

腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析法の検討 —MLVA とパルスネットのパターン比較—

末永 朱美 国寄 勝也 蔵田 和正 石村 勝之
笠間 良雄 吉岡 嘉暁

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例の迅速で詳細な解析が可能な分子疫学的解析法の確立を目的に, Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA)解析の有用性をパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)と比較するとともに, 解析に有用なプライマーの検討を行った。2004 年以降の新たなパルスネットパターンに分類された分離株 43 株の STEC O157:H7 を対象に, MLVA は Lindstedt らの 7 種類および Keys らの 5 種類の計 12 種類のプライマーで縦列反復塩基配列の有無とその繰り返し回数(VNTRs)を解析した。その結果, STEC O157:H7 は Vhec5, Vhec6 の 2 つのプライマーでほぼ同じ繰り返し回数であった。同じパルスネットパターンに分類される株は, Vhec1, Vhec4, TR4 の 3 つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで表されるとともに, Vhec2, TR3, K11, K37 の 4 つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで細分化できることが示唆された。患者の喫食調査等により疫学的に関連する株においても, 同様な結果が得られた。STEC O157:H7 の MLVA パターン解析に有用なプライマーは Vhec1, Vhec2, Vhec4, TR3, TR4, K11, K37 であった。

キーワード: 腸管出血性大腸菌, MLVA, PFGE, STEC, VNTRs

はじめに

広域散在型食中毒事例(diffuse outbreak)への迅速対応や腸管出血性大腸菌感染症散発事例への関連性調査を目的として, 各地方衛生研究所の腸管出血性大腸菌(STEC)分離菌株を国立感染症研究所(以下「感染研」という)に収集して PFGE 解析するシステム(パルスネット)の構築が進んでいる。しかし, パルスネットにおける PFGE 解析は, 制限酵素 XbaI 1 種類の切断パターンの比較により分類が行われるため, 同じ遺伝子型に分類される株が, 他の制限酵素による解析では, 泳動パターンに違いが認められることがあるなど, より詳細な疫学解析を行うためには, 本法のみでは不十分であることが指摘されており, また, 昨年より遺伝子解析の迅速化に関する研究も開始された。そのため STEC 分離株を, より迅速に, 細かく分類するために, より解析能の高い遺伝子解析法が求められていた。

近年, DNA 多型解析法の 1 つとして細菌の DNA に存在する縦列反復塩基配列(Variable-Number Tandem-Repeats)を利用した Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA)が開発され, 多種類の細菌の DNA 多型解析で有用性を示

す報告がなされている。2003 年に Lindstedt ら¹⁾は, 堺株を含めた 73 株の O157:H7 株を用いた MLVA 法の有用性を示し, 2004 年には改良した O157:H7 の MLVA 法を報告した²⁾。また 2005 年に Keys ら³⁾は, Lindstedt らと Noller ら⁴⁾のプライマーに加え, 独自に設計したプライマーと合わせて 29 種類のプライマーを用いて O157:H7 の MLVA 解析を行った。

昨年までの研究において, 我々は MLVA の解析能をより向上させるために, 6 種類のパルスネットパターンおよび O157:H7 感染事例由来株全 97 株を用い, Lindstedt らの 7 種類のプライマーペア(以下「Pr-P」という)に加え, Keys らの 5 種類の Pr-P を使用して MLVA 解析を行い, PFGE の結果と比較し, 12 種類の Pr-P の有用性を確認した。そこで今回は, 2004 年以降に感染研の PFGE 解析により分類された新しいパルスネットパターン(以下「感染研 Pt」という)と MLVA 解析パターンを比較し, STEC O157:H7 の解析に有効な Pr-P の検討を行った。

方 法

1 供試菌株

供試菌株は, 2004 年以降に広島市で分離され,

表 1 供 試 菌 株

No	分 離 日	血 清 型	V T 型	感染研 No	感染研 Pt	事 例	菌株数
28	2004/08/08	O157:H7	VT1+VT2	42342	292	1	
29	2004/08/11	O157:H7	VT1+VT2	42343	292	2	
30	2004/08/14	O157:H7	VT2	42344	261	3	
31	2004/08/16	O157:H7	VT1+VT2	42345	709	4	
32	2004/08/20	O157:H7	VT1+VT2	42347	703	5- 姉	
33	2004/08/20	O157:H7	VT1+VT2	42348	708	5- 妹	
34	2004/08/24	O157:H7	VT1+VT2	42349	292	6	
35	2004/08/24	O157:H7	VT1+VT2	42350	292	7	
38	2004/08/25	O157:H7	VT1+VT2	42353	292	8	
36	2004/08/25	O157:H7	VT1+VT2	42351	292	9	
37	2004/08/25	O157:H7	VT1+VT2	42352	292	10	
39	2004/09/16	O157:H7	VT2	42354	382	11	
47	2004/09/22	O157:H7	VT1+VT2	42966	589	12	
49	2004/10/06	O157:H7	VT2	42968	933	13	
50	2004/10/13	O157:H7	VT1+VT2	42969	934	14	
52	2004/11/21	O157:H7	VT1+VT2	42972	664	15	16
53	2005/05/15	O157:H7	VT2	50528	a70	16- 父	
54	2005/05/16	O157:H7	VT2	50529	a70	16- 子	
55	2005/05/31	O157:H7	VT1+VT2	50531	a63	17	
56	2005/06/13	O157:H7	VT2	50620	a77	18	
57	2005/08/11	O157:H7	VT1+VT2	52211	a27	19	
59	2005/09/13	O157:H7	VT1+VT2	52213	a27	20- 弟	
58	2005/09/13	O157:H7	VT1+VT2	52212	a27	20- 兄	
60	2005/10/27	O157:H7	VT1+VT2	52214	a590	21- 弟	
61	2005/10/28	O157:H7	VT1+VT2	52215	a590	21- 姉	9
2	2006/05/01	O157:H7	VT1+VT2	60504	b52	22	
3	2006/05/26	O157:H7	VT1+VT2	60503	b56	23	
4	2006/06/01	O157:H7	VT1+VT2	60505	b45	24	
5	2006/06/29	O157:H7	VT1+VT2	60706	b107	25- A	
6	2006/06/29	O157:H7	VT1+VT2	60707	b107	25- A	
7	2006/06/30	O157:H7	VT1+VT2	60708	b107	25- A	
8	2006/07/03	O157:H7	VT1+VT2	60709	b107	25- B	
9	2006/07/04	O157:H7	VT1+VT2	60710	b106	25- B	
11	2006/07/18	O157:H7	VT1+VT2	60778	a259	26- 子	
10	2006/07/18	O157:H7	VT1+VT2	60777	a259	26- 母	
12	2006/07/24	O157:H7	VT1+VT2	60779	b129	25- C	
20	2006/08/08	O157:H7	VT1+VT2	-	a259	27- A	
13	2006/08/13	O157:H7	VT1+VT2	61886	a259	27- B兄	
14	2006/08/17	O157:H7	VT1+VT2	61887	a259	27- B弟	
15	2006/08/31	O157:H7	VT1+VT2	61888	b452	28	
16	2006/09/04	O157:H7	VT1+VT2	61889	b452	29	
17	2006/09/22	O157:H7	VT1+VT2	61893	b216	30- 母	
18	2006/09/22	O157:H7	VT1+VT2	61894	b216	30- 子	18

