

2016 年に広島市で分離された広域食中毒事例由来 腸管出血性大腸菌 0157 株等の分子疫学的解析

千神 彩香 青田 達明 栗林 智早 坂本 綾
竹原 佑美 池田 伸代 清水 裕美子 京塚 明美
松室 信宏

2016 年に広島市で発生した散発 7 事例及び広域食中毒 1 事例の患者便及び食品から分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 12 株について、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法、IS-printing system[®] (IS) 法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (9 座位) (MLVA) 法で解析した。疫学調査で関連が不明であった散発事例由来 7 株のうち 4 株は 3 法とも明確に区別されたが、残りの 3 事例由来 3 株中 2 株は 3 法とも一致し区別されなかった。残り 1 株は PFGE 法で高い類似度を示し、IS 法でも 1 か所のコードの違いであったが、MLVA 法では 5 座位が異なった。一方、広域食中毒事例の患者由来 1 株と食品由来 4 株の解析では、PFGE 法及び IS 法では一致した結果であった。MLVA 法では食品由来 1 株に 1 座位のみ 1 リピート異なる SLV を認めた。

今回の解析結果からは、迅速性、簡便性に優れる IS 法であるが、解析能力がやや低いことが認められ、特に疫学調査で関連性が不明な事例間の異同の解釈は、MLVA 法の解析結果を加えて総合的に判断することの必要性が認められた。

キーワード： EHEC, 分子疫学的解析, PFGE 法, IS 法, MLVA 法

は じ め に

腸管出血性大腸菌 (EHEC) はベロ毒素 (Vero toxin, VT) を産生する病原性大腸菌である。これを原因とする感染症は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) により三類感染症に指定されており、診断した医師による届出が必要である。

今回、広域食中毒事例を含むパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法、IS-printing system[®] (IS) 法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の 3 法を用いて解析し、2016 年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 0157 株を感染事例間での疫学的関連性の検討に資するとともに 3 法間の型別能について検証した。

方 法

1 供試菌株

2016 年に広島市内で分離された EHEC0157 12 株を用いた。内訳は、散発事例患者由来 6 株、散発事例無症状病原体保有者由来 1 株、広域食中毒事例患者由来 1 株、広域食中毒事例食品由来 4 株である。事例と株の関係は表 1 に示した。なお、後

述の MST 解析には 2015 年分離株 3 株 (15002, 15003 及び 15008) を加えた。

2 食品からの EHEC0157 の分離・同定

食品からの分離は、通知法¹⁾を用いて行った。

分離菌株の同定は、生化学的性状試験、血清型別試験及びイムノクロマト法による VT 毒素産生試験により行った。

3 PFGE 法

制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いて、国立感染症研究所 (感染研) で示された方法に準拠し実施した。なお、電気泳動は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 で行った。系統樹は、BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths) を用いて解析を行い、Dice 法 (最適化: 0.0%, トレランス: 1.0%) による相似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により作成した。

4 IS 法

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

表 1 2016 年腸管出血性大腸菌 O157 型分離菌株の事例概要

事例番号	事例区分	菌株番号	診断の類型	発症年月日	血清型	VT 型
1	散発	16004	無症状病原体保有者	20160621 ^{*1}	O157 : HNM	VT1
2	散発	16007	患者	20160709	O157 : H7	VT1VT2
3	散発	16008	患者	201607 (日は不明)	O157 : H7	VT1VT2
4	散発	16011	患者	20160718	O157 : H7	VT1VT2
5	散発	16012	患者	20160730	O157 : H7	VT1VT2
6	散発	16019	患者	20161002	O157 : H7	VT1VT2
7	散発	16020	患者	20161008	O157 : H7	VT2
8	食中毒 (広域)	16027	患者	20161027	O157 : H7	VT2
		16028	食品 ^{*2}		O157 : H7	VT2
		16029	食品 ^{*2}		O157 : H7	VT2
		16030	食品 ^{*2}		O157 : H7	VT2
		16031	食品 ^{*2}		O157 : H7	VT2

