

⑭製造全卵液卵

1) 薬剤感受性試験

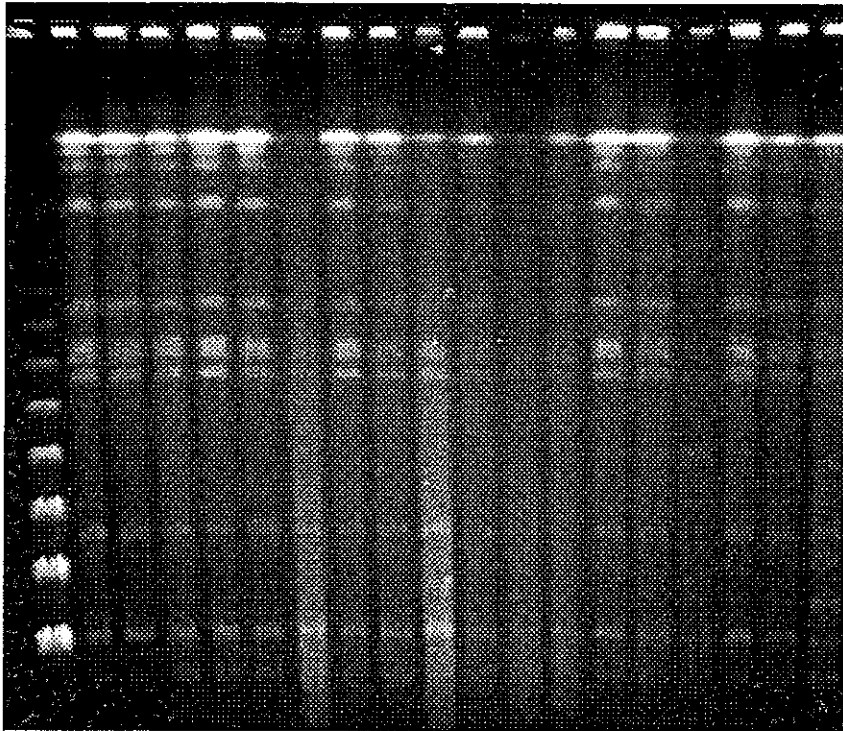
上記のうち①～⑦の患者株と、⑪、⑮の計9株についてセンシディスク法により12薬剤 (CTX, KM, CFX, TC, SM, ABPC, TMP, ST, CP, GM, NA, FOM) の薬剤感受性試験を行ったところ、いずれの菌株も12薬剤全てに感受性で阻止円のパターンも同様であった。

2) PFGE パターン解析

⑯の株を除く17株について、制限酵素 *Bln* I 処理後に PFGE を行ったところ、泳動パターンは全て同様であった。(⑯は前年の集団発生事例患者由来株)

*患者株は検体搬入順になっているため順不同

M ⑥ ⑦ ② ③ ④ ① ⑤ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑰ ⑱ ⑲



補足：近年、本県の食中毒事件で分離される *S. Enteritidis* 株は *Bln* I 処理による PFGE パターンが似通る傾向がある（昨年や一昨年に別々の管内で発生した集団事例株の PFGE パターンもこれと同様であった）。原因食品の原材料等何処かに同一の起源があるとも考えられ、今後調査が必要と思われる。またバンド本数が比較的少ないこともやや不安な点である。

事例3 (但し、何度やっても PFGE がうまくいかない傾向があり、バンド本数も少ないため、あまり PFGE が有効な事例ではなかった。)

発生日時：平成14年8月19日

発生場所：静岡県中部の宿泊施設

原因物質：*S.Saintpaul*[O4 : e,h : 1,2]

発生の概要：8月16日および17日に当該旅館に宿泊し飲食した88グループ495人中22人が、19日午前8時から下痢、腹痛、発熱等の症状を示した。

検査の経過：他県の患者株もあわせ、以下の由来の菌株について検査を行った。

(食品からの菌分離はなし)

①静岡県志太榛原保健所管内 患者便

②愛知県豊田市 患者便

③福井県 患者便

④東京都 患者便

⑤東京都 患者便

⑥東京都 患者便

⑦静岡市 患者便

⑧調理従事者 (No.31) 便

⑨調理従事者 (No.35) 便

⑩調理従事者 (No.49) 便

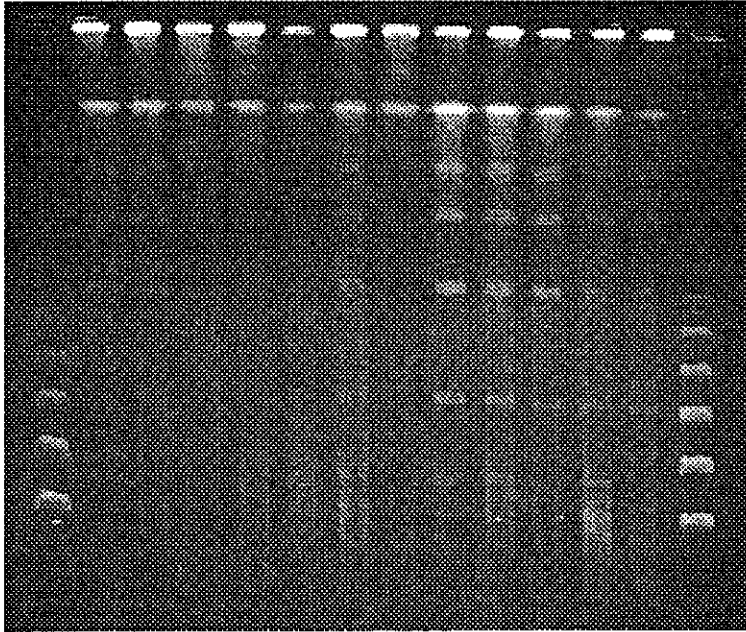
1) 血清型はデンカ生研の免疫血清により全て、*S.Saintpaul*[O4 : e,h : 1,2]と判別された。

