

宮城県で分離された腸管出血性大腸菌のMLVA解析

Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis of *Enterohemorrhagic Escherichia coli* Isolated in Miyagi Prefecture

山谷 聡子 水戸 愛 椎名 麻衣 渡邊 節 山口 友美
佐藤 千鶴子 畠山 敬*1

Satoko YAMAYA, Ai MITO, Mai SHIINA, Setsu WATANABE, Yumi YAMAGUCHI
Chizuko SATO, Takashi HATAKEYAMA

2020年度宮城県で分離された腸管出血性大腸菌（以下、「EHEC」）86株のうち、O157 17株、O26 44株、O111 2株についてMLVA解析を行った。O157は12のMLVA型と6種類のコンプレックス、O26は13のMLVA型と1種類のコンプレックス、O111は1つのMLVA型にそれぞれ同定された。MLVA型が一致した株は同居家族からの分離株若しくは保育所内集団感染事例による株で、散発事例でMLVA型が一致する株はなかった。分離株が集団発生事例の一部かどうかの判断は、事例間の関連性など疫学情報も重要な要素であり、分子疫学解析と疫学情報を併せて結果の解釈を行うことが必要である。

キーワード：MLVA；腸管出血性大腸菌；PFGE；分子疫学解析

Key words：MLVA；*Enterohemorrhagic Escherichia coli*；PFGE；molecular epidemiology genotype

1 はじめに

平成30年（2018年）6月29日付け厚生労働省事務連絡「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」により、EHECの遺伝子型別検査を反復配列多型解析法（Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis; 以下、「MLVA」）に統一化する方針が示された。これは、EHECによる広域的な食中毒・感染症事例の早期探知、関係部門間の連携及び情報共有等を目的としたものである。MLVA法による検査体制の整備が可能な都道府県等は、実施可能な血清型すなわちO157、O26、O111を実施し、検査体制を確保することとされた。そこで当センターは、2019年度からのMLVA検査対応を目指し検査体制の整備を行った。

MLVA法は、ゲノム上に散在する反復配列（リピート配列）に着目した方法で、反復配列の繰り返し部分が何回あるかを数値化し（リピート数）、菌株同士を比較する方法である。検査手順は、PCR法により対象となる遺伝子座を増幅し、得られた産物の大きさからリピート数を推定する。リピート数の解析にはシーケンサーを用い、各産物の大きさを計測することでリピート数を決定する。現在、国立感染症研究所（以下、「感染研」）で実施しているO157、O26、O111を対象としたMLVA法では17カ所の遺伝子座を使用しており、この17遺伝子座のリピート数の組み合わせで菌株同士を比較する。実際の菌株比較には、解析したリピート数により感染研から付与される「MLVA型」や、リピート数が1遺伝子

座異なる single locus variant（以下、「SLV」）など、関連性が推測される複数の型をまとめたコンプレックスを用いて比較する¹⁾²⁾。

MLVA法の利点は、検体数に関係なく1件でも迅速に処理できることや、結果をリピート数で表すため結果の比較が簡便であることとされる。細菌性の食中毒事例や集団感染事例の原因解析では、感染源、食品や患者からの分離菌株の比較を迅速に行い、早期に原因探知することが重要であり、MLVA法は菌株同士をリピート数で比較するため、他機関との比較がしやすいなど、広域発生事例を迅速に探知するためには非常に有用である³⁾。

今回、2020年度に当センターで実施したMLVA法の結果等についてまとめ、MLVA法導入の効果についての検討及びパルスフィールドゲル電気泳動（以下、「PFGE」）との比較を行ったので報告する。

2 材料および方法

2.1 材料

2020年4月から2021年3月まで当センターに搬入されたEHEC菌株及び分離株のうちO157 17株、O26 44株、O111 2株についてMLVA解析を行った。

2.2 方法

2.2.1 MLVA法

「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック（O157、O26、O111編）第1版 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学学会マニュアル作成ワーキンググループ編」に準じて遺伝子型別を行った。サーマルサイクラーは

