

# 系統樹解析ソフトウェアによる腸管出血性大腸菌 O157のPFGEパターン解析における問題点

横山 栄二, 小岩井健司\*

Limitation in the analysis of PFGE patterns of enterohemorrhagic  
*Escherichia coli* O157 by computer-assisted clustering software

Eiji YOKOYAMA and Kenji KOIWA

## I. はじめに

近年、腸管出血性大腸菌 (EHEC) に汚染された食品の広域流通により、EHEC感染症が広範囲な地域で発生するdiffuse outbreakが問題となっている<sup>1)</sup>。diffuse outbreakは、原因食品の汚染菌量が少なく、汚染された食品が比較的長期・広範囲に流通した場合に発生するため、患者の発生が散発的に広範囲に点在することが特徴である<sup>2)</sup>。そのため散発的に発生した患者それぞれが共通の原因食品によって生じていることを把握することは困難であり、diffuse outbreakを単なる散発事例の増加現象と誤認することで被害を拡大させてしまう危険性が高い。被害拡大を防止するためにはdiffuse outbreakを早期に把握する必要があるが、そのためにはdiffuse outbreak初期の散発患者の増加を把握し、分離されたEHECの遺伝子類似性を調べる必要がある<sup>3,4)</sup>。

EHECの遺伝子類似性の比較方法としては、random amplified polymorphic DNA (RAPD)、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE)、amplified fragment length polymorphism (AFLP) 等があるが、現在主流となっているのはPFGEである<sup>2,3,4)</sup>。PFGEを用いて解析した場合、diffuse outbreakの患者由来株とその他の散発患者由来株が混在する状態で解析され、菌株数が多い場合には、比較対象であるdiffuse outbreak由来株が複数のゲルに渡って解析されることとなる。しかしながら、複数のゲルで泳動した多数の菌株の類似性を肉眼で比較することは困難である<sup>5)</sup>。従って、diffuse outbreakの早期把握のためには、複数のゲルで泳動された多数の菌株の類似性を系統樹解析ソフトウェアを使用して解析する必要があるが、PFGEパターンは様々な要因で歪みを生じることがある<sup>6)</sup>。

そこで、PFGEパターンに生じた歪みが系統樹解析に与える影響について検討したところ、若干の知見を得たので報告する。

## II. 材料および方法

### 1. 解析対象

平成14年度に県内で分離された家族内発生2事例、集団発生1事例、散発および保菌8事例由来の32株を対象とした。

千葉県衛生研究所

\*現野田保健所

(2004年1月16日受理)

## 2. PFGE

PFGEは常法<sup>2,3)</sup>により実施した。泳動条件は既報<sup>6)</sup>に従い、ゲルの1レーンに分子量マーカースとしてλ ladder marker (BMA) を泳動した。解析対象の32菌株はゲル6枚を用いて泳動した。

## 3. 系統樹解析

系統樹解析ソフトウェアは、Fingerprinting II Ver.3 (Bio Rad) を使用した。解析は、ポラロイドで撮影したPFGEパターンをスキャナ (EPSON GT9500) を用いて1200dpiで取り込みTIFF形式の画像ファイルとし、それをFingerprinting IIで解析した。

Fingerprinting IIの解析条件は、レファレンスとして分子量マーカースの48.5kbpから533.5kbpを設定し、その間の分子量に存在するPFGEパターンのバンドのみを比較対象とした。PFGEパターンの認識は、PFGEパターン画像ファイルのスペクトル解析により得られたバックグラウンド減算値および最小二乗フィルタリング値を設定し、初期設定値による自動バンド認識で実施した。菌株間のPFGEパターンの類似度は、推奨設定であるトレランス1%および最適化1%の設定でDice法により行った。系統樹作成は、UPGMA法により実施した。

