

# IS-printing System を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析について Molecular Epidemiological Analysis of Escherichia coli O157 Using the IS-Printing System

宮本 孝子                      有塚 真弓                      関 和美                      内田 順子  
Takako MIYAMOTO   Mayumi ARIZUKA   Kazumi SEKI              Junko UCHIDA

## 要 旨

香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 23 株（集団発生 3 事例を含む）と精度管理菌株 5 株についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）と IS-printing System（IS法）で解析し比較した。結果は集団発生 3 事例の株すべてが同一の ISコードとなったが、PFGE法は若干異なるパターンを示した。

IS法は PFGE法に比べ識別能は同等あるいは若干劣るものの、簡便性、迅速性に優れており、今回の集団発生事例でも有用な結果が得られたことから今後、全国的なデータベースの構築を進めれば、スクリーニングとしての有効な活用が期待できる。

キーワード：O157 IS-printing System パルスフィールドゲル電気泳動法 集団発生

## I はじめに

近年、腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学解析法として、菌株の全ゲノムDNAを制限酵素で切断しその断片を電気泳動により分離し得られたバンドパターンにて遺伝子型を決めるPFGE法が広く用いられているが、特殊な装置が必要であり、操作が煩雑で解析に日数を要する。一方、マルチプレックスPCRによるIS法は、操作も簡便で迅速に結果が得られ、データをコード化でき、他株との比較が容易である。

本県は、平成21年度から、「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（厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）」（以下、研究事業）の中国・四国ブロックに参加している。本県で分離された腸管出血性大腸菌 O157（以下、O157）や精度管理菌株の遺伝子解析を行い、中国・四国ブロック内で比較を行っている。今回、IS法とPFGE法を比較し若干の知見を得たので報告する。

## II 方法

### 1 供試菌株

平成21年と22年に、本県で分離されたO157 23株を検討対象とした。その内訳は、集団発生3事例16株、散発7事例7株である。また、研究事業の精度管理

菌株5株を対象とした。

### 2 検査方法

#### (1) PFGE法

国立感染症研究所から提示された方法に従い、Tryptic Soy Broth(Becton Dickinson 製増菌培地)で36°C18時間培養した菌を用いてPFGE法を行った。制限酵素はXbaIを用い37°C18時間振とうし、消化反応させた。分子量マーカーは、Salmonella Braenderup H9812をXbaIを用い同様に処理した。電気泳動は、BioRad CHEF-DRIII Systemを使用し、TBE Bufferを用いて6V/cm、スイッチングタイム2.2-54.2秒、泳動時間19時間、Buffer温度14°Cの条件で実施した。泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下でバンドを検出した。解析はBioRad Fingerprinting IIを用いた。

#### (2) IS法

林らが開発したマルチプレックスPCRによるO157のサブタイピング法をキット化したIS法(東洋紡)を用い、バンドを検出した。結果は、プライマーごとにStandard DNAと比較し、増幅ありを「1」、なしを「0」と判定し、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

表1 供試菌株（香川県で分離された腸管出血性大腸菌O157 23株）

No.	VT	ISコード		PFGE		分離日		年齢	関連事項
		1st	2nd	香川県 Type	感染研 Type				
1	1&2	617577	211547	A	e 762	2009	12月下旬	20歳代	散 発
2	1&2	317575	611257	B	e 756			40歳代	
3	2	145047	303441	C	f 73	2010	6月中旬	50歳代	散 発
4	1&2	017175	601647	D	f 360		7月上旬	70歳代	
5	2	012057	214442	E	f 354		8月中旬	10歳代	
6	1&2	717577	611657	F	c 608	2010	8月下旬	4-6歳	集団 I 保育所① No.6の家族
7								4-6歳	
8								0-3歳	
9								4-6歳	
10								30歳代	
11	1&2	717577	611657	F	c 608	2010	8月下旬	0-3歳	集団 II 保育所② No.11, 12の家族
12								0-3歳	
13								70歳代	
14	1&2	717577	611657	F	c 608	2010	9月下旬	0-3歳	集団 III 保育所② No.14の家族 No.15の家族
15				F	c 608			0-3歳	
16				F	c 608			30歳代	
17				F	c 608			20歳代	
18				F'	f 268			50歳代	
19				F	c 608			80歳代	
20				F	c 608			0-3歳	
21				F	c 608			4-6歳	
22	2	345457	311652	G	c 374	2010	10月上旬	50歳代	散 発
23	2	311557	710413	H	e 377		80歳代		

表2 精度管理菌株 5株

No.	VT	ISコード		PFGE
		1st	2nd	香川県 Type
ア	1&2	717577	611657	I
イ	1&2	717577	611657	
ウ	1&2	717577	611657	I'
エ	2	305455	211642	J
オ	2	305455	211642	J'

