

2018 年夏期に関連性が疑われた腸管出血性大腸菌 O157

山口県環境保健センター
尾羽根 紀子・大塚 仁・野村 恭晴

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 that may have relation to infection in summer, 2018

Noriko OBANE・Hitoshi OHTSUKA・Yasuharu NOMURA
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

分子疫学的解析は、事例間の関連性を知るうえで欠かせない手法であり、分解能・迅速性も要求される。これらを併せ持つ Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法は効率的な手法である。

山口県では 2014 年より MLVA 法を導入し解析を実施している。

2017 年 8 月関東地方を中心に O157 VT2 株が広域的かつ、多数の患者が発生した。これをきっかけに、広域発生事例の早期探知を目的に遺伝子型検査手法が MLVA 法に統一された (平成 30 年 2 月 8 日付け健感発 0208 第 1 号、薬生食監発 0208 号第 1 号「腸管出血性大腸菌の遺伝子型検査体制の整備及び研修会の開催について」)。

2018 年夏期に県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 (以下、O157) 事例について、IS-printing System (IS) 法、MLVA 法を活用し、diffuse outbreak の可能性を示唆できた。さらに、喫食調査から焼肉の外出歴の確認がされたため管轄課および管轄保健所に報告した。これにより利用のあった各焼肉店は同一業者による経営であったことが判明し、感染拡大防止に寄与できた事例について報告する。

対象及び方法

1 供試菌株

2018 年に県内で発生した O157 26 株を供試した。

2 解析方法

(1) DNA 抽出

菌株をトリプトソイ寒天培地 (日水製薬) 上で純培養

後、QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

(2) IS 法

IS-printing System (東洋紡) を用い、取扱説明書に従い実施した。

サイズの大きいバンドから順に 3 バンド毎に「1」、
「2」、
「4」の係数を加算し、12 桁の IS コードとした。

(3) PFGE 法

九州ブロックマニュアル¹⁾に従って実施した。

制限酵素は *Xba* I (Roche) を用い、泳動装置

CHEF-Mapper (Bio-Rad) を使用した。

得られた PFGE パターンは BioNumerics

ver.7.1 (Applied Maths) により解析し、UPGMA により dendrogram を作成した。

(4) MLVA 法

Izumiya らの方法²⁾に従い実施した。

QIAGEN multiplex PCR kit plus (QIAGEN) を使用した PCR 反応後、3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) 及び Gene Mapper software ver.4.1 を使用してフラグメント解析を行った。

size maker は、Genescan 600LIZ size standard (Applied Biosystems) を用いた。

また、BioNumerics Ver7.1 (Applied Maths) により Minimum Spanning Tree (MST) 解析を行った。

結果

1 IS 法

IS コード同型株の発生状況を図 1 に示す。

8 月第 1 週から第 4 週に搬入された検体で、IS コー

ド同型株の集積が見られた。

なお、2018 年に発生した他の O157 株において、IS コードが一致する株はなかった。

2 MLVA 法

IS コード同型株の 4 事例と、2018 年 3 月に発生し、IS コードが一か所異なっている 1 事例、これらの疫学情報と MLVA 型を表 1 に示す(以下、IS コード類似株)。

また、2018 年に発生した O157 全株の MST 解析について図 2 に示す。

IS コード類似株すべてに、焼肉の外食歴があった。

事例 1 と 3 の MLVA 型 (17m0229) が一致し、事例 2 の 2 株と事例 5 の MLVA 型 (18m0154) が一致した。

事例 2 の 1 株 (18m0216) は他 2 株 (18m0154) と比べ、プラスミド由来の O157-36 が脱落した single locus variant(以下、SLV)であった。

事例 4 は事例 1、3 と SLV であった。

その他 2018 年に発生した O157 株において、疫学的関連性が確認された事例毎の MLVA リピート数は図 2 に示すよう一致、または SLV であった。

3 PFGE 法

IS コード類似株の PFGE の結果を図 3 に示す。

IS コード類似株 7 株は、すべて一致した。

考察

2018 年に山口県で発生した 腸管出血性大腸菌のうち、86.7%が O157 であった。

夏期において IS コード同型株の集積があり、分解能の高い MLVA 法でも遺伝的関連性が疑われた。diffuse outbreak の可能性が示唆されたため、管轄課および管轄保健所に報告したところ、店舗が判明している A 店、

