

腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析における MLVA 法の有用性について

今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

腸管出血性大腸菌感染症は、感染力が強く、重症化した場合には死に至ることもある重大な細菌感染症の一つである。そのため、本症の対策では迅速に流行形態を把握し、感染の拡大を防止する必要がある。本研究では迅速な分子疫学的解析の手法としての MLVA 法の有用性を検討した。検討するにあたっては、散発感染事例、集団感染事例や集団食中毒事例といった様々な事例に関連した分離株を供試し、MLVA 法の結果を基にした菌型を調査した。その結果、MLVA 法によっても集団感染の把握が可能であること、従来から用いられてきた PFGE 法に比べて詳細に感染の流行形態を把握できること、実際の事例対応においても有用な情報を迅速に把握できることが確認された。これらの結果から、腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析における MLVA 法の有用性は極めて高いと考えられた。

1. はじめに

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic E. coli* : EHEC) による感染症は、平成 2 年の埼玉県の子供園での集団感染事例、平成 8 年の大阪府堺市での学校給食を原因とした大規模な集団感染事例を契機にその健康被害の重大性が認識されて以来、全国各地で集団、散発感染事例が数多く報告され、現在もなお公衆衛生上の重要な問題となっている。その症状は、無症候性や軽度の下痢から、激しい腹痛、頻回の水様便、さらに著しい血便とともに、有症者の 6~7%において、下痢などの初発症状発現の数日から 2 週間以内に、溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症を併発し、死に至る場合もある¹⁾。

通常、EHEC はそれに汚染された食物などを経口摂取することによって感染する。100 個程度の少ない菌数でも感染が成立することから、ヒトからヒトへの二次感染も問題となる。そのため、本症の対策には、原因菌の迅速な分離同定とともに迅速な分子疫学的解析が求められている。国立感染症研究所においては、広域的集団感染等への対応を目的として、各地方衛生研究所の分離株を収集してパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) で解析するシステム (パルスネット) が構築されている²⁾。個別の事例においては、各地方衛生研究所でも PFGE 法によって集団感染事例の特定や感染経路の推定を行っている。しかしながら、PFGE 法は解析終了まで一週間近くの時間を必要とすること、多くの分離株の分類を行うにあたっては、単一の

制限酵素の切断パターンによる画像の比較解析だけでは判別できない場合があることなどが課題となっていた。

近年、EHEC においても分子疫学的解析法の一つとして細菌の DNA に存在する高変異反復配列を利用した Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA 法) が開発されている^{3, 4)}。

そこで、迅速な腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法として MLVA 法の有用性を検証するため、秋田県内で発生した散発感染事例、集団感染事例や集団食中毒事例といった様々な事例に由来した分離株を用いて、MLVA 法による分子疫学的解析を実施した。本報では、これらの事例の解析結果を中心に、腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析における MLVA 法の有用性について報告する。

2. 方法

2.1 実験材料

集団感染事例の検討として、平成 18 年 5 月に発生した「ふれあい動物イベント」に起因した集団感染事例由来株 9 株を供試した。また、PFGE 法との比較のため、平成 19 年 7 月から 9 月上旬までに秋田県内で個別の散発感染事例から分離された 18 株を供試した。また、実際の事例対応として、平成 20 年 6 月に発生した集団食中毒事例に関連した 26 株を供試した。供試菌株はすべて PCR 法等により EHEC O157:H7 VT1, 2 (+) であることを確認した。

2.2 実験方法

2.2.1 PFGE 法

PFGE 法は、細菌の染色体 DNA の制限酵素処理断片をアガロースのゲル中で断片（バンド）の大きさによって分け、多型性解析する手法である。今回は、制限酵素処理に *Xba*I を使用した⁵⁾。クラスター解析においては、バンドが 1, 2 本異なる場合は同系統の菌型として判断した⁶⁾。

2.2.2 MLVA 法

MLVA 法は、細菌の染色体 DNA もしくはプラスミド DNA 上に存在し、高率に変化する DNA の繰り返し配列の数を比較することで細菌を識別する手法である。今回は、Noller *et al.*³⁾ および Lindstedt *et al.*⁴⁾ の方法を一部改変して行った。繰り返し配列は、O157:H7 の染色体上に存在する 7 か所（VNTR3, VNTR9, VNTR10, VNTR17, VNTR19, VNTR25, VNTR34）とプラスミド上に存在する 1 か所（VNTR36）を対象として、DNA 配列を解析した。DNA 配列から各部分の繰り返し数を算定し、Locus1 から Locus8 まで VNTR9-VNTR10-VNTR17-VNTR25-VNTR3 - VNTR34-VNTR19-VNTR36 の順に表記し⁸⁾、分離株の MLVA Profile とした。クラスター解析においては、1 か所の Locus のみが異なる場合は同系統の菌型として判断した。

