

## 茨城県において平成27年次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解析について

○相原 義之, 山城 彩花, 木澤 千里, 中本 有美, 川又 祐子, 増子 京子

### 要旨

平成 27 年 1 月から 12 月までに茨城県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症分離菌株 45 株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法、IS-printing system(IS)法および Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法の 3 手法による分子疫学解析を行い、各手法間の比較と感染事例間での疫学的関連性の有無について検討した。

キーワード：腸管出血性大腸菌、分子疫学解析、PFGE 法、IS 法、MLVA 法

### はじめに

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析は、従来から PFGE 法が広く利用されているが、近年より迅速かつ簡便に検査結果が得られる IS 法および MLVA 法が普及し始めている。

昨年度より引き続き、平成 27 年次に茨城県内で分離された腸管出血性大腸菌株について PFGE 法、IS 法、MLVA 法の 3 手法による分子疫学解析を行ったので、結果について報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌株

平成 27 年 1 月から 12 月に茨城県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例より分離された菌株 45 株を対象とした。菌株情報については表 1 にまとめた。

#### 2. 解析方法

##### 2-1. PFGE 法

制限酵素は *Xba*I を用い、国立感染症研究所で示されたプロトコルに基づいて実施した。データ解析については BioNumerics (Ver. 6.6, Applied Maths) を利用し、解析は Dice 法 (最適化: 0.5%, トレランス: 0.5%), 系統樹作成は平均距離法(UPGMA)により行った。結果の

解釈は 0~3 バンド違いを同一タイプとした。

##### 2-2. IS 法

IS-printing system (東洋紡) を使用し、添付のプロトコルに従い実施した。解析は 18 種のプライマーごとにバンドの増幅を調べ、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定した。得られた解析数値をプライマーの順に並べて 18 桁の数列とした後、3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算して各セット 6 桁のコードとし、菌株間の比較に用いた。

##### 2-3. MLVA 法

国立感染症研究所細菌第 1 部で示されたプロトコル<sup>1)</sup>に従い、17 か所の locus について解析を行った。Fragment size marker として GeneScan™ 600LIZ Size Standard (Applied Biosystems)を用い、繰り返し回数 (RN) の解析には 3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems) および Gene Mapper ver.4.1(Applied Biosystems) を使用した。

