

腸管出血性大腸菌 0157 : H7 の分子疫学的解析法の比較検討

末永 朱美 田中 寛子 宮野 高光 国井 悦子
花木 陽子 毛利 好江 石村 勝之 池田 義文*

2006年4月から2009年12月までに広島市で分離された腸管出血性大腸菌 0157:H7, 80株を分子疫学解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE), IS-printing法, MLVAの3法を用いて解析し, その解析結果を用いて型別法と疫学的関連性および, その有用性について検討した。供試した80株は, PFGEで43型, MLVAで50型, IS-printing法では29型に分類された。3法で一致した型に分類された株は, 同一事例株間では疫学的関連の裏付けとなった。散発事例間で時期的に近い株は, 疫学的関連は確認されなかったものの同一感染源由来であることが考えられ, より詳細な疫学解析が必要であると考えられた。一つの解析で同一型に分類されても, 他の2法で異なる型として分類される場合については疫学情報などを参考に慎重に疫学的解釈を行う必要があり, 3法により型別の原理が異なるため, 複数の解析法を併用して型別を行うことが有効である。

キーワード： 腸管出血性大腸菌 0157, 分子疫学的解析, MLVA解析, PFGE解析, IS-printing法

はじめに

食中毒および感染症事件発生時に行う疫学調査は, 拡大を防ぐと共に, 再発防止のために重要なものである。近年, 原因菌のDNAを用いた分子疫学的解析が感染源の究明に利用され, その有用性が報告されている。特に腸管出血性大腸菌(EHEC)についてはパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による分子疫学的解析が全国的に行われ, 国立感染症研究所(感染研)を中心にデータベースの構築が進んでいる。しかしながら, PFGE法は, 解析に3日かかるなど迅速性に欠ける部分があり, その欠点を補完する解析法の開発が進められている。

PCR反応を利用して解析が可能なIS-printing System解析(IS法)やMultiple locus variable-number tandem repeats analysis(MLVA)は迅速に結果が得られ, データをコード化して比較が簡便に行えることが特徴である。我々も, PFGE法の他にMLVA法及びIS法の検討を行ってきたが, 今回これらの分子疫学解析法により2006~2009年に広島市で発生したEHEC 0157感染症事例で分離された菌株の解析を行い, 疫学情報と共に比較検討したので報告する。

方 法

1 供試菌株

2006年4月から2009年12月までの期間に広島市域で分離されたEHEC 0157:H7, 43事例80株を用いた。事例の表記は, 広域において散発的に発症があったが, 一つの感染源から発症した広域事例, 発症1週間以内に焼肉店利用が明確な焼肉店事例, 保育園での集団発生事例をそれぞれ「広域」「焼肉店」「保育園」とし, 複数ある場合は時系列で番号を振った。その他の散発事例は発生地区をアルファベットにし時系列で番号を振った。

2 PFGE解析

PFGE法は感染研が示したニュープロトコールに準じて行い, 制限酵素はXba Iを用いた。解析は画像解析ソフト(Fingerprinting II, Bio-Rad)により行い, 類似係数Dice, デンドログラム型UPGMA, トレランス設定は最適化0%, トレランス1.0%でデンドログラムを作成した。また表中のPFGE Type No. (PFGE TN)は, 感染研が型別したその表記に従った。

3 MLVA解析

MLVAは, 9組のprimerを用いて, 9か所(K25, K3, K34, K9, K17, K19, K36, K37, K10)のVNTR領域のPCRを行い, その分子量から繰り返し回数(RN)

