

【調査研究】

腸管出血性大腸菌の検査におけるMLVA法の整備

Study on Introduction of Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Examination in a Prefectural Institute

河合央博, 森本晃司, 仲 敦史, 中嶋 洋, 狩屋英明 (細菌科)

KAWAI Hisahiro, MORIMOTO Koji, NAKA Atsushi, NAKAJIMA Hiroshi, KARIYA Hideaki
(Bacteriology Section)

要 旨

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）O157, O26, O111の反復配列多型解析法（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。）による検査の整備を行った。MLVA法の検査精度の確認のため、平成30年度に収集したEHECの65株について、当センターと国立感染症研究所（以下「感染研」という。）の解析結果（17遺伝子座のリピート数）を比較した。その結果、56株（86.2%）で結果が一致したが、9株（13.8% 内訳：O157株：2株、O26株：7株）はそれぞれ1か所の遺伝子座のリピート数が異なった。結果が異なったO157株のうち1株は、菌の継代時のDNA複製エラーによってリピート数が変化しと考えられたが、他の1株については原因の特定には至らなかった。O26株は、7株全てで遺伝子座O157-37でのリピート数が異なり、当センターでは増幅産物が確認できなかった。これは、これらの菌株の遺伝子座O157-37でのPCR増幅効率の悪さが原因と考えられたが、通常のマルチプレックスPCRと並行してプライマー組成を変更した追加のマルチプレックスPCRを実施することで解消された。以上のことから、当センターで整備したMLVA法は、一部の株の一部の遺伝子座で感染研の結果と異なったものの、その精度はおおむね良好であると考えられた。また、菌の継代によるMLVA法への影響を調査したところ、頻度としては非常にまれであるが、1回の継代であってもリピート数に変化が生じ得ることが確認された。そのため、MLVA法による解析に当たっては、菌株の継代の回数を極力減らすことが望ましいと考える。

[キーワード：腸管出血性大腸菌, 反復配列多型解析法, 疫学調査]

[Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis, epidemiological investigation]

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（以下「EHEC」という。）感染症は、時に生命を脅かす重篤な症状に至る場合があり、また多くの自治体に渡る広域的な感染拡大を示すこともあるなど、保健衛生上注目すべき感染症である。例年、全国的に多くの患者が報告されており、岡山県でも毎年約60件程度の事例が発生している。その多くは散发事例であり、実地疫学調査では感染源の特定ができないケースが多い。しかし、食品流通が進展した近年、広域流通食品を原因とした多数の自治体をまたぐ食中毒事例のようなdiffuse outbreak（散在的集団発生）が問題となっており、一見散发事例と思われる事例が同一の集団事例の1つであることもある。このようなdiffuse outbreakや集団事例の感染源究明には、実地疫学調査と併せた分子疫学解析が有効となる。反復配列多型解析法¹⁾ (multiple-locus

variable-number tandem-repeat analysis, 以下「MLVA法」という。)は、近年注目されている分子疫学解析法であり、複数の遺伝子座のリピート配列をPCR法によって増幅し、高精度な電気泳動によって解析・数値化して遺伝子型別を行う手法である。従来から実施されてきたIS-printing法と比較して型別能に優れ、パルスフィールドゲル電気泳動（以下「PFGE法」という。）と比較しても同等の型別能を有し、かつ検査日数が短い。更には、検査結果が数値化できるため、施設間での比較や共有化も容易であるといったメリットがある。他方、MLVA法による解析には、手技、試薬、機器等、全ての要素に対して高い精度が要求される。また、同一集団事例からの分離株であるにも関わらず遺伝子型が一致しないことがあり、そのほとんどが1か所の遺伝子座でのリピート数が異なるsingle-locus variant（以下「SLV」という。）で、これは

菌が増殖する際のDNA複製エラーに起因するとされる²⁾。これらのことから、結果の解釈に当たっては細心の注意が必要である。

当センターでは、これまでPFGE法又はIS-Printing法によりEHECの分子疫学解析を行ってきたが、今回、高精度の解析結果をより迅速に行政に還元するため、MLVA法を導入した。平成28年度から平成29年度の間に必要な試薬・機器等の整備を行ったが、MLVA法の実用化に当たっては、分離株を用いた検証による問題点の把握や精度の確認が必要不可欠である。そこで、平成30年度に岡山県内で分離されたヒト由来EHECの65株について、MLVA法による解析を行うとともに、国立感染症研究所(以下「感染研」という。)にも解析を依頼し、それぞれの解析結果を比較した。また、菌の継代による解析対象遺伝子座のリピート数への影響を評価するため、継代前後の菌株の解析結果を比較した。

