

3) 各機関で作製したプラグの同時泳動後の泳動像の比較

各機関で作製した菌株 No. 2 のプラグを福岡県保健環境研究所に送付し、全機関のプラグを同時に泳動し、泳動像を比較することにより、プラグ作製における問題点を検討した。

2. 供試菌株

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(図4)を使用した。

3. PFGEにおけるプラグ作成方法

1) 通常法(統一マニュアル)

平成9年5月に感染研で実施された研修会の内容を一部改変し、初心者にも分かりやすいようにポイントを詳述した統一マニュアル(図6)に従って実施した。

2) 迅速法

E. M. Ribotらの方法(J. Clinical. Microbiol., 2001, Vol.39, 1889-1894)を一部改変した方法(図7)で実施した。

4. PFGE 泳動条件

14℃の0.5×TBEバッファーで、6.0 v/cm, 4~8秒9時間, 8~50秒13時間

5. 画像取込方法

各機関での方法で取込み、画像の保存は TIFF形式、8ビット、圧縮なしに統一した。

6. 画像解析法

各機関で得られた画像データ(例:図8, 9)を福岡県保健環境研究所に電子メールで送信し、DNA解析ソフトで解析した。解析ソフトは、平成12及び13年度ではGelComper II(BIO-RAD, 英語版), 14年度ではFingerprinting II(BIO-RAD, 日本語版, 図10)を使用し、ソフトのマニュアルに従って解析した(図11)。

C. 研究結果

平成12年度: PFGE環境の調査

1) 各機関が実施しているPFGE条件

平成12年度時点で各機関で実施していたPFGE条件を表1から5に示した。

2) 標準株による精度管理

画像解析が可能であった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、Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]の条件で解析した結果、92-53%の類似度であった。感染研96212株[II a・II b・I]は100-62%、感染研981553株[II b・II b・I]は92-54%、感染研96132株[III a・ND・ND]は98-60%、感染研970753株[III b・ND・III]は97-46%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。

このように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像がスメアー状となり、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、λ-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。

3) 九州地区の O157 菌株の比較

12 機関で集められた O157 菌株 107 株を解析した。

a) 各機関別の解析

各機関別の画像をそれぞれ GelComper II を用いて解析した。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。

b) 機関全体での解析

機関の異なる菌株間で感染研 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 f・IV・IV] は、機関内では同一であったが機関を越えると相同性は 83%であった。さらに Vero 毒素 1 及び 2 産生型と 2 単独産生型との 2 種に分けて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。

平成 13 年度：PFGE 検査方法の統一

1) 画像解析結果

(1) 画像の保存形式について

① デジタル画像

画像の保存形式はファイル形式の指定のみであったため、フルカラー画像として取り込まれている場合や圧縮された画像が多かった。GelComper II で解析する場合、PFGE 後の泳動像は、グレースケール、8 ビット、TIFF 形式で圧縮無しの画像が必要であり、これに拠らないものは画像解析ができない。しかし、JPEG および BMP (ビットマップ) 形式で保存された画像は TIFF 形式 8 ビット、グレースケールにコンバートすると使用可能であった。フルカラー画像もグレースケールの画像に変換することは可能であった。しかし、フルカラーではデータサイズが大きくなりダウンロードに時間がかかった。また、画像を受け取るコンピュー

タが Macintosh の場合、不具合が多かった。

さらにコンピュータの OS およびインターネットに用いられるソフトウェアの種類やバージョンによって画像ダウンロードの可否が左右されることが分かった。

② アナログ画像

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。この作業には鮮明な写真として保存されている必要がある。1 機関では写真撮影装置が無く、感熱記録紙での保存であったため、バンドの確認作業が困難であった。しかし、デジタル画像の転送で実施されるパルスネットでは、アナログ画像は送信できないので何らかの解決方法が必要である。

(2) PFGE マーカーの認識

12 機関の PFGE で用いられた λ -ラダーをレファレンスマーカーと比較した。Dice (Tol 1.2%-1.2 %) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] で解析した場合、レファレンスマーカーと 100% 一致していた。昨年度マーカーそのものが 100% 一致しない要因について、阻害する要因として次の 3 点が挙げられた。

① マーカーのバンドが薄い。

② マーカーのバンドが濃すぎる。

③ 同一ゲル内のマーカー DNA 量の濃度差がある。

これら問題点は、13 年度ではほぼ改善された。特にマーカーレーン数をできるだけ多く入れることによって、使用可能なマーカーが選択できた。しかし、マーカーのバンドが薄いことを加熱により改善する方法は、ロット毎の予備実験が必要であった。

2) 標準株による精度管理

図 4 に示す 5 株について 12 機関で精度管理を実施した。13 年度は統一マニュアルを作成した結果、泳動像は各地研共に良好な結果が得られた (例: 図 12)。各標準株別にそれぞれ解析した。解析条件は、Dice (Tol 3.0%-3.0 %) (H>0.0%

