

資料

広島県内で分離された腸管出血性大腸菌O157, O26の MLVAによる比較解析 (2013-2017年)

平塚 貴大, 秋田 裕子, 増田 加奈子, 寺内 正裕

Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and O26 isolated from 2013 to 2017 in Hiroshima prefecture

TAKAHIRO HIRATSUKA, HIROKO AKITA, KANAKO MASUDA and MASAHIRO TERAUCHI

(Received October 25, 2018)

2013年から2017年までの間に分離された腸管出血性大腸菌のうちO157とO26についてMulti-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を実施し、株間でMLVA型と疫学情報の比較を行った。同一菌株による集団感染が明らかとなっている事例で分離された株のMLVA型は、ほぼすべての事例で2領域以内の差であったが、同一事例由来の株間で3領域異なる場合があった。これらの株について各領域のリピート数を比較したところ、プラスミドの保有状況の違いによりリピート数が変化したことが考えられた。また、関連性のみられなかった株間のMLVA型が類似し、それらの疫学情報を比較すると、発生地や発生時期などの共通の項目がみられる場合があった。今回の結果から、MLVAが疫学的に関連のある集団感染の証明手段として有用であること、また、疫学的に関連性が不明であってもMLVAの結果から改めて集団感染を疑うための手がかりとなることが示された。

Key words : 腸管出血性大腸菌, O157, O26, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis, Minimum Spanning Tree

緒 言

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、ベロ毒素 (VT) を産生、またはVT遺伝子を保有するEHECの感染によって起こり、主訴は腹痛、水溶性下痢、血便である。重症例では消化器症状だけではなく、血小板減少、溶血性貧血、急性腎不全を伴う溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症する場合もある [1, 2]。

EHEC感染症は、感染症法により三類感染症に指定され、診断した医師は保健所に全数届出を行うこととなっている。これにより、国内では毎年3,000~4,000の届出がされている [1]。全国の地方衛生研究所からの報告によると、EHEC全検出数におけるO血清群の割合は、2017年はO157が53.8% (908/1,689) と最も多く、次いでO26が25.3% (427/1,689) と上位2つの血清型が全体の約8割を占めている。次いでO103, O121, O111, O91, O145が続き、それぞれの占める割合は数%である [1]。

EHEC感染症では、菌が付着した食材が広域に流通することによって、同一菌株による感染が全国で散発的

に発生することが問題となっている。各地で発生したEHEC感染症の把握と、原因となったEHECの性状の比較を行うことは容易ではなく、このような広域の集団感染を早期に探知することは困難であった。このような状況を受け、2018年2月の厚生労働省通知 (健感発0208第1号及び薬生食監発0208第1号) により、分離した全てのEHECについてMulti-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を用いて遺伝子型別を行うことが示され、それ以後MLVAの解析結果を共有する全国的なシステムが構築された。この通知の中で検査可能な施設については自施設でMLVAを実施する体制を整えることとされている。そこで今回、MLVAによる検査の体制整備の一環として、基盤情報の集積を目的に、過去5年間に分離されたEHECのうち、O157, O26のすべての株についてMLVAを行った。

材料及び方法

1 供試菌株

2013年から2017年までの間に県内で分離され、当セン

ターに搬入されたEHECのうち、血清型がO157であった70株、O26であった62株を使用した。

2 MLVA

供試菌株から熱処理 (95°C /10分) によってDNAを回収し、Izumiyaら [3] の方法に従い、O157-10を除いた17か所の領域について解析した。すなわち、QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて各検体2セットのPCR反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) およびGene Mapper Software 5 (Applied biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。Fragment size markerはGeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied biosystems) を使用した。なお、フラグメント解析によりピークが認められない場合は、「-2」とした。得られた17領域のリポート数の集合をMLVA型とし、これを使用してBioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) でMinimum Spanning Tree (MST) を作成した (図1, 2)。

