

1. 北海道における細菌性食中毒原因究明調査の迅速化に関する研究

○山口敬治（北海道立衛生研究所微生物部）

駒込理佳（北海道立衛生研究所微生物部食品微生物科）

池田徹也（北海道立衛生研究所微生物部細菌科）

1 目的

食品由来感染症をはじめとする細菌感染症制御対策として、原因菌の動態を解明しその由来を特定するために、現在は主に遺伝子型の検討、特にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法が事実上の標準法になっている¹⁾。しかし、この方法は結果を得るまでに長い時間を要し、迅速な対応が求められる食中毒事例等では行政判断を下すまでの時間的隘路となっている。

遺伝子型を比較する他の試験法として、近年、細菌DNA構成塩基中の繰り返し配列の多様性に注目した様々な方法が試みられている²⁾。すなわち、Repetitive Extragenic Palindromic sequence-PCR (REP-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR(ERIC-PCR), BOX element-PCR (BOX-PCR), Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis (MLVA)など(以下、「繰り返し配列PCR法」)である。

現在、北海道では細菌性食中毒発生時、保健所で分離した菌株を衛生研究所において分子疫学を含む疫学的検討を実施している。そこで、近年開発された繰り返し配列 PCR 法と PFGE 法を菌種ごとに比較し、分別能の高い方法を確認し、より迅速かつ正確に検査を行うことを目的として本研究を実施した。

2 材料および方法

【菌株】 細菌の種類は、腸管出血性大腸菌 O157(以下、O157)、腸炎ビブリオ(以下、ビブリオ)、セレウス菌(以下、セレウス)とした。O157の菌株は、2008年に北海道内で分離された30株を用いた。ビブリオの菌株は、1999年から2006年にかけて北海道内で分離された33株を使用した。セレウスの菌株は、2001年から2006年に北海道内で分離された10株を使用した。

【DNAの抽出】 DNeasy blood & tissue kit (QIAGEN)を用い、使用説明書に従いDNAの抽出を行った。

【PFGE】 PFGEに用いるプラグはLiu *et al*³⁾に従い作成した。制限酵素はそれぞれ適切なものを用いた。すなわち、O157には *Xba*I を、ビブリオには *Not*I を、セレウスには *Not*I および *Sma*I を用いた。泳動は1%PFCアガロースゲルを担体とし、0.5×TBE(Tris-Borate-EDTA)緩衝液下にて、電圧6V/cm、液温14°Cで行った。O157はスイッチタイム2.2~54.2秒20時間で、ビブリオはスイッチタイム5.0~50.0秒20時間で、セレウスではスイッチタイムは *Not*I で1.0~50.0秒、*Sma*I で1.0~35.0秒18時間とした。泳動後、ゲルを臭化エチジウム(1μg/mL)で染色した。UV照射下で泳動像をPHOTODYNEにてTIFFファイル化し、次いでBioNumerics ver. 3.0を用いてDice法により解析した。なお、クラスター分析には、Tolerance 1.5%の条件でUnweighted Pair Group Method with arithmetic Average法を用いた。

【RAPD-PCR】 RAPD-PCRには、牧野⁴⁾によるAP40, AP41, AP42, AP43, AP45, AP47の6種類のプライマーを用いた。PCRの反応条件は、94°Cで5分、36°Cで5分、72°Cで5分のサイクルを4回行い、その後94°Cで1分、36°Cで1分、72°Cで2分のサイクルを30回行い、最後に72°Cで10分の反応とした。2%GTGアガロースゲルを泳動用担体とし、1×TAE緩衝液下で100V、90分泳動した。泳動後、ゲルを臭化エチジウム(1μg/mL)で染色した。泳動像は、UV照射下でPHOTODYNEを用いてTIFFファイル化し保存した。

【Rep-PCR等】

(1) 腸管出血性大腸菌 O157

IS1203 の PCR のプライマーは Suzuki の報告⁵⁾の配列を使用した。PCR は、終濃度 1 μ M のプライマー、4 μ l の KAPA2G Fast 用 buffer A と 0.5U の KAPA2G Fast DNA polymerase (KAPA biosystems)を含む反応液中にそれぞれの精製 DNA を加えて 20 μ l とし、GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems Japan)を用いて増幅を行った。PCR の反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 5 分間変性後に、90 $^{\circ}$ C で 30 秒間、52 $^{\circ}$ C で 1 分間、70 $^{\circ}$ C で 3 分間のサイクルを 30 回行い、最後に 70 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させて増幅を終了した。反応液を 1%のアガロースゲル中で Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer で 100V、45 分間電気泳動し、Ethidium Bromide で染色後、ゲル撮影装置で画像を取り込んで解析を行った。PFGE は感染症研究所の方法に従って行い、近似度80%以内のものを1つのグループに分類し(アルファベット順に命名)、さらに90%以内の近似度を持つものをサブグループに分類して数字による枝番号をつけた。

