

図1 嘔吐の発症頻度が高い原因物質のレーダー分布

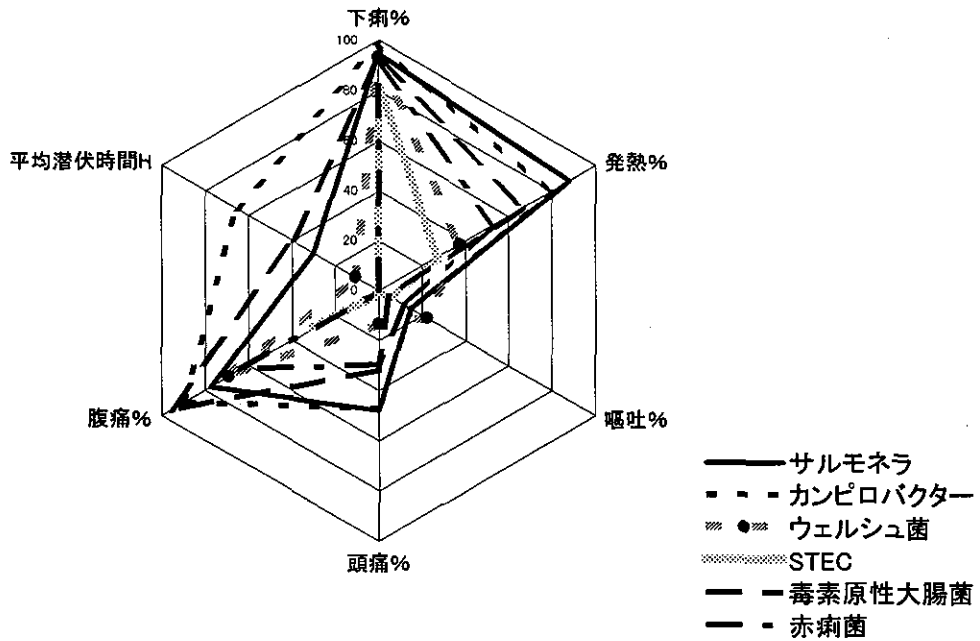


図2 嘔吐の発症頻度が低い原因物質の症状のレーダー分布

表1 原因物質別臨床症状

原因物質	ノロウイルス	サルモネラ	腸炎ビブリオ	カンピロバクター	ウエルシュ菌	腸管出血性大腸菌	毒素原性大腸菌	黄色ブドウ球菌	セレウス菌 (嘔吐型)	赤痢菌	
N=	87	108	48	59	45	178	27	46	5	25	
潜伏時間	平均潜伏時間 hr	36.1	30.2	16.4	65.3	10.7	-	39.7	3.3	0.8	-
	潜伏時間の幅 hr	11-72	6.5-72	1.5-35	24-115	2-19	-	13-83	0.5-10	0.5-2	-
下痢	下痢有症率 %	82.7	94.7	97.8	98.3	93.3	81.0	92.6	85.3	0	90.5
	平均下痢回数	4.7	7.9	7.9	11.7	5.4	-	8.2	4.7	0	8.4
	血便有症率 %	0	1.0	0	0	0	31.8	0	2.2	-	9.1
発熱	発熱有症率 %	66.7	87.8	56.7	78.7	37.2	27.4	66.7	12.0	0	52.9
	発熱平均温度 ℃	37.7	38.5	37.4	38.1	37.0	-	37.1	37.0	-	38.0
	最高発熱 ℃	40.3	40.0	39.0	40.0	39.9	-	38.1	38.0	-	40.2
嘔吐	嘔吐有症率 %	71.5	14.6	56.1	15.0	22	6.7	4.5	94.6	100	11.8
	平均嘔吐回数	3.1	0.4	2.0	0.5	0.3	-	0.1	7.9	3.8	0.1
	最高嘔吐回数	15	6	10	5	2	-	2	60	1-5	1
頭痛	頭痛有症率 %	36.0	48.0	1.2	47.2	13.3	1.1	31.8	17.6	-	29.4
腹痛	腹痛有症率 %	58.2	77.2	87.2	89.5	68.9	30.7	95.7	69.7	-	63.2

表2 腸管出血性大腸菌感染者の臨床症状とベロ毒素型

血清型	n	臨床症状 (%)									ベロ毒素型 (%)		
		下痢	血便	軟便	発熱	腹痛*	感冒症状	頭痛	HUS	嘔吐	1型*	2型*	1+2型*
O157	71	81.7	46.5	11.3	26.8	54.9	1.4	1.4	2.8	12.7	0	64.8	35.2
NON O157**	107	81.3	22.4	12.1	28.0	15.0	1.9	0.9	0.0	2.8	95.3	1.9	2.8
STEC	178	81.0	31.8	11.7	27.4	30.7	1.7	1.1	1.1	6.7	57.3	27.0	15.7