結 果

1 O157の比較解析

O157のMLVAの結果から作成したMSTを図1に示した。17領域中、1領域のリポートが異なる場合をSingle Locus Variant (SLV)、2か所異なる場合をDouble Locus Variant (DLV)、3か所異なる場合をTriple Locus Variant (TLV) としてそれぞれを線の形状で示

した。また、疫学情報などから既に同一菌株による集団感染が明らかとなっている事例から分離された株については、事例ごとに区別して示した。他の事例との関連性が明らかになっていない、散発事例から分離された株については白色で示した。

同一の集団事例で分離された株同士は、リピート数が異なる領域の数が1つ以内であった。その一方で、散発事例や複数の集団事例で分離された株間のMLVA型が、2領域以内の差で、非常に類似しているものが存在した (図1: A~H)。これらについて疫学情報を比較し、同一の菌株による感染を疑わせる情報があるか検討を行った (表1)。Gグループには2例の集団事例と、1例の散発事例から分離された菌株が含まれていたが、これらの株はすべてF地域から、2013年6月中旬から7月上旬までというほぼ同時期に分離された菌株であった。他のグループについては、すべての株で共通する情報はなかったが、Cグループの16-18, 19と16-20において発生地域と届出日及び患者の年齢がほぼ一致するなど、グループ内の一部の株間で、共通項を有しているものが存在した。

2 O26の比較解析

O26のMLVAの結果から作成したMSTを図2に示した。図の表記方法はO157と同様である。

MSTをみると、線で繋がれた株がO157より多く見受けられ、これらの株と、最も近いMLVA型を示す株との差が3領域以内であることが分かった。O157の解析

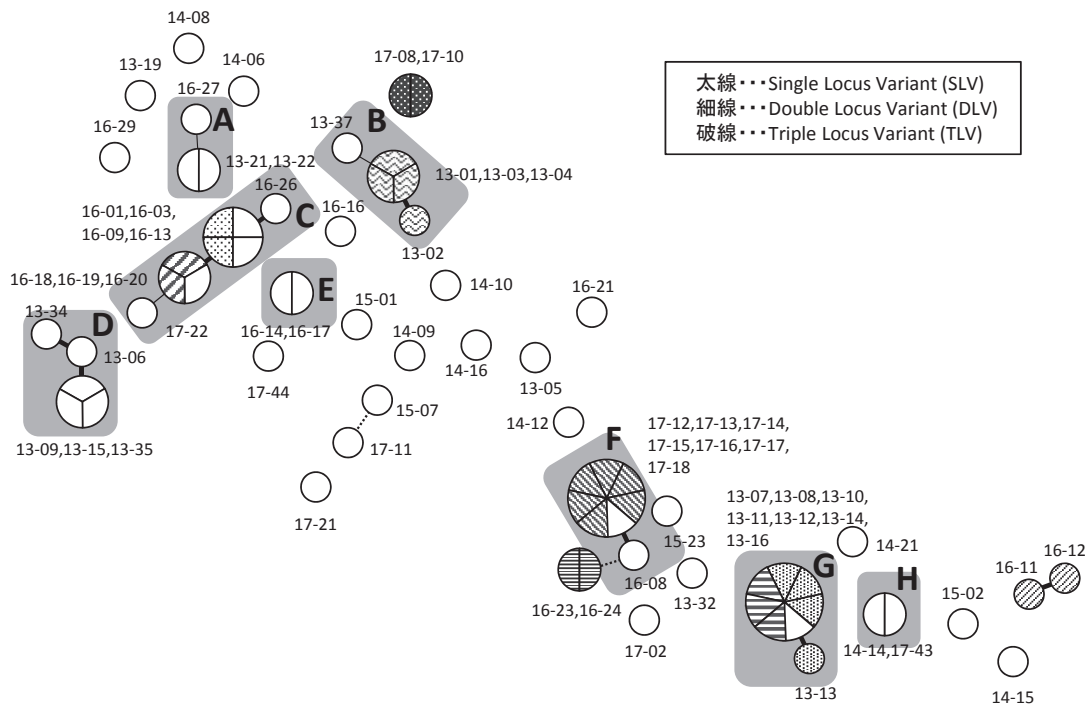


図1 O157のMST

表1 疫学情報の比較 (O157)

