

広島市で分離した腸管出血性大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析とパルスネットシステムの活用

橋渡 佳子 河本 秀一 古田 喜美 佐々木敏之
山本美和子 毛利 好江 石村 勝之 萱島 隆之
平崎 和孝

はじめに

当所では、腸管出血性大腸菌感染症例において、分離菌株間の遺伝子型を比較する目的でパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による疫学解析を実施してきた。現在、全国レベルで系統樹等の作成による画像解析を通じて、各地で分離されている菌株間の遺伝学的関連性を明らかにすることを目標としたパルスネットシステムが試行中であり、当所でもそのための画像解析ソフトの実用性を検討している。今回、市内で分離した腸管出血性大腸菌0157および026について解析を行うとともに、パルスネット上で全国の分離株との遺伝子的な関連性の確認を行ったので報告する。

方 法

1 材料

平成14年に広島市で分離した腸管出血性大腸菌0157 5株、026 9株を供試した。

2 PFGE

菌液150μlの遠心沈渣をアガロースブロックに包埋し、キット(Bio Rad)を用いて溶菌、タン

パク分解などの処理を行った後、制限酵素Xba I (TaKaRa)により染色体DNAを切断した。電気泳動はGene Path(Bio Rad)を用い、1%アガロースゲルで行った。泳動は国立感染症研究所の条件に準じて、電圧6V/cm パルスタイム4~8秒 9時間、8~50秒、13時間を組み合わせ、バッファー温度は12°で行った。泳動後、エチジウムプロマイドでゲルを染色し、紫外線照射下で写真撮影を行った。

3 系統樹の作成

PFGEで得られた画像をもとに、解析ソフトFinger Printing II(Bio Rad)を用いて系統樹を作成した。

結 果

1 広島市の腸管出血性大腸菌感染症発生状況 (平成14年)

平成14年に広島市では腸管出血性大腸菌感染症は年間を通じ13事例が発生した。これを表1に示した。内訳は、家族内3事例、散発10事例で、集団事例はみられなかった。

表1 広島市で発生した腸管出血性大腸菌感染症(平成14年)

事例 No	区分	発症日	年齢	性別	血清型	毒素型	備考
1	散発	14.2.10	2	男	O157:H7	VT2	保育園児
2	散発	14.5.14	4	男	O26:H11	VT1	幼稚園児
3	散発	14.5.26	5	男	O111:H-	VT1,2	幼稚園児
4	家族 A	14.6.18	11	男	O111:H-	VT1,2	小学生
4	家族 A	無	65	男	O111:H-	VT1,2	(祖父)
5	散発	14.7.9	1	女	O26:HUT	VT1	
6	家族 B	14.7.13	1	男	O26:HUT	VT1	
6	家族 B	14.7.13	23	女	O26:HUT	VT1	(母)
7	散発	14.8.27	12	女	O157:H7	VT2	小学生
8	散発	14.9.5	1	女	O26:H11	VT1	
9	散発	14.9.10	55	女	O26:H11	VT1	病院勤務
10	散発	14.10.16	23	男	O157:H7	VT2	会社員
11	散発	14.10.12	15	女	O157:H7	VT2	中学生
12	家族 C	14.11.18	3	男	O26:H-	VT1	
12	家族 C	14.11.27	5	男	O26:H-	VT1	(兄)
12	家族 C	14.11.25	1	男	O26:H-	VT1	(弟)
13	散発	14.12.6	28	女	O157:H7	VT2	

0157 が 5 事例から 5 株 , 026 が 6 事例から 9 株 , 0111 が 2 事例から 3 株の計 17 株が分離された。全国の発生状況と同様に 026 事例の増加傾向がみられた。

2 広島市分離 0157 株の解析結果

5 事例から分離した 5 株は全て異なる泳動パターンを示し , 遺伝子的相同性は 83 ~ 90% であった。これを図 1 に示した。このことから , これらの事例は感染源が異なるものと考えられた。

3 広島市分離 026 株の解析結果

6 事例のうち 2 事例は家族への二次感染が疑われた(事例 6, 12)。家族間の分離株は , いずれも同じパターンで 100% の相同性を示し , 同一由来の株と考えられた。6 事例間では , いずれも異なる泳動パターンを示し , 相同性は 80 ~ 92% であった。これを図 2 に示した。以上の結果から , これらの事例は感染源が異なるものと考えられた。

