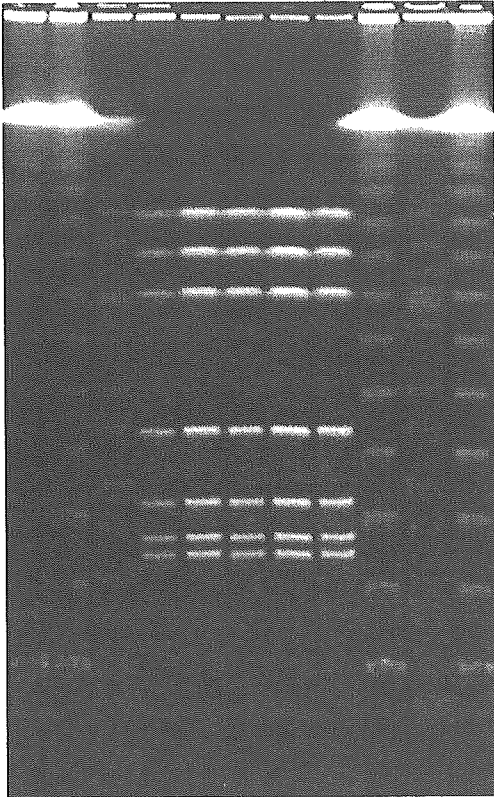


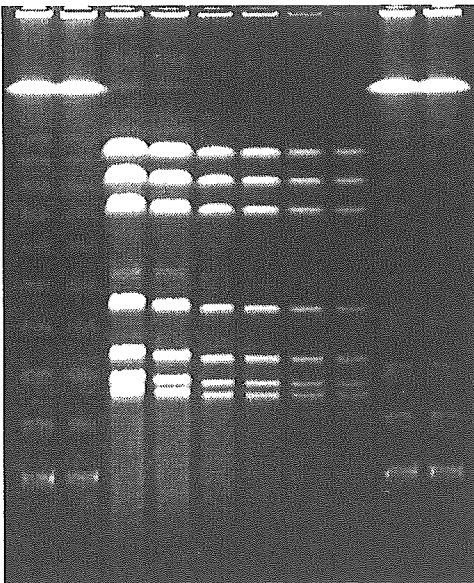
M M M 1 2 3 4 5 M M M



Lane No.	Strain	菌液温度	時間(分)
1	No.1	63℃	10
2	No.1	63℃	2
3	No.1	50℃	10
4	No.1	40℃	10
5	No.1	室温	-

図4 菌液温度の検討

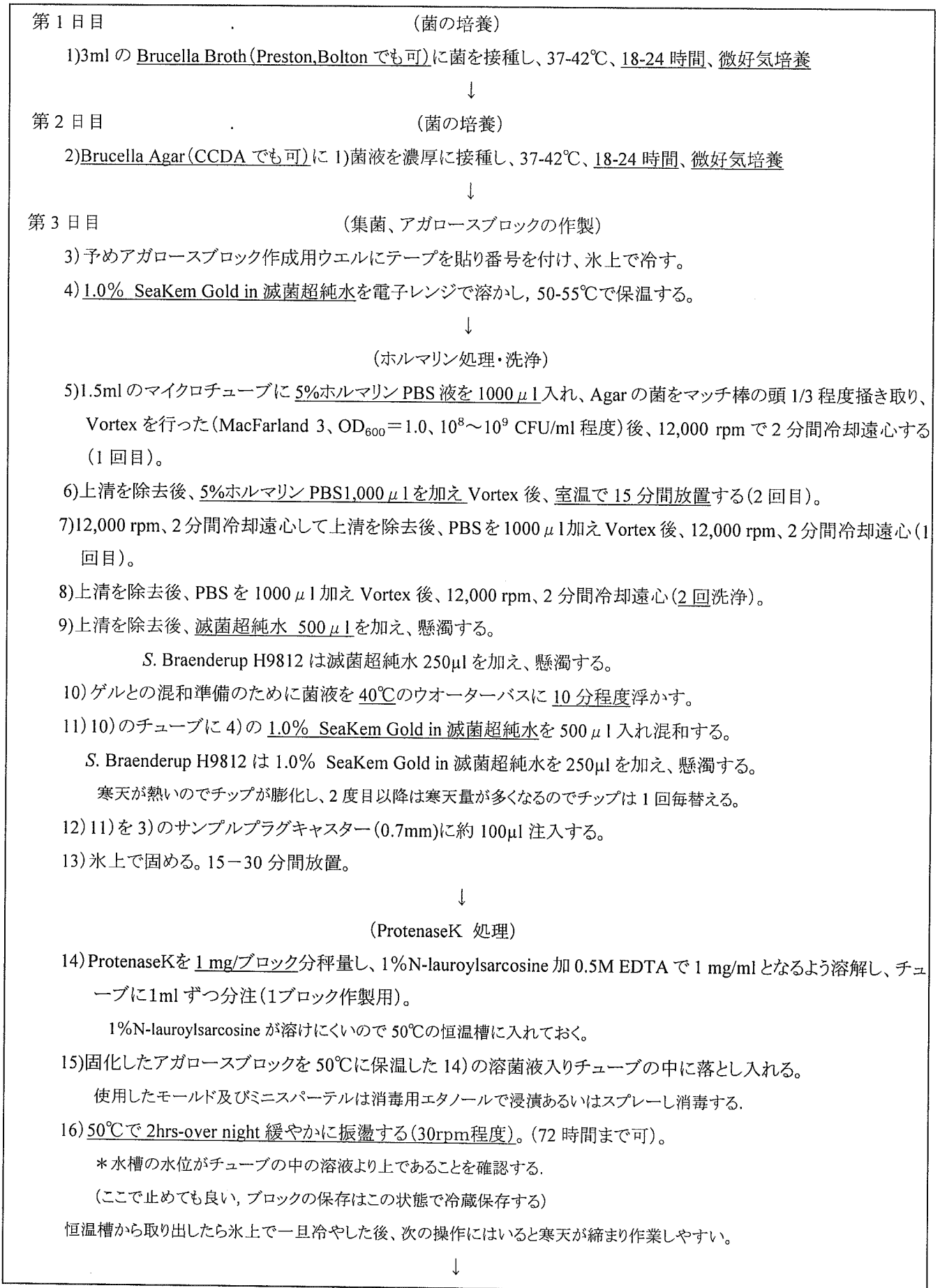
M M 1 2 3 4 5 6 M M



Lane No.	Strain	OD <sub>610</sub>
1	No.1	>3
2	No.1	2.703
3	No.1	1.825
4	No.1	1.013
5	No.1	0.529
6	No.1	0.267

