

山口県において平成 22 年度～平成 24 年度に発生した 腸管出血性大腸菌 O157 感染症分離菌株の分子疫学的検討

山口県環境保健センター
矢端順子, 亀山光博, 野村恭晴, 富永潔

Molecular Epidemiological Study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Isolates from April 2010 to March 2013 in Yamaguchi Prefecture

Junko YABATA, Mitsuhiro KAMEYAMA, Yasuharu NOMURA, Kiyoshi TOMINAGA
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

腸管出血性大腸菌(EHEC)O157(O157)の分子疫学的解析は、従来からパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析が行われてきたが、近年これに加えて、迅速かつ簡便に検査できることから、IS-Printing system (IS)法が、集団発生事例や広域事例などで利用され始め、データベースの構築も行われている¹⁾。また、国立感染症研究所細菌第一部では、わが国において広域に分離された同一 PFGE タイプの O157 について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法による、より詳細な解析が行われている²⁾³⁾⁴⁾。

今回我々は、より精度の高い O157 の分子疫学解析の実施を目的として、平成 22 年度～24 年度に山口県で分離された O157 について、MLVA 法と IS 法による解析を行い、これらの結果に PFGE 解析と疫学的関連性とのリンクさせて分析・検討した。

材料及び方法

1 供試菌株

供試菌株は、平成 22 年度～平成 24 年度に、O157 の患者及び無症状病原体保有者(感染者)から分離された 90 株とした。

2 方法

(1) 疫学的関連性

疫学的関連性については、供試菌株の対象者について、管轄の各環境保健所等(保健所)の実施した積極的疫学調査の結果及び病原体検査依頼票により分析した。

(2) 分子疫学的解析

1) IS 法

IS-printing system[東洋紡]を用いて実施した。解析は、1st set, 2nd set とともに陽性コントロールに含まれる 18 本のバンドの増幅を調べ、増幅された場合は 1、されない場合は 0 と表記した 18 桁の数字の列を作成し、3 つ区切りの 6 グループとし、各グループの 3 つの数字について 1 の数字には、各々 1, 2, 4 の数値を付与し、さらにそれを合計したものを順番に並べた 6 桁の数値コードをプロファイルコードとした。

2) PFGE

国立感染症研究所に菌株を送付、検査を依頼し、付与されたサブタイプ名を PFGE タイプとして使用した。なお、PFGE タイプが異なるもののうち、1 バンドないしは 2 バンドの違いによるものは、同一タイプとみなして「/」で区切り併記した。

3) MLVA 法

国立感染症研究所細菌第一部作成の MLVA プロトコル(2008 年 7 月現在)にしたがって、9 か所の locus (25,3,34,9,17,19,36,37,10)について解析を行った。

Fragment 解析は、3500 Genetic Analyzer および Gene Mapper ver.4.1 [Applied Biosystems]を使用した。

Fragment size marker は、GeneFlo 625 DNA Ladder(ROX Label)[コスモバイオ]を使用した。解析結果を検証するため、代表的な flagment について、Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit[Applied Biosystems]を用いて

シーケンスを実施し、各 locus のリピート数を確認した。なお、Flagment 解析でピークが認められず、かつアガロースゲル電気泳動でバンドの増幅のなかった locus については「null」と表記した。

結果及び考察

1 疫学的関連性の認められた事例

2 年間に発生した事例を分析した結果、疫学的関連性があると判断された事例は 15 事例であった。

2 PFGE タイプの一致した事例

PFGE タイプの一致した菌株では、55 株が 15 のクラスターを形成した。表 1-1 及び 1-2 に、PFGE の一致した事例の解析結果を示す。

PFGE タイプの一致した事例のうち、c253, c483, e627, f120, h34, f746/f745, h20/h21, h22 の 8 事例は、家族事例のみであった。このうち、c253, f34 の 2 事例は、IS 法と MLVA 法においても完全にパターンが一致した。また、f120, f746/f745, h20/h21, h22 の 4 事例は、MLVA 法で各々 1 locus 異なるのみであった。c483 は、3 菌株のうち IS 法で 1 株の 1 コード、MLVA 法で別の 1 株の 1 locus が異なっていた。e627 の 2 株は、MLVA 法で、locus 17, 36, 10 の 3 カ所で異なっていた。家族事例においては、感染時期も同時期が多く、基本的には遺伝子パターンが一致しやすいと考えられるが、MLVA 法ではやや多様なパターンを示す事例もあった。

