

- Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6): e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.
28. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub Apr 25, 2013.
 29. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol*. 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub Mar 23, 2013.
 30. Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, Katayama K and Tohya Y. Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan. Doi: 10.1292/jvms.13-0468; *J. Vet. Med. Sci*. 76(7):1045-1050, 2014.
 31. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan Y.H, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol*. Vol. 28:426-33. doi: 10.1016/j.meegid.2014.08.001. Epub Aug 8, 2014.
 32. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol*. doi: 10.1111/1348-0421.12176. 58(9): 536-9. Sep, 2014.
 33. Nagai M, Aoki H, Sakoda Y, Kozasa T, Tominaga-Teshima K, Mine J, Abe Y, Tamura T, Kobayashi T, Nishine K, Tateishi K, Suzuki Y, Fukuhara M, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Nakamura S, Kida H, Shirai J. Molecular, biological, and antigenic characterization of a Border disease virus isolated from a pig during classical swine fever surveillance in Japan. *J Vet Diagn Invest*. 26(4): 547-552. [Epub ahead of print] Jul 15, 2014.
 34. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation

- sequencing. *PLoS One*. 2014 Jun 27; 9 (6):e100699. doi: 10.1371/journal.pone.0100699. eCollection 2014.
35. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol*. 2014 Jun 25; 171(1-2):66-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009. Epub. Mar 18, 2014.
36. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 23; 111 (38) ; E4043-52, Epub Sep 5, 2014.
37. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* 174, 577-583, 2014.
38. 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
39. 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
40. 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。化学療法の領域、28、1232-40、2012 年
41. 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
42. 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).
43. 笠原ひとみ、上田ひろみ、宮坂たつ子、藤田暁、小野諭子、関映子、他：プール水が原因と推定された腸管出血性大腸菌 O28 集団感染事例—長野県、病原微生物検出情報（国立感染症研究所） 34, 5, 132-133, 2013.
44. 小嶋由香、平井有紀、松葉友美、石井圭、平井晋一郎、横山栄二、他：中国北京ツアー参加者における複数の腸管

