

腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の 分子疫学的解析法 MLVA 法と PFGE 法の比較

古田 喜美^{*1} 下村 佳^{*2} 河本 秀一^{*2} 石村 勝之
吉野谷 進 谷口 正昭 萱島 隆之^{*2} 笠間 良雄
松本 勝 荻野 武雄^{*3}

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例の精度の高い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。6種類のパルスネットパターンに分類される2004年以前に分離株80株、2005年分離株16株、堺株の計97株のSTEC O157:H7を対象に、PFGEはXba I, Bln Iで、MLVAはLindstedtらの7組およびKeysらの5組の計12組のプライマーで縦列反復塩基配列(VNTR)の有無とその繰り返し回数を解析した。その結果、同じパルスネットパターンに分類される株の多くは、MLVAでも区別できなかったが、VNTRの繰り返し回数が異なる株が数株認められた。2005年分離株は、疫学的に関連する株はPFGEとMLVAとも同じパターンを示したが、PFGEで同じクラスターに分類された株の多くがMLVAでは互いに区別された。解析に有用なプライマーペアはVhec1, Vhec3, Vhec4, Vhec7, K11, TR3, TR7で、特にVhec1は16種類に分類可能であった。

キーワード： MLVA, VNTR(s), PFGE, パルスネット, 分子疫学的解析

はじめに

広域散在型食中毒事例(diffuse outbreak)等への迅速対応を目的として、各地方衛生研究所(地研)の分離菌株を国立感染症研究所(感染研)に収集してパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析するシステム(パルスネット)の構築が進み、効果をあげている。しかし、パルスネットにおけるPFGE解析は、全国の多くの分離株の分類を行うため、Xba Iの1種類の制限酵素の切断パターンの比較により分類が行われるが、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、本法のみの解析では不十分な場合があることが指摘されている。

従って、パルスネットにおける同じ遺伝子型のSTEC分離株をさらに細かく分類し、より精度の高い疫学調査を可能とするためには、解析能の高い他の疫学マーカーの併用が必要である。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-Rep

eats)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Noller⁴⁾ら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。

昨年度の研究において、我々はパルスネットパターンND, 2a, NDを示すSTEC O157:H7を用いMLVAの基礎的研究を行った。そこで今回は、MLVAの解析性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2005年散発事例の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に加え、Keysらの5種類のプライマーペアを使用してMLVA解析を行い、PFGEの結果と比較するとともにMLVA解析に有効なプライマーセットの検討を行った。

* : 現 社会局保健部食肉衛生検査所

* : 現 社会局保健部食品保健課

* : 退職

方 法

1 供試菌株

供試菌株は、2004年以前に広島市で分離され、

感染研の PFGE 解析により6種類のパターンに分類された分離株 80 株, 2005 年の広島市および愛媛県の実験室分離株 16 株, 堺株の計 97 株を用いた(表 1)。

2 PFGE 解析

PFGE は感染研の示した PFGE New Protocol (以下, 新 PFGE 法) に準じて実施した。即ち, トリプトソイブロス(TSB)で 37 ℃, 1 夜静置培養した菌液 200 μl を 12,000rpm, 5 分間遠沈後, 沈渣を滅菌蒸留水 200 μl に懸濁し, 等量の 1% Seakem R Gold agarose を加え, サンプルプラグキャストを用いて厚み 0.7mm のプラグを調製した。1% N-lauroylsarcosine 加 1mg/ml proteinase K 処理は 50 ℃ で 4~6 時間, 4mM Pefabloc SC 加 TE での洗浄は 50 ℃ で 30 分 2 回, TE 洗浄は氷上で 30 分 1 回とした。制限酵素処理は Xba I, Bln I とともに 30units/sample を用い 37 ℃, 18~20 時間反応した。泳動装置は GenePath system(Bio-Rad)を使用し, ゲルは 1% Seakem R Gold agarose, 泳動バッファーは 0.5×TBE を用いた。電圧 6.0V/cm, パルスタイム 2.2-54.2s(linear ramp), 水温 12 ℃ の条件で 19 時間泳動後, 0.5 μg/ml ethidium bromide で染色して写真撮影した。PFGE 画像は画像解析ソフト Fingerprinting (Bio-Rad) を用いて解析した。PFGE による分類は原則として 85% 以下の相似度を示した場合異なるクラスタとし, Xba I と Bln I でのクラスタを組合せて PFGE の遺伝子型とした。ただし, 泳動ランが異なり(同一ゲルの泳動

でない), 目視的に同じ遺伝子型と推定される場合は, Fingerprinting の解析結果に関わらず同一遺伝子型とした。

3 MLVA 解析

MLVA 法の PCR 反応条件および泳動方法については, Lindstedt らの改良された方法²⁾に準じて行った。プライマーは, Lindstedt らが使用した 7 種類のプライマーペアに, Keys らが使用したプライマーのうちの PCR 増幅産物の繰返し回数のバリエーションが多い 5 種類のプライマーペアを加えた 12 種類のプライマーペアを使用した(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を用いた。菌液を 10 分間煮沸溶菌させ, 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

表 2 プライマー

名称	配列
Vhec1	-F: 5'-HEX-AGCOCGAGTTGATAOCTACG-3'
	-R: 5'-GATGOCGATGAAAAAGATAAGTT-3'
Vhec2	-F: 5'-TET-AACCGTTATGAAAGAACTOCT-3'
	-R: 5'-TCGOCGAGTAACTATGAAATC-3'
Vhec3	-F: 5'-TET-GCCCGGATGAAACTATGCTAIT-3'
	-R: 5'-GCCGCTATTTTTAOCACCTGACTA-3'
Vhec4	-F: 5'-FAM-ATCGOCTTCCTOCTGTAATG-3'
	-R: 5'-CTCCTGCGCTCAGACAGTG-3'
Vhec5	-F: 5'-FAM-CTCAGCGCGCGTTAAGCTGTAGC-3'
	-R: 5'-TCGCGGAGTTCAGAGAAAAATAA-3'
Vhec6	-F: 5'-HEX-ACGTTAAACCGGAAATGAAAAATC-3'
	-R: 5'-GAGCGAAAAATGTTCTATCTTACG-3'
Vhec7	-F: 5'-FAM-ATGCGCGTTAGCTACAGACA-3'
	-R: 5'-TGAAGCCGACACCATGCGATAAT-3'
TEB3	-F: 5'-HEX-GCAGTGTCTCGTTTTAACATTGCAGGATGAC-3'
	-R: 5'-GGAATGTTTTACATGAGTTGACGATGCGATC-3'
TEB4	-F: 5'-FAM-GCCGAGGAGGCTGATGACCGGTTATTTAGTG-3'
	-R: 5'-GGGCTGAAAAGACATCTCTGTTTTGTTTACAGAC-3'
TEB7	-F: 5'-TET-GCAGTGATCATTATTAGCAOCTTTCTGGATGTTTC
	-R: 5'-GGGGCAGGGAATAAGGCAOCTTTTAAAGC-3'
E11	-F: 5'-HEX-GACCGGCAATCATCGGCAACA-3'
	-R: 5'-GATGCTGAAAAACTGATGAGACTCGGTT-3'
E37	-F: 5'-TET-GCCGOCCTTACATTACGCGGACATTC-3'
	-R: 5'-GCAGGAGACACAACAACACAGCAGTAATCAGACGACG-3'

表 1 供試菌株

パルスネット パターン	菌株 No.	株数
2004 年以前の分離株		
ND,2a,ND	1~27	27
2a,ND,1	28~47	20
2c,ND,1	48~54	7
2a,2a,1	55~67	13
2d,2b,ND	68~77	10
3k,ND,3	78~80	3
広島市分離株	*	11
2005 年分離株		
愛媛県分離株	ST-4,6,7,8,9	5
堺株		1
計		97

* 広島市分離菌株 No :

5002 ~ 5005, 5010, 5011, 5013, 5016, 5017, 5020, 5021

表 3 PCR 反応条件

反 応	温度条件	
初期変性	94	15 分
変性	94	30 秒
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

