

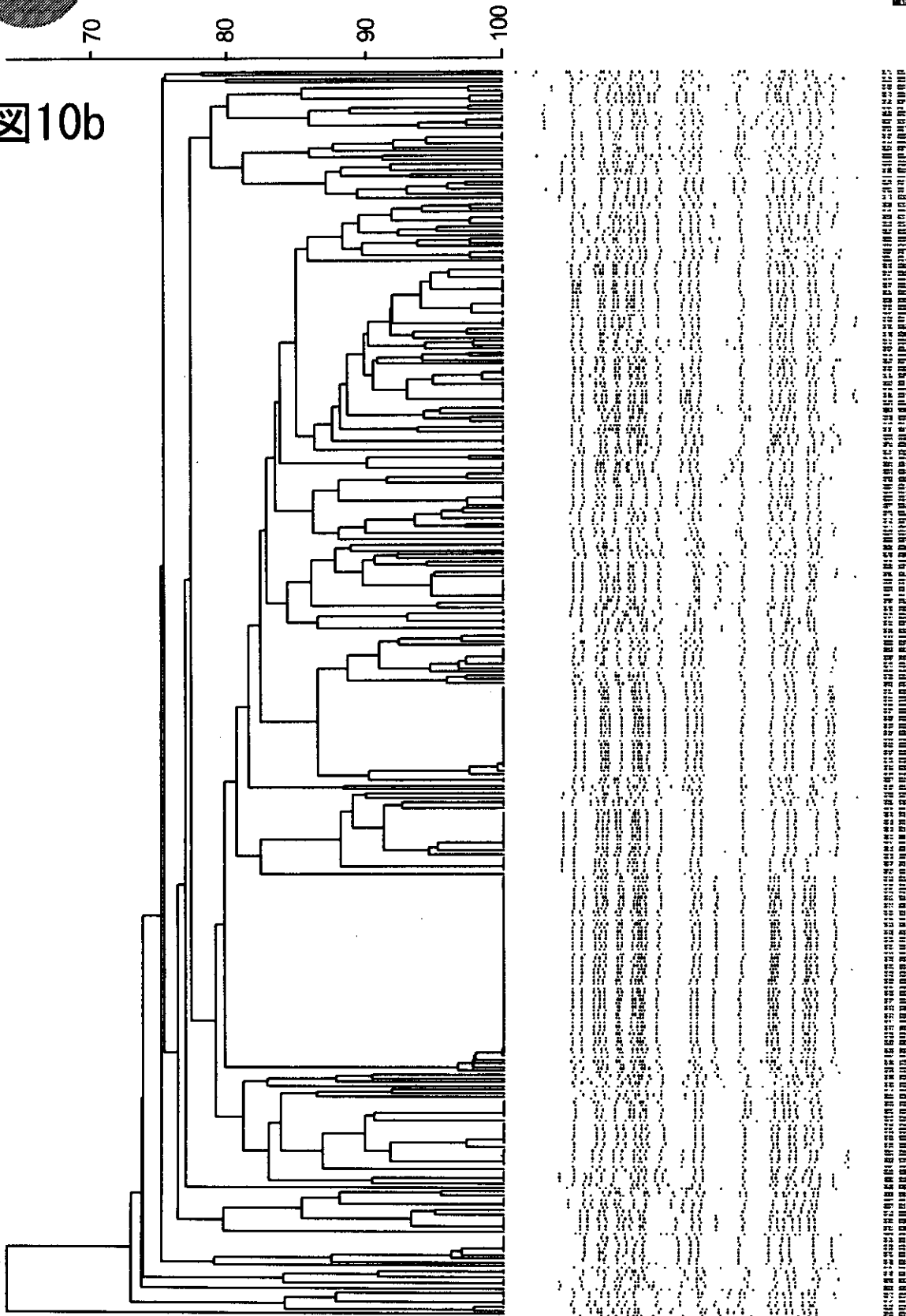
■デンドログラムの表示について 株数が多いためにデータが読み取りにくくなっています。  
トップページに全体像、以降のページは拡大版を掲載しています



026 (2002/12/31までに分離された329株)



図10b



パルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE）標準化及び  
画像診断を基礎とした分散型システム有効性に関する研究

分担研究者 矢野昭起

北海道立衛生研究所

研究要旨：本年度は北海道・東北・新潟ブロックにおいて PFGE に関する精度管理を 2 回行った。供試菌株は腸管出血性大腸菌 O157 が 7 株と同 O26 株が 3 株である。同一施設内における時間変動を知る目的で 1 回目と 2 回目は同じ菌株を使用した。1 回目には、PFGE と同時に方法に関するアンケート調査も実施し、統一したマニュアルを作成するための資料とした。方法については、多数の施設が基本的に国立感染症研究所での方法を採用しており、キットを使用している施設は少数であった。PFGE の解析結果では、泳動条件の相違などによって施設間の similarity はそれほど高くはなかった。このことを踏まえ、2 回目は統一したマニュアルを作成しこれに沿って PFGE を実施したところ、施設間較差は改善され、大体 70%以上の similarity が得られるようになった。一方、北海道において、22 株の特異な表現形質を示す腸管出血性大腸菌 O157:H7 が分離された。これらの株は一夜ではソルビトールを分解しないが、 $\beta$ -グルクロニダーゼを産生した。また、本菌は典型的な O157 株と同様に *stx1&2* の他に *eaeA*、EHEC-*hlyA*、*pas*、*etpD* の遺伝子セットを保有していた。しかし、通常の O157 が保有している *katP* および *espP* についてはこれらを検出することができなかった。一方、PFGE を用いた DNA 解析では、これらの 22 株は互いに非常によく似たパターンを示し、これらの株は独立したクローンに属することが示された。このように、PFGE を実施することによって、特異な性質を持つ菌株の腸管出血性大腸菌 O157 菌全体における位置づけが可能であることが示された。

#### A. 目的

集団感染事例の発生時における迅速な感染源の究明や疫学データの蓄積等のための分子疫学手法として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）は細菌性感染症について現在もっともよく用いられている手技である。また近年、複数の自治体にまたがる広域な分散型集団発生事例（diffuse outbreak）も確認されており、詳細な疫学調査とともに菌学的特性を迅速に把握検討することによりこのような集団発生事例の早期探知を図る必要がある。そのためには全国的なネットワーク（パルスネット）の構築が不可欠である。さらに、本ネットワークが

有機的に機能するためには、各地方衛生研究所における PFGE のパターン解析が常に一定の精度で実施されなければならない。本年度は本研究事業の最終年度であり、これを機に PFGE の技術的精度の維持・向上を目的として精度管理調査を実施した。また、1996 年から 1998 年までに北海道で検出された  $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性（GUD<sup>+</sup>）の非典型的な O157 株の性状についても検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 精度管理調査

北海道で分離された O157 菌 7 株と O26 菌 3

株の 10 株 (表 1) を北海道・東北・新潟ブロックで PFGE を実施している 9 衛生研究所に送付し、北海道立衛生研究所を含む 10 衛生研究所にて PFGE を実施した。合わせて、PFGE の実施方法 (反応条件、試薬の濃度、メーカー等) に関するアンケート調査も実施した。各衛生研究所での PFGE の結果 (写真データ) を北海道立衛生研究所に送付し、同所において、PFGE データ解析ソフト「Fingerprinting II Japanese Edition」を用いて解析を行った。また、本年度は同一施設の時間変動を知る目的で 2 回の精度管理を実施した。1 回目は 6 月の下旬に菌株を送付し、7 月末日をもってデータ提出の期限とした。2 回目については、1 回目と同じ菌株を用い 12 月に実施した。

表 1 精度管理用菌株

No.	血清型	Stx 型	年齢	性別
1	O157:H7	1&2	18	女
2	O157:H7	1&2	16	男
3	O157:H7	1&2	64	男
4	O157:H7	1&2	2	女
5	O157:H7	2	93	女
6	O157:H7	2	53	男
7	O157:H7	2	53	男
8	O26:H11	1	11	女
9	O26:H11	1	?	女
10	O26:H11	1&2	1	女

## 2. $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性非典型的 O157 菌株の細菌学的性状

1996 年から 1998 年まで、北海道において分離された GUD<sup>+</sup> O157 菌株を試験に供した。生物学的性状として、ソルビトール利用能、 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生能、血清学的試験、stx 型別およびエンテロヘモリジン産生能の試験を実施した。ソルビトール利用能は、ソルビトールマッコンキー寒天培地での一夜培養にお

けるコロニーの着色の度合いで判定した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ産生能は「mEC with MUG」を用いて調べた。血清学的試験は凝集反応を用いて、エンテロヘモリジンは洗浄羊血球を用いた血液寒天培地にてそれぞれ調べた。Stx 型別は PCR および RPLA 法にて決定した。

