

菌株数も少なかったため、今後は参加機関も多くし、また菌種、菌株数も増やすとともに、解析しやすいライブラリーの確立も図っていききたい。

E. 結論

レジオネラ属菌の PFGE を各機関で実施し、その画像を交換し比較解析した結果、同じ由

来の菌株間では、100%に近い類似性を示し、良好な結果が得られた。ただし、画像が全体的に染まりが悪く解析不能のものもあったため、方法の検討および技術的訓練が必要と考えられた。

F. 研究発表

なし。

表 1. 標準菌株

感染研 No	菌種名	血清群	由来
NIIB0058	<i>Legionella pneumophila</i>	SG1	臨床分離株
NIIB0138	<i>Legionella pneumophila</i>	SG3	臨床分離株
NIIB0233	<i>Legionella pneumophila</i>	SG4	環境分離株

表 2. 各機関での分離菌株

菌種名	血清群	No	機関	分離年月日	由来
<i>L. pneumophila</i>	SG1	1	A	2002. 2. 15	浴槽水
		2	A	2002. 7. 19	浴槽水
		3	B	2003. 9. 18	浴槽水
		4	B	2003. 9. 11	浴槽水
		5	B	2003. 9. 11	浴槽水
		6	B	2003. 9. 3	患者
		7	B	2003. 9. 12	浴槽水
		8	C	2002. 10. 2	浴槽水
		9	C	2002. 10. 4	浴槽水
		10	C	2002. 10. 10	浴槽水
		11	C	2004. 1. 23	浴槽水
<i>L. pneumophila</i>	SG3	1	B	2003. 9. 12	浴槽水
		2	B	2003. 9. 18	井戸水
		3	C	2002. 10. 3	浴槽水
		4	C	2002. 10. 16	浴槽水
		5	C	2003. 9. 18	浴槽水
		6	C	2003. 9. 18	浴槽水
<i>L. pneumophila</i>	SG5	1	A	2002. 2. 15	浴槽水
		2	A	2002. 2. 15	浴槽水
		3	A	2002. 1. 23	患者
		4	C	2002. 10. 2	浴槽水
		5	C	2002. 10. 3	浴槽水
		6	C	2002. 10. 3	浴槽水
<i>L. pneumophila</i>	SG6	1	A	2002. 2. 15	浴槽水
		2	A	2002. 2. 15	浴槽水
		3	A	2002. 7. 25	循環式浴槽ろ材
		4	B	2003. 9. 11	浴槽水
		5	B	2003. 9. 11	浴槽水
		6	C	2002. 10. 10	浴槽水
		7	C	2004. 1. 27	浴槽水
計		30	株		

図1 レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法

(菌の培養)

BCYE α 寒天培地に菌を接種し、35-37°C、3日間培養する。



第1日目

(集菌)

- 1) 超純水を500 μ l入れた1.5mlのマイクロチューブにとり、菌をごく少量掻き取り懸濁する。(マックファーランド3程度)・・・0157の時(国立感染研からの新しい方法)と同じ程度にする。一緒に流す検体間では同じにすること。



(アガロースブロックの作成)

* 0.7mmのサンプルプラグキャスターを使用する。

- 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) 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を電子レンジで溶かし、50-55°Cに保温しておく。
- 3) 菌の不活化と、ゲルとの混和準備のために菌液を63°Cのウォーターバスに10分程度浮かす。
- 4) 3)の菌液のチューブに2)の1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水500 μ l入れ混和する。
- 5) 4)を1)のプラグ(0.7mmのサンプルプラグキャスター)に注入する。
- 6) 5)を氷上で固める。15-30分間放置する。



(Lysozyme 処理)

- 1) Lysozymeを、0.5M EDTAで10 mg/mlとなるよう溶解し、14mlチューブに1mlずつ分注(1ブロック作成用)する。
- 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over night、ゆっくり振盪する。