Polymerase(5U/μl)0.1μl, DNA テンプレート2μl 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 および Mix2 の増幅産物各 1μl を滅菌精製水 18μl と混合し,その混合希釈液 1μl

に,ホルムアミド 12μl およびサイズマーカー(CHIMERx : GeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label, 50-625bp)1μl を加えたものと, Mix3 の増幅産物 1μl を滅菌精製水 19μl と混合し,その混合希釈液 1μl に,ホルムアミド 12μl およびサイズマーカー1μl を加えたものの 1 検体につき 2 本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, GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems)で解析を行った。デンドログラムは Fingerprinting で作成した。増幅産物の繰返し回数の算出は,各プライマーごとに,表 4 に示す計算式に基づいて行った。

表 4 VNTR の配列と増幅産物の大きさ (bp)

primer	VNTR の配列	増幅産物
Vhec1	TGGCTC	335+6 x n
Vhec2	AGTTAAATAATTCGCAGG	382+18 x n
Vhec3	AAGGTG	464+6 x n
Vhec4	AAATAG	495+6 x n
Vhec5	TCTGGCGGAACTGGCG- -TATCACCGCCGTCA	295+30 x n
Vhec6	TCGGTACTGTCATTGGC- -TTGTTTA	259+24 x n
Vhec7	ACCTCAC	255+7 x n
TR3	TATCTT	120+6 x n
TR4	TGCAAA	112+6 x n
TR7	GACCAC	272+6 x n
K11		187+6 x n
K37		142+6 x n

N は繰返し数

結 果

1 PFGE 解析結果

PFGE によるデンドログラムの分類は,原則として 85% 以下の相似度を示した場合,異なる遺伝子型としてクラスタ分けを行った。パルスネットパターン別の Xba I および Bln I による PFGE の解析結果を図 1~6 に示した。

ND,2a,ND 株では,Xba I は全ての株が 95.5% 以上の相似度を示し,1 種類に分類された(クラスタ A)。Bln I は,No.10,11,15 が他の株と 84.3%の相似度示し,2 種類に分類された(B,C)。遺伝子型は 2 種類に分類された(A-B, A-C)。

2a,ND,1 株では,Xba I は,クラスタは D~F の 3 種類に分類された。No.38~47 の相似度は,93.7%となり,D に分類された。No.28 は単独のクラスタを形成し,E に分類された。No.29~37 の相似度は,90.1%となり F に分類された。Bln I は,クラスタは G~I の 3 種類に分類された。No.28~30, 32~37 の相似度は,91.2%となり,G に分類された。No.31 は単独のクラスタを形成し,H に分類された。No.38~47 の相似度は 94.8%となり,I に分類された。遺伝子型は 4 種類に分類された(D-I, E-G, F-G, F-H)。

2c,ND,1 株では,全ての株が Xba I で 96.3% 以上,Bln I で 97.4% 以上の相似度を示し,1 種類の遺伝子型に分類された(J-K)。

2a,2a,1 株では,Xba I は,No.55,56 が他の株と 80.9%の相似度示し,2 種類に分類された(L,M)。しかし,これらの株の泳動像のバンド本数は,他の株と同じであることから,同一グループとした。Bln I は,全ての株が 93.4% 以上の相似度を示し,1 種類に分類された(N)。遺伝子型は 1 種類に分類された。(ML-N)。

2d,2b,ND 株では,Xba I は No.68 と 71 を除く全ての株が 94.8% 以上の相似度を示し,2 種類に分類された(O,P)。Bln I は,全ての株が 96.6% 以上の相似度を示し,1 種類に分類された(Q)。遺伝子型は 2 種類に分類された(O-Q,P-Q)。

3k,ND,3 株では,Xba I は全ての株が 94.9% 以上の相似度を示し,1 種類に分類された(R)。また,Bln I は,酵素量や,泳動条件を変えて実施しても,バンドが検出できず,解析を行うことができなかった。

2005 年に広島市および愛媛県で分離された O157:H7 散発事例株の Xba I および Bln I による PFGE の解析結果を,図 7 に示した。

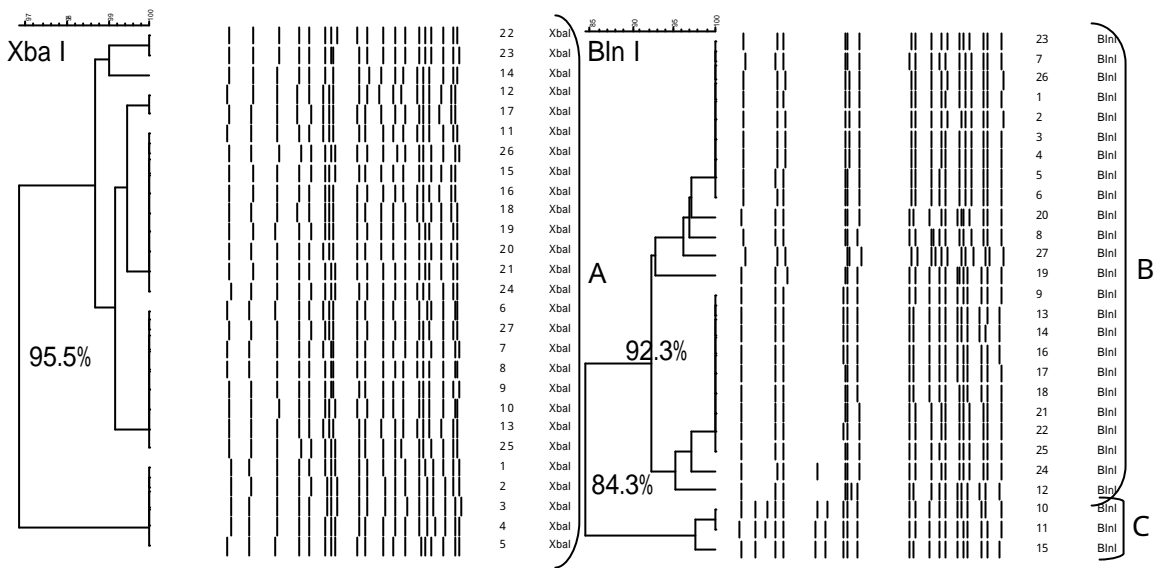


図 1 PFGE デンドログラム (ND, 2a, ND)

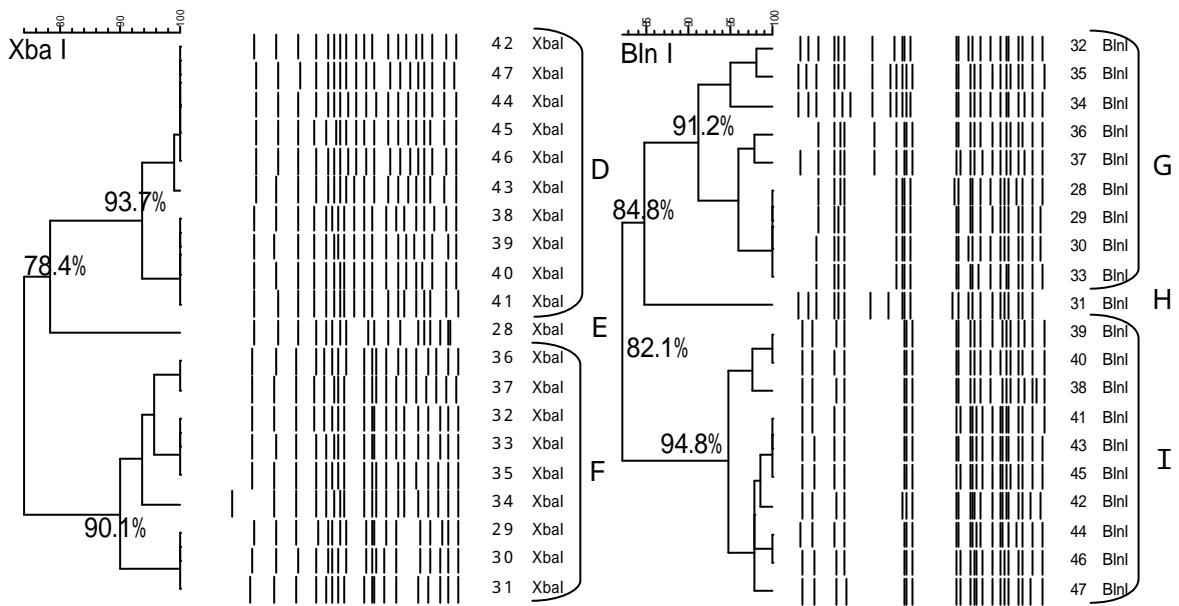


図 2 PFGE デンドログラム (2a, ND, 1)

