資 料

Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)を用いた 腸管出血性大腸菌 0157 の分子疫学解析プロトコールの確立

野田万希子,門倉由紀子,白木 豊,小林香夫

要 旨

迅速・簡便な分子疫学解析手法である Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)の,9 遺伝子座の繰り返し数 (RN)を解析する系のプロトコール検討を行った.その結果,9遺伝子座のうち6 遺伝子座ではフラグメント解析で理論値に近いサイズが検出され,正確にRNが算出できていた.一方,3 遺伝子座ではフラグメント解析で得られたサイズに誤差が生じており,間違ったRNを算出していた.し かしながら,いずれの場合にもその近似曲線は良好な直線となり,この近似曲線を使ってサイズを補正す ることによって正確にRN が算出できた.信頼性の高いMLVAデータを得るためには,精度管理用の株ま たはDNAを用意し,その施設・機器・試薬を使って正確にRNを決定するための予備検討を行う必要が ある.

キーワード:腸管出血性大腸菌,0157,分子疫学解析,PFGE,MLVA

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 や食材が広域に広がった場合には食中毒が大規模化す 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、パルスネット (PulseNet) のシス テムが構築されている. EHEC ではパルスフィール ド・ゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学解析の有効 性が証明されており、現在、地方衛生研究所(地衛研) で分離された菌株は国立感染症研究所(感染研)によ って収集されて PFGE による分子疫学解析と結果還元 が行われている¹⁾. しかしながら, PFGE は手法が煩 雑であること、検査に3~5日と時間を要すること、施 設間での比較が難しいことなどの問題点が指摘されて おり、より迅速で簡便な方法の開発が望まれていた²⁾.

近年、ゲノム中に存在する繰り返し配列の繰り返し 数(RN)を調べることによって型別を行う Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis

(MLVA)が開発された. MLVA は, 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など,その優れた迅 速性・簡便性から, EHEC 0157 についてもさまざまな 系の検討が行われている³⁻⁶. そこで我々は、アメリカ 疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) のグループが報告し³, 感染研⁷¹やい くつかの地衛研で実施されている 9 遺伝子座 (VNTR-25, 3, 34, 9, 17, 19, 36, 37, 10) の RN を調べる 系を導入し、信頼性の高い検査手法確立のための検討 を行ったので報告する.

2 材料と方法

2.1 供試菌株

平成 18~23 年度に岐阜県下で分離され当所に搬入 された EHEC O157:H7 及び O157:H-分離株を用いた. 2.2 DNA 抽出

菌株を Tripticase-soy-agar (TSA) 平板で 37℃で一晩 培養したのち, アルカリ熱抽出法にて DNA を抽出し た. 具体的には, 100µL の 50mM NaOH 溶液に菌苔を 懸濁して 10 分間ボイルした後, 1M Tris-HCI (pH 7.0) を 16µL 添加して中和し, 3,000rpm で 10 分間遠心した 上清をテンプレートとした.

2.3 MLVA

使用したプライマー情報を表1に示した. VNTR-25, 3, 34, 9の領域を増幅する8種のプライマーを混合し た系を Reaction 1, VNTR-17, 19, 36, 37の領域を増 幅する8種のプライマーを混合した系を Reaction 2, VNTR-10を増幅する2種のプライマーを混合した系を

反応系	VNTR locus	別名 (文献4-6)	繰り返し 長さ(bp)	繰り返し 配列	オフセット (bp)	5'末端 標識*	プライマー配列 (5' to 3')
	25	TR4, 0157-25	6	TGCAAA	110	D3	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG
	25					-	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACACGAC
Reaction 1	3	Vhec3, TR5, O157-3	6	AAGGTG	323	D2	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTTGAATTG
						-	GAACAACCTAAAACCCGCCTCGCCATCG
	24	Vhec2, TR6, 0157-34	18	**	99	D4	GACAAGGTTCTGGCGTGTTACCAACGG
	34					-	GTTACAACTCACCTGCGAATTTTTTAAGTCCC
	0	Vhec4, TR1, O157-9	6	AAATAG	472	D4	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC
	9					-	GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
	17	TR3, O157-17	6	TCTTTA	121	D2	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA
						-	GGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	19	TR7, O157-19	6	CCACGA	273	D4	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTC
Departion 2						-	GGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
Reaction 2	26	Vhec7, O157-36	7	TCACACC	109	D4	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC
	30					-	GCCGCTGAAAGCCCACACCATGC
	37	O157-37	6	TGCTAC	142	D3	GCCGCCCTTACATTACGCGGACATTC
						-	GCAGGAGAACAACAAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC
Pagation 2	10	Vhec1, TR2, O157-10	6	GGCTCT	273	D4	TTCATTTCTACAGTCTCAGTATTTTCCTTTA
Reaction 3						-	GATGCCGGATGAAAATGATAAGTT

