

資料

学生寮で発生した腸管出血性大腸菌O26集団感染事例の分子疫学解析

東久保 唯, 平塚 貴大, 秋田 裕子

Molecular Epidemiological Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 isolated from an Outbreak Case in a Student Dormitory

TOKUBO Yui, HIRATSUKA Takahiro, and AKITA Hiroko

(Received: October 13, 2023)

2022年に県内の学生寮で発生した腸管出血性大腸菌O26集団感染事例から分離された16株について、血清型別検査に加えて分子疫学解析手法であるMLVA法、PFGE法及びSNPs解析を実施した。分離された菌株は、血清型別検査では1株のみH抗原の表現型が異なったが、遺伝子型はすべての株で一致した。MLVA法による解析では16株中15株が同一集団事例関連株と判断可能な2遺伝子座以内の相違であったが、1株の結果が3遺伝子座の相違となり、判断の基準を超えた。この理由として、伝播の過程でプラスミドを獲得したことが考えられた。一方、PFGE法では、すべての株でバンドパターンの差異が1バンド以内であった。SNPs解析では、すべての株間の変異差は1塩基以内であった。今回比較した分子疫学解析では、3つの解析結果にわずかな差が確認されたものの、いずれの手法も同一集団事例の判断に有用な手法であることが示された。

Key words : 腸管出血性大腸菌, MLVA法, PFGE法, SNPs解析, 分子疫学解析

結 言

腸管出血性大腸菌感染症とは、ベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌を原因とする感染症である。臨床症状として腹痛、発熱、下痢、血便などがあり、溶血性尿毒症症候群（HUS）を引き起こすと、重篤な後遺症を残したり、死亡する可能性もある。主な感染経路は経口感染で、食品を介した食中毒や、汚染された環境を介して集団感染を起こす場合がある。これらの感染源を解明するためには、菌株レベルで遺伝子を解析する分子疫学解析が重要である。腸管出血性大腸菌の主要な血清群として、O157, O26, O111などが挙げられる。2022年に県内で最も発生届の多かった血清群はO26であり、その中には、学生寮で発生した集団感染事例と1件の家族内感染事例が含まれていた。今回、学生寮で発生した集団感染事例におけるO26の菌株について株間の分子疫学的関連性を明らかにするため、Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) 法、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法及び

全ゲノムを利用したSingle-Nucleotide Polymorphism (SNPs) 解析を行ったので概要を報告する。

方 法

1 供試菌株

2022年の5月下旬から6月初旬にかけて県内の学生寮で発生した集団感染事例で患者から分離され、当所へ搬入された腸管出血性大腸菌O26 16株(菌株番号22-01~15, 17)を用いた。

2 血清型別検査

分離された16株の血清型別を実施した。O血清型別用の試験液には、BHI斜面培地で純培養した各菌株を生理食塩水に濃厚に懸濁し、121℃で30分の高圧蒸気滅菌後、900×gで20分遠心した沈査を滅菌生理食塩水で再懸濁したものを使用した。H血清型別用の試験液作成のために、BHI斜面培地で純培養した各菌株を0.2% TSA培地の端に接種し一晩培養後、反対の端まで遊走した部分を白金耳で釣菌し、TSB培地に接種した。

一晚培養後、最終濃度が0.5%となるようホルマリン加生理食塩水液を加えて固定し、試験液として使用した。

型別には病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を使用し、添付資料に従い検査を実施した。

また、H型についてはHg11のみ、遺伝子型別も実施した。型別用プライマーは病原体検出マニュアル(腸管出血性大腸菌)に記載のHg検出用プライマーを使用した。DNAテンプレートとして、BHI斜面培地で純培養した各菌株を500 µLの滅菌蒸留水に懸濁し、95°C5分加熱後、13000 rpmで2分遠心したものの上清を使用した。PCR試薬にはEx Taq HS (TaKaRa)を使用した。各プライマーの最終濃度が0.2 µMとなるよう試薬を調整し、98°C/1分後に98°C/10分、65°C/30秒、72°C/30秒の反応を35回繰り返し、72°C/10分で後伸長を行った。PCR産物の有無をアガロースゲル電気泳動によって確認した。

3 MLVA法

MLVAハンドブック[1]の方法に従い、O157-10を除いた17ヶ所の遺伝子座について、型別時と同様の方法で作成したDNAテンプレートをを用いて解析した。QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて各菌株で2セットのPCR反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び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リピート数を「-2」とした。また、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用いMinimum Spanning Tree (MST) 解析を行った。

4 PFGE法

国立感染症研究所の方法[2]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°Cの条件で18時間行った。バンドパターンは、BioNumerics Ver.6.6 を用いてDice 及び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。

