

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会

13 March, 2019

腸管出血性大腸菌感染症調査のため
のMLVA法の活用
MLVAの説明、効果、意義、精度等

国立感染症研究所

細菌第一部

腸管出血性大腸菌のタイピング

MLVA

Multiple-**L**ocus **V**ariable-number tandem repeat **A**nalysis
反復配列多型解析法

感染研では従前のPFGE*法からMLVA法による解析を主とする変更を行った。

(*パルスフィールドゲル電気泳動)

2014年～ EHEC O157, O26, O111

2017年～ + EHEC O103, O121, O145, O165, O91

MLVAとは

- 細胞の持つ染色体のなかには、同じ塩基配列が複数回反復する領域が存在する。

例： ATGCTATG **ATC ATC ATC ATC** GGCTAGTCA では ATCが4回反復している。

- このような反復配列は細胞の分裂に伴って反復回数が高頻度で増減することが知られている (Variable-number tandem repeat)。

“ATC”が4回 ATGCTATG **ATCATCATCATC** GGCTAGTCA

細胞分裂に伴う染色体の複製

“ATC”が5回

ATGCTATG **ATCATCATCATCATC** GGCTAGTCA

“ATC”が3回

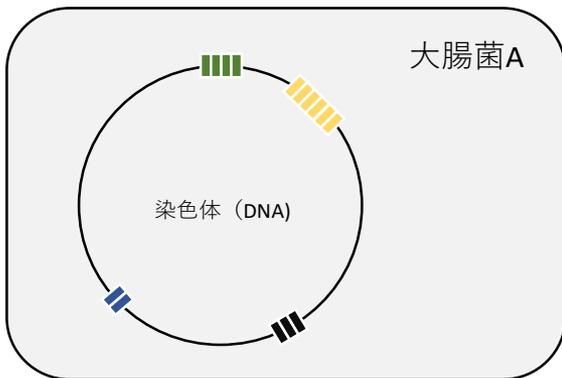
ATGCTATG **ATCATCATC** GGCTAGTCA

- この反復回数の増減は染色体DNAの他の変化よりも頻度が高い。
- そのため、DNA鑑定のようなAとBが同じ細胞由来か？ との問いに答えるために利用されている。

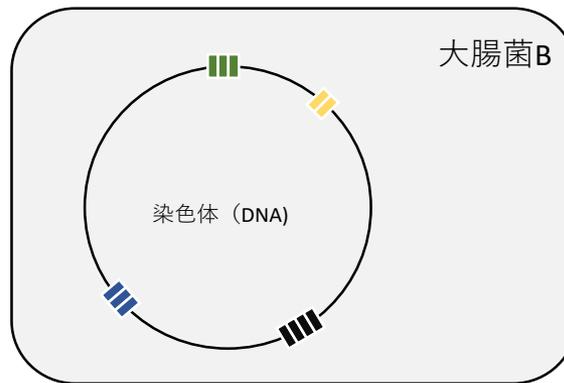
MLVA とは -2

- 反復配列領域を複数箇所解析することで解析は鋭敏となり「同じものを同じ」、「違うものを違う」と言うことの確からしさが上昇する。

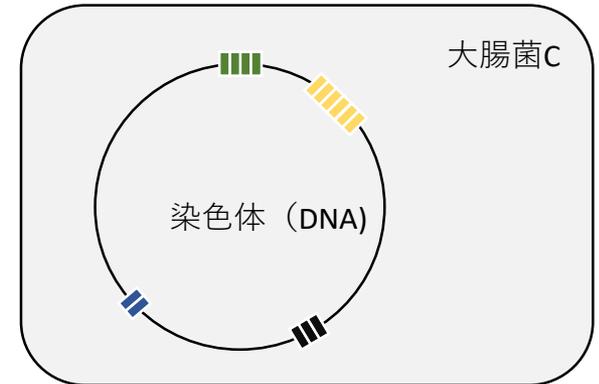
例えば 大腸菌の染色体に4箇所（絵では緑—黄—黒—青）の反復配列領域を解析しそれぞれの繰り返し回数を数える。