3. 結果と考察

3.1 平成 18 年集団感染事例由来株の分子疫学的解析

MLVA 法による解析を行う上での検討課題の一つとして、集団感染事例を裏付けできるかという点があげられる。表 1 に示した EC10759～EC10998 は、平成 18 年 4 月 29 日から 5 月 8 日にかけて開催された「ふれあい動物イベント」に起因した集団感染の患者由来の分離株とイベントに出展されていたヤギに由来する分離株である。これらの分離株は PFGE 法ではいずれも同一もしくはバンド 1 本のみ異なる DNA パターンを示し（パターン 18A, 18A'）、集団感染であったことが裏付けされていたことから、これらの分離株を用いて MLVA 法の検討を行った。MLVA 法では、EC10881 を除く 8 株の MLVA Profile が「16-25-7-4-15-11-12-12」、EC10881

は Locus2 が +1 異なったがそれ以外は一致していた。

これらの結果から、MLVA 法によっても集団感染の推定が可能であると考えられた。

表 1 平成 18 年集団感染事例
由来株の分子疫学的性状

分離株	分離日	PFGE Pattern	MLVA Profile	備考
EC10759	5月10日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10764	5月11日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10767	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10768	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10769	5月12日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10880	5月23日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10881	5月23日	18A'	16-26-7-4-15-11-12-12	
EC10852	6月2日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	
EC10998	7月20日	18A	16-25-7-4-15-11-12-12	ヤギ由来

3.2 平成 19 年散発感染事例由来株の分子疫学的解析

表 2 に示した EC11999～EC12142 は、平成 19 年 7 月から 9 月上旬の間に発生した散発感染事例から分離された株で、PFGE 法によって大きく分けて 3 つの流行株があることが示されたが、互いによく似た DNA パターンを示す分離株も存在し、分類が困難な事例が見受けられた。これらの事例の流行形態を的確に把握し、適切な対策に資する情報を提供するには、より迅速かつ詳細な解析が可能な手法が求められたことから、MLVA 法の検討を行った。その結果、7 月下旬に秋田市、大館、由利本荘、湯沢と比較的広範囲にわたって同じ系統の菌（タイプ 19a）による事例が発生していたことを確認し、広域的な集団感染の可能性を示した。8 月から 9 月上旬に大仙を中心に相次いだ感染事例は、PFGE 法で同一の DNA パターンを示していたが、これらの MLVA Profile は非常に近いもののわずかな変化がみられた（タイプ 19c1, 19c2, 19c3, 19c4）。これは、この地域に侵淫している特定の菌型が存在し、継続的に感染を引き起こしていった過程でわずかな変異が生じていったためではないかと思われるが、同一の菌の繰り返し数がどの程度の頻度で変化するかは今後の検討課題である。また、秋田市で発生した事例の EC12010（タイプ 19f）、EC12021（タイプ 19b）、EC12087（タイプ 19e）や由利本荘で発生した事例の EC12018（タイプ 19d）、湯沢で発生した事例の EC12056（タイプ 19g）には互いにそれ

以外同一の MLVA Profile を示す菌株がなかったことから、散発的な感染と考えられた。

これらの結果から、MLVA 法によってより詳細な流行形態の把握が可能と考えられ、広域的な集団感染の早期探知にも有効と考えられた。

表 2 平成 19 年散発感染事例
由来株の分子疫学的性状

分離株	分離日	管轄保健所	PFGE Pattern	MLVA Profile	タイプ	
EC12010	7月24日	秋田市	19A'	11-35-8-6-10-12-15-7	19f	
EC12000	7月20日	秋田市	19A	11-48-8-6-10-12-14-7	19a	
EC12013	7月25日	大館	19A	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC12017	7月25日	由利本荘	19A	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC12018	7月25日	由利本荘	19A	11-21-8-6-13-12-14-7		
EC12022	7月26日	秋田市	19A	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC12027	7月27日	湯沢	19A	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC12035	8月01日	由利本荘	19A	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC11999	7月20日	秋田市	19AB	11-48-8-6-10-12-14-7		
EC12021	7月26日	秋田市	19B	16-21-8-6-14-11-12-12		19b
EC12087	8月21日	秋田市	19B	16-20-8-6-15-11-12-12		19e
EC12056	8月09日	湯沢	19BC	16-25-7-6-12-12-14-10	19g	
EC12032	7月31日	大仙	19C	14-28-8-9-11-13-14-4	19c1	
EC12076	8月17日	大仙	19C	14-27-8-9-11-13-14-4	19c2	
EC12000	8月22日	秋田市	19C	14-28-8-9-11-13-14-4	19c3	
EC12097	8月24日	大仙	19C	14-29-8-9-11-13-14-4		
EC12130	8月06日	大仙	19C	13-28-8-9-11-13-14-4		
EC12142	9月11日	大仙	19C	13-26-8-9-11-13-14-4	19c4	

