

資料

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析

山田 裕子, 今井 佳積, 増田 加奈子, 高尾 信一

Molecular Epidemiological Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 detected in Hiroshima Prefecture

HIROKO YAMADA, KAZUMI IMAI, KANAKO MASUDA, and SHINICHI TAKAO

(Received October 16, 2014)

2013年に広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法, IS-printing system (IS) 法, および Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法により分子疫学的解析を実施した。疫学的関連が推察される菌株間では, PFGE タイプと IS コードが一致し, MLVA 法では 1 遺伝子座以内の相違であった。3 法による解析結果はほぼ一致したことから, 同等の型別能を有していると考えられた。今回の結果から, MLVA 法は, IS 法とともに, PFGE 法に比べて迅速性・簡便性に優れた疫学的解析法として有用であると考えられた。

Key words : 腸管出血性大腸菌 O157, パルスフィールドゲル電気泳動法, IS-printing System 法, MLVA 法

緒 言

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は, 感染症法により三類感染症に分類され, 診断した医師は直ちに届出を行わなければならない。これにより, 毎年 3,000 ~ 4,000 の患者が報告されている [1]。患者の主症状は激しい血便と腹痛で, 重症例では HUS や脳症などの合併症を引き起こし死に至る場合もある [2]。また, 全国の地方衛生研究所から報告された EHEC 全検出数における O 血清群の割合は, 2013 年は O157 が 52%, O26 が 25%, O111 が 7.2% である [1]。広島県においても, 2013 年に当センターに搬入され, 解析した EHEC のうち, O157 が 59% を占め, 分離頻度の最も高い血清群であった。

集団感染事例等の発生時には, 感染源や感染経路の把握のために, 食品や患者由来の菌株の解析が求められる。また, 散在的集団発生事例の早期探知にも分子疫学的解析は重要である。EHEC O157 の分子疫学的解析法としては, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法が標準法として用いられているが, 操作が煩雑, 解析に時間を要する等の問題がある。そこで, 近年では, 迅速性・簡便性に優れた IS-printing system (IS) 法や Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法が導入されつつある [3, 4]。今回, 我々は 2013 年

に県内で分離された EHEC O157 について, これまで当センターで実施している PFGE 法, IS 法に加え, 新たに MLVA 法を実施し, 疫学的解析法としての有用性の検討を行ったので報告する。

材料および方法

1 供試菌株

2013 年 1 月から 12 月に広島県内で分離され, 当センターへ搬入された EHEC O157 23 株を用いた。各菌株の概要を表 1 に示した。県内 8 ヶ所の保健所管轄区域のうち, 菌株が搬入された 3 地域を A, B, C とした。

2 方法

(1) PFGE 法

国立感染症研究所の方法 [5] に準拠した。制限酵素は *Xba* I (TaKaRa) を用い, 電気泳動は BIO-RAD CHEF MAPPER (BioRad) を用いて 6 V/cm, パルスタイム 2.16-63.8 秒, 14°C の条件で 18 時間行った。PFGE パターンの解析は, BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い, Dice および UPGMA によりクラスター解析を行った。また, 国立感染症研究所による解析結果を参照し, PFGE Type No. (TN) を表記した。

表1 EHEC O157 菌株の概要

菌株番号	届出年月日	地域	年齢	性別	血清型	毒素型	備考
13-01	2013/ 1/12	A	63	女	O157:H7	VT1,2	13-02, 03, 04 の接触者
13-02	2013/ 1/17	A	41	女	O157:H7	VT1,2	13-01 の接触者
13-03	2013/ 1/16	A	11	男	O157:H7	VT1,2	13-01 の接触者
13-04	2013/ 1/16	A	14	男	O157:H7	VT1,2	13-01 の接触者
13-05	2013/ 3/21	B	17	女	O157:H7	VT2	
13-06	2013/ 4/16	A	8	女	O157:H7	VT1,2	
13-07	2013/ 6/13	A	78	男	O157:H7	VT2	13-08, 12 と関連有
13-08	2013/ 6/18	A	80	女	O157:H7	VT2	13-07, 12 と関連有
13-09	2013/ 6/27	B	41	男	O157:H7	VT1,2	
13-10	2013/ 6/28	A	13	女	O157:H7	VT2	13-11, 13, 14 の接触者
13-11	2013/ 6/29	A	7	女	O157:H7	VT2	13-10 の接触者
13-12	2013/ 6/29	A	91	女	O157:H7	VT2	13-07, 08 と関連有
13-13	2013/ 7/ 1	A	45	女	O157:H7	VT2	13-10 の接触者
13-14	2013/ 7/ 1	A	27	女	O157:H7	VT2	13-12 と関連有
13-15	2013/ 7/ 4	A	11	男	O157:H7	VT1,2	
13-16	2013/ 7/ 5	A	16	男	O157:H7	VT2	13-10 の接触者
13-19	2013/ 8/ 1	A	38	男	O157:H7	VT1,2	
13-21	2013/ 8/ 7	A	11	男	O157:H7	VT1,2	
13-22	2013/ 8/13	A	2	女	O157:H7	VT1,2	
13-32	2013/ 8/31	A	19	女	O157:H7	VT2	
13-34	2013/10/ 3	A	3	女	O157:H7	VT1,2	
13-35	2013/10/ 8	A	21	男	O157:H7	VT1,2	
13-37	2013/10/29	C	32	男	O157:H7	VT1,2	

