

## 腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法の比較検討

末永 朱美\*<sup>1</sup> 田内 敦子 宮野 高光 井澤 麻由  
 築地 裕美 花木 陽子\*<sup>2</sup> 国井 悦子 佐藤 真帆  
 坂本 綾 京塚 明美 伊藤 文明 橋本 和久  
 笠間 良雄

2010年3月から11月までに広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例 14 件 23 株を、分子疫学的解析法である PFGE, IS-printing 法, MLVA の 3 法を用いて解析し、これらの解析法と感染事例との疫学的関連性、およびその有用性について検討した。また、同時期に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 (O26, O121, O103) 感染症事例 13 件 20 株を PFGE でクラスター解析し、事例との対応を検討した。その結果、O157 の株は PFGE のクラスター解析で、15 のクラスターに分けられ、同一事例から分離された株は同一クラスターまたは近傍の類似度の高いクラスターに分類された。家族内事例においては、MLVA では全て同じ繰り返し回数 (RN) であるが、IS-printing と PFGE では lband differ. となる株が分離された。また O157 以外の血清型における PFGE のクラスター解析では、血清型ごとに大きな集団にまとまり、さらに事例ごとに区別することができた。このことから、これらの血清型でも O157 と同様に多様な遺伝子型が存在していると考えられた。事例ごとに感染源の推定や浸潤状況を把握するためには疫学解析が重要であり、その手法として PFGE は有用であると思われた。今後 O157 以外の血清型においても、迅速に結果が出る解析方法のさらなる検討が必要である。

キーワード： 腸管出血性大腸菌, 分子疫学的解析, MLVA 解析, PFGE 解析, 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、感染拡大を防ぐと共に、再発防止のために重要なものである。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 (EHEC) 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 (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、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 解析 (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、2010年3月から11月までに広島市で発生し

た EHEC O157 の、解析法と感染事例との疫学的関連性を検討した。また、O157 以外の血清型で PFGE を用いた分子疫学的解析を行い、事例の関連を検討した。

### 方 法

#### 1 供試菌株

2010年3月から11月までの期間に広島市で分離された EHEC43 株を用いた。O157 の内訳は、O157:H7, VT1, 2 産生株 9 株, VT2 産生株 13 株, O157:H-, VT1, 2 産生株 1 株, その他の血清型は O26:H11, VT1 産生株 10 株, O121:H19, VT2 産生株 7 株, O103:H2, VT1 産生株 3 株で、事例との関係は表 1, 2 に示した。

#### 2 PFGE 解析

制限酵素 *Xba*I を用い、感染研で示された方法に従って実施し、Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて解析を行った。解析は、Dice 法 (最適化: 0.0%, トランス: 1.0%) による相似係数を算出し、平均

\*1: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

\*2: 現 経済局工業技術センター

表 1 0157 事例概要と分離菌株

事例	菌株番号	診断の類型	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	O	H	VT 型
1	10001	患者	20100226	女	35	看護師	157	7	VT1VT2
2	10002	患者	20100309	男	7	小学生	157	7	VT1VT2
3	10005	患者	20100505	男	21	大学生	157	-	VT1VT2
4	10006	患者	20100511	男	6	小学生	157	7	VT2
5	10010	患者	20100507	男	35	会社員	157	7	VT1VT2
6	10016	患者	20100523	女	1	無職	157	7	VT2
	10018	無症状病原体保有者		女	65	会社員	157	7	VT2
	10017	無症状病原体保有者		女	38	無職	157	7	VT2
	10019	無症状病原体保有者		男	67	無職	157	7	VT2
7	10027	患者	20100714	女	31	学生, 准看護師	157	7	VT2
8	10031	患者	20100718	女	6	小学生	157	7	VT2
	10030	無症状病原体保有者		男	34	水道工	157	7	VT2
	10032	無症状病原体保有者		女	39	人形販売店員	157	7	VT2
	10029	無症状病原体保有者		女	6	小学生	157	7	VT2
9	10033	患者	20100807	男	5	保育園児	157	7	VT1VT2
	10034	無症状病原体保有者		女	31	会社員	157	7	VT1VT2
10	10035	患者	20100809	女	3	幼稚園児	157	7	VT1VT2
11	10041	患者	20100825	男	10	小学生	157	7	VT1VT2
12	10050	患者	20100906	男	8	小学生	157	7	VT2
	10051	患者		男	38	自営業(造園業)	157	7	VT2
13	10054	患者	20100915	女	9	小学生	157	7	VT2
14	10064	患者	20101106	男	21	会社員	157	7	VT1VT2
	10067	無症状病原体保有者		女	55	無職	157	7	VT1VT2

