

97.07%となる。2つのクラスターの違いは図13に示す★1の部分のバンドの違いである。このバンドは、写真あるいは画像を目視した場合には1本である。このバンドには、いずれもショルダーがありこれを自動検索した場合、バンドとして認識されるものとされないものに分かれ、そこで違いが生じる。このバンドを目視どおりに1本とすると8機関の一致率は100%であった。図27に各機関で泳動されたすべての菌株 no.2 のプラグの泳動像(m:通常法, r:迅速法, m':福岡県保健環境研究所に送付された no.2 のプラグ)を示した。機関7の画像(図5:7-1及び7-2, 図10: Lab. 7)では明瞭なバンドが(特に輝度の高い200kb以上)得られていないが、送られたプラグの泳動像は良好であった(図27の7)。このことは画像解析に支障を及ぼしている事象は、泳動あるいは画像取込時点で発生していることが判明した。

#### D. 考察

今年度は同一ゲルを相互に送付し、泳動による影響を検討した。同一機関で作成したプラグを各機関で泳動することにより、明らかに異なる泳動により差違がでていることが判明した。また、各機関で作成したプラグを一機関で同時に泳動した場合、プラグの作成には全く問題点が無いことが分かる。このことから今後画像の相互共有並びに相互比較を行う上で解決しなければならない問題は、①スライダーでのゲルの均一化、②DNAの移動度、③バンド認識の基準の3点にあることが分かった。解決のためには①シングルピークで確認できるマーカーの安定供給、②PFGE機器の管理と保守点検、③バッファ量と温度による移動度のチェック、④バンド認識の基準策定、⑤画像取込の改善等を行う必要がある。

また、今回迅速法の検討を行ったが、従来法と遜色ない結果が得られプラグ作成の迅速化と柔軟性が得られ今後広く活用できるものと考えられる。

#### E. 結論

##### 1. プラグ作成について

プラグは各機関共に良好に作成でき問題点はほぼない。

##### 2. 泳動

次の点について改善する必要がある。

- ①シングルピークで確認できるマーカーの安定供給
- ②PFGE機器の管理と保守点検
- ③バッファ量と温度による移動度のチェック
- ④バンド認識の基準策定
- ⑤画像取込の改善

3. 迅速法によるプラグ作成法はルーチンワークに使用可能である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

小林一寛、勢戸和子、八柳潤、斎藤志保子、寺尾通徳、金子通治、芹川俊彦、倉本早苗、藤沢倫彦、鈴木理恵子、山崎貢、林賢一、松根渉、安岡富久、堀川和美、村上光一、河野喜美子、山田亨、伊藤健一郎、下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察、感染症学雑誌、2002、76(11)、911-920。

堀川和美、八柳潤、内村真佐子、斎藤眞、小林一寛、田中博、森良一、牛挽肉、ポテトサラダおよび野菜のドレッシング和えからの腸管出血性大腸菌 O157 の検出における培養法、免疫磁気ビーズ、イムノクロマト系簡易キットの有用性の検討、日本食品微生物学会雑誌、2002、19(4)、187-194。

##### 2. 学会等発表

堀川和美 他、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 -画像データの相互比較における問題点-、衛生微生物協議会第23回研究会、奈良市、2002. 7. 10。

堀川和美 他、PFGE解析の解釈及び意味づけ：

地研における PFGE 解析の利点及び問題点, 平成 14 年度希少感染症技術研修会, 東京都,

2003. 2. 19.

表1. EHEC O157標準菌株

番号	分離年	分離府県	市・町	備考	VT型	<100kb	100-200kb	>350kb
1	1996	広島県	東城町	小学校集発	1+2	I a	I	I
2	1996	大阪府	堺市	小学校集発	1+2	II a	II b	I
3	1998	宮崎県	宮崎市	保育園集発	1+2	II b	II b	I
4	1997	埼玉県	上尾市	散発	2	III a	ND	ND
5	1994	神奈川県	記載なし	牛肉	2	III b	ND	III

表2. PFGEにおける泳動及び画像撮影等の条件

機頭名	泳動条件			泳動時のプラグの大きさ	プラグ作製	ゲルの写真撮影環境				画像取込			
	ラダーの処理の有無	bufferの濃度、量、泳動温度	有			ゲル撮影カメラ		フィルムの種類	CCDカメラ取込装置		スキナーによる取込	画像取込ソフト名	
						暗室での可動式撮影セット	フロード型固定型撮影セット		使用していない	ゲルから			写真から
A	無	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/4	ディスプレイホルダー又は0.7mmサンプリングキャスター	○		ポラロイド 665	○	FOTODYNE model 60-2100	NIH Image 1.59		
B	有 45°C 5分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	2.5mm-5mm	マニュアル法はディスプレイホルダー、迅速法は0.7mmサンプリングキャスター	○		Polaroid Polapan 3200B	○	BIORAD Gel DoC1000	Molecular analyst Software		
C	有 50°C 2分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/2	ディスプレイホルダー	○		ポラロイド 667	○	EPSON GT8700	Adobe Photoshop5.5		
D	無	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の約1/3	従来法=ディスプレイホルダー、迅速法=0.7mmサンプリングキャスター	○		Fuji FP3000B	○	EPSON GT8700	Adobe photodelux		
E	無	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/2	ディスプレイホルダー		○		○	TOYOBO FASIII	Adobe photodelux		
F	有 45°C 4分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の約1/2	ディスプレイホルダー	○		ポラロイド 665	○	Bio image Gelprint 2000i	Bio image Gelprint 2000i		
G	有 45°C 5分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/2	ディスプレイホルダー	○		ポラロイド 665	○	EPSON CC700	Adobe Photoshop 6		
H	無	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/2	ディスプレイホルダー	○		感熱紙	○	CanonScan 5000F	Met's Photocrew		
I	有 45°C 4分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドで作った場合の1/2弱-1/3	ディスプレイホルダー	○		Fuji FP3000B	○	ジェミック リューション X Gelprint 2000i	ジェミック リューション Gelprint 2000i		
J	条件を変えて泳動(処理無, 1分, 3分)	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	2-3mmの大きさ	0.7mmサンプリングキャスター	○		Fuji FP3000B	○	EPSON スキヤナー	Adobe Photoshop5		
K	有 45°C 5分	0.5 × TBE, 2L, 14°C	有	プラグモールドの幅×約2mm	ディスプレイホルダー	○		Polaroid Polapan 3200B	○	EPSON GT-7600S	Presto! Pagemanager		

図1 大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

九州ブロック統一マニュアル

第1日目 (菌の培養)

3mlのTSBに菌を接種し、35-37°C、16-18時間、静置培養

↓

第2日目 (集菌)

- 1) 1.5mlのマイクロチューブに培養液を500 $\mu$ lとり、12,000 rpmで5分間冷却遠心
- 2) 上清を除去後、滅菌生理食塩水またはPBS1,000 $\mu$ lを加え混和後、12,000 rpm、5分間冷却遠心
- 3) 2)の操作を繰り返す(2回洗浄)。
- 4) 上清を除去後、滅菌超純水 500 $\mu$ lを加え、懸濁

↓

(アガロースブロックの作成)

- 1) アガロースブロック作成用プラスチック・ウエルに番号を付け、氷上で冷す。
- 2) 1.2%低沸点アガロース(BIO-RAD) in 滅菌超純水を電子レンジで溶かし少し冷ました後に、予め、ガラスのピペットで1.5mlのマイクロチューブに500 $\mu$ lずつ、検体数の本数、分注し、63°Cで保温しておく。  
(量が正確でないと寒天濃度が一定しない)
- 3) 菌の不活化と、ゲルとの混和準備のために菌液を63°Cのウオーターバスに10分程度浮かす。
- 4) 2)のチューブに3)の菌液を全量500 $\mu$ l入れ混和。
- 5) 4)を1)のウエルに注入。
- 6) 5)を氷上で固める。少なくとも30分間放置。