2) 薬剤感受性試験

上記10株についてセンシディスク法により12薬剤 (CTX, KM, CPF, TC, SM, ABPC, TMP, ST, CP, GM, NA, FOM) の薬剤感受性試験を行ったところ、全ての薬剤に感受性であり阻止円のパターンも同様であった。

3) 上記の10株を用い、制限酵素 *Bln I* 処理後に PFGE を行ったところ、患者株と調理従事者株の PFGE パターンは同一であった。

M ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ M



⑪静岡県志太榛原保健所 患者便 (①と全く同じ時期に発生の散発株)

⑫1999年散発患者便

分担研究・東海・北陸地方4地方衛生研究所による腸管出血性大腸菌 O26
を用いたパルスネットのための予備試験

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
分担研究者 田中大祐 富山県衛生研究所

研究要旨

平成15年度から実施される O157 パルスネット(通称パルスネットジャパン)の予備試験として愛知県で検出された4株の異なったパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型の O26(ただし2株は同一株)について愛知県、岐阜県、石川県及び富山県の各地方衛生研究所(地研)で PFGE を実施し、その画像をメールで愛知衛研に電送した。愛知衛研では得られた画像について目視及び解析ソフトを用いて解析を行なった。

その結果、目視及び解析ソフトを用いた解析から、得られた PFGE の画質は検体の PFGE 型が同一か否かの判別には充分であることが明らかとなった。一方、目視による各検体間のバンド本数の違い及び解析ソフトによる各検体間の相同性は各地研で異なっており、詳細な解析にはより質の高い PFGE 画像が必要であると思われた。さらに、解析ソフトを用いて同一検体の PFGE 画像を各地研で比較したところ、最も相同性が高い検体で 78%、最も低い相同性では僅か 16%であった。この原因を検討するために各地研の溶菌過程、制限酵素処理の比較検討を行なったが、PFGE の画質に直接影響を及ぼすような条件の相違は認められなかった。そこで PFGE 機種の違い、前述の過程の前及び後過程であるブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへ挿入するブロックの厚さについて検討を加えた。その結果、PFGE 機種の統一、適切な菌液濃度(1ブロック当たり約 5.0×10^7)及びブロックの厚さ(約 0.7 mm)によって PFGE 画像の質が改善されることが明らかとなった。

これらの結果から、来年度から稼働するパルスネットの実施には PFGE 実施条件の統一が必須であることが明らかとなった。さらに、O26 は O157 と同様の条件を用いて PFGE が実施可能であり、O157 と同等の遺伝子レベルでの多様性を有していることからパルスネットは O26 にも応用可能であることが示唆され、O26 による diffuse outbreak に対してもその早期発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

研究協力者 松本昌門 愛知県衛生研究所 主任研究員
板垣道代 岐阜県保健環境研究所 専門研究員
倉本早苗 石川県保健環境センター 主任技師

A. 研究目的

東海・北陸ブロックでは、平成 12 年度には腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析法を確立するため、全国の地方衛生研究所 (地研) で用いられ、我が国の O157 の PFGE 標準法となっている国立感染症研究所 細菌第一部 (感染研) の O157 の PFGE 実施条件が O26 に応用可能であるか否かを検討した。具体的には東海・北陸地方で平成 8 年から 12 年の 5 年間に検出された 196 株について感染研の O157 の染色体調製、電気泳動条件等を用いて PFGE を行なった。その結果、O157 に用いられている実施条件によって型別分類可能な泳動パターンが得られることが明らかとなり、O26 に応用可能であることが示唆された。

平成 13 年度には、平成 12 年度に PFGE 解析を実施した 196 株のうち分離県、分離年月等を考慮して選んだ 105 株について目視においては行なうことのできない多数の菌株の型別分類を解析ソフトを用いて行なった。その結果、105 株の O26 は 71 の PFGE 型に型別分類された。この 71PFGE 型のうち 52 の型は 1 型 1 株であり、残り 19 の型は 1 つの型に複数の菌株が存在していた。これら菌株のなかには異なった県でほぼ同時期に検出された PFGE 型も存在し diffuse outbreak (散在的集団事例) の可能性も示唆された。以上の結果から O26 は遺伝子レベルで型別分類に応用できる多様性を有しており、PFGE によって O26 の diffuse outbreak の検出も可能であることが示唆された。

平成 14 年度は、O26 のパルスネットへの応用の可能性についてさらに検討するための予備試験を行なった。つまり愛知県で平成 8 年から 12 年の間に検出された PFGE 型の同一または異なる 4 株の O26 について東海・北陸地方の 4 地研において PFGE を実施し、得られた画像をメールで愛知県衛生研究所 (愛知衛研) に電送した。これら画像は愛知衛研において目視及び解析ソフトを用いて解析を行ない、パルスネット稼動の際に生じるであろう問題点等について検討を加えた。

B. 研究方法

菌株：散發事例 3 事例に由来する 3 株の EHEC O26 を用いた。これら菌株は、愛知県で平成 8 年度 (菌株番号：96-291)、9 年度 (97-134) 及び 12 年度 (0-129) に検出され、その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類に関しては、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌

免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。

パルスネットのための予備試験：

[I]送付菌株

4 検体の O26 を予備試験に用いた。検体番号 1 から 4 はそれぞれ菌株番号 96-291、97-134、96-291、及び 0-129 であり、検体 1 と 3 は同一菌株である。

