

2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O26:H11 (VT1 産生) 株の分子疫学的解析

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

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 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により三類感染症に指定されており、診断した医師は直ちに最寄りの保健所へ届出をしなければならない。EHEC はベロ毒素 (Vero toxin, VT) を産生する病原性大腸菌であり、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) や脳症を発症して死に至るケースもある。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。

今回、2013 年から 2017 年にかけて本市において分離された EHEC O26:H11 (VT1 産生) 株 32 株について、分子疫学的解析手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) 法を実施し、感染事例間での疫学的関連性を検討したので報告する。

方法

1 供試菌株

2013～2017 年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11 (VT1 産生) 感染症事例から分離された菌株 32 株を用いた。内訳は、2013 年分離菌株 10 株、2014 年分離菌株 3 株、2015 年分離菌株 7 株、2017 年分離菌株 12 株である。分離菌株の事例概要を表 1 に示した。

2 PFGE 法

制限酵素 *Xba*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、電気泳動はスメ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 社) 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。

3 MLVA 法

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い、表 2 の 7 ヶ所の VNTR 領域について解析を行った^{1), 2)}。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。また、BioNumerics Ver. 7.5 (Applied Maths 社) を用いて Minimum Spanning Tree (MST) 解析を行った。

結果

2013～2017 年に分離された O26 菌株 32 株の PFGE バンドパターン及び MLVA リピート数 (Repeat Number, RN) を図 1 に、MLVA 解析結果に基づく MST 系統樹を図 2 に示した。PFGE バンドパターンにおいて類似度 95% 以上のものを同一 PFGE クラスタ (図 1 の A～F) とし、MLVA RN が完全に一致したものを同一 type (図 1 及び図 2 の a～d) とした。

1 PFGE 法

事例 2014-1 の 14001 株及び事例 2014-2 の 14002 株は、類似度 95.0% で同一クラスタ (A) を示した。

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、バンドパターンが 100% 一致し同一クラスタ (B) を示した。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株においても同一クラスタ (C) を示した。

事例 2015-4 の 3 株 (15009, 15010 及び 15012) 及び事例 2015-3 の 2 株 (15008 及び 15011) では共にバンドパターンがそれぞれ 100% 一致し、これら二つの事例間の類似度は 95.5% で同一クラスタ (D) を示した。

事例 2013-7 の 13022 株及び事例 2013-9 の 13024 株ではバンドパターンが 100% 一致し、これら 2 株と事例 2013-6 の 13021 株との類似度は 95.7% で同一クラスタ (E) を示した。

事例 2017-5 の 4 株 (17031, 17032, 17033 及び 17034) 及び事例 2017-6 の 2 株 (17036 及び 17037)

*: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

表1 2013~2017年腸管出血性大腸菌 O26:H11 (VT1 産生株) 分離菌株の事例概要

事例番号	菌株番号	診断の類型	発症年月日	発生区	性別	年齢	備考
2013-1	13001	患者	20130605	ア	女	21	
2013-2	13009	患者	20130707	イ	女	12	
2013-3	13012	患者	20130816	イ	女	71	
2013-4	13014	患者	20130822	ウ	女	7	同一家族事例
	13015	無症状病原体保有者	-		女	38	
2013-5	13016	患者	20130902	エ	女	64	
2013-6	13021	患者	20130916	オ	男	16	
2013-7	13022	患者	20130924	ウ	男	10	
2013-8	13023	患者	20130925	イ	男	5	
2013-9	13024	患者	20130929	エ	女	7	
2014-1	14001	患者	20140619	ウ	女	82	
2014-2	14002	患者	20140626	イ	女	2	
2014-3	14006	患者	20140830	オ	男	2	
2015-1	15001	患者	20150508	カ	女	5	
2015-2	15013	無症状病原体保有者	-	ウ	女	59	
2015-3	15008	患者	2015(月日は不明)	ウ	男	32	同一家族事例
	15011	患者	20150629		女	2	
	15009	患者	20150624		男	35	
2015-4	15010	無症状病原体保有者	-	ウ	女	8	同一家族事例
	15012	患者	20150624		女	5	
2017-1	17003	患者	2017(月日は不明)	キ	女	23	
2017-2	17005	患者	20170406	ク	男	19	
2017-3	17008	無症状病原体保有者	-	ウ	女	34	同一家族事例
	17009	患者	20170528		女	15	
2017-4	17029	患者	20171005	イ	女	12	
	17031	無症状病原体保有者	-		男	37	
	17032	無症状病原体保有者	-		女	37	
	17033	無症状病原体保有者	-		女	7	
2017-5	17034	無症状病原体保有者	-	カ	女	5	同一家族事例
	17035	患者	20171009		女	1	
	17036	無症状病原体保有者	-		カ	男	
17037	患者	20170925	女	5			