↓

(Lysozyme 処理)

- 1) Lysozymeを1mg/ブロックあたりに秤量し、0.5M EDTAで1mg/mlとなるよう溶解し、14mlチューブに2mlずつ分注(2ブロック作成用)。
- 2) 固化したアガロースブロックを1)のチューブに落とし入れる。
- 3) 37°Cで3時間(1-2時間~over nightでも可)振盪反応

↓

(ProtenaseK 処理)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、Lysozyme液を丁寧に抜き取る。
- 2) ProtenaseKを1mg/ブロックあたりに秤量し、1%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTAで1mg/mlとなるよう溶解し、Lysozyme液を抜き取ったチューブに2mlずつ分注(2ブロック作成用)。
- 3) 50°Cでover night 振盪反応。(72時間まで可)。ブロックの保存はこの状態で行い、冷蔵保存。  
(ここで止めても良い)

↓

第3日目 (プロテナーゼKの洗浄)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、アガロースブロックを取り出す。
- 2) 半分を切り取りTE(シャーレ)をくぐらせ次の操作へ、半分はProtenaseK液に戻す。

↓

(プロテナーゼKの不活化)

- 1) 新しいチューブに4mM Pefabloc in TEを0.5ml加え、アガロースブロック半分を入れ、50°C30分間振盪反応(1回目)。
- 2) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、Pefabloc液を丁寧に抜き取る。  
新しい4mM Pefabloc in TEを0.5ml加え50°C30分間振盪反応(2回目)。
- 3) 2)の操作を繰り返す。(3回目)。

↓  
( Pefabloc 液の洗浄)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、Pefabloc 液を除去し、TE を数 ml 加え直ちに除去、さらに TE を数 ml 加え、氷上で 30 分以上穏やかに振盪。
- 2) TE を捨て、新しいチューブにブロックを入れ、さらに TE を数 ml 加え、振盪器を用いて氷上で 30 分以上穏やかに振盪洗浄。
- 3) TE を捨て、TE を数 ml 加える。 (ここで止めても良い)

↓  
(制限酵素による消化)

- 1) ブロックを出し、新しいチューブに制限酵素を含まない buffer を 200  $\mu$ l を入れ、氷上で 30 分以上振盪
- 2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (Xbal, 30unit / sample plug、BSA を加える、ヘーリンガー・マッヘイム) をチューブに入れ、37°C cover night 振盪反応 (ここで止めても良い)

↓  
第 4 日目 (泳動用ゲルの作成 及び 泳動)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やす。
- 2) 泳動用緩衝液  $\times 0.5$  TBE を 2,700ml 作成
  - ・泳動槽に TBE を入れ、予め 14°C まで Cool down する。
  - ・  $\times 0.5$  TBE で 1% PFGE ゲルを作成寒天が固化した後、TBE を表面に流し、コームを取り除き、冷蔵庫で冷却させる。(30~60 分)
- 3) 制限酵素処理したマイクロチューブに TE を 300  $\mu$ l 入れ氷上に置き寒天が堅くなるのを待つ
- 4) 冷蔵庫から取り出した泳動用ゲルにプラグを詰める。この時ウエルの中に緩衝液が入っていることを確認する。また、詰める時に気泡が入らないように丁寧にやる。
- 5) マーカーを冷凍庫から取り出し、良く TE buffer で洗浄する。場合によっては加熱処理後使用する。
  - ・注 マーカーの加熱処理をする場合は 45°C で実施する(温度厳守)。時間は 3~5 分が良いが、ロットによって違うので各自前もって確かめる。時間が長すぎると火の玉みたいにボーツと膨れる。予め 45°C の恒温槽で TE 0.5ml を入れたチューブを 10 分間暖め、使用量分だけのマーカーを 1 チューブに 1 個ずつ入れ、3~5 分加熱。加熱後は直ちに急冷。
- 6) マーカー及びサンプルのプラグを入れ終わったら、穴の前方にプラグを寄せる。  
プラグの後方の隙間に 0.6% 低融点アガロースを入れ固める。
- 7) 泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。泳動の温度は 14°C。  
泳動条件は、200V 又は 6.0V/cm、4 to 8 sec 9 時間、8 to 50 sec 13 時間

↓  
第 5 日目 (染色・写真撮影)

- 1) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は 2 度蒸留水で洗浄。
- 2) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3  $\mu$ g/ml のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で 30 分(時間厳守) 振盪・染色。  
アルミフویلなどで染色槽に蓋をする。
- 3) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら 2 時間洗浄。こまめに DW を替える。特に最初が肝心。  
アルミフویلなどで槽に蓋をする。
- 4) 写真撮影 : イルミネーターにサランラップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真をとる。
- 5) 写真は上はコームの真上、下は寒天の真下にとる。拡大されていた方が取り込みやすいため。  
コームの跡が分かり、下の寒天の位置が分かるようにする。
- 6) 写真は最低限 2 枚撮影(露出時間を長めにしてバンドが良く読める写真 1 枚、露出時間が普通の写真 1 枚)
- 7) コンピューター取り込み用は背景が暗めの方が良い。JPEG は画像が解析できないので、TIFF 形式で保存する。

図2. EHEC O157 の PFGE 迅速法(E. M. Ribot らの方法を一部改変)

### 1. 被検菌の調整

- (1)標準菌株をドルセット卵培地から白金線で少し掻き取り TSB に接種し, 37°C, 16-18 時間静置培養する.
- (2)(1)の培養液を 1.5ml マイクロチューブに管底部分から沈殿した菌を取らぬよう試験管中程から菌液を 400 $\mu$ l 取る.
- (3)(2)を 5000 rpm, 10 分間, 4°Cで遠心する.
- (4)上清を取り除き生理食塩水(生食)1ml を加え, 5000 rpm, 10 分間, 4°Cで遠心する.
- (5)(4)の上清を取り除き 400 $\mu$ l の滅菌超純水を加える.

### 2. プラグの作製

- (6)(5)に 20mg/ml のプロテナーズ K(プロテナーズ K は滅菌蒸留水で溶かす)を 25 $\mu$ l 加え, やさしく混和する.
- (7)TE バッファーで溶かした 1%クロモゾーマルグレードアガロース(名称が変わり Certified Megabase アガロース、ローメルトアガロースより扱いやすいので、できればこれを使用する)を(6)に 400 $\mu$ l 加えマイクロピペットで 2-4 回混和する.  
\* (6)を 63°Cの恒温槽で保温しながらするとやりやすく, また菌の失活もかねられるので安全である.
- (8)プラグモールドに(7)(約 100 $\mu$ l)を流し込む.
- (9)4°Cで 10 分程度放置する(氷上にアルミ箔で包んだプラグを置く).

### 3. 溶菌

- (10)5ml の溶菌液を丸底 13ml チューブに入れる, これにプラグを入れる, 54°C, 15 分間ゆっくりと恒温水槽で振盪する.

### 4. 洗浄

- (11)洗浄は 4 回行う. 毎回 15-20 分間ゆっくりと, 54°Cの恒温水槽で振盪する.  
1 回目:滅菌超純水  
\* 滅菌シャーレに液ごと移し, 滅菌超純水を 5ml 入れた新しいチューブに滅菌したミニスパーテルでプラグを入れる.  
2, 3, 4 回目:TE バッファー  
\* 滅菌シャーレに液ごと移し, TE バッファーを 5ml チューブに入れ, プラグをミニスパーテルで戻す.  
最後に冷却した TE バッファーに置き換える.

