

論文

腸管出血性大腸菌集団感染事例の解析と 継代培養による PFGE と MLVA パターン変化の比較

野田万希子, 門倉由紀子, 亀山芳彦, 小林香夫

要 旨

疫学情報から同一株の腸管出血性大腸菌 (O157, O26, O111) による感染であると推察された集団感染事例の菌株について、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) と multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を行い、疫学解析結果の比較を行った。その結果、86 事例中 85 事例で PFGE と MLVA の判定結果が一致し、PFGE と同様の分子疫学解析結果が迅速・簡便に得られる MLVA の有用性が証明された。

また、O157 菌株 3 株を 100 回継代培養してそれぞれ 132 コロニーを解析し、どの程度分子疫学パターン変化に違いが生じるか比較したところ、元株と異なるパターンとなったコロニーの割合は菌株 I, II, III の順に PFGE では 57.6%, 6.1%, 12.9% だったのに対し、MLVA では 15.9%, 3.0%, 5.3% であった。菌株ごとの変化の度合いは両法ともに菌株 I > III > II で同様な傾向が認められたが、MLVA で出現したパターン数は明らかに PFGE と比較して少なかったことから、MLVA はクローナルターンオーバーの影響を受けにくいことが明らかになった。

キーワード：腸管出血性大腸菌, 分子疫学解析, MLVA, PFGE, 継代培養

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は少ない菌量で感染が成立する感染力の強い病原体であり、ひとたび EHEC に汚染された食品や食材が流通した場合には食中毒患者が広域で報告される可能性がある。このような自治体を超えて患者が発生する“diffuse outbreak” (散在的集団発生) への迅速対応を目的として、EHEC 菌株の分子疫学解析が各自治体や国立感染症研究所で行われている¹⁾。分子疫学解析の標準法はパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) であるが、より迅速かつ簡便で数値データで判定可能な multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が近年開発された。MLVA は、ゲノム中に存在する繰り返し配列の繰り返し数を調べる PCR をベースとした簡便な型別手法であり、大量の菌苔を必要としないこと、迅速であること、結果がデジタルデータであり他機関との比較がしやすいこと等が PFGE と比較して優れている。国立感染症研究所では O157, O26, O111 の 3 血清群²⁾については 2014 年 4 月から、さらに O103, O121, O145, O165, O91 の 5 血清群についても 2017 年 6 月から PFGE から MLVA へ解析法を変更している。

菌株がウシやヒトの腸管を通過する際や、*in vitro* で

の植継ぎの際に PFGE パターンに変化が起こることが見いだされており、この現象はクローナルターンオーバーと呼ばれている³⁾。新しい分子疫学解析手法を取り入れる上で、その手法がこのクローナルターンオーバーの影響をどの程度受けるかを把握することは結果を解釈する上で重要である。PFGE ではパターン変化の度合いは菌株に大きく依存することが知られている³⁾が、MLVA ではそのような報告はされておらず不明である。

そこで今回我々は O157, O26, O111 について MLVA 実施体制を整備し、当所に搬入された集団感染事例株を解析することで PFGE と MLVA の集団感染事例における分子疫学解析判定結果に違いが出るのかを検討した。また、MLVA でのクローナルターンオーバーの影響の程度を把握することを目的に、*in vitro* で継代培養することによって現れるパターンの変化を O157 菌株で解析し、PFGE でのパターン変化と比較したので報告する。

2 材料と方法

2.1 集団感染事例株の解析

2.1.1 供試菌株

家族, 保育園, 勤務先, 同一人物で複数回分離等の

疫学情報から同一株による感染であると推察された事例を“集団感染事例”と定義し株の解析を行った。O157菌株は2006年4月～2014年3月の期間に当所に搬入された55事例の156株(1事例の株数2～12株)を、O26菌株は1999年4月～2015年3月の期間に搬入された26事例の130株(1事例の株数2～50株)を、O111菌株は1996年4月～2013年3月の期間に搬入された5事例の27株(1事例の株数2～16株)を用いた。

