

とした。デンドログラムについては、分離株全てを含むデンドログラムではなく各々のサブタイプの代表株についてのみ作成した。したがって、一部には、異なるサブタイプである株が同一クラスターに属する場合が出ている。容易なアクセスで情報が入手できるように Internet 利用による情報の提供も検討中である。具体的には、感染研のホームページ上で地研等に対してユーザー名とパスワードによる管理を行っての限定公開を想定している。

D. 結論

標準化プロトコールを用いることで高精度の PFGE 解析結果が得られ、CDC とのデータの互換性も確保できた。新サブタイプ法により、頻度の低い共通パターンでも見逃すことなくデータベースから検出でき、広域共通パターンを示す株の探知に結びついていると考えられた。また、より迅速に解析情報を共有化するために、容易なアクセスが可能である Internet 利用による情報公開も引き続き検討すべきと考えられた。

参考文献

- 1) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. Evolving from PFGE network as PulseNet Japan to participation in PulseNet Asia Pacific. PulseNet News Special Edition, 2004
- 2) Shima, K., Terajima, J., Sato, T., Nishimura, K., Tamura, K., Watanabe, H., Takeda, Y., and Yamasaki, S. Development of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for the Epidemiological Analysis of Shiga Toxin-Producing Escherichia

coli. Journal of Clinical Microbiology; 42, 5205-5213, 2004

- 3) Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kuniyosi, H., Kinjo, Y., Terajima, J., Watanabe, H., Kobayashi, J., Swaminathan, B., Braden, CR., and Dunn, JR. Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation — Okinawa, Japan, February 2004. MMWR; 54, 40-42, 2005

- 4) Hirose, K., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., Arakawa, E., Takai, N., and Watanabe, H. Antimicrobial susceptibility of Shigella sonnei isolates in Japan and molecular analysis of S. sonnei isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. , 49, 1203-1205, 2005

- 5) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄。菌株レベルの同定：パルスフィールドゲル電気泳動法による菌株のサブタイピング。腸内細菌学雑誌、18, 117-122, 2004

図1 Dendrogram of EHEC 0157:H/-isolates in Japan (1987 entries)
 (2004/1/1-12/30) Tol:1.2%

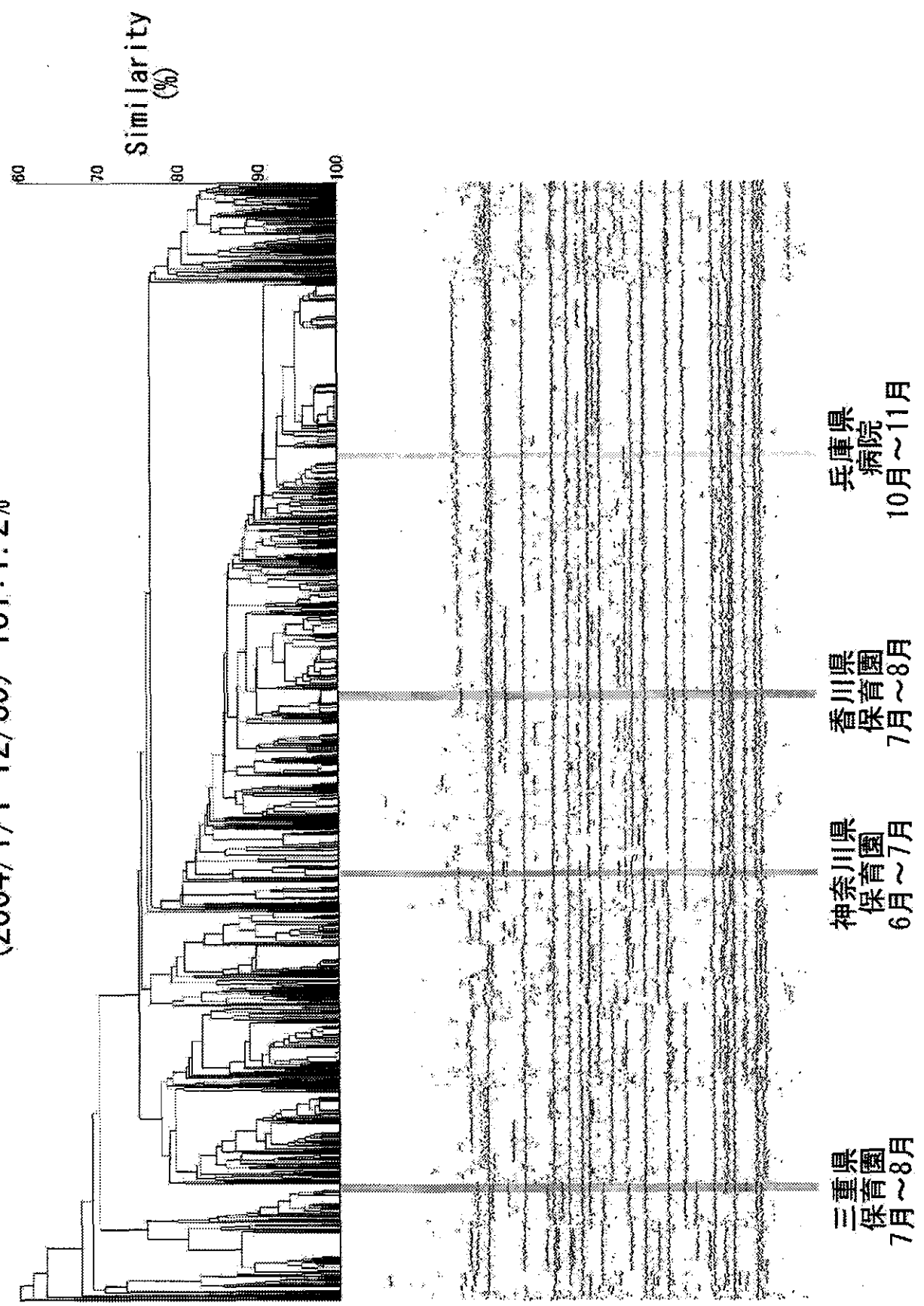


図2 Dendrogram of EHEC O26 isolates in Japan (507 entries)
 (2004/1/1-12/30) Tol:1.2%

