

資料

腸管出血性大腸菌 O157, O26 および O111 の分子疫学的解析法の比較

山田 裕子, 増田 加奈子, 高尾 信一

Comparison of Molecular Epidemiological Analysis Methods for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O26, and O111

HIROKO YAMADA, KANAKO MASUDA, and SHINICHI TAKAO

(Received October 9, 2015)

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 32株, O26 15株, O111 18株を, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法, IS-printing System (IS) 法, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法により解析した. 疫学的関連の推察される菌株間では, PFGE法, MLVA法ともに, 密接に関係していると解釈された. 一方, 疫学情報では関連は不明な菌株間で, MLVA法では不一致, PFGE法では関係有と解釈される結果が得られた事例が存在し, MLVA法の方がより正確に遺伝学的差異を識別可能な場合もあると考えられた. IS法は, 2法に比べて解析能力がやや劣る結果であった. MLVA法は, PFGE法に比べ, 短時間で結果が得られ, データの比較が容易であるため, 迅速な分子疫学的解析法として有用であることが示された.

Key words : 腸管出血性大腸菌O157, O26, O111, 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, 診断した医師は保健所に全数届出を行う. これにより, 毎年3,000~4,000の届出がされている [1]. 患者の主症状は激しい血便と腹痛で, 重症例では溶血性尿毒症症候群 (HUS) を引き起こし, 脳症などを併発して死に至ることもある [2]. 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, 2014年はO157が最も多く, 59.2% (1,355/2,289) を占め, 次いでO26が21.9% (502/2,289), O111が5位で34% (78/2,289) であった [1]. 過去5年間 (2009~2013年) の報告数をみると, 毎年O157が第1位, O26が第2位を占め, O111が3位または4位であったことから [3-7], これら3群は, 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と言える.

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, 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IS-printing system (IS) 法やMulti-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法が導入されている. 平成26年度からは, 国立感染症研究所におけるEHEC O157, O26, O111のDNA型別解析がPFGE法から17遺伝子座を対象としたMLVA法に変更された. 今回, 当センターにおいても, 新たに17遺伝子座を対象としたMLVA法による解析を導入し, 県内で分離されたEHEC O157, O26, O111について, これまで実施しているPFGE法, IS法 (O157のみ) に加え, MLVA法による解析を実施し, 疫学的解析法としての有用性を比較した.

材料および方法

1 供試菌株

広島県内で分離され, 当センターへ搬入されたEHEC O157 32株 (2013~14年), O26 15株 (2013~14年), O111 18株 (2000~13年) を用いた. 各菌株および患者の概要を表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7地域をA~Gとした.

