

香川県で分離された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析(2021)

Molecular Epidemiological Analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* Isolated in Kagawa Prefecture (2021)

岩下 陽子 目黒 響子 関 和美 福田 千恵美
Yoko IWASHITA Kyoko MEGURO Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

要 旨

腸管出血性大腸菌の感染事例での分子疫学解析を行い関連性を検討した。対象は 2021 年 1 月から 12 月に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌、026 : 10 株、0157 : 5 株、08 : 2 株、063 : 1 株、081 : 1 株、091 : 1 株、093 : 1 株、0 型不明 : 1 株を用いた。026、0157 はパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis : PFGE 法)、反復配列多型解析法 (Multiple locus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA 法) を、その他の 0 群型は PFGE 法にて検討を行った。発生状況は、散発が 11 事例、家族内感染が 1 事例、同一施設利用者内感染 2 事例で、家族内感染、同一施設利用者内感染において関連性が見られた。また、散発事例間での関連性は認められなかった。

キーワード : 分子疫学解析 腸管出血性大腸菌 PFGE 法 MLVA 法

I はじめに

腸管出血性大腸菌感染症は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の 3 類感染症に分類され、診断した医師の全数届出が義務付けられている。また、疫学調査を行うことは、感染の原因究明や拡大防止、再発防止のために大変重要である。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析にはパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis : PFGE 法) が広く用いられてきた。しかし、解析に時間がかかることなどの問題点がある。近年、分解能、迅速性に優れた分子疫学解析法として、反復配列多型解析法 (Multiple locus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA 法) が用いられるようになってきている。MLVA 法はゲノム上の反復配列の多形性を利用する方法で、反復配列領域を PCR で増幅し得られた増幅産物の大きさから繰り返し配列のコピー数を決定し、複数の反復配列領域のコピー数の差異から菌株間の異同を調べる方法である。また、MLVA 法は数値化するため、機関間での比較も容易であるといった利点がある。当センターでは 2019 年から腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 について従来法の PFGE 法に加え MLVA 法での分子疫学解析を行っている。

今回、2021 年に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌について PFGE 法、MLVA 法を用いて分子疫学解析を行

ったので報告する。

II 方法

1 対象

2021 年 1 月から 12 月に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌 22 株 (026 : 10 株、0157 : 5 株、08 : 2 株、063 : 1 株、081 : 1 株、091 : 1 株、093 : 1 株、0 型不明 : 1 株) を対象とし、026、0157 については、PFGE 法と MLVA 法を、その他の血清型は、PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。

2 PFGE 法

2004 年に国立感染症研究所で示された方法¹⁾に従い実施した。供試菌をトリプトソーヤブイヨン「ニッスイ」(日水製薬)で 36°C 18 時間培養した培養液を用いてアガロースブロックを作成し、制限酵素 Xba I を用いて、37°C 18 時間振とうし、消化反応させた。分子量マーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 を同様に処理した。電気泳動は、Bio Rad CHEF-DRIII System を使用し、TBE Buffer を用いて 6 V/cm、スイッチングタイム 2.2-54.2 秒、泳動時間 19 時間、Buffer 温度 14°C の条件で実施した。解析は BioNumerics v7.6 (インフォコム) を用いて、類似係数 Dice、デンドログラム型 UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.0% でデンドログラムを作成した。

3 MLVA 法

腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック²⁾に従い実施した。DNA 抽出はアルカリ熱抽出法により行った。抽出した鋳型を用い、解析対象とする17か所の遺伝子座の領域について、2種類のマルチプレックス PCR で増幅した。電気泳動はSeqStudio Genetic Analyzer (ThermoFisher) を用いた。また、国立感染症研究所より検査結果をもとに得られる統一的な記号(MLVA 型)の付与、およびコンプレックス解析結果(MLVAcomplex)の提供を受けた。国立感染症研究所では、リピート数が1遺伝子座において異なる Single Locus Variant (SLV) など、関連性が推測される型を complex としてまとめる様式をとっている³⁾。

III 結果

1 026 事例

事例概要及び MLVA 解析結果を表1に、PFGE 法解析結果を図1に示した。2月から7月の間に10株搬入され、その中に同居家族内感染が1事例(事例1)と同一施設(施設A)利用者内感染1事例(事例2)が含まれていた。事例1は MLVA Type は一致、PFGE 法解析でも同一 group(a) に分類された。事例2は MLVA 法では5株のうち4株は一致、1株は SLV であり、この5株は同一 complex(21c203)であった。また PFGE 法解析でも同一 group(b) に分類された。

