

香川県で分離された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析(2022-2023)

Molecular epidemiological analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Kagawa Prefecture (2022-2023)

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の検討をした。対象は 2022年1月から2023年12月に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌65株 (O157 : 27株、O105 : 10株、O26 : 4株、O111、O186 : 各3株、O113、O115 : 各2株、O23、O55、O76、O100、O103、O121、O146、O148、O174、O181 : 各1株、OUT : 4株) を用いた。O157、O26、O111はMLVA法を、その他の血清群はPFGE法にて解析を行った。発生状況は、2022年は散発が18事例、家族間での感染が2事例、2023年は散発が24事例、家族・知人間での感染が2事例、県内の同一施設利用者間での感染1事例、県外施設での集団感染1事例であった。同一事例の菌株はすべて関連性が見られた。また、別事例や散発事例との間で同一MLVA complexの株があったが関連は不明であった。

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、全数把握対象疾患となっている。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。また、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り、当センターでは2019年から腸管出血性大腸菌 O157、O26、O111 について MLVA 法での分子疫学解析を行っている。

今回、2022年、2023年に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌について MLVA、PFGE 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

2022年1月から2023年12月に香川県内で分離され当センターに搬入された腸管出血性大腸菌は65株 (O157 : 27株、O105 : 10株、O26 : 4株、O111、O186 : 各3株、O113、O115 : 各2株、O23、O55、O76、O100、O103、O121、O146、O148、O174、O181 : 各1株、OUT (O 群型別不能 : O-Untypable) : 4株) を対象とし (図1)、O157、O26、O111 については、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。また、腸管粘膜接着に関わる細胞外膜蛋白であるインチミンをコードする遺伝子 *eae* の検出を腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル¹⁾ に従い PCR 法によって行った。

2 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 DNA を鋳型とし、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)、解析は GeneMapper (ThermoFisher) を用いた。また、国立感染症研究所より検査結果をもと

* 退職

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 (MLVA complex) 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⁾。

3 PFGE 法

2004年に国立感染症研究所で示された方法⁴⁾に従い実施した。供試菌をトリプチケースソイブロス (ベクトン ディッキンソン) 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 6V/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。

III 結果

2022 年は散発が 18 事例 (18 株)、家族・親戚間での感染が 2 事例 (4 株) であった。2023 年は散発が 24 事例 (24 株)、家族・知人間での感染が 2 事例 (10 株)、県内の同一施設利用者間での感染 1 事例 (8 株)、県外施設での集団感染患者 1 例 (1 株) であった。

1 0111 事例

事例概要及び MLVA 解析結果を表 1 に示した。6 月に 3 株搬入された。すべての株が *eae* を保有していた。同居親族間での感染事例 (事例 1) が 2 株、散発事例が 1 株であった。集発事例 2 株の、MLVA type は 1 ローカス違いであった。

2 0157 事例

事例概要及び MLVA 解析結果を表 2 に示した。搬入されたすべての株が *eae* を保有していた。27 株のうち、散発事例が 16 株、集発事例が 11 株であった。他県施設での集団感染が 1 事例 (事例 3)、同居家族を含む親族間の感染事例が 2 事例 (事例 4、6) であった。23c024、23c033 の 2 種類の MLVA complex が検出された。MLVA 情報集計・可視化システム MLVA-mate により Minimum Spanning Tree (MST) を作成した⁵⁾。(図 2)

(1) 23c024

親族内感染 2 事例 (事例 4、6) および散発事例 1 事例との間で MLVA complex が一致したが事例間での関連は不明であった。

(2) 23c033

散発事例 2 事例が含まれていたが、関連は不明であった。

3 026 事例

事例概要及び MLVA 解析結果を表 3 に示した。すべて散発事例で異なる MLVA 型であった。すべての株が *eae* を保有していた。

4 0105 事例

事例概要を表 4 に、PFGE 法解析結果を図 3 に示した。OUT、VT2 の菌株として搬入された。VT 遺伝子の確認のために PCR 法を行ったところ、マルチプレックス PCR 法 (フルタイピング)¹⁾ には VT2 遺伝子が検出されなかったが、ExEC マルチプレックス PCR⁶⁾ では、VT2 サブタイプ *stx2f* が検出された。同一施設利用者由来 (事例 5) 8 株と散発事例 2 株が搬入され、すべて VT2 サブタイプ *stx2f*、*eae* が検出され、PFGE パターンも同一グループ (group A) に含まれていたが、散発事例との関連は不明であった。