表1 供試菌株および患者の概要

菌株番号	届出年月日	地域	年齢	性別	血清型	毒素型	疫学情報
13-01	2013/ 1/12	A	63	女	O157:H7	VT1,2	
13-02	2013/ 1/17	A	41	女	O157:H7	VT1,2	13-01の家族
13-03	2013/ 1/16	A	11	男	O157:H7	VT1,2	13-01の家族
13-04	2013/ 1/16	A	14	男	O157:H7	VT1,2	13-01の家族
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	
14-06	2014/ 7/ 8	A	2	男	O157:H7	VT1,2	
14-08	2014/ 7/22	A	80	女	O157:H-	VT1,2	
14-09	2014/ 7/24	D	22	男	O157:H7	VT1,2	
14-10	2014/ 7/28	D	16	男	O157:H7	VT1,2	
14-12	2014/ 7/30	A	28	男	O157:H7	VT2	
14-14	2014/ 8/ 8	A	75	女	O157:H7	VT2	
14-15	2014/ 8/21	A	31	女	O157:H7	VT2	
14-16	2014/ 8/30	A	72	男	O157:H7	VT1,2	
14-21	2014/10/ 3	E	82	女	O157:H7	VT2	
13-17	2013/ 7/11	F	28	女	O26:H11	VT1	
13-18	2013/ 7/11	F	37	女	O26:H11	VT1	
13-23	2013/ 8/10	A	5	男	O26:H11	VT1	
13-24	2013/ 8/14	A	29	女	O26:H11	VT1	13-23の家族
13-25	2013/ 8/14	A	1	女	O26:H11	VT1	13-23の家族
13-26	2013/ 8/20	A	3	男	O26:H11	VT1	
13-27	2013/ 8/23	A	27	女	O26:H11	VT1	13-26の家族
13-31	2013/ 8/28	A	1	女	O26:H11	VT1	13-26の家族
14-07	2014/ 7/22	F	27	女	O26:H11	VT1	
14-11	2014/ 8/ 4	F	22	男	O26:H11	VT1	
14-13	2014/ 8/14	F	17	女	O26:H11	VT1	
14-17	2014/ 9/20	D	2	男	O26:H11	VT1	
14-18	2014/ 9/ 9	D	34	女	O26:H11	VT1	14-17の家族
14-19	2014/ 9/ 9	D	8	男	O26:H11	VT1	14-17の家族
14-20	2014/ 9/12	D	5	女	O26:H11	VT1	14-17の家族
00-9	2000/ 6/22	C	6	女	O111:H-	VT1,2	
00-23	2000/ 8/ 3	C	4	男	O111:H-	VT1	
00-28	2000/ 8/19	F	1	女	O111:H-	VT1,2	
00-29	2000/ 8/25	F	6	女	O111:H-	VT1,2	00-28の家族
00-33	2000/ 8/24	A	8	男	O111:H-	VT1,2	
00-34	2000/ 8/27	A	36	女	O111:H-	VT1,2	00-33の家族
01-8	2001/ 5/11	F	2	女	O111:H-	VT1,2	
02-8	2002/ 5/15	G	2	男	O111:H-	VT1,2	
05-32	2005/ 8/30	F	1	女	O111:H-	VT1	
08-8	2008/ 5/20	C	23	男	O111:HUT	VT1	
08-21	2008/ 7/23	F	21	男	O111:HUT	VT1,2	
08-62	2008/10/ 1	D	2	女	O111:H-	VT1,2	
08-64	2008/10/ 6	D	66	女	O111:H-	VT1,2	08-62の家族
09-9	2009/ 5/14	F	3	女	O111:HUT	VT1,2	
09-40	2009/ 9/ 1	F	4	男	O111:HUT	VT1	
09-42	2009/ 9/ 6	F	5	男	O111:HUT	VT1	09-40の家族
13-28	2013/ 9/ 6	E	36	女	O111:H-	VT1	
13-38	2013/10/31	A	9	男	O111:H-	VT1,2	

2 方法

(1) PFGE法

国立感染症研究所の方法 [8] 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℃ 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。バンドパターンの相違数が 3 以内を同一クラスターとして分類した。

(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 [9] の方法に従い、O157-10 を除いた 17 ケ所の 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。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 Locus 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。また、リピート数の相違が 1 遺伝子座以内 [Single locus variant (SLV)] を同一コンプレックスとして分類した。

結 果

1. EHEC O157の解析結果

(1) PFGE法

2013 から 2014 年に県内で分離された EHEC O157 32 株は、PFGE 法により 20 パターンに型別され、5 つのクラスターを形成した (図 1)。接触者、同一家族等の菌株