[II]方法

愛知衛研より 4 検体を岐阜県保健環研究所、石川県保健環境センター、及び富山県衛生研究所に送付した。そして、愛知衛研を含む 4 地研において送付された 4 検体について PFGE を実施した。各地研の溶菌過程、制限酵素処理、及び PFGE 機種名等を表 3 に示した。また、PFGE 泳動条件は 4 地研とも感染研 O157 の条件を用いた。その条件は、PFGE 機種 Gene Navigator（ファルマシア社）の場合は電圧 200V、泳動時間 22 時間 1 分、パルスタイム 4 秒から 8 秒 6 時間、8 秒から 4 秒 1 分、4 秒から 8 秒 6 時間、8 秒から 50 秒 10 時間であり、CHEF DR-III（バイオラド社）の場合は 6 V/cm、パルスタイム 4 秒から 8 秒 9 時間、8 秒から 50 秒 13 時間である。3 地研にて得られた PFGE 画像は jpeg ファイル形式でメールにて電送され、解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には各地研で PFGE を行なった 4 検体について各地研毎に検体間の相同性を調べ、そのパーセントで示される相同性及び系統樹を各地研間で比較した。また、検体ごとに系統樹を作成し、同じ検体が地研によってどの程度相同性に違いがあるか否かを検討した。

[III] PFGE 機種、ブロックの菌液濃度、及びブロックの厚さが PFGE 画質に及ぼす影響

愛知衛研において PFGE 機種による違いが PFGE 画像に及ぼす影響を調べるために 4 検体について Gene Navigator（ファルマシア社）及び DR III（バイオラド社）を用いて PFGE を実施した。また、ブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへの挿入時のブロックの厚さが及ぼす影響を調べるために、同一検体について 2 種類の異なった菌液濃度のブロック（約 5.0×10^7 、約 1×10^8 ）及び異なった厚さのブロック（約 0.7 mm と約 2.0 mm）をゲルに挿入して PFGE を行なった。そして得られた画像について目視にてバンドのシャープさの程度について比較検討した。

C. 研究結果

[I] 目視による 4 地研の PFGE 画像の解析

図 1 には電送された 2 地研の PFGE 画像を示した。地研によって画像の質（バンドの濃淡及び太さ）に差が認められた。すなわち地研 A の画像はバンドがや

や薄い傾向が認められたが、地研 B、C、D ではバンドがやや濃くて太い傾向が認められた。しかし、何れの地研の泳動図も目視によって検体 1 と 3 が同一の泳動パターンであること。また、検体 1 と 3、2 及び 4 がそれぞれ異なった泳動パターンであることは識別可能であった。次に、目視によって検体間のバンド本数の違いを各地研間で調べ、その結果を表 1 に示した。検体 1 と 2 ではバンド本数の違いは各地研によって 3 本から 5 本であり、検体 1 と 4 では 5 本から 8 本、検体 2 と 4 では 7 本から 9 本であった。このことから、目視においても詳細な解析にはより質の高い画像が求められることが明らかとなった。

III 解析ソフト「フィンガープリント II」による 4 地研の PFGE 画像の解析

1. 各地研内での検体の相同性の比較

解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて各地研の 4 検体について相同性を求めた結果を表 2 に示した。検体間の相同性に関しては、電気泳動の際のレーン番号は異なるが同一検体である検体 1 と 3 では何れの地研も非常に高い相同性が得られた。特に地研 A と D ではその相同性は 100% であり、地研 B、C もそれぞれ 86 と 94% であった。一方、検体 1 と 2 では地研 A と B はほぼ同じ相同性 (71%、69%) であったが、地研 C、D ではそれぞれその値よりやや低い 64% か、逆に高い 78% であった。検体 1 と 4 では地研 C、D はほぼ同じ値 (57、58%) で、地研 A、B ではそれぞれその値より 10% 以上低い値 (41%、46%) であった。

検体 1 と 2 及び検体 1 と 4 の相同性は検体 1 と 3 に比べ施設間にばらつきが認められたが、その系統樹は各地研で類似した形となった (系統樹は省略)。

2. 各検体の地研間での相同性の比較

図 2 に各検体ごとに地研間での相同性を系統樹で比較した結果を示した。その結果、同一検体である検体 1 と 3 は同一地研内では 86% から 100% の非常に高い相同性が得られたが、地研毎に比較すると、最も相同性が高い地研で地研 B と D の 78% であったが、最も低い相同性は地研 AC と BD で僅か 24% であった。検体 2 と 4 の結果も図 2 に示したが、検体 1 と 3 の場合と同様な結果が得られた。すなわち、検体 2 で最も相同性が高い地研は B と D で 68% であり、最も低い相同性は A と BCD で 16% であった。検体 4 についても最も相同性が高い地研は B と D の 64% であり、最も低い相同性は地研 AC と BD で 22% であった。このように泳動条件のみを統一して実施した今回の PFGE 画像の解析では、PFGE 画質の大きなばらつきによると考えられる地研間での大きな相同性の違いが認められた。しかしながら、以下に述べるような今回の研究結果から、多くの実施条件を統一することにより今後は相同性の大きな向上が期待できるものと考えられた。

「III」東海・北陸地方の4地研が用いている溶菌過程、制限酵素処理、及びPFGE機種と比較

同一検体であるにもかかわらず4地研間でその検体の相同性に大きな違いが認められたことから4地研の溶菌過程、制限酵素処理、及びPFGE機種と比較を行なった(表3)。

ブロックの作成の項目での各地研間での主な相違点は低融点アガロースの濃度で、地研B、Dでは2%を用いていたが、地研A及びCではそれぞれ1及び1.6%であった。

菌体を破壊するためのLysozyme及びProteinase K処理の項目では3地研(A、B、C)はほぼ同じ実施条件を用いていたが、地研Dはこれら地研と大きく異なっていた。すなわち、地研DはLysozyme処理を行なっておらず、Proteinase K処理の項目でもProteinase Kの濃度が他の3地研と比較し半分の0.5 mg/mlであり、溶液のpHも9.5と他の地研に比べやや高めであった。Proteinase Kを不活化するための制限酵素前処理の項目では地研A、CはPefablocを用い、地研B、DではPMSFを用いていた。Pefabloc処理では処理後のTE溶液による洗浄で地研AはCに比べ時間、回数とも少なかった(地研A:30分、1回;地研C:2時間、2回)。PMSF処理では地研Bは30分で新しいPMSF溶液に変えてさらに30分処理していた。これに対して地研Dでは同じ溶液で60分処理していた。また地研Dは洗浄も酵素反応用バッファーを用い60分1回のみであった。以下の項目、制限酵素処理、PFGE機種、マーカー及び泳動バッファーに関しては、4地研で大きな相違は認められなかった。ただし、PFGE機種に関して地研Cはファルマシア社のGENE NAVIGATORを用いていたが、他の3地研はバイオラド社のDR-IIIであった。

