

香川県で分離された腸管出血性大腸菌の遺伝子検査 (2018)

Genetic Testing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Isolated in Kagawa Prefecture (2018)

関 和美 岩下 陽子 福田 千恵美 西山 由加里
Kazumi SEKI Yoko IWASHITA Chiemi FUKUDA Yukari NISHIYAMA

要 旨

2018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23株について遺伝子検査を行い、菌の同一性の確認を行った。分離された腸管出血性大腸菌は、0157:8株、026:8株、0111:1株、091:1株、08:2株、0113:1株、0168:1株、0183:1株であった。0157についてはパルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE 法) と IS - printing System (IS 法) を実施し、0157以外についてはPFGE法を実施した。また、0157と026、0111、091については、国立感染症研究所 (感染研) が反復配列多型解析法 (multiple locus variable-number tandem repeat analysis: MLVA 法) により解析した結果も併せて比較した。発生状況は、一般世帯内発生が3事例、散発発生が14事例であった。

結果は、0157の一般世帯内発生では、PFGE法、IS法、MLVA法の全ての解析結果で同一性が確認できた。また、026の一般世帯内発生では、PFGE法とMLVA法で同一性が確認できた。

0157の散発発生の中には、IS法で同一性が確認されたが、PFGE法とMLVA法で同一性が確認できなかった事例があった。また、026の散発発生では、MLVA法で同一性が確認できたが、PFGE法では確認できなかった事例があり、3つの検査方法の結果が一致しない場合があった。

菌の同一性の確認を確実なものにするためには、いろいろな角度から検査をすることが重要である。

キーワード：腸管出血性大腸菌、菌の同一性、PFGE法、IS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、香川県では、毎年20～50名の感染者が発生している。腸管出血性大腸菌の遺伝子検査を行い、結果を比較・解析し、菌の同一性を確認することは、感染源の究明や感染拡大防止、予防対策などに有用であり、公衆衛生上重要である。

本報では、2018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23株について遺伝子検査を行い、菌の同一性の確認を行ったので報告する。

II 方法

1 供試菌株

2018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23株 (0157:8株、026:8株、0111:1株、091:1株、08:2株、0113:1株、0168:1株、0183:1株) を対象とした。

2 方法

腸管出血性大腸菌のうち、0157についてはPFGE法とIS法を実施し、0157以外についてはPFGE法を実施した。また、0157と026、0111、091については、感染研がMLVA法により解析した結果も併せて比較した。

(1) PFGE法

制限酵素 Xba I を用い、2004年に感染研で示された方法¹⁾ に従いPFGE法を実施した。疫学的解釈は、感染研の示した分類²⁾ では、DNAの断片パターン上での異なるバンド数が0の場合は一致する、2～3は密接に関係がある、4～6は関係する可能性がある、7以上は不一致としているので、それに基づき、バンドパターンの相違数が3以内を同一クラスターとして分類した。

(2) IS法

IS - printing System (東洋紡) を用いて実施した。電気泳動は3%アガロースゲルを使用した。増幅されたスタンダードDNA18バンドを高分子量側から3バンドに区切り、各区分に順に「1」「2」「4」の数字を当て、検体はスタ

ンダーDNAのバンドと比較し、増幅された場合はその数字を加算して12桁にコード化し解析した。

(3) MLVA法

感染研が実施した解析結果を用いた。感染研では、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 0157の解析結果

事例概要を表1に示す。

(1) PFGE法の解析結果

PFGE解析結果を図1に示す。事例1～6の8株は、5つのバンドパターンに型別された。事例1の一般世帯内発生

3株は、全て同一のバンドパターンであった (EH18-12、14、15)。事例4、5の散発発生2株は、同一のバンドパターンであった (EH18-20、EH18-22)。さらに、事例1と事例4、5が、同一クラスター【A】に分類された。事例2、3、6の散発発生3株は、全て異なるバンドパターンであった (EH18-13、EH18-16、EH18-21)。