2 方法

2.1 菌株

平成30年度に県内で分離されたヒト由来EHECの65株(O157:34株, O26:28株, O111:3株)を解析対象とした。

2.2 MLVA法

MLVA法は、EHECのうち主要なO157, O26, O111に

ついて、既報の方法^{1), 3)}に準じた方法(以下「通常法」という。)で実施した。すなわち、菌株を滅菌超純水に浮遊し、100℃10分間加熱してDNAテンプレートを作成した。次に、解析対象とする17か所の遺伝子座(EH111-11, EH111-14, EH111-8, EH157-12, EH26-7, EHC-1, EHC-2, EHC-5, EHC-6, O157-3, O157-34, O157-9, O157-25, O157-17, O157-19, O157-36, O157-37)について、2種類のマルチプレックスPCRを行った。各プライマーミックスの組成、PCR反応液の組成及びPCR条件を表1に示す。増幅産物は、シーケンサーを用いた高精度電気泳動によってフラグメント解析を行い、各遺伝子座のリピート数を決定した。なお、サーマルサイクラーはVeriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)、シーケンサーは3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)、フラグメント解析ソフトはGeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems)を使用した。

2.3 フラグメント解析の最適化

当センターにおけるフラグメント解析の最適化に当たり、平成29年度以前に感染研でMLVA解析を実施した県内分離ヒト由来EHECの161株(O157:128株, O26:25株, O111:8株)の結果を、各遺伝子座のリピート数の指標とした。これらの株について、当センターの試験環境で各遺伝子座のマルチプレックスPCRを行い、

表1 MLVA法におけるマルチプレックスPCR法(通常法)の条件

(1)反応液組成(μL)(1検体あたり)

テンプレート	1
H ₂ O	11.1
2×QIAGEN Multiplex PCR Master Mi (Qiagen multiplex PCR kit #206143)	12.5
プライマーミックス	0.4
計	25

(2)PCR反応条件

95℃ 15分
↓
95℃ 20秒
60℃ 90秒
72℃ 60秒
↓
72℃ 10分

(35サイクル)

(3)プライマーミックス組成

①プライマーミックス1

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EHC-2	EHC-2F	VIC	1	EHC-2R	1
O157-25	O157-25F	PET	1	O157-25R	1
O157-9	O157-9F	VIC	1	O157-9R1	3
				O157-9R	2
EH157-12	EH157-12F	PET	1	EH157-12R	1
EH111-8	EH111-8F1	PET	0.75	EH111-8R1	0.75
	EH111-8F	PET	0.75	EH111-8R	0.75
EHC-1	EHC-1F	VIC	1	EHC-1R	1
EHC-5	EHC-5F	NED	1	EHC-5R	1
O157-3	O157-3F	NED	1	O157-3R	1
O157-34	O157-34F	6-FAM	1	O157-34R	2
計			9.5	計	14.5

+ TE 76μL
計 100μL

②プライマーミックス2

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH26-7	EH26-7F	PET	2	EH26-7R	2
O157-19	O157-19F	NED	1	O157-19R	1
EH111-11	EH111-11F	6-FAM	1	EH111-11R	1
EHC-6	EHC-6F	NED	1	EHC-6R	1
O157-37	O157-37F	PET	1	O157-37R	1
O157-17	O157-17F	VIC	1	O157-17R	1
O157-36	O157-36F	NED	1	O157-36R	1
EH111-14	EH111-14F	6-FAM	1	EH111-14R	1
計			9	計	9