表 2 供試プライマー

名 称	配 列
Vhec1	-F: 5'-HEX-AGCCCGCAGTTGATACCTACG-3' -R: 5'-GATGCCGGATGAAAATGATAAGTT-3'
Vhec2	-F: 5'-TET-AACCGTTATGAAAGAAAGTCCT-3' -R: 5'-TCGCCCAGTAAGTATGAAATC-3'
Vhec3	-F: 5'-TET — GGCCGGATGGAAACTATGCTATT-3' -R: 5'-GCCGCTATTTTTTAACCACTGACTA-3'
Vhec4	-F: 5'-FAM-ATCGCCTTCTTCCTCCGTAATG-3' -R: 5'-CTCCTCGCGCTCAGACAGTG-3'
Vhec5	-F: 5'-FAM-CTCAGGCGCCGTTAAGGTGTAGC-3' -R: 5'-TCCGCGGAGTGCAGAGAAAATAAA-3'
Vhec6	-F: 5'-HEX-ACGTTAAACCCGGAATGGAAAATC-3' -R: 5'-GAGCGAAAAATGTCTATCTTGAGG-3'
Vhec7	-F: 5'-FAM-ATGCGCGGTTAGCTACACGACA-3' -R: 5'-TGAAAGCCCACACCATGCGATAAT-3'
TR3	-F: 5'-HEX-GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGAC-3' -R: 5'-GGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC-3'
TR4	-F: 5'-FAM-GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG-3' -R: 5'-GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGTTTACACGAC-3'
TR7	-F: 5'-TET-GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT-3' -R: 5'-GGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC-3'
K11	-F: 5'-HEX-GACCGGCAATCATCGGGCCAACCA-3' -R: 5'-GATGCTGGAAAAACTGATGCAGACTCGCGT-3'
K37	-F: 5'-TET-GCCGCCCTTACATTACGCGGACATTC-3' -R: 5'-GCAGGAGAACAACAAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC-3'

新たな感染研 Pt に分類された分離株 43 株を用いた (表 1)。

2 MLVA 解析法

MLVA 法の PCR 反応条件および泳動方法については、Lindstedt ら²⁾の改良された方法に準じて行った。プライマーは、Lindstedt らが使用した 7 種類の Pr-P に、Keys らが使用したプライマーのうち、PCR 増幅産物の繰返し回数のバリエーションが多い 5 種類の Pr-P を加えた 12 種類の Pr-P を使用した(表 2)。フォワードプライマーは 5' 側に HEX, TET, FAM のいずれかの蛍光色素を標識したものを用いた。菌液を 10 分間

表 3 PCR 反応条件

反 応	増幅条件		
初期変性	94	15 分	
変性	94	30 秒	25 回
アニーリング	63	90 秒	
伸張反応	72	90 秒	
最終伸張反応	72	10 分	

煮沸溶菌させ、12,000rpm、5 分遠沈した上清をテンプレートとした。PCR 反応液の組成は、プライマー (100 pmol/μl) 各 0.1 μl、10×Ex Taq Buffer 1.2 μl、滅菌精製水 8 μl、dNTP(2.5mM)0.5 μl、Ex Taq Polymerase (5U/μl)0.1 μl、DNA テンプレート 2 μl とした。PCR 反応は、プライマー Vhec1・3・4・5 を混合した Mix1、Vhec1・2・6・7 を混合した Mix2、TR3・4・7 と K11・37 を混合した Mix3 の 1 検体につき 3 本の反応系で、表 3 に示す反応条件で行った。PCR 後 Mix1 と Mix2 の増幅産物各 1 μl を滅菌精製水 18 μl と混合し、その混合希釈液 1 μl に、ホルムアミド 12 μl とサイズマーカー (CHIMERx : GeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label, 50-625bp) 1 μl を加えたもの、及び Mix3 の増幅産物 1 μl を滅菌精製水 19 μl と混合し、その混合希釈液 1 μl に、ホルムアミド 12 μl とサイズマーカー 1 μl を加えたもの、2 系列の電気泳動を行った。電気泳動は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で 60、40 分間行い、Gene

表 4 供試プライマーと繰り返し部位

プライマー		基本増幅域		Tandem Repeat	クロモゾーム / プラスミド	Keys*	
		(bp)	(bp)	配 列			
Lindstedt	Vhec 1	335	6	TGGCTC	クロモゾーム DNA	10	○
	Vhec 2	382	18	AGTTAAATAATTCGCAGG	クロモゾーム DNA	34	○
	Vhec 3	464	6	AAGGTG	クロモゾーム DNA	3	○
	Vhec 4	495	6	AAATAG	クロモゾーム DNA	9	○
	Vhec 5	295	30	TCTGGCGGAACTGGCGTA TCACCGCCGTCA	クロモゾーム DNA	5	
	Vhec 6	259	24	TCGGTACTGTCATGGCTT TGTTTA	クロモゾーム DNA	-	
Noller	Vhec 7	255	7	ACCTCAC	プラスミド DNA	36	○
	TR 3	120	6	TATCTT	クロモゾーム DNA	17	○
	TR 4	112	6	TGCAAA	クロモゾーム DNA	25	○
	TR 7	272	6	GACCAC	クロモゾーム DNA	19	○
Key's	K11	187	6	-	クロモゾーム DNA	11	
	K37	142	6	-	プラスミド DNA	37	○

* ○ : Hyttia-Tress ら⁵⁾の報告で選定された, MLVA 解析に最適な9つのプライマー

Scan Analysis Software (Applied Biosystems)で解析を行った。繰返し回数(以下「TRN」という)の算出は、各プライマーごとに、表4に示す基本増幅域(bp)と繰返しサイズ(bp)に基づいて算出した。

3 パルスネットパターンとTRNの比較

2004年以降の新しい感染研Ptと、MLVA解析結果を比較し、感染研Ptと一致するPr-Pの組合せと、同一の感染研Ptを詳細に分類するPr-Pの組合せについて比較検討を行った。

4 疫学的同一事例とTRNの比較

疫学的に同一集団と考えられる事例ごとに、感染研PtとMLVA解析結果の比較検討を行った。

結 果

1 MLVA解析

各プライマーによる供試43株のTRNを表5にまとめた。最も分類数が高かったプライマーはVhec(以下「Vh」という)で17種類に分類された。以下、K37(12種類)、Vh3・Vh7(10種類)、TR3・TR4(9種類)、Vh2・Vh4・K11(8種類)、TR7(6種類)の順に分類数が多かった。Vh5はTRN6回、Vh6はTRN3回がいずれも38株(88.4%)と大半を占めた。

