

腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の分子疫学的解析

田内 敦子 築地 裕美 佐多 俊子* 児玉 実
石村 勝之

2013年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 0157 感染症事例 4 件 7 株について、分子疫学解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE), IS-printing system[®]法, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の 3 手法を実施し、感染事例間での疫学的関連性について検討した。その結果、事例間の関連性は低いと考えられた。また腸管出血性大腸菌 026 感染症事例 9 件 11 株についても PFGE を実施したところ、いくつかの事例で疫学的関連性が疑われたものの感染経路の特定には至らなかった。一方、新たな試みとして血清型 026 でも MLVA を検討し、その解析結果を比較したところ、PFGE で類似度が高い菌株は MLVA でも結果が一致しており、026 の MLVA が PFGE と同程度の型別能を有し、集団事例内や散発事例間での疫学的関連性を迅速に検討する検査情報となる可能性が示唆された。今後さらなるデータの集積が必要である。

キーワード： 腸管出血性大腸菌, 分子疫学的解析, MLVA 法, PFGE 法, 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、感染拡大を防ぐとともに、再発防止のために重要なものである。なかでも原因菌の DNA を用いた分子疫学的解析は感染源の究明に利用されており、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法 (PFGE) 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 日以上かかるなど迅速性に欠ける部分があり、より短時間で解析可能な方法の開発が進められている。

一方、PCR 反応を利用して解析を行う IS-printing system (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。これらの手法を用いて、2013年に広島市で発生した EHEC 0157 感染事例間での疫学的関連性を比較検討した。また当所においてこれまで 0157 のみで実施していた MLVA を、026 菌株の分子疫学的解析でも使えるよう検討を行った。

方法

1 供試菌株

2013年6月から12月までに広島市で分離された EHEC 0157:H7 7 株および EHEC 026:H11 11 株を用いた。事例と菌株の関係は表 1 に示した。

2 PFGE

制限酵素 *Xba*I および *Bln*I を用いて感染研で示された方法に準拠し、さらにスミアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた 0.5×TBE で電気泳動を行った¹⁾。Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて解析を行い、Dice 法 (最適化: 0.0%, トレランス: 1.0%) による相関係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により系統樹を作成した。また、感染研で型別された結果を PFGE TypeNo. および 26type No. として併記した。

3 MLVA

フラグメント解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) および Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い、0157 は 9 カ所の VNTR 領域について²⁾、026 は 7 カ所の VNTR 領域について^{3), 4)}、それぞれ解析を行った。Fragment size marker は GeneScan[™] 600 LIZ[®] Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。繰り返し回数 (RN) は、上記シーケンサーを使用し、

*: 現 健康福祉局保健部食肉衛生検査所

表 1 2013 年に広島市で発生した EHEC 0157 および 026 感染症事例概要と分離菌株

事例	菌株番号	VT 型	診断の種類	発症年月日	性別	年齢	職業	備考
157-1	13005	VT2	患者	20130623	女	21	大学生	同居家族
	13006	VT2	無症状病原体保有者		女	48	給食調理員	
	13007	VT2	患者	20130626	女	19	大学生	
	13008	VT2	患者	20130624	男	49	鉄工所勤務	
157-2	13011	VT1VT2	患者	20130812	男	47	会社員	
157-3	13025	VT1VT2	患者	20131002	女	15	高校生	
157-4	13031	VT1VT2	患者	20131208	女	46	介護職員	
26-1	13001	VT1	患者	20130605	女	21	会社員	
26-2	13009	VT1	患者	20130707	女	12	中学生	
26-3	13012	VT1	患者	20130816	女	71	無職	陰性確認 1 回目
	13013	VT1						
26-4	13014	VT1	患者	20130822	女	7	小学生	同居家族
	13015	VT1	無症状病原体保有者		女	38	飲食店経理	
26-5	13016	VT1	患者	20130902	女	64	主婦	
26-6	13021	VT1	患者	20130916	男	16	高校生	
26-7	13022	VT1	患者	20130924	男	10	小学生	
26-8	13023	VT1	患者	20130925	男	5	保育園児	
26-9	13024	VT1	患者	20130929	女	7	小学生	

表 2 026-MLVA 法の Primer set と Locus の概要

PCR mix	Locus	Dye	Sequence (5'-3')	Repeat size (bp)	Off set (bp)
Mix 1	0157-9	F VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTCC	6	465
		R	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAAATATTTTTTG		
	EHC-1	F VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	6	75
		R	CGCGGCTGCCGGAGTATC		
	EHC-2	F VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	6	214
		R	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
EHC-5	F NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	6	109	
	R	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC			
Mix 2	0157-37	F PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	6	84
		R	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG		
	EH26-7	F PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	22	292
		R	CGCCGGAAGGCAAAAATCAT		
	EHC-6	F NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	9	387
		R	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		

一部の検体について PCR 産物のシーケンス解析を行って確認した。026 のプライマーと蛍光標識については表 2 のように設定した。

4 IS-printing System

IS 法は IS-printing system[®](東洋紡)を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。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 set, 2nd set の順に並べて 12 桁で表わして IS コードとした。