S>0.0%) [0.0%-100.0%]で実施した。その結果、感染研標準株 960002 株 [I a: I: I] は、100-85.22%の類似度であった。コームから 2 番目のバンド(約 436.5kb 付近)は、3 番目のバンドと重なりショルダーとして確認されるバンドであるが、分離が困難である。感染研 960212 株 [II a: II b: I] は 100-93.65%、感染研 981553 株 [II b: II b: I] は 100-86.79%、感染研 970153 株 [III a: ND: ND] は 100-94.15%、感染研 960132 株 [III b: ND: III] は 100-93.05% の類似度であった。5 株ともに 48.5kb 以下のバンドは、不鮮明である場合が多かった(図 13)。当年度は Band-Tolerance 値を 3.0 にして比較した。同一機関で PFGE を行う場合には Band-Tolerance 値を 1.2 で実施した方がよいと考えられるが、異なる機種・施設間で実施する場合には Band-Tolerance 値を 3.0 程度に設定する必要があると考えられた。また、精度管理に使用した5株は、194-291kb間のバンド数が多く、現在の PFGE 泳動条件では分離しづらいため、近似度に影響が出やすいと考えられる。PFGE 泳動条件については、総合的な検討が必要であると考えられる。

12 年度の問題点の改善度について下記に示す。

① 被検菌株の DNA 濃度の調節

マニュアルを作成し、ほぼ改善された。

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、λ-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、機器の整備等複数の要因が考えられる。再度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

マニュアルを作成することにより一部施設を除き改善された。改善されていない施設は「染色及び脱色」の行程ではなく、写真撮影の段階で原因があると考えられた。

3) 各地研分離株の検討

12 機関で集められた O157 菌株 60 株を用いて

解析した。感染研に送付され PFGE 型が [II a: II a: I、#577] と診断された菌株を交えて解析を行った。解析条件は Dice (Tol 3.0%-3.0 %) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] で実施した。その結果、PFGE 型が [II a: II a: I、#577] 株は、泳動された地研別にはほぼ 100-95% の類似度であった(図 14)。また、全体での比較では、精度管理株で一致率の高かった機関間では #577 株の一致率も高かった。しかし、#577 株に見られる 194-291kb 間のバンドは、現在の PFGE 泳動条件では分離しづらい(図 13)。分離能がよければ 6 本として認識できるが、ほとんどの場合は 5 本として認識される。これらのことは近似度に影響をあたえる要因であった。

平成 14 年度：画像解析の試行準備

1) 画像処理について

各研究協力機関から福岡県保健環境研究所に電子メールで送信された。当年度は画像のファイル形式については、詳しく指定していた(図 15)ので、殆ど問題がなかった。画像のサイズについては特に指定していなかったため、機関により画像サイズが 0.3-1.2 MB とまちまちであったが、解析時に問題となることはなかった。ただし、画像を保存する場合に、ゲルを直接保存したものと一旦写真に撮って保存したものでは画像の鮮明度に差違が見られた。特に泳動は全く問題ないが、写真撮影時に泳動像が鮮明に撮れていないケースがみられた。また、感熱紙から保存された画像はバンドが鮮明でなく解析困難であった。

2) 通常法と迅速法との比較

O157 PFGE のプラグ作成方法について、通常 4 日で行われている通常法と 2 日間で行う迅速法について図 4 に示す標準株 5 株を用いて各機関で比較検討した(例:図 16)。迅速法を試行実施した 10 機関中 9 機関で PFGE の泳動像を得ることができた。9 機関での従来法と迅速法で得られた標準株 5 株について各々比較した。解析に用いたトレランスは、最適化 1%、バンド比較トレランス 1.23%、フィンガープリント内のトレランス変化

率 1%で、13 年度より厳しく解析した。その結果、迅速法と従来法は 90%以上の相同性であった。100%の相同性が得られなかった原因は、方法の違いによるものではなく、むしろ①2 法を同一ゲルで流したか流さなかったか、②DNA の移動度が早く 25kb 以下のバンドがゲル上に残っていない、③ショルダー部分のバンドを認識できたかできなかったか等の問題であることが判明した。特に標準株として使用している 5 株中 no.1, 2, 3 は、現在の PFGE 泳動条件では分離が悪くショルダーとなりバンド検索時にバンドと認識できたりできない場合があり、バンドの違いとして相同性を比較する場合に違いとなって現われてくる。また、5 株いずれも 25kb 以下のバンドは輝度が低い場合、バンド認識が不安定であった。さらに小さなサイズの DNA フラグメントはゲルから流れ出てしまっているケースもあり、バンド数が少なくなり「バンド数の違い」となって相同性に影響を及ぼしていた。

3) λ -ラダーによるゲル標準化における問題点

λ -ラダーでゲルの標準化を行う場合、 λ -ラダーの影響を大きく受ける(図 17)。14 年度は 13 年度に比べ λ -ラダーの泳動状況は良くなかった(図 18, 19)。各機関共に λ -ラダーの適切なバンドを得るのに苦慮した。メーカーから熱処理を行うことにより改善されるとの情報があったが、熱処理条件が難しく(図 20)、適切なバンドが得られていないケースもあった。特に過加熱な場合ブロードなバンドとなり、ピーク認識では複数のピークが検出された(図 21)。またピーク認識が困難なため、左右の移動度に微妙な影響を及ぼした。同一菌株について機関間の相同性を見る場合、PFGE 泳動ゲルが異なるとマーカーやバッファー温度により複合的に移動度が異なり、微妙な違いを生じ、相同性の違いとなって現われる。

4) 同一プラグを使用した各機関での泳動像の比較 (—泳動における問題点の検討—)

各機関で作成・泳動した菌株 no.2 の解析及び福岡県保健環境研究所で作成し、9 機関で

泳動した画像(図 22)の解析結果では、100%一致率を見るものはいずれも同一ゲルで流したものの、あるいは移動度が近似しているものであることが判明した。他の差違は 450kb 以上のスミア一状バンドの影響や 25kb 以下のバンド数の違い、ショルダー部分のバンド認識の違いに起因していた。

