

一方、散発例において、事例 4.5.8 の菌株は各々他と異なるパターンを示した。しかし、事例 2 (菌株③) と事例 9 (菌株⑫) に関しては、IS-Printing System で同一の C パターンを示し、PFGE 型も同一であったことから、同一菌の可能性が示唆された。同様に、事例 7 (菌株⑩) は家族内発生の事例 6 (菌株⑧) と比較した結果、IS-Printing System および PFGE 法どちらも同じ結果であり、事例間の関連性が考えられた。このように IS-Printing System と PFGE 法ではそれぞれ原理、検出系が異なるサブタイピング法であるが、双方ともほぼ同等の識別能を有していることが確認できた。

IS-Printing System は半日で結果判定が可能であり迅速性に優れているが、今回 1st で 500bp 以上のバンドがやや不明瞭であったことや、eaeA, stx1 という EHEC 必須バンドの検出が確実でなかったことから、今後はさらに最適な PCR 条件の検討が必要であると思われた。また、現在ポジ

ティブコントロール DNA の作成が進められており、これを用いることにより増幅バンドの正確な判定が可能になると思われる。IS-Printing System が分子疫学的解析方法として確立されるためには、増幅や泳動の条件などさらに検討し、標準化プロトコールが必要であると思われる。

#### D 結論

腸管出血性大腸菌 O157 12 株について、IS-Printing System を用いて型別し、PFGE 型別と比較・検討した。その結果、双方ともほぼ同等の識別能を有していることが確認できた。IS-Printing System が分子疫学的解析方法として確立されるためには、増幅や泳動の条件などさらに検討し、標準化プロトコールが必要であると思われた。

#### F 研究発表

なし

反応液の調製

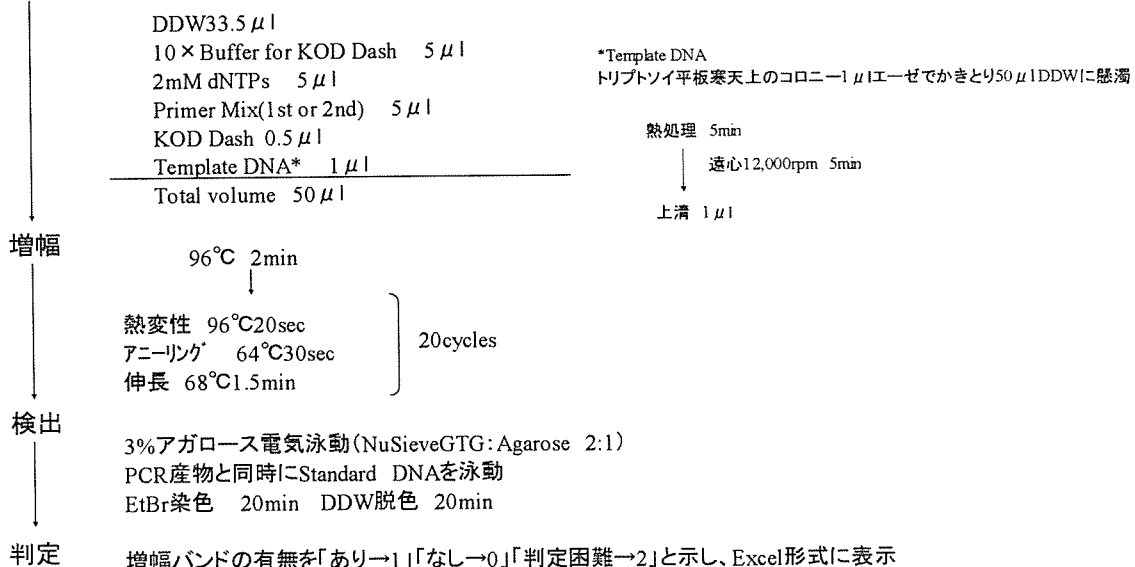


図1 IS-Printing System プロトコール

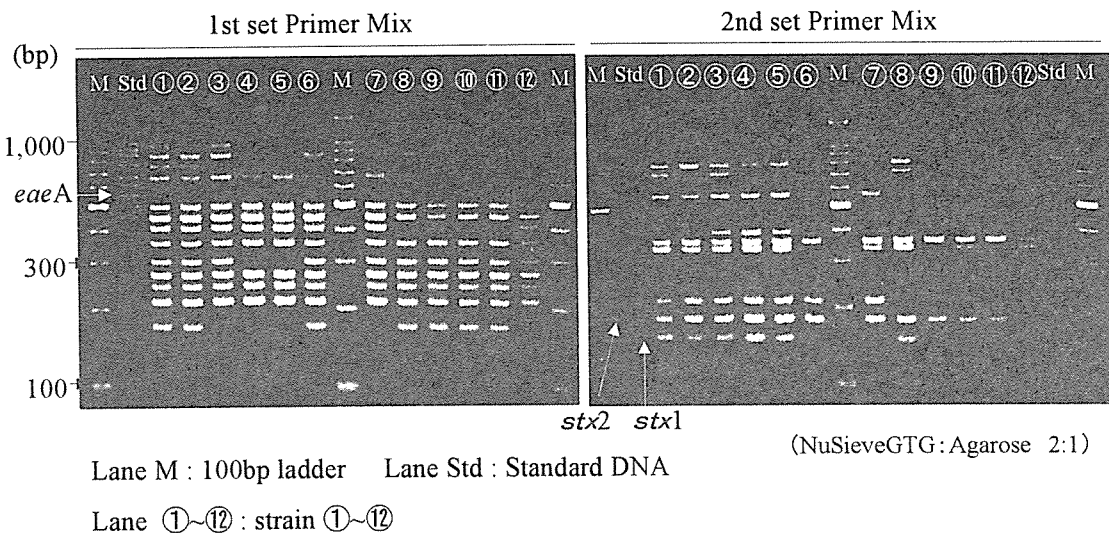


図2 IS-Printing System 泳動画像

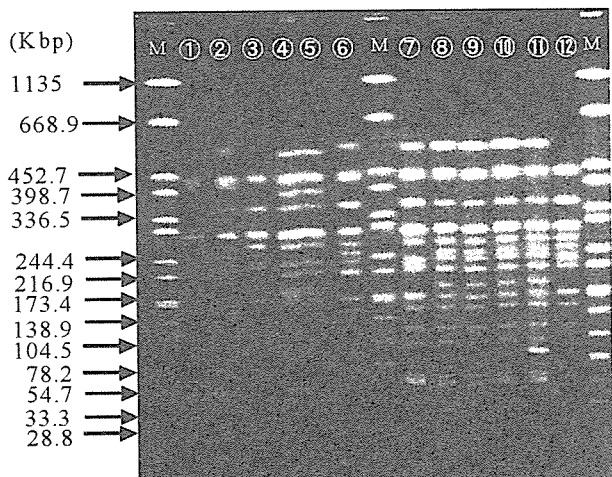


図3 PFGE 法泳動画像

表1 1st primer mix 判定結果

		1st Primer mix																
primer NO.		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	eae	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	1-16
	Size(bp)	974	905	839	742	645	595	547	495	442	405	353	325	300	269	241	211	171
①		1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
②		1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
③		1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
④		0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
⑤		0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
⑥		0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
⑦		1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
⑧		0	0	1	1	2	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
⑨		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
⑩		0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
⑪		0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
⑫		1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0

表2 2nd primer mix 判定結果

		2nd Primer Mix																	
primer NO.		2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
	Size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
①		0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
②		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
③		0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
④		0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
⑤		0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
⑥		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
⑦		0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
⑧		0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
⑨		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
⑩		0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
⑪		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
⑫		0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1