*P<0.01

**O26 : 79例, O111 : 22例, O103, O119, O121, O145, O153, O161 : 各1例

レジオネラ属菌についての PFGE 画像の機関間差の検討及び九州地区で
検出されたレジオネラ属菌のデータベース化についての基礎的研究

研究協力者	河野喜美子	岡田 美香	宮崎県衛生環境研究所
	田栗 利紹		長崎県衛生公害研究所
	丸住美都里		熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代		大分県衛生環境研究センター
	中山浩一郎		鹿児島県環境保健センター
	久高 潤		沖縄県衛生環境研究所
	瓜生 佳世		福岡市保健環境研究所
	藤田 景清		北九州市環境科学研究所
	松雪 星子		佐賀県衛生薬業センター
	植木 信介		長崎市保健環境試験所

研究要旨

レジオネラ属菌の細菌学的疫学指標データを有効活用するため、平成15年度に引き続き、標準菌株についてパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) 画像の精度管理を5機関で、各機関分離株について PFGE 画像の相同性比較を6機関で実施した。さらに、2000～2004年のレジオネラ属菌の由来別検出状況を10機関から収集した。

その結果、標準菌株5株の PFGE パターンは、それぞれの菌株で80%以上の類似性が見られたが、異なる機関間の画像を解析するためには、より高い類似性を持つ安定したデータが必要と思われた。

また PFGE を実施した各機関分離株62株中56株は *L. pneumophila* であり、これらは他の菌種と70%以下の類似性を示した。また、*L. pneumophila* 内での類似性は血清群とは関連せず、100%一致した6株を除き、約40～95%の類似性を示した。100%一致した6株のうち、3株は由来が同じであることが判明したが、他の3株は同じ県内の別々の3ヶ所の修景水 (噴水) 分離株であり一致した原因は明らかにできなかった。今後さらに菌株数を増やし本 PFGE 法 (制限酵素 *SfiI* 使用) の有用性を評価したい。

さらに10機関でのレジオネラ属菌の検出状況調査の結果、九州全体で15菌種 (その他に菌種不明有り)、そのうち *L. pneumophila* については12血清型 (その他に血清群不明有り) が検出されていることが明らかになった。

A. 研究目的

レジオネラ症集団感染事例において PFGE による遺伝子多型解析は原因究明に欠かせない手法である。また、近年は人の頻繁な移動により患者発生も一地方に限定されず広域に亘

ることも多い。その場合、他関係地域への情報の伝達、PFGE 解析結果の比較や交換が可能なシステムが必要となる。平成15年度は、異なる機関間の連携システムづくりを目的とし、3機関でレジオネラ標準菌株及び各機関分

離菌株の PFGE を実施し、その画像データを 1 機関に集めて解析した。その結果、標準菌株を用いた精度管理試験では概ね良好な結果が得られたが、安定した PFGE 画像を得るために方法の検討及び検査技術の向上が必要であることが示唆された。また、株数は少なかったが、各機関分離菌株を解析した結果、由来の異なる株間では遺伝子パターンの多型性が認められ、本 PFGE 法が疫学解析に有用であると推測された。平成 16 年度は、レジオネラ属菌に関する細菌学的疫学指標データを有効活用するため、各機関間の連携システムを作ることとを目的として、平成 15 年度の研究を引き続き実施した。さらに九州内でのレジオネラ属菌の由来材料別検出状況を調査し、情報の共有化を図った。

B. 研究方法

1. 参加機関

標準株を用いての PFGE の精度管理については 5 機関、各機関分離株の PFGE パターンの同一性比較については 6 機関、及びレジオネラ属菌の由来別検出状況調査については、10 機関が参加した。

2. 材料

PFGE の精度管理には、感染研から分与されたレジオネラ属菌標準菌株 5 株 (表 1) を使用した。また、各機関で分離されたレジオネラ属菌の PFGE 同一性比較解析には、参加機関で分離・選定された株を用いた。分離菌の総菌株数は 62 株で、その血清型、由来等を表 2 に示した。なお、分離菌株は、原則として、一施設から分離され、菌種・血清型・PFGE パターンが同一であった株を 1 株とした。

さらにレジオネラ属菌の由来別検出状況調査は、参加機関で分離されたレジオネラ属菌を調査対象とした。

3. PFGE の方法

PFGE の方法は原則として国立感染症研究所

のプロトコールに準じたが、一部、変更して実施した (図 1)。検査にあたって注意した点は、菌量を検討してから実施すること、サイズマーカーのラムダラダーは 37°C5 分間保温したものを用いること、泳動時の条件は厳守すること等であった。画像データは、画像解析装置で取り込んだ画像 (TIFF 形式、グレースケール、8 ビット) を、宮崎県衛生環境研究所へ送付し、解析した。

4. 画像解析法

各機関から送付された画像は、Fingerprinting™ II ソフトウェア (BIO-RAD) を用いて解析した。解析条件は、Dice、Band-Tolerance 値は 1.0%、最適化値 1.0% とした。

5. 各機関におけるレジオネラ属菌の由来材料別検出状況調査の方法

各機関に調査表をメール送信し、回答された結果を集計した。調査項目は、分離されたレジオネラ属の菌種、血清型、由来 (循環式公衆浴場、掛け流し式公衆浴場、24 時間風呂、冷却塔水、修景用水、患者、その他) とし、2004~2000 年、1999 年以前の 2 期間に分けて調査した。