緑 4 — 黄 6 — 黒 3 — 青 2



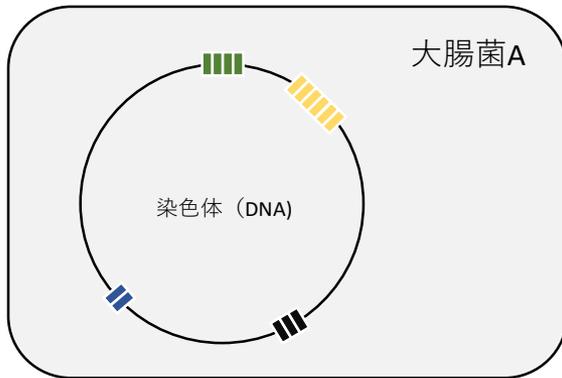
緑 3 — 黄 2 — 黒 4 — 青 3



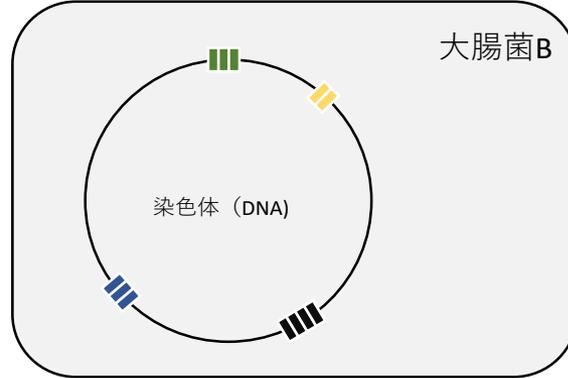
緑 4 — 黄 6 — 黒 3 — 青 2

MLVA とは -3

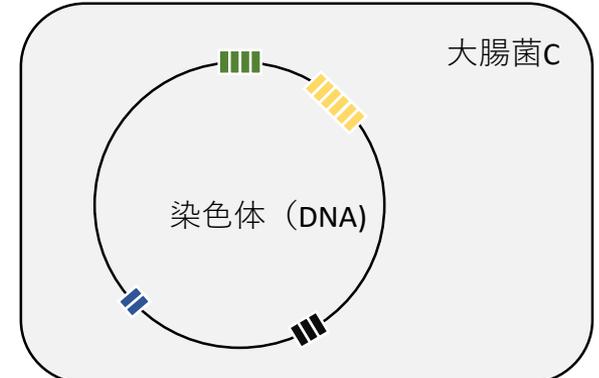
- 偶然一致する確率は？と問われたら。
- 偶然一致することは “可能性はゼロではないけどほぼ” ないと答える。



緑 4 - 黄 6 - 黒 3 - 青 2



緑 3 - 黄 2 - 黒 4 - 青 3



緑 4 - 黄 6 - 黒 3 - 青 2

それぞれの反復配列領域の繰り返し数の出現頻度（上記の3株の場合）

	緑	黄	黒	青
1				
2		1/3		2/3
3	1/3		2/3	1/3
4	2/3		1/3	
5				
6		2/3		

緑 4 - 黄 6 - 黒 3 - 青 2 となる確率は
 $2/3 \times 2/3 \times 2/3 \times 2/3 = 16/81$ (0.197)

緑 4 - 黄 6 - 黒 3 - 青 3 となる確率は
 $2/3 \times 2/3 \times 2/3 \times 1/3 = 8/81$ (0.099)

Allele Frequency

例えば、
2016年のEHEC O157株全株の17 MLVAローカスのレポート数の出現頻度

	EH111-11T	EH111-14BB	EH111-8O	EH157-12N	EH26-7D	EHC-1Q	EHC-2C	EHC-5S	EHC-6U	O157-3W	O157-34Y	O157-9M	O157-25J	O157-17Z	O157-19L	O157-36AA	O157-37V	MLVA Type																
co171172	2	-2	1	6	-2	11	5	-2	-2	11	9	12	4	4	7	9	6	17m0121																
2	1641	-2	1650	1	1650	1	267	-2	1650	3	26	-2	1	-2	1113	-2	1474	-2	171	3	1	-2	95	2	87	2	10	3	5	-2	52	-2	9	
3	9					2	22			4	22	3	1	2	67	2	2	2	3	5	106	4	3	3	172	3	318	4	127	2	3	0	2	
						3	70			5	398	4	906	3	6	3	1	3	1	6	7	5	44	4	202	4	304	5	217	3	261	2	2	
						4	858			6	405	5	531	5	3	5	2	4	86	7	2	6	15	5	752	5	109	6	717	4	127	3	21	
						5	75			7	301	6	62	6	17	6	39	5	21	8	25	7	81	6	279	6	146	7	447	5	91	4	33	
						6	293			8	117	7	130	7	29	7	1	6	15	9	496	8	118	7	38	7	384	8	91	6	377	5	131	
						7	65			9	147	8	15	8	26	8	16	7	152	10	185	9	75	8	103	8	169	9	23	7	169	6	537	
						10	9	9	2	9	95	9	15	8	95	9	15	8	307	11	246	10	171	9	8	9	21	10	20	8	90	7	515	
						11	78	10	1	10	160	10	11	9	145	10	11	9	145	12	508	11	314	10	6	10	29	11	1	9	204	8	293	
						12	79	11	1	11	29	11	20	10	165	13	70	12	314	11	1	11	53	13	2	10	187	9	38					
						13	18			12	29	12	10	11	84	14	3	13	105	13	1	12	23				11	33	10	39				
						14	15			13	42	13	6	12	159	15	1	14	153	15	1	13	14				12	38	11	16				
						15	22			14	17	14	15	13	59			15	42			14	5				13	4	12	2				
						16	7			15	2	15	10	14	76			16	12			15	61				15	7	13	1				
						18	1			16	2	16	6	15	46			17	21			16	3				17	3	14	2				
						19	4			17	2	17	10	16	67			18	23			17	1				18	3	15	1				
						21	1			18	5	18	5	17	47			19	54			19	54				21	1	16	2				
										19	1	19	2	18	21			20	3			20	3				17	1						
										22	4	20	3	19	9			21	2			21	2				18	5						
										25	1	21	2	20	4			22	5			22	5											
	1641	1650	1650	293	1650	78	531	1113	1474	84	496	314	202	304	447	204	537																	
	0.994545	1	1	0.177576	1	0.047273	0.321818	0.674545	0.893333	0.050909	0.300606	0.190303	0.122424	0.184242	0.270909	0.123636	0.325455	1.15934E-09																