「IV」PFGE機種、ブロック作成時の菌液濃度とゲルへ挿入するブロックの厚さの解析結果に及ぼす影響

Gene Navigator (ファルマシア社)によるPFGEでは泳動が蛇行する傾向にある(図3)ことから、愛知衛研においてPFGE機種の違いが検体間の相同性に及ぼす影響を検討した。表4にGene NavigatorとDR IIIで行なった各検体間の相同性を示した。検体1と3ではDR IIIを用いた場合、その相同性が100%となり、検体1と2でもDR IIIではその相同性が20%増した。しかし検体1と4ではその相同性に大きな差は認められなかった。さらにDR IIIの結果を地研Cの結果として他の地研と系統樹を作成して検体間の相同性の比較を行なった(図4)。検体1と3の場合には、地研CとAの検体の相同性が37%から52%に改善されたものの、地研Cと地研B、Dの相同性は24%と改善は認められなかった。検体2でも地研CとAの相同性が16%から18%に僅かに改善されたが、

地研 C と地研 B、D の相同性は 64% から 40% へと減少した。検体 4 でも地研 C と A の相同性が 32% から 44% に改善されたが、地研 C と地研 B、D の相同性は 22% で変化は認められなかった。

前述した「III」東海・北陸地方の 4 地研が用いている溶菌過程、制限酵素処理に 4 地研間で明らかな相違が認められなかったことから、その前及び後過程であるブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへの挿入時のブロックの厚さについて検討を加えた。すなわち、2 種類の菌液濃度（約 5.0×10^7 、約 1×10^8 ）のブロックを作成し、厚さ約 0.7 と約 2.0 mm の 2 種類の異なる厚さのブロックをゲルに挿入して電気泳動を行ない、得られたバンドを比較した（図 5）。その結果、約 0.7 mm の厚さで菌液濃度約 5.0×10^7 のブロックの場合に目視によって最もシャープなバンドが得られ、1 本 1 本のバンドがより鮮明に確認できた。また約 0.7 mm の厚さで菌液濃度約 10×10^7 のブロックの場合には、バンドがやや太くなる傾向が見られたがバンド本数の確認は可能であった。これに対して厚さ約 2.0 mm のブロックの場合には、何れの菌液濃度のブロックを用いて PFGE を実施しても複数のバンドが重なり目視でのバンド数の確認が困難であった。

D. 考察

これまでの研究の結果、O26 の PFGE による解析に感染研 O157 の解析条件が応用可能であること。また、解析ソフトを用いた 100 株以上の O26 の解析結果から O26 は O157 と同様遺伝子レベルで多様性に富んでおり、PFGE による分子疫学的解析が充分可能であることが明らかになった。本年度はパルスネット研究班の最終年度にあたることから、東海・北陸ブロックでは、来年度からのパルスネット稼働の予備試験として 4 株の O26（2 株は同一 PFGE 型）を用いて 4 地研で PFGE を実施し、得られた PFGE 像をメールで愛知衛研に電送し、検体の PFGE 画像について、その相同性の比較を行なった。

各地研で得られた PFGE 画像はその画質に相違が認められた。具体的には地研 A はバンドが薄く、地研 B、C と D はバンド濃く太い傾向が認められた。4 地研で得られた PFGE 画像について目視による解析を行なった結果、その画質の違いにかかわらず、何れの地研の PFGE 画像においても検体の PFGE 型が同じか否かの判定は比較的容易であった。しかし、各検体間のバンド本数の違いを比較したところ、各地研で同一もしくは 1～2 本異なっていた。したがって目視による判定においても、「バンド本数の相違を調べる」という段階では鮮明なバンドを有する PFGE 画像が求められるものと思われた。

解析ソフト「フィンガープリント II」による解析では、各地研内での 4 検体の相同性は、相同性の指標であるパーセントの違いはあるものの、その系統樹は地研間で類似していた。すなわち今回得られた PFGE 画質は検体の PFGE 型が

同じか否かのレベルを判定するには充分であることが解析ソフトを用いた結果からも明らかとなった。

しかし、同じ検体を地研間でその相同性を比較したところ、最も高い値が得られた検体1と3で78%、最も低い値は検体2の僅か16%であり、パルスネットの基本である異なった地研が実施したPFGE画像の比較が現行では実施不可能であることが示された。各地研間で同一検体にもかかわらず高い相同性が得られなかった原因を検討した。その結果、4地研が用いている溶菌過程、制限酵素処理については、地研Dが溶菌過程のひとつであるLysozyme処理を行っていないものの4地研間で明らかな相違は認められなかったことから、これらの過程が直接PFGE画質に影響を及ぼしている可能性は低いと推察された。そこで、PFGE機種、前述した過程の前及び後過程であるブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへの挿入時のブロックの厚さについて検討を加えた。その結果、PFGE機種を統一することによって各地研間の相同性の改善がある程度認められた。また、適切な菌液濃度（1ブロック当たり約 5.0×10^7 ）のブロックかつ薄めのブロック（約0.7 mm）のゲルへの挿入を用いてPFGEを行なうことによってバンドのシャープさが改善されることが明らかとなった。

