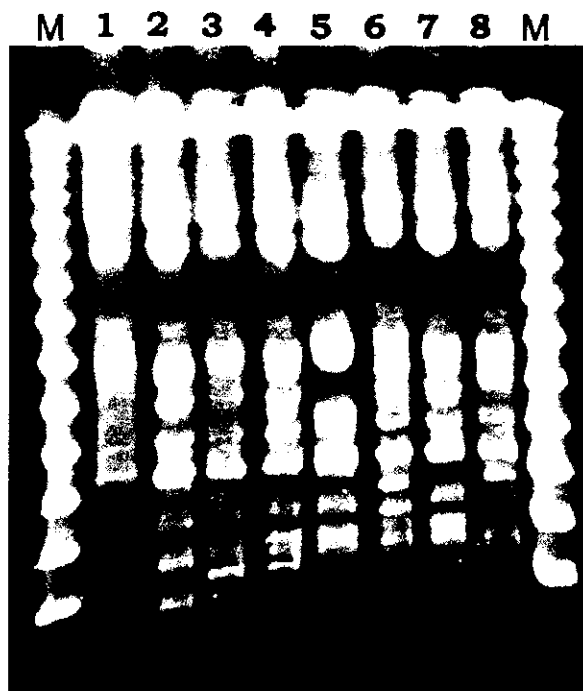


*Xba*IでのPFGE



*Bln*IでのPFGE

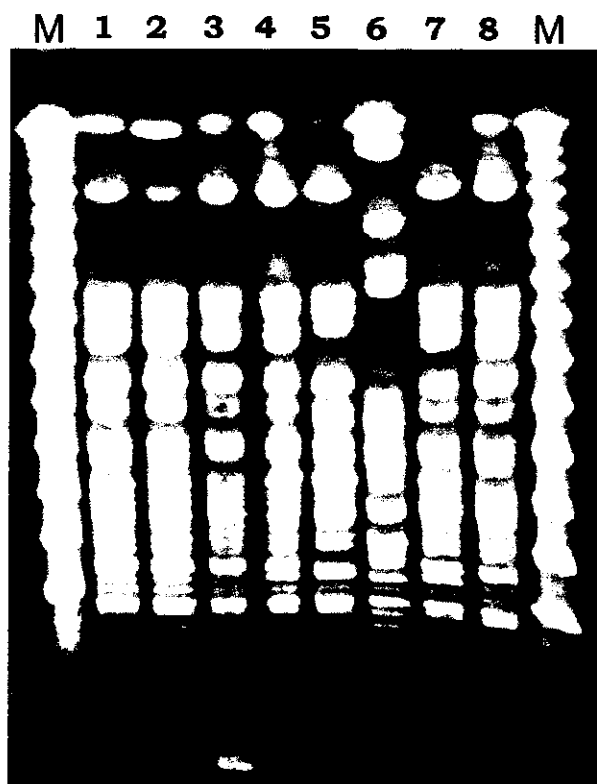


図5 B施設で実施したPFGEの画像

供試菌株

M: λ Ladder

1: B1756 (海外由来株)

2: B1819 (海外由来株)

3: 今治 163

4: 今治 165

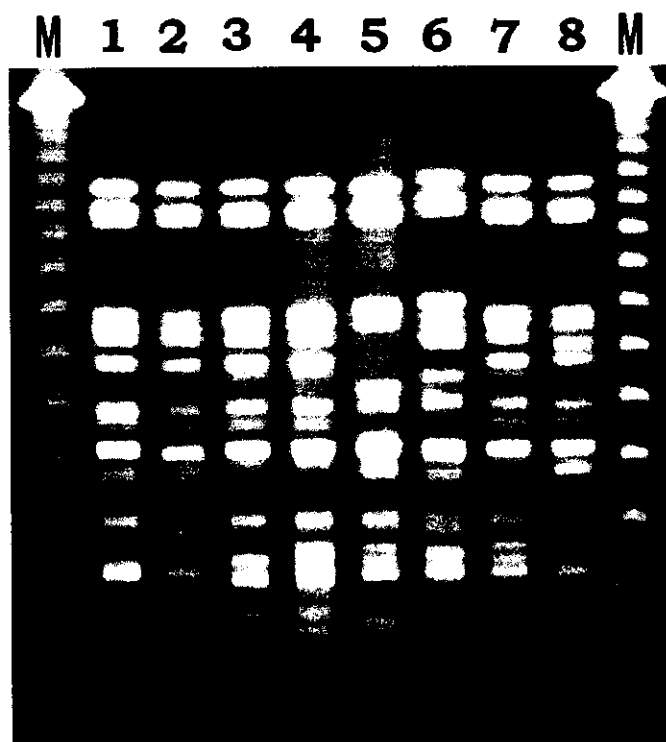
5: 愛媛 70

6: 愛媛 126

7: 愛媛 179

8: 愛媛 180

*Xba*IでのPFGE



*Bln*IでのPFGE

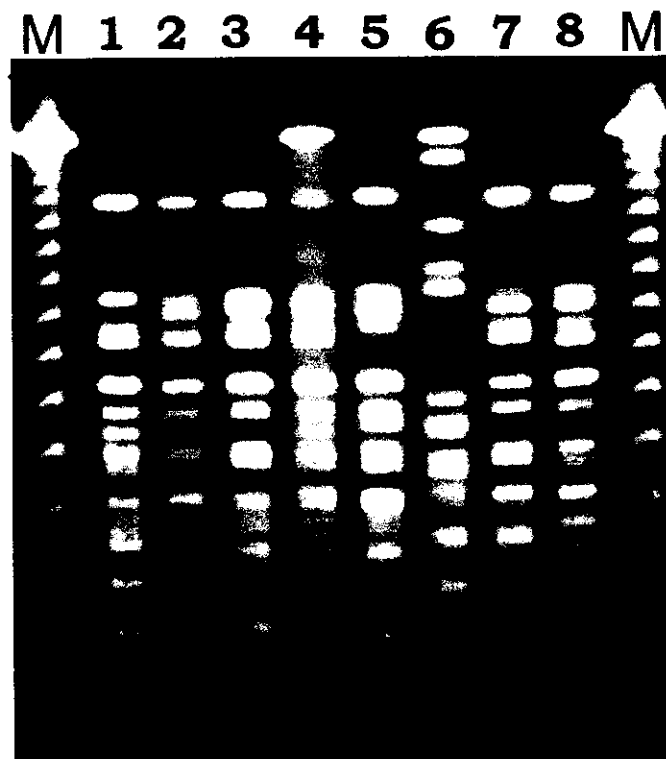


図6 C施設で実施したPFGEの画像

供試菌株

M: λ Ladder

1:C1 (静岡関連株)

2:C2 (福岡関連株)