2.1.2 PFGE

既報⁴⁾に従い制限酵素 *Xba* I 処理で実施した。PFGEの判定基準⁵⁾(表1)により、6バンド差までの株同士は疫学的に関連性があると判定した。

表1 PFGEの判定基準

分類	遺伝子変異数	バンド差(本)	疫学的評価
区別できない	0	0	分離株は流行株の一部
極めて関連あり	1	2～3	分離株はほぼ流行株の一部
関連の可能性あり	2	4～6	分離株は流行株の一部の可能性
異なる	≥3	≥7	分離株は流行株の一部ではない

2.1.3 MLVA

O157 は 8 遺伝子座 (O157-25, O157-3, O157-34, O157-9, O157-17, O157-19, O157-36, O157-37) を、O26 は 7 遺伝子座 (O157-9, O157-37, EHC-1, EH26-7, EHC-5, EHC-2, EHC-6) を、O111 は 9 遺伝子座 (O157-37, EH111-11, EHC-1, EH111-8, EHC-2, EH111-14, EHC-6, O157-9, EHC-5) を、それぞれ国立感染症研究所で実施している 17 遺伝子座²⁾から選択し、各遺伝子座数の繰り返し数を既報⁶⁾に準じて測定した。ただし、O157 解析系では O157-9 のオフセットを 472 bp から 466 bp、O157-36 のオフセットを 107 bp から 102 bp に変更した。PCR 産物が得られなかった場合は“その遺伝子座が存在しない (null allele)”と判断し、繰り返し数は-2 と表記した。既報²⁾に従い、1 遺伝子座違い (single-locus variant; SLV) までの株同士は疫学的に関連性があると判定した。

2.2 継代培養による分子疫学パターンの変化

事前に PFGE と MLVA パターンが互いに異なることを確認した O157:H7, *stx*1,2 保有臨床分離株 2 株 (菌株 I, II) と O157:H7, *stx*2 保有臨床分離株 1 株 (菌株 III) の合計 3 株を用いた。既報^{3,7)}に準じて Heart Infusion Agar (HIA) 斜面培地で 37°C, 3～4 日間隔で 100 回 (50 週間) 継代培養し、10 回の継代ごとに HIA 平板に画線培養した 12 コロニーをランダムに選び PFGE と MLVA を 2.1.2 および 2.1.3 記載の方法にて実施した。