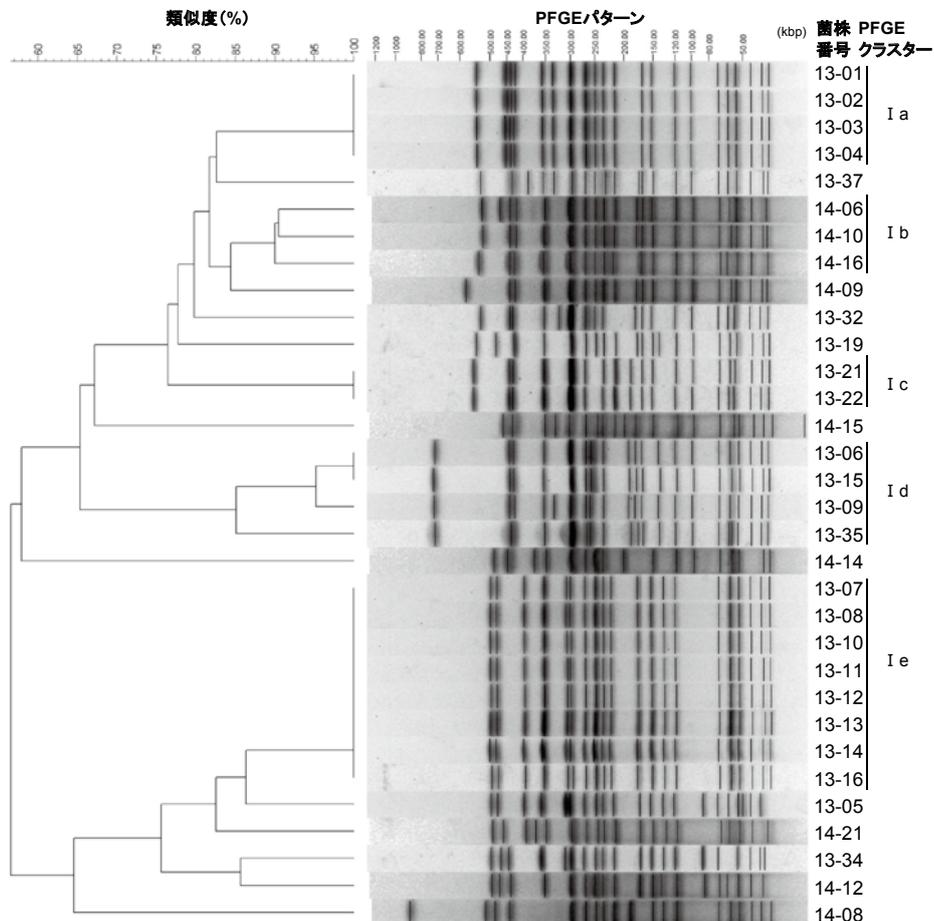


図 1 EHEC O157のPFGEクラスター

表2 EHEC O157のMLVA, ISおよびPFGE法による解析結果

菌株番号	MLVA リピート数													MLVA コンプレックス	ISコード		PFGE クラスター			
	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	1st
13-01	12	9	4	11	4	2	1	5	4	17	7	4	9	6	-2	-2	-2			
13-02	13*	9	4	11	4	2	1	5	4	17	7	4	9	6	-2	-2	-2	I A	717577	611557
13-03	12	9	4	11	4	2	1	5	4	17	7	4	9	6	-2	-2	-2			
13-04	12	9	4	11	4	2	1	5	4	17	7	4	9	6	-2	-2	-2			
13-05	16	11	4	9	6	2	1	5	4	-2	6	6	5	7	-2	-2	-2		105457	311252
13-06	10	12	3	11	4	2	1	6	4	2	7	7	10	8	-2	-2	-2		717577	211657
13-15	10	12	3	11	4	2	1	6	4	2	7	7	11	8	-2	-2	-2	I B	717575	211657
13-09	10	12	3	11	4	2	1	6	4	2	7	7	11	8	-2	-2	-2		717555	211657
13-35	10	12	3	11	4	2	1	6	4	2	7	7	11	8	-2	-2	-2			
13-07	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-08	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-10	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-11	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2	I C	341057	310652
13-12	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-13	19	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-14	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-16	18	9	3	9	6	2	1	4	5	-2	5	8	-2	8	-2	-2	-2			
13-19	11	11	8	12	4	2	1	5	4	11	7	6	3	5	-2	-2	9		717577	611657
13-21	10	13	8	12	4	2	1	5	5	-2	8	6	3	5	-2	-2	-2	I D	717555	611657
13-22	10	13	8	12	4	2	1	5	5	-2	8	6	3	5	-2	-2	-2			
13-32	14	9	5	9	6	2	1	10	5	-2	4	7	6	7	-2	-2	-2		305457	611242
13-34	10	14	3	11	4	2	1	6	4	2	7	7	10	8	-2	-2	-2		717557	611657
13-37	12	9	4	11	4	2	1	5	4	7	6	4	9	6	-2	-2	-2		717557	631557
14-06	10	12	6	12	4	2	1	5	5	2	7	6	3	5	-2	-2	11		717577	611657
14-08	10	14	7	9	4	2	1	9	5	-2	4	10	4	3	-2	-2	-2		311057	310457
14-09	12	9	5	12	4	2	1	6	4	10	6	6	12	7	-2	-2	-2		717557	611657
14-10	13	12	5	11	4	2	1	5	4	-2	10	6	14	7	-2	-2	-2		707557	611657
14-12	9	20	4	9	6	2	1	12	4	-2	4	7	10	6	-2	-2	-2		245457	611242
14-14	4	-2	3	9	4	2	1	12	5	-2	5	7	6	5	-2	-2	-2		012057	214442
14-15	7	8	3	9	1	2	1	7	5	2	3	5	7	6	-2	-2	-2		114057	303443
14-16	13	11	5	13	5	2	1	6	4	-2	6	6	5	7	-2	-2	-2		317577	211757
14-21	14	10	4	9	6	2	1	3	5	-2	7	8	-2	9	-2	-2	-2		345457	311652

