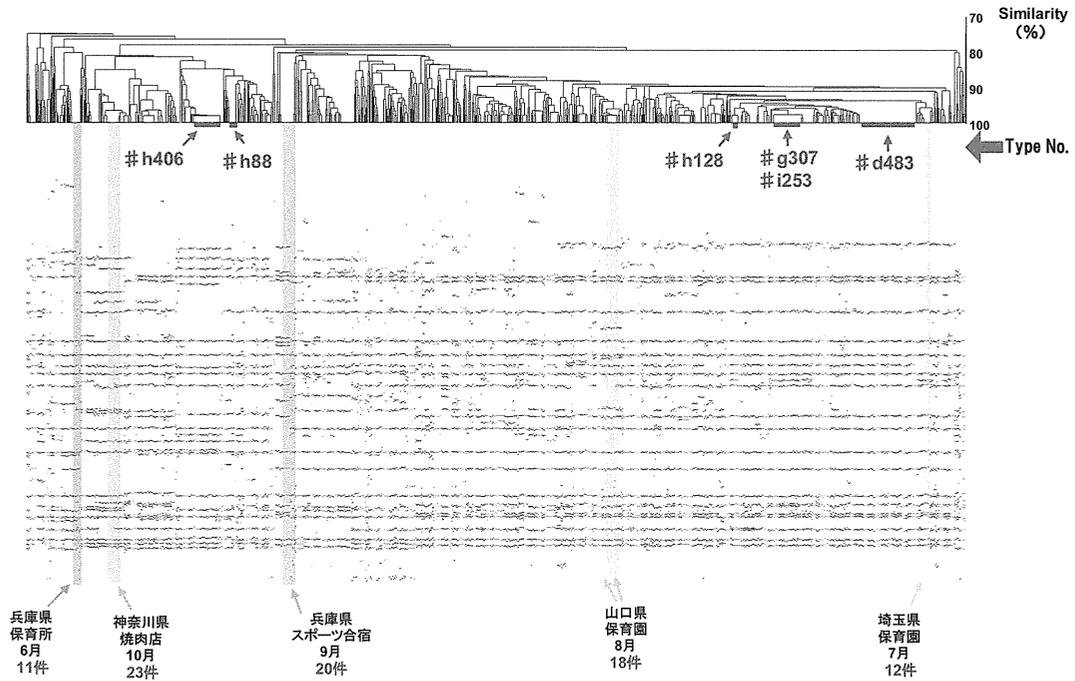


図 2

Dendrogram of EHEC O26:H/-isolates in Japan (517 entries)  
(2013/1/10 - 12/16) Tol : 1.5%