表2 MLVA 法に用いた Locus 及びプライマー

Locus	Sequence (5'-3')	Concentration (μ M)	Dye	Repeat size (bp)	Offset
Mix1	O157-3 F GCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	0.04	NED	6	323
	R GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG	0.04			
	O157-9 F GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	0.04	VIC	6	465
	R GTGTCAGGTGAGCTACAGCCGCTTACGCTC	0.08			
	O157-25 F GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG	0.04	PET	6	110
	R GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACAC	0.04			
	O157-34 F TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	0.04	6-FAM	18	141
	R AGGCATTAATAGCAGATGTTT	0.08			
Mix2	O157-10 F CAAACTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC	0.04	VIC	6	350
	R AGGTATTATAAGGGGCTTAAAGATAAAAAG	0.08			
	O157-17 F GCAGTTGCTCGGTTTTAACAATTGCAGTGATGA	0.04	VIC	6	121
	R AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC	0.04			
	O157-19 F GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTT	0.04	NED	6	273
	R CGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC	0.04			
	O157-37 F AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	0.04	PET	6	84
	R GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG	0.04			
	O157-36 F GCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	0.04	NED	7	102
	R GCCGTGAAAGCCCACACCATGC	0.04			

(2) IS 法

IS-printing system (東洋紡) を用い、取扱説明書に従って実施した。判定は、2種類のプライマーセット(1st set, 2nd set) ごとに、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とし、増幅サイズの大きいバンドから順に3バンドごとに「1」、「2」、「4」の係数を乗じた数値を加算して、1st set, 2nd set の順に並べ、12桁のISコードとした。

(3) MLVA 法

Izumiyaら[6]の方法に準じ、表2に示したプライマーを用いて、9ヶ所の遺伝子座について解析を行った。QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて各検体2セットのPCR反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) および Gene Mapper Software 5 (Applied biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。Fragment size marker は GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied biosystems) を

使用した。また、代表的なフラグメントについて、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行い、各遺伝子座のリピート数を確認した。なお、フラグメント解析によりピークが認められない場合は、「- 2」とした。次に、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用いて、categorical coefficient および UPGMA によりクラスター解析を行い、クラスターごとに、I ~ VIII の番号を付けた。

結 果

1 PFGE 法による解析結果

EHEC O157 23 株は、PFGE 法により 11 パターンに分類された (図 1, 表 3)。接触者等の疫学情報から関連の疑われる菌株間では、13-01 ~ -04 の 4 株 (PFGE TN: i12) および 13-07, -08, -10 ~ -14, -16 の 8 株 (PFGE TN: g501) は PFGE パターンが一致した。

一方、疫学情報では関連性が認められなかった株のうち、13-06 と -15 (PFGE TN: i49), 13-21 と -22 (PFGE TN: i399) のパターンが一致した。また、13-37 は 13-01 ~ -04 (PFGE TN: i12) と PFGE タイプは異なるが、パターンは 4 バンド違いで、類似度は 90.5% であった。さ

らに、13-09 は -06 および -15 (PFGE TN: i49) と 1 バンド違いで類似度 97.6%, 13-35 は 2 バンド違いで類似度 92.0% であった。

2 IS 法による解析結果

EHEC O157 23 株は、IS 法により 11 のコードに分類され、PFGE タイプによる分類と完全に一致した (表 3)。同一 PFGE タイプで異なる IS コードを示す株、あるいは同一 IS コードで異なる PFGE タイプを示す株は認められなかった。また、IS コードが「341057-310652」の 13-07, -08, -10 ~ -14, -16 のグループでは、すべての菌株で 1st プライマーセットの高分子量の位置にエキストラバンドが認められた。