+ TE 82μL
計 100μL

GeneMapper Software v4.1を用いて増幅産物の大きさを求め、指標のリピート数と紐付けすることでリピート数の判定範囲となるBinを設定した。指標に存在しなかったリピート数のBinについては、感染研から別途提供されたBin Setデータを参考にして設定し、Bin Setデータにも存在しなかったリピート数のBinについては、設定済みのBinからリピートサイズを基に算出して設定した。また、各Binのoffsetについては、基本的に遺伝子座のリピートサイズが10 bp以下の場合は1 (±1)、10 bpを超えた場合はその数値の1/10に設定した。

2.4 MLVA法の検査精度の確認

平成30年度に県内で分離されたヒト由来EHECの65株(O157:34株, O26:28株, O111:3株)について、当センターの試験環境に最適化したMLVA法により解析し、感染研の解析結果と比較して検査精度、問題点等を把握した。なお、増幅産物のピークがBinの範囲から外れた場合、近傍のBinのリピート数を採用した。また、1か所の遺伝子座に複数のピークが認められた場合は、最も高いピークが示すリピート数を採用した。

2.5 PCR増幅効率の低い遺伝子座に対するマルチプレックスPCR追加法

通常法で増幅効率が低い遺伝子座について、通常法と並行して追加のマルチプレックスPCR(以下「追加法」という。)を実施した。O157株には、遺伝子座O157-34及びEH111-8に対応するプライマーミックス3を(組成は表2-①に示す。)、O26株及びO111株には、遺伝子座O157-37, O157-9, EH26-7にそれぞれ対応するプライマーミックス4(組成は表2-②に示す。)を使用した。

また、O26株の遺伝子座O157-37での増幅効率を確認するため、単独プライマーセットによるPCR法も実施した。

この場合のプライマー組成は、プライマーミックス4におけるO157-37プライマー以外を全てTE bufferに置き換えた。

2.6 菌の継代による解析結果への影響の評価

EHECの12株(O157:9株, O26:2株, O111:1株)について、TSA平板培地で37℃で一晩培養後、1個の単独コロニーを釣菌し、これを起点株とした。次に、この起点株を再度TSA平板培地で同様に培養し、それぞれ8個の単独コロニーを無作為に釣菌したものを継代株とした。起点株12株及び継代株96株をそれぞれMLVA法で解析し、継代前後の結果を比較することで菌の継代による解析対象遺伝子座のリピート数への影響を評価した。

3 結果及び考察

3.1 MLVA法の検査精度の確認

平成30年度に収集したEHECの65株をMLVA法で解析した結果、増幅産物のピークが認められた遺伝子座は、全1105か所(65株×17遺伝子座)のうち816か所であった。このうち1か所は、増幅産物のピークがBinの範囲から外れたため、近傍のBinが示すリピート数を採用した。これらを感染研の結果と比較したところ、56株(86.2%)については、17遺伝子座におけるリピート数の組み合わせ(以下「MLVAパターン」という。)が完全に一致した。しかし、残りの9株については、それぞれ1か所の遺伝子座でリピート数が異なっていた(表3)。このうち、O157株No.2071は、遺伝子座EHC-6のリピート数が異なった。この結果は、再検査でも変わらなかったことから、菌の継代時のDNA複製エラーによってリピート数が変化したのではないかと考えられた。O157株No.2089は、遺伝子座O157-37のリピート数が異なった。この株の遺伝子座

表2 MLVA法におけるマルチプレックスPCR追加法の条件

①プライマーミックス3 (O157株用プライマーセット)

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH111-8	EH111-8F1	PET	1.1	EH111-8R1	1.1
	EH111-8F	PET	1.1	EH111-8R	1.1
O157-34	O157-34F	6-FAM	1.5	O157-34R	3
	計		3.7	計	5.2

+ TE 91.1μL
計 100μL

②プライマーミックス4 (O26株, O111株用プライマーセット)

*各プライマーは100μM

遺伝子座	Forward			Reverse	
	プライマー名	蛍光	添加量(μL)	プライマー名	添加量(μL)
EH26-7	EH26-7F	PET	3	EH26-7R	3
O157-37	O157-37F	PET	2	O157-37R	2
O157-9	O157-9F	VIC	1.5	O157-9R1	4.5
				O157-9R	3
	計		6.5	計	12.5