3:今治 165

4:今治 163

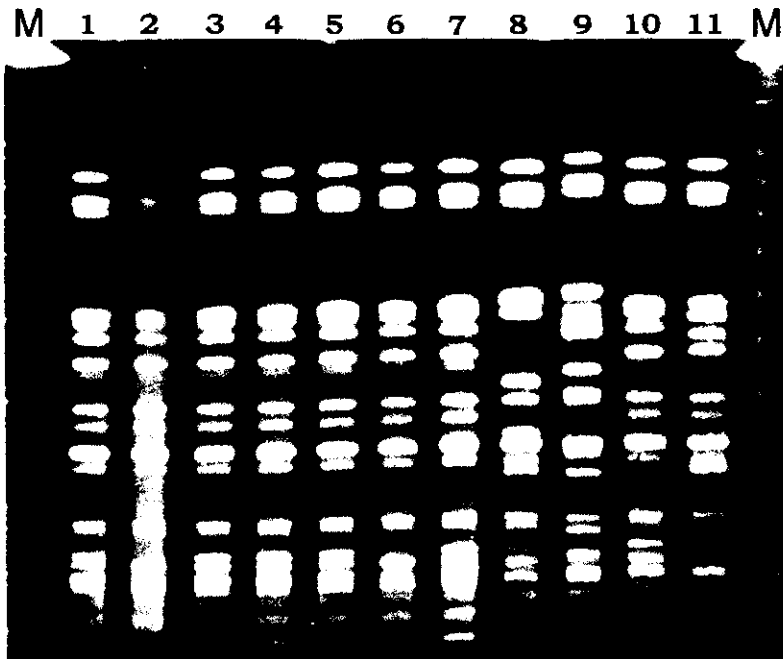
5:愛媛 70

6:愛媛 126

7:愛媛 179

8:愛媛 180

*Xba*IでのPFGE



*Bln*IでのPFGE

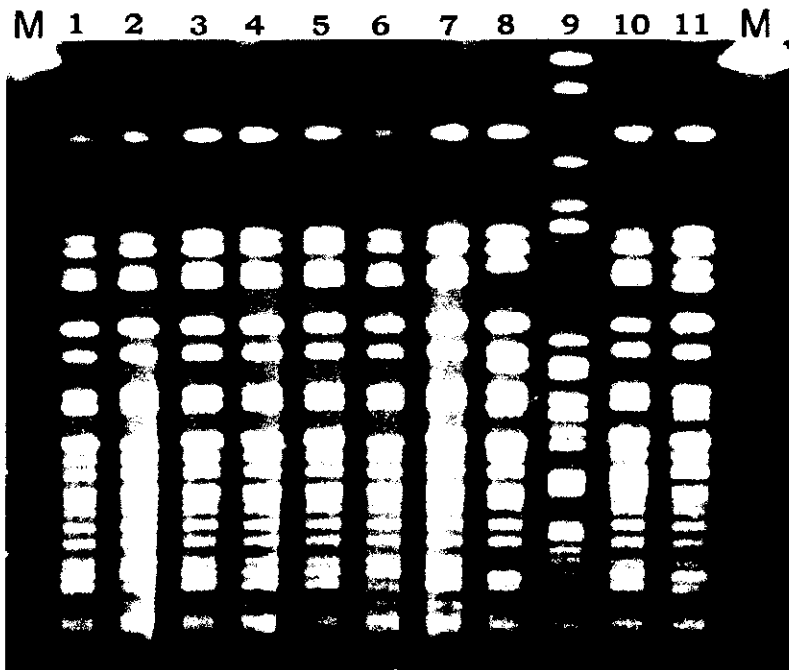


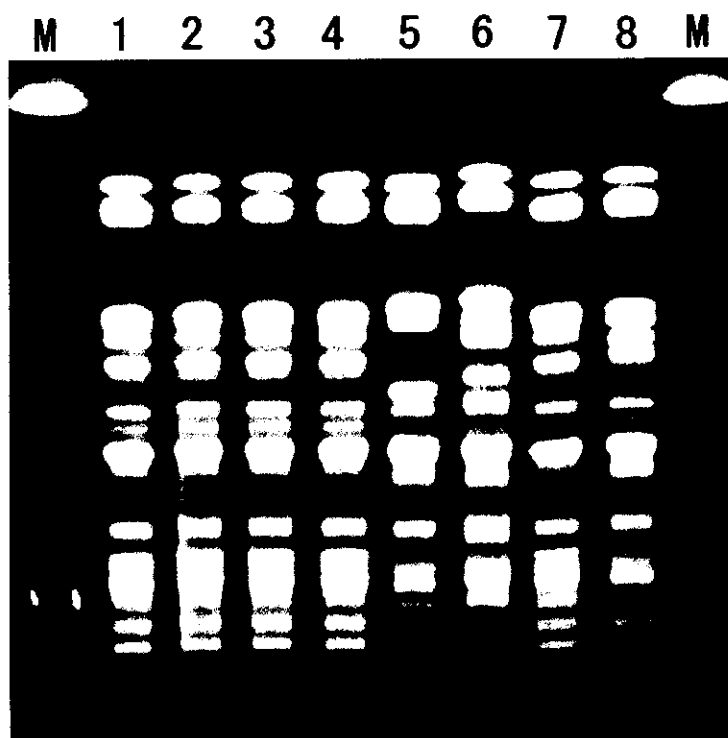
図7 D施設で実施されたPFGEの画像

供試菌株

M: λ Ladder

1:D171 (今治関連株)	6:今治 163	11:愛媛 180
2:D162 (今治関連株)	7:今治 165	
3:D160 (今治関連株)	8:愛媛 70	
4:D168 (今治関連株)	9:愛媛 126	
5:D164 (今治関連株)	10:愛媛 179	

*Xba*IでのPFGE



*Bln*IでのPFGE

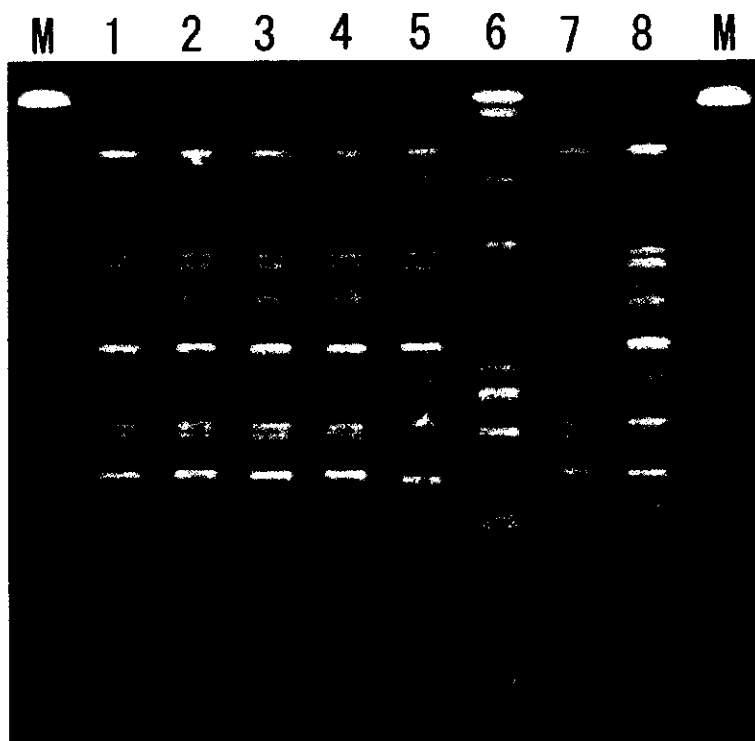


図8 E施設で実施したPFGEの画像

供試菌株

M: λ Ladder

1: E8 (今治関連株)

2: E9 (今治関連株)

3: E10 (今治関連株)