感染研PtごとのPr-P別TRNを表6に示した。

(1) Lindstedtのプライマー別解析結果

Vh1では、増幅産物が得られないもの(4株)と、TRNが14,15,16,19,20,23,25,26,28,30,34,37,43,45,46,48回の17種類が認められた(表5)。感染研Pt別では、「a259」5株がTRN25,26,43回の3種類、「292」7株が48回、「b107」4株が43回、「a27」3株が23回、「a70」2株が30回、「a590」2

株が16回、「b216」2株が20回、「b452」2株が25回の1種類であった。2006年における事例「25」関連株である「b107」、「b106」、「b129」6株は34,43回の2種類、事例「27」関連株「a259」3株は、26,43回の2種類であった(表6)。

Vh2では、増幅産物が得られないもの(2株)と、TRNが2,3,4,5,6,7,10回の8種類が認められ、その内5,6回のものが27株(62.8%)を占めた(表5)。感染研Pt別では、「a259」5株がTRN4,7,10回、「a27」3株が0,4,5回の3種類、「292」7株、「b107」4株が5,6回、「a590」2株が3,4回、「b216」2株が4,5回、「b452」2株が4,5回の各2種類、「a70」2株が5回の1種類であった。2006年における事例「25」関連株「b107」、「b106」、「b129」の6株は、2,5,6回の3種類、事例「27」関連株「a259」3株は、4,7回の2種類であった(表6)。

Vh3では、増幅産物が得られないもの(6株)と、TRNが1,3,5,7,8,9,10,12,13回の10種類が認められ、その内5,9回のものが22株(51.2%)を占めた(表5)。感染研Pt別では、「a27」3株がTRN10,12回、「b452」2株が0,7回の2種類、「292」7株、「b107」4株が5回、「a259」5株が9回、「a70」2株が8回、「a590」2株が9回、「b216」2株が10回の各1種類であった。2006年における事例「25」関連株「b107」、「b106」、「b129」の6株は5回、事例「27」関連株「a259」3株は9回の各1種類であった(表6)。Vh4では、増幅産物が得られないもの(4株)と、TRNが3,7,8,9,11,12,13回の8種類が認められ、その内7,8回のものが24株(55.8%)を占めた(表5)。感染研Pt別では、「a259」5株がTRN11,12回の2種

表 5 プライマー別の繰り返し回数(菌株数)

TR	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh5	Vh6	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
0	4	2	6	4	1	3	2	2		9	8	
1			2			2	2					
2		1							2			
3		2	1	3		38	14	5	7		1	1
4		8			2		2	2	26	5	5	1
5		16	15		1		5	2	2		13	
6		11			38		7	2		22	13	19
7		1	3	17				23		2	1	11
8			3	7			8	3		3		3
9			7	3	1			3				
10		2	4				1		1	2	1	
11				3					1			1
12			1	4				1	2			1
13			1	2								
14	1								1			
15	1											
16	2											
17									1			
19	1											1
20	2											
22							1					
23	3											
24											1	
25	3											
26	2											
28	2											2
29												1
30	3											1
31							1					1
34	1											
37	1											
43	7											
46	1											
48	8											
種 類	17	8	10	8	5	3	10	9	9	6	8	12

Vh:Vhec

類, '292' 7 株, 'b107' 4 株が 7 回, 'a27' 3 株, 'a590' 2 株が 8 回, 'a70' 2 株が 3 回, 'b216' 2 株が 9 回, 'b452' 2 株が 13 回の各 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b106', 'b107', 'b129' の 6 株は, 7, 8 回, 事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, 11, 12 回の各 2 種類であった(表 6)。

Vh5 では, 増幅産物が得られないもの(1 株)と, TRN が 4, 5, 6, 9 回の 5 種類が認められ, その内 6 回のものが 38 株(88.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, 'b452' 2 株が TRN 6, 9 回の 2 種類, '292' 7 株, 'b107' 4 株, 'a259' 5 株, 'a27' 3 株, 'a70' 2 株, 'a590' 2 株, 'b216' 2 株が 6 回の 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株, 事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, いずれも 6 回の 1 種類であった(表 6)。

Vh6 では, 増幅産物が得られないもの(3 株)と, TRN が 1, 3 回の 3 種類が認められ, その内 3 回のも

のが 38 株(88.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, 'a259' 5 株が TRN 1, 3 回, 'b452' 2 株が 0, 3 回の 2 種類, '292' 7 株, 'b107' 4 株, 'a27' 3 株, 'a70' 2 株, 'a590' 2 株, 'b216' 2 株は, いずれも 3 回の 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株は, 0, 3 回, 事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, 1, 3 回の各 2 種類であった(表 6)。

Vh7 では, 増幅産物が得られないもの(2 株)と, TRN が 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 22, 31 回の 10 種類が認められ, その内 3, 6, 8 回のものが 29 株(67.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, 'a259' 5 株が TRN 4, 8 回, 'b452' 2 株が 6, 31 回の各 2 種類, '292' 7 株, 'b107' 4 株が 3 回, 'a27' 3 株が 8 回, 'a70' 2 株が 5 回, 'a590' 2 株, 'b216' 2 株が 6 回の各 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株は, 3, 22 回, 事

