

2011年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 0157:H7 の分子疫学的解析

田内 敦子 京塚 明美 築地 裕美 井澤 麻由
佐藤 真帆 国井 悦子*¹ 坂本 綾 伊藤 文明*²
橋本 和久*³

2011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 0157:H7 感染症事例 15 件 19 株について、分子疫学解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動法、IS-printing system[®]法、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis の3種を実施し、3法間の比較および感染事例間での疫学的関連性について検討した。その結果、同一感染源である可能性の高い家族内事例の菌株は3法で結果がほぼ一致したが、PFGE で類似度の高いクラスターに分類されていても、MLVA や IS-printing では違う結果になったものもあったことから、3法の結果がほぼ一致していなければ同一感染源であるとはいえないことが示唆された。集団事例や散発事例間の関連性を調べる上での分子疫学解析は、初めに結果が早く出る MLVA、IS-printing を行って関連性を検討し、さらに PFGE でより可能性を高めていくというように3法を使い分けることで、疫学調査への迅速なフィードバックもでき、感染源の特定により有効であると考えられる。

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、感染拡大を防ぐとともに、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、今年度も広島市で発生した EHEC 0157:H7 を解

析し、感染事例間での疫学的関連性の評価への有用性の検討を進めた。

方 法

1 供試菌株

2011年3月から11月までに広島市で分離された EHEC 0157:H7 19 株を用いた。事例と菌株の関係は表 1 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

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) および Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い、Hyttia-Trees¹⁾ からの 9 カ所の VNTR 領域について解析を行った。Fragment

*1: 現 健康福祉局食肉衛生検査所

*2: 現 南区役所厚生部健康長寿課

*3: 退職

表 1 事例概要と分離菌株の毒素型

事例	菌株番号	診断の種類	発症年月日	性別	年	当該者職業	VT 型
1	11001	患者	20110312	男	11	小学生	VT2
2	11003	患者	20110519	男	41	クレーン車運転	VT2
3	11005	患者	20110520	女	18	専門学校生	VT2
4	11007	患者	20110524	男	46	税理士	VT2
5	11011	患者	20110603	男	11	小学生	VT2
6	11012	患者	20110606	男	23	大学生	VT1VT2
7	11013	患者	20110623	男	53	会社員	VT1VT2
8	11016	患者	20110720	男	9	小学生	VT1VT2
9	11018	患者	20110727	女	64	無職	VT1VT2
10	11020	患者	20110801	男	22	会社員	VT1VT2
11	11021	患者	20110803	女	73	無職	VT1VT2
12	11022	患者	20110813	女	7	小学生	VT1VT2
	11023	無症状病原体保有者		男	40	塗装業	VT1VT2
	11024	無症状病原体保有者		女	32	一般事務	VT1VT2
13	11027	患者	20110830	男	3	保育園児	VT1VT2
	11026	患者	20110901	女	16	高校生	VT1VT2
	11025	患者	20110903	男	51	工場の管理職	VT1VT2
14	11034	患者	20111004	男	3	幼稚園児	VT2
15	11037	患者	20111117	男	24	無職	VT1VT2

表 2 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	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	
Mix3	K-10	Forward	FAM	CAGCCTCCTGCAAACTTTACTGTTCATTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATCATTTGAATGAACAACCCATTTC

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、上記と同じシーケンサーを使用して、一部の検体について PCR 産物のシーケンス解析を行って確認した。プライマーと蛍光標識については表 2 のように設定した。

4 IS-printing System 解析

IS-printing は 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、平成 19 年度の本研究において近畿ブロックが実施した方法に準拠し、処理した。すなわち、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桁で表わしてISコードとした。

結 果

1 3法比較

MLVA RN, ISコードおよび感染研 PFGE TNを表3に、PFGE クラスタとバンドパターンを図1に示した。

(1) 家族内事例

家族内感染したと思われる事例12で分離された菌株(11022~11024)は、MLVA RN, ISコードおよび感染研 PFGE TN 全てで結果が一致し、当所で行ったPFGEでも1bandの違いで類似度は95%であった。

もう一つの家族内事例13(11025~11027)でも、MLVA RN および ISコードの結果が一致し、感染研 PFGE TN および当所 PFGE では1 band 違いで類似度97%であった。

(2) 散発事例

5月後半から6月初めにかけて発生した散発事例2~5で分離された菌株(11003, 11005, 11007, 11011)は、11011のMLVA RNがK10で1違ってい

たが、その他の結果は全て一致した。

散発事例9および11で分離された菌株(11018, 11021)と家族内事例12(11022~11024)で分離された菌株は、PFGEでは1~2bandの違いで類似度95%以上であったが、MLVA RN および ISコードはそれぞれ異なっていた。また散発事例15の菌株(11037)についても、11018, 11021, 11022~11024とPFGEで類似度92%であったが、MLVA RN および ISコードは違っていた。

考 察

同一感染源であると推察される家族内事例12および13では、それぞれ3法ともほぼ結果が一致していた。過去の結果も同様の傾向にあり^{2,3)}、3法で結果がほぼ一致していれば感染源が同じである可能性はかなり高いことが示唆された。

一方で、PFGEのクラスタ解析で比較的高い類似度で分類された菌株でも、MLVA RN や ISコードは違った結果になった。これまでの結果も併せると、3法での結果が全て、ほぼ一致していなければ同一感染源であるとは言えず、集団事例や散発事例間の関連性を調べる上での分子疫学解析は、それぞれの方法の迅速性、簡便性等特性を考え使

