

島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 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・寺本彩香

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、早期の感染源、感染経路の究明と感染拡大防止に役立つ可能性がある。

O157 感染症の発生時に IS printing 法を用いた分子疫学解析を行い、解析のツールとして有用であるか検討した。

2. 材料および方法

2.1 材料

使用した菌株は、平成22年度中に島根県内で届出のあった O157 16 株（9 事例）である（表 2）。

2.2 方法

IS printing 法については、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、1 st または 2 nd 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 % 濃度の NuSieve GTG : SeaKem GTG 2 : 1 アガロース、0.5 × TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動装置で 120V 100 分を行った。

IS printing の結果は、各プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、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）した（表 1）。また、電気泳動像および IS コードを県庁の感染症主管課に報告した。

パルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）法については国立感染症研究所（以下感染研）に菌株を送付し解析を依頼した。

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	<i>eae</i>	1-16	<i>hlyA</i>
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	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	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	┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐		
	7			1			7			5			7			7		

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	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
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	0
係 数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加 算	┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐			┌───┐		
	6			1			1			6			5			3		

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
増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定
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
セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化

表2 使用した菌株とその疫学的関連および解析結果

菌株 No.	事例	届出年月日	発生場所等	VT	IS printing コード		各事例内の疫学的関連	PFGE type No. (感染研)
					1st set	2nd set		
①	1	平成22年5月21日	M市	2	7 1 7 5 7 7	6 1 1 6 5 3	②の子。	f34
②	1	平成22年5月18日	M市	2	7 1 7 5 7 7	6 1 1 6 5 3	①の親。焼肉店でユッケを喫食。	f34
③	2	平成22年6月10日	M市	2	1 1 5 0 5 5	3 0 3 4 4 3	⑤の同僚。宴会でホルモン鍋を喫食。	f81
④	3	平成22年6月10日	I市	2	1 5 5 0 4 5	3 0 3 4 4 2	⑦の弟。母が焼肉店でレバ刺しを喫食。	f80
⑤	2	平成22年6月15日	M市	2	1 1 5 0 5 5	3 0 3 4 4 3	③の同僚、⑥の親。宴会でホルモン鍋を喫食。	f81
⑥	2	平成22年6月18日	M市	2	1 1 5 0 5 5	3 0 3 4 4 3	⑤の子。	f81
⑦	3	平成22年6月20日	I市	2	1 5 5 0 4 5	3 0 3 4 4 2	④の姉。母が焼肉店でレバ刺しを喫食。	f80
⑧	4	平成22年7月17日	T町	2	1 1 4 0 5 7	3 0 3 4 4 3	特記事項なし。	f528
⑨	5	平成22年7月24日	H町	1&2	7 1 7 5 5 7	6 1 1 6 5 7	特記事項なし。	f522
⑩	6	平成22年9月24日	O町	1&2	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 6	⑪の居酒屋店員。生レバーを喫食。	f525
⑪	6	平成22年9月30日	O町	1&2	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 6	⑩の店長。生レバーを喫食。	f525
⑫	7	平成22年9月30日	M市	1&2	3 0 7 5 5 5	6 1 1 6 5 7	焼肉店で生レバー、ユッケを喫食。	f517
⑬	8	平成22年10月8日	G市	1&2	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 6	⑭の子、⑮の弟。特記事項なし。	f525
⑭	8	平成22年10月11日	G市	1&2	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 6	⑬、⑮の親。特記事項なし。	f525
⑮	8	平成22年10月19日	G市	1&2	3 1 7 5 5 7	6 1 1 7 5 6	⑬の兄、⑭の子。特記事項なし。	f524(1band diffr.from f525)
⑯	9	平成22年10月26日	H市	1&2	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 6	特記事項なし。	f525

3. 結果 (表2、図1~5)

島根県における平成22年度のO157感染症の発生は、発生時期により5月18日届出から7月24日届出までの9件(5事例)と9月24日届出から10月26日届出までの7件(4事例)に分けられた。事例1から5および事例7では事例間で異なったISコードを示し、事例内で複数の患者等があった場合(事例1、2、3)は全て同一であり、疫学情報と一致した。

事例6、8、9では事例間でも同一のISコードを示し、3つの事例の患者等の住所地が半径約20km以内と比較的近接していることから何らかの関連性が疑われた。しかし事例6で生レバーを喫食していたこと以外特記すべき暴露源は確認できず、疫学調査でも共通の感染源は認められなかった。また、事例8では事例内でバンドが1本異なった株(菌株No.⑮)が認められた。

SD ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ TM SD ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ TM

