

MLVA 法による栃木県内で検出された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析

微生物部
関川麻実 永木英徳¹ 齋藤明日美 若林勇輝 江原栞 渡邊裕子 鈴木尚子²
(¹ 現県南健康福祉センター) (² 現医薬・生活衛生課)

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下 EHEC) は、ベロ毒素 (VT) を産生または VT 遺伝子を保有する大腸菌で、わずかな菌数で感染し、多くは腹痛や下痢、血便等を呈するに留まるが、重症患者においては溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を発症し、致死的な経過をたどることもある。主な感染経路は EHEC に汚染された食品や水からの経口感染である。近年の複雑な食品流通を背景に、多数の自治体で同時多発的に大規模な食中毒が広域に発生 (散在的集団発生) することもあり、注意が必要である¹⁾。

このような散在的集団発生においては菌株間の関係性を明らかにする必要があり、そのための手法として「反復配列多型解析法 (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis: 以下 MLVA 法)」が用いられる。本手法は、EHEC のゲノムに含まれる特定の配列を繰り返す領域を解析する方法であり、菌株間の関係性を数値化できるため、他自治体とも情報共有することが可能である。2018 年には厚生労働省から通知²⁾が発出され、食中毒事例の早期探知や関係部門間の連携を図る目的で、各地方衛生研究所での MLVA 解析が求められており、2022 年度から 2024 年度までの調査研究課題として、MLVA 法の立ち上げと栃木県内で検出された EHEC 分離株の分子疫学解析を行ったので報告する。

2 材料と方法

2.1 検体

2023 年 4 月から 2025 年 3 月までに栃木県内で分離され、感染症発生動向調査検体として当センターに搬入された EHEC 菌株 68 株のうち、MLVA 法で解析可能な O 血清群であった 49 株 (O157: 41 株、O26: 6 株、O111: 2 株) を用いた。

2.2 検査法

地方衛生研究所全国協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループが作成した腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157、O26、O111 編) 第 1 版 (Ver.1.2) 2018 年 11 月編を基に、当センターに即したプロトコルを作成して検査を実施した。

2.2.1 培養と DNA 抽出

供試菌株 (-80℃保存) をミューラーヒントン II 寒天培地に塗抹し、好気下 37℃で 18 時間培養した。形成されたコロニーを 500μL の滅菌蒸留水に懸濁したものを各サンプルとし、QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) を使用して DNA を抽出した。

2.2.2 PCR 反応

菌株から抽出した DNA を用いて、目的とする遺伝子座を PCR 反応により増幅した。なお、使用したプライマーは表 1 のとおり調製し、PCR 試薬の調製及び PCR 反応条件は図 1 のとおりとした。

表 1 プライマーの調製

Mix1	F1	F2	R1	R2	TE(DW)	Mix2	F	R	TE(DW)
EHC-2	1.0		1.0			EH26-7	2.0	2.0	
O157-25	1.0		1.0			O157-19	1.0	1.0	
O157-9	1.0		3.0	2.0		EH111-11	1.0	1.0	
EH157-12	1.0		1.0			EHC-6	1.0	1.0	
EH111-8	0.75	0.75	0.75	0.75		O157-37	1.0	1.0	
EHC-1	1.0		1.0			O157-17	1.0	1.0	
EHC-5	1.0		1.0			O157-36	1.0	1.0	
O157-3	1.0		1.0			EH111-14	1.0	1.0	
O157-34	1.0		2.0				9.0	9.0	
	9.5		14.5		76.0 (μL)				82.0 (μL)