## 4. PFGEパターンの歪みが系統樹解析に与える影響の調査

### (1) 同一ゲル内における影響

同一ゲルで泳動した菌株のうち、目視でPFGEパターンが一致した菌株について、系統樹解析を実施した。

### (2) 異なるゲル間における影響

解析対象の菌株から6菌株を無作為に抽出し、2回泳動した。2枚のゲルのPFGEパターンについて、同一菌株間の類似度解析を行い、系統樹解析を実施した。

集団発生事例由来株は、4回に分けて泳動を行った。ゲルIおよびIIIで2レーン、ゲルIIで3レーン、ゲルIVで9レーンを使用して泳動し、異なるゲル間で目視でのPFGEパターンが一致するレーンについて、2レーン間の類似度解析を実施した。

## III. 成績

### 1) 同一ゲル内における影響

同一ゲルで泳動した菌株のうち、家族内発生2事例由来5株 (N家由来2株およびS家由来3株)、集団発生1事例由来9株が目視でPFGEパターンが一致した。

系統樹解析の結果、N家由来2株およびS家由来3株の類似度はそれぞれ100%であった (図1, 2)。また、集団発生1事例由来9株の類似度は90%以上であった (図3)。

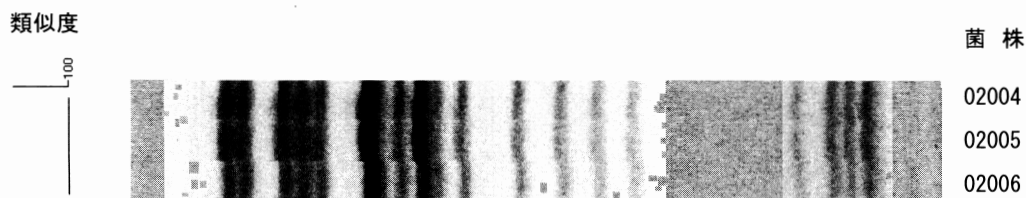


図1 家族内発生事例（S家）由来株の泳動像の系統樹解析結果

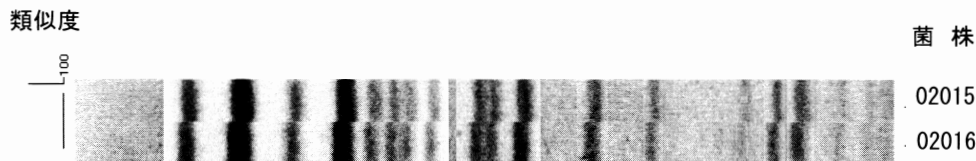


図2 家族内発生事例（N家）由来株の泳動像の系統樹解析結果

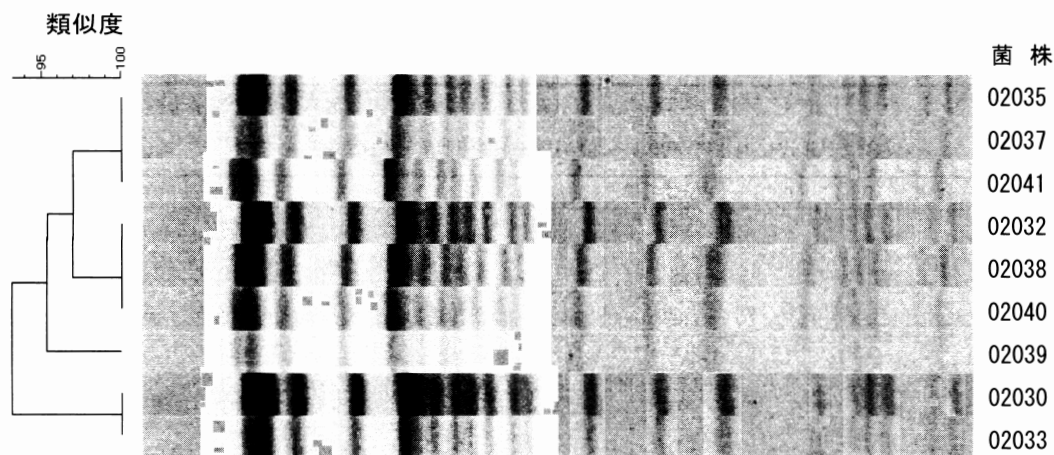


図3 集団発生事例由来株の泳動像の系統樹解析結果

2) 異なるゲル間における影響

2枚のゲルで泳動した6菌株の類似度は80.0~100%であった(表1)。算出された類似度に基づき系統樹解析を行ったところ、02011株の類似度は67.98%に低下した(図4)。

集団発生事例において目視のPFGEパターンが一致する2レーン間の類似度は、ゲルのレーン数が少ないゲルⅠ~Ⅲでは、77.42~91.43%であった(表2)。一方、レーン数が多いゲルⅣでは37.50~100%で、レーン1に泳動された分子量マーカーから遠いレーンほど類似度が低下する傾向が認められた(表3)。

表1 異なるゲルで泳動した同一菌株間の類似度

菌株	類似度	備考
02003	93.8	散发事例
02004	85.7	S家家族内発生