表 6 感染研パターンとプライマーペア別の繰り返し回数

No	感染研 Pt	事例	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh5	Vh6	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
28	292	1	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
29	292	2	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
34	292	6	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
35	292	7	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
36	292	9	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	5	6
37	292	10	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
38	292	8	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
5	b107	25- A	43	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
6	b107	25- A	43	6	5	7	6	3	3	7	4	0	5	6
7	b107	25- A	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
8	b107	25- B	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
9	b106	25- B	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
12	b129	25- C	34	2	5	8	6	0	22	9	4	6	6	6
10	a259	26- 母	43	4	9	12	6	3	8	0	4	0	5	6
11	a259	26- 子	25	10	9	12	6	3	8	0	17	0	4	12
13	a259	27- B兄	26	7	9	11	6	1	4	6	4	4	5	19
14	a259	27- B弟	26	4	9	12	6	3	8	12	4	4	5	6
20	a259	27- A兄	43	4	9	12	6	3	8	7	4	4	5	6
57	a27	19	23	5	10	8	6	3	8	9	12	0	0	28
58	a27	20- 兄	23	0	10	8	6	3	8	8	12	0	0	28
59	a27	20- 弟	23	4	12	8	6	3	8	3	4	6	0	7
53	a70	16- 父	30	5	8	3	6	3	5	3	2	4	5	8
54	a70	16- 子	30	5	8	3	6	3	5	3	2	4	5	8
60	a590	21- 弟	16	4	9	8	6	3	6	7	3	0	4	7
61	a590	21- 姉	16	3	9	8	6	3	6	7	3	6	4	7
17	b216	30- 母	20	5	10	9	6	3	6	7	3	7	4	7
18	b216	30- 子	20	4	10	9	6	3	6	7	3	7	4	7
15	b452	28	25	4	0	13	6	3	6	8	4	6	5	7
16	b452	29	25	5	7	13	9	0	31	4	4	6	5	7
32	703	5- 姉	14	6	8	11	5	3	1	4	5	10	0	3
33	708	5- 妹	45	5	13	7	6	3	6	7	4	6	6	6
30	261	3	37	10	0	7	0	3	0	6	14	0	3	30
39	382	11	48	3	5	0	4	3	1	3	3	6	10	11
47	589	12	19	6	0	11	6	3	5	7	3	6	0	8
52	664	15	28	5	7	3	6	3	8	7	3	6	5	7
31	709	4	0	6	0	7	6	3	3	7	4	6	0	6
49	933	13	15	0	3	0	4	0	0	5	11	0	0	29
50	934	14	30	6	0	8	6	3	10	7	4	8	5	7
55	a63	17	46	6	1	7	6	3	3	9	4	0	0	6
56	a77	18	0	4	1	0	6	3	5	5	10	10	24	31
4	b45	24	0	5	7	0	6	3	6	8	4	6	5	7
2	b52	22	0	5	0	9	6	1	4	3	4	8	7	4
3	b56	23	28	5	5	7	6	3	5	7	5	8	6	7

例 27 関連株 a259 3 株は , 4 , 8 回の各 2 種類であった(表 6)。

(2) Keys のプライマー別解析結果

TR3 では , 増幅産物が得られないもの(2 株)と , TRN が 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 12 回の 9 種類が認められ , その内 7 回のものが 23 株(53.5%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では , a259 5 株が TRN 0 , 6 , 7 , 12 回の

4 種類 , a27 3 株が 3 , 8 , 9 回の 3 種類 , b452 2 株が 4 , 8 回の 2 種類 , 292 7 株 , b107 4 株 , a590 2 株 , b216 2 株が 7 回 , a70 2 株が 3 回の 1 種類であった。2006 年における事例 25 関連株 b107 , b106 , b129 の 6 株は , 7 , 9 回の 2 種類 , 事例 27 関連株 a259 3 株は , 6 , 7 , 12 回の 3 種類であった(表 6)。

TR4 では, 全て増幅産物が得られ, TRN が 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 14, 17 回の 9 種類が認められ, その内 3, 4 回のものが 33 株(76.7%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, 'a259' 5 株が TRN 4, 17 回, 'a27' 3 株が 4, 12 回の各 2 種類, '292' 7 株, 'b107' 4 株, 'b452' 2 株が 4 回, 'a70' 2 株が 2 回, 'a590' 2 株, 'b216' 2 株が 3 回の各 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株と事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, いずれも 4 回の 1 種類であった(表 6)。

TR7 では, 増幅産物が得られないもの(9 株)と, TRN が 4, 6, 7, 8, 10 回の 6 種類が認められ, その内 6 回のものが 22 株(51.2%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, 'b107' 4 株, 'a27' 3 株, 'a590' 2 株が TRN 0, 6 回, 'a259' 5 株が 0, 4 回の各 2 種類, '292' 7

株, 'b452' 2 株が 6 回, 'a70' 2 株が 4 回, 'b216' 2 株が 7 回の各 1 種類であった。一方、2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株は, 0, 6 回の 2 種類, 事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, 4 回の 1 種類であった(表 6)。

K11 では, 増幅産物が得られないもの(8 株)と, TRN が 3, 4, 5, 6, 7, 10, 24 回の 8 種類が認められ, その内 5, 6 回のものが 26 株(60.5%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, '292' 7 株, 'b107' 4 株が TRN が 5, 6 回, 'a259' 5 株が 4, 5 回の各 2 種類, 'a27' 3 株が 0 回, 'a70' 2 株, 'b452' 2 株が 5 回, 'a590' 2 株, 'b216' 2 株が 4 回の各 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株は, 5, 6 回の 2 種類, 事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は, 5 回の 1 種類であった(表 6)。

表 7 感染研パターンと繰り返し回数

感染研Pt	株数	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
292	3	48	6	5	7	3	7	4	6	6	6
292	2	48	5	5	7	3	7	4	6	6	6
292	1	48	6	5	7	3	7	4	6	5	6
292	1	48	5	5	7	3	7	4	6	6	6
b107	2	43	5	5	7	3	7	4	6	6	6
b107	1	43	6	5	7	3	7	4	0	5	6
b107	1	43	6	5	7	3	7	4	6	6	6
a259	1	25	10	9	12	8	0	17	0	4	12
a259	1	26	4	9	12	8	12	4	4	5	6
a259	1	26	7	9	11	4	6	4	4	5	19
a259	1	43	4	9	12	8	0	4	0	5	6
a259	1	43	4	9	12	8	7	4	4	5	6
a27	1	23	5	10	8	8	9	12	0	0	28
a27	1	23	0	10	8	8	8	12	0	0	28
a27	1	23	4	12	8	8	3	4	6	0	7
a70	1	30	5	8	3	5	3	2	4	5	8
a70	1	30	5	8	3	5	3	2	4	5	8
a590	1	16	3	9	8	6	7	3	6	4	7
a590	1	16	4	9	8	6	7	3	0	4	7
b216	1	20	4	10	9	6	7	3	7	4	7
b216	1	20	5	10	9	6	7	3	7	4	7
b452	1	25	5	7	13	31	4	4	6	5	7
b452	1	25	4	0	13	6	8	4	6	5	7
変異株 *	-	1	8	2	1	2	6	2	4	3	3

* :同一感染研 P 内で, 繰り返し回数が異なる一部の株の数

感染研 Pt 'a259' の Vh1 において, 繰り返し回数 26 回と 43 回の 2 つは, eq-TR とみなした。

感染研 Pt '292' の Vh2 において, 繰り返し回数 5 回と 6 回の 2 つは, cl-TR とみなした。

感染研 Pt 'a590', 'b216', 'b452' において, 異なる繰り返し回数の 2 株は, 変異株数 1 とした。

K37 では、全て増幅産物が得られ、TRN が 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 19, 28, 29, 30, 31 回の 12 種類が認められ、その内 6, 7 回のものが 30 株(69.8%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、'a259' 5 株が TRN 6, 12, 19 回の 3 種類、'a27' 3 株が 7, 28 回の 2 種類、'292' 7 株、'b107' 4 株が 6 回、'a70' 2 株が 8 回、'a590' 2