第2日目

(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、1%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTAで1 mg/mlとなるよう溶解し、Lysozyme液を抜き取ったチューブに1mlずつ分注(1ブロック作成用)する。
- 3) 50°Cでover night振盪反応。ブロックの保存はこの状態で行い、冷蔵保存する。(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) カバーグラス等を使って、泳動時の大きさ(0157の時と同様)に切り取りTE(シャーレ)をくぐらせ次の操作へ、残りは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°C1時間振盪反応させる(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°C1時間振盪反応させる(2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1ml加え、氷上で1時間穏やかに振盪する。
- 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1ml加え、振盪器を用いて氷上で1時間穏やかに振盪洗浄する。(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 $200\mu\text{l}$ を入れ、氷上で1時間振盪する。
- 2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (SfiI、 $30\text{unit} / \text{sample plug}$ を加える) をチューブに入れ、 50°C over night 振盪反応する。
(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) そのチューブに TE を $300\mu\text{l}$ 入れ氷上においておく。
- 3) 泳動用緩衝液 $\times 0.5$ TBE を $2,700\text{ml}$ 作成
 - ・泳動槽に TBE $2,000\text{ml}$ を入れ、予め 14°C まで Cool down する。
 - ・ $\times 0.5$ TBE で $1\%1.0\%$ SeaKem Gold を溶かし、 $55-60^\circ\text{C}$ に保温しておく。
 - ・ アガロースプラグ (検体およびマーカー) をコームに貼り付け、 $50-55^\circ\text{C}$ に保温した寒天を1滴ずつかぶせて固化させる (コーム貼り付け法)。
* マーカーはラムダラダー使用。使用直前に、 37°C 、5分間保温する。
 - ・ コームをゲル作成台に装着し (コームの先端は底板に接着させる)、寒天を流し込む。
 - ・ 寒天が固化した後 (30-45分)、コームを抜き、冷蔵庫で冷却させる (1時間程度)。
- 4) 泳動槽に 2L の泳動用バッファー ($0.5 \times \text{TBE}$) を入れ、あらかじめ 14°C に冷やしておく。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 $6.0\text{V}/\text{cm}$ 、5 to 50 sec 21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度蒸留水で洗浄し乾燥させておく。
- 2) 染色：ゲルは暗室で染色。 $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で30分 (時間厳守) 振盪・染色する。
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枚撮影する (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. 3機関におけるPFGE精度管理

