

腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学的解析結果の比較

田内 敦子 築地 裕美 佐多 俊子 児玉 実
石村 勝之

2012年5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 感染症事例 8 件 10 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 (PFGE), IS-printing system[®]法, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) の 3 種を実施し、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、集団感染が疑われた 1 事例は感染源の特定には至らず、その他の散发事例も関連性は低いと考えられた。また、2006~2012 年に広島市で分離された EHEC 0157 139 株の 3 法での解析結果を比較検討したところ、IS-printing や PFGE では、株間の結果が一致していても他の 2 法での結果が異なるケースがみられたが、MLVA の結果が完全一致していると他の 2 法の結果はほぼ一致しており、散发事例間の関連性を検討する上での MLVA の有用性が示唆された。

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、2012 年に広島市で発生した EHEC 0157 感染事例間での疫学的関連性を検討した。さらに 2006~2012 年までの分離菌株の解析結果を用いて、3 法間の型別能についての比較を行った。

方 法

1 供試菌株

2012 年 5 月から 11 月までに広島市で分離された EHEC 0157 10 株を用いた。事例と菌株の関係は表 1 に示した。また、3 法間の型別能を比較するため、2006 年から 2011 年までに広島市で分離された EHEC 0157 129 株の解析結果も用いた¹⁾⁻³⁾。

表 1 2012 年の事例概要と分離菌株の血清型および毒素型

事例	菌株番号	血清型	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	VT 型
1	12002	0157:H7	20120519	女	38	パート (飲食以外)	VT2
	12020	0157:H7	20120622	女	43	介護職員	VT1VT2
2	12021	0157:H7	20120625	男	84	無職	VT1VT2
	12022	0157:H7	20120626	男	91	無職	VT1VT2
3	12023	0157:H7	20120802	男	10	小学生	VT1VT2
4	12024	0157:H7	20120811	女	66	事務職	VT1VT2
5	12025	0157:H7	20120917	男	70	無職	VT2
6	12026	0157:H7	20120924	女	68	薬剤師	VT1VT2
7	12032	0157:HNM	20121024	男	11	小学生	VT1VT2
8	12033	0157:H7	20121028	男	39	会社員	VT2

2 PFGE 解析

制限酵素 *Xba*I を用い、感染研で示された方法に準拠し、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)により系統樹を作成した。また、感染研で型別された結果を 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、Hyytia-Trees⁴⁾ らの 9 ヶ所の VNTR 領域について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver. 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。

4 IS-printing System 解析

IS 法は 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、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 2012 年分離菌株の解析結果

2012 年に分離された菌株の MLVA RN, IS コードおよび感染研 PFGE TN を表 2 に、PFGE クラスタとバンドパターンを図 1 に示した。

表 2 2012 年分離菌株の 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	12002	1	VT2	4	24	7	10	6	8	-	10	35	345457	311652	g255
2	12020		VT1VT2	5	14	9	6	7	4	12	6	26	613157	610446	g332
3	12021	2	VT1VT2	5	14	9	6	7	4	12	6	27	613157	610446	h81*
4	12022		VT1VT2	5	14	9	6	7	4	12	6	26	613157	610446	g332
5	12023	3	VT1VT2	5	11	9	7	7	5	6	7	35	317575	211756	h115
6	12024	4	VT1VT2	5	9	10	10	7	6	6	6	39	317577	211756	h128
7	12025	5	VT2	5	16	7	6	4	7	9	6	34	305457	211642	h325
8	12026	6	VT1VT2	5	14	9	14	8	6	9	7	6	717577	211657	h330
9	12032	7	VT1VT2	3	20	9	5	11	7	4	4	23	310457	110416	h368
10	12033	8	VT2	4	-	7	11	3	5	7	7	21	145047	103443	g591

*: one band diffr. from g332

(1) 集団感染疑い事例

事例 2 で分離された菌株(12020~12022)は、12021 の MLVA RN が K10 で他の 2 株と 1 リピート違い、PFGE でも 1 band 違っていたが類似度は 97.44% であり、IS コードは 3 株で一致していた。

(2) 散発事例

8 月初めに発生した事例 3 で分離された菌株(12023)と事例 5 で分離された菌株(12024)は、PFGE で 1 band 違いの類似度 97.30% であったが、MLVA RN および IS コードが違っていた。その他の事例間で結果が一致したものはなかった。

2 3 法間の型別能の比較¹⁾⁻³⁾

(1) IS コードを軸にした比較

図 2 に示すように、2006~2012 年の分離株の中で、IS コードが一致していても PFGE バンドパターンや MLVA RN は異なっているケースがあった。