- 出血性大腸菌感染症事例，病原微生物
検出情報（国立感染症研究所）34，5，
137-139，2013.
45. 勢戸和子：0157 以外の志賀毒素産生性
大腸菌の重要性. FFI ジャーナル 2012，
217:67-75.
46. 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 2012，65：2583-2587.
47. 川津健太郎，勢戸和子，久米田裕子：
食中毒細菌の簡易迅速検査法. 微生物
の簡易迅速検査法（株式会社テクノシ
ステム）2013，521-530.
48. 大平文人，勢戸和子，笹井康典：保育
所における細菌性赤痢集団発生事例.
小児科 2014，77:1027-1035.
49. 片山和彦 ロタウイルス概要 IASR
ロタウイルス特集号 vol. 35 No. 3 Mar.
2014.
50. 片山和彦 ノーウォークウイルス（ノ
ロウイルス）の遺伝子型 2014 年版
IASR ノロウイルス特集号 vol. 35
No. 7 July 2014.
51. 片山和彦 ノロウイルス感染症とその
対策 救命救急 vol. 17 No. 1 12-15，
2014.
52. 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場に
ノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が
発生する可能性 日本医事新報
No. 4723，59-60，2014.
53. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症
ノロウイルスとは 調剤と情報
vol. 20 No. 12，10-12，2014
54. 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症
ノロウイルスの感染拡大を防ぐには
調剤と情報 vol. 20 No. 12，14-19，
2014
55. 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃
腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス
ノロウイルス感染症とは-ウイルスの
特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対
策 ICT ジャーナル vol. 9 No. 4 2014.
56. 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健
ニュース ノロウイルスの感染予防
Dec. 18，2014.
57. 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健
ニュース ノロウイルスの感染予防
Dec. 18，2014.
58. 片山和彦 ウイルス性胃腸炎 SRL 社
宝函 vol. 35，No. 4，p23-34，2015.
59. 片山和彦 Luncheon Seminar Report
No. 1 ノロウイルス -感染制御を目指
した研究の歩みと最新の成果- デンカ
生研、p1-4、リーフレット、2015/02/24
60. 片山和彦 ヒトに感染するノロウイル
スの感染様式の研究 黎明 vol23，
pi-ii，2014.
- 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
3. 小西典子, 齊木大, 石塚理恵, 赤瀬悟, 横山敬子, 門間千枝, 河村真保, 尾畑浩魅, 高橋正樹, 貞升健志, 甲斐明美 : 2013年に東京都で発生した腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症の特徴, 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2014.
 4. 小西典子, 齊木大, 石塚理恵, 赤瀬悟, 横山敬子, 門間千枝, 河村真保, 尾畑浩魅, 高橋正樹, 平井昭彦, 仲真晶子, 甲斐明美 : パルスネットによる連携によって解明された腸管出血性大腸菌 0157 による集団食中毒事例, 2014.
 5. 平井晋一郎, 横山栄二, 江藤良樹, 瀬戸順次他 : IS-printing を用いた腸管出血性大腸菌 0157 の clade 推定法の確立, 第35回日本食品微生物学会学術総会, 2014.
 6. 柳本恵太, 植松香星 : ローストビーフを原因とする黄色ブドウ球菌による食中毒事例, 第27回地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会総会・研究会, 2015.
 7. 関口真紀, 笠原ひとみ, 中沢春幸, 藤田暁 : エンテロトキシン G・I 型遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌による食中毒事例, 第27回地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会総会・研究会, 2015.
 8. 松本昌門ら 臨床検体及び市販鶏肉由来カンピロバクター菌株の血清型別及び遺伝子検査等による疫学的解析 第60回日本化学療法学会西日本支部総会、第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会 平成24年11月5日、福岡市
 9. 山田和弘ら 愛知県における糞便からの ESBL 遺伝子陽性大腸菌分離状況 第33回日本食品微生物学会学術総会 平成24年10月26日 福岡市
 10. 鈴木匡弘ら 市中獲得型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 USA300 の市販抗菌薬軟膏耐性 第86回日本感染症学会総会・学術講演会 平成24年4月25日 長崎市
 11. 鈴木匡弘、松本昌門ら 臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析 第87回日本感染症学会学術講演会 平成25年6月5日～6日、横浜市
 12. 鈴木匡弘 遺伝子タイピングと感染管理 第29回日本環境感染学会総会・学術集会 平成26年2月15日 東京都
 13. 鈴木匡弘、山田和弘、松本昌門ら 国内分離された *Acinetobacter baumannii* international clone II の全ゲノムによる系統解析 第88回日本感染症学会学術講演会 平成26年6月18日～20日、福岡市
 14. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら 腸管出血性大腸菌 multiplex PCR typing 法 (EHEC_mPT 法) の開発 第35回日本食品微生物学会学術総会 平成26年9月18日～19日 堺市
 15. 勢戸和子 : 近畿ブロック IS データベー