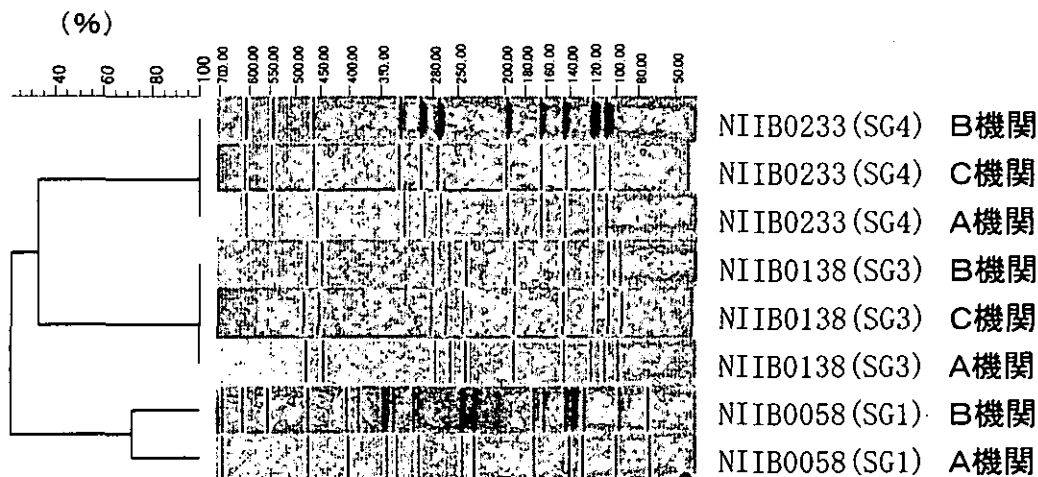


図3. 3機関でのSG1株のPFGEパターン比較解析

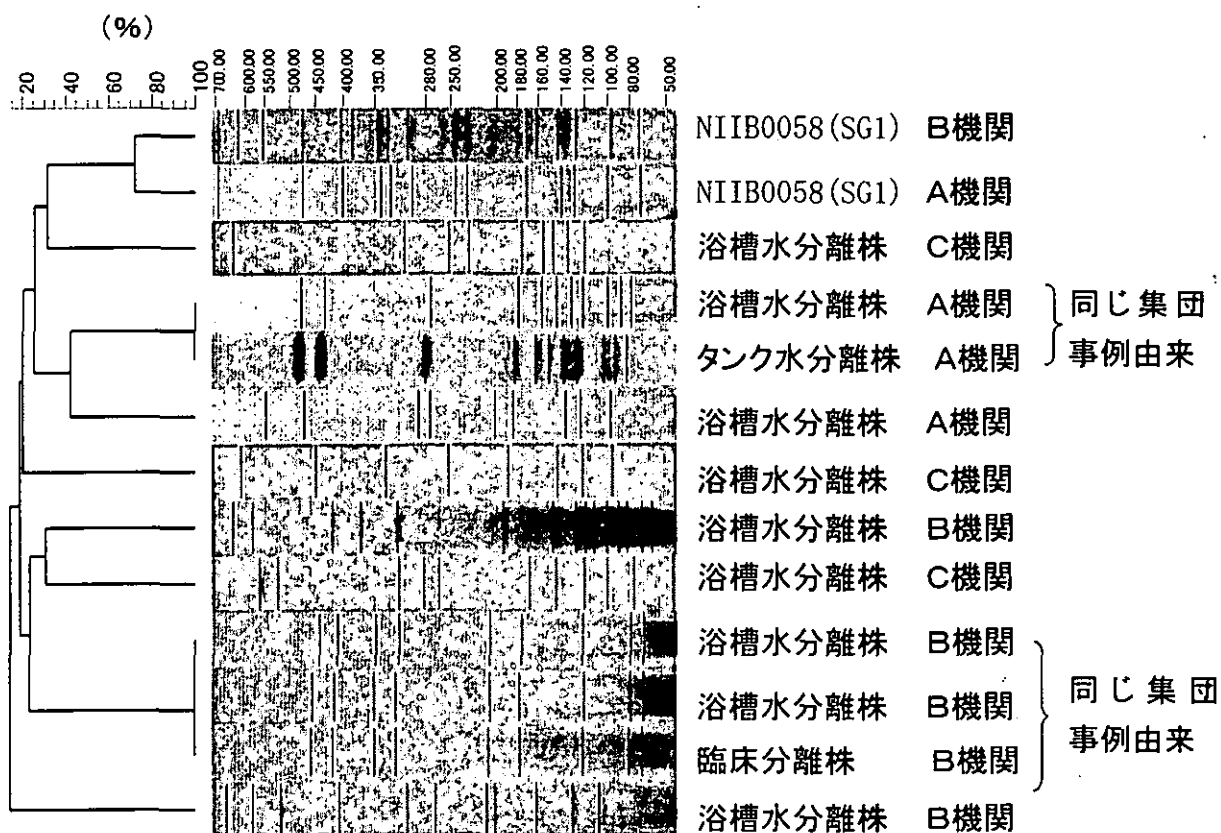


図4. 3機関でのSG3株のPFGEパターン比較解析