C. 研究結果

1. 精度管理

標準菌株 5 種について、5 機関で PFGE を実施した画像を比較解析した (図 2)。5 菌株について 80%以上の類似性が見られたが、異なる機関間の画像を解析するためには、より高い類似性が望まれる。今回、類似性が低かった原因は、実施機関により、出たり出なかったりする薄いバンドがあったことである。これが、何に原因するものか明確にできなかったが、各機関で常に安定した PFGE 画像を得るためには、これらの問題を解消する必要がある。

2. 分離株の PFGE パターン比較解析

6 機関で分離された *Legionella* 属菌につ

いて PFGE を実施し、得られた画像を比較解析した結果を図 3~7 に示した。図 3 では、標準菌株 5 株及び今回実施した全分離株の PFGE パターンの類似性を示した。今回 PFGE を実施した 62 株中 56 株は *L. pneumophila* であり、これらは他の菌種と 70% 以下の類似性しかなく、菌種間で差があることが推測されたが、*L. pneumophila* 内では血清群によって類似したパターンを示すというような特徴的な傾向は認められなかった。最も株数の多かった SG1 (図 4) については、浴槽水分離株間で概ね 70% 以下の類似性を示し多型性が見られた。しかし D 機関で採取された由来の異なる修景用水分離株 3 株のパターンは 100% 一致しており、その原因が、同じ県内で由来が元々同じであるのか、違う由来の株が偶然同一パターンになったのかは明らかにできなかった。また A 機関の患者と患者が入浴した 2 つの浴槽水は 100% 一致した。SG5

(図 7)、SG 3 (図 6)、SG6 (図 8) については、それぞれ、約 85% 以下、75% 以下、80% 以下の類似性を示し、由来が異なる株で PFGE パターンが一致する株は見られなかった。

3. 各県市におけるレジオネラ属菌検出状況調査

各県市から送付されたレジオネラ属菌検出状況調査表を集計した。調査は 2000~2004 年と 1999 年以前の分離状況に分けて実施したが、1999 年以前の回答が少なく、今回は 2000~2004 年のみ集計し、その結果を表 3~10 に示した。九州全体では、患者、循環式公衆浴場、掛け流し式公衆浴場、24 時間風呂、冷却塔水、修景用水、ミネラルウォーターから、15 菌種 (その他に菌種不明有り)、そのうち *L. pneumophila* については 12 血清型 (その他に血清群不明有り) が検出されていた。循環式浴場からは最も多くレジオネラ属菌が検出され、*L. pneumophila* SG1~11、14、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei*、

L. londiniensis、*L. cherrii*、*L. erythra*、*L. israelensis*、*L. maceachernii*、*L. oakridgensis* 等が検出された。修景用水は 2 機関で調査されているが、浴槽水から検出されていない *L. hackeliae*、*L. feeleii*、*L. rubrilucens*、*L. anisa* 等の菌種が検出され、菌相の違いが示唆された。

D. 考察

昨年度に引き続き、検査機関間での、レジオネラ属菌の PFGE 画像交換と比較解析を実施した。昨年度の研究において、PFGE 画像のバンドが薄い機関が多く、今回は菌量を検討して実施したため、バンドの濃さについては、概ね良好な結果となった。また、ラムダラダーは 37°C 5 分保温したものを用い、ほぼ良好な成績が得られた。しかし、今回は、PFGE において、各機関によって出たり出なかつたりする薄い不安定なバンドが見られ、解析に支障を来すという問題が生じた。この原因を明らかにし問題を解消するには、使用菌株の培養期間、PFGE の方法、及び手技の問題などを検討するとともに、技術的訓練の必要があると考えられる。

分離株についての PFGE パターンの相同性比較では、供試された株のほとんどが *L. pneumophila* であったため、他の菌種についての解析、及び菌種間でのパターンの比較は十分にはできなかった。*L. pneumophila* の血清群間解析では、血清群によって類似したパターンを示すというような傾向は認められず、異なる血清型でも 90% 程度の類似性を示す株が見られた。今回、標準菌株を含む由来の異なる株 60 株 (患者株とその原因となった浴槽水分離株 2 株は 1 株とした) のうち、その PFGE パターンが一致したのは、D 機関で採取された修景用水 (噴水) 分離株 3 株のみであった。これらの修景用水のパターンが一致した原因が、同じ県内で由来が元々同じで

あるのか、明らかに違う由来の株が同一パターンになったのか明らかにできなかったが、この例を含めても、本 PFGE 法によるデータは疫学指標として有用であると考えられた。

さらに今回は 10 機関でレジオネラ属菌検出状況調査を行い、多菌種のレジオネラ属菌が、それぞれの材料から検出されていることが明らかになった。来年度もさらに調査を続け、レジオネラ属菌の生息状況等を明らかにしていきたい。

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、同じ菌株間では、80%以上の類似性で昨年より良くない結果であった。異なる機関間の画像を解析するためには、各機関で常に安定した PFGE 画像を得ることが必要で、そのために、方法の検討をするとともに、さらなる技術的訓練の必要がある。