表 2 0157 以外の血清型事例概要と分離菌株

事例	菌株番号	診断の類型	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	血清型	VT 型
026-1	10007	患者	20100507	女	45	事務員	026:H11	VT1
026-2	10011	患者	20100517	男	15	学生	026:H11	VT1
	10012	無症状病原体保有者		女	43	無職	026:H11	VT1
026-3	10013	患者	20100516	男	11	小学生	026:H11	VT1
	10015	無症状病原体保有者		女	68	無職	026:H11	VT1
026-4	10037	無症状病原体保有者		男	57	調理師	026:H11	VT1
026-5	10043	患者	20100831	女	3	保育園児	026:H11	VT1
	10042	無症状病原体保有者		女	28	保育士	026:H11	VT1
026-6	10055	患者	20100926	男	8	小学生	026:H11	VT1
	10056	無症状病原体保有者		女	37	会社員(パート)	026:H11	VT1
0103-1	10020	患者	20100528	女	11	小学生	0103:H2	VT1
0103-2	10052	患者	20100914	女	10	小学生	0103:H2	VT1
	10053	無症状病原体保有者		男	7	小学生	0103:H2	VT1
0121-1	10009	患者	20100518	男	18	大学生	0121:H19	VT2
0121-2	10040	患者	20100825	男	29	会社員(IT関連)	0121:H19	VT2
	10046	患者		男	1	保育園児	0121:H19	VT2
0121-3	10049	患者	20100914	女	5	保育園児	0121:H19	VT2
	10047	患者		男	34	建設業	0121:H19	VT2
0121-4	10045	患者	20100911	男	2	保育園児	0121:H19	VT2
0121-5	10065	患者	20101111	男	18	高校生	0121:H19	VT2

距離法(UPGMA)による系統樹を作成した。また、感  
染研で解析し型別された結果を PFGE TN として併  
記した。

### 3 MLVA 解析

3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)

および Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用  
い、9 ヲ所の VNTR 領域について解析を行った<sup>1)</sup>。  
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) は昨年までに 310 Genetic  
Analyzer (Applied Biosystems 社) および GeneScan

表 3 MLVA primer と Dye set

PCR mix	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	FAM	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
Mix3	K-10	Forward	FAM	CAGCCTCTGCAAACCTTACTGTTCATTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATCATTTGAATGAACAACCCATTTC

Analysis Software (Applied Biosystems 社)を用いて得られたデータと合うように補正したものを使用した。プライマーと蛍光標識については表 3 に示した。

4 IS-printing System 解析

IS-printing system<sup>®</sup>(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 桁で表して IS コードとした。

結 果

1 0157 株の 3 法比較 (表 4)

0157 の散発事例 1, 2 は 3 月に発生し、これらから分離された菌株(10001, 10002)は 3 法全てで結果が一致した。

散発事例 7 から分離された株 10027 と家族内事例 8 から分離された 4 株(10029~10032)は、IS コード、PFGE TN が同一であったが、MLVA では 10027 と他 4 株とで、K10 の RN が 14 違いであった。

家族内事例 9 で分離された 2 株 (10033, 10034) の IS コードは 1band differ. により異なり、PFGE でも 1band differ. であったが、MLVA では全ての RN が一致していた。また散発事例 10 での分離株 10035 と比較すると 10034 は 1band differ. により、10033 は 2band differ. により異なった IS コードとなり、PFGE では 3~4 band differ., MLVA では

5 か所の RN が異なっていた。

家族内事例 12 で分離された 2 株(10050, 10051) と散発事例 13 で分離された 1 株 (10054) では、IS コードが 1band differ. により異なり、PFGE も 1band differ. であったが、MLVA では全ての RN が一致していた。

その他の家族内事例では、事例内株の解析結果が全て一致し、他の事例と区別できた。

2 0157 以外の PFGE の結果 (図 1)

(1) 026 事例

6 事例 10 株が 6 つのクラスターに分けられ、ほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 3 で分離された 2 株のうち 1 株は、家族内事例 2 で分離された 2 株と PFGE TN が同じであり、類似度 100%のクラスターに分類されたが、もう一方の株はこの 3 株と 1 band differ. で、類似度が 96%のクラスターを単独で形成した。