* : 退職

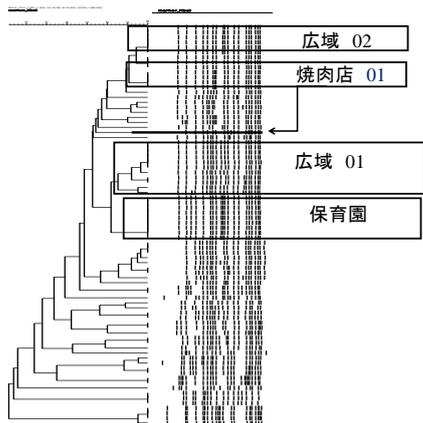


図1 PFGE 解析結果とバンドパターン

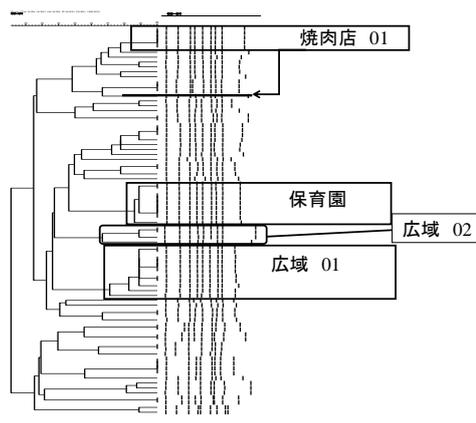


図2 MLVA 解析結果とバンドパターン

を計算した。測定可能な PCR 産物が得られない場合は、配列が確認できない” null allele” として RN は 0 とした。Fragment size marker は GeneFlo 625 TAMRA labeled(CHIMERx 社)を使用し、解析には 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 社)及び GeneScan Analysis Software(Applied Biosystems 社)を用いて行った。

4 IS-printing System 解析

市販のキット IS-printing system® (東洋紡社)を用い、添付のプロトコールに従い実施した。また結果は、プライマーごとに増幅ありを「1」、なしを「0」と判定し、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st, 2nd の順に並べて 12 桁で表わして IS コード型とした。

結 果

1 PFGE 解析

供試した 80 株は、PFGE 法により 43 の PFGE 型に型別された。同一事例から複数株が分離された 18 事例のうち、11 事例は同一事例で分離された株全てが同一クラスタに分類された。残りの同一クラスタに分類されなかった 7 事例のうち、6 事例は類似度 90%以上に分類された。残りの 1 事例「焼肉店 01」で分離された 6 株中 5 株は、同一クラスタまたは類似度 90%以上に型別されたが、残りの 1 株は、他の 5 株とは類似度の低い PFGE 型となった。感染研の型別は同じであるが当所の結果では異なる型となった株の組み合わせは 4 組、感染研の型別は異なるが当所では同じであるとされた株の組み合わせは 4 組あったが、その違いは 1~3 バンドの違いであった。

2 MLVA 解析

供試した 80 株は、MLVA 法により 50 の型に型別された。同一事例から複数株が分離された 18 事例

表 1 IS コード型と事例

IS型	ISコード型	株数	事例数	事例	VT型
1	010057214443	1	1	N04	2
2	012057210443	1	1	S01	2
3	012057214443	1	1	M02	2
4	115047341447	1	1	NK03	1,2
5	115057303443	2	1	AK04	2
6	117177601747	9	1	保育園	1,2
7	135247303447	5	2	AM01, H04	1,2
8	215455605243	3	1	AM07	2
9	245057311442	2	1	焼き肉店02	2
10	305457711242	2	1	焼き肉店05	2
11	307557611657	1	1	H01	1,2
12	311557710413	5	3	焼き肉店03, AM04, N06	2
13	315557211356	2	1	S02	1,2
14	315577611357	1	1	NK01	1,2
15	317175611757	4	1	広域02	1,2
16	317557611653	2	2	N05, N07	2
17	317575211757	7	3	焼き肉店01, H02, AK05	1,2
18	317575611757	1	1	焼き肉店01	1,2
19	317577611557	1	1	H03	1,2
20	317577611657	3	2	N09, M03	1,2
21	317577611757	2	2	AM05, AM06	1,2
22	345457311652	2	1	H05	2
23	517557611653	1	1	AK03	2
24	613577610646	11	5	AK01, 広域01, AK02, N03, N08	1,2
25	707575611617	2	2	N02, AM02	1,2
26	717557611653	4	2	焼き肉店04, M01	2
27	717557611657	1	1	NK02	1,2
28	717577611653	1	1	AM03	2
29	717577611657	2	2	N01, AM08	1,2

