

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)  
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  
(H24-新興-一般-012)

平成 24-26 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：「国内で分離される重症者由来の非典型的な腸管出血性大腸菌に  
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：李 謙一, 石嶋 希, 石原 朋子(国立感染症研究所・細菌第一部)

### 研究要旨

国内で 2007 年から 2014 年までに重症者(血便または溶血性尿毒症症候群発症者)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)のうち、分離頻度の高い(分離数が 10 以上の)O 血清群は順に O157, O26, O121, O111, O145, O103, O165 となった。これら 7 つの O 血清群に属する EHEC が共通に保有する病原性遺伝子は志賀毒素遺伝子(*stx1* および[または]*stx2*)に加え、接着因子である Intimin をコードする *eae* 遺伝子である。国内における非典型的な EHEC の分離状況およびそれらが保有する病原性遺伝子の分布状況について解析する目的で、2007 年から 2014 年 4 月までに国内で分離された上記の 7 血清群を除く O 血清群に属する EHEC (n=868)のうち、重症者由来株(n=65)について *eae* の分布状況を解析した。その結果 27 株(41.5%)が *eae* 陰性の非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC)であり、このうち 20 株は接着遺伝子として *saa* を保有する株であった。残り 7 株のうち 2 株は Eib 陽性であり、残り 5 株はいずれの蛋白質性接着遺伝子が陰性であった。このうちの 2 株は分離年、分離地域が異なる散発血便患者由来株であったが、いずれも血清型 O115:H10 であった。さらに、2014 年 6 月に HUS 患者の血液(および尿)培養液から分離された EHEC もこれらと同様な *stx1* 型の O115:H10 であることが判明した。以上 3 株(血便患者由来 2 株と HUS 由来株 1 株)の O115:H10 はいずれも培養細胞へ効率よく接着することが明らかとなった。

国内で分離される EHEC O26:H11/H-の多くは志賀毒素遺伝子として *stx1* のみを保有するが、近年 *stx2* のみを保有する株が重症者から分離されている。*stx2* のみを保有する EHEC O26 の multi-locus sequencing typing (MLST) 型を解析したところ、*stx1* のみや *stx1 stx2* の両方を保有する大部分の O26 に見いだされる ST21 以外に ST29 が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的  
腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC)による日本国内における感染者は無症状保菌者を含めて年間 3,000 名から 4,000 名を数え、このうち重症者(ここでは血便または[および]溶血性尿毒

症候群[hemolytic uremic syndrome: HUS] 発症者と定義する)は全体の約30%を占める(国立感染症研究所・細菌第一部の集計)。これまでの我々の研究から、重症者由来株として分離頻度の多い血清群としてO157, O26, O111, O121, O145, O103, O165が明らかとなっている。これら7つのO血清群に属するEHECは病原性遺伝子として志賀毒素遺伝子(*stx1*と*stx2*のいずれか一方または両方)と接着因子であるIntiminをコードする*eae*遺伝子を共通に保有することが我々の研究から明らかとなっている。2011年にドイツで発生した集団発生の原因菌は血清型O104:H4の*eae*非保有性のEHEC(以下、*eae*がコードされている遺伝子領域[locus of enterocyte effacement: LEE]-非保有型EHEC: LEE-negative EHECと表記する)であり、他の下痢原性大腸菌のカテゴリーである腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*: EAggEC)が保有する病原性遺伝子群(*agg*)を保有することから、EAggECとEHECのハイブリッド型(EAggEHC)であった。そこで本研究では、日本国内において、EAggEHCを含む他の下痢原性大腸菌カテゴリーとEHECのハイブリッド型およびその他のLEE-negative EHECの重症者由来株における分布状況、およびそれらの非典型株が保有する接着因子等の病原性因子の分布状況について解析することを目的とした。一方、LEE保有型では高病原性と考えられる系統株の抽出を行った。

## B. 研究方法

### 1) 血清型別

デンカ生研または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: 欠番としてO31, O47, O67, O72, O94, O122があり、O18, O28およびO112はいずれも因子血清abまたはacにさらに分類されるため、合計184種類存在する)およびH血清(H1-H56: 欠番としてH13, H22, H50があるため合計53種類存在する)を用いて日本国内で分離されたヒト由来のEHECの血清型別(O:H型別)を定法に従って行った。

### 2) PCR

*stx1*および*stx2*のPCRにはCebulaらのプライマーセット(*J Clin Microbiol.* 1995 33: 248-250)またはScheutzらのセット(*J. Clin. Microbiol.* 2012, 50: 2951-2963)を用い、*saa*はPatonらのセット(*J Clin Microbiol.* 2002, 40: 271-274)を用いた。その他のプライマー(*eae*, *aggR*)については未発表のため、詳細はここでは省略する。Taq DNA polymeraseはTaKaRaのExTaqを使用し、サーマルサイクラーは、ABI 9700 (Perkin Elmer), T1 Thermo cycler (Biometra), DNA Engine (Bio-Rad), または T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)を使用した。

### 3) Eib 保有状況の解析

LEE-negative EHECに特異的に見出される接着遺伝子*eib*はPCR検出系が確立されていないため、Eib蛋白質(*E. coli* immunoglobulin-binding protein)の特性であるイムノグロブリン結合(ヒトIgG[Fcの部分]への結合)活性をウエスタンブロット法によって解析した。

### 4) HUS患者血清における抗大腸菌抗体価解析(血清診断)

EHEC 検査マニュアル ( <http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC.pdf> ) に記載の方法によって HUS 患者血清中の 7 つの主要 O 血清群の抗体価について解析を行った。