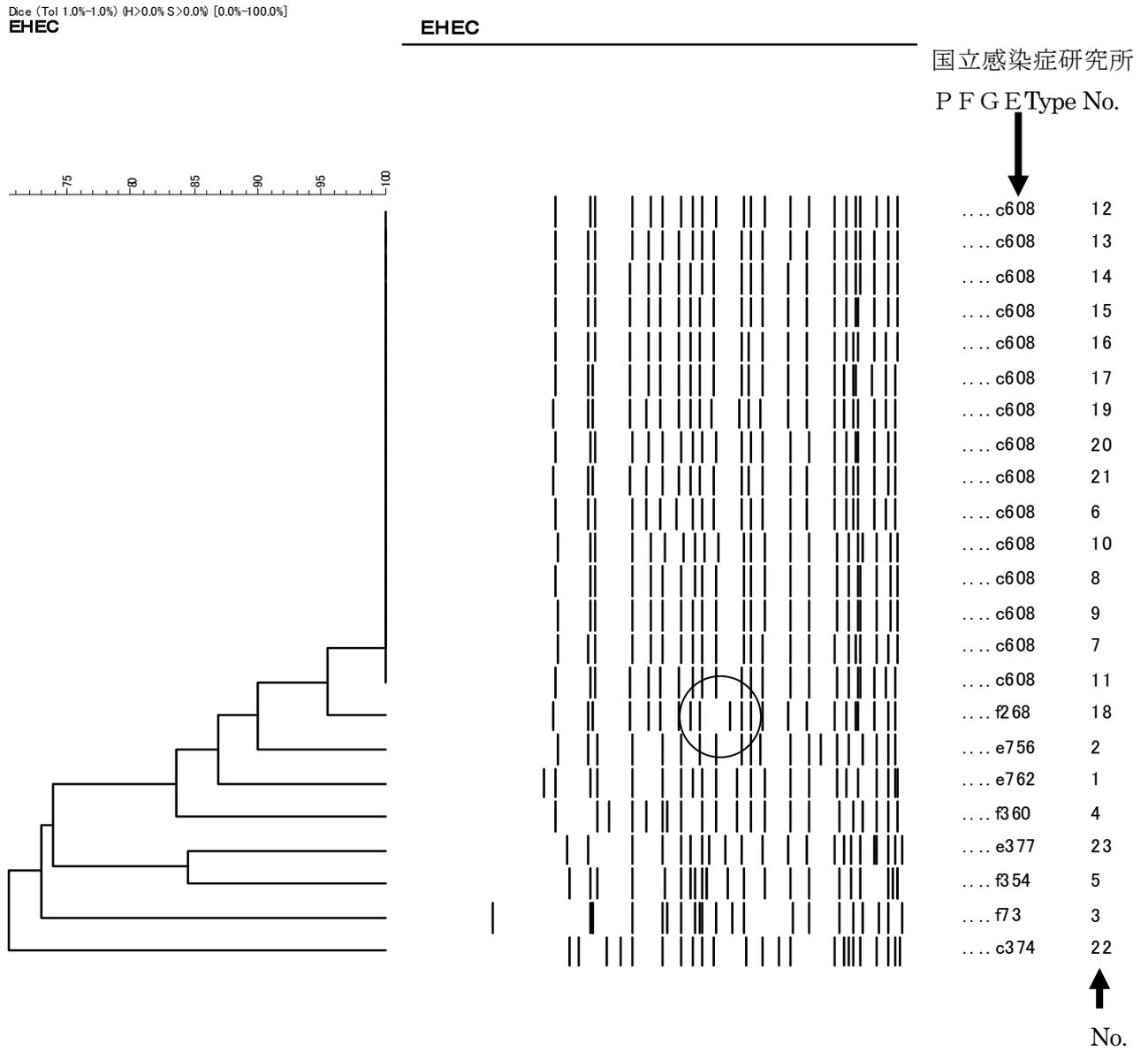


図1 PFGE法 デンドログラム (供試菌株 23 株)

