

表1. 各機関のPFGEの方法および機器に関する実際

地研	菌の培養			DNAの精製-アガロース包埋			PFGE装置名	ゲルの染色および撮影					PFGE解析
	菌の培養	培養時間	培養条件	菌洗浄液	包埋用液名	菌液保温度度		イルミネーター機種名および会社名	写真撮影装置名および会社名	写真フィルム名	UV波長	画像取り込み装置名および会社名	
1	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	63°C	Mapper	UV Transilluminator, TM-20, フナコシ	POLAROID MP-4 LAND CAMERA	ポラロイド665	312	Kodak EDAS 290, 1D3.5.3	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
2	3ml TSB	16-18h	静置	生食	超純水	63°C	GenePath system	GelDoc EQ	同左	同左	302	GelDoc EQ	Finger Printing II
3	TSB	16-18h	静置	生食	ミリQ水	63°C	CHEF-DR III	Bio-Rad GEL DOC2000	Bio-Rad GEL DOC2000	*三菱カラービデオコピープロセッサ用紙	302	Bio-Rad GEL DOC2000	Finger Printing II
4	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	55°C	Mapper	UVP High Performance TFM-20 UV Transilluminator, TM-36, フナコシ	フナロイドカネラ-TM	ポラロイド667	312	-	なし
5	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	63°C	CHEF-DR III	UV Transilluminator, DT20MGT, ATTO	POLAROID MP-4 LAND CAMERA	FUJIFP3000B	312	EPSON-GT9300UF	Bionumerics
6	TSB	16-18h	静置	滅菌生食	蒸留水	63°C	CHEF-DR III	TOYOBO FAS-III	-	-	300	FUJIFILM DF-20M	なし
7	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	63°C	CHEF-DR III	Bio Image Gel Print 200i/VGA	Bio Image Gel Print 20i/VGA	-	312	Bio Image Gel Print 20i/VGA	なし
8	TSB	16h	静置	生食	蒸留水	63°C	GenePath	UV Transilluminator, N TM-36, フナコシ	POLAROID MP-4 LAND CAMERA	ポラロイド665	302	BIORAD GelDoc 1000	MOLECULAR ANALYST /MACINTOSH FINGERPRINTING
9	TSB	16-18h	静置	PBS	蒸留水	63°C	CHEF-DR III System	Insta Doc II BIO-RAD	Insta Doc II BIO-RAD	mitsubishi K65H-CE/KP65H-CE	302	Insta Doc II BIO-RAD	Finger Printing II
10	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	63°C	CHEF-DR III	使用せず	使用せず	使用せず	312	シニマックソリューションズ Gelprint 2000i	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
11	TSB	16-18h	静置	生食	蒸留水	63°C	CHEF-DR III	Mini-Transilluminator BIO RAD	フナロイドカメラ FP-6000型	FUJIFILM FP-3000B	302	Gel Doc 2000 BIO RAD	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
12	普通寒天	16-18	静置	DW	滅菌超純水	56°C	GenePath	UV Transilluminator, TM-20, フナコシ	POLAROID MP-4 LAND CAMERA	Polaroid Polapan 3200B	312	EPSON GT7600S	Finger Printing II DST BIO RAD

表2. 画像サイズ、泳動条件および反応時間

地研	画像 サイズ, kb		泳動時間, hr		泳動槽温度, °C		備考		ProteinaseK 反応時間		制限酵素 反応時間	
	Step1	Step2	Step1	Step2	Step1	Step2	Step1	Step2				
1	637 × 580 364.tif	637 × 580 364.tif	21	21	14	14			over night		over night	
2	640 × 480 304 TIFF	640 × 480 304 TIFF	19	19	14	12			over night		over night	
3	640 × 480 302.tif	2048 × 1536 3.0Mb, tif	19	19	14	14			3 hr		16	
4	1260 × 951 68.3 JPEG	1260 × 981 64.9 JPEG	19	19	14	14	泳動アガー1.1%	泳動アガー1.2%	over night	over night	4	4
5	475 × 563 265	687 × 571 386.tif	18.5	19	12.5	12			over night		over night	
6	640 × 480 901	640 × 480 901.tif	19, 18	19	14, 13	12			over night	20hr	over night	16hr
7	640 × 480 300.tif	640 × 480 300.tif	19	19	12	12			19.5		4	
8	2592 × 1944 4840 JPEG	640 × 480 302.tif	19	18.5	14	12			over night	over night	over night	over night
9	640 × 480 293.tif	640 × 480 290.tif	19	21	14	12			24	over night	16	16
10	185 × 470 86.2.tif	640 × 480 300.tif	19	19	14	14			over night		over night	
11	640 × 480 300.tif	640 × 480 303.tif	19	19	14	14			16		15	
12	1113 × 861 11400 TIFF	1089 × 828 887 TIFF	18	18	14	14	直接DWに掻き取る	直接DWに掻き取る	2.5 hr	2 hr	4	4 hr

図 1. 大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

九州ブロックマニュアル

第 1 日目 菌の培養

3ml の TSB に菌を接種し, 35-37°C, 16-18 時間, 静置培養

第 2, 3 日目 集菌, アガーブロック作製, ProtenaseK 処理, ProtenaseKの失活, 制限酵素処理, 泳動

[集菌とアガーブロックの作製]

- 1) 1.5ml のマイクロチューブに培養液を 1,000 μ l とり, 12,000 rpm で 5 分間冷却遠心する.
- 2) 上清を除去後, 滅菌生理食塩水または PBS1,000 μ l を加え混和後, 12,000 rpm, 5 分間冷却遠心する.
- 3) 2) の操作を繰り返す(2 回洗浄).
- 4) 上清を除去後, 滅菌超純水 500 μ l を加え, 懸濁する.
S. Braenderup H9812 は滅菌超純水 250 μ l を加え, 懸濁する.
- 5) 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.
- 6) 5) のチューブに 50-55°C で保温した 1% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 500 μ l 入れ混和する.
S. Braenderup H9812 は 1% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 250 μ l を加え, 懸濁する.
寒天が熱いのでチップが膨化し, 2 度目以降は寒天量が多くなるのでチップは 1 回毎替える.
- 7) 予めアガロースブロック作成用ウエルにテープを貼り番号を付け, 氷上で冷したサンプルプラグキャスター(0.7mm) に 6) を 120 μ l 注入する.
- 8) 7) を氷上で 15-30 分間放置し, 固化させる.