表 1 事例概要と分離菌株情報

事例番号	菌株番号	発症・診断日	管轄保健所	患者性別	患者年齢	患者職業	毒素型
No.1	IB15007	5月27日	水戸	男	10歳未満	小学生	VT1VT2
	IB15008	6月8日	水戸	女	40代	公務員	VT1VT2
No.2	IB15009	5月25日	つくば	女	80代	主婦	VT1VT2
No.3	IB15020	6月30日	水戸	女	90代	無職	VT1VT2
	IB15021	7月9日		男	70代	無職	VT1VT2
No.4	IB15022	6月30日	竜ヶ崎	女	70代	無職	VT1VT2
	IB15023	7月13日		男	60代	会社員	VT1VT2
No.5	IB15027	7月5日	常陸大宮	女	60代	無職	VT1VT2
No.6	IB15033	7月25日	日立	男	50代	会社員	VT1VT2
	IB15034	8月2日		女	50代	ピアノ講師	VT1VT2
No.7	IB15035	7月25日	常総	女	30代	喫茶店員	VT1VT2
No.8	IB15037	7月31日	潮来	男	40代	飲食店調理員	VT1VT2
No.9	IB15052	9月13日	筑西	男	70代	無職	VT1VT2
No.10	IB15053	9月17日	筑西	女	60代	無職	VT1VT2
	IB15054	9月27日		男	60代	会社員	VT1VT2
No.11	IB15055	9月23日	つくば	男	10歳未満	小学生	VT1VT2
No.12	IB15056	9月24日	筑西	男	70代	無職	VT1VT2
No.13	IB15057	10月1日	筑西	男	80代	自営業	VT1VT2
No.14	IB15058	9月30日	水戸	男	10歳未満	小学生	VT1VT2
No.15	IB15064	11月2日	潮来	女	10歳未満	園児	VT1VT2
	IB15065	11月3日		女	10歳未満	園児	VT1VT2
	IB15066	11月11日		女	40代	自営業	VT1VT2
No.16	IB15026	7月7日	土浦	女	40代	薬局店員	VT1
No.17	IB15029	7月10日	常陸大宮	女	30代	病院関係者	VT1
No.18	IB15005	5月8日	水戸	女	70代	無職	VT2
No.19	IB15006	5月18日	水戸	女	30代	教師	VT2
No.20	IB15010	6月9日	鉾田	女	30代	保育士	VT2
No.21	IB15011	6月17日	土浦	男	10歳未満	小学生	VT2
No.22	IB15013	6月25日	つくば	男	10歳未満	園児	VT2
	IB15014	6月29日		女	10歳未満	園児	
	IB15015	6月30日		男	10歳未満	園児	
No.23	IB15016	6月17日	ひたちなか	女	10代	高校生	VT2
	IB15017	6月24日	ひたちなか	男	60代	無職	VT2
No.24	IB15030	7月14日	常総	女	80代	無職	VT2
	IB15031	7月25日		男	60代	無職	VT2
No.25	IB15036	7月23日	古河	男	10代	高校生	VT2
No.26	IB15040	8月13日	つくば	男	10歳未満	園児	VT2
No.27	IB15043	8月24日	竜ヶ崎	男	20代	大学生	VT2
No.28	IB15044	9月1日	つくば	女	10歳未満	無職	VT2
	IB15045	9月8日		女	30代	主婦	VT2
	IB15046	9月8日		男	10歳未満	園児	VT2
No.29	IB15048	8月27日	つくば	女	20代	保育士	VT2
No.30	IB15049	9月4日	常総	女	50代	保育士	VT2
No.31	IB15050	9月8日	筑西	女	20代	食品製造	VT2
No.32	IB15063	10月18日	土浦	女	50代	食品製造	VT2

実験結果

PFGE バンドパターンを図 1 に、IS コードおよび MLVA の RN を表 2 に示した。

1) 家族内事例

事例番号 1, 3, 4, 6, 10, 15, 22, 23, 24, 28 については患者間で家族関係が確認され、

PFGE パターンが 95%以上一致した。また、これらの事例では IS コードおよび MLVA の RN も完全に一致、もしくは 1 領域違いであり、いずれの手法においても相関関係があることがわかった。