### 5. 制限酵素処理

- (12)洗浄液ごと滅菌シャーレにプラグを移し, パラフィルム上にプラグを取り出し

カミソリや使い捨てメスの刃で 2mm にカットする。

(13) Xba I が入っていない制限酵素バッファーを滅菌した 0.5ml マイクロチューブに 200 $\mu$ l 分注し、(12)でカットしたプラグを入れる。室温 5 分間放置。

(14) 30 ユニットの Xba I が入った制限酵素液を滅菌した 0.5ml マイクロチューブに 200 $\mu$ l 分注し、(13)で制限酵素バッファーで馴らしたプラグをミニスパーテルで優しく抜き取り、制限酵素液に入れる。

(15) (14)のチューブをフロー用のシートに差し込むなどして、使用してる制限酵素の至適温度に設定した恒温水槽にシートを浮かし、2 時間優しく振盪する。

## 6. 泳動

(16) 0.5  $\times$  TBE バッファーを滅菌した 0.5ml マイクロチューブに 200 $\mu$ l 分注し、(15)のチューブからプラグを抜き取り TBE バッファーに移す。

(17) 泳動用ゲルに(16)のプラグ及び入マーカを装填する。

\* この時ミニスパーテルなどでプラグを穴の底の部分に気泡を入れないようきっちりと入れる。

(18) 穴の残りの部分に保温しておいた泳動用アガロスを充填し、穴を塞ぐ。

\* 泳動用ゲルは 1% PFGE ゲルを使用する。通常の装填方法の時には予め泳動用ゲルを作製し、1 時間程度冷蔵庫もしくは氷上で冷却する。

\* (17)・(18)はコーム・アタッチ法で行っても良いが、泳動用ゲルが固化した後、1 時間程度冷蔵庫もしくは氷上で冷却するのを怠らないこと。

(19) 泳動は通常法と同じに行う。

\* 6.0V/cm, 4 - 8 sec.(linear ramp) 9hr, 8 - 50 sec.(linear ramp) 13hr, 14 $^{\circ}$ C

\* 泳動槽に泳動用 0.5  $\times$  TBE バッファーを 2 リットル(量を守る)入れ、予め 14 $^{\circ}$ C に冷却しておく。

## 7. ゲルの染色・脱色

(20) アルミ製のトレイに 0.5  $\times$  TBE バッファーに 0.3 $\mu$ g/ml となるようエチジウムブロミドを 300ml 入れ、泳動後のゲルを入れ 30 分間染色する。

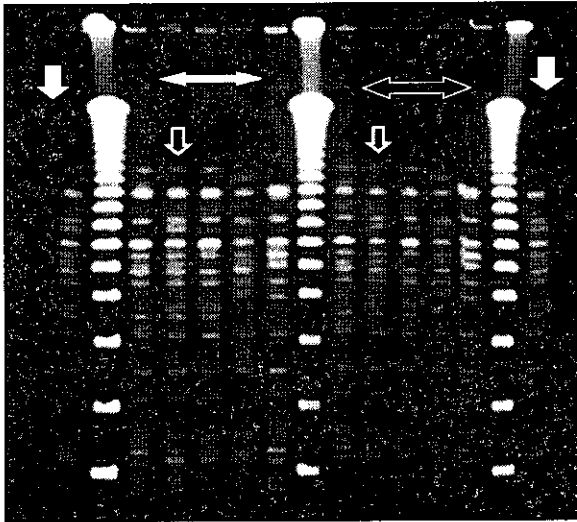
\* 染色・脱色は静かに振盪して行う。また操作中のトレイはアルミ箔などで蓋をし、遮光する。

(21) 染色したゲルは 10 - 20 分間隔で蒸留水を交換しながら 1.5 - 2 時間程度脱色する。

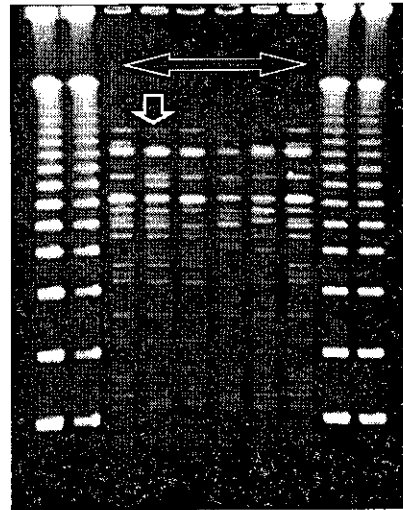
## 8. 写真撮影

(22) トランスイルミネータにサランラップを敷き、脱色したゲルを載せ、ポラロイド写真を撮影する。写真撮影は通常マニュアルのとおりに行う。

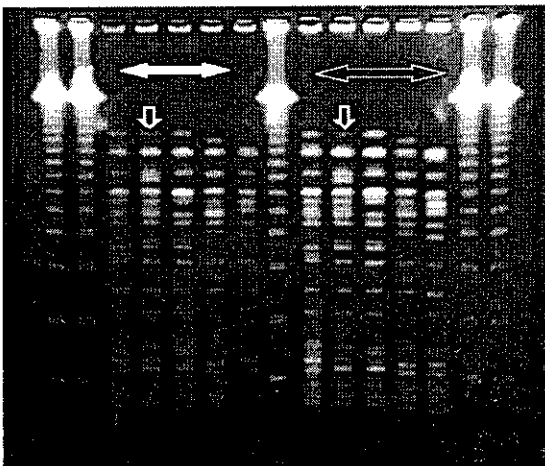




1-1 ゲルを直接取り込んだ画像



1-2 ゲルを直接取り込んだ画像



従来法



迅速法

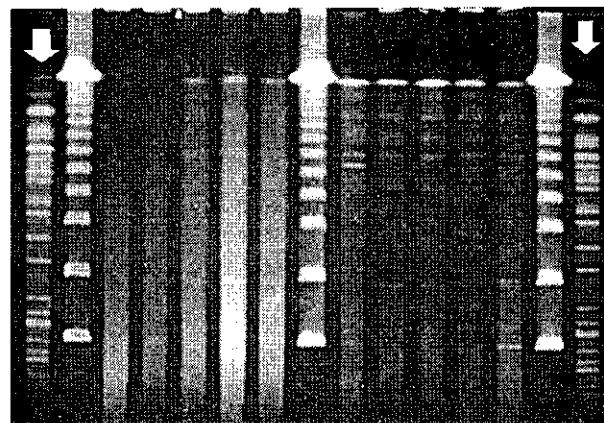
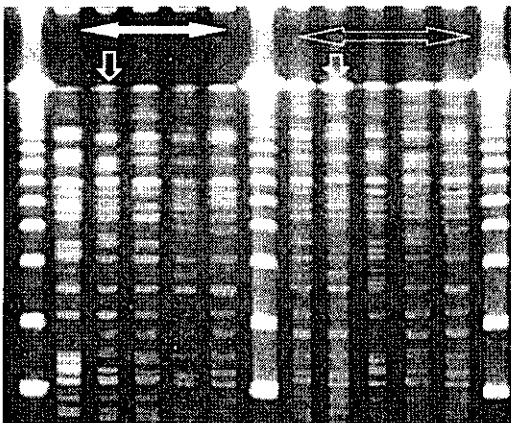