5 0186 事例

事例概要を表 5、PFGE 法解析結果を図 4 に示した。すべての株が *eae* を保有していた。家族内感染 1 事例 (事例 2) 2 株と散発事例 1 株であった。同一事例では PFGE 法解析でも同一グループ (group B) に分類された。

6 その他の血清型

事例概要を表 6 に示した。搬入された 18 株のうち、O113、O115 が 2 株ずつ、その他の血清型が 1 株ずつであった。また、OUT が 4 株搬入されたが H 型はすべて異なった。16 株 (88.9%) は *eae* を保有していなかった。O113 及び O115 事例の PFGE 法解析結果を図 5、6 に示した。いずれも散発事例であり PFGE 法解析では異なるバンドパターンであった。

その他の株は、PFGE 法解析結果を比較するものがないためデータを蓄積した。

IV まとめ

2022 年 1 月から 2023 年 12 月の間に香川県内で分離され当センターに搬入された腸管出血性大腸菌は O157:

27株、O105:10株、O26:4株、O111、O186:各3株、O113、O115:各2株、O23、O55、O76、O100、O103、O121、O146、O148、O174、O181:各1株、OUT:4株の65株であった。

家族・親戚等内感染は4事例、同一施設関係者間での感染が2事例で、そのうちの1事例は他県施設での集団感染事例であった。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、異なる事例もしくは散発事例の菌株間でMLVA解析での類似性が高い菌株が確認されたが関連は不明であった。

O105事例の菌株からはVT2のサブタイプであるstx2fが検出されたが、VT遺伝子でよく利用されているPCR法でもプライマーによっては検出できない場合がある

るので注意が必要である。

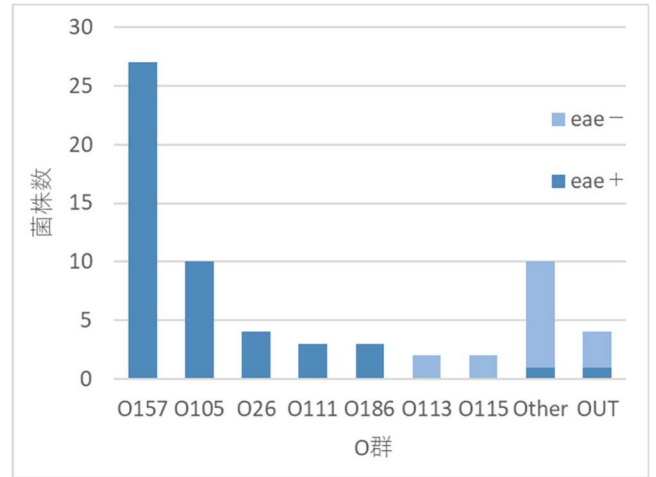


図1 県内で分離された腸管出血性大腸菌のO群とeae保有菌株数(2022-2023)

表1 O111事例

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	MLVA type	MLVA comp
EH22-08	1	2022年6月	10~19歳	M	A家族・親戚	患者	集発	O111	H-/Hg8 ^{※2}	1+2	+	22m3016 ^{※1}	-
EH22-09	1	2022年6月	10~19歳	M	A家族・親戚	患者	集発	O111	H-/Hg8 ^{※2}	1+2	+	22m3017 ^{※1}	-
EH22-10		2022年6月	5~9歳	F	散発	患者	散発	O111	H8	1+2	+	15m3007	-

■ 事例1

※1 1ローカス違い

※2 ※ H-:運動性なし/ Hg:H型に対応した遺伝子型 (H-genotype=Hg)