株、'b216' 2 株、'b452' 2 株が 7 回の各 1 種類であった。2006 年における事例 '25' 関連株 'b107', 'b106', 'b129' の 6 株は、6 回の 1 種類、事例 '27' 関連株 'a259' 3 株は、6, 19 回の 2 種類であった(表 6)。

2 パルスネットパターンと TRN の比較

表 8 感染研パターンとプライマーの組合せ

感染研 Pt	一 致 度		一致する組合せ	分 類 度 (種 類)	細分する組合せ						
			eq-TR		cl-TR						
	菌 株	種 類	Vh1-Vh4-TR4	Vh2	-	TR3	-	K11	-	K37	
292	7 / 7	4 / 4	48- 7- 4	3 / 4	5 6	-	7	-	5 6	-	6
b107	4 / 4	3 / 3	43- 7- 4	3 / 3	5 6	-	7	-	5 6	-	6
a259	4 / 5	3 / 5	26-12- 4	5 / 5	4	-	0	-	4	-	6
			43-12- 4		7		6		5		12
					10		7				19
							12				
a27	2 / 3	2 / 3	23- 8-12	3 / 3	0	-	3	-	0	-	7
					4		8		28		
					5		9				
a70	2 / 2	2 / 2	30- 3- 2	1 / 2	5	-	3	-	5	-	8
a590	2 / 2	2 / 2	16- 8- 3	2 / 2	0	-	7	-	4	-	7
					3						
b216	2 / 2	2 / 2	20- 9- 3	2 / 2	4	-	7	-	4	-	7
					5						
b452	2 / 2	2 / 2	25-13- 4	2 / 2	4	-		-	5	-	7
					5		8				
b106		1	43- 7- 4	1	5	-	7	-	6	-	6
b129		1	34- 8- 4	1	2	-	9	-	6	-	6
703		1	14-11- 5	1	6	-	4	-	0	-	3
708		1	45- 7- 4	1	5	-	7	-	6	-	6
261		1	37- 7-14	1	10	-	6	-	3	-	30
382		1	48- 0- 3	1	3	-	3	-	10	-	11
589		1	19-11- 3	1	6	-	7	-	0	-	8
664		1	28- 3- 3	1	5	-	7	-	5	-	7
709		1	0- 7- 4	1	6	-	7	-	0	-	6
933		1	15- 0-11	1	0	-	5	-	0	-	29
934		1	30- 8- 4	1	6	-	7	-	5	-	7
a63		1	46- 7- 4	1	6	-	9	-	0	-	6
a77		1	0- 0-10	1	4	-	5	-	24	-	31
b45		1	0- 0- 4	1	5	-	8	-	5	-	7
b52		1	0- 9- 4	1	5	-	3	-	7	-	4
b56		1	28- 7- 5	1	5	-	7	-	6	-	7

種類：母数は、全ての Pr-P の組合せによるパターン数

表 9 感染研パターンと繰り返し回数 (平成 17)

感染研Pt	株数	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
ND,2a,ND	26	48	5	6	7	3	7	4	6	6	6
ND,2a,ND	1	48	5	6	7	3	7	4	6	5	6
2a,2a,1	12	41	5	6	7	3	7	4	6	6	6
2a,2a,1	1	41	2	6	7	3	7	4	6	6	6
2a,ND,1	9	49	5	6	7	3	7	4	6	6	7
2a,ND,1	1	49	5	5	7	3	7	4	6	6	7
2a,ND,1	8	45	5	5	8	3	8	4	6	6	7
2a,ND,1	1	45	5	4	8	3	8	4	6	6	7
2a,ND,1	1	46	5	5	8	3	8	4	6	6	7
2d,2b,ND	9	24	4	6	12	6	7	4	6	7	8
2d,2b,ND	1	25	4	6	12	6	7	4	6	7	8
2c,ND,1	4	39	4	6	9	5	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	39	4	6	9	7	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	40	4	6	9	5	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	37	4	6	9	5	7	4	7	5	7
3k,ND,3	3	0	1	0	0	15	6	2	9	14	4

Vh:Vhec

2004 年以降 , 感染研の PFGE 解析により分類された新たなパルスネットパターンごとに , Vh5 と Vh6 を除く 10 種類の Pr-P による MLVA 解析結果を比較検討した(表 7)。Vh5 と Vh6 は、供試菌株の大半が同一の TRN であり 検討対象から外した。

(1) 感染研 Pt ごとの TRN 解析結果

'292 '7 株では , Vh1 , Vh3 , Vh4 , Vh7 , TR3 , TR4 , TR7 , K37 は同一の TRN を示し , Vh2 , K11 は 2 種類の TRN を認めた。

'b107 '4 株では , Vh1 , Vh3 , Vh4 , Vh7 , TR3 , TR4 , K37 は同一の TRN を示し , Vh2 , TR7 , K11 は 2 種類の TRN を認めた。

'a259 '5 株では , Vh3 は同一の TRN を示し , Vh4 , Vh7 , TR4 , TR7 , K11 は 2 種類 , Vh1 , Vh2 , K37 は 3

種類 , TR3 は 4 種類の TRN を認めた。

'a27 '3 株では , Vh1 , Vh4 , Vh7 , K11 は同一の TRN を示し , Vh3 , TR4 , TR7 , K37 は 2 種類 , Vh2 , TR3 は 3 種類の TRN を認めた。

'a70 '2 株は , 全て同一の TRN を示した。

'a590 ' , 'b216 ' , 'b452 ' は , 2 株ずつであるが , 同様に同一の感染研 Pt 内で共通する TRN と異なる TRN が認められた。

(2) 感染研 Pt と Pr-P の組合せ

感染研 Pt と一致する Pr-P の組合せと , 一致せず に詳細に分類される Pr-P の組合せについて , 比較検討を行った。

Vh1 , Vh3 , Vh4 , Vh7 , TR4 , TR7 , K11 , K37 で , 同一感染研 Pt 内で , TRN が異なる一部の株(以下 変

表 10 感染研パターンとプライマーの組合せ (平成 17)

感染研Pt	一 致 度		一致する組合せ	分 類 度 (種 類)	細分する組合せ
	株 数	種 類	eq-TR Vh1 - Vh4 - TR4		cl-TR Vh2 - TR3 - K11 - K37
ND,2a,ND	27/27	2 / 2	48 - 7 - 4	2 / 2	5 - 7 ?(5 ,6)- 6
2a,2a,1	13/13	2 / 2	41 - 7 - 4	2 / 2	(2 ,5)- 7 - 6 - 6
2a,ND,1	19/20	4 / 5	45 - 8 - 4 49 - 7 - 4	2 / 5	5 ?(7 ,8)- 6 - 7
2d,2b,ND	09/10	2 / 2	24 -12 - 4	1 / 2	4 - 7 - 7 - 8
2c,ND,1	05/07	2 / 4	39 - 9 - 4	1 / 4	4 - 7 - 5 - 7
3k,ND,3	03/03	1 / 1	0 - 0 - 2	1 / 1	1 - 6 ? 14 - 4