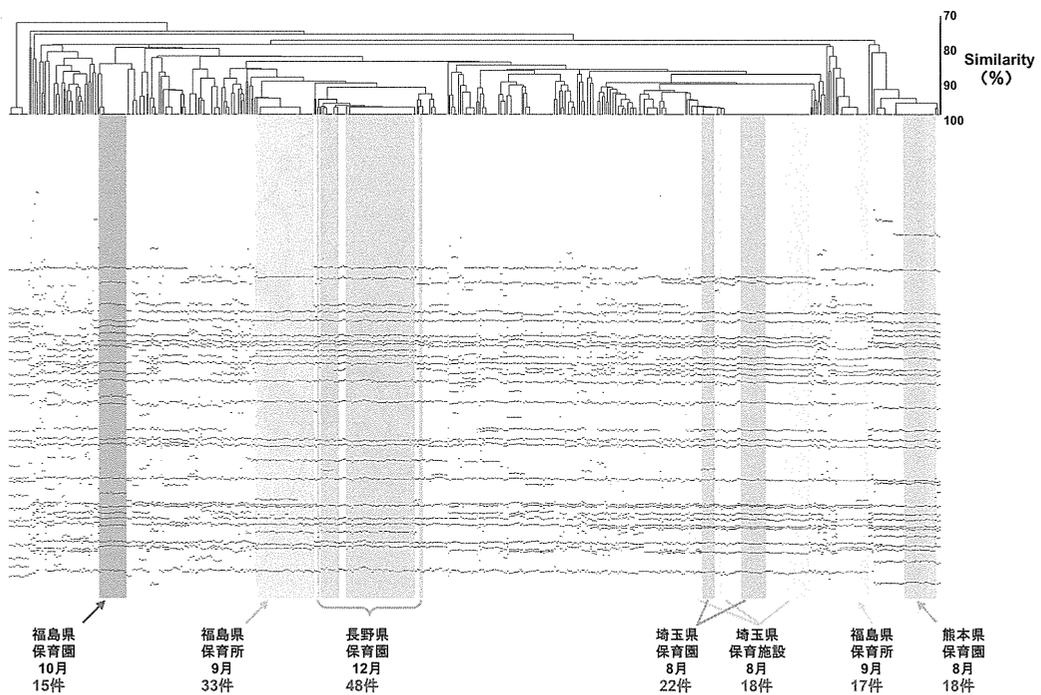


図 3

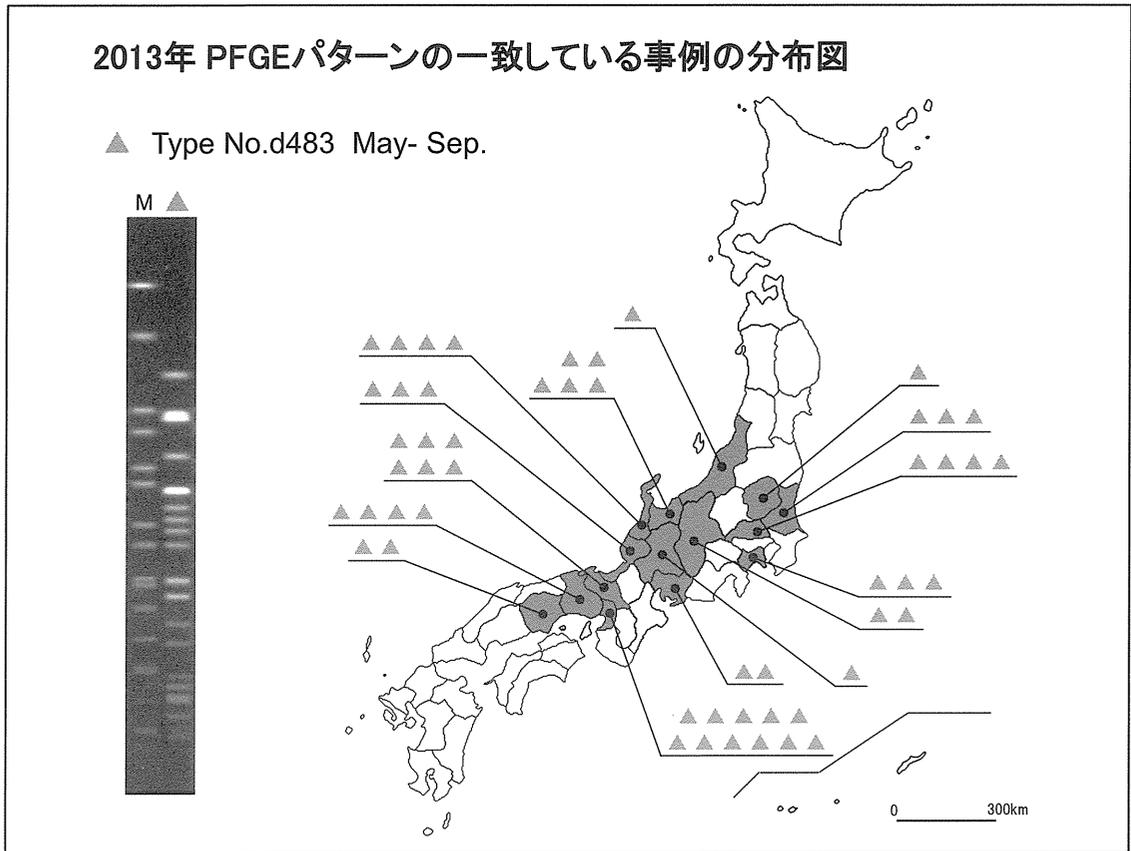


図 4

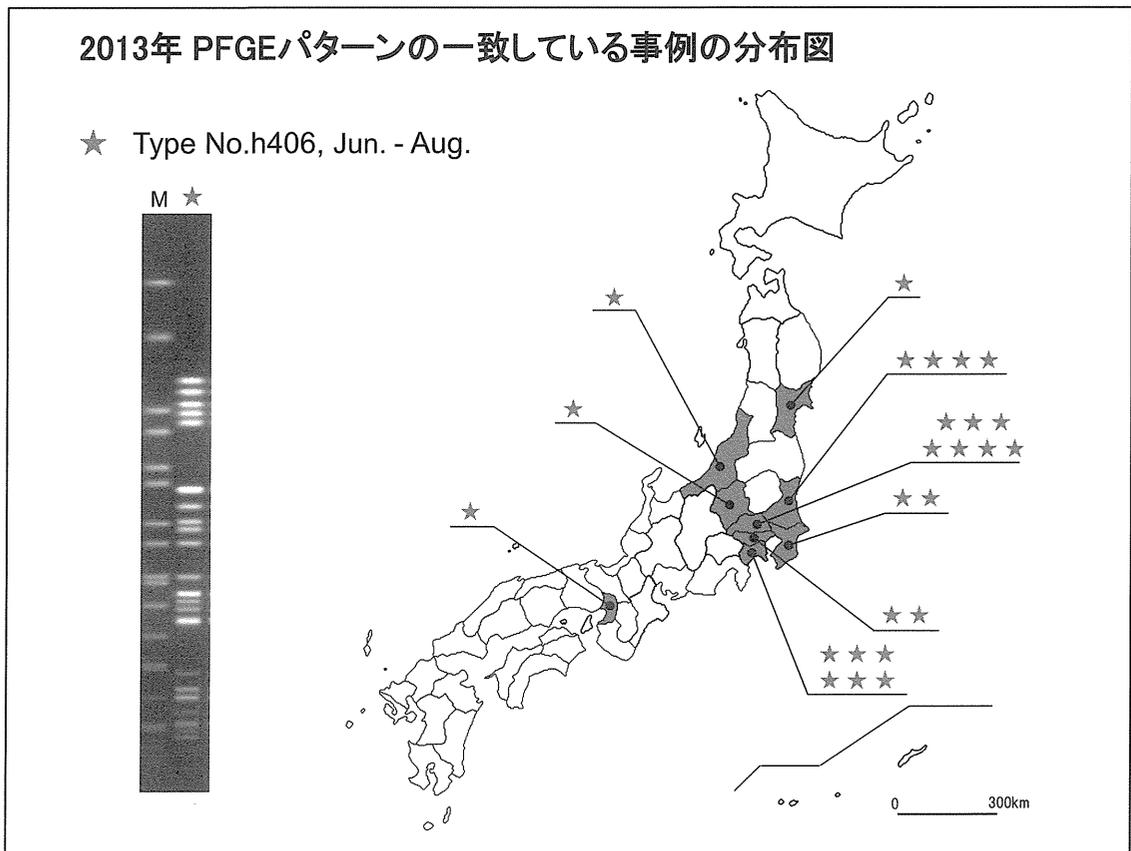


図 5

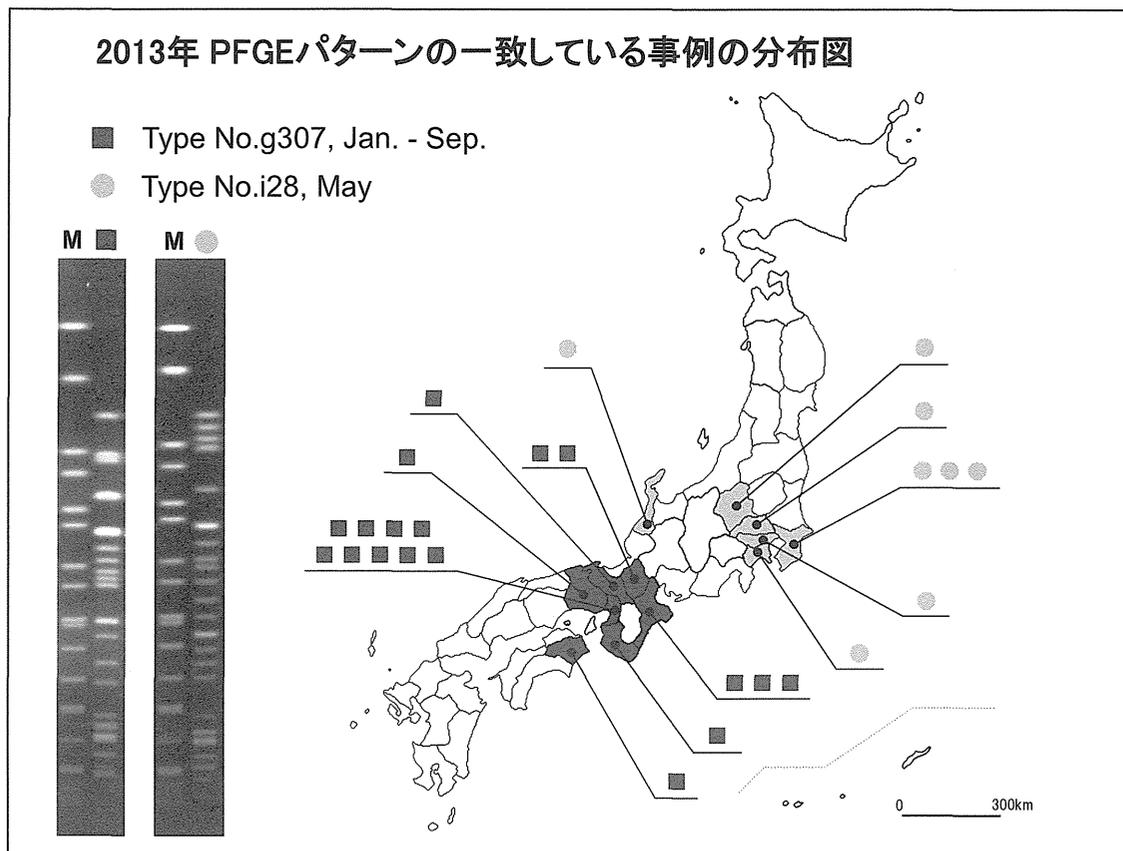


図 6

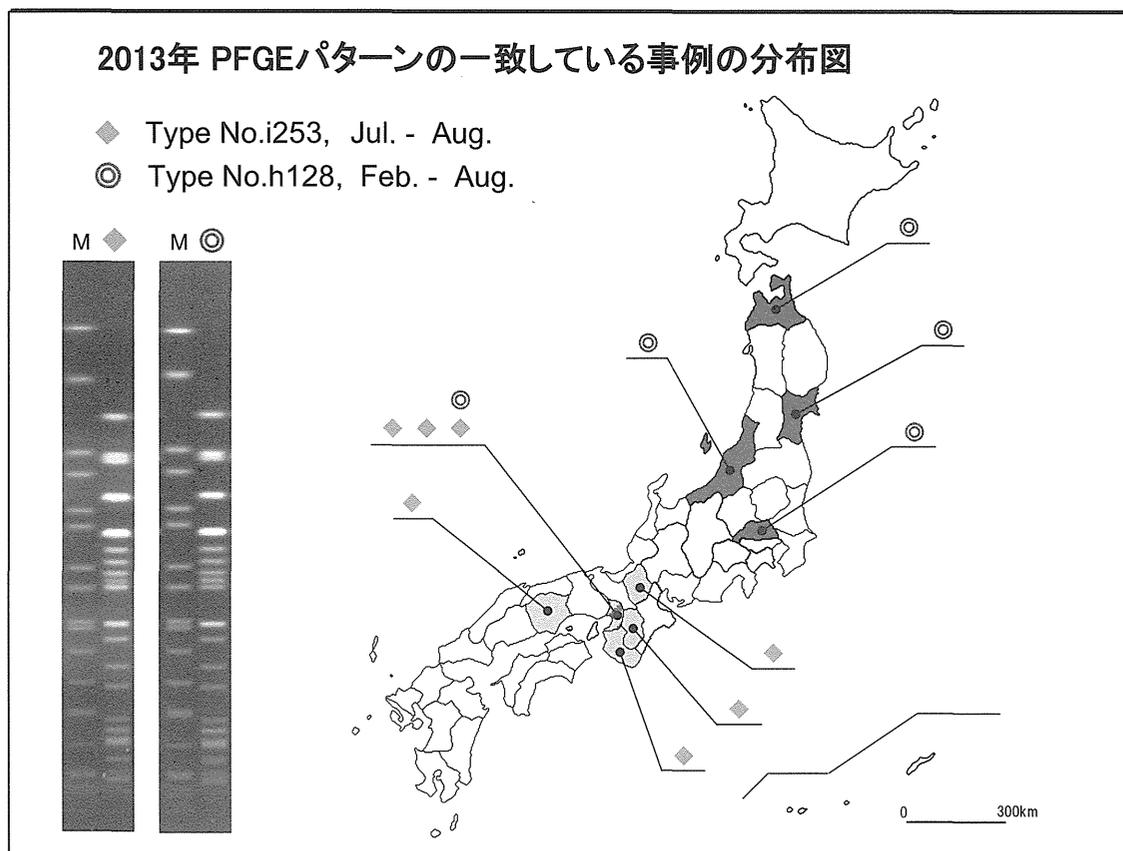