バンドあり→1 バンドなし→0 判定困難→2

表3 IS-Printing System とPFGE法との比較

事例	菌株No.	報告年月日	届出保健所	年齢	性別	発生状況	薬剤感受性試験 (耐性薬剤)	感染研での PFGE型別	IS-Printing System の型別	
1	①	H17.3.28	松山市	28	F	家族内	ABPC	a25	A	
	②	H17.3.28	松山市	3	F		ABPC	a25	①と同じ	B
2	③	H17.8.9	松山市	61	F	散发	なし	a412	C	
3	④	H17.8.25	松山市	34	M	家族内	ABPC・SM	936	D	
	⑤	H17.8.28	松山市	9	F		ABPC・SM	a418	④と2バンド違い	D
4	⑥	H17.12.1	松山市	27	F	散发	ABPC	a798	E	
5	⑦	H18.7.10	今治	3	M	散发	なし	b188	F	
6	⑧	H18.7.20	宇和島	7	F	家族内	なし	a259	G	
	⑨	H18.7.23	宇和島	34	F		なし	a259	⑧と同じ	H
7	⑩	H18.7.27	松山市	10	F	散发	なし	a259	⑧と同じ	G
8	⑪	H18.8.2	松山市	8	M	散发	なし	b193	I	
9	⑫	H18.8.4	松山市	35	M	散发	なし	a412	③と同じ	C

## 散発例由来 *Salmonella* Infantis の遺伝子解析の検討

研究協力者 広島県保健環境センター 大原祥子 榎 美代子 妹尾正登

### 研究要旨

*S. Infantis* の分離株について PFGE による遺伝子解析を実施し詳細な発生状況を把握するとともに、2種類の制限酵素による分離株間の DNA 識別能力等について検討を行った。その結果、制限酵素 *Bln*I は *Xba*I に比べ、分離株間の DNA 識別能がやや優れていた。いずれの制限酵素においても、デンドログラムは 70%以上の類似性があった。また、*Xba*I における優勢な遺伝子型に見られた同一 PFGE パターンは、*Bln*I では、さらに細区分され、遺伝子型 BC から遺伝子型 BD へ徐々に変化しつつあると考えられた。

#### A. 研究目的

ヒト由来サルモネラ検出数は、2000 年以降、*S. Enteritidis* の減少に伴い減少傾向にある。その要因の一つとして、ブロイラー農場や採卵鶏農場等における衛生対策の強化及び *S. E* ワクチン接種の効果等が考えられる。しかし、その検出数が減少する一方で、*S. Infantis* の全国における検出数は、2004 年以降、*S. Enteritidis* に続き、第 2 位であり<sup>1)</sup>、広島県においても、同様な傾向を示している(表 1)。また、*S. Infantis* は、国産鶏肉から多く分離される血清型の一つであり、その割合は年々高くなっている。

したがって、*S. Infantis* の分離株につ

いて詳細な発生状況を把握しておく必要がある。そこで、PFGE による遺伝子解析を実施するとともに、2種類の制限酵素による分離株間の DNA 識別能力等についても検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1 供試菌株

2001 年から 2005 年までに、県内医療機関の協力により得られた散発例の *S. Infantis* 分離株 44 株を用いた。

##### 2 方法

PFGE は感染研 New protocol に準拠し実施した。制限酵素は *Bln*I 及び *Xba*I を用い、泳動条件は、6.0V/cm, 2.16 - 63.8

表1 広島県内のサルモネラ主要血清型

	2001年	2002年	2003年	2004年	2005年
Enteritidis	106	Enteritidis 228	Enteritidis 125	Enteritidis 67	Enteritidis 16
Infantis	8	Infantis 16	Infantis 8	Typhimurium 13	Infantis 8
Virchow	8	Typhimurium 6	Agona 7	Infantis 4	Thompson 7
Thompson	4	Hadar 6	Typhimurium 5	Montevideo 4	Pakistan 4
その他	31	その他 29	その他 27	その他 18	その他 28
合計	157	285	172	106	63

秒、泳動時間 18 時間で行った。泳動像は DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD) で解析した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1 制限酵素による DNA 識別能及び遺伝子型別

制限酵素 *Xba*I による PFGE では、類似値 80% で分岐し始め、全分離株の 66% が遺伝子型 XA3 に分類された (図 1)。これに対し、制限酵素 *Bln*I による PFGE の結果、分離株の遺伝子型は、類似値 73% で分岐し始め、全分離株の 64% が遺伝子型 BC1 及び BC2 に分類された (図 2)。図 3 にそれぞれの PFGE パターンを示した。*Xba*I で

は、遺伝子型が 10 タイプに分類され、コンピューターによる類似値 90% での遺伝子型は、5 タイプであった。一方、*Bln*I による PFGE では、遺伝子型は 14 タイプに分類され、類似値 90% での遺伝子型は、7 タイプであった。また、遺伝子型 XA3 に分類された菌株は、*Bln*I で解析した場合、遺伝子型 BC1-3 のいずれかに分類された。*Xba*I では、同一 PFGE パターンを示す分離株群を *Bln*I では、さらに細区分でき、その有用性が示唆された。これらのことを併せ考えると、*Bln*I が *Xba*I に比較して DNA 識別能力にやや優れていると考えられた。しかし、逆に、*Xba*I の方が *Bln*I よりも遺伝子型数が多かったと

