

44. 腸管出血性大腸菌 0157 における 迅速遺伝子識別法の研究

○柴井 毅（奈良県保健環境研究センター）

〔はじめに〕

強い感染力と重篤な感染症状を特徴とする腸管出血性大腸菌（EHEC）0157 は、食品安全・公衆衛生における重要な危険因子である。集団感染に対処するこの病原体の遺伝子型識別法は、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が標準的手法とされているが¹⁾、実施に数日を要し、解析結果の研究施設間比較が難しいなどいくつかの問題点を抱えている。そこで、地域における健康危機管理対応を向上させることを目的に、新たな手法として近年注目されている反復配列多型分析（Multi-Locus Variable-number tandem repeat Analysis：MLVA）法と IS-printing 法を採り上げ、PFGE 法の代替法として実用的運用法を研究した。

〔研究方法〕

対象菌株：平成 17 年 4 月から平成 23 年 3 月までの 6 年間に奈良県及び近接地域で分離された 220 株（食中毒や家族感染など、疫学的に集団性のある感染と認められる 30 事例に関係した 99 株を含む）の腸管出血性大腸菌 0157 を材料として研究を実施した。

IS-printing 法：市販の試薬キット〔東洋紡(株)〕を取扱説明書に従い使用した。

MLVA 法：米国疾病予防管理センターの手法を国立感染症研究所（感染研）が日本向けに改訂したプロトコール²⁾をもとに、蛍光色素の変更、ノンラベル側にテイルドプライマーの採用、VNTR-10 に新規プライマー配列（感染研プロトコールに併記）の採用、サイズマーカーを GeneScan 600 LIZ に変更といった調整を行い、キャピラリ 1 本タイプの機器を用いて 9 領域の VNTR を 1 検体約 40 分の泳動で解析する実用的な系を検討した。その上で、表 1 に示す解析対象の塩基配列解析を実施し、解析結果の信頼性を確保した。

表 1 塩基配列解析実施菌株

解析菌株	解析領域
保育園集団の代表株	全領域（解析困難の VNTR-34 を除く）
上記集団の変異株（1 株）	変異領域（VNTR-10）
家族感染の代表株	全領域
上記家族の変異株（2 株）	変異領域（VNTR-10）
集団食中毒の代表株	全領域
上記集団食中毒の変異株（2 株）	変異領域（VNTR-9、10）
上記集団食中毒の関連株（別メニュー摂食者由来）	全領域
共通原因が疑われた集団の代表株	全領域

PFGE 法：国立感染症研究所による PFGE 解析結果（型別番号）²⁾ を参照した。

〔結果〕

感染研プロトコールを改変し、より実用的な MLVA 解析系を確立した。MLVA 解析結果の信頼性確保を目的に行った塩基配列解析では、解析した全ての VNTR 領域の PCR 産物について、繰返し数が正しいことを確認した。全 220 株の MLVA 解析結果から、各繰返し領域のパラメーターを算出した結果、これまでの文献³⁾における解析データと概ね同様の傾向を示した。

患者背景等から集団的な感染症と認められる 30 事例（99 株）について、IS-printing（以下“IS-P”と略す）法及び MLVA 法の結果（繰返し数）と感染研 PFGE 型別番号の一覧を表 2 に示した。株数の欄において（）で示した数は変異型の内訳である。表 2 の各集団において共通する型別結果を一番上に示し、変異型別以外は省略した。IS-P 法の結果は、36 標的遺伝子の陽性／陰性を具体的に示すとわかりにくいいため、簡略化して 99 株におけるパターン番号（01～25）として示した。MLVA 解析において Null Allele（繰返し数解析不能）は“-2”で示した。解析の結果、IS-P 法では 1 事例（集団 No.7）の 3 株が 1 箇所ずつ異なる変異型別になったが、それ以外では事例ごとに同じ型別となった。MLVA 法では 9 事例において合計 13 株の変異型別がみられたが、1 事例（集団 No.4）の 1 株（VNTR-17）を除き、多様性の特に高い領域（VNTR-3、9、10）における変異型別であり、通常変異型別とみなされる範囲であった。PFGE 法と比較して、MLVA 法のみでも十分な識別能力を有していたが、IS-P 法の結果を合わせて評価することで、MLVA 法における変異型別が「確かに同じ集団に属する株である」ことがより一層明確になった。