5 SNPs解析

分離された菌株からPowerBead tubes, glass 0.5mm (QIAGEN) によるビーズ破砕後にQIAamp DNA

Mini Kit (QIAGEN) によってDNAを抽出し、QIAseq FX DNA Library CDI Kit (QIAGEN) を使用してライブラリを作成した。iSeq 100 system (Illumina) を使用し、150bpのペアエンドシーケンスを実施した。得られたリードデータについてfastp [3] (ver. 0.23.2) によるクオリティコントロールを実施後、BactSNP (ver. 1.1.0, <http://platanus.bio.titech.ac.jp/bactsnp>) を使用してコアSNPsを抽出し、シュードゲノムを作成した。参照配列として、National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した腸管出血性大腸菌のゲノムデータ(アクセッション番号 AP018808) を使用した。作成したシュードゲノムから組み換え領域をGubbins [4] (ver. 3.1.6) によって除去し、popart (ver. 1.7, <https://popart.maths.otago.ac.nz/>) を使用してmedian-Joining法によるネットワーク図を作成した。

結 果

1 血清型別検査

血清型別の結果を表1に示した。22-10を除く15株はO26:H11と型別された。22-10は0.2%TSA培地中で遊走がみられなかったため、O26:H-と判定した。遺伝子の保有状況を確認するため、Hg11型別PCRを実施した結果、22-10を含むすべての株がHg11に型別された。

表1 本事例で分離された腸管出血性大腸菌の性状

菌株番号	血清型		毒素型
	表現型	遺伝子型 (H型のみ)	
22-01	O26:H11	Hg11	VT1
22-02	O26:H11	Hg11	VT1
22-03	O26:H11	Hg11	VT1
22-04	O26:H11	Hg11	VT1
22-05	O26:H11	Hg11	VT1
22-06	O26:H11	Hg11	VT1
22-07	O26:H11	Hg11	VT1
22-08	O26:H11	Hg11	VT1
22-09	O26:H11	Hg11	VT1
22-10	O26:H-	Hg11	VT1
22-11	O26:H11	Hg11	VT1
22-12	O26:H11	Hg11	VT1
22-13	O26:H11	Hg11	VT1
22-14	O26:H11	Hg11	VT1
22-15	O26:H11	Hg11	VT1
22-17	O26:H11	Hg11	VT1

2 MLVA法

MLVA法によって解析を行った菌株の各遺伝子座のリピート数及びMLVA型を表2に示した. 16株中22-03, 17以外の14株は, すべての遺伝子座のリピート数が一致し, 13m2214であった. 一方で, 22-03は3か所, 22-17 は1か所の遺伝子座にリピート数の違いがみられた. 22-03は17遺伝子座のうち, 3か所の遺伝子座 (EHC-2, O157-37, EHC-6) でリピート数が異なっており, MLVA型は22m2016となった. EHC-2では他の株と比べて1リピート増加し, 14リピートであった. O157-37, EHC-6においては, それぞれ3リピート, 10リピートという結果になったが, 他の株ではこの遺伝子座でピークは検出されなかった. 22-17では1か所の遺伝子座 (O157-9) において他の株より1リピート多く9リピートで, MLVA型は14m2192であった. 16株のうち14株が13m2214, 1株は22m2016, 1株は14m2192となり, 同じ集団感染事例の中に異なるMLVA型の菌株が存在していたことが確認された. この結果をMinimum Spanning Treeによって解析したものを, 図1Aに示した.

3 PFGE法

解析した16株のPFGE法によるバンドパターンを図2に示した. 22-09以外の15株で同一のバンドパターンを示し, 22-09とは1バンドの差があった (図2).

4 SNPs解析

菌株間のSNPsに基づき作成したネットワーク図を図1Bに示した. 16株のうち13株にはSNPsはみられず, 22-02, 22-17, 22-11にはそれぞれ主要な集団から1塩基ずつ変異が生じていた.