表 2 事例「焼肉店 01」分離株比較

発症(分離)年月日	発症状況	菌株番号	VT型	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	ISコード型	PFGE
2006/7/6	無症状保菌者	6014	1,2	5	10	10	11	7	6	6	6	38	317575211757	b107
2006/7/7	無症状保菌者	6015	1,2	5	10	10	11	7	6	6	6	38	317575211757	b107
2006/6/24	患者	6016	1,2	5	10	10	11	7	6	6	6	38	317575211757	b107
2006/6/27	患者	6017	1,2	5	10	10	11	7	6	6	6	38	317575211757	b107
2006/6/19	患者	6018	1,2	5	10	10	11	7	6	6	6	38	317575211757	b106*
2006/7/9	患者	6023	1,2	5	10	10	13	9	6	6	6	45	317575611757	b129

* one band different from b107

のうち、同一事例で分離された株全てが同一クラスタに分類された事例は 9 事例であった。

3 IS-printing system 解析

供試した 80 株は、IS 法により 29 の IS コード型に分けられた。ほとんどの同一事例株は同一 IS コード型に分けられたが、「焼肉店 01」は 2 種類の IS コード型に分けられた。複数事例を含むコード型は 10 種類あった。

4 3 法の比較

3 法の型別は、事例とよく一致した。また同一事例から複数株が分離された 18 事例のうち、3 法で同一型または類似した型に分類された事例は「焼肉店 01」を除く 17 事例であった。異なる事例間で IS コード型が同一で PFGE 型、MLVA 型が同一または類似した株をグループとしてまとめ、結果を比較した。グループは 7 グループできた(表 3)。同様に 3 法で型別が一致しなかった株をグループとしてまとめ、結果を比較した。

IS コード型が同じで PFGE 型、MLVA 型が分かれるものは 3 グループ、PFGE のクラスタ解析で 100% のクラスタを形成した株で IS コード型と MLVA 型が分かれるものは 1 グループあった(図 3)が、MLVA 型が同じであるもので IS コード型が分かれる株は存在しなかった。

考 察

「焼肉店 01」で分離された 6 株中 1 株(表 2, 菌株番号 6023)は IS コード型、PFGE, MLVA のいずれも他 5 株と異なった(表 2)。この株を分離した患者は発症日が他の患者よりも 1 週間近く遅く、また喫食した店は系列店ではあったが、別の店舗であったことから、感染源は異なるものと考えられた。この事例を除き、集団感染事例、家族間感染事例など疫学的関連のある株は、IS 法で同一型に分類され、MLVA, PFGE では画像パターンもよく類似しており、クラスタ解析による類似度も高く、

表 3 遺伝子型類似株の解析結果

グループ	発症(分離)年月日	菌株番号	事例	VT型	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	ISコード型	PFGE
1	2006/8/25	6027	N02	1,2	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
	2006/8/30	6028	AM02	1,2	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
2	2007/9/26	7017	焼き肉店04	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
	2007/9/27	7018	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	33	717557611653	c566
	2007/10/1	7019	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
	2007/10/2	7021	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
3	2008/7/25	8018	AM05	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	29	317577650757	d154*
	2008/7/26	8019	AM06	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	28	317577650757	d523*
4	2008/8/24	8031	H02	1,2	5	9	10	11	8	6	6	6	29	317575211757	d524
	2009/3/3	9001	AK05	1,2	5	9	10	12	8	6	6	6	40	317575211757	d524
5	2008/7/22	8017	N05	2	5	15	9	13	7	6	4	7	30	317557611653	c304**
	2008/12/5	8049	N07	2	5	14	9	13	7	6	4	7	29	317557611653	d879**
6	2009/7/23	9016	N09	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
	2009/7/24	9017	N09	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
	2009/7/31	9018	M03	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
7	2006/7/18	6021	AK01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2006/7/18	6022	AK01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2006/8/13	6025	広域01	1,2	3	14	9	16	5	4	11	6	21	613577610646	a259
	2006/8/17	6026	広域01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	21	613577610646	a259
	2006/9/17	6033	広域01	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	b216
	2006/9/19	6034	広域01	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	b216
	2007/7/19	7007	AK02	1,2	5	13	9	17	7	4	11	6	22	613577610646	a259
	2007/7/15	7011	AK02	1,2	5	13	9	17	7	4	11	6	22	613577610646	a259
	2007/9/9	7014	N03	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2007/9/13	7015	N03	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	26	613577610646	a259
	2009/6/19	9011	N08	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	21	613577610646	a259