5) 各機関で作製したプラグの同時泳動後の泳動像の比較 (—プラグ作成における問題点の検討—)

各機関から福岡県保健環境研究所に送付されたプラグを同時に泳動した画像を図 23, 24 に示した。機関 2 のプラグは、PFGE ゲルに装填時に壊れ、泳動状況が悪かった。また機関 3 についてはスミア一状となったため、解析できなかった。同一ゲル上での比較であるため、解析のトレランスは、最適化 0%、バンド比較トレランス 1.23%、フィンガープリント内のトレランス変化率 0%で実施した。すべてのバンドを自動で認識した結果、バンドが不明瞭であった機関 2 を除いた場合、一致率は 91.8%であった(図 25)。また機関 6 については、535kb 付近のバンドが欠落し、430 及び 110kb 付近に他の機関と異なるバンドが 2 本検出された。機関 2 及び 6 を除いた場合、5 機関と 3 機関との 2 つのクラスターに分かれ、一致率は 97.07%となる。2 つのクラスターの違いは 1 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(図 25)。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。各機関で泳動されたすべての菌株 no.2 のプラグの泳動像は、すべて良好であった。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

現在、EHEC に関してすべて感染研において PFGE 型別が実施されている。一方では各機関においても EHEC を含めた種々の菌種について集団・散発事例の菌株について比較し、その関連性について解析を行っている。しかし、機関相互のデータを交換し相互の関連性を比較するいわゆるパルスネットには至っていない。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。平成 12 年度では機器や PFGE 条件や方法に関する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。

平成 13 年度は、12 年度の問題点を解決するため PFGE 実施方法の詳細なマニュアル化、統一菌株及び各機関分離株を使用した PFGE 像の比較を行った。その結果、平成 12 年度と平成 13 年度の精度管理の結果を比べると明らかに統一マニュアルの作成の成果が現れていると考えられた。一方、現時点で九州地区参加機関でのパルスネット実行には、PFGE および画像データ転送・ダウンロードにおける改善並びに整備が必要であることが分かった。PFGE では、①泳動槽の電流の点検、②チラー槽の点検、③イルミネーター上部ガラスの清浄点検、④イルミネーターの照度の確認、⑤写真撮影装置の点検、⑥PFGE 泳動用ゲル作成と充填時の注意、⑦制限酵素処理における注意等が今後の課題である。また、画像データ送信・ダウンロードをスムーズに実行するためには、予めネットワーク機関間でのコンピュータハードおよびソフト両面の調整並びに画像作成におけるマニュアル

が必要であることが分かった。本研究ではホスト（画像データをダウンロードする側）が Macintosh で各ブランチ（画像データを送付する側）が Windows であったため、支障が多かった。しかし、対応するソフトを準備すれば問題解決は可能であったが、実用的でないと考えられた。特に解析ソフト GelComper II は、Windows 対応版であり、Windows で統一した方が現実的である。また、画像データの保存方法は、解析ソフト GelComper II の使用どおり「グレースケール、8ビット、TIFF 形式、画像サイズ 300-800kb 程度」と明記する必要があることが判明した。

平成 14 年度は、13 年度に判明した機関間でのインターネット環境調査を行った。また、画像を受け取るコンピュータを Windows にし、さらに大容量の画像をダウンロードできる環境を作った。また、画像の保存形式を徹底したことによって、画像授受における問題は発生しなかった。一方、5 種の菌株を 3 年間使用し各機関で作成・泳動した PFGE 画像による DNA 解析の結果、当初はプラグの作成上の問題点も多々あったが、統一マニュアルを作成することによって解決した。しかし、なお同一菌株が 100%一致しない問題を解明するため、「同一機関で作成したプラグを各機関で泳動すること」「各機関で作成したプラグを一機関で同時に泳動すること」を試みた。その結果、改めてプラグの作成には全く問題点が無く、λ-ラダー・泳動・写真に問題があることが判明した。

しかし、今後パルスネットを全国規模で実施するには法整備等今後整備すべき要件(図 26)の解決が必要である。また、事例間の関連性を考察する場合、図 27 に示すような PFGE パターンに関する問題について統一見解を出す必要がある。

一方、14 年度に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。このことにより早期事件解決が可能となる。

E. 結論

1. PFGE 用プラグ作成について

統一マニュアルによりプラグ作成を行うことにより、良好なプラグが作成可能である。

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
- ② PFGE 機器の管理と保守点検
- ③ バッファー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. 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.

小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 齊藤志保子, 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.

3. 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*

堀川和美, 村上光一, 牛から検出される腸管出血性大腸菌の特性, 第 5 回腸管出血性大腸菌シンポジウム, 福岡市, 2001. 6. 15.

堀川和美, 村上光一, 人及び牛から分離された大腸菌の血清型と病原因子について, 第 54 回日本細菌学会九州支部総会, 北九州市,

2001. 9. 7.

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.