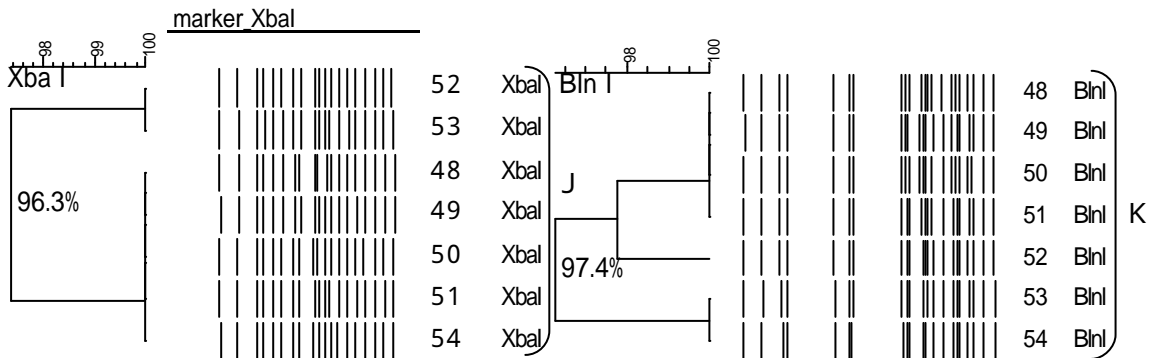


図 3 PFGE デンドログラム (2c, ND, 1)

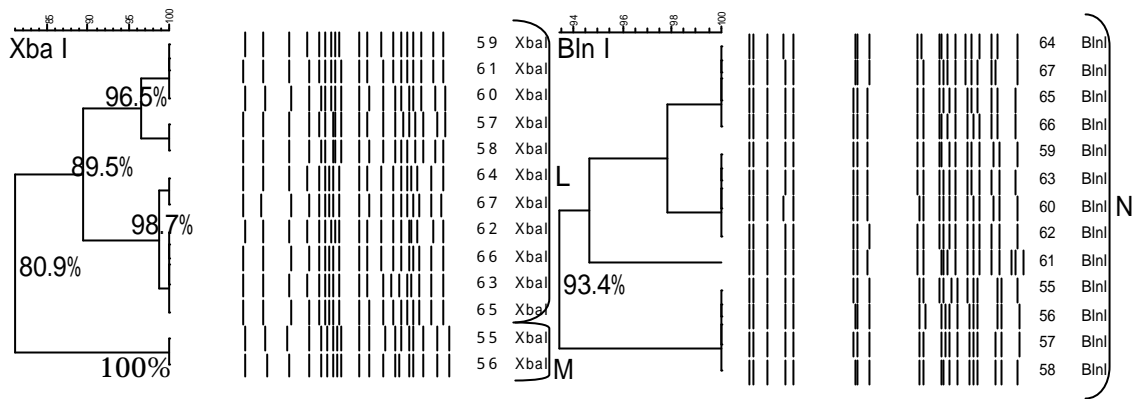


図 4 PFGE デンドログラム (2a, 2a, 1)

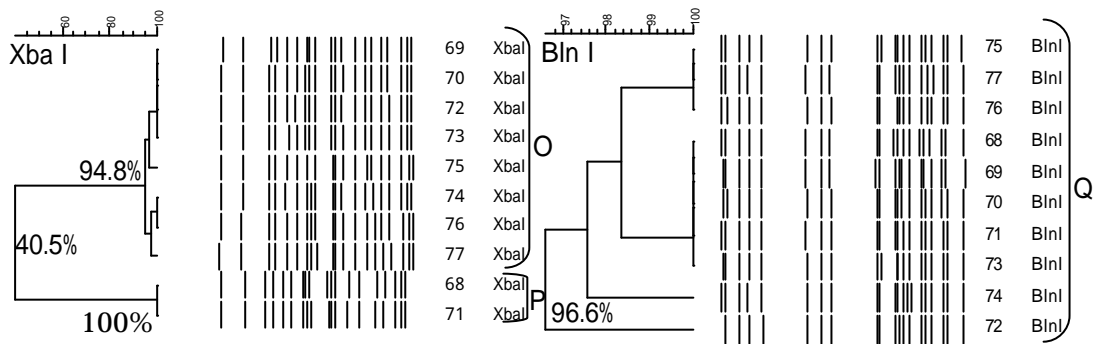
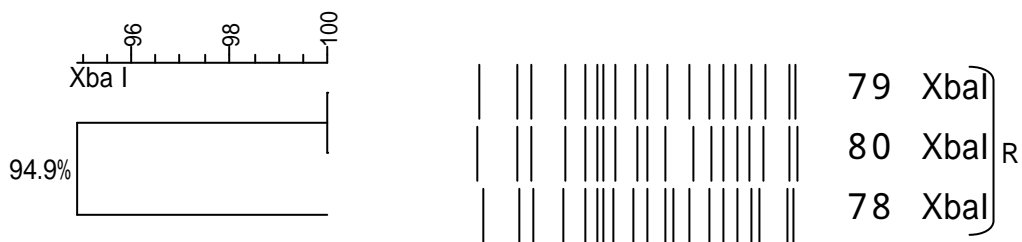
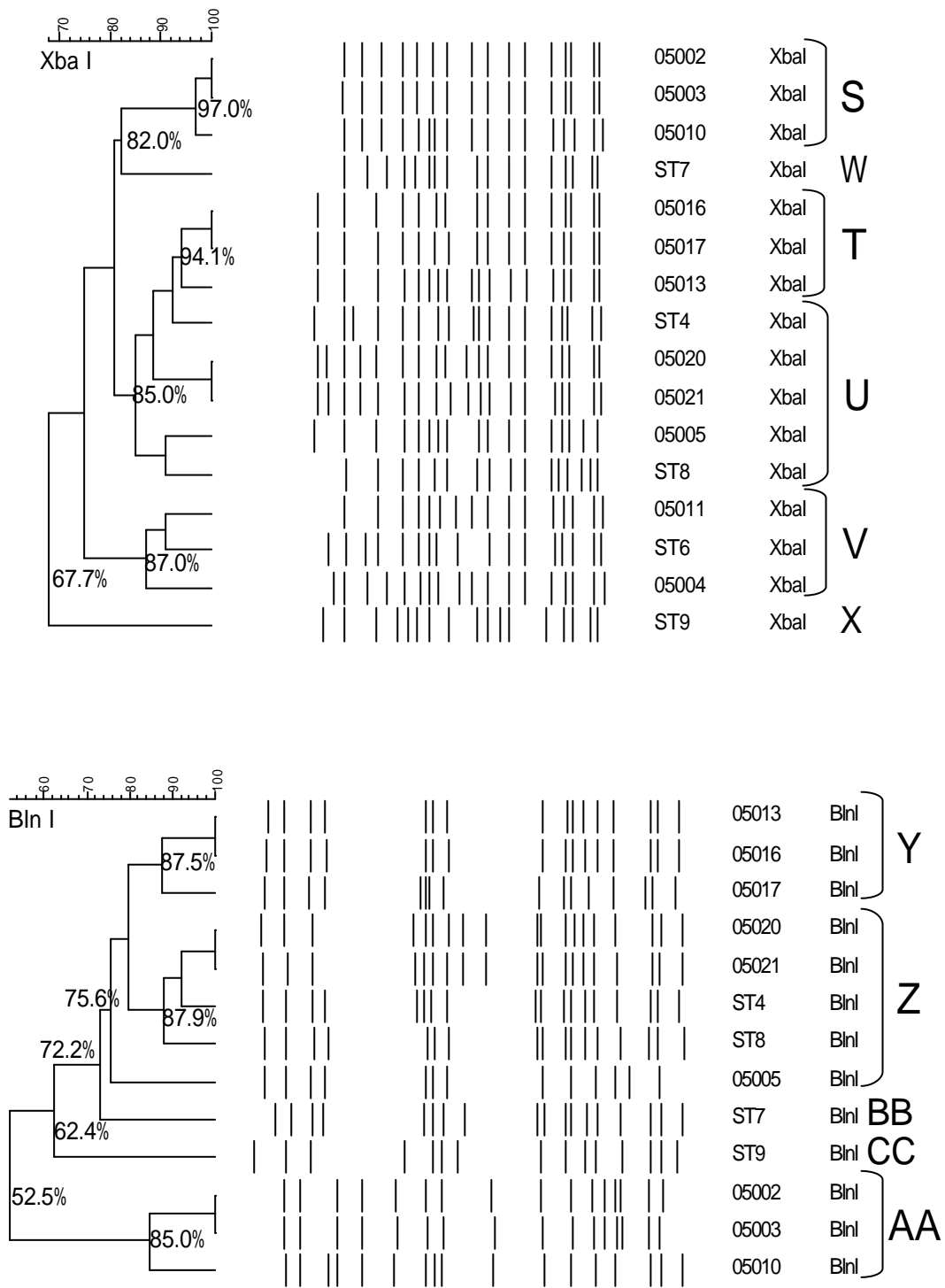