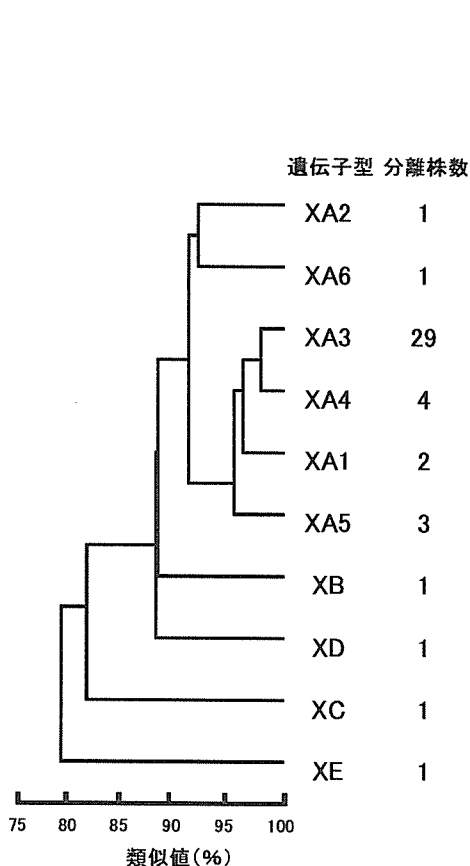


図1 *Xba*I による遺伝子型の類似性

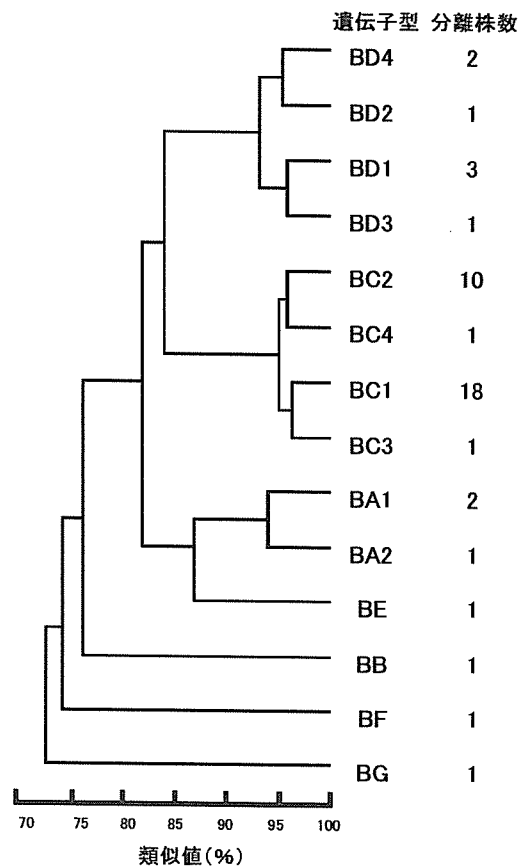


図2 *Bln*I による遺伝子型の類似性

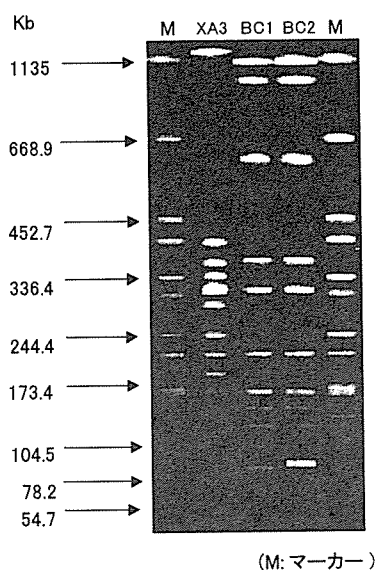


図3 主要遺伝子型のPFGEパターン

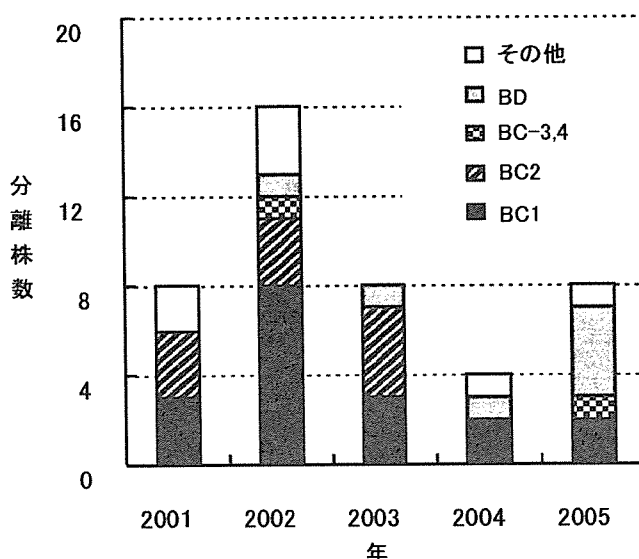


図4 *BlnI*による遺伝子型の年別検出状況

いう報告もあるため<sup>2)</sup>,引き続き検討する必要がある。

## 2 遺伝子型の年別検出状況

*XbaI*では、遺伝子型の年別検出状況に顕著な変化が見られなかった。しかし、*BlnI*では、その変化が見られた(図4)。遺伝子型BC1は2002年をピークに毎年検出されており、次いで多く検出された遺伝子型BC2は2001年から2003年まで毎年検出されたが、2004年及び2005年では検出されなかった。その一方で、2002年から毎年僅かに検出されていた遺伝子型BDが、2005年では、最も多く検出された。遺伝子型BCと遺伝子型BDは、84%の類似性があり、優勢な遺伝子型が徐々に変化している傾向があると考えられた。ただし、調査した菌株数が少ないため、今後も菌株数を増やして検討する必要がある。

## D. 結論

1 *S. Infantis*の遺伝子解析において、

制限酵素*BlnI*は、*XbaI*に比べ、分離株間のDNA識別能力にやや優れていた。

2 広島県で検出された*S. Infantis*は、いずれの制限酵素においても、デンドログラムは70%以上の類似性を示した。

3 *BlnI*で84%の類似性を持つ遺伝子型間において、優勢な遺伝子型が徐々に変化しつつあると考えられた。

## E. 研究発表

なし

## F. 参考文献

- 1) 国立感染症研究所編：サルモネラ症 2006年6月現在. 病原微生物検出情報, 27, 191-192, 2006
- 2) Kudaka J, Itokazu K, Taira K, Iwai A, Kondo M, Susa T, Iwanaga M. Characterization of *Salmonella* Isolated in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:15-19, 2006

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
協力研究報告書

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の検討  
—MLVA とパルスネットのパターン比較—

研究協力者 広島市衛生研究所生物科学部

渡邊朱美 国寄勝也 蔵田和正 石村勝之 笠間良雄 松本 勝 吉岡嘉暁

### 研究要旨

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例の迅速で詳細な解析が可能な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。2004年以降の新たなパルスネットパターンに分類された分離株43株の STEC O157:H7 を対象に、MLVA は Lindstedt らの7種類および Keys らの5種類の計12種類のプライマーで縦列反復塩基配列の有無とその繰り返し回数(VNTRs)を解析した。その結果、STEC O157:H7 は Vhec5, Vhec6 の2つのプライマーでほぼ同じ繰り返し回数であった。同じパルスネットパターンに分類される株は、Vhec1, Vhec4, TR4 の3つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで表されるとともに、Vhec2, TR3, K11, K37 の4つのプライマーによる繰り返し回数の組合せで細分化できることが示唆された。患者の喫食調査等により疫学的に関連する株においても、同様な結果が得られた。STEC O157:H7 の MLVA パターン解析に有用なプライマーは Vhec1, Vhec2, Vhec4, TR3, TR4, K11, K37 であった。

### A. 研究目的

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、各地方衛生研究所の腸管出血性大腸菌(STEC)分離菌株を国立感染症研究所(以下「感染研」という。)に収集して PFGE 解析するシステム(パルスネット)の構築が進んでいる。しかし、パルスネットにおける PFGE 解析は、制限酵素 *Xba* I 1種類の切断パターンの比較により分類が行われるため、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、本法のみでは不十分であることが指摘されており、また、昨年より遺伝子解析の迅速化に関する研究も開始された。そのため STEC 分離株を、より迅速に、細かく分類するため

に、より解析能の高い遺伝子解析法が求められていた。

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-Repeats)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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。また2005年に Keys ら<sup>3)</sup>は、Lindstedt らと Noller ら<sup>4)</sup>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。

昨年までの研究において、我々は MLVA の解析能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 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(以下「Pr-P」という。)に加え、Keys らの 5 種類の Pr-P を使用して MLVA 解析を行い、PFGE の結果と比較し、12 種類の Pr-P の有用性を確認した。そこで今回は、2004 年以降に感染研の PFGE 解析により分類された新しいパルスネットパターン(以下「感染研 Pt」という。)と MLVA 解析パターンを比較し、STEC O157:H7 の解析に有効な Pr-P の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1 供試菌株

供試菌株は、2004 年以降に広島市で分離され、新たな感染研 Pt に分類された分離株 43 株を用いた(表 1)。

### 2 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<sup>2)</sup>の改良された方法に準じて行った。プライマーは、Lindstedt らが使用した 7 種類の Pr-P 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 Pr-P を加えた 12 種類の Pr-P 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/ $\mu$ l)各 0.1  $\mu$ l, 10 $\times$  Ex Taq Buffer 1.2  $\mu$ l, 滅菌精製水 8  $\mu$ l, dNTP (2.5mM)0.5  $\mu$ l, Ex Taq Polymerase (5U/ $\mu$ l)0.1  $\mu$ l, DNA テンプレート 2  $\mu$ l とした。PCR 反応は、プライマー Vhec1 $\cdot$ 3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 5 を混合した Mix1, Vhec1 $\cdot$ 2 $\cdot$ 6 $\cdot$ 7 を混合した Mix2, TR3 $\cdot$ 4 $\cdot$ 7 と K11 $\cdot$ 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 と Mix2 の増幅産物各 1  $\mu$ l を滅菌精製水 18  $\mu$ l と混合し、その混合希釈液 1  $\mu$ l に、ホルムアミド 12  $\mu$ l とサイズマーカー(CHIMERx : GeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label, 50-625bp)1  $\mu$ l を加えたもの、及び Mix3 の増幅産物 1  $\mu$ l を滅菌精製水 19  $\mu$ l と混合し、その混合希釈液 1  $\mu$ l に、ホルムアミド 12  $\mu$ l とサイズマーカー 1  $\mu$ l を加えたもの、2 系列の電気泳動を行った。電気泳動は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で 60°C, 40 分間行い、Gene Scan Analysis Software (Applied Biosystems)で解析を行った。繰返し回数(以下「TRN」という。)の算出は、各プライマーごとに、表 4 に示す基本増幅域(bp)と繰返しサイズ(bp)に基づいて算出した。