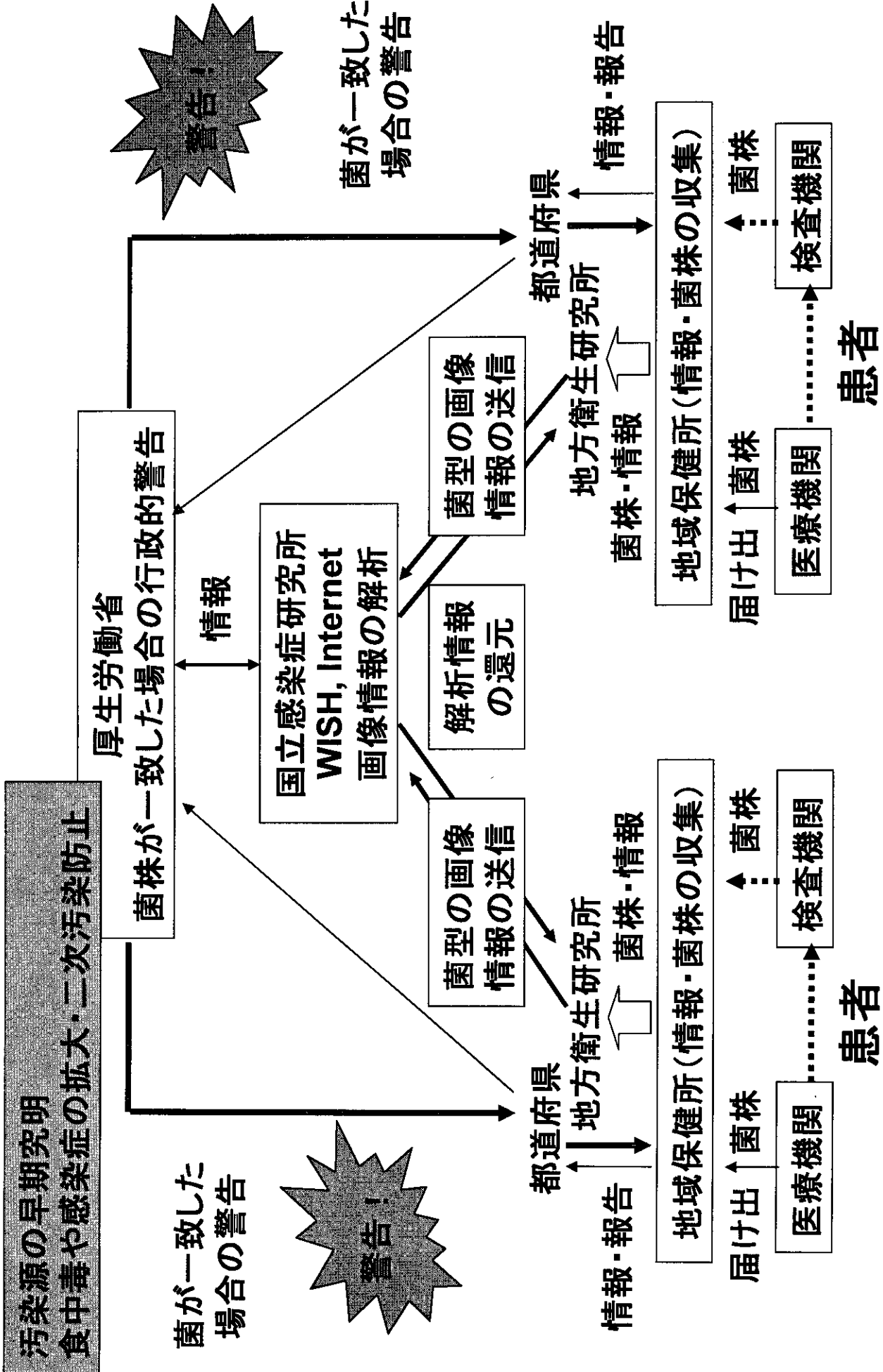
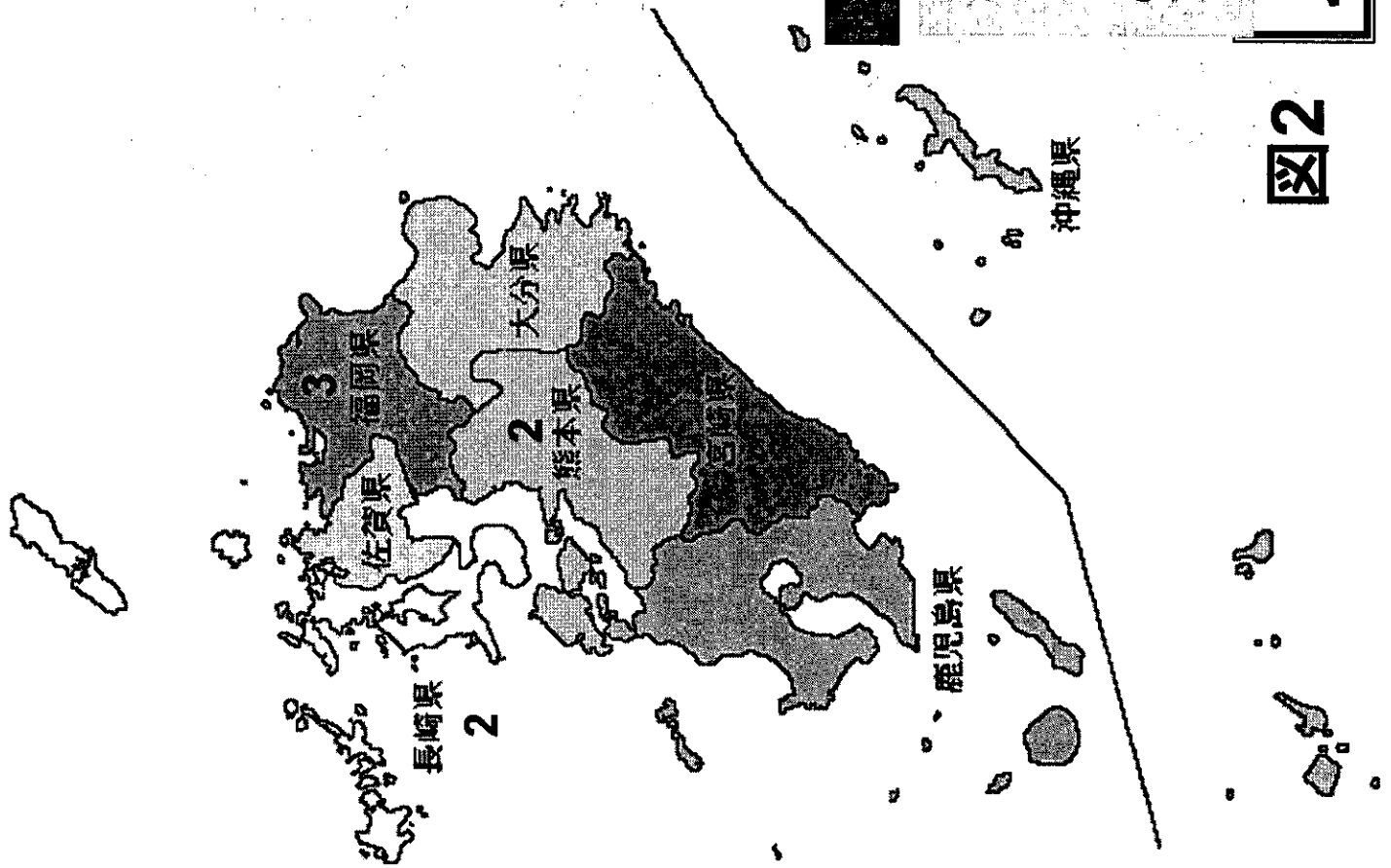