種類 :母数は , 全ての Pr-P の組合せによるパターン数

異株」という)は、それぞれ 1, 2, 1, 2, 2, 4, 3, 3 種類であった。変異株の少ない Pr-P の内 Vh1, Vh4, TR4 を選択して(以下「eq-TR」という)感染研 Pt と比較すると、24 種類の感染研 Pt すべてを、重複せずによく表現できた(表 8)。

感染研 Pt '292', 'b107', 'a259', 'a27' と eq-TR の一致度(一致する種類数/パターン内の種類数)は、それぞれ 4/4, 3/3, 3/5, 2/3 であり、'a70', 'a590', 'b216', 'b452' では全て 2/2 であった。

感染研 Pt とあまり一致しない Pr-P は、Vh2, TR3, TR7, K11, K37 で、変異株はそれぞれ 8, 6, 4, 3, 3 種類であった。変異株の多い Vh2, TR3 と、感染研 Pt '292', 'b107', 'a259' をよく分類する K11, K37 を選択して(以下「cl-TR」という)感染研 Pt と比較すると、すべての感染研 Pt をよく分類できた。TR7 は感染研 Pt をよく分類したが、TRN 0 回のものが多いた

め、組合せから外した。

'292' 7 株では、感染研 Pt と一致する(表現する)組合せ 'Vh1-Vh4-TR4' の TRN のパターンは、'48-7-4' であり、細分化する組合せ 'Vh2-TR3-K11-K37' の TRN パターンにより、3 種類に分類された。

'b107' 4 株の eq-TR は '43-7-4' であり、cl-TR により 3 種類に分類された。

'a259' 5 株の eq-TR は '26-12-4' または '43-12-4' であり、cl-TR により 5 種類に分類された。

'a27' 3 株の eq-TR は '23-8-12' であり、cl-TR により 3 種類に分類された。

'a70' 2 株の eq-TR は '30-3-2' であり、cl-TR により分類されなかった。

'a590' 株, 'b216' 株, 'b452' 株は、2 株ずつであるが、eq-TR はそれぞれ '16-8-3', '20-9-3', '25-13-4' であり、cl-TR により、いずれも 2 種類に分類さ

表 11 事例と感染研パターン、繰り返し回数の組み合わせ

No	VT型	事 例	PFGE		M L V A			
			感染研Pt	一致する組合せ	細分する組合せ	Vh3	Vh7	TR7
				eq-TR	cl-TR			
				Vh1-Vh4-TR4	Vh2-TR3-K11-K37			
5	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	6- 7- 6- 6	5	3	6
6	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	6- 7- 5- 6	5	3	0
7	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
8	1+2	25-B	b107	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
9	1+2	25-B	b106	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
12	1+2	25-C	b129	34- 8- 4	2- 9- 6- 6	5	22	6
11	1+2	26-子	a259	25-12-17	10- 0- 4-12	9	8	0
10	1+2	26-母	a259	43-12- 4	4- 0- 5- 6	9	8	0
20	1+2	27-A兄	a259	43-12- 4	4- 7- 5- 6	9	8	4
13	1+2	27-B兄	a259	26-11- 4	7- 6- 5-19	9	4	4
14	1+2	27-B弟	a259	26-12- 4	4-12- 5- 6	9	8	4
57	1+2	19	a27	23- 8-12	5- 9- 0-28	10	8	0
58	1+2	20-兄	a27	23- 8-12	0- 8- 0-28	10	8	0
59	1+2	20-弟	a27	23- 8- 4	4- 3- 0- 7	12	8	6
54	2	16-子	a70	30- 3- 2	5- 3- 5- 8	8	5	4
53	2	16-父	a70	30- 3- 2	5- 3- 5- 8	8	5	4
61	1+2	21-姉	a590	16- 8- 3	3- 7- 4- 7	9	6	6
60	1+2	21-弟	a590	16- 8- 3	4- 7- 4- 7	9	6	0
18	1+2	30-子	b216	20- 9- 3	4- 7- 4- 7	10	6	7
17	1+2	30-母	b216	20- 9- 3	5- 7- 4- 7	10	6	7
32	1+2	5-姉	703	14-11- 5	6- 4- 0- 3	8	1	10
33	1+2	5-妹	708	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	13	6	6

Vh:Vhec

れた。

'b106' 1 株の eq-TR は '43-7-4' で、疫学的に 'b107' の事例と同一の集団発生が強く疑われる菌株で、'b107' の eq-TR と同一であった。

以上の eq-TR は、他の散発事例 15 株の eq-TR と全て異なり、特異的であった。

平成 17 年度の研究で得られた TRN について eq-TR を適用し、比較検討した (表 9, 10)。

感染研から '292' と同一パターンであると報告のあった 'ND, 2a, ND' 27 株の eq-TR は全て '48-7-4' で、新しい感染研 Pt '292' の eq-TR と同一であり、その他の eq-TR は、'2a, 2a, 1' 13 株全てが '41-7-4', '2a, ND, 1' 20 株中 19 株が '45-8-4' または '49-7-4', '2d, 2b, ND' 10 株中 9 株が '24-12-4', '2c, ND, 1' 7 株中 5 株が '39-9-4' であった。更に cl-TR を適用したところ、感染研 Pt 'ND, 2a, ND', '2a, 2a, 1' は、それぞれ 2 種類に分類され、その他の感染研 Pt は分類できなかった。

3 疫学的同一事例と TRN の比較

疫学的に同一集団と考えられる事例ごとに、感染研 Pt と、Vh5 と Vh6 を除く 10 種類の Pr-P による MLVA 解析結果を比較検討した (表 11)。

事例 '25' は、2006 年 7 月の約 1 ケ月間に、3 つの施設 A, B, C が、食材や従事者を介して、相互に密接に関連して発生したことが疑われた事例であった。患者や従事者の菌株 6 株の内、5 株は eq-TR '43-7-4' で、感染研 Pt では 'b107' 4 株、'b106' 1 株の 2 種類に区別された。残り 1 株は、eq-TR '34-8-4', 感染研 Pt 'b129' で、他の 5 株とは、異なっていた。

事例 '26' と '27' は、約 2 週間の間隔で発生し、疫学的に関連が認められなかった 2 事例である。更に事例 '27' は、食材の仕入先が共通するのみの散発 2 事例(A, B)の集合事例であったが、2 事例 5 株の感染研 Pt は 'a259' の 1 種類のみを集約された。しかし MLVA 解析では、事例 '26' の患者 2 株は、eq-TR '43-12-4', '25-12-17' の 2 種類、事例 '27' の患者 3 株は、eq-TR '43-12-4', '26-11-4', '26-12-4' の 3 種類に分類された。

