

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析法の検討 ～ MLVA および IS-printing System ～

末永 朱美 国寄 勝也 蔵田 和正 石村 勝之
伊藤 文明 笠間 良雄

はじめに

腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学的解析法として、現在制限酵素による DNA 切断パターンの比較によるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)が広く用いられているが、操作が煩雑であり、解析に3日を要する。そこで近年、より迅速に結果が出せる DNA 多型解析法として、縦列反復塩基配列 (Variable Number Tandem Repeats : VNTR) を利用した Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis(MLVA)や、IS 構造多形性を示すゲノム領域を標的とした IS-printing System などが開発された。この MLVA 解析や IS-printing System を用いて、腸管出血性大腸菌 O157 のサブタイピングを行い PFGE 法と比較し、その有用性を検討した。

方 法

1 供試菌株

2006 年度と 2007 年度に広島市で分離され国立感染症研究所(感染研)にて PFGE Type No.(以下、TN)a259 と分類された菌株 8 株, TN b129 1 株, TN c73 1 株, TN b423 1 株, 計 11 株を用いた(表 1)。これをグループ A とする。また、2007 年度に広島市内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染事例の患者から分離した菌株からの再分離コロニー 5 株および糞便から分離した 15 株, 計 20 株を試験菌株として用いた。これをグループ B とする。

2 IS-printing System 解析

IS-printing System (東洋紡) のキットを用いて添付書類の記載条件で PCR を実施した。解析は Fingerprinting (Bio-Rad) を用いて行った。

3 MLVA 解析

PCR は Trees らの 9 組のプライマー(以下「Keys Set」)を用いた¹⁾。繰り返し回数(リピート数)は表 2 の式に基づいて計算し、小数点第一位を四捨五入して整数とした。

結 果

1 IS-printing System 解析

グループ A のうち TN a259 の株は 8 株とも同じバンドパターンを示した。TN b129 と TN c73 はそれぞれ異なるバンドパターンを示し、PFGE による感染研バンドパターンとほぼ同じクラスタを形成した。同一検体から分離したグループ B は全て同じバンドパターンを示した。

2 MLVA 解析

グループ A について MLVA を行った結果、リピート数は表 3 に示した。グループ B についてリピート数は表 4 に示した。

ま と め

IS-printing System では TN a259 と分類された 8 株と、同一の患者の糞便またはコロニーから分離された 8 株は同一のバンドが得られ、他の TN のものとは、異なるクラスタを形成した(図 2)。これは、おおむね PFGE のクラスタ解析と一致した。迅速性、簡便性という点でキット化されている IS-printing System は大変優れており、今後広域の疫学解析において有力な手段となることが期待される¹⁾。

MLVA では TN a259 の 8 株の間でほぼ一致したリピート数を示した。K25, K17 においてリピート数が 1 違う株があるなど変異もみられたが、グループ B のリピート数を見ても同一検体由来株においても Single Locus Variant でかつリピート数が 1 違いである変異株は 3 株存在していることから、Single Locus Variant でかつリピート数が 1 違い程度である変異は同一由来株と考えられる。また K10 における変異は最も頻繁に起こると考えられ、PFGE よりもさらに詳細な解析が可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 主任研究者 寺嶋淳: 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究, 新興・再興感染症研究事業平成 18 年度総括・分担研究報告書(2007)

表 1 供試菌株

菌株番号	感染研 TN	VT type	血清型
6021			
6022			
6025			
6026			
7007	a259	VT1+VT2	
7011			O157:H7
7014			
7015			
6023	b129		
7003	c73		
7024	b243	VT2	

表 2 増幅産物のリピート数

VNTR loci	増幅産物 (bp)
K3	321+6n
K9	465+6n
K25	110+6n
K34	100+18n
K17	120+6n
K19	272+6n
K36	102+7n
K37	142+6n
K10	269+6n

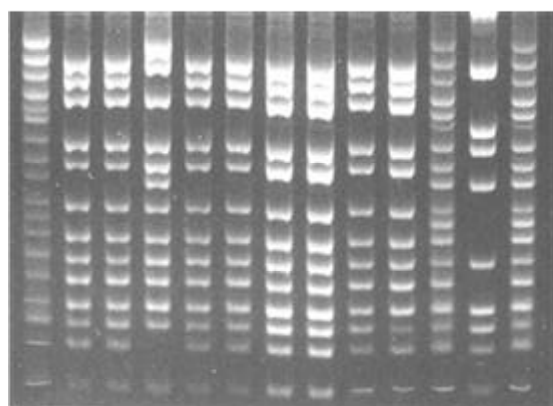
n: リピート数

表 3 グループ A における VNTR のリピート数

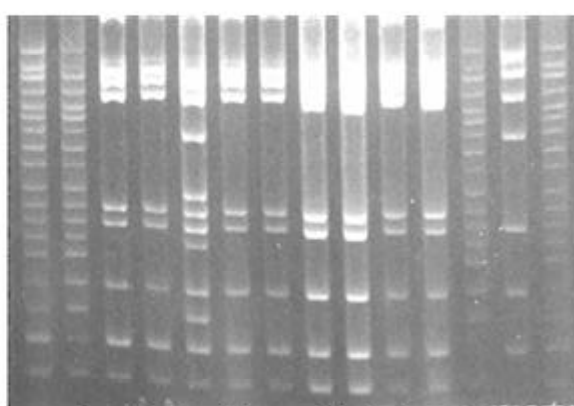
菌株番号	K10	K34	K3	K9	K36	K25	K37	K19	K17
6021	20	9	14	16	11	4	6	4	7
6022	20	9	14	16	11	5	6	4	7
6025	21	9	14	16	11	5	6	4	6
6026	21	9	14	16	11	4	6	4	7
7007	22	9	14	16	11	5	6	4	7
7011	23	9	14	16	11	4	6	4	7
7014	21	9	14	16	11	4	6	4	7
7015	28	9	14	16	11	4	6	4	7
6023	45	10	10	13	6	5	6	6	9
7003	41	9	18	11	11	3	9	8	5
7024		7	5		6	2	5	8	4

1st set

2nd set



St 6022 6025 7007 7014 St St
6021 6023 6026 7011 7015 7003



St 6022 6025 7007 7014 St St
St 6021 6023 6026 7011 7015 7003

図 1 IS printing System 泳動図

表4 グループBにおけるVNTRのリポート数

No.	菌株番号	K10	K34	K3	K9	K36	K25	K37	K19	K17
1		23	9	14	16	11	4	6	4	7
2	7007 (菌株由来)	23	9	14	16	11	4	6	4	7
3		22	9	14	16	11	4	6	4	7
4		23	9	14	16	11	4	6	4	7
5		22	9	14	16	11	4	6	4	7
6		23	9	14	16	11	4	6	4	7
7	7007 (便由来)	23	9	14	16	11	4	6	4	7
8		22	9	14	16	11	4	6	4	7
9		23	9	14	16	11	4	6	4	7
10		23	9	14	16	11	4	6	4	7
11	7011 (便由来)	23	9	14	16	11	4	6	4	7
12		23	9	14	16	12	4	6	4	7
13		23	9	14	16	11	4	6	4	7
14		23	9	14	16	11	4	6	4	7
15		24	9	14	16	11	4	6	4	7
16	7024 (便由来)		7	5		6	2	5	8	5
17			7	5		6	2	5	8	4
18			7	5		6	2	5	8	4
19			7	5		7	2	5	8	4
20			7	5		6	2	5	8	4