図 5 PFGE デンドログラム (2d, 2b, ND)



Bln I では、バンドを検出することができなかった。

図 6 PFGE デンドログラム (3k, ND, 3)



* クラスタ V の株は Bln I ではバンドを検出することができなかった。

図 7 PFGE デンドログラム (2005 年散発事例分離株)

散発事例株であるため、デンドログラムも、パルスネットパターン別のデンドログラムと比較して、全ての株の相似度が低い値を示した。Xba I は、クラスタはS-Xの6種類に分類された。05002, 05003, 05010の相似度は97.0%となり、Sに分類された。05013, 05016, 05017の相似度は94.1%となり、Tに分類された。05005, 05020, 05021, ST4, ST8の相似度は85.0%となり、Uに分類された。05004, 05011, ST6の相似度は87.0%となり、Vに分類された。ST7およびST9は、それぞれ単独のクラスタに分類された(W,X)。Bln I は、クラスタはY Z, AA, BB, CCの5種類に分類された。05013, 05016, 05017の相似度は87.5%となり、Yに分類された。05005, 05020, 05021, ST4, ST8の相似度は87.9%となり、Zに分類された。05002, 05003, 05010の相似度は85.0%となり、AAに分類された。ST7およびST9は、それぞれ単独のクラスタに分類された(BB,CC)。05004, 05011, ST6は、酵素量や、泳動条件を変えて実施してもバンドが検出できず、解析できなかった。遺伝子型は、6種類に分類された(S-AA, T-Y, U-Z, V, W-BB, X-CC)。

2 MLVA 解析結果

MLVAによる97株分の結果をプライマーペア別に図8-1, 8-2にまとめた。

(1) Lindstedt のプライマーペア別による VNTR 繰返し回数結果 (図 8-1)

Vhec1では、増幅産物が得られないもの(無)と、繰返し回数が10, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 37, 39, 40, 41, 45, 46, 48, 49回の16種類が認められた。パルスネットパターン別では、2a, ND, 1株が繰返し回数45, 46, 49回の3パターン、2c, ND, 1株が37, 39, 40回の3パターン、2d, 2b, ND株が24, 25回の2パターンのパリエーションがあった。一方、2005年散発事例由来株では、無, 16, 20, 23, 25, 27, 30, 46の8パターンが認められた。

Vhec2では、1, 2, 4, 5回の4種類が認められた。パルスネットパターン別では、2a, 2a, 1株が2, 5回の2パターンが認められた。2005年散発事例由来株では、1, 2, 4, 5回の4パターンが認められた。

Vhec3では、無, 0, 1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 21回の11種類が認められた。パルスネットパターン別では、2a, ND, 1株が4, 5, 6回の3パターンが認められた。一方、2005年散発事例由来株では、無, 1, 6, 9, 10, 11, 14, 21回の8パターンが認められた。

Vhec4では、無, 3, 6, 7, 8, 9, 12, 13回の8種類が

認められた。パルスネットパターン別では、2a, ND, 1株が7, 8回の2パターンが認められた。2005年散発事例由来株では、無, 3, 7, 8, 13回の5パターンが認められた。

Vhec5では、1, 6回の2種類が認められた。パルスネットパターン別では、すべての株において繰返し回数と同じ6回であった。2005年散発事例由来株では、1株のみ繰返し回数が1回で、残りの株はすべて6回であった。

Vhec6では、1, 3回の2種類が認められた。パルスネットパターン別では、すべてが同じ繰返し回数3回であった。また、2005年散発事例由来株では、1株のみ繰返し回数が1回で、残りの株はすべて3回であった。

Vhec7では、1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15回の9種類が認められた。パルスネットパターン別では、2c, ND, 1株が5, 7回の2パターンが認められた。また、2005年散発事例由来株では、1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 回の7パターンが認められた。

(2) Keys のプライマーペア別による VNTR 繰返し回数結果 (図 8-2)

TR3では、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9回の7種類が認められた。パルスネットパターン別では、2a, ND, 1株が7, 8回の2パターンが認められた。また、2005年散発事例由来株では、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 回の7パターンが認められた。

TR4では、2, 3, 4回の3種類が認められた。パルスネットパターン別では、パターンごとにすべてが同じ繰返し回数であった。また、2005年散発事例由来株では、繰返し回数が2, 3, 4回の3パターンが認められた。

TR7では、4, 6, 7, 8, 9, 10回の6種類が認められた。パルスネットパターン別では、パターンごとにすべてが同じ繰返し回数であった。また、2005年散発事例由来株では、繰返し回数が4, 6, 7, 8, 10回の5パターンが認められた。

K11では、4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14回の8種類が認められた。パルスネットパターン別では、ND, 2a, ND株が5, 6回の2パターンが認められた。また、2005年散発事例由来株では、4, 5, 6, 9, 11, 12回の6パターンが認められた。

K37では、4, 5, 6, 7, 8回の5種類が認められた。パルスネットパターン別では、パターンごとにすべてが同じ繰返し回数であった。また、2005年散発事例由来株では、繰返し回数が5, 6, 7, 8回の4パターンが認められた。