図 7

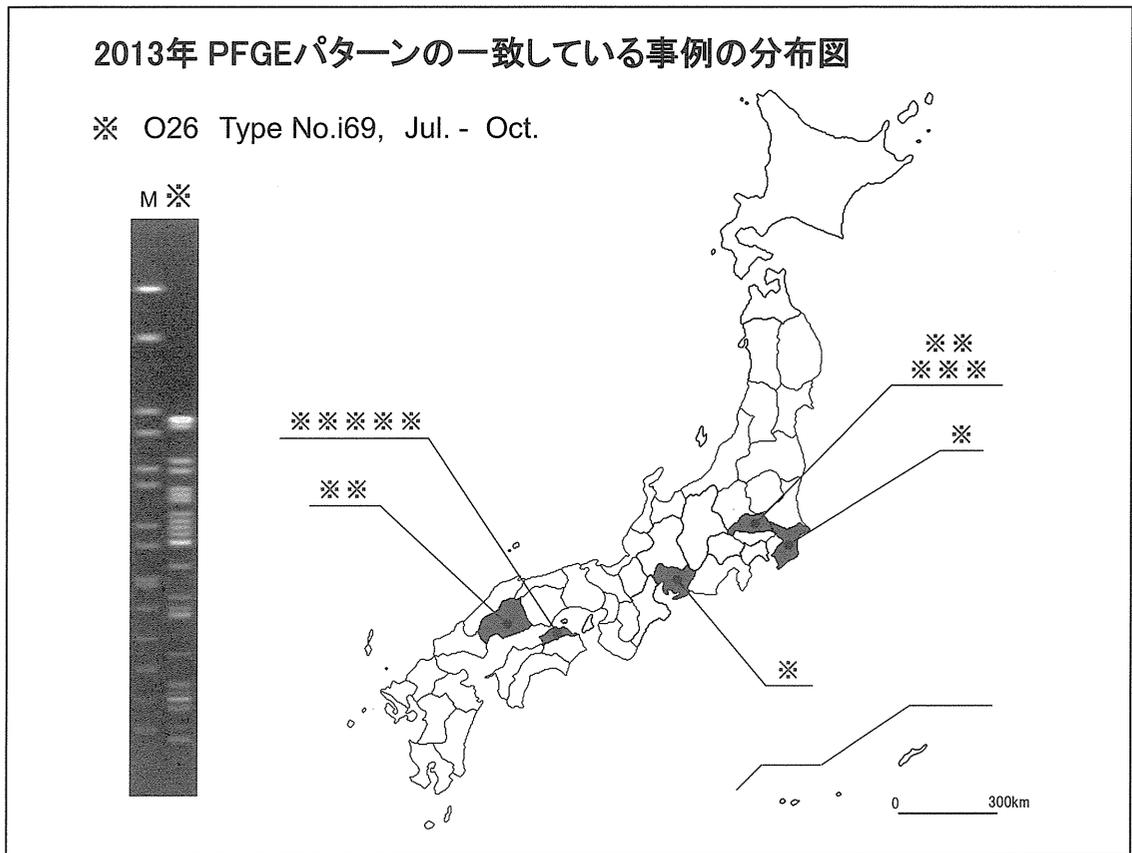


図 8

### 3地研以上で分離されたPFGE型

Type#	地研数	VT	菌株数	北海道 北新潟	関東 甲信 静	東海 北陸	近畿	中国 四国	九州
d483	13	1+2	29	1	14	10	4		
h406	8	2	34	1	33				
i28	6	2	10		7	3			
i133	5	1+2	10		10				
i195	5	1+2	9	4	5				
b423	4	2	14		14				
i18	4	1+2	9				4		5
h128	4	1+2	7	3	2		2		
g501	3	2	10					8	2
h245	3	2	8		8				
d594	3	1+2	8			7			1
i130	3	1+2	7		1		6		
i179	3	1+2	6		6				
i53	3	1+2	4		4				
i160	3	2	4	1	3				
i15	3	1+2	3		3				
h634	3	1+2	3	2	1				