(2) MLVA RN を軸にした比較

図 2 および図 3 に示すように、2006~2012 年の分離株において、MLVA RN が 9 ヶ所の領域全てで一致したものは、PFGE バンドパターンが 1~2band 違いの類似度 95% 以上、IS コードは 2 例(10033 と 10034, 10050 および 10051 と 10054)を除いて一致していた。

(3) PFGE バンドパターンを軸にした比較

2006~2012 年の分離株において、PFGE バンドパターンの類似度が高いものでも、IS コードおよび MLVA RN が異なっているケースが多数存在した。

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

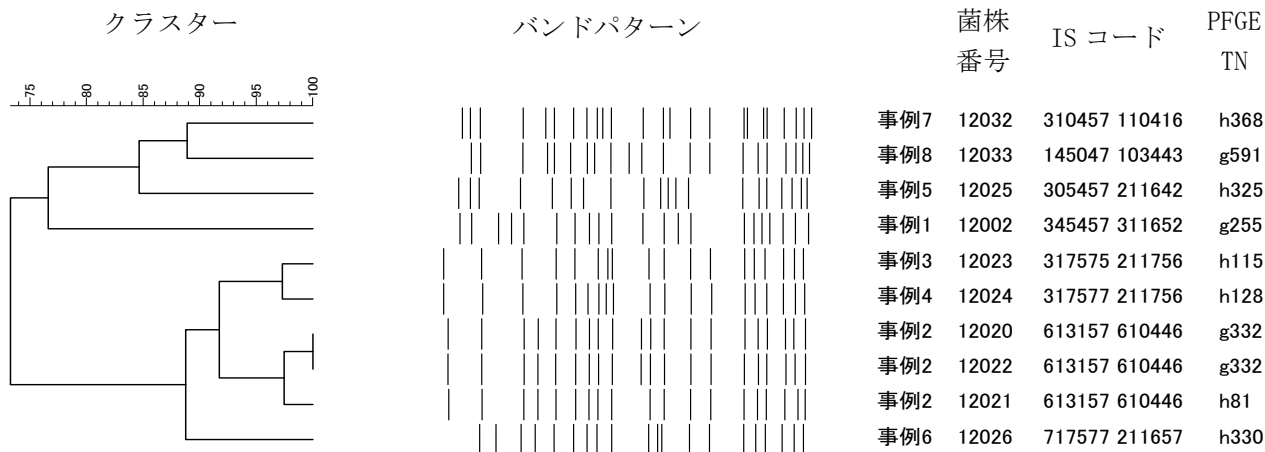


図1 2012年分離菌株のPFGEクラスターとバンドパターン

考 察

2012年の事例2は、同時期に併設する高齢者施設の入所者および施設内にあるデイサービスの職員から分離された菌株であり、3法全てで結果がほぼ一致していたため集団感染が疑われたが、保健センターや保健所の調査では3名に接触はなく、また施設内の給食施設に残されていた検食からも0157は検出されなかったため、感染源を特定することはできなかった。

その他の散発事例は、発生時期や発生場所、疫学調査でも共通するところはなく、関連性はないと考えられる。例年に比べ、2012年はEHEC発生件数が特に少なかったが、これは飲食店における牛生レバーの提供禁止も寄与しているものと思われる。また、家族内感染が1例もなく、保健センターによる患者、家族への衛生指導の効果が確実に現れていた。

2006～2012年までに広島市で分離されたEHEC 0157菌株の中で、家族内感染や共通食があるなどの同一事例内の株同士では、ISコードが一致していれば他の2法でも結果がほぼ一致していたが、事例間で比べると、ISコードが一致していてもPFGEバンドパターンが違い、さらにMLVA RNも異なっていたケースが5例あった。散発事例間の関連性をISコードのみでみる場合、疫学背景の検討はさらに重要になることが示唆された。

一方、MLVA RNが9領域で全て一致していた場合、家族又は集団事例内でも散発事例間でも、PFGEバンドパターンの類似度は高く、さらにISコードは2例を除き全て一致していたことから、MLVAは散発事例間の関連性をみる上で有用性が高いことが示唆された。しかし9ヶ所の領域のうち、1ヶ

所のみが1レポート違っていても、他の2法で結果がほぼ一致している例も存在することから、どの程度の違いまでが同一株と判断できる許容範囲であるか明確にしていくことが今後の課題である。

またPFGEバンドパターンの類似度が高くても、他の2法では違った結果になった例が多数みられたことから、3種の異なる分子疫学的解析法を用いることは事例間の関連性を判断する上で有意義である。