*太字はsingle locus variantを示す

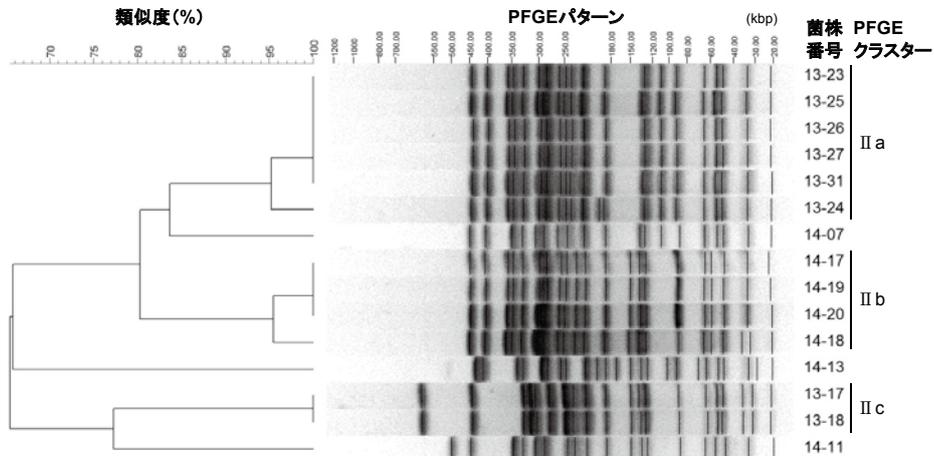


図2 EHEC O26のPFGEクラスター

間では、13-01～-04の4株（クラスター I a）および13-07/-08/-10～-14/-16の8株（I e）はPFGEパターンが完全に一致した。一方、疫学情報では関連が不明な13-06, -09, -15, -35（I d）、13-21, -22（I c）及び14-06, -10, -16（Ib）は3バンド以内の相違で、類似度85%以内の同一クラスターに分類された（図1）。

(2) IS法

EHEC O157 32株は、疫学情報から関連のある13-01～04の4株、13-07/-08/-10～-14/-16の8株は同一のISコードを示した（表2）。また、疫学情報からは関連が不明な13-19と14-06、13-21と-22および13-34と14-09のISコードが一致した。

(3) MLVA法

EHEC O157 32株は、4種類のMLVA コンプレックスを形成した。疫学情報から関連のある13-01～04の4株（コンプレックス I A）、13-07/-08/-10～-14/-16の8株（I C）は17ヶ所の遺伝子座のうちリピート数の相違が1（SLV）以内であり、疫学情報からは関連が不明な13-06, -09, -15, -35（I B）、13-21, -22（I D）がSLV以内の同一コンプレックスに分類された。

2. EHEC O26の解析結果

(1) PFGE法

2013年から2014年に分離されたEHEC O26 15株は、

表3 EHEC O26のMLVAおよびPFGE法による解析結果

菌株番号	MLVA リピート数															MLVA コンプレックス	PFGE クラスター		
	O157	O157	O157	O157	EH157	EH111	EH111	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157	O157	O157	O157	EH26			EH111	EHC-6
13-17	-2	9	2	1	2	2	1	7	12	7	-2	1	-2	-2	4	1	-2	II A	II c
13-18	-2	9	2	1	2	2	1	7	12	7	-2	1	-2	-2	4	1	-2		
13-23	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
13-24	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
13-25	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	II B	II a
13-26	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
13-27	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
13-31	-2	9	2	1	2	2	1	9	16	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
14-07	-2	8	2	1	2	2	1	12	14	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2		
14-11	-2	10	2	1	2	2	1	8	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	8	II C	II b
14-13	-2	11	2	1	2	2	1	12	15	2	-2	1	-2	2	3	1	17		
14-17	-2	11	2	1	2	2	1	8	15	14	-2	1	-2	-2	2	1	-2		
14-18	-2	11	2	1	2	2	1	8	15	-2*	-2	1	-2	-2	2	1	-2		
14-19	-2	11	2	1	2	2	1	8	15	14	-2	1	-2	-2	2	1	-2		
14-20	-2	11	2	1	2	2	1	8	15	14	-2	1	-2	-2	2	1	-2		

