

研 究

腸管出血性大腸菌O157の分子系統解析

西村 英之¹⁾ 中田 聡²⁾ 荻原 康則¹⁾

1) 宮城県食肉衛生検査所

2) 宮城県食と暮らしの安全推進課

要 約

牛由来の腸管出血性大腸菌O157について、株間の相同性を確認するためMLVA法による解析を行い、ヒト由来株とも比較した。その結果、農場環境中における同一株の蔓延や同居牛間での水平伝播、さらに、長期にわたり農場に定着する株系統の存在が示され、農場では蔓延防止に向けた衛生管理の徹底が求められる。また、株の遠隔地への伝播が疑われる事例もみられたことから、対策の必要性が示唆された。ヒト由来株との比較では、農場所在地と患者居住地域が一致した例がみられたが、当該牛と患者の疫学的関連は不明であった。

キーワード：牛、腸管出血性大腸菌O157、MLVA法

腸管出血性大腸菌 (enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, 以下EHEC) はベロ毒素産生性の大腸菌で、特に牛の腸管内に存在することが知られており、O血清群としてはO157による食中毒および感染症の報告が多い。EHECの分子系統解析法としては、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulse field gel electrophoresis ; PFGE) が主流であったが、手技の煩雑さや所要時間の長さなどから、近年ではその代替法として簡便性と迅速性を備えたMLVA法 (Multi locus variable number tandem repeat analysis) が用いられてきている¹⁾。MLVA法はゲノム上に散在する複数の反復配列領域を検出し、その反復コピー数の組み合わせに基づき系統解析を行う方法である。当所では管轄と畜場に搬入された牛の糞便中のEHEC保有状況を継続的に調査しているが、これまで分離された株間の詳細な分子系統解析は実施していなかった。そこで今回、EHEC O157について株間の相同性を確認するためMLVA法を実施した。また、ヒトのEHEC O157感染症患者由来株についても実施し、牛由来株と比較したので併せて報告する。

材料および方法

供試菌株：牛由来株は、平成25年5月から平成30年9月にかけて牛の直腸便から分離された5道県16農場（北海道3農場10株、青森県8農場23株、秋田県1農場1株、岩手県1農場1株、宮城県3農場8株）の43株を試験に供した（株No.1～43）。ヒト由来株は、仙台市を除く宮城県内の感染症事案で平成25年7月から平成30年6月にかけて患者の便から分離されたEHEC O157株のうち60株を用いた（株No.101～160）。なお、対象期間にEHEC O157が原因と断定された食中毒事例はなかった。

DNA抽出：-80℃保存菌株を血液寒天培地にて1晩培養後、1コロニーをMightyPrep reagent for DNA（タカラバイオ株式会社）100μlに懸濁、95℃で10分加熱したのち、12,000rpm 2分間遠心した上清をPCRの鋳型とした。

VNTR (variable number tandem repeat) 遺伝子座：現在、国内の行政検査機関ではEHEC O157, O26, O111の3血清型を対象とした17遺伝子座を使用したMLVA法^{1,2)}が主流であるが、今回の試験ではア

表1 使用した遺伝子座とプライマー

遺伝子座	蛍光色素	プライマー-F (Sequence 5'-3')	プライマー-R (Sequence 5'-3')
O157-3	6-FAM	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCCTCGCCATCG
O157-9	NED	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
O157-17	6-FAM	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
O157-19	6-FAM	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTG	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
O157-25	NED	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACAC
O157-34	NED	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
O157-36	6-FAM	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAAGCCACACCATGC
O157-37	NED	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG

メリカ疾病対策予防センターがO157のみを対象として選定した9遺伝子座³⁾のうち、変化が早すぎるとして現在は使用されていない1つを除いた8遺伝子座¹⁾を用いた。なお、この8遺伝子座は先述の17遺伝子座に含まれる。

PCR：試薬は、*TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version*（タカラバイオ株式会社）を使用した。プライマーは、フォワードプライマーの5'末端側に蛍光色素6-FAMまたはNEDを修飾し使用した（表1）。反応条件については、初期変性95℃1分の後、変性98℃10秒、アニーリング60℃30秒、伸張72℃30秒を30回繰り返し、最終伸張を72℃10分とした。