#### 5) 細胞接着性の解析

HEp-2 細胞を用いて大腸菌の宿主細胞への接着性を定法に従って解析した。

#### 6) multi-locus sequencing typing (MLST)法

<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli> に記載の方法によって実施した。

### C. 研究結果

#### 1) LEE-negative EHEC の解析

##### a) 血清型別

2007 年から 2014 年までに分離された重症者由来の EHEC 株として分離頻度の高い O 血清群は順に O157 (82.7%), O26 (8.3%), O121 (2.5%), O111 (2%), O145 (1.6%), O103 (1.2%), O165 (0.6%) となっており、これら主要 7 血清群の EHEC は病原性 (接着) 遺伝子として *eae* を保有することが確認された。これらの主要 7 血清群に続いて重症者由来株として多い O 血清群として O55 (総分離数 28, 血便由来分離数 8), O177 (総分離数 11, 血便由来分離数 7), O91 (総分離数 229, 血便由来分離数 5), O119 (総分離数 13, 血便由来分離数 3), O115 (総分離数 31, 血便由来分離数 3) となっており、O91 のすべてと O119 の一部を除く O 群はすべて *eae* 陽性であった。

日本国内における非典型的な EHEC (LEE-negative EHEC) を同定するために、2007 年から 2014 年 4 月までに分離された

EHEC のうち、上記の主要 7 血清群以外の O 血清群に属する株として 868 株が存在し、このうち重症者由来株は 65 株であった。

##### b) LEE-negative EHEC の検出

a) で抽出した 65 株のうち *eae* の保有状況を PCR で解析したところ、LEE-negative EHEC は 27 株であった (約 41.5%)。

##### c) *saa* の分布解析

*saa* は LEE-negative EHEC に特異的に存在する接着遺伝子である。b) で明らかとなった重症者由来の LEE-negative EHEC 27 株のうち 20 株は *saa* 保有株 (約 74.1%) であった (資料 2)。これらの結果から、*saa* は重症者由来 LEE-negative EHEC の重要な接着遺伝子であると考えられる。

##### d) Eib の分布解析

Eib は LEE および *saa* 陰性の大腸菌に存在する接着因子である。Eib のヒト IgG (Fc) への結合活性を利用したウエスタンブロット法で解析を行った結果、上記 b), c) の解析で蛋白質性の接着遺伝子が未同定であった LEE-negative EHEC 7 株のうち、2 株が Eib 陽性であることが判明した (血清型はいずれも O91:H- であった)。

いずれの蛋白質性接着因子/遺伝子も保有しない EHEC 株として 5 株が残った。これらの血清型は O115:H10 が 2 株、残りは O18ac:H7, O141:H-, OUT:H34 がそれぞれ 1 株であった。O115:H10 の 2 株は分離年および分離地域が異なる散発事例株である (資料 2)。

なお、2011 年のドイツ集団発生株で見られたハイブッドタイプ (EAggHEC) は存在しなかった。

##### e) HUS 患者由来の EHEC O115:H10 株の解析

2014年6月にHUS患者の血液(および尿)培養液から分離されたO115:H10について上記と同様な解析を行ったところ、これらの株はLEE-negativeであり、さらに*saa*陰性、Eib陰性であることが判明した。志賀毒素型は*stx1*で、これまでにHUS症例由来株としては分離例のない*stx1*単独保有のLEE-negative EHECであることが明らかとなった(資料3)。

本HUS患者の便からはEHECは分離されなかった。EHEC感染によるHUS症例の確定診断は便からのEHEC分離、便中の志賀毒素検出、血清中の大腸菌抗体陽性のいずれかを証明する必要があるため、本HUS患者血清中の抗大腸菌抗体価を解析したところ、主要7血清群の抗体はいずれも陰性となったが、分離されたO115に対する抗体は陽性となった。これらの血清診断からEHEC感染によるHUS症例と確定した。

#### f) 培養細胞への接着形態の解析

これまでの解析から、LEEを保有するEHEC株は局所接着性、*Saa*を保有する株は分散型接着性、Eibを保有する株は鎖状接着性を示し、接着パターンと保有する接着遺伝子の保有パターンは相関があると考えられている。d)およびe)で明らかとなった重症患者由来のLEE-negative EHEC O115:H10(血便患者由来株2株とHUS患者由来株1株)の培養細胞への接着性を解析したところ、いずれの株も効率よく培養細胞へ接着することが確認された(資料2)。

#### 2) *stx2*のみを保有するO26のMLST解析

国内で分離されるEHEC O26の大部分は*stx1*のみを保有するタイプであり、次いで*stx1 stx2*保有型である(資料4)。国内では

2012年の後半から2014年にかけて*stx2*のみを保有するタイプの分離数が増加している(IDWRの集計による)。ドイツを中心としたヨーロッパ各国では*stx2*保有型のO26による重症感染事例が多発しており、これらの株のMLST解析によれば、EHEC O26の大部分が属するST21以外に、ST29に型別される株が存在することが判明している(*Clin Infect Dis.* 2013, 56:1373-1381)。

国内で分離された36株の*stx2*保有型のO26についてMLST解析を行ったところ、17株がST21、19株がST29に型別されることが判明し、血便または(および)HUS患者の割合はST21では3/17(17.6%)、ST29が8/19(42.1%)であった(資料5)。

#### D. 考察

本研究から、日本国内における重症者に由来するLEE-negative EHECの分布が明らかとなった。上述した通り、国内で分離頻度の高い7血清群は接着遺伝子群としてLEEを保有する。従って、日本国内で分離される大部分の重症者由来株はLEEを保有する株であるといえる。一方でLEE-negative EHECによる重症者由来株は2007-2014年4月の間に少なくとも27株存在し、そのうち20株は接着遺伝子として*saa*を保有する株であることが明らかとなった。*saa*はオーストラリアで発生したHUS発症者数名から分離された接着因子であり、LEE-negative EHECに特異的に存在することが明らかとなっている。本研究から、日本国内の重症者由来のLEE-negative株にも広く存在することが明らかとなったことから、LEE-negative EHEC

の重要なマーカーの 1 つであると考えられる。今後、これらの病原性遺伝子の重症者以外の症状または無症状由来の EHEC における分布状況を解析することで、重症化への貢献度を解析する必要がある。