考 察

この集団感染事例の16株について行った血清型別の結果, 22-03はHg11の遺伝子は保有しているものの, その発現がない株であると考えられた. 本事案のように疫学情報が明確である場合は, 同一事案に関連性がある株かどうかの判断に窮することはないが, 疫学情報が不明な場合, 性状と分子疫学解析の結果が不一致であるとその判断が困難になる場合がある. 今回の結果から, 遺伝子を保有していても発現していない可能性があることから, 遺伝子の保有状況も確認するとともに, 他

表2 MLVA法による各遺伝子座のリピート数とMLVA型

菌株番号	各遺伝子座のリピート数														MLVA type			
	O157 -3	O157 -9	O157 -25	O157 -34	EH157 -12	EH111 -11	BH111 -8	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37		EH26 -7	EH111 -14	EHC-6
22-01	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-02	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-03	-2	8	2	1	2	2	1	7	14	-2	-2	1	-2	3	3	1	10	22m2016
22-04	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-05	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-06	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-07	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-08	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-09	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-10	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-11	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-12	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-13	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-14	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-15	-2	8	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	13m2214
22-17	-2	9	2	1	2	2	1	7	13	-2	-2	1	-2	-2	3	1	-2	14m2192

の検査結果との比較を行うことで疫学的解析の精度が向上する可能性がある。

MLVA法による解析の結果、今回用いた菌株については3つの型がみられた。集団感染の一部と考える基準の範囲はリピート数の異なる遺伝子座が1~2遺伝子座以内とされているが、1株のみ3遺伝子座の違いとなり、基準を超えた。

同一の集団感染事例の中でMLVA型に多型がみられるひとつの理由として、プラスミドの獲得や脱落によるリピート数の変化があることが考えられた。O157-37, EHC-6はプラスミド上にあるこ

とが知られており[5], 22-03のみがプラスミドを保有していたために2遺伝子座が他の株と異なり, その結果集団内で1株だけ3遺伝子座が異なるリピート数であったと示唆された。

22-03がプラスミドを獲得したことを確認するため、今回の16株のNGSによって得られたデータについて解析を実施した。iSeqから得られたショートリードデータを Genepid-J (<https://gph.niid.go.jp/genepid-j/>) によって解析した結果、解析した株のうち22-03のみがInc FIIタイプのプラスミドを保有していた。また、Inc