(2013年11月1日現在、感染研細菌第一部解析株について)

図 9

## PFGEパターン

類似のPFGEパターン並びに疫学情報がありましたら、お知らせください  
 (問い合わせ先: 感染研細菌第一部、[ehec@nih.go.jp](mailto:ehec@nih.go.jp))

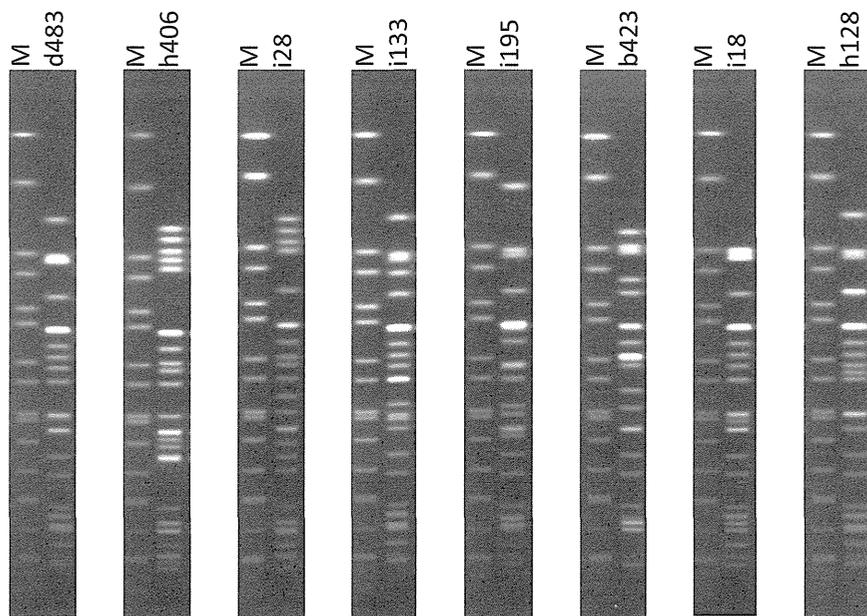


図 10

## Top 8 Type別発生状況

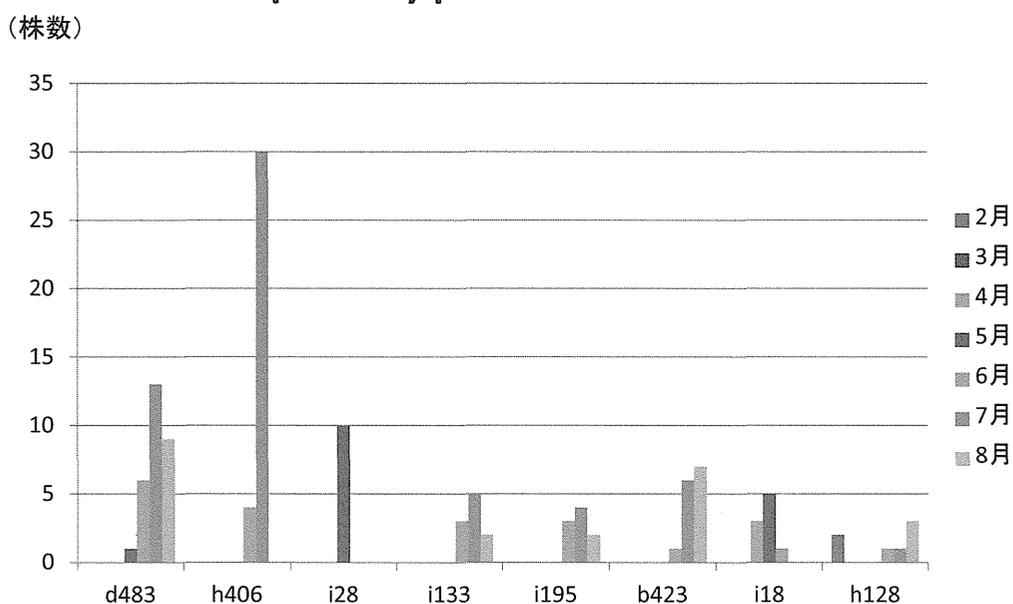
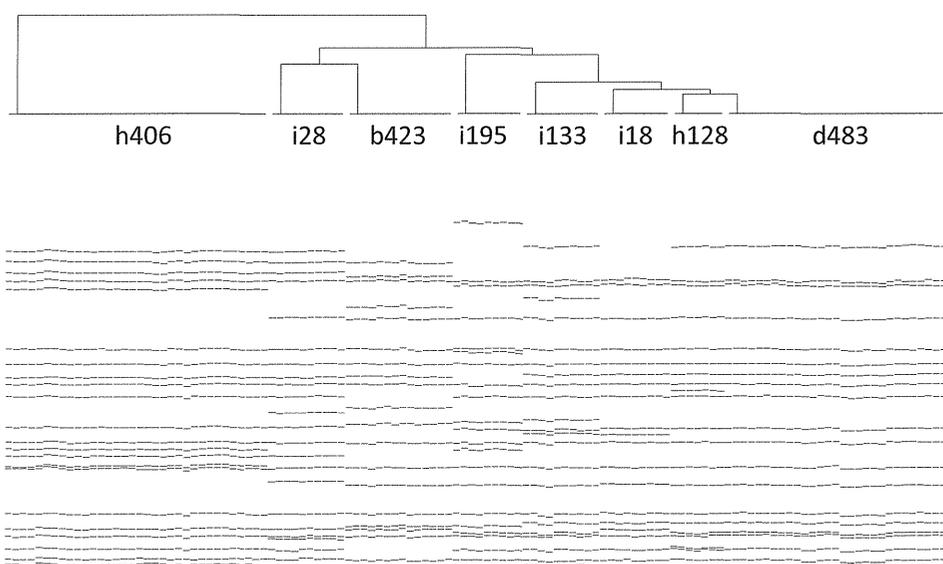