を使って 17m0121 が出現する頻度を計算すると 1.16×10^{-9}

MLVA リピートユニットの変化

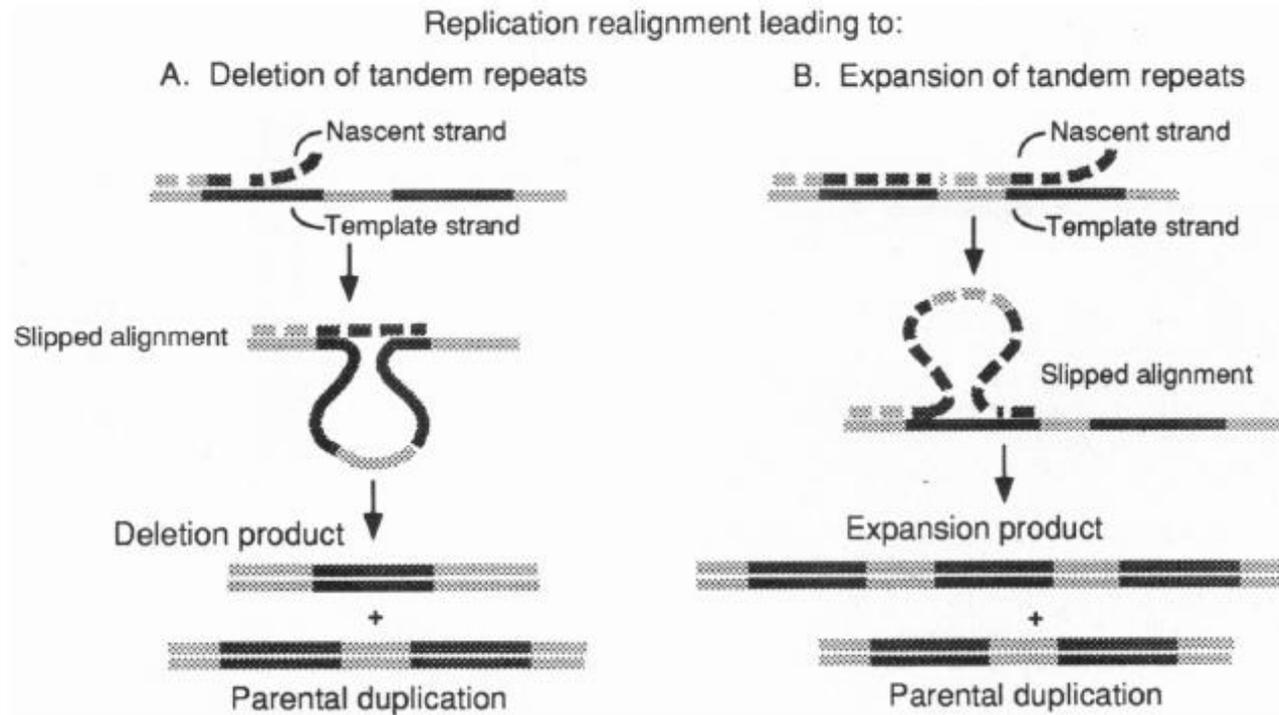


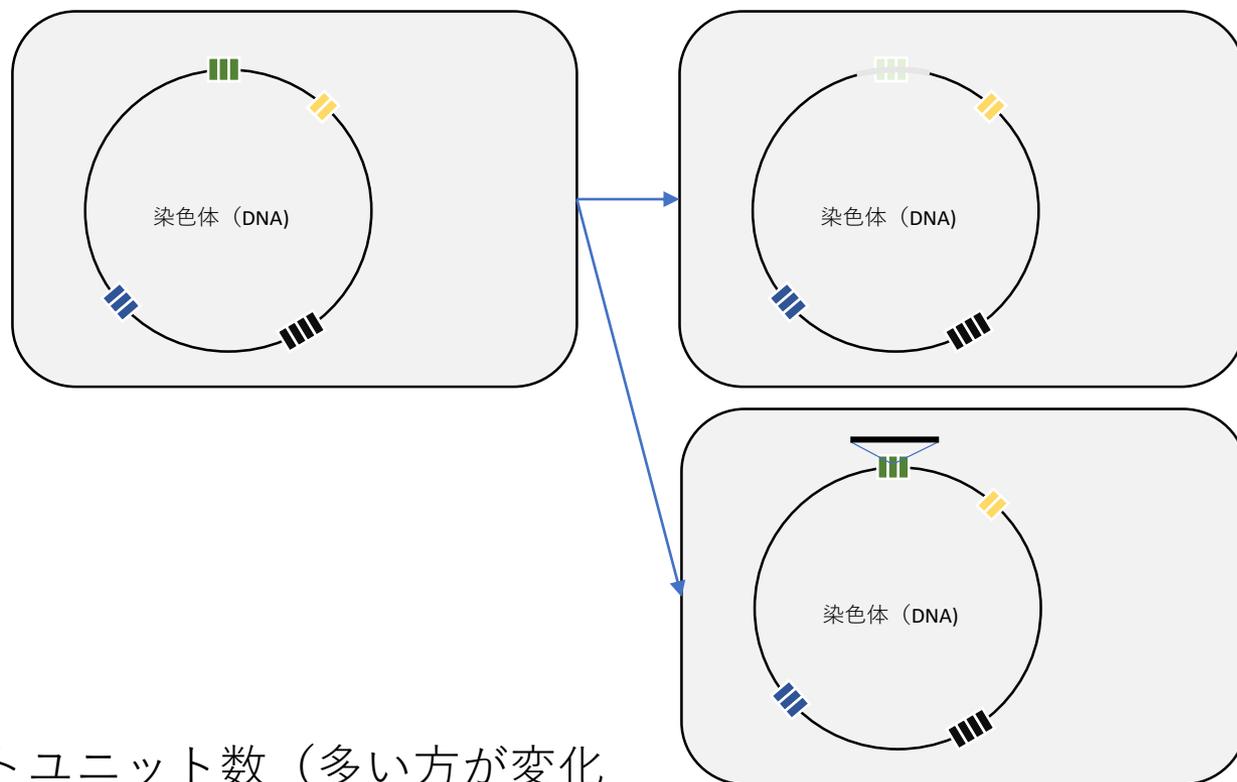
FIG. 1. The replication slippage model showing misalignments that lead to deletion (*A*) or expansion (*B*) of tandem repeats. (*A*) Slipped alignment of the nascent strand with its template, producing a loop between the repeats on the template, will result in a deletion after completion of replication. (*B*) Slipped alignment of the nascent strand with its template, producing a loop between repeats on the nascent strand, will result in an expansion product after completion of replication.

