

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 パターンのバ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が同じ 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。

D. 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、アニーリング、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。PFGE および MLVA の解析結果を表 6 に示した。

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 *Vhec*1,3,4,および TR3 で 2 種類に分類され、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 *Vhec*3 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 *Vhec*1,3 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、*Vhec*1 または *Vhec*7 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 *Vhec*2 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 *Vhec*1 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、*Vhec*1・*Vhec*3・*Vhec*4・*Vhec*7・TR3・TR7・K11 であることが分かった。特に *Vhec*1 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 *Vhec*2 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、①VNTR 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。②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、③1 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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

学会発表

古田喜美ほか：Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats (MLVA) による O157:H7 の分子疫学的解析法の検討，平成 17 年度日本獣医三学会(中国)・日本獣医公衆衛生学会(中国)(2005 年 10 月，岡山)

古田喜美ほか：Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA) による腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析法の検討，衛生微生物技術協議会第 26 回研究会(2005 年 7 月，福井)

G. 参考文献

- 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. Antimicrob.* 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)

表 1 供試菌株

| 菌株 | 菌株 No. | 株数 | |
|----------------|----------|--------------|----|
| パルスネット パターン | 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 |
| 2005 年分離株 | 広島市分離株 | * | 11 |
| | 愛媛県分離株 | ST-4,6,7,8,9 | 5 |
| | 堺株 | | 1 |
| 合計 | | | 97 |

* 広島市分離菌株 No : 5002~5005,5010,5011,5013,5016,5017,5020,5021

表 2 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'-TCGCCAGTAAGTATGAAATC-3' |
| Vhec3 | -F: 5'-TET-GGCCGGATGGAAACTATGCTATT-3' |
| | -R: 5'-GCCGCTATTTTAAACCACTGACTA-3' |
| Vhec4 | -F: 5'-FAM-ATCGCCTTCTCCTCCGTAATG-3' |
| | -R: 5'-CTCCTCGCGCTCAGACAGTG-3' |
| Vhec5 | -F: 5'-FAM-CTCAGGCGCCGTTAAGGTGTAGC-3' |
| | -R: 5'-TCCGCGGAGTGCAGAGAAAATAAA-3' |
| Vhec6 | -F: 5'-HEX-ACGTAAACCCGGAATGGAAAATC-3' |
| | -R: 5'-GAGCGAAAATGTCTATCTTGAGG-3' |
| Vhec7 | -F: 5'-FAM-ATGCGCGTTAGCTACACGACA-3' |
| | -R: 5'-TGAAAGCCACACCATGCGATAAT-3' |
| TR3 | -F: 5'-HEX-GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGAC-3' |
| | -R: 5'-GGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC-3' |
| TR4 | -F: 5'-FAM-GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG-3' |
| | -R: 5'-GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACACGAC-3' |
| TR7 | -F: 5'-TET-GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTC-3' |
| | -R: 5'-GGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC-3' |
| K11 | -F: 5'-HEX-GACCGGCAATCATCGGGCCAACCA-3' |
| | -R: 5'-GATGCTGGAAAACTGATGCAGACTCGCGT-3' |
| K37 | -F: 5'-TET-GCCGCCCTTACATTACGCGGACATTC-3' |
| | -R: 5'-GCAGGAGAACAACAAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC-3' |

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 |

表 4 VNTR の配列と増幅産物の大きさ(bp)

| プライマー名 | 繰返し部位の塩基配列 | PCR 産物の大きさ(bp) |
|--------|--------------------------------|---------------------|
| Vhec1 | TGGCTC | $335 + 6 \times n$ |
| Vhec2 | AGTTAAATAATTCGCAGG | $382 + 18 \times n$ |
| Vhec3 | AAGGTG | $464 + 6 \times n$ |
| Vhec4 | AAATAG | $495 + 6 \times n$ |
| Vhec5 | TCTGGCGGAACTGGCGTATCACCGCCGTCA | $295 + 30 \times n$ |
| Vhec6 | TCGGTACTGTTCATTGGCTTGTTTA | $259 + 24 \times n$ |
| Vhec7 | ACCTCAC | $255 + 7 \times n$ |
| TR3 | TATCTT | $120 + 6 \times n$ |
| TR4 | TGCAAA | $112 + 6 \times n$ |
| TR7 | GACCAC | $272 + 6 \times n$ |
| K11 | | $187 + 6 \times n$ |
| K37 | | $142 + 6 \times n$ |

n は繰返し回数

表 5 プライマー別の VNTR の繰返し回数の多様性

| プライマー名 | 繰返し回数 | 種類 |
|--------|--|----|
| Vhec1 | 0,10,20,23,24,25,27,30,37,39,40,41,45,46,48,49 | 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 |