(2) IS法の解析結果

IS解析結果を表1に示す。事例1～6の8株は、4つのISコードに型別された。事例1の一般世帯内発生3株は、全て同一のISコード (317575 211756) であった (EH18-12、14、15)。また、事例3、4、5の散発発生3株が、同一のISコード (717557 611657) であった (EH18-16、EH18-20、EH18-22)。事例2、6の散発発生2株は、異なるISコードであった (EH18-13、EH18-21)。

表1 0157 事例概要、IS法とMLVA法の解析結果

事例番号	菌株番号 (EH)	血清型	発症		毒素型	IS-printing		MLVA(感染研)	
						1st	2nd	MLVA型	MLVA complex
1	18-12	O157:H7	有	一般世帯	VT1,2	317575	211756	18m0025	18c022
	18-14		有						
	18-15		有						
2	18-13	O157:H7	無		VT2	145045	301443	16m0278	18c050
3	18-16	O157:H7	有		VT1,2	717557	611657	14m0428	—
4	18-20	O157:H7	有		VT1,2	717557	611657	16m0039	18c016
5	18-22	O157:H7	有		VT1,2	717557	611657	16m0039	18c016
6	18-21	O157:H7	無		VT2	114057	303443	18m0504	—



図1 0157 PFGE法の解析結果

(3) MLVA法の解析結果

MLVA解析結果を表1に示す。事例1～6の8株は、5つのMLVA型に型別された。事例1の一般世帯内発生3株は、同じ型(18m0025)であった(EH18-12、14、15)。また、事例4、5の散発発生2株が、同じ型(16m0039)であった(EH18-20、EH18-22)。事例2、3、6の散発発生3株は、全て異なる型であった(EH18-13、EH18-16、EH18-21)。

2 026の解析結果

事例概要を表2に示す。

(1) PFGE法の解析結果

PFGE解析結果を図2に示す。事例7～10の8株は、5つのバンドパターンに型別された。事例8の一般世帯内発生

4株は、同一のバンドパターンであった(EH18-5～8)。事例7の一般世帯内発生2株は、異なったバンドパターンであったが、同一クラスター【B】に分類された。(EH18-3、4) 事例9、10の散発発生2株は、異なるバンドパターンであった(EH18-9、EH18-18)。

(2) MLVA法の解析結果

MLVA解析結果を表2に示す。事例7～10の8株は、3つのMLVA型に型別された。事例7と8の一般世帯内発生は、各事例内で同じ型であった(EH18-3、4 18m2014)(EH18-5～8 18m2031)。また、事例9の散発発生が、事例8と同じ型(18m2031)であった(EH18-9、EH18-5～8)。事例10の散発発生は、異なる型であった(EH18-18)。

表2 026 事例概要、MLVA法の解析結果

事例番号	菌株番号(EH)	血清型	発症		毒素型	MLVA (感染研)	
						MLVA型	MLVA complex
7	18-3	O26:H11	無	一般世帯	VT1	18m2014	—
	有						
8	18-5	O26:H11	有	一般世帯	VT1	18m2031	—
	18-6		有				
	18-7		有				
	18-8		有				
9	18-9	O26:H11	無		VT1	18m2031	—
10	18-18	O26:H11	有		VT1	13m2018	—