A								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-21	F	2013/8/7	11	男	O157:H7	+	+	
13-22	F	2013/8/13	2	女	O157:H7	+	+	
16-27	F	2016/9/28	78	女	O157:H7	+	+	
B								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-01	F	2013/1/12	63	女	O157:H7	+	+	13B
13-03	F	2013/1/16	11	男	O157:H7	+	+	13B
13-04	F	2013/1/16	14	男	O157:H7	+	+	13B
13-02	F	2013/1/17	41	女	O157:H7	+	+	13B
13-37	EF	2013/10/29	32	男	O157:H7	+	+	
C								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
16-01	EF	2016/5/16	38	女	O157:H7	+	+	
16-03	F	2016/5/11	77	男	O157:H7	+	+	
16-09	N	2016/8/3	6	女	O157:H7	+	+	16C
16-13	EF	2016/8/12	67	女	O157:H7	+	+	16C
16-18	F	2016/8/23	77	男	O157:H7	+	+	16D
16-19	F	2016/8/26	72	女	O157:H7	+	+	16D
16-20	F	2016/8/26	67	女	O157:H7	+	+	
16-26	EF	2016/9/20	22	男	O157:H7	+	+	
17-22	F	2017/8/23	15	男	O157:H7	+	+	
D								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-09	E	2013/6/27	41	男	O157:H7	+	+	
13-15	F	2013/7/4	11	男	O157:H7	+	+	
13-35	F	2013/10/8	21	男	O157:H7	+	+	
13-34	F	2013/10/3	3	女	O157:H7	+	+	
13-06	F	2013/4/16	8	女	O157:H7	+	+	
E								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
16-14	K	2016/8/20	37	女	O157:H7	+	+	
16-17	F	2016/8/21	13	男	O157:H7	+	+	
F								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
17-12	WE	2017/8/17	17	女	O157:H7	-	+	
17-13	E	2017/8/15	3	男	O157:H7	-	+	17A
17-14	E	2017/8/18	1	女	O157:H7	-	+	17A
17-15	E	2017/8/18	8	男	O157:H7	-	+	17A
17-16	E	2017/8/19	10	男	O157:H7	-	+	17A
17-17	E	2017/8/20	5	男	O157:H7	-	+	17A
17-18	N	2017/8/23	17	男	O157:H7	-	+	17A
16-08	F	2016/7/13	35	女	O157:H7	-	+	
G								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-07	F	2013/6/13	78	男	O157:H7	-	+	13C
13-08	F	2013/6/18	80	女	O157:H7	-	+	13C
13-10	F	2013/6/28	13	女	O157:H7	-	+	13A
13-11	F	2013/6/29	7	女	O157:H7	-	+	13A
13-12	F	2013/6/29	91	女	O157:H7	-	+	13C
13-14	F	2013/7/1	27	女	O157:H7	-	+	
13-16	F	2013/7/5	16	男	O157:H7	-	+	13A
13-13	F	2013/7/1	45	女	O157:H7	-	+	13A
H								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
14-14	F	2014/8/8	75	女	O157:H7	-	+	
17-43	F	2017/9/27	2	男	O157:H7	-	+	

結果と比較するとMLVA型が全体的に似ている傾向にあった。

同一の集団事例で分離された株のMLVA型の差は、多くの場合2領域以内であったが、MLVA型が3領域異なる集団事例が存在した(図2:※, 表2)。この事例について各菌株のMLVA型を比較してみると、EHC-2, O157-37, EHC-6の3領域においてリピート数の多型がみられ、これにより同一の事例で分離された菌株のMLVA型が5種類に分かれていた。

O157と同様に、DLVの中で、散発事例や複数の集団事例で分離された株で構成されるもの(図2:A~E)について疫学情報の比較を行った(表3)。どのグループについてもグループ内のすべての株で共通する情報はなかったが、一部の株の間で、地域と届出日が一致する等の共通項を有しているものが複数存在した。