結 果

1 0157 菌株の解析結果

2013 年に分離された 0157 菌株 7 株の解析結果および感染研 PFGE TypeNo. を図 1 に示した。

(1) 家族内感染事例

事例 157-1 で分離された 4 菌株(13005~13008)は、3 種の分子疫学解析法すべてで結果が一致していた。

(2) 散発事例

事例間で結果が一致したものはなかった。

2 026 菌株の解析結果

2013 年に分離された 026 菌株 11 株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ、MLVA RN および感染研 26type No. を図 2 に、*Bln*I 処理による PFGE クラスタを図 3 に示した。

(1) 家族内感染事例

事例 26-4 の 2 株(13014, 13015)は、PFGE において 2 種類の制限酵素処理ともに同一クラスターを形成し、さらに MLVA RN も一致していた。

(2) 散発事例

事例 26-3(13012, 13013)と事例 26-5(13016)は、PFGE において 2 種類の制限酵素処理ともに 95%以上と高い類似度であった。またこの 3 株は、従来の泳動方法ではスミアバンドとなり解析できなかったが、50 μM チオ尿素を加えた 0.5×TBE で泳動することでバンドを検出することができた。

9 月末に発生した、事例 26-7(13022)と事例 26-9(13024)は、PFGE において *Xba*I 処理では同一クラスターを形成し、さらにその一週間前に発生した事例 26-6(13021)とは類似度 96%であった。一方 *Bln*I 処理ではこれら 3 株とも切断されなかった。

散発事例間の PFGE において、同一クラスターあるいは 95%以上の類似度であった菌株は、MLVA RN も一致していた。

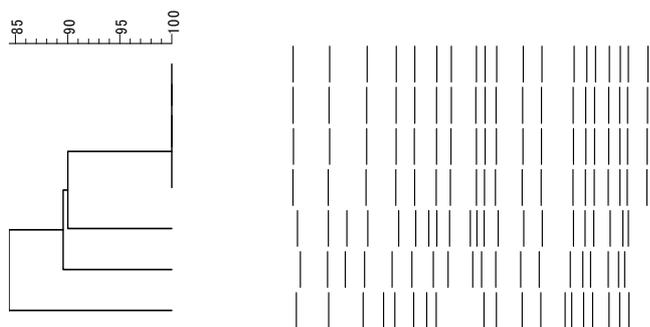
考 察

当所では例年、分離された 0157 感染症由来菌株の分子疫学的解析を、PFGE, IS 法, MLVA にて実施しており、これまでの検討結果から、これら 3 種の方法すべてで結果が一致していれば、同一感染源であると推察している。2013 年に発生した 0157 感染症由来菌株を解析した結果、事例間で一致したものはなく、疫学的関連性は低いと考えられた。

026 感染症では、事例 26-3 と 26-5 や、事例 26-6, 26-7 と 26-9 の発生時期が比較的近く、PFGE 解析結果から疫学的関連性が疑われたが、患者の生活圏は異なっており、保健センターや保健所による疫学調査でも共通する点はみられず、感染経路は不明であった。

現在当所で行っている EHEC の分子疫学的解析は、0157 以外の血清型では PFGE のみである。

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI marker_XbaI



事例	菌株番号	PFGE TypeNo.	IS コード	MLVARN									
				K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	
157-1	13005	i235	317555611653	5	12	10	8	6	6	10	7	34	
157-1	13006	i235	317555611653	5	12	10	8	6	6	10	7	34	
157-1	13007	i235	317555611653	5	12	10	8	6	6	10	7	34	
157-1	13008	i235	317555611653	5	12	10	8	6	6	10	7	34	
157-4	13031	h142	613577610646	5	13	9	11	7	4	11	6	24	
157-3	13025	i465	317555611657	5	15	10	9	6	6	10	7	20	
157-2	13011	i463	717573611657	3	10	9	14	7	7	11	8	25	

図 1 0157 菌株の PFGE クラスタ、IS コードおよび MLVA RN

しかし、026 感染症は 0157 に次いで発生件数が多く、また 2013 年の広島市における件数も例年に比べて多かったため、PFGE に加え、より迅速に解析が可能な MLVA についての検討を行った。2013 年に発生した 026 感染症由来菌株の PFGE と MLVA の結果を比較すると、PFGE で同一クラスター、または類似度が高かった菌株の MLVA RN は、7 領域全てで一致している一方、PFGE のクラスターが違えば MLVA RN も異なっていた。このことから 026 の MLVA は PFGE と同程度の型別能を有しており、集団事例内や散発事例間での疫学的関連性を迅速に検討する検査情報となる可能性が示唆された。しかしながら今回の解析は 2013 年分離の 11 株のみと少なく、また 7 つの VNTR 領域の内、0157-37 と EHC-6 は全ての株が PCR で増幅されなかったため、実質 5 領域での比較となった。今後 0157 の解析における MLVA と同様にその有用性を示していく上でも、さらに解析数を増やして検討していく必要がある。