*太字はsingle locus variantを示す

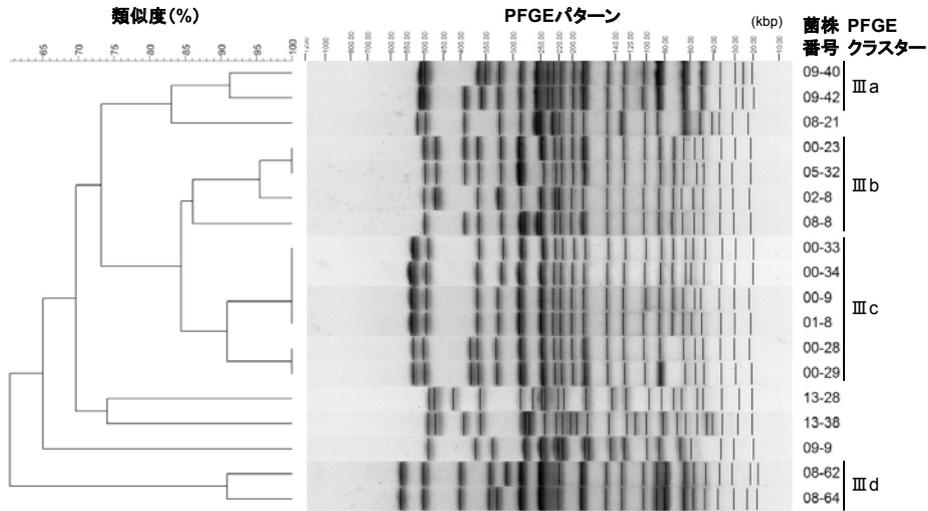


図3 EHEC O111のPFGEクラスター

表4 EHEC O111のMLVAおよびPFGE法による解析結果

菌株番号	MLVA リピート数															MLVA コンプレックス	PFGE クラスター	
	O157	O157	O157	O157	EH157	EH111	EH111	EHC-	EHC-	EHC-	O157	O157	O157	O157	EH26			EH111
00-9	-2	8	2	3	2	4	5	7	9	-2	-2	1	-2	9	-2	1	3	III c
00-23	-2	14	2	3	2	4	5	12	9	-2	-2	1	-2	5	-2	1	3	
00-28	-2	12	2	3	2	4	5	8	8	-2	-2	1	-2	-2	-2	1	3	III A
00-29	-2	11*	2	3	2	4	5	8	8	-2	-2	1	-2	-2	-2	1	3	
00-33	-2	10	2	3	2	4	5	11	9	-2	-2	1	-2	8	-2	1	3	
00-34	-2	10	2	3	2	4	5	11	9	-2	-2	1	-2	8	-2	1	3	III B
01-8	-2	8	2	3	2	4	5	11	8	-2	-2	1	-2	8	-2	1	3	
02-8	-2	12	2	3	2	4	5	14	9	2	-2	1	-2	12	-2	1	3	III b
05-32	-2	13	2	3	2	5	5	13	9	7	-2	1	-2	12	-2	1	3	
08-8	-2	14	2	3	2	4	5	16	9	-2	-2	1	-2	10	-2	1	3	
08-21	-2	10	2	3	2	4	5	10	8	-2	-2	1	-2	10	-2	1	3	
08-62	-2	13	2	3	2	4	5	10	10	9	-2	1	-2	10	-2	1	3	III C
08-64	-2	13	2	3	2	4	5	10	10	9	-2	1	-2	10	-2	1	3	
09-9	-2	6	2	3	2	3	9	9	11	10	-2	1	-2	11	-2	1	6	
09-40	-2	12	2	3	2	4	5	13	9	9	-2	1	-2	6	-2	1	3	III D
09-42	-2	12	2	3	2	4	5	13	9	9	-2	1	-2	6	-2	1	3	
13-28	-2	9	2	3	2	3	13	9	18	-2	-2	1	-2	9	-2	1	3	
13-38	-2	10	2	3	2	4	5	22	10	-2	-2	1	-2	10	-2	1	3	