MLVA リピートユニットの変化

前のスライドで示した通り、基本的にはDNAの複製の際に変化する

リピートが存在する部位がまとめて無くなる場合

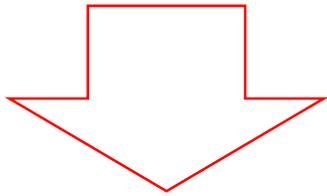
リピートにリピートと関係のない挿入配列が入る場合



変化する頻度はリピートユニット数（多い方が変化する可能性が高い）、リピート配列によって異なる

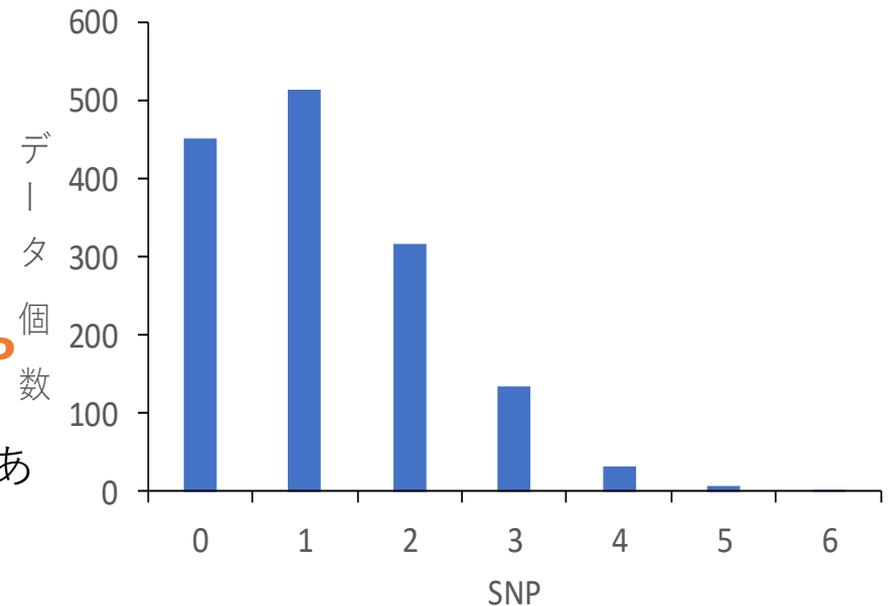
ゲノム解析による検証

疫学関連があることが既知の菌株間で、どの程度SNPが存在するか？



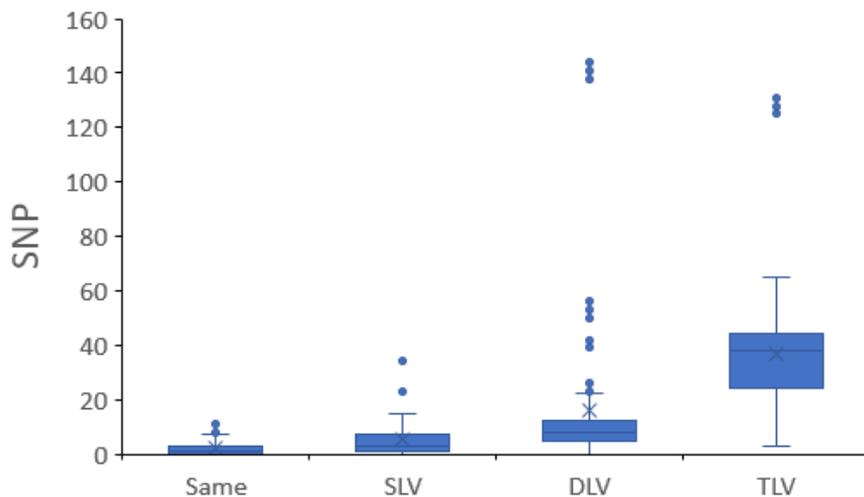
最大で6か所、99.9%が5か所以内のSNP

SNPが5箇所以内であれば、共通原因があると推定することが可能



MLVA型完全一致～TLV別に見たSNPの分布

2013～2016年に全国的に検出された
6種のMLVA型およびそれらの1～3 locus variants (SLV, DLV, TLV)
計272株を使用
Illumina MiSeqでWGS取得



完全一致株間では 2.2 ± 2.6 か所
SLVでは 5.2 ± 7.1 か所のSNPが存在

Statistics	Same	SLV	DLV	TLV
n	168	44	29	24
Mean	2.2	5.2	16.0	36.5
Median	1	3	8	38
SD	2.6	7.1	28.1	20.8
Min	0	0	0	3
Max	13	36	144	131