図5 菌量の検討

図 6 *Campylobacter* の PFGE プロトコール



(プロテナーゼKの不活化・洗浄)

17) 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泳動時用の大きさ(コーム幅×約 2-4mm)にカットする。

泳動時の大きさにすると取り扱いが大変なので取り敢えず半分にしても良い。

残りは新しい ProtenaseK液(0.5mgProtenaseK in TE, 1%N-lauroylsarcosine は入れない)で保存する。

\* S. Braenderup H9812 マーカーはこの状態のものを作っておくと便利である。

18) 0.5ml 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で 20 分以上振盪し ProtenaseK液を不活化する(1 回目)。

19) チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後、Pefabloc 液を丁寧に抜き取り、新しい 4mM Pefabloc in TE を 0.5ml 加え 50°C20 分間以上振盪する(2 回目)。

20) TE (1ml/sample)にバッファーを変えて、50°Cで 20 分以上振盪し洗浄する。この操作を 2 回行う。

(ここで止めても、1 週間いないであれば冷蔵保存できる。日をおいて再開する場合は TE で洗浄する。この時 50°C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)

《 21)アガロースブロックを TE 液からパラフィルムなどの上に取り出し、コーム幅×約 2-4mm に整形する。 》

22)制限酵素を含まない制限酵素用の buffer を 1.5ml チューブに 200  $\mu$ l 分注しする。

23)整形したアガロースブロックを 22)に入れ、各酵素の至適温度で 20 分以上振盪する。

24)チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後、buffer を丁寧に抜き取る。

25)制限酵素の入った buffer(30unit / sample plug) 100 $\mu$ l をチューブに入れ、30°C or 25°C(Sma I)、37°C(Kpn I)、37°C(Xba I = Salmonella マーカー用)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。保存したアガロース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。)



(アガロースブロックのコームへの貼り付け)

作業前に黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、1.9L の 0.5×TBE バッファーを泳動槽に注ぎ入れ、12-14°Cに予冷する。

26)0.5×TBE バッファー100ml に 1g の SKG アガロースを加え、電子レンジ等で溶解する。

27)55-60°Cの恒温水槽で溶解した 1%アガロースを保温する。

\*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。

28)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 400 $\mu$ l 加え、氷冷する。

29)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。

30)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。

31)コームにある余剰の液をキムワイプで除き、10 分間程度乾燥させる。

\*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。

32)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。

33)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。

34)20-30 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)

泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。

泳動条件は、は 6.0V/cm, 6.8 to 38.4 sec, 19 時間, 12.0-14.0°C

\*泳動槽や温度、TBE のメーカーなどにより泳動距離が微妙に異なる。

S. Braenderup H9812 マーカーの最後のバンドが泳動用ゲルの端から 2-3cm のところにくるように時間を設定する。



第 4 日目以降

(染色・写真撮影)

35) 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 度蒸留水で洗浄する。

36) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3  $\mu$ g/ml のエチジウムブロミド (TBE) で 30 分 (時間厳守) 振盪・染色。  
アルミホイルなどで染色槽に蓋をする。

37) 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。

例) 10 分、10 分、20 分、20 分、20 分、20 分。特に最初が肝心。

アルミホイルなどで槽に蓋をする。

38) 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。

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。

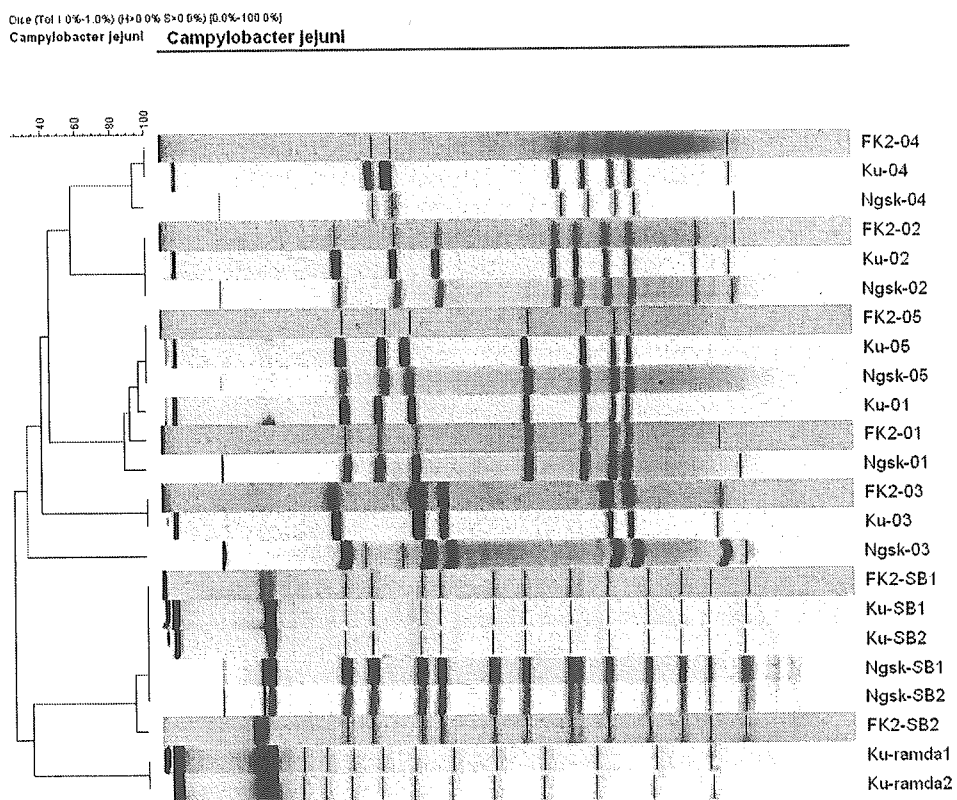
2 枚目はゲルの下端に固定して極限までアップでとる。

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。

2 枚目は写真は 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)