表6 PFGEおよびMLVAの解析結果

| No | パルスネット パターン (菌株No) | PFGEによる 分類 | | MLVA解析結果 (各プライマーの増幅産物のVNTR繰返し回数) | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------------|---------------|-------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | Xba I | Bln I | Vhec | Vhec | Vhec | Vhec | Vhec | Vhec | Vhec | TR3 | TR4 | TR7 | K11 | K37 |
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | | | | |
| 1 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 2 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 3 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 4 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 5 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 6 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 5 | 6 |
| 7 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 8 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 9 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 10 | ND,2a,ND | A | C | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 11 | ND,2a,ND | A | C | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 12 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 13 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 14 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 15 | ND,2a,ND | A | C | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 16 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 17 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 18 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 19 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 20 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 21 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 22 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 23 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 24 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 25 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 26 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 27 | ND,2a,ND | A | B | 48 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 28 | 2a,ND,1 | E | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 29 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 30 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 31 | 2a,ND,1 | F | H | 49 | 5 | 5 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 32 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 33 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 34 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 35 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 36 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 37 | 2a,ND,1 | F | G | 49 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 38 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 39 | 2a,ND,1 | D | I | 46 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 40 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 41 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 42 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 43 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 44 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 45 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 46 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 4 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 47 | 2a,ND,1 | D | I | 45 | 5 | 5 | 8 | 6 | 3 | 3 | 8 | 4 | 6 | 6 | 7 |
| 48 | 2c,ND,1 | J | K | 39 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 7 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 49 | 2c,ND,1 | J | K | 39 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 50 | 2c,ND,1 | J | K | 39 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 51 | 2c,ND,1 | J | K | 39 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 52 | 2c,ND,1 | J | K | 39 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 53 | 2c,ND,1 | J | K | 40 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 54 | 2c,ND,1 | J | K | 37 | 4 | 6 | 9 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| 55 | 2a,2a,1 | M | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|----------|---|----|----|---|----|----|---|---|----|---|---|----|----|---|
| 56 | 2a,2a,1 | M | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 57 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 58 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 59 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 2 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 60 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 61 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 62 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 63 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 64 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 65 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 66 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 67 | 2a,2a,1 | L | N | 41 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 68 | 2d,2b,ND | P | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 69 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 70 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 71 | 2d,2b,ND | P | Q | 25 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 72 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 73 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 74 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 75 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 76 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 77 | 2d,2b,ND | O | Q | 24 | 4 | 6 | 12 | 6 | 3 | 6 | 7 | 4 | 6 | 7 | 8 |
| 78 | 3k,ND,3 | R | | | 1 | 0 | | 6 | 3 | 15 | 6 | 2 | 9 | 14 | 4 |
| 79 | 3k,ND,3 | R | | | 1 | 0 | | 6 | 3 | 15 | 6 | 2 | 9 | 14 | 4 |
| 80 | 3k,ND,3 | R | | | 1 | 0 | | 6 | 3 | 15 | 6 | 2 | 9 | 14 | 4 |
| 05002 | | S | AA | 30 | 2 | | 3 | 6 | 3 | 5 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 05003 | | S | AA | 30 | 2 | | 3 | 6 | 3 | 5 | 3 | 2 | 4 | 5 | 8 |
| 05004 | | V | | | 2 | 1 | | 6 | 3 | 9 | 4 | 2 | 10 | 12 | 5 |
| 05005 | | U | Z | | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 9 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| 05010 | | S | AA | 30 | 2 | 6 | 3 | 6 | 3 | 5 | 3 | 2 | 4 | 5 | 8 |
| 05011 | | V | | 46 | 2 | 1 | | 6 | 3 | 5 | 5 | 2 | 7 | 9 | 5 |
| 05013 | | T | Y | 23 | 4 | 11 | 8 | 6 | 3 | 8 | 8 | 4 | 6 | 5 | 7 |
| 05016 | | T | Y | 23 | 4 | 11 | 8 | 6 | 3 | 8 | 8 | 4 | 6 | 5 | 7 |
| 05017 | | T | Y | 23 | 4 | 11 | 8 | 6 | 3 | 8 | 8 | 4 | 6 | 5 | 7 |
| 05020 | | U | Z | 16 | 4 | 10 | 8 | 6 | 3 | 6 | 7 | 3 | 6 | 4 | 7 |
| 05021 | | U | Z | 16 | 4 | 10 | 8 | 6 | 3 | 6 | 7 | 3 | 6 | 4 | 7 |
| ST4 | | U | Z | 25 | 5 | 9 | 13 | 6 | 3 | 6 | 8 | 4 | 6 | 5 | 7 |
| ST6 | | V | | | 2 | 1 | | 6 | 3 | 3 | 5 | 2 | 8 | 12 | 5 |
| ST7 | | W | BB | | 1 | 14 | | 1 | 1 | 4 | 6 | 2 | 6 | 11 | 8 |
| ST8 | | U | Z | 20 | 5 | 6 | 7 | 6 | 3 | 3 | 7 | 4 | 6 | 6 | 6 |
| ST9 | | X | CC | 27 | 2 | 21 | 8 | 6 | 3 | 1 | 4 | 3 | 10 | 9 | 8 |
| 97 | 塚株 | | | 30 | 4 | 6 | 6 | 6 | 3 | 7 | 8 | 3 | 4 | 5 | 7 |

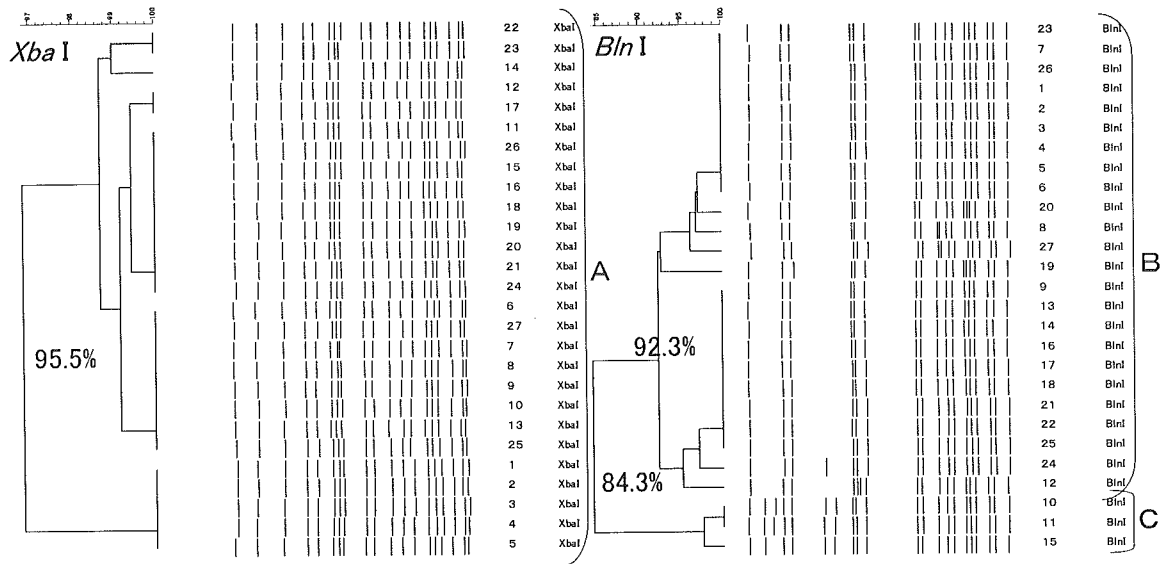


図 1 PFGE デンドログラム (ND,2a,ND)

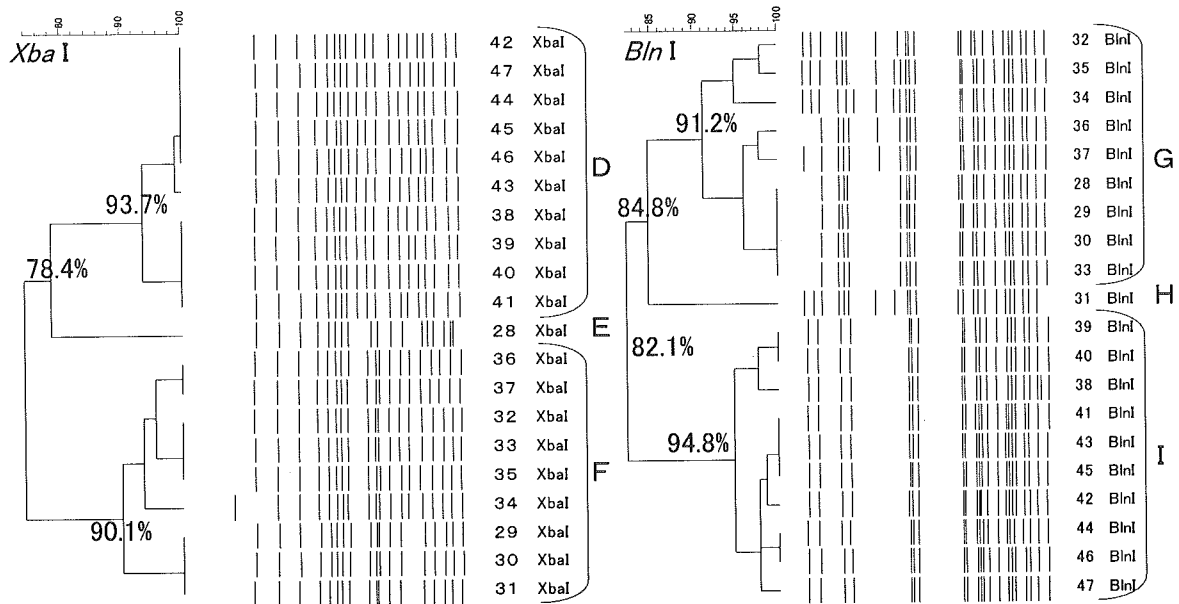


図 2 PFGE デンドログラム (2a,ND,1)

