

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）  
「食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究」

### 分担研究報告書

#### 反復配列多型解析法の有効性の検証・精度管理手法の確立

研究代表者 大西 真 国立感染症研究所 副所長  
研究分担者 平井 晋一郎 国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター

腸管出血性大腸菌（EHEC）の分子疫学的解析法である反復配列多型解析（MLVA）法は、菌株の類似性を判定する能力に優れていることから、全国の地方衛生研究所（地衛研）で広く用いられている。しかし、菌株の保存や継代培養で発生した変異がMLVA法の結果に与える影響はあまり調査されていない。一方で、MLVA法の結果は複数の遺伝子座位における反復配列の繰り返し（TR）数の組み合わせ、つまり、結果が数値のみのために解析の失敗を見抜く手掛かりはほぼ無い。MLVA法を地衛研において正しく運用するには、検査精度を高く保つ必要がある。本研究では、菌株の継代培養がMLVA法に与える影響を検証するために、過去に感染研に搬入されたEHEC菌株の中から、MLVA法で様々なTR数を持つ19菌株のEHECを選んだ。これら菌株を20日間連続で継代培養した後、コロニーを得た。コロニーについてMLVA法を実施したところ、19菌株中7菌株においてTR数の変化があった。しかし、TRが変化しただけのコロニーで、変化した領域は1つであった。この結果は、継代培養はMLVA法の結果に大きな影響を与えず、本法は分子疫学的解析法として有効性が高いことを示している。一方で、地衛研に対しMLVA法を実施する場合、試験に適した検体を選ばなくてはならない。精度管理試験でEHEC菌株を配布する際は、継代培養でTR数が変化しなかった7菌株を選ぶべきだろう。また、InstaGene Matrixを用いて抽出したDNAを冷凍、冷蔵及び常温で3日間保管し、TRの遺伝子増幅効率や検出限界を調べたところ、どの温度でも保存日数の経過で低下はなかった。そのため、この方法で抽出したDNAは精度管理試験で配布する検体として適していることが分かった。

#### A. 研究目的

2002年、反復配列多型解析（MLVA）法は、腸管出血性大腸菌（EHEC）の新しい分子疫学的解析法として開発された<sup>1)</sup>。MLVA法ではEHECの特定遺伝子座位における反復配列の繰り返し（TR）数の解析により、菌株間の類似性を判定する。MLVA法の菌株間の類似性を判定する能力（分離能）は、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法と同程度以上であると報告されている<sup>2)</sup>。また、MLVA法ではPCR法を用いるため、PFGE法と比較し短時間で解析結果を出すことが可能である。現在、地方衛生研究所（地衛研）や国立感染症研究所（感染研）等の公衆衛生分野の研究では、PFGE法に代わる分子疫学的解析法としてMLVA法は使用されている。

MLVA法は分子疫学的解析法として分離能・迅速性に優れているが、菌株の保存や継代培養がMLVA法の結果に与える影響は殆ど検討されていない。近年のある論文により、EHEC O157の菌株は検査の過程、特に培養により変異が蓄積し、ゲノム解

析に影響を与えると報告された<sup>3)</sup>。例えば、EHECの食中毒が発生した場合、多くの自治体では保健所や医療機関等で患者便は検査され、EHEC菌株が分離される。その後、菌株は地衛研に搬入されて詳細な検査が行われると共に、食中毒事例の行政処分のためにMLVA法が実施される。最終的に、EHEC菌株は地衛研を経由して感染研に搬入され、全国的に蔓延したEHEC菌株の検出のためにMLVA法で解析される。菌株は各機関で検査や継代されており、感染研や地衛研に搬入されるまでに変異が蓄積しているだろう。MLVA法が分子疫学的解析法として真に有効であると言うためには、継代培養後の菌株でもTR数が変化しないことを確認する必要がある。

一方で、MLVA法の能力を公衆衛生分野の検査でより活かすには、地衛研での検査精度を高く保つ必要がある。近年、食品流通網の拡大に伴い、大規模なEHEC集団食中毒が発生している。PFGE法では、電気泳動後のバンドパターンを視覚的に比較することで菌株間の類似性を判定する。そのため、感染者が複数自治体に存