ゲルドックなどが無く画像をスキャナーで取り込む場合も保存形式は、TIFF 形式、圧縮無しで保存する。

図 7 Reference 株の精度管理試験結果



レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、及び九州各機関で  
検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析

研究協力者	河野喜美子	岡田 美香	宮崎県衛生環境研究所
	村上 光一	野田多美枝	福岡県保健環境研究所
	徳崎 里美		北九州市環境科学研究所
	眞子 純孝		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
	緒方喜久代		大分県衛生環境研究センター
	八尋 俊輔		熊本県保健環境科学研究所
	丸住美都里		熊本市環境総合研究所
	上野 伸広		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

### 研究要旨

レジオネラ属菌についてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析法を有効活用するため、平成 15, 16 年度に引き続き、標準菌株についての PFGE の精度管理、及び各機関分離株についての PFGE 画像相同性比較を実施した。さらに、2005 年のレジオネラ属菌由来別検出状況を参加 10 機関から収集した。

標準菌株 3 株の PFGE パターンについて、それぞれの菌株で 80%以上の類似性が見られたが、この結果は満足できるものではなかった。類似性が低くなった原因は、サイズマーカーとして使用した  $\lambda$  ラダーの画像の不具合が多かったことによるものであると推定された。異なる機関間の画像を解析するためには、サイズマーカーは、比較の基礎となるものであることから検討を要する。

今後、各機関で常に安定した PFGE 画像を得るために、この問題も含め、方法の検討とともに、さらなる技術的訓練が必要と考える。

また、各機関が PFGE を実施した分離株の総数は 174 株で、そのうち解析を実施した *Legionella* (*L.*) *pneumophila* serogroup (SG) 1 43 株、SG3 10 株、SG4 6 株、SG5 10 株、及び SG6 20 株の PFGE パターンの類似性については、一部に 90%程度の高い類似性を示す株があったものの、概ね、85%以下であった。すなわち、制限酵素 *Sfi*I を使用した PFGE パターンは、多型を示し、疫学指標としての有用性が示された。

さらに、レジオネラ属菌の検出状況調査の結果、九州全体で 5 菌種 (その他に菌種不明有り) が検出され、そのうち *L. pneumophila* については 11 血清型 (その他に血清群不明有り) が確認された。

### A. 研究目的

レジオネラ症集団感染事例の原因究明に

においてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子多型解析は最も有効な

手法である。また、その発生原因となる温泉施設、冷却塔、修景水施設などは、人が頻繁に接触したり、遠方からの利用者が訪れる場所であり、患者発生も広域に亘ることも多い。そのため、他地域の関係機関への情報の伝達、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。

今年度は平成 16 年度に引き続き、異なる機関における連携システムづくりを目的とし、10 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。

また、2005 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、九州全域でのレジオネラ分布状況を調査した。

## B. 研究方法

### 1. 参加機関

標準株を用いての PFGE の精度管理、各機関分離株の PFGE パターンの相同性比較、及びレジオネラ属菌の由来別検出状況調査について、10 機関が共同で調査を行った。

### 2. 材料

PFGE の精度管理には、国立感染症研究所から分与されたレジオネラ属菌標準菌株 3 株（表 1）を使用した。また、各機関で分離され、PFGE を実施した総菌株数は 174 株であった。なお、分離菌株は、原則として、異なる施設、異なる事例から分離された株を対象とした。

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 の方法は国立感染症研究所のプロトコールを一部変更して実施した（図 1）。試験にあたって注意した点は、菌は発育 3 日以内の新しい菌を用いること、使用菌量を検討してから実施すること、泳動時間は 19 時間を目安とするが、サイズマーカーの最後のバンドが

泳動ゲルの末端から、2cm 前後の所まで泳動するような時間が最適であること、サイズマーカーは  $\lambda$  ラダーを使用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。解析は、Dice 係数使用、Band-Tolerance 値は 1.2%で行った。

### 5. 各機関におけるレジオネラ属菌の由来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、2005 年に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、温泉源泉、冷却塔水、修景水、患者、その他）とした。

## C. 研究結果

### 1. 精度管理

標準菌株 3 種について、10 機関で PFGE を実施した画像を比較解析した（図 2）。3 菌株とも、80%以上の類似性が見られたが、100%一致したのは、一部のみであった。今回、 $\lambda$  ラダーの泳動像が、幅広、又は 2 重になった画像が多く、異なる機関間、異なるゲル間の画像を解析するためのサイズマーカーとして、満足できるものではないと思われた。実際、同一のバンド数が得られているにもかかわらず 100%の類似性が得られていないものもある。サイズマーカーは、異なる画像間の比較を行う場合の基礎であり、この画像の良し悪しがその後の解析データに大きく影響することから、 $\lambda$  ラダーの使用を検討する必要があると考えられた。

また、より見やすい画像を得るため、使用

菌量の検討を各機関で行った。一機関から、マックファーランド3程度では、バンドが薄く、マックファーランド7では濃すぎて白い帯状になるが、マックファーランド5で、バンドが最も見やすかったことが報告された。

各機関で常に安定したPFGE画像を得ることが、異なる機関間で比較する場合の必要条件であるため、最適な前処理条件、泳動条件を確立する必要がある。

## 2. 分離株のPFGEパターン比較解析

9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。全分離株中、最も多かった*Legionella*(*L.*) *pneumophila* serogroup (SG) 1 43株のPFGEパターンを見ると、90%以上の類似性を示した株が2組