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
NIIB0095	<i>Legionella micdadei</i>		臨床分離株
NIIB0091	<i>Legionella dumoffii</i>		臨床分離株

表 2 PFGE を実施したレジオネラ属分離菌株

菌種・血清型	株数*	由来	分離年
<i>L.pneumophila</i> SG1	1	源泉水 1	2003
	9	循環式浴槽浴槽水	2002-2004
	1	掛け流し式浴槽水	2004
	1	冷却塔水	1995
	4	修景水(噴水)	2004
	1	ヒト	2004
<i>L.pneumophila</i> SG3	1	源泉水 2	2003
	2	循環式浴槽浴槽水	2003
<i>L.pneumophila</i> SG5	13	循環式浴槽浴槽水	2003
	1	修景水(噴水)	2004
	1	ヒト	2002
<i>L.pneumophila</i> SG6	6	循環式浴槽浴槽水	2002-2004
<i>L.pneumophila</i> SG7	1	修景水(噴水)	2004
	1	がちょう用プール	2003
<i>L.pneumophila</i> SG8	1	循環式浴槽浴槽水	2002
	2	循環式浴槽ろ過器ろ材	2002
	1	循環式浴槽ふきとり	2002
	1	循環式ヘアキャッチャー	2002
<i>L.pneumophila</i> SG9	1	循環式浴槽浴槽水	2003
<i>L.pneumophila</i> SG10	1	循環式浴槽浴槽水	2003
	1	掛け流し式浴槽水	2003
<i>L.pneumophila</i> SG11	1	循環式浴槽浴槽水	2003
<i>L.pneumophila</i> SGUT	4	循環式浴槽浴槽水	2003
	1	がちょう用プール	2003
<i>L.dumoffii</i>	2	循環式浴槽浴槽水	2002-2003
<i>L.londiniensis</i>	1	循環式浴槽浴槽水	2002
<i>L</i> 属菌種不明	2	循環式浴槽浴槽水	2002
分離株合計	62		

* 菌株数は、一施設の検体から分離され、菌種・血清型・PFGE パターンが同一の株を 1 株とした。

表 3 九州地区における材料由来別レジオネラ属菌検出状況(2000～2004年)

菌種・血清群	患者	循環式 公衆浴場	掛け流し式 公衆浴場	24時間 風呂	冷却塔水	修景水	その他
	(5 機関)	(10 機関)	(3 機関)	(1 機関)	(2 機関)	(2 機関)	(1 機関)
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○	○	○	○	○	
<i>L.pneumophila</i> SG2		○					
<i>L.pneumophila</i> SG3		○	○	○			○ミネラル ウォーター
<i>L.pneumophila</i> SG4		○	○	○		○	
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○	○	○		○	
<i>L.pneumophila</i> SG6		○	○	○	○	○	
<i>L.pneumophila</i> SG7		○			○		
<i>L.pneumophila</i> SG8		○				○	
<i>L.pneumophila</i> SG9		○	○				
<i>L.pneumophila</i> SG10		○	○	○			
<i>L.pneumophila</i> SG11		○					
<i>L.pneumophila</i> SG14		○					
<i>L.pneumophila</i> SGUT		○					
<i>L.bosemanii</i>					○		
<i>L.dumoffii</i>	○	○	○				
<i>L.gormanii</i>		○					
<i>L.micdadei</i>		○				○	
<i>L.londiniensis</i>		○					
<i>L.cherrii</i>		○					
<i>L.erythra</i>		○				○	
<i>L.israelensis</i>		○					
<i>L.maceachernii</i>		○	○				
<i>L.oakridgensis</i>		○					
<i>L.hackeliae</i>					○	○	
<i>L.feeleii</i>						○	
<i>L.rubrilucens</i>						○	
<i>L.anisa</i>						○	
<i>L.spp</i>		○				○	

表 4 九州地区における患者からのレジオネラ属菌検出状況(2000～2004年)

菌種・血清群	患者 2000～2004年					
	全体 (5 機関)	宮崎県	大分県	福岡市	北九州市	鹿児島県
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○	○	○	○(血清抗体価)	○
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○				
<i>L.dumoffii</i>	○	○(血清抗体価)				

表5 九州地区における循環式浴場からのレジオネラ属菌検出状況(2000~2004年)

菌種・血清群	循環式公衆浴場										
	全体 (10機関)	福岡 市	北九州 市	佐賀 県	長崎 県	長崎 市	熊本 市	大分 県	宮崎 県	鹿児島 県	沖縄 県
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG2	○	○	○				○	○			
<i>L.pneumophila</i> SG3	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○
<i>L.pneumophila</i> SG4	○	○		○			○	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG7	○	○							○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG8	○	○	○				○		○		○
<i>L.pneumophila</i> SG9	○	○	○		○	○	○		○		○
<i>L.pneumophila</i> SG10	○	○					○		○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG11	○									○	
<i>L.pneumophila</i> SG14	○									○	
<i>L.pneumophila</i> SGUT	○		○		○						
<i>L.bosemanii</i>											
<i>L.dumoffii</i>	○	○			○		○		○		
<i>L.gormanii</i>	○						○				
<i>L.micdadei</i>	○	○	○				○		○		
<i>L.londiniensis</i>	○								○		
<i>L.cherrii</i>	○	○									
<i>L.erythra</i>	○	○									
<i>L.israelensis</i>	○	○									
<i>L.maceachernii</i>	○	○									
<i>L.oakridgensis</i>	○	○									
<i>L.spp</i>	○		○						○		