一方、平成 17 年 4 月から平成 22 年 3 月までの 184 株に対象菌株を絞って、散発発生株を含めた全株を解析した結果、集団株と同じ IS-P 型別の菌株は合計 27 株検出された。うち 19 株は MLVA 型別が異なっており、IS-P 法と MLVA 法の併用によって識別可能であった。残り 8 株は IS-P 型別、MLVA 型別ともに集団株と一致したが、うち 5 株は集団株と同じ PFGE 型別番号であり、何らかの関連性が推察される株であった。残り 3 株について、PFGE 解析を実施したところ、バンドパターンは 1～2 バンド違いであり、集団感染において変異株とみなされる範囲の差異であった。PFGE 法における相同性が高い菌株が、IS-P 型別、MLVA 型別ともに同じ型別に分類された可能性が示唆され、散発発生株についても IS-P 法と MLVA 法の併用のよって PFGE 法と同等以上の識別能力を有すると考えられた。

〔考察〕

MLVA 法は有益性が高く評価されている反面、変異型別が多いことや Null Allele 領域を持つ株の存在など、実用面の問題点が懸念される。一方 IS-P 法は識別能力が PFGE 法や MLVA 法に比べてやや劣るものの、菌株間の共通性を検出しやすいという点において一次スクリーニングに適した手法と考えている。そこで、本研究では、識別法の特徴や原理の異なる IS-P 法と MLVA 法を組み合わせることによって、相互の弱点を補うことを期待し実用的運用へ

表2 30事例におけるIS-printing解析及びMLVA解析結果と感染研PFGE型別番号一覧

集団 No.	株数	IS-printing 型別	M L V A 型別 (各 VNTR 領域の繰返し数)										PFGE 型別
			25	03	34	09	17	19	36	37	10		
1	2	(1) (1)	01	4	21	7	13	4	9	4	7	18	1007 a123
2	2	(2)	02	5	11	9	15	8	6	9	7	23	a128
3	5	(3)	02	5	11	9	15	8	6	9	7	23	a128
		(1)					14						
4	6	(1)			13								
		(4)	03	5	9	10	15	7	8	6	8	50	a653
5	3	(1)						6				49	
		(3)	04	3	4	7	-2	5	8	6	5	28	413
6	2	(1)	05	6	8	7	16	4	9	4	3	5	a757
		(1)	06										
7	3	(1)	07	5	11	9	11	8	6	14	7	20	b190
		(1)	08										b291
		(1)	09										
8	2	(1)	10	5	9	9	15	6	8	5	6	33	解析不能
		(1)				11		11					
9	2	(1)	11	4	10	10	12	7	6	6	6	34	b178
		(1)										32	
10	7	(6)	12	5	-2	6	14	3	5	6	6	11	c877
		(1)											c897
11	2	(1)	13	3	15	8	19	7	7	11	5	45	c230
		(1)					18						
12	2	(2)	14	2	16	8	12	13	7	4	7	37	c472
13	2	(2)	15	5	16	7	15	3	7	6	7	5	c47
14	2	(2)	16	3	15	8	15	8	7	4	7	29	d40
15	3	(2)	17	5	9	10	11	7	6	6	5	37	b142
		(1)											d94
16	2	(2)	18	5	10	10	12	7	7	5	7	11	d90
17	3	(3)	19	4	18	7	10	6	8	-2	10	31	c57
18	2	(1)	20	4	10	9	18	7	6	9	-2	21	d684
		(1)											d685
19	3	(3)	15	5	16	7	15	3	8	6	7	6	c47
20	4	(3)	21	5	6	7	10	3	5	7	10	30	e152
		(1)										32	
21	3	(1)	22	2	18	8	12	3	7	4	8	37	e204
		(1)										36	
		(1)										39	
22	3	(3)	23	2	15	8	15	11	7	4	7	36	d594
		(6)	24	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241
23	9	(1)										61	
		(1)											e239
		(1)					8						
24	8	(8)	11	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579
25	4	(3)	02	5	10	9	16	9	6	9	7	21	f30
		(1)											f77
26	2	(2)	07	5	17	9	12	10	6	11	7	24	f132
27	2	(2)	07	5	17	9	12	10	6	11	7	24	f132
		(1)	07	4	10	10	9	6	6	10	7	19	f431
28	4	(1)											f429
		(1)											f427
		(1)										18	
29	2	(1)	25	4	4	7	-2	5	8	6	5	-2	d492
		(1)											f418
30	3	(2)	25	4	4	7	-2	5	8	6	5	-2	f418
		(1)											d492