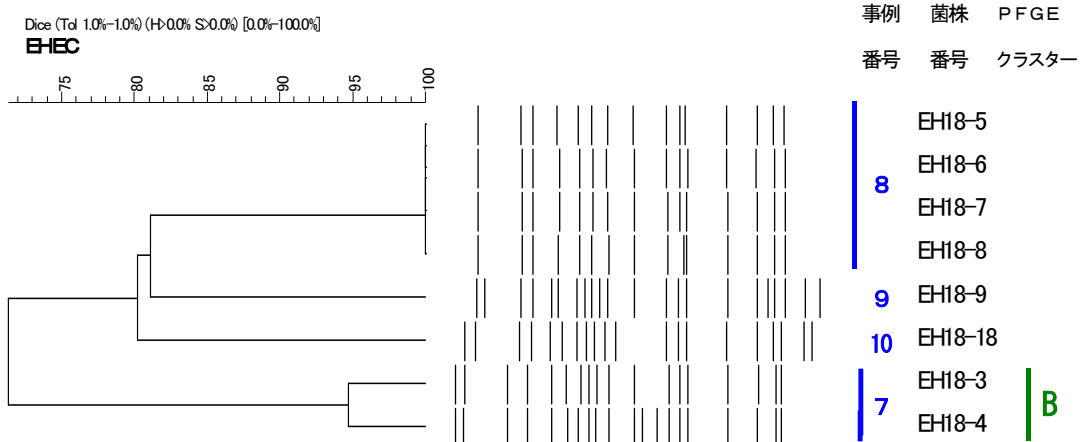


図2 026 PFGE法の解析結果

3 08の解析結果

事例概要を表3、PFGE解析結果を図3に示す。事例11、12の散発発生2株は、異なるバンドパターンであった(EH18-11、EH18-19)。

ものがないため2017年の菌株と比較した。PFGE解析結果を図4に、MLVA解析結果と2017年事例概要を表4に示す。

事例13の散発発生のPFGE解析結果は、2017年の株とは異なるバンドパターンであった。また、MLVA型も2017年の株とは異なる型であった(EH18-23)。

4 0111の解析結果

事例概要を表4に示す。PFGE解析結果は、比較する

表3 08 事例概要

事例番号	菌株番号 (EH)	血清型	発症	毒素型
11	18-11	O8:H19	無	VT1,2
12	18-19	O8:H19	無	VT2



図3 08 PFGE法の解析結果

表4 0111 事例概要、MLVA法の解析結果

事例番号	菌株番号 (EH)	血清型	発症	毒素型	MLVA(感染研)	
					MLVA型	MLVA complex
13	18-23	O111:H-	有	VT1,2	18m3047	—
17-1	17-4	O111:H-	有	VT1	16m3009	17c302
	17-5		有			
	17-6		無			
	17-7		有			
17-2	17-12	O111:H-	有	VT1	17m3010	—
17-3	17-18	O111:H-	有	VT1	17m3022	—

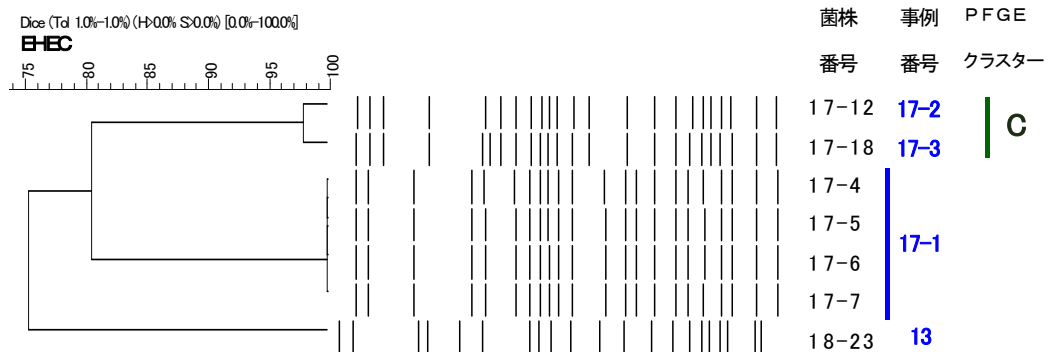


図4 0111 PFGE法の解析結果

5 091の解析結果

事例概要を表5に示す。PFGE解析結果は、比較するものがないため2017年の菌株と比較した。PFGE解析結果を図5、MLVA解析結果と2017年事例概要を表5に示す。