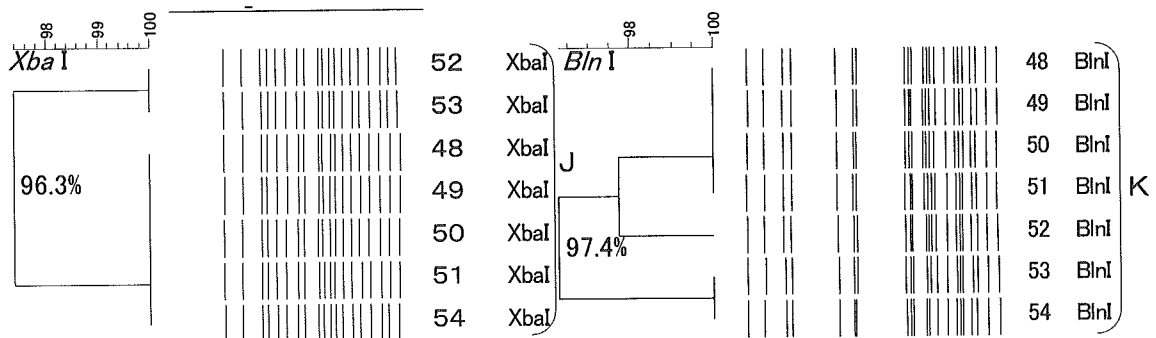


図 3 PFGE デンドログラム (2c,ND,1)

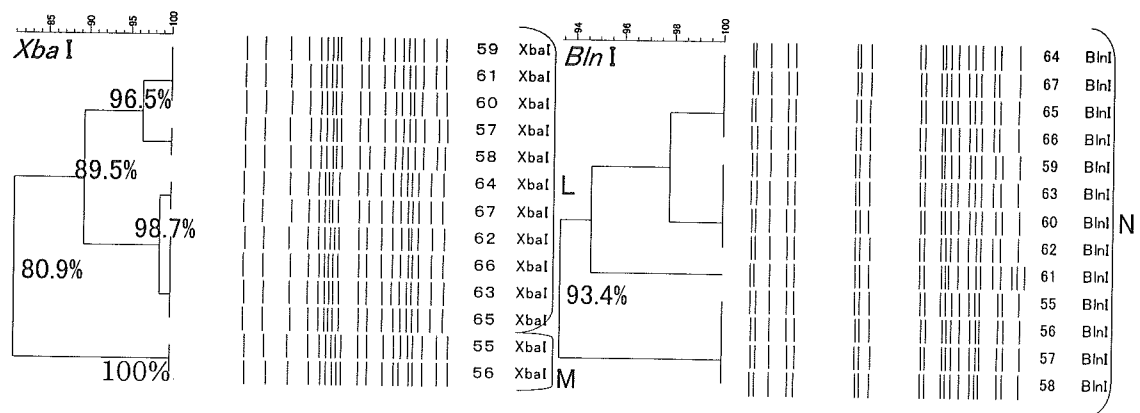


図 4 PFGE デンドログラム (2a,2a,1)