- スを用いたEHEC 0157の流行株の探知，衛生微生物技術協議会第33回研究会（2012年7月，横浜）
16. 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）
17. 勢戸和子，神吉政史，原田哲也，田口真澄：大阪府で分離された 0157 以外の志賀毒素産生性大腸菌（non-0157 STEC）の特徴-ヒト由来株と食品由来株の比較，第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会（2013 年 7 月，つくば）
18. 勢戸和子，田口真澄，河原隆二：EHEC 0157 流行株探知に向けた近畿 IS データベースの運用，第 87 回日本細菌学会（2014 年 3 月，東京）
19. 原田哲也，勢戸和子，田口真澄：すべての VT サブタイプを検出するためのリアルタイム PCR 法の確立と食品検査への応用，第 35 回日本食品微生物学会（2014 年 9 月，大阪）
20. 前田詠里子，村上光一，江藤良樹，市原祥子，大石明，濱崎光宏，堀川和美，麻生 嶋 七 美、 本 田 己 喜 子：Antimicrobial resistance and lineage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates from humans in Fukuoka Prefecture, Japan, 28th International Congress of Chemotherapy and Infection（2013 年 6 月，横浜）
21. 江藤良樹，市原祥子，前田詠里子，平井晋一郎，横山栄二，世良暢之，堀川和美：福岡県で分離された腸管出血性大腸菌 0157 の clade 解析と志賀毒素産生量の比較，第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会（2013 年 7 月，つくば市）
- 3). その他
（講演会・シンポジウムなど）
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
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	泉谷秀昌	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 年度から開始した BioNumerics (BN) server による PFGE オンラインデータベースの継続的な運用を行った。平成 23 年度から構築を始めた IS printing system (IS 法) データベースについてはオンラインシステムの改修を進めながら、データベースの拡充を行った。平成 26 年度から Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) の活用を開始し、腸管出血性大腸菌 0157、026 および 0111 については本法ならびに PFGE による解析を行った。上記システムを活用し、ブロック代表を通じた電子メールによる回覧、食中毒調査支援システム (NESFD) における情報共有を推進した。菌株の解析から、集団発生事例関連株のクラスター、ならびに共通の感染源が示唆される同一もしくは類似の遺伝子型を示す菌株のクラスターが多数明らかとなった。

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 24-26 年に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析および

MLVA を行った。解析結果のデータベース化を BioNumerics (Applied Maths 社) により行った。結果については、電子メールにより菌株送付機関に還元した。広域事例が疑われる場合には、必要に応じて、電子メールにより全国 6 ブロックの研究代表者を介して各地方衛生研究所への配信を行ったり、食中毒調査支援システム (NESFD) において情報共有を行ったりした。

PFGE については Pulsenet International に準拠した方法で、MLVA

については Izumiya ら(2008)に記載の遺伝子座を用いて解析した。

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

2012年：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種類見いだされた。

2013年：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種類見いだされた。

2014年：EHEC 0157については、2014年に分離・送付されたもののうち695株が、2014年に分離された新しいサブタイプとして300種類、それ以前に分離されたことのあるサブタイプが56種類見いだされた。

いずれの年においても、それぞれの血清型において集団発生由来株等がクラスターを形成した。

2. MLVA

2014年に分離・送付されたEHEC 0157 1447株、026 438株、0111 48株をMLVAで解析した。それぞれ、537、163、29のタイプが同定され集団事例由来株はそれぞれクラスターを形成した。

3. EHEC 0157 及び 026 における広域株の解析

2012年：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、*XbaI*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。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。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。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た。026については、すべてが散发事例由来株であり、分離時期が6月に集中していた。

2013年：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、*XbaI*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。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。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、散发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。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。散发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。

2014年：MLVAでは関連が疑われるタイプ同士をコンプレックスとして包括している。

2014年分離、解析したEHEC株のうち、5地研以上で検出されたMLVAコンプレックスもしくはタイプに含まれる株は639株であった。コンプレックスは0157 12種類、026 1種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは0157で3種類、026で2種類であった。このうち、14c001は2014年4月に発生した広域食中毒事例、14c018は8月に発生した広域集団事例の株を含んでいた。また、14c007は171株からなり、2014年7月をピークに18都府県、23機関からの株を含んでいた。このうち、71株についてPFGEを行った結果、15パターンが得られ、互いに類似したi133(n=17)およびi327(n=34)が大勢を占めた。

4. 広域株に関する情報提供

複数地研以上で共通パターンを示す株について、構成菌株リストおよびMLVA型間の関係を示すMSTをまとめ、関係機関に還元し、必要に応じてNESFD内掲示板ならびに全国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。