本研究から血便患者由来株として抽出された O115:H10 の 2 株は *stx1* 型の LEE-negative EHEC で *saa* および Eib 陰性であった。2014 年に HUS 患者から分離された O115:H10 もこれらと同様な EHEC 株であった。これまで、*stx1* 型の LEE-negative EHEC は HUS 由来株として分離されたことはなく、今後の分離状況について注視する必要がある。国内では 2007 年以降に約 40 株の O115 EHEC が分離されており、このうち重症者由来株は上記の研究から明らかとなった 3 株のみであるが、これら 3 株を含む O115:H10 の系統、ゲノム配列、病原性に関する詳細について今後慎重に解析する必要がある。現時点ではマイナーな菌株であってもそれらが保有する病原性遺伝子について詳細な解析を行っておくことは、将来を見据えた EHEC の感染症対策に重要であると考えられる。

ドイツ等を中心としたヨーロッパでは *stx2* 型の O26 による重症例が多数報告されており、それらの系統解析から *stx2* 型の O26 には ST29 と呼ばれる系統が存在することが報告されている。日本国内で分離される主要 7 血清群のうち、O157 に次いで分離頻度の高い O 群が O26 である。国内分離 O26 の約 92% は *stx1* 型であり、*stx2* 型は全体の約 1% 程度である。本研究から、国内の O26 分離株にも ST29 が存在することが明らかとなった。上記のヨーロッパ分離株の解析では、

*Stx2* 型が重症化ファクターであり、ST21 と ST29 の系統の違いは重症化には影響しないことが明らかとなっている。一方、国内分離の *stx2* 型 O26 株は分離数こそ少ないものの、これまでのところ ST29 が ST21 よりも多くの重症例に関連していることが明らかとなっている (資料 4, 5)。今後も引き続き *stx2* 型 O26 株の分離状況およびそれらの ST について注視すると共に、ST29 のゲノム解析および病原性解析を行う必要があると考えられる。

#### E. 結論

- ・ 2007 年から 2014 年までに分離された重症者由来の EHEC 株とて分離頻度の高い O 血清群は順に O157 (82.7%) , O26 (8.3%) , O121 (2.5%) , O111 (2%) , O145 (1.6%) , O103 (1.2%) , O165 (0.6%) であった。
- ・ 上記の主要 7 血清群に続いて重症者由来株として多い O 血清群として O55, O177, O91, O119, O115 で、O91 のすべてと O119 の一部を除くこれらの O 群はすべて LEE 保有型であった。
- ・ 7 大 O 血清群以外の重症例由来株 65 株のうち 27 株が LEE-negative EHEC であった。このうち 20 株は *saa* 保有型、2 株は Eib 保有型の O91:H-、残り 5 株はいずれの蛋白質性接着因子も保有しない EHEC であった。Saa は LEE-negative EHEC の
- ・ Saa は重症者由来 LEE-negative EHEC に多く見いだされる接着因子として重要である。
- ・ これら 5 株の血清型は O115:H10 が 2 株、残りは O18ac:H7, O141:H-, OUT:H34 がそれぞれ 1 株であった。

・血便患者由来の O115:H10 の 2 株と 2014 年に HUS 患者から分離された同一血清型の 1 株はいずれも効率よく HEp-2 細胞へ接着することが確認された。

・2011 年のドイツ集団発生株 (O104:H4) と同様な *agg* を保有する株は存在しなかった。

・国内分離の *stx2* 型 O26 (n=36) のうち、17 株が ST21、19 株が ST29 であった。

・上記の *stx2* 型 O26 のうち、ST29 は 42.1%、ST21 は 17.6%が重症例由来株であった。

#### F.健康危機情報

なし

#### G.研究発表

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.

資料1. ヒト由来EHECのO群と重症者(血便および/またはHUS発症者)由来株数(2007年-2014年12月)

O group	total isolates	HUS-/BD-derived	HUS-derived	% (HUS/BD)
O157	13,680	6,289	307	46.0
O26	3,809	635	7	16.7
O121	492	191	9	38.8
O111	739	153	13	20.7
O145	462	125	4	27.1
O103	543	89	0	16.4
O165	87	44	6	50.6
O55	28	8	0	28.6
O177	11	7	1	63.6
O91	229	5	0	2.2
O5	27	5	0	18.5
O119	13	3	0	23.1
O115	31	3	1	9.7
OUT	152	18	1	11.8
others	424	32	4	7.5
<b>total</b>	<b>20,727</b>	<b>7,607</b>	<b>353</b>	<b>36.7</b>

HUS: hemolytic uremic syndrome, BD: bloody diarrhea

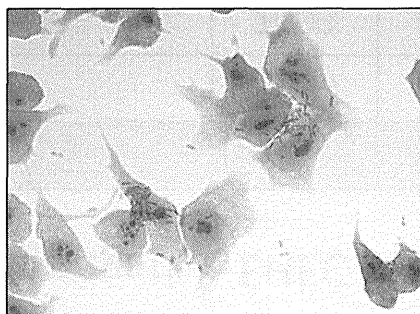
## 資料2. Summary of LEE-negative EHEC (2007-Apr 2014)

EHEC human isolates neither -O157, -O26, -O111, -O121, -O103, -O145, nor -O165: 868 isolates

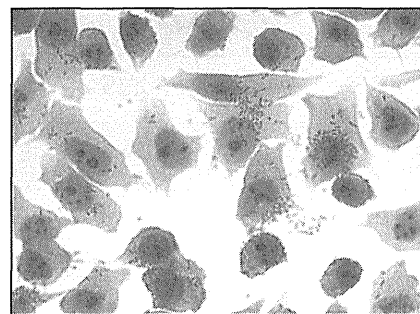
- BD- and/or HUS-derived: 65 isolates

LEE-negative ( <i>eae</i> -),	27 (41.5%)
<i>saa</i> -positive,	20
Eib-positive,	2
<i>eae</i> -, <i>saa</i> -, Eib-,	5
	O115:H10 (2), O18ac:H7 (1), O141:H- (1), OUT:H34 (1)

O115:H10  
adhesion  
on HEp-2  
cells



Strain 1



Strain 2



### 資料3. LEE-negative EHEC from HUS/TTP patient in Japan

Serotype	Year	<i>stx</i> type, adhesin gene
O86:H-*	1999	<i>stx2+</i> , <i>agg+</i>
O170:H16	2003	<i>stx2+</i>
O183:H18**	2012	<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O113:H- [H21]	2012	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O174:H8	2012	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O113:H- [H21]	2013	<i>stx2+</i> , <i>saa+</i>
O115:H10**	2014	<i>stx1+</i>

\* : EAggEC-EHEC hybrid type like German O104:H4 strain.