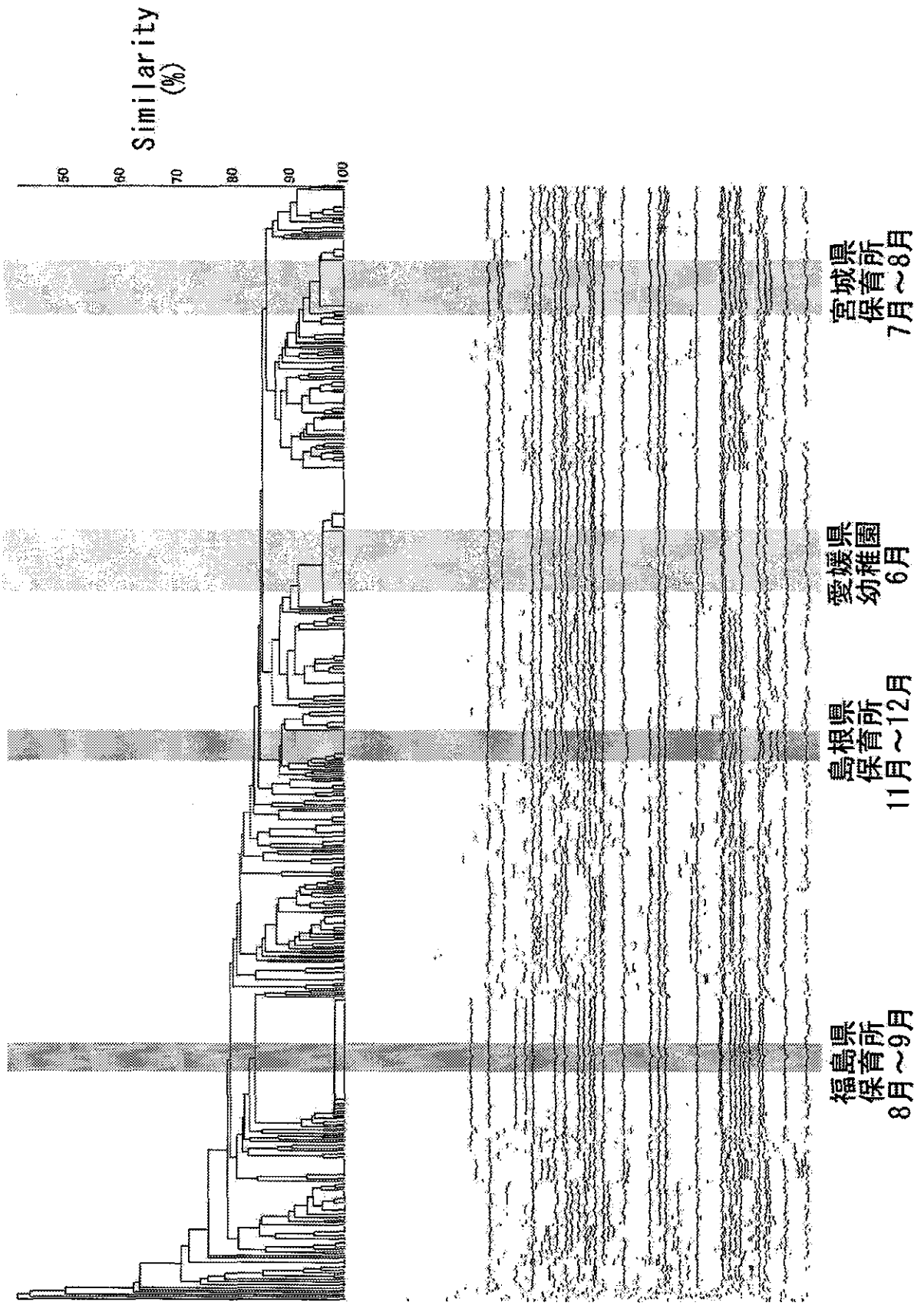
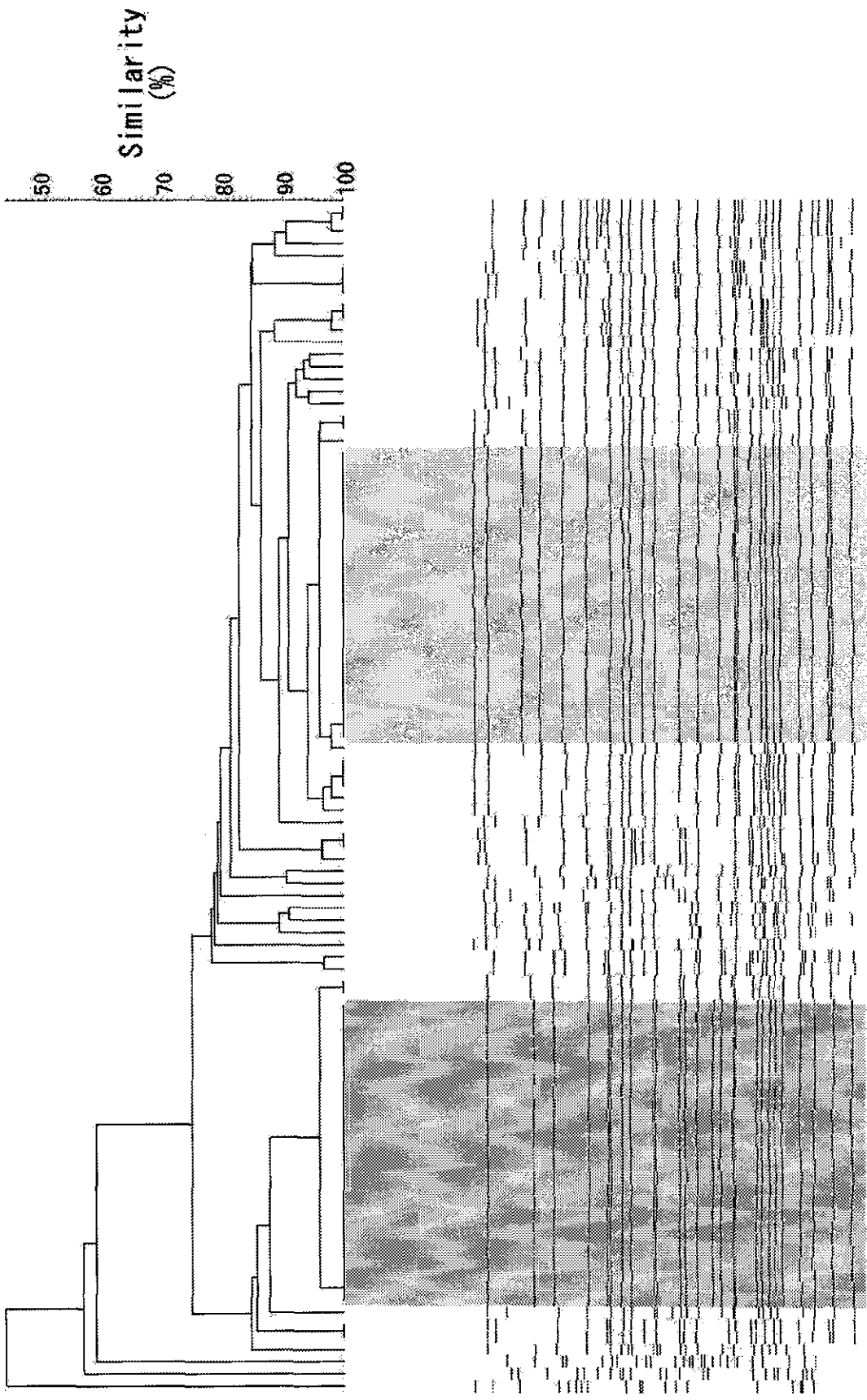


図3 Dendrogram of EHEC O111 isolates in Japan (97 entries)
 (2004/1/1-12/30) Tol:1.2%

