

腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析の比較

末永 朱美 田中 寛子 花木 陽子 毛利 好江
蔵田 和正* 石村 勝之 池田 義文 笠間 良雄

平成 20 年に広島市で発生した集団感染事例を含む 12 事例から分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7, 24 株について PFGE 法, MLVA 法, IS-printing System により解析した。

供試 24 株は, 散発事例 2 株を除き, 事例に一致した 11 のタイプに分類され, 3 法で一致した結果であった。

IS-printing System および MLVA 法は, 簡易・迅速に行える疫学解析手法として有用と考えられたが, 解析方法の統一や解析結果の解釈基準の設定等の課題があり, 今後さらに検討が必要である。また, IS-printing System および MLVA 法は, PFGE 法とは異なる原理を用いた手法であることから, 解析目的によっては 3 方法を組み合わせて行う必要があると考えられた。

キーワード: 腸管出血性大腸菌 O157, 分子疫学的解析, MLVA, PFGE, IS-printing System

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, 再発防止のために大変重要なものである。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 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¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。これらの分子疫学解析法により平成 20 年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例で分離された菌株の解析を行い, 比較検討した。

方法

1 供試菌株

平成 20 年 4 月から 10 月までに広島市で発生した 12 事例から分離された腸管出血性大腸菌 O157,

24 株 (O157:H7 VT1, 2 ; 14 株, O157:H7 VT2 ; 10 株) を用いた。

2 PFGE 解析

PFGE 法は国立感染症研究所 (以下, 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, デンドログラムタイプ 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, PFGE タイプは, 感染研が型別したその表記に従った。

3 MLVA 解析

MLVA は, 感染研が使用している 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 (以下, RN) 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" として表中の RN の記載は 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) および GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems 社) を用いて行った。

MLVA 型は集団事例から分離された株では同時に 3 か所以上で RN が異なる場合に違う型とし, 散発事例では 1 か所で RN が 1 違う場合を同一型とし, それ以外は違う型とした。同一型で RN の違うもの

*: 現 環境局施設部施設課

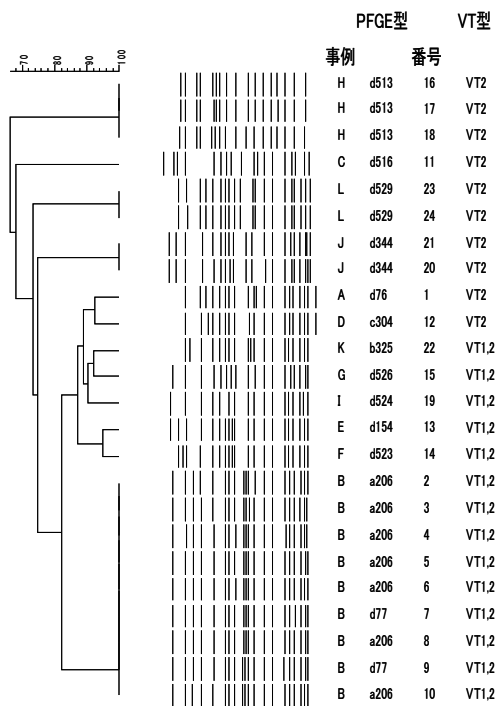


図1 腸管出血性大腸菌のPFGE解析結果

は枝番を付けて区別した。

4 IS-printing System 解析

IS-printing system[®] (東洋紡) 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コードとした。

結 果

1 PFGE 解析

感染研のPFGE解析による型別では24株を13タイプに分類し、コメントのone band deffer.を同一型とすると11のタイプに分類できた。

当所で行ったPFGE解析では、集団事例Bで分離された9株は、感染研でone band deffer.とされた2株も含めて類似度100%で全て同一パターンを示した。散发事例E, Fから分離された2株は感染研の解析ではone band deffer.とされたが、当所では2バンドの違いがあり、類似度は95.0%であった(図1, No. 13, 14)。また、特にコメントのなかった散发事例G, I, Kから分離された株は、それぞれ独立した類似度90%以上のクラスターを形成した。同様に事例A, Dから分離された株は類似度92.3%でクラスターを形成した。

2 MLVA 解析

MLVA法では、9か所全体のRNの違いにより18のタイプに区別された。異なる事例から分離された菌株は、異なるMLVAタイプとして区別された(表1)。

最も識別能が高い場所はK10で、11種のRNがみられた。最も識別能が低い場所はK25, K34, K19で4種のRNがみられた。K9, K10では、null alleleの株が認められた(表1, No. 11, 16~18)。同一事例内でvariantが見られたのはK25, K9, K36, K37, K10の5 lociであった。

集団事例Bの9株中6株は、同一のB-1型であった。RNが異なった3株の内訳はK10でRN2違いのB-2型1株(No. 8), K36でRN1違いのB-3型2株(No. 9, 10)であった。