表 6 九州地区における掛け流し式浴場からのレジオネラ属菌検出状況(2000~2004年)

菌種・血清群	掛け流し式公衆浴場			
	全体 (3機関)	福岡市	大分県	鹿児島県
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG2				
<i>L.pneumophila</i> SG3	○	○		○
<i>L.pneumophila</i> SG4	○	○		
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○		○
<i>L.pneumophila</i> SG6	○	○		
<i>L.pneumophila</i> SG7				
<i>L.pneumophila</i> SG8				
<i>L.pneumophila</i> SG9	○	○		
<i>L.pneumophila</i> SG10	○	○		
<i>L.pneumophila</i> SG11				
<i>L.pneumophila</i> SG14				
<i>L.pneumophila</i> SGUT				
<i>L.bosemanii</i>				
<i>L.dumoffii</i>	○	○		
<i>L.gormanii</i>				
<i>L.micdadei</i>				
<i>L.londiniensis</i>				
<i>L.cherrii</i>				
<i>L.erythra</i>				
<i>L.israelensis</i>				
<i>L.maceachernii</i>	○	○		
<i>L.oakridgensis</i>				
<i>L.spp</i>				

表 7 九州地区における24時間風呂からのレジオネラ属菌検出状況(2000~2004年)

菌種・血清群	24時間風呂	
	全体 (1機関)	福岡市
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG2		
<i>L.pneumophila</i> SG3	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG4	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG6	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG7		
<i>L.pneumophila</i> SG8		
<i>L.pneumophila</i> SG9		
<i>L.pneumophila</i> SG10	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG11		
<i>L.pneumophila</i> SG14		
<i>L.pneumophila</i> SGUT		
<i>L.bosemanii</i>		
<i>L.dumoffii</i>		
<i>L.gormanii</i>		
<i>L.micdadei</i>		
<i>L.londiniensis</i>		
<i>L.cherrii</i>		
<i>L.erythra</i>		
<i>L.israelensis</i>		
<i>L.maceachernii</i>		
<i>L.oakridgensis</i>		
<i>L.spp</i>		

表 8 九州地区における冷却塔水からのレジオネラ属菌検出状況(2000～2004年)

菌種・血清群	冷却塔水		
	全体 (2機関)	福岡市	長崎市
<i>L.pneumophila</i> SG1	○		○
<i>L.pneumophila</i> SG2			
<i>L.pneumophila</i> SG3			
<i>L.pneumophila</i> SG4			
<i>L.pneumophila</i> SG5			
<i>L.pneumophila</i> SG6	○		○
<i>L.pneumophila</i> SG7	○		○
<i>L.pneumophila</i> SG8			
<i>L.pneumophila</i> SG9			
<i>L.pneumophila</i> SG10			
<i>L.pneumophila</i> SG11			
<i>L.pneumophila</i> SG14			
<i>L.pneumophila</i> SGUT			
<i>L.bosemanii</i>	○	○	
<i>L.dumoffii</i>			
<i>L.gormanii</i>			
<i>L.micdadei</i>			
<i>L.londiniensis</i>			
<i>L.cherrii</i>			
<i>L.erythra</i>			
<i>L.israelensis</i>			
<i>L.maceachernii</i>			
<i>L.oakridgensis</i>			
<i>L.hackeliae</i>	○	○	
<i>L.feeleii</i>			
<i>L.spp</i>			

表 9 九州地区における修景水からのレジオネラ属菌検出状況(2000~2004年)

菌種・血清群	修景水 2000~2004年						
	全体 (2機関)	噴水		滝		水時計	川
		福岡市	沖縄県	福岡市	沖縄県	福岡市	福岡市
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○	○	○	○	○	○
<i>L.pneumophila</i> SG2							
<i>L.pneumophila</i> SG3							
<i>L.pneumophila</i> SG4	○	○					
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○	○				
<i>L.pneumophila</i> SG6	○	○					
<i>L.pneumophila</i> SG7			○				
<i>L.pneumophila</i> SG8	○	○					
<i>L.pneumophila</i> SG9							
<i>L.pneumophila</i> SG10							
<i>L.pneumophila</i> SG11							
<i>L.pneumophila</i> SG14							
<i>L.pneumophila</i> SGUT							
<i>L.bosemanii</i>							
<i>L.dumoffii</i>							
<i>L.gormanii</i>							
<i>L.micdadei</i>	○	○		○			
<i>L.londiniensis</i>							
<i>L.cherrii</i>							
<i>L.erythra</i>	○			○			
<i>L.israelensis</i>							
<i>L.maceachernii</i>							
<i>L.oakridgensis</i>							
<i>L.hackeliae</i>	○	○					
<i>L.feeleii</i>	○	○		○			
<i>L.rubrilucens</i>	○	○					
<i>L.anisa</i>	○			○		○	
<i>L.spp</i>	○				○		

