

## 広島市域における腸管出血性大腸菌 026 の 分子疫学的解析

田内 敦子 千神 彩香 築地 裕美\*1 児玉 実\*2  
石村 勝之

2008 年から 2014 年までに広島市内で分離された腸管出血性大腸菌 026:H11 (VT1 産生)51 株について、分子疫学的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を実施し、その解析結果を比較したところ、同数のクラスターを形成したことから両解析法の型別能が同等であることが確認された。また PFGE で同一クラスターを形成した菌株は MLVA でも結果がほぼ一致しており、同時期に発生した散発事例間や集団事例内の菌株を迅速に比較する手段として、MLVA は有用である。一方 MLVA において、オフセット領域が一部欠損している株があり、同じ繰り返し回数でもオフセット領域の長さの違いが型別の一つの特徴となる場合があると考えられた。

キーワード： 腸管出血性大腸菌，分子疫学的解析，PFGE，MLVA

### はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、感染すると腹痛、水様性下痢、血便などを引き起こし、重篤な合併症である溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を発生して死に至るケースもある。感染経路としては、食品を介して感染する食中毒の他、ヒトからヒトへの感染も起こる。EHEC 感染症の発生を探知すると、感染の拡大と再発を防止するため疫学調査を実施するが、そのなかでも分子疫学的解析は感染源の究明に重要な役割を担っている。EHEC の分子疫学的解析にはパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の他、より迅速に解析が可能な IS-printing system や Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) などが実施されている。

EHEC 感染症における分離菌の O 血清群は、例年 0157 が最も多いが、026 は次いで多く検出されている。当所ではこれまで、0157 でのみ MLVA を実施していたが、026 にも対応できるよう、過去 7 年間分の 026 分離菌株の MLVA を実施し、その型別能と解析結果を PFGE と比較した。

\*1：現 衛生研究所生活科学部

\*2：現 経済観光局食肉市場

### 方 法

#### 1 供試菌株

2008 年から 2014 年までに広島市内で分離された VT1 産生 EHEC 026:H11 51 株を用いた。

#### 2 PFGE

制限酵素 *Xba*I を用い、国立感染症研究所 (感染研) で示された方法に準拠して行った。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%) による相似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により系統樹を作成した。

#### 3 MLVA

3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems) を用い、7 ヶ所の VNTR 領域について解析を行った<sup>1),2)</sup>。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems) を使用した。一部の検体については、上記シーケンサーを使用して PCR 産物のシーケンス解析を行い、繰り返し回数 (RN) を確認した。

### 結 果

#### 1 型別能の比較

PFGE においては類似度 95% 以上のクラスターを、MLVA においては 7 か所の VNTR 領域全てで RN が一致するものを一つのクラスターと考えると、

共に 24 のクラスターを形成した。

## 2 解析結果の比較

PFGE でパターンが完全一致、あるいは同一クラスターを形成した菌株は、MLVA RN もほぼ一致していた。しかし菌株番号 10055~10058 は PFGE でパターンが一致したものの、MLVA では EHC-1 の RN に違いがみられた。一方、菌株番号 10011~10015 及び 11008~11010 は、MLVA RN は全て一致していたが、PFGE では分離年ごとにクラスターを形成し、その間で 3~4 バンドの違いがみられた。

### 考 察

2008 年から 2014 年までに本市で分離された EHEC O26 51 株の PFGE と MLVA の結果を比較したところ、両解析法において同数のクラスターを形成したことから、O26 菌株の分子疫学解析において MLVA は PFGE と型別能が同等であることが確認され、感染研等が示す結果と一致した<sup>3)-5)</sup>。

また PFGE で同一パターンあるいは同一クラスターを形成した菌株は、MLVA RN もほぼ一致しており、事例間の関連性を迅速に検討する上での MLVA の有用性も確認された。しかしなかには PFGE ではパターンが一致しているものの、MLVA で 1 か所の RN が違っている例もみられた。これらの菌株は、家族内感染及びその陰性確認で分離されたものであるため、MLVA RN が一部違っていても同一感染源であると推察されるが、このような 1 か所の VNTR 領域で違いがみられる菌株間の関連性を検討する場合は、疫学的情報がより一層重要である。

一方で MLVA RN は一致しているが、PFGE では異なるクラスターを形成した例があった。これらの PFGE のクラスターは菌株分離年ごとに形成されており、また MLVA では 7 か所の VNTR 領域の内 4 か所でしか PCR 産物が得られなかった。従って MLVA RN が一致していても分離時期が離れている場合や、増幅されている領域が少ない場合などは、解釈に注意が必要である。

フラグメント解析をする中で、オフセット値よりも低分子量側、あるいはアレルを設定した箇所より数 bp ずれてピークを検出したものがあった。これらの PCR 産物をシーケンスしたところ、繰

り返し配列は確認できたが、オフセット領域が一部欠損しており、このため生じたずれであることが判明した。MLVA RN のみで結果を示すと同一 RN となり、差が表れてこないが、オフセット領域もこのような違いを精確に検討することで、菌株間の特異的な差異として、型別の一つの特徴となる場合もあると考えられる。