Stx 以外の病原因子としては、PCR およびサザンハイブリダイゼーション法を用いて検索した。ターゲット遺伝子は、クロモゾーム支配としては、インチミンをコードする *eaeA* および分泌タンパク群である Esp の分泌に関与する Pas 蛋白をコードする *pas* の 2 種とし、プラスミド支配では、ラージプラスミドに存在するエンテロヘモリジンをコードする EHEC-*hlyA*、カタラーゼーベルオキシダーゼをコードする *katP*、ヒトの第 V 血液凝固因子を分解するセリンプロテアーゼをコードする *espP*、および II 型タンパク分泌経路に関与すると思われる *etp* 遺伝子群の 4 種類とした。

ゲノム DNA の解析には、*XbaI* を用いた PFGE を実施した。得られたバンドパターンはゲルコンバー II を用いて解析した。また PFGE に関しては、1996 年から 1998 年までに分離された典型的な O157 菌株についてもパターンの比較のため試験に供した。

## C. 研究結果

### 1. 第 1 回精度管理調査

#### a アンケート調査

何らかの形でキットを使用している施設は 3 施設であったが、このうち 2 施設についてはキットの使用は部分的で、自家製の試薬と併用していた。他の施設については自家調整の試薬を用いており国立感染症研究所で作成したマニュアルに準じた反応系を採用していたが、泳動条件については独自の条件を検討していた。以下、サンプル調整の個々のステップについて調べた。また個々の施設で採用されていた試薬、方法等については表 2 に示した。

### 1) 菌培養

培地は、寒天平板培地が2施設(施設 B, D)、他の8施設はブイヨン培地であった。培養時間は2施設(施設 A, B)が6時間以内、他の8施設が一夜培養であった。6時間培養の2施設は LB broth とミューラーヒントン平板を用いていた。ブイヨン培地を用いていた8施設中2施設(施設 C, G)で、静置培養を採用していた。

### 2) プラグモールドの作製

菌浮遊液については、2施設(施設 C, J)がキット添付の cell suspension buffer を用い、他の8施設は精製水を用いていた。菌濃度については、たとえば、60  $\mu\text{l}$  in 100  $\mu\text{l}$  の場合、アガロースとの混合液として 100  $\mu\text{l}$  中に菌培養液 60  $\mu\text{l}$  相当の菌を含有することを意味する。アガロースプラグ作製時の菌濃度は、最初の培養条件によっても左右され、この混合比率からだけでは一概に判断できない。包埋用アガロースについては、1施設(J)がキット添付のクリーンカットアガロースを 0.8% で用い、クロモゾーマルグレードアガロースを採用している2施設(施設 C, H)ではそれぞれ 0.7 および 0.6% の濃度であった。他の7施設は低融点アガロースで、その濃度は 0.5~1% であった。プラグモールドとしては4施設(施設 C, E, H, J)が 0.7mm 厚のサンプルプラグキャスターを採用しており、他施設はディスポーザブルのプラグモールドを用いていた。

### 3) リゾチーム処理

バイオラッドのキットを使用している施設が3施設(A, C, J)で、他の施設は自家調整であった。メーカー別では、和光純薬が4施設、バイオラッドが3施設、ロシュ、シグマ、生化学工業がそれぞれ1施設ずつであった。リゾチームの使用濃度、溶解液の組成はキットを使用

している施設を除き、すべて同一条件であったが、液量では違いが認められ、0.3ml が1施設(A)、0.5ml が3施設(C, E, J)、それ以外は 1ml であった。処理条件では、すべての施設で 37°C を採用していたが、処理時間では、1時間が1施設(C)、2時間ないしそれ以上が2施設(A, B)、その他では3時間以上であった。

### 4) プロテナーゼ K 処理

リゾチームと同様にバイオラッドのキットを使用している施設が施設(A, C, J)で、他の施設は自家調整であった。メーカー別では、ロシュが5施設、バイオラッドが3施設、GIBCO BRL、和光純薬がそれぞれ1施設であった。プロテナーゼ K の使用濃度、溶解液の組成はキットを使用している施設を除き、すべて同一条件であったが、液量ではリゾチームの場合と同様に違いが認められ、0.3ml が1施設(A)、0.5ml が3施設(C, E, J)、それ以外は 1ml であった。処理条件は、すべての施設で 50°C 一夜であった。

### 5) 洗浄

Wash buffer による洗浄が1施設(C)、1 mM の PMSF を用いている施設は5施設(和光純薬製が3施設で、シグマが2施設)で、4 mM の Pefabloc SC (ロシュ) を使用している施設は4施設であった。液量は 1 ml が4施設、0.5ml が4施設、1.5ml、1.8ml がそれぞれ1施設であった。反応温度は室温、37°C がそれぞれ1施設で、他の施設はすべて 50°C であった。処理回数では、施設 A が 30 分 1 回であったが、他施設は 2 回以上であった。施設 A については、リンスに時間と回数をかけていた。

### 6) *Xba*I による消化

処理ブロックの大きさでは、ゲルブロックの 1/6 が1施設、1/4 が2施設、1/3 が1施設、1/2 が5施設、カットしないで用いる施設が1施設

であった。*Xba*I のメーカーでは、ロシュが4施設、TaKaRa が3施設、ニッポンジーンが2施設、バイオラッドが1施設であった。酵素の濃度については、30単位が最も多く、5施設で、後は、50単位(3施設)、45単位、30~40単位がそれぞれ1施設であった。反応液の液量では、0.2ml が4施設、0.3ml、0.1ml がそれぞれ3施設で、反応時間では、一夜が5施設で、4時間以上が3施設、4時間が2施設であった。

### 7) 泳動条件

泳動装置については、全施設がバイオラッドの泳動装置を用いていたが、機種別では、CHEFF DRIII が4施設、CHEFF DRII が3施設、CHEFF mapper が2施設、GenePath System が1施設であった。泳動条件については、施設Aのみが異なった条件を採用していた。泳動ゲルの染色では、GelStar 染色、SYBR Green で染色していた施設がそれぞれ1施設、その他の施設は EtBr で染色していた。

## b 解析結果

### 1) 画像データ

各施設における泳動像を図1に示した。施設Aでは泳動条件が異なっているため、それが泳動像に反映されており、特に低分子量領域のパターンが異なっていた。施設Eでは、分子量マーカーとして用いているラムダラダーが不明瞭であった。全体的には、部分消化によると思われるバンドがいくつか認められた。50kb以下のバンドが不明瞭である傾向がみられた。また、高分子領域では、菌濃度と泳動に用いるゲル片の厚さがバンドの解像度に影響している傾向がみられ、サンプルプラグキャスターを使用している施設とディスプレイのプラグモールドを使用している施設では若干の違いが見られた。

### 2) 施設毎の各菌株の比較

解析条件は、類似性係数を Dice、デンドログラムタイプを UPGMA、バンド比較の tolerance を 1.2%で行った。各施設の株間におけるデンドログラムを図2に示した。今回の精度管理用菌株には O157 を7株と O26 を3株用いたが、10施設とも O157 と O26 はそれぞれ異なったクラスターとしてグループ化されていた。O157 菌株内でデンドログラムを詳細に比較すると、それぞれの施設でそのデンドログラムは異なっていた。しかし、9施設で菌株1, 3, 6, 7の4菌株が近似グループに入っていた。施設Dでは、菌株3, 4, 6, 7が近似し、菌株1はそれに隣接していた。もっとも similarity の低い菌が菌株5である施設は A, B, D, G, I の5施設、菌株4, 5である施設は C, 菌株2, 5である施設は E, H の2施設、菌株2である施設は F, J の2施設であった。

### 3) 菌株毎の各施設の比較

施設間における菌株毎のデンドログラムを図3に示した。tolerance を 1.2%にとると、similarity が 80%を超えたのは菌株10(80.92%)の1例のみで、70%を超えたのは菌株4, 5, 6, 7, 8の5例、他の4菌株は50%代であった。この中で、90%以上の similarity を示した施設数はそれぞれ菌株1で5施設、菌株2で6、菌株3で7、菌株4で7(9施設中)、菌株5で4、菌株6で8、菌株7で8、菌株8で7、菌株9で6、菌株10で8施設であった。このように、半数近く、菌株によっては8割が90%以上の similarity を示した。一方、tolerance を 3%にとると、菌株8(79.54%)を除いたすべての菌株において80%以上の similarity を示した。施設AとEが極端にはずれるケースが多かったが、その理由はきわめて明確である。すなわち、施設Aについては泳動条件が異なっているために normalization の限界を超えており、最上部のバンド認識は写真の上端に相当する。これは通常実施している解析では

normalization 前に削除できるバンド認識であるが、この場合は削除できなかった。施設 E については、ラムダラダーのマーカースバンドが不明瞭で、解析時においても低分子量の 2, 3 本しかそのバンドの位置を特定することができず、そのためゲルの normalization に不備が生じたためであった。