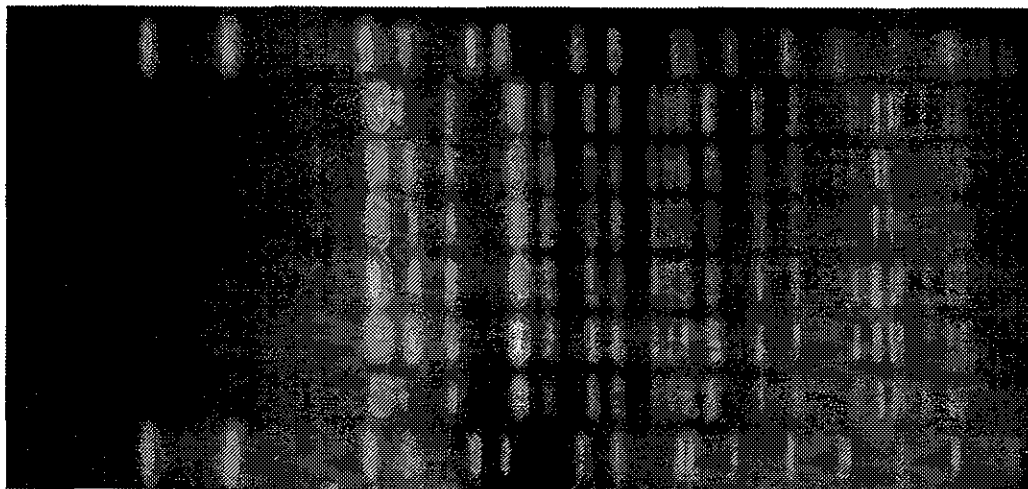


石川県
 高等学校
 7月

福島県
 幼稚園
 10月~11月

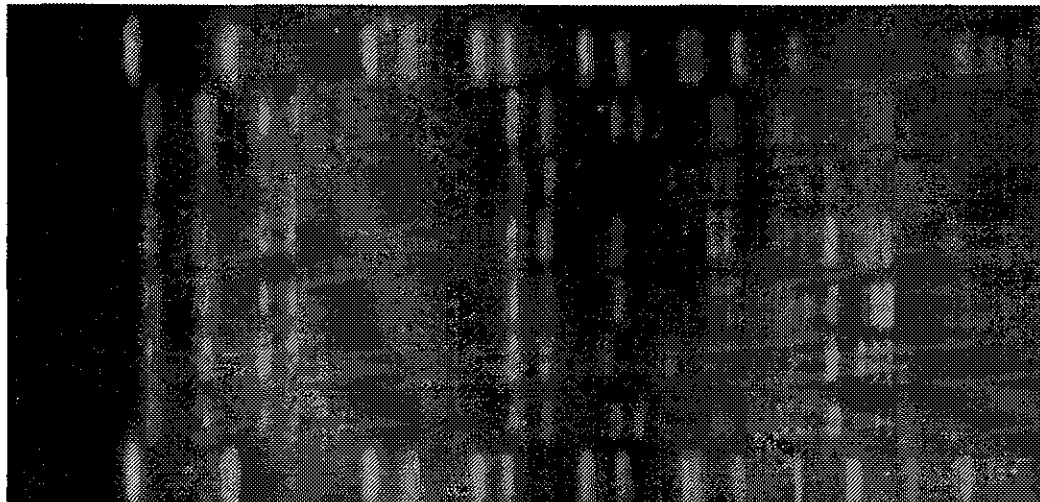
図4 Xba I digestion で同一クラスターとなるO157:H7

1780
2023
2365
2615
2767
534



Xba I

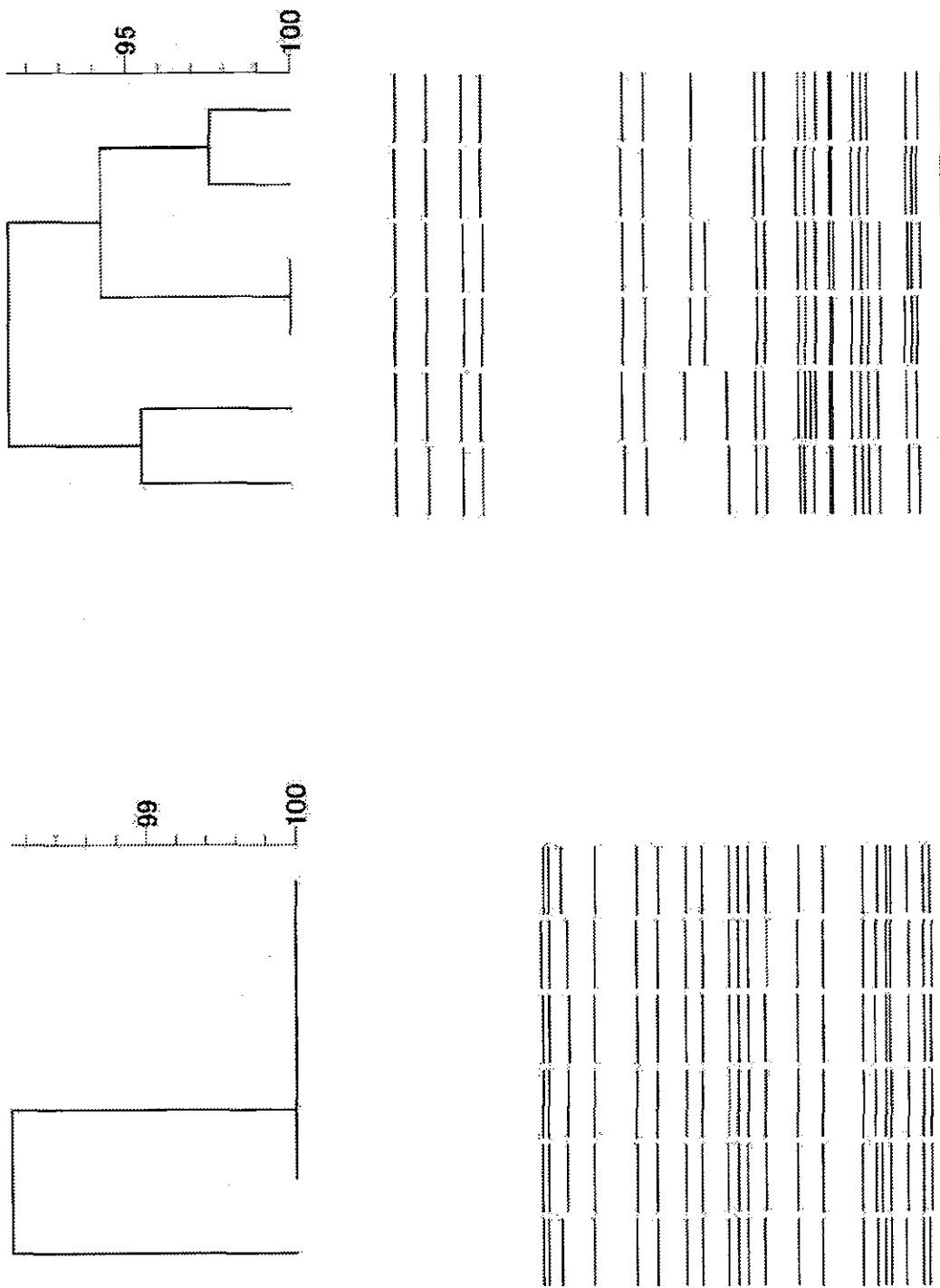
1780
2023
2365
2615
2767
534



Bln I

図5

同一クラスターとなるO157:H7株のdendrogram



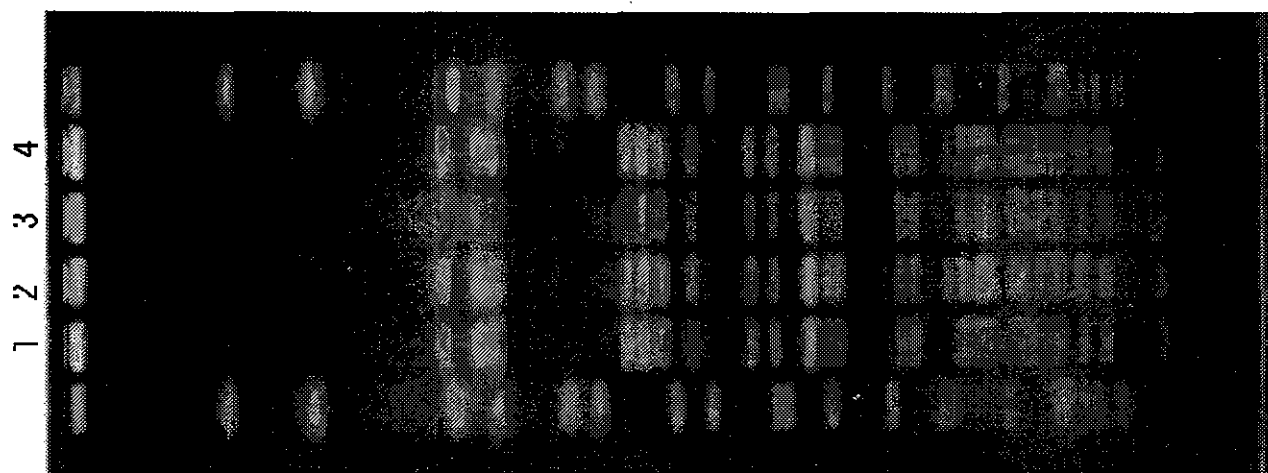
534 2767 2615 2365 2023 1780

Xba 1