3 MLVA 法による解析結果

解析した 9 ヶ所の遺伝子座のうち、相違する部位が 1 [single locus variant (SLV)] 以内を同一クラスターとすると、8 のクラスターに分類された (図 2, 表 3)。

疫学的関連の疑われる菌株については、PFGE 法により同一パターンを示した 13-01 ~ -04 (PFGE TN: i12) の 4 株間では、O157- 3 の遺伝子座で 1 リピート (13-02), O157-10 で 1 リピート (13-04) の相違が 1 株ずつに認められたが、同一クラスター (IV) に分類された。また、

表 3 EHEC O157 の PFGE, IS, MLVA 法による解析結果

菌株 番号	PFGE Type No.	IS コード		MLVA repeat-numbers									MLVA クラスター
		1st	2nd	O157- 3	O157- 9	O157- 25	O157- 34	O157- 10	O157- 17	O157- 19	O157- 37	O157- 36	
13-01	i12	717577	611557	12	9	4	11	27	7	4	6	9	IV
13-02				13**	9	4	11	27	7	4	6	9	
13-03				12	9	4	11	27	7	4	6	9	
13-04				12	9	4	11	28	7	4	6	9	
13-37	i440	717557	631557	12	9	4	11	28	6	4	6	9	
13-32	i393	305457	611242	14	9	5	9	33	4	7	7	6	VI
13-19	i206	717577	611657	11	11	8	12	8	7	6	5	3	VIII
13-21	i399	717555	611657	10	13	8	12	29	8	6	5	3	VII
13-22				10	13	8	12	29	8	6	5	3	
13-06	i49	717577	211657	10	12	3	11	29	7	7	8	11	I
13-15				10	12	3	11	32	7	7	8	11	
13-09	i197	717575	211657	10	12	3	11	27	7	7	8	11	
13-35	i603	717555	211657	10	12	3	11	30	7	7	8	11	
13-07	g501	341057*	310652	18	9	3	9	16	5	8	8	-2	III
13-08				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-10				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-11				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-12				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-13				19	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-14				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-16				18	9	3	9	16	5	8	8	-2	
13-05	i48	105457	311252	16	11	4	9	37	6	6	7	5	V
13-34	i348	717557	611657	10	14	3	11	26	7	7	8	10	II