表1 プライマー情報

*D2: Beckman dye 2, D3: Beckman dye 3, D4: Beckman dye 4

** AAATAATCTACAGAAGTT, AAATAATTCGCAGGAGTT, AAATAATCATCAGAAGTT, AAATAATAATACAGAAGTT,

AAATAATATACAGGAGTTのいずれかの配列

Reaction 3 とし、1 検体につき 3 本の PCR 反応を行った. それぞれの反応系は 10µL の容量で実施し、10× PCR バッファーを 1µL, dNTPs Mixture を 0.8µL, 1U/µL Ex Taq HS (TaKaRa)を 1µL, プライマーおよ び滅菌蒸留水を 6.2µL, テンプレートを 1µL の組成で 混合した. 反応条件は 95°C5分, 95°C20 秒-65°C20 秒 -72°C20 秒を 35 サイクル、72°C5分で実施した. PCR 産物を滅菌蒸留水で希釈したのち、Sample Loading Solution (SLS, Beckman Coulter) と CEQ SizeStandard-600

(Beckman Coulter)を混合して電気泳動(フラグメン ト解析)に供した. 機器は CEQ 8000 (Beckman Coulter) を使用し,泳動温度は 50℃,泳動時間は 60~70 分で 行った.

フラグメントのピークが二重に検出された場合は 蛍光強度が高かったピークのサイズを採用した.フラ グメント解析で得られたサイズ,オフセット(プライ マーで増幅される領域のうち,繰り返し配列部分を除 いた部分)のサイズおよび繰り返し配列のサイズから 表計算ソフトにて RN を算出した.

2.4 繰り返し数確認のための遺伝子配列の決定

フラグメント解析で得られる PCR 産物サイズのデ ータは小数点第2位までの数値であり,算出した RN も整数にはならない.最終的に RN を確定するために は、四捨五入などの整数にする工程が必要となる.フ ラグメント解析で正確に RN を求められるかを検証す るため、各遺伝子座についてあらかじめ RN が異なっ ていることが推察された株(表 2)のシーケンスを実 施した. 具体的には,各遺伝子座の蛍光標識されてい ないプライマーを別途用意し,シングルプレックス PCR で増幅を行った PCR 産物を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により精製し, GenomeLabTM DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter) により標識してダイレクトシーケンス法によって塩基 配列を得た.得られた遺伝子配列より RN および PCR 産物のサイズを決定した.フラグメント解析結果のサ イズ (以下,S_fと略す) とシーケンスで確認した実際 のサイズ (以下,S_sと略す),および S_fから算出した RN の小数点以下を四捨五入して整数とした RN (以下, RN_fと略す) とシーケンスで確認した実際の RN (以下, RN_fと略す) とシーケンスで確認した実際の RN (以下, RN_sと略す) を比較した.

表2 近似曲線の比較

VNTR	シーケンス	RN種類	近似曲線			
locus	株数	(RNの幅)	数式*	R ²		
25	18	6(2~8)	y = 1.00x + 6.11	1.000		
3	18	15(4~27)	y = 0.99x + 4.23	1.000		
34	12	7(7~13)	y = 1.01x - 1.93	0.999		
9	16	12(4~17)	y = 1.00x + 0.12	1.000		
17	12	10(3~14)	y = 0.95x + 8.88	1.000		
19	13	7(4~10)	y = 1.02x - 4.92	1.000		
36	14	12(2~16)	y = 1.01x - 0.38	1.000		
37	12	9(4~12)	y = 0.99x - 1.09	1.000		
10	23	19 (4~59)	y = 0.97x + 7.93	1.000		

* x : フラグメント解析で得られたピークのサイズ (S_f) y : シーケンスで確認した実際のサイズ (S_s)