MLVA法：まず、株No.1の大腸菌のDNAを調製し、これを鋳型として蛍光修飾していないプライマーを用いて各遺伝子座のPCRを行い、増幅産物をABI3500ジェネティックアナライザー（Applied Biosystems）を用いてDNA塩基配列解析し、各遺伝子座の増幅産物サイズと、ユニット配列の反復コピー数を確認した。次いで、蛍光プライマーにより増幅したPCR産物について同機器とGene Mapper 5（Applied Biosystems）でフラグメント解析を行い、これにより算出されたフラグメントサイズと、先に判明している実際の各遺伝子座の増幅産物サイズとの差を確認した。これを基準として、他のサンプルについてフラグメント解析による実測サイズから反復コピー数を推定した。

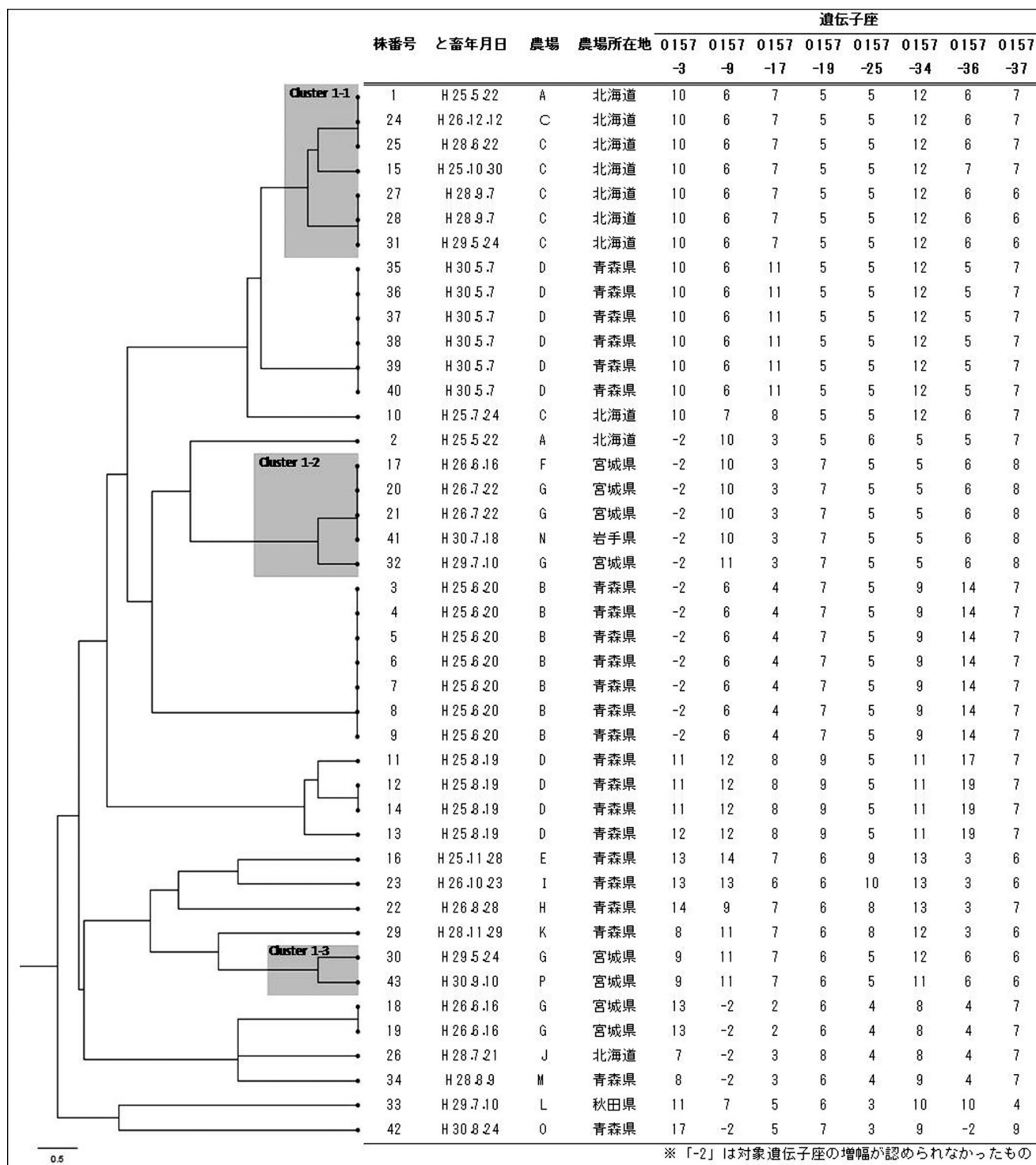
系統樹作成：各株の8遺伝子座の推定反復コピー数からGenAlEx 6.5を用いて距離行列を作成し、Phylip形式で出力した。次に、Neighbor version 3.69を用いてUPGMA法（平均距離法）により系統樹データを作成、FigTree v1.4.3により描画した。