h330 は、県外の結婚式での食事が感染源となった食中毒事例で、IS 法と MLVA 法でも、パターンが完全に一致した。また、バリ島旅行で感染したとみられる h333 の事例でも、完全に一致した。

h107/h106 は、平成 24 年の 6 月～7 月にかけて発生した下関の老人福祉施設における集団感染事例の PFGE タイプで、その MLVA 法のリピート数は、同時期に分離された 1 菌株では locus 36 において 1 リピートのみ異なっており、他の株とほぼ一致していたが、分離時期が約 10 日後と少しずれて分離された 1 菌株では、locus 17, 10 の 2 カ所において、各々 1 リピートずつ他の株と異なっており、分離時期の差が MLVA パターンに反映されたものと推察された。この事例の主流パターンは、同時期に、宇部保健所管内で発生した散発事例 1 例と、PFGE のみならず、IS 法と MLVA 法においても完全に一致しており、共通の感染源があったことが推察された。

e377 は、家族事例 1 例と散発事例 2 例の PFGE タイプが一致したもので、散発事例の 1 例は、他の 2 例と分離

時期が 3 ヶ月近くずれているものの、同じ保健所管内であり、IS 法も一致、MLVA 法では、1～2 locus で異なっているのみであったことから、継続的な汚染を受けた共通の感染源があった可能性が考えられた。

g307 は、家族事例 1 例と散発事例 4 例で 7 菌株のクラスターを形成した。このうち、平成 23 年 1 月に分離された菌株は、他の 6 菌株と、IS 法で、4 コード異なり、MLVA 法でも 6 カ所の locus で異なっていた。このことから、当センターにおいても、PFGE 解析(*Xba* I 及び *Bln* I)を行い確認したが、やはり同一パターンであった。このことから、本菌株は偶発的に PFGE が同一パターンを示すが、その他とは異なる由来の菌株ではないかと考えられた⁵⁾⁶⁾。また、6 菌株については、明らかな疫学的関連性はなかったものの、分離時期が平成 24 年の 8 月～9 月で、隣接した地域に居住し、共通の店舗等の利用が示唆されていることから、継続的に汚染された食材からの感染が疑われる。この 6 菌株の MLVA 法のパターンは、locus 9, 37, 10 で各々 1～3 リピートと僅かに異なっていた。

h102/h101 の 3 菌株については、2 株は家族事例で、1 株は疫学的関連性がない散発事例であった。しかし、IS 法と MLVA 法でも一致し、同じ保健所管内でかつ分離時期も近いことから、共通の飲食物が感染源である可能性が推察された。

3 PFGE タイプ不一致で疫学的関連性のある事例

表 2 に示すように、疫学的関連性はあるが PFGE タイプが異なった事例が 2 例認められた。

1 例は、韓国旅行の同行者の感染事例で、血清型と VT 型が同一の菌が分離されたことから、当初は同一感染源由来と考えられた。しかし、PFGE タイプが異なる上に、IS 法では 1 コードの差があり、MLVA 法においても、6 カ所の locus でリピート数が異なることから、異なる由来の菌株であると考えられた。

もう一方の事例は、同一店を利用し、焼肉を喫食したことが判明しているが、PFGE タイプは異なっていた事例である。この事例については、IS 法は一致し、MLVA 法においても locus 10 で 1 リピートと僅かな差があるにすぎなかった。このことから、同一感染源由来の株である可能性が高いと推察された。