* 高分子量にエキストラバンド有

**太字は single locus variant を示す

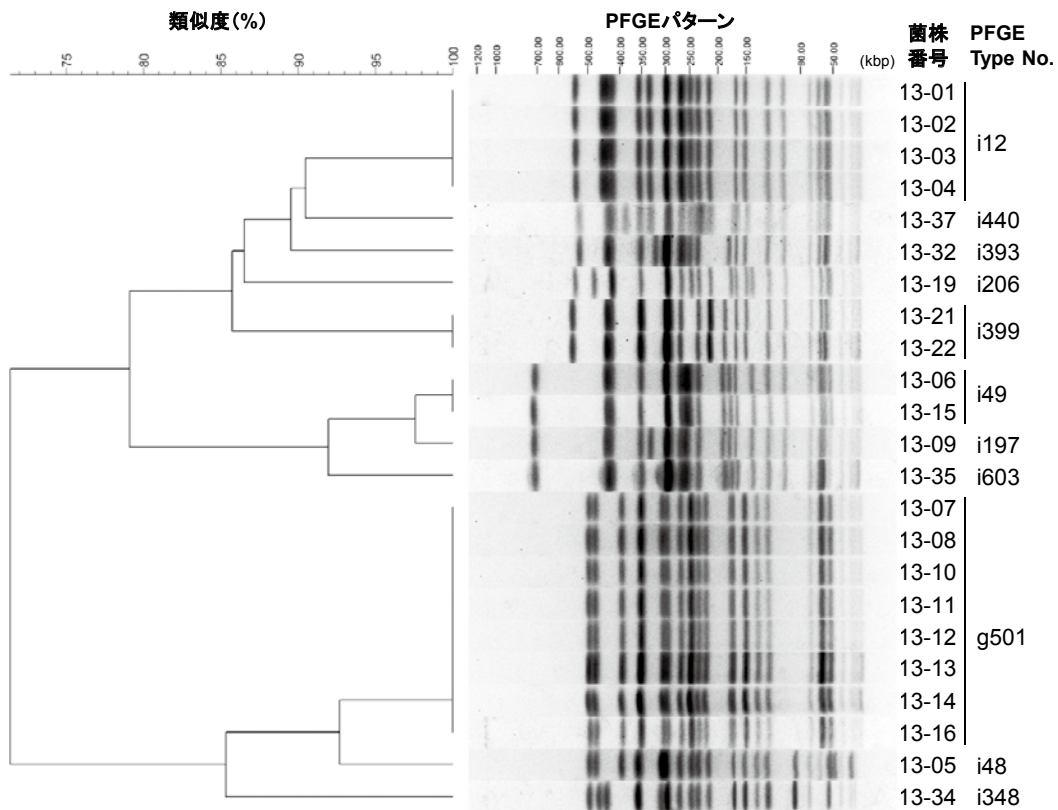


図1 EHEC O157 の PFGE クラスタ

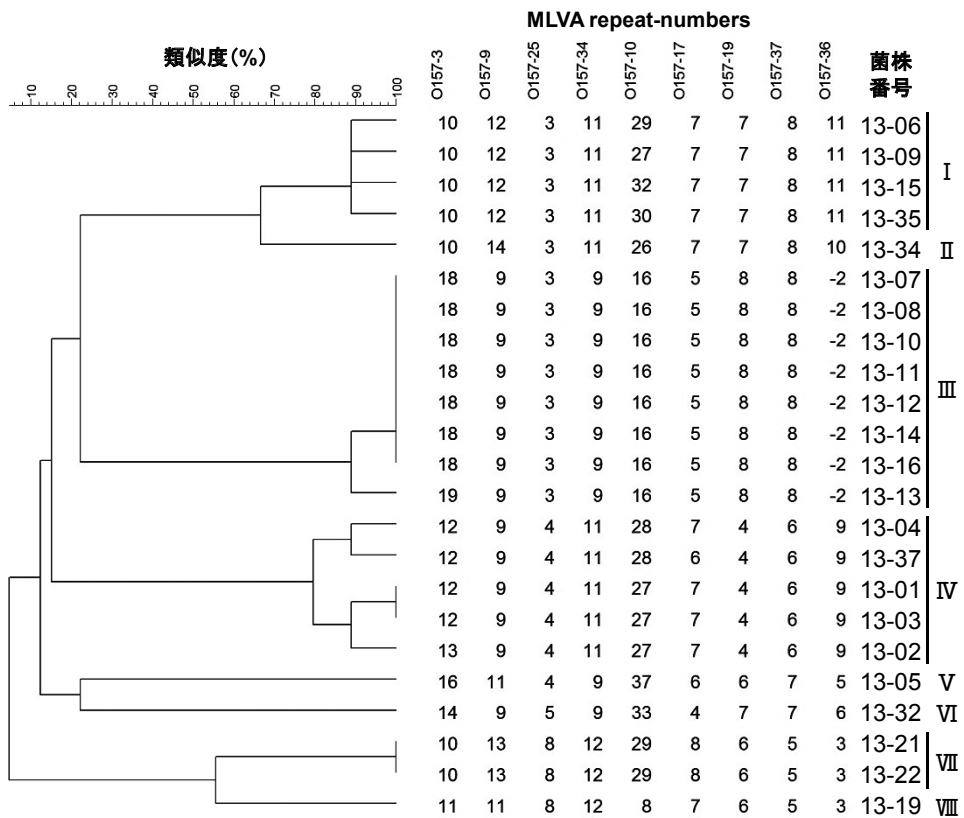


図2 EHEC O157 の MLVA クラスタ

13-07, -08, -10 ~ -14, -16 (PFGE TN: g501) の 8 株間では, 1 株 (13-13) のみ O157-3 の遺伝子座で 1 リピート異なっていたが, その他は完全に一致し, すべての株が同一クラスター (Ⅲ) に分類された。

一方, 疫学情報から関連性が認められなかった株について, PFGE 法および IS 法で同一タイプを示した株 (13-21, -22 あるいは 13-06, -15) は, 1 遺伝子座以内の相違で, 同じクラスター (Ⅶあるいは I) に分類された。その他, PFGE 法および IS 法では異なるパターンを示した株のうち, 13-37 は 13-04 と 1 遺伝子座, 13-01, -03 と 2 遺伝子座違いであり, 13-09 と -35 は 13-06, -15 と 1 遺伝子座違いであった。

考 察

2013 年に広島県内で分離された EHEC O157 23 株について, PFGE 法, IS 法, MLVA 法により解析した。

疫学情報から関連性が疑われる 13-01 ~ -04 および 13-07, -08, -10 ~ -14, -16 の 2 グループ間では, それぞれ, PFGE タイプと IS コードが一致し, MLVA 法では, 1 遺伝子座, 1 リピート以内の相違であった。国立感染症研究所の示した分類では, PFGE 法においては, バンドの相違数が 0 の場合は一致, 2 - 3 は密接に関係, 4 - 6 は関係する可能性があると解釈し [7], MLVA 法においては, 相違する部位数が 0 の場合は一致, 1 (SLV) は密接に関係, 2 は関係する可能性があるとして解釈することから, これらのグループの菌株は, それぞれ集団発生の一部である可能性が高いと考えられた。