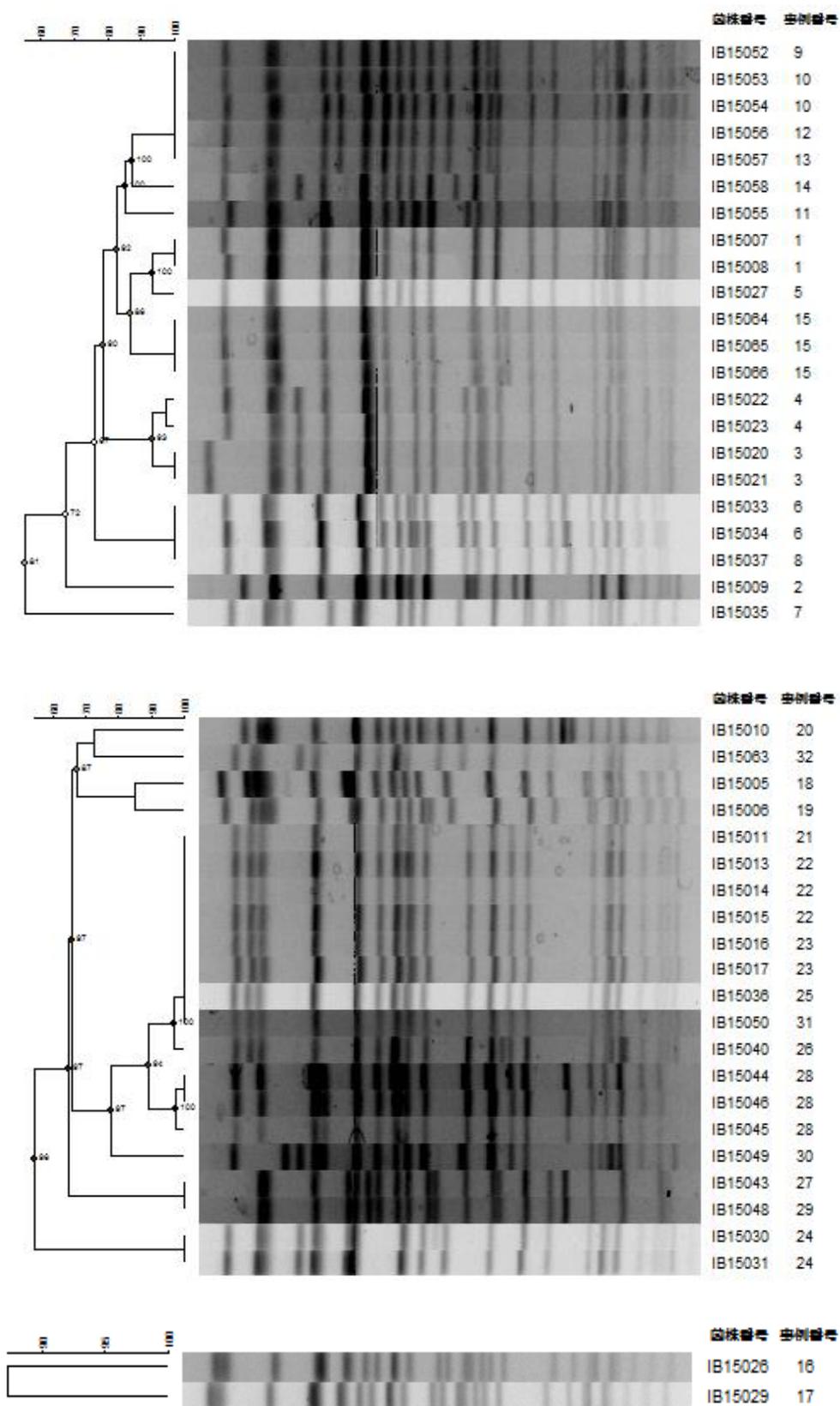


図1 PFGE クラスタとバンドパターン (上段 : VT1,2 陽性株, 中段 : VT2 陽性株, 下段 : VT1 陽性株)

## 2) 散発事例

6月中旬～9月上旬にかけて発生した散発事例 21, 22, 23, 25 及び 31 の原因菌株 (IB15011, IB15013, IB15014, IB15015, IB15016, IB15017, IB15036, IB15050) は PFGE パターン及び IS コードが完全に一致しており, MLVA の RN もすべての領域で一致していたため, 同一由来株であると考えられた。なお, 散発事例 26 由来株 (IB15040) は, これらの株と IS コードが一致したものの, PFGE, MLVA の結果は異なっており, 同一由来株の可能性は低いと考えられた。

また, VT2 陽性株による散発事例 27 及び 29 の原因菌株 (IB15043, IB15048) は PFGE パターンと MLVA の RN が完全に一致していた。そのため, 同一由来株による感染症の可能性が示唆されたが, 両事例の届出者間に家族関係はなく, 共通行動等の繋がりも確認できなかった。

同様に, 散発事例 16 及び 17 における VT1 陽性原因菌株 (IB15026, IB15029) についても, PFGE パターンが 85%以上の相同性を示し, また MLVA の RN が完全に一致していたことから, 同一由来株による感染症である可能性が高いと考えられたが, 事例間の関連性を見いだすことができなかった。

## 3) 筑西保健所管内で発生した腸管出血性大腸菌感染症について

平成 27 年 9 月中旬から 10 月上旬にかけて, 筑西保健所管内で VT1,2 陽性 O157 感染症が 4 事例 (事例 9, 10, 12, 13) 連続的に発生した。この 4 事例の届出者 5 名に由来する菌株群 (IB15052, IB15053, IB15054, IB15056, IB15057) の PFGE パターンと MLVA の RN は完全に一致しており, 同一由来株の可能性が高いと判断された。また, 国立感染症研究所の情報提供により, 栃木県においても同時期に, 本事例菌株と MLVA の RN が一致している菌株による感染症が発生していることが判明した。