4: 今治 165

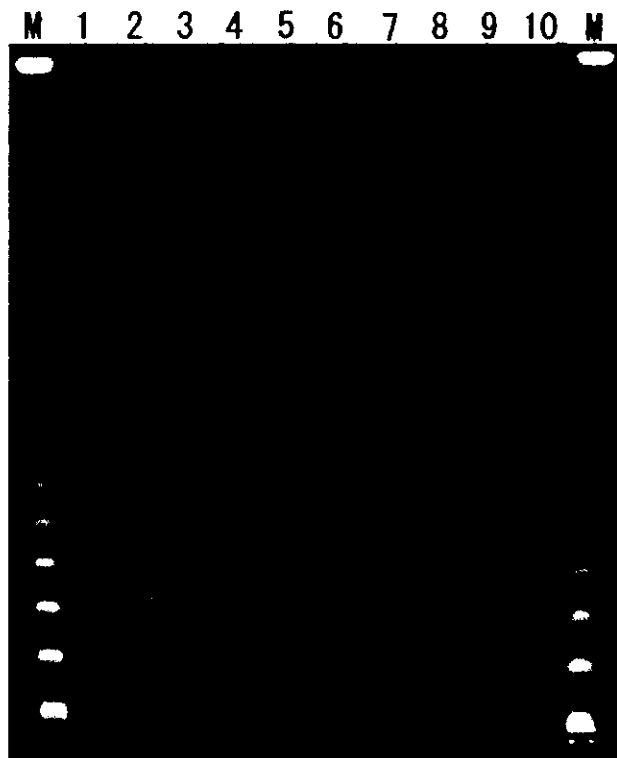
5: 愛媛 70

6: 愛媛 126

7: 愛媛 179

8: 愛媛 180

*Xba*IでのPFGE



*Bln*IでのPFGE

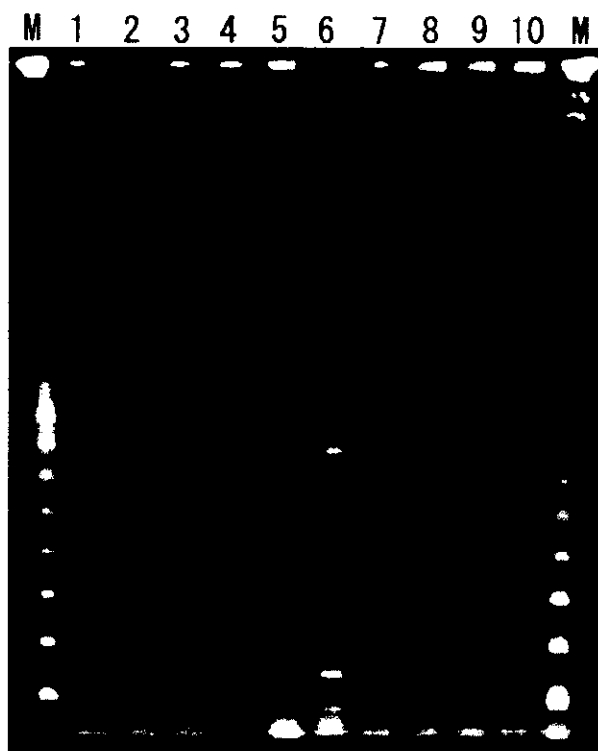


図9 F施設で実施したPFGEの画像

供試菌株

M: λ Ladder

1:F1 (今治関連株)

2:F2 (今治関連株)

3:F4 (今治関連株)

4:F4 (今治関連株)

5:愛媛 126

6:愛媛 163

7:愛媛 165

8:愛媛 179

9:愛媛 179

10:愛媛 180

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）
分担研究報告書

九州 12 機関におけるパルスネット構築に向けた基礎的研究
－腸管出血性大腸菌 O157 事例における PFGE の方法及び画像解析について－

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

真子 俊博	福岡市保健環境研究所	森下 正人	北九州市環境科学研究所
森屋 一雄	佐賀県衛生研究所	野口英太郎	長崎県衛生公害研究所
海部 春樹	長崎市保健環境試験所	宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所
藤井 幸三	熊本市環境総合研究所	淵 祐一	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 パルスネット構築に向けた基礎的研究を行うため、九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 事例におけるパルスフィールド電気泳動法（PFGE）の方法及び画像解析について検討した。すなわち EHEC O157 の感染症研究所標準株 5 株及び各機関の分離株 7-10 株について、参加機関でそれぞれ PFGE を実施し、泳動後の画像データを 1 機関に集め、解析ソフト GelComper II で解析を行い、PFGE の方法及び解析結果等を比較検討した。その結果、PFGE 関連の機器整備及び PFGE の実施方法を改善する必要があることが分かった。この問題を解決するためにはハード面では画像取り込み装置や写真撮影装置等の整備が必要であること、ソフト面では PFGE 実施方法について詳細なマニュアルを作成し研修・勉強会を実施し、定期的な精度管理が必要であることが分かった。本報告書ではパルスネット構築にあたり現状における問題点とその解決方法について言及する。

A. 研究目的

パルスフィールド電気泳動法（PFGE）による遺伝子解析は、現在、病原細菌の疫学調査に最も有用な手段として広く実施されている。また食品流通の広域化に伴い、食中毒や感染症が広域化し diffuse outbreak の事例も増加していることから、被害の拡大を防ぐためには広い地域での調査や対策が必要となってきた。そのため地方衛生研究所（地研）と感染症研究所（感染研）とを結ぶ全国的な PFGE ネットワーク（パルスネット）構築の準備が急がれている。本研究ではパル

スネット構築にむけた基礎的研究として、PFGE に関する検査法及び解析について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

PFGE の標準菌株として、感染研から分与された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 5 株（表 1）を使用した。また、2000 年あるいは 1999 年に分離された EHEC O157 株を各機関約 10 株を選び、PFGE に供試した。参加機関は A-L の 12 機関で、用いた菌株の合計は 119 株であり、

各機関の内訳は表 2 に示すとおりである。また血清型は O157:H7 115 株、O157:HNM 1 株、O157:NT 1 株、O111:HNM 2 株であった。

2. 毒素産生試験

毒素産生試験は、各機関において、PCR、或いは RPLA 法（デンカ生研キット、VTEK-RPLA「生研」使用）で実施した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、各機関において、BBL センシディスクを用いマニュアルに準じて実施した。使用薬剤は、ABPC, SM, TC, CPF, KM, CTX, CP, STX, TMP, GM, NA 及び FOM の 12 剤である。

4. 感染研による PFGE 型別

EHEC O157 117 株中 106 株は、各地研からそれぞれ予め感染研に送付し PFGE 型別が実施された。

5. PFGE 検査法

PFGE 実施方法は原則として感染研のプロトコールに準拠した。特に PFGE の泳動条件については、機関間で泳動像を比較するため、感染研プロトコールを遵守しなければならないこととした。ただし、菌体処理については、各機関独自の方法で既に確立しているところは、各機関の方法で差し支えないこととした。各機関で実施した方法については、菌の培養、DNA の調製、制限酵素による消化反応、パルスフィールド電気泳動、ゲルの染色・写真撮影等についてまとめ表 7-11 に示した。

6. 画像解析法

各機関で得られた画像データは、ポラロイド写真及び TIFF または可能なファイル形式で保存した（CCD カメラ、画像解析装置、スキャナーで泳動した写真を取り込み）画像を福岡県保健環境研究所で集積後、GelComper II (BIO-RAD) を用い解析した。