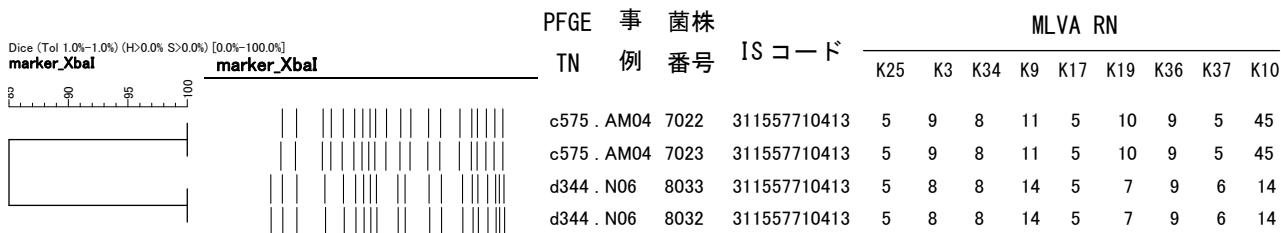
謝 辞

PFGE解析を実施していただいた国立感染症研究所細菌第一部 寺嶋淳先生に深謝いたします。

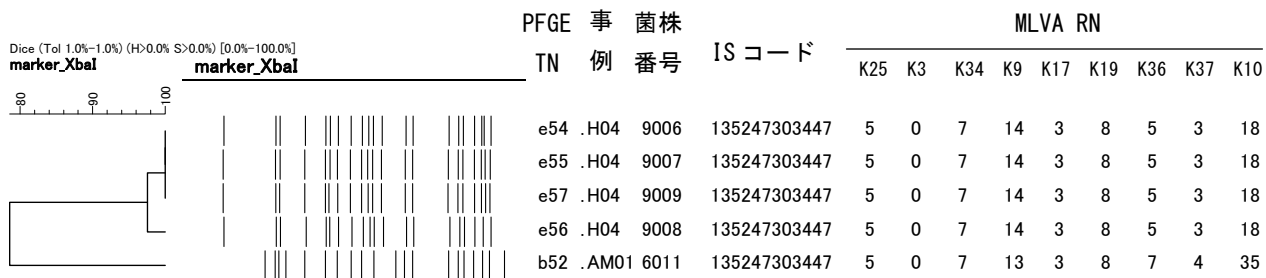
文 献

- 1) 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)
- 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22年度総括・分担研究報告書, 142～148(2011)
- 3) 田内敦子 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23年度総括・平成21～23年度総合研究報告書, 121～125(2012)
- 4) Hyttia-Trees E 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)