(2株ずつ)あった。そのうち、ポンティアック熱様患者株と24時間風呂株は96%程度の高い類似性が見られたが、これは、患者とその患者宅の風呂から分離された株であることが判明した。他の1組はA機関で採取された分離株であったがそれらの関連性は不明であった。その他の株は、株間で概ね85%以下の類似性で、PFGEパターンは多型を示した。SG3 10株(図4)、SG4 6株(図5)、SG5 10株(図6)、及びSG6 20株(図7)についても、ほぼ同様な結果で、90%以上の類似性を示す株が一部に見られたが、ほとんどの株が85%以下の類似性で、パターンは多型を示した。なお、SG1では、浴槽水と冷却塔水で、PFGEパターンが分かれる傾向が見られた。

## 3. 各機関におけるレジオネラ属菌検出状況調査

各機関から送付された2005年レジオネラ属菌検出状況調査表を集計し、その結果を表2~8に示した。その結果、循環式公衆浴場、掛け流し式浴場、温泉源泉、24時間風呂、冷却塔水、修景水から、九州全体で5菌種(その他に菌種不明有り)、そのうち*L. pneumophila*

については11血清型(その他に血清群不明有り)が検出された。循環式浴場から最も多くレジオネラ属菌が検出され、菌種は、*L. pneumophila* SG1~6、8~10、15、*L. dumoffii*であった。また、菌種については、掛け流し式浴場も同様の傾向であった(*L. pneumophila* 以外の菌種として、*L. maceachernii*が検出されているが)が、冷却塔水では浴槽水で検出されていない*L. pneumophila* SG7、*L. anisa*、*L. spiritensis*が検出され、菌相の違いが示唆された。

## D. 考察

これまで2年間の、PFGEの精度管理において、バンドが薄い機関が多かったが、今回はそれぞれの機関で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。しかし、今回、スラダーの画像に問題がある機関が多く、スラダーの使用を再検討する必要があると考えられた。

また、分離株のPFGEにおいて、*L. pneumophila*について血清型ごとに解析したところ、一部に90%程度の高い類似性を示す株もあったが、同一のパターンを示す株は全くなく、概ね85%以下の類似性で多型のPFGEパターンを示したことから、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。

また、*L. pneumophila* SG1株で、浴槽水由来株と、冷却塔水由来株の、PFGEパターンが異なることを、前川ら(国立感染症研究所)が示しているが、今回、同様な結果が得られたことは興味深い。

レジオネラ属菌検出状況調査では、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たが、浴槽水と、その他の環境水では、棲みついている菌相が異なることが推測された。

## E. 結論

レジオネラ属菌についてPFGEの精度管理を



菌量の検討を各機関で行った。一機関から、マックファーランド3程度では、バンドが薄く、マックファーランド7では濃すぎて白い帯状になるが、マックファーランド5で、バンドが最も見やすかったことが報告された。

各機関で常に安定したPFGE画像を得ることが、異なる機関間で比較する場合の必要条件であるため、最適な前処理条件、泳動条件を確立する必要がある。

## 2. 分離株のPFGEパターン比較解析

9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。全分離株中、最も多かった *Legionella(L.) pneumophila* serogroup (SG) 1 43株のPFGEパターンを見ると、90%以上の類似性を示した株が2組(2株ずつ)あった。そのうち、ポンティアック熱様患者株と24時間風呂株は96%程度の高い類似性が見られたが、これは、患者とその患者宅の風呂から分離された株であることが判明した。他の1組はA機関で採取された分離株であったがそれらの関連性は不明であった。その他の株は、株間で概ね85%以下の類似性で、PFGEパターンは多型を示した。SG3 10株(図4)、SG4 6株(図5)、SG5 10株(図6)、及びSG6 20株(図7)についても、ほぼ同様な結果で、90%以上の類似性を示す株が一部に見られたが、ほとんどの株が85%以下の類似性で、パターンは多型を示した。なお、SG1では、浴槽水と冷却塔水で、PFGEパターンが分かれる傾向が見られた。

## 3. 各機関におけるレジオネラ属菌検出状況調査

各機関から送付された2005年レジオネラ属菌検出状況調査表を集計し、その結果を表2~8に示した。その結果、循環式公衆浴場、掛け流し式浴場、温泉源泉、24時間風呂、冷却塔水、修景水から、九州全体で5菌種(その他に菌種不明有り)、そのうち *L. pneumophila*

については11血清型(その他に血清群不明有り)が検出された。循環式浴場から最も多くレジオネラ属菌が検出され、菌種は、*L. pneumophila* SG1~6、8~10、15、*L. dumoffii*であった。また、菌種については、掛け流し式浴場も同様の傾向であった(*L. pneumophila* 以外の菌種として、*L. maceachernii* が検出されているが)が、冷却塔水では浴槽水で検出されていない *L. pneumophila* SG7、*L. anisa*、*L. spiritensis* が検出され、菌相の違いが示唆された。

## D. 考察

これまで2年間の、PFGEの精度管理において、バンドが薄い機関が多かったが、今回はそれぞれの機関で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。しかし、今回、スラダグの画像に問題がある機関が多く、スラダグの使用を再検討する必要があると考えられた。

また、分離株のPFGEにおいて、*L. pneumophila* について血清型ごとに解析したところ、一部に90%程度の高い類似性を示す株もあったが、同一のパターンを示す株は全くなく、概ね85%以下の類似性で多型のPFGEパターンを示したことから、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。

また、*L. pneumophila* SG1株で、浴槽水由来株と、冷却塔水由来株の、PFGEパターンが異なることを、前川ら(国立感染症研究所)が示しているが、今回、同様な結果が得られたことは興味深い。

レジオネラ属菌検出状況調査では、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たが、浴槽水と、その他の環境水では、棲みついている菌相が異なることが推測された。

## E. 結論

レジオネラ属菌についてPFGEの精度管理を

各機関で実施した結果、同一の菌株であるにもかかわらず、100%に近い類似性は得られず、昨年とほぼ同様 80%以上の類似性という結果であった。この原因は、サイズマーカーとして使用したλラダーの画像の不具合によるものであると推定された。サイズマーカーは、異なる機関間の画像を解析するための比較の基礎となるものであり、今後、検討する必要