C. 研究結果

1. PFGE を行った EHEC 菌株の性状

(1) EHEC O157 株の毒素産生性

供試菌株 119 株中、血清型 O111:HNM の 2 株は集計から除き、117 株の O157 について集計を行った。その結果、117 株中、患者由来株 92 株の Vero 毒素 (VT) 型は、VT1 3 株、VT2 42 株、VT1+2 47 株、保菌者由来株 25 株は、VT1 1 株、VT2 13 株、VT1+2 11 株、合計すると 117 株中、VT1 4 株、VT2 55 株、VT1+2 58 株 であった。患者由来株と保菌者由来株で毒素型の有意差はみられなかったが、患者・保菌者由来株ともに VT1 産生株が非常に少なく、VT2 産生株と VT1+2 産生株は同程度であったのが特徴であった（表 3）。また各機関ごとにまとめた結果は表 4 に示した。

(2) EHEC O157 株の薬剤感受性試験結果

EHEC O157 の 117 株中、65 株 (55.6%) がすべての薬剤に対し感受性を示したが、他の 52 株 (44.4%) はいずれかの薬剤に対し耐性を示した（表 5）。すなわち ABPC あるいは TC の 1 剤に対する耐性株が、それぞれ 15 株 (12.8%)、2 株 (1.7%)、また ABPC・SM、ABPC・TC、SM・TC の 2 剤に対する耐性株が、それぞれ 13 株 (11.1%)、6 株 (5.1%)、10 株 (8.5%) 見られた。さらに 3 剤以上に対する耐性株も見られ、ABPC・SM・TC 耐性が 4 株 (3.4%)、SM・TC・CP 耐性が 1 株 (0.9%)、ABPC・TC・KM・STX・TMP の 5 剤耐性株が 1 株 (0.9%) あった。

各機関ごとに見ると、全株が全薬剤感受性株であった機関はなく、12 機関すべてに何株かの耐性株が見られた。また、A 機関、F 機関の株には全薬剤感受性株が 1 株もなく、全株がいずれかの薬剤の耐性菌であり、今後の調査が必要であると思われた。

(3) EHEC O157 株の感染研 PFGE 型の結果

O157 の菌株 117 株中 106 株は、既に感染研で PFGE 解析済みであったので、106 株について PFGE 型別に分類した（表 6）。その結果、106

株は 56 種類という多くの PFGE パターンに型別された。106 株中 G 機関 2 株と F 機関 3 株が III f・IV・IV のパターンを示し、その他 II a・II a・I が 3 株、II a・II c・I が 3 株、II c・II b・I が 3 株が、地域を越えた PFGE 同一型があることが分かった。

2. PFGE 条件について

PFGE の方法は、原則として感染研の方法で行うこととし、特に泳動パターンを比較するため、Xba I の使用及び泳動条件は同一にすることとした。一方、他の条件については参加機関で通常感染研と異なる方法を行っている場合、各機関で行っている方法でも良いこととした。12 参加機関で実施された方法について以下に示す。

(1) 菌の培養 (表 7)

1) 使用培地

菌を培養する培地として、12 機関中 9 機関で液体培地が使用され、3 機関で寒天培地が使用されていた。液体培地は、TSB を使用した機関が 4 機関と最も多く、その他、L プロス 2 機関、BHI プイヨン 1 機関、普通プイヨン 1 機関、GNBroth を 1 機関が使用していた。一方、寒天培地は普通寒天を 2 機関、トリプトソイ寒天を 1 機関で使用していた。

2) 培養条件

寒天培地で培養を行った 3 機関はすべて 37℃・Overnight・静置培養を行っていた。液体培地を用いた 9 機関では 2 機関が 37℃・Overnight・静置培養、4 機関が 37℃・Overnight 振盪培養、及び 3 機関が 37℃・4～5 時間・振盪培養を行っていた。

(2) DNA の調製—アガロース包埋 (表 7)

1) キットの使用

DNA の調製及び制限酵素処理の過程において、12 機関中 1 機関は GenePath (BIO-RAD) 用のキットを使用していた。他の 11 機関は以下の方法で実施していた。

2) 菌の洗浄及び菌液調製

寒天培地培養菌を用いた 3 機関は菌の洗浄を行わず培養菌を直接水に懸濁し、菌液を調製していた。液体培地培養菌を用いた機関でも 9 機関中 2 機関が、洗浄せずに遠心後直接水又はキット付属試薬に懸濁し、菌液を作っていた。他の 7 機関中 3 機関は、洗浄及び菌液調製に Pett IV を使い、その他 4 機関は TE buffer (2 機関)、生理食塩水 (1 機関)、PBS (1 機関) で洗浄後、水に懸濁し、菌液としていた。

3) アガロース包埋前の菌液保温温度

12 機関中 4 機関が室温、3 機関が 50℃、2 機関が 65℃、その他 55℃、37℃、氷上に菌液を保持していた。

4) アガロースブロック作成のためのアガロースの種類及び濃度

アガロースブロック作成に用いるアガロースとしては、12 機関中 9 機関が低融点アガロース (BIO-RAD)、他の 2 機関が Chromosomal Grade アガロース (BIO-RAD)、1 機関がキットの付属品を用いていた。またアガロースの濃度については、感染研法で示されている最終濃度 0.5% になるように調製した機関が 4 機関であったのに対し、それより濃い 0.6%、0.75%、1% 濃度のアガロースをそれぞれ 2 機関、4 機関、2 機関が使用していた。

(3) DNA の調製—Lysozyme 処理 (表 8)

感染研では 1mg/ml 濃度の Lysozyme で 1 時間の処理を行うことを目安にするよう薦めている。参加 12 機関においては、Lysozyme 処理を行った機関が 9 施設あるのに対し、Lysozyme 処理を全く行っていない機関も 2 施設あった。処理の方法としては 1 機関 (キット使用) において濃度が不明である以外は、実施したすべての機関で 1mg/ml 濃度の溶液を使用し、反応時間は、4 機関が 3 時間、3 機関が Overnight、2 機関が 1 時間、1 機関が 2 時間の反応時間で行っていた。

(4) DNA の調製 - Proteinase K 処理と失活

(表 9)

1) Proteinase K 処理回数

12 機関中 1 機関は 2 回の処理を行っていたが、他の 11 機関は 1 回の処理を実施していた。

2) Proteinase K の溶解液、濃度および処理時間

Proteinase K の溶解液としては、感染研法で示された 1%N-lauroylsarcosine 加 0.5MEDTA を使用した機関が 8 機関、Lysis buffer を使用した 2 機関、1%N-lauroylsarcosine 加 0.25M EDTA を使用した 1 機関及びキットに付属している溶解液を使用した機関が 1 機関あった。Proteinase K の濃度はキット使用の 1 機関以外は、すべて 1mg/ml 濃度を用い、処理時間は 12 機関すべて Overnight で行っていた。

3) Proteinase K 失活試薬

Proteinase K 失活試薬として、12 機関中 6 機関が Pefabloc SC を用い、他の 5 機関が PMSF を使用していた。他の 1 機関はキットを使用しており、キットのマニュアルには Proteinase K 失活のための反応は特に記載がないが、Proteinase K 処理後に 5 回の洗浄を行うので、これがこの反応と関連するものと思われる。