\*\* : isolates from blood/urine culture

Since 1996, we have isolated only 7 LEE-negative EHEC strains from HUS/TTP patients in Japan.

資料4. *stx* type of human-derived EHEC O26:H11/H-  
(2007-2013年)

<i>stx</i> type	# of isolates	# of BD/HUS	% (BD/HUS)
<i>stx1</i>	3,113	462 / 1	14.9
<i>stx2</i>	36	10 / 1	30.6
<i>stx1 stx2</i>	212	59 / 2	28.8
unknown	5	0 / 0	---
total	3,366	534	15.9

資料5. MLST of EHEC O26:H11/H- *stx2* (n=36: 資料3参照)

ST	# of isolates	# of BD/HUS	%
21	17	3 / 0	17.6
29	19	7 / 1	42.1

平成 24-26 年度分担研究報告書  
非典型的 EHEC のプロファイリングに関する研究

研究分担者	甲斐 明美	（東京都健康安全研究センター・微生物部）
研究協力者	小西 典子	（東京都健康安全研究センター・微生物部）
	尾畑 浩魅	（東京都健康安全研究センター・微生物部）
	貞升 健志	（東京都健康安全研究センター・微生物部）

研究要旨：

主要 3 血清型以外の EHEC に関する基礎データを把握することを目的として、東京都で分離された non-0157 EHEC を対象に分離状況および接着因子等の病原因子保有状況を調べた。

2012-2014 年に東京都内で分離された 916 株のうち、血清群 0157, 026 および 0111 以外の株は 93 株（10.2%）で、全国と比較して 0157 の割合が高い傾向であった。92 株の血清群は、0103（30 株、3.3%）、0121 および 0145 が各 17 株、1.9%、091 が 5 株（0.5%）等、14 種類の血清型に分類された。OUT は 14 株（1.5%）であった。HUS 発症などの重症事例 3 名（076, 0103, 0183）に認められた。

付着因子等の病原遺伝子保有状況を調べた結果、有症者からの分離が多い血清群 0103, 0121 は、全ての株で *eae*, *hlyA* を保有していた。HUS 患者由来の 3 株では、076 および 0103 が *eae* と *hlyA* を、0183 は *saa*, *hlyA*, *subA* を保有していた。一方、食品由来株 8 株（VT2 産生）はこれらの病原遺伝子陰性であった。

非典型的 EHEC による食中毒・感染症の発生時に、迅速・効率的に検査を行うためには、菌株に関する情報が重要である。検査に有用となる情報、非典型的 EHEC 検査のポイントについてまとめた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒・感染症患者は、全国で毎年 3,000~4,000 例報告されており、減少傾向にはない。その原因菌の血清型は血清群 0157 が最も多く、全体の 60% 程度である。0157 以外の non-0157 EHEC による感染例も増加しており、以前と比較して EHEC の中に占める割合も高くなってきている。non-0157 EHEC による食中毒・感染事例の原因血清型としては、血清群 026, 0111, 0121 等が比較的多く報告されている。しかし、2011 年にドイツを中心に発生した大規模食中毒では 0104 : H4（VT2 産生）というこれまでほとんど報告されて来なかった血清型菌が原因となった。今後、日本でもこのようなマイナーな血清型菌による大規模集団食中毒・

下痢症が発生する可能性も否定できない。そこで非典型的 EHEC 感染症に対応するための基礎データを把握することを目的として、2012-2014 年に東京都で分離された non-0157 EHEC を対象に分離状況および病原因子の保有状況を調べた。また非典型的 EHEC 食中毒・感染症が発生した際に対応可能な検査系を確立することを目的として、必要な情報収集項目等のリストアップを行った。

B. 研究方法

1. EHEC の病原因子保有状況

1) 供試菌株

2012-2014 年に東京都内で分離された EHEC 916 株のうち、血清群 0157, 026, 0111 以外の血清群菌 93 株を対象とした。また食

中毒の原因菌調査のために当センターに搬入された食品由来の non-0157 EHEC 8 株を供試した。

## 2) 病原遺伝子の確認

既知の付着因子あるいは病原因子である *eae*, *saa*, *hlyA*, *aggR*, 新しい毒素として報告されている SubAB に関与する *subA* 遺伝子について PCR 法で保有状況を調べた。

## 2. 非典型的 EHEC を原因とした食中毒・感染症のための検査法の確立

非典型的な EHEC 食中毒・感染症が発生した場合に対応するための検査法を確立することを目指し、検査工程ごとに考えるべきポイントをまとめた。

## C. 研究結果

### 1. EHEC の病原因子保有状況

#### 1) ヒト由来株の分離状況

2012-2014 年に東京都内で分離されたヒト由来 EHEC 株は 916 株であった (表 1)。そのうち 0157 が 687 株 (75.0%) で最も多く、次いで 026 が 120 株 (13.1%) であった。この上位血清群で全体の 88.1% を占めており、2 血清以外の血清群菌は 109 株 (11.9%) であった。