福岡県作成 no.2 プラグ



各地研作成 no.2 プラグ

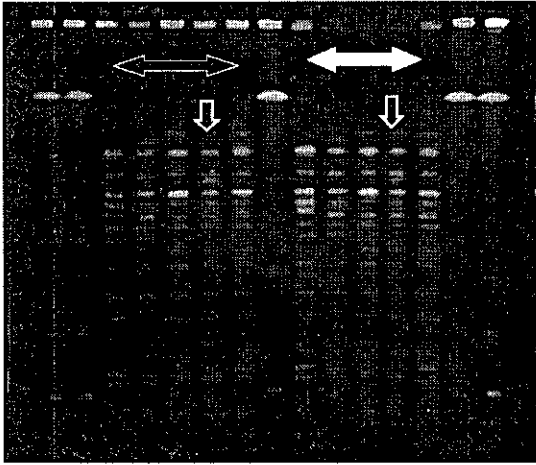
2 写真を取り込んだ画像



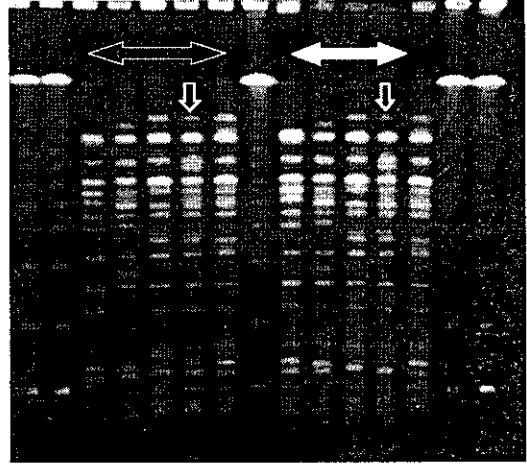
3-1 写真を取り込んだ画像

3-2 写真を取り込んだ画像

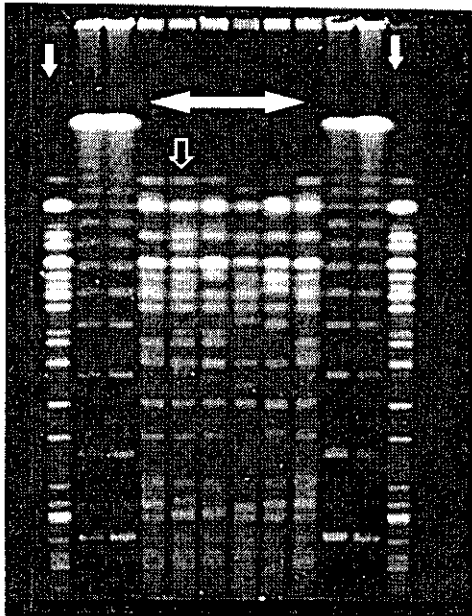
図3 機関1, 2, 3から送付された画像



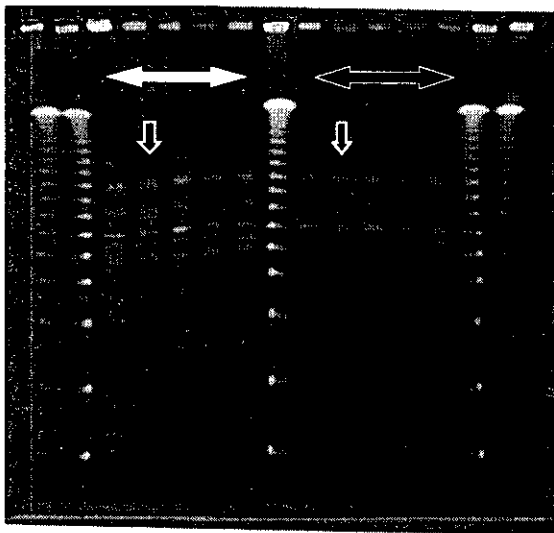
4-1 画像を CCD カメラで取り込んだ画像



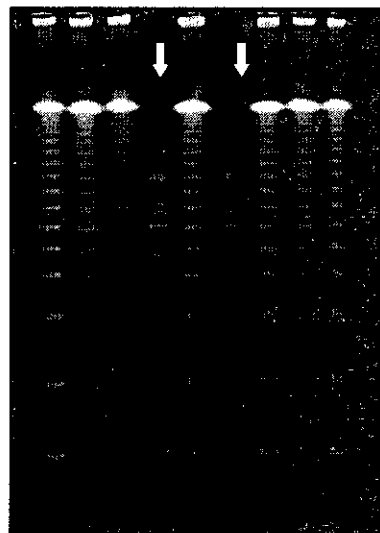
4-2 写真をスキャナーで取り込んだ画像



5 ゲルを直接取り込んだ画像

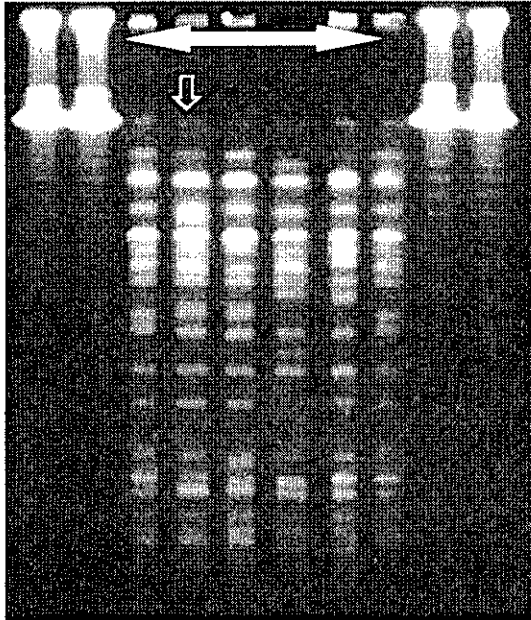


6-1 写真を取り込んだ画像

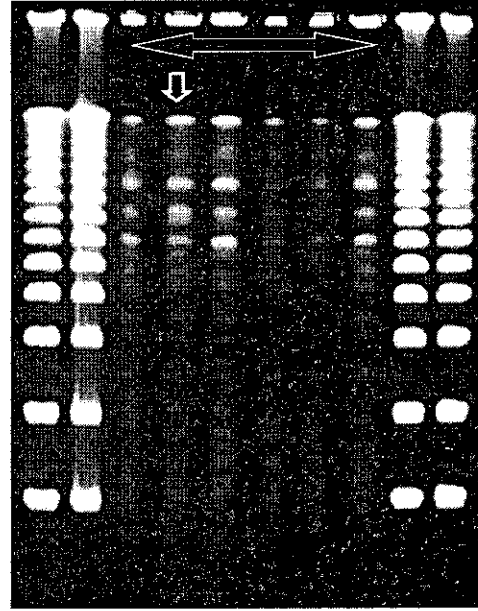


6-2 写真を取り込んだ画像

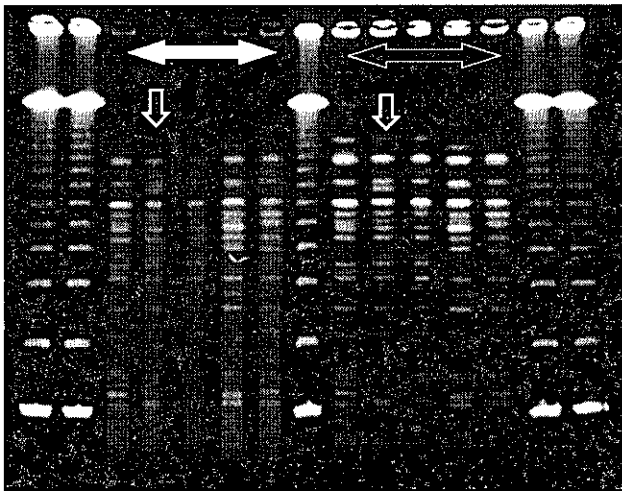