はバンドパターンが 100%一致し、これら 6 株と事例 2017-5 の 17035 株との類似度は 97.9%を示した。事例 2017-3 の 17008 株及び 17009 株ではバンドパターンが 100%一致し、これら 2 株と事例 2017-5, 2017-6 の 7 株との類似度は 95.2%で同一クラスター(F)を示した。

2 MLVA 法

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、MLVA RN が 7 座位全て一致し、同一 type(a)であった。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株は同一 type(b)であった。

事例 2015-4 の 3 株(15009, 15010 及び 15012), 事例 2015-3 の 2 株(15008 及び 15011), 事例 2013-7 の 13022 株, 事例 2013-9 の 13024 株, 事例 2013-6 の 13021 株, 事例 2017-3 の 2 株(17008 及び 17009) 及び事例 2015-1 の 15001 株は同一 type(c)であった。

事例 2017-5 の 5 株(17031, 17032, 17033, 17034 及び 17035)及び事例 2017-6 の 2 株(17036 及び 17037)は同一 type(d)であった。

なお、PFGE で同一クラスターA を示した 2 株については、MLVA type が 3 座位で異なった。

表 2 Primer set と Locus の概要

PCR mix	Locus	Dye	Sequence (5'-3')	Repeat size (bp)	Offset
Mix 1	0157-9	F	VIC GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	6	466
		R	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAAATTTTTTG		
	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	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTC		
Mix 2	0157-37	F	PET AATCAGAGCGGCAGAAAAAGAAGA	6	84
		R	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG		
	EH26-7	F	PET CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	22	292
		R	CGCCGGAAGGCAAAAAGATCAT		
	EHC-6	F	NED ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	9	387
		R	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		