事例 '19' と '20' は、約 1 ケ月の間隔で発生し、疫学的に関連が認められなかった 2 事例で、感染研 Pt では 'a27' 1 種類のみを集約された。MLVA 解析でも 2 事例の各 1 株は eq-TR '23-8-12' で一致し、1 株は TR4 のみが異なっていた。

事例 '16' では、感染研 Pt 'a70', eq-TR '30-3-2' で一致し、cl-TR で区別されなかった。

事例 '21' では、感染研 Pt 'a590', eq-TR '16-8-

3' で一致し、cl-TR で 2 種類に区別された。

事例 '30' では、感染研 Pt 'b216', eq-TR '20-9-3' で一致し、cl-TR で 2 種類に区別された。

事例 '5' では、2 株が感染研 Pt '703', '708' に区別され、eq-TR, cl-TR をはじめ、Vh6 を除く 11 種類の TRN が一致しなかった。

考 察

1 MLVA 解析

近年 MLVA の分子疫学的解析手法としての有用性が報告されている。昨年度、Lindstedt らの改良した MLVA 解析法に基づき、PCR 反応の初期変性、アニーリング、伸張反応を検討した結果、ノイズが減少し目的とするピークの特定制が容易になった。さらに、増幅産物は 120 ~ 630bp の範囲にあるため、サイズマーカーを CHIMERx 社の GeneFlo™ DNA Ladder TA MRA Label 50-625bp を用いて電気泳動を行った。

昨年度に引き続き、今年度も 43 株の O157:H7 を用いて、Lindstedt ら(7 種類)と Keys ら(5 種類)の 12 種類のプライマーにより MLVA 解析を実施し、パルスネットパターンと比較し、MLVA 解析に有用なプライマーの選定を行った。

各プライマーによる 43 株の TRN は、Vh1 ~ 7 で順に 17, 8, 10, 8, 5, 3, 10 種類、TR3, TR4, TR7 で順に 9, 9, 6, K11, K37 で 8, 12 種類であり、昨年度の 97 株についての報告では、Vh1 ~ 7 で順に 16, 4, 10, 8, 2, 2, 9 種類、TR3, TR4, TR7 で順に 7, 3, 6 種類、K11, K37 で 8, 5 種類であり、全体的にやや収束しているが、ほぼ同様の分類能が確認された。

(1) Lindstedt のプライマー別解析結果

Vh1 では、感染研 Pt '292', 'b107', 'a27', 'a70', 'a590', 'b216', 'b452' に対して、それぞれ 48 回、43 回、23 回、30 回、16 回、20 回、25 回の 1 種類の TRN が特徴的に対応しており、12 種類の Pr-P の内で、感染研 Pt を最もよく表現できる Pr-P であった。しかし 'a259' では 25, 26, 43 回の 3 種類の TRN が観察されるなど、Vh1 のみでは完全に感染研 Pt を表すことはできず、他の Pr-P による補完が必要であった。

Vh2 では、感染研 Pt '292', 'b107', 'a259', 'a27', 'a70', 'a590', 'b216', 'b452' の TRN は、それぞれ 2, 2, 3, 3, 1, 2, 2, 2 種類に分類され、PFGE (制限酵素 XbaI 1 種類の切断パターン)では解析できない配列部位の分類能を有し、感染研 Pt を最もよく細分化する Pr-P であった。

Vh3 では、感染研 Pt '292', 'b107', 'a259', 'a70', 'a590', 'b216' の TRN は、5, 5, 9, 8, 9, 10 回の

各 1 種類であり、5, 9 回が 2 つの感染研 Pt で重複するものの、感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる分類能の高い Pr-P であった。

Vh4 では、感染研 Pt "292", "b107", "a27", "a70", "a590", "b216", "b452" の TRN は、7, 7, 8, 3, 8, 9, 13 回の各 1 種類が、感染研 Pt と相応して出現する Pr-P であった。しかし TRN 7, 8 回が 2 つの感染研 Pt で重複しているため、Vh4 のみでは完全に感染研 Pt を表すことはできないが、他の Pr-P と組合せて感染研 Pt を表現できる可能性が示唆された。

Vh5 と Vh6 は、TRN の種類数が特に少なく、Vh5 の 6 回、Vh6 の 3 回がいずれも 38 株(88.4%)、昨年度の報告でも、Vh5 の 6 回、Vh6 の 3 回がいずれも 96 株(99.0%)と大半を占め、感染研 Pt と相応して出現せず、分類能も低く、STEC O157:H7 の解析に有効な Pr-P ではなかった。

しかし、2003 年の Lindstedt らの報告では、Vh5, Vh6 における特異的な偏りは観察されていないため、Vh5 が 6 回、Vh6 が 3 回の STEC O157:H7 が特徴的に出現した現象については、今後の MLVA 解析法の標準化と国内外のデータとの比較解析が必要である。

なお、Hyytia-Tress ら⁵⁾の報告では、29 種類の Keys のプライマーを検討し、最終的に 9 種類のプライマーに絞り込んでおり、その過程で我々と同様に Vh5(keys のプライマー No.5)、Vh6 の 2 つのプライマーを対象外としている(表 4)。

Vh7 では、感染研 Pt "292", "b107", "a27", "a70", "a590", "b216" の TRN は、3, 3, 8, 5, 6, 6 回の各 1 種類であり、3, 6 回が 2 つの感染研 Pt で重複するものの、感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる分類能の高い Pr-P であった。

(2) Keys のプライマー別解析結果

TR3 では、感染研 Pt "a259", "a27", "b452" の TRN は、それぞれ 4, 3, 2 種類に分類され、PFGE では解析できない遺伝子部位の分類能を有し、感染研 Pt をよく細分化することが示唆された。

TR4 では、感染研 Pt "292", "b107", "a70", "a590", "b216", "b452" の TRN は、4, 4, 2, 3, 3, 4 の各 1 種類が、感染研 Pt と相応して出現する Pr-P であった。しかし、TRN 3, 4 回が 2 つの感染研 Pt で重複しているため、TR4 のみでは完全に感染研 Pt を表すことはできないが、他の Pr-P と組合せて感染研 Pt を表現できる可能性が示唆された。

TR7 では、感染研 Pt "292", "a70", "b216", "b452" の TRN は、6, 4, 7, 6 回の各 1 種類であり、6 回が

重複するものの、感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。

K11 では、感染研 Pt "a27", "a70", "a590", "b216", "b452" の TRN は、0, 5, 4, 4, 5 回の各 1 種類であり、4, 5 回が重複するものの、感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。

K37 では、感染研 Pt "292", "b107", "a70", "a590", "b216", "b452" の TRN は、6, 6, 8, 7, 7, 7 回の各 1 種類であり、6, 7 回が重複するものの、感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。一方、感染研 Pt "a259" が 3 種類、"a27" が 2 種類に分類され、PFGE では解析できない遺伝子部位の分類能を有し、感染研 Pt をよく細分化できることが示唆された。