各プライマーによる供試97株のVNTRの繰返し回

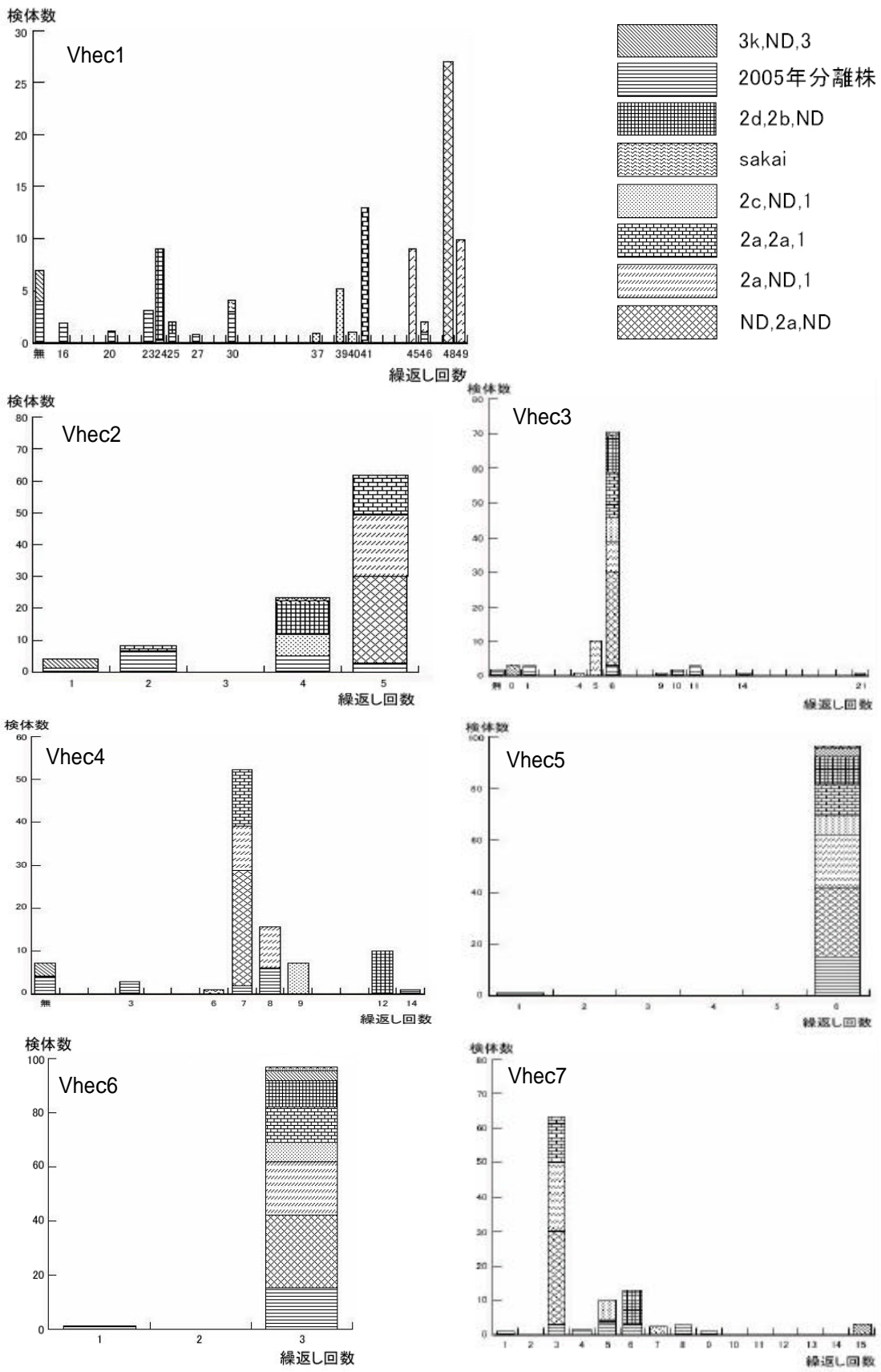


図 8-1 Lindstedt のプライマーによる MLVA 繰返し回数結果

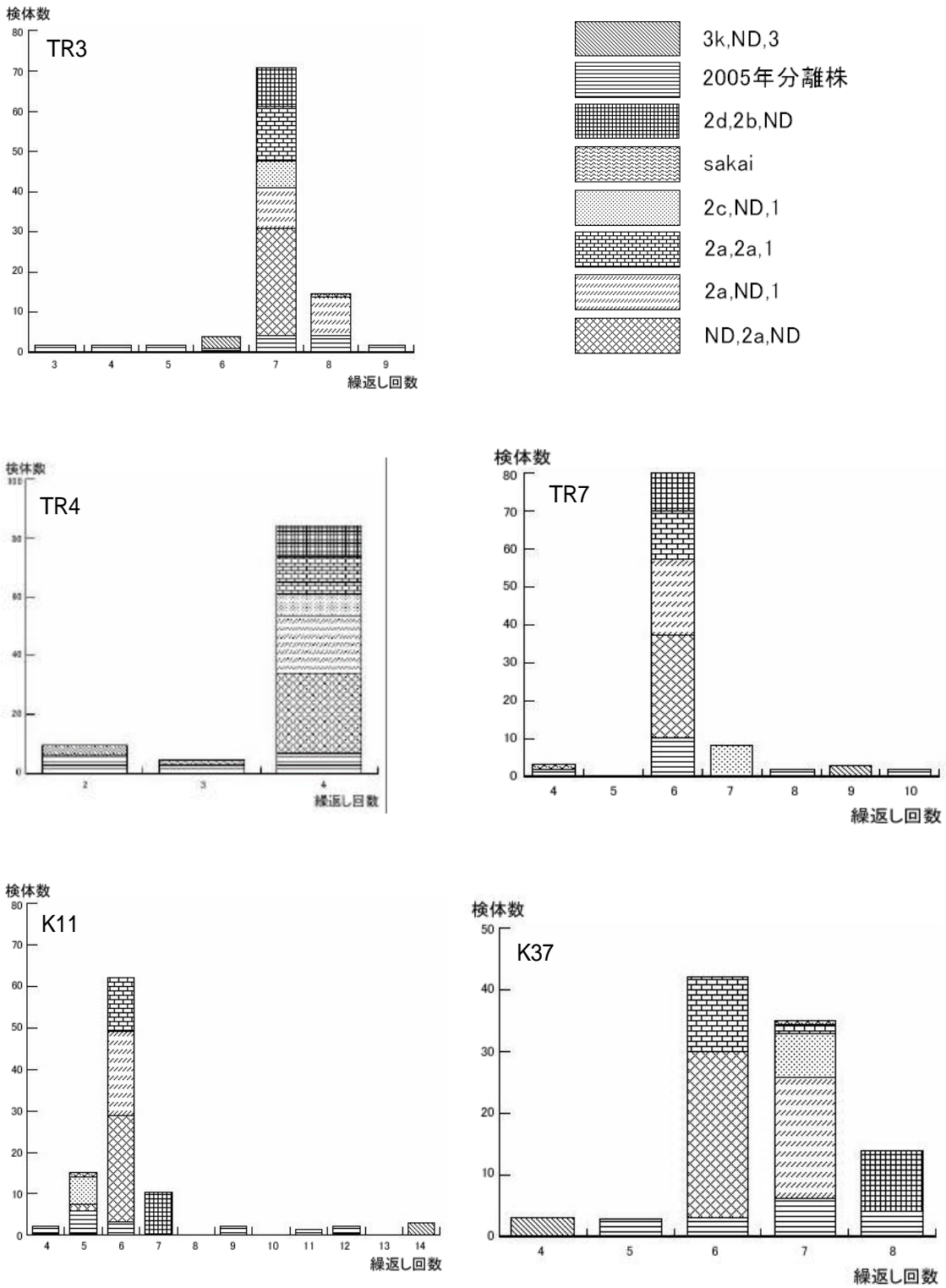


図 8-2 Keys のプライマーによる MLVA 繰返し回数結果

表5 プライマー別の VNTR の繰返し回数

primer	繰返し回数	種類
Vhec1	0,10,20,23,24,25,27,30,37, 40,41,45,46,48,49	16
Vhec2	1,2,4,5	4
Vhec3	無,0,1,4,5,6,8,10,11,14,21	11
Vhec4	無,3,6,7,8,9,12,13	8
Vhec5	1,6	2
Vhec6	1,3	2
Vhec7	1,3,4,5,6,7,8,9,15	9
TR3	3,4,5,6,7,8,9	7
TR4	2,3,4	3
TR7	4,6,7,8,9,10	6
K11	4,5,6,7,9,11,12,14	8
K37	4,5,6,7,8	5

N は繰返し数

数を表 5 にまとめた。最も分類数が高かったプライマーは Vhec1 で 16 種類に分類された。以下, Vhec3(11 種類), Vhec7(9 種類), Vhec4 と K11(8 種類), TR3(7 種類), TR7(6 種類) の順に分類数が多かった。