表 10 九州地区におけるその他の材料からのレジオネラ属菌検出状況(2000~2004年)

菌種・血清群	全体 (1 機関)	その他 2000~2004年
		鹿児島県
<i>L.pneumophila</i> SG3	○	○ミネラルウォーター

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

九州ブロック統一マニュアル

本方法は、感染研の検査マニュアルに準じています。

第1日目 (菌の培養)

BCYE α 寒天培地に菌を接種し、35-37°C、3日間培養

↓

第2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。
(マックファーランド?程度?)...これについては昨年マックファーランド3で薄かったのもっと濃目にする。一緒に流す検体では同じにすること。

↓

(アガロースブロックの作成) できれば、0.7mmのサンプルプラグキャスターを使用。

- 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。
(又は0.7mmサンプルプラグキャスター使用)
- 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。
- 5) 4)を1)のplug mold(又は0.7mmのサンプルプラグキャスター)に注入。
- 6) 5)を氷上で固める。15-30分間放置。

↓

(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)。
- 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

↓

(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)。
- 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。(ここで止めても良い)

↓

第3日目 (プロテナーゼKの不活化・洗浄)

- 1) アガロースブロックを取り出し、カバーガラス等を使って、泳動時の大きさ(O157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。
- 2) 新しいチューブに4mM Pefabloc in TEを0.5ml 加え、1)のアガロースブロックを入れ、50°Cで1時間振盪反応(1回目)。
- 3) Pefabloc 液を丁寧に抜き取り、新しい4mM Pefabloc in TEを0.5ml 加え50°Cで1時間振盪反応(2

回目)。

4) Pefabloc 液を除去し、TE を1ml 加え、氷上で1時間穏やかに振盪し、平衡化・洗浄を2回行う。

(ここで止めても良い)

↓

(制限酵素による消化)

1) 制限酵素を含まない buffer 200 μ l を入れた新しいチューブに、アガロースブロックを移し、氷上で1時間振盪。

2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (Sfil, 30unit / sample plug を加える) をチューブに入れ、50°C over night 振盪反応 (ここで止めても良い)

↓

第4日目 (アガロースブロックのコームへの貼り付け)

- 1) 0.5 × TBE 100ml に1gの SeaKem Gold アガロースを加え、溶解。
- 2) 55-60°Cの恒温水槽で、溶解した1%アガロースを保温する。
- 3) 50°Cの恒温水槽からチューブを取り出し、0.5 × TBE を 400 μ l 加え、氷冷。
- 4) ゲルの作成台において先端が gel platform の底に接していることを確認。
- 5) 泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き、順にプラグを貼り付けていく。
- 6) マーカーは入ラダーを使用。入ラダーは、貼り付ける前に、泳動用の大きさに切り、TE で洗浄後、ブロックを、TE 1ml程度を入れた 1.5ml チューブに入れ、37°Cの恒温槽に5分間浸ける。5分間たったら急冷し、他のサンプルと同じ方法で、コームに貼り付ける。
- 7) コームにある余剰の液を滅菌したキムワイパーで除く。5~10 分間乾燥。
- 8) コームの先端がプラットホームに接着するようにコームをゲル作成台にセット。
- 9) 溶解・保温したアガロースをゲル作成台にゆっくりとコームの反対側から注ぎ込む。
- 10) 黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、2Lの0.5 × TBEを注ぎ入れ、14°Cに予冷。
- 11) 30~45 分間アガロースを固化させた後、アガロースからコームを抜く。

※: 余分なバッファーをキムワイパー等で吸い取る。プラグと一緒に残っているバッファーが多いと乾くのに時間がかかる。

※: 完全に溶かした泳動用アガロースゲルは、あらかじめ 55~60°Cに保温しておく。あまり熱いゲルを注ぎ込むとコームに貼り付けたプラグがずり落ちることがある。

↓

(泳動)

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、パルスタイム 5秒から 50秒 21時間泳動

↓

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 фоль 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。
アルミフイル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。