#### 4) 全体での比較

通常の比較条件である tolerance を 1.2%にとると、比較的良好にグループ化されていた O26 株でさえも、それぞれの株がクラスターとして 1つのグループには入らなかった。O157 株では、菌株 2, 5, 6 が比較的グループ化されていたが、他の株は同一グループには入らなかった (図 4)。tolerance を 3%にとると、O26 の 3 株はそれぞれがクラスターとして分かれた。しかし、O157 菌株については、1.2%の tolerance の結果と比較すると改善されてはいるものの、完全にはグループ化されなかった (図 5)。そこで、乖離の原因が明らかな 2 施設を除いて 8 施設で解析すると、1.2%の tolerance でも、O26 の 3 株、O157 では菌株 5, 6, 7 の 3 株がそれぞれ同一グループとしてグループ化された (図 6)。

## 2. 第 2 回精度管理調査

2 回目の精度管理は 1 回目と同じ菌株を用い、12 月に実施した。1 回目のアンケート調査の結果をもとに試行マニュアルを作成し (図 7)、基本的にそれに基づいて PFGE を実施した。今回の泳動像 (図 8) を比べると、前回みられた、泳動条件の違いによる極端なパターンの違いは認められなかった。またバンドの濃度についても均一であったが、部分的に未消化バンドが散見された。

菌株毎の施設間における similarity を解析し、その結果を図 9 に示した。トレランスは 1.2% と 3%とした。1.2%のトレランスでは 60%代の

similarity を示したのは 2 菌株、80%代では 1 菌株、他の 7 菌株は 70%代であった。トレランスを 3%にとると、ほとんどの菌株で 90%代の similarity を示した。1 回目の精度管理と 2 回目の精度管理の菌株毎の similarity を表 3 にまとめた。各菌株の similarity を比較すると、2 回目の方が改善されていることが示された。

次に、施設毎の PFGE パターンを 1 回目と 2 回目についてトレランス 1.2%で比較し、その結果を図 10 に示した。同一菌株を 2 回泳動しているため、理想的には、100%の similarity を示す株が 2 つずつ並んだデンドログラムができるはずである。この形に最も近いデンドログラムを示したのは施設 G であった。ここでは、4 菌株において 100%の similarity を示した。他の施設でも少数の菌株で 100%の similarity が認められた。このように、100%の similarity を示す菌株は少なかったが、大部分の菌株において 90%以上の similarity を示した。

全施設の PFGE データについてのデンドログラムを図 11 (トレランス 1.2%) と図 12 (トレランス 3%) に示した。今回は 1.2%のトレランスでも、比較的良好にグループ化されていた。O26 である菌株 8, 9, 10 と O157 株とは区別されていたが、3%のトレランスでは、O26 株と O157 株の区別が曖昧になった。これはバンド認識の許容範囲を広くとりすぎているためであると思われる。

## 3. $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性 O157 菌株の性状

1996 年に千歳市で発生した O157 感染事例における原因菌が  $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性 (GUD<sup>+</sup>) の O157 であることが判明し、以来、北海道では 1998 年までに表 4 に示した 22 株の非典型的な O157 菌が分離されている。本菌の生化学性状の特徴として、GUD<sup>+</sup>以外には、ラムノースを発酵することがあげられるが、ドイツで分離されている GUD<sup>+</sup>株のように一夜

でソルビトールを分解することはなかった。また、これらの株はエンテロヘモリジンを産生した。病原因子については表5に示したプライマーを用いたPCRにて検出した。*stx*型は*stx1&2*で、*eae*型はγ1、*pas*遺伝子を保有し、プラスミド上にはEHEC-*hly*と*etpD*が認められたが、*katP*、*espP*は認められなかった。

これらのGUD<sup>+</sup>株は特徴的なPFGEパターンを示し、典型的なO157株とは区別された。図13に示したPFGEパターンにみられるように、GUD<sup>+</sup>株同士では非常によく似たパターンを示した。また、サザンハイブリダイゼーションによって*stx1*および*stx2*遺伝子を含むバンドについても同じ位置であることが示された。さらに、1996から1998年までに北海道で分離されたO157菌株のPFGEパターンについてのデンドログラムを作成すると(図14)、GUD<sup>+</sup>株が一つのグループを形成していることが判明した。

#### D. 考 察

パルスネットの構築あたり、各地方衛生研究所においてPFGEを実施しその結果を施設間で比較するためには、均質なPFGEパターンが得られなかつそのパターンを同じように解析する必要がある。そのためには、PFGEの実施には統一したマニュアルが必要であり、定期的な技術研修も有意義であるかもしれない。今回は統一マニュアルの作成に当たりその資料とするためのアンケート調査を実施するとともに、PFGEに関する2回の精度管理を行った。

アンケート調査の結果からは、大多数の施設が自家製の試薬を採用しておりキットを使用している施設は少数であることがわかった。PFGEパターンに影響を与えると思われるプラグモールドでは、10施設中4施設で0.7mm厚のサンプルプラグキャスターを使用していたが、6施設ではディスポーザブルのプラグモールドを採用していた。どのプラグモールドを用

いるかによってバンドの太さに違いが生じ、それによってバンドパターンの解像度に影響があらわれる。近接したバンドが2本のバンドと認識されるか、一本の太いバンドと認識されるかはバンドパターンの解析を行うにあたって重要な要素となる。従って、今後、どのプラグモールドを採用するかを統一するか、あるいはゲル片の厚さを統一する必要がある。

1回目の精度管理では、情報の統一性が不足しており泳動条件も統一されていなかった。そのため、極端な泳動パターンの違いが認められた施設もあり、解析を行う際にその違いを吸収することができなかった。バンドの濃度にも差があり、さらにはマーカーバンドの濃度にも不均一性が認められ、施設間における較差は若干高めであった。2回目の精度管理では図7に示した試行マニュアルを作成し泳動条件などの基本的な方法の統一化が図られた。その結果、泳動パターンの均一化が認められ、施設間較差も縮まり従って施設間における similarity も高まった。このことは、統一化されたマニュアルがあり、しっかりとしたPFGE技術が備わっていれば、ネットワークの構築は可能であることを示している。

いくつかの例において、1.2%と3%のトレランスを用いた場合のデンドログラムを比較した。1.2%のトレランスで作成したデンドログラムはバンドの相似性の許容範囲が厳しく、菌株の同一性を吟味する際には有力な手法であると思われた。また、3%のトレランスでは、視覚的なクラスターとデンドログラムが一致するように思われたが、各バンドの同一性を議論するには許容範囲が広すぎる感があり、実用的ではなかった。

一方、本年度の報告として、北海道で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 GUD<sup>+</sup>株の菌学性状を取り上げた。ドイツでもGUD<sup>+</sup>株が多く分離されているが、ソルビトールの発酵性において北海道の分離株と異なっている。プラ

スミド上の病原因子をコードしている遺伝子について、通常の GUD<sup>-</sup> O157 菌株は EHEC-*hlyA*, *etpD*, *katP*, *espP* の 4 種類のセットを保有しているが、GUD<sup>+</sup> 株は *katP*, *espP* の 2 つを欠いていた。このプラスミド上の病原因子をコードする遺伝子セットはドイツでの分離株と一致していた。また、これらの GUD<sup>+</sup> 株は特徴的な PFGE パターンを示し、他の典型的な O157 菌株とは区別された。このことから、GUD<sup>+</sup> 株は独立したクローンを形成していることがわかった。このように、O157 グループ全体におけるサブクローンの位置づけを考える場合、PFGE は非常に有力なツールになることが示された。

#### E. 結論

第一回精度管理調査：PFGE の方法に関するアンケート調査によって、多数の施設が自家製の試薬を用い PFGE を実施していることが分かった。また、PFGE の方法を統一しなかったため、施設間較差が認められ、同一菌株を比較したときの similarity はそれほど高くはなかった。

第二回精度管理：1 回目のアンケート調査をもとに試行マニュアルを作成し、基本的にこれに則って PFGE を実施したところ、その泳動パターンが改善され、施設間較差が縮まり similarity も高くなった。同一施設における 1 回目と 2 回目との比較では、100% の similarity が得られた施設は少なかったものの、おおむね 90% 以上の similarity を示していた。

GUD<sup>+</sup> O157 菌株の菌学特性：北海道で分離されたこれらの 2 2 菌株における病原因子の保有状況では、プラスミド上の遺伝子組成が異なっており、GUD<sup>-</sup> O157 にはみられる *katP*、*espP* は、GUD<sup>+</sup> 株では認められなかった。また、PFGE 解析において、これらの GUD<sup>+</sup> 株は独立したクローンであることが示された。

このように、PFGE の疫学調査における有用

性と利便性が示されたが、全国的なレベルでの比較が可能となるパルスネットは今後さらに重要性が増すものと思われる。

#### F. 協力研究者

北海道立衛生研究所：長野秀樹、熊田洋行、若森吉広

札幌市衛生研究所：広地敬広

青森県環境保健センター：大友良光

秋田県衛生科学研究所：八柳潤、齋藤志保子

岩手県環境保健研究センター：佐藤卓

山形県衛生研究所：大友勝実

宮城県保健環境センター：齋藤紀行

仙台市衛生研究所：齋藤卓哉、牛水真紀子

福島県衛生研究所：須釜久美子、長沢正昭

新潟県保健環境科学研究所：佐々木寿子、不二崎順二

#### G. 研究発表

1. Nagano, H., Okui, T., Fujiwara, O., Uchiyama, Y., Tamate, N., Kumada, H., Morimoto, Y., Yano, S. Clonal structure of shiga toxin (Stx)-producing and  $\beta$ -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan. *J. Med. Microbiol.* 2002. 51:405-416.