[ProtenaseK 処理]

- 9) ProtenaseK を 1 mg/ブロック分秤量し, 1% N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA で 1 mg/ml となるよう溶解し, チューブに 1ml ずつ分注(1ブロック作製用).
- 10) 固化したアガーブロックを 50°C に保温した 1) の溶菌液入りチューブの中に落とし入れる.
使用したモールド及びミニスパーテルなどは消毒用エタノールで浸漬あるいはスプレーし消毒する.
- 11) 50°C で 2h - over night 緩やかに振盪する。(できれば over night 以上反応させた方がよい. また時間延長は 72 時間まで可能).
(ここで止めてもよい, ブロックの保存はこの状態で冷蔵保存する)

[プロテナーゼKの不活化・洗浄]

- 12) アガロースブロックを取り出し, メスやカバーグラスを使ってプラグを半分にかットする.
残りは 0.5mg ProtenaseK in TE で冷蔵保存する.
- 13) 500 μ l ずつ分注した 1mg(4 mM) Pefabloc SC(AEBSF)/ml in TE にブロックを移し, 50°C, 20 分以上振盪し ProtenaseK を不活化する(1 回目).
- 14) Pefabloc 液を抜き取り, 新しい 4mM Pefabloc in TE を 500 μ l 加え 50°C, 20 分間以上振盪する(2 回目).
- 15) Pefabloc 液を抜き取り, TE を 2ml 加え 50°C で 20 分以上振盪し洗浄する.
この洗いの操作が重要. この操作を 2 回行う.
(ここで止めても, 1 週間以内であれば冷蔵保存できる. 日をおいて再開する場合は TE で再度洗浄する. この時

50℃の恒温水槽で20分間ゆっくり振盪する。この操作を2回繰り返す。）

[緩衝液による平衡化及び制限酵素による消化]

- 16) アガーブロックを TE 液からパラフィルムなどの上に取り出し、コーム幅×約2-3mmに整形する。
- 17) 制限酵素を含まない制限酵素用のバッファーを1.5mlチューブに200μl分注しする。
- 18) スライスしたアガーブロックを17)に入れ37℃で20分以上振盪する。
- 19) バッファーを丁寧に抜き取り、制限酵素の入ったバッファー(XbaI, 30unit / sample plug)を100μlチューブに入れ、37℃で2時間—over night 振盪反応する。
(16時間以上の反応は行なわない。またここで作業を止める場合は、TEで2回洗浄した後TEで冷蔵保存する。保存したアガーブロックを泳動する場合は、泳動前に室温程度の温度のTEで2回洗浄する。)

[アガロースプラグのコームへの貼り付け]

- 20) 37℃の恒温水槽からチューブを取り出し、0.5×TBEバッファー(TEでも可)を400μl加え、氷冷する。
- 21) 15穴コームを装着し、予めゲルの作成台において先端がgel platformの底に接着していることを確認する。
- 22) 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。
- 23) コームにある液をキムワイパーで除き、10分間程度乾燥させる。

[泳動用アガロースゲルの作製]

- ゲル・フレームを泳動槽に装着し、2Lの0.5×TBEバッファーを泳動槽に注ぎ入れ、14℃に予冷する。
- 24) 0.5×TBEバッファー100mlにSKGアガロース1gを加え、電子レンジ等で溶解する。
 - 25) 55-60℃の恒温水槽で溶解した1)を保温する。
*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。
 - 26) コームの先端がプラットフォームに接着するようコームをゲル作製台にセットする。
 - 27) 溶解・保温したアガロースをとコームの反対側からゲル作製台にゆっくり注ぎ込む。
 - 28) 30-45分間アガロースを固化させた後、コームをアガロースから抜く。

[泳動]

- 29) 泳動槽に周りに付着した寒天の破片を拭取ったゲルをフレームに装着する。
- 30) 泳動槽のバッファー温度が14℃になっていることを確認し、泳動開始する。

泳動条件は、は6.0V/cm, 2.2 to 54.2 sec, 19時間, 14℃

*泳動槽や温度、TBEのメーカーなどにより泳動距離が異なるので、時間やバッファー温度を調整する。

S. Braenderup H9812 マーカーの最後のバンドが泳動用ゲルの端から1-1.5cmのところにくるように時間を設定する。

第3, 4日目 染色・写真撮影

- 1) 染色 : ゲルは暗室で0.3μg/mlのエチジウムブロミド300ml(TBE)で30分(時間厳守)間振盪して染色する。染色, 脱色中にはバットに蓋をする。
- 2) 脱色 : 染色したゲルを蒸留水を交換し定期的に振盪しながら、2時間脱色, 洗浄する。
例)10分, 10分, 20分, 20分, 20分, 20分。特に最初が肝心。
- 3) 写真撮影: イルミネーターにサララップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真をとる。

パワーポイント参照

ゲルドックなどで取込を行なう場合

ゲル全体を撮影するし、8ビット・TIFF形式、圧縮無しで保存する。

ポラロイド写真

- 1 枚目はゲルの下端と上端ぎりぎりにして全体写真に撮る.
- 2 枚目はゲルの下端に固定して極限までアップでとる.

必要試薬

- ① 滅菌生理食塩水
- ② 滅菌超純水
- ③ プロテナーース K
- ④ 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- ⑤ TE バッファー

1 リットルあたりに下記試薬を超純水に加え 121°C, 15 分間オートクレーブ

1M Tris buffer(pH8.0) を 10ml(最終濃度 10mM Tris)

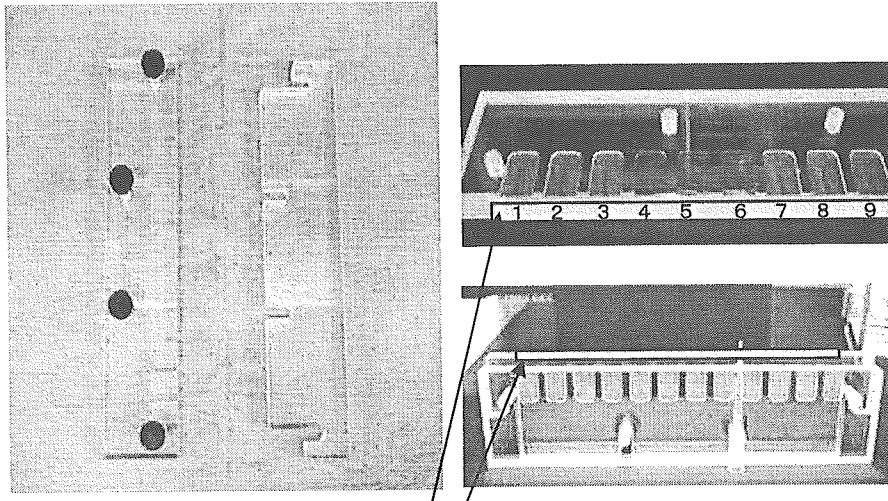
0.5M EDTA(pH8.0)を 2ml(最終濃度 1mM EDTA)

- ⑥ SeaKem Gold agarose

試薬の調製

- ① 溶菌液(プロテナーース K 最終濃度 1mg/ml)
 - a. 0.5 M EDTA (pH 8.0)に N-lauroylsarcosine を 1%加え 50°Cの恒温水槽で溶かす.
 - b. 次にプロテナーース K を a に 1mg/ml 加える.
- ② プロテナーース K 不活化液(ペファブロック最終濃度 1mg/ml, 4 mM)
Pefabloc SC (AEBSF)を TE バッファーに 1mg/ml となるよう加え, 溶解する.
- ③ プラグ作製用アガロースゲル
SeaKem Gold agarose を滅菌超純水で 1%となるよう溶解する.
- ④ PFGE 用小アガロースゲル(大ゲル)
SeaKem Gold agarose 1g(1.5g)を 100ml(150ml)の 0.5×TBE バッファーで溶解する.
- ⑤ 0.5×TBE バッファー
5×TBE バッファーを超純水で 10 倍に希釈したもの.