4 PFGE タイプ不一致で疫学的関連性もない事例

表 3 に、PFGE タイプが不一致で、疫学的関連性もなかった 31 菌株の解析結果を示す。IS 法が一致した事例が 3

表 1-1 PFGE タイプの一致した事例の分子疫学的解析結果

PFGE タイプ	H 型 (VT 型)	管轄 保健所	疫学的関連	分離年月日	IS コード		MLVA VNTR loci									
					1st	2nd	25	3	34	9	17	19	36	37	10	
c253	H7(VT2)	宇部	家族事例	2010/11/6	012057	214443	3	4	7	null	5	8	7	5	null	
				2010/11/12	012057	214443	3	4	7	null	5	8	7	5	null	
c483	H7(VT1&VT2)	宇部	家族事例	2011/10/4	317577	611756	5	8	10	10	7	6	6	6	32	
				2011/10/12	317577	611756	5	8	10	10	7	6	6	6	30	
				2011/10/12	317577	611757	5	8	10	10	7	6	6	6	32	
e377	H7(VT2)	下関	散发事例	2010/7/20	311557	710413	5	6	8	14	5	7	4	7	41	
			散发事例	2010/10/9	311557	710413	5	6	8	14	5	7	4	7	40	
				2010/10/8	311557	710413	5	6	8	14	7	7	4	7	40	
			家族事例	2010/10/12	311557	710413	5	6	8	8	5	7	4	7	41	
e627	H7(VT1&VT2)	宇部	家族事例	2011/9/12	317477	611756	5	10	11	12	11	7	6	8	40	
				2011/9/16	317477	611756	5	10	11	12	4	7	5	8	41	
f120	H7(VT2)	宇部	家族事例	2010/7/3	155047	343443	4	9	7	8	3	7	9	9	23	
				2010/7/3	155047	343443	4	9	7	8	3	7	9	9	23	
				2010/7/6	155047	343443	4	null	7	8	3	7	9	9	23	
f122	H7(VT2)	宇部	散发事例	2010/6/25	012057	214443	3	4	7	12	5	8	6	5	null	
		山口	散发事例	2010/6/28	012057	214443	3	4	7	null	5	8	6	5	null	
f34	H7(VT2)	宇部	家族事例	2010/5/26	717577	611653	5	15	11	16	7	6	11	14	25	
				2010/5/31	717577	611653	5	15	11	16	7	6	11	14	25	
				2010/6/4	717577	611653	5	15	11	16	7	6	11	14	25	
f746	H7(VT1&VT2)	下関	家族事例	2010/11/26	317575	611257	5	9	10	15	8	7	10	8	38	
2010/11/30				317575	611257	5	9	10	14	8	7	10	8	38		
f746/f745				2010/11/30	317575	611257	5	9	10	15	8	7	10	8	38	
g307	H7(VT1&VT2)	防府	散发事例	2011/1/18	307577	211757	5	10	10	12	6	6	6	5	41	
		山口	家族事例	2012/8/6	317477	611756	5	10	11	14	10	7	6	9	44	
				2012/8/9	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	9	44	
		防府		2012/8/9	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	9	44	
		山口	散发事例	2012/8/21	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	43	
		宇部	散发事例	2012/9/27	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	46	
		山口	散发事例	2012/9/28	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	46	
h102	H7(VT1&VT2)	宇部	散发事例	2012/7/21	717557	611657	5	9	10	9	6	6	10	7	33	
			家族事例	2012/7/17	717557	611657	5	9	10	9	6	6	10	7	33	
h102/h101				2012/7/19	717557	611657	5	9	10	9	6	6	10	7	33	

NM:Not Motility

表 1-2 PFGE タイプの 一致した事例の分子疫学的解析結果

PFGE タイプ	H 型 (VT 型)	管轄 保健所	疫学的関連	分離年月日	IS コード		MLVA VNTR loci										
					1st	2nd	25	3	34	9	17	19	36	37	10		
h107	H7(VT1&VT2)	宇部	散発事例	2012/6/25	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/6/27	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/6/29	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/6/29	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/6/30	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/7/1	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
		下関	老人福祉施設	2012/7/2	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
				2012/7/5	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
		h107/h106		2012/7/5	613157	610446	5	13	9	7	7	4	12	6	26		
		h107		2012/7/7	613157	610446	5	13	9	7	7	4	13	6	26		
		2012/7/18	613157	610446	5	13	9	7	8	4	12	6	27				
h20	H7(VT2)	宇部	家族事例	2012/1/31	717575	611453	5	14	9	13	6	7	10	6	25		
h20/h21					2012/2/1	717575	611453	5	14	9	13	6	7	10	6	25	
					2012/2/3	717575	611453	5	14	9	13	6	7	11	6	25	
h20					2012/2/5	717575	611453	5	14	9	13	6	7	10	6	25	
h22	H7(VT2)	下関	家族事例	2012/1/20	114057	203443	3	7	7	13	3	5	7	6	31		
						2012/1/23	114057	203443	3	7	7	13	3	5	7	6	31
						2012/1/24	114057	203443	3	7	7	13	3	5	7	6	33
h330	H7(VT1&VT2)	宇部	県外の結婚式の 食事	2012/9/25	717577	211657	5	13	9	15	8	6	9	7	6		
		山口			2012/9/25	717577	211657	5	13	9	15	8	6	9	7	6	
		周南			2012/10/6	717577	211657	5	13	9	15	8	6	9	7	6	
h333	HNM(VT2)	下関	旅行(バリ島)	2012/9/25	013057	214443	3	4	7	null	6	10	11	6	null		
						2012/9/29	013057	214443	3	4	7	null	6	10	11	6	null
NM:Not Motility																	