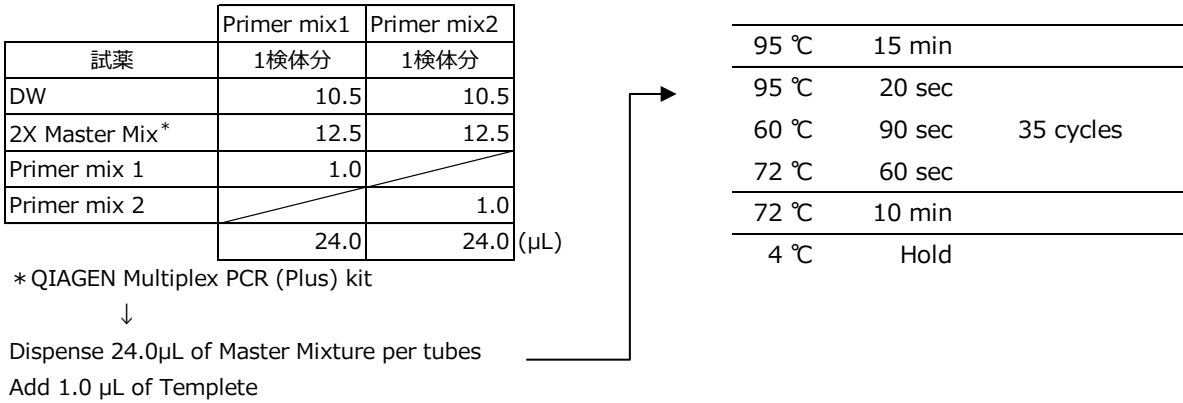


図 1 PCR 試薬調製及び PCR 反応条件

2.2.3 サンプル調製

PCR 反応で得られた増幅産物を、至適濃度にするため分子生物学用純水にて 100 倍希釈し、さらに測定しやすい状態にするため、図 2 のとおりサンプル調製を行った。

試薬	1検体分
Hi-Di ホルムアミド	10.0
GeneScan600LIZ	0.2

(μL)

必要量をまとめて1.5mLマイクロチューブに作製し、Vortex&スピンドウン

↓

96ウェルプレートに10 μL ずつ分注

↓

希釈したPCR産物 1 μL を加え、軽く遠心

↓

サーマルサイクラーで蓋を開けたまま99℃、3分間加熱し、その後氷冷（約5分）

図 2 サンプル調製

2.2.4 キャピラリー電気泳動

SeqStudio（Thermo Fisher Scientific 社）を用いてキャピラリー電気泳動を行い、PCR 反応後の各サンプルを測定することにより、増幅された DNA 断片のサイズを測定した。

2.2.5 フラグメント解析

キャピラリー電気泳動で得られた DNA 断片のサイズ情報を、フラグメント解析用ソフトウェア「GeneMapper」を用いて解析した。目的とする領域における繰り返し配列のリピート数は、図 3 のように灰色の帯 (BIN) とよばれる範囲が設定されており、サンプルのピークと重なったところからリピート数が決定される。こうして 17 領域全てを目視で確認し、MLVA パターンを得た。

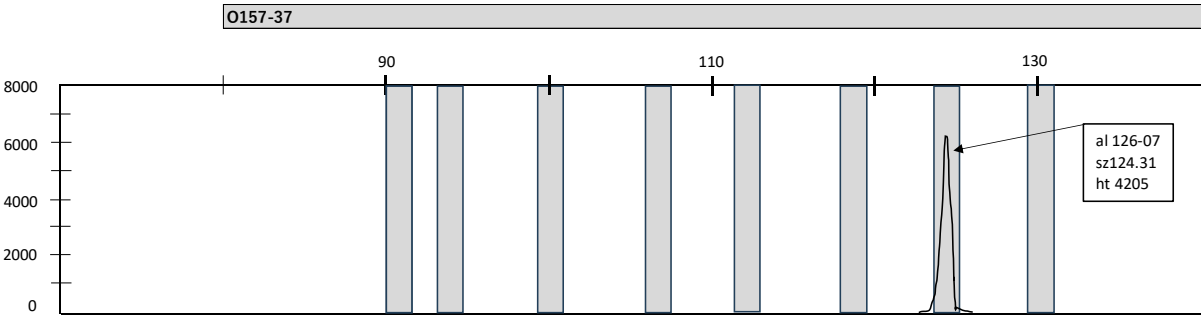


図 3 GeneMapper における BIN とサンプルピークの一例

2.2.6 国立感染症研究所の解析データとの比較

当センターで得られた MLVA パターンと、国立感染症研究所（以下、感染研）に送付し解析を依頼した同一菌株の MLVA パターンを 17 領域全てで比較し、その整合性を確認した。

2.2.7 Minimum Spanning Tree (MST) 図の作成

数字の配列である MLVA パターンの遺伝子近縁性を把握するため MST 図を作成した³⁾。MST 図は頂点と辺から構成され、頂点に配置した円が各遺伝子型を表し、その遺伝子に属する菌株数に比例して円は大きくなる。菌株の属性データは任意のカテゴリ別に色分けすることができ、複数のカテゴリを含むものは複数色に色分けされた円グラフとなる。また、辺の長さは遺伝子間の不一致領域数を表している。つまり一致する領域数が多いほど辺は短くなり、中でも不一致領域 1 または 2 である近縁遺伝子型はグラフ上の円が実線で結ばれ、近縁遺伝子型でない場合は点線となる。