表2 O157集団感染事例の解析結果

事例 No.	株数	疫学情報	事例内での違い*		MLVAパターン**															
			PFGE	MLVA	3	9	7	12	3	5	9	7	6	10	6					
1	2	家族内	一致	一致	5	8	13	10	7	6	10	6								
2	3	家族内	一致	一致	5	14	9	16	6	4	11	6								
3	2	家族内	一致	一致	5	9	10	17	7	6	10	6								
4	5	家族内	6(4)	一致	5	9	10	17	7	6	10	6								
5	3	家族内	一致	一致	5	-2	7	13	3	7	5	4								
6	2	家族内	18(1)	8(1)	6	15	10	14	5	8	8	5								
7	2	家族内	一致	一致	3	4	7	-2	7	10	16	5								
8	2	家族内	一致	一致	4	11	10	17	5	6	9	7								
9	2	家族内	一致	一致	4	11	10	17	5	6	9	7								
10	4	集団 (保育園)	一致	一致	5	14	10	17	8	6	9	6								
11	2	家族内	一致	一致	5	8	10	11	7	6	6	6								
12	2	家族内	一致	一致	5	10	10	12	7	7	6	7								
13	4	家族内	一致	一致	5	12	10	11	7	6	6	6								
14	2	家族内	一致	一致	5	8	10	11	7	6	6	6								
15	2	家族内	一致	一致	5	9	10	11	7	6	6	6								
16	2	家族内	2(1)	1(1)	-	11	-	-	-	-	-	-								
17	3	家族内	一致	一致	5	8	10	11	7	6	6	5								
18	8	食中毒疑い	1(1)	1(1)	-	9	-	-	-	-	-	-								
19	3	家族内	2-3(1)	3(1)	5	12	10	9	6	6	10	7								
20	5	食中毒	一致	一致	5	9	9	10	7	4	8	9								
21	2	家族内	一致	一致	5	12	10	9	6	6	10	7								
22	3	家族内	1(1)	2(3)	5	9	10	12	7	6	6	6								
23	2	家族内	一致	一致	5	9	10	11	6	6	6	4								
24	3	家族内	一致	一致	5	9	7	17	4	7	8	6								
25	5	集団	一致	一致	4	9	10	12	8	6	6	6								
26	2	家族内	一致	一致	4	7	8	13	3	5	7	7								
27	3	家族内	一致	一致	5	9	7	17	4	7	7	6								
28	2	食中毒	一致	一致	5	11	9	18	8	6	9	7								
29	4	食中毒	一致	一致	5	8	10	11	6	6	6	6								
30	3	家族内	2-3(1)	3-4(1)	5	8	10	11	6	6	6	6								
31	2	家族内	一致	一致	5	9	9	11	7	4	8	8								
32	2	同一人物	一致	一致	5	9	10	12	7	6	6	6								
33	2	家族内	一致	一致	5	10	10	10	7	6	5	5								
34	2	家族内	一致	一致	5	6	10	10	7	6	5	5								
35	3	家族内	一致	一致	5	14	9	16	7	6	9	8								
36	2	家族内	一致	一致	5	14	9	16	7	6	9	8								
37	3	家族内	一致	一致	4	4	7	-2	5	7	10	5								
38	2	家族内	一致	一致	5	8	10	11	7	6	9	6								
39	2	家族内	一致	一致	4	8	10	5	7	7	9	8								
40	2	同一人物	一致	一致	4	18	7	10	6	8	-2	11								
41	2	家族内	一致	一致	5	12	9	17	7	4	11	6								
42	4	家族内	一致(3)	一致(3)	4	19	7	11	6	8	-2	12								
43	2	家族内	一致	一致	1(1)	-	20	-	-	-	-	-								
44	2	家族内	一致	一致	5	13	9	16	7	4	12	6								
45	2	家族内	一致	一致	3	5	8	-2	4	5	6	4								
46	3	集団 (職場)	一致	一致	3	7	7	12	3	5	7	7								
47	2	共通行動	一致	一致	5	7	10	11	7	6	6	7								
48	2	家族内	一致(7)	一致(7)	5	13	11	15	6	6	11	11								
49	12	集団 (幼稚園)	1(2)	一致(2)	-	-	-	16	-	-	-	-								
50	2	家族内	1(1)	1(1)	-	12	-	-	-	-	-	-								
51	4	家族内	3(2)	一致(2)	-	-	-	-	-	-	-	-								
52	2	家族内	一致	一致	5	9	10	13	8	7	6	6								
53	2	家族内	一致	一致	5	9	10	13	8	7	6	6								
54	2	家族内	一致	一致	4	23	7	11	6	8	-2	10								
55	2	家族内	一致	一致	5	8	7	10	4	7	10	6								
56	2	家族内	一致	一致	5	8	9	11	7	6	6	6								
57	2	家族内	一致	一致	5	9	8	13	5	7	12	5								
58	2	家族内	一致	一致	5	18	7	15	3	7	6	7								
59	2	家族内	一致	一致	5	8	10	11	7	6	6	6								
60	2	家族内	一致	一致	2	15	8	18	14	7	4	8								
61	2	家族内	2(1)	1(1)	-	-	-	17	-	-	-	-								
62	2	共通行動	一致	一致	4	8	10	12	8	7	6	6								
63	3	家族内	一致	一致	5	11	10	10	6	6	10	7								
64	2	家族内	一致	一致	4	-2	8	9	3	6	5	10								

* PFGEはバンド本数の差、MLVAは遺伝子座数の差を示した。同一事例中で複数のMLVAパターンが認められた場合、同じ繰り返し数は「-」で示した。
 ** O157-25, O157-3, O157-34, O157-9, O157-17, O157-19, O157-36, O157-39の順に繰り返し数を示した。

3 結果と考察

3.1 集団感染事例株の解析

集団感染事例株の解析を行った結果を血清型ごとに表2, 表3, 表4に示した。また, 表5に各事例での初発患者株に対して認められたPFGEとMLVAパターンとの差の最大値の相関を示した。