図 11

# PFGEパターン

d483,h406,i28,i133,i195,b423,i18,h128



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 25 年度 分担研究報告書

分担研究課題名: 「腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing system 解析結果の評価」

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: 石原 朋子(国立感染症研究所・細菌第一部)

## 研究要旨

国内でヒトから分離される腸管出血性大腸菌(EHEC)のうち、血清群 O157 は依然として全体の半数以上を占める。分離された EHEC O157 菌株間の相同性を解析する手法として、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法をゴールドスタンダードとして使用している。PFGEより解像度は劣るものの、迅速性に優れる IS-printing system (IS-PS) 法はすでに多くの地方衛生研究所等で分子疫学的解析に使用されている。本研究では、IS-PS 法による解析結果の評価を行うことを目的に、IS 法と PFGE 法による解析結果を比較した。その結果、集団発生事例だけではなく、散在的集団発生事例として複数の異なる地域で散在的に分離された菌株間の解析に使用可能であることも判明した。さらに、PFGE 型が同じであるが IS-PS 型が異なる菌株が存在することが明らかとなった。

IS-PS 解析結果のタイムリーな情報共有化を目指し、本研究班ではこれまでに IS-PS データベース (IS-DB) を構築してきた。IS-DB を拡充する目的で、2012-2013 年に分離された EHEC O157 株のデータを 570 株以上解析した。その結果、IS データベースに登録された菌株数は 2,121 となった(2013 年 2 月 7 日現在)。登録データの解析から、異なる PFGE 型を示す 50 株以上の菌株によって構成される同一 IS-PS 型が複数存在することが判明した。これらの IS-PS 型が分離された場合には PFGE 法等で確認を行うことが必須であると考えられる。

### A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) の半数以上は依然として血清群 O157 によるものである。分離された血清群 O157 を含む EHEC 菌株相互間の関係を分子レベルで比較するため、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法による解析結果をゴールドスタンダード

として使用している。PFGE は解像度に優れる一方、解析結果が得られるまでに数日から 1 週間程度の時間を要する。PFGE 以外の解析手段として、O157 ゲノム中に散在する挿入配列 (insertion sequence: IS) の 1 つである IS629 内部の共通配列とゲノム中の挿入位置情報を利用した PCR ベースのタイピング法である IS printing system (IS-PS) 法がある。IS-PS 法は数時間程度の解析時間で結果が得

られる上、型別の対象とする PCR 増幅断片は 36 本（例外としてエキストラバンドを判定基準に入れることがある）であり、これらの増幅断片の有無（1/0）で結果をデジタル化することも容易である。集団発生事例等で活用例がすでに報告されており、地方衛生研究所等でも使用頻度が上昇している。一般的に、IS-PS 法による解像度は PFGE より劣るとされているが、これまでの解析結果から、集団発生事例におけるスクリーニング法として十分使用可能であることが明らかとなっている（研究発表）。一方で、散発事例間での解析等への応用についてはこれまで評価が十分ではなかった。そこで本研究では、散在的集団発生事例（散発的に広域で発生しているが、同一の原因による感染と予想される事例）由来株を用いて、IS-PS 法と PFGE 法の解析結果について比較し、IS-PS 法の評価を行うことを目的とした。さらに、2012-2013 年に分離された O157 のうち、ピックアップした菌株について IS-PS 解析を行い、これまでの研究班の成果として構築した IS データベース（IS-DB）のデータ拡充を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 使用菌株の選定

全国の地方衛生研究所・保健所等から送付された EHEC O157 株のうち、集団発生事例由来株または散在的集団発生事例由来株（本研究では 5 カ所以上の自治体で分離され、同一 PFGE 型を示した株とした）を選択し、IS-PS による解析に使用した。

### 2) IS-PS 法

添付のプロトコールに従って解析を行っ

た。ただし、反応液のボリュームは 15  $\mu$ L とした（使用する反応液は一反応あたり 7.5  $\mu$ L）。解析データは、感染研・細菌第一部内に設置しているサーバー内に存在する IS-DB にデータ（インターネット経由で ID とパスワードを入力すればアクセス可能であるが、現時点では未公表）として入力した。

### 3) PFGE 法

従来のプロトコールに従って解析を行った。解析結果は BioNumerics Ver. 6.6 を使用してデンドログラム化した。

## C. 研究結果

### 1) 集団発生事例由来株の IS-PS 解析

IS-PS を開発した Ooka ら (*J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:2888-2894) の解析によれば、集団発生事例由来株を用いた IS-PS 解析結果は PFGE のそれと一致することが明らかとなっている。本研究においても、いくつかの集団発生事例由来株を解析したところ、PFGE 型が一致する株間では一部の例外を除いてほとんどのケースで IS-PS 結果が一致した（データ省略）。さらに、PFGE のバンドが最大で 7 本異なる場合でも同一の IS-PS 型を示すことが明らかとなった（データ省略）。以上の結果から、IS-PS 法は PFGE 法と比較して解像度は低いものの、集団発生事例では解析結果を迅速に得るための手法として十分活用可能であることが確認された。

