

	13-16					
	ka-15	517557	611657	i578		香川県
	13Y30	613577	610646	i346		山口県
	13Y33					
⑥	1738	615457	311656	i443		岡山県
	1784			i444		
	E063			i218		愛媛県
	13Y40	713577	600657	i572		山口県
⑦	1758	717555	611657	i399		岡山県
	13-21					広島県
	13-22					
	1794	717557	611653	i613		岡山県
⑧	13Y05	717557	611657	i100	ステーキ店集発	山口県
	13Y06			i100		
	13Y07			i101		
	13Y08			i102		
	13Y09			i100		
	13Y10			i101		
	13Y11			i101		
	13Y12			i101		
	ka-01			i317		香川県
	13-09	717575	211657	i197		広島県
	1797	717575	611657	i607	1799 関連	岡山県
	1799			i607		
	1800			i609		
	1801			i608	1801 関連	
	1802					
	13-06			717577	211657	
	13-15					
	13-01	717577	611557	i12	13-01 関連	広島県
	13-02					
	13-03					
	13-04					
⑨	1737	717577	611657	i434		岡山県
	1739			i439		
	1760			i446		

13Y18			i347	保育園集発	山口県
13Y19			i348		
13Y20			i348		
13Y21			i348		
13Y22			i348		
13Y23			i348		
13Y24			i349		
13Y25			i348		
13Y26			i348		
13Y27			i350		
13Y28			i351		
13Y35			i347		
13Y36			i351		
13Y37			i352		
13Y38			i348		
13Y39			i575		
13Y01			i103		
13Y02			i103		
13Y31			i348		
13Y32			i348		
13Y41			i351		
13-19			i206		広島県
1766	717577	631557	i440		岡山県

島根県における IS-printing 法による腸管出血性大腸菌 O26 の 分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所
榎本 孝史 黒崎 守人

研究要旨

2013 年度に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 15 株 (4 事例) を用いて IS-printing 法 (IS 法) を用いた分子疫学解析を行い解析ツールとして有用であるか検討した。同一の IS コードを示した 2 事例はパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) においても同一のパターンを示したが、疫学的な関連性は不明であった。腸管出血性大腸菌 O26 における IS 法は菌株間の型別法としては事例数を増やす等のさらなる検討が必要であるが、解析結果がデジタルなデータであるためデータの比較も容易であり、迅速性、簡便性に優れていることから事例発生時のスクリーニング法として有効な解析法と思われる。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌等の分子疫学的解析手法として広く行われている PFGE 法は解析能や再現性も高く、またデータの蓄積もあり信頼性のある手法である。しかし、特殊な機器を必要とすること、解析に時間がかかることなど問題点もある。一方 IS 法は、Insertion Sequence 領域を標的とし、Multiplex PCR を基本としたサブタイピング法で、腸管出血性大腸菌 O157 については PFGE 法より迅速かつ簡便でほぼ同等の結果が得られるため普及してきている。腸管出血性大腸菌 O26 に関しては 2011 年に Mainil らが IS621 insertion site を標的とした IS 法を報告した¹⁾ ところである。今回、腸管出血性大腸菌 O26 感染症の発生時に IS 法を用いた分子疫学解析を行い解析ツールとして有用であるか検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2013 年度に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 15 株 (4 事例) を用いた。

2. 方法

(1) IS printing 法

Mainil らの報告¹⁾ に基づき実施し各 Insertion site の 5' 末端の内側と外側に設計されたプライマー (OS_L) と 3' 末端の内側と外側に設計されたプライマー (OS_R) を用いた PCR (L セット及び R セット) を行い、各 Insertion site が正しく検出されていることを確認した。L セット及び R セットのプライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」として、表 1 の例に従い変換し、detection PCR の結果 (+/-) を合わせて、5 桁にコード化した (以下 IS コード)。なお、反応組成を QIAGEN Multiplex PCR Kit に変更し一部の条件を変更した。

(2) パルスフィールドゲル電気泳動法

感染研ニュープロトコールに準拠しプラグ作成、Proteinase K 処理、制限酵素 (Xba I) 処理した。泳動は CHEF DR (BIO-RAD: 条件 6 V/cm, 2.2~54.2sec) で、0.5×TBE buffer (温度 14°C) を使用し 19 時間行った