NM:Not Motility

表 2 PFGE タイプが不一致で疫学的関連性のある事例の分子疫学的解析結果

PFGE タイプ	H 型 (VT 型)	管轄 保健所	疫学的関連	分離年月日	IS コード		MLVA VNTR loci									
					1st	2nd	25	3	34	9	17	19	36	37	10	
f125	HNM(VT1&VT2)	山口	旅行(韓国)	2010/6/7	415457	311656	4	11	7	12	8	7	4	10	8	
f126	HNM(VT1&VT2)			2010/6/12	615457	311656	4	14	7	10	null	6	4	9	9	
e245	H7(VT2)	下関	同一店の利用 (焼肉)	2010/6/18	713575	610657	8	9	10	12	7	6	3	5	18	
f117	H7(VT2)			2010/6/19	713575	610657	8	9	10	12	7	6	3	5	17	
NM:Not Motility																

NM:Not Motility

表 3 PFGE タイプが不一致で疫学的関連性もなかった事例の分子疫学的解析結果

PFGE タイプ	H 型(VT 型)	管轄保健所	分離年月日	IS コード		MLVA VNTR loci									
				1st	2nd	25	3	34	9	17	19	36	37	10	
f29	H7(VT2)	周南	2011/5/29	114057	303443	3	7	7	9	3	5	7	6	32	
f705	H7(VT2)	山口	2010/7/18	114057	303443	3	9	8	8	3	5	8	7	34	
c374	H7(VT2)	周南	2011/5/24	345057	311652	4	15	7	11	5	7	5	9	25	
g256	H7(VT2)	岩国	2011/5/30	345057	311652	4	15	7	11	5	7	18	9	25	
g254	H7(VT2)	岩国	2011/5/24	345457	311652	4	18	7	10	6	8	16	11	31	
g255	H7(VT2)	下関	2011/3/11	345457	311652	4	20	7	11	6	9	5	11	25	
h62	H7(VT2)	下関	2012/8/24	055047	303043	4	null	8	9	3	6	5	10	37	
g465	H7(VT1&VT2)	長門	2011/11/14	113577	600657	5	12	10	5	6	6	5	7	23	
f121	H7(VT2)	山口	2010/4/26	114055	303643	3	8	8	11	3	5	7	5	37	
f112	H7(VT1&VT2)	柳井	2010/7/11	117575	641757	5	9	10	12	7	6	5	6	29	
h334	H7(VT2)	防府	2012/8/29	145047	103443	4	null	7	11	3	5	7	7	26	
h109	H7(VT2)	周南	2012/8/7	155047	303442	3	null	7	10	3	6	5	7	22	
f47	HN(M(VT1&VT2)	下関	2011/8/24	155047	341446	5	17	8	7	3	6	14	7	23	
f36	H7(VT1&VT2)	山口	2010/8/28	215455	311656	4	14	7	7	7	7	4	9	11	
f124	H7(VT2)	宇部	2010/5/10	305447	711242	4	16	7	12	4	9	4	7	23	
g461	H7(VT2)	下関	2011/9/28	305457	611242	7	10	7	8	4	7	4	7	42	
d402	H7(VT2)	宇部	2010/8/19	305457	711242	3	9	7	11	4	9	4	6	29	
g263	HN(M(VT1&VT2)	周南	2011/6/3	311057	310457	6	15	7	12	3	10	4	3	8	
f755	H7(VT1&VT2)	宇部	2010/12/18	313575	610657	5	12	10	5	7	6	9	7	13	
g227	H7(VT1)	下関	2011/8/5	317477	611755	6	9	10	12	7	6	6	6	41	
d483	H7(VT1&VT2)	山口	2012/10/5	317477	611756	5	10	11	null	11	7	6	8	46	
h105	H7(VT1&VT2)	宇部	2012/4/18	317555	411757	5	9	10	11	6	6	6	6	41	
e807	H7(VT1&VT2)	宇部	2012/10/10	317577	211756	5	8	10	11	7	6	6	6	36	
f107	H7(VT1)	周南	2010/6/6	317577	651755	5	8	10	11	7	6	6	6	45	
f93	H7(VT1&VT2)	宇部	2011/8/3	613575	610446	5	13	9	16	7	4	12	6	29	
f23	H7(VT1&VT2)	防府	2011/7/27	613577	610646	4	9	9	17	7	4	12	6	31	
h17	H7(VT1&VT2)	宇部	2011/12/25	713557	610457	5	11	10	6	7	6	9	6	27	
f757	H7(VT1&VT2)	下関	2010/11/25	713577	610657	5	8	10	6	10	6	7	7	34	
h108	H7(VT1&VT2)	山口	2012/5/17	717557	611657	5	12	10	9	6	6	10	7	32	
c148	H7(VT1&VT2)	宇部	2012/5/24	717577	411657	5	13	9	15	8	6	9	7	5	
f753	H7(VT1&VT2)	防府	2010/8/27	717577	611657	8	9	10	12	7	6	3	5	19	