図 4 機関 4, 5, 6 から送付された画像



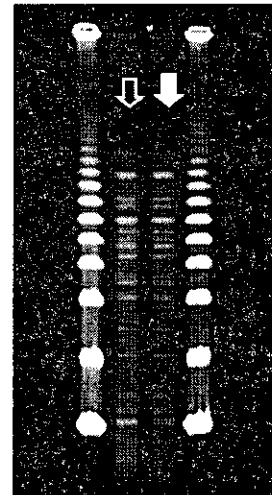
7-1 感熱紙から取り込んだ画像



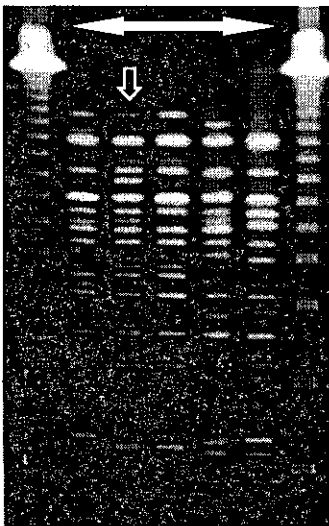
7-2 感熱紙から取り込んだ画像



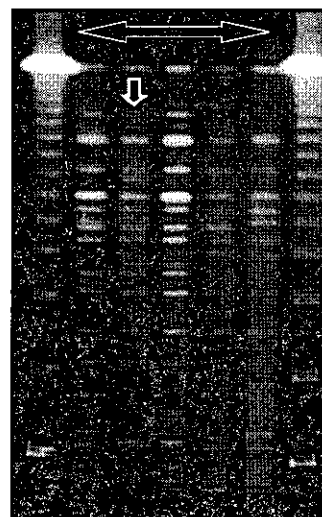
8-1 ゲルを直接取り込んだ画像



8-2 ゲルを直接取り込んだ画像

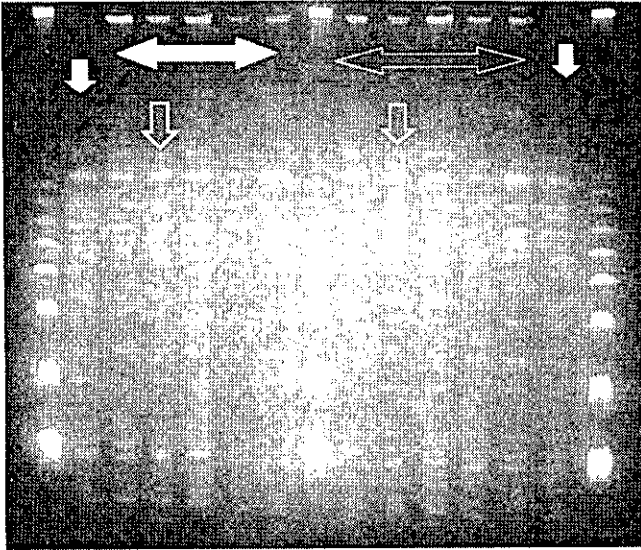


9-1 写真を取り込んだ画像

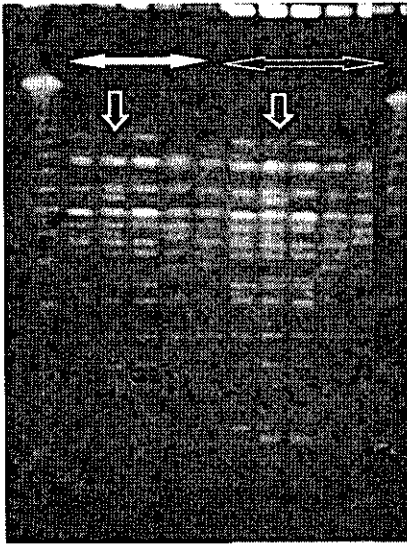


9-2 写真を取り込んだ画像

図5 機関7, 8, 9から送付された画像



10 写真を取り込んだ画像



11 写真を取り込んだ画像

図 6 機関 10, 11 から送付された画像

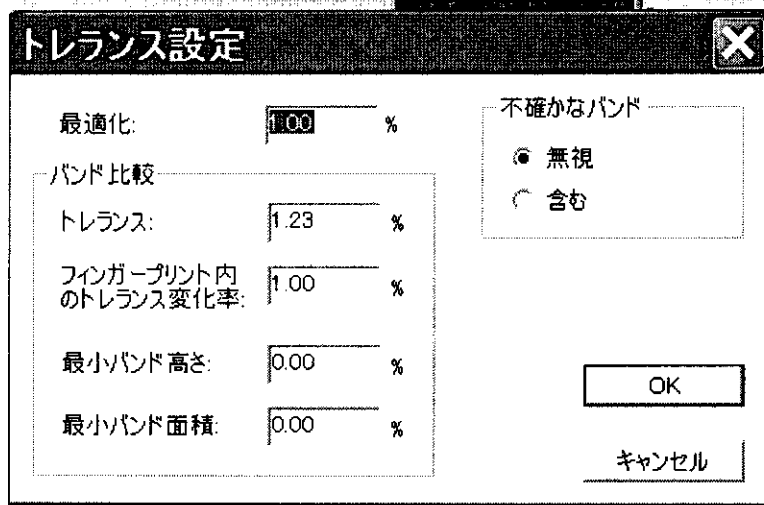
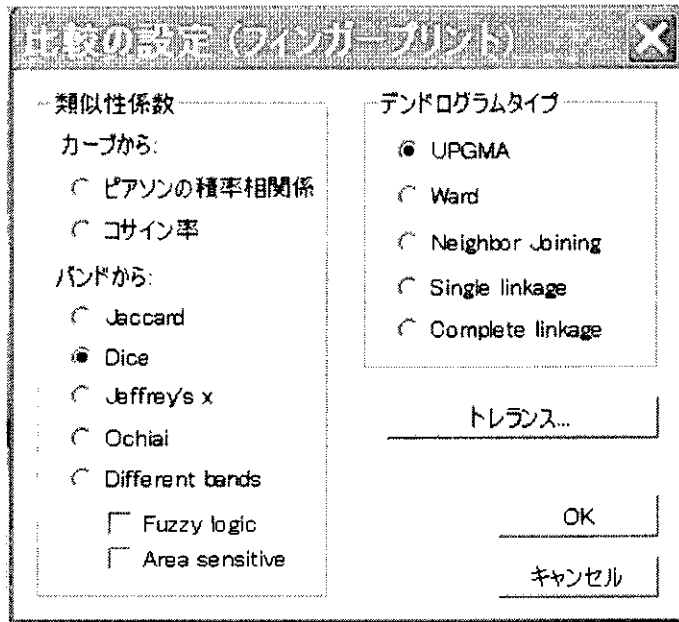