4) Proteinase K 失活試薬の処理時間及び回数

キットを使用していない 11 機関中 8 機関が、感染研法で示された 50℃ 30 分の処理を行っており、2 機関が室温 1 時間、1 機関が 20 分の処理を実施していた。また処理回数は 2 回実施が 7 機関、3 回が 3 機関、1 回が 1 機関であった。

5) 処理後の洗浄

感染研法では、氷上で 30 分、1 回、TE buffer での洗浄を行うことを示しているが、キット使用の 1 機関を除いた 11 機関では、洗浄回数 1 回は 3 機関、2 回が 4 機関、3 回が 2 機関、4 回が 2 機関と感染研法より多く洗浄する傾向が見られた。

(5) 制限酵素 *Xba*I による消化反応 (表 10)

1) *Xba*I 溶解緩衝液による馴化

感染研法では、氷上 30 分の *Xba*I 溶解緩衝液による馴化を示しているが、12 機関中馴化を行っていない機関が 2 機関、他の 10 機関は馴化を行っていた。

2) 制限酵素 *Xba*I の濃度及び反応時間

*Xba*I の濃度は、12 機関中 9 機関で、感染研が示した 30units/sample 濃度を用い、他は 40units/sample、25units/sample、20units/sample 濃度を用いていた。処理時間はすべての機関が Overnight で行っていた。

(6) パルスフィールドゲル電気泳動 (表 10)

1) アガロース

12 機関中 11 機関で、Pulsed Field Certified Agarose (BIO-RAD) が使用され、1 機関で Molecular Biology Certified Agarose (BIO-RAD) が使用された。アガロース濃度はすべての機関で 1% 濃度が使用された。

2) PFGE 装置

12 機関中、9 機関が CHEF-DR III (BIO-RAD)、2 機関が Gene Path (BIO-RAD)、他の 1 機関が Mapper (BIO-RAD) を使用した。

(7) ゲルの染色および撮影 (表 11)

1) エチジウム・プロマイド溶液の濃度、染色時間及び脱色時間

感染研では 0.3 μ g/ml、30 分染色、1-2 時間の脱色が薦められている。濃度については、0.3 μ g/ml 使用及び 0.5 μ g/ml 使用が、それぞれ 5 機関、0.1 μ g/ml 使用が 1 機関、1 μ g/ml 使用が 1 機関であった。染色時間は 30 分が 5 機関、1 時間が 5 機関、15-20 分が 2 機関あった。脱色時間は 8 機関が 2 時間、4 機関が 1 時間実施していた。

2) 写真撮影

写真撮影のためのフィルムは、フジ F P 3000 B (3 機関)、ポラロイド 667 (3 機関)、ポラロイド 665 (2 機関)、ポラロイド 3200 B (2

機関)およびビデオプリンター用紙(1 機関)が用いられていた。1 機関は写真撮影を行っていない。UV波長は 254nm、365nm を用いている機関がそれぞれ 1 機関ずつあったが、他はすべて 302 及び 312nm の波長が用いられていた。

(8) 画像の取り込み及び保存 (表 11)

画像取り込み装置及びスキャナーについては、ゲルドック(BIO-RAD)が 3 機関で使用されていたが、他は施設によりまちまちであった。また画像の保存形式は TIFF(9 機関)及び JPEG(2 機関)であった。

3. 画像解析について

(1) 画像の保存形式について

1) 画像の取り込み装置

GelComper II で解析する場合 PFGE 後の泳動像を TIFF 形式で保存した画像が必要である。参加 12 機関中 2 機関では JPEG 形式での保存のみが可能であった。一旦 JPEG 形式で保存された画像を数種のソフトウェアを用い TIFF ファイル形式にコンバートしたが、GelComper II での認識は不可能であった。今後解析を行うに当たり TIFF 形式で保存可能な画像取り込み装置の整備が必要である。

2) 写真撮影装置

画像を解析用に加工する際、バンドの確認作業が必要であった。この作業には感度の良い写真として保存されている必要がある。2 機関では写真撮影装置無しに、PFGE のゲルを直接画像として取り込み感熱記録紙や画像ファイルとして保存されていた。正確な解析を行うためには写真撮影装置が必要である。

(2) PFGE マーカーの認識

10 機関の PFGE で用いられた Lambda ラダーマーカー(3 レーン×10 機関 + 感染研 5 レーン)を感染研から供与されたレファレンスマーカーと比較した(図 1)。Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] で解析した場

合、65 レーン中 53 レーンはレファレンスマーカーと 100%一致していた。しかし、類似度が 1% 以下異なるものが 4 レーン、2.1%が 4 レーン、3.7%が 2 レーン、6.9%が 3 レーンであった。マーカーそのものが 100%一致しない要因について、阻害する要因別に以下に示す。

1) マーカーの DNA 量が少ない場合

今回の共同研究では 1 機関の泳動像で全く写真や画像においてもマーカーを認識できずレファレンスマーカーとの比較及び画像の標準化ができないため解析不可能であった。

2) マーカーの DNA 量が多い場合

12 機関中 5 機関においてマーカーの DNA 量が多く、解析のための加工過程で支障を来した。マーカーの DNA 量が多い場合、画像の加工過程でバンドをピークとして判定する際、シングルピークとして認識されず、バンド幅が大きくさらにピークが富士山状になっているためバンド位置の決定ができない。また DNA 量が多いため移動度が遅く DNA の展開度が悪く、被検菌株の移動度に影響を及ぼしていると考えられた。

3) 同一ゲル内のマーカー DNA 量の濃度差

同一ゲル内でのマーカー DNA 量の濃度差は、泳動像の彎曲、歪みの原因となる。濃い濃度レーンは移動度が遅くなる傾向があり、その後のバンド認識にも大きな影響があった。

(3) 標準株による精度管理

表 1 に示す 5 株について 12 機関で精度管理を実施した。12 機関の泳動像を図 2 に示した。画像解析の可能であった 10 機関について、各標準株ごとにそれぞれ解析した。感染研標準株 96002 株 [I a · I · I] は、マーカーと同一条件で解析した結果、92-53%の類似度であった(図 3)。感染研 96212 株 [II a · II b · I] は 100-62%(図 4)、感染研 981553 株 [II b · II b · I] は 92-54%(図 5)、感染研 96132 株 [III a · ND · ND] は 98-60%(図 6)、感染研 970753 株 [III b · ND · III] は

97-46% (図 7) の類似度であった。明らかに機関間での類似度が低く問題点が多くあることが分かった。しかし、写真を目視で観察した場合、同一の PFGE パターンを示している機関が多かった。

これら類似性が低い結果となった要因について示す。

1) 被検菌株の DNA 濃度が多い場合

2 機関で PFGE 像がスメア一状となり、すべての被検菌株において通常濃度では無い 90kbp 付近にバンドが見られた。プラグ作成時の菌量過多のためと考えられた。さらに 4 機関でも DNA 濃度が高い為、マーカーと同様にシングルピークが得られずバンド確認作業が困難であった。分子量の高いバンドの確認において、目視では複数のバンドが確認されるにもかかわらずピークとして認識できない場合が多かった。