*1 前 保健環境センター

SimpliAmp (applied biosystems), フラグメント解析を行うシーケンサーは SeqStudio (applied biosystems) を用いた。フラグメント解析ソフトは GeneMapper Software 6 (applied biosystems) を使用した。BinSet データは感染研から提供された SeqStudio 用データを設定した。PCR 反応試薬は Platinum MultiplexPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。また、BIONUMERICS Ver8.0 (Applied Maths) を用いて Minimum Spanning Tree (以下, 「MST」) 解析を行った。

2.2.2 P F G E 法

分離した EHEC 菌株は, 制限酵素 *Xba* I を用いた PFGE 法を実施した。CHEF MAPPER (BIO RAD) を用い, パルスタイム 2.2~54.2 秒, 電圧 6.0V/cm, 泳動時間 17 時間の条件で行った。データ解析は BIONUMERICS Ver8.0 (Applied Maths) を使用し, 解析は Dice 法 (最適化 0.0%, トレランス 1.0%), 系統樹作成は平均距離法 (UPGMA) により行った。

3 結果

3.1 MLVA 法

2020 年度に当センターで分離された EHEC 株は 86 株でそのうち O157 は 17 株, O26 は 44 株, O111 は 2 株だった。なおコンプレックス情報は 2021 年 3 月 31 日時点の情報である。

O157 の 17 株は 12 の MLVA 型が同定され, コンプレックスは 6 種類だった。内訳は, 20m0378 及び 20m0243 が 3 株でそれぞれ同居家族からの分離株, 19m0513 が同居家族から分離された 2 株, 20m0398, 20m0155, 20m0156, 20m0207, 20m0217, 20m0226, 20m0288, 20m0377 及び 20m0399 が各 1 株であった。このうち, 20m0378 と 20m0398 は同居家族から分離されたもので SLV であり, 宮城県分離株のみで構成されるコンプレックス 20c042 に含まれた。その他の 5 つのコンプレックスは各々が全国から分離された株を含む広域タイプだった。コンプレックスに含まれない広域タイプの MLVA 型は 20m0217 の 1 種類だった。その他, 1 株ずつ分離された 4 種類の型は散发事例だった (表 1)。

MST 解析では, 20c042 に含まれる 20m0378 と 20m0398 が SLV だったほか, 19m0513 と 20m0226 は SLV, 19m0513 と 20m0243 はリポート数が 2 遺伝子座異なる double locus variant (以下, 「DLV」) だった (図 1)。

O26 の 44 株は 13 の MLVA 型が同定され, コンプレックスは 1 種類だった。内訳は, 20m2094 が 25 株, 13m2168 及び 21m2003 が 4 株, 20m2081 が 2 株, 20m2101, 20m2102, 13m2123, 16m2153, 20m2044, 20m2050, 20m2054, 20m2058 及び 21m2007 が各 1 株だった。このうち, 20m2101 と 20m2102 は 20m2094 と SLV でありコンプレックス 20c209 に含まれた。この

コンプレックスに含まれた株は集団感染事例関連とその 2 次感染と考えられる家庭内感染の株だった。13m2168 は同居家族 4 人から分離された株で, コンプレックスに含まれない広域タイプであり 2021 年 3 月 31 日時点で全国 4 機関 11 株が分離されていた。21m2003 と 20m2081 はそれぞれ同居家族から分離された株で, MLVA 型が各々一致した。その他の 1 株ずつ分離された 7 種類の型は散发事例だった (表 2)。

MST 解析ではコンプレックス 20c209 に含まれる株同士は SLV だが, その他の県内分離株で SLV になるものはなかった。また, 13m2168 と 13m2123 は DLV となった (図 2)。

O111 の 2 株は同居家族 2 名から分離された株で, MLVA 型は 19m3027 となり一致した (表 3)。

表 1 2020 年度 O157 株 MLVA 解析結果 (検出数上位順)

MLVA 型	血清群	VT型	株数	コンプレックス
20m0378	O157	VT2	3	20c042
20m0398	O157	VT2	1	
20m0243	O157	VT1+VT2	3	20c028
19m0513	O157	VT1+VT2	2	20c030
20m0155	O157	VT2	1	20c046
20m0156	O157	VT1+VT2	1	20c018
20m0207	O157	VT1+VT2	1	20c026
20m0217	O157	VT1+VT2	1	—
20m0226	O157	VT1+VT2	1	
20m0288	O157	VT1+VT2	1	
20m0377	O157	VT2	1	
20m0399	O157	VT1+VT2	1	
合計			17	

