

〔資 料〕

新しい分子疫学的解析法である Random Amplified Polymorphic DNA 法 (RAPD 法) の有用性に関する検討

石川県保健環境センター健康・食品安全科学部 児玉 洋江・倉本 早苗
山田 恵子・戌亥 一朗
石川県石川中央保健福祉センター河北地域センター 芹川 俊彦

キーワード：RAPD 法，腸管出血性大腸菌 O157，*Salmonella* Enteritidis

1 はじめに

広域に流通する食品や食料が経口感染症に關与する病原体に汚染された場合，広範囲な地域において多数の感染者が出ることになる。このような状況においては感染症や食中毒の拡大を未然に防ぎ被害を最小限にとどめるため，感染源の迅速な把握および，それに対する適切な対策が求められる。そのためには原因となる病原体の検出・同定はもちろんのこと，各地で分離された病原体間の関連性等に関する科学的データを集約し，その結果に基づいて疫学的解析を行うことが必要不可欠である。

分子疫学的解析法の1つであるパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法¹⁾²⁾ は，菌株間の DNA 構成の差を検出するのに感度的にも，また再現性においても優れた方法である。しかし，その解析には数日間を要し迅速性に欠ける欠点がある。

近年，PCR 法を用いた新たな迅速分子疫学的解析法として Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法³⁾⁴⁾ が報告されている。そこで，我々はこの RAPD 法の有用性を検討するため，腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) および *Salmonella* Enteritidis (以下 S.E) の分離株について RAPD 法および PFGE 法により分子疫学的解析を実施し，比較検討を行った。

2 材料および方法

2・1 使用菌株

腸管出血性大腸菌 O157 については，2004年4月から8月にかけて石川県内で分離された30株 (集団発生例6事例由来22株および散发事例由来8株)，また S.E については，2000年8月から2005年10月にかけて県内で分離された30株 (集団発生例6事例由来21株および散发事例由来9株) を用いた。

2・2 方 法

(1) RAPD 法

RAPD 法については，再現性および識別能の低さが指摘されている⁵⁾。しかし，Pharmacia Biotech 社製の Ready to Go RAPD Analysis Kit は，2種類の耐熱性ポリメラーゼの組み合わせにより，細かい泳動パターンが再現性良く得られるよう改良されており，また RAPD 解析に必要な試薬がビーズの形状でチューブに入っており，使用が簡便であることから，本キットを使用した。

RAPD 解析用試薬添加のチューブに DNA 抽出液およびプライマーを加え，PCR (94°C, 1分，その後 95°C, 1分；36°C, 1分；72°C, 2分を45サイクル) を行い，その後2.5%アガロースにて電気泳動を行った。今回の検討では，O157については，RAPD プライマー

Examination of Random Amplified Polymorphic DNA Method as New Molecular Epidemiological Analyses. by KODAMA Hiroe, KURAMOTO Sanae, YAMADA Keiko, INUI Ichiro (Health and Food safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science) and SERIKAWA Toshihiko (Ishikawa Chuoh Health Welfare Center of Ishikawa Prefectural Government)

Key words : RAPD Method, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* serovar O157, *Salmonella* Enteritidis

表 1 O157集団発生例 6 事例由来22株
における RAPD 解析結果

菌株No.	事例No.	プライマー 3	プライマー 4	グループNo.
1	1	A	A	①
2		A	A	①
3		A	A	①
4		A	A	①
5		A	A	①
6	2	B	A	②
7		B	A	②
8		B	A	②
9	3	B	A	②
10		B	A	②
11		B	A	②
12		B	A	②
13	4	B	A	②
14		B	A	②
15		B	A	②
16		B	A	②
17		B	A	②
18	5	C	B	③
19		C	B	③
20		C	B	③
21	6	B	A	②
22		B	A	②

(以下プライマー) 3 および 4, S.E については
プライマー 5 および 6 の 2 種類を用いて PCR を
行い, その泳動パターンから DNA の相同性を判
定した。なお, 使用したプライマーは, 由来が異
なる O157 および S.E の各 2 株についてキット付
属の 6 種類のプライマーを用いて PCR を行い,
その中から最も泳動パターンに差異が認められた
2 種類を選択したものである。

(2) PFGE 法

O157 については, 国立感染症研究所が作成したプロ
トコール⁶⁾に準じて, S.E については, 仲西ら⁷⁾が作成
したプロトコールに準じて解析を行った。即ちアガロ
スブロックに包埋した菌体から DNA を抽出し, 制限酵
素にて断片化し, PFGE 法により断片をバンドとして
分離し, そのバンドの泳動パターンから DNA 構成の相
同性を判定した。なお, 使用した制限酵素については
O157 は *Xba* I, S.E は *Bln* I であり, また各々の泳動
条件は電圧: 6 V/cm, パルスタイム: 2.2 から 54.2 秒,
泳動時間: 19 時間ならびに電圧: 6 V/cm, パルスタイ
ム: 5.0 から 50 秒, 泳動時間: 22 時間である。