(3) パルスネットパターン別の MLVA 解析結果 (図 9 ~ 14)

ND,2a,ND 株 (菌株 No.1 ~ 27) では, 27 株中 26 株は同じパターンを示したが, 菌株 No.6 は K11 プライマーでの結果が, 他の株と異なった。

2a,ND,1 株 (No.28 ~ 47) では, 全 20 株は, No.28 ~ 30,32 ~ 37(9 株), No.38,40 ~ 45,47(8 株), No.46(1 株), No.39(1 株), No.31(1 株) の 5 種類に分けられた。これらは, Vhec1,3,4,TR3 プライマーの繰返し回数の違いで, No.28 ~ 37 と No.38 ~ 47 の 2 群に大きく分けられた。

2c,ND,1 株 (No.48 ~ 54) は, No.49 ~ 52(4 株), No.48(1 株), No.53(1 株), No.54(1 株) の 4 種類に分けられた。

2a,2a,1 株 (No.55 ~ 67) では, 13 株中 12 株は同じパターンを示したが, No.59 のみ Vhec2 プライマーでの結果が, 他の株と異なった。

2d,2b,ND 株 (No.68 ~ 77) では, 10 株中 9 株は同じパターンを示したが, 菌株 No.71 のみ Vhec1 プライマーでの結果が, 異なった。

3k,ND,3 株 (No.78 ~ 80) では, すべての株が同じパターンを示した。また, これらの株は, Vhec1 と Vhec4 の増幅産物は見られなかった。

O157:H7 散発事例株の PFGE の結果から分類された株の MLVA 解析結果を, 図 15 ~ 19 に示した。

クラスタ T-Y の 3 株 (No.05013,05016,05017) は, すべての株が同じパターンを示した。

クラスタ U-Z の 5 株 (No.05005,05020,05021,ST4,ST8) は, No.05020,05021 (2 株), No.ST8(1 株), No.ST4 (1 株), No.05005(1 株) の 4 種類に分けられた。

クラスタ S-AA の 3 株 (No.05002,05003,05010) およびクラスタ V の 3 株 (No.05004,05011,ST6) は, 全て異なるパターンを示した。

クラスタ W-BB 株 (No.ST7) と X-CC 株 (No.ST9) は, いずれも他の株と一致しない異なったパターンを示した。

考 察

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ことから, 昨年度の研究で, 本方法の予備的な検討を行った。しかし, MLVA 解析で得られたチャートの波形のピークは大小様々でノイズと目的とするピークとの区別が困難なピークもみられ, 解析を行うには, PCR 条件の変更検討に加え, 電気泳動においても改良が必要であった。2004 年, Lindstedt らは改良した MLVA を報告したことから, その方法に基づき, PCR 反応では, 初期変性, アニールング, 伸張反応を, 昨年度の条件から大幅に変更し検討を行った。その結果, ノイズが減少し目的とするピークの特定が容易になった。さらに, 増幅産物の多くは 120 ~ 630bp の大きさであり サイズマーカーも Applied Biosystems 社の GeneScan™ 500 TAMRA™ Size Standard 35-500bp を使用すると 600bp 以上の増幅産物の大きさが計測できないため, サイズマーカーを CHIMERx 社の GeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label 50-625bp に変更して電気泳動を行った。その結果, 分子量からの VNTR の繰返し回数の算出も幅広く可能となり, 再現性のある結果が得られた。そこで, 今回は, 堺株を含めた O157:H7 株全 97 株を用いて, Xba I および Bln I による PFGE と, Lindstedt らの 7 種類のプライマーに Keys らの 5 種類のプライマーを加えた 12 種類のプライマーでの MLVA 解析を実施し, MLVA 法と PFGE 法の比較と, MLVA 解析に有用なプライマーの選定を行った。

ND,2a,ND 株では, Xba I と Bln I で No.10,11,15 とそれ以外の株で 2 種類の遺伝子型に分類されたが, MLVA の結果は, 菌株 No.6 が K11 の繰返し回数の違いにより, 他の株と区別ができるのみで, PFGE と MLVA との分類は異なっていた。

2a,ND,1 株では, Xba I で 3 つのクラスタに分類されたが, そのうちの F, D のクラスタが, No.31,39,46 を除いて MLVA でも Vhec1,3,4, および TR3 で 2 種類に

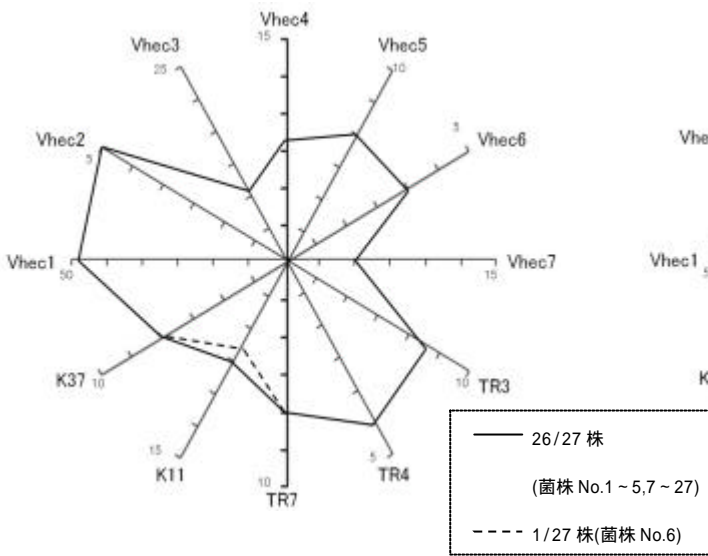


図9 MLVA 解析結果 (ND,2a,ND 全 27 株)

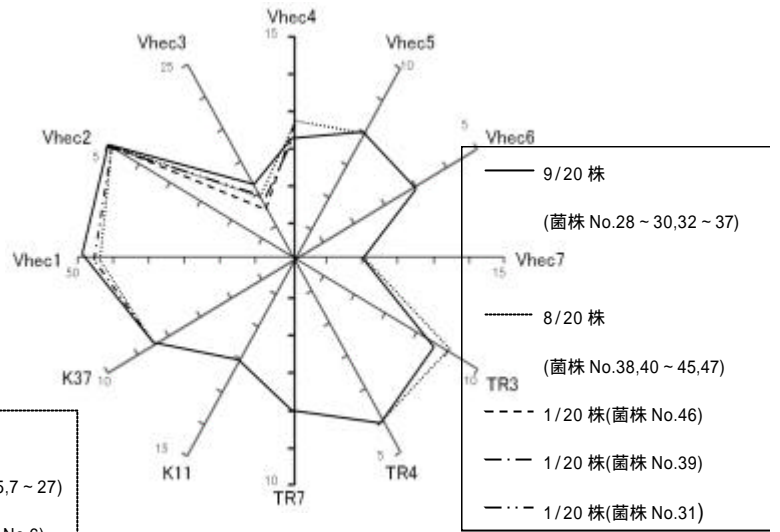


図10 MLVA 解析結果 (2a,ND,1 全 20 株)

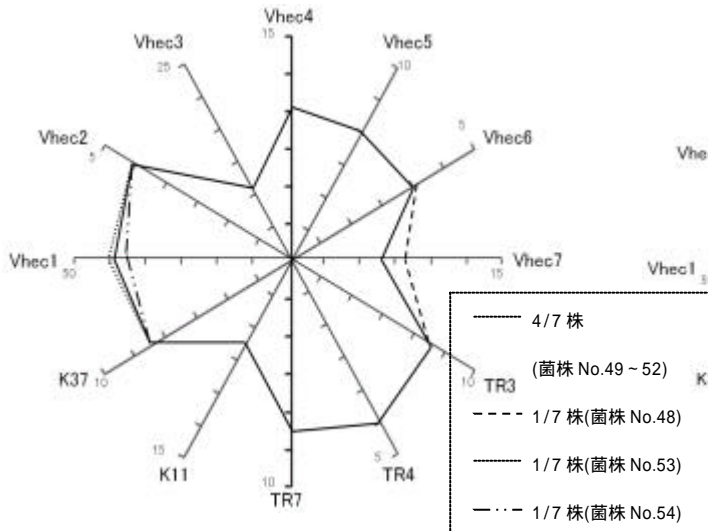


図11 MLVA 解析結果 (2c,ND,1 全 7 株)