*1 : 無症状病原体保有者のため、発症年月日ではなく届出報告年月日を記載

*2 : 原因施設で保管されていた食品(メンチカツ, そうざい半製品)

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。

5 MLVA 法

3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い, Hyttia-Trees²⁾ らの 9 カ所の VNTR 領域についてフラグメント解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。プライマーと蛍光標識は表 2 に示した。また, リピート

数の相違が 1 遺伝子座以内 (Single locus variant, 以下 SLV) を同一グループとして分類し, BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths) を用いて MST (Minimum Spanning Tree) 解析を行った。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。

結 果

1 2016 年分離菌株の解析結果

2016 年に分離された菌株 12 株の MLVA リポート

表 2 使用した MLVA primer と Dye set

PCR	locus		Dye	primer (5'-3')
Mix 1	K-3	Forward	VIC	GG CGG TAA GGA CAA CGG GGT GTT TGA ATT G
		Reverse		GAA CAA CCT AAA ACC CGC CTC GCC ATC G
	K-9	Forward	NED	GC GCT GGT TTA GCC ATC GCC TTC TTC C
		Reverse		GTG TCA GGT GAG CTA CAG CCC GCT TAC GCT C
	K-25	Forward	PET	GC CGG AGG AGG GTG ATG AGC GGT TAT ATT TAG TG
		Reverse		GCG CTG AAA AGA CAT TCT CTG TTT GGT TTA CAC GAC
	K-34	Forward	VIC	GA CAA GGT TCT GGC GTG TTA CCA ACG G
		Reverse		GTT ACA ACT CAC CTG CGA ATT TTT TAA GTC CC
Mix 2	K-17	Forward	FAM	GC AGT TGC TCG GTT TTA ACA TTG CAG TGA TGA
		Reverse		GGA AAT GGT TTA CAT GAG TTT GAC GAT GGC GAT C
	K-19	Forward	PET	GC AGT GAT CAT TAT TAG CAC CGC TTT CTG GAT GTT C
		Reverse		GGG GCA GGG AAT AAG GCC ACC TGT TAA GC
	K-36	Forward	VIC	GG CGT CCT TCA TCG GCC TGT CCG TTA AAC
		Reverse		GCC GCT GAA AGC CCA CAC CAT GC
	K-37	Forward	NED	GC CGC CCC TTA CAT TAC GCG GAC ATT C
		Reverse		GCA GGA GAA CAA CAA AAC AGA CAG TAA TCA GAG CAG C
Mix 3	K-10	Forward	FAM	CAGCCTCCTGCAAACTTTACTGTTTCTTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATTCATTGAATGAACAACCCATTTC

数 (MLVA RN), IS コード及び PFGE バンドパターンの一一致の有無を表 3 に, 類似度 95% 以上を示したものを同一 PFGE クラスタ (点線内) とし, 制限酵素 *Xba* I で処理したものを図 1 に, *Bln* I で処理したものを図 2 に示した。また, 2015 年及び 2016 年に分離された EHEC0157 株の MLVA 法解析結果に基づく MST 系統樹を図 3 に示した。

(1) 散発事例

事例 3 (16008) 及び事例 5 (16012) において, MLVA RN, IS コード及び PFGE バンドパターンが全て一致した。事例 2 (16007) は事例 3 及び事例 5 と IS コードが類似し, PFGE でも類似度 97% の同一クラスタを示したが, MLVA 法では 5 座位が異なった。他の事例は 3 法とも互いに異なった。

(2) 広域食中毒事例

事例 8 の患者由来菌株 (16027), 食品 (メンチカツ, そうざい半製品) 由来菌株 (16028, 16029, 16030 及び 16031) において, IS コード及び PFGE バンドパターンは一致した。MLVA では, 5 株とも 8 領域で一致したが, 1 菌株 (16028) が 1 座位 (K10) で他の 4 株と RN が 1 違った (SLV)。

2 3 法間の型別能の比較

(1) PFGE 法

Xba I 処理では, 散発事例 3 (16008) 及び事例 5 (16012) でバンドパターンが 100% 一致した。事例 2 (16007) はこの事例 3 及び事例 5 と類似度 97% の同一クラスタに区別された。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