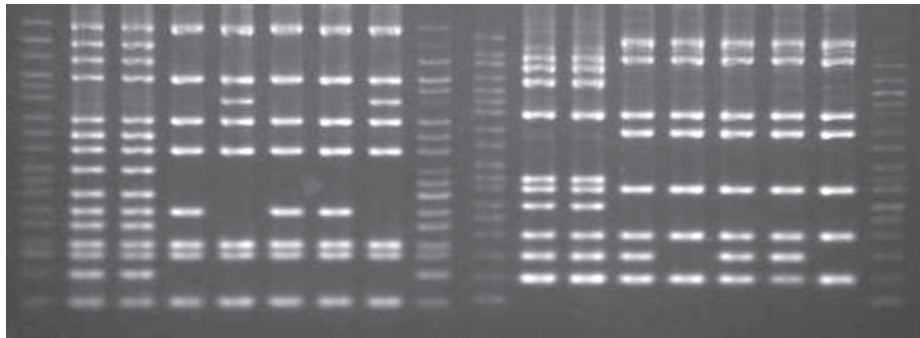


図1 菌株No.①~⑦(事例1~3)のIS printingの電気泳動像(左:1st set、右:2nd set) SD:スタンダードDNA(泳動コントロール)、①~⑦:菌株No.①~⑦、TM:テンプレートミックス(PCRコントロール)。以下同様。

SD ⑧ ⑨ TM SD ⑧ ⑨ TM SD ⑩ ⑪ ⑫ TM SD ⑩ ⑪ ⑫ TM

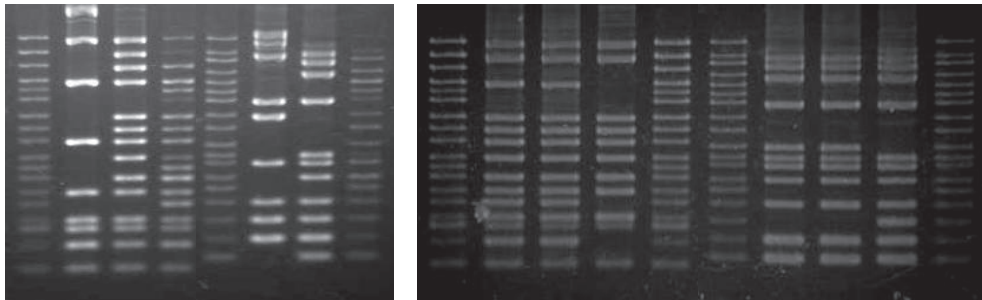


図2 菌株No.⑧、⑨(事例4、5)のIS printingの電気泳動像

図3 菌株No.⑩、⑪、⑫(事例6、7)のIS printingの電気泳動像

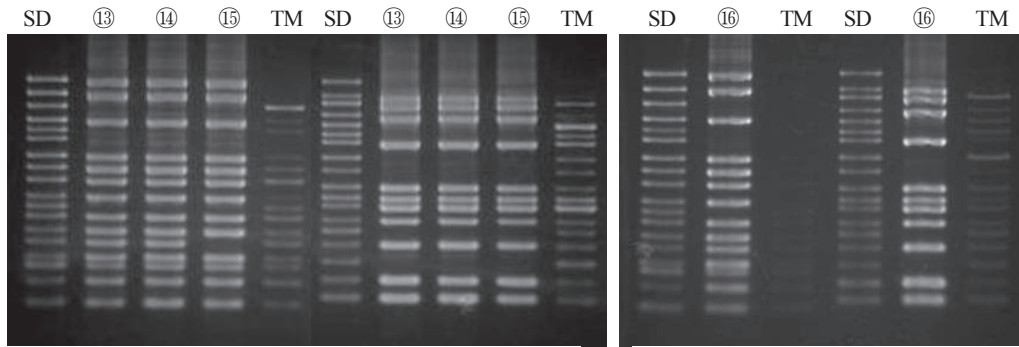


図4 菌株No.⑬、⑭、⑮（事例8）のIS printingの電気泳動像

図5 菌株No.⑯（事例9）のIS printingの電気泳動像

感染研のPFGE法による解析でも同様の結果であり、事例1の菌株は平成22年5月に大阪で分離された株と同じパターンであったが、他の事例の菌株は島根県以外の地域で同一のPFGEパターンを示したものはなかった。

4. 考 察

IS printing法の型別能力はPFGE法よりやや劣るものの疫学解析には十分利用可能である¹⁾といわれているが、平成22年度の島根県のO157発生事例においてはPFGE法による解析結果と完全に一致しており、IS printing法は有用な解析ツールであると思われる。

事例6、8、9では事例間で同一コードを示し共通の感染源が疑われたが、疫学調査では関連性は見いだせなかった。

また、事例8では事例内で1バンド異なるパターンの株が認められた。PFGE法による解析でも同様の結果であったが、IS printing法において、バンドの有

無が若干異なっている場合の菌株の相同性の評価について今後の検討が必要である。

PFGE法による解析では事例1のみ大阪で分離された株と同じパターンであり、他の事例の株は島根県でのみ分離されていた。PFGE法により広域的な発生の有無を探知するためには、菌株を感染研に送付しなければならないが、IS printing法による解析結果はデジタルなデータであり、データのやりとりやデータベース化は比較的容易である。事例内の関連のみならず、解析結果を集約して広域的な事例間の関連性を比較的迅速に探知できるシステムを構築する際にもIS printing法は有用であると思われる。

文 献

- 1) 中嶋 洋 他 (2010) : 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究 平成21年度 総括・分担研究報告書, 87-90