02009	90.9	集団発生 A型
02011	80.0	散发事例
02014	93.8	集団発生 B型
02015	100.0	N家家族内発生

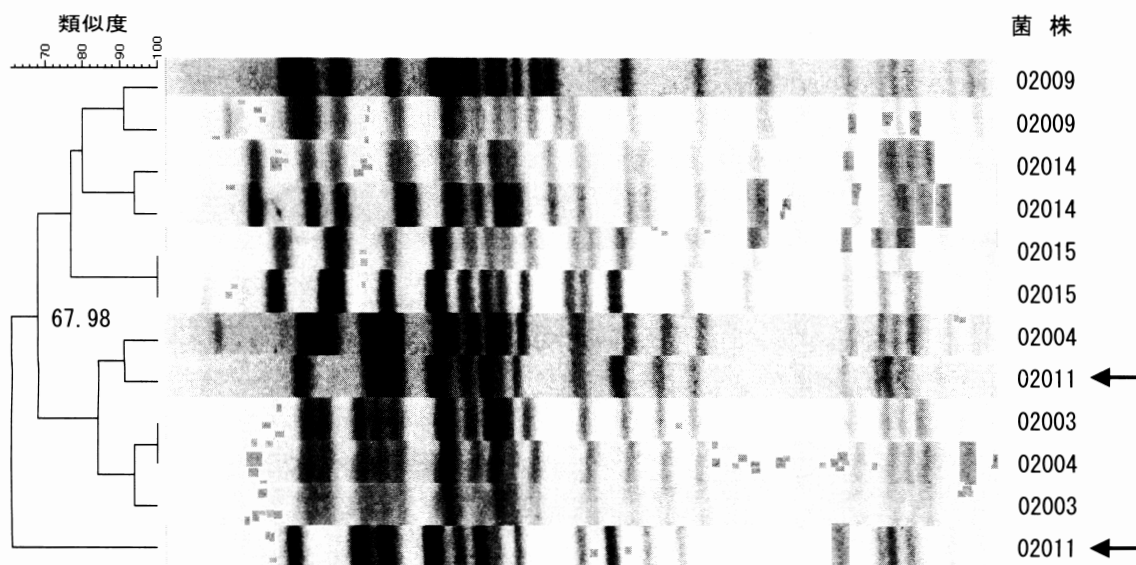


図4 異なるゲルで泳動した同一菌株間の類似度に基づく系統樹

表2 ゲルI～III相互のレーン間類似度比較結果

	マーカー	I:2*	I:3	I:4	マーカー	II:2	II:3	II:4	II:5	II:6	マーカー	III:2	III:3	III:4
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
I:2*	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
I:3	・	・	・	・	・	90.91	・	・	・	81.25	・	83.87	78.79	・
I:4	・	・	・	・	・	91.13	・	・	・	88.23	・	83.87	78.79	・
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:2	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	87.50	87.50	・
II:3	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:4	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:5	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:6	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	77.42	83.87	・
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
III:2	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
III:3	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
III:4	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・

\* ゲルNo.:レーンNo.