5. IS法を利用したデータベースの構築

EHEC報告数の6割以上を占める血清群0157の迅速分子疫学解析法としてIS法による解析とデータベースの構築を進めた。データベースは感染研細菌第一部内のサーバーに設置し、研究分担者からオンラインでデータを登録する形をとっている。運用していくにあたって修正の必要が生じた点(情報フィールドの項目、Windows OSのアップデート対応など)の改修作業を行った。

D. 考察

複数の都道府県から分離され分子疫学的解析から同一性もしくは類似性が明らかとなるEHECは遺伝子型として毎年数十種類

にのぼる。2014年から0157、026、0111について、MLVAを主体とした解析システムの導入を行った。MLVAの結果から関連が疑われる株、および上記3血清群以外の菌株についてはPFGE解析を行った。集団事例株についてはMLVAもPFGEも同様のクラスターを形成した。

PFGE、MLVA、IS法は、対応可能な血清型、迅速性、分解能などそれぞれに特徴があり、それらを活用して迅速な情報共有を行うことで流行の広域化の防止、感染源の解明につながると考えられ、今後も解析手法の検討ならびに情報共有システムの改善を図ることが必要である。

E. 結論

現在IS printing systemによる0157迅速解析が普及してきており、集団発生事例および広域流行株においてPFGE、MLVAを併用しつつ迅速な情報共有が進められている。

今後も各解析法の長所を生かし、迅速な情報共有に結び付けて感染源の究明に努めることが肝要である。

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
学療法の領域、28、1232-40、2012 年

4. 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. 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

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 24-26 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診断、DNA 型別、系統に関する研究」
研究分担者:伊豫田淳(国立感染症研究所・細菌第一部)
協力研究者:勢戸和子(大阪府公衆衛生研究所)、清水俊一(北海道立衛生研究所)、甲斐明美(東京健康安全研究センター)、松本昌門(愛知県衛生研究所)、中嶋洋(岡山県環境保健センター)、堀川和美、江藤良樹、市原祥子、世良暢之(福岡県保健環境研究所)、木全恵子、磯部順子(富山県衛生研究所)、右田雄二(長崎県環境保健研究センター)、緒方喜久代(大分県衛生環境研究センター)、本田己喜子(福岡市保健環境研究所)、久保田勉(北九州市環境科学研究所)、河野喜美子(宮崎県衛生環境研究所)、松本一俊(熊本県食肉衛生検査所)、久高潤(沖縄県衛生環境研究所)、浅井紀夫(京都府保健環境研究所)、矢端順子、富永潔(山口県環境保健センター)、寺嶋淳(国立医薬品食品衛生研究所)、小椋義俊(宮崎大学)、井口純(宮崎大学)、小林秀樹(動物衛生研究所)、工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所)、石原朋子、泉谷秀昌、齊藤剛仁、大西真(国立感染症研究所)、EHEC ワーキンググループ(詳細略)

研究要旨

国内で原因菌が分離されないものの、EHEC 感染が原因と考えられる重篤な症例(溶血性尿毒症症候群: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。しかし、その測定法についてはこれまで国内で統一したプロトコールが存在しなかった。本研究では、2011 年に発生した焼き肉チェーン店における O111 による集団発生事例を受け、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価のプロトコールを策定し、本研究班の分担研究者を通じて全国に伝達した。

分離された EHEC O157 菌株間の相同性を解析する手法として、MLVA 法または PFGE 法が使用されている。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 O157 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。

EHEC 感染による重症例である溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) 発症例の 80%以上は血清型 O157:H7/H-によるものである。国内で分離される O157 株の系統解析を行う目的で、塩基配列ベースによる系統解析法 (clade 1-9 型別法) を用いて 1999-2011 年までに分離された計 656 株 (PFGE 型がそれぞれ異なる無症状保菌者由来株 387 株と HUS 患者由来株 269 株) について clade 型および *stx* 遺伝子亜型の分布解析を行った。その結果、1) clade 3, 6, 8 は HUS 患者由来株に有意に多いこと、2) clade 7 は無症状保菌者由来株に有意に多いこと、3) *stx2a* 保有株は clade 8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いこと、4) *stx2a stx2c* 保有株は clade 6/8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いことが明らかとなった。以上の結果から、HUS 発症リスクの高い clade と *stx* 型の組み合わせは、clade 8 + *stx2a* または clade 6/8 + *stx2a stx2c* であることが明らかとなった。