Bln I 処理でも散発事例 3 (16008) 及び事例 5 (16012) はバンドパターンが 100% 一致し, 事例 2 (16007) の類似度が 97% と高かった。なお, 事例 7 (16020) は *Bln* I では切断されなかった。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

(2) IS 法

散発事例 3 (16008) 及び事例 5 (16012) は IS コードが一致した。これらと PFGE 法で類似度の高かった事例 2 (16007) は, IS 法では 12 桁中 1 か所のコードが異なった。

広域食中毒事例 8 由来の 5 株は同一コードを示した。

(3) MLVA 法

散発事例 3 (16008) 及び事例 5 (16012) では MLVA RN が 9 座位全て一致し, MST 解析で同じグループに付置された。これらと前述の 2 法で類似度の高い事例 2 (16007) は, MLVA RN が K3, K34, K19, K36 及び K10 の 5 領域で異なり (Multi Locus Variant), MST 解析で同じグループとならなかった。

広域食中毒事例 8 の 5 株中 4 株は, 9 領域全てで一致し, 食品由来 16028 が K10 で RN が 1 リピート異なったが, MST 解析で同じグループに分類された。

その他の 2016 年に分離された株で MST 解析の同じグループに分類されたものはなかったが, 16019 は 2015 年に分離された 15002 及び 15003 と同じグループに, 16020 は 15018 と同じグループにそれぞれ分類された。

表 3 2016 年分離菌株の MLVA RN, IS コード及び PFGE バンドパターン一致の有無

菌株 番号	事例 番号	MLVA RN									IS コード		PFGE バンドパ ターン一致の有無
		K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10			
16004	1	5	10	11	11	7	6	6	6	38	317175	611755	無
16007	2	5	13	8	10	7	4	7	6	35	317577	611757	無
16008	3	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577	211757	16012 と一致
16011	4	4	12	10	9	7	6	10	6	15	717557	611657	無
16012	5	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577	211757	16008 と一致
16019	6	4	10	9	8	8	6	8	5	18	106555	211457	無
16020	7	3	4	7	-2*	5	7	6	5	-2*	012057	214442	無
16027	8	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457	211642	16027, 16028, 16029, 16030, 16031 は一致
16028		5	8	7	12	4	7	10	6	19	305457	211642	
16029		5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457	211642	
16030		5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457	211642	
16031		5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457	211642	