(2) 0121 事例

5 事例 7 株がほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 3 の患者と散発事例 4 の患者は同じ保育園に通っており、発症も同時期であった。この二つの事例から分離された株は、感染研では全て同じパターンであり、当所では 1~2band の違いで類似度が 90%以上であった。

(3) 0103 事例

2 事例 3 株が 3 つのクラスターに分けられたが、ほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 2 で分離された 2 株は 1band differ. で類似度が 96%であった。

表 4 0157 MLVA RN , IS コードおよび PFGE TN

菌株番号	事例	VT 型	K 25	K 3	K 34	K 9	K 17	K 19	K 36	K 37	K 10	IS コード	PFGE TN
1	10001	1	VT1VT2	19	13	11	14	6	6	3	5	29	717577 650657 e671
2	10002	2	VT1VT2	19	13	11	14	6	6	3	5	29	717577 650657 e671
3	10005	3	VT1VT2	2	14	8	16	11	5	4	7	33	315455 350656 f59
4	10006	4	VT2	5	9	10	16	10	4	9	9	40	311555 630253 f60
5	10010	5	VT1VT2	6	14	10	21	7	4	12	6	28	613177 210646 d482
6	10016		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653 f34
7	10018	6	VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653 f34
8	10017		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653 f34
9	10019		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653 f34
10	10027	7	VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	27	311557 710413 e377
11	10031		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413 e377
12	10030	8	VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413 e377
13	10032		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413 e377
14	10029		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413 e377
15	10033	9	VT1VT2	5	13	11	15	7	6	10	7	20	717575 611657 f402
16	10034		VT1VT2	5	13	11	15	7	6	10	7	20	717577 611657 f417*
17	10035	10	VT1VT2	4	11	10	9	6	6	10	7	20	717557 611657 f404
18	10041	11	VT1VT2	5	9	10	11	7	6	6	6	44	317575 611757 c785
19	10050	12	VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305457 611642 c47
20	10051		VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305457 611642 c47
21	10054	13	VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305057 611642 f526**
22	10064	14	VT1VT2	5	11	9	12	9	6	10	7	25	317557 611657 f634
23	10067		VT1VT2	5	11	9	12	9	6	10	7	25	317557 611657 f634

\*:one band differ. from f402    \*\*:one band differ. from c47

考 察

0157 株を 3 種の分子疫学的手法を用いて解析し、感染事例間の関連性を見てみると、0157 家族内事例 9 で分離された 2 株は、IS コード、PFGE では 1band differ. であり、MLVA では全ての RN が一致したことから、同一由来株であると考えられた<sup>1,2,3)</sup>。

また 0157 家族内事例 12 と散発事例 13 の 3 株は、IS コード、PFGE で 1band differ. であり、MLVA では全ての RN が一致したことから、上記事例 9 と同様に同一由来株であることが考えられた。0157 家族内事例 12 の患者と散発事例 13 の患者は同じ小学校の同学年であり、発症時期も近かったが、共通の感染源を特定することはできなかった。これらの結果から、IS コードと併せて MLVA の解析結果を検討することで、迅速に事例間の関連性を推察することができた。

一方で 0157 家族内事例 9 と散発事例 10 は、疫学的に発症時期や年齢等から同一感染源であることが疑われ、また分離された 3 株は IS コードが類似しており、PFGE では 3~4band の違いで類似度が 91.35% と、ほぼ同一株と判断できる値であった。一方で MLVA では 5 か所の RN が 1~6 異なっていた。MLVA の RN は、環境によって短期間で大きく変異

することも考えられ<sup>4)</sup>、どの程度の違いまでを同一株の変異とするか共通の見解が得られていない。PFGE や IS-printing でも同様であり、今後さらなる疫学情報をふまえた解析や実験による検討が必要である。

PFGE では血清型ごとに類似のクラスターに分かれ、その中で事例ごとに区別することができた。

0157 以外の血清型では、026 家族内事例 2 と 3、また 0121 家族内事例 3 と散発事例 4 のほかに異なる事例間で類似したパターンになることはなかった。026 家族内事例 2 と 3 は同時期の発生であったが、共通する感染源の特定はできなかった。0121 家族内事例 3 と散発事例 4 は同時期の発生であり、また患者が保育園の同じクラスであったため、同一感染源の可能性が示唆されたが感染源の特定には至らなかった。