### 3 パルスネットパターンと TRN の比較

2004 年以降の新しい感染研 Pt と、MLVA 解析結果を比較し、感染研 Pt と一致する Pr-P の組合せと、同一の感染研 Pt を詳細に分類する Pr-P の組合せについて比較検討を行った。

### 4 疫学的同一事例と TRN の比較

疫学的に同一集団と考えられる事例ごとに、感染研 Pt と MLVA 解析結果の比較検討を行った。

## C. 研究結果

### 1 MLVA 解析

各プライマーによる供試 43 株の TRN を表 5 にまとめた。最も分類数が高かったプライマーは Vhec (以下「Vh」という。)1 で 17 種類に分類された。以下、K37(12 種類), Vh3 $\cdot$ Vh7(10 種類), TR3 $\cdot$ TR4(9 種類), Vh2 $\cdot$ Vh4 $\cdot$ K11 (8 種類), TR7(6 種類)の順に分類数が多かった。Vh5 は TRN 6 回, Vh6 は TRN 3 回がいずれも 38 株(88.4%)と大半を占めた。

感染研 Pt ごとの Pr-P 別 TRN を表 6 に示した。

#### (1) Lindstedt のプライマー別解析結果

Vh1 では、増幅産物が得られないもの(4 株)と、TRN が 14, 15, 16, 19, 20, 23, 25, 26, 28, 30, 34,



37, 43, 45, 46, 48 回の 17 種類が認められた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a259"5 株が TRN 25, 26, 43 回の 3 種類, "292"7 株が 48 回, "b107"4 株が 43 回, "a27"3 株が 23 回, "a70"2 株が 30 回, "a590"2 株が 16 回, "b216"2 株が 20 回, "b452"2 株が 25 回の 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株である"b107", "b106", "b129"6 株は 34, 43 回の 2 種類, 事例"27"関連株"a259"3 株は, 26, 43 回の 2 種類であった(表 6)。

Vh2 では, 増幅産物が得られないもの(2 株)と, TRN が 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 回の 8 種類が認められ, その内 5, 6 回のもので 27 株(62.8%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a259"5 株が TRN 4, 7, 10 回, "a27"3 株が 0, 4, 5 回の 3 種類, "292"7 株, "b107"4 株が 5, 6 回, "a590"2 株が 3, 4 回, "b216"2 株が 4, 5 回, "b452"2 株が 4, 5 回の各 2 種類, "a70"2 株が 5 回の 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107", "b106", "b129"の 6 株は, 2, 5, 6 回の 3 種類, 事例"27"関連株"a259"3 株は, 4, 7 回の 2 種類であった(表 6)。

Vh3 では, 増幅産物が得られないもの(6 株)と, TRN が 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13 回の 10 種類が認められ, その内 5, 9 回のもので 22 株(51.2%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a27"3 株が TRN 10, 12 回, "b452"2 株が 0, 7 回の 2 種類, "292"7 株, "b107"4 株が 5 回, "a259"5 株が 9 回, "a70"2 株が 8 回, "a590"2 株が 9 回, "b216"2 株が 10 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107", "b106", "b129"の 6 株は 5 回, 事例"27"関連株"a259"3 株は 9 回の各 1 種類であった(表 6)。

Vh4 では, 増幅産物が得られないもの(4 株)と, TRN が 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13 回の 8 種類が認められ, その内 7, 8 回のもので 24 株(55.8%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a259"5 株が TRN 11, 12 回の 2 種類, "292"7 株, "b107"4 株が 7 回, "

a27"3 株, "a590"2 株が 8 回, "a70"2 株が 3 回, "b216"2 株が 9 回, "b452"2 株が 13 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b106", "b107", "b129"の 6 株は, 7, 8 回, 事例"27"関連株"a259"3 株は, 11, 12 回の各 2 種類であった(表 6)。

Vh5 では, 増幅産物が得られないもの(1 株)と, TRN が 4, 5, 6, 9 回の 5 種類が認められ, その内 6 回のもので 38 株(88.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "b452"2 株が TRN 6, 9 回の 2 種類, "292"7 株, "b107"4 株, "a259"5 株, "a27"3 株, "a70"2 株, "a590"2 株, "b216"2 株が 6 回の 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107", "b106", "b129"の 6 株, 事例"27"関連株"a259"3 株は, いずれも 6 回の 1 種類であった(表 6)。

Vh6 では, 増幅産物が得られないもの(3 株)と, TRN が 1, 3 回の 3 種類が認められ, その内 3 回のもので 38 株(88.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a259"5 株が TRN 1, 3 回, "b452"2 株が 0, 3 回の 2 種類, "292"7 株, "b107"4 株, "a27"3 株, "a70"2 株, "a590"2 株, "b216"2 株は, いずれも 3 回の 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107", "b106", "b129"の 6 株は, 0, 3 回, 事例"27"関連株"a259"3 株は, 1, 3 回の各 2 種類であった(表 6)。

Vh7 では, 増幅産物が得られないもの(2 株)と, TRN が 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 22, 31 回の 10 種類が認められ, その内 3, 6, 8 回のもので 29 株(67.4%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では, "a259"5 株が TRN 4, 8 回, "b452"2 株が 6, 31 回の各 2 種類, "292"7 株, "b107"4 株が 3 回, "a27"3 株が 8 回, "a70"2 株が 5 回, "a590"2 株, "b216"2 株が 6 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107", "b106", "b129"の 6 株は, 3, 22 回, 事例"27"関連株"a259"3 株は, 4, 8 回の各 2 種類であった(表 6)。

## (2) Keys のプライマー別解析結果

TR3 では、増幅産物が得られないもの(2株)と、TRN が 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 回の 9 種類が認められ、その内 7 回のもので 23 株(53.5%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、"a259"5 株が TRN 0, 6, 7, 12 回の 4 種類、"a27"3 株が 3, 8, 9 回の 3 種類、"b452"2 株が 4, 8 回の 2 種類、"292"7 株、"b107"4 株、"a590"2 株、"b216"2 株が 7 回、"a70"2 株が 3 回の 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107"、"b106"、"b129"の 6 株は、7, 9 回の 2 種類、事例"27"関連株"a259"3 株は、6, 7, 12 回の 3 種類であった(表 6)。

TR4 では、全て増幅産物が得られ、TRN が 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 14, 17 回の 9 種類が認められ、その内 3, 4 回のもので 33 株(76.7%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、"a259"5 株が TRN 4, 17 回、"a27"3 株が 4, 12 回の各 2 種類、"292"7 株、"b107"4 株、"b452"2 株が 4 回、"a70"2 株が 2 回、"a590"2 株、"b216"2 株が 3 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107"、"b106"、"b129"の 6 株と事例"27"関連株"a259"3 株は、いずれも 4 回の 1 種類であった(表 6)。