これらの結果から、パルスネット実施にはPFGE実施条件の統一が不可欠であることが明らかとなった。また、今回の研究から、異なった地研で行なった画像の比較検討には、同一PFGE機種、適切な菌液濃度でのブロックの作成、及び薄め（約0.7 mm）のブロックのゲルへの挿入が特に重要であることが示唆された。

我々のO26のPFGEに関する研究結果から、パルスネットは厳密なPFGE実施条件の統一と精度管理の実施によって構築可能であり、O26も同一のPFGE実施条件を用いて応用可能であることが明らかとなった。

よって、我が国のO26によるdiffuse outbreakの際にはパルスネットを用いて解析することが可能となり、本システムはO26によるdiffuse outbreakに対しても早期の発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

E. 結論

平成15年度から実施されるパルスネットの予備試験として愛知県で検出された4株のO26（2株は同一株）について愛知県、岐阜県、石川県、及び富山県の各地研でPFGEを実施し、その画像をメールで愛知衛研に電送した。愛知衛研で得られた画像について目視及び解析ソフトを用いて解析を行なった。

その結果、目視による検体間のPFGEバンド本数の違い、及び解析ソフトによる検体間の相同性は各地研間で異なっており、より質の高いPFGE画像が必要であると思われた。さらに同一検体の相同性を各地研で比較したところ、最

も高い検体で78%、最も低い検体では僅か16%であった。そこでPFGE画質に影響を与える要因について検討をおこなったところ、PFGE機種の統一、ブロック作成の際の適切な菌液濃度（1ブロック当たり約 5.0×10^7 ）及び薄めのブロック（約0.7 mm）のゲルへ挿入によってPFGE画質が改善されることが明らかとなった。

これらの結果から、パルスネット実施にはPFGE実施条件の統一が不可欠であることが明らかとなった。さらにパルスネットはO26にも応用可能であることが示唆された。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表

Tanaka D *et al*: Molecular epidemiology of group A streptococci T serotype 1. *Jpn J Infect Dis* 55 : 89-90, 2002.

表1 目視による検体間のバンド本数の違い

地研	各検体間のバンド本数の 違い (本)		
	検体1と2	検体1と4	検体2と4
A	3	5	8
B	4	8	8
C	4	6	7
D	5	5	9

表2 解析ソフト「フィンガープリントII」での検体間の相同性 (%) の違い

地研	各検体間の相同性 (%)		
	検体1と3	検体1と2	検体1と4
A	100	71	41
B	86	69	46
C	94	64	57
D	100	78	58

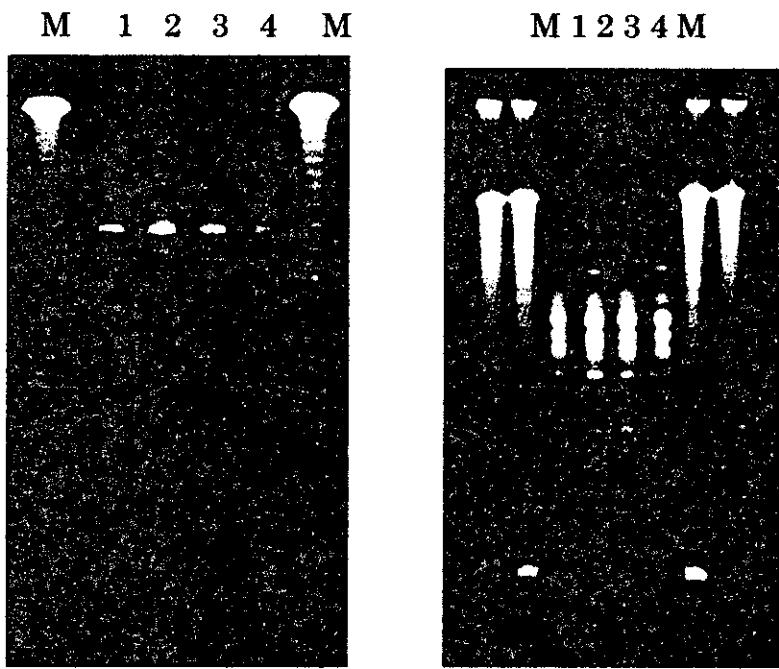
表3 東海・北陸4地研の溶菌過程、制限酵素処理及びPFGE機種の比較

地研名	A	B	C	D
ブロックの作成				
菌液または菌体浮遊液	菌液	菌体浮遊液	菌液	菌体浮遊液
低融点アガロース濃度	1	2	1.6	2
会社名	Bio-Rad	日本ジーン	日本ジーン	日本ジーン
Lysozyme処理				なし
Lysozyme濃度	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	
0.5M EDTA (pH8.0)	○	○	○	
反応時間	4~5	5	5~6	
会社名	和光純薬	和光純薬	シグマ	
Proteinase K処理				
Proteinase K濃度	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml
0.5M EDTA (pH8.0)+1%Laurooylsarcosine	○	○	○	×(pH9.5)
反応時間	16	16	16	18
会社名	和光純薬	和光純薬	シグマ	和光純薬
制限酵素前処理				
Pefabloc	○		○	
Pefabloc濃度	4		4	
時間 回数	30分、2回		30分、2回	
TE溶液洗浄				
時間 回数	30分、1回		2時間、2回	
PMSF		○		○
PMSF濃度		1		1
時間 回数		30分、2回		60分、1回
TE溶液洗浄				酵素反応用バッファー
分 回数		60分、2回		60分、1回
制限酵素処理				
酵素単位	30	30	30	30
反応時間	16	18	16	18
会社名	ロシュ	タカラ	ロシュ	日本ジーン
PFGE機種	DR-III	DR-III	GENE NAVIGATOR	DR-III
マーカ				
会社名	New England Biolabs	Bio-Rad	Bio-Rad	Bio-Rad
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE

表4 PFGE機種の違いによる検体間の相同性の違い

PFGE	各検体間の相同性 (%)		
	検体1と3	検体1と2	検体1と4
Gene Navigator	94	64	57
DR-III	100	84	59

図1 電送された地研A、BのPFGE画像

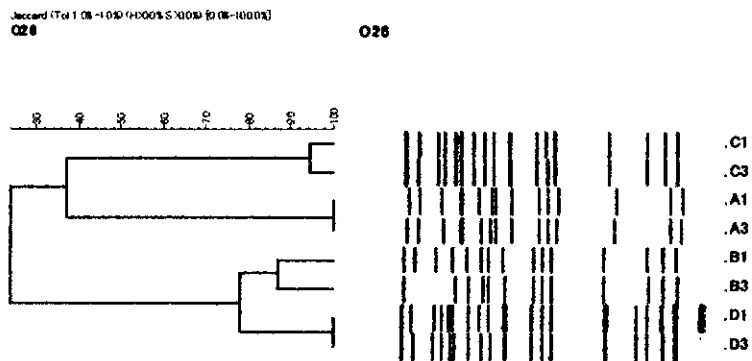


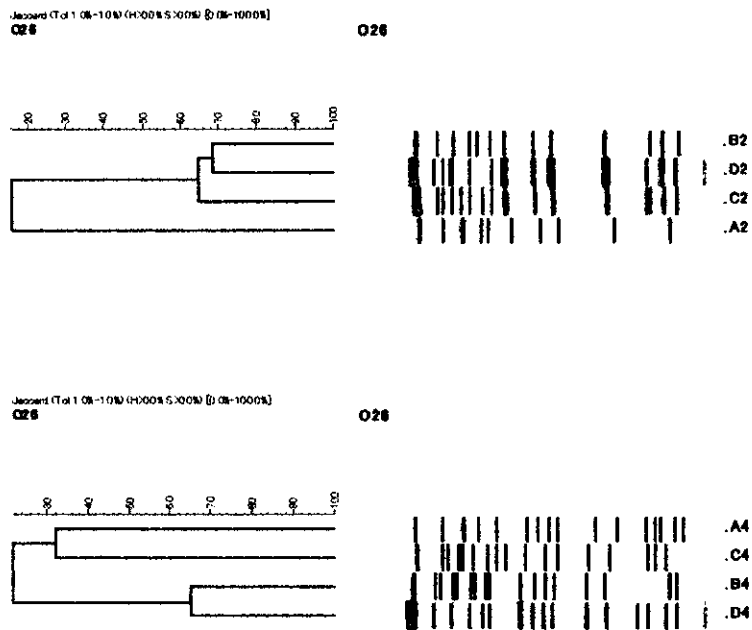
地研A

地研B

M : マーカー、1から4は検体番号

図2 各検体ごとの地研間での相同性の違い





A から D は地研名、1 から 4 は検体名を示す。

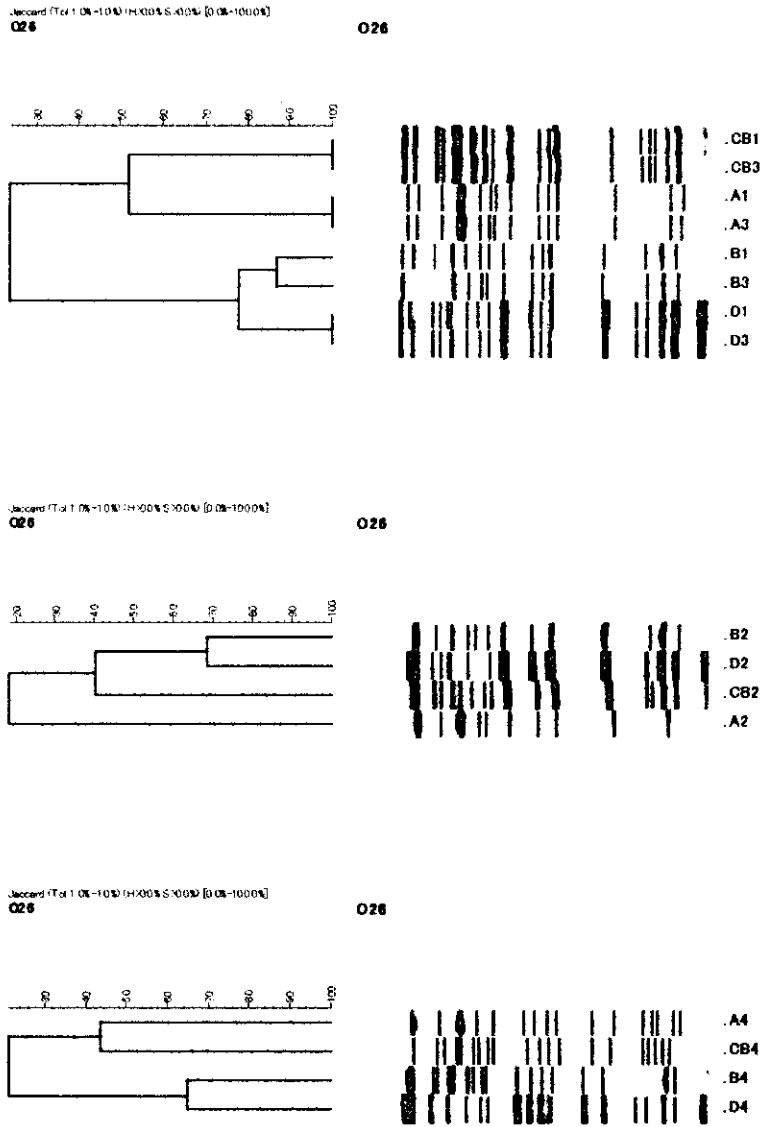
図3 地研Cの Gene Navigator (ファルマシア社) による PFGE 画像