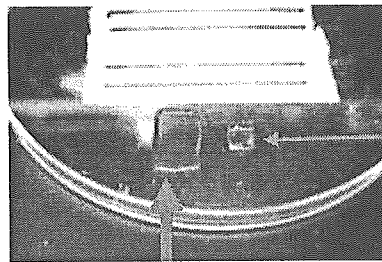
・・・00サンプルプラグキャスターの準備



紙テープなどをカットして貼り番号を書くと作業がし易い

プラグ作成後は、アルコールなどで殺菌すること。

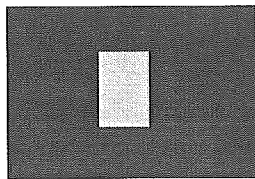
プラグのサイズと
カットの時期



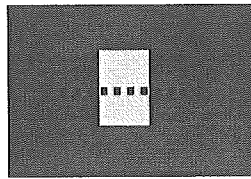
ディスポのプラグ
キャスターで
作製したプラグ

サンプルプラグキャスターで作製したプラグ

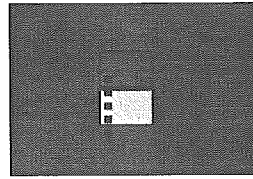
処理中のプラグの大きさ(あくまでも例です, 制限酵素処理は各自やりやすいサイズで)



ProtenaseK 処理
サイズは元のまま



プロテナーゼKの不活化・
洗浄前にカット

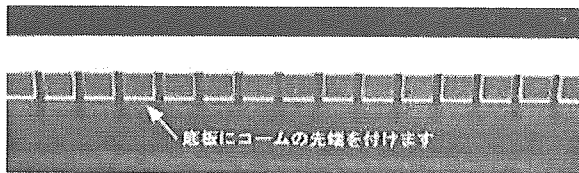


緩衝液による平衡化及び
制限酵素による消化 後カット

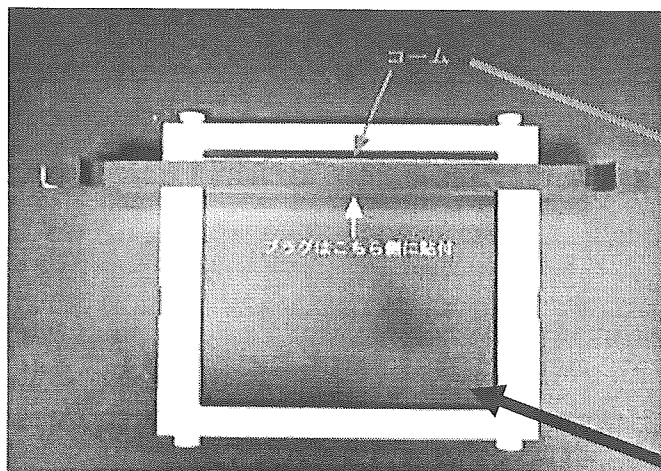
残りのプラグは→・・・01・2TQVGPCUG- KP・6' 残りのプラグは→TE

図1の説明 - 1

貼り付け後の泳動時におけるコーム装着



注)1
コーム先端をゲル板
に付けて固定する



注)2
コームは黒い板の背面

↑
貼り付けたプラグ

寒天は端から流し入れる。

レーンの設定

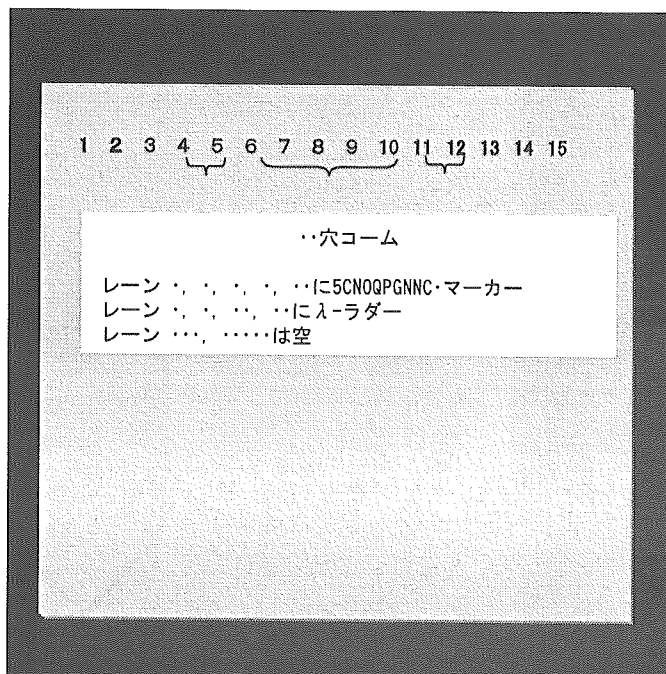
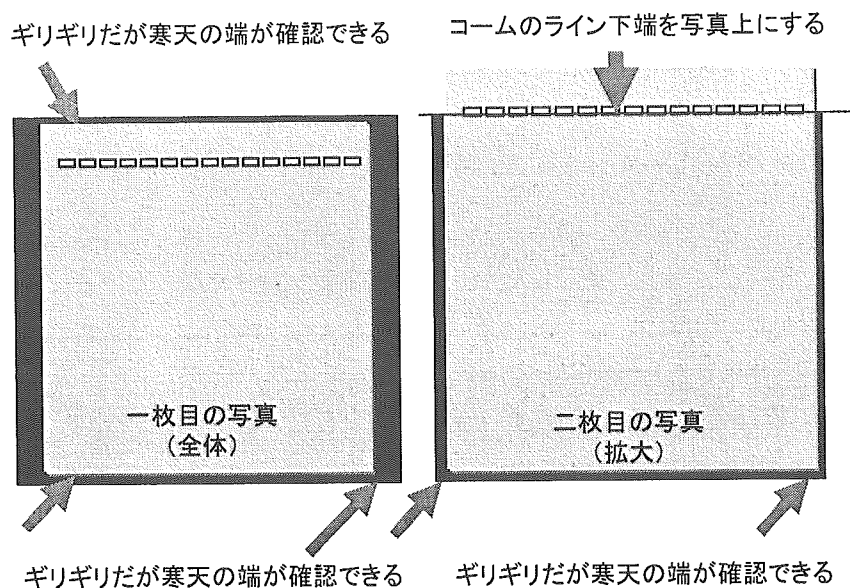


図1の説明 - 2

ゲルドック取込と写真の撮影



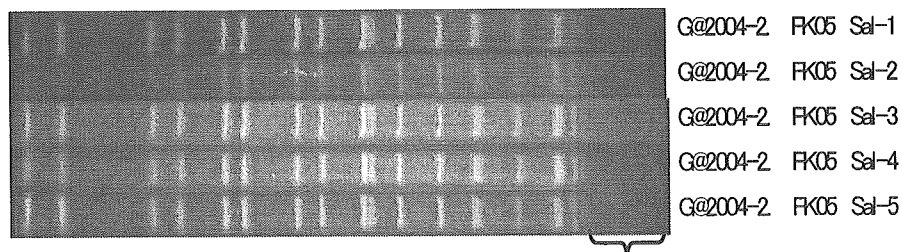
- ・画像の取込は、ゲル全体(一枚目の写真と同様)
- ・ゲルドックの場合は写真を撮る前に取り込んだ方が、画像が鮮明

2)'泳動条件

1% Megabase agarose
 0.7 mm プラグキャスター使用
 6 v/cm, 2.2 - 54.2 sec., 19 hr (-21hr)
 バッファー温度 14℃ (-12℃)

Dae (Td 1.2%-1.2%) (H+0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 2 2004-2