TR7 では、増幅産物が得られないもの(9株)と、TRN が 4, 6, 7, 8, 10 回の 6 種類が認められ、その内 6 回のもので 22 株(51.2%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、"b107"4 株、"a27"3 株、"a590"2 株が TRN 0, 6 回、"a259"5 株が 0, 4 回の各 2 種類、"292"7 株、"b452"2 株が 6 回、"a70"2 株が 4 回、"b216"2 株が 7 回の各 1 種類であった。一方、2006 年における事例"25"関連株"b107"、"b106"、"b129"の 6 株は、0, 6 回の 2 種類、事例"27"関連株"a259"3 株は、4 回の 1 種類であった(表 6)。

K11 では、増幅産物が得られないもの(8株)と、TRN が 3, 4, 5, 6, 7, 10, 24 回の 8 種類が認められ、その内 5, 6 回のもので 26 株(60.5%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、"292"7 株、"b107"4 株

が TRN が 5, 6 回、"a259"5 株が 4, 5 回の各 2 種類、"a27"3 株が 0 回、"a70"2 株、"b452"2 株が 5 回、"a590"2 株、"b216"2 株が 4 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107"、"b106"、"b129"の 6 株は、5, 6 回の 2 種類、事例"27"関連株"a259"3 株は、5 回の 1 種類であった(表 6)。

K37 では、全て増幅産物が得られ、TRN が 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 19, 28, 29, 30, 31 回の 12 種類が認められ、その内 6, 7 回のもので 30 株(69.8%)を占めた(表 5)。感染研 Pt 別では、"a259"5 株が TRN 6, 12, 19 回の 3 種類、"a27"3 株が 7, 28 回の 2 種類、"292"7 株、"b107"4 株が 6 回、"a70"2 株が 8 回、"a590"2 株、"b216"2 株、"b452"2 株が 7 回の各 1 種類であった。2006 年における事例"25"関連株"b107"、"b106"、"b129"の 6 株は、6 回の 1 種類、事例"27"関連株"a259"3 株は、6, 19 回の 2 種類であった(表 6)。

## 2 パルスネットパターンと TRN の比較

2004 年以降、感染研の PFGE 解析により分類された新たなパルスネットパターンごとに、Vh5 と Vh6 を除く 10 種類の Pr-P による MLVA 解析結果を比較検討した(表 7)。Vh5 と Vh6 は、供試菌株の大半が同一の TRN であり、検討対象から外した。

### (1) 感染研 Pt ごとの TRN 解析結果

"292"7 株では、Vh1, Vh3, Vh4, Vh7, TR3, TR4, TR7, K37 は同一の TRN を示し、Vh2, K11 は 2 種類の TRN を認めた。

"b107"4 株では、Vh1, Vh3, Vh4, Vh7, TR3, TR4, K37 は同一の TRN を示し、Vh2, TR7, K11 は 2 種類の TRN を認めた。

"a259"5 株では、Vh3 は同一の TRN を示し、Vh4, Vh7, TR4, TR7, K11 は 2 種類、Vh1, Vh2, K37 は 3 種類、TR3 は 4 種類の TRN を認めた。

"a27"3 株では、Vh1, Vh4, Vh7, K11 は同一の TRN を示し、Vh3, TR4, TR7, K37 は 2 種類、Vh2,

TR3 は 3 種類の TRN を認めた。

“a70”2 株は、全て同一の TRN を示した。

“a590”, “b216”, “b452”は、2 株ずつであるが、同様に同一の感染研 Pt 内で共通する TRN と異なる TRN が認められた。

## (2) 感染研 Pt と Pr-P の組合せ

感染研 Pt と一致する Pr-P の組合せと、一致せずに詳細に分類される Pr-P の組合せについて、比較検討を行った。

Vh1, Vh3, Vh4, Vh7, TR4, TR7, K11, K37 で、同一感染研 Pt 内で、TRN が異なる一部の株(以下「変異株」という。)は、それぞれ 1, 2, 1, 2, 2, 4, 3, 3 種類であった。変異株の少ない Pr-P の内 Vh1, Vh4, TR4 を選択して(以下「eq-TR」という。)感染研 Pt と比較すると、24 種類の感染研 Pt すべてを、重複せずによく表現できた(表 8)。

感染研 Pt “292”, “b107”, “a259”, “a27”と eq-TR の一致度(一致する種類数/パターン内の種類数)は、それぞれ 4/4, 3/3, 3/5, 2/3 であり, “a70”, “a590”, “b216”, “b452”では全て 2/2 であった。

感染研 Pt とあまり一致しない Pr-P は、Vh2, TR3, TR7, K11, K37 で、変異株はそれぞれ 8, 6, 4, 3, 3 種類であった。変異株の多い Vh2, TR3 と、感染研 Pt “292”, “b107”, “a259”をよく分類する K11, K37 を選択して(以下「cl-TR」という。)感染研 Pt と比較すると、すべての感染研 Pt をよく分類できた。TR7 は感染研 Pt をよく分類したが、TRN 0 回のもので多いため、組合せから外した。

“292”7 株では、感染研 Pt と一致する(表現する)組合せ“Vh1-Vh4-TR4”の TRN のパターンは、“48-7-4”であり、細分化する組合せ“Vh2-TR3-K11-K37”の TRN パターンにより、3 種類に分類された。

“b107”4 株の eq-TR は“43-7-4”であり、cl-TR により 3 種類に分類された。

“a259”5 株の eq-TR は“26-12-4”または“43-

12-4”であり、cl-TR により 5 種類に分類された。

“a27”3 株の eq-TR は“23-8-12”であり、cl-TR により 3 種類に分類された。

“a70”2 株の eq-TR は“30-3-2”であり、cl-TR により分類されなかった。

“a590”株, “b216”株, “b452”株は、2 株ずつであるが、eq-TR はそれぞれ“16-8-3”, “20-9-3”, “25-13-4”であり、cl-TR により、いずれも 2 種類に分類された。

“b106”1 株の eq-TR は“43-7-4”で、疫学的に“b107”の事例と同一の集団発生が強く疑われる菌株で、“b107”の eq-TR と同一であった。

以上の eq-TR は、他の散発事例 15 株の eq-TR と全て異なり、特異的であった。

平成 17 年度の研究で得られた TRN について eq-TR を適用し、比較検討した(表 9, 10)。

感染研から“292”と同一パターンであると報告のあった“ND,2a,ND”27 株の eq-TR は全て“48-7-4”で、新しい感染研 Pt “292”の eq-TR と同一であり、その他の eq-TR は、“2a,2a,1”13 株全てが“41-7-4”, “2a,ND,1”20 株中 19 株が“45-8-4”または“49-7-4”, “2d,2b,ND”10 株中 9 株が“24-12-4”, “2c,ND,1”7 株中 5 株が“39-9-4”であった。更に、cl-TR を適用したところ、感染研 Pt “ND, 2a,ND”, “2a,2a,1”は、それぞれ 2 種類に分類され、その他の感染研 Pt は分類できなかった。

## 3 疫学的同一事例と TRN の比較

疫学的に同一集団と考えられる事例ごとに、感染研 Pt と、Vh5 と Vh6 を除く 10 種類の Pr-P による MLVA 解析結果を比較検討した(表 11)。

事例“25”は、2006 年 7 月の約 1 ヶ月間に、3 つの施設 A, B, C が、食材や従事者を介して、相互に密接に関連して発生したことが疑われた事例であった。患者や従事者の菌株 6 株の内、5 株は eq-TR “43-7-4”で、感染研 Pt では“b107”4 株, “b106”1 株の 2 種類に区別された。残り 1 株は、eq-

TR”34-8-4”, 感染研 Pt”b129”で, 他の5株とは, 異なっていた。

事例”26”と”27”は, 約2週間の間隔で発生し, 疫学的に関連が認められなかった2事例である。更に事例”27”は, 食材の仕入先が共通するのみの散発2事例(A, B)の集合事例であったが, 2事例5株の感染研 Ptは”a259”の1種類のみを集約された。しかしMLVA解析では, 事例”26”の患者2株は, eq-TR ”43-12-4”, ”25-12-17”の2種類, 事例”27”の患者3株は, eq-TR”43-12-4”, ”26-11-4”, ”26-12-4”の3種類に分類された。