(2) 腸炎ビブリオ

Rep-PCR のプライマーは Versalovic⁶⁾の配列を使用した。PCR は、終濃度 1 μ M のプライマー、2 μ l の Ex Taq 用 buffer と 0.5U の Ex Taq (Takara)を含む反応液中にそれぞれの精製 DNA を加えて 20 μ l とし、GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystems Japan)を用いて増幅を行った。PCR の反応条件は、94 $^{\circ}$ C 5分間変性後に、90 $^{\circ}$ C で 30 秒間、52 $^{\circ}$ C で 1 分間、70 $^{\circ}$ C で 5 分間のサイクルを 30 回行い、最後に 70 $^{\circ}$ C で 7 分間反応させて増幅を終了した。反応液を 1%のアガロースゲル中で TAE buffer で 100V、45 分間電気泳動し、Ethidium Bromide で染色後、ゲル撮影装置で画像を取り込んで解析を行った。PFGE による解析は近似度80%以内のものを1つのグループに分類し、アルファベット順に命名した。

(3) セレウス菌

REP-PCR 法⁷⁾、BOX-PCR 法⁸⁾、(GTG)₅-PCR 法⁹⁾は、それぞれの PCR mixture に DNA 鋳型を添加し、次の PCR 増幅条件で行った⁷⁾。まず 95 $^{\circ}$ C で 7 分反応させ、その後 90 $^{\circ}$ C で 0.5 分、45 $^{\circ}$ C で 1 分、65 $^{\circ}$ C で 5 分のサイクルを 30 回行い、最後に 70 $^{\circ}$ C で 10 分の反応とした。1% PFC アガロースゲルを泳動用担体とし、1 \times TBE 緩衝液下で Subcell 192 システム (BioRad, USA)を用いて、100V で 90 分間泳動した。泳動後、ゲルを臭化エチジウム(1 μ g/mL)で染色した。泳動像は、UV 照射下で PHOTODYNE により TIFF ファイル化し保存した。PFGE による解析は近似度 90%以内のものを1つのグループに分類し、アルファベット順に命名した。

3 結果及び考察

(1) 腸管出血性大腸菌 O157

O157 の菌株から抽出した DNA を用いて IS1203-PCR を行ったところ、10 本前後のバンドが 0.7kbp から 5kbp にかけて観察され、パターンの違いにより、8グループに分類された。これらを PFGE による分類と比較すると、表1のように、No.08419, No.08508, No.08464 の 3 株が、PCR でも PFGE と同様に他の株と違うグループに分類された。PFGE 型で B1の 1 グループに分類されている群が、PCR 型では I から III の 3 つのグループに更に細分化されていた。その逆に、PCR 型でグループ V の 1 グループに分類される群が PFGE 型では C1 から C3 の 3 つのグループに、PCR 型でグループ I に分類されている群が PFGE 型では A と B1 の 2 つのグループに細分化されていることから、PFGE の方が詳細に分類できる群も存在していた。なお、同一事例の菌株は、どちらによる分類でも同じグループ内に分類された。

(2) 腸炎ビブリオ

ビブリオの菌株から抽出した DNA を用いて Rep-PCR を行ったところ、10本前後のバンドが 0.5kbp から 7kbp にかけて観察され、パターンの違いにより、7グループに分類された。表2に示すように、O3:K6 株は I と II の 2 グループに分類され、O4:K8 株も IV と V の 2 グループに分類されたので、同一血清型においても

PCR 型で更に遺伝子型を分離することが可能であった。しかし、PFGE による分類では、O3:K6 株は4グループに、O4:K8 株は3グループに分類されたので、これらの血清型では PFGE の方が識別能に優れていた。O3:KUT 株が O3:K6 株と同一のグループ II に分類され、O4:K10 株が O4:K68 株と同一のグループ III に分類されたが、PFGE でもグループ B がこれらの血清型を含む一つのグループを形成していたことから、これらは血清型が異なるが遺伝子型が類似した菌株と考えられる。

(3) セレウス菌

セレウスの菌株から抽出した DNA を用いて Rep-PCR を行ったところ、嘔吐毒産生株が原因であった H18-25 事例では 1 株を除いて PFGE と結果が一致し、嘔吐毒産生株ならびに下痢毒産生株の複数の種類が混在した H13-9 事例では分離された 4 株について PFGE の結果と完全に一致した。また、H15-2 事例ならびに RS/05 株も Rep-PCR の結果と PFGE の結果とは一致した。RAPD-PCR の結果はどのプライマーを用いても、PFGE と同じ結果を示し、3 種の方法を用いた結果はおおむね同様の分離能があるものと考えられた。

その他、*Salmonella* Enteritidis ならびに *Salmonella* Infantis について rep-PCR 導入を検討したが、サルモネラについては rep-PCR を用いた遺伝子型の分別能は PFGE にはるかに及ばなかった(データは示さない)。

以上の結果より、PCR 型による分類は、菌株によって PFGE よりも識別能が劣る場合も優れる場合もあるが、菌株間の遺伝子型が同一かどうかを推定する分子疫学マーカーの一つとして利用できると思われる。PFGE は分子疫学に広く用いられている手法であるが、最短でも2日間を要し、高価な機器を必要とする。それに対して、今回検討した PCR を利用した方法は特殊な機器を必要とせず、菌株から DNA 抽出を行い、PCR から泳動まで1日以内に終了する、迅速かつ簡便なものである。PCR システムを保有する保健所において、この方法を導入することにより疫学解析の迅速化が可能となり、素早い行政対応に寄与すると思われる。