2767 2023 534 1780 2615 2365

Bln 1

図6 ハワイでのS.sonnei集団発生事例由来株のPFGEパターン



Lanes 1,2 日本

Lanes 3,4 USA

图7

Number of various PFGE type isolates in 2004

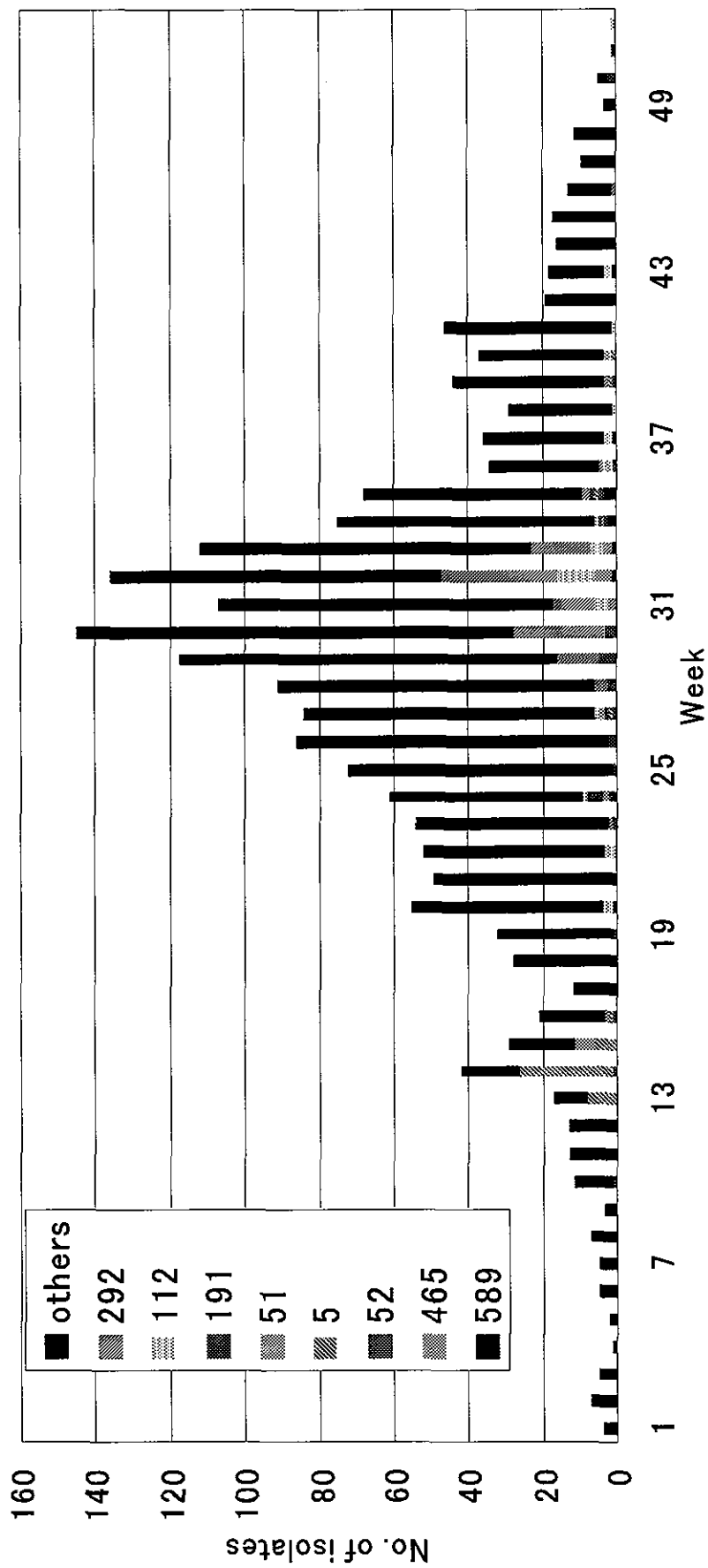


図8 2004年 PFGEパターン的一致している事例の分布図(1)

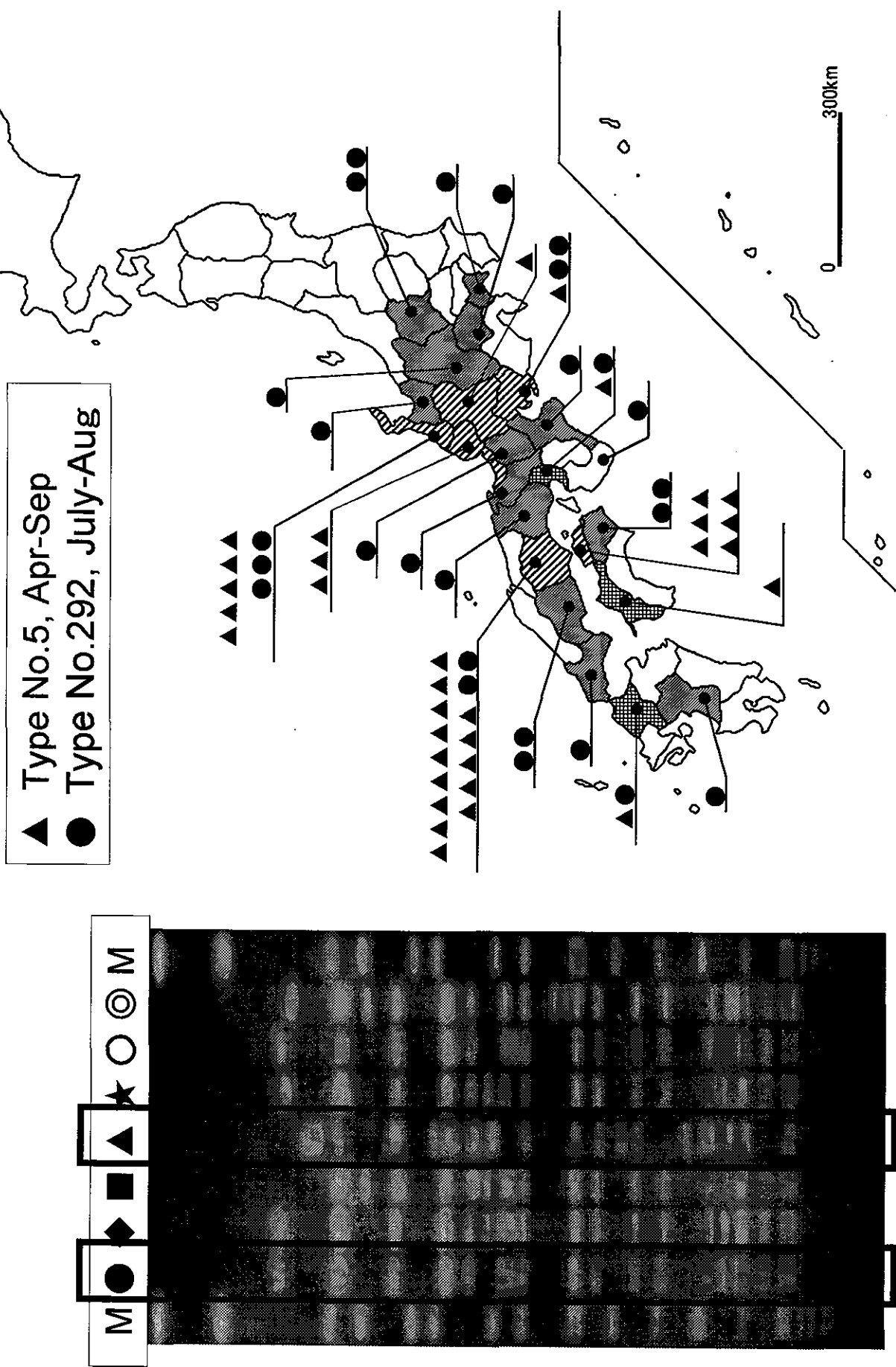


図9

2004年 PFGEパターンの一致している事例の分布図(2)

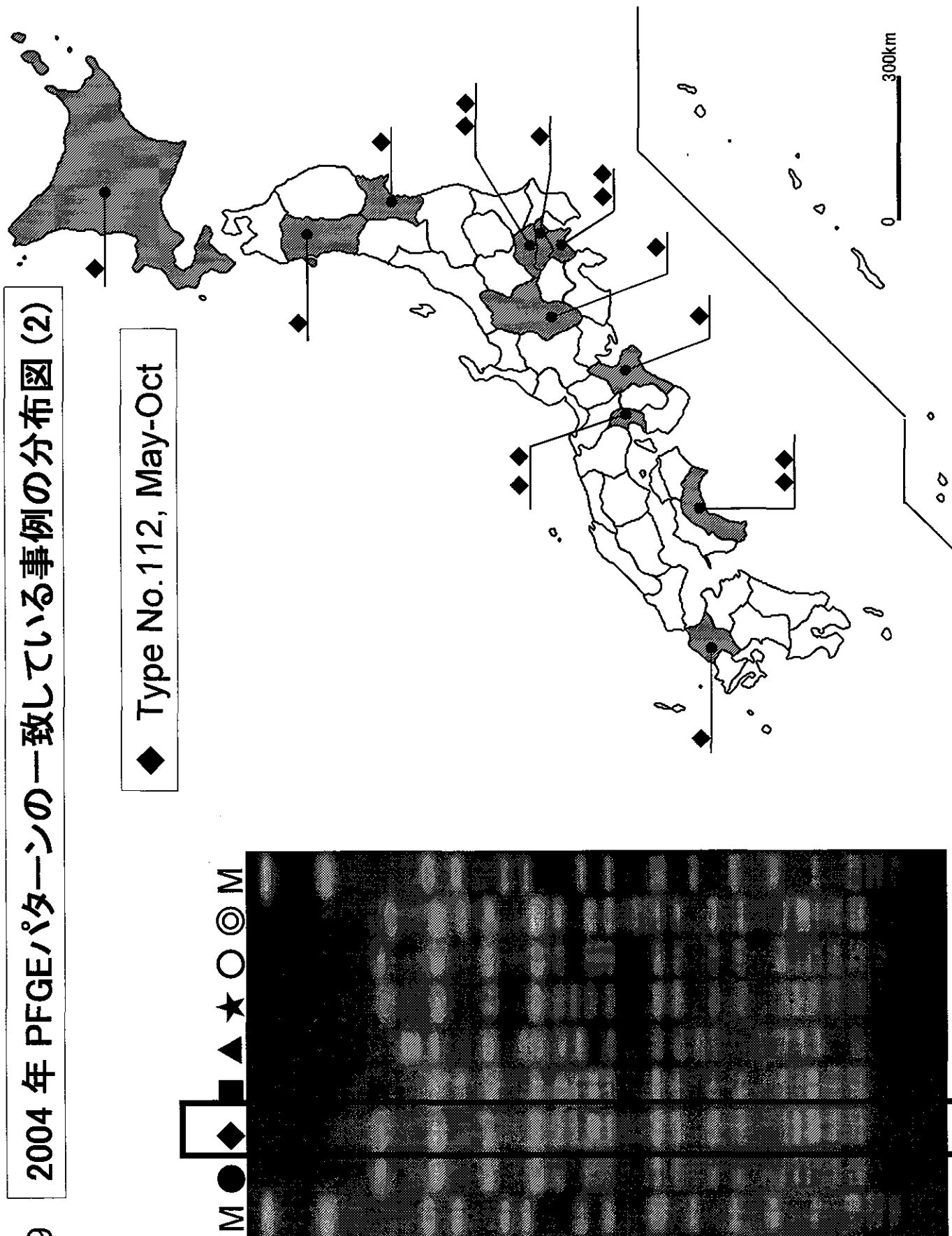


図10 2004年 PFGEパターンの一致している事例の分布図(3)