A. 研究目的

国内で原因菌が分離されないものの、腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染が原因と考えられる重篤な症例 (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。しかし、その測定法についてはこれまで国内で統一したプロトコールが存在しなかった。2011 年に富山県を中心に発生した焼き肉チェーン店における O111 による集団発生事例では菌が分離されない HUS 症例が数多く発生したことを受け、本研究で HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価のプロトコールの策定を行うことにした。

国内でヒトから単離される 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。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。

EHEC感染による重症例であるHUS発症例の80%以上はO157が原因とされている。Manningら（Proc. Nat. Acad. Sci. 105: 4868-4873, 2008.）は様々な集団発生由来のO157株を用いて96遺伝子座の一塩基置換（single nucleotide polymorphism: SNP）解析に基づくDNA型別法（clade typing）を開発した。このclade型別法によって、これまでに主として米国で分離された集団発生由来のO157:H7/H-株はおおよそ9つの遺伝学的clade（clade 1-9）に分類され、2006年に米国で発生したハウレン草やレタスの喫食に由来する二つの集団発生由来株はclade 8として型別された。EHEC感染によるHUSの発症率（全患者数に対するHUS発症数）は、通常の事例では5%程度と見積もられているが、clade 8が関連した上記の2つの集団発生事例ではそれぞれ15%と11%であることが報告されており、このためclade 8は高病原性であると推定されている。Manningらは過去の米国での分離株のうち、HUS患者由来株として10株を解析し、このうち7株までがclade 8、残り3株がclade 2であったと述べているが、これらの解析はHUS由来株の解析数が少ない上、無症状保菌者（asymptomatic carrier: AC）由来株の解析も十分ではないため、clade 8のHUS発症への関

与については不明な点が多い。そこで本研究では、国内で分離されたO157株のうち、PFGE型の異なるHUS患者由来株とAC由来株を用いてclade型別を行うと共に、これらの株が保有している志賀毒素遺伝子（*stx*）の亜型（*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a-g*）の解析を行い、重症者に有意に多く見られるcladeと*stx*の亜型の分布について解析することを目的とした。

B. 研究方法

B. 研究方法

1) 血中抗体価測定に関するアンケート調査

HUS患者由来の血清中抗大腸菌抗体価の測定について各衛生研究所等での実施状況をアンケートで調査した。調査項目は、1. 調査実績の有無（過去または現在）、2. 実績がある場合の検査方法の概略、3. 今後の検査予定、であった。本研究班の研究分担者を介して全国の地方衛生研究所へ電子メールでアンケートを送信し、回答は各衛研の担当者から直接感染研へ返信するよう依頼した。

2) 血中抗体価測定法プロトコルの策定

1)のアンケート調査結果を基に、最も検査頻度の高かった大阪府公衆衛生研究所・細菌部のプロトコル（試験管法）および国立感染症研究所・細菌第一部のプロトコル（プレート法）のハイブリッド版を作製した。

3) IS-PS法評価に使用したO157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。

4) IS-PS 法、PFGE 法

標準のプロトコールに従ってそれぞれ解析を行った。

5) 系統解析に使用した O157 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（1999 年から 2011 年までに分離）のうち、HUS 患者由来株と AC 由来株に絞り、散発事例由来株または集団発生事例由来の代表株 1 株のみを選択した。次に、これまでに本研究班の成果として蓄積してきた PFGE 型を比較し、すべての菌株が異なる PFGE 型である株を選択した。その結果、無症状保菌者由来株 387 株と HUS 患者由来株 269 株について解析を行った。