血清群 0157, 026 および 0111 以外の血清群菌は 93 株 (10.2%) であった。これらを対象に血清型別試験を実施したところ、14 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 30 株 (3.3%)、次いで 0121 および 0145 (17 株, 1.9%)、0111 (16 株, 1.8%)、091 (5 株, 0.5%) 等であった。血清型別不能 (OUT) は 14 株 (1.5%) であった。

#### 2) 分離菌と症状

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: 22, 不明 6), 0121 (有症: 9, 不明: 8), 0145 (有症: 10, 不明: 5) であった。HUS を発症した事例は 3 事例認められ、その原因血清群は 076, 0103, 0183 であった。

### 3) 遺伝子保有状況

病原因子関連遺伝子である *eae*, *saa*, *hlyA*, *aggR*, *subA* 遺伝子の保有状況を表 3 に示した。

#### (1) インチミン遺伝子 (*eae*)

供試した 92 株中 76 株 (82.6%) が陽性であった。血清群 05, 076, 0103, 0109, 0121, 0145, 0153 および 0165 では分離された全ての株が *eae* 陽性であった。その他、OUT 株 14 株中 8 株で *eae* を保有していた。

#### (2) STEC アドヘシン遺伝子 (*saa*)

0183 1 株が陽性であった。

#### (3) ヘモリシン遺伝子 (*hlyA*)

*hlyA* の保有率は血清群によって異なっており、05, 076, 0103, 0121, 0128, 0153, 0165, 0183 は 100% 陽性であった。0145 は 17 株中 16 株が陽性、091 は 5 株中 3 株で陽性となった。OUT 株では 14 株 3 株が陽性であった。

#### (4) 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。

#### (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を用いて調べた結果、0128, 0146, 0183 および OUT の各 1 株が陽性であった。

### 2. 食品由来株の病原因子保有状況

食中毒の原因究明調査のために当センターに搬入された食品から分離された 8 株の血清群は 074 (豚ハツ由来), 0119 (牛ツラミ刺し由来), 0121 (豚レバ刺し, 豚ハツ刺し, 豚タン刺し, 卵和え由来), 0142 (豚タン由来), OUT (牛小腸由来) であった。これらの株はいずれも VT2 産生株であったが、*eae* 等の病原因子関連遺伝子は、全て陰性であった (表 4)。

### 3. 非典型的 EHEC を検査することを目的とした検査法の確立

#### 1) 菌株および患者情報

患者からすでに菌が検出されている場合は、菌株に関する情報を知っておくことで

検査が迅速・容易となる。検査に有用となる情報をまとめた（表 5）。血清型や毒素型が分からない場合でも、CT に対する感受性やソルビトールなどの糖の分解性が分かれば菌の分離が容易になる。糞便検体の場合は糞便提出者の情報があるとよい。発症の有無や抗菌薬投与の有無は特に重要である。

## 2) 糞便を対象とした検査法

検査をする時に、それぞれの検査過程で考えるべきポイントをまとめた（表 6）。菌株情報あるいは患者情報を参考にしながら、使用する分離培地や増菌培地を選択すべきである。また増菌培養では培養温度によってバックブランドの菌が抑えられる場合もある。遺伝子検査としてリアルタイム PCR 法で VT 遺伝子をスクリーニングする方法や免疫磁気ビーズ法を用いた対象菌の濃縮も非常に有効である。

## D. 考察

2012-2014 年に東京都内で分離された 916 株のうち血清群 0157 は 687 株 (75.0%)、026 は 120 株 (13.1%) で、この 2 血清群で分離株の 88.1% を占めていた。東京都では、全国と比較して毎年 0157 の占める割合が高い傾向である。0157、026、0111 以外の血清群菌は 93 株 (10.2%) であった。93 株は 14 種類の血清群および OUT に型別され、非常に多彩であった。

0157、026、0111 以外の血清型について、付着因子等の病原遺伝子保有状況をみると、有症者からの分離が多い血清群 05、076、0103、0121、0165 は全ての株で *eae*、*hlyA* を保有していた。同様に有症者からの分離の多い 0145 は、17 株中 *eae* 保有が 17 株、*hlyA* 保有は 16 株であった。*hlyA* が陰性であった 1 株については、再度検討する予定である。*subA* を保有する株は、0128、0146、0183、OUT の各 1 株で、かなり限定されていることが明らかとなった。

HUS 患者由来の 3 株では、076 および 0103 が *eae* と *hlyA* を、0183 は *saa*、*hlyA*、*subA* を保有していた。

一方、食品由来の 8 株は、VT2 産生株で

あったが、全てこれらの病原関連遺伝子を保有していなかった。食品や環境から分離される EHEC の病原因子については、さらに菌株を増やして調べる必要がある。

非典型的 EHEC の食中毒・感染症が発生した場合、迅速な検査に対応するためには、日ごろから検査体制を整えておく必要がある。患者からすでに菌が検出されている場合には、菌株に関する情報があれば、検査が非常に迅速・効率的となるため、それらの検査に必要な情報についてまとめた。これらの情報が少しでも集まれば、検査時間の短縮・効果的な検査に繋がるものと考えている。

## E. 結論

2012-2014 年に東京都内で分離された 916 株のうち、血清群 0157、026 および 0111 以外の株は 93 株 (10.2%) であった。93 株の血清群は、0103 (30 株, 3.3%)、0121 および 0145 (17 株, 1.9%) 等、14 血清型に分類された。重症化 (HUS 発症) が確認されたのは、076、0103、0183 の 3 例のみであった。

付着因子等の病原遺伝子保有状況を調べた結果、有症者からの分離が多い血清群 0103、0121 は全ての株で *eae*、*hlyA* を保有していた。HUS 患者由来の 3 株では、076 および 0103 が *eae* と *hlyA* を、0183 は *saa*、*hlyA*、*subA* を保有していた。一方、食品由来株 8 株 (VT2 産生) はこれらの病原遺伝子陰性であった。

