14. 県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の集団遺伝学的解析による集団動態の把握

○横山　栄二（千葉県衛生研究所）

【研究目的】

千葉県における腸管出血性大腸菌 O157（以下「O157」）の進化状況を把握するために、O157 を系統グループに細分化し、そのグループにおいて有効な集団遺伝学的解析法を検討する。

【研究の必要性】

千葉県では毎年 150 名程度の O157 感染者が報告されているが、感染源が明らかとなるケースは少なく、そのため有効な対策を打つことが出来ていない。近年、O157 は進化状況によって lineage や clade といった系統学的グループに細分化されることが報告された。しかし、これまで O157 の解析に汎用されていたパルスフィールドゲル電気泳動では系統学的グループへの細分化は行うことが出来ないため、千葉県にどのような系統学的グループの O157 が分布しているのか、ということは不明である。

また、病原細菌は同一の系統学的グループであってもその分化が地域によって異なるため、千葉県に分布する O157 の分化状況を把握することは感染対策上重要である。近年、集団遺伝学的解析を行うことで細菌の分化状況を把握するために、集団遺伝学的解析を行った例が報告された[1, 2]。しかし O157 に関しては、集団遺伝学的解析はこれまで全く調査されていない。Yokoyama らは、O157 の IS*629* 分布状況が lineage によって偏りがあることを報告し、IS*629* の分布状況のデータが集団遺伝学的解析に利用出来る可能性を示唆した[3]が、他の系統学的グループにおける有効性は不明である。

【研究計画】

１）供試菌株

2002～2009 年に千葉県内で分離された O157 菌株のうち、疫学的関連性のない 470 株を使用して調査する。

２）系統グループへの細分化

Yang ら[4]の lineage specific polymorphism assay-6（LSPA-6）により lineage へ細分化すると共に、Shaikh ら[5]に準じて subgroup および cluster へ細分化する。また、Manning ら[6]の報告した SNP 解析のうち、ECs0517、ECs0654、ECs1011、ECs2357、ECs2521、ECs3881、ECs3942 及び ECs4130 の 8 領域を使用して clade へ細分化する。

３）IS*629*分布状況

Ooka ら[7]の IS-printing に準じ、primer set は version 2 を使用して実施する。正確性を高めるため、2 つの outward primer を 6FAM で標識し、増幅産物を ABI PRISM Genetic Analyzer 310 (Life Technology)を用いて泳動し、IS*629*の insertion 状況を調べる。

【実施内容・結果】

供試菌株は SNP 解析によって clade に細分化された。調査期間を通じて clade 7 の分布が多かった。2008 年に clade 8 の菌株数が激増した他は、増減はあるものの優勢に分布する clade に変化は認められなかった（図 1)。