O157では55事例中54事例がPFGE解析でバンド差6本の範囲, MLVAでSLVまでの違いの範囲であり, 両法ともに疫学的に関連性があると判定された(表2, 表5の1))。1事例(表2事例No.5)では3株中1株が他の2株に対してPFGE解析でバンド18本差, MLVAで8遺伝子座すべての繰り返し数が異なっており両手法ともに関連性がないと判定された。本事例は初発患者と家族検便(接触者検便)で保菌者2名が見つかった家族内感染と推定された事例であり, 初発患

表3 O26集団感染事例の解析結果

事例No.	株数	疫学情報	事例内での違い*		MLVAパターン**																								
			PFGE	MLVA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	2	家族内	一致	一致	11	-2	8	3	9	19	-2																		
2	2	家族内	一致	一致	13	-2	9	2	2	19	-2																		
3	2	家族内	一致	一致	10	-2	7	3	10	16	-2																		
4	3	家族内	一致	一致	11	-2	6	3	-2	17	-2																		
5	2	家族内	一致	一致	9	-2	5	3	-2	15	-2																		
6	2	家族内	一致	一致	9	-2	8	3	-2	18	-2																		
7	4	家族内	一致	一致	12	-2	7	3	-2	24	-2																		
8	2	家族内	一致	一致	9	-2	7	3	-2	9	-2																		
			一致(36)	一致(36)	8	4	10	3	-2	20	11																		
			一致(1)	1(1)	7	-	-	-	-	-	-																		
9	50	集団(保育園)	1(9)	一致(1)	-	-	-	-	-	-	-																		
			1(1)	1(1)	-	-	-	-	-	21	-																		
			2(2)	一致(2)	-	-	-	-	-	-	-																		
			6(1)	一致(1)	-	-	-	-	-	-	-																		
10	4	家族内	一致	一致	9	-2	6	-2	-2	18	-2																		
11	5	家族内	一致	一致	8	4	10	3	-2	20	11																		
12	2	家族内	一致	一致	10	-2	9	3	2	22	-2																		
13	2	家族内	一致	一致	7	-2	9	2	-2	18	-2																		
14	2	家族内	-	一致	8	-2	8	3	12	13	-2																		
15	4	集団	一致	一致	8	-2	8	3	12	13	-2																		
			-	-	10	-2	9	3	-2	15	11																		
16	3	家族内	一致(1)	1(1)	-	-	-	-	-	-	-2																		
			3(1)	1(1)	-	-	-	-	-	-	-2																		
17	17	集団	一致	一致	10	-2	9	3	-2	15	-2																		
18	2	家族内	一致	一致	10	-2	9	3	-2	15	-2																		
19	2	家族内	一致	一致	10	-2	9	3	-2	15	-2																		
20	2	家族内	一致	一致	10	5	9	3	-2	15	8																		
21	2	家族内	一致	一致	10	-2	8	2	8	19	9																		
22	2	家族内	一致	一致	9	-2	7	3	-2	14	13																		
23	2	家族内	一致	一致	13	-2	8	3	-2	22	-2																		
24	6	集団	一致	一致	10	-2	9	3	-2	15	-2																		
25	2	家族内	一致	一致	13	-2	4	3	-2	18	-2																		
26	2	家族内	一致	一致	11	-2	7	5	-2	17	-2																		

* 記載の注意点は表2と同様
 ** 0157-9, 0157-37, EHC-1, EH26-7, EHC-5, EHC-2, EHC-6の順に繰り返し数を示した。

表4 O111集団感染事例の解析結果

事例No.	株数	疫学情報	事例内での違い*		MLVAパターン**																								
			PFGE	MLVA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	3	家族内	-	一致	-2	4	8	5	9	1	3	11	-2																
2	2	家族内	一致	一致	16	4	14	5	9	1	3	12	-2																
3	4	家族内	一致	一致	14	4	11	5	10	1	3	15	-2																
4	2	家族内	一致	一致	12	4	14	5	11	1	3	13	-2																
			一致(12)	一致(12)	11	4	14	5	11	1	3	14	7																
			一致(1)	1(1)	12	-	-	-	-	-	-	-																	
5	16	集団(保育園)	1(1)	DLV(1)	-2	-	-	-	-	-2	-																		
			2(1)	一致(1)	-	-	-	-	-	-	-																		
			2(1)	1(1)	-	-	-2	-	-	-	-																		