0157 以外の血清型による事例も増加していることから今後他の血清型でも迅速に解析できる方法を検討していく必要がある。

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部 寺嶋淳先生に深謝いたします。

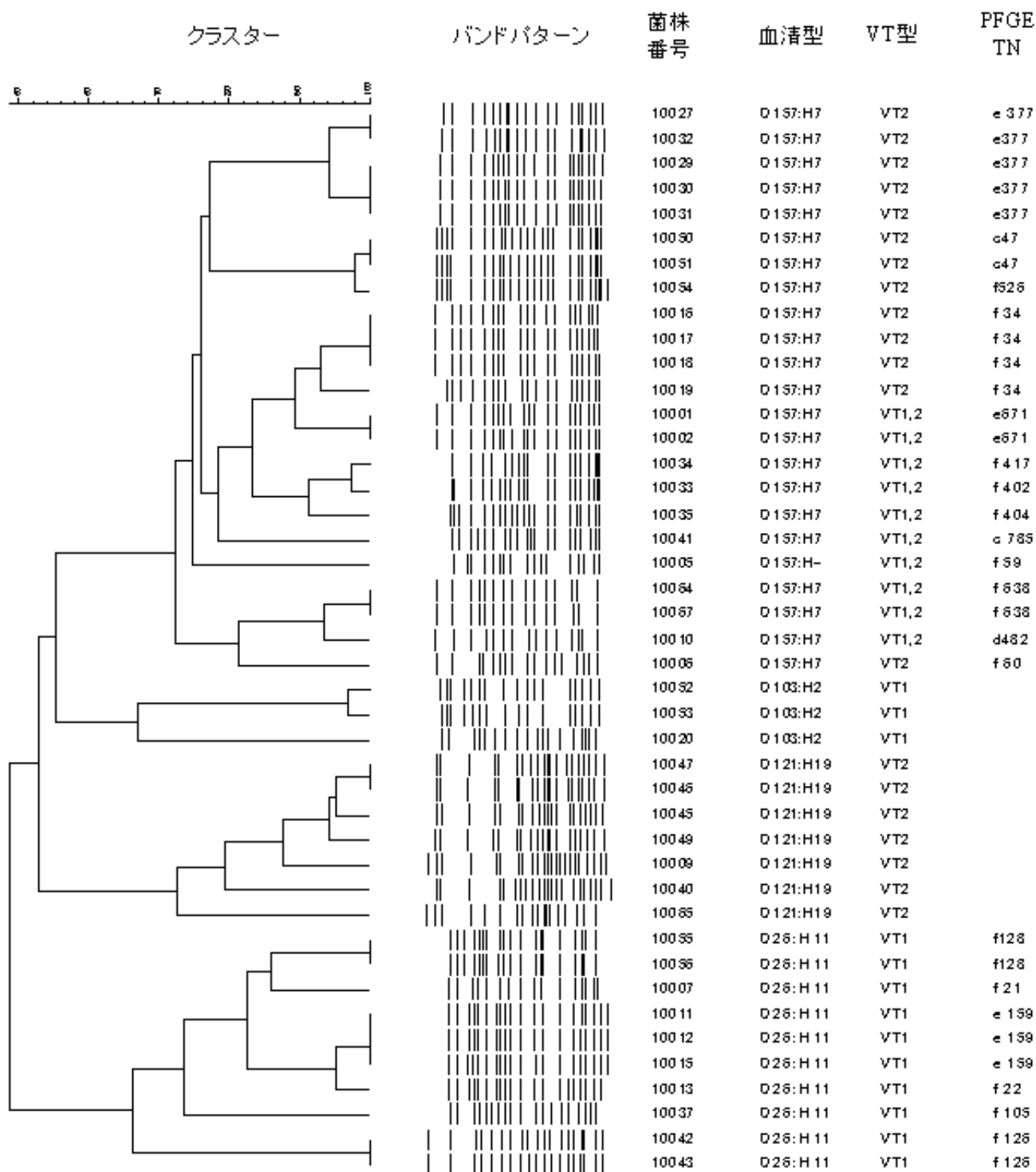


図1 PFGE クラスタとバンドパターン

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) Tadasuke O., et al. : Development of a Multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol.*, Sept., 2888-2894, 2009
- 3) Noriyo Y., Yoshitoshi O., Tetsuya H., et al. : Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile Changes Resulting from Spontaneous Chromosomal in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during Passage in Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:5719-5726, 2009
- 4) Michael B. C., Diana C., Kimberly N., et al. : Effects of Environmental Stress on Stability of Tandem Repeats in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:3398-3400, 2010