C. 結果及び考察

表 2 に示すとおり 2013 年度に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 15 株 (4 事例) は IS コードで 3 タイプに分類された。事例 1 と事例 2、3 では L セットと R セットで異なる IS コードを示したため Mainil らの報告¹⁾ に基づきそれぞれ「61/553+」、「60/453+」と表記した。(図 1~5)

事例 2、3 が同一の IS コードを示したが、PFGE 法においてもすべての菌株が同じパターンであった (図 6)。両事例に何らかの関連性が疑われたが、感染源については不明であった。また、IS コードが違う事例 1、4 においても PFGE 法を実施したところ、事例 2 (菌株⑤)、事例 3 (菌株⑫) のバンドパターンと違うことを確認した (図 7)。

事例 1 の 4 株は同一の IS コードを示したが PFGE タイプは 3 タイプに分けられたものの、2 バンドまでの違いであったことから関連株と推測された。

腸管出血性大腸菌 O26 における IS 法は菌株間の型別法としては事例数を増やす等のさらなる検討が必要であるが、解析結果がデジタルなデータであるため、データの比較も容易であり、迅速性、簡便性に優れていることから事例発生時のスクリーニング法として有効な解析法と思われる。

E. 謝辞

ご協力・ご助言いただいた宮崎大学医学部

大岡唯祐先生に深謝いたします。

F. 研究発表なし

G. 参考文献

1). Mainil JG ら Journal of Applied Microbiology 111. 773-786

表1 ISコード変換例(菌株1)

L set												
IS insertion site	1	3	5	6	9	10	11	13	14	16	17	18
Size (bp)	328	189	260	292	369	617	457	412	666	983	871	570
増幅の有無	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	6			1			5			3		

R set													detection PCR
IS insertion site	1	3	5	6	9	10	11	13	14	16	17	18	4
Size (bp)	779	194	230	297	387	164	473	563	257	330	855	139	
増幅の有無	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	(+/-)*
加算	6			5			5			3			+

* 711bpのバンドが検出されれば(+)と表記し、639bpのバンドが検出されれば(-)と表記する。

表2 事例とISコード

事例	菌株No	届出年月日	性	住所	H型別	ベロ毒素型	備考	ISコード
1	①	7月24日	M	U市	H11	VT1	患者(保育園児)	61/553+
	②	7月24日	F	U市	H11	VT1	姉	61/553+
	③	7月24日	F	U市	H11	VT1	祖母	61/553+
	④	7月24日	M	U市	H11	VT1	曾祖父	61/553+
2	⑤	8月3日	F	N郡	H11	VT1	患者(保育園児)	60/453+
	⑥	8月3日	F	N郡	H11	VT1	祖母	60/453+
	⑦	8月3日	F	N郡	H11	VT1	母	60/453+
	⑧	8月3日	M	N郡	H11	VT1	父	60/453+
	⑨	8月3日	M	N郡	H11	VT1	兄	60/453+
	⑩	8月3日	M	N郡	H11	VT1	祖父	60/453+
	⑪	8月3日	M	N郡	H11	VT1	叔父	60/453+
3	⑫	8月27日	F	O市	H11	VT1	保育園児	60/453+
	⑬	8月27日	F	O市	H11	VT1	あね	60/453+
	⑭	8月27日	F	O市	H11	VT1	母	60/453+
4	⑮	11月24日	F	O郡	H11	VT1	健康保菌者	6751+