+ TE 81μL
計 100μL

O157-37では、リピート数が「5」及び「13」の2本のピークが認められ、当センターではより高いピークの「13」を採用したが、感染研では逆であった。今回、複数のピークを認めた遺伝子座を有する株は5株であったが、感染研の結果と異なったのはNo.2089のみであった。ピークの高さが施設間で異なった原因は、現段階では不明である。また、O26株No.2066を含む7株は、全株でMLVAパターンが一致したが、両施設で遺伝子座O157-37のリピート数が異なった。当センターではこの遺伝子座でピークが認められず、すなわち判定は「-2」（増幅産物なし）であったのに対し、感染研では「1」であった。これらの菌株について、遺伝子座O157-37の単独プライマーを用いて解析を行ったところ、リピート数「1」のピークが非常に小さいながらも認められた（図1）。このことから、これらの菌株は、遺伝子座O157-37の増幅効率が悪いために通常法でピークが認められなかったと考えられた。特定の遺伝子座でピークが低くなる現象については、O157株の遺伝子座O157-34及びEH111-8、O26株の遺伝子座O157-37、

O157-9及びEH26-7、O111株の遺伝子座O157-9で、それぞれ複数認められた（図2）。これらの遺伝子座のピークは、菌液濃度が低下するとさらに小さくなり、判定が困難になると推察された。そこで、通常法と並行して、特定の遺伝子座の増幅率向上を目的としたプライマー組成の追加法を実施した。その結果、どの株の遺伝子座においても、通常法と比較して明瞭なピークが得られた（図2）。このことから、この追加法は、当センターでのMLVA法実施において有用な補助手法になると考えられた。

3.2 菌の継代による解析結果への影響の評価

EHECの起点株12株及び継代株96株について、継代前後のMLVAパターンを比較したところ、継代株のうちO157株No.1940の1株及びNo.2000の1株でそれぞれMLVAパターンに変化が認められた（図3）。No.2000の変化は、遺伝子座EHC-6で生じ、リピート数は起点株の「14」が継代株で「15」となった。他の継代株7株は、全て起点株と同じMLVAパターンであったことから、この変化は菌の継代時に偶然生じたDNA複製エラーによるものと考え

表3 感染研のMLVAパターンと異なった株（内訳）

菌株No.	O血清型	遺伝子座	リピート数*		内容
			感染研	当センター	
2071	O157	EHC-6	14	13	リピート数の変化
2089	O157	O157-37	5	13	リピート数「5」及び「13」の2本のピークの高さが感染研と逆
2066	O26	O157-37	1	-2	全ての株でMLVAパターンが一致 当センターではピークが確認出来ず、「増幅産物なし」と判定
2067					
2068					
2069					
2072					
2073					
2074					

*「-2」:増幅産物なし

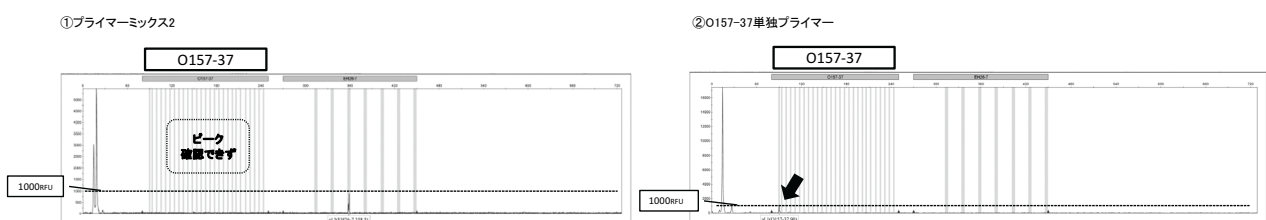


図1 O26株No.2066の遺伝子座O157-37における増幅産物のピーク
 (左側：①プライマーミックス2を用いた際のSamples Plot
 右側：②O157-37単独プライマーを用いた際のSamples Plot
 ①、②ともに同一テンプレートを使用して比較)

られた。また、O157株No.1940の変化は、遺伝子座O157-36及びO157-37の2か所で生じた。遺伝子座O157-36のリピート数は、起点株の「9」が継代株で「-2」に、また遺伝子座O157-37のリピート数は、起点株の「2, 6, 9」（ピークの高さは、「6」>「2」>「9」）が継代株で「2, 9」（ピークの高さは、「2」>「9」）になった。つまり、遺伝子座O157-36では「9」のピークが消失し、遺伝子座O157-37では3本のピークのうち「6」のみが消失した。今回解析した17か所の遺伝子座のうち、O157-36、O157-37及びEHC-6はプラスミドに由来しているため、プラスミドが