表2 アンケート調査の結果

1. 菌培養

施設	培地	温度	時間	振盪
A	LB broth (5 ml)	37°C	5-6 時間	あり
B	MH 平板	37°C	4-6 時間	-
C	TSB	37°C	overnight	なし
D	トリプトソイ寒天平板	37°C	18-24 時間	なし
E	HI ブイヨン	37°C	overnight	あり
F	TSB	37°C	overnight	あり
G	TSB	37°C	overnight	なし
H	BHI	37°C	18 時間	あり
I	乳糖ブイヨン	36.5°C	18 h	あり 110rpm
J	LB broth (1 ml)	37°C	overnight	あり

2. プラグモールドの作製

施設	菌浮遊液	菌濃度	包埋用アガロース	モールド	固化条件
A	滅菌水	60ul in 100ul	LMP (B-R), 0.55%	Plug mold (B-R)	4°C15 分
B	滅菌精製水	マックフアラーランド #3-5	LMP (B-R), 0.5%	Plug mold (B-R)	4°C15 分以上
C	Cell suspension buffer <sup>a)</sup>	100 ul in 140 ul	CGA (B-R), 0.7%	サンブルプラグキャスター-0.7mm	4°C20 分
D	DW	マックフアラーランド #3	LMP (B-R), 0.5%	Plug mold (B-R)	4°C20 分
E	精製水	70 ul in 400 ul	LMP (B-R), 0.5%	サンブルプラグキャスター-0.7mm	4°C30 分
F	MilliQ 水	70 ul in 400 ul	LMP (B-R), 0.5%	Plug mold (B-R)	4°C20 分
G	超純水 (PBS で洗浄)	100ul in 400ul	LMP (B-R), 1%	Plug mold (B-R)	氷上 20 分
H	滅菌蒸留水 (滅菌蒸留水で洗浄)	150ul in 300 ul	CGA (B-R), 0.6%	サンブルプラグキャスター-0.7mm	氷上 30 分
I	水	200ul in 400ul	LMP (B-R), 1%	Plug mold (B-R)	氷上 20~30 分
J	Cell suspension buffer <sup>b)</sup>	70ul in 300ul	CleanCut agarose <sup>b)</sup> , 0.8%	サンブルプラグキャスター-0.7mm	4°C10 分

LMP; low melt preparative grade agarose, CGA; chromosomal grade agarose

a) GenePath 試薬キット (B-R)

b) CHEF bacterial DNA plug kit (B-R)

表2 アンケート調査の結果 (続き)

3. リゾチーム処理

施設	メーカー名	濃度	液量	溶解液	処理温度時間	処理後のリンス
A	B-R	Lysozyme 溶液 <sup>a)</sup> 12ul	0.3 ml	Lysis buffer <sup>a)</sup>	37°C、2時間	1 x wash buffer 1ml
B	和光純薬	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C 2時間以上	
C	B-R	Lysozyme 溶液 <sup>a)</sup> 20 ul	0.5 ml	Lysis buffer <sup>a)</sup>	37°C 1時間	
D	和光純薬	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C3時間以上	
E	ロシュ	1 mg/ml	0.5 ml	0.5 M EDTA	37°C4時間以上	
F	シグマ	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C3時間以上	
G	生化学工業	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C3時間	
H	和光純薬	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C3時間以上	
I	和光純薬	1 mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA	37°C3時間	
J	B-R	Lysozyme 溶液 <sup>b)</sup> 20 ul	0.5 ml	Lysis buffer <sup>b)</sup>	37°C3時間以上	なし

a) GenePath 試薬キット (B-R)

b) CHEF bacterial DNA plug kit (B-R)

4. プロテナーゼ K 処理

施設	メーカー名	濃度	液量	溶解液	処理温度時間	処理後のリンス
A	B-R	ProteinaseK 溶液 <sup>a)</sup> 12ul	0.3 ml	Proteinase K buffer <sup>a)</sup>	50°C16-20時間	1 x wash buffer 1.5ml RT 30分
B	ロシュ	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight	
C	B-R	ProteinaseK 溶液 <sup>a)</sup> 20 ul	0.5 ml	Proteinase K buffer <sup>a)</sup>	50°C overnight	
D	ロシュ	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight	
E	GIBCO BRL	1mg/ml	0.5 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight	
F	ロシュ	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight (振湯)	
G	ロシュ	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight	
H	和光純薬	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C 8時間	
I	ロシュ	1mg/ml	1 ml	0.5 M EDTA, 1% Sarkosyl	50°C overnight	
J	B-R	ProteinaseK 溶液 <sup>b)</sup> 20 ul	0.5 ml	Proteinase K buffer <sup>b)</sup>	50°C overnight	なし

a) GenePath 試薬キット (B-R)

b) CHEF bacterial DNA plug kit (B-R)

表2 アンケート調査の結果 (続き)

5. プロテナーゼ K のブロック

施設	試薬	濃度	液量	温度	処理時間・回数	処理後のリンス
A	PMSF (和光純薬)	17.5 mg/ml (1.3 mM)	1.5 ml	室温	30分・1回	1x wash buffer 1 ml 室温 30分 2回, 0.1x wash buffer 0.5 ml 室温 30分 1回
B	PMSF (シグマ)	1 mM	1 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 1 ml 30分 1回
C	Wash buffer <sup>a)</sup>	1 x	1 ml	37°C	3回/hr	0.1 x wash buffer 1 ml 37°C 1時間
D	PMSF (シグマ)	1 mM	1 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 1 ml 30分 1回
E	PMSF (和光純薬)	1 mM	0.5 ml	50°C	30分・2回	TE buffer 0.5 ml 4°C 30分 1回
F	Pefabloc SC (ロシユ)	4 mM	0.5 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 1 ml 30分 2回
G	Pefabloc SC (ロシユ)	4 mM	0.5 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 1 ml 30分 1回
H	Pefabloc SC (ロシユ)	4 mM	0.5 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 0.5 ml 30分 1回
I	PMSF (和光純薬)	1 mM	1.8 ml	50°C	30分・2回	氷冷 TE buffer 1.8 ml 30分 1回
J	Pefabloc SC (ロシユ)	4 mM	1 ml	50°C	30分・2回	TE buffer 1 ml 室温 1回

a) GenePath 試薬キット(B-R)

6. XbaI 処理

施設	処理ブロックの大きさ	平衡化	メーカー名	濃度	液量	処理温度時間
A	約 45 ul	NEBuffer2 0.5 ml RT 30分	ニッポンジーン	30 U	0.3 ml	37°C 4時間 (振盪)
B	1個、90 ul	0.5 ml 氷冷 30分	ニッポンジーン	30 U	0.3 ml	37°C 4時間以上
C	1/4、約 35 ul	0.5 ml XbaI buffer 37°C 1時間	B-R	50 U	0.3 ml	37°C overnight
D	1/3、約 30 ul	0.1 ml 氷冷 30分	TaKaRa	30 U	0.1 ml	37°C 4時間~overnight
E	1/2、70 ul	0.2 ml 4°C 30分	TaKaRa	30~40 U	0.2 ml	37°C overnight
F	1/2、約 37 ul	0.2 ml 氷上 30分	ロシユ	30 U	0.1 ml	37°C overnight (振盪)
G	1/2、45 ul	0.2 ml 氷上 30分	ロシユ	30 U	0.1 ml	37°C overnight
H	1/6、20 ul	0.2 ml 氷上 30分	ロシユ	50 U	0.2 ml	37°C 4時間以上
I	1/2、75ul/2	1 ml 氷上 30分	TaKaRa	45 U	0.2 ml	37°C 4時間
J	1/4、約 35 ul	0.3 ml H buffer RT 30分	ロシユ	50 U	0.2 ml	37°C overnight

表2 アンケート調査の結果 (続き)

7. 泳動

施設	泳動装置	アガロース	泳動条件	染色
A	CHEFF DRIII (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 10 °C, 4-8 s 11 h, 8-50 s 9 h	0.1-0.2 ug/ml EtBr RT 40 分、水洗 10 分 1 回
B	CHEFF DRII (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 60 分、水洗 20 分以上 1 回
C	CHEFF DR III (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	GelStar 染色 (BMA) 10,000X 室温 30 分、RO 水で洗浄 1 時間 1 回
D	GenePath System (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 15 分、水洗 30 分 1 回
E	CHEFF mapper (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml ETBr RT 30 分、水洗 30 分 1 回
F	CHEFF DRIII (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 30 分、水洗 1 時間 2 回
G	CHEFF DRU (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 30 分、水洗 10 分 2 回、20 分 2 回
H	CHEFF DRU (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 30 分、水洗 30 分 2 回
I	CHEFF mapper (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	SYBR Green 1 nucleic acid gel stain, BMA
J	CHEFF DR III (B-R)	1% PFC agarose (B-R)	6 V/cm, 0.5x TBE, 14 °C, 4-8 s 9 h, 8-50 s 13 h	0.5 ug/ml EtBr RT 30 分、水洗 30 分 2 回