2 0157 事例

事例概要及び MLVA 解析結果を表2に、PFGE 法解析結果を図2に示した。5月に1株、9月に4株搬入され、その中には同一施設(施設B)利用者内感染1事例(事例3)含まれており、MLVA 型は一致し、PFGE 法解析でも類似度は100%で同一 group(c) に分類された。

3 08 事例

事例概要を表3に、PFGE 法解析結果を図3に示した。8月と12月に1件ずつ発生した散発事例であり PFGE 法は異なるバンドパターンであった。

4 その他の血清型事例

事例概要を表4に示した。1月に063:1株、10月に093:1株、081:1株、091:1株、0型別不明株:1株の計5株であった。すべて散発事例由来無症状保菌者からの分離株であった。PFGE 法解析結果は比較するものがないのでデータを蓄積した。

IV 考察

1 026 事例

事例1は家族内感染で、MLVA type、PFGE group 共に一致しており、家族間で感染したものと考えられる。事例2については、MLVA 解析では5株中4株は一致、1株は SLV であった。これらは同一 complex(21c203)であり、PFGE 解析でも同一 group であったことより同じ保育施設(施設A)内で幼児が感染し、同園に通う幼児及び職員に感染を起こしたと考えられる。また、国立感染症研究所の解析によると complex(21c203)は北海道、東北新潟、関東甲信越、東海北陸、近畿、中国四国の広いブロックに渡る22機関で分離された広域 complex である⁴⁾が関連性は不明である。

2 0157 事例

事例3は同じ保育施設(施設B)に通う幼児2名かが感染した事例であった。MLVA type、PFGE group 共に一致し、保育施設内で感染したと考えられる。

3 08 事例

2株とも勤務先での定期検便で判明した散発事例由来であり、PFGE 法解析でも関連性は認められなかった。

表1 026事例

菌株番号	事例No.	発生日	年齢	O血清群	H型	VT型	MLVA type	MLVA comp	PFGE group	疫学情報
EH21-02	1	2月	0-4歳	26	11	1	21m2004		a	患者、同居家族
EH21-03		3月	50歳代	26	11	1	21m2004		a	保菌者、同居家族
EH21-04		3月	0-4歳	26	11	1	21m2004		a	保菌者、同居家族
EH21-05		3月	0-4歳	26	11	1	21m2004		a	保菌者、同居家族
EH21-07		6月	20歳代	26	11	1	21m2045			保菌者(散発)
EH21-08	2	7月	0-4歳	26	11	1	21m2042	21c203	b	患者
EH21-09		7月	0-4歳	26	11	1	21m2042	21c203	b	患者
EH21-10		7月	0-4歳	26	11	1	21m2042	21c203	b	保菌者、接触者
EH21-11		7月	50歳代	26	11	1	21m2049	21c203	b	保菌者、接触者
EH21-12		7月	0-4歳	26	11	1	21m2042	21c203	b	保菌者、接触者

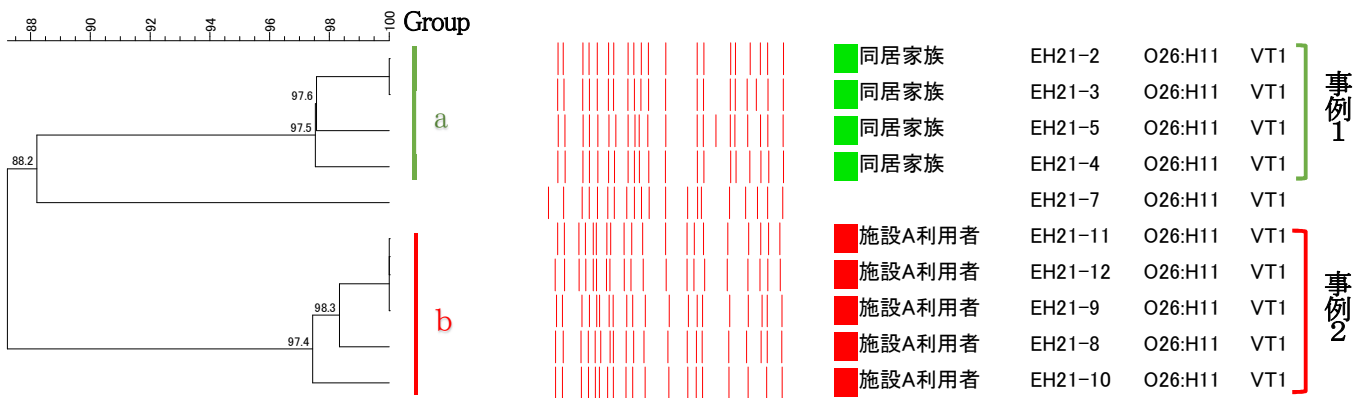


図1 026事例のPFGE法解析結果

表2 0157事例

菌株番号	事例No.	発生日	年齢	O血清群	H型	VT型	MLVA type	MLVA comp	PFGE group	疫学情報
EH21-06		5月	60歳代	157	7	1, 2	21m0041	21c013		患者(散発)
EH21-13	3	9月	0-4歳	157	-	1, 2	21m0175		c	患者(散発)
EH21-14		9月	0-4歳	157	-	1, 2	21m0175		c	保菌者、接触者
EH21-16		9月	5-9歳	157	-	1, 2	20m0078			患者(散発)
EH21-17		9月	70歳代	157	7	2	21m0313			患者(散発)

