

資料

腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例における分子疫学的解析

秋田 裕子, 増田 加奈子, 平塚 貴大, 高尾 信一

Molecular Epidemiological Analysis in Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection

HIROKO AKITA, KANAKO MASUDA, TAKAHIRO HIRATSUKA and SHINICHI TAKAO

(Received September 29, 2016)

平成27年に当県で発生した腸管出血性大腸菌O26の集団感染疑い事例において、分離菌株のMLVA法による解析を実施し、さらに、PFGE法による解析結果と比較した。本事例関連の9株は、MLVA法では2遺伝子座以内の相違、PFGE法では1バンド以内の相違であり、いずれの結果からも関連する菌株の集団感染である可能性が高いと判断された。MLVA法とPFGE法は、同等の解析能力を有していたが、MLVA法の方が、PFGE法に比べて迅速性、簡便性に優れていることから、集団感染事例等の発生時における有用な分子疫学的解析法であると考えられた。

Key words : 腸管出血性大腸菌O26, MLVA法, パルスフィールドゲル電気泳動法

緒 言

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、ベロ毒素 (VT) を産生、またはVT遺伝子を保有するEHECの感染によって起こる全身性疾病で、主訴は腹痛、水溶性下痢、血便である。重症例では、溶血性尿毒症症候群 (HUS) を引き起こし、小児や高齢者では脳症などを併発して死に至ることがある [1, 2]。

EHEC感染症は、感染症法により三類感染症に指定され、診断した医師は保健所に全数届出を行うこととなっている。これにより、国内では毎年3,000~4,000の届出がされている [1]。全国の地方衛生研究所からの報告によると、EHEC全検出数におけるO血清群の割合は、2015年はO157が60.9% (1,040/1,709) と最も多く、次いでO26が21.2% (363/1,709) であった [1]。過去5年間の報告数をもみても、毎年O157が第1位、O26が第2位を占めており [3-7]、これらは、我が国で検出される腸管出血性大腸菌の主要な血清群である。

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り、近年、迅速性・簡便性に優れたMulti-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法が導入されている [8]。平成26年度より、国立感染症研究所においても、EHEC O157, O26, O111のDNA型別解析は、PFGE法に代わり17遺伝子座を対象としたMLVA法に変更された。当センターでも、平成26年度よりEHEC O157, O26, O111について、17遺伝子座を対象としたMLVA法による解析を導入している。

今回、平成27年に当県で発生したEHEC O26の集団感染疑い事例において、関連した菌株による集団感染であるかを明らかにするため、MLVA法による解析を行った。さらに、PFGE法による解析を併せて実施し、MLVA法と比較した。

材料および方法

1 供試菌株

平成27年7月中旬から9月中旬に、広島県内の保育所での集団感染疑い事例において分離されたEHEC O26を9株、および平成27年に県内で分離された、疫学情報からは本事例とは無関係と考えられるEHEC O26を2株用いた。

2 方法

(1) MLVA法

Izumiyaら[9]の方法に従い, O157-10を除いた17ヶ所のLocusについて解析した. すなわち, 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. 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. また, BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い, Minimum Spanning Tree解析を行った.

(2) PFGE法

国立感染症研究所の方法 [10] 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6V/cm, パルスタイム2.16-63.8秒, 14℃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.

結 果

1. 事例の概要

平成27年7月中旬以降から9月中旬にかけて, 県内の保育所で下痢, 腹痛, 発熱等の症状を示す患者の発生が続き, 園児6名, 家族3名からEHEC (O26 VT1) が検出された. 原因究明のため, 濃厚接触者等の検便を行い, 分離された菌株の分子疫学的解析を実施した.

2. MLVA法による解析結果

EHEC O26 11株のMLVA法による解析結果を表1, 解析結果を基に作製したMinimum Spanning Treeを図1に示した. MLVA法では, 集団感染事例関連のEHEC O26 9株のうち, 7株(菌株番号15-06, -14, -15, -17, -18, -19, -20)は17ヶ所の遺伝子座すべてでリピート数が完全に一致した. これに対し, 菌株番号15-12が1遺伝子座違い, 15-13が2遺伝子座違いであった. 一方, 本事例とは無関係の2株(15-04, -16)では, 3遺伝子座以上の相違がみられた.