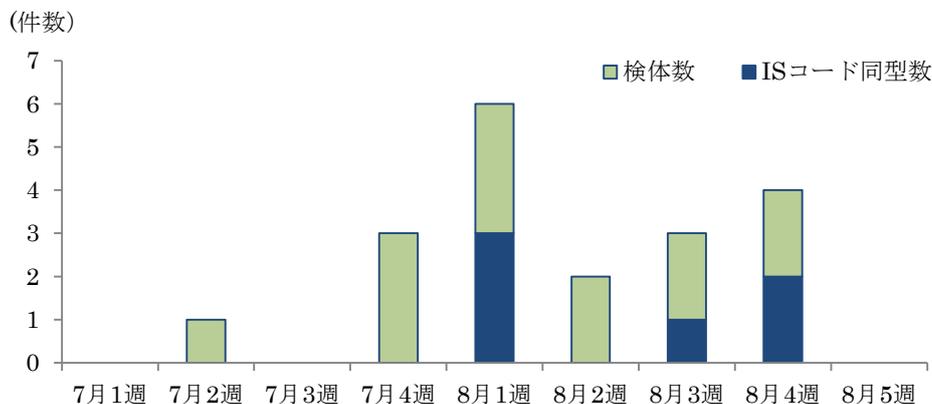


図 1 IS コード同型株の発生状況

B 店は、同一業者による経営であった。

MLVA 法で使用している 17 ヶ所の遺伝子座のうち、O157-36, 37, EHC-6 はプラスミドに由来しており、獲得、脱落することにより集団事例において多形を生じるとされている³⁾。事例 2 の 18Y15 は、プラスミド由来の O157-36 が脱落したため 18Y14, 16 と complex を形成した集団事例であったが、その他の関連 5 事例 6 株は、2 か所以内の相違で遺伝的関連の可能性があった。

さらに、PFGE 法では 7 株は一致し、遺伝的関連が高いことを裏付けた。

なお、感染源の特定について、関係施設の詳細な調査はされていないため断定は難しいが、3 法による分子疫学的解析結果と喫食歴から、同一感染源による可能性が高いことが推察された。

腸管出血性大腸菌は、潜伏期間が長いいため感染源の特定は困難となる場合が多い。

迅速な解析法の活用は、散发事例と思われた事例間の関連性を早期に示唆し、疫学調査の再調査のきっかけとなり、感染拡大防止に役立つ解析法であると考えられる。

文献

- 1) 寺島淳：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(課題番号：H15-新興-1)平成 17 年度総括・分担研究報告書,168-185(2006)
- 2) Izumiya H, et al : Microbiol.Immunol,54,569-577(2010)
- 3) 泉谷秀昌：獣医公衆衛生研究,6-11 (2018)

表 1 IS コード類似株の疫学情報, MLVA 型

事例	菌株 No	発症日	IS-printing	喫食調査	MLVA type	MLVA comp	
1	散発	18Y01	2018/3/29	317557 -611756	焼肉 A 店	17m0229	18c006
2	家族 (3 人)	18Y14	2018/7/26	317577 -611756	焼肉 B 店	18m0154	18c021
		18Y15	保菌者			18m0216	
		18Y16	保菌者			18m0154	
3	散発	18Y19	2018/8/6		焼肉 B 店	17m0229	18c006
4	散発	18Y21	2018/8/13		焼肉の喫食あり (店舗不明)	17m0285	18c026
5	散発	18Y22	2018/7/11	焼肉 A 店	18m0154	18c021	