クの高さは、「2」>「9」）になった。つまり、遺伝子座O157-36では「9」のピークが消失し、遺伝子座O157-37では3本のピークのうち「6」のみが消失した。今回解析した17か所の遺伝子座のうち、O157-36、O157-37及びEHC-6はプラスミドに由来しているため、プラスミドが

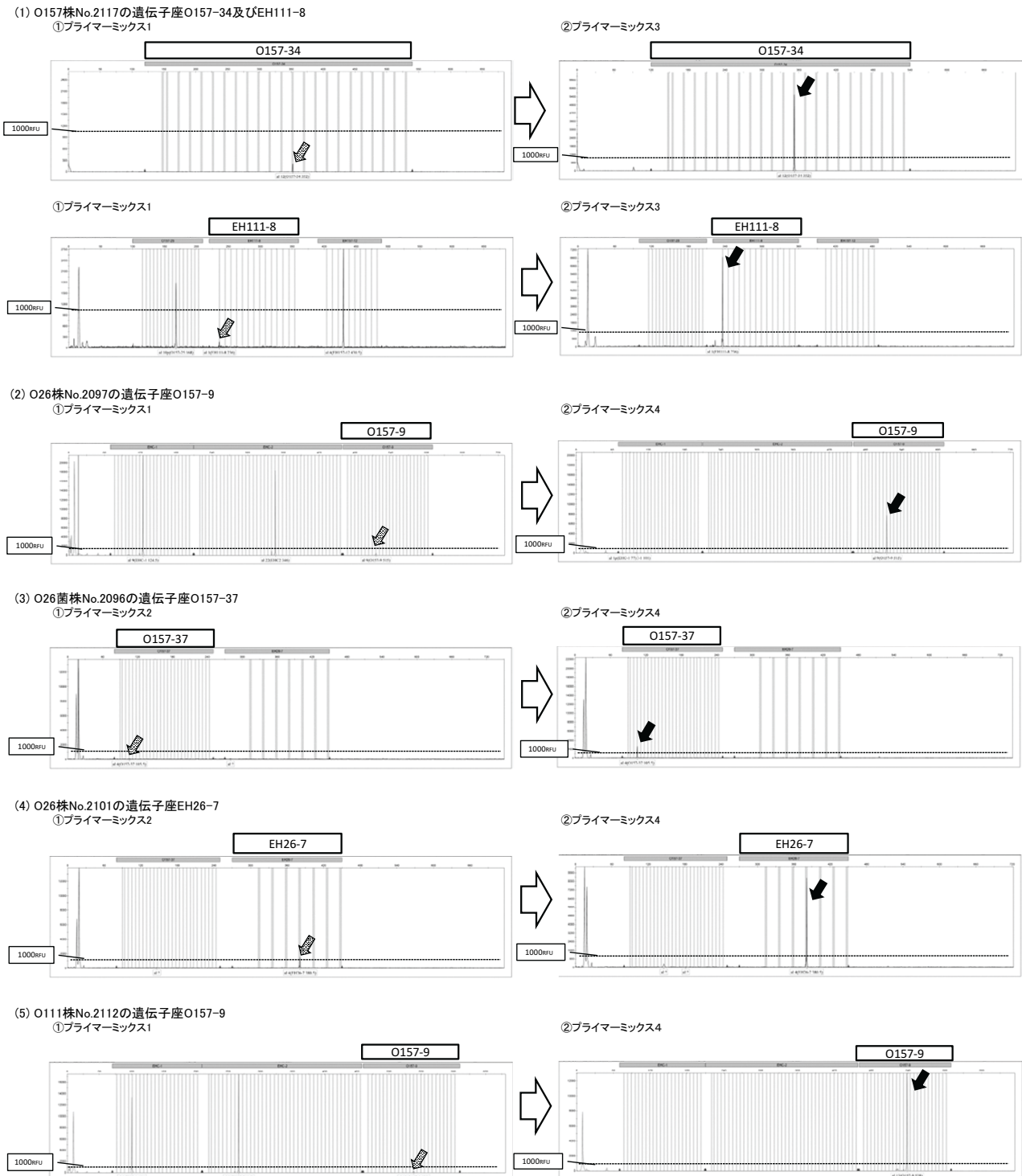


図2 マルチプレックスPCR追加法による増幅産物のピークの改善
 (左側①：通常法のマルチプレックスPCRによるSamples Plot、右側②：マルチプレックスPCR追加法によるSamples Plot
 ①、②ともに同一テンプレートを使用して比較)