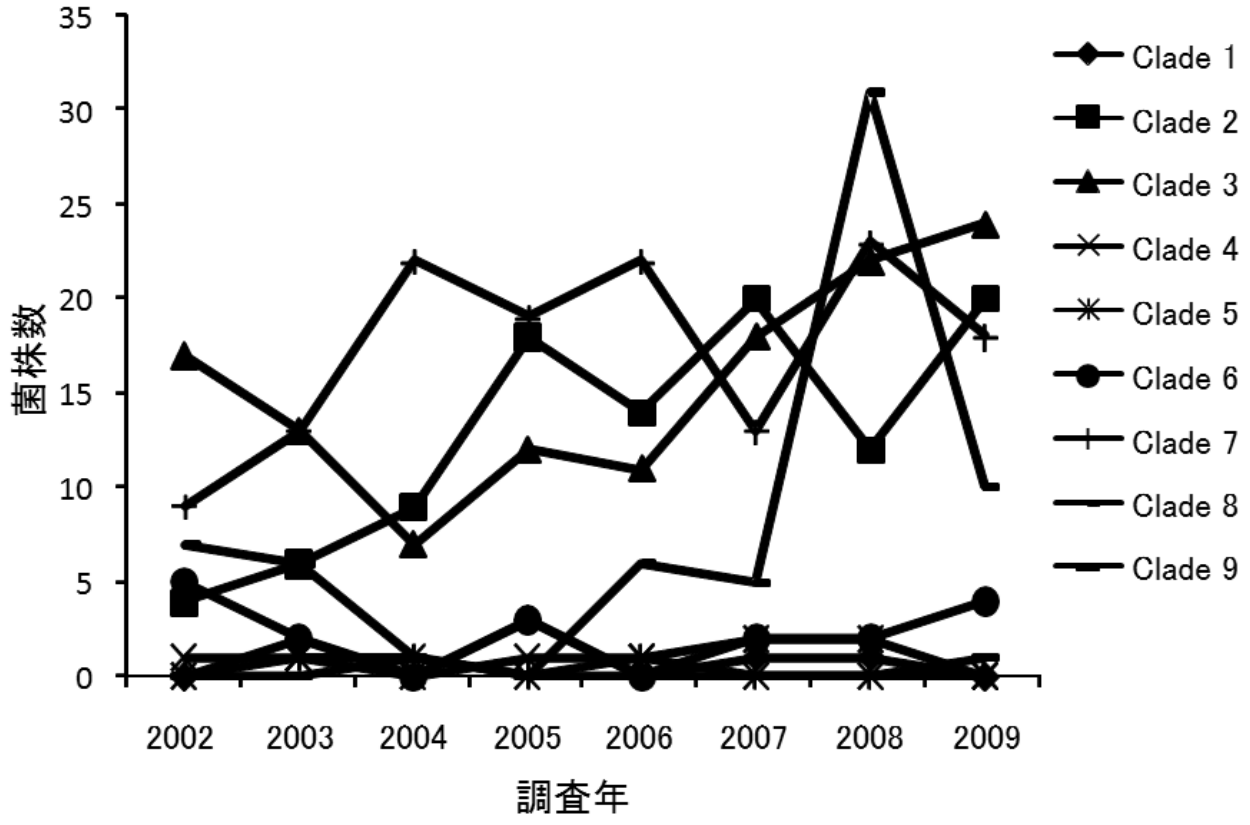

図1　調査期間における各cladeの分離状況

菌株数が比較的多かった clade 2、3、6、7 及び 8 について、IS*629*分布状況データに基づいて minimum spanning tree（MST）を作成したところ、clade ごとに特定の branch に集族する傾向が確認された（図 2)。