表 2 2020 年度 O26 株 MLVA 解析結果 (検出数上位順)

MLVA型	血清群	VT型	株数	コンプレックス
20m2094	O26	VT1	25	20c209
20m2101	O26	VT1	1	
20m2102	O26	VT1	1	
13m2168	O26	VT1	4	—
21m2003	O26	VT1	4	—
20m2081	O26	VT1	2	—
13m2123	O26	VT1	1	
16m2153	O26	VT1	1	
20m2044	O26	VT1	1	
20m2050	O26	VT1	1	
20m2054	O26	VT1	1	
20m2058	O26	VT1	1	
21m2007	O26	VT1	1	
合計			44	

表 3 2020 年度 O111 株 MLVA 解析結果 (検出数上位順)

MLVA型	血清群	VT型	株数	コンプレックス
19m3027	O111	VT1	2	—
合計			2	

3.2 PFGE法

MLVA 型の一致した株について、PFGE 法の結果と比較した。

O157 の PFGE 解析では、分離された 17 株は 11 のバンドパターンに分けられた。このうち、20c042 に含まれる 4 株はバンドが全て一致した。20m0243 の 3 株は 2 種類のバンドパターンに分かれ 1 バンド違いで類似度 95.4% だった。19m0513 の 2 株は 2 バンド違いで類似度 94.4% だった。19m0513 と SLV だった 20m0226、DLV だった 20m0243 の 3 種類の MLVA 型は PFGE 法では 2 バンド以内の違いであり類似度 94.4% だった (図 3)。

O26 の PFGE 解析では、分離された株のうち 43 株について解析したところ (21m2007 は PFGE 未解析) 19 のバンドパターンに分けられた。このうち、コンプレックス 20c209 に含まれる 27 株は 4 バンド以内の違いで類似度 92.4%、13m2168 の 4 株は 1 バンド違いで類似度 97.6%、21m2003 の 4 株は 3 種類のバンドパターンに分かれ、それぞれ 1 バンド違いで類似度 96.6%、20m2081 の 2 株はバンドが全て一致した (図 4)。

O111 の 2 株の結果は、バンドが全て一致した。

4 考察

2020 年度、宮城県では EHEC を原因とする食中毒事例は発生しなかったため、分離された EHEC 株は散发事例、ヒト-ヒト感染によるものだった。

宮城県内分離株で MLVA 型が一致したものは、家族内の 2 次感染によるものか、保育所内集団感染事例によるものであり、散发事例で MLVA 型が一致した株はなかった。MLVA 型が一致した株についての PFGE 解析では、いずれの MLVA 型も類似度は 90% 以上でほぼ同一のバンドパターンを示していた。感染研の示す分類によると³⁾、疫学的関連がある事例内では MLVA 法において、株同士のリピート数が異なる部位が 0 の場合は「一致」、1 か所異なる SLV は「密接に関係」、2 か所異なる DLV は「関係する可能性がある」と解釈される。同様に PFGE 法においても、異なるバンドの数が 0 の場合は「一致」、2 から 3 バンド異なる場合は「密接に関係」、4 から 6 バンド異なる場合は「関係する可能性がある」と解釈される。これらのことから判断すると、宮城県で確認された家族内 2 次感染や集団感染などの同一事例内において、MLVA 法と PFGE 法の結果について、疫学的解釈はほぼ一致しているといえる。また、O157 のうち 19m0513 と 20m0226 は SLV、19m0513 と 20m0243 は DLV となり、分離時期は SLV の 2 株は 1 か月違い、DLV の 2 株は同一週に分離された株で分離株が集団発生の一部であることが示唆された。PFGE 法においてもこれら 3 種類の型は類似度 94.4% であった。しかし、それぞれが全く別の全国的なコンプレックスに含まれており、疫学情報等動向を注視していたが、現時点で共通感