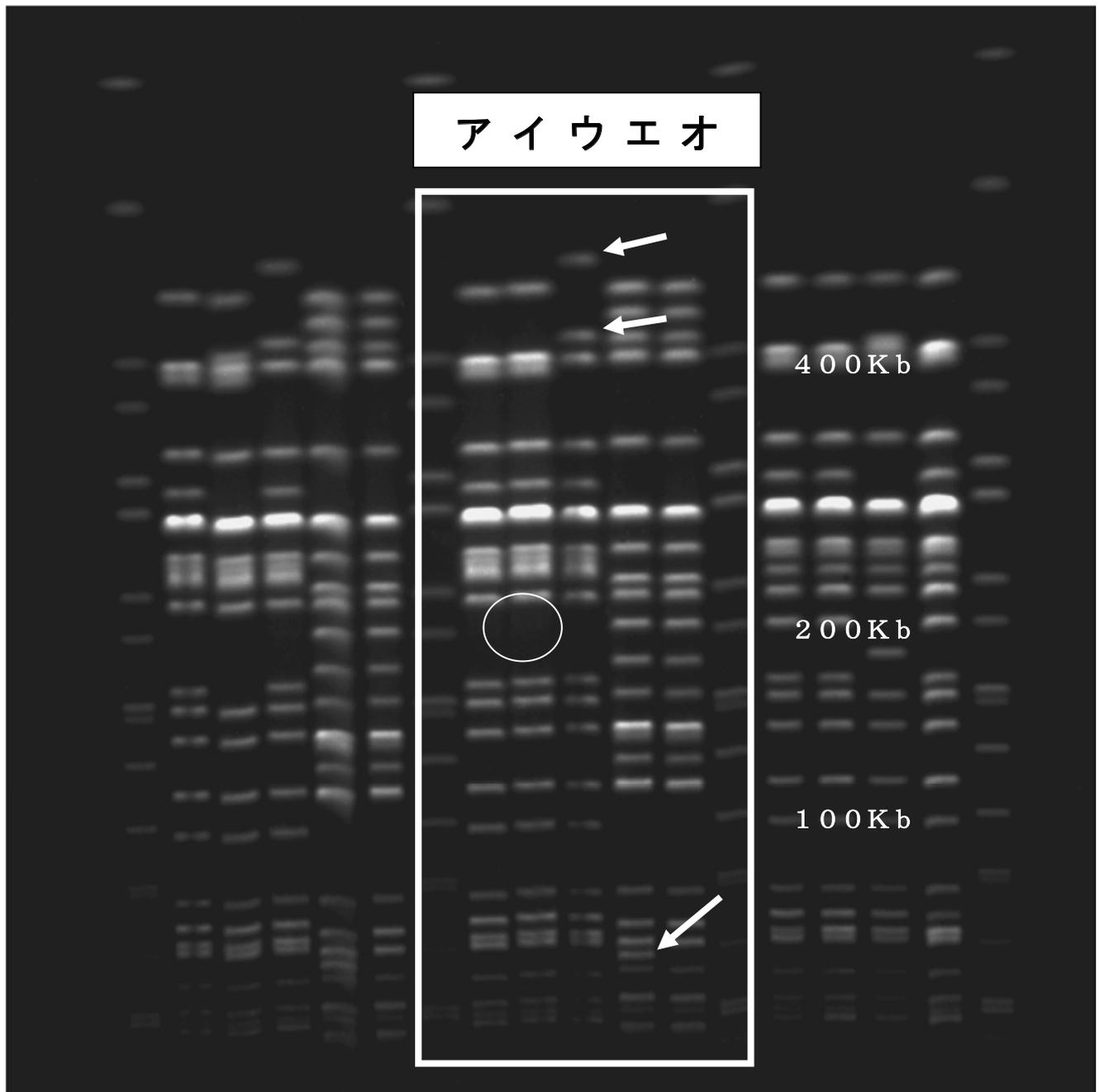


図2 PFGE法 (精度管理菌株 ア~オ)

値を加算し、1st, 2ndの順に並べて12桁にコード化した。

## II 結果

供試菌株の分離株の結果を表1に、PFGE法のデンδροグラム(樹形図)を図1に、精度管理の結果を表2に、泳動像を図2に示した。表1左から、菌株番号、ベロ毒素型(VT), ISコード, PFGE法の当センターのタイプ(香川県 Type)・国立感染症研究所でのタイプ(感染研 Type), 菌を分離した日, 患者年齢, 関連事項を表している。

集団I (No. 6~10)は、昨年8月に発生した保育所①での事例である。園児2名(No. 6, 7)からO157の感染が確認されたため、全園児と職員、感染者の家族を対象として検便を実施した。その結果、3名からO157が検出された(No. 8~10)。集団Iの分子疫学解析の結果はPFGE法, IS法とも全株で一致した。

集団II (No. 11~13)は、家族内感染事例である。PFGE法, IS法ともに同一パターンとなり、また集団Iのパターンとも一致した。そのうち、園児2名(No. 11, 12)が保育所②に通っていたが、この時点では他の園児の検便は行わなかった。

集団III (No. 14~21)は、集団IIの約1ヵ月後に保育所②の園児2名(No. 14, 15)が感染した事例である。接触者を対象に検査を行った結果、両患児の家族計6名(No. 16~21)の感染が確認された。この中には保育所②以外の園児(No. 21)からも確認されたが、検査の結果、その園児からの感染の拡大はなかった。この集団IIIにおいては、IS法はすべての株で集団I, 集団IIと一致したが、PFGE法は図1に示した丸く囲んだNo. 18のみ、バンド2本の相違を示した。