表3 分離菌株のMLVA RN, ISコードおよびPFGE TN

菌株 番号	事例	VT型	MLVA RN										ISコード	PFGE TN	
			K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10				
1	11001	1	VT2	4	6	7	-	7	9	11	8	-	012057	214442	g28
2	11003	2	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057	311652	c374
3	11005	3	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057	311652	c374
4	11007	4	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057	311652	c374
5	11011	5	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	26	345057	311652	c374
6	11012	6	VT1VT2	5	10	10	11	8	6	7	7	40	106577	201657	g52
7	11013	7	VT1VT2	5	10	10	11	6	6	6	6	33	307575	211757	e570
8	11016	8	VT1VT2	3	11	9	13	7	7	11	8	30	717575	611657	-
9	11018	9	VT1VT2	5	13	11	15	7	6	11	11	25	717577	611657	c272
10	11020	10	VT1VT2	6	14	9	15	7	4	12	6	25	613575	610446	g233
11	11021	11	VT1VT2	9	13	11	9	7	6	3	6	32	715577	611257	g235
12	11022		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557	611657	g236
13	11023	12	VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557	611657	g236
14	11024		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557	611657	g236
15	11027		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557	611657	g450
16	11026	13	VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557	611657	g449*
17	11025		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557	611657	g450
18	11034	14	VT2	5	5	7	-	5	9	8	5	-	012057	214443	f740
19	11037	15	VT1VT2	5	12	10	5	7	6	9	6	27	713557	610457	g167

*: one band diffr. from g450

い分けを行うことが必要であると考えられる。具体的には、MLVA や IS-printing は最短でほぼ1日で解析結果が得られるので、関連性に関する情報を早く知る上ではこれらの方法を実施する。結果が違っていれば同一感染源である可能性をほぼ否定でき、一致していれば同一感染源である可能性が高いため、疫学調査担当に結果を速報すると同時に PFGE を行い、並行して性状試験や薬剤感受性試験などで総合的に判断するという形である。特に散発事例間で関連性が高いことが早く分かれば、聞き取り等のより詳細な疫学調査が迅速に行えるため、感染源の追及には有用性が高い。

事例間の疫学的関連性については、散発事例 2~5 で 3 法の結果がほぼ一致していたため、同一感染源であることが疑われた。これらの事例は発生時期が比較的近かったものの、患者の年齢、職業、生活区域は異なっていた。保健所の喫食調査によると、唯一の共通事項は肉の喫食であり、事例 5 ではバーベキューだったがその他ではレバ刺し等の生食が確認されていた。しかし一部患者の調査協力が得られなかったため、肉の流通ルート等さらなる遡り調査はできず、感染源の特定には至らなかった。MLVA, IS-printing の結果が出た

時点で疫学調査担当に同一感染源の可能性を情報提供できれば、さらに踏み込んだ調査により感染源を追究できた可能性もあり、今後迅速な結果のフィードバックとそれを生かした追加調査を行う等の体制の構築が課題である。

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。

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 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157(STEC O157). Foodborne pathog.dis.,3,118-131(2006)
- 2) 末永朱美 他: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)
- 3) 末永朱美 他: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)

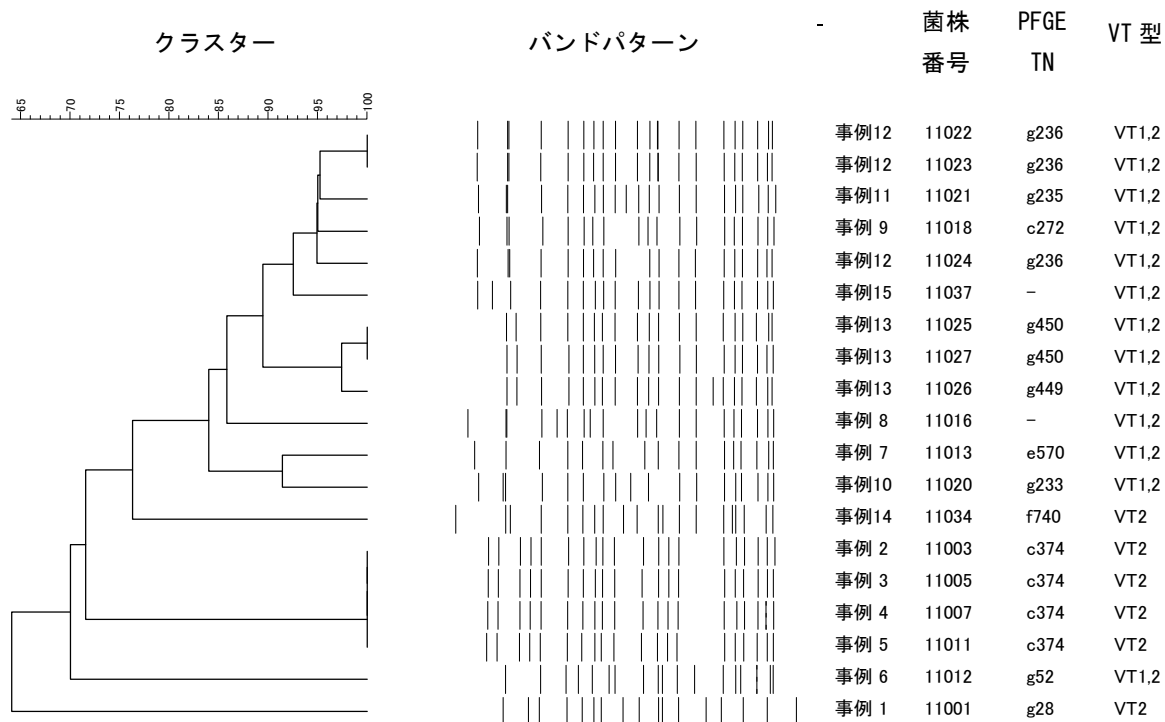


図 1 PFGE クラスターとバンドパターン