成 績

同一農場内での株の比較：16農場のうちA, B, C, D, Gの5農場で複数株が分離された（表2）。A農場は同一と畜日の牛由来2株（No.1, 2）について解析したところ、8遺伝子座のうち一致するのは2つのみで、系統的に大きく離れていた。同一農場かつ同一と畜日の牛由来株で系統が大きく離れた例はA農場のみにみられた。B農場の7株（No.3～9）は同一と畜日の牛由来株で、すべてMLVA型が一致していた。C農場では4年にわたり計7株（No.10, 15, 24, 25, 27, 28, 31）が分離されており、No.10のみ系統がやや離れ、その他はいずれもMLVA型が一致ないし2座以内の違いであった。D農場の10株（No.11～14, 35～40）はH25.8.19と畜牛由来の4株とH30.5.7と畜牛由来の6株である。先の4株間は一貫しない遺伝子座が2座以内、後の6株はすべての遺伝子座が一致していたが、先の4株と後の6株で比較すると6遺伝子座が異なっており、系統は大きく離れていた。G農場の6株（No.18～21, 30, 32）はH26.6.16と畜牛由来の2株、H26.7.22と畜牛由来の2株、H29.5.24と畜牛由来の1株、H29.7.10と畜牛由来の1株である。と畜日によって異なるMLVA型の株が分離されているが、H26.7.22の2株とH29.7.10の1株は1遺伝子座の違いであった。

農場間での株の比較：農場間でMLVA型が一致ないし1遺伝子座違いであった組み合わせは、Cluster 1-1 [No.1/24/25/15/27/28/31], Cluster 1-2 [No.17/20/21/32/41], Cluster 1-3 [No.30/43] であった（表2）。

表2 MLVA法による牛由来株の解析



※「-2」は対象遺伝子座の増幅が認められなかったもの

道県間での株の比較：特定の道県由来の株が同一のClusterに偏在する傾向は見られなかった（表2）。供試株が最も多い青森県の株（8農場23株）は、11のMLVA型に分類されたが、系統樹上では散在していた（表2）。

牛由来株とヒト由来株の比較：牛由来とヒト由来の株間でMLVA型が一致しないし1遺伝子座違いであった組み合わせはCluster 2-1 [No.30/103/125/135/149], Cluster 2-2 [No.18/19/142] の2つであった（表3）。

表3 牛由来株とヒト由来株で形成されたCluster

Cluster 2-1												
由来	株番号	と畜年月日*	農場	農場所在地	遺伝子座							
					0157-3	0157-9	0157-17	0157-19	0157-25	0157-34	0157-36	0157-37
牛	30	H29.5.24	G	宮城県	9	11	7	6	5	12	6	6
牛	43	H30.9.10	P	宮城県	9	11	7	6	5	11	6	6
ヒト	103	H25.7.25	—	—	9	11	7	6	5	12	6	6
ヒト	125	H27.7.31	—	—	11	11	7	6	5	12	6	6
ヒト	135	H28.6.30	—	—	9	11	7	6	5	12	8	6
ヒト	149	H29.8.17	—	—	8	11	7	6	5	12	6	6

Cluster 2-2												
由来	株番号	と畜年月日*	農場	農場所在地	遺伝子座							
					0157-3	0157-9	0157-17	0157-19	0157-25	0157-34	0157-36	0157-37
牛	18	H26.6.16	G	宮城県	13	-2	2	6	4	8	4	7
牛	19	H26.6.16	G	宮城県	13	-2	2	6	4	8	4	7
ヒト	142	H28.10.6	—	—	12	-2	2	6	4	8	4	7

※ヒト由来株については保存された年月日

考 察

今回の調査では同一農場の牛由来株のMLVA型が一致する例が複数あり、農場環境中の同一株の蔓延、または同居牛間での水平伝播が示唆された。

一方、同一農場でも異なるMLVA型がみられる例もあった。A農場の2株は同一と畜日牛由来であるが系統が大きく異なっており、農場内での同一クローンの変異による多様化ではなく、外部からの侵入などによる別の由来株であることが示唆された。と畜日は異なるが、同様の例がD農場、G農場でもみられた。

C農場、D農場、G農場では、MLVA型が一致しないが、1～2遺伝子座違いの組み合わせがみられた。このことは、これらの株が農場内での変異によって生じた同一クローン由来株であることを示唆する。特にC農場では、複数年にわたり近縁な株が分離されており、同一クローン由来株が変異を起こしつつ農場に定着し続けていると考えられる。G農場でも同様の例がみられた。

農場間で比較すると、近縁な3つのClusterがみられた。Cluster1-1 [No.1/24/25/15/27/28/31]については、A農場、C農場ともに北海道内ではあるが、地理的には直線距離で約150km離れており、これら

が疫学的関連による同一クローン由来株であるのかは不明である。Cluster1-2 [No.17/20/21/32/41]はF、G、Nの3農場の株で構成されている。F農場とG農場は宮城県の同一市町村内に位置しており、株が分離された時期も1ヶ月差と近く、同一クローン由来株であることが示唆される。一方、N農場は岩手県北部と地理的に離れていることに加え、分離された時期も異なることから、関連性は不明である。Cluster1-3 [No.30/43]については宮城県内のG農場とP農場の株であるが、これらの位置関係は不明であり、分離時期も1年余り異なった。

地域間で比較すると、近縁株の地理的な偏在傾向は見られず、同一道県でも遺伝的に遠い株が混在しており、家畜流通の広域化に伴う遠方伝播および定着が推察される。

ヒト由来株と牛由来株の比較では、宮城県内のヒト由来株とMLVA型が一致しない1遺伝子座違いの牛由来株は、いずれも宮城県内農場の牛から分離された株であり、特にCluster 2-2では農場所在地と患者居住地域が一致していたが、当該牛と患者の疫学的関連は不明である。

今回の分子系統解析により、当所で分離されたEHEC O157の株間の遺伝的関係性を明らかにすることができた。特に、同一農場において隔年で同一

MLVA型、またはそこから変異したと考えられる株が分離される例が確認され、長期にわたり農場に定着する株系統の存在が示された。全国的に分離が確認されている病原体であることも鑑みると、個々の農場における清浄化は困難であると考えられる。したがって、農場レベルでは蔓延防止に向けた糞便の適切な処理、水平感染の防止などの一般的衛生管理の徹底が求められる。また、同一農場、同一道県で遺伝的に遠い株、地理的に離れた農場で近縁株がみられたことから遠隔地への伝播対策の必要性が示唆される。

最後に、今回の研究を実施するにあたり、多大なるご指導をいただきました石巻専修大学阿部知顕教授ならびに柴田清孝教授、そしてヒト由来株DNAの分与にご協力いただきました宮城県保健環境センター微生物部の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 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) Hidemasa I, Yingxin P, Jun T, Makoto O, Tetsuya H, Sunao I, Haruo W : New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups : O157, O26, and O111, *Microbiol Immunol*, 54(10), 569-577 (2010)
- 3) Hyytia-Trees E, Smole S.C., Fields P.A., Swaminathan B., Ribot E. : Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157), *Foodborne Pathog Dis*, 3(1), 118-131 (2006)