考 察

国立感染症研究所の示した分類では、MLVA型が完全に一致した株は同一の菌株、SLVは密接に関係している、DLVは関係する可能性がある、3以上は不一致と解釈することとされている。集団感染が疑われた株の解析の結果、一部を除きほぼすべての事例で2領域以内の差であったことは、MLVAの結果が、疫学情報を基に推定された集団感染の範囲内で整合性がとれたことを示しており、集団感染の特定にあたってMLVAによる解析が有効であることを示す結果となった。しかし、表2に示したように、同一の集団事例でも、MLVA型が3領域異なる場合があった。多型がみられた領域のうち、O157-37, EHC-6はプラスミド上に存在することが知られており[3]、17-30, 33はO157-37の領域を、17-30, 32, 33, 37はEHC-6の領域を保有していることがわかる。このプラスミドによる解析領域の保有状況の違いが、MLVA型に差が生じた1つの要因になったと考えられる。一般的にプラスミドの脱落や獲得は遺伝子の変異よりも生じやすく、今回の解析で見られたような、同一事例内でのプラスミドの保有状況の変化によるMLVA型の多様化という現象は今後も観察されることが考えられる。解析の際にはこのような現象について把握したうえで解析を行う必要がある。

関連性がみられない株間で、同一菌株の判断基準である、MLVA型の差が2領域以内であるものが存在した。これらの株の疫学情報を比較した結果、一部の株間で発生地域や時期などの共通する情報が存在した。この結果は、MLVAを行うことによって疫学情報のみでは捉えきれなかった集団感染の広がりを特定できる可能性を示している。つまり、MLVA型の比較結果をもとに、疫学情報を再度確認、あるいは追加の聞き取り等を行うこ

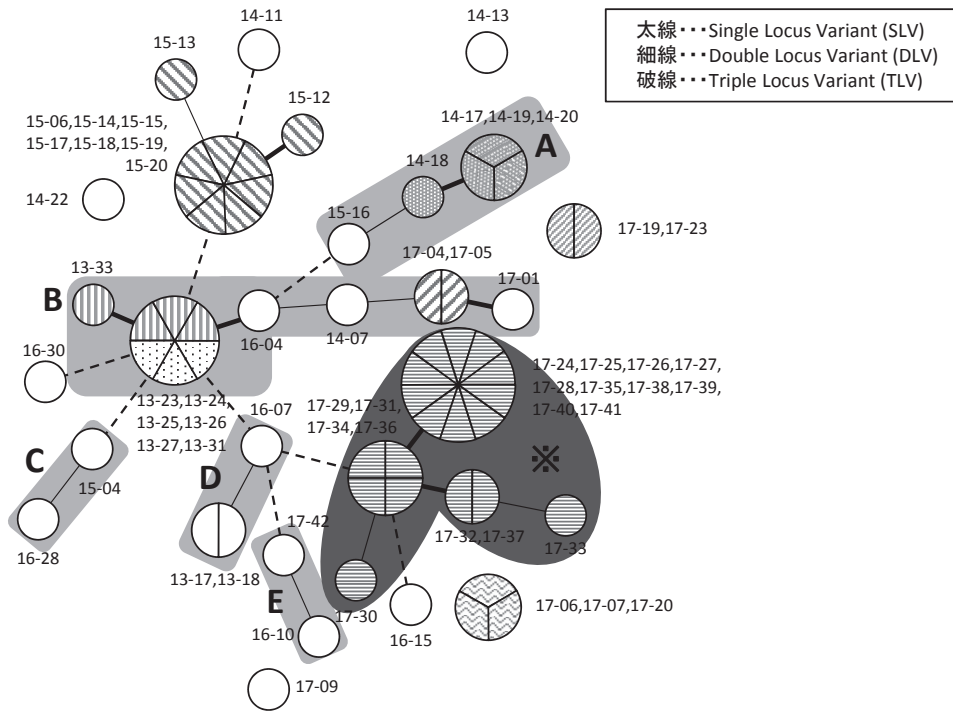


図2 O26のMST

表2 同一事例由来菌株のMLVA型比較

	O157 -3	O157 -9	O157 -25	O157 -34	EH157 -12	EH111 -11	EH111 -8	EHC -1	EHC -2	EHC -5	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37	EH26 -7	EH111 -14	EHC -6
17-24	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-25	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-26	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-27	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-28	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-35	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-38	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-39	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-40	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-41	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-29	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-31	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-34	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-36	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-32	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	7
17-37	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	1	7
17-30	-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	4	-2	1	19
17-33	-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	5	-2	1	7