在する食中毒事例をPFGE法で検査する場合、1つの地衛研に菌株を集めて検査しなければ、正確な結果を得られない。しかし、MLVA法の結果は数値であるため、地衛研間での結果の共有が容易である。一方で、PFGE法の場合、電気泳動後の画像を観察すれば、バンドパターンの歪みや制限酵素処理で切れ残ったバンドの存在等から結果が正しくないことを認識できる。しかし、MLVA法では結果が数値のみであり、解析の失敗を見抜く手がかりが殆どなく、誤った結果を自治体間で共有してしまう恐れもある。MLVA法の結果共有性を活かすには、地衛研における精度管理を行う必要がある。

地衛研に対して適切に精度管理を行うには、試験に適した検体を選定しなくてはならない。ある研究では、検査過程での培養により、特定のEHEC菌株は他の菌株と比べて変異の蓄積量が優位に多いことを報告している<sup>3)</sup>。この様な菌株をMLVA法で解析する場合、配布後にTR数が変わってしまうかもしれない。また、TRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が頻繁に起こる菌株も存在する。非特異的な増幅が起きる菌株を精度管理試験で配布すると、MLVA法の検査精度を正しく評価できない恐れがある。一方で、精度管理において菌株DNAを配布して試験を行う場合、輸送期間中にDNAの品質が低下するかもしれない。MLVA法で用いるMultiplex PCRにおいて、幾つかの領域は増幅効率が低いことが知られている<sup>4)</sup>。増幅効率が低い領域では、DNAの品質低下によりTRが検出されなくなる可能性がある。配布用のDNAは品質低下が起きにくい方法で抽出される必要がある。

本研究では、①MLVA法の分子疫学的解析法としての有効性を確かめるために、EHEC菌株の継代培養がTR数の変化に与える影響を調査した。次に、②精度管理試験に適したEHEC菌株を選ぶために、①の結果を基に、継代培養してもTR数が変化せず、非特異的な遺伝子増幅が起きない菌株を探した。また、③DNAの品質低下がTRの検出に与える影響を調査し、精度管理試験に適切なDNA抽出法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株の選定

全国の各地で感染者から分離されたEHEC菌株は、厚生労働省の通知に基づき地衛研を介して感染研に集積される。本研究のために、過去に感染研に搬入された全国のEHEC菌株の中から、千葉県で分離された菌株を抽出した。次に、抽出した菌株の中からEHEC 0157については2016～2019年に、EHEC 026と0111については、2015～2019年に分離された菌株を抜き出した。抜き出された352菌株のEHEC 0157、102菌株のEHEC 026、及び22菌株のEHEC 0111の各血清型について、感染研で実施済みのMLVA法の結果を基に、MLVA-mateを使

ってMinimum Spanning Treeを作成した<sup>5)</sup> (図1)。供試菌株を多様な特徴を持つ集まりとするために、MST上の位置で偏りが出ない様に菌株を選定した。その結果、10菌株のEHEC 0157、5菌株のEHEC 026及び5菌株のEHEC 0111が選ばれた (表1)。

### 2. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

供試菌株について継代培養後のコロニーを以下の通りに得た。各菌株を1枚のLB寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。培養後、平板に発育した菌株を偏りなく新しいLB寒天平板培地 (Becton, Dickinson and Company) に継代するため、コロニーに分離していない部分を全て生理食塩水に懸濁後、白金耳を使って新しい1枚の培地に画線塗抹し、同様の条件で培養した。この継代培養を20日間連続で行い、5日目、10日目、15日目及び20日目に1枚の平板培地から5コロニーを白金耳で掻き取った。

掻き取ったコロニーについて以下の通りにMLVA法を実施した。InstaGene matrix (Bio-Rad Laboratories) を使って取扱説明書に従い各コロニーからDNAを抽出した。Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を使用し、DNA濃度を2 ng/ $\mu$ lに調整した。調製したDNAを用いて、泉谷らの方法に準じてMLVA法を実施した<sup>2)</sup>。Multiplex PCR法で増幅した遺伝子についてはキャピラリーゲル電気泳動装置で電気泳動し、GeneMapper Ver 4.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用しTR数を算出した。