* 記載の注意点は表2と同様
 ** 0157-37, EH111-11, EHC-1, EH111-8, EHC-2, EH111-14, EHC-6, 0157-9, EHC-5の順に繰り返し数を示した。

表5 集団感染事例におけるPFGEとMLVAパターンとの差の最大値の相関(事例数)

PFGEでの違い (バンド数)	MLVAでの違い(遺伝子座数)			
	一致	1	2	≥3
一致	34	3		
1~3	9	5		
4~6	3			
≥7				1

1) O157 (55事例)

PFGEでの違い (バンド数)	MLVAでの違い(遺伝子座数)			
	一致	1	2	≥3
一致	23			
1~3	1	1		
4~6		1		
≥7				

2) O26 (26事例)

PFGEでの違い (バンド数)	MLVAでの違い(遺伝子座数)			
	一致	1	2	≥3
一致	3			
1~3	1		1	
4~6				
≥7				

3) O111 (5事例)

各手法で関連性ありと判定される範囲を点線で示した。

者と保菌者1名の分離株2株はPFGEおよびMLVAパターンが一致していたものの, もう1名の保菌者株は前述のとおり大きく異なるパターンであった。なお, 血清型や毒素型はO157:H7 VT2で一致していた。別パターンであった保菌者は家族内感染とは異なる機会に他の感染源によって感染したか, またはこの家族内感染自体が同時に複数の系統のO157株による重複感染を受けており, たまたま1株のみ検査したことによって別株として判定された可能性などが考えられた。通常感染者1名から1株ずつしか検査しないため真実は明らかにできなかったが, MLVAはPFGEに比べて迅速・簡便に分子疫学解析が行えるため, 今後はこの事例のように疫学情報と分子疫学解析結果が一致せず疑義が生じた場合に, 元の糞便検体や検査途中の分離平板等から複数の系統の株が混在していないか等の再試験を行うことができるものとする。

一方, O26では26事例すべてが, O111では5事例中4事例がPFGE解析でバンド差6本の範囲, MLVAでSLVの範囲であり, 両法ともに疫学的に関連性があると判定された(表2, 表3, 表5の2)および3)。O111の1事例(表4事例No.5)はPFGEでは全株がバンド差2本の範囲であったのに対しMLVAでは2遺伝子座違い(double-loci variant; DLV)の株が1株認められた。本事例は16名の感染が判明した大規模な事例

であり、二次感染とみられる家族内感染も複数例含まれていた。MLVA では PFGE の判定基準 (表 1) のような二重の判定基準とはなっていないものの、大規模な事例では SLV のみならず DLV も事例の判定として利用することも必要であることが示唆された。

全体として、検討を行った 86 事例中 85 事例で PFGE と MLVA の判定結果は一致しており、PFGE と同様の分子疫学解析結果が迅速・簡便に得られる MLVA の有用性が証明された。

3.2 継代培養による分子疫学パターンの変化

O157 菌株 3 株を 100 回継代培養し、10 回継代するごとに単離した 12 コロニーを PFGE と MLVA の両法で解析した。各株 132 コロニーの PFGE で出現したパターンを表 6 と図 1 に示した。菌株 I では元のパターンと 1~7 本差の 15 パターンが出現し、各パターンとなったコロニー数とその割合 (%) は、元パターンが 56 コロニー (42.4%)、バンド差 3 本までが 11 パターン 71 コロニー (53.8%)、バンド差 4~6 本差までが 3 パターン 4 コロニー (3.0%) であった。100 回継代後の 1 コロニー (0.8%) より 7 本差のパターン (I-P16) が認められた。なお、このコロニーの MLVA パターンは元パターンと同一 (I-M1) であった。菌株 II では元パターンとのバンド差 2 本までの 5 パターンが出現し、各パターンとなったコロニー数とその割合 (%) は、元パターンが 124 コロニー (93.9%)、バンド差 2