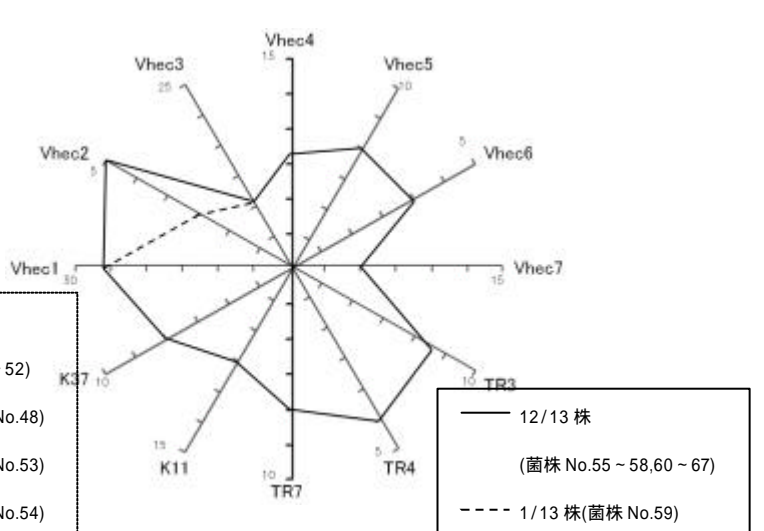


図12 MLVA 解析結果 (2a,2a,1 全 13 株)

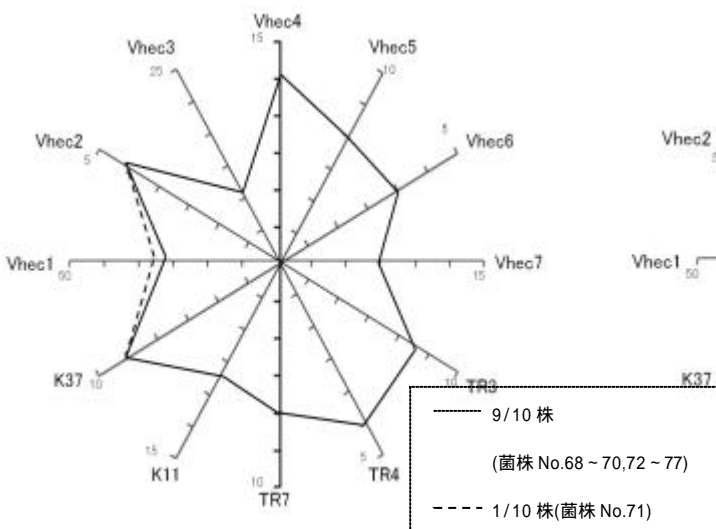


図13 MLVA 解析結果 (2d,2b,ND 全 10 株)

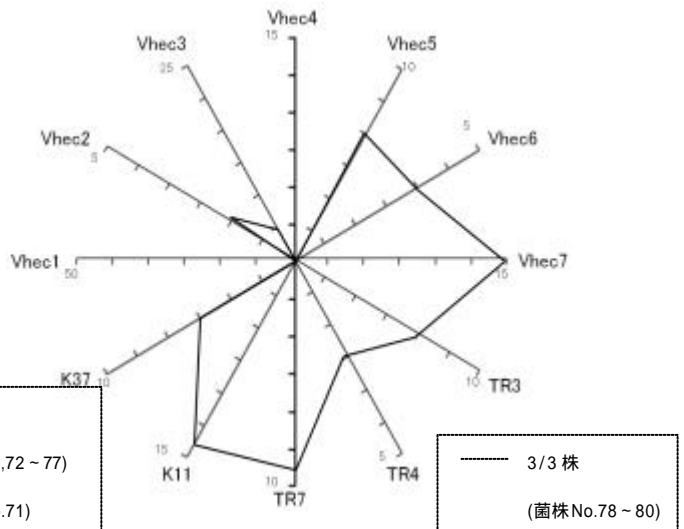


図14 MLVA 解析結果 (3k,ND,3 全 3 株)

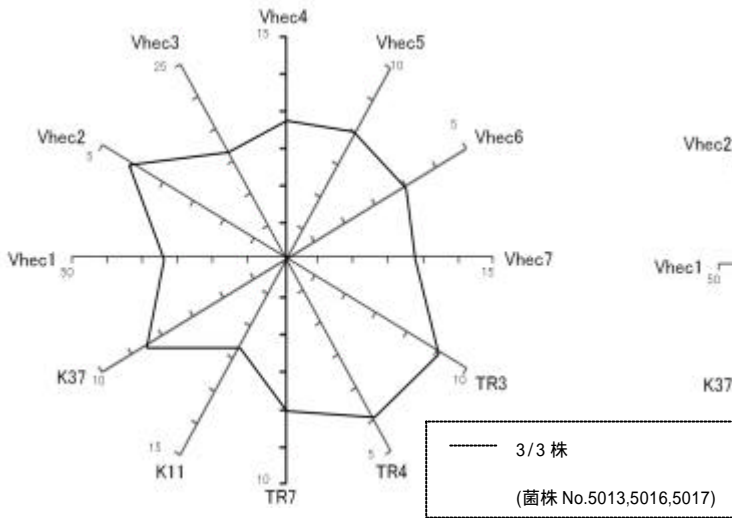


図 15 MLVA解析結果 (2005年 T-Y 全 3 株)

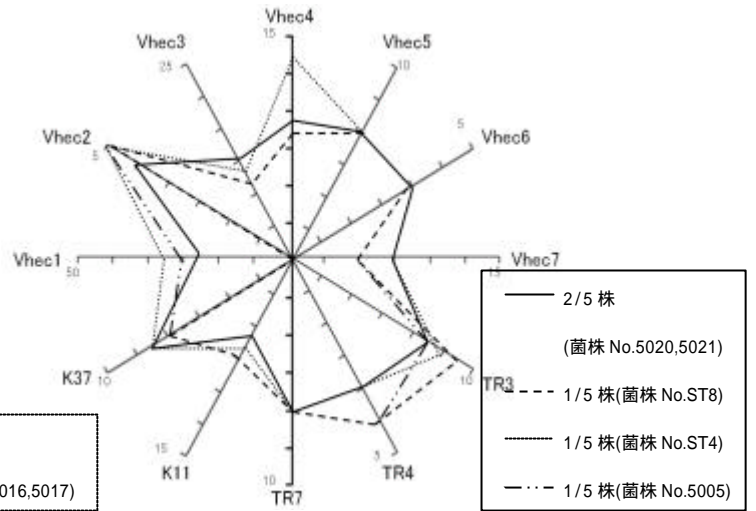


図 16 MLVA解析結果 (2005年 U-Z 全 5 株)

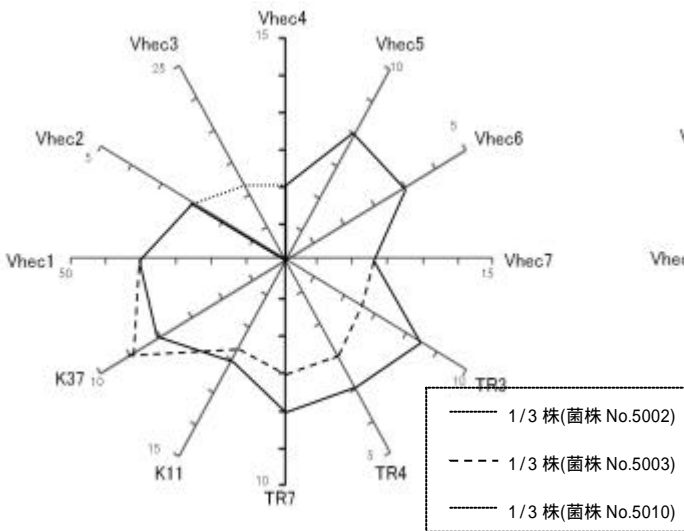


図 17 MLVA 解析結果 (2005 年 S-AA 全 3 株)