がある。さらに、各機関で常に安定した PFGE 画像を得るための検討が必要であり、一層の相互的な情報交換や技術的訓練を要すると考える。

#### F. 研究発表

なし。

## 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

パルスフィールド・ゲル電気泳動九州ブロック統一マニュアル

本方法は、国立感染症研究所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  $\alpha$  寒天培地に菌を接種し、35-37°C、2-3 日間培養

↓

### 第2日目 (集菌)

1) 超純水を 500  $\mu$ l 入れた 1.5ml のマイクロチューブにとり、菌を少量掻き取り懸濁する。

(マックファーランド5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。

(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  $\mu$ 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、ゆっくり振盪する

↓

(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。(ここでとめても良い。ブロックの保存はこの状態で、冷蔵保存。)

↓

### 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°C1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°C1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が 1 週間以内にする。冷蔵保存。日をおいて再開する場合は TE で再度洗浄する)

↓  
(制限酵素による消化)

- 1) 制限酵素を含まない buffer 200  $\mu$ 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時間振盪する。
- 2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (SfiI, 30unit / sample plug を加える) をチューブに入れ、50°C over night 振盪反応 (ここで止める場合は TE で 2 回洗浄後冷蔵保存。)

↓  
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、溶解する。
- 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  $\mu$ l 加え、氷冷する。
- 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する。
- 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 スラダー を使用。スラダーは、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 分間乾燥させる。
- 8) コームの先端がプラットフォームに接着するようにコームをゲル作成台にセットする。
- 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 に予冷する。
- 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、5 to 50 sec 19-21 時間

(時間はマーカーの最後のバンドが、泳動ゲルの端から 2cm 前後のところにくるように、各機関の設備で、設定する)

↓  
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  $\mu$ 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。  
アルミオイル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。  
アルミオ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) 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。

図2 PFGE精度管理 (tolerance 1.2%)

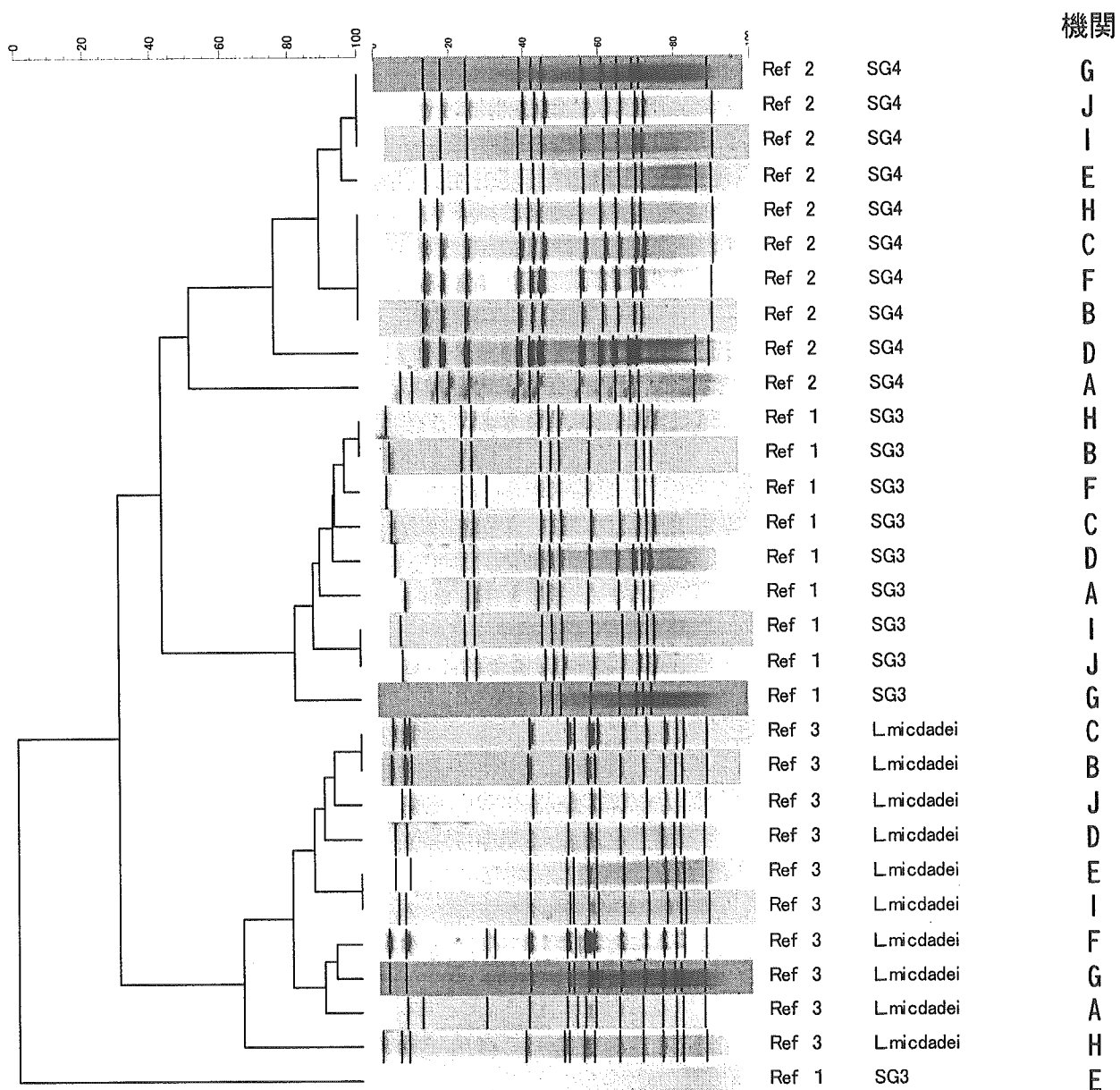


図3 *L.pneumophila* SG1 のPFGEパターンの比較 (tolerance 1.2%)