今回得られた MLVA パターンから MST 図を作成し、各菌株間の遺伝子近縁性を可視化した。なお、色分けは広域健康福祉センターごとに設定した。

3 結果と考察

対象とした 49 菌株全てで MLVA パターンが得られた。当センターの解析結果と感染研での解析結果を比較した結果、ほとんどの領域で同一リピート数となり、正しい結果が得られていたことが確認できた。不一致であったものはダブルピークやプラスミドの脱落によるもので、特に問題となるようなものはなかった。

次に、得られた MLVA パターンを基にして MST 図を作成した（図 4）。地域による偏りは認められなかったが、広域健康福祉センターごとに菌株が同じ円を構成しているものが複数見られ、そのうち家庭内感染は 9 事例であった。また、それ以外にも散発事例間において実線（不一致領域 1 または 2）で結ばれたものもあり、何らかの疫学的関連が示唆された。

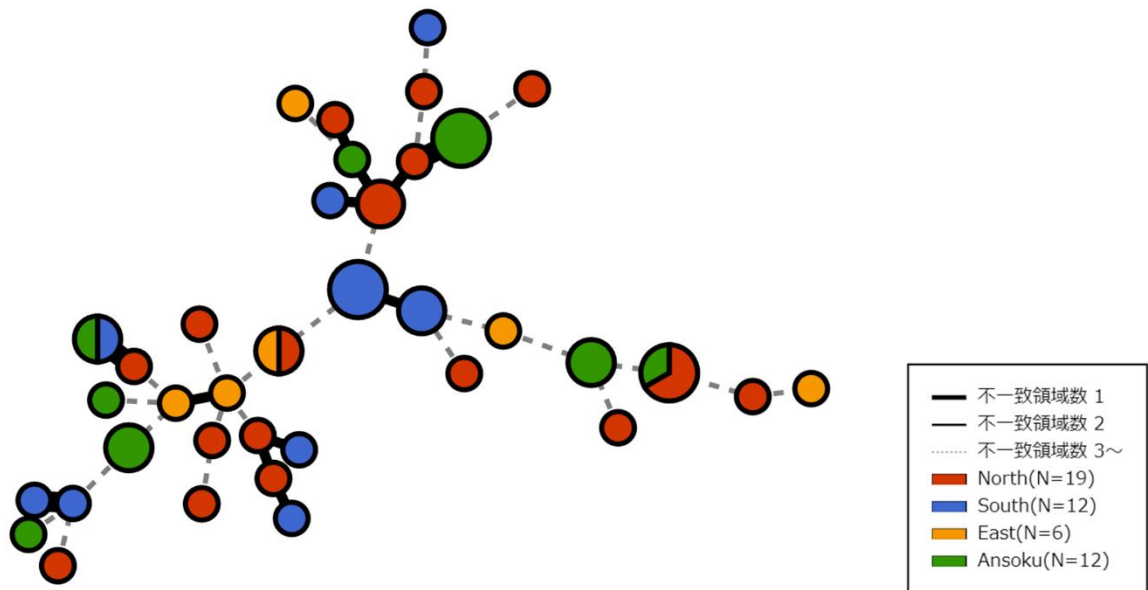


図 4 栃木県内で検出された EHEC の MST 図（2023 年 4 月～2025 年 3 月搬入分）

4 まとめ

今回、MLVA 法の検査法立ち上げから分子疫学解析までの一連の検査体制を構築できた。MLVA 法は、EHEC 菌株間の相同性を客観的な数値や MST 図により視覚的に解析することが可能で、実地疫学の一助となる有益な情報である。しかしながら、感染源の推定や感染の広がりを評価するためには、さらに詳細な疫学情報が不可欠であり、それらの情報を総合的に判断することが重要である。

今後は、MLVA 法をルーチン化して解析菌株数を増やし、それらのデータを蓄積して栃木県内における EHEC の分子疫学解析を充実させていく予定である。また、MLVA 法による解析は、手技、試薬、機器など全ての要素において高い精度が求められるため、各種精度管理調査に積極的に参加し、検査精度を担保していきたいと考えている。

5 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、20(2)、6-11、2018
- 2) 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（厚生労働省健康局結核感染症課、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課）平成30年6月29日事務連絡
- 3) Ryo NASUHARA, Yoko NADAOKA, Akiko KUSABUKA et al., Development of an Aggregation and Visualization System (MLVA-mate) for MLVA and VNTR Sequence Typing, Ann Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 69, 2018