### 2) 同一 PFGE 型を示す散在的集団発生事例由来株の IS-PS 解析

2012 年に全国から送付された EHEC O157 株について散発事例由来株相互間の PFGE 型を解析したところ、5 つ以上の異なる自治体から分離された菌株で同一 PFGE 型を示

す株がいくつか存在することが明らかとなった（PFGE 型 h62, h397, h52 および h150）。これらの PFGE 型について IS-PS 法の解析結果と比較した。

#### a) PFGE 型 h62

11 の異なる自治体から集団事例または散発事例由来として 2012 年 6 月から 10 月までに分離され、PFGE 型 h62 として型別された O157:H7 (VT2+) 菌株 (n=16) について IS-PS 解析を行ったところ、すべて同一の IS 型 AA338 (これらの IS 型名はデータベース上で自動的に割り振られる IS-PS 型固有の番号である) を示すことが明らかとなった。

#### b) PFGE 型 h397

6 つの異なる自治体からすべて散発事例由来として 2012 年 10 月から 2013 年 3 月までに分離され、PFGE 型 h397 として型別された O157:H7 (VT1+VT2+) 菌株 (n=9) について IS-PS 解析を行ったところ、すべて同一の IS-PS 型 AA241 となることが判明した。

#### c) PFGE 型 h52

7 つの異なる自治体から集団事例または散発事例由来として 2012 年 6 月から 12 月までに分離され、PFGE 型 h52 として型別された O157:H7/H- (VT2+) 菌株 (n=19; 資料 1) について IS-PS 解析を行ったところ、18 株については同一の IS-PS 型 AA330 となることが判明したが、残り 1 株は 1 カ所の PCR 増幅産物が得られない型 AA337 となることが判明した (資料 2)。従って、PFGE 型としては同一であるものの、IS-PS 型が異なる例が存在することが明らかとなった (資料 3)。AA330 には PFGE 型 i96 および i166 も含まれることから、これらの PFGE 型を比較した

ところ、h52, i96 および i166 は異なるクラスターに分類される一方で、IS-PS 型は同一であることが判明した (資料 3)。

#### d) PFGE 型 h150

8 つの異なる自治体から集団事例または散発事例として 2012 年 6 月から 9 月までに分離され、PFGE 型 h62 として型別された O157:H7 (VT1+VT2+) 菌株 (n=18; 資料 4) について IS-PS 解析を行ったところ、16 株については同一の IS-PS 型 AA039 となることが判明したが、残り 2 株はそれぞれの IS-PS 型が AA039 とは 1 カ所または 2 カ所異なる AA088 および AA041 となる (AA088 と AA041 は 1 カ所異なる) ことが明らかとなった (資料 5)。上記 c) の場合と同様に、PFGE 型としては同一で IS-PS 型が異なるケースが存在することが明らかとなった (資料 6)。AA039 には PFGE 型 e807, h82, h345, h380, i133, i179 が、AA041 には PFGE 型 h86 が含まれることから、これらの PFGE 型を確認したところ、異なるクラスターに分類される一方で、IS-PS 型は同一であることが判明した (資料 6)。

2012 年以降に分離された EHEC O157 株の IS-PS 解析を行い、当研究班の研究成果としてこれまでに構築している IS-PS のデータベース (IS-DB) へデータ入力を行った。520 株以上の菌株解析結果を IS-DB へ登録した結果、IS-DB に収載されているデータの総数は 2,121 件となった (2013 年 2 月 7 日現在)。

IS-DB に登録された IS-PS 型の解析から、登録されている同一 IS-PS 型のうち、50 株以上の菌株で構成される IS-PS 型が 6 つ存在することが判明した (資料 7)。これらの各 IS-PS

型構成株の PFGE 型は大きく異なる場合がある（データ省略）。

#### D.考察

・疫学的なリンクが見られる集団発生事例のみならず、散在的集団事例においても IS-PS の解析結果は PFGE とほぼ一致する場合が多いことから、散在的集団事例解析の迅速法としても有用であると考えられる。

・PFGE のバンドが最大で7本異なる場合においても IS-PS が一致する場合があることから、これまでの解釈と同様に PFGE 法と比較して解像度は一般的に低いと考えられる。

・50 株以上の菌株で構成される IS-PS 型が存在し、明らかに PFGE 型が異なる場合があることから、これらの IS-PS 型を示す株は、PFGE または multi-locus variable tandem repeat analysis (MLVA) によって解析結果を確認することが必須である。

#### E.結論

IS-PS 法の使用上の注意点として：

- ・分解能は PFGE より劣る（例外あり）。
  - ・集団事例や散在的広域散発事例の検出・確認に適用できる。
  - ・菌株解析の優先順位を決める情報として活用できる。
  - ・50 株以上の株で構成される同一 IS-PS 型が存在し、PFGE 型が大きく異なるケースがある。
  - ・迅速スクリーニング検査として使用可能であるが、PFGE もしくは MLVA によって IS-printing の結果を確認する必要がある。
- などが本研究の結果から明らかとなった。