図1. 標準パルスフィールド電気泳動法(PFGE)の情報ネットワーク



パルスフィールドゲル電気泳動法の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

九州地区12地方衛生研究所

図2

図3 「PFGEを用いた遺伝子解析による細菌感染症の疫学調査 のための全国的ネットワーク(パルスネット)構築」

平成12年度

- ・標準菌株を用いたPFGE(11機関へ福岡県から菌株を送付)
- ・平成12年に分離されたO157代表株の解析

平成13年度

- ・標準菌株を用いたPFGE(11機関へ福岡県から菌株を送付)
- ・平成13年に分離されたO157:H7 #577株の解析

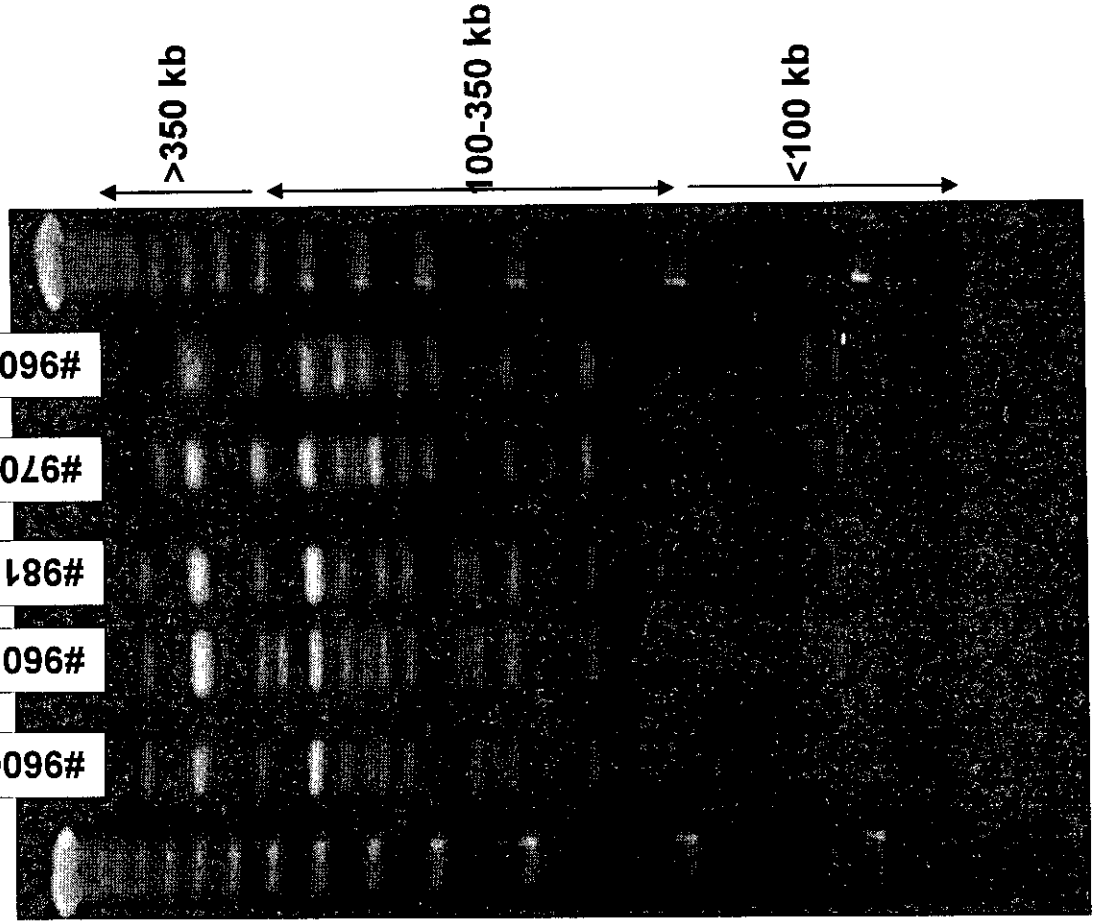
平成14年度

- ・標準菌株を用いたPFGE(11機関へ福岡県から菌株を送付)
- ・ゲルの保存性の確認(機関相互の作成済みゲルの送付)
- ・PFGE迅速法の開発

図4. 標準菌株を用いた精度管理

使用した腸管出血性大腸菌O157

| 感染研番号 | 分離年 | VT型 | <100kb | 100-350kb | >350kb |
|---------|------|-----|--------|-----------|--------|
| #960002 | 1996 | 1+2 | I a | I | I |
| #960212 | 1996 | 1+2 | II a | II b | I |
| #981553 | 1998 | 1+2 | II b | II b | I |
| #970753 | 1997 | 2 | III a | ND | ND |
| #960132 | 1994 | 2 | III b | ND | III |



PFGE泳動条件

4 - 8 sec, 9 h

8 - 50 sec, 13 h

11 地方衛生研究所

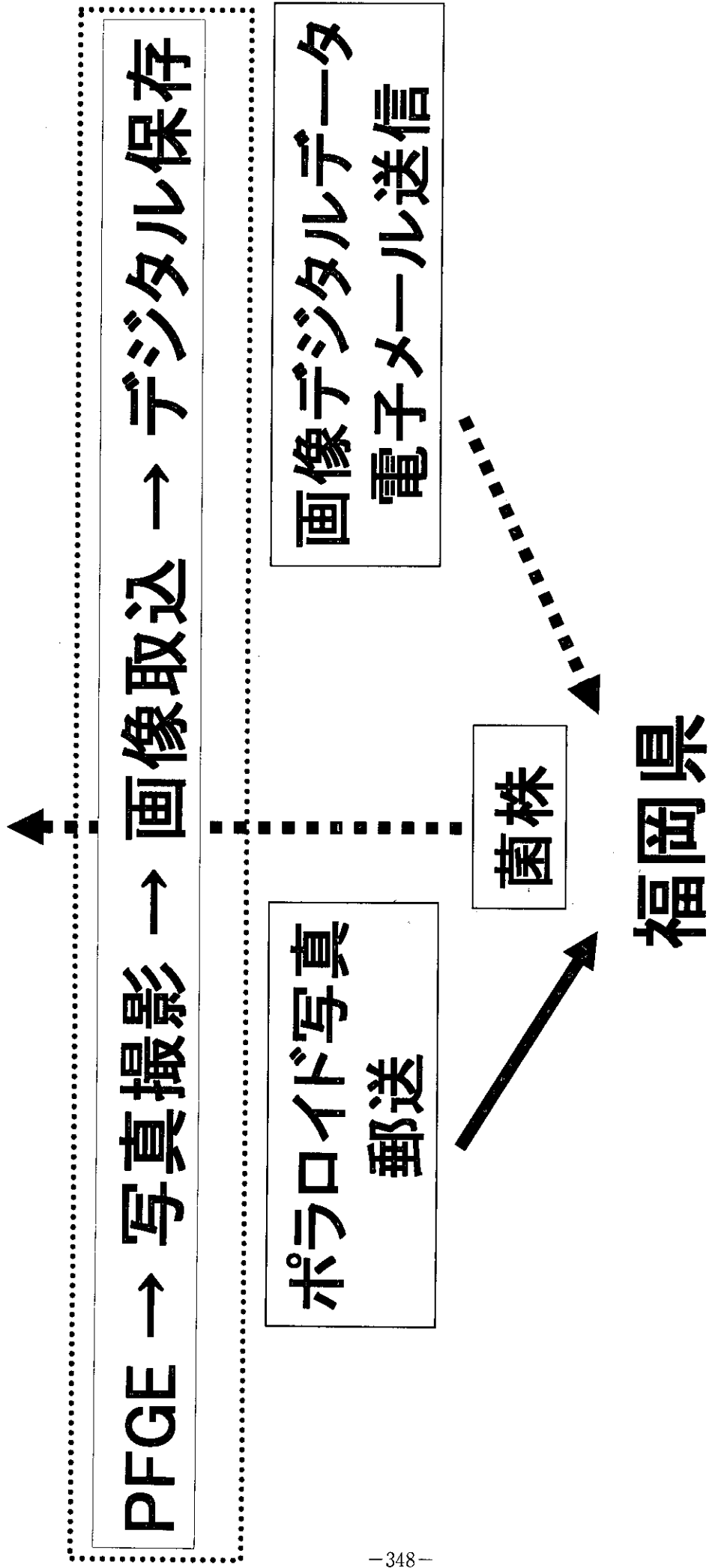


図5 問題点の明確化および解決

図6 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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) 固化したアガーブロックを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 μ l に入れ、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 (XbaI, 30unit / sample plug、BSA を加える、ペーリンガーマソヘム) 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 μ 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ポーツと膨れる。
 - ・ 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 μ 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 7. 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ l 分注し、(13)で制限酵素バッファーで馴染ませ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 μ 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—マーカーを装填する。

* 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ースを充填し、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(量を守ること)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 μ 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。