非典型的 EHEC による食中毒・感染症の発生時の迅速な検査対応には、菌株に関する情報が、その後の検査に非常に重要である。検査に有用となる情報、非典型的 EHEC 検査のポイントについてまとめた。

## 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) 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, 2017年7月, 京都.
- 2) 畠山 薫, 小西典子, 貞升健志, 甲斐明美: 東京都内でヒトおよび動物から分離された志賀毒素産生性大腸菌 091株の疫学解析, 第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2013年7月, つくば.
- 3) 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

表1. ヒトから分離された腸管出血性大腸菌(2012 - 2014年, 東京都)

血清群	菌株数 (%)	産生毒素		
		VT1	VT2	VT1+VT2
O157	687(75.0)	7	232	448
O26	120(13.1)	92	26	2
O103	30(3.3)	29		1
O121	17(1.9)		16	1
O145	17(1.9)	2	15	
O111	16(1.8)	5		11
O91	5(0.5)	5		
O5	1(0.1)	1		
O8	1(0.1)		1	
O76	1(0.1)		1	
O109	1(0.1)		1	
O115	1(0.1)	1		
O128	1(0.1)			1
O146	1(0.1)	1		
O153	1(0.1)		1	
O165	1(0.1)		1	
O183	1(0.1)			1
OUT	14(1.5)	4	8	2
合計	916(100)	147	302	467

表2. O157, O26, O111以外の血清群別発症状況  
(2012-2014年, 東京都)

血清群	供試数	症状			HUS
		有	無	不明	
O5	1	1			
O8	1		1		
O76	1	1			1
O91	5		2	3	
O103	30	22	2	6	1
O109	1		1		
O115	1			1	
O121	17	9		8	
O128	1	1			
O145	17	10	2	5	
O146	1	1			
O153	1			1	
O165	1	1			
O183	1	1			1
OUT	14	3	2	9	
合計	93	50	10	33	3

表3. ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清群別遺伝子保有状況  
(2012 - 2014年, 東京都)

血清群	供試数	保有菌株数				
		<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>aggR</i>	<i>subA</i>
O5	1	1		1		
O8	1					
O76	1	1		1		
O91	5			3		
O103	30	30		30		
O109	1	1				
O115	1					
O121	16	16		16		
O128	1			1		1
O145	17	17		16		
O146	1					1
O153	1	1		1		
O165	1	1		1		
O183	1		1	1		1
OUT	14	8		3		1
合計	92	76 (82.6%)	1 (1.1%)	74 (80.4%)	0	4 (4.3%)

表4. 食品由来株の病原因子保有状況

No.	由来	血清型	毒素型	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>hlyA</i>	<i>aggR</i>	<i>subA</i>
5	豚ハツ	O74:HUT	VT2	-	-	-	-	-
6	牛ツラミ刺し	O119:H16	VT2	-	-	-	-	-
1	豚レバ刺し	O121:H10	VT2	-	-	-	-	-
2	豚ハツ刺し	O121:H10	VT2	-	-	-	-	-
3	豚タン刺し	O121:H10	VT2	-	-	-	-	-
4	卵和え	O121:H10	VT2	-	-	-	-	-
7	豚タン	O142:NM	VT2	-	-	-	-	-
8	牛小腸	OUT:H4/17	VT2	-	-	-	-	-



表5. 検査に有用となる情報

---

分離株の性状について <ul style="list-style-type: none"> <li>・血清型(O血清群)</li> <li>・毒素型</li> <li>・CTに対する感受性                         <ul style="list-style-type: none"> <li>→ CT-SMAC寒天培地やクロモアガーSTEC培地に発育する菌か否か</li> </ul> </li> <li>・糖の分解性                         <ul style="list-style-type: none"> <li>(ソルビトール, ラムノース, ソルボース, 乳糖, 白糖, その他)</li> </ul> </li> </ul>
---

---

糞便検体提出者に関する情報 <ul style="list-style-type: none"> <li>・属性(患者, 調理従事者, 家族, 同時喫食者等)</li> <li>・症状の有無</li> <li>・発症者であれば                         <ul style="list-style-type: none"> <li>→ 何病日の検体か</li> <li>→ 抗菌薬投与の有無</li> </ul> </li> </ul>
---

---

表6. 非典型的EHEC検査のポイント

---

分離平板 <ul style="list-style-type: none"> <li>・CT-SMAC寒天, CT-RMAC寒天, CT-ソルボースMAC寒天等CTを含む培地</li> <li>・クロモアガーSTEC等の酵素基質培地</li> <li>・DHL寒天, マッコンキー寒天, XM-G寒天等選択性の弱い培地</li> <li>・エンテロヘモリジン培地</li> </ul>
増菌培地 <ul style="list-style-type: none"> <li>・mEC培地, ノボビオシン加mEC培地, CT-TSB, TSB, EC培地 Rapidcalt, UPB等</li> </ul>
増菌培養温度 <ul style="list-style-type: none"> <li>・37°C, 42°C</li> </ul>
遺伝子検査によるスクリーニング試験 <ul style="list-style-type: none"> <li>・対象遺伝子: VT遺伝子, O抗原遺伝子</li> <li>・対象検体 : 分離平板(Colony-sweep法), 増菌培養液</li> </ul>
菌の分離 <ul style="list-style-type: none"> <li>・リアルタイムPCR法によるVT遺伝子のスクリーニング試験                         <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Ct値の低い検体から菌の分離を行う</li> </ul> </li> <li>・免疫磁気ビーズ法による対象菌の濃縮(診断用血清を用いて自家調整することも可能)</li> <li>・できるだけ多くの集落を検査する</li> </ul>

---

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究  
分担課題 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 農学部 畜産草地科学科・准教授）