3.3 平成 20 年集団食中毒事例由来株の分子疫学的解析

MLVA 法による解析が、実際の検査に対応できるかを検討するため、表 3 に示した平成 20 年 6 月に秋田市内で発生した集団食中毒事例に関連して分離された株 EC12721~EC12766 を用いて、MLVA 法による解析を行った。検食から分離された EC12738 の MLVA Profile (タイプ 20a1) とは 17 株が完全に一致した。それ以外では、Locus1 が +1, Locus2 が -1~+3, Locus8 が +1 異なるサブタイプがみられた (タイプ 20a2~20a7)。また、EC12756 は全く異なる MLVA Profile を示し (タイプ 20b)、食中毒とは関係のない散発事例であったと考えられた。

以上の結果から、食中毒のような集団感染発生時にも MLVA 法による対応が可能であるが、一部の Locus におけるわずかな変化はサブタイプとして考慮が必要であることが確認された。平成 19 年の散発感染事例の解析結果においても、一部地域の分離株の菌型にわずかな変異が生じており、このような場合には、事例の背景や PFGE 法の結果などを鑑みて、総合的に判断する必要があると考えられた。一方、EC12756 のように発生時期等から集団感染との関連が疑われ、分離株の関連性を迅速に調査する必要が求められた際には、MLVA 法を用いることで迅速に関連があるのか判断できることから、極めて有用であると考えられた。

この検討により、MLVA 法によってリアルタ

イムに菌株の情報を得ることで、即座に保健所等の関連機関に情報を還元することが可能となることが実証され、患者情報などの事例背景に科学的な裏付けを与えることで、適切な行政対応の支援につながるものと考えられた。

表 3 平成 20 年集団食中毒事例
由来株の分子疫学的性状

分離株	分離日	MLVA Profile	タイプ	備考
EC12738	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	検査
EC12728	6月26日	12-39-8-6-10-12-14-7	20a2	従業員
EC12721	6月25日	11-38-8-6-10-12-14-7	20a3	
EC12724	6月25日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12725	6月26日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12736	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12737	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12731	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12732	6月27日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12739	6月28日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12740	6月28日	11-40-8-6-10-12-14-7	20a4	
EC12741	6月28日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12742	6月28日	11-41-8-6-10-12-14-7	20a5	
EC12749	6月30日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12751	7月2日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12752	7月2日	11-42-8-6-10-12-14-7	20a6	
EC12755	7月3日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12756	7月3日	8-39-11-3-13-10-15-5	20b	
EC12758	7月4日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12759	7月4日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12761	7月7日	11-40-8-6-10-12-14-7	20a4	
EC12762	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12763	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-8	20a7	
EC12764	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12765	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	
EC12766	7月7日	11-39-8-6-10-12-14-7	20a1	

4. まとめ

MLVA 法を取り入れることで、これまでより迅速かつ詳細な流行形態の把握が可能となった。また、MLVA 法により得られたデータはデジタル化されているため比較解析や精度管理も容易であり、これまでの方法で課題とされていた点を大きく改善することができた。本研究により得られた成果を活用することで、今後より適切な感染症対策への貢献が期待される。

参考文献

- 1) Karmali MA.: Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli.*, *Clin Microb Rev.*, 2, 1989, 15-38.
- 2) Watanabe H., Terajima J., Izumiya H., Iyoda S., Tamura K.: PulseNet Japan: surveillance system for the early detection of diffuse outbreak based on the molecular epidemiological method., *Kansenshogaku Zasshi.*, 76, 10, 2002, 842-848.
- 3) Lindstedt BA., Heir E., Gjernes E., Vardund T., Kapperud G.: DNA fingerprinting of Shiga-toxin

- producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA)., *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, **10**, 2003, 2-12.
- 4) Noller AC., McEllistrem MC., Pacheco AGF., Boxrud DJ., Harrison LH.: Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates., *J Clin Microbiol.*, **41**, 2003, 5389-5397.
- 5) Izumiya H., Terajima J., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tamura K., Watanabe H.: Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis., *J Clin Microbiol.*, **35**, 7, 1997, 1675-1680.
- 6) Tenover FC., Arbeit RD., Goering RV., Mickelsen PA., Murray BE., Persing DH., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing., *J Clin Microbiol.*, **33**, 7, 1995, 1804-1806.
- 7) Noller AC., McEllistrem MC., Shutt KA., Harrison LH.: Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157:H7., *J Clin Microbiol.*, **44**, 2, 2006, 374-377.
- 8) Keys C., Kemper S., and Keim P.: Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E.coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing., *J Appl Microbiol.*, **98**, 2005, 928-940.