### 3. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

菌株co161058をLB寒天平板培地に画線塗抹し、37°C1晩、静置培養した。1つのコロニーを掻き取り、InstaGene Matrixを使ってDNA抽出した。DNA濃度を2 ng/ $\mu$ lに調整した後、-20°C (冷凍)、4°C (冷蔵) 及び15°C (常温) で保存した。

次に、各温度で0日、1日、2日及び3日間保存したDNAについて、領域0157-34のTRをMultiplex PCR法で増幅した。領域0157-34を解析対象に選んだ理由は「2. 継代培養によるTR数の変化頻度の実験」で増幅遺伝子をシーケンサーで検出した際、多くの菌株において、この領域のピークの検出強度が低かったからである。1検体当たりの反応液として、DNAを1  $\mu$ l、TaqMan Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を10  $\mu$ l、MLVA法のプライマーセットMix 1を2.0  $\mu$ l<sup>2)</sup>、プローブプライマー (10  $\mu$ M, FAM-CAGTTGATTTACGATACGGA) を0.4  $\mu$ l、及び脱イオン蒸留水を6.6  $\mu$ l混合し、合計で25  $\mu$ lとした。反応条件として、95°C、20秒間でDNAポリメラーゼを活性化し、その後の40サイクルは95°C、20秒間の熱変性と60°C、1分間のアニーリング/伸長反応を繰り返した。M

uitiplex PCR法実施後、領域0157-34のTRの増幅効率の評価のために、DNA 2 ng/μlのC<sub>T</sub>値及び検出限界のDNA濃度を調査した。

## C. 研究結果

### 1. 継代培養によるTR数の変化頻度の調査

継代培養が各菌株のTR数の変化に与える影響を調査した(表2)。EHEC 0157は10菌株中3菌株で、EHEC 026は5菌株中3菌株で、EHEC 0111は5菌株中1菌株でTR数の変化が確認された。これらコロニーで変化した領域は1つのみであった。コロニーの変化の詳細は以下の通りである。菌株co170503については、10継代以降も継続して領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニーが取れた。菌株co190202については、採取した全てのコロニーで同一の変異が観察された。これらコロニーでは、領域0157-37における増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であり、数を判定できなかった。菌株co190173については、10継代で領域157-10のTR数が変化したコロニーが確認されたが、15継代以降、この領域が変化したコロニーは取れなかった。菌株co152166については、5継代でのみ、領域EHC-1が変化したコロニーが取れた。菌株co190892及びco150594は、本来、領域0157-3にTRを持たないが、TRと誤判定される非特異的な遺伝子増幅が見られた。

継代培養後のTR数の変化がどの領域で起きているかで整理した(表3)。18領域中5領域でTR数の変化が見られた。領域EHC-1及び0157-10では、3菌株においてTR数の変化が観察された。領域0157-37が変化した菌株はco190202のみだった。領域0157-3では、本来、TRを持たない菌株において非特異的な遺伝子増幅が確認された。

### 2. DNAの輸送条件がTRの増幅効率に与える影響の調査

冷凍、冷蔵及び常温の各温度で、2 ng/μlの菌株co161058のDNAを1日、2日及び3日間保存した後、Mtiplex PCRを用いて、領域0157-34のTRの増幅したところ、C<sub>T</sub>値の範囲は20.51~22.13であり、検出限界は全て2 x 10<sup>-4</sup> ng/μlだった(表4)。C<sub>T</sub>値についてカイ二乗検定を行ったところ、各温度について保存日数間で有意な増減は無かった。また、異なる保存温度間でもC<sub>T</sub>値に有意な違いはなかった。