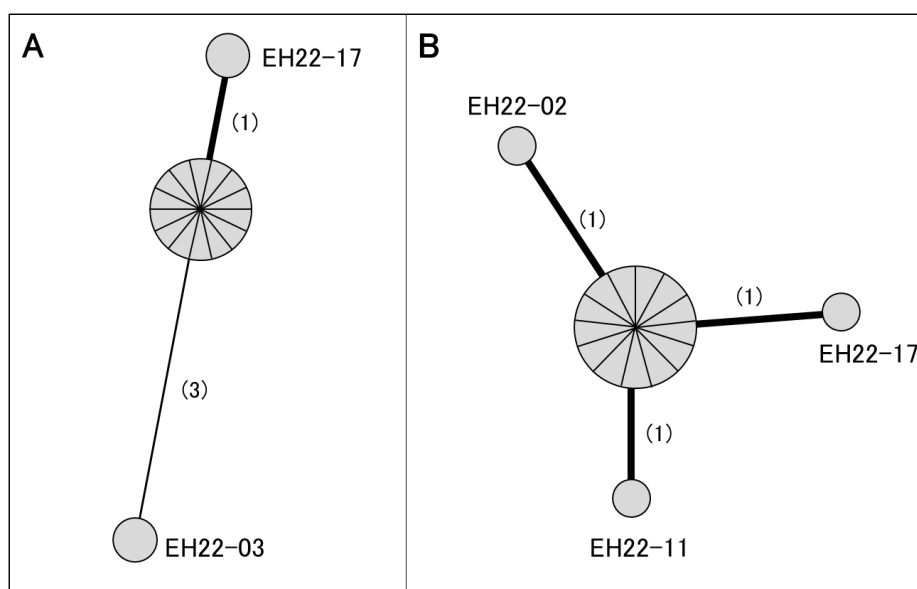


図1 MLVA法によるMST (A) とSNPs解析によるネットワーク図 (B) の比較

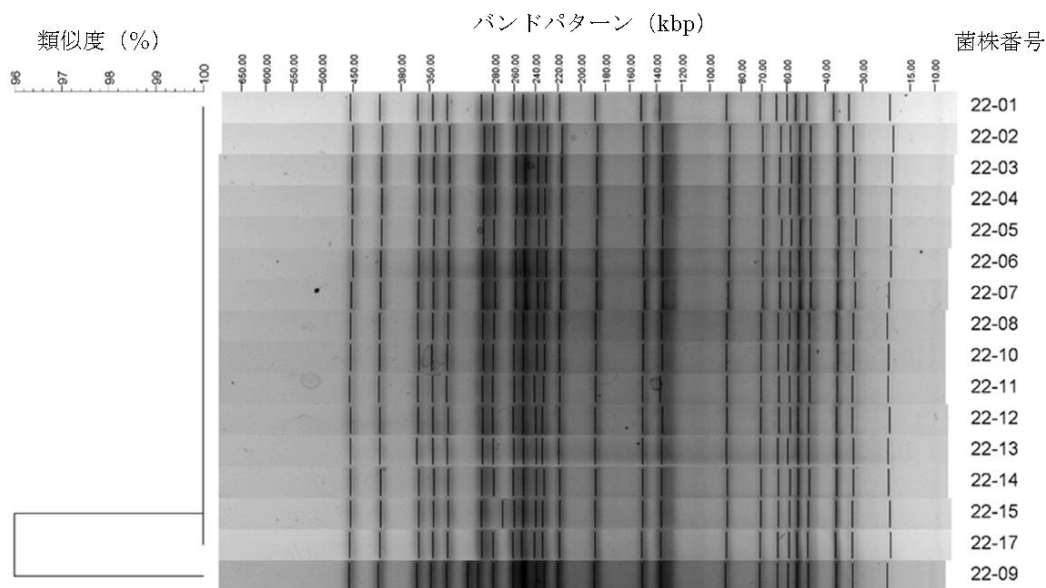


図2 PFGE法によるバンドパターンの比較

FIIプラスミドと判定されたコンティグの配列を確認すると、配列中にO157-37, EHC-6のタンデムリピートが存在していた。このように、疫学情報では共通事項がみられる株であっても、MLVA解析において3遺伝子座以上の違いがみられる場合もあるため、集団感染事例においては疫学情報を基にして総合的に判断する必要がある。

PFGE法では、22-09が1バンド異なるのみで他の株は同一のバンドパターンを示した。集団感染の一部と考える基準の範囲は、その違いが7バンド以内とされているため[6]、今回分離された16株はすべて集団感染事例に関わる菌株であると判断できる範囲内であった。

SNPsの比較では、16株中13株には変異がみられず、その他の3株においてもそれぞれ1塩基ずつの変異のみであった。Lee[7]らの報告によると、MLVA法において遺伝子座の差異が3つ以内であれば、SNPsの差は約20~40塩基になることが報告されている。今回解析した株間のSNPsは1塩基以内の変異にとどまっており、この結果はLeeらの報告と一致していた。22-03についてはプラスミドの獲得によるリピート数の変化があったことが推測されるが、プラスミドの獲得が直接的に遺伝子内の塩基置換に影響しているわけではないため、MLVA法において3遺伝子座の違いがあっても、SNPsの差が比較的少なかったことが推測された。

MLVA法、PFGE法及びSNPs解析の結果に違いが見られたのは、3つの解析法の対象が異なることにあると考えられる[8]。MLVA法は決められた遺伝子座に存在する繰り返し配列の数によって分別するものであるのに対し、PFGE法はゲノム全体を制限酵素で切断し、分子量の異なる断片数の違いにより株を分別する。SNPs解析ではすべての株が共通して保有するSNPsを抽出し、組み換え領域を取り除いた後に解析に使用した。このように各手法の原理の違いによって、今回の解析では結果に違いが生じたことが示唆された。22-03はMLVA法による解析においては集団感染事例関連株であると判断する基準から外れてしまったが、それ以外の解析手法では、いずれの手法においても集団感染事例関連株と判断できる範囲内の差であった。

結 語

2022年に県内の学生寮で発生した集団感染事例から分離された腸管出血性大腸菌O26 16株について、MLVA法、PFGE法及びSNPs解析により分子疫学解析を実施した。今回の事例で分離された株は、MLVA法では多型がみられたが、PFGE法、SNPs解析ではすべての株が事例関連株であると判断する基準範囲内であった。今回の事例のように、株間で血清型別や分子疫学解析の結果に違いがみられることがあるため、解析結果の解釈には疫学情報を考慮するとともに、複数の方法を併用することにより、より正確な判断が可能となると考えられる。

謝 辞

本研究は新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(23fk0108636h0502)の補助を受けて実施した。

文 献

- [1] 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編. 腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157, O26, O111 編) 第1版 (Ver1.2) (2018年11月). <https://www.chieiken.gr.jp/manual01/MLVA/MLVA-handbook2018.pdf>
- [2] 寺嶋淳, 泉谷秀昌 他. 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. 2004, 10-21.
- [3] Chen S, Zhou Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018, 34, i884-i890.
- [4] Croucher NJ, Page AJ, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res*. 2015, 43(3), e15.
- [5] Izumiya H, Pei Y, et al. 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.
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.
- [7] Lee K, Izumiya H, et al. Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol.* 2019, 85(17), e00728-19.
- [8] 野田万希子, 門倉由紀子 他. 腸管出血性大腸菌集団感染事例の解析と継代培養によるPFGEとMLVA パターン変化の比較. 岐阜県保健環境研究所報. 2017, 25. 1-6.