図7 DNA解析ソフト(Fingerprinting II)の解析条件

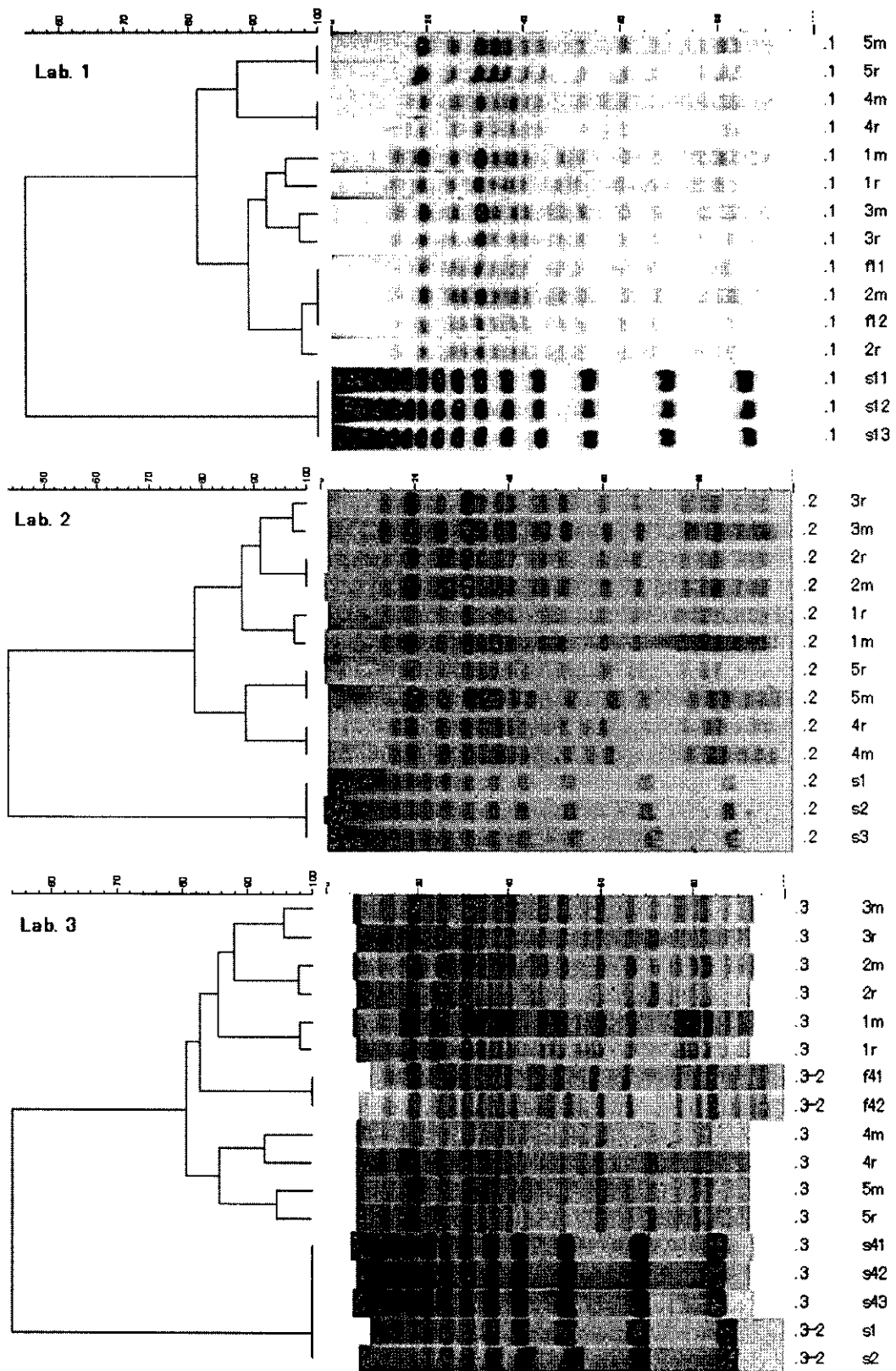


図 8 従来法と迅速法によって作成したプラグの比較 (機関 1, 2, 3)

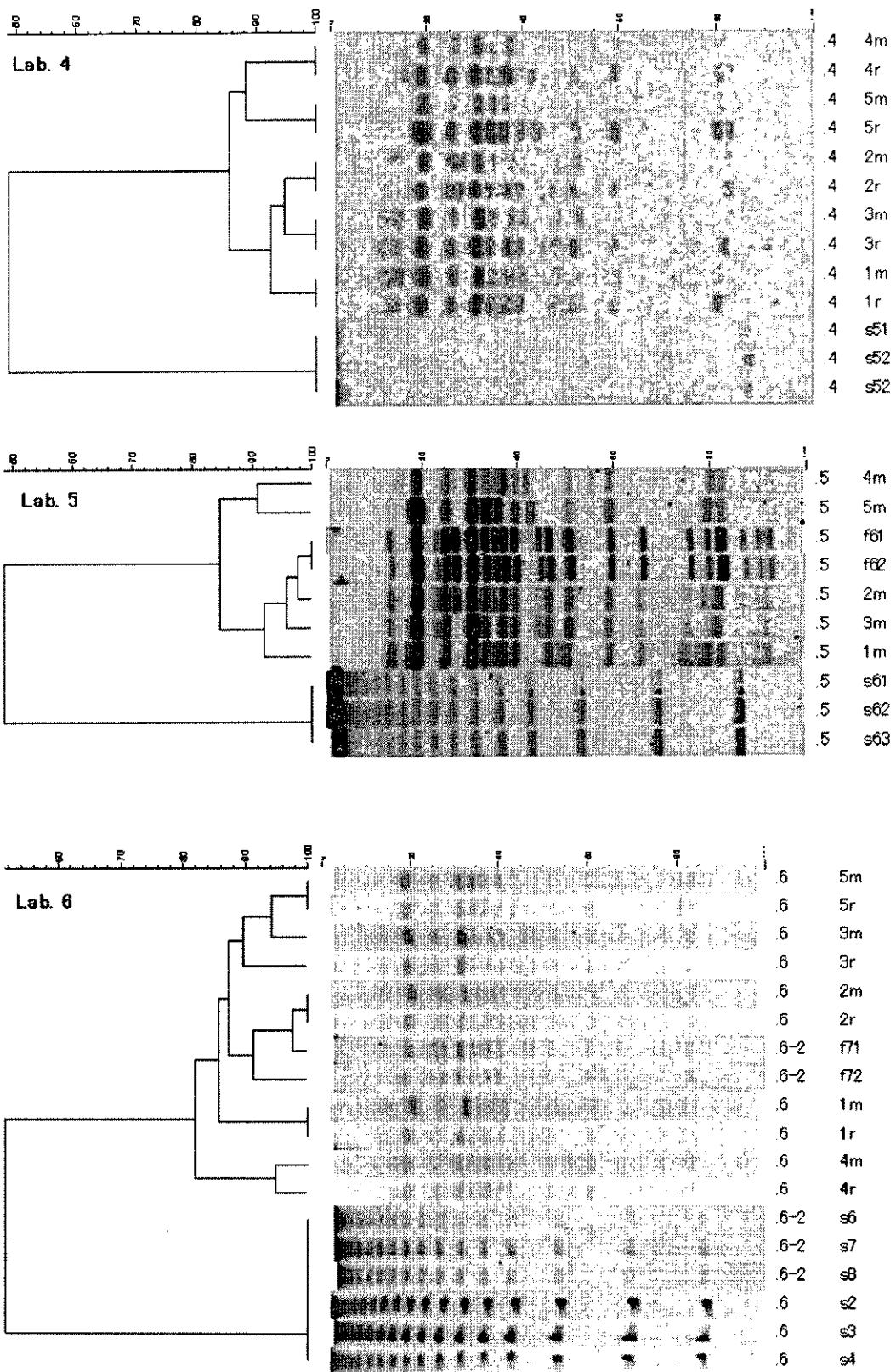


図9 従来法と迅速法によって作成したプラグの比較 (機関4, 5, 6)