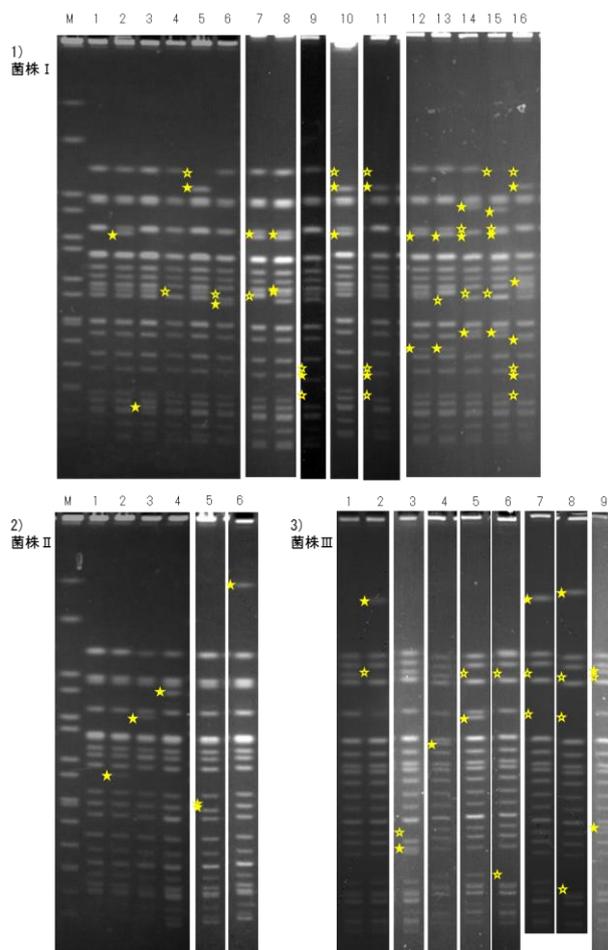


図1 継代実験で出現したPFGEバンドパターン
元パターンと比較して出現したバンドを★、欠失したバンドを☆を示した。

本までが 8 コロニー (6.1%) であった。菌株 III では元のパターンと 1~4 本差の 8 パターンが出現し、元パターンが 115 コロニー (87.1%)、バンド差 3 本までが 7 パターン 15 コロニー (11.4%)、バンド差 4~6 本差までが 1 パターン 2 コロニー (1.5%) であった。

一方、MLVA で出現したパターン変化を表 7 に示した。菌株 I、II とともにそれぞれ元パターンの SLV の 4 パターンが出現し、繰り返し数の変化は ±1 または null allele となる変化であった。元パターンと SLV のパターンとなったコロニー数とその割合 (%) は、菌株 I ではそれぞれ 111 コロニー (84.1%) と 21 コロニー (15.9%)、菌株 II ではそれぞれ 128 コロニー (97.0%) と 4 コロニー (3.0%) であった。また、菌株 III では元パターンが 125 コロニー (94.7%)、SLV の 3 パターン (繰り返し数 ±1 の変化) が 5 コロニー (3.8%)、DLV の 1 パターン (2 遺伝子座とも null allele となる変化) が 2 コロニー (1.5%) 認められた。この DLV のパターン (III-M3) となった 2 コロニーの PFGE パターンは 20 回継代後のコロニーは元パターンと同一 (III-P1)、90 回継代後のコロニーは元パターンとバンド 3 本違いのパターン (III-P7) であった。

PFGE パターンの変化のしやすさはパターン数、コロニー数ともに菌株 I > III > II の順であり、既報³⁾と

表 6 継代培養によって出現した PFGE パターンの変化

菌株 および パターン 番号	元パターン との バンド差	継代後に出現した各パターンのコロニー数 (n=12)											
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
I-P1	元パターン	12	12	12	10	3	3	4					
I-P2	1				1	3	8	3					
I-P3	1				1								
I-P4	1					4	1	5	6	3	5	4	
I-P5	2					1							
I-P6	2					1							
I-P7	2								3	6	5	3	
I-P8	3								3				
I-P9	3									1			
I-P10	3									2			
I-P11	5										2		
I-P12	2											1	
I-P13	3											1	
I-P14	5											1	
I-P15	6											1	
I-P16	7											1	
II-P1	元パターン	12	11	12	11	11	10	10	11	12	12	12	12
II-P2	1		1			1							
II-P3	1			1									
II-P4	1					2	1						
II-P5	2						1						
II-P6	1								1				
III-P1	元パターン	12	12	12	12	11	12	11	8	11	6	8	
III-P2	2					1							
III-P3	2							1	1				
III-P4	1								2				
III-P5	2								1				
III-P6	2									1	4	1	
III-P7	3										1	1	
III-P8	4										1	1	
III-P9	3										1	1	