次に, 疫学情報からは関連性の認められなかった株では, 13-37 が 13-01 ~ -04 と MLVA 法では 2 遺伝子座以内の違い, PFGE 法では 4 バンド違いであった。これらは分離時期が 9 ヶ月以上離れており, 地域も異なるが, 何らかの関連を有している可能性も考えられる。

また, 13-06, -09, -15, -35 については, MLVA 法では 1 遺伝子座違い, PFGE 法および IS 法では, 2 バンド以内の相違で, 類似度も高かった。13-06, -15, -35 は同一地域で分離された株であるが, 分離時期は離れており, 13-09 と -15 は, 地域は異なるが近い時期に分離されている。これらの株は, 解析結果からは遺伝学的に近縁であることが推察されるため, 広域散在発生の可能性も考えられる。

その他, 13-21 と -22 は, PFGE タイプ, IS コード, MLVA リピート数のいずれも完全に一致しており, 分離時期も近いことから, 関連を有する可能性が高いと考えられた。

以上のことから, 3 法による EHEC O157 の解析結果はほぼ一致し, MLVA 法が PFGE 法および IS 法と同様に, 分子疫学解析法として有用であることが確認さ

れた。一方, PFGE パターンが完全に一致した場合でも MLVA 法ではリピート数に若干の相違が認められたことや, MLVA 法で 1 または 2 遺伝子座違いであっても, PFGE パターンが異なる場合も存在したことから, 結果の解釈は, 疫学情報等を加味し, 総合的に判断する必要があると考えられる。

IS 法については, 同一 IS コードで異なる PFGE パターンを示す株の存在が以前から報告されているが [8], 今回供試した菌株では, IS 法による分類結果は PFGE タイプによる分類と完全に一致し, IS 法が, PFGE 法に比べて迅速・簡便な分子疫学的解析法であることが確認された。また, 13-07, -08, -10 ~ -14, -16 のグループでは, すべての菌株に共通して, 1st プライマーセットの高分子量の位置に明瞭なエキストラバンドが認められた。2012 年に北海道で発生した O157 集団感染事例由来株は, IS 法においてエキストラバンドを有することが特徴であったことが報告されているが [9], 同様に, エキストラバンドも集団発生時には有用な情報となり得ることが示唆された。

本研究により, 当センターにおいても MLVA 法の有用性が確認され, PFGE 法, IS 法, MLVA 法の 3 法は同等の型別能を有していると考えられた。迅速性・簡便性に優れた IS 法と MLVA 法, 現在の標準法である PFGE 法の 3 法を必要に応じて併用することにより, 菌株間の関連性をより明確にすることが可能となると考える。

なお, この研究の一部は, 平成 25 年度厚生労働科学研究「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」において実施した。

謝 辞

MLVA 法についてご指導をいただきました国立感染症研究所細菌第一部第二室長 泉谷秀昌先生に深謝いたします。

文 献

- [1] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症 2014 年 4 月現在. 病原微生物検出情報. 2014;35(5):117-119.
- [2] 勢戸和子. *Escherichia coli*, STEC (志賀毒素産生性大腸菌). 仲西寿男, 丸山務監修. 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規出版; 2009. p. 281-296.
- [3] 田内敦子, 築地裕美, 佐多俊子, 児玉実, 石村勝之. 腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析結果の

- 比較. 広島市衛生研究所年報. 2013;32:40-44.
- [4] 榮井毅, 田邊純子, 橋田みさを, 大前壽子. 腸管出血性大腸菌 O157 に関する 3 種の遺伝子型別法の比較. 奈良県保健環境研究センター年報. 2009;44:45-48.
- [5] 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 三戸部治郎. 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 平成 15 年度総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業); 2004. p. 10-21.
- [6] Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol*. 2010;54:569-577.
- [7] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-2239.
- [8] 勢戸和子, 河野智美, 野村憲一, 平野隆, 小笠原準, 横田正春, 西海弘城, 黒川学, 川西伸也, 榮井毅, 他. 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究. 平成 19 年度総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業); 2008. p. 101-128.
- [9] 小嶋由香, 佐藤弘康, 池田徹也, 瀬戸順次, 鈴木裕, 小西典子, 齋木大, 松本裕子, 田辺純子, 他. 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. 病原微生物検出情報. 2013;34(5):127-128.