表1 腸管出血性大腸菌O26の菌株の概要とMLVAリピート数

菌株番号	届出日	年齢	性別	疫学情報	血清型	毒素型	各遺伝子座のリピート数																
							O157-3	O157-9	O157-25	O157-34	EH157-12	EH111-11	EH111-8	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	EH26-7	EH111-14	EHC-6
15-06	7.16	4	男	園児	O26:H-	VT1	-2*	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-12	8.31	6	男	園児	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-13	9.7	1	男	園児	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	5	3	1	8
15-14	9.10	62	女	園児家族	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-15	9.11	1	男	園児	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-17	9.12	4	男	園児家族	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-18	9.12	1	女	園児	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-19	9.16	2	男	園児	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-20	9.17	25	女	園児家族	O26:H-	VT1	-2	11	2	1	2	2	1	11	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-04	6.23	62	男	散発事例	O26:H11	VT1	-2	-2	2	1	2	2	1	13	17	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2
15-16	9.3	15	女	散発事例	O26:H-	VT1	-2	10	2	1	2	2	1	8	14	-2	-2	1	-2	-2	2	1	-2

*2: 増幅なし
**太字: Single locus variant

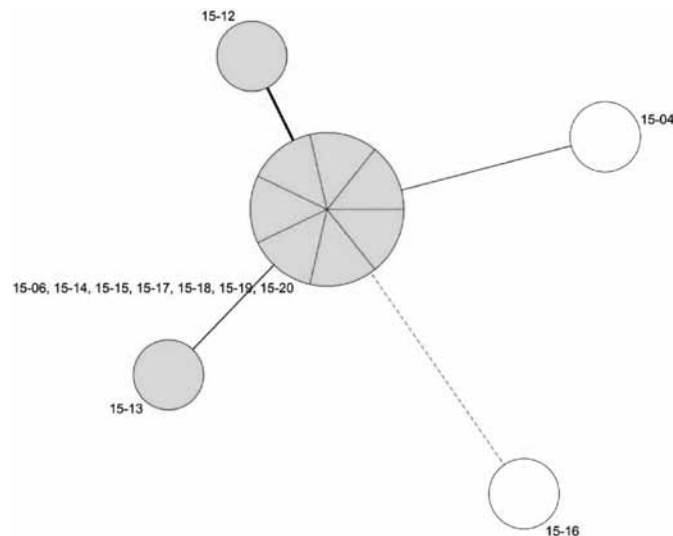


図1 腸管出血性大腸菌O26のMLVA Minimum Spanning Tree
Minimum Spanning Treeの円の大きさは株数に基づき, 距離は変異の割合を反映している.