事例”19”と”20”は, 約1ヶ月の間隔で発生し, 疫学的に関連が認められなかった2事例で, 感染研 Pt では”a27”1種類のみを集約された。MLVA解析でも2事例の各1株は eq-TR”23-8-12”で一致し, 1株はTR4のみが異なっていた。

事例”16”では, 感染研 Pt”a70”, eq-TR”30-3-2”で一致し, cl-TR で区別されなかった。

事例”21”では, 感染研 Pt”a590”, eq-TR”16-8-3”で一致し, cl-TR で2種類に区別された。

事例”30”では, 感染研 Pt”b216”, eq-TR”20-9-3”で一致し, cl-TR で2種類に区別された。

事例”5”では, 2株が感染研 Pt”703”, ”708”に区別され, eq-TR, cl-TR をはじめ, Vh6を除く11種類のTRNが一致しなかった。

## D. 考察

### 1 MLVA 解析

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。昨年度, Lindstedt らの改良したMLVA解析法に基づき, PCR反応の初期変性, アニールリング, 伸張反応を検討した結果, 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, 増幅産物は120~630bpの範囲にあるため, サイズマーカーをCHIMERx社のGeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label 50-625bpを用いて電

気泳動を行った。

昨年度に引き続き, 今年度も43株のO157:H7を用いて, Lindstedtら(7種類)とKeysら(5種類)の12種類のプライマーによりMLVA解析を実施し, パルスネットパターンと比較し, MLVA解析に有用なプライマーの選定を行った。

各プライマーによる43株のTRNは, Vh1~7で順に17, 8, 10, 8, 5, 3, 10種類, TR3, TR4, TR7で順に9, 9, 6, K11, K37で8, 12種類であり, 昨年度の97株についての報告では, Vh1~7で順に16, 4, 10, 8, 2, 2, 9種類, TR3, TR4, TR7で順に7, 3, 6種類, K11, K37で8, 5種類であり, 全体的にやや収束しているが, ほぼ同様の分類能が確認された。

#### (1) Lindstedt のプライマー別解析結果

Vh1では, 感染研 Pt”292”, ”b107”, ”a27”, ”a70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”に対して, それぞれ48回, 43回, 23回, 30回, 16回, 20回, 25回の1種類のTRNが特徴的に対応しており, 12種類のPr-Pの中で, 感染研 Ptを最もよく表現できるPr-Pであった。しかし”a259”では25, 26, 43回の3種類のTRNが観察されるなど, Vh1のみでは完全に感染研 Ptを表すことはできず, 他のPr-Pによる補完が必要であった。

Vh2では, 感染研 Pt”292”, ”b107”, ”a259”, ”a27”, ”a70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”のTRNは, それぞれ2, 2, 3, 3, 1, 2, 2, 2種類に分類され, PFGE(制限酵素 *Xba*I 1種類の切断パターン)では解析できない配列部位の分類能を有し, 感染研 Ptを最もよく細分化するPr-Pであった。

Vh3では, 感染研 Pt”292”, ”b107”, ”a259”, ”a70”, ”a590”, ”b216”のTRNは, 5, 5, 9, 8, 9, 10回の各1種類であり, 5, 9回が2つの感染研 Ptで重複するものの, 感染研 Ptと相応して一定のTRNが現れる分類能の高いPr-Pであった。

Vh4では, 感染研 Pt”292”, ”b107”, ”a27”, ”a

70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”の TRN は, 7, 7, 8, 3, 8, 9, 13 回の各 1 種類が, 感染研 Pt と相応して出現する Pr-P であった。しかし TRN 7, 8 回が 2 つの感染研 Pt で重複しているため, Vh4 のみでは完全に感染研 Pt を表すことはできないが, 他の Pr-P と組合せて感染研 Pt を表現できる可能性が示唆された。

Vh5 と Vh6 は, TRN の種類数が特に少なく, Vh5 の 6 回, Vh6 の 3 回がいずれも 38 株(88.4%), 昨年度の報告でも, Vh5 の 6 回, Vh6 の 3 回がいずれも 96 株(99.0%)と大半を占め, 感染研 Pt と相応して出現せず, 分類能も低く, STEC O157:H7 の解析に有効な Pr-P ではなかった。

しかし, 2003 年の Lindstedt らの報告では, Vh5, Vh6 における特異的な偏りは観察されていないため, Vh5 が 6 回, Vh6 が 3 回の STEC O157:H7 が特徴的に出現した現象については, 今後の MLVA 解析法の標準化と国内外のデータとの比較解析が必要である。

なお, Hyytia-Tress ら<sup>5)</sup>の報告では, 29 種類の Keys のプライマーを検討し, 最終的に 9 種類のプライマーに絞り込んでおり, その過程で我々と同様に Vh5(keys のプライマーNo.5), Vh6 の 2 つのプライマーを対象外としている(表 4)。

Vh7 では, 感染研 Pt ”292”, ”b107”, ”a27”, ”a70”, ”a590”, ”b216”の TRN は, 3, 3, 8, 5, 6, 6 回の各 1 種類であり, 3, 6 回が 2 つの感染研 Pt で重複するものの, 感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる分類能の高い Pr-P であった。

## (2) Keys のプライマー別解析結果

TR3 では, 感染研 Pt ”a259”, ”a27”, ”b452”の TRN は, それぞれ 4, 3, 2 種類に分類され, PFGE では解析できない遺伝子部位の分類能を有し, 感染研 Pt をよく細分化することが示唆された。

TR4 では, 感染研 Pt ”292”, ”b107”, ”a70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”の TRN は, 4, 4, 2, 3, 3, 4

の各 1 種類が, 感染研 Pt と相応して出現する Pr-P であった。しかし, TRN 3, 4 回が 2 つの感染研 Pt で重複しているため, TR4 のみでは完全に感染研 Pt を表すことはできないが, 他の Pr-P と組合せて感染研 Pt を表現できる可能性が示唆された。

TR7 では, 感染研 Pt ”292”, ”a70”, ”b216”, ”b452”の TRN は, 6, 4, 7, 6 回の各 1 種類であり, 6 回が重複するものの, 感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。

K11 では, 感染研 Pt ”a27”, ”a70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”の TRN は, 0, 5, 4, 4, 5 回の各 1 種類であり, 4, 5 回が重複するものの, 感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。

K37 では, 感染研 Pt ”292”, ”b107”, ”a70”, ”a590”, ”b216”, ”b452”の TRN は, 6, 6, 8, 7, 7, 7 回の各 1 種類であり, 6, 7 回が重複するものの, 感染研 Pt と相応して一定の TRN が現れる Pr-P であった。一方, 感染研 Pt ”a259”が 3 種類, ”a27”が 2 種類に分類され, PFGE では解析できない遺伝子部位の分類能を有し, 感染研 Pt をよく細分化できることが示唆された。

## 2 パルスネットパターンと TRN の比較

感染研 Pt と一致する Pr-P の組合せについて比較検討した結果, 変異株の少ない Pr-P, Vh1, Vh4, TR4 を選択することによって, 24 種類の感染研 Pt すべてを, 重複せずによく表現できることが分かった。また, 昨年度の研究で得られた TRN について再検討した結果, 80 株, 6 種類の感染研 Pt について同様な結果が得られた。

Vh1 の TRN は 17 種類であるため, 24 種類の感染研 Pt を完全に表現することはできなかった。そのため TRN が 8 種類の Vh4 と 9 種類の TR4 のいずれかを組合せると 24 種類の感染研 Pt を完全に表現することが可能であったが, より確実に対応させるため, 3 つの Pr-P の組合せによる eq-TR を用いた結果, 制限酵素 *Xba*I による PFGE