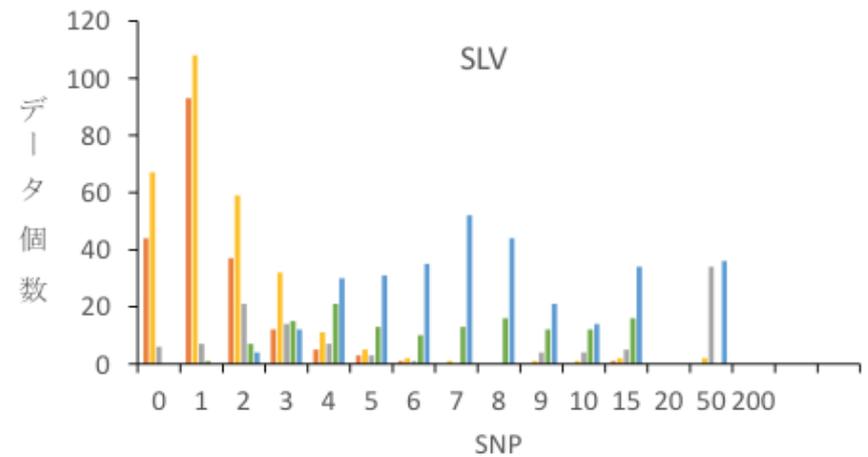
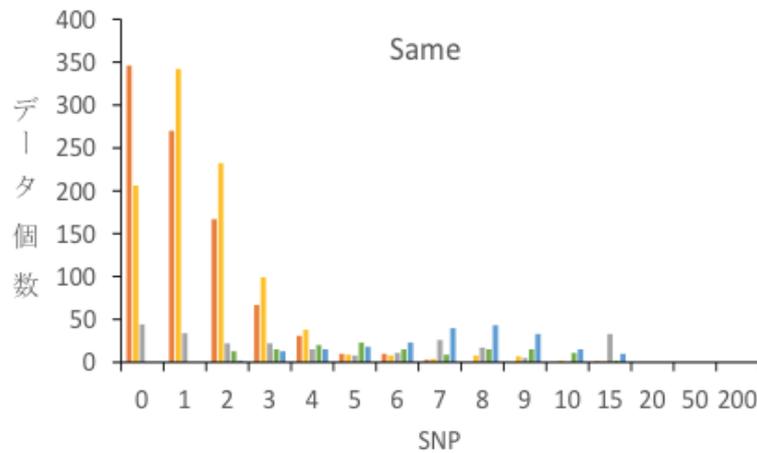
SNPの分布からは
完全一致株間のSNP数はSLVの関係にある株間のSNP数より少ないことがわかる。
つまり、MLVA完全一致株間はSLVの関係にある株間よりも遺伝的には近い

分離日間隔とSNPの関係性

Same・SLV

MLVA完全一致株間はSLVの関係にある株間よりも遺伝的には近いことが示されたが、分離日の近い株同士はSLVの関係であってもSNP数はMLVA完全一致株間と相違はない。

0～30日
98%が5 SNP以内



分離日間隔

- 0-7
- 8-30
- 31-180
- 181-365
- 366-

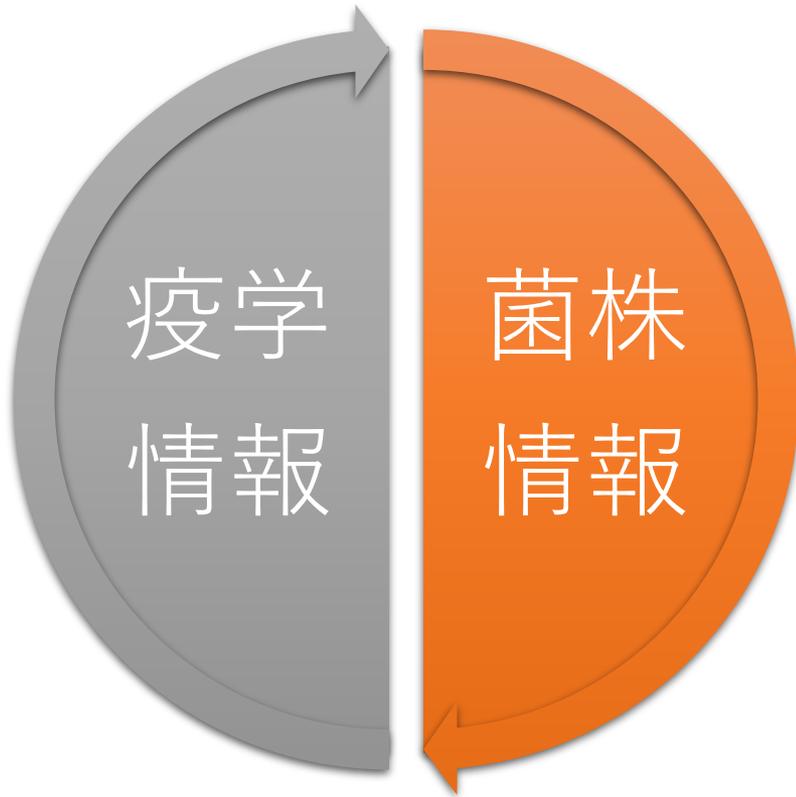
- 0-7
- 8-30
- 31-180
- 181-365
- 366-



菌株解析の結果について

菌株同士が、、、

- ある程度以上異なる場合
 - 異なる由来（汚染源）の可能性が高い
 - 複数汚染の可能性を排除しない
- 一致もしくは類似している場合
 - 共通の汚染源による可能性が高い
 - ただし、共通の汚染源を保証しているわけではない



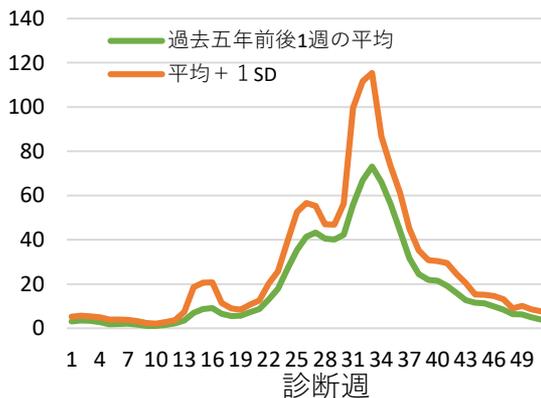
菌株情報（分子疫学解析の結果）と疫学情報とで相互にフィードバックし、
情報が合致することが重要