表2 0157 事例

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	MLVA type	MLVA comp
EH22-11		2022年6月	60~69歳	F	散発	保菌者	散発	O157	H7	1+2	+	22m0112	-
EH22-13		2022年8月	50~59歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	22m0267	-
EH22-15		2022年7月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	O157	H7	1+2	+	20m0270	-
EH23-04	3	2023年6月	20~29歳	M	他県施設	患者	集発	O157	H7	2	+	23m0077	-
EH23-07	4	2023年7月	20~29歳	M	C家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	23m0207	23c024
EH23-08	4	2023年7月	20~29歳	F	C家族・親戚	保菌者	集発	O157	H7	1+2	+	23m0207	23c024
EH23-09	4	2023年7月	50~59歳	F	C家族・親戚	保菌者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-10		2023年7月	20~29歳	M	散発	患者	散発	O157	H7	2	+	22m0551	-
EH23-11	4	2023年7月	20~29歳	F	C家族・親戚	保菌者	集発	O157	H7	1+2	+	23m0238	23c024
EH23-12		2023年7月	50~59歳	M	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	22m0271	23c033
EH23-13		2023年7月	10~19歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	22m0271	23c033
EH23-14		2023年7月	60~69歳	M	散発	患者	散発	O157	H7	2	+	23m0239	-
EH23-22		2023年8月	10~19歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	2	+	23m0261	-
EH23-23		2023年8月	10~19歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	23m0262	-
EH23-24		2023年8月	70歳以上	M	散発	保菌者	散発	O157	H7	1+2	+	23m0263	-
EH23-26		2023年8月	0~4歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-31		2023年8月	10~19歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	20m0320	-
EH23-34		2023年8月	10~19歳	F	散発	患者	散発	O157	H-	1+2	+	23m0405	23c064
EH23-35	6	2023年9月	0~4歳	F	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	23m0207	23c024
EH23-36	6	2023年9月	30~39歳	F	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-37	6	2023年9月	5~9歳	F	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-38	6	2023年9月	0~4歳	M	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-39	6	2023年9月	0~4歳	M	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-40	6	2023年9月	0~4歳	M	D家族・親戚	患者	集発	O157	H7	1+2	+	20m0374	23c024
EH23-41		2023年9月	30~39歳	F	散発	患者	散発	O157	H7	2	+	23m0407	-
EH23-42		2023年9月	70歳以上	M	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	23m0453	-
EH23-45		2023年10月	20~29歳	M	散発	患者	散発	O157	H7	1+2	+	23m0614	-