と同等の解析能を持つことが示された。

この eq-TR については、更に多くの菌株について試験結果を集積し、必要な修正を加えて、より確実性を高めていく必要がある。

同一の感染研 Pt を細分する cl-TR については、変異の多い Vh2, TR3, 感染研 Pt”292”, ”b107” をよく分類する K11, 感染研 Pt”a259”, ”a27” をよく分類する K37 を選択した結果、すべての感染研 Pt をよく分類できた。

Vh7 と K37 は、分子量の低いプラスミド DNA 上にあり(表 4)、クロモゾーム DNA を主目標として約 50kbp 以上の遺伝子断片を解析する PFGE パターンとは独立なパターンが得られる可能性が高い Pr-P である。今回の結果では、Vh7 は感染研 Pt とよく相応し、K37 は一部の感染研 Pt をよく分類した。

しかし、プラスミド DNA は環境条件により変異が起こる可能性が高いため、患者に投与された抗生物質の種類、別の細菌との接触、保存中の継代回数について、情報の収集や記録管理が必要である。従って、Vh7 と K37 は eq-TR にはやや不適であり、cl-TR の判定においては、K37 の TRN の変異に留意が必要と考えられた。

### 3 疫学的同一事例と TRN の比較

事例”25”では、2 種類の感染研 Pt”b107”, ”b106”が eq-TR”43-7-4”1 種類に集約され、K11 以外の cl-TR でも分類されず、他の TRN の類似性も高いことから強い関連性が示唆された。”b129”1 株は、感染研 Pt, eq-TR, TRN でも、他の株と大きく異なり、別の感染ルートが示唆された。

疫学的に関連性がない事例”26”と”27”では、5 株の感染研 Pt が”a259”の 1 種類に集約されたが、MLVA 解析では、eq-TR で 4 種類、cl-TR で 4 種類に分類された。

疫学的に関連性がない事例”19”と”20”では、3 株の感染研 Pt が”a27”の 1 種類に集約されたが、

MLVA 解析では、eq-TR で 2 種類、cl-TR で 3 種類に分類された。

疫学的に関連性がない事例”21”, ”30”では、2 株ずつであるが感染研 Pt と相応した eq-TR が得られ、cl-TR でそれぞれ 2 種類に分類できた。

事例”5”では、2 株とも異なる感染研 Pt と eq-TR が得られ、cl-TR も全く異なるため、別の感染ルートが示唆された。

これらの事例の解析結果から、MLVA 解析は、感染研 Pt が異なっても、一定の関連性を示唆したり、逆に関連性のないことを強く示唆する能力、また、感染研 Pt が同一であっても、関連性のないことを示唆できる能力があることが分かった。

## 4 PFGE と MLVA

PFGE は、泳動条件や電気泳動装置の違い、ゲンドログラム作成におけるバンドの位置決定など様々な要因によって結果が影響され、再現性や客観性に関する問題点が指摘され、異なる研究室での検査結果の比較を困難にしている。

また、操作工程数が多く、検査結果を得るまで約 5 日を要するため、感染源の特定や予防対策などの行政活動への迅速な反映は困難である。

MLVA は、低分子の PCR 増幅産物を比較する TRN の高い再現性、数値結果による客観的な比較、感染研 Pt の推定と詳細な分類、2 日以内で判定する迅速性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には、今後、PCR や泳動条件、TRN 読み取りの標準化などの技術面の確立と、共通した最小限の有効なプライマーの選定が必要であり、数多くの O157:H7 分離株について、疫学的な情報に基づく解析、研究を集積していく必要がある。

## E. 結論

新たな感染研 Pt に分類された STEC O157:H7 43 株について、Lindstedt らの 7 種類、Keys らの 5

種類の計 12 種類の Pr-P で TRN を解析した。

Vh5, Vh6 は, 43 株でほぼ同じ TRN を示し, MLVA 解析に有効な Pr-P ではなかった。

24 種類の感染研 Pt を重複せずによく表現できる Pr-P の組合せ eq-TR は, Vh1, Vh4, TR4 であった。同一の感染研 Pt をよく細分する cl-TR は, Vh2, TR3, K11, K37 であった。

MLVA 解析は, 異なる感染研 Pt の株に一定の関連性を示唆し, 逆に関連性が低いことを肯定する能力, 同一の感染研 Pt の株に関連性が無いことを示唆し, 逆に同一性を肯定する能力, 即ち PFGE に対する否定的な補完性と肯定的な補完性の 2 つの性能が認められた。

これらの性能を確認し, 技術的に確立するためには, 今後, 詳細な疫学的な調査結果に基づいた, 更に多数の事例についての PFGE と MLVA 両法の解析結果に対する研究の集積が必要である。

## F. 研究発表

学会発表

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 27 回研究会(2006 年 7 月, 札幌市)

## 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)

5) Eijja Hyytia-Tress et al : Second Generation Subtyping: A Proposed PulseNet Protocol for Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157), *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol3, 1, 118~131(2006)

表1 供試菌株

No	分離日	血清型	V T 型	感染研No	感染研 Pt	事例	菌株数
28	2004/08/08	0157:H7	VT1+VT2	42342	292	1	
29	2004/08/11	0157:H7	VT1+VT2	42343	292	2	
30	2004/08/14	0157:H7	VT2	42344	261	3	
31	2004/08/16	0157:H7	VT1+VT2	42345	709	4	
32	2004/08/20	0157:H7	VT1+VT2	42347	703	5-姉	
33	2004/08/20	0157:H7	VT1+VT2	42348	708	5-妹	
34	2004/08/24	0157:H7	VT1+VT2	42349	292	6	
35	2004/08/24	0157:H7	VT1+VT2	42350	292	7	
38	2004/08/25	0157:H7	VT1+VT2	42353	292	8	
36	2004/08/25	0157:H7	VT1+VT2	42351	292	9	
37	2004/08/25	0157:H7	VT1+VT2	42352	292	10	
39	2004/09/16	0157:H7	VT2	42354	382	11	
47	2004/09/22	0157:H7	VT1+VT2	42966	589	12	
49	2004/10/06	0157:H7	VT2	42968	933	13	
50	2004/10/13	0157:H7	VT1+VT2	42969	934	14	
52	2004/11/21	0157:H7	VT1+VT2	42972	664	15	16
53	2005/05/15	0157:H7	VT2	50528	a70	16-父	
54	2005/05/16	0157:H7	VT2	50529	a70	16-子	
55	2005/05/31	0157:H7	VT1+VT2	50531	a63	17	
56	2005/06/13	0157:H7	VT2	50620	a77	18	
57	2005/08/11	0157:H7	VT1+VT2	52211	a27	19	
59	2005/09/13	0157:H7	VT1+VT2	52213	a27	20-弟	
58	2005/09/13	0157:H7	VT1+VT2	52212	a27	20-兄	
60	2005/10/27	0157:H7	VT1+VT2	52214	a590	21-弟	
61	2005/10/28	0157:H7	VT1+VT2	52215	a590	21-姉	9
2	2006/05/01	0157:H7	VT1+VT2	60504	b52	22	
3	2006/05/26	0157:H7	VT1+VT2	60503	b56	23	
4	2006/06/01	0157:H7	VT1+VT2	60505	b45	24	
5	2006/06/29	0157:H7	VT1+VT2	60706	b107	25-A	
6	2006/06/29	0157:H7	VT1+VT2	60707	b107	25-A	
7	2006/06/30	0157:H7	VT1+VT2	60708	b107	25-A	
8	2006/07/03	0157:H7	VT1+VT2	60709	b107	25-B	
9	2006/07/04	0157:H7	VT1+VT2	60710	b106	25-B	
11	2006/07/18	0157:H7	VT1+VT2	60778	a259	26-子	
10	2006/07/18	0157:H7	VT1+VT2	60777	a259	26-母	
12	2006/07/24	0157:H7	VT1+VT2	60779	b129	25-C	
20	2006/08/08	0157:H7	VT1+VT2	—	a259	27-A	
13	2006/08/13	0157:H7	VT1+VT2	61886	a259	27-B兄	
14	2006/08/17	0157:H7	VT1+VT2	61887	a259	27-B弟	
15	2006/08/31	0157:H7	VT1+VT2	61888	b452	28	
16	2006/09/04	0157:H7	VT1+VT2	61889	b452	29	
17	2006/09/22	0157:H7	VT1+VT2	61893	b216	30-母	
18	2006/09/22	0157:H7	VT1+VT2	61894	b216	30-子	18