広域散発事例探知システム

O血清型VT毒素型ごとに、過去データからベースラインと閾値を設定し、閾値を超えたときに自動でアラートメールを出す

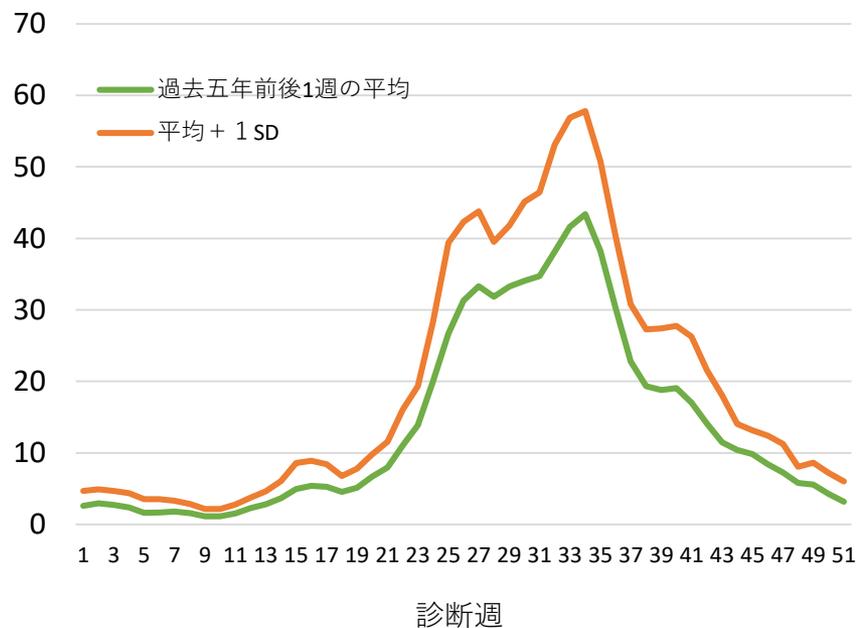
ベースラインと閾値設定(例：O157-VT1VT2、無症状除く)