2 パルスネットパターンと TRN の比較

感染研 Pt と一致する Pr-P の組合せについて比較検討した結果、変異株の少ない Pr-P、Vh1, Vh4, TR4 を選択することによって、24 種類の感染研 Pt すべてを、重複せずによく表現できることが分かった。また、昨年度の研究で得られた TRN について再検討した結果、80 株、6 種類の感染研 Pt について同様な結果が得られた。

Vh1 の TRN は 17 種類であるため、24 種類の感染研 Pt を完全に表現することはできなかった。

そのため TRN が 8 種類の Vh4 と 9 種類の TR4 のいずれかを組合せると 24 種類の感染研 Pt を完全に表現することが可能であったが、より確実に対応させるため、3 つの Pr-P の組合せによる eq-TR を用いた結果、制限酵素 Xba I による PFGE と同等の解析能を持つことが示された。

この eq-TR については、更に多くの菌株について試験結果を集積し、必要な修正を加えて、より確実性を高めていく必要がある。

同一の感染研 Pt を細分する cl-TR については、変異の多い Vh2, TR3, 感染研 Pt "292", "b107" をよく分類する K11, 感染研 Pt "a259", "a27" をよく分類する K37 を選択した結果、すべての感染研 Pt をよく分類できた。

Vh7 と K37 は、分子量の低いプラスミド DNA 上に(表 4)、クロモゾーム DNA を主目標として約 50kbp 以上の遺伝子断片を解析する PFGE パターンとは独立なパターンが得られる可能性が高い Pr-P である。今回の結果では、Vh7 は感染研 Pt とよく相応し、K37 は一部の感染研 Pt をよく分類した。

しかし、プラスミド DNA は環境条件により変異が起こる可能性が高いため、患者に投与された抗生物質

の種類,別の細菌との接触,保存中の継代回数について,情報の収集や記録管理が必要である。従って,Vh7 とK37 は eq-TR にはやや不適であり,cl-TR の判定においては,K37 の TRN の変異に留意が必要と考えられた。

3 疫学的同一事例と TRN の比較

事例 '25' では,2 種類の感染研 Pt 'b107', 'b106' が eq-TR '43-7-4' 1 種類に集約され,K11 以外の cl-TR でも分類されず,他の TRN の類似性も高いことから強い関連性が示唆された。'b129' 1 株は,感染研 Pt ,eq-TR ,TRN でも,他の株と大きく異なり,別の感染ルートが示唆された。

疫学的に関連性がない事例 '26' と '27' では,5 株の感染研 Pt が 'a259' の 1 種類に集約されたが,MLVA 解析では,eq-TR で 4 種類,cl-TR で 4 種類に分類された。

疫学的に関連性がない事例 '19' と '20' では,3 株の感染研 Pt が 'a27' の 1 種類に集約されたが,MLVA 解析では,eq-TR で 2 種類,cl-TR で 3 種類に分類された。

疫学的に関連性がない事例 '21', '30' では,2 株ずつであるが感染研 Pt と相応した eq-TR が得られ,cl-TR でそれぞれ 2 種類に分類できた。

事例 '5' では,2 株とも異なる感染研 Pt と eq-TR が得られ,cl-TR も全く異なるため,別の感染ルートが示唆された。

これらの事例の解析結果から,MLVA 解析は,感染研 Pt が異なっても,一定の関連性を示唆したり,逆に関連性のないことを強く示唆する能力,また,感染研 Pt が同一であっても,関連性のないことを示唆できる能力があることが分かった。

MLVA 解析結果については,その PCR 産物についてシーケンサーによる TRN の確認を行い,更に精度の高い比較解析を行う必要がある。

4 PFGE と MLVA

PFGE は,泳動条件や電気泳動装置の違い,デンドログラム作成におけるバンドの位置決定など様々な要因によって結果が影響され,再現性や客観性に関する問題点が指摘され,異なる研究室での検査結果の比較を困難にしている。

また,操作工程数が多く,検査結果を得るまで約 5 日を要するため,感染源の特定や予防対策などの行政活動への迅速な反映は困難である。

MLVA は,低分子の PCR 増幅産物を比較する TRN の高い再現性,数値結果による客観的な比較,感染研 Pt の推定と詳細な分類,2 日以内で判定す

る迅速性などの多くの利点を持っている。

MLVA を分子疫学的解析手法として確立するには,今後,PCR や泳動条件,TRN 読み取りの標準化などの技術面の確立と,共通した最小限の有効なプライマーの選定が必要であり,数多くの O157:H7 分離株について,疫学的な情報に基づく解析,研究を集積していく必要がある。

5 結 論

新たな感染研 Pt に分類された STEC O157:H7 43 株について,Lindstedt らの 7 種類,Keys らの 5 種類の計 12 種類の Pr-P で TRN を解析した。

Vh5 ,Vh6 は,43 株でほぼ同じ TRN を示し,MLVA 解析に有効な Pr-P ではなかった。

24 種類の感染研 Pt を重複せずによく表現できる Pr-P の組合せ eq-TR は,Vh1 ,Vh4 ,TR4 であった。同一の感染研 Pt をよく細分する cl-TR は,Vh2 ,TR3 ,K11 ,K37 であった。

MLVA 解析は,異なる感染研 Pt の株に一定の関連性を示唆し,逆に関連性が低いことを肯定する能力,同一の感染研 Pt の株に関連性が無いことを示唆し,逆に同一性を肯定する能力,即ち PFGE に対する否定的な補完性と肯定的な補完性の 2 つの性能が認められた。

これらの性能を確認し,技術的に確立するためには,今後,詳細な疫学的な調査結果に基づいた,更に多数の事例についての PFGE と MLVA 両法の解析結果に対する研究の集積が必要である。

文 献

- 1) Lindstedt BA et al, DNA fingerprinting of shiga-toxin producing Escherichia coli O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA), Ann Clin Microbiol Antimicrobiol. 2,1-7, (2003)
- 2) Lindstedt BA et al: Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of Escherichia coli O157 using PCR multiplexing and multicolored capillary electrophoresis, J Clin Microbiol Methods, 58, 213 ~ 222(2004)
- 3) Keys C et al : Highly diverse variable number tandem repeat loci in the E.coli O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing , J Appl Microbiol , 98 , 928 ~ 940(2005)
- 4) Noller AC et al: Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic Escherichia coli O157: H7

- isolates, J Clin Microbiol, 41, 5389 ~ 5397(2003)
- 5) Eijia Hyytia-Tress et al :Second Generation Subtyping:A Proposed PulseNet Protocol for Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Shiga Toxin-Producing Esherichia coli O157(STEC O157) ,Foodborne Pathogens and Disease ,3 ,118 ~ 131(2006)