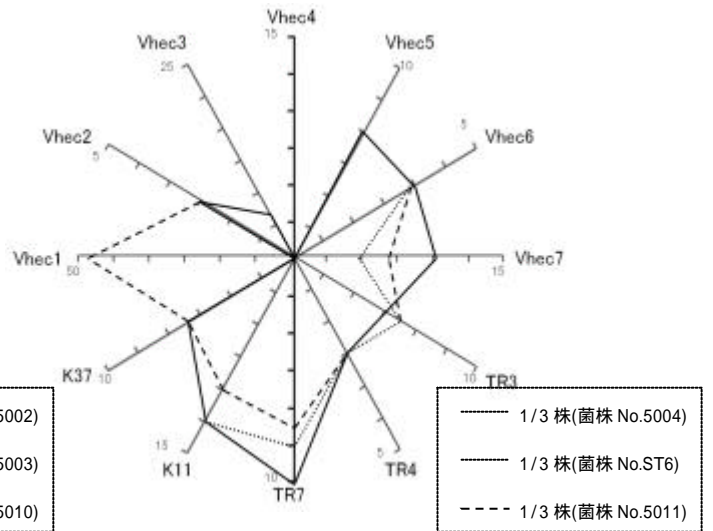


図 18 MLVA 解析結果 (2005 年 V 全 3 株)

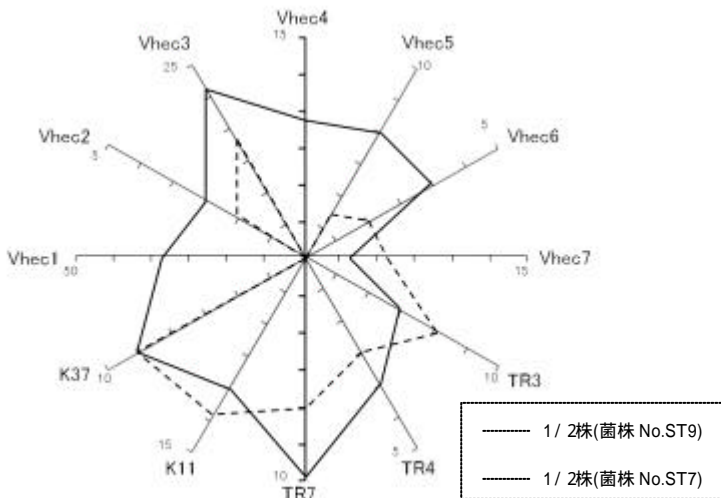


図 19 MLVA 解析結果 (2005 年 X-CC, W-BB 全 2 株)

分類され、両法の分類がおおまかに一致した。また、No.28 は、PFGE では E-G 遺伝子型に分類されるものの MLVA では F-G 遺伝子型と区別することができなかったが、Bln I で独立したクラスタを形成した No.31 の F-H 遺伝子型は MLVA では Vhec3 で区別が可能であり、PFGE では D-I 遺伝子型を示した No.39,46 は、それぞれ Vhec1,3 で他の D-I 遺伝子型株と区別することができた。

2c,ND,1 株では、Xba I と Bln I で 1 種類の遺伝子型に分類されたが、MLVA は、4 種類の遺伝子型に分類された。PFGE で J-K 遺伝子型を示した No.49 ~ 52 群と No.48,53,54 は、Vhec1 または Vhec7 の繰返し回数の違いにより区別することができた。

2a,2a,1 株では、Xba I と Bln I で、バンドのゆらぎがあるものの、その本数は等しく 1 種類の遺伝子型に分類された。MLVA では PFGE で L(M)-N 遺伝子型を示した No.59 が Vhec2 の繰返し回数の違いにより他の株と区別することができた。

2d,2b,ND では、Xba I で、No.68,71 が単独クラスタを形成したが、両菌株は初回の PFGE でバンドが現れず、後日に再検査を行った。PFGE は泳動する度に、様々な要因によりバンドにゆらぎと本数の差が生じる。そのため、このように初回に検査したものと再検査したものでは、泳動パターンが異なり、デンドログラムで、2 種類のクラスタを形成したのではないと思われた。しかし、Bln I では全ての株が 96.6% 以上の相似度で 1 種類のクラスタに分類された。このことから、2d,2b,ND 株全てが、PFGE では 1 種類の遺伝子型に分類されるのではないかと思われた。また、No.71 は、PFGE では O(P)-Q 遺伝子型に分類されるものの MLVA では Vhec1 で他の O(P)-Q 遺伝子型株と区別することができた。

3k,ND,3 株では、Xba I で 1 種類に分類されたのみで、Bln I は、酵素量や泳動条件の変更、プラグ洗浄の徹底に気をつけ PFGE を実施したが、バンドが検出されなかった。MLVA では、Xba I と同様に 1 種類に区別され、両法の分類が一致した。

2005 年散発事例株では、Xba I と Bln I で、同一遺伝子型に分類された S-AA, T-Y, U-Z, V は、MLVA では、T-Y 群(菌株 No.05013,05016,05017)の株は、PFGE と MLVA で分類が一致したが、その他の株は、PFGE と MLVA の分類で一致しなかった。パルスネット情報からも、広島市と愛媛県で共通パターンの報告は無かったことから、これらは、異なった株による STEC 感染症であり、パルスネットと MLVA 解析結果でその分類は一致した。

今回、97 株の O157:H7 株を使用して MLVA 解析を行った結果から、Lindstedt と Keys のプライマーにおいて、MLVA に有用なプライマーの組合せは、Vhec1・Vhec3・Vhec4・Vhec7・TR3・TR7・K11 であることが分かった。特に Vhec1 のプライマーは最も細かく分類が可能であった。また、上述のプライマーセットに Vhec2 と K37 を加えれば、さらに細かく識別ができると思われた。

以上の結果、MLVA はこれまでの報告と同様に PFGE と同等の解析性を持つことが示された。PFGE は、泳動条件や電気泳動装置の違い、異なる電気泳動ランによる泳動パターンのわずかな変化、デンドログラム作成におけるバンドの位置決定の個人差など様々な要因によって影響を受けるため、再現性や結果の客観性に問題点が指摘されている。このことは、PFGE が電気泳動の画像データに基づいている以上、解決できない根本的な問題であり、異なる研究室での検査結果の比較を困難にする最大の理由となっている。また、操作が煩雑であることから検査結果を得るまで数日を必要とするため、感染源の特定や予防対策など検査結果を行政に反映することが困難な場合も多い。一方 MLVA は、VNTR 領域の有無およびその繰返し回数により低分子の PCR 増幅産物を比較するため再現性が高く、検査結果を数値として得ることができ、株間の比較が客観的に行える。使用するプライマーの数により、スクリーニング的な使用からより詳細な分類も可能、1 日以内で解析が可能であることから迅速性に優れる、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ためには、散発事例に応じたプライマーの選定が重要であり、今後数多くの O157:H7 分離株について検討を重ねる必要がある。

6 種類のパルスネットパターンに分けられた O157:H7 株と 2005 年に広島市および愛媛県で分離された O157:H7 株計 97 株について、複数の制限酵素を使用した PFGE 解析に加え MLVA による解析を行った結果、PFGE と MLVA の結果はおおむね一致し、MLVA と PFGE の同等の解析能を確認することができた。また、使用した 12 種類のプライマーペアのうち 7 種類は、O157:H7 の MLVA 解析に有用なプライマーペアと考えられた。

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 Microb Anti microb* 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)