*: 「-2」は PCR 産物なし

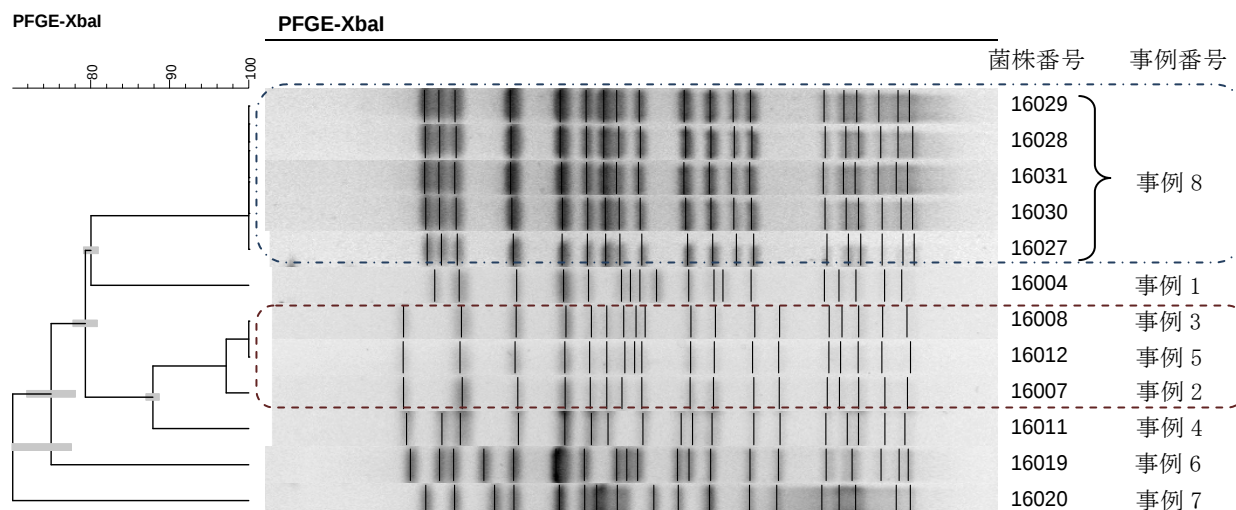
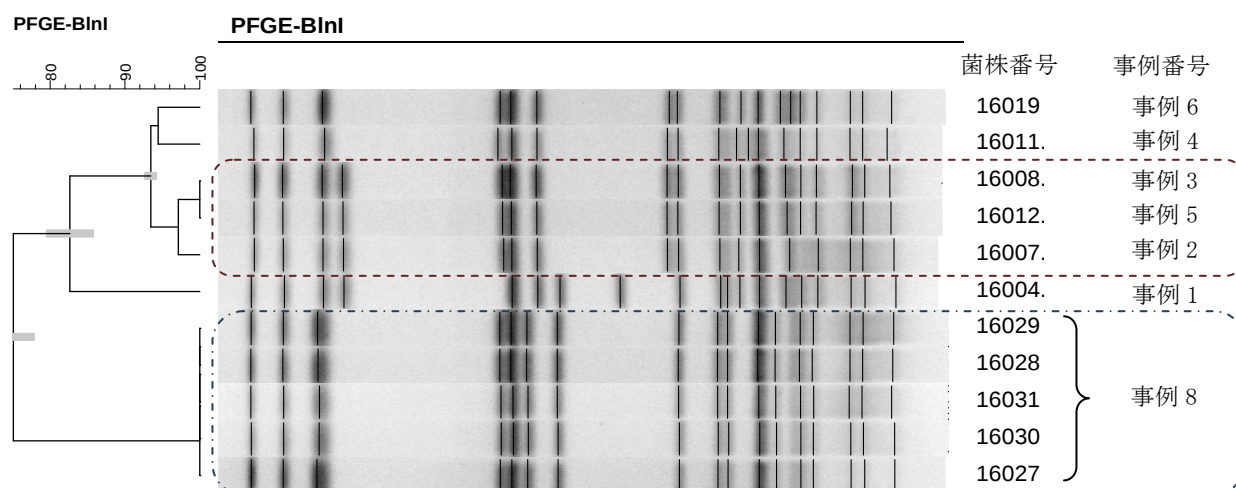


図 1 2016 年分離菌株の *Xba* I 処理による PFGE クラスター



※16020 は *Bln* I で切断されなかった。

図 2 2016 年分離菌株の *Bln* I 処理による PFGE クラスター

考 察

今回、2016 年の散発事例及び全国的な広域食中毒事例の一つとして広島市で発生した患者及び原因施設で保管されていた食品(そうざい半製品)から分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌株について分子疫学的解析を行った。

散発事例由来株においては、事例 3 の 16008 株及び事例 5 の 16012 株において、PFGE 法、IS 法及び MLVA 法の 3 法全てで一致した。この解析結果からは、この菌株同士が遺伝子学的に同じか近縁である可能性が高いことが考えられる。一方で、疫学的に関連性のない事例間で偶然パターンの一致した株が検出された可能性も考えられるが、今回の事例の疫学調査からは事例間の関連性は認められなかった。

広域食中毒事例 8 の分離株 5 株においては、PFGE

法及び IS 法の 2 法ではパターンが完全に一致したが、MLVA 法では食品由来 1 株(16028)は 1 座位(K10)で RN が 1 違う SLV であった。感染研が作成した 14 座位における MLVA 解析結果の基準では、SLV は「ほぼ確実に集団発生の一部である」と解釈できるとされている。当所が検討実施している MLVA 法は、現在のところ 9 座位のみの解析方法であるため、感染研での 14 座位における解析能との同等性は保証されないが、今回の解析において、これら 5 株は疫学情報から考慮しても全て同一食中毒事例の患者及び食品から分離された菌株であり、1 株のみが MLVA RN の一部違う SLV であることから、5 株とも関連性が高いと推察される。