## 研究要旨

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は原因菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となる。本研究では大腸菌の血清学的判定に対応した安価で迅速な核酸検出法の開発を目指した。まず大腸菌 O 抗原合成遺伝子領域の網羅的な塩基配列情報を基に、各 O 血清群（またはグループ）を特異的に判定できる 162 種類の PCR プライマーセットをデザインした。さらに、それら全プライマーセットを用いて 20 種類のマルチプレックス PCR キットからなる大腸菌 O 血清群-PCR 検査系（*E. coli* O-genotyping PCR 法）を開発した。本法の特異性は全 184 種類の大腸菌 O 血清群参考株により確認した。さらに野生株 690 株（O 血清群が判定できた 579 株に加え、判定できなかった 111 株を含む）を用いて妥当性および有効性を評価した。本研究で開発した手法は、分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられた。

## A. 研究目的

大腸菌の血清学的な分類は、分離菌株間の系統的関連性やその系統集団に関連した病原因子を予測する上で重要な手掛かりとなる。特に事例発生時の初動調査において、分離菌株間の O 血清群同一性の確認は、原因細菌の感染範囲や感染経路を特定する上で有用な情報となり、重要な検査項目の一つとなっている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所（Statens Serum Institut: SSI）（兼 WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*）により現在のところ O1 から O187 までが定められており、3 種類の亜型（O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac）と 6 種類の欠番（O31、O47、O67、O72、O94、O122）があるために 184 種類の O 血清群が認められている。ヒト患者から分離される腸管出血性大腸菌（EHEC）の O 血清群は O157、O26、O111、O103、O145、O121、O165 などが大半を占めるが、稀な O 血清群に属する EHEC の分離も報告されている。国立感染症研究所の調べによると 2007 年から 2011 年の間に少なく

とも 90 種類の O 血清群が確認されており、血便や溶血性尿毒症症候群を呈した重症患者から稀な O 血清群が分離される事例も複数報告されている。また 2011 年にはドイツを中心に、過去に事例報告例がほとんど無い EHEC O104 による大規模な集団事例が発生した。このような状況において、検査現場では稀な O 血清群にも対応した検査法を備え、事例発生時に早期対応できる態勢を整えておくことが望まれる。しかし、SSI から販売されている O 血清群完全判定用抗血清試薬のセットは高価であるために地方衛生研究所などの検査現場で揃えることは経済的に難しい。国内メーカーからも抗血清試薬は販売されているが主要な 50 種類に限られている。また血清学的な凝集反応試験は、菌株によって交差反応や非特異的凝集、不凝集などが起こることも知られており、その不鮮明さや煩雑性の解消が課題となっている。

O 抗原の合成に関わる遺伝子（10 から 20 個程度）は染色体上の特定遺伝子座にクラスター（O 抗原合成遺伝子領域）を形成している。この領域における比較解析から、O 血清群の違い

により糖転移や糖鎖輸送に関わる遺伝子の相同性がオーソログ間で大きく異なることが知られている。近年ではこれら塩基配列の多様性を利用した、それぞれの O 血清群を特異的に判定できる遺伝学的手法（PCR 法、リアルタイム PCR 法、ハイブリダイゼーション法など）が開発されている。しかしそれら手法の多くは病原大腸菌に関連性の高い一部の O 血清群のみを標的としたものであり、現在のところ稀な O 血清群をカバーした網羅的な判定手法は存在しない。本研究では大腸菌の O 血清群を網羅的に判定できる遺伝学的な検査法の開発および実用化を目指し、①大腸菌全血清群からの O 抗原合成遺伝子領域塩基配列情報の収集と比較解析、②特異的 PCR プライマーのデザイン、③マルチプレックス PCR-検査系（*E. coli* O-genotyping PCR : Og-typing PCR）の構築、④参考株と野生株を用いた開発手法の特異性と妥当性の評価、を行った。

## B. 研究方法

### 1. 大腸菌 O 血清群参考株

大腸菌の O 血清群は現在のところ SSI により O1 から O187 までが定められており、3 種類の亜型（O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac）と 6 種類の欠番（O31、O47、O67、O72、O94、O122）があるために 184 種類の O 血清群が認められている。本研究では SSI 由来の参考株を用いて O 抗原合成遺伝子領域の配列決定および開発手法の特異性評価を行った（表 1）。

PCR に供した DNA は以下の通りに調整した。LB 培地による培養液から Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) により DNA を精製した。10ng/μl に調整した個別 DNA と、5 種類の DNA を混和したプール DNA（個別 DNA の最終濃度は 10ng/μl）を準備した。一方で、LB 培地による培養液を遠心して上清を除去し、ペレットに 1/4 量の TE を加えて懸濁後、98℃で 10 分間熱処理して遠心した上清を、菌体熱処理上清（テンプレート DNA）として用いた。

### 2. 大腸菌野生株

ヒトや家畜から分離された野生株 690 株を使用した（表 2）。551 株は国内分離株を使用し、139 株は SSI 由来大腸菌コレクションを使用した。O 血清群の判定にはオートクレーブ処理した菌体を抗原として用い、マイクロタイタープレート上で抗血清との凝集を観察した。SSI が販売する *E. coli* O プール抗血清（AA～XX、計 23 種類）でスクリーニングを行い、凝集が確認

されたものはそのプールに含まれる個別抗血清 [*E. coli* O 個別抗血清 (O1～O187、計 184 種類)] を用いて O 血清群を判定した。全プール抗血清で凝集が確認されなかったもの、個別抗血清で凝集がなかったものおよび個別抗血清で 2 種類以上にほぼ同等の力価で凝集したものは O 血清群判定不能 (OUT) とした。