Marker: *Salmonella* Braenderup H9812



マーカー最後のバンド……MDがゲル下端から ……E0・付近まで泳動する。
 泳動距離は施設により異なるので、時間と泳動槽のバッファー温度を調整する。

図1の説明 - 3

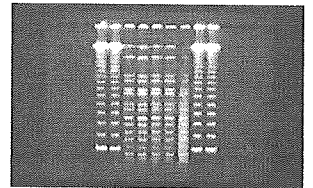
各位様

Step 1

この度各施設で泳動して頂いたマーカの画像を貼り付けています。
泳動は、各施設によって機器の特徴があります。
機関6で条件を検討されています。機関6の場合19h, 12°C位なのでしょうか？
機関8は、19h, 12°C位でチャレンジして頂けますでしょうか。

Step 2

O157を使った精度管理を行なう予定でしたが、もう一度マーカを流して下さい。
写真はゲルをギリギリに全部入れた写真のみで結構です
(右の写真のように)。
画像は取込後はそのまま(カットや加工をせずに)を送って下さい。
・次回にお願いしたい事項を下記に記入しています。



ゲルの大きさ

提出期限: 12月20日(火)

- ∴ ∴ : λマーカを両端に2本ずつ入れて下さい。
- ∴ ∴ : 2本に分離していないのは、泳動槽が原因かもしれません。
こちらから作成したプラグを送付しますので一緒に流して下さい。
- ∴ ∴ : 泳動槽が水平になっているか確認して下さい。
もし、水平であればメンテナンスが必要です。
メンテが不可能であれば、5VGR 2は5VGR 1と同じ条件でお願いします。
再現性を見ます。
- ∴ ∴ : 5VGR 1と同じ条件でお願いします。
- ∴ ∴ : 泳動条件は、まず∴J, ∴°Cでやってみて下さい。両端は均等に空ける。
プラグの幅をもう少し細く切って泳動して下さい。
- ∴ ∴ : 泳動槽が水平になっているか確認して下さい。
もし、水平であればメンテナンスが必要です。
メンテが不可能であれば、5VGR 2はそのままお願いします。
再現性を見ます。
- ∴ ∴ : 泳動条件は ∴J, ∴°Cくらいで如何でしょうか？
- ∴ ∴ : プラグの幅をもう少し細く切って泳動して下さい。
- ∴ ∴ : 画像取込み条件を調節してみても如何でしょうか？
ポラロイド写? は鮮明です。参考までに去年の画像を右に
貼り付けてみました。5TGR 2でも写? を送って下さい。
- ∴ ∴ : 画像の取込み条件の調製が間に合わないようでしたら
ポラロイド写? を撮って、送って下さい。



2004-11

図2-1

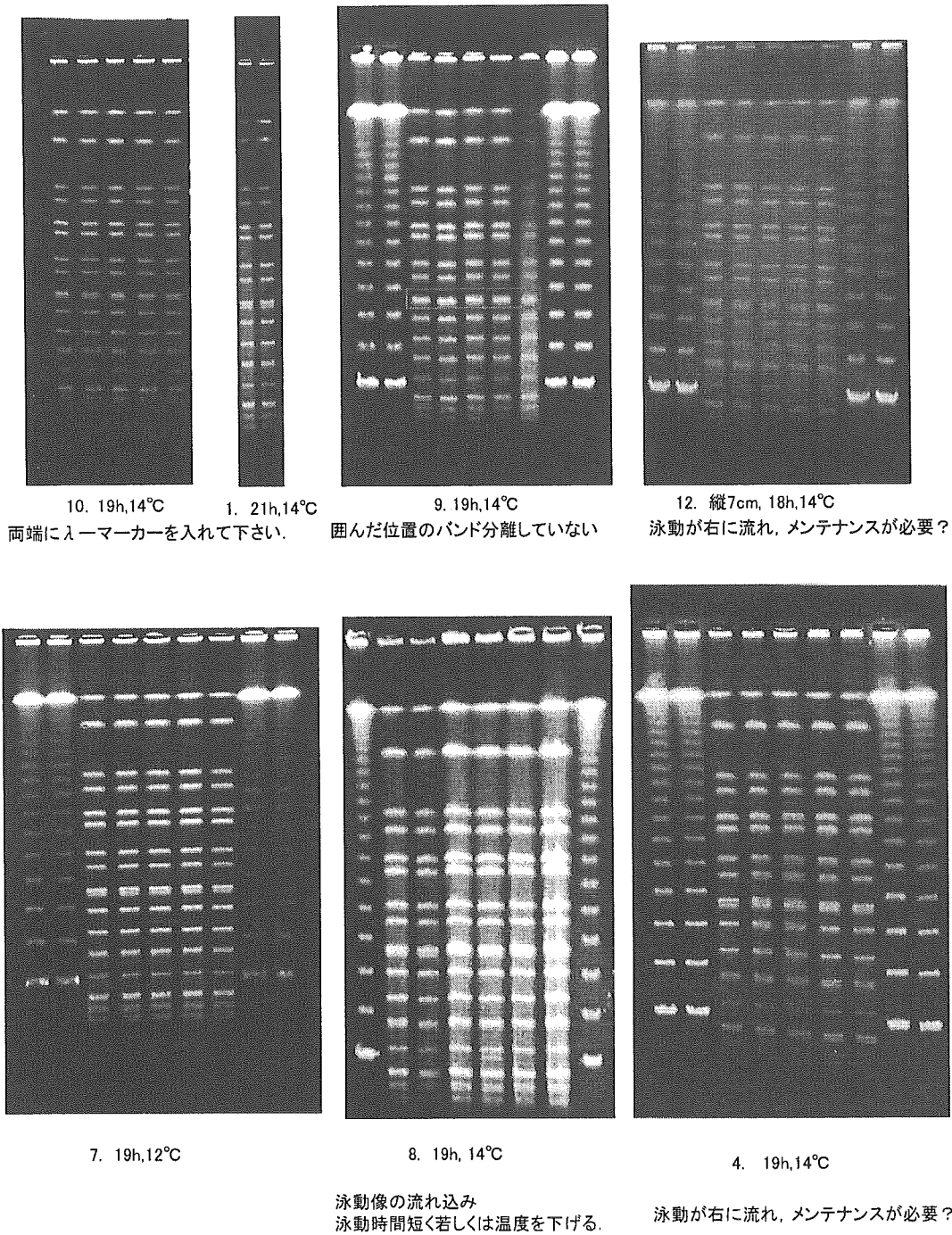
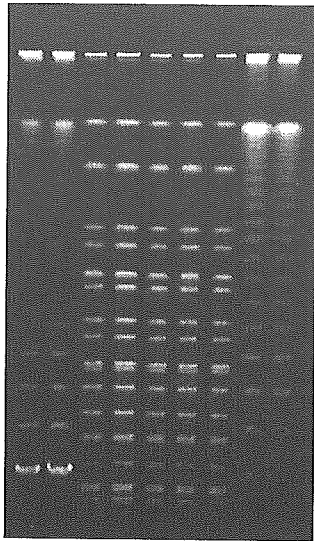
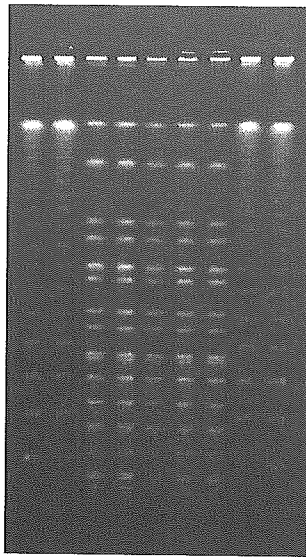