## D. 考察

MLVA法はEHEC菌株の継代培養で変異の影響を受けず、分子疫学的解析法としての有効であった。供試した19菌株のEHECについて、20日連続の継代培養を行ったところ、7菌株についてTR数が変化したり、非特異的な遺伝子増幅が見られたコロニーが確認された。特に、2菌株では同じTR数の変化を持つコロニーが継続的に確認された。例えば、菌株co170503では領域EHC-1のTR数が9から2に減少したコロニー

が、10継代以降、継続して確認された。この現象はTR数が変化したクローンが何回も発生したのではなく、変化したクローンが分離平板上で増加し一定の割合以上を占めたためだろう。また、菌株co190202では採取した全てのコロニーにおいて、領域0157-37での増幅遺伝子のサイズがTR数6と7の間であった。以前に感染研でMLVA法を実施した際は、co190202の領域0157-37のTR数は7だった。本研究でco190202を使用するまでの保存中に領域0157-37で数塩基の欠損が起きたのだろう。他にも、5菌株のコロニーでTR数が変化していたが、全てのコロニーにおいて変化した領域は1つであった。泉谷らは、MLVA法では2領域違いまでの菌株を同一クローン由来と判定できると報告している<sup>2)</sup>。従って、継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えないと思われる。

継代培養によるTR数の変化頻度の調査の結果から、精度管理試験に適したEHEC菌株を選定できた。精度管理試験において、TR数が変異し易い菌株やTRと誤判定される様な非特異的な遺伝子増幅が起こる菌株を配布すると、受験機関の回答が誤っていた場合、その原因の特定が困難となる。本研究で用いた19菌株のEHECの内、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認されなかった12菌株を精度管理試験で用いると良いと思われる。一方で、本研究では、泉谷らの報告に従い18領域を解析した<sup>2)</sup>。しかし、感染研及び地衛研では、同一の食中毒事例由来のEHEC菌株間で領域0157-10のTR数は頻繁に異なっていることから、この領域を解析対象から除いている。本研究でも、TR数の変化や非特異的な遺伝子増幅が確認された5領域の内、変異した菌株数が最も多かった領域は0157-10であり、この領域の変異頻度は高いことを示している。以上より、精度管理試験を行う場合、領域0157-10を除いた17領域で行うべきである。

精度管理試験で配布するDNAの抽出法として、InstaGene Matrixを用いた方法は適していた。菌株のDNAを精度管理試験の検体とする場合、日本郵便株式会社や民間の配送事業を利用し、常温、冷蔵又は冷凍の温度で全国の地衛研に送ることになる。これら事業を利用すると、感染研から最も輸送日数がかかる沖縄県には2日間を要する。InstaGene Matrixを用いたDNA抽出法では、菌体に樹脂入りの液体を混ぜた後、加熱して遠心分離後、上清を抽出液とする。この方法では樹脂でPCR反応を阻害する金属イオン等を取り除いているが、DNAの精製効果は低い。そのため、InstaGene Matrixにより抽出したDNAでは不純物の存在により輸送中に品質が低下し、MLVA法の結果に影響を与えることが考えられる。本研究では、InstaGene Matrixで抽出した菌株のDNAを冷凍、冷蔵及び常温で保管し、1日目、2日目及び3

日目に領域O157-34における遺伝子増幅の効率を調査した。その結果、各温度について保存日数の経過で $C_T$ 値及び検出限界のDNA濃度に有意な低下は見られず、更に、異なる温度間でも有意な低下も確認されなかった。以上より、InstaGene Matrixで抽出したDNAは輸送中にMLVA法の結果に影響を与える様な品質低下を起こさないとと思われる。

#### E. 結論

継代培養によるTR数の変異は、MLVA法による類似性の判定に大きな影響を与えず、本法は分子疫学的解析法として有効であった。次に、地衛研に対する精度管理試験に適したEHEC菌株として、継代培養してもTR数が変化せず、非特異的な遺伝子増幅が起きない菌株を選定した。精度管理試験で菌株のDNAを配布する場合、InstaGene Matrixを用いてDNAを抽出すると良い。

