資　料

腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE および IS-printing System による分子疫学的解析

金子紀子，大谷勝実，青木敏也 [1)]

Examination of the Epidemiologic Molecular Subtypings of *Escherichia coli* O157 using Pulsed-field Gel Electrophoresis and IS-printing System.

by Akiko KANEKO, Katsumi OOTANI and Toshiya AOKI

平成 19 年 4 月から 11 月までに山形県内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌 O157 17 事例 26 株を対象に，従来から分子疫学的手法に用いられているパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)と IS-printing System の 2 つのサブタイピング法を用いて解析を行い，比較検討した．

その結果，PFGE と IS-printing System の解析は，おおむね一致していた．IS-printing System は迅速・簡便性に優れており，リアルタイムで結果を提供することが可能であり，疫学調査等において有力な手段となることが期待される．

Key Words　腸管出血性大腸菌 O157, IS-printing System, サブタイピング

Ⅰ　はじめに

腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 の分子疫学的解析手法として広く行われている PFGE は解析能や再現性も高く，またデータの蓄積もあり信頼性のある手法である．しかし，特殊な機器を必要とすること，解析に時間がかかることなど問題点もある．IS-printing System(東洋紡績㈱)は，Insertion Sequense(IS)構造多形性を示すゲノム領域を標的とし，Multiplex PCR を基本とした EHEC O157 のサブタイピング法で，新しく開発された手法である．平成 19 年 4 月から 11 月までに山形県内で分離された 26 株の EHEC O157 について PFGE と IS-printing System によるサブタイピングを用いて解析し，比較検討した．

Ⅱ　材料および方法

供試菌株は，平成 19 年 4 月から 11 月までに山形県内で，17 事例から分離された EHEC O157:H7, O157:H- 26 株(ヒト由来株，無症状保菌者を含む)を用いた(表 1)．菌株の由来は，集団感染 1 事例，3 株，家族内感染 4 事例，10 株，散発 12 事例，13 株である．PFGE は，食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究報告書 [1)] に準拠して行った．プレートに一晩培養したコロニーをかきとり，100 μℓの滅菌蒸留水に懸濁した(OD_{610nm}=0.5-0.6)．100 μℓの 1%Seakem Gold agarose を混ぜ合わせサンプルキャスターに流し込み固化させた．固化したプラグを 1ml の Proteinase K 溶液(1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine, 0.5 EDTA pH8.0)に入れ，50℃で 2 時間消化した．プラグを泳動時の大きさに切り，500 μℓの TE buffer で調整した 1mM Phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF)に入れ，50℃で 30 分 2 回洗浄した．その後 TE

1) 山形県村山保健所検査課

表1 供試菌株

事例No.	菌株No.	分離月日	保健所名	性別	年齢	血清型	VT型	備考
1	1-1	H19.5.7	置賜保健所	女	79	O157:H7	VT1	同一人
	1-2	H19.5.7	置賜保健所	女	79	O157:H7	VT1,2	
2	2-1	H19.5.22	置賜保健所	男	79	O157:H7	VT1,2	散発
3	2-2	H19.6.23	村山保健所	女	25	O157:H-	VT1,2	散発
4	2-3	H19.7.20	村山保健所	女	72	O157:H7	VT1,2	散発
5	5-1	H19.7.13	置賜保健所	女	81	O157:H7	VT1,2	集団
	5-2	H19.7.22	置賜保健所	女	75	O157:H7	VT1,2	
	5-3	H19.7.23	置賜保健所	女	68	O157:H7	VT1,2	
6	6-1	H19.7.12	置賜保健所	女	63	O157:H-	VT1,2	散発
7	7-1	H19.8.2	村山保健所	男	59	O157:H7	VT1,2	散発
8	8-1	H19.7.12	村山保健所	男	65	O157:H7	VT1,2	散発
9	9-1	H19.8.17	置賜保健所	女	92	O157:H7	VT2	散発
10	10-1	H19.8.20	置賜保健所	女	16	O157:H7	VT1,2	散発
11	11-1	H19.9.7	置賜保健所	男	9	O157:H7	VT2	散発
12	12-1	H19.10.1	置賜保健所	女	2	O157:H7	VT1,2	家族内
	12-2	H19.10.5	置賜保健所	男	28	O157:H7	VT1,2	
	12-3	H19.10.5	置賜保健所	女	31	O157:H7	VT1,2	
13	13-1	H19.10.9	置賜保健所	女	80	O157:H7	VT2	家族内
	13-2	H19.10.13	置賜保健所	男	81	O157:H7	VT2	
14	14-1	H19.10.10	庄内保健所	女	36	O157:H7	VT2	家族内
	14-2	H19.10.11	庄内保健所	男	4M	O157:H7	VT2	
	14-3	H19.10.4	庄内保健所	女	59	O157:H7	VT2	
15	15-1	H19.10.23	最上保健所	女	10	O157:H7	VT1,2	散発
16	16-1	H19.10.29	置賜保健所	女	20	O157:H-	VT1,2	散発
17	17-1	H19.11.6	最上保健所	男	79	O157:H7	VT1,2	家族内
	17-2	H19.11.9	最上保健所	女	46	O157:H7	VT1,2	