6) clade 8 型別法

本研究成果を発表した論文（Iyoda et al., 2014）に記載の通り、clade 8 については特異的な mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCR 系を構築し、PCR ベースで型別を行った。

7) その他の clade 型別法

32 箇所 の SNPs によって clade 1-7, 9 の型別を行った（Iyoda et al., 2014）。

C. 研究結果

1) 血清診断法

a) 血中抗体価測定に関するアンケート調査結果：全国の 78 研究所のうち、検査未実施機関が 42（うち、3 機関は過去に検査実績有り）、現在実施中の機関が 11（秋田県、山形県、千葉県、東京都、横浜市、名古屋市、滋賀県、大阪府、福岡県、佐賀県、宮崎県）で、実施不明が 20 機関であった。このうち、大

阪府と横浜市では従来からの検査実績が感染研より多かった。

b) 血中抗体価測定法プロトコールの策定：

a) のアンケート調査から、大阪府公衆衛生研究所の検査実績が最も多く、検査実績に基づいた検査プロトコールもすでに確立されていた。そこで、大阪府の検査プロトコール（試験管法）を土台に、感染研での検査プロトコール（プレート法）を取り入れたハイブリッド版を作製し、以下に示す血中抗体価検査プロトコールとして策定した。なお、感染研のプロトコールは、2011 年に富山県を中心として発生した O111 による重症事例に関連して、菌が分離されなかったいくつかの HUS 事例（富山県、大阪市、仙台市、横浜市依頼分）について解析した結果、すべての事例において、HUS 発症事例の 90%以上を占める 7 つの EHEC O 血清群（O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165）のうち、O111 だけの抗体価上昇が確認され、富山の事例と同様に O111 の EHEC による HUS 症例として確定診断することが可能となった。

2) O157 の分子疫学的解析手法における IS-PS 法の評価

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。大部分の株で PFGE と IS-PS の結果が一致した。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。

2012年以降に分離された EHEC O157株のいくつかについて 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) ヘデータ入力を行った。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。

3) O157 の系統解析

a) clade の分布

clade 3, clade 6, clade 8 は AC 由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く、中でも clade 8 は最も有意差が大きい。一方、clade 7 は AC 由来株に有意に多い clade であることが判明した (表 1)。

b) *stx* 遺伝子型

stx 型が *stx1a stx2a* および *stx2a stx2c* の株は AC 由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多い。一方、*stx* 型が *stx1a stx2c* および *stx2c* の株はほとんどが clade 7 であり、AC 由来株に有意に多いことが判明した (表 2)。

重症者由来株に多く見い出されると考えられている *stx2a* 型株は HUS 由来株と AC 由来株で差はなかった (表 2)。

c) clade と *stx* 遺伝子型

2) で有意差が見いだせなかった *stx2a* の株は、clade 7 の場合には AC 由来株に有意に多いことが、clade 8 の場合には HUS 株に有意に多いことが明らかとなった (表 3)。

同様に、*stx2a stx2c* の株は clade 6/8 であれば HUS 由来株に、clade 7 であれば AC 由来

株に有意に多いことが明らかとなった (表 3)。

D. 考察

1) 血清診断法

HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価測定法については今後多くの検査実績結果を基に改訂を重ねる必要がある。特に、プレート法における陽性判定は血清の 160 倍希釈以上での凝集が基準となっているが、これについては議論の余地がある。HUS 以外の症例において、症状や発症からの日数等と血中抗体価の関係について詳細な検討が必要であると思われる。

2) O157 の分子疫学的解析手法における IS-PS 法の評価

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 とほぼ一致するケースが多いことから、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 が一致するケースがあることから、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。

3) O157 の系統解析

これまでの研究から、重症例に多く見られると考えられていた *stx2a* 型株は、本研究で用いた菌株では HUS 患者由来株と AC 由

来株ではほぼ同数であった。しかし、本研究の clade 解析の結果、clade 7 の場合には AC 由来株に有意に多いことが、clade 8 の場合には HUS 株に有意に多いことが明らかとなった。重症化リスク解析には *stx* 型のみならず、clade 型別が重要であることを示唆している。