散发事例E, Fからの分離された2株はK10で1RN違いであった(No. 13, 14)。散发事例E, I, Kから分離された3株No. 13, 19, 22はNo. 13と19の間でK25で2RN, K3で1RN違い, No. 19と22の間ではK17で1RN, K10で17RN違いであった。

3 IS-printing System 解析

ISコードは11タイプに分類され、同一事例で分離された菌株は同一のISコードを示した。

散发事例E, Fから分離された2株は、同一のISコードを示した(No. 13, 14)。

考 察

今回の解析では、PFGE法, MLVA法, IS-printing法のうち、IS-printing法が最もおおまかに分類され、事例との関連が一致している。逆にMLVAは最も細かく分類され同一事例内でも異なる型がみられたが、SLVを同一型とするとIS-printing法による分類とよく一致した。

しかし一方で、同一のISコードを示す複数の株が、5タイプ以上のPFGE型を示すことが報告されており、このような分離菌株の評価に関しては、より詳細な広域疫学調査情報を得るとともに、他の分子疫学的解析を行って菌株間の関係を総合的に評価していくことが必要と考えられた。

MLVA法では、これまでの報告からも、K9, 10のRNはバリエーションが多く、また比較的高頻度に変異が起こることが知られている。逆にK17, 19, 34では配列の保存性が高いことが報告されており、今回の解析結果でも供試株数は少ないが同様の傾向がみられる。

このように変異の頻度が場所により異なるので、

表1 腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学的解析法による解析結果

番 号	事 例	VT 型	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	MLVA 型	IS コード	PFGE	TN
1	A	2	5	14	9	13	5	6	5	7	36	A	517557611653	d76	
2	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	a206	
3	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	a206	
4	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	a206	
5	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	a206	
6	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	32	B-2	117177601747	a206	
7	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	d77	
8	B	1,2	6	12	9	15	7	7	7	7	30	B-3	117177601747	a206	
9	B	1,2	6	12	9	15	7	7	7	7	30	B-3	117177601747	a206	
10	B	1,2	6	12	9	15	7	7	8	7	30	B-1	117177601747	d77	
11	C	2	4	5	7	0	5	8	6	5	0	C	012057214443	d516	
12	D	2	5	15	9	13	7	6	4	7	30	D	317557611653	c304	
13	E	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	29	E	317577611757	d154	
14	F	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	28	E	317577611757	d523	
15	G	1,2	5	12	9	11	12	6	11	7	27	G	717557611657	d526	
16	H	2	4	10	7	0	3	6	4	10	50	H-1	215455605243	d513	
17	H	2	4	10	7	0	3	6	4	11	50	H-2	215455605243	d513	
18	H	2	3	10	7	0	3	6	4	10	50	H-3	215455605243	d513	
19	I	1,2	5	9	10	11	8	6	6	6	29	I	317575211757	d524	
20	J	2	4	8	8	14	5	7	9	6	14	J-1	311557710413	d344	
21	J	2	5	8	8	14	5	7	9	6	14	J-2	311557710413	d344	
22	K	1,2	5	9	10	11	7	6	6	6	46	K	317577611557	b325	
23	L	2	4	7	7	18	3	5	9	12	7	L-1	115057303443	d529	
24	L	2	4	7	7	17	3	5	9	12	7	L-2	115057303443	d529	

同じSLVであってもその意味等に評価することには課題を残しており、得られたRNの評価方法について場所ごとに今後検討していく必要があると思われた。散発事例E, F, I, Kから分離されたNo. 13, 14, 19, 22の株は2か所以内でRNが異なる散発事例の分類に関する課題を提起した形となった。疫学的には共通点は見られなかったが、IS-printing System, PFGE 解析の結果を合わせて考慮すると、No. 13, 14の株はほぼ同一であるが、No. 13, 19, 22の株は似ているけれども違う型として分類されることが考えられた。これらの結果から、locus ごとの変異の起こりやすさや繰り返し回数幅を考慮した解析方法の検討が必要となってくることが示唆された。

PFGE 解析は、唯一感染研を中心にデータベース化が進んでいる解析法であるが、画像のデータベ

ースが無い場合、当所で行ったものとの比較が難しい。感染研との結果に相違がある場合、手技的な問題も考えられるが、輸送、継代を重ねるうちに変異が起こったことも考えられる。今後継代と保存条件での変異についてくわしく検討していく必要があると考えられる。

IS-printing System, MLVA 法およびPFGE 法は異なる原理を用いた解析手法であり、それぞれのクラスタリングの結果が常に一致するとは限らない。従って、事例によっては、これらの3方法を適宜併用し、疫学的検討を行うことも有効であると考えられた。

謝 辞

PFGE 解析結果を出していただいた感染研の寺嶋淳先生他、ご協力いただいた方々に感謝いたし

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 Shiga toxin-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, 厚生労働科学研究費補助金平成 20 年度総括・分担研究報告書 (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, 広島県獣医学会誌, 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)