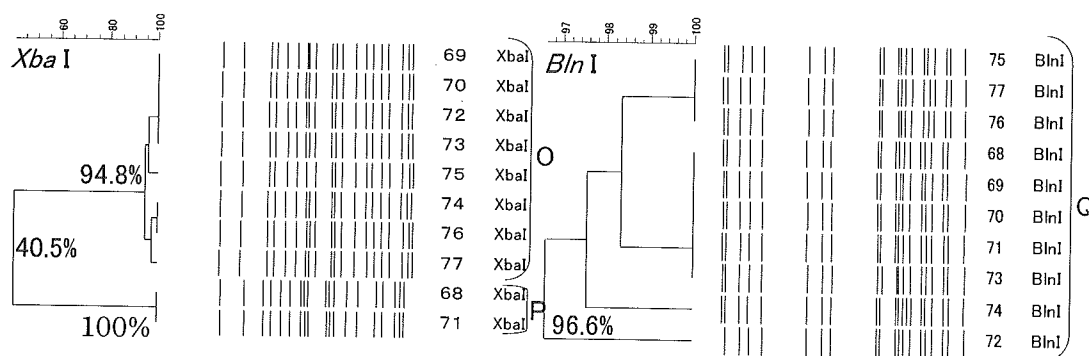
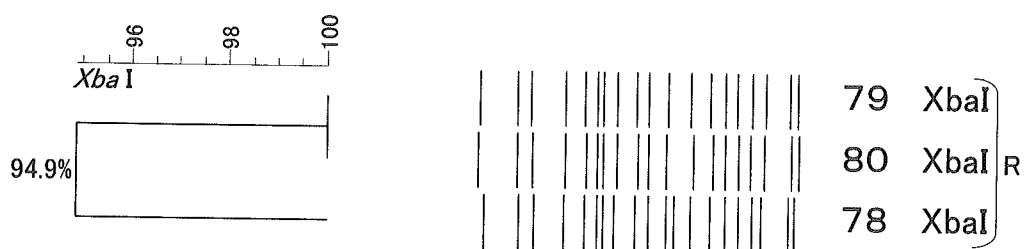
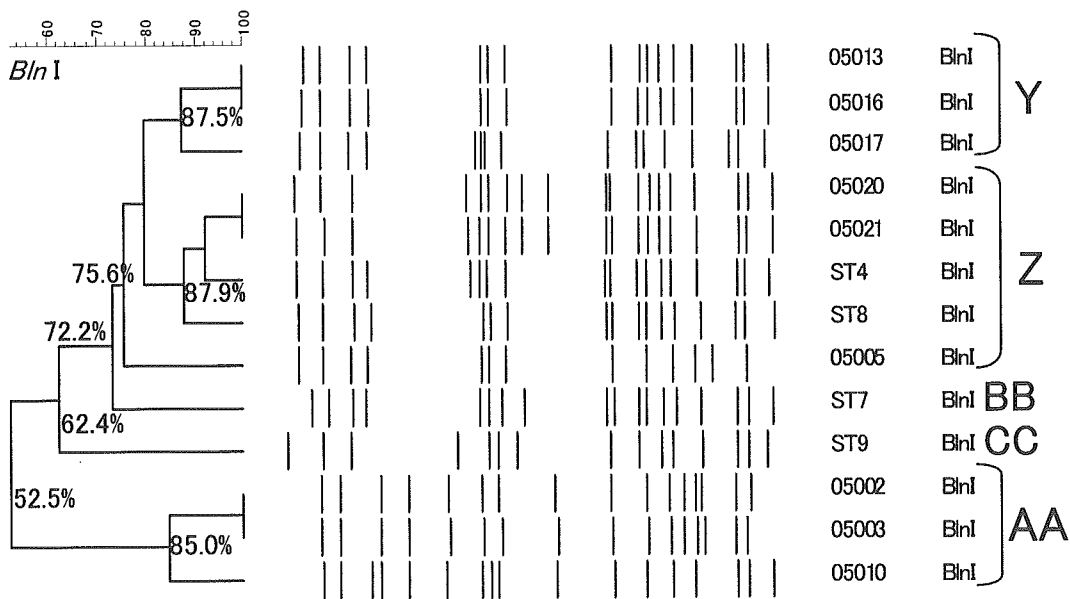
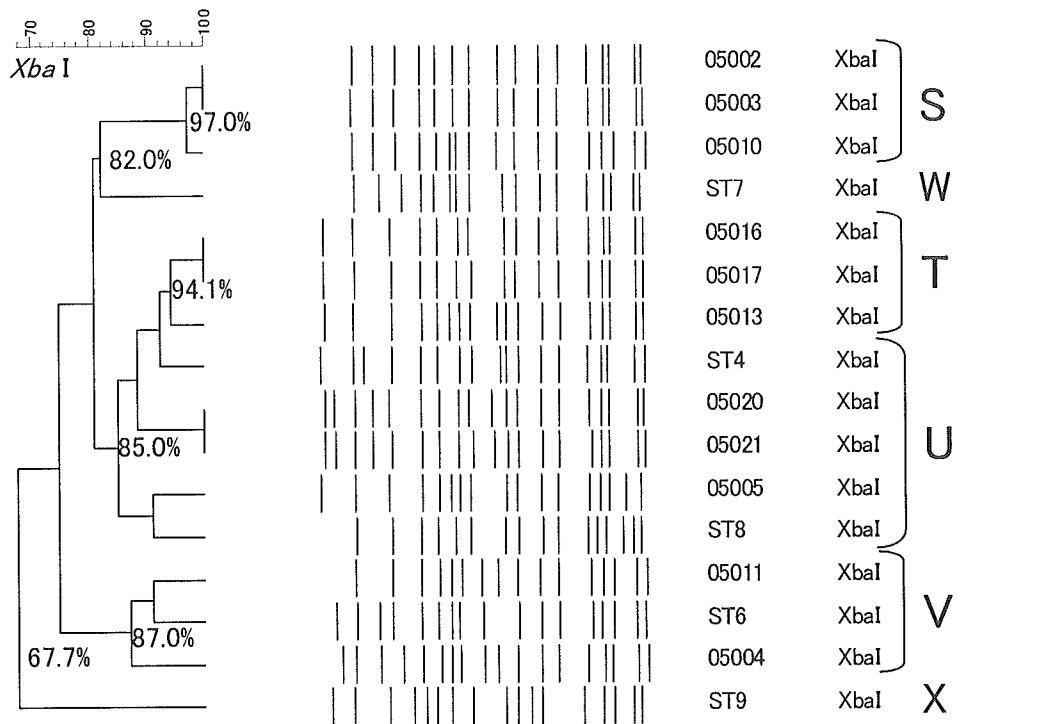


図 5 PFGE デンドログラム (2d,2b,ND)



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)



* クラスター 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)