とで、同一菌株による感染の広がりをより正確に把握できると考えられる。また、分離された地域の異なる株間でMLVA型が一致した場合、食品などに付着したEHECが広域に拡散したことによる感染の可能性を疑うことができる。このため、同一ロットの食品の使用規制などの全国的な対応を迅速に行うことも可能になると考えられる。

MLVAを行うに当たって注意しなければならないの

は、MLVAの結果のみで集団感染の特定は行えないという点である。株間のMLVA型が一致した場合でも、それらの株が同一菌株であるとは限らず、同一の株による集団感染であったとしても、MLVA型が一致しない場合がある。正確な把握には他の疫学情報との比較が必須であり、最終的にすべてに矛盾のない結果を導き出すことが重要である。

表3 疫学情報の比較 (O26)

A								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
14-17	WE	2014/9/20	2	男	O26:H11	+	-	14A
14-19	WE	2014/9/9	8	男	O26:H11	+	-	14A
14-20	WE	2014/9/12	5	女	O26:H11	+	-	14A
14-18	WE	2014/9/9	34	女	O26:H11	+	-	14A
15-16	WK	2015/9/3	15	女	O26:H-	+	-	

B								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-23	F	2013/8/10	5	男	O26:H11	+	-	13A
13-24	F	2013/8/14	29	女	O26:H11	+	-	13A
13-25	F	2013/8/14	1	女	O26:H11	+	-	13A
13-26	F	2013/8/20	3	男	O26:H11	+	-	13B
13-27	F	2013/8/23	27	女	O26:H11	+	-	13B
13-31	F	2013/8/28	1	女	O26:H11	+	-	13B
13-33	F	2013/9/1	27	女	O26:H11	+	-	13B
16-04	E	2016/6/9	7	男	O26:H11	+	-	
14-07	W	2014/7/22	27	女	O26:H11	+	-	
17-04	WE	2017/7/28	12	女	O26:H11	+	-	17A
17-05	WE	2017/7/31	43	女	O26:H11	+	-	17A
17-01	F	2017/4/18	18	男	O26:H11	+	-	

C								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
15-04	WH	2015/6/23	62	男	O26:H11	+	-	
16-28	F	2016/10/11	13	女	O26:H11	+	-	

D								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
13-17	W	2013/7/11	28	女	O26:H11	+	-	
13-18	W	2013/7/11	37	女	O26:H11	+	-	
16-07	F	2016/7/6	24	女	O26:H11	+	-	

E								
No	地域	届出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2	集団
16-10	北部	2016/8/3	4	女	O26:H-	+	-	
17-42	F	2017/9/15	27	女	O26:H11	+	-	

結 語

EHECにおけるMLVAによる解析は集団感染の解析において有効であること、また、疫学情報のみでは特定できない集団感染の解明の一助となることが示された。ただし、明らかに同一の集団事例でもMLVA型が3領域異なる場合もあり、MLVAのみの結果だけでは集団感染の特定には至らず、他の情報との比較が重要であると考えられた。

文 献

- [1] 国立感染症研究所. 腸管出血性大腸菌感染症2018年4月現在. 病原微生物検出情報. 2018;39(5):71-74.
- [2] 勢戸和子. *Escherichia coli*, STEC (志賀毒素産生性大腸菌). 仲西寿男, 丸山務監修. 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規出版;2009. p. 281-296.
- [3] Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H. 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*. 2010; 54: 569-577.