ice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
シ'2005

レシ'2005

機関

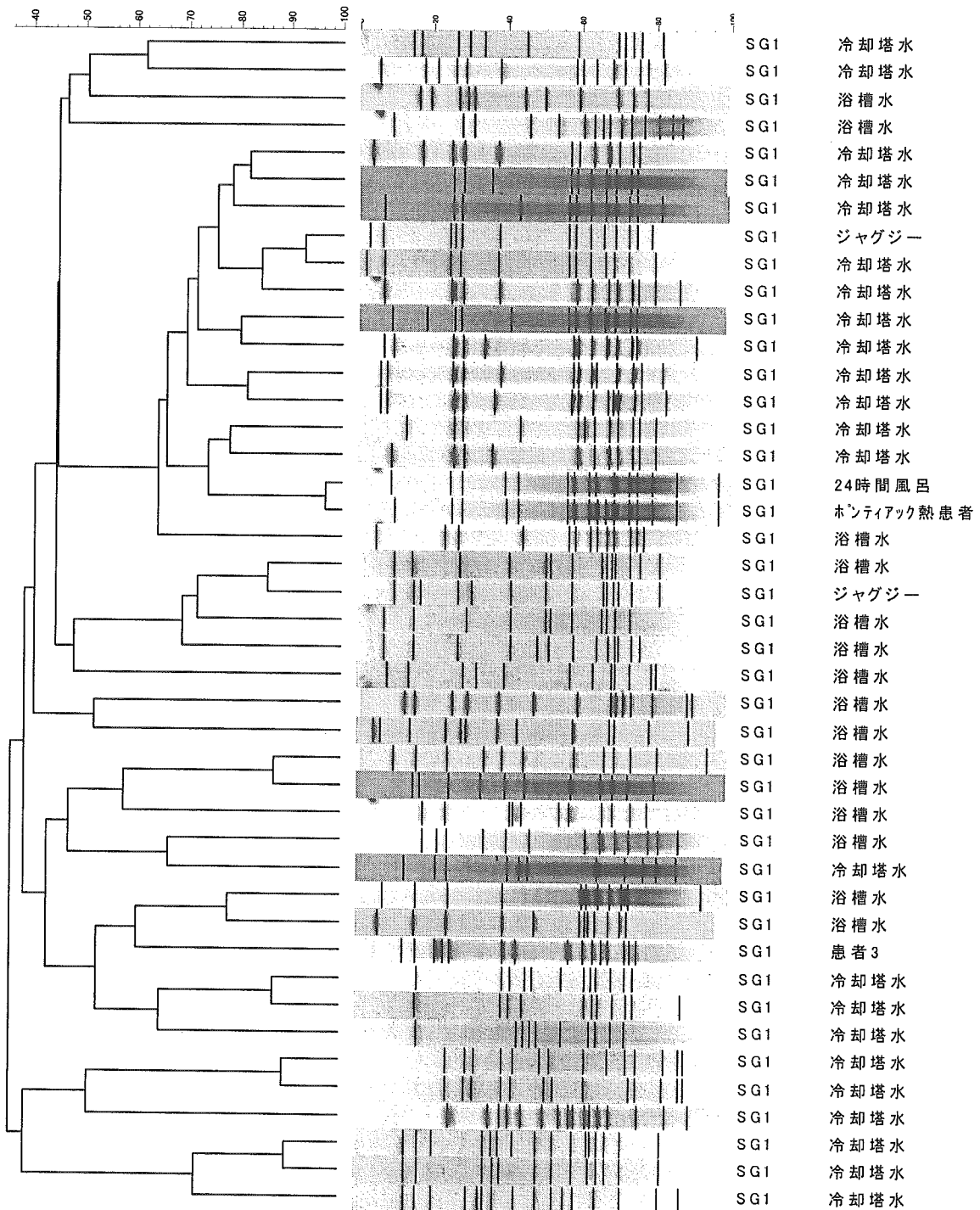


図4 *L.pneumophila* SG3 のPFGEパターンの比較 (tolerance 1.2%)

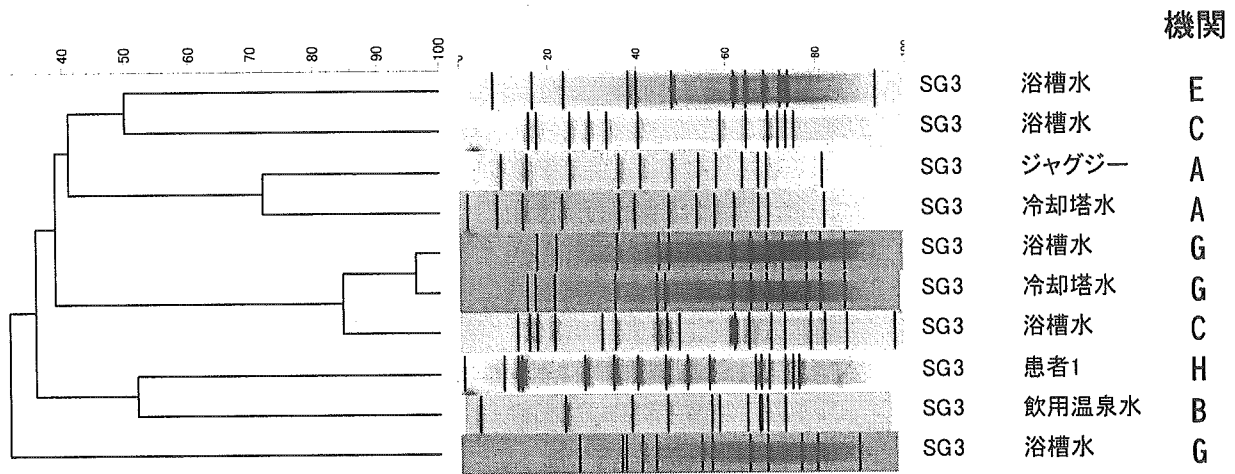


図5 *L.pneumophila* SG4 のPFGEパターンの比較 (tolerance 1.2%)