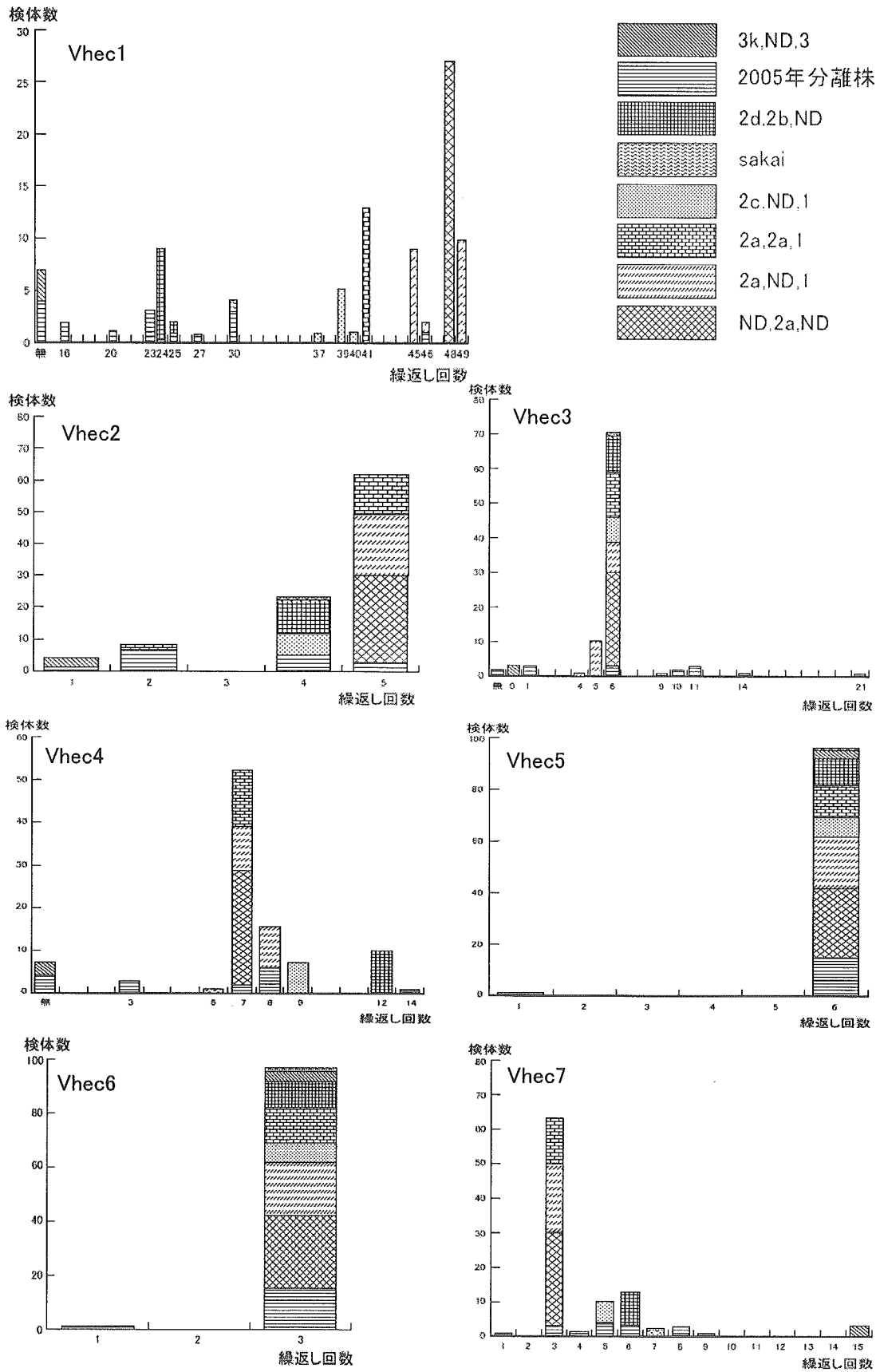


図 8-1 Lindstedt のプライマーによる MLVA 繰返し回数結果

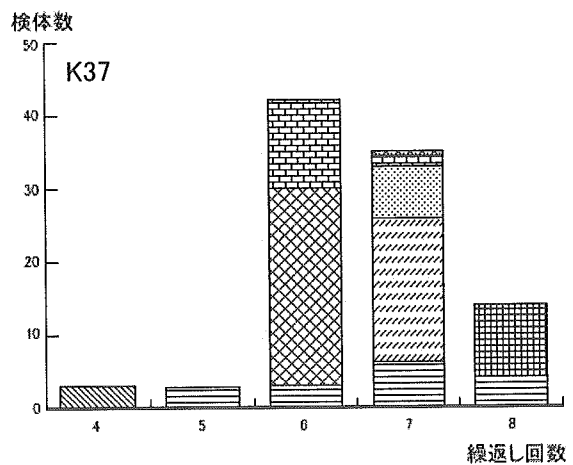
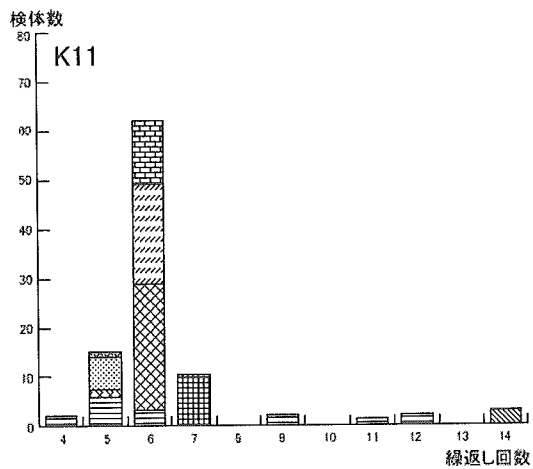
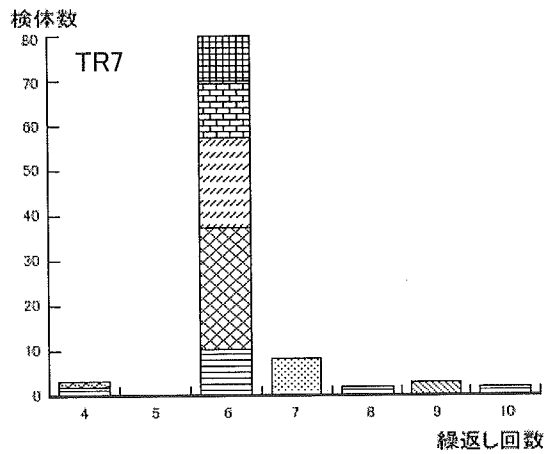
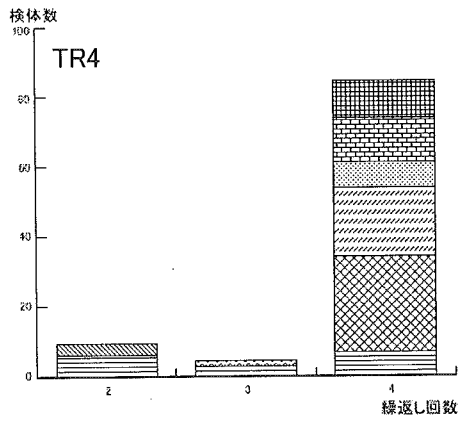
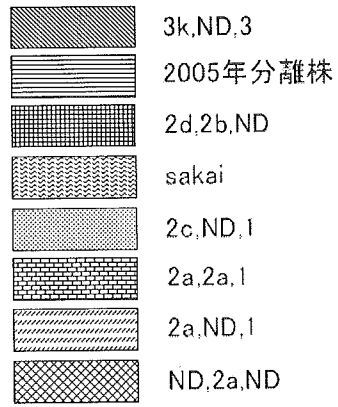
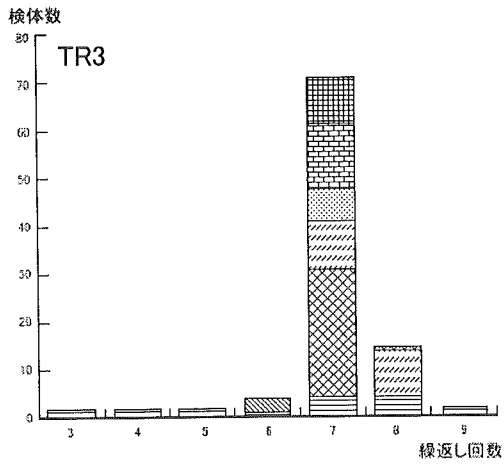


図 8-2 Keys のプライマーによる MLVA 繰返し回数結果

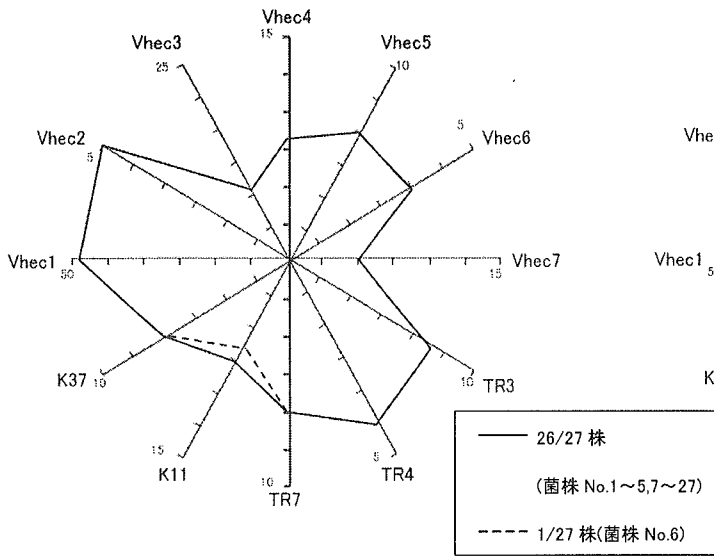


図9 MLVA 解析結果 (ND,2a,ND 全 27 株)