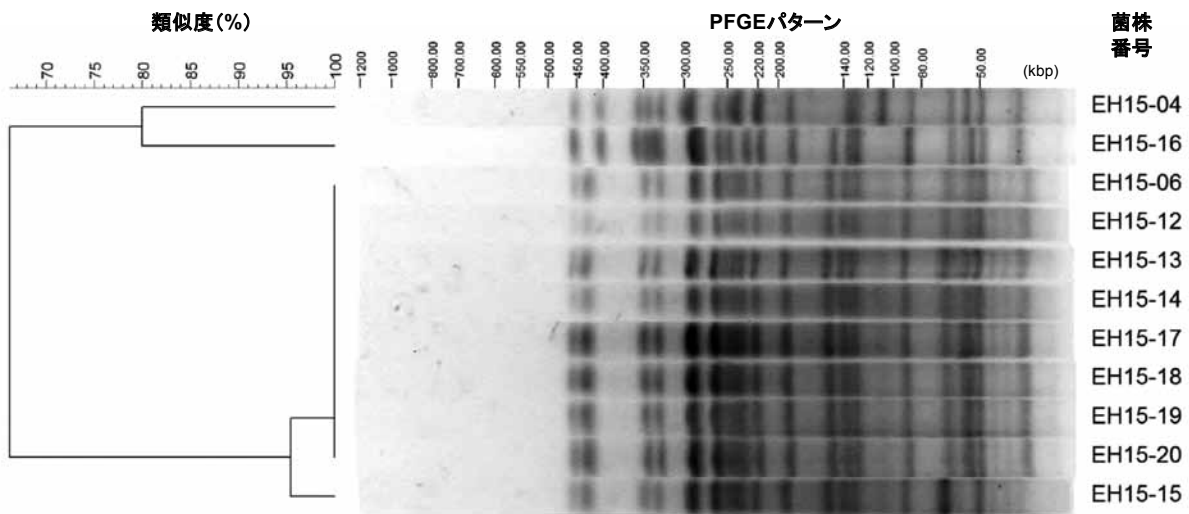


図2 腸管出血性大腸菌O26のPFGE法による解析結果

3. PFGE法による解析結果

EHEC O26 11株のPFGE法による解析結果を図2に示した。集団感染事例関連のEHEC O26 9株のうち8株 (15-06, -12, -13, -14, -17, -18, -19, -20) はバンドパターンが完全に一致し、残り1株 (15-15) は1バンドのみの相違であった。また、事例とは無関係の2株 (15-04, -16) のバンドの相違数は、7以上であった (図2)。

考 察

県内で発生した集団感染疑い事例において分離されたEHEC O26 9株、事例とは無関係の2株、合計11株についてMLVA法およびPFGE法により解析した。

国立感染症研究所の示した分類では、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 (DLV) は関係する可能性がある、3以上は不一致と解釈することとされている。一方、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、7以上は不一致と解釈する [11]。今回の集団感染事例関連株は、MLVA法では、9株のうち7株が完全に一致し、残り2株も2遺伝子座以内の相違であったことから、関係する可能性が高いと判定され、分子疫学的観点からも集団感染事例であることが裏付けられた。一方、本事例とは無関係の2株は、3遺伝子座以上の相違で、不一致と解釈された。

また、PFGE法においても、これら9株は1バンド以内の相違であり、MLVA法と同様に、集団感染を示唆する結果が得られた。

MLVA法およびPFGE法による解析結果より、本事例はEHEC O26を原因とした集団感染であると判断された。

MLVA法とPFGE法を操作性・迅速性の面から比較すると、MLVA法は、菌株を入手して1～2日で結果が得られ、操作も簡便であった。また、本事例では、菌株が分離される度に搬入されたため、その都度菌株の関連性を調べる必要があったが、MLVA法では、個別に迅速な対応が可能であった。一方、PFGE法は結果を出すまでに3～4日を要し、また、個別での実施が困難なため、MLVA法に比べて迅速性に欠けた。当県では、一昨年度よりMLVA法を用いているが、進行中の事案に対応した例は今回が初めてであり、その有用性を確認できた。一方、本事例において、MLVA法では、最初に搬入された3株を比較した時点で1～3遺伝子座での相違がみられたため、どの株を基準とするかにより、DLV以内か否かの判断が異なるという問題点があった。解析能力については、MLVA法とPFGE法のいずれからでも9株すべてが関係している可能性が高いという結果が得られ、同等の解析能力を有していると考えられた。しかしながら、9株すべてが完全一致ではなく、MLVA法では一致したが、PFGE法では若干の相違がみられた株、またその逆も存在したため、解析方法によって、結果の相違を生じる可能性があると考えられた。そのため、結果の解釈には、疫学情報を加味した総合的な判断が必要であると考えられる。

EHEC感染症集団発生のうち、2015年に報告された菌陽性者10名以上の12事例中7事例が保育施設における人から人への感染によるものと推定されており [1]、その他飲食店等を原因とした集団感染も発生していることから、このような集団感染事例発生時には、MLVA法が集団感染の根拠となる科学的データを示すために、有用な手段となり得ると考えられる。

結 語

本県で発生したEHEC O26集団感染疑い事例において、MLVA法およびPFGE法による解析により、集団感染の根拠となるデータを示した。特に、MLVA法は、PFGE法に比べ、迅速性、簡便性に優れていたことから、事案発生時の迅速な対応に非常に有用であった。

なお、この研究の一部は、平成27年度厚生労働科学研究「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化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2016年4月現在. 病原微生物検出情報. 2016;37(5):85-88.
- [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] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2015年4月現在. 病原微生物検出情報. 2015;36(5):73-74.
- [4] 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):117-118.
- [5] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2013年4月現在. 病原微生物検出情報. 2013;34(5):123-124.
- [6] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2012年4月現在. 病原微生物検出情報. 2012;33(5):115-116.
- [7] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2011年4月現在. 病原微生物検出情報. 2011;35(5):125-126.
- [8] 高橋雅輝, 岩渕香織, 山中拓哉, 高橋知子, 齋藤幸一. Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysisによる腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26遺伝子型別法の検討. 岩手県環境保健研究センター年報第11号. 2011;11:67-69.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.