管轄保健所が行った届出者 5 名の行動調査によると, うち 4 名が届出日から遡って 1 週間前後の間に葬儀に参列したことが確認された。しかし, 利用した葬儀場はそれぞれ異なっており, 届出者間におけるその他の共通行動, 接点も存在しなかった。直接的な関連は見られなかったものの, このように同地区において, 同一由来株による O157 感染症が短期間に集中的に発生したため, 関連部署に情報提供を行った。

## 考察

前述のように, 平成 27 年度においては直接的な因果関係が確認されなかったものの, 分子疫学解析の結果から事例間の相関が示唆された事例が発生した。本事例においては, PFGE, IS-printing, MLVA と異なる 3 つの分子疫学解析手法を導入し, 多角的に遺伝子解析を行うことでデータの確度を高めることが可能となり, 行政側への情報提供に繋げることができた。

腸管出血性大腸菌感染症は, ごく少数の食中毒事例・同一施設内での集団発生を除くと, 因果関係が不明であるケースが多い。しかし, 検出された菌株の遺伝子情報解析とデータの集積により事例間の関連性を明確にすることで, 行政側の蔓延防止対策を効率化できるため, さらなる感染症の発生を未然に防ぐ可能性が高まる。IS-printing や MLVA といった分子疫学解析手法の確立・普及により, 解析の簡便化・迅速化が著しくなった昨今, 感染症予防の側面からも分子疫学解析を行う意義が大きくなりつつあると考えられる。

## 謝辞

MLVA 解析の実施に際し, 懇切丁寧な指導と助言を下さいました国立感染症研究所細菌第一部 泉谷秀昌先生に深謝いたします。

## 文献

- 1) Izumiya, H. *et al*; *Microbiol. Immunol.*, 2010;**54**, 569-577.