### 謝 辞

MLVA についてご指導いただきまし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) Izumiya H 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*, 54, 569 ~ 577 (2010)
- 2) 高橋雅輝 他: Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis による腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 遺伝子型別法の検討, 岩手県環境保健研究センター年報第 11 号, 67~69 (2011)
- 3) 石原朋子 他: 腸管出血性大腸菌の分子型別, 病原微生物検出情報, 35(5), 129~130 (2014)
- 4) 山田裕子 他: 広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157, O26, O111 における分子疫学的解析法の検討, 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 26 年度総括・研究分担報告書, 103~110 (2015)
- 5) 亀山光博 他: 2014 年に山口県内で多発した腸管出血性大腸菌 O26 感染症の分子疫学的解析, 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 26 年度総括・研究分担報告書, 115~120 (2015)

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

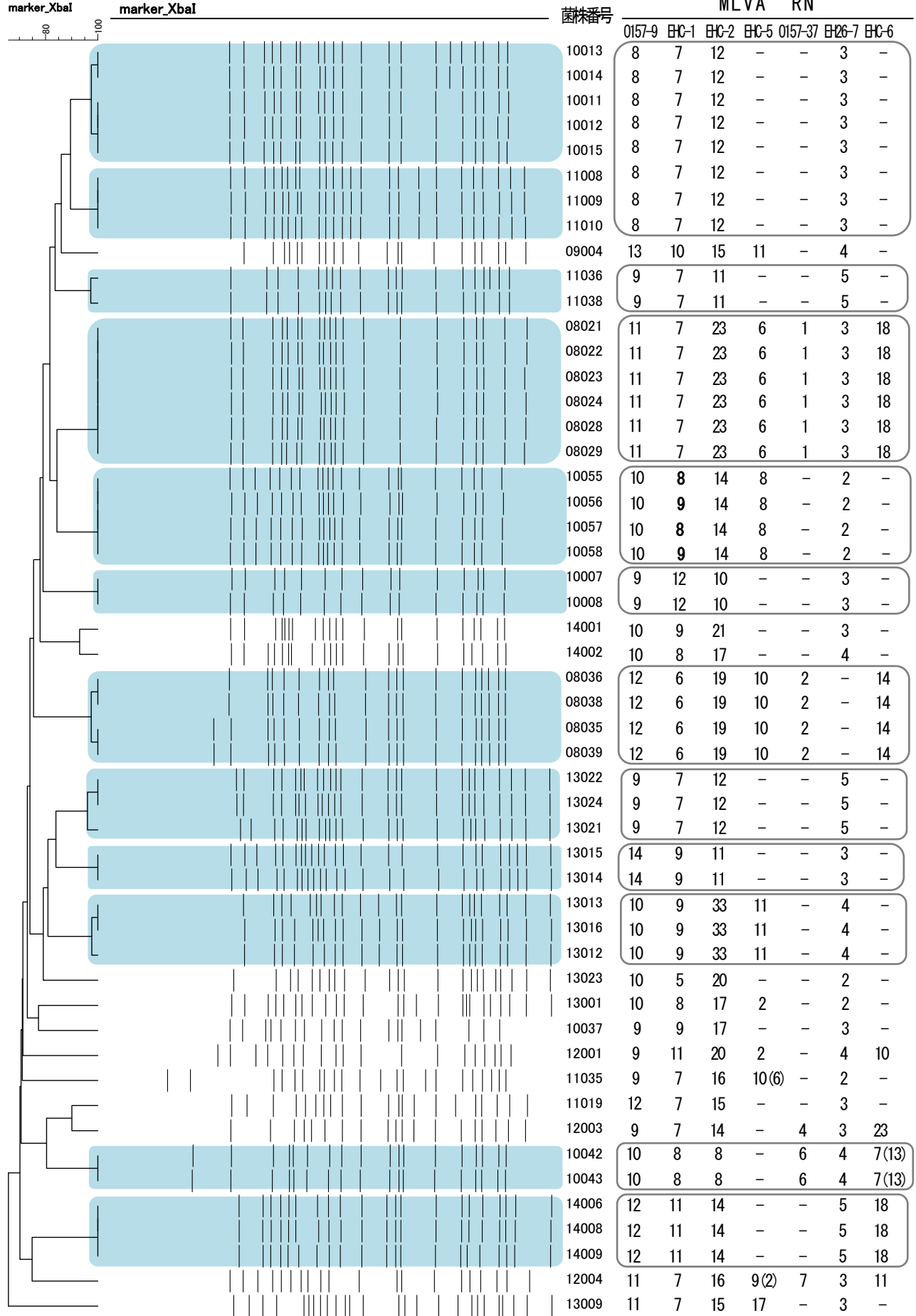


図 2008~2014年 VT1 産生 EHEC O26:H11 分離菌株の PFGE クラスターと MLVA RN  
 (—; PCR 産物なし, ()); 解析において二つのピークを検出したものの内, 低ピーク側の値)