

# 腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学解析（MLVA）に関する研究

鹿児島県環境保健センター ○山本 真実 穂積 和佳 石谷 完二 眞鍋 佳月  
園田 奈央 新川奈緒美 吉田 隆典

## 1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下、「EHEC」という）は、ベロ毒素を産生又は、ベロ毒素遺伝子を保有する大腸菌として、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（以下、「感染症法」という）において、四種病原体に含まれ、EHEC感染症は三類感染症に位置づけられている。

分離菌株の遺伝子を調べ、同じ血清群に属する菌株をさらに分ける分子疫学解析は、細菌サーベイランスで広く使用されており、分子疫学解析を通じて異なる型の株が流行していることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。分子疫学解析は、こうした広域に流行する株の探知に有効であり、EHECの病原体サーベイランスでは散发事例・集団事例を問わず事例間の関連性を知るうえで欠かせないものである<sup>1)</sup>。中でも反復配列多型解析法：MLVA（multilocus variable-number tandem repeat analysis）は、迅速性と分解能の観点から、PFGEとIS-printing systemのデメリットを補う最も効率的な方法として使用されている。

今回、令和4年度に収集したEHEC菌株について、当センターで初めてMLVA解析を行ったので報告する。

## 2 対象

2022年4月から2023年2月までに感染症法に基づく届出のあったEHEC感染症34件のうち、当センターに分与されたO157、O26、O111の菌株20件を対象とした。

## 3 検査方法

「腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック<sup>2)</sup>」に基づき検査を行った。

- 1) 鋳型DNAの調製
- 2) PCR
- 3) PCR増幅産物をシーケンサーで電気泳動
- 4) 泳動結果の解析（解析ソフト「Gene Mapper」）

## 4 結果

### 1) MLVA型

各遺伝子座（以下、「ローカス」という）におけるリピート数及びMLVA型は表1のとおりである。

以下のとおりMLVA型が一致しているグループが4組あった。

グループ1：22-3, 22-4, 22-5

グループ2：22-10, 22-11

グループ3：22-6, 22-15, 22-16, 22-17

グループ4：22-18, 22-22

### 2) 疫学情報

4結果の1)MLVA型におけるグループ1からグループ4の疫学情報は表2のとおりである。

## 5 考察とまとめ

MLVAは、ゲノム上に散在する反復配列（リピート構造）の多型性を利用し、複数の反復配列領

域（ローカス）においてリピート数を決定することにより菌株間の異同を高い分解能で調べることが可能となる<sup>1)</sup>。

EHEC（O157, O26, O111）では、17か所のローカスでリピート数を決定し、増幅産物が検出されなかったローカスには「-2」を付ける。17個の数字の組み合わせが一致したものは同じMLVA型となる。

今回、MLVA解析を実施した20件のうちMLVA型が一致したグループが4組あった。

グループ1は、患者と接触者による家族内での感染事例であった。

グループ2は、22-9が患者として発症し、その後、接触者の検便にて22-10と22-11の感染が判明した家族内での感染事例であったが、22-9と22-10, 22-11では2か所のローカスでリピート数が異なった。同居の家族内の事例であるものの、MLVA解析の結果からは直接的な関連性は低いと考えられた。この事例が二次感染だった場合、一次感染事例とこの3名の間に中間的なMLVAパターンを示す事例があった、若しくは共通汚染源からの感染だった場合、汚染源が混合汚染であったということが要因として推察された。

グループ3は、先に家族が発症し、その後の接触者の検便にて、22-15と22-16の感染が判明した家族内での感染事例であった。22-6, 22-17と22-15, 22-16にそれぞれ疫学調査による関連性は認められなかった。22-6はC保健所管内、22-15, 22-16, 22-17はD保健所管内の事例であり、22-15, 22-16, 22-17はほぼ同時期の事例で、22-6はこの3事例より約4か月前の事例であった。

MLVA解析の結果から、この4事例について、同一の感染源が疑われたが、22-6においては、発症時期がずれているため、直接的な関連性は低いと推察された。また、22-15, 22-16及び先に発症していた患者と22-17においても疫学情報からは直接的な関連性は認められなかった。しかし、MLVA型が偶然一致することはほばない<sup>3)</sup>ため、何かしらの共通事例が存在したと推察された。

グループ4は、同一保育園の同一クラスで1例目（22-18）が発生後、約1か月の期間が経過して2例目（22-22）が発生した事例であった。

同じ集団事例、家族内事例では多くの株が同じMLVA型を示す。そのため、グループ1とグループ4においては想定通りの結果が得られたが、グループ2とグループ3については、疫学情報とMLVA解析結果で乖離が見られた。

また、疫学調査結果から、それぞれのグループの感染源の特定には至らなかった。

今回のMLVA解析は令和4年度の菌株をまとめて実施したため、それぞれの事例の発症時期からMLVA解析結果が判明するまでに時間が経過していた。そのため、事例発生時の疫学調査にMLVA解析結果を活かすことができなかった。

分子疫学解析の結果の一致は共通の感染源を強く示唆するものであるが、保証するものではない。

そのため、分子疫学解析の結果と疫学調査の結果を噛み合わせることが重要である。

グループ3の事例のように、単なる散発事例と思われた事例が同じMLVA型を示す場合がある。また、グループ2やグループ3の事例のように県内だけではなく、他県とMLVA型が一致する場合がある。MLVA解析は、集団事例や家族内事例における菌株の同一性の確認に限らず、散発事例も含めた事例間の関連性及び広域性の有無を確認できる有効な検査法である。