2) 泳動における DNA 断片の移動度の違い

各機関同一条件で泳動しているにもかかわらず、Lambda ラダーを含めた DNA 断片の移動度が大きく異なっていた。原因として緩衝液温度の制御能、PFGE 解析環境、PFGE 機種、DNA 調整等複数の要因が考えられる。各機関での精度管理を行いながら詳細な調整が必要と考えられる。

3) 染色及び脱色

染色・脱色後、退色によって輝度の弱いバンドが確認できない。また、脱色が悪いとバックグラウンドが高く、画像の加工に支障がある場合があった。

(4) 九州地区の O157 菌株の比較

12 機関で集められた O157 菌株 107 株は、感染研に送付され PFGE 型が既に判明している。これらの株について各機関で再度 PFGE 解析したその整合性並びに各機関で類似性のある菌株について検索を行った。

1. 各機関ごとの解析

各機関毎の画像をそれぞれ GelComper II を

用いて解析した (図 8-17)。その結果、感染研 PFGE 型で同一と判定されている菌株若しくは疫学的に同一と考えられる菌株については類似度が 95-100% の結果が得られている機関が 4 機関であった。

2. 機関全体での解析

機関の違う菌株間で感染研 PFGE 型が同一である菌株に注目し、解析可能な 2 型についてデンドログラムを作成した。感染研 PFGE パターン III・IV・IV は、2 機関では同一であったが機関を越えると 2 機関での相同性は 83% であった (図 18)。また、IIa・IIc・I は 3 機関 1 株ずつ見られたが A と D 機関で 83%、G 機関とは 48% の相同性しか見られなかった (図 19)。

さらに Vero 毒素 1 及び 2 産生型と 2 単独産生型との 2 種に分けデンドログラムを作成したが、GelComper II の使用方法の不備、機器や手技の不統一のため解析に至る結果は得られなかった (図 20、21)。

D. 考察

現在、すべての EHEC に関して感染研において PFGE 型別が実施されている。また、各機関毎にも EHEC を含めた菌株の相同性を検討している。しかし、機関ごとに解析を進め相互のデータを交換するにあたっての予備調査は未だ十分ではない。そこで本研究ではパルスネット構築のため九州地区 12 地研の PFGE の解析及び各機関での PFGE 周辺状況を調査した。さらに解析ソフト GelComper II を用い一機関での画像解析を試みた。本研究で機器や PFGE 条件や方法の問題点がクローズアップされた。さらに、GelComper II の適正な使用には、かなりトレーニングが必要であることも分かった。これら問題点の解決には、パルスネットを実施するために必要な最低機器の提示及び整備、PFGE 実施方法の詳細なマニュアル化及び研修、統一ゲル及び菌株を使用した PFGE の精度管理が必要である。

E. 結論

パルスネット構築のためには次の点について早急に改善を図る必要性があることが分かった。

1. 機器整備

パルスネット構築のための必要備品の提示を行う。本研究で不足していた主に機器は次の2点であった。

- a. PFGE 泳動後の写真撮影装置
- b. TIFF 形式で保存できる画像取り込み装置

2. 技術面

PFGE の作業はかなりトレーニングが必要であり、緊急事態に備えるべくパルスネット機構には恒常的技術の継承が必要である。そのためには次の項目について実施することが急務である。

- a. PFGE に関する詳細なマニュアルの作成
- b. マニュアルに基づいた技術の習得
- c. 標準菌株による精度管理
- d. GelComper II の画像解析方法の研修並びに統一

F. 研究発表

1. 著書

堀川和美, 環境と生命, 常盤 寛 編集, 青山社, 2000, pp147-173.

2. 論文発表

Yuko Meno, Shuji Fujimoto, Kazumi Horikawa, and Yoshida Shin-ichi, Release of membrane vesicles containing endotoxic lipopolysaccharide in Escherichia coli O157:H7 clinical isolates, Microbiological and Immunology, 2000, 44(4), 271-274.

Fujimoto Shuji, Kenichi Umene, Mitsumasa

Saito, Kazumi Horikawa and Martin J. Blaser, Restriction fragment length polymorphism analysis using random chromosomal gene probes for epidemiological analysis of Campylobacter jejuni infections, Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(4), 1664-1667.

中山 宏, 川端与志子, 石橋邦博, 堀川和美, 免疫磁気ビーズ法を用いた人便からの腸管出血性大腸菌 O157 検査における増菌培養の検討, 感染症学雑誌, 2000, 74(6), 527-535.

Bin Chang, Shin-ichi Yoshida, Hiroshi Miyamoto, Midori Ogawa, Kazumi Horikawa, Kikuyo Ogata, Mitsuaki Nishibuchi, Hatsumi Taniguchi, A unique and common restriction fragment pattern of the nucleotide sequences homologous to the genome of Vf33, a filamentous bacteriophage, in pandemic strains of Vibrio parahaemolyticus, FEMS Microbiol. Letters, 2000, 192, 231-236.

Kazumi Horikawa, Koichi Murakami and Fujiko Kawano, Isolation and characterization of methicillin Staphylococcus aureus strains from nurses and their gowns, Microbiological Research, 2001, 155, 345-349.

2. 学会発表

Kazumi Horikawa, Koichi Murakami, Hiroshi Nakayama and Jun Yatsyanagi, Characterization and virulence factors of Escherichia coli O157 strains that do not produce Shiga toxin, VTEC 2000, Kyoto, 2000. 10. 31.

表1. EHEC O157 の標準株

感染研no.	分離年	分離府県	市・町	備考	VT型	<100kb	100-200kb	>350kb
960002	1996	広島県	東城町	小学校集発	1+2	Ia	I	I
960212	1996	大阪府	堺市	小学校集発	1+2	IIa	IIb	I
981553	1998	宮崎県	宮崎市	保育園集発	1+2	IIb	IIb	I
960132	1997	埼玉県	上尾市	散発	2	IIIa	ND	ND
970753	1994	神奈川県	記載なし	牛肉	2	IIIb	ND	III

表2. 解析に用いたEHECの菌株数と血清型

血清型	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	計
O157:H7	10	9	10	9	10	10	10	10	7	10	10	10	115
O157:HNM				1									1
O157:HNT		1											1
O111:HNM									2				2
計	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	119

表3. EHEC O157の毒素産生性

由来	計	毒素型		
		VT1	VT2	VT1+2
患者	92	3	42	47
保菌者	25	1	13	11
計	117	4	55	58

表4. 各地研別 EHEC O157の毒素産生性

施設	由来	計	毒素型		
			VT1	VT2	VT1+2
A	患者	8		2	6
	保菌者	2		1	1
B	患者	9		5	4
	保菌者	1		1	
C	患者	10		2	8
	保菌者	0			
D	患者	4		2	2
	保菌者	6		3	3
E	患者	7		3	4
	保菌者	3		2	1
F	患者	7		6	1
	保菌者	3		3	
G	患者	6		3	3
	保菌者	4		3	1
H	患者	8		4	4
	保菌者	2			2
I	患者	7	2	4	1
	保菌者	0			
J	患者	9		3	6
	保菌者	1			1
K	患者	8		5	3
	保菌者	2			2
L	患者	9	1	3	5
	保菌者	1	1		
合計		117	4	55	58