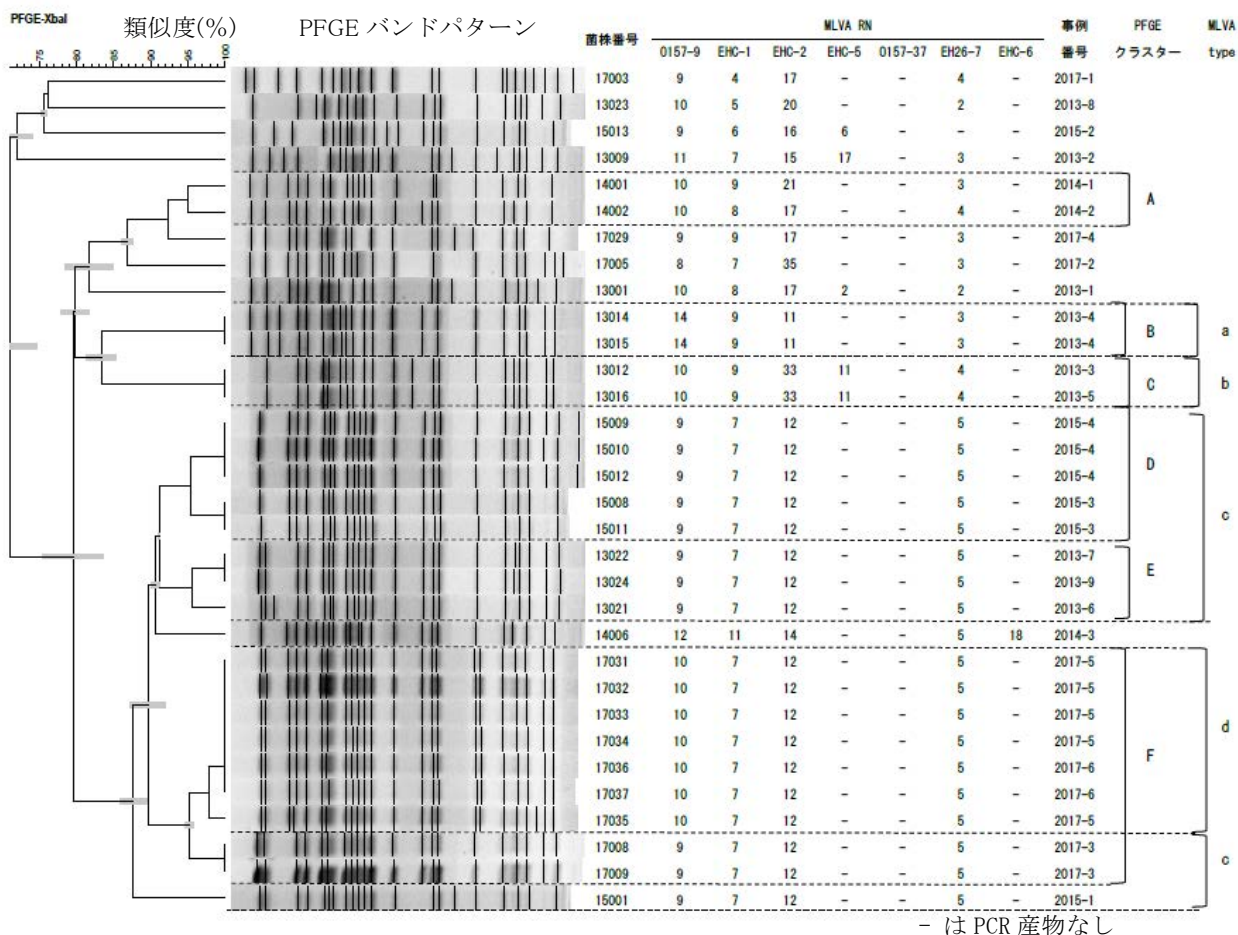


図 1 2013~2017 年分離菌株の Xba I 処理による PFGE クラスタ及び MLVA RN 解析結果

考 察
2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)は, 共に患

者は高齢であるが発生区が異なり, 疫学的関連性も認められていないが, 両解析方法で完全に一致

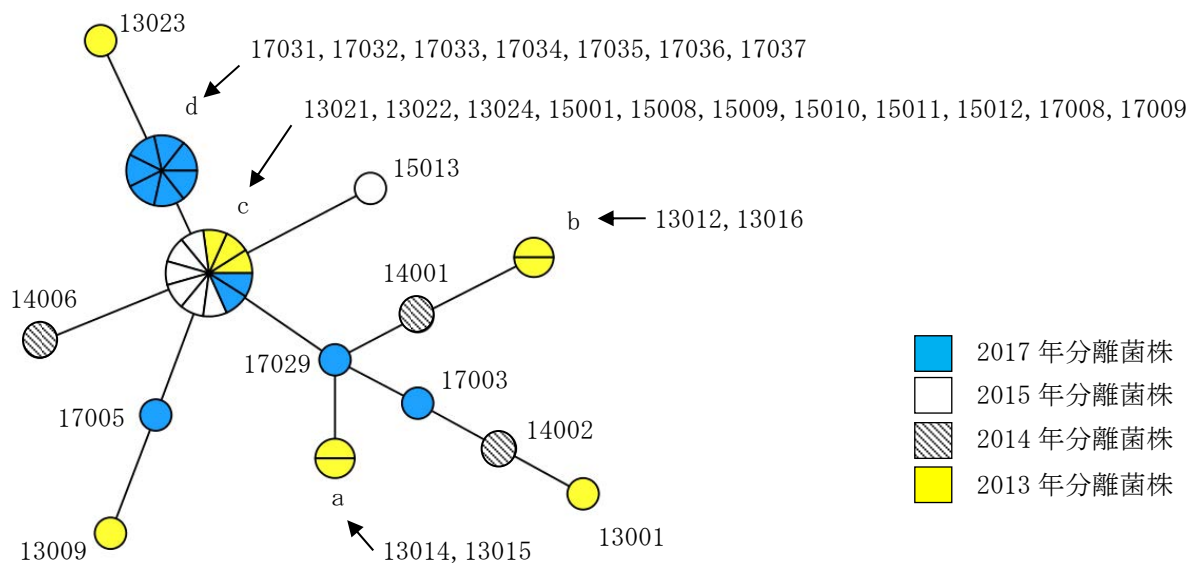


図2 2013～2017年分離菌株32株のMLVA解析結果(7座位)に基づくMST系統樹

した(PFGE法でクラスターC, MLVA法でtype b)。

2015年の事例(2015-3及び2015-4)は、発生区が同じであり、発生時期も近いが疫学的関連性は認められていない。しかしこれらの株はPFGE法で類似度が高く同一クラスターを示し(クラスターD), MLVA法で一致した(type c)。

2013年の事例(2013-3及び2013-5)や2015年の事例(2015-3及び2015-4)のように、疫学調査から関連性が認められていないがPFGE法で同一クラスターかつ同一MLVA typeを示した例もあった。これらの株は、類似の遺伝子を持つ可能性、又は疫学的関連性のない株間で遺伝子のパターンが偶然一致した可能性が考えられる。しかし2013年の事例(2013-3及び2013-5)の2株(13012及び13016)に関しては、PFGEクラスターのみならずバンドパターンも100%一致したことから、潜在的な疫学的関連性を示唆している可能性もあると考えられる。

2017年の事例(2017-5及び2017-6)は、PFGE法でほぼ一致し、MLVA法でも一致した(type d)。この二事例は両家族の交流が聞き取り調査から認められ、疫学的関連性が示唆された。

2013年から2017年までに発生したO26(VT1産生)感染症の家族内感染事例6事例(2013-4, 2015-3, 2015-4, 2017-3, 2017-5及び2017-6)由

来株は、各事例で両解析方法共に高い一致性が認められた。一方、今回のMLVA解析からtype cとした事例が多年にわたり認められたが、年が異なるとPFGE法ではバンドパターンが異なることから、当所の現行のO26用MLVA法を使用する際には留意が必要であると考えられた。

謝 辞

調査を担当された本市保健所、各区保健センター及び健康推進課の皆様、菌株の分与にご協力いただきました医療機関の皆様に深謝いたします。

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)