また今回 026 の PFGE において、スミアバンドのため解析不能となったものが 3 株あったが、泳動バッファーに 50 μM チオ尿素を加えることでバンドを検出することができ、さらにこれらの株はクラスター解析で高い類似度を示した。今後は解析不能株を減らすため、チオ尿素を加えたバッファーで電気泳動した方がよいと考えられる。

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第一部 泉谷秀昌先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 沼田 昇 他：パルスフィールド・ゲル電気泳動におけるスミアバンド発生の防止 - チオ尿素加トリス泳動バッファーを用いた電気泳動，病原微生物検出情報，23(3)，66～68(2002)
- 2) Hyytia-Trees E et al: Second generation subtyping:a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable- number tandem repeat analysis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* 0157(STEC 0157), Foodborne pathog dis, 3, 118～131 (2006)
- 3) Izumiya H et al: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups:0157,026, and 0111, Microbiol Immunol, 54, 569～577(2010)
- 4) 高橋雅輝 他：Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis による腸管出血性大腸菌 (EHEC) 026 遺伝子型別法の検討，岩手県環境保健研究センター年報，11, 67～69(2011)

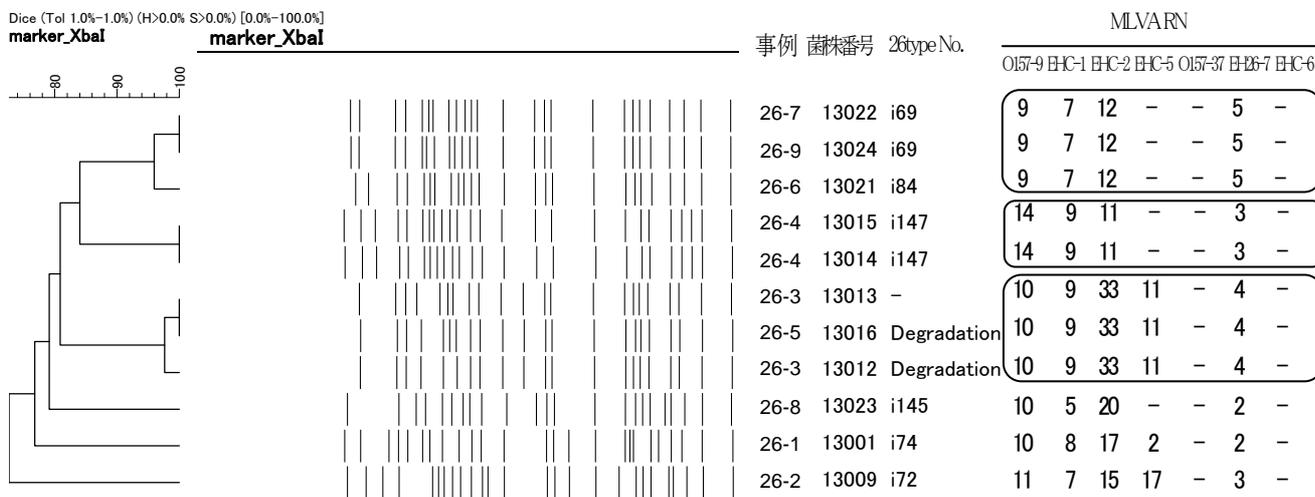
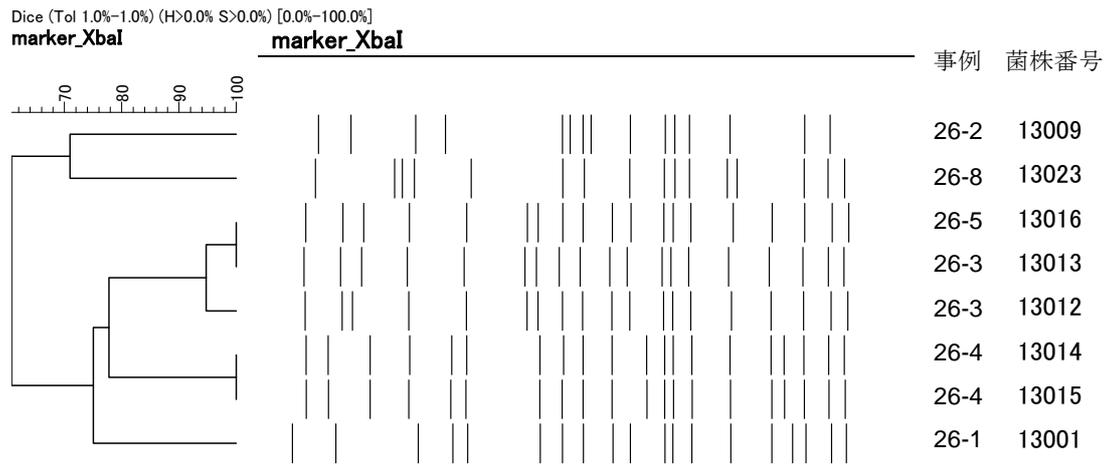


図2 026 菌株の XbaI 処理による PFGE クラスターと MLVA RN



※13021, 13022, 13024 の 3 株は *Bln* I 処理で切断されなかった

図 3 026 菌株の *Bln* I 処理による PFGE クラスター