表2 O157菌株のRN (MLVA) とISコード

事例番号	菌株番号	毒素遺伝子	1st.set										2nd.set										IS.code	
			O157-34Y	EHC-1Q	EHC-2C	O157-9M	EHC-5S	O157-3W	O157-25J	EH11-80	EH157-12N	EH11-4BB	EH11-11T	O157-17Z	O157-30AA	O157-19L	EHC-6U	O157-37V	EH26-7D	1st.set	2nd.set			
1	IB15007	VT1, VT2	13	6	4	13	null	10	4	4	1	4	null	2	9	6	7	9	8	null	317475	611756		
	IB15008	VT1, VT2	13	6	4	13	null	10	4	4	1	4	null	2	9	6	7	9	8	null	317475	611756		
2	IB15009	VT1, VT2	10	5	5	12	null	24	2	1	4	4	null	2	12	4	7	7	7	null	215457	311656		
	IB15020	VT1, VT2	12	6	4	8	null	15	5	1	4	4	null	2	7	7	5	5	8	null	317575	211656		
3	IB15021	VT1, VT2	12	6	4	8	null	15	5	1	4	4	null	2	7	7	5	5	8	null	317575	211656		
	IB15022	VT1, VT2	12	6	4	8	null	15	5	1	4	4	null	2	7	7	5	5	8	null	317575	211656		
4	IB15023	VT1, VT2	12	6	4	8	null	15	5	1	4	4	null	2	7	7	5	5	8	null	317575	211656		
	IB15027	VT1, VT2	12	6	4	12	null	10	5	1	4	4	null	2	6	6	6	5	5	null	307577	211757		
6	IB15033	VT1, VT2	11	5	4	11	null	11	5	1	4	4	null	2	10	12	6	6	7	null	705557	651257		
	IB15034	VT1, VT2	11	5	4	11	null	11	5	1	4	4	null	2	10	12	6	6	7	null	705557	651257		
7	IB15035	VT1, VT2	10	3	7	5	2	8	5	1	4	4	null	2	5	9	8	4	4	null	301557	710417		
	IB15037	VT1, VT2	11	5	4	11	null	11	5	1	4	4	null	2	10	12	6	12	7	null	705557	611257		
9	IB15082	VT1, VT2	11	6	4	13	10	7	5	1	4	4	null	2	13	6	7	7	8	null	017577	611747		
	IB15053	VT1, VT2	11	6	4	14	10	7	5	1	4	4	null	2	13	6	7	7	8	null	017577	611747		
10	IB15084	VT1, VT2	11	6	4	13	10	7	5	1	4	4	null	2	13	6	7	7	8	null	017577	611747		
	IB15055	VT1, VT2	13	5	4	10	null	11	7	1	4	4	null	2	7	3	6	10	6	null	717577	611657		
12	IB15056	VT1, VT2	11	6	4	13	10	7	5	1	4	4	null	2	13	6	7	7	8	null	017577	611747		
13	IB15057	VT1, VT2	11	6	4	13	10	7	5	1	4	4	null	2	13	6	7	7	8	null	017577	611747		
14	IB15058	VT1, VT2	12	6	4	13	null	10	5	1	6	6	null	2	6	6	6	13	7	null	357677	211757		
	IB15084	VT1, VT2	12	5	4	12	null	8	8	1	4	4	null	2	7	3	6	6	6	null	717555	611657		
15	IB15065	VT1, VT2	12	5	4	13	null	8	8	1	4	4	null	2	7	3	6	6	6	null	717555	611657		
	IB15066	VT1, VT2	12	5	4	12	null	8	8	1	4	4	null	2	7	3	6	6	6	null	717555	611657		
16	IB15026	VT1	10	5	5	16	null	13	2	1	4	4	null	2	13	4	7	7	7	null	615455	311654		
17	IB15029	VT1	10	5	5	15	null	13	2	1	4	4	null	2	13	4	7	7	7	null	615455	311654		
18	IB15005	VT2	10	18	6	11	null	18	4	1	3	3	null	2	5	3	7	4	4	null	315457	611413		
19	IB15006	VT2	10	18	6	11	null	18	4	1	3	3	null	2	5	3	7	4	4	null	315457	611413		
20	IB15010	VT2	10	9	5	7	null	11	3	1	4	4	null	2	5	10	6	4	4	null	315557	711413		
21	IB15011	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
	IB15013	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
22	IB15014	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
	IB15015	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
	IB15016	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
23	IB15017	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
	IB15030	VT2	9	7	5	11	2	null	4	1	1	1	null	2	3	7	6	9	9	null	145047	103443		
24	IB15031	VT2	9	7	5	11	2	null	4	1	1	1	null	2	3	7	6	9	9	null	145047	103443		
	IB15036	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
26	IB15040	VT2	9	9	5	7	null	8	5	1	6	6	null	2	4	10	8	6	6	null	305457	211642		
	IB15043	VT2	8	15	4	null	null	12	4	1	3	3	null	2	2	4	6	7	7	null	205457	601247		
	IB15044	VT2	9	12	4	5	null	11	4	1	6	6	null	2	4	8	8	6	6	null	105457	611242		
28	IB15045	VT2	9	12	4	5	null	11	4	1	6	6	null	2	4	8	8	6	6	null	105457	611242		
	IB15046	VT2	9	12	4	5	null	11	4	1	6	6	null	2	4	8	8	6	6	null	105457	611242		
29	IB15048	VT2	8	15	4	null	null	13	4	1	3	3	null	2	2	4	6	7	7	null	205457	605243		
30	IB15049	VT2	9	3	4	11	null	22	4	1	6	6	null	2	6	null	8	10	6	null	345457	311652		
31	IB15050	VT2	9	11	5	12	null	11	5	1	6	6	null	2	4	9	7	6	6	null	305457	211642		
32	IB15063	VT2	9	12	5	5	null	4	3	1	4	4	null	2	5	6	7	5	5	null	012057	214442		