#### F.健康危機情報

なし

#### G.研究発表

- ・小嶋由香, 佐藤弘康, 池田徹也, 瀬戸順次, 鈴木裕, 小西典子, 齊木大, 松本裕子, 田辺純子, 坂本裕美子, 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳, 大西真: 白菜浅漬によるO157食中毒事例におけるIS-printing system解析例について. IASR 34:127-128, (2013)

資料1

IS analysis of PFGE type h52

疫学情報	症状	O:H	VT1	VT2	PFGE	IS-PS	菌株入手自治体
患者、散発	腹痛、下痢、血便	O157:H7	-	+	h52	AA330	A都道府県
患者、散発	腹痛、発熱、下痢、血便、HUS	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	腹痛、発熱、下痢、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	腹痛	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	腹痛、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	水様下痢	O157:H-	-	+	h52	AA330	C都道府県
患者、散発	下痢、腹痛、血便、悪心、嘔吐	O157:H-	-	+	h52	AA330	D都道府県
患者、散発	腹痛、下痢、血便、発熱(38°C)	O157:H-	-	+	h52	AA330	D都道府県
患者、散発	下痢、腹痛、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	D都道府県
患者、散発	腹痛、下痢、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	A都道府県
患者、散発	腹痛、嘔吐、発熱(36.9)、下痢、血便		-	+	h52	AA330	B都道府県
患者	腹痛、発熱(37~38)、下痢、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
保菌者、散発	無症状	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	腹痛、下痢、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	腹痛、下痢、血便		-	+	h52	AA330	B都道府県
患者、散発	下痢、腹痛、血便	O157:H-	-	+	h52	AA337	D都道府県
患者		O157:H-	-	+	h52	AA330	E都道府県
患者、散発、焼鳥喫食	腹痛、下痢、血便		-	+	h52	AA330	F市
患者、集発(家族内)	腹痛、下痢、血便	O157:H-	-	+	h52	AA330	G都道府県

18/19 : AA330 (same PFGE and IS type)

1 / 19 : AA337 (same PFGE but diff IS type)

資料2

IS-code of:

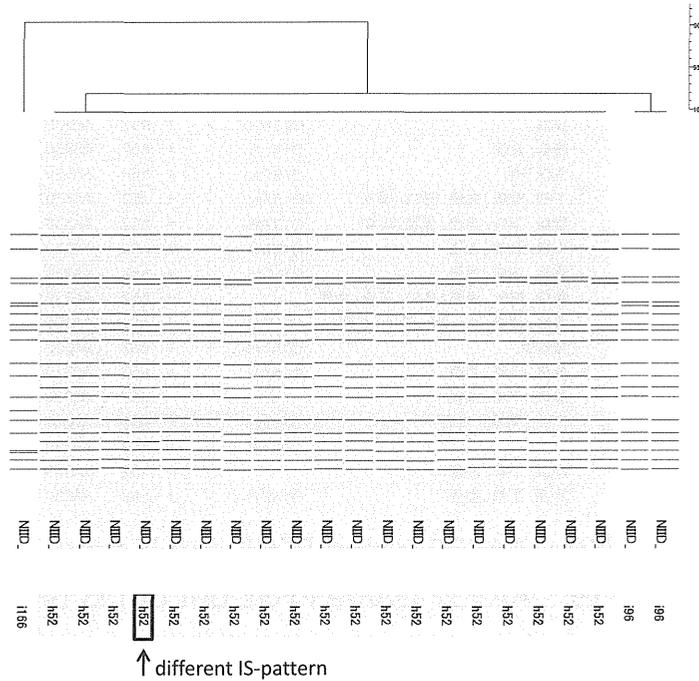
PFGE-types h52, i96 and i166: 18/19

AA330	primer set 1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hly	ext
	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	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
	primer set 2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
	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	0	0	0	0	1	0	1	0		

PFGE-type h52: 1/19

AA337	primer set 1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hly	ext
	size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139	
	判定	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
	primer set 2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
	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	0	0	0	0	1	0	1	0		

### 資料3 PFGE-types h52, i96 and i166



### 資料4 IS analysis of PFGE type h150

疫学情報	症状	O/H	VT1	VT2	PFGE	IS-PS	菌株入手自治体
患者、散発	下痢、腹痛、血便、悪心、嘔吐、発熱(39°C)	O157:H7	+	+	h150	AA039	A都道府県
保菌者、散発	無症状	O157:H7	+	+	h150	AA088	A都道府県
保菌者、散発	無症状	O157:H7	+	+	h150	AA039	A都道府県
患者、散発	下痢、腹痛、血便	O157:H7	+	+	h150	AA039	A都道府県
患者、散発	腹痛、発熱、下痢、血便	O157:H7	+	+	h150	AA039	B市
		O157:H7	+	+	h150	AA039	C市
患者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
患者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者		O157:H7	+	+	h150	AA039	D都道府県
保菌者、家族内	無症状	O157:H7	+	+	h150	AA041	E都道府県
患者	腹痛、下痢	O157:H7	+	+	h150	AA039	F都道府県
患者、散発	水様下痢、腹痛	O157:H7	+	+	h150	AA039	G市
患者		O157:H7	+	+	h150	AA039	H都道府県

16/18 : AA039 (same PFGE and IS type)

1 / 18 : AA088 (same PFGE but diff IS type)

1 / 18 : AA041 (same PFGE but diff IS type)