

パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）標準化及び 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

研究期間（平成 13 年度～ 14 年度）

堀川和美¹，村上光一¹，河野喜美子²，尾崎延芳³，藤田景清⁴，森屋一雄⁵，山口仁孝⁶，
海部春樹⁷，徳永晴樹⁸，松岡由美子⁹，成松浩志¹⁰，吉國謙一郎¹¹，久高 潤¹²

要 旨

全国的パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）ネットワーク（パルスネット）の構築は、食中毒の発生探知及び未然防止を可能とするが、本邦では未だ構築されていない。本研究ではパルスネットを
実行するために必要なPFGE法の標準化と画像診断について検討した。PFGE法標準化にはPFGE法の統一
マニュアルが必要であり、各地研で実行しているPFGE法を調査すると同時にその画像を判定しPFGEに
関する問題点を抽出した。その結果に基づき初心者向けの統一マニュアルを作成した。一方、各地で
発生した食中毒事例が同一汚染源であることを迅速に証明するために、汚染菌株のDNAパターンを相
互に画像診断し判定することが不可欠である。そこで九州地区12地方衛生研究所（地研）で標準菌株
を用いたPFGE精度管理と画像診断を実施した。統一マニュアルによる成果は現れたが、各地研で泳動
した同一菌株の泳動像を比較した結果、全体的に一致率が良好でなかった。この原因を究明するため
次の実験を行った。当研究所で作成した標準プラグと各地研において作成した標準プラグを各地研で
同時に両プラグを泳動し同一泳動像が得られるか、また各地研で作成・送付されたプラグを当研究所
にて同時に泳動し同一泳動像が得られるかを検討した。その結果、プラグ作成ではなく主としてマ
ーカーを原因とする泳動とその後の画像診断に問題があることが分かった。本研究では統一マニ
ュアルを提示するとともに正確な画像診断のための提言を行った。一方、PFGEプラグ作成の迅速化を図
るため方法の改良並びに実用化について検討した。今回我々が応用したPFGEプラグ作成迅速法は各地研
共に従来法と遜色ない泳動像が得られ、今後ルーチンワークに使用可能であることが分かった。

〔キーワード：食中毒，パルスフィールドゲル電気泳動，ネットワーク，データベース〕

1 はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による遺
伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な方法であり、
地方衛生研究所（地研）と感染症研究所（感染研）間の
全国的 PFGE ネットワーク（パルスネット）構築の準備
が急がれている。九州地区 12 地研でパルスネット構築
のため PFGE に関する検査及び解析法について検討し
た。

2 方 法

2・1 研究方法と方針

2・1・1 PFGE法の統一マニュアルの作成

12 地研で実施している PFGE プラグ作成及び泳動方
法・条件について調査した。また、5 株の腸管出血性大
腸菌（EHEC）O157 標準株（表 1）について各地研で PFGE
を実施し、その画像を判定し問題点を検討した。検討結
果に基づき PFGE 検査統一マニュアルを作成した。

2・1・2 PFGE検査の精度管理

精度管理は 3 回実施した。使用菌株は毎回開始前に当

1.福岡県保健環境研究所（〒 818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野 39）

2.宮崎県衛生環境研究所，3.福岡市保健環境研究所，4.北九州市環境科学研究所，5.佐賀県衛生薬業センター，

6.長崎県衛生公害研究所，7.長崎市保健環境試験所，8.熊本県保健環境科学研究所，9.熊本市環境総合研究所，

10.大分県衛生環境研究センター，11.鹿児島県環境保健センター，12.沖縄県衛生環境研究所

表 1. 精度管理に使用した O157 標準株

番号	分離年	分離府県	市・町	VT型	<100kb	100-350kb	>350kb
1	1996	広島県	東城町	1+2	I a	I	I
2	1996	大阪府	堺市	1+2	II a	II b	I
3	1998	宮崎県	宮崎市	1+2	II b	II b	I
4	1997	埼玉県	上越市	2	III a	ND	ND
5	1994	神奈川県	記載なし	2	III b	ND	III

研究所で確認した 5 株の O157 標準株を各地研に送付した (表 1)。11 地研から PFGE 泳動像の写真と画像のデジタルデータを当研究所に送付し、当研究所で各菌株毎に DNA パターンを画像解析し、その一致率を見た (図 1)。デジタル画像は写真からあるいはゲルから直接泳動像を取込み、グレースケール、8 ビット、TIFF 形式、画像サイズ 300-800kb 程度で保存した。デジタル画像ファイルはインターネットを用いメールで送受信した。

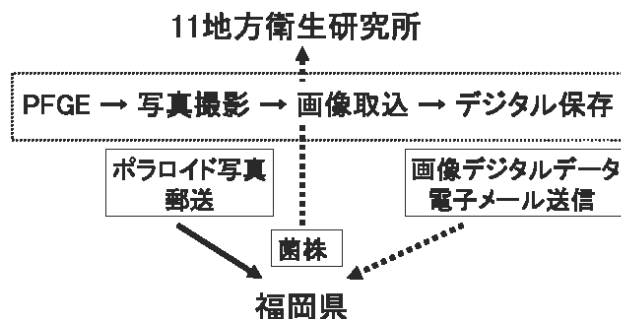


図 1. O157 標準菌株を用いた精度管理

2・1・3 プラグ作成における問題点の調査

各地研で作製された菌株 no.2 のプラグを当所に集積し、全地研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・1・4 泳動における問題点の調査