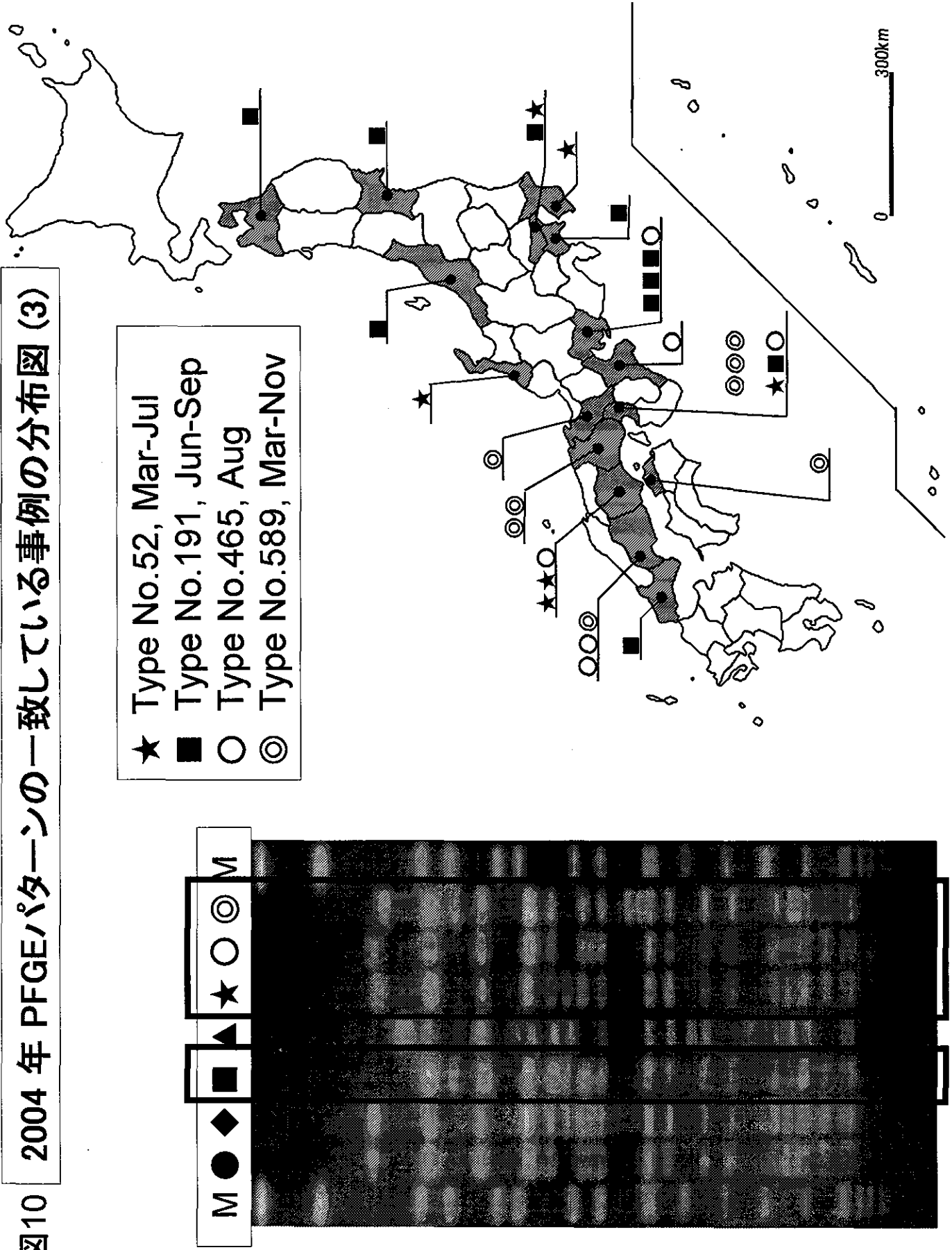
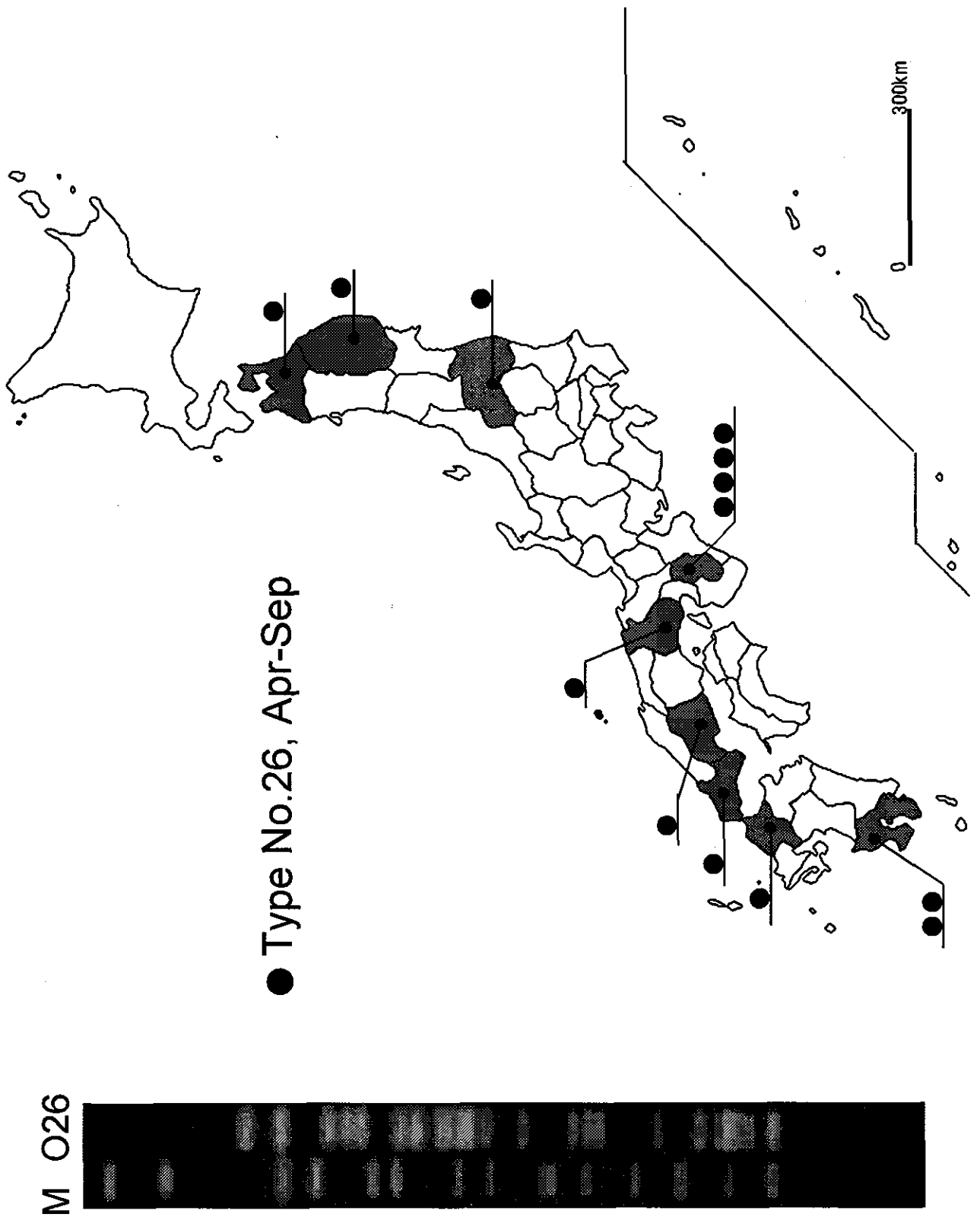