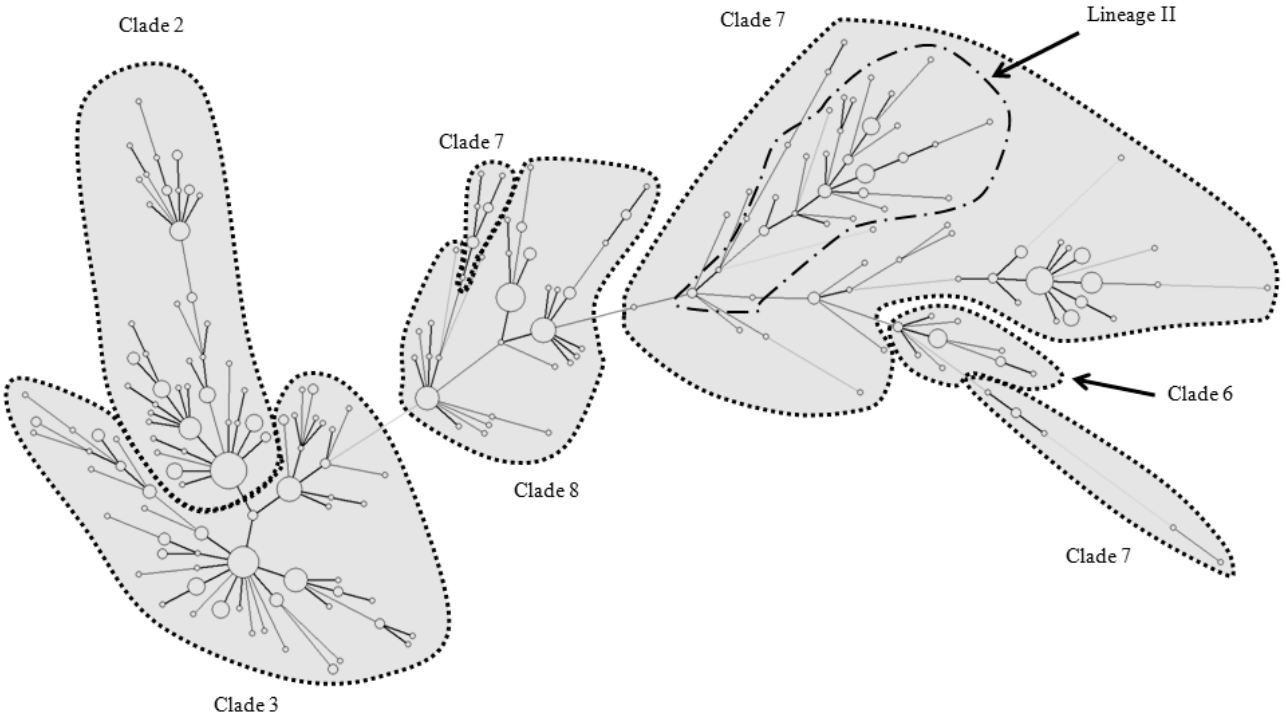

図2　IS*629*分布データに基づくminimum spanning tree

また、IS*629*分布データを LIAN Version 3.5[8]を用いて解析したところ、clade ごとに連鎖不平衡が確認された（表 1）。

表1　IS*629*分布データにおける連鎖不平衡

Clade	V_D	Ve	$_SI_A$	Monte Carlo Simulation		
				$Var(V_D)$	P	L
2	6.2758	2.5219	0.0480	0.0394	<0.001	2.8752
3	4.1933	2.7334	0.0172	0.0543	<0.001	3.1384
6	5.7599	2.0127	0.0601	0.2233	<0.001	2.8915
7 (Lineage I/II)	18.6613	3.8609	0.1162	0.0867	<0.001	4.3871
7 (Lineage II)	11.6094	4.1387	0.0547	0.1861	<0.001	4.8887
8	7.0497	2.7369	0.0508	0.0678	<0.001	3.1822

【考察と今後の課題】

本研究で、千葉県に分布する O157 は clade 7 が優勢であることが判明した。この傾向は、Manning ら[6]が報告した米国ミシガン州周辺のデータとはかなり異なっており、地域によって clade の分布が異なる可能性が示唆された。また、調査期間中には clade 8 の激増以外には大きな増減は認められなかったことから、千葉県に分布する O157 は安定した感染源が存在することが示唆された。

IS*629* の分布状況は、それぞれの clade において偏りがあることが MST で示されたことから、連鎖不平衡の有無を解析したところ、連鎖不平衡が確認された。これまで、より上位の系統学的グループである lineage において、IS*629* 分布データに連鎖不平衡が確認されていた[2]が、より下位の系統学的グループである clade においても本研究によって連鎖不平衡が確認された。連鎖不平衡を示す genetic marker は集団遺伝学的解析に利用出来ることが知られている[9]ことから、IS*629* 分布データを用いて O157 の集団遺伝学的解析が行えることが明らかとなった。

今後、我が国に分布する O157 の特性を把握するために、国内の他の地域における clade 分布状況に加えて IS*629* 分布状況を調査する必要がある。そのためには、全国の地方衛生研究所との協力体制が欠かせない。今後、協力体制の構築に取り組んでいきたいと考えている。

【参考文献】

[1] Ansede-Bermejo, J. et al. (2010) Mol. Ecol. 19: 3924-3937.
[2] Yokoyama, E. et al. (2012) Infect. Genet. Evol. 12: 630-636.
[3] Yokoyama, E. et al. (2011) Infect. Genet. Evol. 11: 11:78-82.
[4] Yang, Z. et al. (2004) Apple. Environ. Microbiol. 70: 6846-6854.
[5] Shaikh, N. et al. (2003) J. Bacteriol. 185: 3596-3605.
[6] Manning, S. D. et al. (2008) Proc. Na. Acad. Sci. USA 105: 4868-4873.
[7] Ooka, T. et al. (2009) J. Clin. Microbiol. 47: 2888-2894.
[8] Haubold, B. et al. (2000) Bioinformatics 16: 847-848.
[9] Goldstein, D. B. et al. Curr. Biol. 11: R576-579.

【研究発表】

1．横山栄二、平井晋一郎（2012）腸管出血性大腸菌 O157 の clade 解析．第 85 回日本細菌学会総会

2．Yokoyama, E., Hirai, S., Hashimoto, R., Uchimura, M.（2012）Clade analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7/H- strains and hierarchy of their phylogenetic relationships. Infect. Genet. Evol. 12: 1724-1728.

【経費使途明細】

製品名	数量	価格
FastStart Taq DNA polymerase 250u × 10	1	¥201,946
Sybre Green I	1	¥41,485
NucleoBond AXG20	9	¥151,476
NucleoBond Buffer Set III	3	¥65,488
NucleoBond Rack Small	1	¥7,465
2-propanol	2	¥7,329
70% エタノール	1	¥5,806
TE buffer (pH8.0)	1	¥8,505
1.5ml Microtube	1	¥10,500
計		¥500,000