bufferに換えて氷上で30分間洗浄した.XbaⅠを10U含むbufferに換え37℃4時間程度振盪しながら消化した．消化したプラグは0.5×TBEに入れ,泳動まで,4℃で保存した．プラグをコームに貼り付け，0.5×TBE で作成した1% Seakem Gold agaroseに包埋した．泳動は，GENE Path System(BIO-RAD社)を用い，6.0V/cm，パルスタイム2.2-54.2秒，泳動時間21時間の条件で行った．解析には，FingerprintingⅡ(BIO-RAD 社)を使用し，Dice,Tolerance 1.0%により系統樹解析を実施し，クラスター分類を行った．

IS-printing System は，推奨法に従い，大きさ 1mm 程度のコロニーを 50 μℓの 25mM NaOH水溶液に懸濁して95℃5分間加熱,4μℓの 1M Tris-HCl(pH7.0)を加えて中和し，12,000rpmで5分間遠心後，上清1μℓをPCRの Template とした．PCR 条件(BIO RAD My Cycler)は，96℃2分後，96℃20秒→64℃30秒→68℃90秒の20サイクルで行った．電気泳動(ADVANCE Mupid)は，3%アガロースゲル(NuSive GTG：SeaKem GTG=2:1)を用いて，0.5×TBEで付属のLoading Dyeに含まれる青色の色素がアガロースから抜ける程度まで泳動を行った．

Ⅲ　結果

PFGE の解析結果，集団感染事例由来株，家族内感染事例由来株はそれぞれ同一クラスターを形成し，散発事例も含めA～Kの11クラスターに分類された(図1)．

PFGE で分類されたクラスターごとにIS-printing System の結果(増幅ﾊﾞﾝﾄﾞの有無)を表2に示した．PFGEによりクラスター分類された株をIS-printing Systemでみてみると，クラスターAに分類された4株は，1株(散発)を除き3株(散発1株，家族内2株)は同一であった．クラスターD に分類された8株はIS-printing Systemで5株(集団3株，散発2株)，2株(家族内)，1株(散発)の3つのパターンに細分類された.クラスターJの2株は *stx* の違いで2つに細分類された．クラスターKの1株はクラスターDの集団を含む5株と同一のパターンであった.この例を除き，IS-printing System による分類が PFGE によるクラスター分類と重複するものは見られなかった．

PFGE，IS-printing System の組み合わせで同一のパターンを示した事例間において，保健所の疫学調査から関連性を認めるものは無かった．

Ⅳ　考察

PFGEでクラスターA，D，Jに分類された株は，IS-printing Systemでそれぞれ2つ，3つ及び2つのパターンに細分類され,識別能がPFGEより高いことが窺われた.逆に,PFGEでクラスターD，K に分類されたものがIS-printing System では分類することができなかった.どちらのサブタイピング法が識別能が高いかは今回の検討では言及できない．しかし，サブタイピングには両者を組み