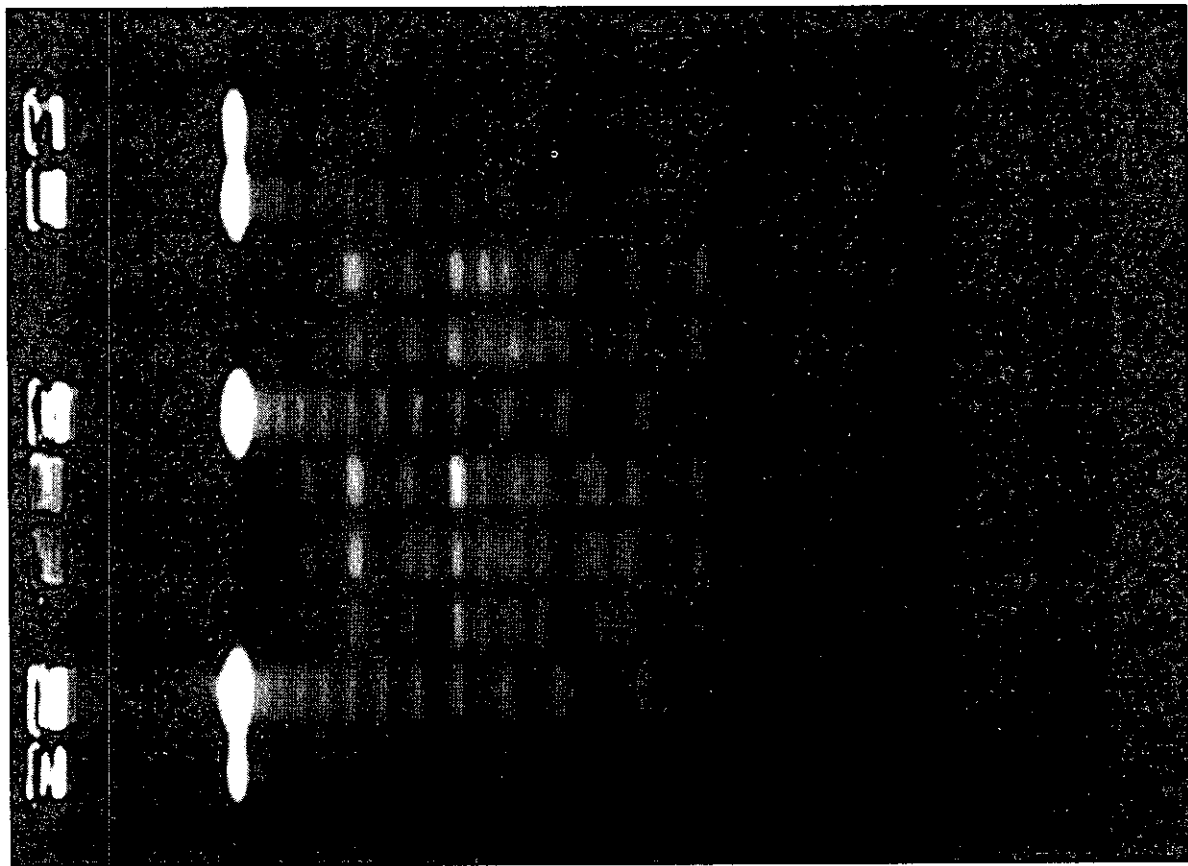
* 染色・脱色は静かに振盪して行う。また操作中のトレイはアルミ箔などで蓋をし、遮光する。