4 パルスネットによる全国分離株と広島市分離株の比較

本市で分離した 0157 3 株および 026 6 株と , 全国分離株との比較をパルスネット上で行った結果 , 100% の相同性を示す株はみられなかった。しかし 0157 では関西圏で分離された株と 90% 程度 , また 026 では関西圏や岡山で分離された株と 85 ~ 90% , 広島県分離株と 90 ~ 98% の相同性を示す , 系統的に類似した株がみられた。

パルスネットシステムは , 異なる地域の分離株間の遺伝子的特徴の比較を可能とし , 分散型集団感染事例(diffuse outbreak)の発見に有用である¹⁾。さらに今後電送比較システムが確立されると , 迅速な疫学調査への利用が可能となり , 汚染源の早期究明に寄与するものと思われる。

文 献

- 1) 渡辺治雄 他 : 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制 ; パルスネットの構築 , 感染症学雑誌 , 76 , 842 ~ 848 (2002)

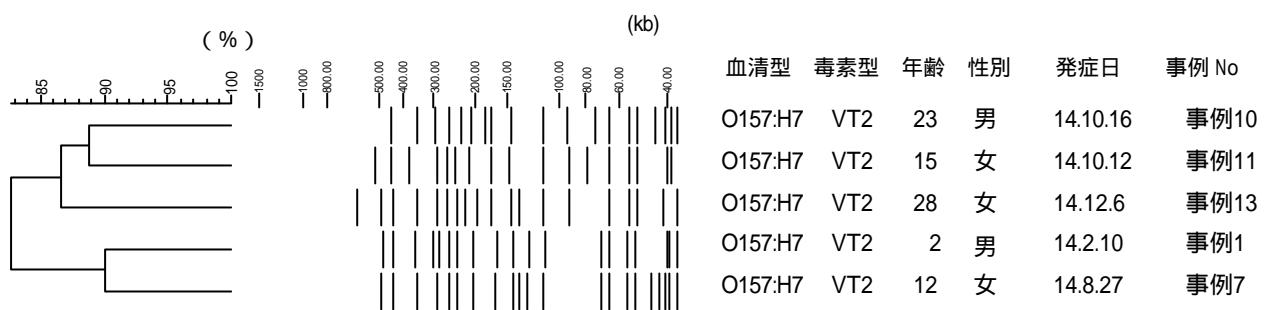


図1 広島市で分離された腸管出血性大腸菌0157の系統樹

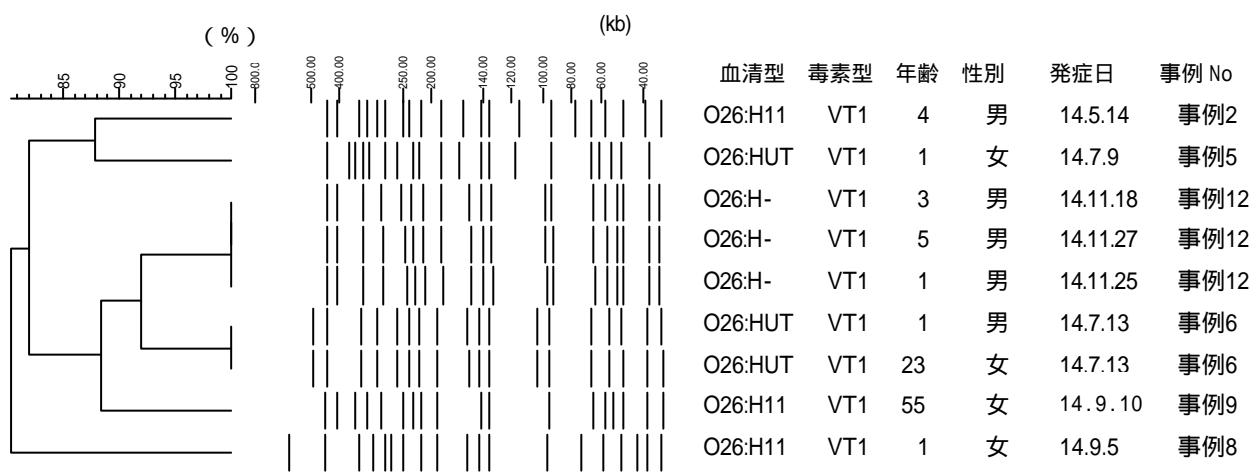


図2 広島市で分離された腸管出血性大腸菌026の系統樹