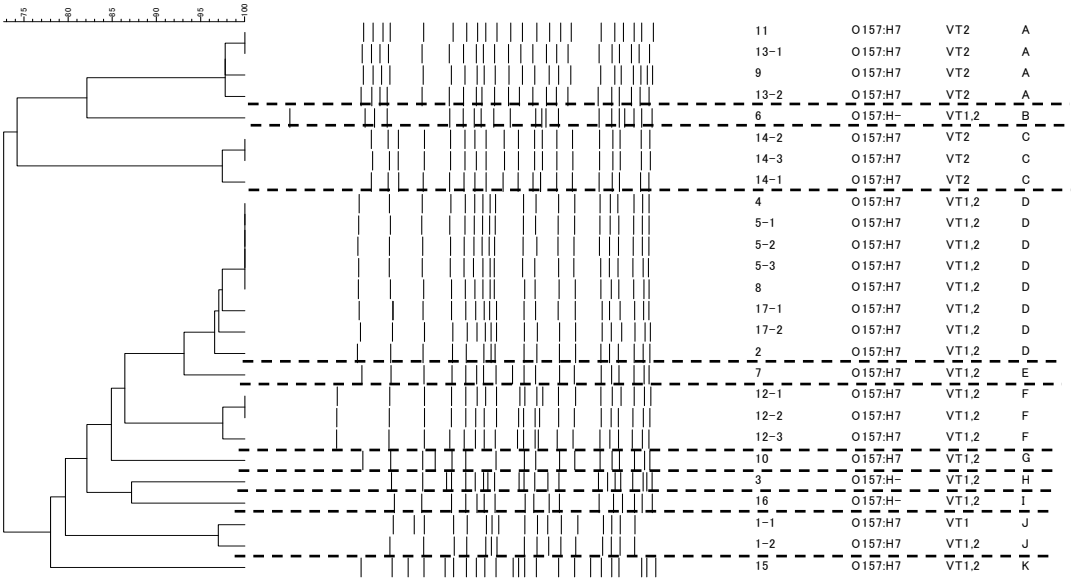

図1　系統樹解析結果

表2 IS-printing System結果

PFGEクラスター分類		A	A	A	A	B	C	C	C	D	D	D	D	D	D	D	D	E	F	F	F	G	H	I	J	J	K
菌株No.		9	11	13-1	13-2	6	14-1	14-2	14-3	2	4	5-1	5-2	5-3	8	17-1	17-2	7	12-1	12-2	12-3	10	3	16	1-1	1-2	15
				(家族内)			(家族内)					(集団)				(家族内)			(家族内)						(同一人)		
Primer No.	Size (bp)																										
1-01	974	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1-02	839	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1-03	742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1-04	645	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1-05	595	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-06	561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-07	495	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-08	442	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
1-09	405	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1-10	353	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
1-11	325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-12	300	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-13	269	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-14	241	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
1-15	211	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
eae	185	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-16	171	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
hlyA	137	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Primer No.	Size (bp)																										
2-01	987	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2-02	861	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-03	801	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2-04	710	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-05	642	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-06	599	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-07	555	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2-08	499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-09	449	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-10	394	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2-11	358	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-12	331	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-13	301	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2-14	278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-15	240	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-16	211	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
stx2	181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
stx1	151	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

合わせることにより，より識別能が高まると推察された．

家族内感染事例及び集団感染事例は，同一菌の感染によるものと考えるのが一般的である．今回供試した家族内4事例由来株及び集団感染事例株は，PFGE及びIS-printing Systemによる解析でそれぞれの事例で同一パターンに分類された．このことは，PFGE及びIS-printing Systemによる解析で同一と分類された株の事例は，同一菌の感染によることを示唆するものと考えられた．

一方，PFGE及びIS-printing Systemによる解析で，複数の事例由来株が同一となった例，すなわちクラスターAのNo.9，No.13-1，No.13-2及びクラスターDのNo.4，No.5-1，No.5-2，No.5-3，No.8はそれぞれ同一菌の感染症事例由来株であった可能性が考えられた．しかし，保健所の疫学調査で事例間に関連性を見出すことはできなかった．EHEC感染症におけるDiffuse out-breakを見出す疫学調査の困難さがあるが，今後もこのような菌学的事実を携えて地道な調査が必要と思われる．

IS-printing SystemはPCRを基本とした手法で，迅速，簡便性に優れており，よりリアルタイムで結果を行政部門に提供することが可能であり，疫学調査等において有力な手段となることが期待される．

この研究は，平成19年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」の協力研究で行った．

文献

1)寺嶋淳：広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究，平成18年度　総括・分担研究報告書