#### F. 謝辞

本研究の遂行において、終始、貴重なご指導とご助言を賜りました感染研 細

菌第一部の泉谷秀昌先生に深く感謝申し上げます。

#### G. 参考文献

- 1) Noller, et al., J Clin Microbiol, 41: 5389-5397, 2002
- 2) Izumiya, et al., Microbiol Immunol, 54: 569-577, 2010
- 3) Yokoyama, et al., Int J Food Microbiol, 264: 39-45, 2018
- 4) Seto, et al., J Microbiol Methods, 139: 12-14, 2017
- 5) 南須原ら, 東京都健康安全研究センター年報, 69: 279-284, 2018

#### H. 健康危険情報

なし

#### I. 研究発表

なし

#### J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

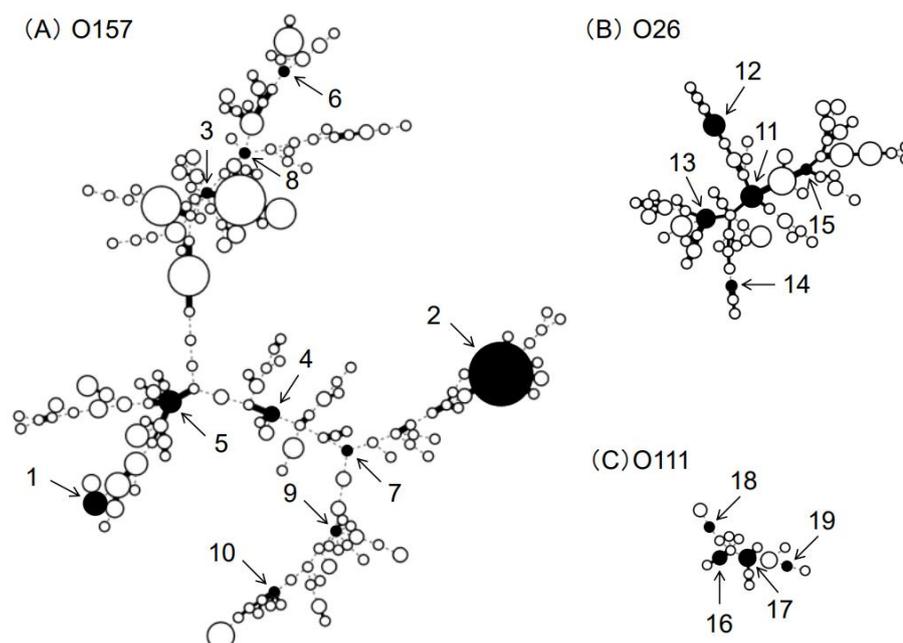


図1 継代培養によるタンデムリピート(TR)の変化頻度の調査に用いた19菌株の腸管出血性大腸菌(EHEC)

表1 継代培養によるTRの変化頻度の調査に用いたEHEC菌株

菌株	血清型	反復配列多型解析 (MLVA 法) においてプライマー-Mix1 で検出する領域									MLVA 法においてプライマー-Mix2 で検出する領域							
		EHC -2	O157 -25	O157 -9	EH157 -12	EH111 -8	EHC -1	EHC -5	O157 -3	O157 -34	EH26 -7	O157 -19	EH111 -11	EHC -6	O157 -37	O157 -17	O157 -36	EH111 -14
co161058	O157:H7	4	6	19	4	1	5	0	12	12	0	6	2	0	7	8	3	0
co161706	O157:H7	4	5	14	4	1	6	10	7	11	0	6	2	0	8	15	7	0
co161729	O157:H7	5	5	12	6	1	11	0	11	9	0	7	2	0	6	4	9	0
co171440	O157:H7	4	5	6	4	1	6	0	10	12	0	5	2	0	7	7	6	0
co180453	O157:H7	4	8	12	4	1	5	0	9	12	0	6	2	0	6	7	3	0
co181163	O157:H7	5	2	0	3	1	10	0	4	9	0	8	2	0	8	5	8	0
co190173	O157:H7	4	7	7	4	1	7	10	11	12	0	6	2	0	7	6	6	0
co190176	O157:H-	5	5	11	4	1	11	0	12	9	0	7	2	0	6	5	4	0
co190191	O157:H7	5	3	11	1	1	7	0	7	9	0	5	2	0	6	3	7	0
co190892	O157:H7	7	5	10	1	1	6	0	0	5	0	7	2	0	9	3	6	0
co150594	O26:H11	16	2	9	2	1	11	11	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co170503	O26:H11	16	2	9	2	1	9	2	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co182152	O26:H11	25	2	9	2	1	10	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co190202	O26:H11	14	2	8	2	1	12	0	0	1	3	1	2	5	6	0	0	1
co190205	O26:H-	13	2	8	2	1	8	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1
co152166	O111:H-	10	2	10	2	5	14	0	0	3	0	1	4	3	9	0	0	1
co152173	O111:H-	6	2	9	2	5	14	0	0	3	0	1	4	3	6	0	0	1
co173040	O111:H-	13	2	11	2	8	6	0	0	3	0	1	3	3	9	0	0	1
co182158	O111:H-	6	2	14	2	5	8	10	0	3	0	1	4	3	7	0	0	1