図2 PFGE 精度管理

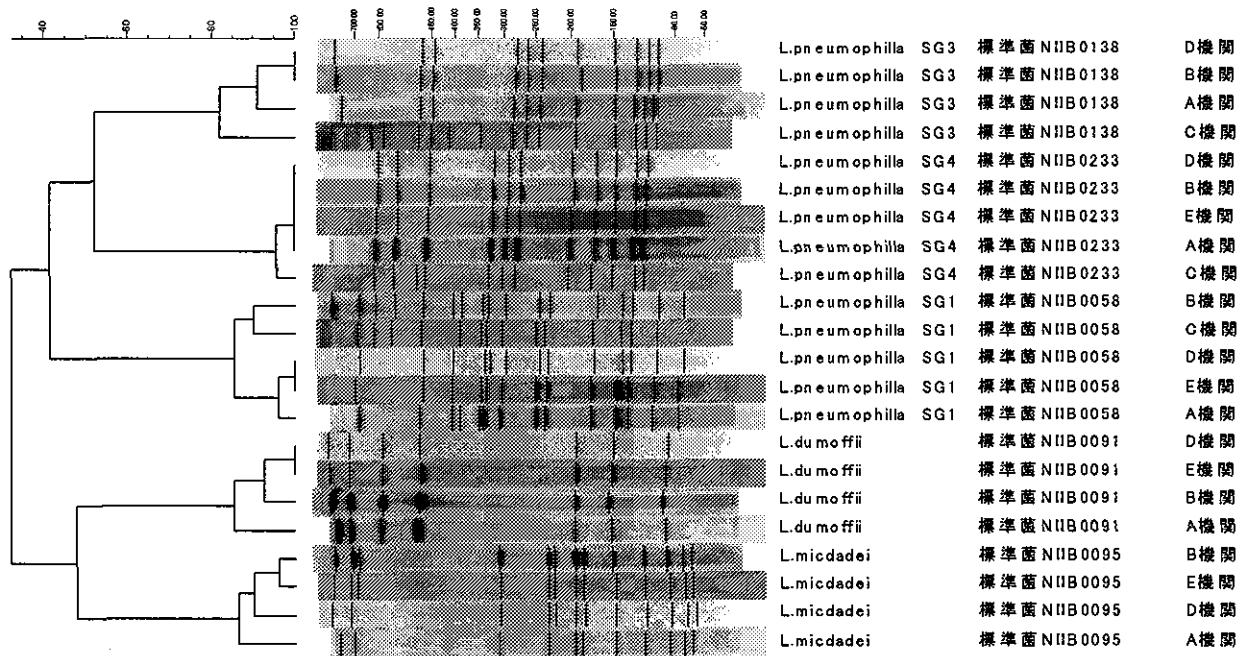


図4 *L. pneumophila* SG1 の PFGE パターンの比較

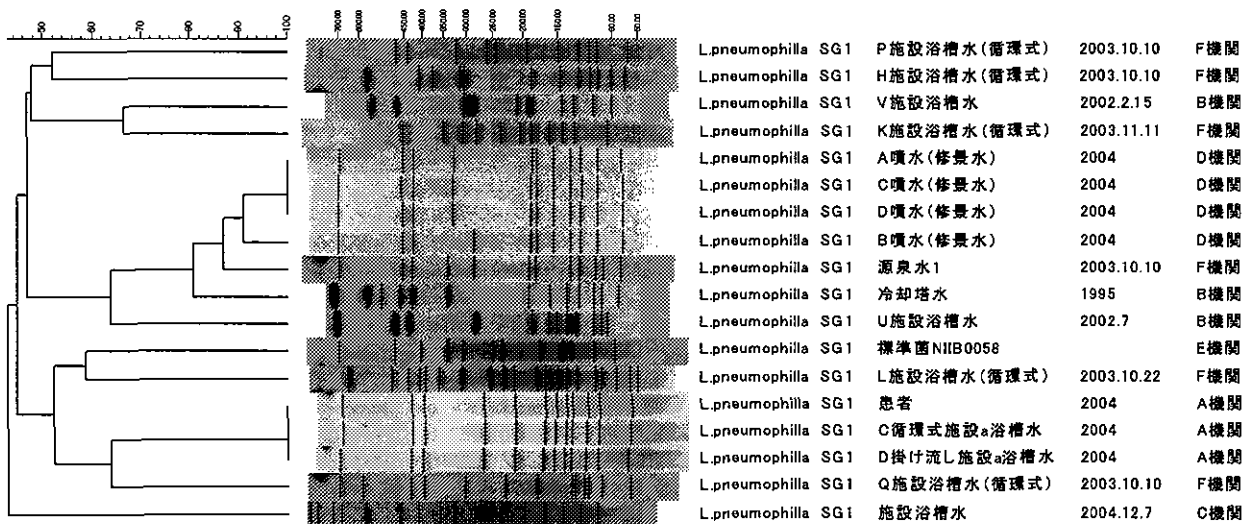


図5 *L. pneumophila* SG3 のPFGEパターンの比較

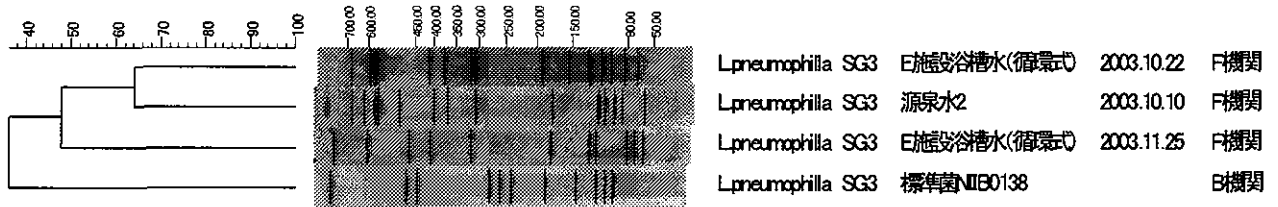


図6 *L. pneumophila* SG5 のPFGEパターンの比較

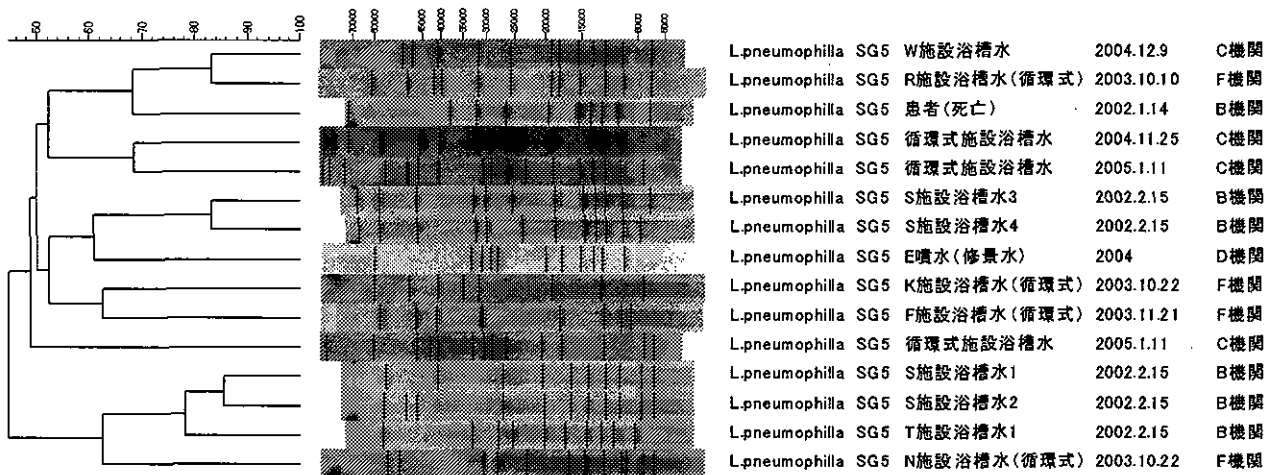
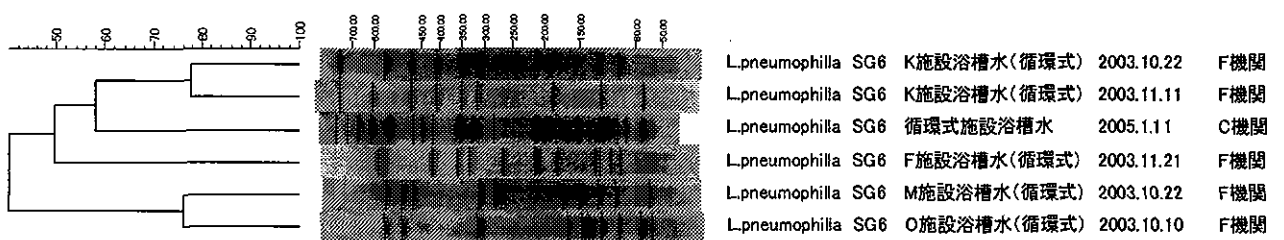


図7 *L. pneumophila* SG6 のPFGEパターンの比較



研究成果の刊行

誌上研究発表

1. 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.
2. Masakado Matsumoto, Kenji Sakae, Michio Ohta, Miyoko Endo, Rumi Okuno, Shoko Murayama, Kyoko Hirasawa, Rieko Suzuki, Junko Isobe, Daisuke Tanaka, Chihiro Katsukawa, Aki Tamaru, Masaaki Tomita, Kikuyo Ogata, Tomihisa Yasuoka, Tadayoshi Ikebe, Haruo Watanabe and The Working Group for Group A Streptococci in Japan.
Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A Streptococcus isolates of T serotypes 4 and 11. Int. J. Antimicrob. Ag. 25:142-147, 2005.
3. Nagiec MJ, Lei B, Parker SK, Vasil ML, Matsumoto M, Ireland RM, Beres SB, Hoe NP, Musser JM. Analysis of a Novel Prophage-encoded Group A *Streptococcus* Extracellular Phospholipase A2. J. Biol. Chem. 279:45909-18. 2004.
4. Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Masao Takahashi and Kenji Sakae.
Development of a rapid PCR method using the insertion sequence *IS1203* for genotyping shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. J. Clin. Microbiol. 42:5462-5466, 2004.
5. Taguchi, M., Seto, K., Kanki, M., Tsukamoto, T., Izumiya, H., and Watanabe, H. :
Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104, Jpn. J. Infect. Dis., 58:55-56 2005
6. Seno M, Sakaki M, Ogawa H. Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited area during one year. J. Infect. 49:291-296, 2004.
7. 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

8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 千葉県衛生研究所
3種類の腸管出血性大腸菌 O157 が検出された大学内集団感染事例—千葉県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 25(6), 144, 2004.
13. 横浜市衛生研究所
横浜市内の幼稚園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 による集団食中毒事例, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 25(6), 149, 2004.
14. 千葉県衛生研究所
保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O103:H2 による集団感染事例—千葉県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 25(6), 150, 2004.
15. 神奈川県衛生研究所
保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症の集団事例—神奈川県, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 26(1), 18, 2005.