		PulseNet International ⁸⁾	感染研 ⁹⁾	当所	
PCR					
Taq ポリメラ	ーゼ	Platinum Taq (Invitorogen)	Platinum Taq (Invitorogen)	ExTaq HS (TaKaRa)	
	VNTR-25	0.12	0.1	0.12	
	VNTR-3	0.6	0.2	0.6	
	VNTR-34	0.36	0.2	0.2	
プライマー	VNTR-9	0.2	0.2	0.2	
最終濃度	VNTR-17	0.6	0.06	0.3	
(µM)	VNTR-19	0.02	0.04	0.04	
	VNTR-36	0.012	0.03	0.03	
	VNTR-37	0.03	0.04	0.03	
	VNTR-10	0.09	0.3	0.3	
フラグメント解析	-				
PCR産物の利	 希釈倍率	60倍	100倍	60倍	
泳動機種		CEQ 8000/8800 (Beckman Coulter)	ABI 3130 Genetic Analyzer (ABI)	CEQ 8000 (Beckman Coulter)	
バッファー	I.	20 µL (SLS)	8.8 µL (Hi-Di Formamide)	20 µL (SLS)	
マーカー量		0.08 μL (CEQ Size Standard-600)	0.2 μL (GeneFlo 625 DNA Ladder ROX Label)	0.1 μL (CEQ Size Standard-600)	
希釈PCR産物	勿添加量	1 µL	1 μL	1 μL	
最終希釈倍率		1200倍	1000倍	1200倍	

表3 プロトコールの比較

2.5 誤差の改善のための試み

2.5.1 蛍光標識の変更

表 1 に示したプライマーのうち, VNTR-25 と VNTR-37 の D3 標識を D4 標識に変更したプライマー を作製し, VNTR-25 は6 種類の RN_sを示した 18 株, VNTR-37 は9 種類の RN_sを示した 12 株を対象として シングルプレックス PCR で増幅した後, フラグメント 解析を行った.

2.5.2 泳動温度の変更

VNTR-25 は6 種類の RN_sを示した 11 株, VNTR-37 は9 種類の RN_sを示した 10 株, 対照として誤差の生 じていない VNTR-36 の 10 種類の RN_sを示した 10 株 を用いてシングルプレックス PCR で増幅した後, 泳動 温度を通常より高い 60°Cと, PulseNet International が採 用している 35°Cでフラグメント解析を実施した.

2.5.3 オフセットサイズの変更

VNTR-10 の追加プライマーとして感染研が設計し たプライマー10F new: 5'D4 -CAGCCTCCTGCAAA CTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC-3', 10R new: 5' -GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCA TTTC-3'を使って,オフセットがオリジナル(表1) の273bpよりも小さくなる組み合わせのプライマーを 使用し,19種類のRNsを示した23株を対象としてフ ラグメント解析を行った.

3 結 果

3.1 検査法確立のための検討

3.1.1 PCR のプライマー濃度と希釈倍率の検討

CDC が主体となって実施している PulseNet International および感染研の MLVA プロトコール^{8,9)}を 入手し, PulseNet International の CEQ 8000/8800 用プロ トコールを基本として検討を行った(表 3). プライマ ー濃度は、マルチプッレクスの系である Reaction 1,2 の PCR 産物の蛍光シグナルが等量程度検出されるよ うに一部改変し、最終濃度を決定した. PCR 産物の希 釈倍率を 60 倍希釈(最終希釈倍率 1,200 倍)としてフ ラグメント解析を行ったところ、サイズスタンダード である CEQ SizeStandard-600 と比較して十分な蛍光強 度を示すシグナルが検出できた(図 1).

3.1.2 フラグメント解析で得られた PCR 産物のサイズと、シーケンスで確認した実際のサイズ の比較

表 2 に示した株のシーケンスを行い,S_fを x 軸に,S_sを y 軸にプロットして近似曲線を作成したところ, すべての遺伝子座において,傾きが 0.95~1.02,相関 係数 R^2 が 0.999~1.000 の,ほぼ 1 対 1 対応の直線性の 近似曲線が得られた.9遺伝子座中6遺伝子座(VNTR-3, 34,9,17,19,36)では, $RN_f \ge RN_s \ge iii \le iiii \le iii \le i$



図1 フラグメント解析で検出されたPCR産物のシグナル

常に1大きく算出された(図2,D3標識).この2遺 伝子座ではRNの大小に係らず誤差の幅が同じであっ た.VNTR-10では,RN_sが4~23の範囲ではRN_fと RN_sが一致したが,RN_sが24以上(S_sが417bp以上) では一致せず,サイズが大きくなるにつれて誤差が大 きくなる傾向が認められた(表4).

3.2 誤差の改善のための試み

RN_fとRN_sとが一致しなかった3遺伝子座(VNTR-25, 37, 10) について,以下の検討を行った.