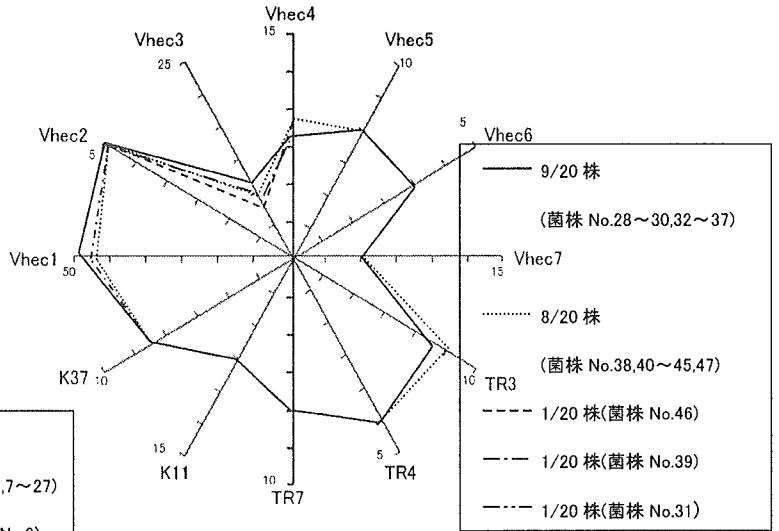


図10 MLVA 解析結果 (2a,ND,1 全 20 株)

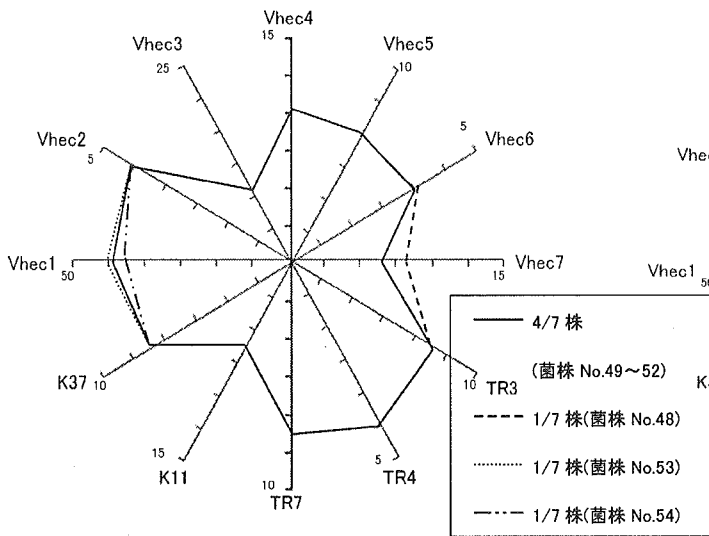


図11 MLVA 解析結果 (2c,ND,1 全 7 株)

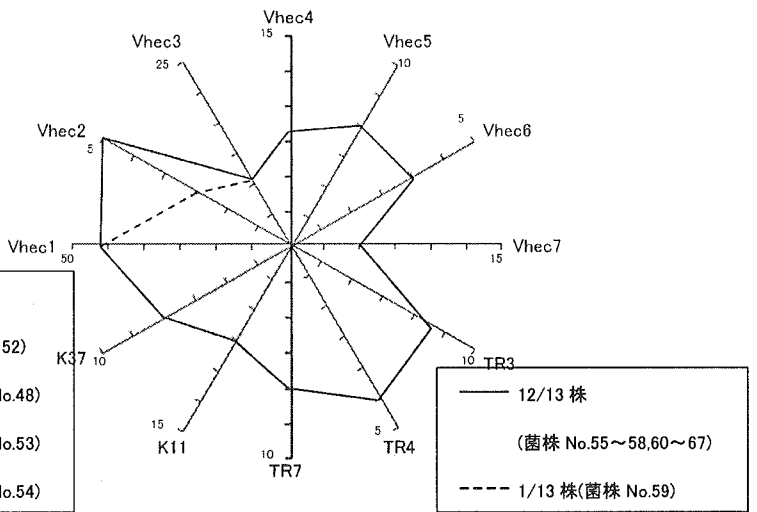


図12 MLVA 解析結果 (2a,2a,1 全 13 株)

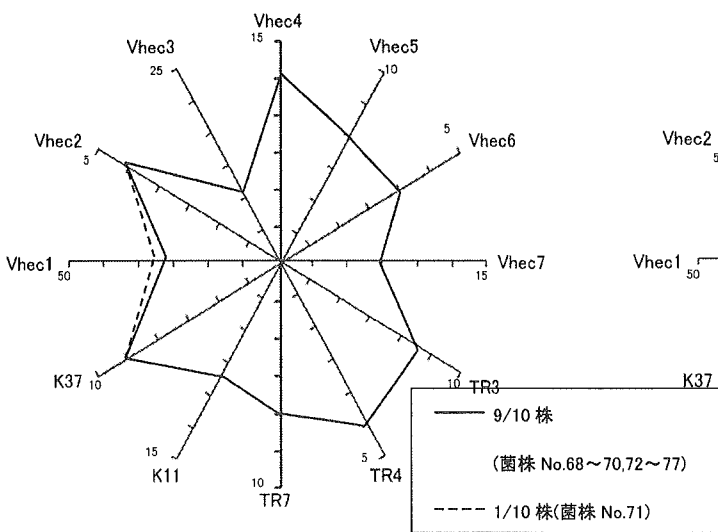


図13 MLVA 解析結果 (2d,2b,ND 全 10 株)

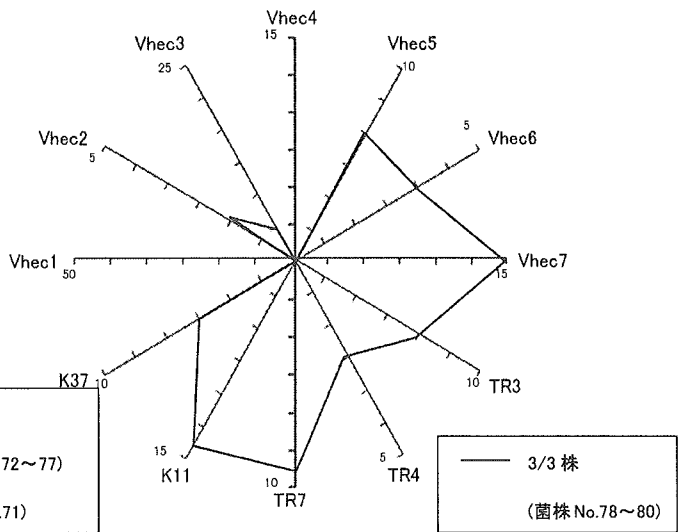


図14 MLVA 解析結果 (3k,ND,3 全 3 株)