8. 画像の取り込み

施設	撮影装置	UV 装置	画像のデジタル化
A	Mamiya RB67、フジ FP-3000P		
B	ボラロイドカメラ、667 フィルム	280nm トランスイルミネーター	デジカメ (フジフィルム FinePix700)
C	ボラロイドカメラ: ATTO、667 フィルム	312nm トランスイルミネーター: ATTO	スキャナー (JPEG)
D	ボラロイドカメラ、667 フィルム	302 nm トランスイルミネーター	FAS-III mini + DF20 (TOYOBO)
E	ボラロイドカメラ、667 フィルム	312nm トランスイルミネーター	スキャナー (TIFF)
F	ボラロイドカメラ、667 フィルム	302 nm トランスイルミネーター	スキャナー
G	ボラロイドカメラ、667 フィルム	312nm トランスイルミネーター	
H	アサマカメラ、フジ FP3000 フィルム	302nm 3UV™ トランスイルミネーター(フナコシ)	
I	ボラロイドカメラ、667 フィルム	トランスイルミネーター	
J	ボラロイドカメラ、フジ FP3000 フィルム	312nm トランスイルミネーター	スキャナー (PFU)

图1—1 Figure of PFGE analysis

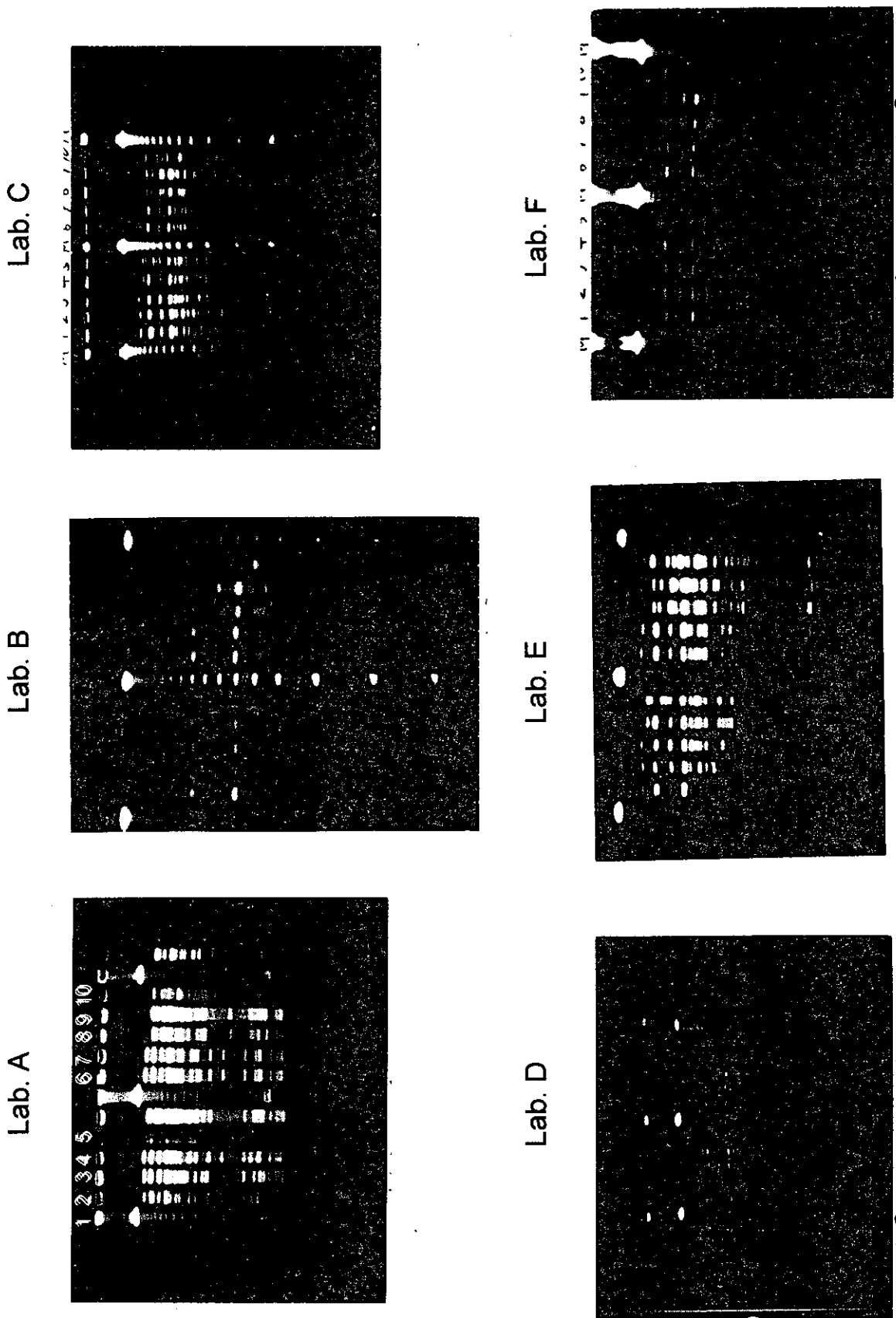
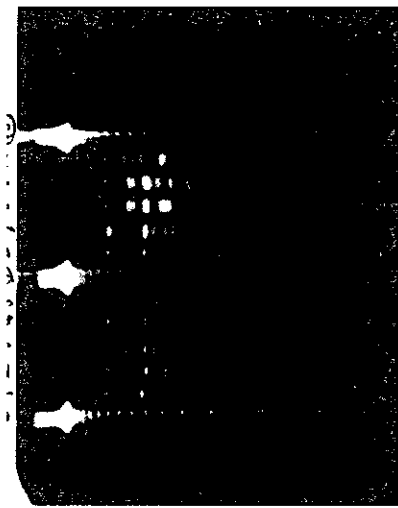


图1—2 Figure of PFGE analysis

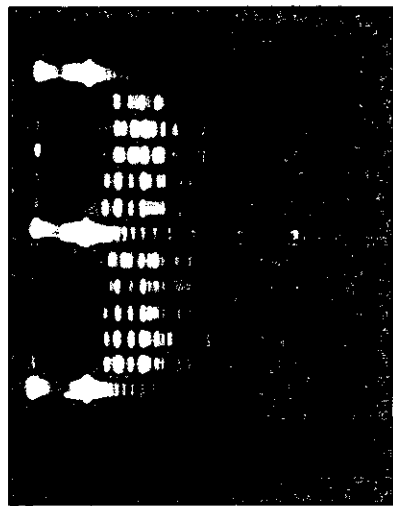
Lab. G



Lab. H



Lab. I



Lab. J

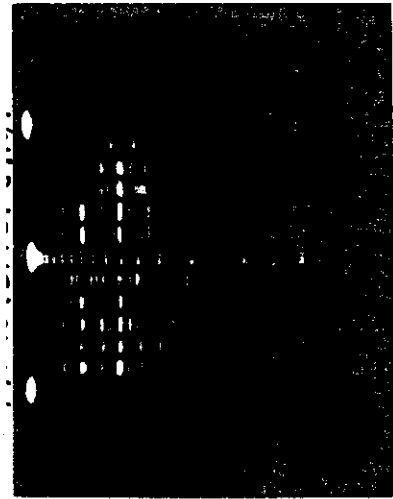
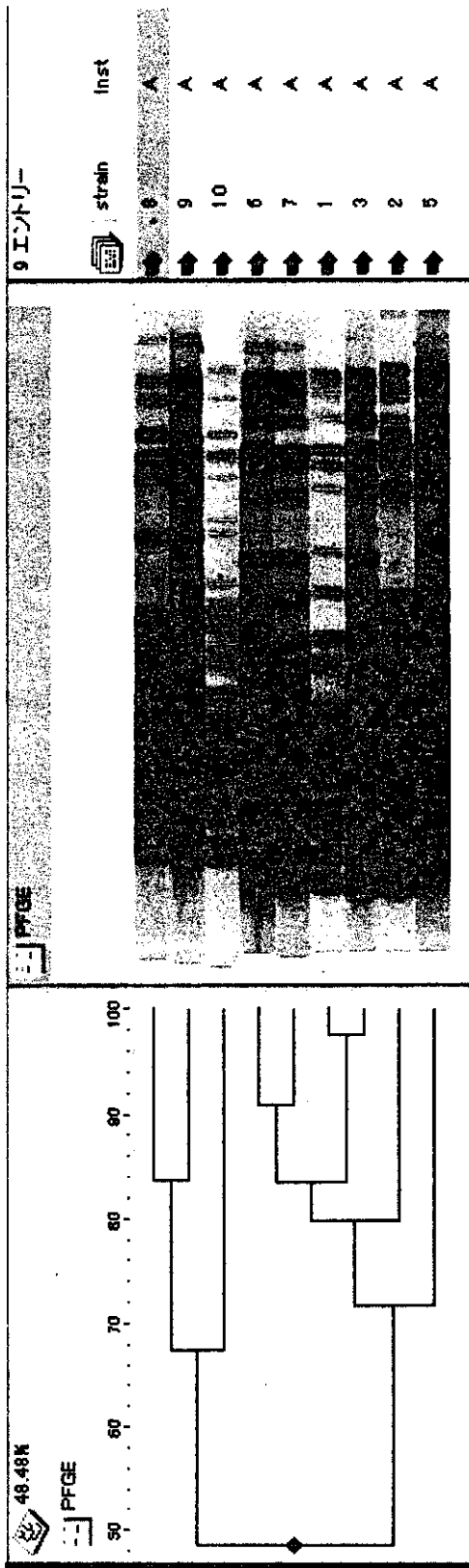