NM:Not Motility

例認められた。このうち、PFGE タイプが f29, c374, g256 及び g254 については、県東部地域での同時期の発生であったため、広域多発事例が疑われたものの、疫学的関連性は見いだされなかった。しかし、c374, g256, g254, g255 の 4 菌株は clade 解析でいずれも 8 に分類された⁷⁾。また、c374 と g256 については、IS 法は一致し、MLVA 法では locus36 が 13 リピート違うのみで、遺伝学的に近似した菌株であることが示唆された。

PFGE タイプ e807 と f107 については、IS 法では 3 コード異なったが、MLVA 法では locus10 で 9 リピート異なるのみであった。これらの菌株は発生時期も管轄保健所も異なる上に、VT 型もそれぞれ VT1 と VT1&VT2 で異なっていたにもかかわらず MLVA 法で近似した結果となったのは、これらの菌株が相当な変異をした結果なのか、あるいは、かなり異なる菌株であるにもかかわらず MLVA がたまたま近似したのかは不明であった。

4 IS 法と MLVA 法の評価

IS 法は、各クラスターにおいて、ほとんど変化のないプロファイルコードを示し、微細な遺伝子タイプの判別する解析能力は PFGE などに比べて劣ると考えられた。反面、IS 法でかなりの違いがあれば、異なる由来の菌株である可能性が高いと考えられた。また、迅速かつ簡便に検査できることから、集団発生や広域事例においてスクリーニング検査法として活用されている⁸⁾⁹⁾。が、PFGE 法や MLVA 法と組み合わせることにより、精度の高い、非常に有用な O157 菌株の遺伝子型別検査が可能になると考えられた。

MLVA 法は、全国データの解析において、集団発生株に比べ、広域分離株では遺伝的多様性に富むことが指摘されている²⁾³⁾⁴⁾。今回の当県における結果でも、PFGE よりも、遺伝学的な多様性を、より鋭敏に反映していると考えられ、共通の飲食物を介して、同時に曝露されたと考えられる事例では、パターンが一致しやすく、継続的な汚染を疑うものでは、パターンが微妙に異なってくると推察された。特に locus10 は変異株が多くみられ、このように変異しやすい locus における差をどのように考慮するかが今後の課題であると考えられた。

IS 法と MLVA 法は数値データで結果を得られることから、データベース化することにより、施設間で情報共有や交換がしやすいと考えられる。PFGE は、O157 等の分子疫学的解析法の Gold Standard であるが、g307 のような事例では、IS 法や MLVA 法などの方が、より正確に

菌株の遺伝的差異を判定することが可能である場合もあると考えられた。

今後、これらの解析方法をさらに検討し、迅速で精度の高い分子疫学解析手法を確立することにより、O157 感染の原因究明に結びつくデータベースシステム等を構築することが必要である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、PFGE 解析の実施及び MLVA 法に関するご指導及びご助言をいただきました、国立感染症研究所細菌第一部の先生方に深謝いたします。

文献

- 1) 研究代表者 寺嶋淳：病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究 平成 24 年度総括・研究分担報告書, 13-20(2013)
- 2) 寺嶋淳ほか：IASR.32(5),128-129(2011)
- 3) 寺嶋淳ほか：IASR.33(5),127-128(2012)
- 4) 寺嶋淳ほか：IASR.34(5),139-140(2013)
- 5) 研究代表者 寺嶋淳：病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究 平成 24 年度総括・研究分担報告書, 153-164(2013)
- 6) Mitsuhiro Kameyama et al：JJID.66,355-357(2013)
- 7) 研究代表者 寺嶋淳：食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究 平成 23 年度総括・研究分担報告書,126-136(2012)
- 8) 緒方喜久代ほか：IASR.31(6),161-162(2010)
- 9) 坂本裕美子ほか：IASR.34(5),126(2013)