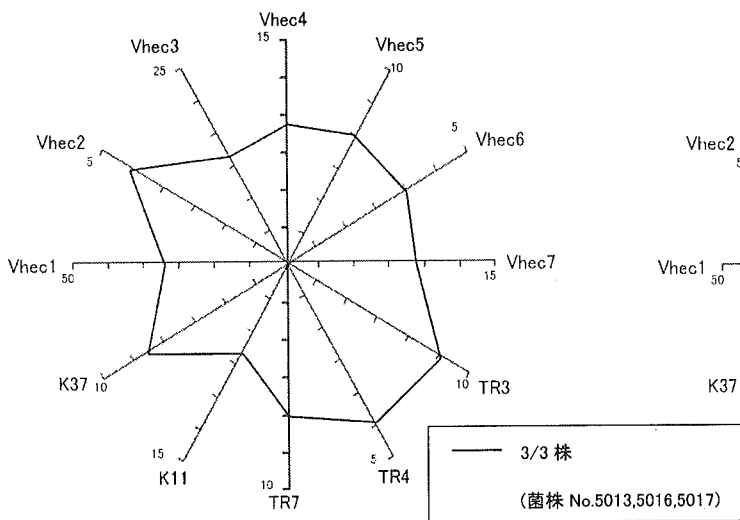


図 15 MLVA 解析結果 (2005年T-Y全3株)

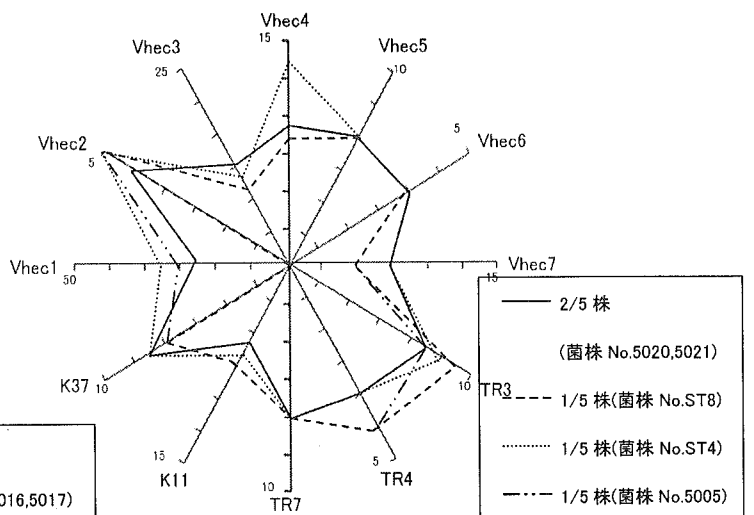


図 16 MLVA 解析結果 (2005年U-Z全5株)

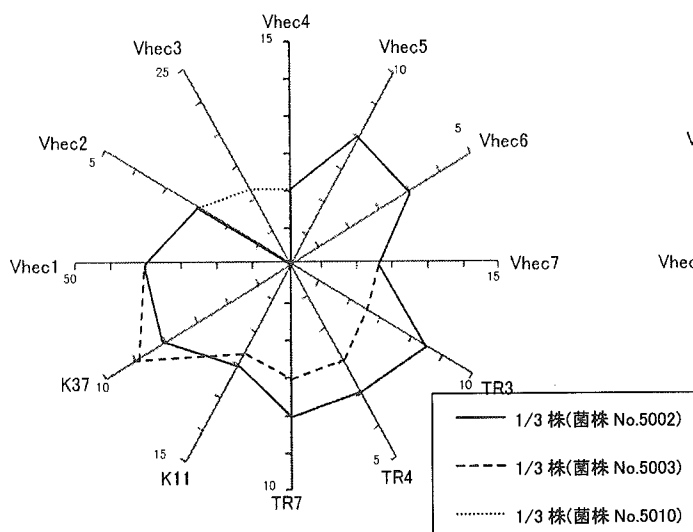


図 17 MLVA 解析結果 (2005年S-AA全3株)

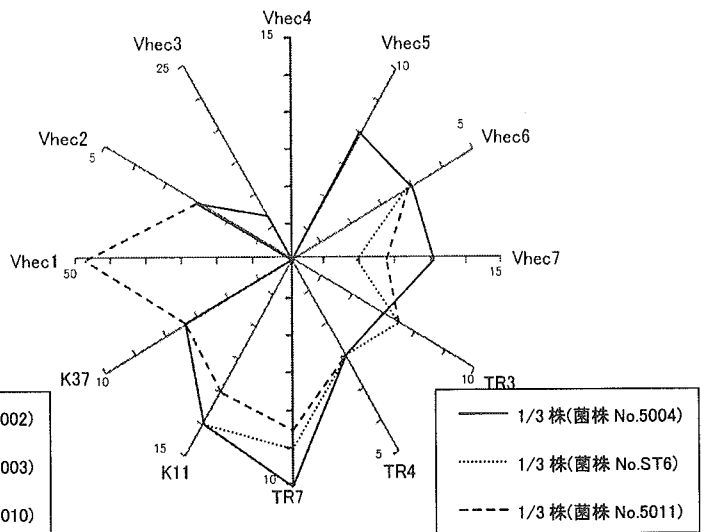


図 18 MLVA 解析結果 (2005年V全3株)

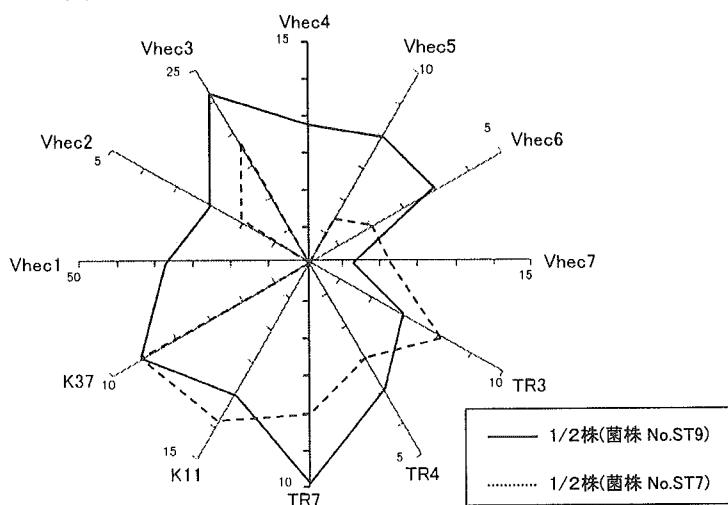


図 19 MLVA 解析結果 (2005年X-CC,W-BB全2株)