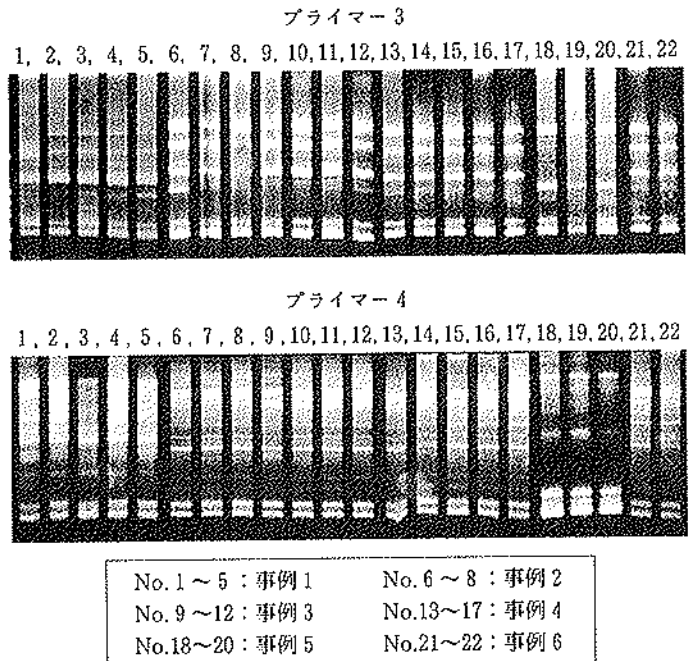


図 1 O157集団発生例 6 事例由来22株における RAPD 解析結果

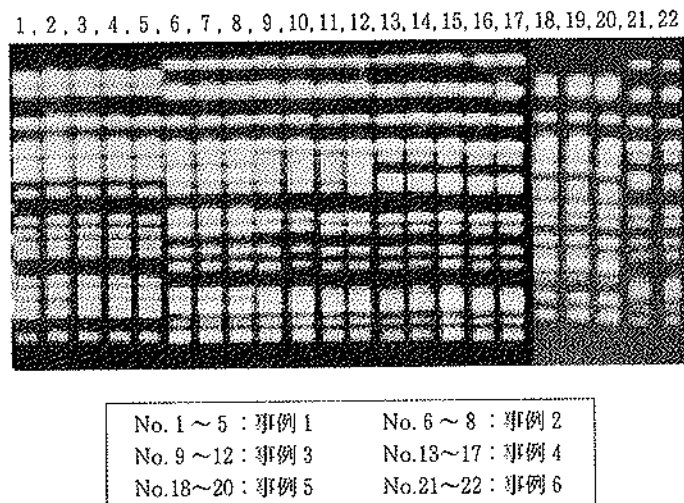


図 2 O157集団発生例 6 事例由来22株における PFGE 解析結果

3 結 果

3・1 O157 についての検討結果

集団発生例 6 事例由来の 22 株を RAPD 法で解析した
結果, プライマー 3 により 3 種類, プライマー 4 により
2 種類に分類され (図 1), この結果の組み合わせから
3 グループ (①~③) に分類された (表 1)。即ち, 6
事例中 4 事例 (14 菌株) の泳動パターンは全て一致 (②
グループ) し, また残り 2 事例 (8 菌株) については,
1 事例 (5 菌株) が ①グループ, 他の 1 事例 (3 菌株)
が ③グループに分かれた。

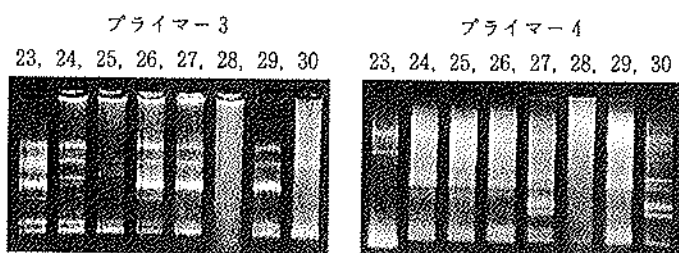


図3 O157散発事例由来8株におけるRAPD解析結果

表2 O157散発事例由来8株におけるRAPD解析結果の分類

菌株No.	プライマー3	プライマー4	グループNo.
23	B	D	④
24	D	A	⑤
25	E	A	⑥
26	B	A	②
27	B	C	⑦
28	F	E	⑧
29	B	A	②
30	G	C	⑨