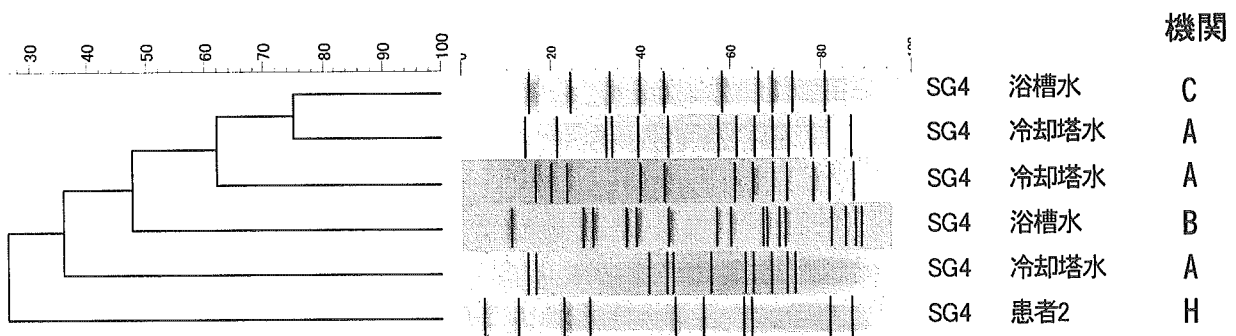


図6 *L.pneumophila* SG5 のPFGEパターンの比較 (tolerance 1.2%)

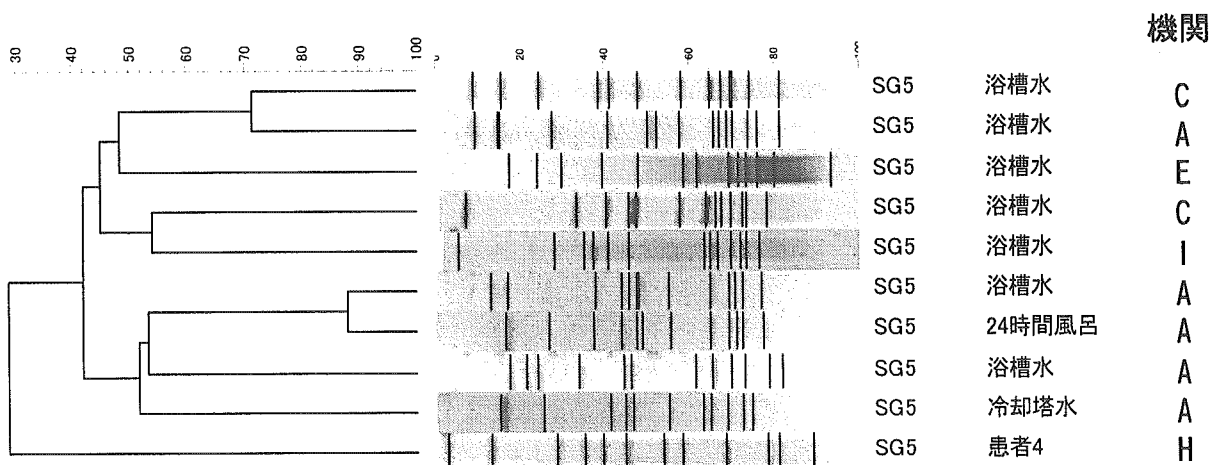


図7 *L.pneumophila* SG6 のPFGEパターンの比較 (tolerance 1.2%)