患者症例数の過去5年前後1週
(計15個)の平均と+1SD



集団発生をクラスタリング
→

イベント数の過去5年前後1週 (計15個)
の平均と+1SD

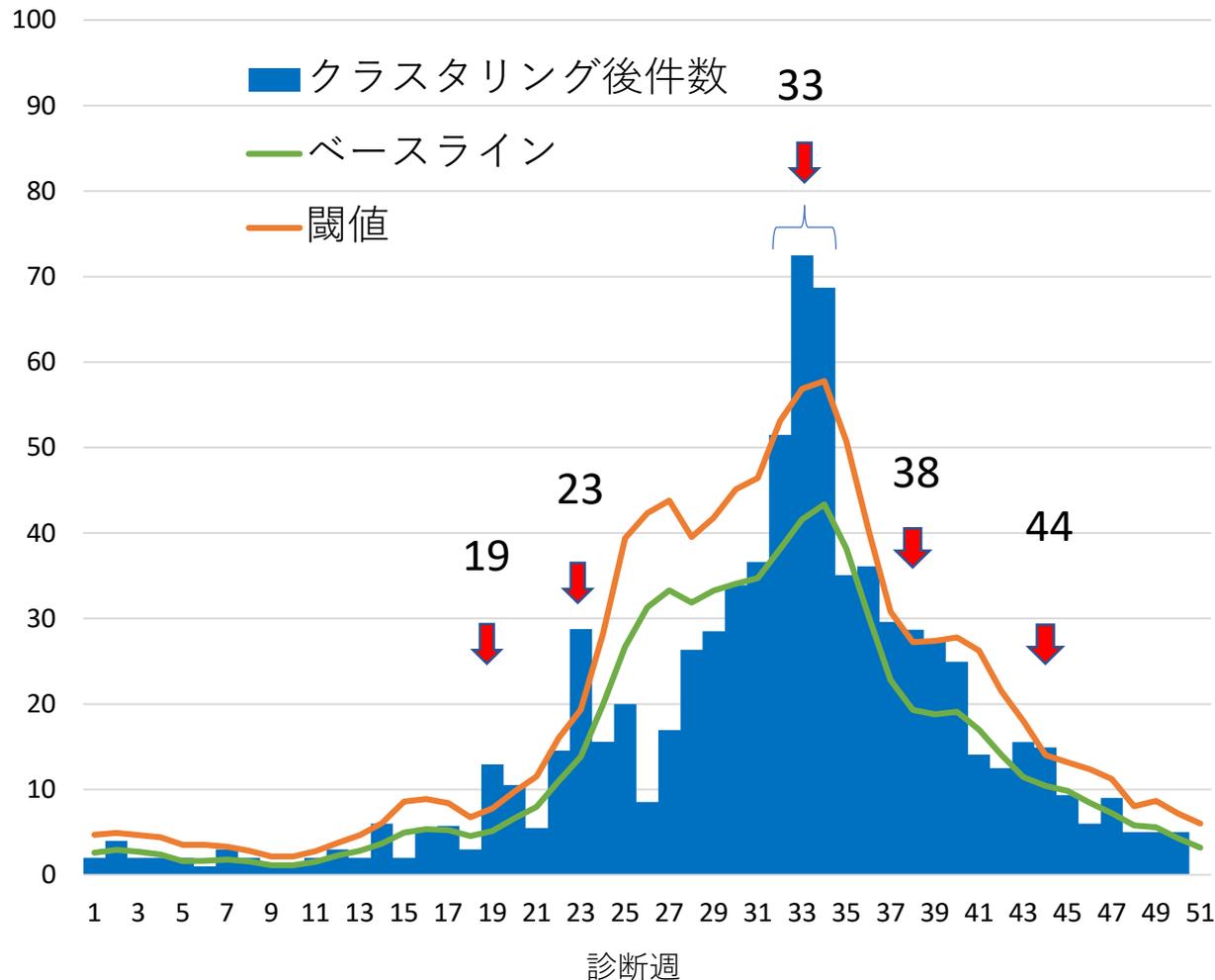


集団発生があると平均とばらつきが大きくなる

これをベースラインとする

O157-VT1VT2、2018年

集団発生・家族内感染の自動クラスタリング後



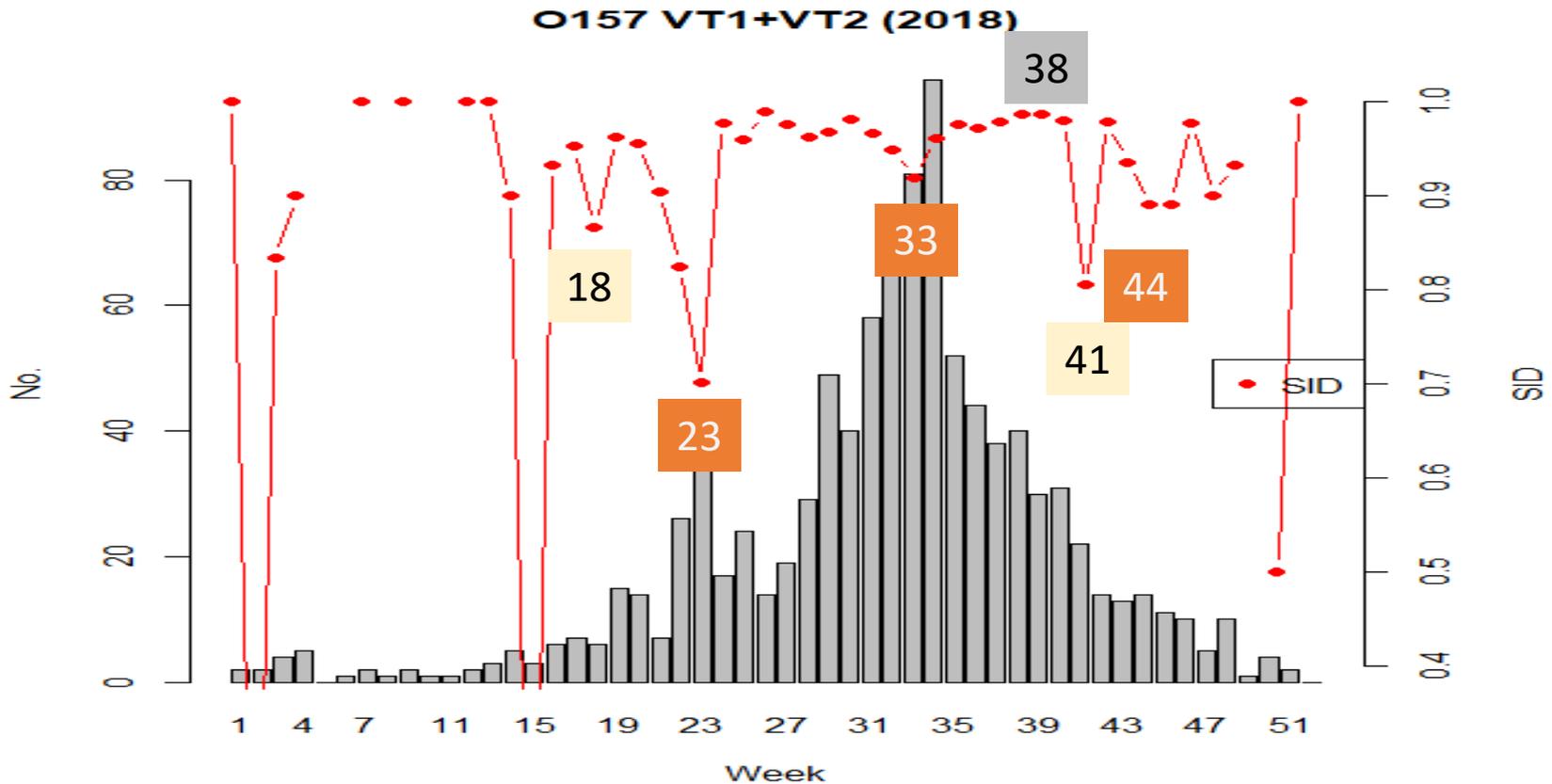
散発増加 が含まれている可能性を探知

O157-VT1VT2、2018年

MLVAデータから見た同一型の異常集積

分離週ごとの多様性指数 (SID, 赤プロット) が低下する

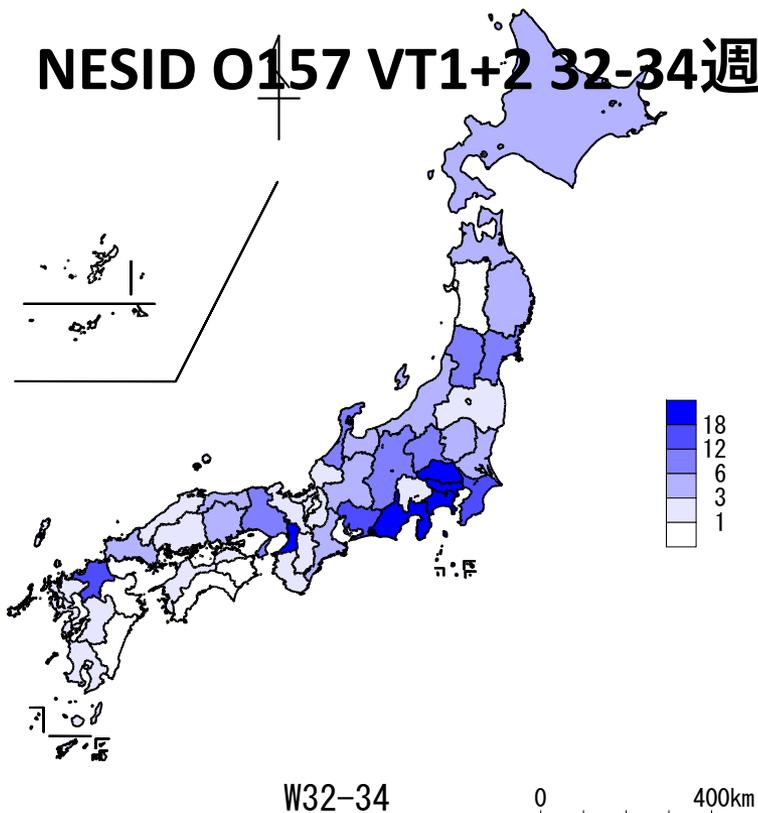
NESIDデータから見た異常集積19W, 23W, 33W, 38W, 44Wのうち23W, 33W, 44WはMLVAデータからも同一型の集積が認められた。