表 5. EHEC O157 の薬剤耐性パターン

薬剤耐性パターン	地 研 名												合計
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
すべて感受性		8	3	7	9		8	8	5	6	5	6	65
ABPC	3		5			4	1			1		1	15
TC										1		1	2
ABPC,SM	5	1	1	1			1			2	1	1	13
ABPC,TC						6							6
SM,TC			1	2				1	2		3	1	10
ABPC,SM,TC	2	1			1								4
SM,TC,CP								1					1
ABPC,TC,KM,SXT,TMP											1		1
合 計	10	10	10	10	10	10	10	10	7	10	10	10	117

表7. PFGE条件：菌の培養ア及びガロース包埋

地研名	菌の培養		DNAの調製—アガロース包埋			
	使用培地	培養時間	培養条件 (静置・振盪)	菌洗浄用液名→菌液作成用液名	菌液保温 温度	アガロース名
A	Lブロス	Over night	振盪	PettIV→ PettIV	5 0℃	低融点7ガロース,BIO-RAD
B	BHIアイン	Over night	振盪	無 → 蒸留水	3 7℃	低融点7ガロース,BIO-RAD
C	普通寒天	Over night	静置	無 → 超純水	水上	低融点7ガロース,BIO-RAD
D	TSB	Over night	静置	PBS → 超純水	室温	低融点7ガロース,BIO-RAD
E	GNBroth	5時間	振盪	無 → キット付属品	5 0℃	キット付属品
F	TSB	5時間	振盪	TE → 超純水	5 5℃	低融点7ガロース,BIO-RAD
G	TSB	4-5時間	振盪	PettIV→ PettIV	6 5℃	如モノアゲレド7ガロース,BIO-RAD
H	Lブロス	18時間	振盪	PettIV→ PettIV	6 5℃	如モノアゲレド7ガロース,BIO-RAD
I	普通寒天	24時間	静置	無 → 超純水	5 0℃	低融点7ガロース,BIO-RAD
J	TSB	16時間	静置	TE → 超純水	室温	低融点7ガロース,BIO-RAD
K	TSA	18時間	静置	無 → 超純水	室温	低融点7ガロース,BIO-RAD
L	普通ブイヨン	18-24時間	振盪	生食水→DNA, RNAfreeの水	室温	低融点7ガロース,BIO-RAD

使用順 位	菌の培養		DNAの調製—アガロース包埋			
	液体培地	使用培地	培養時間及び培養条件	菌洗浄用液名→菌液作成用液名	菌液保温 温度	アガロース名
1	TSB(4)	寒天培地 普通寒天(2)	Over night、静置(5) (寒天培地培養(3)を含む)	無 → 水 (4) (寒天培地培養(3)を含む)	室温(4)	低融点7ガロース,BIO-RAD(9)
2	Lブロス(2)	TSA(1)	Over night、振盪(4)	PettIV→ PettIV(3)	5 0℃(3)	如モノアゲレド7ガロース,BIO-RAD(2)
その他	BHIアイン(1) 普通ブイヨン(1) GNBroth(1)		4-5時間、振盪(3)	TE → 水(2) 生食水→水(1) PBS → 水(1) 無 → キット付属品(1)	6 5℃(2) 3 7℃(1) 水上(1) 5 5℃(1)	キット付属品(1) 1.2%(2) 2%(2) 0.6%(2) 1%(2)

() 内は地研数

表8. PFGE条件：Lysozyme処理

DNAの調製 - Lysozyme処理					
地研名	Lysozymeの使用の有無	Lysozyme濃度	Lysozyme溶解液名	反応時間	Lysozyme液洗浄回数
A	有	1mg/ml	EC lysis buffer	Over night	1回
B	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	1回
C	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無
D	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無
E	有	キット付属品	キット付属品	1時間	1回
F	有	1mg/ml	0.5MEDTA	2時間	1回
G	無				
H	無				
I	有	1mg/ml	0.5MEDTA	24時間	1回
J	有	1mg/ml	0.5MEDTA	Over night	無
K	有	1mg/ml	0.5MEDTA	1時間	無
L	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	1回

DNAの調製 - Lysozyme処理					
使用順位	Lysozymeの使用の有無	Lysozyme濃度	Lysozyme溶解液名	反応時間	Lysozyme液洗浄回数
1	有(10)	1mg/ml(9)	0.5MEDTA(8)	3時間(4)	1回(6)
2	無(2)	キット付属品(1)	EC lysis buffer(1) キット付属品(1)	Over night(3)	無(4)
その他				1時間(2) 2時間(1)	

表9. PFGE条件：Protenase K処理と失活

地研名	DNAの調製 - Proteinase処理及び失活								
	ProteinaseK 処理回数	ProteinaseK濃度	ProteinaseK溶解液名	反応時間	ProteinaseK 洗浄回数	ProteinaseK失 活試薬名	反応時間	反応回数	洗浄回数
A	1回	1mg/ml	0.25MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	1回	PMSF	30分	2回	2回
B	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	1回	Pefabloc SC	30分	2回	3回
C	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	無	Pefabloc SC	30分	2回	2回
D	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	無	PMSF	30分	3回	1回
E	1回	キット付属品	キット付属品	17時間	5回	無			無
F	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	16時間	1回	PMSF	20分	3回	3回
G	2回	1mg/ml	Lysis buffer	Over night	4回	PMSF	1時間	2回	4回
H	1回	1mg/ml	Lysis buffer	18時間	4回	PMSF	1時間	3回	4回
I	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	15時間	1回	Pefabloc SC	30分	2回	1回
J	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	2回	Pefabloc SC	30分	2回	2回
K	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	無	Pefabloc SC	30分	2回	1回
L	1回	1mg/ml	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine	Over night	1回	Pefabloc SC	30分	1回	2回

使用順 位	DNAの調製 - Proteinase処理							DNAの調製 - Proteinaseの失活			
	ProteinaseK 処理回数	ProteinaseK濃度	ProteinaseK溶解液名	反応時間	ProteinaseK 洗浄回数	ProteinaseK失 活試薬名	反応時間	反応回数	洗浄回数		
1	1回(11)	1mg/ml(11)	0.5MEDTA,1%N-lauroylsarcosine(8)	Over night(12)	1回(5)	Pefabloc SC(6)	30分(8)	2回(7)	2回(4)		
2	2回(1)	キット付属品(1)	Lysis buffer(2)		無(3)	PMSF(5)	1時間(2)	3回(3)	1回(3)		
その他			0.25MEDTA,1%N-lauroylsarcosine(1) キット付属品(1)		4回(2) 5回 2回	キットのため不明	20分(1) 不明(1)	1回(1) 3回(2) 4回(2) 無(1)			

表10. PFGE条件：制限酵素処理とPFGE

地研名	制限酵素による消化反応		パルスフィールド電気泳動				
	Xba I 溶解緩衝液による馴化の有	Xba I 濃度 / Sample plug	反応時間	アガロース名	アガロース濃度	PFGE装置メーカー名	PFGE装置名
A	有	40 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
B	有	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Gene Path
C	有	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
D	有	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
E	有	20 units	18時間	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
F	有	30 units	16時間	Molecular Biology Certified Agarose, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Gene Path
G	無	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Mapper
H	無	25 units	18時間	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
I	有	30 units	18時間	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
J	有	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
K	有	30 units	Over night	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII
L	有	30 units	18時間	PFC7 ガロース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII