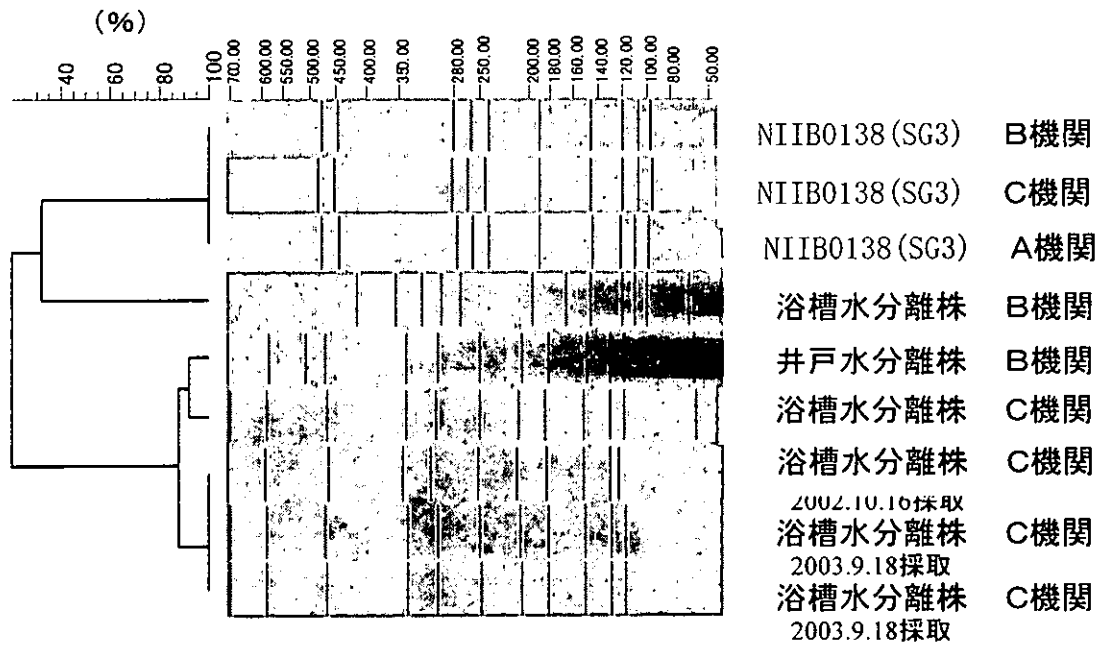


図5. 3機関でのSG5株のPFGEパターン比較解析

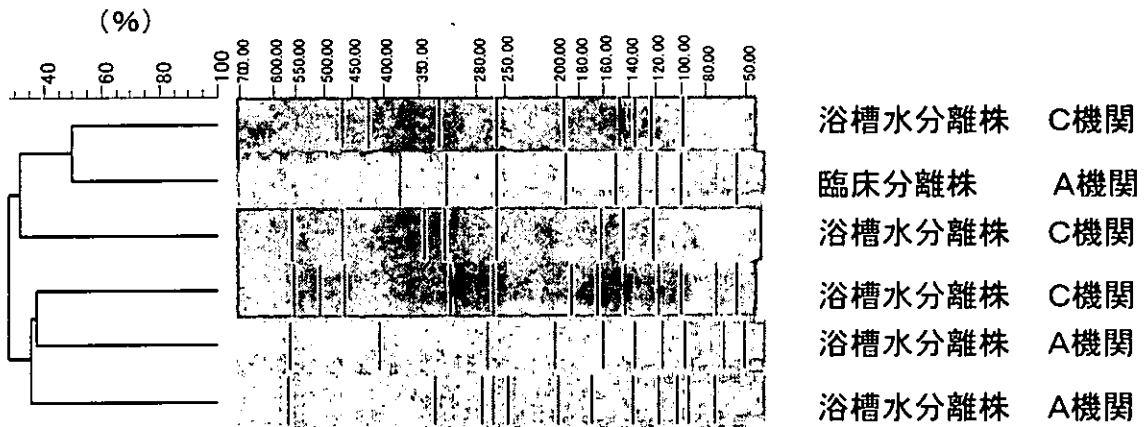
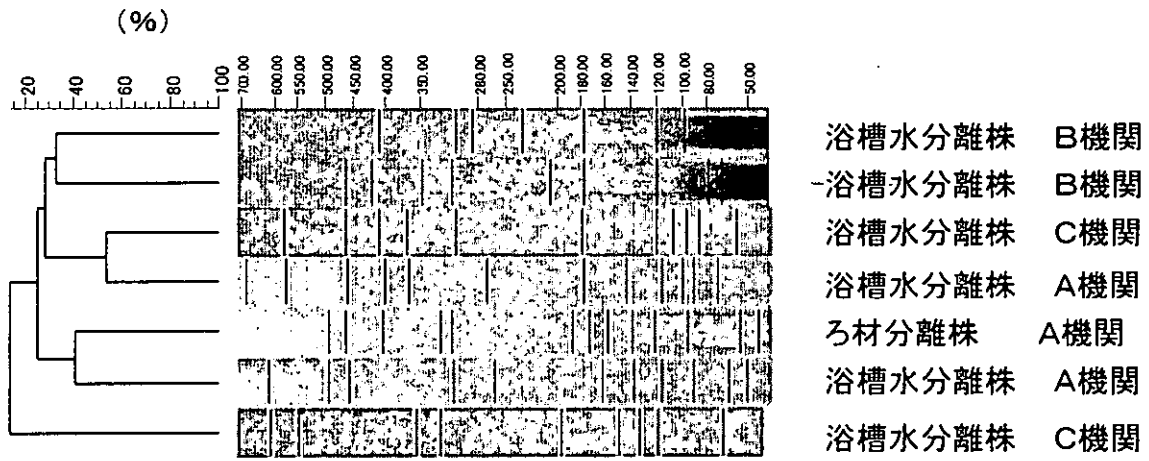