図11 2004年O26 PFGEパターン的一致している事例の分布図



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」
平成16年度分担研究報告書

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）の画像解析における施設間差の検討

分担研究者 長野秀樹 北海道立衛生研究所
協力研究者 木村浩一、若森吉広、駒込理佳 北海道立衛生研究所
広地敬 札幌市衛生研究所
大野譲治 青森県環境保健センター
八柳潤、齋藤志保子 秋田県衛生科学研究所
藤井伸一郎 岩手県環境保健研究センター
畠山敬 宮城県保健環境センター
牛水真紀子 仙台市衛生研究所
熊谷奈々子 須釜久美子 福島県衛生研究所
佐々木寿子 新潟県保健環境科学研究所

研究要旨：北海道・東北・新潟ブロックの衛生研究所7施設においてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）の画像解析について施設間差を検討した。北海道立衛生研究所で用意したPFGE画像3枚を衛生研究所6施設に送付し、それぞれの施設において解析ソフトであるFingerprint II（バイオラッド社）を用いて解析を実施した。北海道立衛生研究所がそれらの解析結果を回収し、施設間差について比較検討を行った。それぞれの画像を個別に解析すると、得られたデンドログラムの分岐パターンはすべて一致した。また、複数のPFGE画像を組み合わせて解析した場合においてもそのデンドログラムは各施設において同じ形状を示した。一方、分岐パターンに基づく株間の類似性（%）を比較すると、分岐位置によって多少の違いが認められた。そこで、株ごとに解析に用いるバンドの数を比較したところ、そのレンジは0から4であり、PFGEパターンにより差が生じることが示された。このことから、解析に用いるバンドの数が類似性の違いに影響していることが推察される。

A. 目的

細菌性食中毒あるいは細菌性感染症の集団感染事例の場合、個々の患者に関する臨床疫学的データと共に原因菌の菌学特性に関するデータを比較検討することは、感染源調査や感染経路を解明するときに重要な手がかりとなる。以前は、このような目的のために表現型として生化学性状

や血清学的性状が用いられてきたが、現在ではDNAレベルでの比較がこれらに取って代わっている。DNAを比較する手法としては、制限酵素断片長多型（RFLP）法であるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法が現在最もよく用いられており、行政の場においても実地的な集団発生時の対応に活用されている。昨年度までは、大腸菌を用いたPFGEの手技に重点を置いた各施設

における PFGE パターンを比較してきたが、大腸菌における手技上の精度は統一化され、それに関する問題は解消されつつあると思われる。従って今年度は、画像解析に関して比較検討を行った。

B. 研究方法

北海道立衛生研究所において個別に3枚の PFGE 画像を用意した。画像1、2は出血性大腸菌 O157、画像3はサルモネラ菌血清型エンテリティディスを用いた。PFGE の手法については、昨年度、国立感染症研究所（感染研）によって示された米国 CDC 法をベースとした方法に従って実施した。つまり、プレート上のコロニーを掻き取り、200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した (OD_{610nm}=0.5-0.6)。200 μ l の 1% Seakem Gold agarose と混ぜ合わせ、サンプルプラグキャストへ流し込み室温で 10-15 分間放置し、固化させた。固まったプラグを 1ml のプロ K 溶液 (1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA, pH 8.0) に入れ、50°C で 2 時間インキュベートした。プラグを取り出し、泳動時の大きさにカットした後、500 μ l の TE buffer で調製した 4mM Pefacloc SC (AEBSF) に移し、50°C、20 分以上の洗浄を 2 回実施した。TE buffer に変えて氷上で 20 分以上平衡化した。酵素用 buffer に変えて (200 μ l/sample) 氷上で 20 分以上平衡化した。酵素を含む buffer 100 μ l (30 units/sample) に変え、37°C 最低 2 時間振盪しながらインキュベートした後、酵素処理の終わったサンプルは 0.5 x TBE 液に交換した。泳動は 0.5 x TBE で調製した 1% Seakem Gold agarose で行い、6.0V/cm、2.2-54.2 s (linear ramp)、19 時間、14°C の条件で実施した。泳動終了後、0.2-0.5 μ g/ml の ethidium bromide で

20-30 分間染色し、蒸留水で 30 分以上脱色し、トランスイルミネーター上でバンドを観察した。バンドパターンの解析には、Fingerprinting II (バイオラッド社) を用いた。

PFGE 画像 3 枚を CD-ROM に書き込み、各施設に送付した。参加施設は解析ソフトを所有し、定期的に PFGE を業務として行っている施設とした。従って、本比較研究に参加した施設は北海道立衛生研究所も含め、7 施設であった。

送付した画像について各衛生研究所で解析し、その解析結果を北海道立衛生研究所にて回収し、比較検討した。

C. 研究結果

図 1 に今回解析に用いた画像 1-3 の PFGE パターンを示した。

まず、それぞれの画像を単独に解析したときの結果を比較した。

画像 1 の解析結果を図 2 に示した。 dendrogram の形状は全ての施設で同じであった。すなわち、分岐のパターン、菌株の類似関係はどの施設でも同じ情報を得ることができた。しかし、その類似性の距離をみると、施設毎に若干の違いがみられた。そこで、それぞれの分岐における類似度 (similarity, %) を比較した (図 3)。その結果、分岐点 c に比べ、a のばらつきが大きいように思われた。レンジにおいても c では 3.01 であったが、a では 7.02 であった。

画像 2 の解析結果を図 4 に示した。菌株 6, 7 は全ての施設で 100% マッチを示した。画像 1 の場合と同様にその similarity を比較すると、SD が 2.28、レンジが 7 で、やはり若干のばらつきがみられた (図 5)。

画像 3 の解析結果を図 6 に示した。 dendrogram

ドログラムの形状はどの施設でも同じ情報が得られている。Similarityの比較では、やはりばらつきがみられた(図7)。

複数の画像を取り込んだときの解析結果を比較した。画像1, 2を取り込んで解析すると、そのデンドログラムは全施設で同じ形状を示した。また、画像1の菌株4と画像2の5が同じPFGEパターンを示し、100%のsimilarityであった。これについても全施設で同じ情報を得ることができた(図8)。similarityを比較すると、分岐点によってレンジの大きさに違いがみられた。これは単独の画像で解析したときと同じであった(図9)。

画像1, 2および3の3枚を取り込んで解析した結果を図10に示した。3枚を取り込んでも、100%マッチする画像1の菌株4と画像2の菌株5および画像2の菌株6と7のsimilarityは100%のままであった。さらにデンドログラムの形状も同じで、全施設において同じ分岐パターンが得られた。similarityを比較すると、これまでと同様に、分岐点によってそのばらつきの度合いが異なる傾向が認められた(図11)。

PFGE画像を解析する際には、まず、どのバンドを解析に用いるかを決定しなければならない。今回用いた解析ソフトは、バンドの位置と数をその解析対象としている。従って、最初に選択するバンドの数はその解析結果に影響を与えることが予想される。そこで、各施設においてどのバンドを解析の対象としているのかを調べた。その結果、菌株3のように全施設が19本のバンドを選択し、全くばらつきがみられなかった菌株がある一方で、菌株9および10のようにレンジが4を示す菌株も認められた。さらに、画像1, 2および3の3枚の画像を取り込んだときの各分岐点

におけるsimilarityを施設毎にプロットし、施設ごとの傾向を知るためにその平均値を算出し、同じようにグラフ上にプロットした(図12)。下のグラフには解析の用いたバンドの数の平均値を示した。その結果、similarityの平均値の低さとバンドの数の多さが対応しているように思われた。より多くのバンドを解析に用いることによってそのsimilarityが低下したものと考えられた。

D. 考 察

PFGE画像を基に解析ソフトを用いてデンドログラムを作成し菌株の異同を評価する場合、解析結果に影響を与える因子として、PFGEそのものの手技上の問題や画像取得の技術の他に、ソフトの適切な使用があげられる。PFGEの手技に関しては、これまで本研究班を通じて北海道・東北・新潟ブロック内の精度管理を実施してきた。統一マニュアルの採用など数回の精度管理を経て、手技的にはほとんどの施設が一定の技術レベルにあるように思われた。そこで今回は、解析ソフトを用いた解析結果についてその施設間差を評価した。

北海道・東北・新潟ブロックにおいて、定常的に解析ソフトを使用していたのは全部で7施設であった。このなかには、本研究班から付与された地研2施設も含まれるので、独自でソフトを購入した地研は5施設であった。ブロック内の全衛生研究所でPFGEを実施していない1施設を除いた10施設中7施設で解析ソフトを使用しており、細菌性食中毒あるいは感染症において本ソフトの使用頻度の高さが窺われた。