の基本的な検討を行った。

今回の結果からは、IS-P 法と MLVA 法の併用により、PFGE 法と同等以上の識別能力を有することが認められた他、迅速性や解析結果の扱いやすさという利点が改めて確認された。集団感染株の解析において、変異型の範囲の基準についてしばしば問題となるが、PFGE 法では 1 から 2 バンド違いのパターンという範囲がほぼ確立している。IS-P 法では 1 箇所違いまでを変異型別と認めると、ほとんどの変異型別を網羅できると文献に報告されている⁴⁾。変異型別の出現は他の手法より少ないものの、今回も 1 事例（集団 No. 7）に確認された。MLVA 法に関しては VNTR-10、次いで VNTR-9 にリピート数違いが頻繁に現れることが報告されている。今回の研究でも多様性の高い領域（VNTR-03、09、10）に多くの変異型別が見られたほか、それほど多様性の高くない VNTR-17 でも 1 例の変異型別が認められた。

日本で分離された菌株に関する文献²⁾では、PFGE 型別番号（*Xba*I 切断）ごとにグループ化された菌株について検討した結果、上記 VNTR-03、09、10、17 以外に、VNTR-25、34、36、37 でも変異型別が見られており、VNTR-19 以外のすべての領域で変異型が認められている。しかしこの文献の場合、大部分が数ヶ月にわたって分離された散発発生株であり、短期間（通常数日）に集中して発生する集団感染とは事情が異なる。同じ PFGE 型別の EHEC 菌株が数年にわたって全国各地から分離される場合、MLVA 型別が経時的に変化することが知られている⁵⁾。MLVA 法の場合、菌株が短期間に集中して分離されたものであるか、数ヶ月から数年といった比較的長期間にわたって分離されたものであるかによって、変異型別に関する判断基準を変える必要性を考慮すべきである。

本研究では塩基配列解析により MLVA 解析結果の信頼性確保を行っている。この手法は、解析ソフトウェア（GeneMapper）の設定（解析パネル等）が正しく行われている場合、原理的に考えて、間違いのない解析結果を得ることができる解析システムである。そこで複数施設が解析を実施する場合には、共通 DNA テンプレートを用いた精度管理が有益であると考えられる。

PFGE 法は、これまでの多くの実績によって確立された手法であり、EHEC 0157 遺伝子型別手法として今後も重要性である。原理的にみても PFGE 法は細菌ゲノム全体を解析対象としているため、遺伝子の局所の違いで型別する IS-printing 法や MLVA 法に比べ、型別において大きな問題が生じる可能性は低いと推察される。IS-P 法、PFGE 法、MLVA 法はそれぞれ別の原理に基づいて型別を行っているため、これら 3 つの手法を組み合わせることによって菌株間の関連性をより一層明確にすることが可能であり、疫学的関連性が不明である散発発生株を解析する際には特に威力を発揮すると考えられる

〔まとめ〕

本研究の結果、IS-printing 法と MLVA 法を併用することにより、迅速な遺伝子型別が必要となる集団感染に対し、高い識別能力と迅速性を持った解析手段を提供できることが明らかになった。食中毒など緊急性を要する検査の場合、これらに転換することで時間が大

幅に短縮され、感染症拡大防止策等の対応がより迅速に行われることが期待される。また、近年増加傾向にある散発的集団発生事件へ対処するためにも、極めて有益な情報を提供することが期待できる。本今回の研究は、奈良県という特定の地域で分離された菌株を対象としているが、食品流通の広範囲化などによって、全国的な散発的集団感染が発生している状況を考慮すると、より広範な地域を対象とした研究が今後望まれる。

なお、研究成果の一部は *Japanese Journal of Infectious Diseases* 誌上 (vol. 61 No. 2 2011) で報告した。

〔謝辞〕

本研究をとりまとめるにあたり、研究助成を頂きました財団法人大同生命厚生事業団に心より感謝申し上げます。また、精度の高いPFGEを実施し、PFGE型別番号を報告していただいている国立感染症研究所細菌第一部の寺嶋先生、伊豫田先生に深謝いたします。

〔参考文献〕

- 1) Swaminathan, B., et al : *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 382-389, 2001
- 2) Pei Y., et al : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **61**, 58-64, 2008
- 3) Hyytia-Trees, E., et al : *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 118-131, 2006
- 4) Ooka, T., et al : *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2888-2894, 2009
- 5) 寺嶋淳, 他 : 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成 21 年度 総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業), 15-24, 2010

〔研究助成金の使途明細〕

消 耗 品 等	品 名	税込み金額(円)
	M L V A 蛍 光 プ ラ イ マ ー	224,910
	サ イ ズ マ ー カ ー	69,615
	機 器 校 正 用 試 薬	17,577
	塩 基 配 列 確 認 試 薬	111,562
	IS-printing 法 試 薬 キ ャ ッ ト	62,685
	論 文 校 正 等 費 用	7,035
	文 房 具 等	6,616
	合 計	500,000