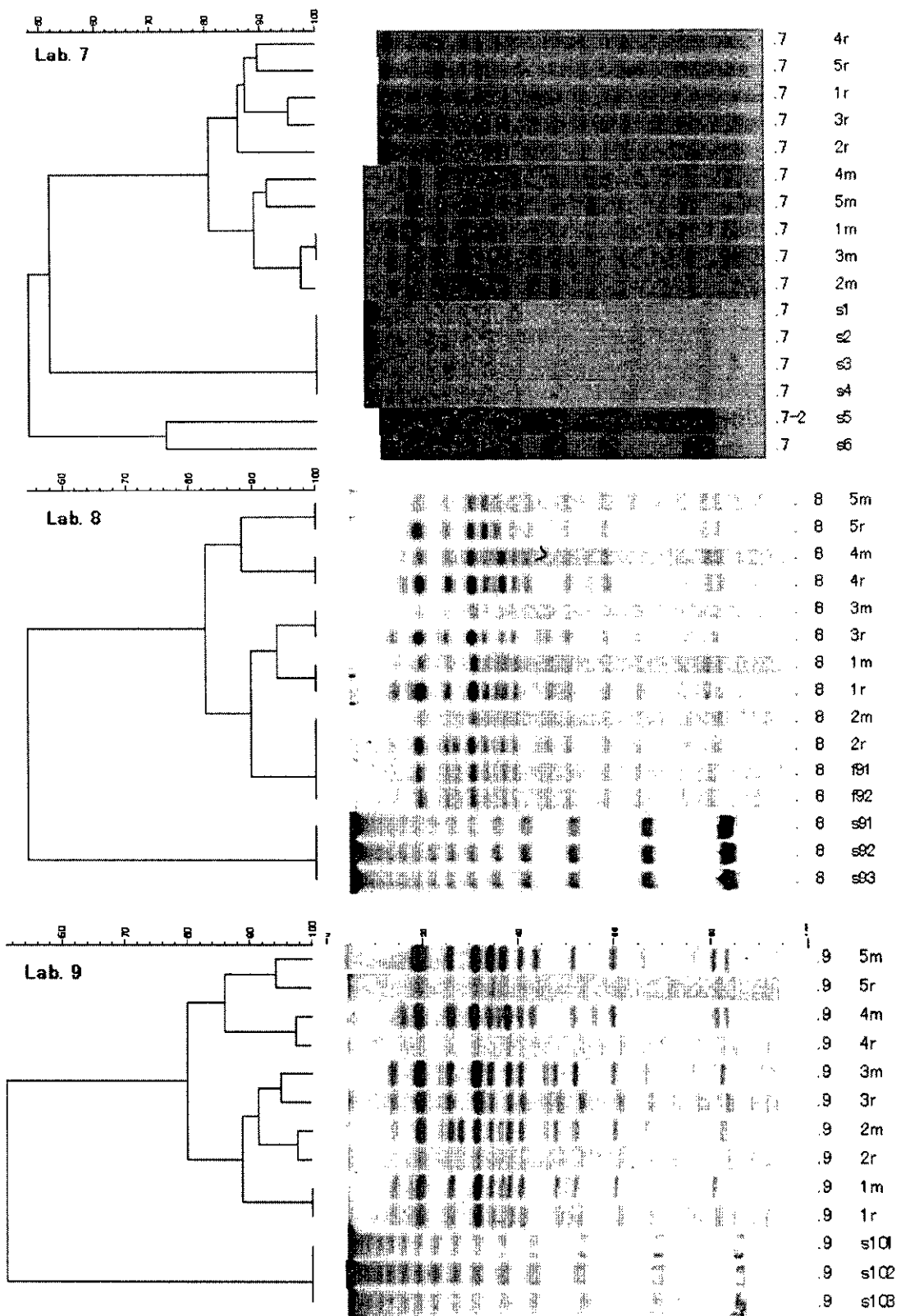


図 10 従来法と迅速法によって作成したプラグの比較（機関 7, 8, 9）



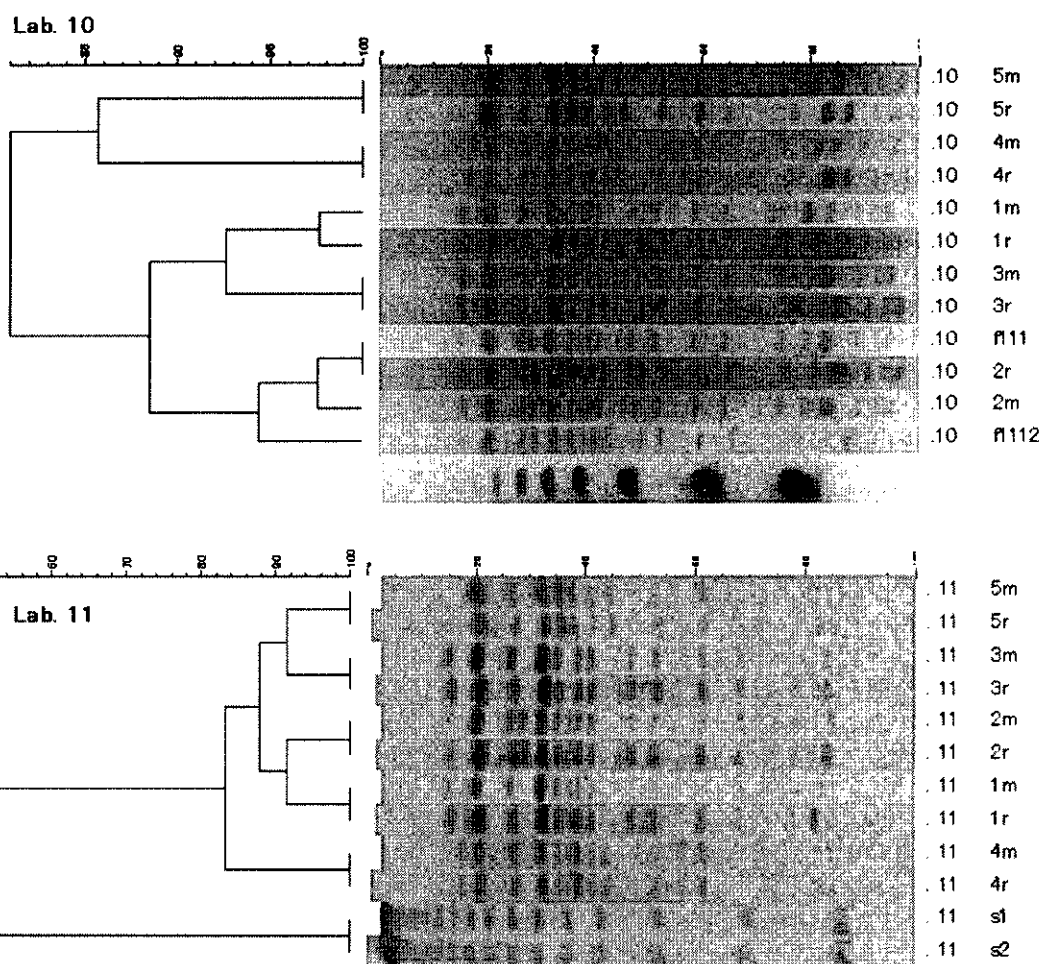


図 11 従来法と迅速法によって作成したプラグの比較 (機関 10, 11)