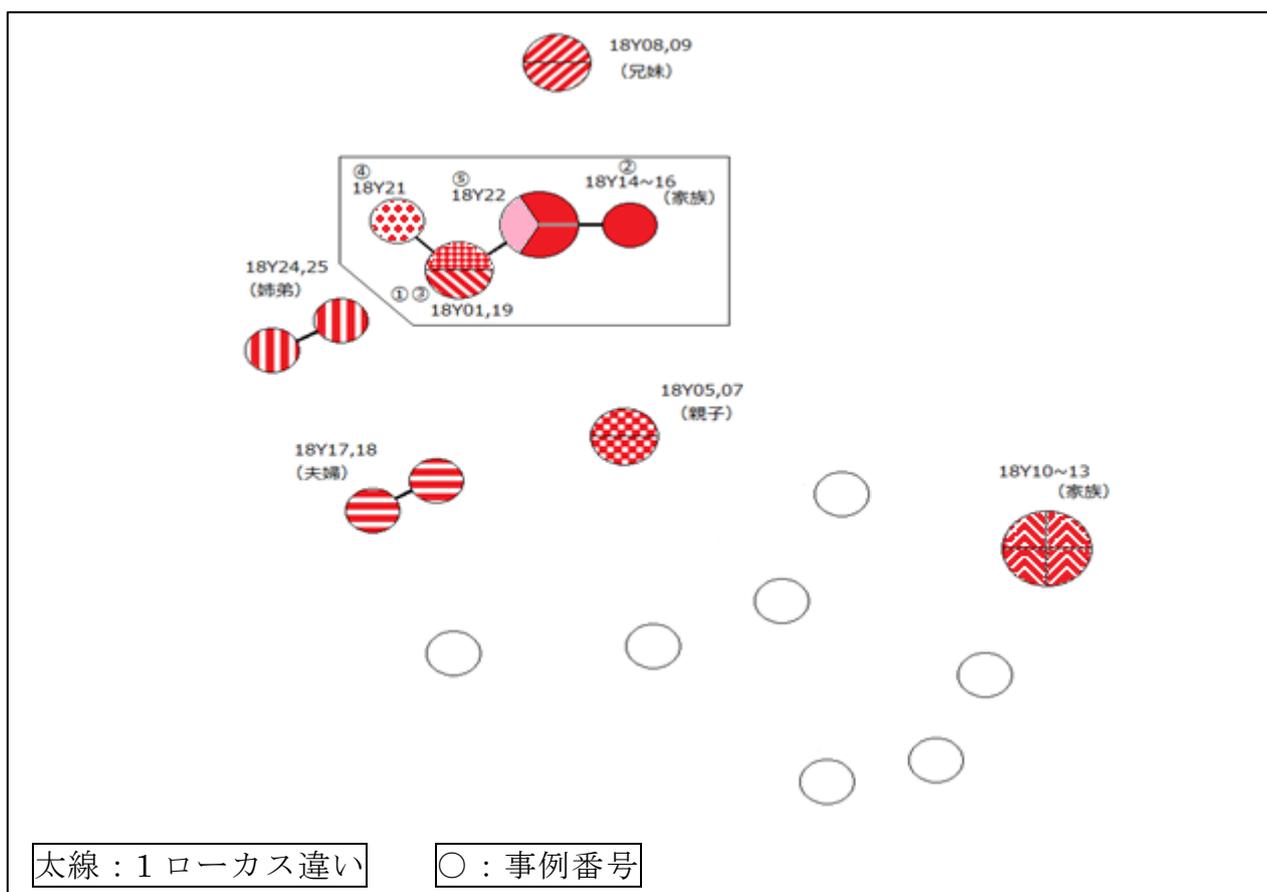


図 2 MLVA 法による Minimum Spanning Tree

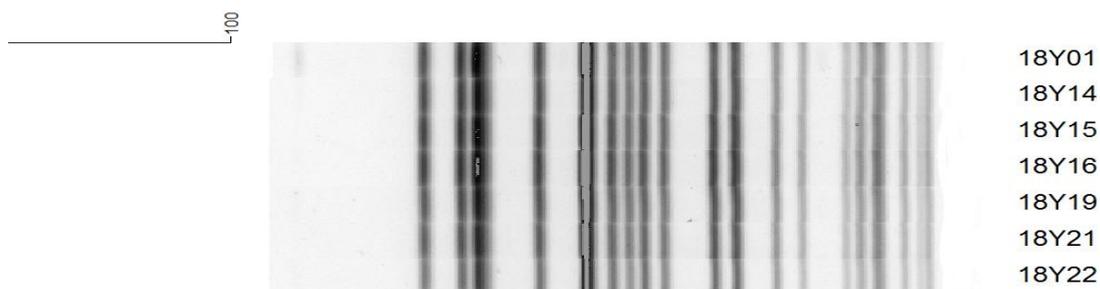


図 3 PFGE 法の解析結果