PCR に供した DNA は Wizard Genomic DNA purification kit で精製し、10ng/μl に調整して用いた。

国内分離株は以下の機関より分与されたものを使用した：大阪府立公衆衛生研究所、沖縄県衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、北九州市環境科学研究所、さいたま市健康科学センター、愛媛県立衛生環境研究所、横浜市衛生研究所、岡崎市保健所、岡山県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、岐阜県保健環境研究所、宮崎県衛生環境研究所、宮城県保健環境センター、熊本県保健環境科学研究所、熊本市環境総合センター、広島県立総合技術研究所保健環境センター、香川県環境保健研究センター、佐賀県衛生薬業センター、埼玉県衛生研究所、三重県保健環境研究所、山口県環境保健センター、滋賀県衛生科学センター、鹿児島県環境保健センター、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、青森県環境保健センター、静岡県環境衛生科学研究所、静岡市環境保健研究所、石川県保健環境センター、仙台市衛生研究所、千葉県衛生研究所、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、相模原市衛生試験所、大阪市立環境科学研究所、大分県衛生環境研究センター、長崎県環境保健研究センター、長野県環境保全研究所、島根県保健環境科学研究所、東大阪市環境衛生検査センター、徳島県立保健製薬環境センター、奈良県保健研究センター、姫路市環境衛生研究所、富山県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、福岡県保健環境研究所、福岡市保健環境研究所、福島県衛生研究所、北海道立衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、大阪市立大学、宮崎大学医学部附属病院、川崎市立井田病院、日本微生物研究所、以上 55 機関。

### 2. O 抗原合成遺伝子領域の配列情報の収集

O 抗原合成遺伝子領域の全長が既に発表されている 78 種類は DNA データベースより配列情報を収集し、それ以外については参考株より配列を決定した（表 1）。配列決定については、O 抗原合成遺伝子領域の全長を挟み込む PCR プラ

イマーを用いて増幅し、その PCR 産物 (10~30 kb) からショットガンライブラリーを作製してサンガー法により決定した。PCR 産物が得られない菌株については、MiSeq システムによりドラフトゲノム情報を決定した後に必要な領域を抽出した。ギャップなどが存在した場合にはサンガー法を併用して決定した。遺伝子予測・アノテーションについては相同性検索とモチーフ検索により行った。

### 3. 比較解析

領域間および遺伝子間の比較解析および相同性検索にはインシリコモレキュラークロニング (インシリコバイオロジー株式会社、横浜) を用いた。系統樹作製には MEGA5 に含まれる clustalW を用いて配列アライメントを行い、Neighbor-Joining 法で作製した。

### 4. PCR プライマーセットのデザイン

比較解析の結果を基に、162 種類の O 抗原合成遺伝子領域を識別できるプライマーセットを準備した (表 3)。本研究で新しくデザインしたプライマーについては、プライマー長が 20 から 22 bp、増幅産物長が 130 bp から 1300 bp、 $T_m$  値が 56 から 58°C の範囲内でデザインした。

### 5. シンプレックス PCR

シンプレックス PCR の反応液組成および反応条件は表 4 および表 5 に示す。シンプレックス PCR の評価にはプール DNA および個別 DNA を用いた。まずは全プール DNA を用いて陽性の有無を確認し、次に陽性プールに含まれる個別 DNA を用いて陽性検体を特定した。Taq ポリメラーゼおよび反応液は KAPATaq Extra (日本ジェネティクス) を使用し、サーマルサイクラーは GeneAmp PCR システム 9700 (アプライドバイオシステムズ) または TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を使用した。PCR 産物は、PCR 反応液  $2\mu\text{l}$  を 2%ゲル上で約 40 分間泳動した後にエチジウムブロマイドによる染色および水洗を行い、UV トランスイルミネーター上で観察した。

### 6. マルチプレックス PCR のデザイン

162 種類の個別プライマーセットから PCR 増幅産物サイズが明らかに異なる 6 から 9 種類を選定し、全プライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR を作製した (表 6)。

### 7. マルチプレックス PCR

マルチプレックス PCR の反応液組成および反応条件は表 7 および表 8 に示す。プライマーミックスの組成は表 6 に示す。マルチプレックス PCR の評価には個別 DNA を用いた。供試 DNA の精度確認の為に、大腸菌の *gyrB* を標的とした PCR も併せて行った。増副産物の確認には、QIAxcel Advanced System/QX Screening Kit (キアゲン) を用い、陽性検体についてはゲル電気泳動により再確認を行った。その他の条件などはシンプレックス PCR と同じ方法で行った。全 20 種類のマルチプレックス PCR によっても PCR 産物が得られないものは OgUT (O-genotype untypeable) と判定した。

倫理面への配慮 該当しない

## C. 研究結果

### 1. O 抗原合成遺伝子領域の配列情報の収集

全 184 種類の O 血清群から O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列情報を収集した (表 1 および図 1)。76 種類は既報情報を使用し、残る 108 種類は本研究などで新しく決定した。O14 および O57 については O 抗原合成遺伝子領域の大半が脱落していた (図 1)。LPS-SDS PAGE とその銀染色によっても O 抗原が発現していないことを確認した (データ省略)。

### 2. 領域レベルでの比較解析

O14 と O57 を除く 182 種類の領域を比較した結果、37 種類は類似性の高い遺伝子セットから成る 16 グループ (Gp1 から Gp16) にまとめられた (図 2)。Gp1 から Gp9 までは相同な遺伝子構成であり、領域間の塩基配列の相同性は 98.3%以上であった。Gp10 から Gp16 ではほぼ相同な遺伝子構成であったが、挿入配列 (Insertion sequence: IS) の遺伝子非破壊挿入、遺伝子の挿入・欠失、部分的な組換えなどが観察された。

### 3. 遺伝子レベルでの比較解析

オーソログ間での配列的な多様性が知られている糖鎖輸送・連結に関わる遺伝子 [*wzx/wzy* (O-unit flippase/O-antigen polymerase) および *wzm/wzt* (O-antigen ABC transporter)] について比較解析を行った。O14 と O57 を除く 182 種類の領域のうち、171 種類は *wzx/wzy* タイプの遺伝子を持ち、残る 11 種類は *wzm/wzt* タイプであった。領域間の比較解析でグループ化されたものは、それぞれのオーソログにおいて DNA レベルで 97%以上の相同性を示した (図