図1 菌株 No.①、②、③、④、⑤、⑥、⑦ (事例1、2) の

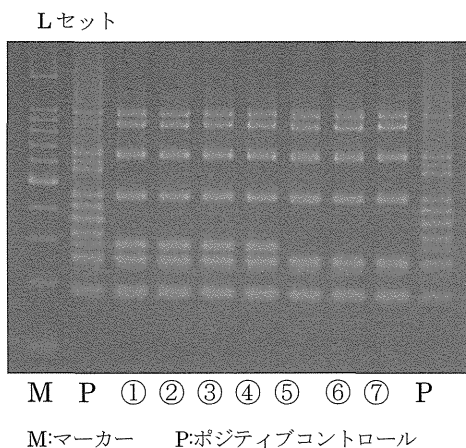


図2 菌株 No.①、②、③、④、⑤、⑥、⑦ (事例1、2) の R

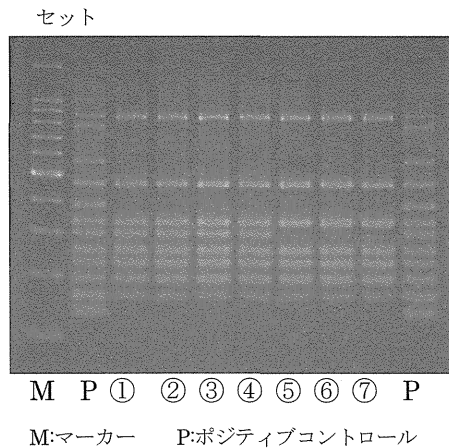
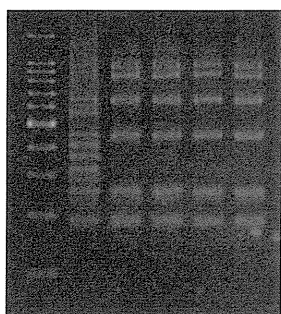


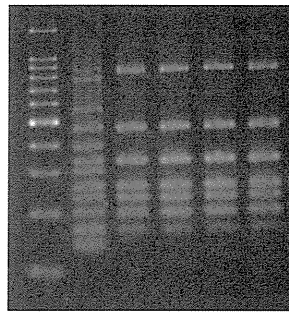
図3 菌株 No.⑧、⑨、⑩、⑪ (事例2) のLセット



M P ⑧ ⑨ ⑩ ⑪

M:マーカー P:ポジティブコントロール

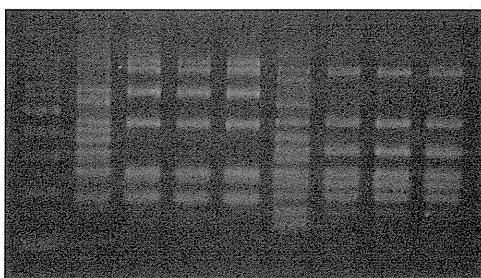
図4 菌株 No.⑧、⑨、⑩、⑪ (事例2) のRセット



M P ⑧ ⑨ ⑩ ⑪

M:マーカー P:ポジティブコントロール

図5 菌株 No.⑫、⑬、⑭ (事例3) のLセット(左)及びRセット(右)



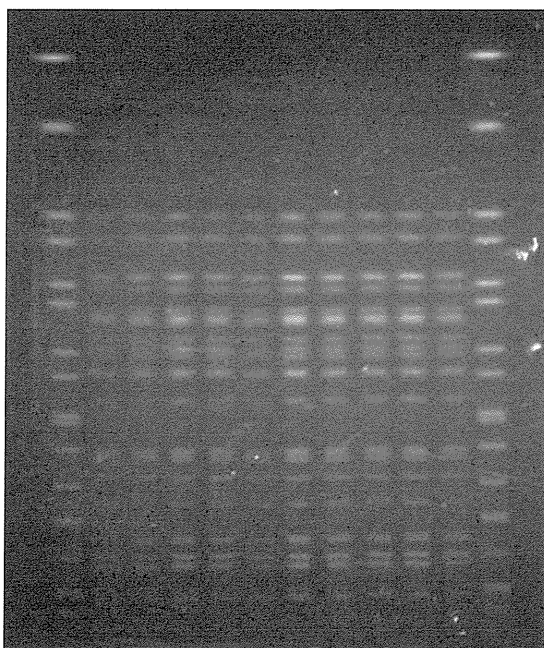
M LP ⑫ ⑬ ⑭ RP ⑫ ⑬ ⑭

M:マーカー

LP:Lセットポジティブコントロール

RP:Rセットポジティブコントロール

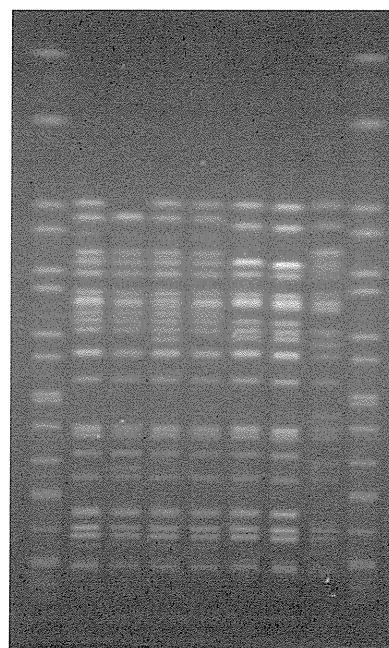
図6 菌株 No.⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩、⑪、⑫、⑬、⑭ (事例2、3) のPFGE法による泳動像



M ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ M

制限酵素: Xba I M: S. Braenderup

図7 菌株 No.①、②、③、④、⑤、⑫、⑮ (事例1、4) のPFGE法による泳動像



M ① ② ③ ④ ⑤ ⑫ ⑮ M

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 における分子疫学的解析法の検討

研究協力者 広島県立総合技術研究所保健環境センター
山田 裕子 今井 佳積 東久保 靖

研究要旨

2013年に広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 20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, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を実施した。その結果, 3法による解析結果はほぼ一致し, 同等の型別能を有していると考えられた。疫学的関連の疑われる菌株間では, PFGE タイプと IS コードがすべて一致し, MLVA 法では, 1Locus, 1リポート以内の差異で, 類似度 85%以上の同一クラスターに分類された。これらの結果から, 当センターにおいて今年度新たに実施した MLVA 法も, IS 法と同様に, 菌株間の関連性を検討する上で, 迅速性・簡便性に優れた有用な分子疫学的解析法であることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の分子疫学的解析法として, 従来からパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法が用いられているが, 近年, 迅速性・簡便性に優れた IS-printing System (IS) 法や Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法が開発され, その有用性が検討されている。今回, 2013年に県内で分離された EHEC O157について, これまで当センターで検討している IS 法に加えて, 新たに MLVA 法を実施し, その有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2013年1月から8月に県内で分離され, 当センターへ搬入された EHEC O157 20株を用いた。各菌株の概要を表1に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

国立感染症研究所による解析結果を参照し, PFGE Type No.(TN)を表記した。

(2) IS-printing 法

IS-printing System (東洋紡) を用い, 取扱説明書に従って実施した。判定は, 2種類のプライマーセット (1st set, 2nd set) ごとに, 増幅ありを「1」, 増幅なしを「0」とし, 増幅サイズの大きいバンドから順に 3バンドごとに「1」, 「2」, 「4」の係数を乗じた数値を加算して, 1st set, 2nd set の順に並べ, 12桁の IS コードとした。

(3) MLVA 法

Izumiyaら¹⁾の方法に従い, 表2に示したプライマーを用いて, 9ヶ所のLocusについて解析を行った。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。また、代表的なフラグメントについて、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行い、各Locusのリポート数を確認した。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。次に、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用いて、categorical coefficientおよびUPGMAによりクラスター解析を行った。

C. 研究結果

県内で 2013 年に分離された EHEC O157 20 株の PFGE 法, IS 法, MLVA 法による解析結果を表 3 に示した。

1. PFGE 法による解析結果

EHEC O157 20 株は、PFGE 法により、8 パターンに分類された。接触者等の疫学的に関連の疑われる菌株間では、13-01～04 の 4 株は TN i12 に、13-07, 08, 10～14 および 16 の 8 株は TN g501 に型別され、すべて同一タイプであった。また、13-06 と 15, 13-21 と 22 の PFGE タイプが同一であった。

2. IS 法による解析結果

IS 法により、20 株は 8 つのコードに分類され、PFGE 法による分類と完全に一致した。同一 PFGE タイプで異なる IS コード、同一 IS コードで異なる PFGE タイプを示す株は認められなかった。また、IS コードが「341057-310652」の 13-07, 08, 10～14 および 16 のグループでは、すべての菌株で 1st プライマーセットの高分子量の位置にエキストラバンドが認められた。

3. MLVA 法による解析結果

MLVA 法によるデンドログラムを図 1 に示した。類似度 85%以上で分類すると、7 つのクラスターに分類された。

PFGE 法により TN i12 に分類された 13-01～04 の 4 株間では、O157-3 の Locus で 1 リポート (13-02), O157-10 で 1 リポート (13-04) の差異が 1 株ずつに認められたが、類似度 85%以上の同一クラスターに分類された。TN g501 に分類された 13-07, 08, 10～14 および 16 の 8 株間では、1 株 (13-13) のみ O157-3 で 1 リポート異なっていたが、すべての株が類似度 89%以上の同一クラスターに分類された。

類似度 85%以上を同一クラスターとした場合の MLVA 法による分類は、1 株を除き、PFGE 法, IS 法による分類と一致した。解析結果の異なった 13-09 については、PFGE 法および IS 法では、13-06 および 15 と異なるタイプに分類されたが、MLVA 法では類似度 89%の同一クラスターに分類され、O157-10 の Locus のみ 2～5 リポート違いで、その他 8 つの Locus ではリポート数が完全に一致していた。