(1) SLV事例(O157株No.2000)

起点株		遺伝子座																		
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37		
		2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	14	13	12	10	5	6	6	11	7.10		
		↓ 継代 ↓																		
継代株数		起点株との比較		遺伝子座																
				EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
1	SLV	2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	15	13	12	10	5	6	6	11	7.10		
7	変化なし	2	-2	1	4	-2	6	4	6.9	14	13	12	10	5	6	6	11	7.10		

(2) DLV事例(O157株No.1940)

起点株		遺伝子座																		
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37		
		2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	9	2.6.9		
		↓ 継代 ↓																		
継代株数		起点株との比較		遺伝子座																
				EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
1	DLV	2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	-2	2.9		
7	一致	2	-2	1	4	-2	5	5	2.10	6	9	12	11	5	7	6	9	2.6.9		

図3 継代によるMLVAパターンの変化
 複数のピークが認められた遺伝子座には複数の数字を示す。また、ピークの高さをフォントサイズの大小で表す。
 「-2」：増幅産物なし SLV：single-locus variant DLV：double-locus variant

これらの遺伝子座を複数保有していた場合、脱落によって2か所の遺伝子座のリピート数が変化するとされている²⁾。このことから、No.1940で変化が見られた継代株は、遺伝子座O157-36及びO157-37を保有するプラスミドが継代時に何らかの要因で脱落したdouble-locus variant (以下「DLV」という。)であると考えられた。また、この株のO157-37の「2, 9」は、「6」とは別のプラスミド上にあったために残存した可能性があるが、原因の特定には至っていない。

本検証によって、たとえ1回の継代であってもSLVやDLVといった変化が生じることが明らかとなった。その頻度は2.1% (2/96株)であったが、今回検証した菌株数は少なく、また変化は偶発的に生じると考えられるため、変化の正確な頻度を求めるには更なる調査が必要と考える。

4 まとめ

今回、当センターで整備したMLVA法の検査精度を確認するため、平成30年度に収集したEHECの65株を用いて当センターと感染研の結果を比較したところ、①各遺伝子座の増幅産物のピークがおおむね設定したBinの範囲内に認められたこと、②一部の株の一部の遺伝子座でリピート数の相違が認められたものの、その他の株ではMLVAパターンが完全に一致したこと、③一部の遺伝子

座で増幅効率が悪かったが、追加法を通常法と並行して実施することで明確な結果を得られたことから、おおむね高い精度で実施できていると考えられた。

また、菌の継代時のDNA複製エラーが要因と考えられるMLVAパターンの変化は、頻度としては非常にまれではあるが、実際の検査中にも起こり得ることが明らかになった。そのため、MLVA解析に当たっては、継代の回数を極力減らすことが望ましいと考える。

平成30年に厚生労働省は、EHECによる広域的な感染症・食中毒に関する調査において、O157, O26, O111の遺伝子型検査法をMLVA法に統一し、解析データを自治体間で共有することとした。そのため、当センターにおいても引き続きMLVA法の精度確認を行い、必要に応じて改善する予定である。

謝 辞

MLVA法導入にあたり御指導をいただき、そして菌株のMLVA解析結果の提供をいただきました国立感染症研究所の泉谷秀昌先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hidemasa Izumiya, Yingxin Pei, Jun Terajima, Makoto Ohnishi, Tetsuya Hayashi et al. : 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

- 2) 泉谷秀昌：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について，獣医公衆衛生研究, 20-2, 6-11, 2018
- 3) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編：腸管出血性大腸菌MLVAハンドブック（O157, O26, O111編）第1版, 2017