事例14の散発発生時のPFGE解析結果は、2017年の株とは異なるバンドパターンであった。また、MLVA型も2017年

の株とは異なる型であった (EH18-2)。

6 0113、0168、0183の解析結果

事例概要を表6に示す。PFGE解析結果は、比較するものがないためデータを蓄積した。

表5 091 事例概要、MLVA法の解析結果

事例番号	菌株番号 (EH)	血清型	発症	毒素型	MLVA(感染研)	
					MLVA型	MLVA complex
14	18-2	O91:H7	無	VT1	18m8003	—
17-4	17-36	O91:H-	無	VT1	17m8021	—
17-5	17-47	O91:H-	無	VT1	17m8024	—

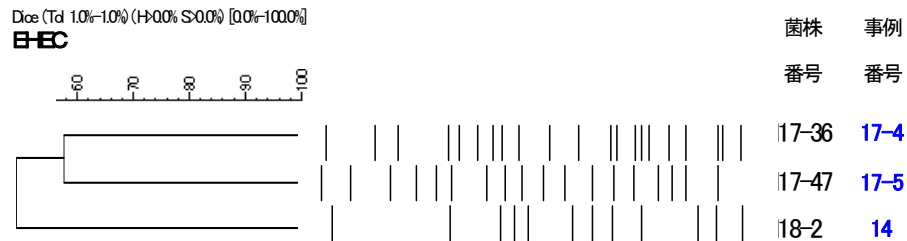


図5 091 PFGE法の解析結果

表6 0113、0168、0183 事例概要

事例番号	菌株番号 (EH)	血清型	発症	毒素型
15	18-17	O113:H21	無	VT2
16	18-10	O168:H7	無	VT2
17	18-1	O183:H18	無	VT2

IV 考察

1 0157

事例1の一般世帯内発生では、PFGEのバンドパターン、ISコード、MLVA型が全て一致しており、菌の同一性が確認された。また、事例4、5は散発発生だが、PFGEのバンドパターン、ISコード、MLVA型が全て一致しており、菌の同一性が確認された。しかし、事例4と5については詳しい疫学調査は行われておらず、この2事例の共通点は不明である。

事例3は、事例4、5とISコードが一致していたが、PFGEのバンドパターンとMLVA型は異なっていた。また、事例1と事例4、5がPFGEで同一クラスターに分類されたが、MLVA型が異なっておりcomplexも異なっていた。事例3と事例4、5及び事例1と事例4、5は、3つの方法で結果が一致せず、それぞれの事例間で菌の同一性は確認されなかった。

2 026

事例7、8の一般世帯内発生は、PFGEのバンドパターンとMLVA型で、各事例内で菌の同一性が確認された。

事例9の散発発生が、事例8の一般世帯内発生と同一MLVA型であったが、PFGEのバンドパターンが異なっており、この2事例間で菌の同一性は確認されなかった。

3 IS法、PFGE法、MLVA法の3つの検査方法の結果が一致しない事例があったが、検査方法により遺伝子の調べる部位や調べ方等が異なるため、結果に違いが出たと考えられる。菌の同一性の確認を確実なものにするためには、いろいろな角度から検査をすることが重要である。

V まとめ

1 事例1は事例内で、また事例4と5は、IS法とPFGE法及びMLVA法で同一性が確認できた。

2 事例3と4、5は、IS法で同一性が確認できたが、PFGE法とMLVA法では確認できなかった。

3 事例7、8は各事例内で、PFGE法とMLVA法で同一性が確認できた。

4 事例8と9は、MLVA法で同一性が確認できたが、PFGE法では確認できなかった。

5 菌の同一性の確認を確実なものにするためには、いろいろな角度から検査をすることが重要である。

文献

- 1) 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究者 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) 国立感染症研究所細菌第一部 石原朋子, 泉谷秀昌 伊豫田淳, 大西真：腸管出血性大腸菌の分子型別, 病原微生物検出情報, **35**(5), 129-130, (2014)
- 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)