散発事例のNo. 1~5, 22, 23はIS法, PFGE法ともにそれぞれ異なるパターンを示し、集団IからIIIとの関連性はなかった。

精度管理菌株について、表2に示した。IS法では2種類のISコードに分類された。PFGE法では、図2のNo. ア~ウとNo. エ, オの2パターンに分類され、バンドの相違から、4種類に識別された。(矢印に示す。)この結果を中国・四国ブロックの各県(以下、各県)と比較したところ、PFGE法は、本県を含めた4県で精度管理菌株No. イの220Kb付近でバンドが検出されなかった。IS法では各県と同じISコードになった。<sup>1)</sup>

## IV 考察

散発事例7株と集団発生3事例16株の分離株23株について検討した結果、散発事例は、PFGE法, IS法ともにパターンが明確に異なり、関連性は無いものと考えられた。

集団IIIのPFGE法は、No. 18のみバンド2本の相違を示したが、3バンドの差までは、極めて関連ありと解釈される<sup>2)</sup>ため、この株も同一起源であると判断した。

3事例の集団発生16株は、すべてISコードが一致し、かつPFGEパターンからも関連性があったことから、同一起源であることが示唆された。保育所①と保育所②は離れており、接触があった可能性が低いことから、関連性は不明である。

国立感染症研究所の報告では、今回の集団発生株のPFGEパターン(感染研 Type. c608)は、2009年, 2010年に全国各地で散発事例として報告されている。

さらに、集団IIと約1ヵ月後に発生した集団IIIは、保育所②の園児を含む発生であり、IS法はすべての株で一致し、PFGE法では、No. 18以外で同一パターンとなり、感染経路の判明が期待される事例であったが、疫学調査では原因の特定には至らなかった。

精度管理菌株ではPFGE法で僅かな遺伝子パターンの差異を検出できなかった。これは、菌株間の疫学的関連性を否定する程の違いではないが、菌の濃度調整や酵素処理、泳動などの検査時の技術的な差や、泳動像から得られた遺伝子パターンのバンド認識の違いなどが考えられる。

IS法は、1つの県を除き、全て同じ結果を示し、安定した結果が得られる分子疫学解析手法として有用性が再確認できた。異なる結果が出た原因として、コンタミネーションによる遺伝子増幅や高濃度のテンプレートDNAを用いたことによる非特異バンドの増幅が考えられ、当センターにおいても注意が必要である。

IS法は、バンドの有無や位置を取り違えた場合などに、別コードとなることから、各県と比較する場合は精度管理が重要である。しかし、遺伝子パターンをISコードで表記できるため、PFGE法に比べ、施設間での比較が容易である。また、集団発生やdiffuse outbreakなど早期に行政対応が求められる場合に、スクリーニング的に使用することで、迅速性、簡便性の点から効果的であると思われる。

PFGE法は、泳動に特殊な装置が必要であり、操作

が煩雑で解析に日数を要するが、IS法は操作が簡便で迅速に結果が得られデータをコード化できるので、今後はPFGE法に加え、IS法も並行して行い、分子疫学解析を進めていきたい。

## V まとめ

- 1 香川県で分離された腸管出血性大腸菌O157 23株と精度管理菌株5株について、PFGE法とIS法で解析を行った。
- 2 IS法はPFGE法に比べ、識別能は同等あるいは若干劣っているが、簡便性、迅速性に優れているので感染事例初期に行政対応が求められる場合に効果的であると思われる。
- 3 今後も「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（厚生労働科学研究）」を継続し、新たな疫学解析手段としてIS法の疫学解析実績を蓄積していきたい。

## 文献

- 1) 中嶋 洋ほか：食品由来感染症における分子疫学手法に関する研究 平成21年度総括・研究分担報告書（厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業），116-179，（2011）
- 2) 満田 年宏：感染対策のための分子疫学入門，86-98，メディカ出版，（大阪府）（2002）

## Abstract

Using both the Pulsed Field Gel Electrophoresis Method and the IS-Printing System Method, we analyzed 23 samples of enterohemorrhagic *E.coli* O157 (including 3 mass outbreak strands) that were isolated in Kagawa Prefecture, as well as 5 control samples, and we then compared the results of the two methods. In the results of our comparison all three mass outbreak strands had the same IS code, but the PFGE Method showed that the sample patterns varied slightly.

In comparison, we found the IS Method's information distinguishing functions to be equal to or slightly inferior to the PFGE Method, but its ease of use and speed were much better. The IS Method gave us useful results for this current test of mass outbreak strands of *E. coli* O157. From here on out, we expect that it can be used effectively for screening purposes if a national database can be established.