E. 結論

1) 血清診断法

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法について、地方衛生研究所における検査状況を把握すると共に、共通の検査プロトコールを策定し、全国に配布した。

2) O157 の分子疫学的解析手法における IS-PS 法の評価

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。

3) O157 の系統解析

・HUS 発症リスクの高い clade と *stx* 型の組み合わせとして、clade 8 + *stx2a*, *stx6/8* + *stx2a stx2c* であると考えられた。

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).

・Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, and Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular *stx* subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Forum Infectious Diseases, 1 (2): first published online July 18, 2014.

表1

Distribution of clade type of O157:H7 isolates from HUS patients and asymptomatic carriers (AC)			
clade	Strains derived from:		OR (95% CI), <i>p</i> value for HUS
	HUS (n=269)	AC (n=387)	
1	9	5	2.64 (0.88-7.98), 0.13
2	75	75	1.61 (1.11-2.32), 0.014
3	84	66	2.21 (1.53-3.2), <0.0001
4/5	4	2	2.91 (0.53-16), 0.23*
6	24	10	3.69 (1.74-7.86), 0.00062
7	23	216	0.074 (0.046-0.12), <0.0001
8	50	13	6.57 (3.49-12.4), <0.0001

*: Fisher's exact test value (two-tailed)

表2

Association of <i>stx</i> genotypes with clinical outcome			
<i>stx</i> genotype	strains from:		OR (95% CI), <i>p</i> value for HUS
	HUS (n=269)	AC (n=387)	
<i>1a</i>	1	3	0.48 (0.049-4.62), 0.65*
<i>2a</i>	53	53	1.55 (1.02-2.35), 0.04
<i>2c</i>	10	131	0.075 (0.04-0.15), <0.0001
<i>1a 2a</i>	152	139	2.32 (1.69-3.19), <0.0001
<i>1a 2c</i>	2	30	0.06 (0.02-0.27), <0.0001*
<i>1a 2a 2c</i>	1	9	0.16 (0.02-1.24), 0.05*
<i>2a 2c</i>	50	22	3.79 (2.23-6.43), <0.0001

*: Fisher's exact test value (two-tailed)

表3

<i>stx</i> genotype of strains belonging to each clade group							
clade	<i>stx</i> genotype of isolates from HUS/AC						
	<i>1a</i>	<i>2a</i>	<i>2c</i>	<i>1a 2a</i>	<i>1a 2c</i>	<i>1a 2a 2c</i>	<i>2a 2c</i>
1	0/0	1/0	0/0	8/5	0/0	0/0	0/0
2	1/1	11/3	0/0	62/69	0/0	1/2	0/0
3	0/2	2/2	0/0	82/62	0/0	0/0	0/0
4/5	0/0	3/0	0/2	0/0	0/0	0/0	1/0
6	0/0	2/1	3/1	0/0	0/3	0/0	19/5
7	0/0	11/40	7/128	0/3	2/27	0/7	3/11
8	0/0	23/7	0/0	0/0	0/0	0/0	27/6

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（H24－H26）

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 池田徹也	(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 福田 理	(青森県環境保健センター)
	岩渕 香織 梶田弘子	(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 松原弘明	(仙台市衛生研究所)
	牛水真紀子 坂本 宣子	
	千葉 一樹 菊地理慧	(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)

研究要旨

平成 24 年度から 26 年度に全国地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックの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。平成 24 年度に本研究を開始した際、参加 10 機関のうち、5 機関の担当者が IS-printing を行うのが初めてという状況であった。EHEC O157 計 13 株を供試し、QIAamp DNA Mini Kit により抽出した DNA 溶液を参加機関に配布して IS-printing を実施し、結果を比較した。その結果、反応系に加える DNA 量が結果の再現性に大きな影響を及ぼすことが示された。また、菌株の種類によっては、正規のバンドと同等の輝度を呈するエキストラバンドが出現し、判定の不一致が発生することも経験された。このように、IS プリンティングの精度管理には未だに課題が存在することが浮き彫りとなり、今後もブロック内における IS-printing system の精度管理の取り組みを継続し、問題点を洗い出しながらブロック内地方衛生研究所の IS プリンティング精度向上を目指す必要があると考えられた。