図6. 3機関でのSG6株のPFGEパターン比較解析



研究成果の刊行

誌上研究発表

1. Daisuke Tanaka, Junko Isobe, Shiho Hosorogi, Keiko Kimata, Miwako Shimizu, Koji Katori, Yotaku Gyobu, Yoshiyuki Nagai, Takayoshi Yamagishi, Tadahiro Karasawa and Shinichi Nakamura.
An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. Jpn. J. Infect. Dis. 56:137-139, 2003
2. H. Nakamura, M. Hatanaka, K. Ochi, M. Nagao, J. Ogasawara, A. Hase, T. Kitase, K. Haruki, Y. Nishikawa:
Listeria monocytogenes isolates from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan, and their molecular typing. International Journal of Food Microbiology. (in press) (2004)
3. Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H.
A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. Microbiol. Immunol. 48, 49-52, 2004
4. Izumiya, H., Nojiri, N., Hashiwata, Y., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H.
Salmonella enterica Serovar Enteritidis, Japan. Emerg. Infect. Dis. 9: 1650-1651, 2003
5. Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H.
Genotypic Analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and Development of a Pandemic Group-Specific Multiplex PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4676-4682, 2003
6. Shaikh, N., Terajima, J., and Watanabe, H.
IpaC of *Shigella* binds to the C-terminal domain of b-catenin. Microbial Pathogenesis 35, 107-117, 2003
7. Watanabe H, Terajima J, Izumiya H, and Iyoda S.
Molecular typing methods for STEC.
Methods Mol Med. 2003 73: 55-65. Review

8. Hiromi Nakamura, Jun Ogasawara, Cie Monma, Atsushi Hase, Hiroshi Suzuki, Akemi Kai, Kosuke Haruki and Yoshikazu Nishikawa
Usefulness of a combination of pulsed-field gel electrophoresis and enrichment culture in laboratory investigation of a foodborn outbreak due to *Clostridium perfringens*
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 47, 471-475, 2003.
9. 伊豫田淳, 渡辺治雄.
志賀毒素産生性大腸菌食中毒. 臨床検査. 2003 47(5):459-465.
10. 伊豫田淳, 渡辺治雄.
腸管出血性大腸菌感染症. 化学療法の領域. 2003 20(2):56-59.
11. 加藤一夫、須釜久美子、平澤恭子、長沢正秋、渡部啓司.
Salmonella Enteritidis のパルスフィールド電気泳動法による解析.
福島県医師会報 66(2) : 28-32.
12. 埼玉県衛生研究所
ユッケによる diffuse outbreak の可能性が疑われた O157 事例—埼玉県.
病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 24(9), 214, 2003.
13. 辻 英高、池野まり子、押部智宏、西海弘城ほか
腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例—兵庫県
病原微生物検出情報 24, 326, 2003
14. 丸岡捷治、山野親逸、原田 保、伊藤千恵、小石智和、竹上修平
Salmonella Enteritidis 集団食中毒事例—京都市
病原微生物検出情報 24, 214-215, 2003

学会発表

15. 鈴木匡弘、秦 眞美、松本昌門、鈴木康元
志賀毒素産生大腸菌 O157 の IS1203 による PCR 遺伝子型別分類法の開発.
第 40 回日本細菌学会中部支部総会、新潟市、2003.10.13.