*one band different

**two band different

PFGE バンドパターン	菌株番号	事例	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	ISコード型	PFGE TN
	6027	N02	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
	6028	AM02	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
	9025	広域02	2	13	9	17	9	6	10	7	59	317175611757	e241
	9026	広域02	2	13	9	18	9	6	10	7	59	317175611757	e241
	9027	広域02	2	13	9	17	9	6	10	7	59	317175611757	e241
	9030	広域02	2	13	9	17	8	6	10	7	51	317175611757	e241

図3 PFGE バンドパターンと MLVA, IS コード型比較

同一感染源由来と考えられた。

疫学的関連性は確認できない事例間で、3法ではほぼ同一型とされた株は7グループあった(表3)。これらのうち発症または分離の時期が集中している4グループ(グループ1, 2, 3, 6)は疫学的関連性を示すデータはないが、共通の感染源を持つ可能性が示唆された。

異なる事例間においてIS法で同一ISコード型とされたが、PFGE, MLVAでは違う型とされた株の組み合わせは3グループあった。3グループともPFGE, MLVAでは事例ごとに同じ型別となり、IS法よりも詳細に型別できることが示唆された。このようにIS法は3法の中で最も迅速ではあるが型別の種類が少なく、同一型が必ずしも他法での一致を示すものではないこともあり、単独での分子疫学解析を行う際には詳細な疫学情報も必要になると思われる。

PFGEで同一型とされ、IS法, MLVAで異なる型とされたものは1グループで3事例6株あった(図3)。これらのうち散発事例2事例2株がISコード型, MLVA型も一致し感染研によるPFGE TNも同じであった。この2株とPFGE TNが異なる「広域02」の4株はMLVA型がわずかに異なっていたがISコード型は同じであった。これらの株のPFGEを再度行い、泳動像を目視で確認したところ、PFGE TNの型別ごとに2バンドの差異が確認できた。これをFingerprinting IIで解析したところ類似度100%のクラスターを形成した。この例のようにソフトによる解析には限界があり、再検査等で確認することも可能だが、MLVAやIS法を組み合わせることでより迅速かつ容易に区別することができ、複数での解析の有用性が示唆された。

以上のことから、単独の解析では同一型となり事例間で区別できないような例では、3法を組み合わせることでより効率的に型別ができるものと考えられた。

謝 辞

PFGE 解析を実施していただいた国立感染症研究所細菌部 寺嶋淳先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hyytia-Trees, E., Smole, S. C., Fields, P. A., et al.: Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157(STEC O157). Foodborne pathog. dis., 3, 118-131(2006)
- 2) 寺嶋淳: 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, 厚生労働科学研究報告書, 18-21(2009)
- 3) 古田喜美: 2004年中国・四国地区で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析; 広島県獣医学会雑; No. 21; 55-60(2006)
- 4) Yingxin Pei, Jun Terajima, Yasunori Saito, Reiko Suzuki, et al.: Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates dispersed across Japan by pulsed field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis Jpn. J. Infect. Dis., 61, 58-64(2008)
- 5) Tadasuke O., et al.: Development of a Multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol., Sept., 2888-2894(2009)
- 6) C. Keys, S. Kemper and P. Keim: Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. J Appl Microbiol.; 98 (4):928-40(2005)
- 7) 末永朱美: 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析の比較; 広島市衛生研究所年報, 28, 37-40(2009)