3.2.1 VNTR-25 と VNTR-37

VNTR-25 と VNTR-37 に共通している D3 標識を D4 標識に変更した結果を図 2 に示した. VNTR-25 では, D3 標識の S_fが S_sに対して平均で 5.7bp(標準偏差 SD: 0.12bp)小さく検出されていたのに対し, D4 標識のプ ライマーを使用した場合でも平均で 4.6bp(SD: 0.36bp) 小さく検出されていた.また、VNTR-37 では、D3 標 識の S_f が S_s に対して平均で2.5bp (SD:0.28bp) 大きく 検出されていたのに対し、D4 標識のプライマーを使用 した場合でも平均で3.4bp (SD:0.32bp) 大きく検出さ れていた.得られた S_f から RN_f を算出したところ、両 遺伝子座とも D4 標識のプライマーを使っても RN_f と RN_s との不一致は改善されなかった.

次に、フラグメント解析の泳動温度を 60°Cと 35°C で実施し、50°C での結果と比較したところ、対照とした VNTR-36 ではどの泳動温度においても $S_f \ge S_s$ の差が-1.25 ~0.03bp に収まったのに対し、VNTR-25 と VNTR-37 では泳動温度が 60°C では実際のサイズに近い値となり、逆に 35°C の泳動ではさらに誤差が大きくなった(図 3). 60°C で泳動した場合、VNTR-37 では RN_f と RN_sが一致しており RN の誤判定は改善された.



図2 VNTR-25とVNTR-37の近似曲線



表	4 VN]	r R-10 0	ワプラ	イマー	変更	によ	る誤差	の変	化
RNs	10F/10R (オリジナル) オフセット:273bp			10F/ オフセ _ン	10R new ソト:1:	, 56bp	10F new/10R new オフセット:178bp		
	$\mathbf{S}_{\mathbf{s}}$	\mathbf{S}_{f}	$RN_{\rm f}$	理論 サイズ	\mathbf{S}_{f}	RN_{f}	理論 サイズ	\mathbf{S}_{f}	RN_{f}
4	297	298.4	4	180	181.1	4	202	203.1	4
5	303	304.9	5	186	186.6	5	208	209.1	5
8	321	322.8	8	204	205.3	8	226	228.3	8
14	357	358.7	14	240	241.5	14	262	263.7	14
18	381	383.0	18	264	265.9	18	286	287.8	18
23	411	413.7	23	294	296.0	23	316	318.0	23
23	411	413.5	23	294	296.1	23	316	318.0	23
24	417	420.0	25	300	302.2	24	322	324.2	24
28	441	444.5	<u>29</u>	324	326.4	28	346	348.4	28
30	453	457.1	<u>31</u>	336	338.4	30	358	360.5	30
33	471	475.8	<u>34</u>	354	ND	ND	376	378.9	33
34	477	481.8	<u>35</u>	360	362.8	34	382	384.8	34
37	495	500.4	<u>38</u>	378	381.2	38	400	403.5	38
39	507	512.9	<u>40</u>	390	393.2	<u>40</u>	412	415.5	40
40	513	519.1	41	396	399.3	41	418	421.7	41
41	519	525.4	<u>42</u>	402	405.5	42	424	428.0	42
41	519	525.6	<u>42</u>	402	405.4	<u>42</u>	424	427.8	42
42	525	532.1	<u>43</u>	408	ND	ND	430	434.0	43
45	543	550.3	<u>46</u>	426	430.0	<u>46</u>	448	452.2	<u>46</u>
46	549	556.6	<u>47</u>	432	ND	ND	454	458.3	47
46	549	557.7	<u>47</u>	432	436.3	47	454	458.9	47
59	627	636.5	<u>61</u>	510	517.4	<u>60</u>	532	540.2	<u>60</u>
59	627	638.1	61	510	517.3	<u>60</u>	532	540.1	<u>60</u>

アンダーラインはRNsと一致していないことを示す

ND:未実施

しかしながら, VNTR-25 では 60℃で泳動した場合で も RN_fと RN_sとの不一致は完全には改善されなかった. 3.2.2 VNTR-10

オフセットのサイズが小さくなるプライマーの組 み合わせを使って VNTR-10 のフラグメント解析を行ったところ、オフセットが 156bp となる組み合わせで は RN_sが 37 以上(理論サイズが 378bp 以上)、オフセ ットが 178bp となる組み合わせでも RN_sが 37 以上(理 論サイズが 400bp 以上)になると RN_f と RN_s とが一致 しなかった(表 4).