使用順位	制限酵素による消化反応		パルスフィールド電気泳動				
	Xba I 溶解緩衝液による馴化の有	Xba I 濃度 / Sample plug	反応時間	アガロース名	アガロース濃度	PFGE装置メーカー名	PFGE装置名
1	有(10)	30 units(9)	Over night(12)	PFC7 ガロース, BIO-RAD(11)	1%(12)	BIO-RAD(1)	CHEF-DRIII(9)
2	無(2)	20 units(1) 25 units(1) 40 units(1)		Molecular Biology Certified Agarose, BIO-RAD(1)			Gene Path(2)
その他							Mapper(1)

表11. PFGE条件：ゲルの染色および撮影

地研名	ゲルの染色および撮影									
	エジウム・ブロード濃度	染色時間	洗浄時間	使用フィルム名	UV波長	画像取り込み装置名	ファイル保存形式	キットの使用等		
A	0.5 μg/ml	1時間	1時間	ボロナイト 667	312nm	Bio image Gel Print2000i/VGA	TIFF			
B	0.3 μg/ml	1時間	1時間	ボロナイト 667	302nm	ゲルト ック1000	TIFF			
C	0.33 μg/ml	30分	2時間以上	三菱ビテック・ブロード セツ用感熱記録紙	302nm	Sony Quick Access FD Drive 2X	JPEG			
D	0.5 μg/ml	30分	2時間	73 FP3000B	365nm	Bio image Gel Print2000i/VGA	TIFF			
E	0.3 μg/ml	1時間	2時間	73 FP3000B	302nm			BIO-RAD GenePath用キット		
F	1 μg/ml	15分	2-4時間	ボロナイト3200B	302nm	EPSON GT-7600S	TIFF			
G	0.5 μg/ml	30分	2時間	ボロナイト 665	312nm	FOTODYNE	TIFF			
H	0.1 μg/ml	30分	2時間	ボロナイト3200B	302nm	ゲルト ック1000	TIFF			
I	0.5 μg/ml	30分	1時間	ボロナイト 665	312nm	ゲルト ック2000	TIFF			
J	0.5 μg/ml	1時間	1時間	ボロナイト 667	312nm	EPSON GT8700	TIFF			
K	0.3 μg/ml	20分	2時間	73 FP3000B	254nm	EPSON GTGT-9000	TIFF			
L	0.3 μg/ml	1時間	2時間	ボロナイト 667	302nm	TOYOBO FASIII	JPEG			

使用順位	ゲルの染色および撮影									
	エジウム・ブロード濃度	染色時間	洗浄時間	使用フィルム名	UV波長	画像取り込み装置名	ファイル保存形式	キットの使用等		
1	0.5 μg/ml(5)	30分(5)	2時間位(8)	73 FP3000B(3)	302nm(6)	ゲルト ック1000又は2000(3)	TIFF(9)	BIO-RAD GenePath用キット(1)		
2	0.3 μg/ml (5)	1時間(5)	1時間(4)	ボロナイト 667 (3)	312nm(4)	Bio image Gel Print 2000i /VGA(2)	JPEG(3)			
その他	0.1 μg/ml(1)	20分(1)		ボロナイト 665(2)	254nm(1)	Sony Quick Access FD Drive 2X(1)				
	1 μg/ml(1)	15分(1)		ボロナイト3200B(2) 三菱ビテック・ブロード セツ用感熱記録紙(1)	365nm(1)	EPSON GT-7600S(1) FOTODYNE(1) EPSON GT8700(1) EPSON GTGT-9000(1) TOYOBO FASIII(1)				

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE

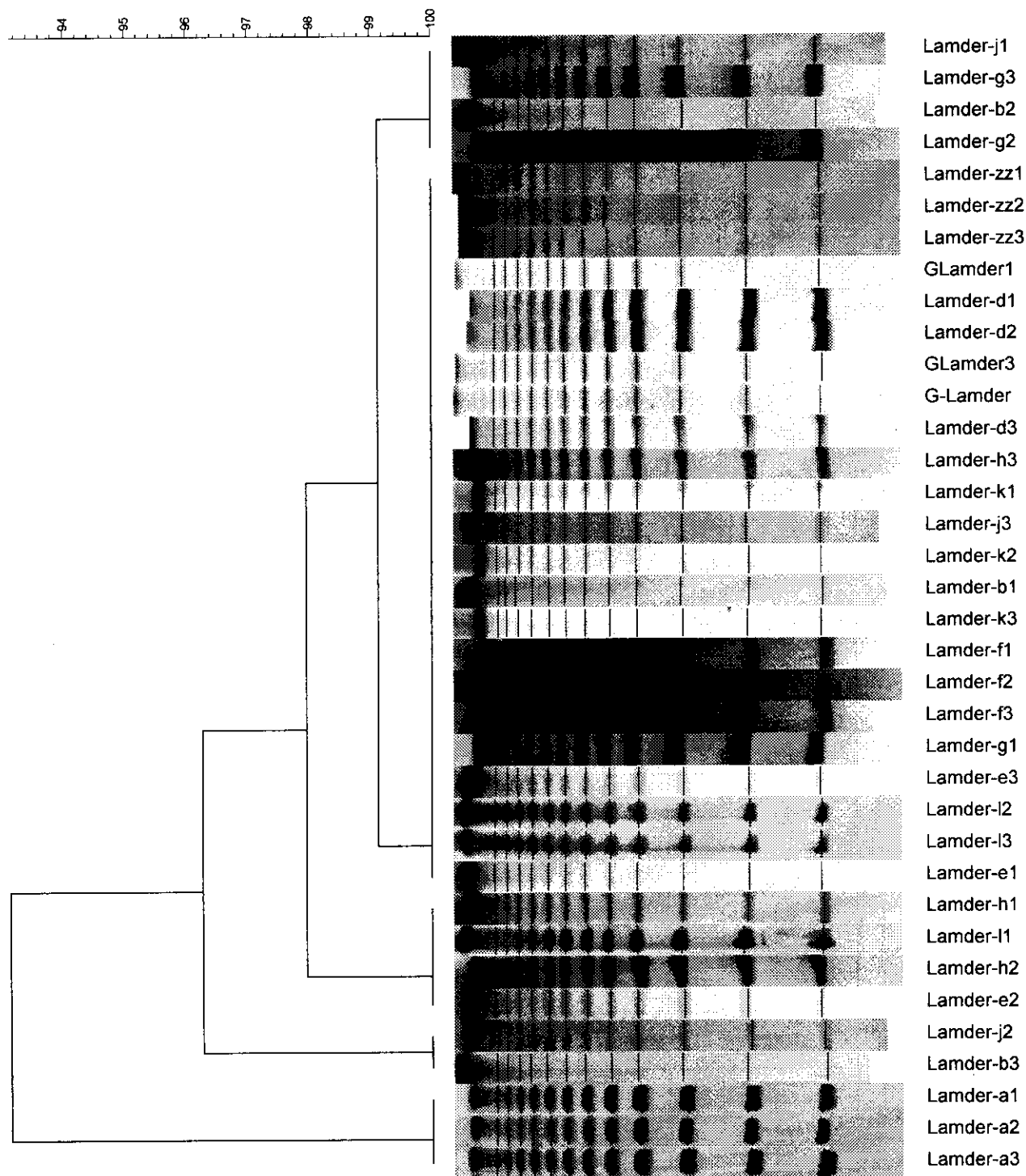


図 1. DNA サイズスタンダード・Lambda ラダーの比較