そのため、今後はできる限り迅速に菌株の収集をし、MLVA解析を実施して、関係機関に結果を還元することで、疫学調査に活用してもらい、EHEC感染症対策に努めていきたい。

## 参考文献

- 1) 泉谷 秀昌；腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について、獣医公衆衛生研究（2018）
- 2) 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；腸管出血性大腸菌感染症調査のためのMLVA法の活用MLVAの説明、効果、意義、精度等、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会（2019年3月13日）

## 謝辞

今回の調査にあたり、疫学情報の提供をいただきました関係保健所に感謝いたします。

表1 各ローカスにおけるリポート数及びMLVA型

検体番号	O型, H型	VT毒索	EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-3A	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	MLVA型
22-1	O111:-	VT1	4	1	5	2	-2	16	11	-2	3	-2	3	12	2	-2	1	-2	4	22m3047
22-2	O26:11	VT1	2	1	1	2	6	8	14	-2	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	21m2115
22-3	O26:-	VT1	2	1	1	2	5	8	12	-2	-2	-2	1	11	2	-2	1	-2	-2	14m2078
22-4	O26:-	VT1	2	1	1	2	5	8	12	-2	-2	-2	1	11	2	-2	1	-2	-2	14m2078
22-5	O26:-	VT1	2	1	1	2	5	8	12	-2	-2	-2	1	11	2	-2	1	-2	-2	14m2078
22-6	O157:-	VT2	2	-2	1	3	-2	10	4	2	-2	17	9	-2	4	3	5	3	7	22m0155
22-8	O157:-	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	7	5	-2	11	11	10	7	2	10	6	4	7	22m0579
22-9	O157:7	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	10	12	12	8	7	10	3	6	22m0580
22-10	O157:7	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6	20m0169
22-11	O157:7	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	8	7	7	3	6	20m0169
22-12	O157:-	VT1	2	-2	1	4	-2	8	5	-2	-2	21	10	8	2	10	7	4	8	22m0293
22-13	O157:7	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	5	4	5	-2	10	11	-2	4	7	5	11	7	22m0036
22-14	O157:7	VT2	2	-2	1	3	-2	6	5	-2	-2	4	9	-2	5	5	10	10	5	23m0008
22-15	O157:-	VT2	2	-2	1	3	-2	10	4	2	-2	17	9	-2	4	3	5	3	7	22m0155
22-16	O157:-	VT2	2	-2	1	3	-2	10	4	2	-2	17	9	-2	4	3	5	3	7	22m0155
22-17	O157:-	VT2	2	-2	1	3	-2	10	4	2	-2	17	9	-2	4	3	5	3	7	22m0155
22-18	O111:-	VT2	4	1	5	2	-2	21	9	-2	3	-2	3	7	2	-2	1	-2	10	23m3003
22-20	O157:-	VT1VT2	2	-2	1	4	-2	6	5	-2	-2	19	9	9	2	14	7	4	9	23m0009
22-21	O26:-	VT1	2	1	1	2	5	7	13	6	-2	-2	1	9	2	-2	1	-2	-2	22m2028
22-22	O111:-	VT2	4	1	5	2	-2	21	9	-2	3	-2	3	7	2	-2	1	-2	10	23m3003

□ : グループ1

□ : グループ2

□ : グループ3

□ : グループ4

※ MLVA型は国立感染症研究所で決定する。

表2 疫学情報

	検体番号	保健所	年齢・性別	症状の有無	喫食状況	行動歴	接触者等	共通点	他県とのMLVA型一致
グループ1	22-3	A	5・M	腹痛, 下痢	生肉(焼き肉等)の喫食なし, 外食なし	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	周囲に感染者なし	家族(同居)	—
	22-4	A	39・M	なし	—	—	22-3の接触者	家族(同居)	—
	22-5	A	7・F	なし	—	—	22-3の接触者	家族(同居)	—
グループ2	22-9	B	97・M	腹痛, 下痢, 食欲不振	生野菜(宅配), 牛肉の喫食なし, 外食なし	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	周囲に感染者なし	家族(同居)	—
	22-10	B	92・F	なし	生野菜(宅配), 牛肉の喫食なし, 外食なし	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	22-9の接触者	家族(同居)	大阪, 福岡, 奈良, 広島 等
	22-11	B	59・F	なし	生野菜(宅配), 牛肉の喫食なし, 外食なし	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	22-10の接触者	家族(同居)	
グループ3	なし	D	6・M	腹痛, 下痢, 血便, 嘔吐, 発熱	外食(焼き肉)をしたが, 肉は食べていない	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	周囲に感染者なし	家族(同居)	—
	22-15	D	10・M	なし	—	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	検体番号なしの接触者	家族(同居)	宮崎, 広島
	22-16	D	8・M	なし	—	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	検体番号なしの接触者	家族(同居)	
	22-6	C	30・F	腹痛, 下痢, 嘔吐, 発熱	肉類の喫食なし, 弁当(手作り), 外食あり	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	周囲に感染者なし	なし	
22-17	D	63・M	腹痛, 下痢	スーパーで購入した惣菜, ステーキ(自宅で調理)	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	周囲に感染者なし	なし		
グループ4	22-18	E	2・M	腹痛, 下痢, 血便, 嘔吐, HUS	焼き肉(自宅), 回転寿司(生ものの喫食なし)	旅行なし, 自宅で鶏を飼育している	周囲に感染者なし(保育園の同クラスで軟便の園児が数名いた)	同一保育園	—
	22-22	E	1・M	下痢	外食なし	旅行なし, 動物等との触れ合いなし	22-18と同クラス	同一保育園	—