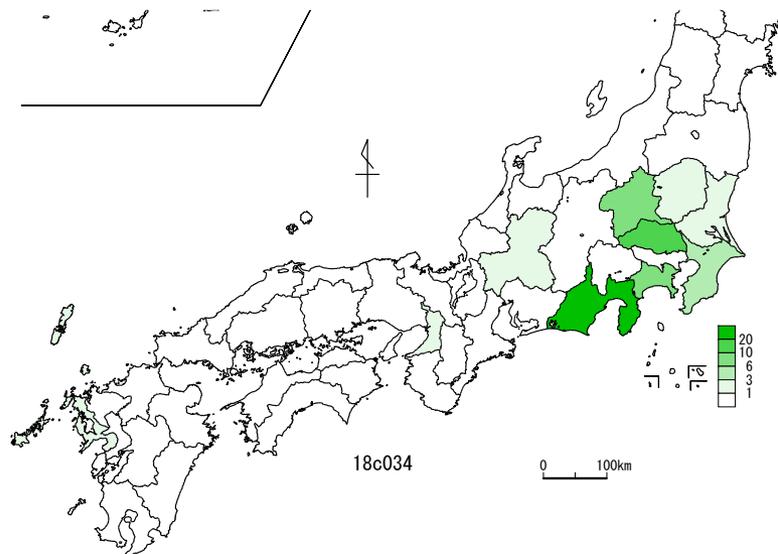
O157 VT1+VT2 18c034

静岡県研修センター食堂食中毒
(患者数60名、喫食者385名)

NESID O157 VT1+2 32-34週



18c034

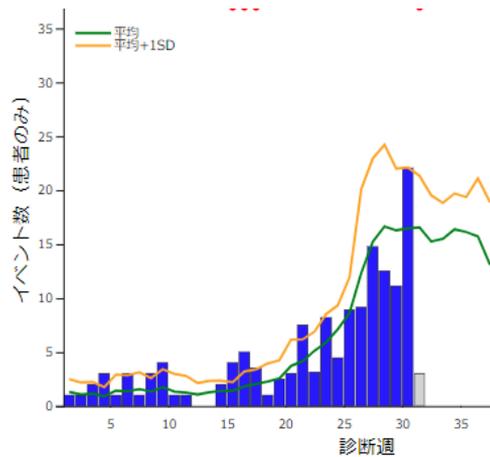


(56株、13機関)

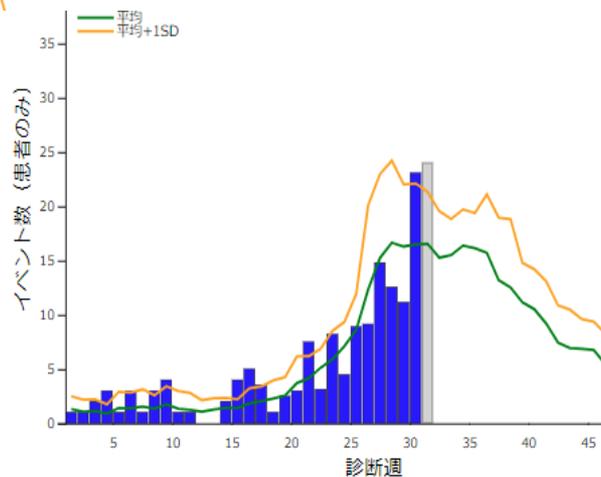
SID[機関ばらつき] =0.788

感染症発生動向モニタ一

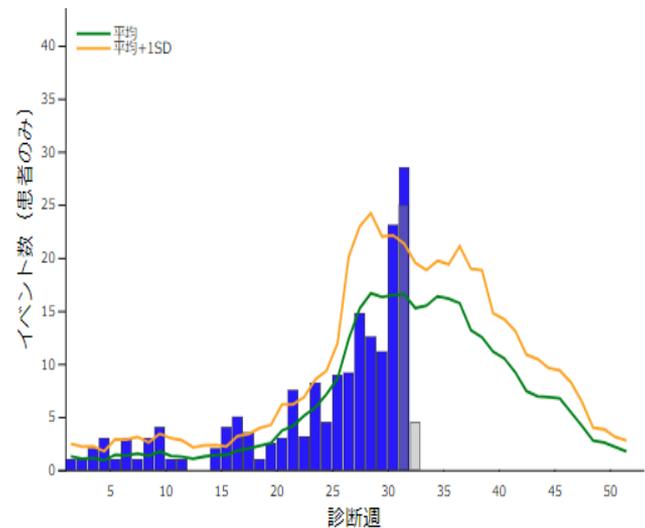
2018/7/30 (月)



2018/8/3 (金)



2018/8/6 (月)



NESIDデータから異常集積を検知 (感染研)
→ 厚労省に連絡

+ MLVAデータ (菌株) の収集と解析