表7 継代培養によって出現したMLVAパターンの変化

菌株 および パターン番号	元パターンとの違い		継代後に出現した各パターンのコロニー数 (n=12)												MLVAパターン *						
	遺伝子座数	繰り返し数	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100								
I-M1	元パターン		12	12	12	12	11	12	12	8	6	6	8	5	9	10	13	7	6	6	6
I-M2	1	+1					1							-	10	-	-	-	-	-	-
I-M3	1	null								3	6	5	4	-	-	-	-2	-	-	-	-
I-M4	1	+1								1				-	-	-	14	-	-	-	-
I-M5	1	+1										1		-	-	-	-	8	-	-	-
II-M1	元パターン		12	12	12	12	11	12	10	12	12	12	11	5	12	9	18	7	4	11	6
II-M2	1	-1					1							-	-	-	-	-	-	10	-
II-M3	1	+1								1				-	-	-	-	-	-	12	-
II-M4	1	null								1				-	-2	-	-	-	-	-	-
II-M5	1	null										1		-	-	-	-	-	-	-	-2
III-M1	元パターン		12	10	11	12	12	12	12	10	11	11	12	4	17	7	17	3	7	6	7
III-M2	1	+1		2						1				-	18	-	-	-	-	-	-
III-M3	2	null			1							1		-	-	-	-	-	-	-2	-2
III-M4	1	-1								1				3	-	-	-	-	-	-	-
III-M5	1	-1									1			-	-	-	-	-	6	-	-

* 左から順に遺伝子座0157-25, 0157-3, 0157-34, 0157-9, 0157-17, 0157-19, 0157-36, 0157-37の繰り返し数を示した。

同様に菌株によって大きく異なっていた。特に菌株 I では6割近くのコロニーが元パターンと異なっていた。一方、MLVA パターンの変化のしやすさは、コロニー数では PFGE と同様に菌株 I > III > II の順に大きかったものの、PFGE と比較して小さく、菌株 I であっても2割以下のコロニーに限られた。また、パターン数ではどの株も4パターンで違いが認められなかった。これらの結果より、MLVA は PFGE と比較してクロノラルターンオーバーの影響を受けにくく、パターンが安定していることが示唆された。

今回実施した継代の条件はウシやヒト腸内での増殖やヒトからヒトへの感染時の条件とは異なっており、直接的に臨床分離株でのパターン変化に置き換えることはできないが、PFGE で元パターンと7本差であったコロニーは PFGE の判定基準(表1)からすると元株と異なる株と判定され、間違った結果が導かれることになりかねない。一方、MLVA では集団感染事例の解析で示したように、判定基準を PFGE と同様に二重の判定とし DLV までの違いを関連の可能性ありと考えることによって、100回継代までの全コロニーを関連性のある株と判定できることが示された。

さらに、PFGE で元パターンと4~7本差であった5パターン (I-P11, 14, 15, 16, III-P8) を示した7コロニーの MLVA パターンはすべて元パターンと同一であったこと(データ示さず)、逆に MLVA で DLV の差であった2コロニーの PFGE パターンが元パターンと同一またはバンド3本差のパターンであった結果より、両法のパターン変化は同じようには挙動していないことが半明した。PFGE は全ゲノムの中の制限酵素切断部位をターゲットに、MLVA は繰り返し配列を含む領域をターゲットにした手法であることから、既報³⁾でも報告されているように原理が異なる手法でのパターン変化は必ずしも同じように挙動しないことが改めて裏付けられた。