4 考 察

今回, 我々は PulseNet International や感染研の検査法 を参考に9遺伝子座の RN を解析する MLVA プロトコ ールを検討した. その結果, 9遺伝子座のうち6遺伝 子座(VNTR-3, 34, 9, 17, 19, 36)では, フラグメント解 析で理論値に近いサイズが検出され, 算出した RN の 小数点第1位を四捨五入して整数にすることで RNsと 矛盾しない RN が算出できていた. 一方, 残りの3遺 伝子座(VNTR-25, 37, 10)では, フラグメント解析で 得られたサイズに誤差が生じており, 間違った RN を 算出していた. しかしながら, いずれの場合にもその 近似曲線は良好な直線となり, この近似曲線を使って サイズを補正した上で RN を算出することによって正 確な RN が算出できることが分かった. 今後も, 今ま での分離株で経験していない新しい RN が出現した際 には、シーケンスを行って RN。および PCR 産物のサ イズを確認し近似曲線を作成し直すことで誤差を確認 していく必要がある.

3遺伝子座(VNTR-25, 37, 10)の誤差を改善するた め、蛍光標識の種類、泳動温度、オフセットサイズの 変更を行い検証した.そのうち、VNTR-25 と VNTR-37 では蛍光標識の変更、VNTR-10 ではオフセットのサイ ズが小さくなるようなプライマーの組み合わせを検証 したが、いずれも誤差の改善には至らなかった.一方、 VNTR-25 と VNTR-37 で行った 60℃での泳動では、あ る程度の誤差の改善が認められた.しかしながら、60℃ での泳動でも誤差が完全には解消されなかったこと、 50℃での泳動で作成した近似曲線が良好な直線性を示 し誤差の補正が可能なこと、60℃での泳動は50℃での 泳動よりも機器への負担が高まると予想されること等 を踏まえ、当所の MLVA プロトコールでは機器メーカ 一推奨の 50℃での泳動で問題ないと考えた.

MLVA では、フラグメント解析を行う機器の機種、 泳動に使用するポリマーの種類、蛍光標識の種類によって誤差が生じることが知られており¹⁰、今回の検討 においても信頼性の高い MLVA データを得るために はあらかじめ RN が判明している株や DNA での検討 が不可欠であることがわかった.また、今回我々の検 討ではオフセットに存在する繰り返し配列に似た配列 を RN に換算していないが、換算している報告もある ¹¹. 今後、施設間で MLVA 結果を共有していくために は、RN の換算方法を含めたプロトコールの統一化を 行うとともに、精度管理用の株またはDNAを用意し、 その施設・機器・試薬を使って正確に RN を決定する ための予備検討を行った上で、実際の分離株のデータ 共有を行う必要がある.

謝 辞

MLVA についてご教授くださいました国立感染症研 究所細菌第一部の寺嶋淳先生に深謝いたします.

文 献

- 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,感染症学雑誌,76, 842-848,2002.
- 山崎伸二: O157 の簡便・迅速な分子疫学解析法の開発とその応用, 日本食品微生物学会雑誌, 24, 89-93, 2007.
- Hyytia-Trees E, Smole SC, Fields PA, Swaminathan B, Ribot EM: 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 Pathog Dis., 3, 118-31, 2006.
- Lindstedt BA: Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria, Electrophoresis, 26, 1567-2582, 2005.
- 5) Keys C, Kemper S, Keim P: 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.

- Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AGF, Boxrud DJ, Harrison LH: Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates, J. Clin. Microbiol., 41, 5389-5397, 2003.
- 7) Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, et al.: Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulse-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, Jpn. J. Infect. Dis., 61, 58-64, 2008.
- PulseNet International: Laboratory standard operating procedure for PulseNet MLVA of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157)
 Beckman Coulter CEQ 8000 platform, PulseNet International HP (<u>http://www.pulsenetinternational.org/ protocols/Pages/mlva.aspx</u>), 2007.
- 国立感染症研究所細菌第一部: MLVA プロトコル (2008 年 7 月現在), 2008.
- 10) 泉谷秀昌:赤痢菌の分子タイピング,平成23年 度希少感染症診断技術研修会,2012.
- 21) 榮井毅,田邉純子,橋田みさを,大前壽子:腸管 出血性大腸菌 O157 に関する3種の遺伝子型別法 の比較,奈良県保健環境研究センター年報,44, 45-48,2009.

Procedure for Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 0157

Makiko NODA, Yukiko KADOKURA, Yutaka SHIRAKI, Yoshio KOBAYASHI

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