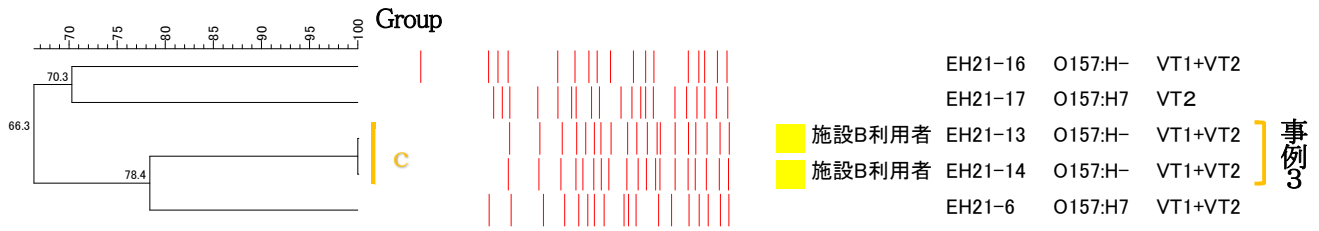


図2 0157 事例の PFGE 法解析結果

表3 08 事例

菌株番号	事例No.	発生日	年齢	O血清群	H型	VT型	eae	PFGE group	疫学情報
EH21-15		8月	50歳代	8	19	2	-		患者(散発)
EH21-22		12月	50歳代	8	19	2	-		保菌者(散発)

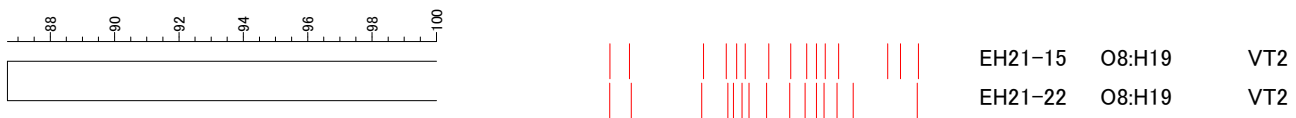


図3 08 事例の PFGE 法解析結果

表4 その他の0群事例

菌株番号	事例No.	発生日	年齢	O血清群	H型	VT型	PFGE group	疫学情報
EH21-01		1月	20歳代	63	6	2		保菌者(散発)
EH21-18		10月	40歳代	93	28	2		保菌者(散発)
EH21-19		10月	60歳代	UT	19	2		保菌者(散発)
EH21-20		10月	30歳代	81	21	1, 2		保菌者(散発)
EH21-21		10月	20歳代	91	—	1		保菌者(散発)

V まとめ

2021年1月から12月の間に搬入された腸管出血性大腸菌の菌株は、026:10株、0157:5株、08:2株、063:1株、081:1株、091:1株、093:1株、0型不明:1株であった。家庭内感染が1事例4株、保育施設での感染が2事例7株であった。同一事例でのMLVAパターンは一致

もしくは同一 complex であった。同一事例での PFGE パターンも一致もしくは類似性が高かった。また、散発事例の菌株間で MLVA 解析、PFGE 解析での類似性が高い菌株は確認されなかった。疫学調査、MLVA 解析、PFGE 解析での結果が一致した。また、事例2は MLVA 解析の結果、北海道、東北新潟、関東甲信静岡、東海北陸、近畿、中国四

国の広いブロックに渡る 22 機関で分離された広域 complex(21c203)に含まれることが判明した。MLVA 法を導入することで、より迅速な菌株解析と広域株の探知が可能となった。

文献

- 1) 国立感染症研究所細菌第一部(寺嶋淳):食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15~17 年度総括・総合研究報告書, 168-185, (2005)
- 2) 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ:腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック(0157、026、0111 編)第一版(Ver1.2), (2018)
- 3) 国立感染症研究所細菌第一部(泉谷秀昌, 李謙一, 伊豫田淳, 大西真):2017 年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析, 病原微生物検出情報, 39(5), 81-82, (2018)
- 4) 国立感染症研究所細菌第一部(泉谷秀昌, 李謙一, 伊豫田淳, 明田幸宏):2021 年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析, IASR, 43, 108-109, (2022)