事例3 事例4 事例6

23c024 23c033

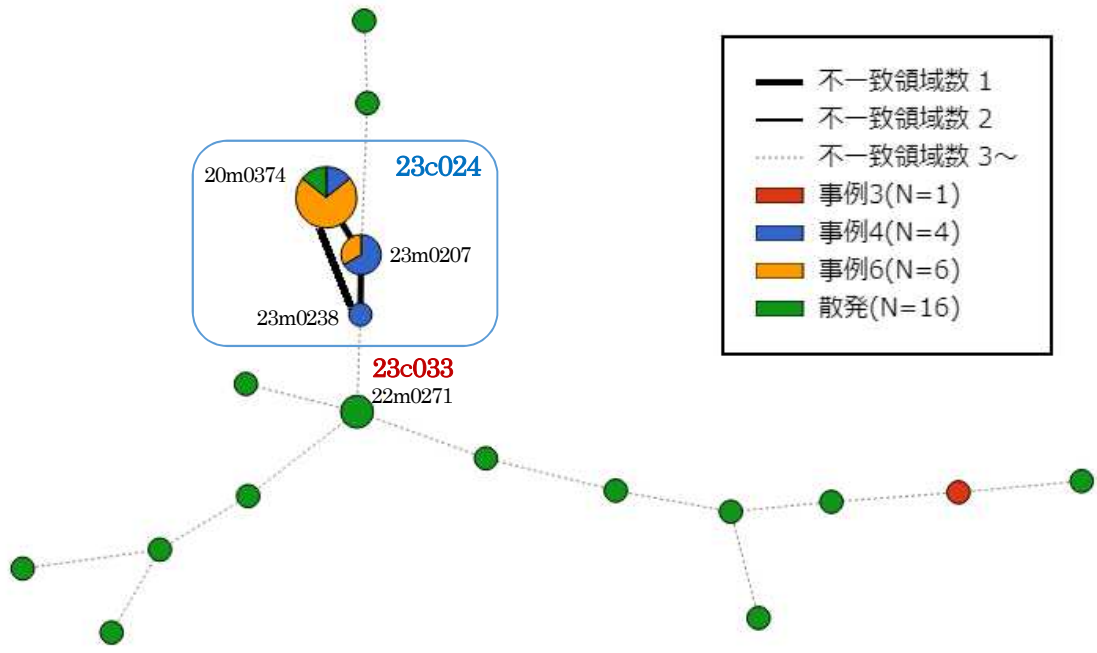


図2 0157 事例の MLVA 解析結果を用いた Minimum Spanning Tree

表3 026 事例

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	MLVA type	MLVA comp
EH22-06		2022年5月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	O26	H11	1	+	22m2043	-
EH22-07		2022年6月	10~19歳	M	散発	患者	散発	O26	H11	1	+	22m2044	-
EH22-21		2022年11月	0~4歳	F	散発	患者	散発	O26	H11	1	+	22m2123	-
EH23-46		2023年12月	70歳以上	F	散発	保菌者	散発	O26	H11	1	+	23m2096	-

表4 0105 事例

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	PFGE group
EH23-15	5	2023年7月	20~29歳	F	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-16	5	2023年7月	50~59歳	F	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-18	5	2023年7月	20~29歳	M	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-19	5	2023年7月	10~19歳	F	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-20		2023年7月	40~49歳	F	散発	患者	散発	O105	H7	2	+	A
EH23-25	5	2023年8月	70歳以上	F	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-27	5	2023年8月	30~39歳	M	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-28	5	2023年8月	30~39歳	M	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-29	5	2023年7月	70歳以上	M	a 施設関係者	保菌者	集発	O105	H7	2	+	A
EH23-30		2023年8月	30~39歳	F	散発	保菌者	散発	O105	H7	2	+	A

■ 事例5

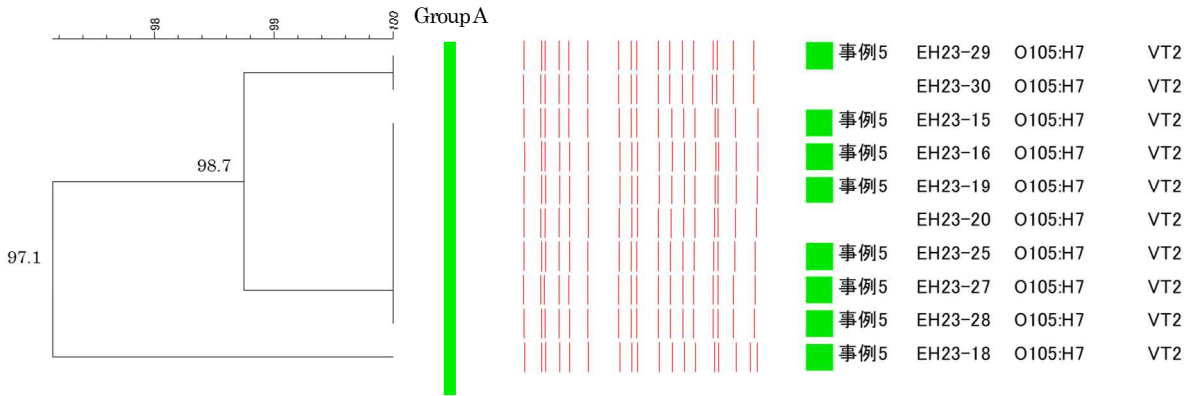


図3 O105 事例の PFGE 法解析結果

表5 O186 事例

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	PFGE group
EH22-02		2022年4月	30~39歳	F	散発	保菌者	散発	O186	H-/Hg10 [※]	1+2	+	-
EH22-19	2	2022年10月	0~4歳	M	B家族・親戚	患者	集発	O186	H-/Hg2 [※]	2	+	B
EH22-20	2	2022年10月	0~4歳	F	B家族・親戚	患者	集発	O186	H-/Hg2 [※]	2	+	B