M 1 2 3 4 1 2 3 4 M



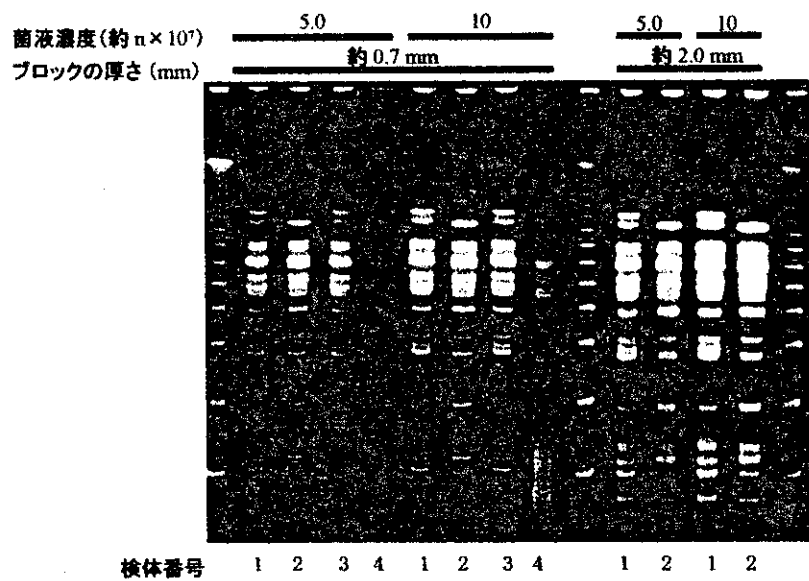
M: マーカー、右4つの検体1から4はブロックの菌液濃度が約 5.0×10^7 、左4つの検体1から4はブロックの菌液濃度が約 1×10^8

図4 地研CがDR IIIを用いた場合の各検体ごとの地研間での相同性の違い



AからDは地研名、ただしCBは地研CがDR IIIを用いた場合を示す。1から4は検体名を示す。

図5 ブロック作成時の菌液濃度とゲルへ挿入するブロックの厚さが PFGE 画質に及ぼす影響



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動型別法の
施設間変動について -14 年度報告-

分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所・公衆衛生部・微生物課長

協力研究者	石川和彦	滋賀県立衛生環境センター
	藤原恵子	京都府保健環境研究所
	竹上修平	京都市衛生公害研究所
	中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	横田正春	堺市衛生研究所
	辻 英高	兵庫県立健康環境科学研究センター
	黒川 学	神戸市環境保健研究所
	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
	中山章文	奈良県保健環境研究センター
	金澤祐子	和歌山市衛生研究所
	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

パルスネット構築に向けた基礎的研究のため、13 年度に引き続き近畿支部の衛生研究所において同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い本法の安定性をみた。昨年度は各施設の方法の違いに由来すると考えられる差が認められたため、本年度は可能な限り統一した条件で PFGE 型別を行った。その結果各施設の画像の質をコントラストの高い鮮明なものに統一する必要があることがわかった。そのためには各施設の技術の向上が必須であるが、さらに PFGE 解析法についても、533.5kb 以上と 48.5kb 以下のバンド認識など現在の方法では施設間の差が大きい問題点の解決を図る必要があると考えられた。

A.研究目的

13 年度の研究では、各施設間の方法の違いに由来すると考えられる差が認められ、PFGE 条件の統一と精度管理の必要性が認識された

ことから、本年度は近畿支部 11 カ所の衛生研究所間において可能な限り統一した条件で PFGE 型別を行い、本法の安定性をみることにした。

B.研究方法

1.供試検体

腸管出血性大腸菌 O157:H7 6株 (検体 No. 1~6) と、検体 No.6 を大阪府立公衆衛生研究所で制限酵素 (*Xba*I) 処理したゲルブロック 1個 (検体 No.7)、そして3株の腸管出血性大腸菌 O26:H11 (検体 No.8~10) の合計 10 検体を用いた。

2.PFGE 法

昨年度は、国立感染症研究所の平成 9 年の講習会の方法に準拠した方法で実施した施設が 8 施設、BIO-RAD の試薬キット使用が 3 施設あったが、試薬キット使用施設の電気泳動写真中に制限酵素未消化と考えられるバンドがみられたため、本年度は試薬キットを使用しないことにし、表 1 に示した国立感染症研究所の方法に準拠した方法 (14 年度統一法) でアガロースゲルブロックの作成から電気泳動までを実施した。表のなかで*印を付けた試薬類と、表には示さなかったが、アガロースブロック作成時に用いるディスポーザブルプラグモールド (BIO-RAD) は同一ロットのものを配布した。

国立感染症研究所法では菌液の調整は滅菌水に平板培養の菌を浮遊させるが、昨年度は菌液の濃度が菌株によって不均一の施設があったので、菌液の調整はトリプトソーヤブイヨン培養菌液で行った。また検体 No.7 は他の検体と同一アガロースゲルで電気泳動を行った。

DNA サイズマーカーは初めは A 社製のマーカーを使用し、大阪府立公衆衛生研究所で通常実施していた 50°C 1.5 分加熱処理して使用する方法を統一法に示していたが、この条件では僅かな加熱時間の差が結果に影響

し、バンドがはっきり認められる場合と非常に薄い場合がみられて (図 1) 濃度のばらつきが大きかったため、加熱の必要がない Lambda Ladder PFG Marker (NEW ENGLAND BioLabs) に変更した。

以上の条件でゲルブロックの作成から電気泳動、写真撮影までを 2 回実施した。

3.PFGE 解析画像の電送

2 回実施した PFGE 解析画像を TIFF 形式で保存し、電子メールで大阪府立公衆衛生研究所に送付し、同時に写真も郵送し比較した。TIFF 形式での送付が不可能な場合は他の形式で送付した。