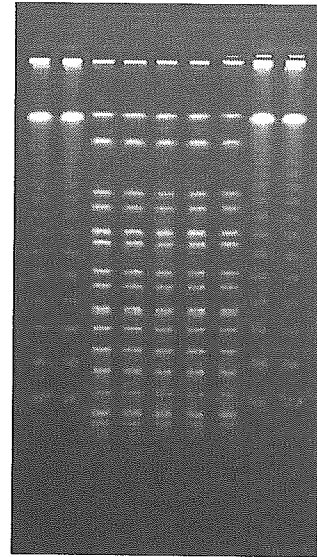
図2-2



6-1 19h, 14°C
端から5mm

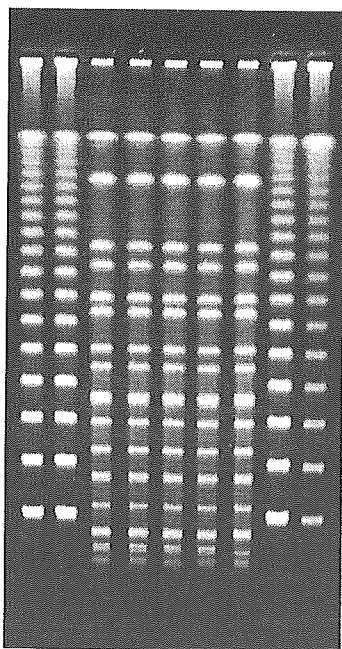


6-2 19h, 13°C
端から7mm

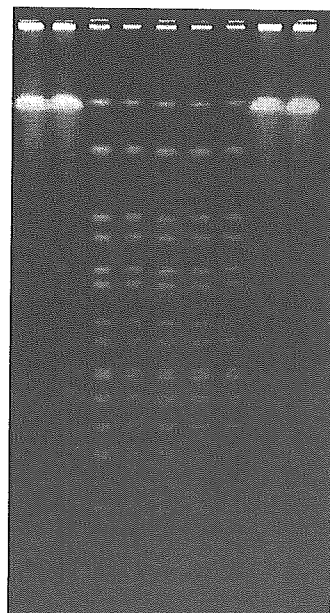


6-3 縦6cm, 18h, 13°C
端から21mm

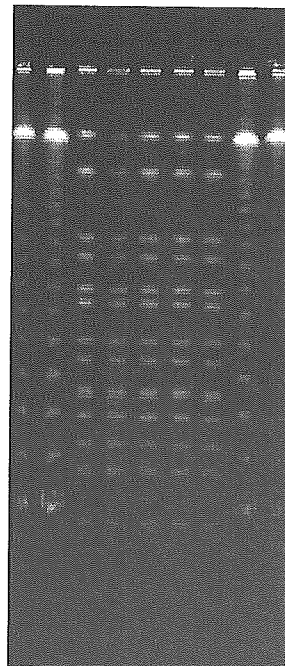
泳動条件は 19h, 12°Cくらいで如何でしょうか？



5. 18.5h, 12.5°C



11. 19h, 14°C



3. 19h, 14°C

DNA量が多い。

λ-マーカ-ともにもう少し量を少なく？ 写真は、とてもクリアーです。

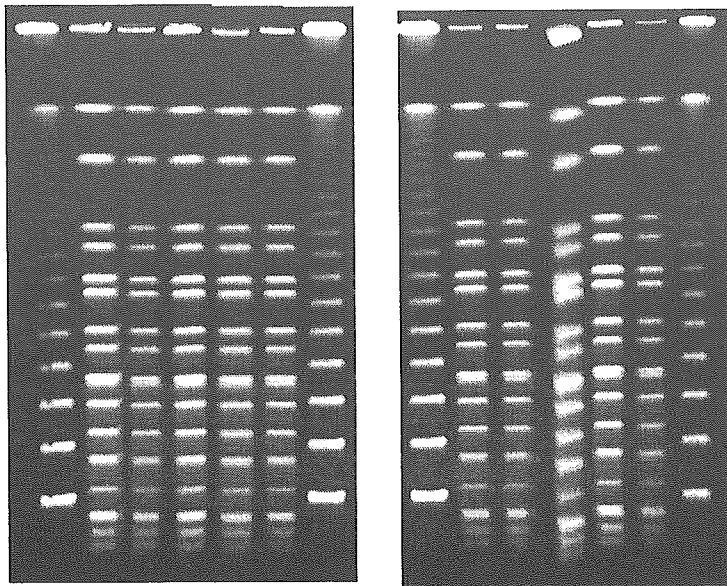
取込後処理をせずに送って下さい。

ポラロイド写真を貰っていますが、

取込の条件を変えてみたら如何でしょうか？

9.と全く同じ取込装置が使用されていますが、
解像度が悪いです。現在取込の条件を調整中。
ポラロイド写真を撮影できればお願いします。

図2-3



冷凍保存したProtenase K

用事調整したProtenase K

2. 19h, 14°C

冷凍保存したProtenase Kを使用した泳動像は、バックの抜けが悪い様です。泳動がのびすぎているので、温度を12°Cで実施しては如何でしょうか？

図2-4

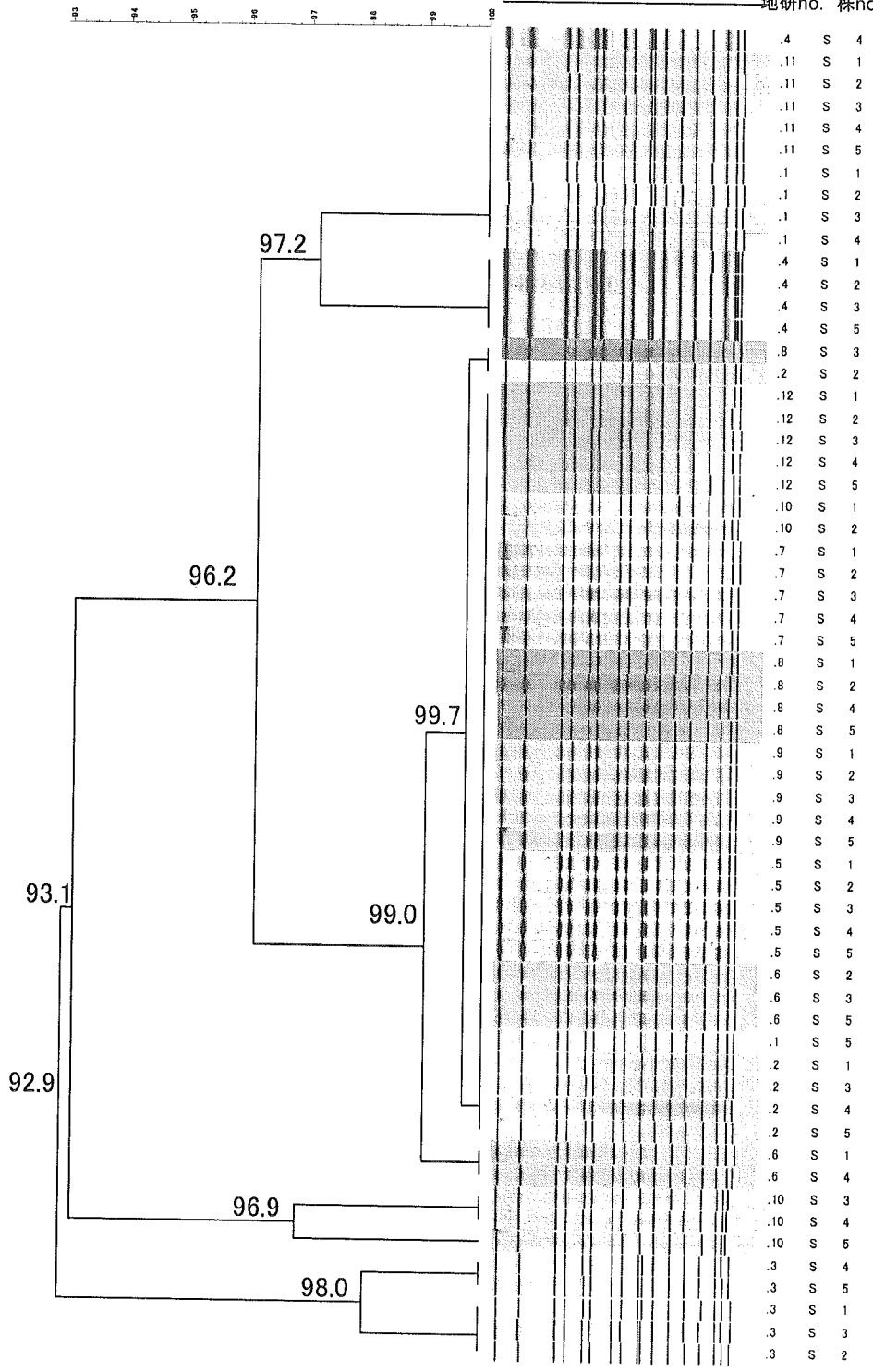


図3. *Salmonella* Braenderup H9812の比較

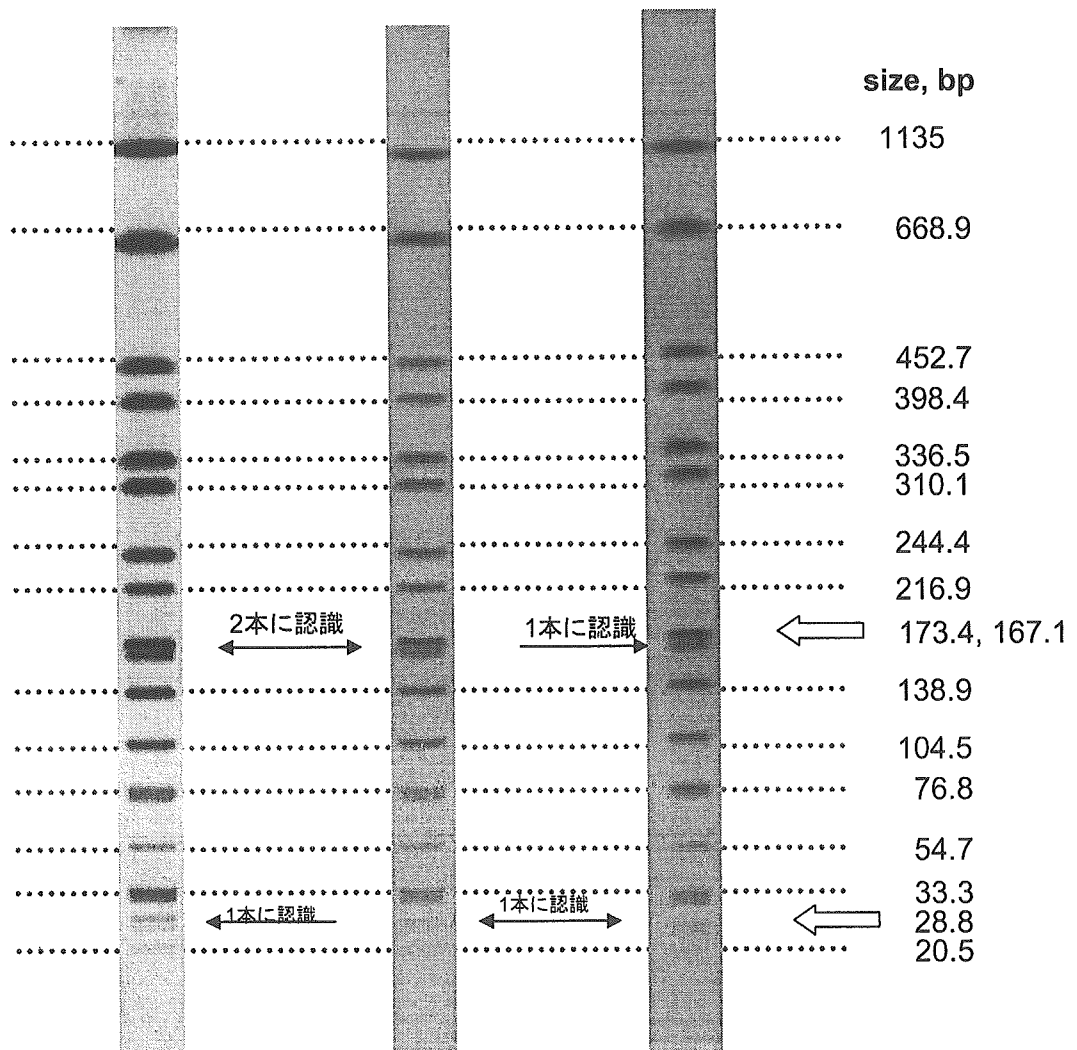
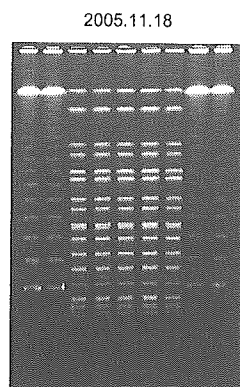


図4. S. Braenderup H9812のDNAバンド認識の違い

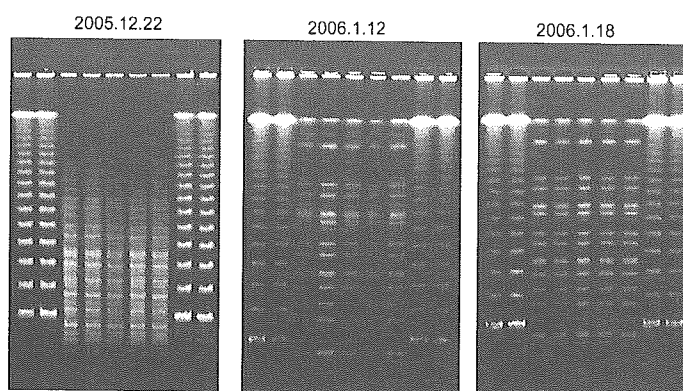
機関7

Step 1



制限酵素反応4時間

Step 2



2005.12.22
条件は前回とほとんど同じですが制限酵素(古い)の時間が長いですが(これのせいかも)。18時間くらい反応させていました。

2006.1.12
原因をしらべたら制限酵素を古いやつを使っていました。多分そのせいでしょうね(なんと期限が1999.9)。バンドがなんかおかしいですから(前回もそうでしたもの)。3時間反応。