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。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の一つとして、宮崎大学の林教授のグループにより IS-printing system が開発・市販された。この方法では、得られる結果がデジタル的なデータであるためにデータベース化が容易である。また、PFGE と比較して解析結果が得られるまでの時間が大幅に

短縮されることから、多くの地方衛生研究所において EHEC O157 の分子疫学解析に応用されている。

本研究では、平成 24 年度から 26 年度に全国地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックの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。

B. 研究方法

1. 参加機関

北海道立衛生研究所、札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課、青森県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、山形県衛生研究所、宮城県保健環境センター、仙台市衛生研究所、福島県衛生研究所、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、秋田県健康環境センターの 11 機関が参加した。

2. 供試菌株と DNA 溶液

表 1 に示す EHEC O157 計 13 株を供試した。これらの株から QIAamp DNA Mini Kit により DNA を抽出し、15 μ g/ml (H24)、5 μ g/ml (H25)、10 μ g/ml (H26) の濃度に調製した溶液を試料として参加機関に送付した。

3. IS-printing system

TOYOBO 製 IS-printing system を一括購入して参加機関に配布した。IS-printing はキット付属の取り扱い説明書に従い実施した。参加機関で使用した PCR 装置の一覧を表 2 に示す。

4. 結果の集計

集計用エクセルファイルを作成し、参加機関に配布した。記載項目は IS-printing の結果 (1st Set、2nd Set)、使用 PCR 装置、プレート量とした。尚、初年度である平成 24 年度には担当者の IS-printing 実施経験も集計した。

C. 研究結果及び考察

表 3 に供試株の IS-printing 1st set PCR の結果を年度毎に示す。表には参加機関のうち陽性 (+) と判定した機関数と陰性 (-) となった機関数を供試株毎にそれぞれ示した。平成 24 年度の検討では 10 機関中 1 機関が供試した 4 株全てについて hly をマイナスと判定し、結果が他 9 機関と異なった。平成 25 年度の検討では、供試した 5 株の結果が 11 機関全てで一致した。平成 26 年度の検討において、EC16130 株では 1 機関が 1-08 と 1-09 を陽性と判定し、他の 9 機関は陰性と判定した。EC16169 株では 1 機関が 1-09 を陽性と判定し、他の 9 機関は陰性と判定した。EC16180 株については、1-03 を 3 機関が陽性と判定し、他の 7 機関が陰性と判定した。なお、3 機関が 1-03 に該当すると判定したバンドは、複数の機関において泳動位置の違いからエキストラバンドと判断された。一方、表 4 に供試株の IS-printing 2nd set PCR の結果を示す。平成 24 年度の検討において、EC15419 と EC15468 では 1 機関で 2-02 と 2-03 の結果が他 9 機関の結果と異なった。平成 25 年度と平成 26 年度の検討においては、供試株の結果が全参加機関で一致した。

平成 24 年度に本研究を開始した際、参加 10 機関のうち、5 機関の担当者が IS-printing を行うのが初めてという状況であった。平成 24 年度の検討において、1 機関が供試株全ての hly を陰性と判定した。EHEC O157 は hly と eae を保有し、通常は IS-printing system でこれらの遺伝子が陽性となるが、PCR 装置の種類の違いや電気泳動の際のアプライ量など、実験条件の違いによっては hly 遺伝子が偽陰性となる場合があり得ると考えられた。IS-printing system はキット化されている市販品であり、再現性なども十分検討されていると思われるが、今回の検討では使用菌株の特徴や実験条件の違い