図2-1 各施設における株間の比較

Lab. A



Lab. B

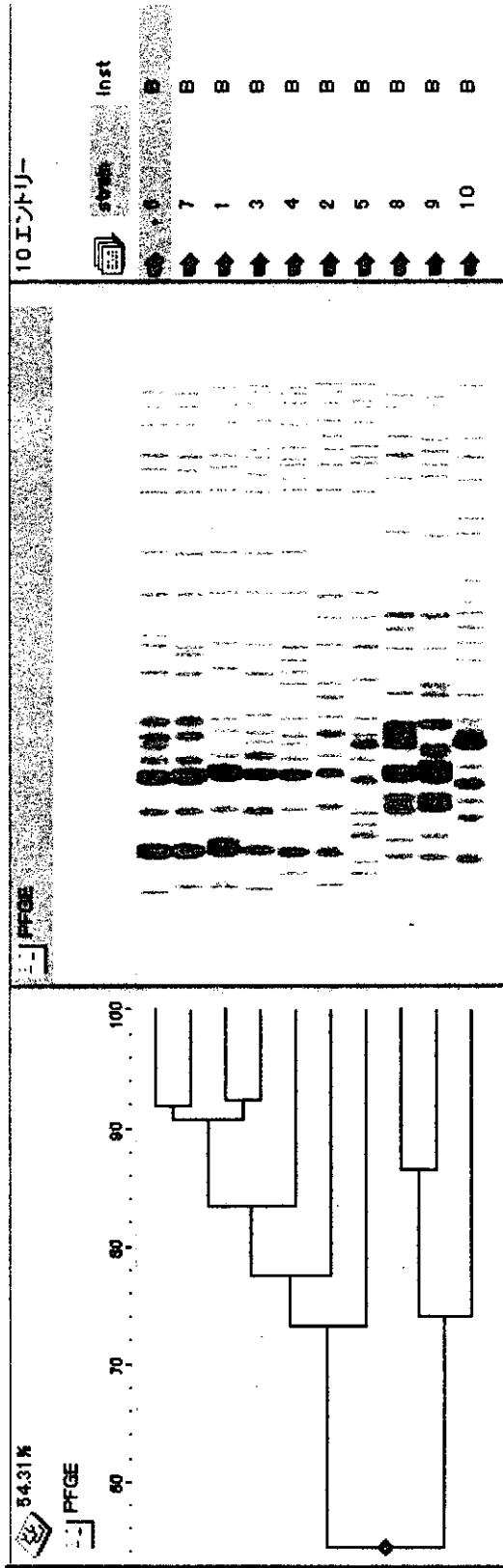
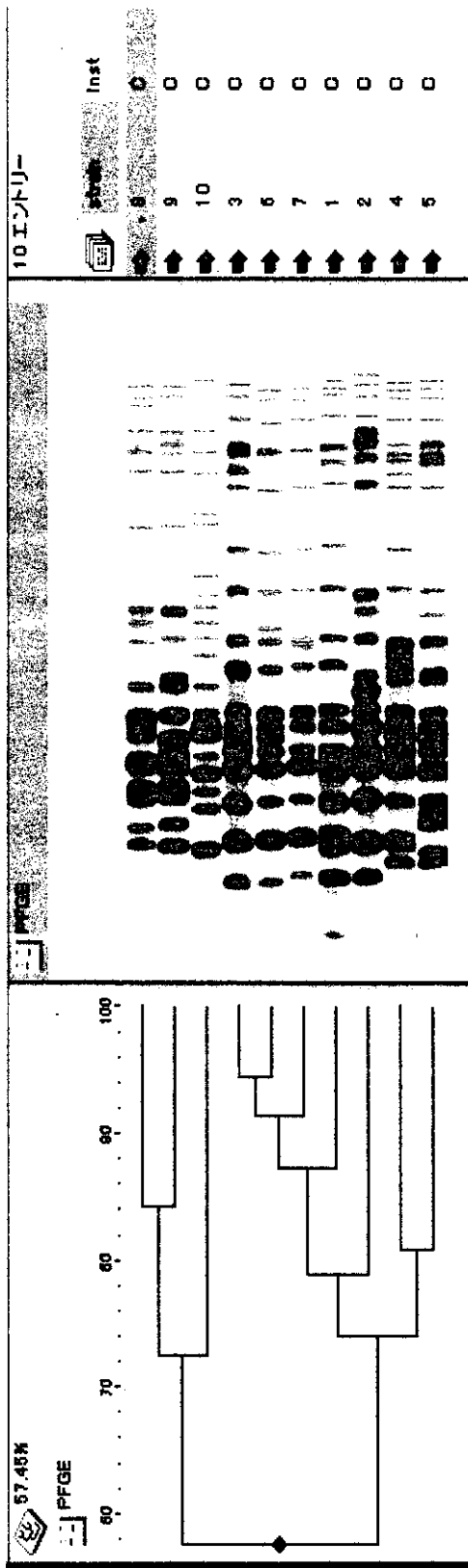


図2-2 各施設における株間の比較

Lab. C



Lab. D

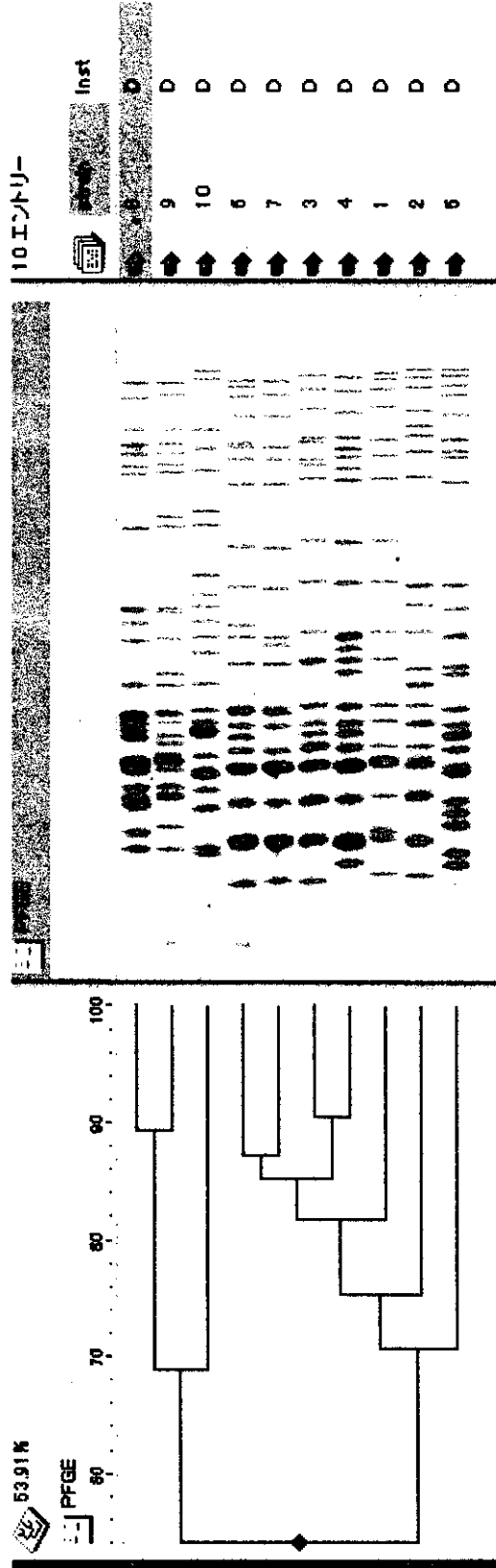
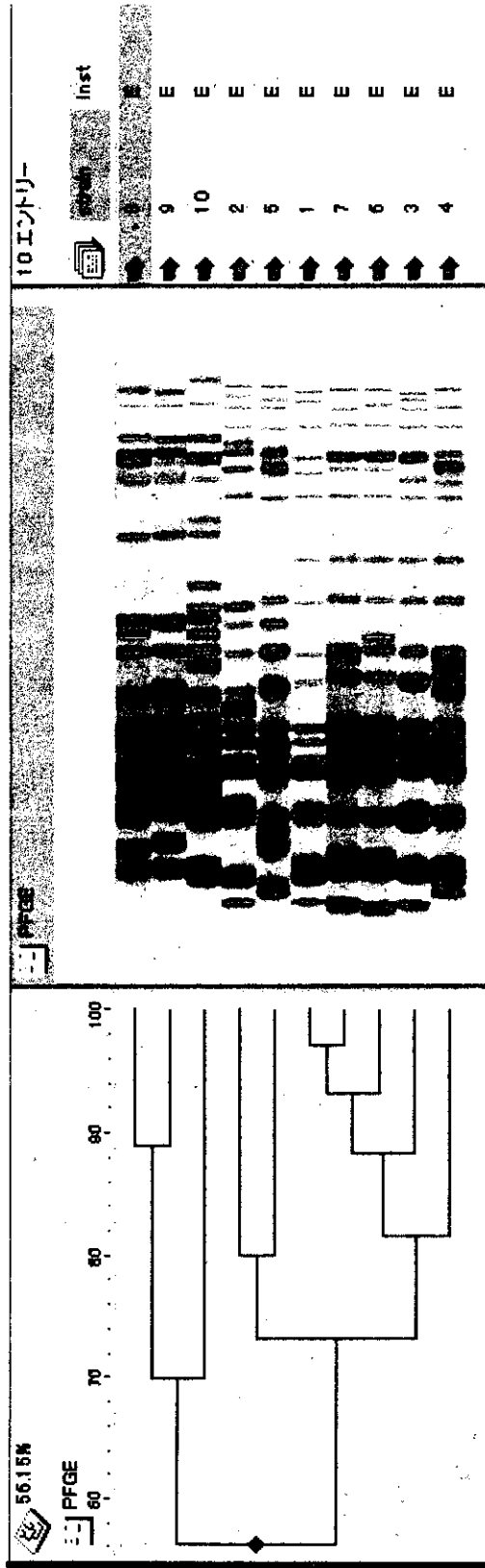