当所で作製した菌株 no.2 のプラグを各地研に送付し、各地研で泳動後、泳動像を当所に集積・泳動像の比較を行うことにより、泳動における問題点を検討した。

2・1・5 PFGE検査法の迅速化

カンピロバクターに用いられていた迅速法¹⁾を O157 に改変し、予め 2 地研でその有用性を確認した。精度管理に用いた 5 菌株の O157 を用いて、通常法 (統一マニュアル法) と迅速法により各地研で PFGE を実施し、泳動像を当所に集積・解析し、迅速法の実用性について検討した。

2・2 DNA解析方法

PFGE 泳動像は、Fingerprinting II (BIO-RAD) を使用し、仕様書に従い解析を行った。

3 結果

3・1 PFGE環境の調査とPFGE検査方法の統一

各地研が用いていた PFGE 法は、平成 9 年 5 月に感染研で実施された研修会での方法及び Barrett²⁾ の方法による 2 法であった。しかし、調査により菌の培養方法やプラグ作成に用いる菌量など PFGE の結果を左右する点において各地研で異なることが分かった。そこで 10 地研で使用されていた感染研の方法を基に詳細な O157 用の PFGE 統一マニュアルを作成した。

3・2 PFGE検査の精度管理

3 回実施した精度管理の初回は、各地研の方法で実施したため、一致率が低かった。しかし、最終回では解析に用いた条件を厳しくしたにも関わらず 3 施設を除くと 85 % 以上の一致率であった。100 % の相同性が得られなかった原因は、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 150kb - 450kb サイズの DNA の分離が悪く、バンド検索時にバンドと認識できる場合とできない場合があり、バンド数の違いとなって現われたためであった。また、50kb 以下のバンドは輝度が低く、バンド



図 2. PFGE 泳動像

認識が不安定であり「バンド数の違い」となって一致率に影響を及ぼしていた。

一方、マーカースとして使用する λ -ラダー (BIO-RAD) でゲルの標準化を行うため、 λ -ラダーの影響を大きく受ける。 λ -ラダーの泳動像は、ロットに大きく左右される。各地研共に λ -ラダーの良好な泳動像を得るのに苦慮した。特にバンドの輝度が十分に得られないため、メーカーが熱処理を推奨しているが、熱処理条件が難しく、適切なバンドが得られていないケースが多かった。特に過加熱の場合ブロードなバンドとなり、1 本のピークであるべきところが複数のピークが検出された。このため左右の移動度に微妙な影響を及ぼした。

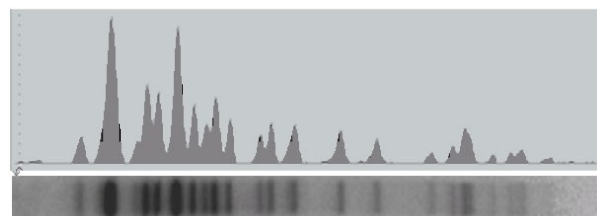


図 3. 認識が困難な DNA バンド (菌株 no.2)

3・3 プラグ作成における問題点の調査

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

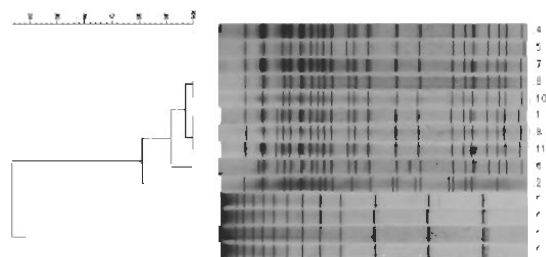


図4. 各地研から送られてきた no.2 プラグの同時泳動

あった地研2を除くと、一致率は91.8%であった。また地研6については、535kb付近のバンドが欠落し、430及び110kb付近に他の地研と異なるバンドが2本検出された。地研2及び6を除いた場合、5地研と3地研との2つのクラスターに分かれ、一致率は97.07%となった。2つのクラスターの違いは1バンドの違いであった。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。このバンドは、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場合とされない場合がある。このバンドを目視どおりに1本とすると8地研の一致率は100%であった。各地研で作成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原因は、バンド認識の時点で発生していることが判明した。

3・4 泳動における問題点の調査

各地研で作成した菌株 no.2 のプラグと当所で作成した菌株 no.2 のプラグを各地研で泳動した場合、同一ゲルで流したものでは85-100%の一致率であった。また同時に泳動してない場合は、同時に流した場合より一致率が低かった。一致率が低い場合の原因は精度管理の場合と同一で、良好なマーカーの泳動像が得られない場合とバンド認識が違ふ場合の2点であった。