*太字はsingle locus variantを示す

PFGE法により8パターンに型別され、3つのクラスターを形成した(図2)。同一家族由来の菌株間では、13-23/-24/-25の3株は1バンド以内の相違で、類似度95.2%の同一クラスター(II a)、13-26/-27/-31の3株

はパターンが一致(II a)、14-17~20の4株は1バンド以内の相違で、類似度95.5%の同一クラスター(II b)に分類された。一方、13-23~25と13-26/-27/-31は異なる家族であるが、PFGEパターンが完全に一致した(II

a). また, 13-17, -18は疫学情報からは関連は不明であるが, PFGEパターンが一致した (II c).

(2) MLVA法

EHEC O26 15株は, MLVA法により3つのコンプレックスを形成した (表3). 家族内事例 (13-23~25, 13-26/-27/-31, 14-17~-20) では, それぞれ菌株間のリピート数の相違が1遺伝子座以内 (SLV) であり, 同一コンプレックスに分類された (II B). また, PFGE法での結果と同様に, 13-23~-25と13-26/-27/-31は異なる家族であるが, すべての遺伝子座でリピート数が一致し (II B), 疫学的関連が不明の13-17, -18も完全に一致した (II A).

3. EHEC O111の解析結果

(1) PFGE法

2000年から2013年に分離されたEHEC O111 18株は, PFGE法により13パターンに型別され, 4つのクラスターを形成した (図3). 家族内事例では, 00-28/-29 (III c) および00-33/-34 (III c) はPFGEパターンが一致, 09-40/-42は2バンドの相違で類似度91.3% (III a), 08-62/08-64は2バンドの相違で類似度90.9% (III d) の同一クラスターに含まれた. また, 疫学情報からは関連が不明な株については, 00-23, 02-8, 05-32, 08-8が3バンド以内の相違で類似度86.1%の同一クラスター (III b), 00-9, 00-28/-29, 00-33/-34, 01-8が2バンド以内の相違で類似度90.9%の同一クラスター (III c) に分類された.

(2) MLVA法

EHEC O111 18株は, 4種類のコンプレックスを形成した (表4). 家族内事例の00-28/-29 (III A), 00-33/-34 (III B), 08-62/08-64 (III C), 09-40/-42 (III D) は, それぞれSLV以内の同一コンプレックスに分類された. その他, 疫学的関連は不明の菌株間では, 00-33/-34と01-8がリピート数の相違が2遺伝子座 [Double locus variant (DLV)] の関係であったが, その他の菌株では関連は認められなかった.

考 察

広島県内で分離されたEHEC O157 32株, O26 15株, O111 18株をPFGE法およびMLVA法により解析した. O157については, IS法を加えた3法により解析した.

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, 7以上は不一致と解釈し [10], 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. 2013~14年に県内で分離されたEHEC O157 32株は, 疫学情報から関連の認められる菌株間 (13-01~-04,

13-07/-08/-10~-14/-16) はPFGE法およびIS法による解析結果は完全に一致し, MLVA法においてもSLV以内の相違で, 密接に関係していると解釈され, 分子疫学的にも, 集団発生の一部であることが示された. 一方, 疫学情報からは関連が不明な菌株間では, 13-06, -09, -15, -35は, PFGE法では3バンド以内で, MLVA法ではSLV以内, IS法では2バンド以内の相違であった. 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, -15は, 地域は異なるが近い時期に分離されている. 13-06, -09, -15, -35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. 次に, 13-21, -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. また, 14-06, -10, -16はPFGE法では3バンド以内の相違で密接に関係していると解釈される結果であったが, IS法およびMLVA法では分子疫学的にも不一致という結果であった. これらの株は分離地域や時期も異なることから, 疫学的関連を有する可能性は低いと考えられる. また, IS法の結果では, 疫学情報からは関連が不明の菌株間 (13-19, 14-06および13-34, 14-09) でISコードが一致したが, これらは, PFGE法およびMLVA法では不一致という結果であったため, 関係性は低いと考えられる.