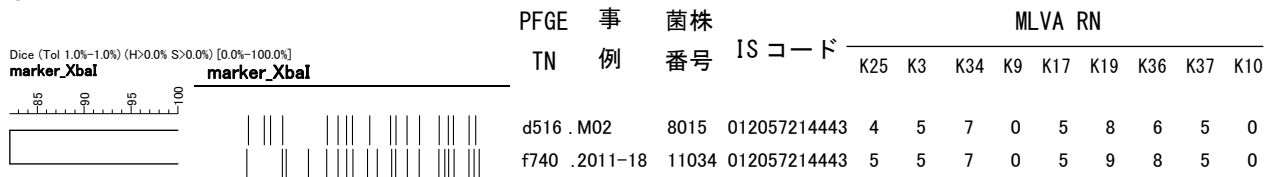
① ISコード：311557710413



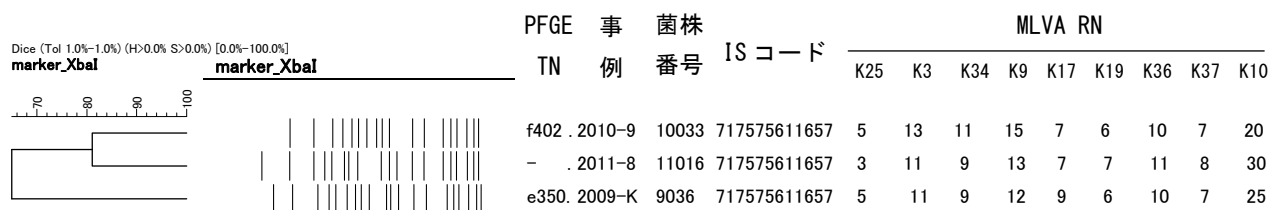
② ISコード：135247303447



③ ISコード：012057214443



④ ISコード：717575611657



⑤ ISコード：717577611657

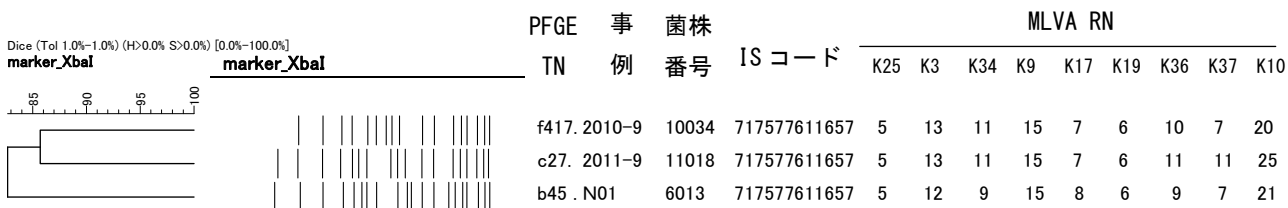


図 2 同一 ISコード菌株の PFGE クラスタおよび MLVA RN

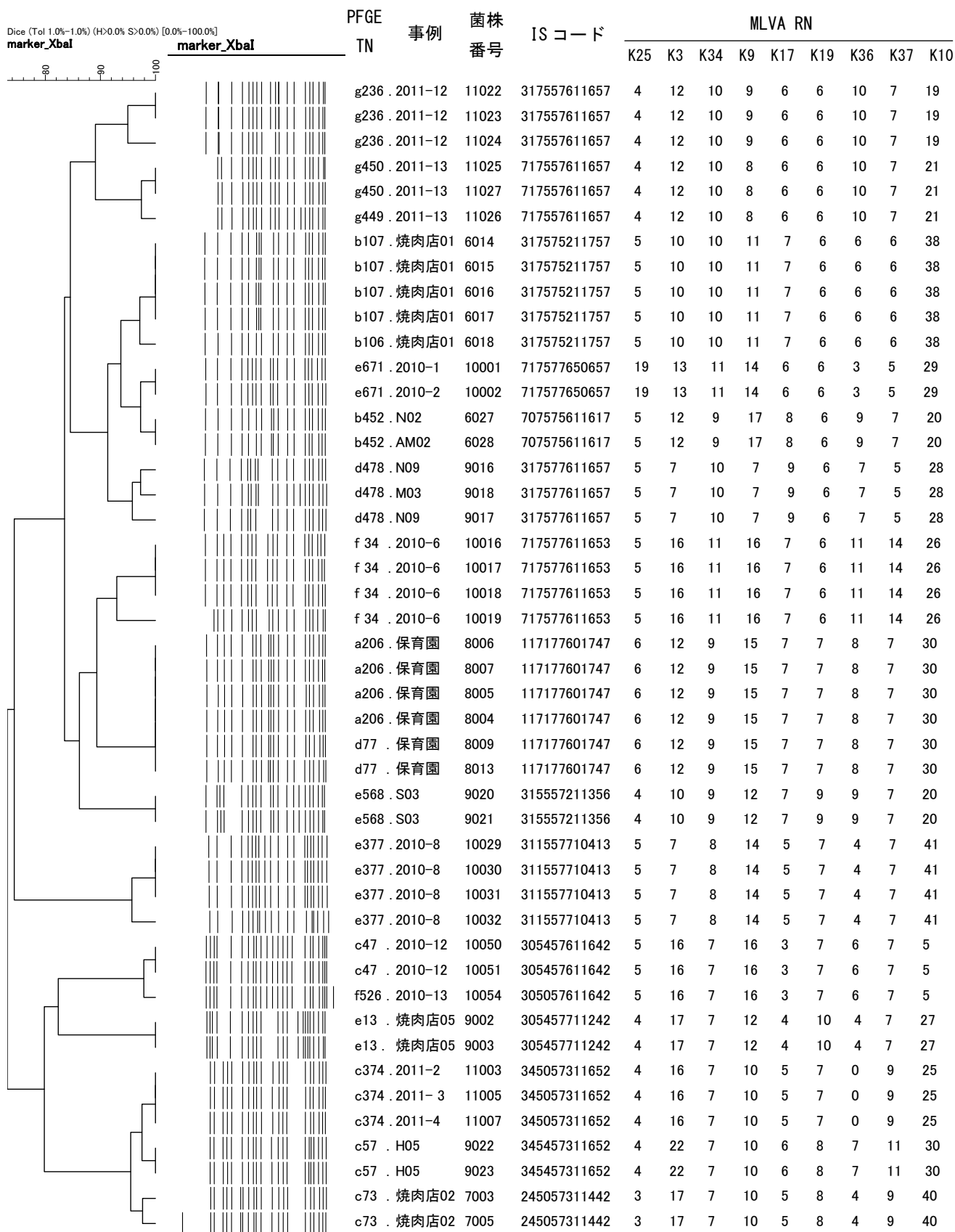


図3 同一 MLVA RN 菌株の PFGE クラスターおよび IS コード