3 法の解析能のうち、IS 法の識別能力は比較的低いと言われており、当所の今回を含めたこれまでの検討結果³⁾⁻⁶⁾からも言えるが、特に関連性の

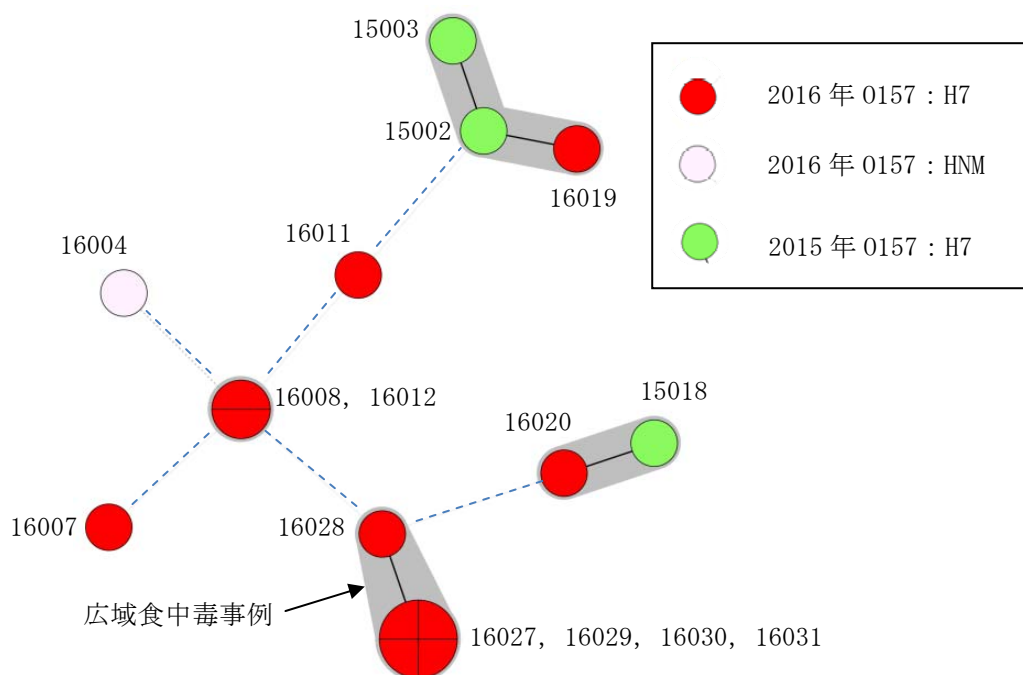


図3 広島市で2015年及び2016年に分離されたEHEC0157株のMLVA解析結果(9座位)に基づくMST系統樹

不明な散発事例株での使用と結果の解釈には他の2手法との結果もふまえて総合的な判断が必要と考えられる。MLVA法は今回の適応例からも有用性が認められたことから、MLVAも合わせて実施することで異なる遺伝子型であることを再確認できる事例があると考えられた。以上より、疫学情報を照らし合わせながら使用する解析手法を総合的に選択することが重要である。

謝 辞

この調査研究にご協力いただいた本市保健所及び各区保健センターの関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局：腸管出血性大腸菌026, 0103, 0111, 0121, 0145 及び 0157の検査法について 食安監発1120第1号, 平成26年11月20日
- 2) Hyttia-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) 末永朱美 他：腸管出血性大腸菌0157:H7の分子疫学的解析の比較検討, 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書, 107~112 (2010)
- 4) 末永朱美 他：腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法の比較検討, 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成22年度 総括・分担研究報告書, 142~148 (2011)
- 5) 田内敦子 他：腸管出血性大腸菌0157:H7の分子疫学的解析, 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成23年度総括・研究分担報告書及び平成21~23年度総合研究報告書, 121~125 (2012)
- 6) 田内敦子 他：広島市で分離された腸管出血性大腸菌0157の分子疫学的解析, 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 平成24年度 総括・研究分担報告書, 146~152 (2013)