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'-GCCGCTATTTTTAACCACTGACTA-3'
Vhec4	-F: 5'-FAM-ATCGCCTTCTTCCTCCGTAATG-3' -R: 5'-CTCCTCGCGCTCAGACAGTG-3'
Vhec5	-F: 5'-FAM-CTCAGGCGCCGTTAAGGTGTAGC-3' -R: 5'-TCCGCGGAGTGCAGAGAAAATAAA-3'
Vhec6	-F: 5'-HEX-ACGTTAAACCCGGAATGGAAAATC-3' -R: 5'-GAGCGAAAAATGTCTATCTTGAGG-3'
Vhec7	-F: 5'-FAM-ATGCGCGTTAGCTACACGACA-3' -R: 5'-TGAAAGCCCACACCATGCGATAAT-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-GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTC-3' -R: 5'-GGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC-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°C 15分
変性	94°C 30秒
アニーリング	63°C 90秒
伸張反応	72°C 90秒
最終伸張反応	72°C 10分

} 25回

表 4 プライマーと繰り返し回数

プライマー	基本増幅域 (bp)	Tandem Repeat		クロモゾーム /プラスミド	Keys*
		(bp)	配 列		
<b>Lindstedt</b>					
Vhec 1	335	6	TGGCTC	クロモゾーム DNA	10 ○
Vhec 2	382	18	AGTTAAATAATTCGCAGG	クロモゾーム DNA	34 ○
Vhec 3	464	6	AAGGTG	クロモゾーム DNA	3 ○
Vhec 4	495	6	AAATAG	クロモゾーム DNA	9 ○
Vhec 5	295	30	TCTGGCGGAACTGGCGTA TCACCGCCGTC	クロモゾーム DNA	5
Vhec 6	259	24	TCGGTACTGTCATGGCTT TGTTTA	クロモゾーム DNA	-
Vhec 7	255	7	ACCTCAC	プラスミド DNA	36 ○
<b>Noller</b>					
TR 3	120	6	TATCTT	クロモゾーム DNA	17 ○
TR 4	112	6	TGCAAA	クロモゾーム DNA	25 ○
TR 7	272	6	GACCAC	クロモゾーム DNA	19 ○
<b>Key's</b>					
K11	187	6	-	クロモゾーム DNA	11
K37	142	6	-	プラスミド DNA	37 ○

\* ○:Hyytia-Tressら<sup>5)</sup>の報告で選定された, MLVA解析に最適な9つのプライマー

表5 プライマー別の繰り返し回数

TR	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh5	Vh6	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
0	4	2	6	4	1	3	2	2		9	8	
1			2			2	2					
2		1							2			
3		2	1	3		38	14	5	7		1	1
4		8			2		2	2	26	5	5	1
5		16	15		1		5	2	2		13	
6		11			38		7	2		22	13	19
7		1	3	17				23		2	1	11
8			3	7			8	3		3		3
9			7	3	1			3				
10		2	4				1		1	2	1	
11				3					1			1
12			1	4				1	2			1
13			1	2								
14	1								1			
15	1											
16	2											
17									1			
19	1											1
20	2											
22							1					
23	3											
24											1	
25	3											
26	2											
28	2											2
29												1
30	3											1
31							1					1
34	1											
37	1											
43	7											
45	1											
46	1											
48	8											
種類	17	8	10	8	5	3	10	9	9	6	8	12

Vh : V h e c

表6 感染研パターンとプライマーペア別の繰り返し回数

No	VT型	感染研Pt	事例	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh5	Vh6	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
28	1+2	292	1	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
29	1+2	292	2	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
34	1+2	292	6	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
35	1+2	292	7	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
36	1+2	292	9	48	6	5	7	6	3	3	7	4	6	5	6
37	1+2	292	10	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
38	1+2	292	8	48	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
5	1+2	b107	25-A	43	6	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
6	1+2	b107	25-A	43	6	5	7	6	3	3	7	4	0	5	6
7	1+2	b107	25-A	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
8	1+2	b107	25-B	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
9	1+2	b106	25-B	43	5	5	7	6	3	3	7	4	6	6	6
12	1+2	b129	25-C	34	2	5	8	6	0	22	9	4	6	6	6
10	1+2	a259	26-母	43	4	9	12	6	3	8	0	4	0	5	6
11	1+2	a259	26-子	25	10	9	12	6	3	8	0	17	0	4	12
13	1+2	a259	27-B兄	26	7	9	11	6	1	4	6	4	4	5	19
14	1+2	a259	27-B弟	26	4	9	12	6	3	8	12	4	4	5	6
20	1+2	a259	27-A	43	4	9	12	6	3	8	7	4	4	5	6
57	1+2	a27	19	23	5	10	8	6	3	8	9	12	0	0	28
58	1+2	a27	20-兄	23	0	10	8	6	3	8	8	12	0	0	28
59	1+2	a27	20-弟	23	4	12	8	6	3	8	3	4	6	0	7
53	2	a70	16-父	30	5	8	3	6	3	5	3	2	4	5	8
54	2	a70	16-子	30	5	8	3	6	3	5	3	2	4	5	8
60	1+2	a590	21-弟	16	4	9	8	6	3	6	7	3	0	4	7
61	1+2	a590	21-姉	16	3	9	8	6	3	6	7	3	6	4	7
17	1+2	b216	30-母	20	5	10	9	6	3	6	7	3	7	4	7
18	1+2	b216	30-子	20	4	10	9	6	3	6	7	3	7	4	7
15	1+2	b452	28	25	4	0	13	6	3	6	8	4	6	5	7
16	1+2	b452	29	25	5	7	13	9	0	31	4	4	6	5	7
32	1+2	703	5-姉	14	6	8	11	5	3	1	4	5	10	0	3
33	1+2	708	5-妹	45	5	13	7	6	3	6	7	4	6	6	6
30	2	261	3	37	10	0	7	0	3	0	6	14	0	3	30
39	2	382	11	48	3	5	0	4	3	1	3	3	6	10	11
47	1+2	589	12	19	6	0	11	6	3	5	7	3	6	0	8
52	1+2	664	15	28	5	7	3	6	3	8	7	3	6	5	7
31	1+2	709	4	0	6	0	7	6	3	3	7	4	6	0	6
49	2	933	13	15	0	3	0	4	0	0	5	11	0	0	29
50	1+2	934	14	30	6	0	8	6	3	10	7	4	8	5	7
55	1+2	a63	17	46	6	1	7	6	3	3	9	4	0	0	6
56	2	a77	18	0	4	1	0	6	3	5	5	10	10	24	31
4	1+2	b45	24	0	5	7	0	6	3	6	8	4	6	5	7
2	1+2	b52	22	0	5	0	9	6	1	4	3	4	8	7	4
3	1+2	b56	23	28	5	5	7	6	3	5	7	5	8	6	7

Vh : V h e c