次に、MLVA の繰り返し数の変化に着目すると、3

株で出現した元パターンと異なる合計12パターンのうち8パターンでは繰り返し数の変化が±1の範囲であった。繰り返し数の変化は、反復DNA配列が複製される際に鋳型DNA鎖と新生DNA鎖の間でずれが生じ、反復配列の単位が増加あるいは減少する現象によって生じる⁸⁾が、元株とより近縁の株では繰り返し数の差が±1程度で現れることが実験的に示された。また、残りの4パターンは null allele となる変化であり、このうち1パターンは、0157-36と0157-37の2つの遺伝子座が同時に null allele となっていた。今回は null allele となった遺伝子座にどんな変異が起こっていたのか個別に調べることはできなかったが、0157菌株である EDL933 のゲノム情報によると、0157-36と0157-37は pO157 と呼ばれる巨大プラスミド上の近傍に位置していることから^{9,10)}、たとえ1回の変異であってもこの領域が大規模に欠失するような変異が起こった場合には同時に null allele となる可能性があると推察された。

今回検討を行った集団感染事例株での解析と継代培養によって現れるパターン変化の解析結果より、MLVA 結果の判定に際しては、EHEC 感染症が食中毒に代表されるように一度の機会に感染が広がる場合ばかりではなく、家族内感染等の二次感染が含まれる事例も頻発することも考慮し、SLV という判定基準にとられることなく場合によっては DLV までの違いの株であっても関連性を疑うことや、繰り返し数の違いの程度も含めて柔軟に関連性を判断する必要があると考えられた。

MLVA は PFGE よりも迅速・簡便であり、かつ PFGE 同様に高い識別能力を持っていた。また、MLVA は PFGE よりもクロノラルターンオーバーによる影響を受けにくいことが半明した。MLVA によってリアルタイムに菌株同士の疫学的関連性を推察することによって、広い地域にまたがって発生する“diffuse outbreak”への迅速対応が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村和満: 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, 感染症誌, 76, 842-848, 2002.
- 2) Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H: New System for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111, *Microbiol Immunol*, 54, 569-577, 2010.
- 3) Shima K, Wu Y, Sugimoto N, Asakura M, Nishimura K, Yamasaki S: Comparison of a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay to pulse-field gel electrophoresis to determine the effect of repeated subculture and prolonged storage on RFLP patterns of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7, *J Clin Microbiol*, 44, 3963-3968, 2006.
- 4) 野田万希子, 古田紀子, 門倉由紀子, 白木豊, 小林香夫, 非酵素法で行うパルスフィールド・ゲル電気泳動の適用菌種の検討, 岐阜県保健環境研究所報, 19, 5-10, 2011.
- 5) Tenovar F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing., *J Clin Microbiol*, 33, 2233-2239, 1995.
- 6) 野田万希子, 門倉由紀子, 白木豊, 小林香夫, Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析プロトコールの確立, 岐阜県保健環境研究所報, 20, 1-6, 2012.
- 7) Iguchi A, Osawa R, Kawano J, Shimizu A, Terajima J, Watanabe H: Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulse-field gel electrophoresis profiles, *J Clin Microbiol*, 40, 3079-3081, 2002.
- 8) 特集「ヒトゲノム中98%の“未踏領域”非コードDNAに挑む」, 実験医学2012年9月号, vol.30, No.14
- 9) Cooley M, Carychao D, Nguyen K, Whitehand L, Mandrell R: Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157:H7, *Appl Environ Microbiol*, 76, 3398-3340, 2010.
- 10) Jenke C, Harmsen D, Weniger T, Rothganger J, Hyttia-Trees E, Bielaszewska M, et al.: Phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987-2008, *Emerg Infect Dis*, 16, 610-616, 2010.

Comparison of MLVA to PFGE to Interpret Outbreak Patterns Based on Each Criterion and to Determine the Effect of Repeated Subculture of the EHEC Strains

Makiko NODA, Yukiko KADOKURA, Yoshihiko KAMEYAMA, Yoshio KOBAYASHI

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan

Summary

In this study, we compared a recently developed multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to interpret outbreaks patterns based on each criterion. MLVA could be widely used in molecular epidemiological studies of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection.

Also, we compared MLVA with PFGE using three different EHEC strains to understand whether repeated subculture *in vitro* affect the patterns of EHEC. Our data clearly indicate that MLVA was not affected than PFGE by repeated subculture and is a more practical and reliable method for molecular typing of EHEC strains.

Keywords: EHEC, molecular typing, PFGE, MLVA, repeated subculture