2006.1.18
前回と同じプラグをきってみました。やはり制限酵素の違いみたいです。でも今回も少し変なバンドが見えますがこの辺はどうなのでしょう？前回の2回に比べるとかなりいいですが、少し気になりますね。今回は制限酵素は3時間です。

図5 制限酵素反応による違い (Proteinase K 酵素反応はいずれもover night)

Campylobacter jejuni 分子疫学解析の検討

研究協力者 山口 仁孝 長崎県衛生公害研究所

上野 伸広 鹿児島県環境保健センター

八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所

堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究要旨 *Campylobacter jejuni* のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析画像を、異なる機関間で有効活用することを目標に、平成 16 年度に引き続き同菌の PFGE 基礎解析、新規マニュアルの作成および reference 株を用いた精度管理試験について九州地区 4 機関で検討を行った。

低コストで効率の良い標準化を考慮して、O157 等で広く使用されている試薬組成・マニュアルに近い形で培養・菌液処理を行い、かつ *Campylobacter* の DNA degradation を最小限にするために、今回は同一の reference 株を材料とし、特に制限酵素処理以前の段階での処理方法について比較解析した。その結果、plug 作成前の菌液処理が非常に重要であることが判明し、これらの結果を踏まえて新たにマニュアルを作成し、reference 株を用いて各機関にて精度管理試験を実施し比較解析した。

A. 研究目的

カンピロバクターについての PFGE は、Ribot らの方法¹⁾が広く知られているが、今回我々は、より標準化しやすいことを考慮して、O157 について各地研で一般に行われている、感染研マニュアルを基準としてカンピロバクターPFGE マニュアルを作成した。

とくに、平成 16 年度の成績から制限酵素処理以前の過程が重要と考え、増菌培地の影響、DNase の不活化、plug 作成時の菌液温度に注目し、これらについて比較検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

各機関が共通して使用する標準精度管理株として、熊本県(カンピロバクター九州地区レファレンスセンター)が保有する、Penner および Lior 血清型が明らかな 5 株を使用した(表 1)。

2. 基礎解析

1) 増菌培地の検討

精度管理株 No.1 を用いて、*Campylobacter* の培養で広く使用されている Brucella Broth (以下 BB)

(BBL)を中心に、BB に DNase 阻害を目的に VitB₁₂ (final: 10 μM) を添加(以下 BBV)、あるいは増菌効果を示すとされる *Campylobacter* Growth supplement (OXOID) を添加した増菌液(以下 BBG)、地研で広く使用されている Preston (OXOID) および Bolton (OXOID) 培地(いずれも supplement 入り)をそれぞれ調整し、一次増菌(39℃、18hrs)を行い希釈培養法により菌量を測定して増菌効果を比較するとともに、一次増菌後 CCDA (OXOID) 平板に画線培養し(39℃、18hrs、微好気パックジャー培養)後 PFGE を実施し、DNA への影響を比較解析した。

2) 菌液のホルマリン処理法の検討

Gibson ら²⁾の方法を参考に、平板にて 2 次培養後 sweep した菌液について、PBS にて 2 回洗浄後、5% ホルマリン PBS を作成し処理時間をそれぞれ 5 分、10 分、15 分、30 分、60 分として、PFGE にて比較した。

3) plug 充填時の菌液温度および時間の検討

plug 充填時、ゲルと混和する前の菌液の温度・時間をそれぞれ 63℃・10 分、63℃・2 分、50℃・10 分、40℃・10 分、および無処理として、PFGE にて比較した。

4)plug 菌量の検討

ゲルと混和する菌液濃度(表 2)を調整し、PFGE にて比較した。

3.精度管理試験

送付された精度管理標準株について、新規マニュアルに従い各機関で PFGE(制限酵素 *Sma* I)を実施し、比較した。

4.画像解析法

各機関で得られた画像データは、ポラロイド写真及び TIFF 形式で保存した(CCD カメラ、画像解析装置、スキャナーで泳動した写真を取り込み)画像を長崎県衛生公害研究所に電子メールで送信し、DNA 解析ソフト BioNumerics ver 4.0(Applied Maths)で解析した。トレランスは、1.0 で解析した。

C.研究結果

1.基礎解析結果

1)培地の検討

図 1 に示すとおり、カンピロバクターの一次増菌液の 18 時間培養後の菌数比較では、Brucella Broth が最もよく発育し(1.0×10^6 CFU/ml)、菌量が少なかった Preston (1.3×10^5 CFU/ml)や Bolton 培地(1.4×10^5 CFU/ml)の約 10 倍の菌量が得られたが、PFGE ($OD_{600}=1.0$ 、ホルマリン処理 15 分、菌液処理:40°C 10 分)において各培地による DNA degradation の変化は特に認められなかった(図 2)。

2)菌液のホルマリン処理法の検討

無処理あるいはホルマリン PBS 処理時間 15 分、または 30 分で明瞭なバンドを確認した(図 3)(McF=2.5、菌液処理:40°C 10 分)。

3)plug 充填時の菌液温度および時間の検討

菌液温度 40°C・10 分、および無処理について良好な結果を得た(図 4)(McF=2.5、ホルマリン処理なし)。

4)plug 菌量の検討

ゲル混和時菌液濃度 $OD_{610}=1.013$ 、 1.825 (McFarland 2~4、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ CFU/ml 程度)で良好な結果を得た(図 5)(菌液処理:なし、ホルマリン処理なし)。

2.Campylobacter PFGE 新規マニュアルの作成

基礎解析結果を踏まえ、感染研から示された腸管出血性大腸菌のプロトコールを一部変更したマニュアルを新たに作成した(図 6)。

3.精度管理結果

今回の精度管理株は、各機関が実験を開始する時点で、plug 処理過程において DNA degradation の程度に若干の差があったと考えられる。また、PFGE のバンドのバックがスメアーになるものや、まったくバンドが確認できないものも認められ、各機関間での比較を行うデータは一部しか得られなかった。

標準株 5 株の PFGE 比較データが得られた 3 機関における解析について参考に示す(図 7)。一部菌量が多い場合に、制限酵素の作用が十分でなく非特異的なバンドがみられ、similarity が低くなったものも認められたが、同一株については、おおむね 90%以上の相同性を示し、良好な結果であった。しかしながら、大腸菌等に比較してバンド数が少ないため、*Campylobacter* においては *Sma* I 以外の *Kpn* I などの制限酵素についても検討する必要もあり、今後は PK 処理後の操作についても詳細に検討する必要があるものと思われた。

D.考察

Campylobacter の PFGE においては、PK 処理前の段階の処理方法によって、バンドのバックがスメアーになりやすいものや、まったくバンドを確認できない場合もあったことから、供試時の菌株の発育状態、その後の処理過程が最終的な PFGE におけるバンドの鮮明さに多大な影響を与えることが改めて示された。

培地の検討では、(増菌)培地としては、コストや煩雑さ、菌への影響(増殖率)を考慮すると Brucella Broth (Agar)で十分であると考えられたが、通常使用されているその他の培地を使用した場合でも、DNA への影響は少ないことが示された。

今回の実験では、ホルマリン処理は DNA 変性防止に有効な方法であることが示されたが、一部未処理群(PBS 処理:なるべく低温で取り扱う)において良好な結果を得た。このことはホルマリン処理以前に菌株