また、9ヶ所すべての Locus でリポート数が一致した場合は、PFGE タイプ, IS コードが異なる株は存在しなかった。

D. 考 察

2013 年に広島県内で分離された EHEC O157 20 株を、PFGE 法, IS 法, MLVA 法により解析した。

13-01～04 の 4 株と、13-07, 08, 10～14 および 16 の 8 株は、それぞれ患者情報から疫学的関連が疑われる株であり、PFGE タイプと IS コードが一致した。MLVA 法では、1Locus, 1 リポート以内の差異で、類似度 85%以上の同一クラスターに分類された。これらの結果から、それぞ

れのグループの感染源が同一である可能性が考えられた。

次に、患者情報からは関連性の認められなかった13-06および15について、PFGEタイプおよびISコードが一致し、MLVA法においては、13-09も含め、O157-10の1Locusのみの2~5リピート違いで、類似度89%の同一クラスターに分類された。また、IS法では13-06および15と09は1バンドのみの違いであった。13-06と15は同一地域で分離された株であるが、分離時期が約3ヶ月離れており、13-09と15は、地域は異なるが近い時期に分離されている。偶然の一致である可能性も否定できないが、O157-10のLocusは変異しやすい領域であることも考慮すると、遺伝学的に近縁であることが推察され、広域散在発生の可能性も考えられる。

また、13-21と22は、患者情報では関連が認められなかったが、PFGEタイプ、ISコード、MLVAリピート数のいずれも完全に一致しており、分離時期も近いことから、関連を有する可能性が示唆された。

同一ISコードで異なるPFGEパターンを示す株の存在が以前から報告されているが²⁾、今回供試した菌株では、PFGE法とIS法による分類結果は完全に一致し、IS法が、PFGE法に比べて迅速性・簡便性に優れた有用な分子疫学的解析法であることが確認された。また、疫学的関連が推察される13-07、08、10~14および16のグループでは、すべての菌株に共通して、1stプライマーセットの高分子量の位置に明瞭なエキストラバンドが認められた。2012年に北海道で発生したO157集団感染事例由来株は、IS法においてエキストラバンドを有することが特徴であったことが報告されているが³⁾、同様に、エキストラバンドも集団発

生時には有用な情報となり得ることが示唆された。

MLVA法によるクラスター解析では、PFGE法、IS法による分類とほぼ一致した。前述のとおり、13-09が13-06および15と同一クラスターに分類された点が2法と異なっていた。これらの株はPFGE法とIS法では識別できないが、何らかの関連性を有する可能性もあるため、今後、さらなるデータの蓄積が必要であると考えられる。

一方、MLVA法において、すべてのLocusでリピート数が完全に一致した場合、PFGEタイプ、ISコードが異なる株は存在しなかった。このことから、MLVA法による解析結果が完全に一致する株は関連性が高いと考えられ、広域発生事例を迅速に探知する疫学解析法としての有用性が示唆された。一方で、PFGEタイプとISコードが一致し、疫学的関連が推察されるグループ内でも、MLVA法ではリピート数に若干の差異が認められたことから、MLVA法においては、同一由来株と判断する範囲が難しく、基準の設定が課題であると考えられる。

本研究により、当センターにおいてもMLVA法の有用性が確認された。今回の結果では、PFGE法、IS法、MLVA法による解析結果はほぼ一致し、同等の型別能を有していると考えられたが、MLVA法において一部異なる結果も得られたため、今後の検討が必要である。これらの結果から、迅速性・簡便性に優れたIS法とMLVA法、現在の標準法であるPFGE法の3法を必要に応じて併用することにより、菌株間の関連性をより明確にすることが可能となると考える。

E. 結論

EHEC O157の分子疫学的解析法として、

PFGE 法, IS 法および新たに MLVA 法を
検討したところ, 3 法による解析結果はほ
ぼ一致し, IS 法とともに, MLVA 法も迅速
性・簡便性に優れた疫学的解析法として有
用であると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Izumiya H. et al. (2010): *Microbiol Immunol*, 54: 569- 577.
- 2) 勢戸和子 他(2008): 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 101-128.
- 3) 小嶋由香 他(2013): 病原微生物検出情報, 34(5): 127-128.