3種類のPFGE画像を解析したときの施設間差について検討したところ、デンドロ

グラム形状、つまり菌株の分岐パターンは同じであり、これについては同じ情報を得ることができた。このパターンは複数の画像を用いて解析した場合についても同じ結果であった。これによってスタンダードを用いたゲルの標準化が適切になされていることが示された。

次に、各分岐点における similarity (%) を比較した結果、分岐点によっては施設間によって若干の違いが認められた。この違いは何に起因するのであろうか？解析ソフトを使用するとき、画像を取り込んだ後、スタンダードに使用したバンドを認識しゲル全体の標準化を行う。以前は、市販のラダーをスタンダードにしていたが、バンドがブロードになりやすいという性格上、あまり好ましいものではなかった。しかし、CDC から提供されたサルモネラ菌の制限酵素処理産物をスタンダードとして用いることにより、この問題は解消された。次に解析のためのバンドを認識させるが、このときにどのバンドを選択するかは解析結果に影響するものと考えられる。そこで、各施設がそれぞれの菌株について何本のバンドを選択したかについて調べた。その結果、菌株により、バンドの認識に違いが認められた。すなわち、菌株 3 では全施設が 19 本のバンドを選択したが、菌株 9 および 10 では施設によって 4 本の違いがみられた。そして図 12 から、認識したバンドの数と similarity の度合いとのあいだに何らかの関連性が認められた。このことは、1, 2 本のバンドしか違わないような株を比較するときの影響が出るかもしれない、従って多数の株を解析する際には注意をする必要があることを意味する。

E. 結論

画像解析における施設間差を検討すると、単独の画像を用いた場合のみならず、複数の画像を用いて解析した場合においてもそのデンドログラムの形状は変わらなかった。従って、菌株の異同に関する情報については全ての施設で同じ情報が得られることが示された。また、株間における similarity の比較では、それほど大きな施設間差は認められなかったが、分岐点ごとに検討すると、若干の違いがみられた。解析に用いたバンドの数を比較した成績から、バンドを多く認識すると similarity が低くなる傾向がみられた。

F. 健康危機情報

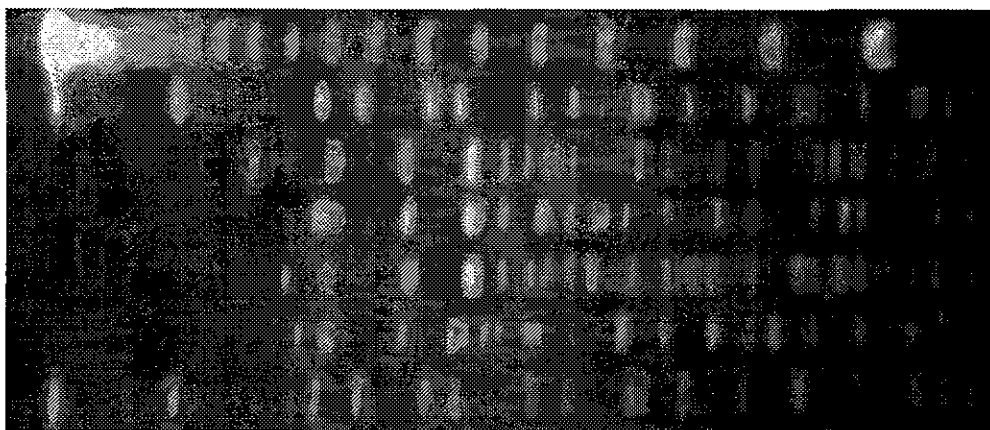
特になし。

G. 研究発表

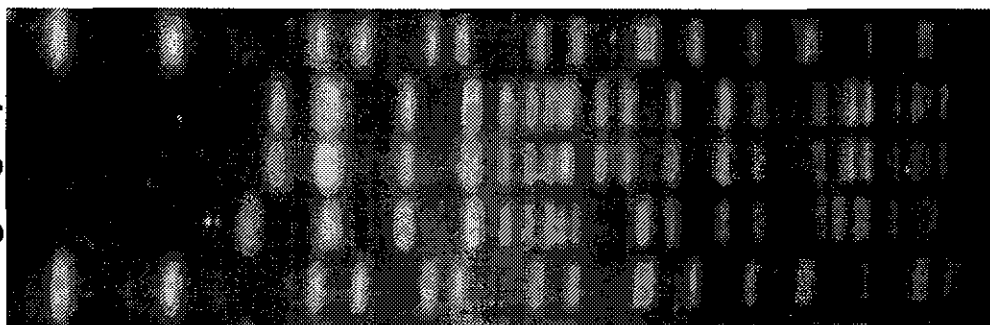
Nagano, H., Hirochi, T., Fujita, K., Wakamori, Y., Takeshi, K., Yano, S. Phenotypic and genotypic characterization of β -D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. *J. Med. Microbiol.* 53:1037-1043, 2004.

図1 解析に使用したPFGEパターン

画像1
1 2 3 4



画像2
5 6 7



画像3
8 9 10

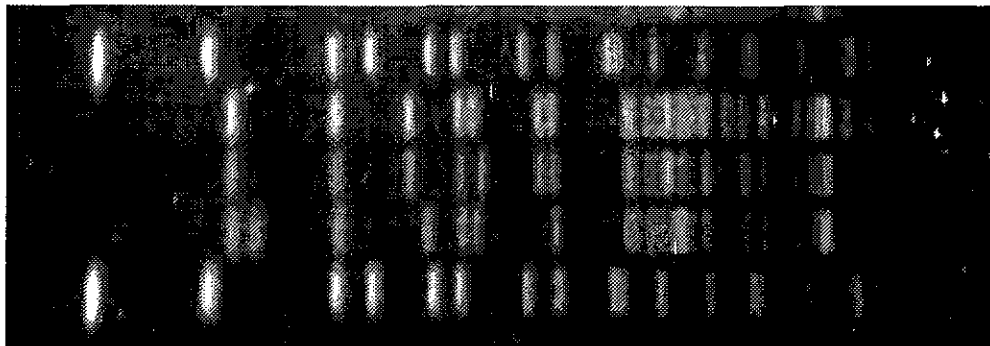
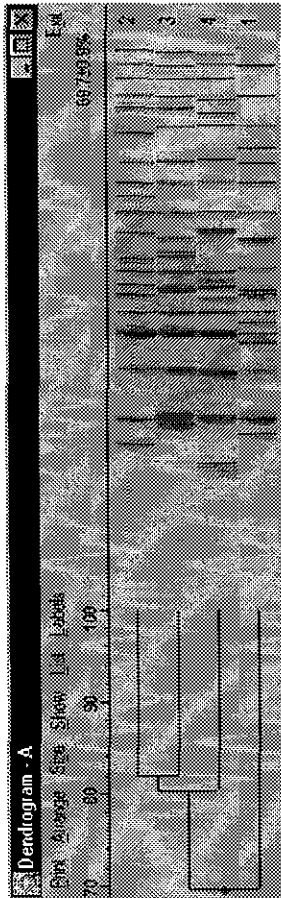
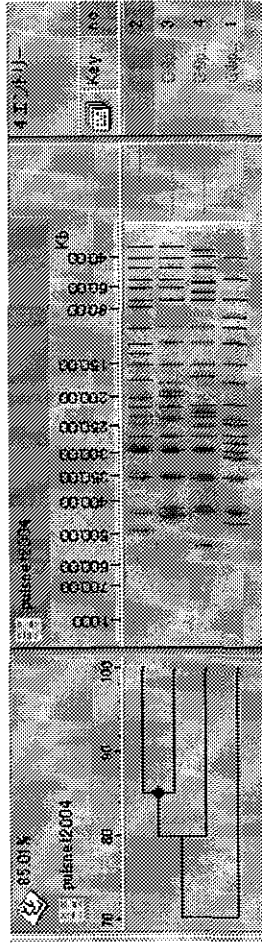
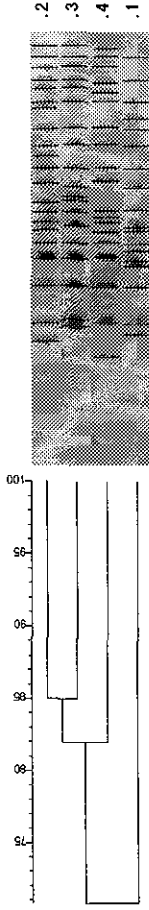