4.画像解析ソフトによる解析

本研究班配布の FingerprintingII Japanese Edition (Bio-Rad) を用い大阪府立公衆衛生研究所で解析した。、解析条件は、バンド検索の設定を最大ピーク高さ 5%、最小面積 0%、ショルダー感度 3 で行い、48.5~533.5kb 間のバンドについて Dice (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]、UPGMA 方式でデンドログラムを作成した。

C.研究結果

1.電気泳動条件

電気泳動装置は CHEF DRIII (BIO-RAD) が 7 施設、CHEF DRII (BIO-RAD) が 2 施設、Gene Path System (BIO-RAD) が 1 施設であった。昨年度は Gene Navigator (Pharmacia) が 2 施設あり、CHEF DRII の 1 施設と Gene Path System の 1 施設もスイッチタイムの変更が出来なかったが、本年度は全ての施設で同一のスイッチタイムの設定が可能になり条件が統一できた。

2.画像の電送状況

各施設のファイル形式は、TIFFのグレースケールモード 5施設、TIFFのRGBカラーモード 2施設、BMP 3施設、JPEG 1施設であった。FingerprintingIIにはTIFFのグレースケール形式の画像が必要であり、他の形式のファイルは読み込む前に別のソフトで変換する必要があった。

ファイルが大きくなると送信時にエラーがでる場合があり、1施設では電送ができずCDで画像を送付した。また、ソフトの違いが原因と考えられる不具合が1施設であり、送られてきた画像を読み込むことができなかった。この施設ではフロッピーディスクで画像を再度送付した。

昨年度は、レーンによってバンドの濃さが異なった施設や、レーン全体が白くなった施設、600kb以上の位置に制限酵素未消化のバンドがみられた施設があったが、本年度は改善されていた。しかし、コントラストの低い画像の施設があり、それらの施設では鮮明な画像を送付するための検討が必要であると考えられた。図2にPFGE画像の1例を示した。

1施設は、A社製のマーカー使用の電気泳動結果送付後、NEW ENGLAND BioLabs (NEB) 製マーカー使用の電気泳動が業務の都合でできなかったため、以下の結果は10施設の解析結果を示した。

3.FingerprintingIIでの解析

10施設のマーカーはLambda Ladder PFG Markerのゲルを薄く切って使用することで明瞭なバンドが得られた。また、マーカーのレーンを中央と両サイドに2~3本入れたことにより解析に適したマーカーを選択することができた。しかし施設Bの1回目の画像はすべてのマーカーを厚く切って使用したことか

ら太いバンドになったため、この施設は1つの画像だけを解析に使用した。

マーカーの認識は、一番下の48.5kbから数えて12番目の582kbがすべてのレーンで認識できた施設は4施設、11番目の533.5kbまでしか認識できなかった施設が3施設で、他の3施設は582kbまでと533.5kbまでのレーンがあった。533.5kb以上に明瞭なバンドが認められる検体があるのにもかかわらず582kbが読めない施設があり、582kbまで読める鮮明な写真であれば、533.5kb以上のバンドも含めて解析するため近似度が変化する可能性があった。

検体1~10の認識では、48.5kb以下のバンドが薄いあるいはスミアのためにFingerprintingIIで正しく認識されなかった施設が6施設あったため、48.5kb以下のバンドは本研究の解析には使用しなかった。

19の画像からトレランス値を2.0%に設定して作成した検体別のデンドログラムを図3~12に示した。そしてデンドログラムの近似度を79%以下、80~89%、90%以上に区切って、幾つの画像がそれぞれの範囲に入っているかを表2にまとめた。

近似度90%以上を同一型と考えると、No.3、6、7、10の4検体では近似度90%以上に17~19画像が含まれ、施設間で89.5~100%の高い一致率を示した。No.2、4、5、9では近似度90%以上に13~15画像が含まれ、施設間で68.4~78.9%の一致率であったが、残りのNo.1、8では近似度90%以上に8画像（一致率42.1%）と11画像（一致率57.9%）のみで低い一致率であった。

検体No.8、9、10はSTEC O26:H11であるが、No.10では一致率が高く、一致率の違

いは血清型によるものではなく、バンドが重ならず分離されやすいか否か等の菌株の特性と、画像の鮮明さが影響を与えていたものと考えられる。

画像の質の影響については、コントラストが低い画像 A1 ではバンドが解析ソフトで正しく認識されず、10 検体中 3 検体だけしか近似度 90%以上に含まれなかったが、コントラストが高い画像ではほとんどのバンドが正しく認識されており、特に画像 I1、I2 では 10 検体全てが近似度 90%以上であった。

D. 考察

昨年度は各施設の方法の違いに由来すると考えられる差が認められたため、本年度は可能な限り統一した条件で PFGE 型別を行った結果、各施設の画像の質をコントラストの高い鮮明なものに統一する必要があることがわかった。また、ファイル形式も解析に適したものを指定することが必要であった。

今回の 10 施設の中にはマーカを 533.5kb までしか認識できなかった施設があったが、それ以上の大きなバンドが存在する菌株の解析にはマーカをもっと上部まで分離する必要があり、そのためにはマーカの泳動方法の検討と同時にパルスタイムの変更も必要ではないかと考えられた。また今回は 48.5kb 以下の小さなバンドが認識されない施設が多かったため解析に使用しなかったが、今後は解析に使用するかどうかを検討する必要がある。

そして FingerprintingII の使用方法の統一も必要であり、解析結果については型分類の基準を近似度何%にするのかも検討する必要があると考えられた。

E. 結論

パルスネット構築のためには各施設の画像の質をコントラストの高い鮮明なものに統一する必要があることがわかった。そのためには各施設の技術の向上が必須であるが、さらに PFGE 解析法についても、533.5kb 以上と 48.5kb 以下のバンド認識など現在の方法では施設間の差が大きい問題点の解決を図る必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

田口真澄、小林一寛 他：パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 型別法の施設間における変動について、第 45 回日本感染症学会中日本地方会総会 (2000 年 11 月、大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし