

IS printing法を用いた腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析の有用性の検討

黒崎守人・熱田純子・高橋起男・川瀬 遵・福島 博

1. はじめに

腸管出血性大腸菌の分子疫学解析には一般的にパルスフィールドゲル電気泳動法（以下PFGE法）が用いられているが、やや迅速さに欠ける。

近年開発されたIS printing法は、腸管出血性大腸菌O157（以下O157）の挿入配列（Insertion sequence : IS）の多型性をMultiplex PCR法により検出する方法であり数時間で結果の判定ができるため、O157感染症が発生した場合、感染源、感染経路の究明と感染拡大防止にタイムリーに役立つ可能性がある。

この方法での解析結果を中国・四国域内で比較することで、IS printing法がO157感染症の広域での発生事例に迅速な分子疫学解析法として応用可能であるか検討したので報告する。

2. 材料および方法

2.1 材 料

使用した菌株は、平成21年中に島根県内で届け出のあった腸管出血性大腸菌O157 4株（3事例）を用いた（表2）。

2.2 方 法

IS printing System（東洋紡）の説明書に記載された方法に準じ、滅菌蒸留水 9 μL、1stまたは2nd set Primer Mix 2.5 μL、2×IS printing Master Mix 12.5 μL、Template DNA 1 μLの計25 μLで行った。

電気泳動は、3%NuSieve 3 : 1 アガロース、0.5×TBEバッファーでサブマリン型電気泳動装置を用いた。電圧、泳動時間は、120V、120分で行った。

IS printingの結果は、表1のように各プライマーセットごとに図1のスタンダードDNAのバンドと比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に3バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット1、セット2の順に12桁にコード化（以下ISコード）して表記した。ISコードは、厚生労働科学研究費補助研究事業「食品由来感染症調査における分子疫学解析手法に関する研究」の研究分担者である岡山県環境保健センターに報告し、岡山県環境保健センターでは、中国・四国域内で発生したO157のISコードを集約、比較し、同一コードのO157が分離されているか

表1. IS printingの増幅バンドサイズと判定のコード変換

| 1st set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| primer No. | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | eae | 1-16 | hlyA |
| size(bp) | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 139 |
| 判定例(菌株No.1) | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算値 | 3 | | | 0 | | | 7 | | | 5 | | | 5 | | | 5 | | |
| 2nd set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| primer No. | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | stx2 | stx1 |
| size(bp) | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 |
| 判定例(菌株No.1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算値 | 6 | | | 1 | | | 1 | | | 6 | | | 5 | | | 7 | | |

コード変換の方法

各プライマーごとに図1のスタンダードDNAと比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定する。増幅サイズの大きいバンドから順に3バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算する。セット1、セット2の順に12桁にコード化する。この例では12桁のコードは307555 611657となる。

表2. 供試菌株とIS printingの結果

| 菌株No | 届出年月日 | 発生病場所等 | H血清型 | VT | IS printingコード | | PFGE型 (感染研) | 還元された情報 |
|------|------------|--------|------|-----|-------------------------|---------|------------------|---------|
| | | | | | 1st set | 2nd set | | |
| ① | 2009/ 8/24 | G市 | 7 | 1&2 | 3 0 7 5 5 5 1 1 1 6 5 7 | e426 | 8月広島県分離株と一致 | |
| ② | 2009/ 9/ 1 | H市 | 7 | 1&2 | 3 5 7 1 7 5 6 1 1 7 5 7 | e241 | 中国・四国域内に一致する株はない | |
| ③ | 2009/ 9/28 | M市 | UT* | 1&2 | 3 1 1 0 5 7 3 1 0 4 5 7 | d9 | 中国・四国域内に一致する株はない | |
| ④ | 2009/10/ 1 | ③の子 | UT* | 1&2 | 3 1 1 0 5 7 3 1 0 4 5 7 | d9 | 中国・四国域内に一致する株はない | |

*UT: 型別不能

について情報還元された。

3. 結果と考察

4株のIS printingの電気泳動パターンは3つの事例間で相違があり、それぞれの事例間では関連がないことが明らかにされた。家族内感染の③と④は同じパターンを示し、疫学情報と一致した(図1、表2)。

また、国立感染症研究所に依頼して実施したPFGE法の結果とも一致しており、IS printing法は迅速、簡便に実施できるので有用なサブタイピング法であると思われる。

菌株No.①および②のISコードは9月中旬に岡山県環境保健センターあて送信し、同日、中四国域内で同じISコードの情報は集約されていない旨還元され、ISコードを集約することで他県で同一タイプのO157の発生があったかどうか比較的迅速に情報が得られた。

しかし、その後菌株No.③および④のISコードを含めて送信したところ、菌株No.①のISコードは広島県分離株と一致しているとの情報還元があった(表2)。

ISコードを早期に報告しても、報告後に他県での情報が追加された場合にその情報を知ることはできない。また、疫学情報を含む場合があることから、タイプが

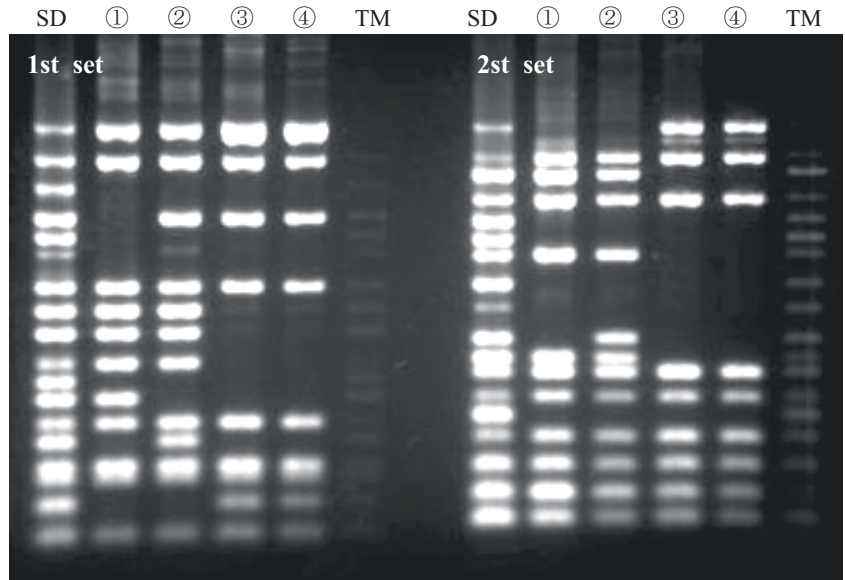


図1 IS printingの電気泳動像

レーン: SD: スタンダードDNA (泳動コントロール)、
①: 菌株①、②: 菌株②、③: 菌株③、④: 菌株④
TM: テンプレートミックス: (PCRコントロール)

一致しない場合、中国・四国域内で一致する株はないとの情報はのみの提供となり、一致した場合でも還元された他県の情報は県名と発生月のみであった。感染源対策、感染拡大防止のためにはより詳細な疫学情報の共有化が必要であり、メンバーならいつでも自由に閲覧可能な情報ネットの構築が望まれる。また、個人情報との兼ね合いから、今後どのような情報を集約するか検討が必要である。