今回の研究では、菌種・血清型等により最適な方法が異なった。PFGE においても菌種・血清型により制限酵素の選択が必要であり、今回の方法でも最適なプライマーの選択が求められるものと考えられる。今後さらに菌の種類と例数を増やして検討し、感染症や食中毒の感染源調査における有用性を検証していくことが重要であると思われる。

4 文献

- 1 満田年宏:感染症対策のための分子疫学入門, 248pp, メディカ出版, 大阪 (2002)
- 2 Gevers D, Huys G, Swings J: FEMS Microbiol., Lett., **205**, 31-36 (2001)
- 3 Liu PY-F, Ke S-C, and Chen S-L: J. Clinical Microbiol., **35**(6), 1533-1535 (1997)
- 4 牧野壮一:モダンメディア別冊, 41(5), 1533-1535 (1995)
- 5 Suzuki M, Matsumoto M, Hata M, Takahashi M, Sakae K: J. Clin. Microbiol., **42**(12), 5462-5466 (2004)
- 6 Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR: Nucleic Acids Res., **19**(24), 6823-6831 (1991)
- 7 Wong H-C and Lin C-H: J. Clinical Microbiol., **39**, 4233-4340 (2001)
- 8 Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, and Daffonchio D: J. Applied Microbiol., **94**, 1108-1119 (2003)
- 9 Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, and Mahillon J: J. Clinical Microbiol., **43**(8), 4277-4279 (2005)

表1 腸管出血性大腸菌 O157 の IS1203-PCR および PFGE によるタイピング

株	事例番号	H型	毒素	PCR型	PFGE型	株	事例番号	O型	K型	PCR型	PFGE型	
08217	8-3	H7	1&2c	I	A	08467	8-9	H7	1&2	(V)	(C1)	
08351	8-4	H7	1&2c			08468	8-10	H7	1&2			
08515	8-22	H7	1&2			08469	8-10	H7	1&2			
08420	96aug3	H7	1&2		B1	08470	8-10	H7	1&2			
08421	96nov1	H7	1&2			08473	8-13	H7	1&2			
08418	96aug1	H7	1&2			08509	8-20	H7	1&2			
08427	96/001-43	H7	1&2			08477	8-17	H7	1&2			C2
08423	97aug1	H7	1&2			08479	8-17	H7	1&2			
08424	97aug2	H7	1&2			08514	8-21	H7	1&2			
08425	97aug2	H7	1&2			08474	8-14	HNM	1&2			C3
08426	97oct1	H7	1&2	08508		8-19	HUT	1&2	VI	F		
08428	97/001-44	H7	1&2	VII		08471	8-11	HNM	1	D		
08422	97/JUL1	H7	1&2			08506	8-11	HNM	1			
08419	96/aug2	H7	1&2	IV	B2	08507	8-11	HNM	1			
08466	8-8	H7	1&2	V	C1	08464	8-7	H7	2	VIII	E	

表2 腸炎ビブリオの Rep-PCR および PFGE によるタイピング

株	事例番号	O型	K型	PCR型	PFGE型	株	事例番号	O型	K型	PCR型	PFGE型
99241	H11-36	3	6	I	A	04306	H16-19	(3)	(6)	(II)	C
99028	H11-54		UT	II	B	06159	H18-27	4	68		III
99018	H11-14		6			06160	H18-27				
99020	H11-14		04278			H16-26					
99021	H11-14		99034			H11-25	B				
99078	H11-25		99036			H11-25					
99099	H11-25		99064			H11-25					
99169	H11-25		99067			H11-25					
01161	01-30		99070			H11-25					
01160	H13-26		99027			H11-25	10				
01163	bact		01213b			H13-42	8			IV	
03261	H15-28		02148	H14-42	V	F					
03018	02-nov5		04277	04-26		G					
03239	02-aug4		04279	04-26							
03261	03-28		06225	H18-38	9	VI	H				
05334			99014	H11-13	5	UT	VII	I			
04304	H16-19										

表3 セレウス菌の RAPD, Rep-PCR および PFGE によるタイピング

株	事例番号	RAPD 型	PCR 型	PFGE 型	株	事例番号	RAPD 型	PCR 型	PFGE 型
06220	H18-25	a	I	A	03071	H15-2	c	III	C
06221	H18-25		VII		05012	RS/05	d	IV	D
06222	H18-25		I		01045	H13-9	e	V	E
06223	H18-25				01048	H13-9	f	VI	F
01053	H13-9	b	II	B	01052	H13-9			

経費使途明細

No.	品 名	税込み金額
1	制限酵素およびbuffer	38,700
2	泳動用分子マーカー	21,500
3	DNA 抽出キット	84,000
4	菌型別血清	50,200
5	菌同定キット	75,000
6	PCR 用タックポリメラーゼ	68,300
7	DNA 合成用塩基	95,000
8	培地および試薬	33,600
9	マイクロチューブ	4,200
10	標準菌株 (定量用)	29,500
	合計	500,000