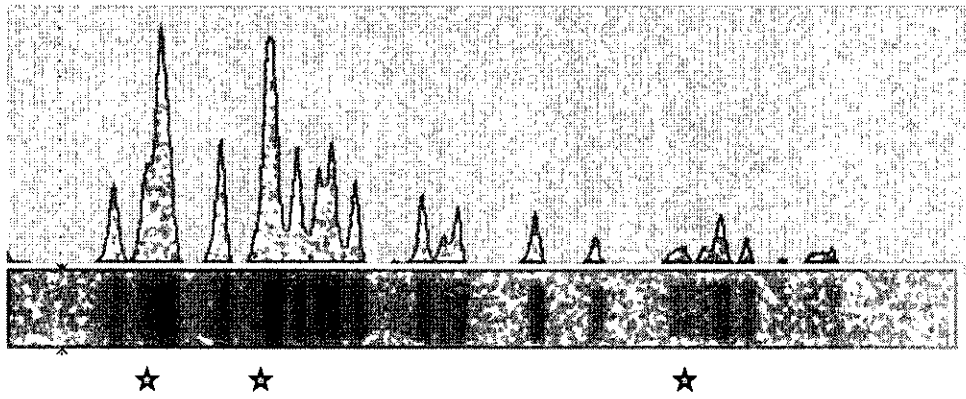


図 12 標準株 no.1 の PFGE 泳動像とデンシトメトリーカーブ

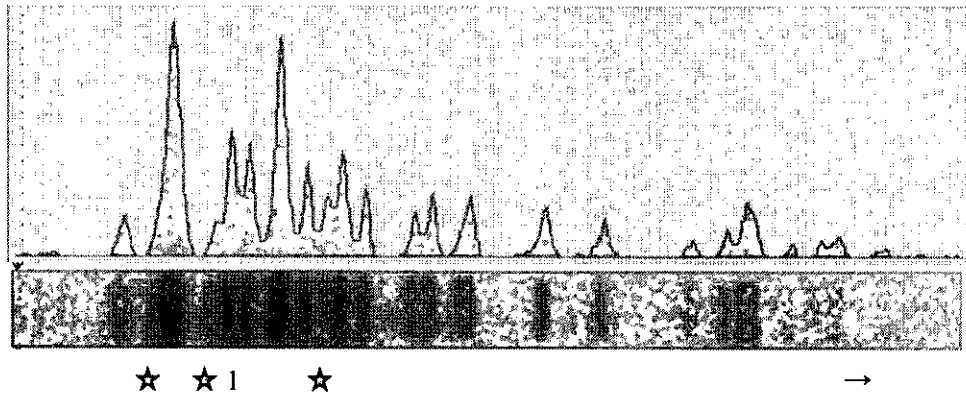


図 13 標準株 no.2 の PFGE 泳動像とデンシトメトリーカーブ

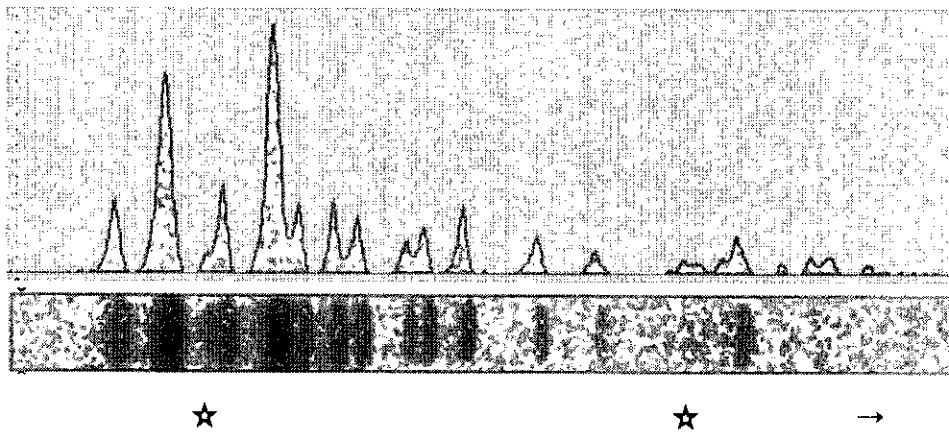
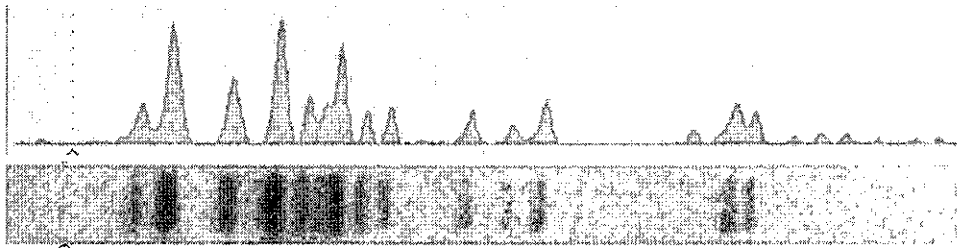


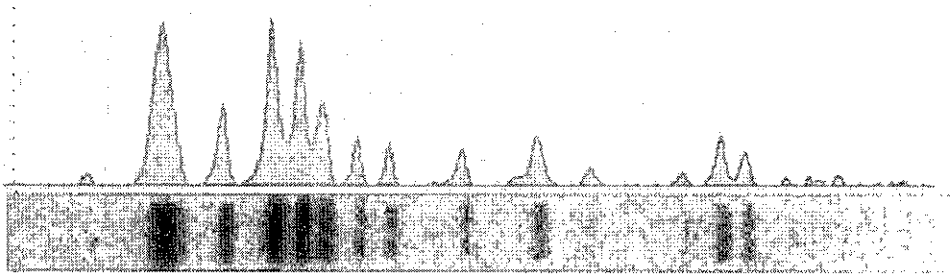
図 14 標準株 no.3 の PFGE 泳動像とデンシトメトリーカーブ



★

→

図 15 標準株 no.4 の PFGE 泳動像とデンシトメトリーカーブ



→

図 16 標準株 no.5 の PFGE 泳動像とデンシトメトリーカーブ

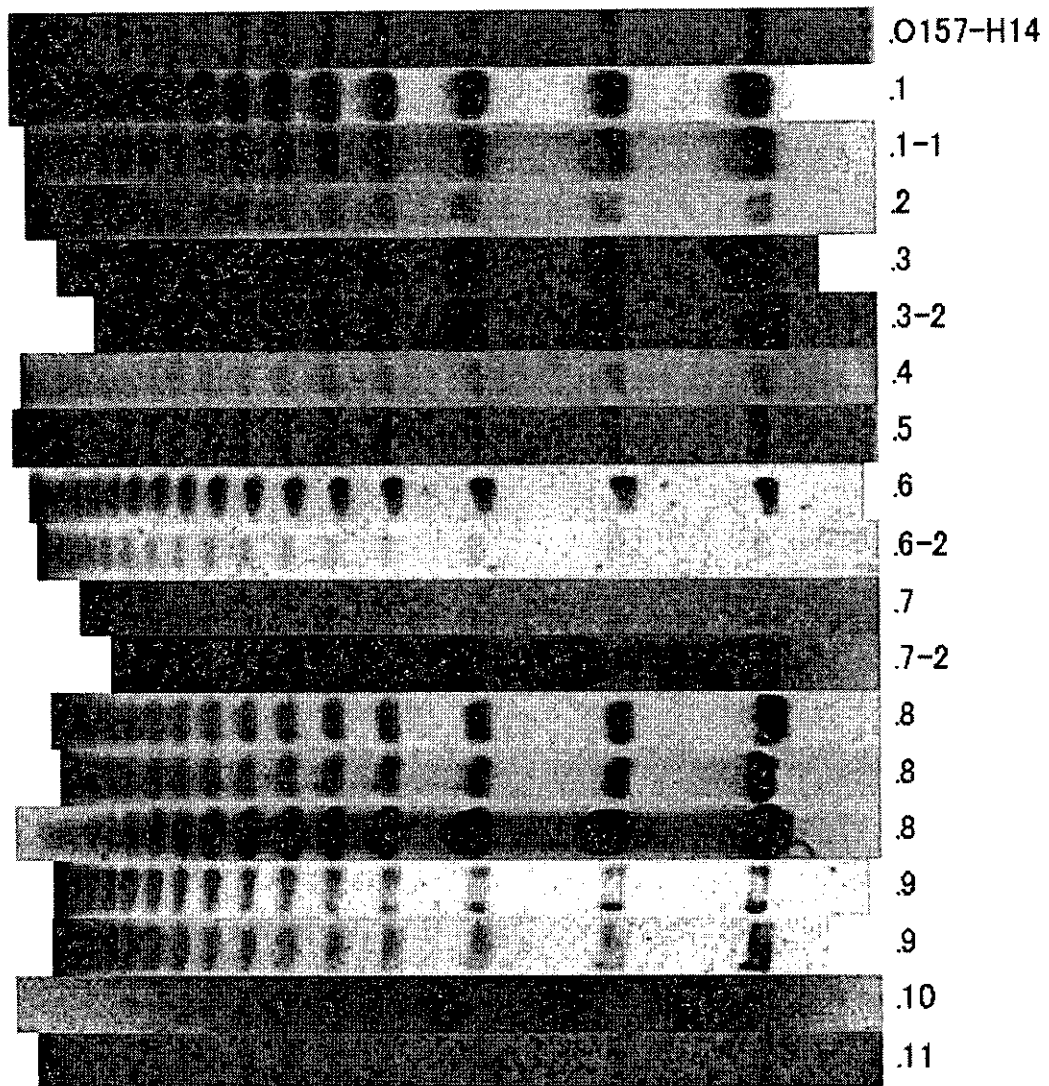


図 17 各機関の PFGE に用いた  $\lambda$ -ラダー (BIO-RAD 製) の泳動像