■ 事例2

※ H : 運動性なし / Hg : H型に対応した遺伝子型 (H-genotype=Hg)



図4 O186 事例の PFGE 法解析結果

表6 その他の血清型

菌株番号	事例番号	分離日	年齢	患者性別	疫学情報	患者・保菌者	散発・集発	O	H	VT	eae	PFGE group
EH22-03		2022年4月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	O76	H19	1	-	-
EH22-04		2022年5月	30~39歳	F	散発	保菌者	散発	O115	H10	1	-	-
EH22-05		2022年5月	40~49歳	F	散発	保菌者	散発	O174	H21	2	-	-
EH22-12		2022年6月	10~19歳	M	散発	保菌者	散発	OUT	H16	1	+	-
EH22-14		2022年6月	20~29歳	M	散発	保菌者	散発	O113	H21	2	-	-
EH22-16		2022年8月	20~29歳	F	散発	患者	散発	OUT	H19	2	-	-
EH22-17		2022年8月	50~59歳	F	散発	保菌者	散発	OUT	H12	1	-	-
EH22-18		2022年9月	60~69歳	F	散発	保菌者	散発	O121	H10	2	-	-
EH23-01		2022年11月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	O146	H21	2	-	-
EH23-02		2022年12月	20~29歳	M	散発	保菌者	散発	O113	H-/Hg21*	2	-	-
EH23-03		2023年3月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	OUT	H7	1+2	-	-
EH23-05		2023年6月	30~39歳	M	散発	保菌者	散発	O23	H24	2	-	-
EH23-06		2023年6月	40~49歳	F	散発	保菌者	散発	O55	H12	1	-	-
EH23-21		2023年7月	40~49歳	F	散発	保菌者	散発	O181	H49	2	-	-
EH23-32		2023年8月	20~29歳	F	散発	患者	散発	O103	H2	1	+	-
EH23-33		2023年8月	50~59歳	F	散発	保菌者	散発	O115	H10	1	-	-
EH23-43		2023年9月	20~29歳	F	散発	保菌者	散発	O148	H18	2	-	-
EH23-44		2023年11月	50~59歳	F	散発	保菌者	散発	O100	H-/Hg20*	2	-	-

※ H-:運動性なし/ Hg:H型に対応した遺伝子型(H-genotype=Hg)

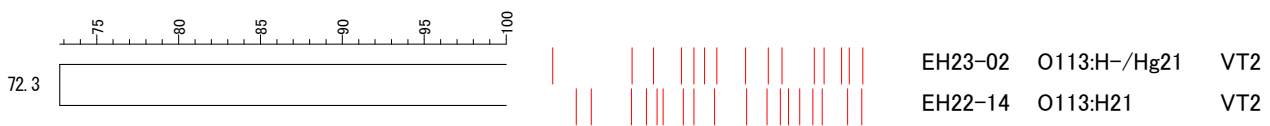


図5 O113 事例の PFGE 法解析結果

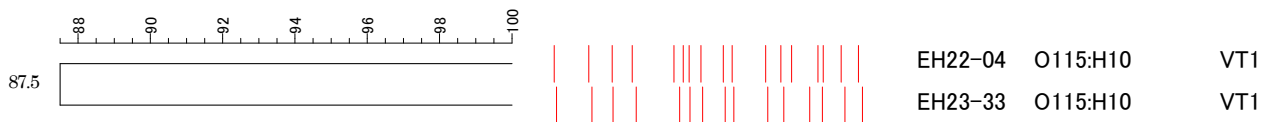


図6 O115 事例の PFGE 法解析結果

文献

- 1) 国立感染症研究所:腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル 2022 年 10 月改訂
- 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 (O157、O26、O111 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 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)
 - 5) 南須原亮,他：MLVA(VNTR)情報の集計・可視化システム MLVA-mate の開発, 東京都健康安全研究センター年報, 69, 279-284, (2018)
 - 6) 伊藤健一郎,他：平成 23 年度 新興再興感染症技術研修遺伝子検査法