図2 画像1での比較



Distance: 12% - 20 (100% S: 0.00) (D: 0% - 100.0%)
Gold

Gold



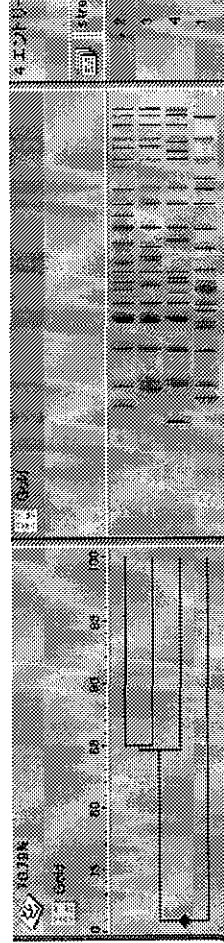
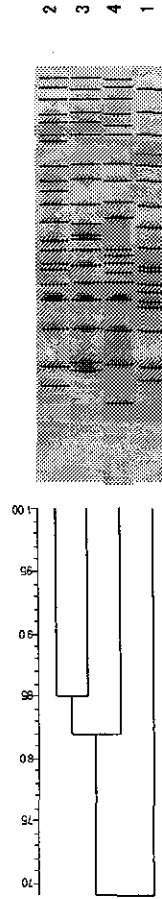
Distance: 12% - 20 (100% S: 0.00) (D: 0% - 100.0%)
O157 PFGE

O157 PFGE



Distance: 12% - 20 (100% S: 0.00) (D: 0% - 100.0%)
PFGE

PFGE



- 施設A 施設H
- 施設B 施設I
- 施設C 施設J
- 施設E 施設E

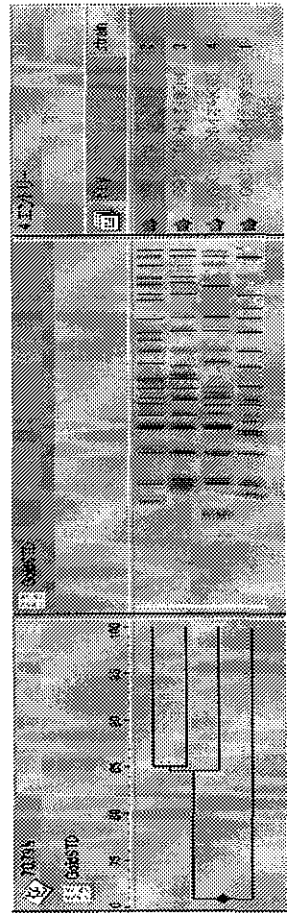


図3 画像1におけるsimilarityの比較(%)

ポイント	施設										Av	SD	Range
	A	B	C	E	H	I	J						
a	69.7	63.77	68.5	70.79	70.79	70.17	70.79	69.2	2.35	7.02			
b	80.5	81.98	82	84.61	81.98	79.93	84.61	82.2	1.68	4.68			
c	82	85.01	85	85.01	85.01	85.01	85.01	84.6	1.05	3.01			

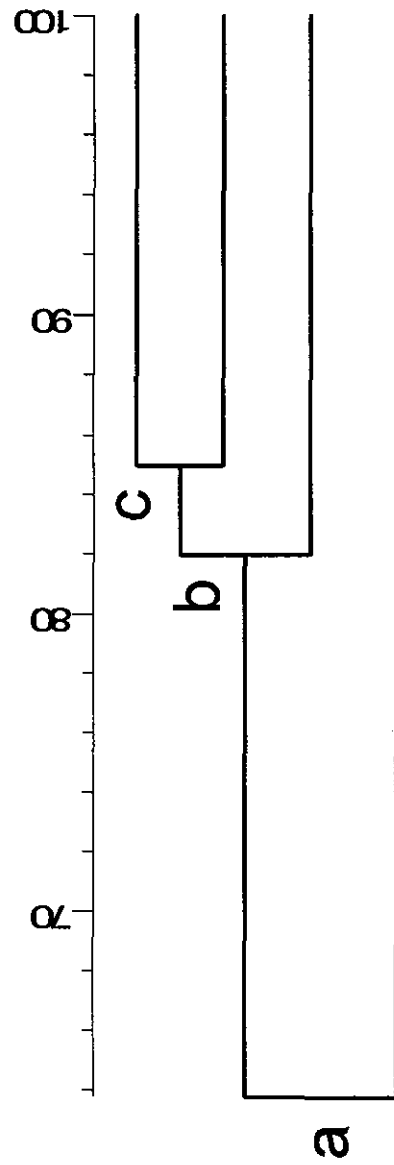
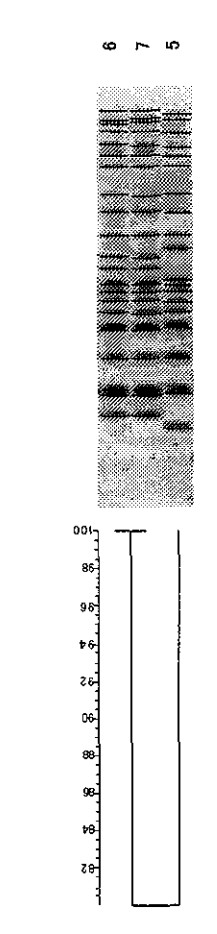
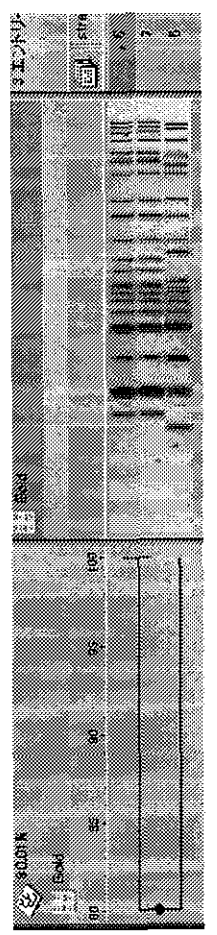
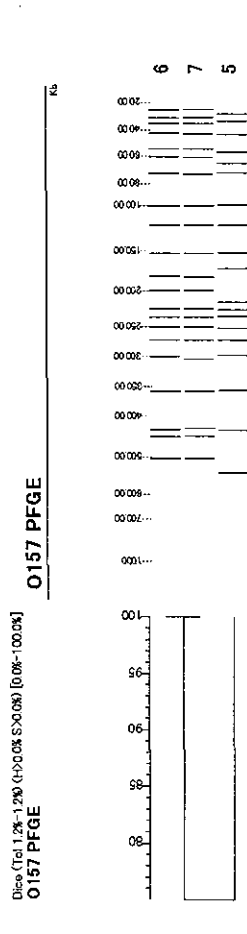
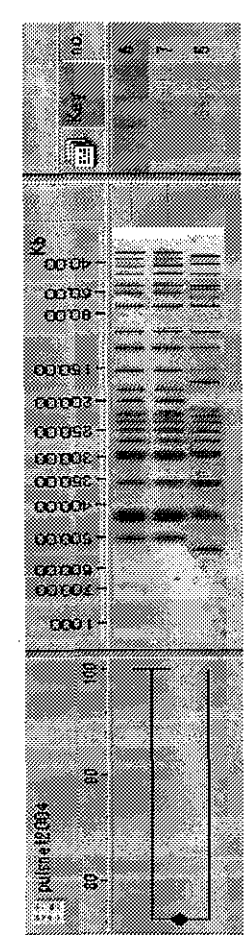
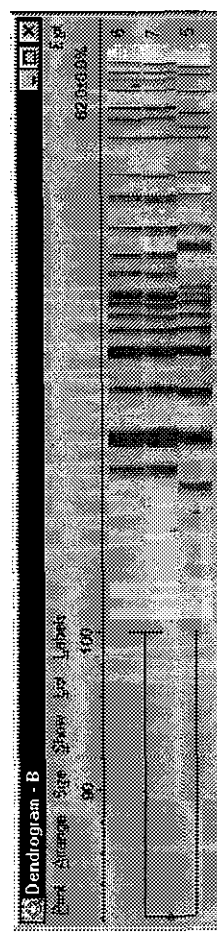
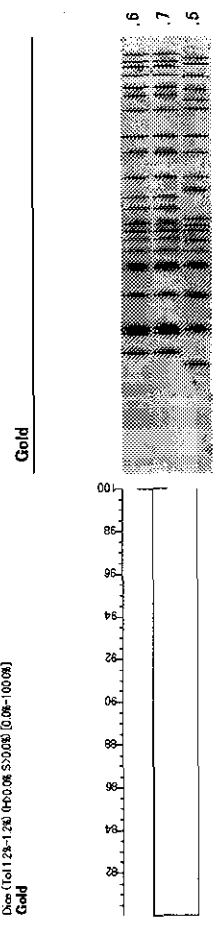


図4 画像2での比較



施設A 施設H
 施設B 施設I
 施設C 施設J
 施設E