表3 ゲルIVに対するゲルI～IIIのレーン間類似度比較結果

	マーカー	IV:2*	IV:3	IV:4	IV:5	IV:6	IV:7	IV:8	IV:9	IV:10	IV:11	IV:12	IV:13	IV:14	IV:15
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
I:2*	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
I:3	・	・	・	・	・	60.32	81.25	90.32	・	84.85	66.67	62.50	43.75	50.00	48.48
I:4	・	・	・	・	・	84.85	88.23	84.85	・	91.13	80.00	70.59	58.82	47.06	45.71
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:2	・	・	・	・	・	93.75	90.91	93.75	・	47.06	41.18	48.48	42.42	48.48	47.06
II:3	・	93.75	88.23	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:4	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:5	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
II:6	・	・	・	・	・	90.32	93.75	90.32	・	96.97	96.97	93.75	87.50	93.75	96.97
マーカー	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・
III:2	・	・	・	・	・	93.33	77.42	86.67	・	68.75	37.50	32.26	38.71	38.71	37.50
III:3	・	・	・	・	・	100.00	96.77	100.00	・	81.25	75.00	58.06	38.71	38.71	37.50
III:4	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・	・

\* ゲルNo.:レーンNo.

#### IV. 考 察

今回、PFGEパターンに生じた歪みが類似度解析に与える影響について検討したところ、同一ゲル内においてはその影響は比較的小さいが、異なるゲル間においては大きな影響を与えることが判明した。また、類似度に基づき系統樹解析を行った場合、類似度が2株間比較に比べて著しく低下することがあった。これは、UPGMA法による系統樹解析の際には、最も高い類似度を有する組合せから優先的にクラスターとして組合せられ類似度がクラスター間の類似度として再計算されるためであり、系統樹解析を行うためにはより正確な類似度解析結果が必要となることが確認された。

今回の調査で類似度および系統樹解析に影響を与えたPFGEパターンに生じた歪みの要因としては、マーカーから遠いレーンほど類似度の低下が認められたことから、マーカーによる補正が十分でないことによるものと示唆される。diffuse outbreakの早期把握のためには系統樹解析ソフトウェアによる類似度解析は欠かせないため、異なるゲル間における歪みの影響を少なくする必要があります。PFGE実施方法の改善としてはすでに標準化の検討が

なされているが<sup>9)</sup>、泳動装置などのハードウェアの経年変化による歪みの発生も考えられることから、発生した歪みを補正する方法について検討する必要があると思われる。

#### 文 献

- 1) 道野英司 (2002): 大規模・広域食中毒発生への行政対応, 日食徴誌, 19: 166-170
- 2) 満田年宏 (2002) 感染対策のための分子疫学入門, メディカ出版
- 3) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村和満 (2002): 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制; パルスネットの構築, 感染症誌, 76: 812-818
- 4) Swaminathan, B., Barrett, T. J., Hunter, S. B., Tauxe, R. V. and the CDC PulseNet Task Force (2001): Pulse Net: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States, Emer. Infect. Dis. 7: 382-389
- 5) Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., de Sousa, M. A., Camou, T., Couzza, C.,

Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sa-Leao, R., Sanches, I. S., Song, J., Tassios, P. T., and Villari, P. (2000) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis : comparison of results obtained in a multilaboratory

effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* 6 : 189-198

- 6) 水口康雄, 小岩井健司 (2001) パルスフィールド電気泳動による病原最近の分子型別の標準化に関する研究, 科学的根拠及び情報を提供する地方衛生研究所の試験検査機能の強化に関する研究分担報告書 80-92