の状態、各処理過程における菌液温度等も PFGE に大きく影響することが想像された。また、アルコール処理(95%Ethanol・5min-未報告)群においても DNA 変性防止に有効なことが認められたことから、今後もより詳細に菌液処理過程を検討する必要があるものと思われる。

また、今回 plug 充填時の菌液温度による DNA への影響が大きいことが複数の機関で認められたことから、ゲルとの混和時には菌液温度を 40°C以下に保つことが *Campylobacter* の PFGE においては、Key point と考えられた。

E.結論

Campylobacter の PFGE においては、菌死滅(不活化)と DNase 活性ブロックのために菌液作成後ホルマリン処理等の何らかの処理を行い、40°C以下に菌液を保ちゲルと混和後 plug 充填を行うことが重要と思われた。

今後は各地研協力のもと、今回作成したマニュアルをさらにより詳細に検討してカンピロバクターの PFGE マニュアルを改訂していきたい。

参考文献

1. EFRAIN M. RIBOT, COLLETTE FITZGERALD, KRISTY KUBOTA, BALA SWAMINATHAN, AND TIMOTHY J. BARRETT
Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*
Journal of Clinical Microbiology, Vol. 39, 5, May, 1889-1894 (2001)

2. GIBSON JR, FITZGERALD C, OWEN RJ
Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections
Epidemiol Infect, Oct;115(2):215-25 (1995).

F.研究発表

なし。

G.知的所有権の取得状況

なし。

表 1 2005 年度キャンピロバクターreference 株

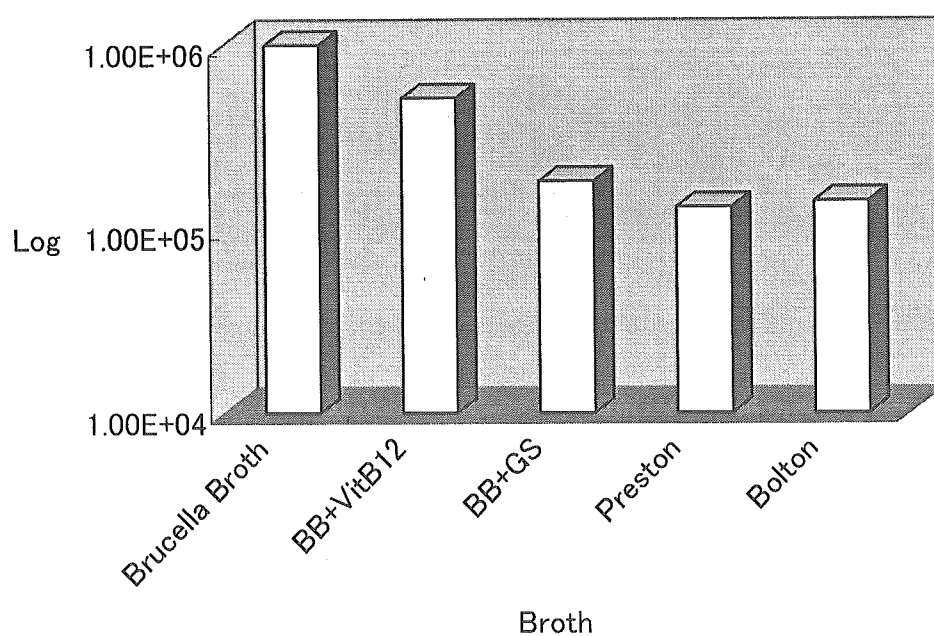
菌株 No.	菌種	Penner	Lior	由来	分離県	分離年度
1	<i>C. jejuni</i>	L	TCK1	患者便	大分県	2005
2	<i>C. jejuni</i>	A	LIO2	患者便	大分県	2005
3	<i>C. jejuni</i>	O	LIO7	患者便	大分県	2005
4	<i>C. jejuni</i>	N	UT	患者便	熊本県	2005
5	<i>C. jejuni</i>	UT	LIO11	患者便	鹿児島県	2005

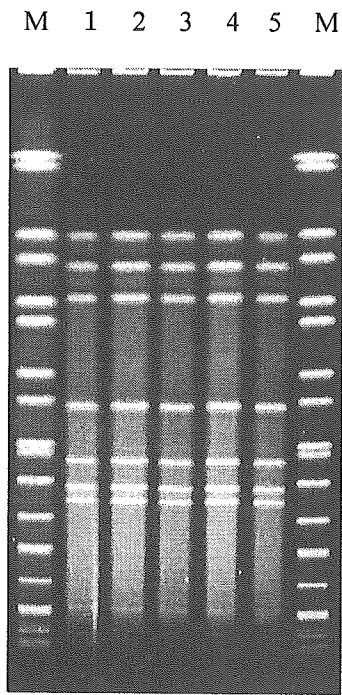
表 2 菌液濃度の検討

No.	OD ₆₁₀ ^①	McFarland ^②	CFU/ml ^②
1	>3	>10	>4.0×10 ⁹
2	2.703	8	2.0×10 ⁹
3	1.825	4	1.0×10 ⁹
4	1.013	2	5.0×10 ⁸
5	0.529	1	2.5×10 ⁸
6	0.267	0.5	1.3×10 ⁸

①実測値 ②近似値

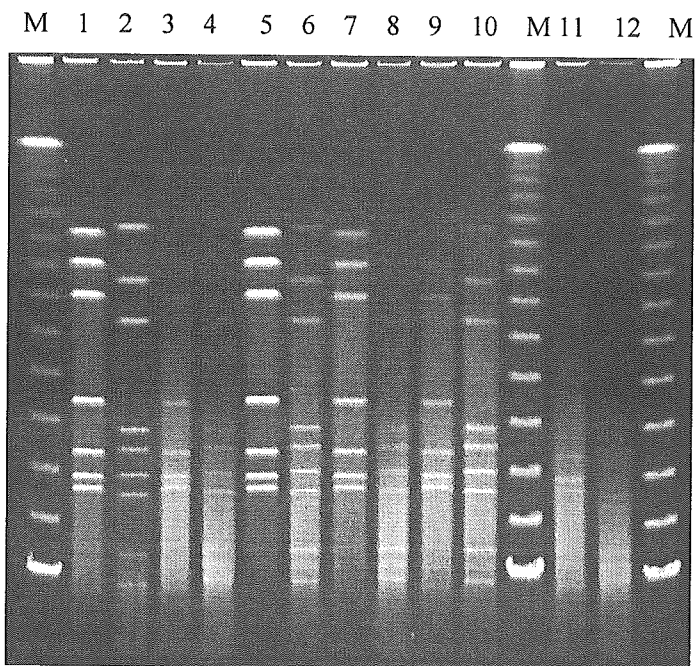
図1 各培地における菌量比較 (CFU/ml)





Lane No.	Strain	Broth
1	No.1	Brucella Broth
2	No.1	BBV
3	No.1	BBG
4	No.1	Preston
5	No.1	Bolton

図2 各培地の影響比較



Lane No.	Strain	処理	時間(分)
1	No.1	PBS	—
2	No.2	PBS	—
3	No.1	ホルマリン	5
4	No.2	ホルマリン	5
5	No.1	ホルマリン	15
6	No.2	ホルマリン	15
7	No.1	ホルマリン	30
8	No.2	ホルマリン	30
9	No.1	ホルマリン	60
10	No.2	ホルマリン	60
11	No.1	アルコール	15
12	No.2	アルコール	15

図3 ホルマリンおよびアルコール処理の検討