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組みⅢ

— 研修と精度管理 —

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所

| | | | |
|--------|--------------|--------|---------------|
| 川内 良介 | 福岡市保健環境研究所 | 徳崎 里美 | 北九州市環境科学研究所 |
| 眞子 純孝 | 佐賀県衛生薬業センター | 山口 仁孝 | 長崎県衛生公害研究所 |
| 植木 信介 | 長崎市保健環境試験所 | 八尋 俊輔 | 熊本県保健環境科学研究所 |
| 丸住 美都里 | 熊本市環境総合研究所 | 緒方 喜代子 | 大分県衛生環境研究センター |
| 上野 伸広 | 鹿児島県環境保健センター | 久高 潤 | 沖縄県衛生環境研究所 |

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 17 年度は ①パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法の研修と精度管理, ②*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討, ③レジオネラ属菌の PFGE の精度管理および九州各機関で検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析, ④A 群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討 4 課題について実施した。本稿では①について以下報告する。

平成 17 年 10 月 19 日および 20 日、九州ブロックにおける PFGE 研修会を行なった。昨年実施した研究内容について討論し、各機関での PFGE の改善点や今後の方向性を話し合った。また、DNA 解析法について研修を実施した。精度管理は 2 ステップで行ない、良好なゲルイメージを得ることと各機関で保有する *S. Braenderup* H9812 株の保存性の確認およびマーカーとしての適性を確認することを目的とした。Step 1 で PFGE 条件検討を行ない、Step 2 では *S. Braenderup* H9812 株の PFGE 画像解析を行なった。その結果、泳動距離やバンドのひずみ、DNA 量や制限酵素消化反応時間等の問題点を洗い出し、改善を行なった。また、各機関で保存された *S. Braenderup* H9812 株は、保存性も良好でマーカーとしても適性であることを確認した。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動された DNA パターンを比較するには、PFGE マーカーが明瞭かつ適切な距離で泳動されることが必須である。これまで O157 株を用いた精度管理を実施してきたが、ただ単に菌株を配布して、各機関の DNA パターンの近似度を確認するだけでは、良好なゲルイ

メージを得るのには限界があることが認められた。そこで、平成 17 年度における九州ブロックの取り組みとしては、「安定した PFGE マーカーの泳動」を目標とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

PFGE のマーカー標準菌株は、感染研から平成 15 年に分与され、各機関で保存していた *S.*

Braenderup H9812 株を使用した。

2. PFGE 法

PFGE 法は、図1に示す統一した方法で実施した。各機関の使用機器や一部異なる点については、表1に示した。

3. 画像の取込方法

染色したアガロースの画像取込は、各機関でそれぞれの方法により行った(表1)。9機関はデジタル画像処理システムを使用し、3機関は写真撮影したアナログ画像をスキャナーでデジタル変換した。

4. 画像解析法

各機関のデジタル画像は、福岡県保健環境研究所に電子メールで送信された。受信した画像は、必要に応じて Adobe Photoshop で 8ビット、グレースケールおよび TIFF ファイル形式に修正し、DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD, 日本語版)で解析した。解析は、最適化0, トランス1.2で行なった。

C. 研究結果

1. Step 1

適切な泳動距離の検討

S. Braenderup H9812 株を 5 コロニーの DNA をそれぞれ泳動用ゲルの中央に、その両端に λ -ladder を置き、[6.0V/cm, 2.2 to 54.2 sec, 19 時間, 14°C]で泳動した(図1)。その結果、次の4つの問題点があり、それぞれに解決策を検討した。(図2-1-2-4)。①バンドが真っ直ぐ流れない。②DNA バンドが流れ込む ③取り込んだデジタル画像の解像度が悪い。④バンドのバックの抜けが悪い。

①泳動時に水準器による泳動槽の水平バランスに留意した。②最終バンドがゲル下端から 1-1.5cm 付近となるように、各機関で泳動用緩衝液の温度および泳動時間を調整した。③機関3では保有している取込み装置では、どうしても良質の画像が保存されなかったため、装着されていた CCD

カメラを外し市販のデジタルカメラを装着した。機関11は、メーカーに調整を依頼し、解像度が改善された。④長期冷凍保存したプロテナーゼ K を使用したためと考えられた。

2. Step 2

1) S. Braenderup H9812 株の分離能

図3に示すようにいずれの機関も良好な分離能を示した。若干の近似度の違いは、バンド認識の違いによるものであった。すなわち、目視ではバンドサイズ [173.4 bpと167.1 bp] は二本に見えるが、解析ソフトでバンド認識をした場合、二本と認識する場合と一本と認識する場合があるためであった(図4)。また、28.8 bp のバンドが二本に分かれる機関が1機関あった。この機関の泳動用ゲル濃度は1.2%であり、このことに起因するか否かについては別の機関で保有している S. Braenderup H9812 株で確認する必要がある。

Step2において機関7で「バンドのバックにスモア一状、ラダー状の薄いバンドが見える」トラブルが発生した。この原因は、制限酵素が古いことが原因と考えられた(図5)。

2) S. Braenderup H9812 株と λ -ladder

各機関で泳動した S. Braenderup H9812 株と λ -ladder を解析した。各機関間で、 λ -ladder の近似度は S. Braenderup H9812 株の近似度より極端に低く、画像解析でゲルの標準化を行なうマーカーとして不向きであることが分かった(図6)。

3) S. Braenderup H9812 株の保存性

各機関で保存した S. Braenderup H9812 株を分離培養後、シングルコロニーを5個釣菌し、PFGEを行なった。その結果、すべての機関で保存されていた S. Braenderup H9812 株に変異は確認されなかった。しかし、1機関は、前述のように 28.8 bp 付近のバンドが二本確認されるため、保存性の問題か、分離能かについて確認しなければならない。

D. 考察

今年度の精度管理は、2 ステップで実施した。

Step 1 で適切な泳動条件の検討を行なうことにより、Step 2 では良好なゲルイメージを得ることができた。しかし、Step 1 では良好な結果が得られていたが、Step 2 で試薬が変わることによるトラブルが発生した。このようなことはいつでもどこでも発生する要因であり、今後 GLP で実施されているような試薬の保管・管理、機器の点検などについても検討する必要があると考えられた。

E. 結論

相互に交換可能な PFGE 画像を確保するためには、定期的なきめ細かな精度管理、研修が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

久高 潤, 堀川和美, 瓜生佳世, 松雪星子, 緒方喜久代, 河野喜美子, 山口仁孝, 山崎省吾, 渡辺治雄, 岩永正昭: 食中毒及び感染性胃腸炎の病原体と臨床症状, 感染症学雑誌, 2005, Vol. 11, 864-870.

財津裕一, 堀川和美, 野田多美枝, 田代律子, 関節腔内注射による黄色ブドウ球菌集団感染事例, Modern Physician, 2006, 26(3), 441-445.