染源の特定は無く広域食中毒事例等とは判断されていない。その他 20c018、20c026、20c046 の 3 種類のコンプレックスについても全国各地から分離された株で構成されており、広域発生事例疑いとして情報収集がなされていたが結果として、大規模な広域食中毒事例には至らなかった。また、O26 の 13m2168 についても、全国 4 機関で型が一致する株が 11 株分離されたが、それ以上の分離株の報告はなかった。これらの事例のように MLVA 法で関連性が示唆されていても、疫学情報と併せて判断すると、結果的に関連性が認められないとする事例も散見される。また、関連性のない株同士の MLVA 型が一致する場合も見られる。よって、分離株が集団発生の一部かどうかの結果の解釈は、分離時期や地域等疫学情報の結果を総合的に判断する必要があり、保健所等による疫学調査が必要不可欠であると考えられる。

これまでは、分子疫学解析の手法として主に PFGE 法等を行っていた。PFGE 法は菌株の識別能力が高く、汎用性があり、再現性も高い。一方で、手技が複雑で結果解析まで時間がかかることやバンドパターンを比較するため、結果の解釈には質の高い泳動像が求められ⁴⁾、他機関で実施した結果を比較することが困難な場合もある。一方、MLVA 法は PFGE 法と同等の解析能を持ち、迅速な多検体処理が可能で結果が各部位のリピート数で表されるため、他機関の検査結果と比較しやすい利点がある³⁾。そのため、今回 MLVA 法を導入したことにより検体受領から MLVA 型報告までの時間を大幅に短縮することができ、株同士の遺伝子型一致の判定を迅速に行うことが可能となった。また、他機関で分離された株との比較についても、菌株の遺伝子解析結果がほぼリアルタイムに全国で共有されるシステムが構築されており、当センターの分離株と関連する株が他県で分離された場合、即座に情報提供され、迅速な対応が可能になった。なお、課題として、結果判定には、波形の読み取りによるリピート数の決定が必須であり、波形解析に技量と熟練が必要である。そのため、当センターではピーク波形の読み落としを防ぐため、試薬等の見直しを行った。その結果、フラグメント解析時のピーク波形がより明瞭になり、解析の作業効率が上がり、迅速な結果報告に繋げることが可能となった。その他、精度管理へも参加し検査精度の向上に努めている。

平成 30 年以降、MLVA 法による検査体制の整備は全国的に進みつつあり、広域発生事例に対する、国・都道府県等の関係機関の連携・協力体制も強化されてきている。発生事例が広域的な感染症・食中毒の可能性の判断には、疫学情報の解析が必須である。疫学調査の早期着手には、迅速な検査結果の報告が必須であり、今後も関係機関と情報共有を図るとともに、MLVA 検査精度の向上と迅速な情報還元を努めたい。

MLVA 法導入に当たり、御指導いただいた国立感染症

研究所細菌第一部泉谷秀昌先生をはじめ、関係各位に感謝申し上げます。

参考文献

1) 泉谷秀昌, 李憲一, 伊豫田淳, 大西真 : IASR, **42**, 96-97 (2021)

2) Izumiya H, *et al.*: Microbiol Immunol., **54**, 569-577 (2010)

3) 石原朋子, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 大西真 : IASR, **35**, 129-130(2014)

4) 泉谷秀昌 : 獣医公衆衛生研究, **20-2**, 6-11 (2018)