図2-3 各施設における株間の比較

Lab. E



Lab. F

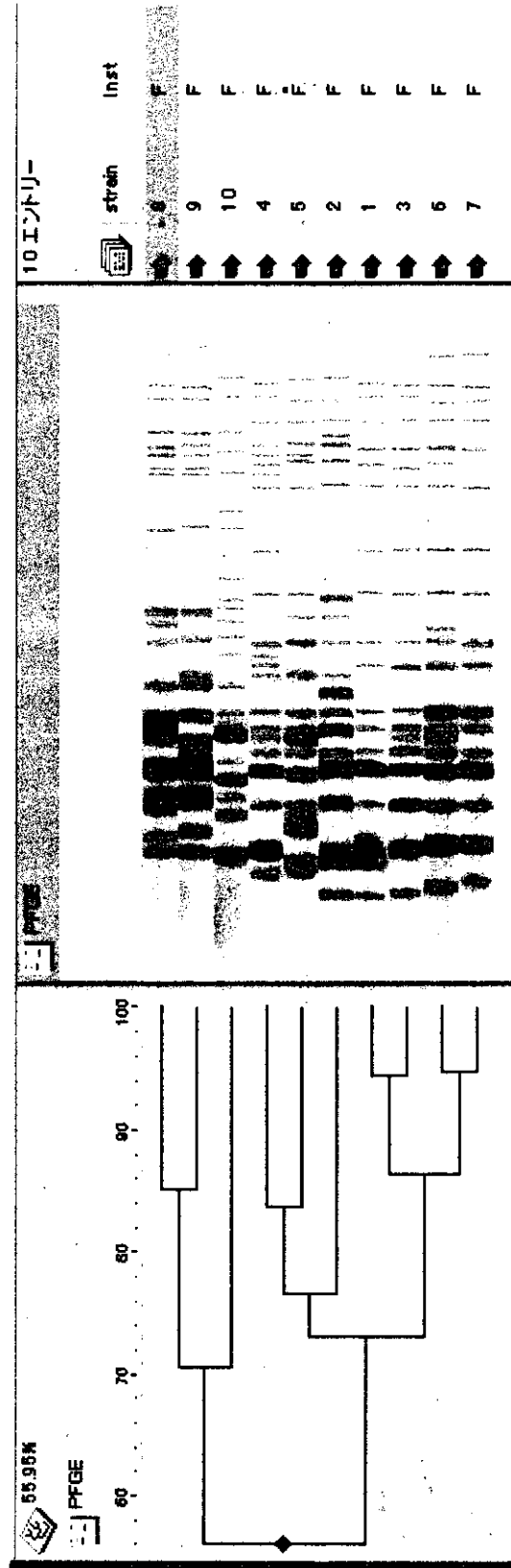
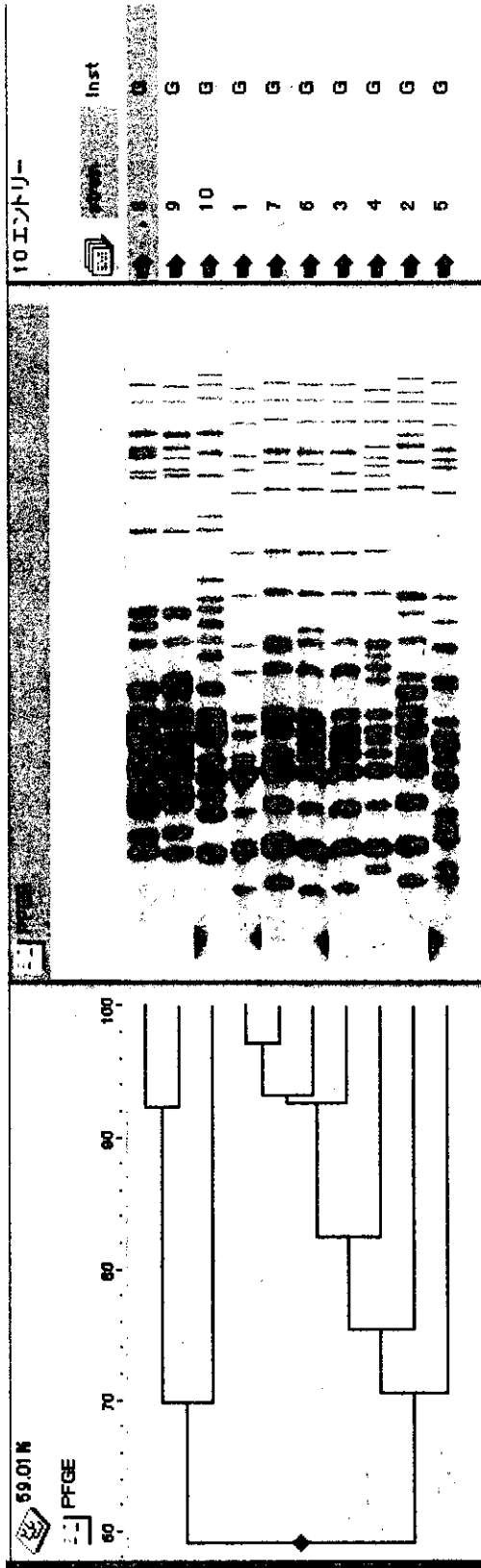