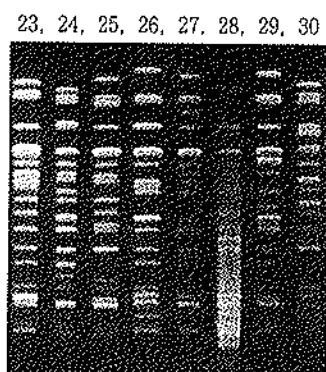


図4 O157散発事例由来8株におけるPFGE解析結果

一方、PFGE法により解析した結果、泳動パターンは6事例ごとに異なったが、同一事例由来株の間では一致した(図2)。

また、散発事例由来8株をRAPD法で解析した結果、プライマー3により5種類、プライマー4により4種類に分類され(図3)、この結果の組み合わせにより7グループに分類された(表2)。一方、PFGE法では全ての菌株の泳動パターンが異なった(図4)。

以上の結果、O157については、RAPD法は同一事例由来株に関する解析には有用であるが、PFGE法と比べ識別能が劣ることが確認された。

3・2 S.E.についての検討結果

集団発生例6事例由来の21株をRAPD法で解析した結果、プライマー5および6ともに全ての菌株で泳動パターンがほぼ同一となった。一方、PFGE法により解析した結果、泳動パターンは事例ごとに異なったが、同一事例由来株の間では一致した。

また、散発事例由来9株についてRAPD法で解析した結果、全ての菌株で泳動パターンがほぼ同一となったが、PFGE法では全ての菌株で泳動パターンが異なった。

以上の結果、S.E.については、今回使用した2種類のプライマーによるRAPD法は有用ではないことが分かった。

4 考 察

RAPD法は、任意配列の短いプライマーを用いて低いアニーリング条件でPCRを行う。増幅されたDNA断片を電気泳動で分離し、その泳動パターンの差から個体間の多型性を検出する手法であり、一連の解析に要する時間は数時間である。即ち、本法は解析に数日間を要するPFGE法と比較し、迅速性、簡便性の点で優れているといえる。しかし、今回我々がO157について検討した結果、RAPD法で同一の泳動パターンを示した菌株がPFGE法では異なる泳動パターンを示したことから、RAPD法はPFGE法に比べ識別能が劣ることが分かった。なお、RAPD法は、使用するプライマーの種類を追加することで、より識別能が向上すると考えられるが、経済性や迅速性の点で実用的ではないと思われる。

O157感染症が発生した際、感染源・感染経路の特定のための科学的根拠を得るために、分離株について分子疫学的解析を実施する。本研究の結果から、分子疫学的解析法については、まずRAPD法でスクリーニング検査を行い、その結果泳動パターンが同一になった場合はPFGE法による解析を行い、菌の相同性を確認するという手法が、経済性ならびに迅速性から最良であると考えられた。

また、S.E.については、由来が異なる2株についてPCRを行い、最も泳動パターンに差異が認められた2種類のプライマーを選択し検討を行ったが、今回の検討に使用した30株については、泳動パターンに明確な差異がみられず、有用ではなかった。今後、その他のプライマーを用い有用性について更に検討する必要がある。

5 ま と め

RAPD法の有用性を検討するため、O157およびS.E.

について RAPD 法および PFGE 法により分子疫学的解析を行い比較検討した。

(1) O157についての検討結果

RAPD 法は、同一事例由来株に関する解析には有効であったが、PFGE 法と比べ識別能が劣ることが分かった。

(2) O157感染症発生時の有用な分子疫学的解析法

RAPD 法でスクリーニング検査を行い、泳動パターンが同一になった場合のみ PFGE 法による解析を行い、DNA の相同性を確認するという手法が最良であると考えられた。

(3) SE についての検討結果

今回使用した 2 種類のプライマーの場合には、泳動パターンに差異が認められず RAPD 法は有用ではなかった。

文 献

1) WATANABE Haruo, WADA Akihito,

INAGAKI Yoshishige, ITO Kenichiro, TAMURA Kazumiti : Lancet, 348, 831—832 (1996)

2) WATANABE Haruo, TERAJIMA Jun, IZUMIYA Hidemasa, WADA Akihito, TAMURA Kazumiti : Pediatr. Internat., 41, 202—208 (1999)

3) 牧野壮一：臨床と微生物, 23(6), 658—662 (1996)

4) TERAJIMA Jun, IZUMIYA Hidemasa, WADA Akihito, TAMURA Kazumiti, WATANABE Haruo : J. Appl. Microbiol., 88, 99—105 (2000)

5) 金子誠二, 仲間晶子：東京都立衛生研究所プロジェクト研究報告書 (平成12年), 27—37 (2000)

6) 渡邊治雄：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会, 17—31 (1997)

7) 仲西寿男：新興・再興感染症研究事業「我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究」研究報告書, 64—67 (1999)