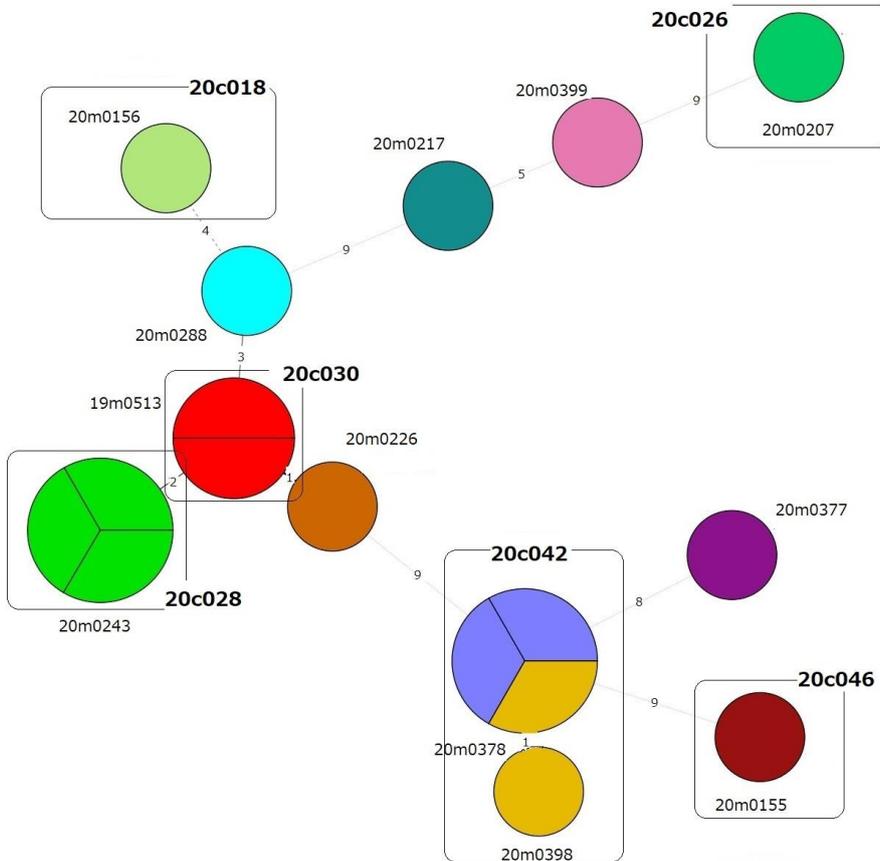


図1 O157分離株のMLVA型と関連性(MST)
 ※円の大きさは分離株数に基づく。色別は検査依頼番号毎による。

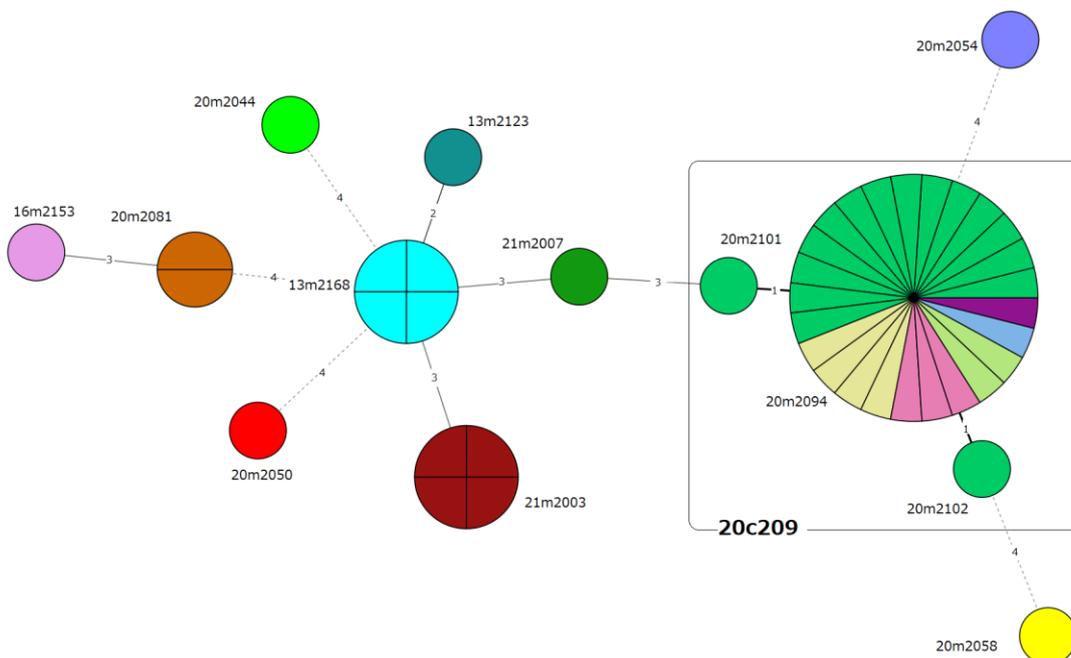


図2 O26分離株のMLVA型と関連性(MST)
 ※円の大きさは分離株数に基づく。色別は検査依頼番号毎による。