図2-4 各施設における株間の比較

Lab. G



Lab. H

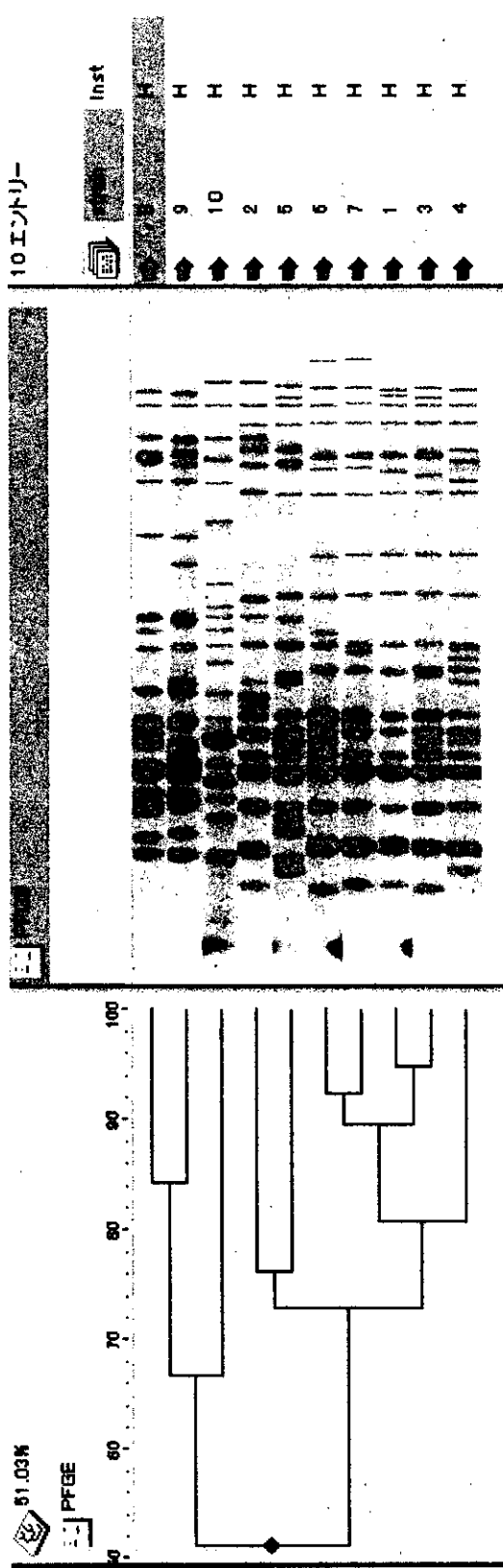
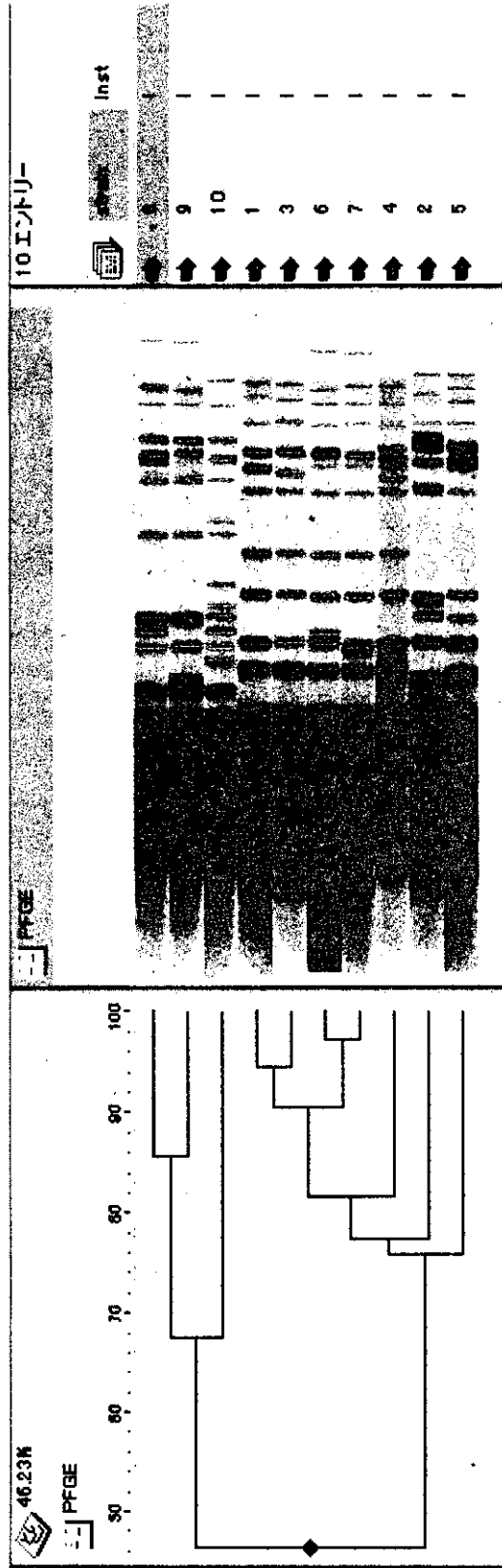


図2-5 各施設における株間の比較

Lab. I



Lab. J

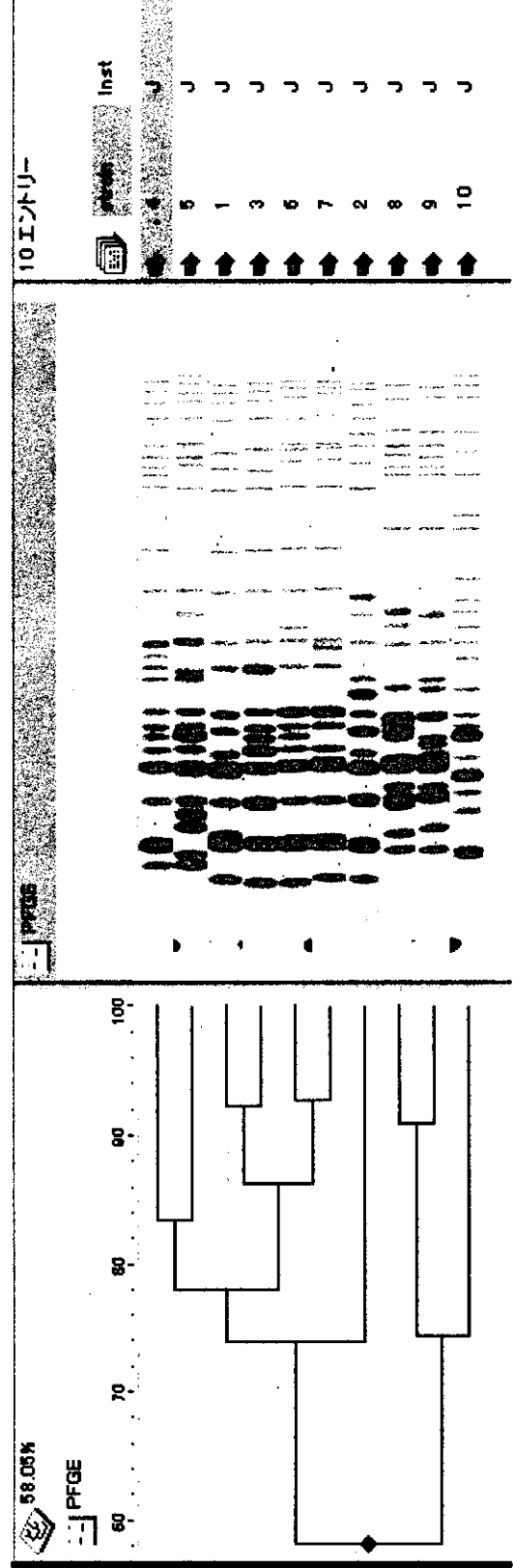
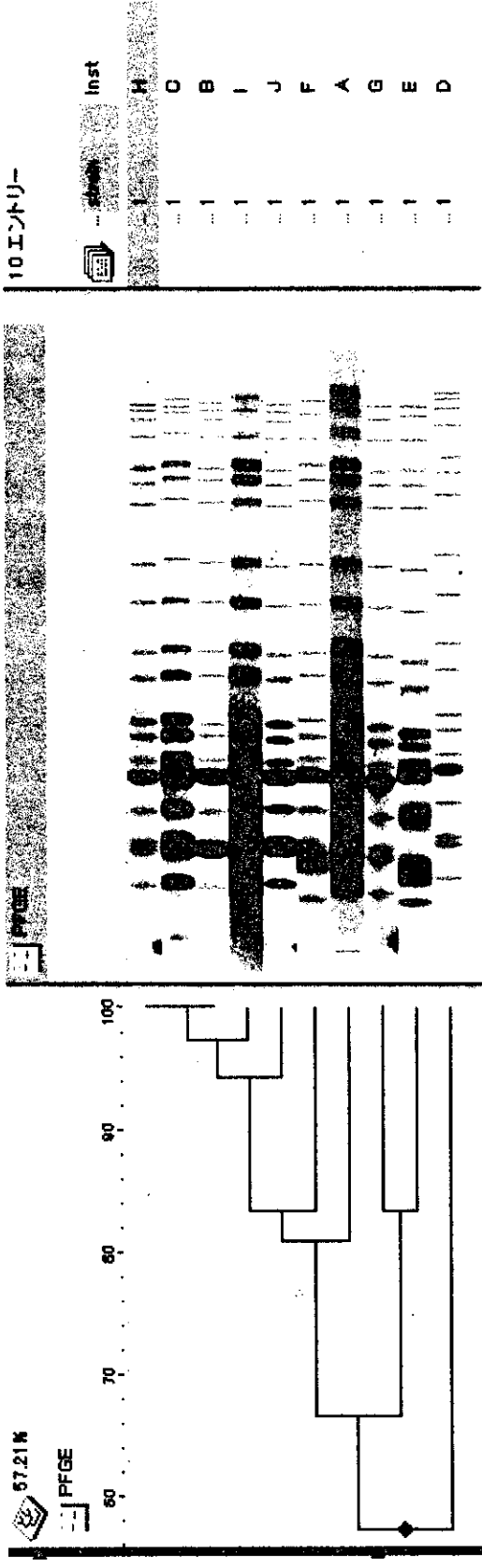


図3-1 菌株における施設間の比較

菌株 1/ tolerance 1.2%



菌株 1/ tolerance 3%