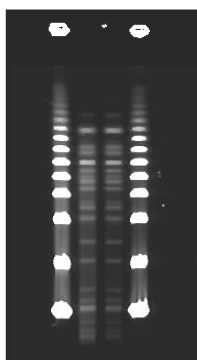


図5. 同時泳動点であった。

3・5 PFGE検査法の迅速化

迅速法はリゾチーム処理及び煩雑なプロテナーゼKの失活操作が無く、また簡便2日間でO157のPFGEプラグ作成が可能であった。迅速法を実施した10地研中9地研でPFGEの泳動像を得ることができた。地研毎に各菌株の迅速法と従来法の泳動像を比較した。その結果、迅速法と従来法は90-100%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2法で作成したプラグを同一ゲルで流したか流さなかった場合やショルダー部分のバンドを認識できたかできなかったことにあった。

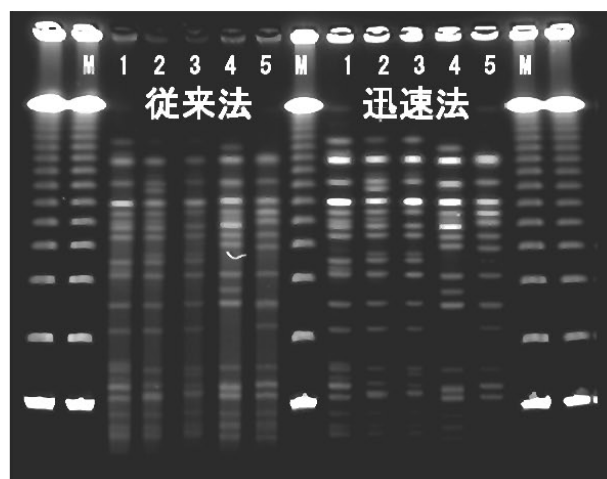


図6. PFGE 従来法と迅速法による泳動像

4 考察及びまとめ

2002年度の腸管出血性大腸菌の感染者数は3,000人を越え、年々増加の傾向にある。また、一方で一見お互いに関連性がなさそうであるが、実際は一つの汚染原因によるいわゆる diffuse outbreak の事例が、毎年発生し、感染拡大と再発防止のために疫学調査とPFGEを用いた分子疫学的手法を用いた汚染源の解明が必須となっている。現在、感染研において全国のEHECのPFGE型別が実施されている。一方では各地研においてもEHECを含めた種々の菌種について集団・散发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、地研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PFGE方法や条件及び機器に関する調査を行い問題点を抽出し、PFGE統一マニュアルを作成した。しかし、写真撮影装置等の周辺機器に問題がある場合、整備されるまで改善されない。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。

一方、現時点で九州地区参加地研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。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Fingerprinting 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、Fingerprinting IIで解析するための画像データは、解析ソフトFingerprinting IIの使用書に示された「グレ

ースケール、8ビット、TIFF形式、画像サイズ300-800kb程度」で保存しなければ解析ができない。また、Fingerprinting 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。

一方、各地研でプラグを作成・泳動したPFGE画像のDNA解析を行った結果、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、「同一地研で作成したプラグを各地研で泳動すること」「各地研で作成したプラグを一地研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上の問題ではなく、λ-ラダー・泳動・写真撮影に問題があることが判明した。円滑なパルスネットの運用には、①良好なλ-ラダーの供給あるいはマーカーの変更、②泳動槽の保守点検、③写真撮影装置の整備、④菌株確保における法整備、⑤菌種毎のPFGE統一マニュアルの作成、⑥菌種毎における内部標準株の指定、⑦PFGEパターン解釈の問い合わせ先の指定、⑧PFGE技術の継承等が必要である。

一方、O157PFGE迅速法の検討を行ったが、従来法では4日必要であったプラグ作成が2日で実施可能であった。また、従来法と比較して遜色ない結果が得られ、今後広く活用できるものと考えられる。複雑な作業行程が減少し時間短縮が図れ迅速な事件解決が望まれるとともに、使用試薬も少なくなり経済的である。

5 行政的意義、貢献

本研究でO157に関するPFGE統一マニュアルを作成した。このことによりPFGE作業技術における人的差異

が大きく減少し、PFGEによる細菌学的疫学調査の精度を大きく向上させた。また、標準菌株を用いた多地研での外部精度管理システムを完成し、パルスネット運用体制を確立した。一方、PFGE迅速法を確立、有用性について実証した。このことにより、食中毒の早期事件解決並びに拡大防止を図ることを可能にした。さらに本法は従来法に比べPFGEの作業コスト削減にも寄与することが可能である。

謝辞

本研究は厚生労働省科学補助金（新興・再興感染症研究事業）により行われた³⁾。

文献及び報告書

1. Ribot, E. M., C. Fitzgerrand, K. Kubota, B. Swaminathan, T. J. Barrett: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, J. Clinical Microbiol., 39, 1889-1894 (2001).
2. Barrett, T. J., H. Lior, J. H. Green, R. Khakhria, J. G. Wells, B. P. Bell: Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing, J. Clinical Microbiol., 32, 3013-3017 (1994).
3. 渡辺治雄 他：平成14年度厚生科学研究「パルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE）の標準化及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」研究報告書