(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。

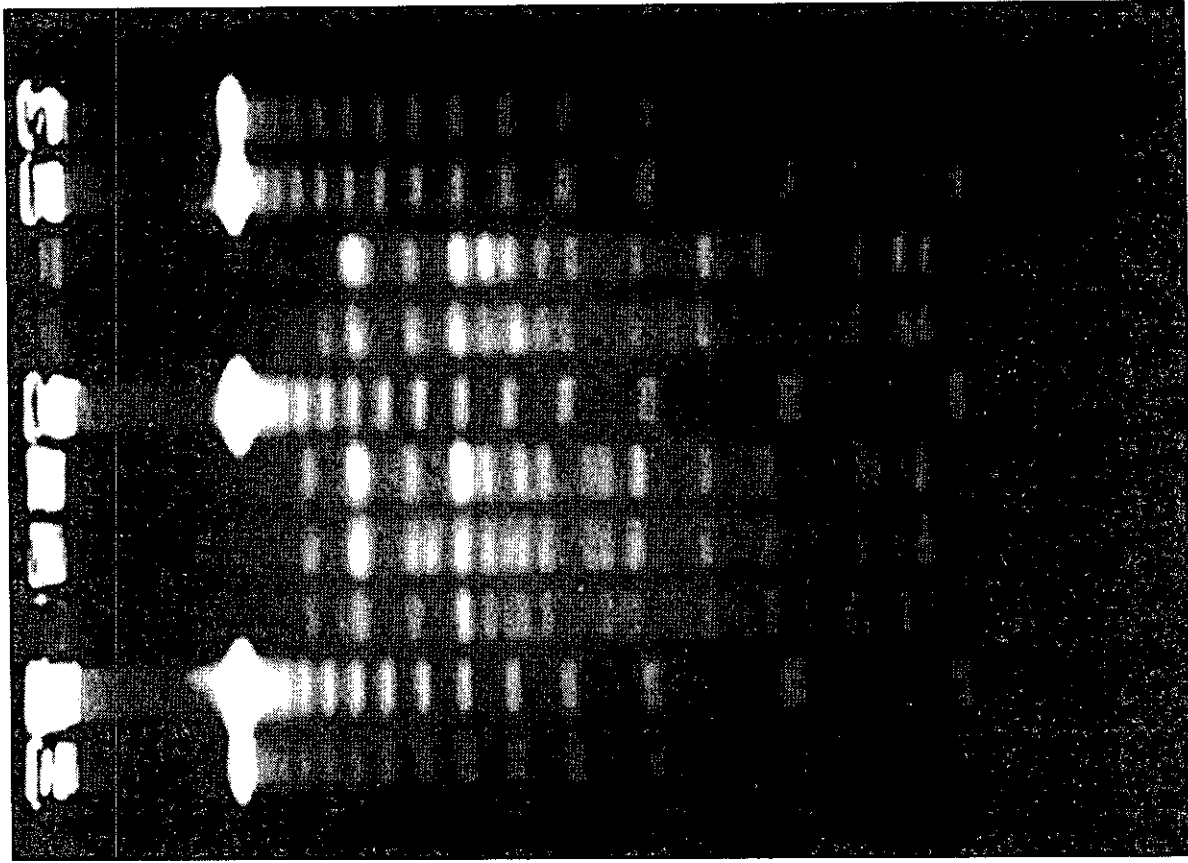
8. 写真撮影

(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。

図8



デジタル画像取込用



バンド目視確認用

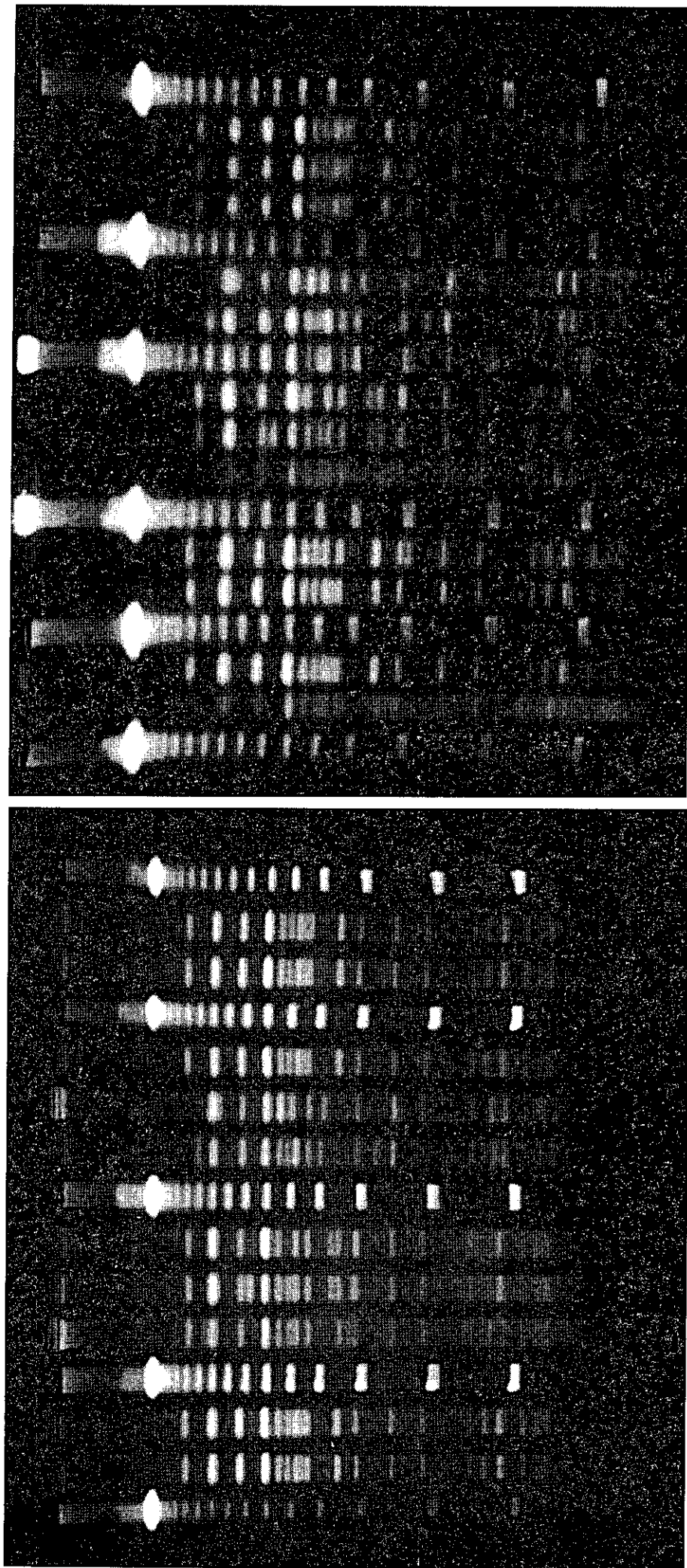


図9 画像処理のしやすい泳動像

- ・ マーカーが複数入っている.
- ・ DNA濃度が適量である.
- ・ 脱色洗浄が十分である.
- ・ 写真が良く撮れている.

Fingerprinting™ II

Software



Bio-Rad Laboratories, Inc.
 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547

| | | | |
|----------------------|---------|---------|----------|
| HomeDir | Analyze | New | Settings |
| DemoEase horikawa | Inspect | Filters | Exit |

図11. PFGE解析の手順

画像の取込

- ①レーンの認識・直線化
- ②レファレンスバンドの認識
- ③ゲルの標準化
- ④自動バンド認識

目視によるバンド確認



菌株間の相同性について解析