表2 継代培養によるEHEC菌株のTRの変化

菌株	O 血清型	各継代数において TR 数が変化、または、 非特異的な遺伝子増幅があったコロニー数			
		5 継代	10 継代	15 継代	20 継代
co161058	O157	0	0	0	0
co161706		0	0	0	1 <sup>a</sup>
co161729		0	0	0	0
co171440		0	0	0	0
co180453		0	0	0	0
co181163		0	0	0	0
co190173		0	1 <sup>a</sup>	0	2 <sup>b</sup>
co190176		0	0	0	0
co190191		0	0	0	0
co190892		0	0	1 <sup>c</sup>	1 <sup>a</sup>
co150594	O26	0	0	1 <sup>c</sup>	0
co170503		0	2 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>
co182152		0	0	0	0
co190202		5 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>
co190205		0	0	0	0
co152166	O111	1 <sup>f</sup>	0	0	0
co152173		0	0	0	0
co173040		0	0	0	0
co182158		0	0	0	0
計	-	6	8	8	10

<sup>a</sup> 領域157-10においてタンデムリピート数が変化。

<sup>b</sup> 領域EHC-2においてタンデムリピート数が6から7に増加。

<sup>c</sup> 領域O157-3においてタンデムリピートと誤って判定される非特異的なピークが出現。

<sup>d</sup> 領域EHC-1においてタンデムリピート数が9から2に減少。

<sup>e</sup> 領域O157-37においてリピート数を判定できないピークが検出される。

<sup>f</sup> 領域EHC-1においてタンデムリピート数が15から14に減少。

**表3 継代培養による各領域でのTRの変化**

領域	プライマーセット	TR 数の変化、または、非特異的な遺伝子増幅が 検出された菌株(継代数)
EHC-2	Mix1	co190173(20)
O157-25		-
O157-9		-
EH157-12		-
EH111-8		-
EHC-1		co152166(5)、co170503(10、15、20) <sup>a</sup>
EHC-5		-
O157-3		co190892(15) <sup>b</sup> 、co150594(15) <sup>b</sup>
O157-34		-
EH26-7	Mix2	-
O157-19		-
EH111-11		-
EHC-6		-
O157-37		co190202(5、10、15、20) <sup>c</sup>
O157-17		-
O157-36		-
EH111-14		-
O157-10		co190173(5)、co161706(20)、co190892(20)

<sup>a</sup> TR数が9から2に減少。

<sup>b</sup> TRと誤って判定される非特異的なピークが出現。

<sup>c</sup> リピート数を判定できないピークが検出される。

**表4 DNAの保存温度・期間と領域O157-34におけるTRの増幅効率の関係**

温度	DNA 2 ng/μl の C <sub>T</sub> 値(検出限界濃度)		
	1 日間	2 日間	3 日間
冷凍	21.84 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	22.13 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	20.74 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)
冷蔵	21.86 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	21.03 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	20.51 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)
常温	21.75 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	21.80 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)	21.61 (2 x 10 <sup>-4</sup> ng/μl)