EHEC O26については, 2013~14年の2年間に分離された15株をPFGE法, MLVA法により解析した. その結果, 同一家族由来の菌株間 (13-23~25, 13-26/-27/-31, 14-17~-20) では, PFGE法ではそれぞれ1バンド以内の相違で類似度も95%以上と高い値であり, MLVA法においてもSLV以内であった. したがって, 密接に関係していると解釈され, 分子疫学的にも, 分離菌株はそれぞれ関係があることが示された. また, 疫学情報からは関連が不明な株について, 13-23/-25と13-26/-27/-31は異なる家族由来であるが, PFGEパターンが一致し, MLVA法でもSLV以内の同一グループに分類された. これらの菌株は同地域で近い時期に分離されていることから, 関係する可能性が示唆された. また, 疫学的関連が不明の13-17, -18についても, PFGEパターン, MLVAリピート数が完全に一致しており, 同時期に同地域で分離されていることから, 関連している可能性が高いと考えられた.

EHEC O111については, 2000~13年の14年間に分離された18株について, PFGE法, MLVA法により解析を行った. 家族内事例 (00-28/-29, 00-33/-34, 08-62/-64, 09-40/-42) では, PFGE法では2バンド以内の相違で類似度は90%以上, MLVA法においてはそれぞれSLV以内であったことから, これらの菌株はそれぞれ密接に関係していることが示された. 一方, 疫学情報から

は関連が不明の00-23, 02-8, 05-32, 08-8は、PFGE法において、関係があると解釈される3バンド以内の相違であったが、MLVA法では不一致であった。これらの株は分離時期が2年以上離れており、地域も異なることから、疫学的関連を有する可能性は低いと考えられる。さらに、00-9, 00-28/-29, 00-33/-34, 01-8はPFGEパターンが2バンド以内の相違であり、00-28/-29と00-33/-34については、分離時期が近いこと、関連を有する可能性も示唆される。また、00-33/-34と01-8はMLVA法においてもDLVの関係であったことから、遺伝学的には近縁であると考えられるが、分離時期や地域は離れており、関連は不明である。

PFGE法とMLVA法の2法を比較すると、今回の結果では、同一家族や接触者由来の菌株間ではすべて、密接に関係していると解釈される結果が得られたことから、疫学的関連が推察されるグループ内では、2法は同等の解析能力を有していると考えられた。一方、関連を有する可能性が低い菌株間で、EHEC O157およびO111ではPFGEパターンの相違が3バンド以内であったが、MLVA法においては関係が示唆される事例が存在した。それに対し、MLVA法においてSLV以内の株では、PFGE法でも2バンド以内の相違で関係があると解釈される結果が得られ、疫学情報ともほぼ一致した。PFGE法は分子疫学的解析法の標準法であるが、今回の結果では、MLVA法の方が、より正確に遺伝学的差異を識別可能な場合もあると考えられた。分子疫学的解析を行う際には、疫学情報を十分考慮することが重要であり、必要に応じて、PFGE法とMLVA法を組み合わせることにより、より正確な判定をすることが可能であると考えられる。また、EHEC O157については、IS法も加えて3法での比較を行ったところ、IS法では、疫学情報からは関連が不明で、PFGE法およびMLVA法では不一致と解釈される菌株間でISコードが一致する事例が2例みられた。これらの菌株が関連を有する可能性は低いと考えられ、今回の結果からは、IS法は、2法に比べて解析能力がやや劣ると考えられた。

本研究により、当センターにおいてもEHEC O157, O26, O111に対するMLVA法の有用性が確認された。MLVA法は、PFGE法に比べ、短時間で結果が得られ、データを数値化できるため、結果の比較が容易であった。したがって、MLVA法を実施している施設間でのデータ共有が可能であり、広域発生事例を探知する上で優れていると考えられる。IS法が現段階ではEHEC O157に限定されるのに対し、MLVA法は、EHECの主要な3血清群を対象としていることから、迅速・簡便で有用な分子疫学的解析法であると考えられた。

なお、この研究の一部は、平成26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2015年4月現在. 病原微生物検出情報. 2015;36(5):73-74.
- [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2014年4月現在. 病原微生物検出情報. 2014;35(5):117-118.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2010年4月現在. 病原微生物検出情報. 2010;31(5):152-153.
- [8] 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.
- [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] 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.