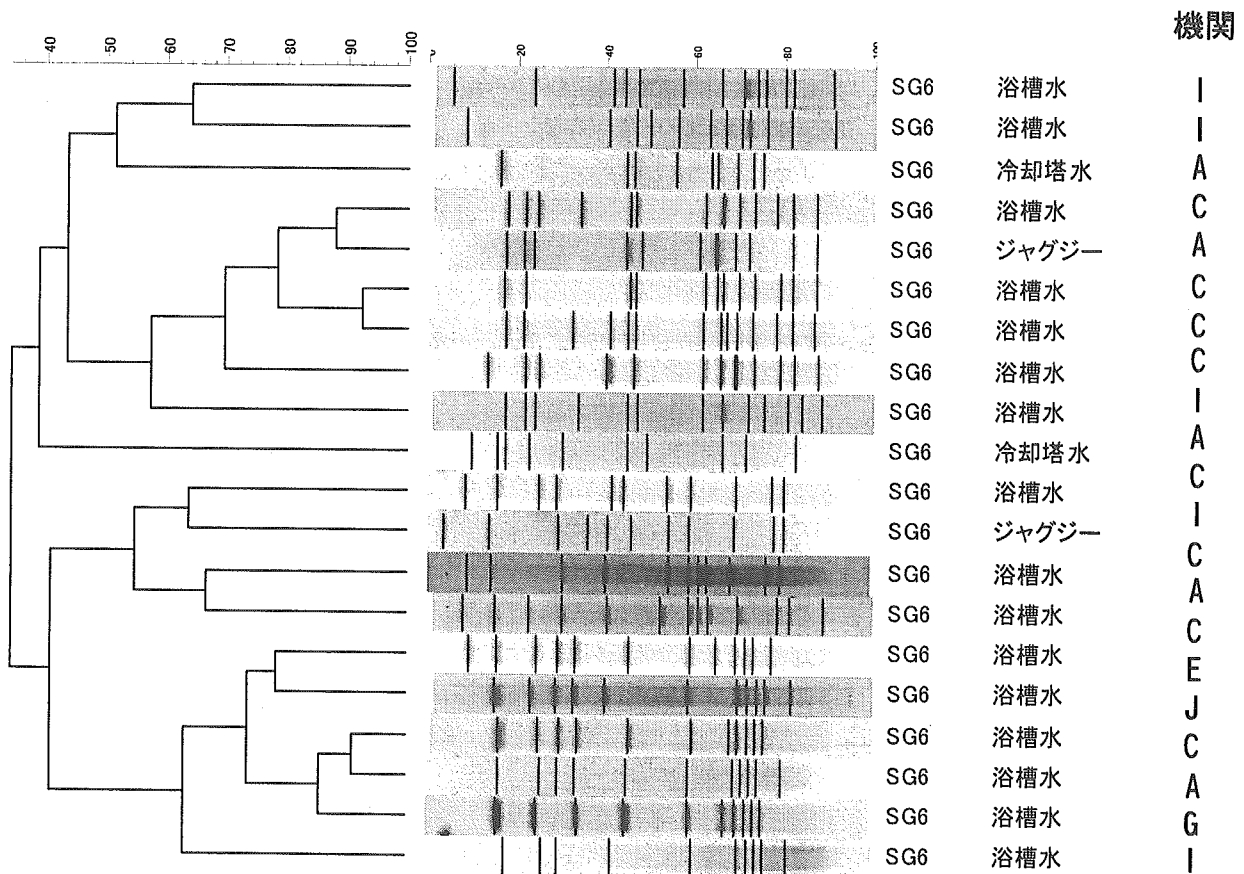


表 1. 標準菌株

No	国立感染症研究所 No	菌種名	血清群	由来
1	NII B0138	<i>Legionella pneumophila</i>	SG3	臨床分離株
2	NII B0233	<i>Legionella pneumophila</i>	SG4	環境分離株
3	NII B0095	<i>Legionella micdadei</i>		臨床分離株



表 2 九州地区における材料由来別レジオネラ属菌検出状況(2005年)

菌種・血清群	全体	循環式公衆浴場	掛け流し式公衆浴場	温泉源泉	24時間風呂	冷却塔水	修景水	(参考)文献で、患者から分離報告のある菌
	(10 機関)	(6 機関)	(5 機関)	(2 機関)	(1 機関)	(3 機関)	(1 機関)	
<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> SG15	○	○						
<i>L.pneumophila</i> SGUT	○					○		
<i>L.dumoffii</i>	○	○					○	
<i>L.maceachernii</i>	○		○				○	
<i>L.anisa</i>	○					○		
<i>L.spiritensis</i>	○					○		
<i>L.spp</i>	○					○		

表 3 九州地区における循環式公衆浴場浴槽水からのレジオネラ属菌検出状況(2005年)

菌種・血清群	全体 (6 機関)	福岡県	北九州市	長崎市	大分県	熊本市	宮崎県
<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> SG15	○					○	
<i>L.pneumophila</i> SGUT							
<i>L.dumoffii</i>	○					○	
<i>L.maceachernii</i>							
<i>L.anisa</i>							
<i>L.spiritensis</i>							
<i>L.spp</i>							

表 4 九州地区における掛け流し式浴場浴槽水からのレジオネラ属菌検出状況(2005年)

菌種・血清群	全体 (5 機関)	長崎市	熊本県	大分県	宮崎県	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> SG15						
<i>L.pneumophila</i> SGUT						
<i>L.dumoffii</i>						
<i>L.maceachernii</i>	○		○			
<i>L.anisa</i>						
<i>L.spiritensis</i>						
<i>L.spp</i>						

表 5 九州地区における温泉源泉からのレジオネラ属菌検出状況(2005年)

菌種・血清群	全体 (2 機関)	熊本県	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> SG15			
<i>L.pneumophila</i> SGUT			
<i>L.dumoffii</i>			
<i>L.maceachernii</i>			
<i>L.anisa</i>			
<i>L.spiritensis</i>			
<i>L.spp</i>			

\* : 源泉から直接引いたラインからの採水を源泉として調査した。

表 6 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	全体 (1機関)	宮崎県
<i>L.pneumophila</i> SG5	○	○

表 7 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(2005年)

菌種・血清群	全体 (3機関)	北九州市	長崎市	宮崎県
<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> SG15				
<i>L.pneumophila</i> SGUT	○	○		
<i>L.dumoffii</i>				
<i>L.maceachernii</i>				
<i>L.anisa</i>	○	○		
<i>L.spiritensis</i>	○	○		
<i>L.spp</i>	○	○		

表 8 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(2005年)

菌種・血清群	全体 (1機関)	人工の小川
		長崎市
<i>L.pneumophila</i> SG1	○	○

## A 群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所	
	岸川 恭子	佐賀県衛生薬業センター	
	尾崎延芳	福岡市保健環境研究所	
	瓜生佳世	福岡市保健環境研究所	
	丸住美都里	松岡由美子	熊本市環境総合研究所

### 研究要旨

A 群溶血レンサ球菌（以下、A 群溶レン菌）のパルスフィールド電気泳動法（以下、PFGE 法）による分子疫学的解析の有用性については、厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）分担研究報告書「我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究（A 群レンサ球菌）」においてもその有用性が示されている。A 群溶レン菌について PFGE 法による遺伝子解析法を有効活用するため、PFGE マニュアルを整備し、その有用性について基礎的な検討を行った。平成 16 年度の検討結果、(1)Lysozyme 処理に比べて Mutanolysin 処理をした方が明瞭なバンドが得られること。(2)A 群溶レン菌の PFGE 法でよく用いられる制限酵素 *Sma* I に *Sfi* I を併用し比較することにより、より正確な解析が可能となることが示された。しかし、検討した泳動条件では小さいサイズの解析が困難であり改良の余地があることも判明した。今年度は、PFGE 法の確立と応用を目的とし、由来が異なる A 群溶レン菌株を対象に、PFGE 法の泳動条件を中心に検討し、発赤毒遺伝子型（以下、*spe* 型）についても併せて実施した。その結果、T 型別と *spe* 型の組み合わせでは疫学的指標としては不十分な場合が多く、PFGE 法の疫学的指標としての有用性が示された。

### A. 研究目的

A 群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、小児の咽頭炎や扁桃炎などの気道感染症や猩紅熱の原因菌として知られているとともに、多臓器不全や手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を起し、急激な病態を惹起する劇症型溶血レンサ球菌の原因菌としても知られている。

一方、本菌で汚染された飲食物を喫食した人が咽頭痛、発熱等の臨床症状を呈する、いわゆる食品を介した集団感染事例が埼玉県、東京都、高知県、茨城県などで報告されており、九州地区においては 1997 年に福岡市（T-B3264 型）、1998 年に熊本市（T-28 型）において、その報告がある。

今回は、食品を介した集団感染事例（2 事

例）由来株と同一の T 型を有する溶レン菌感染症と診断された小児の咽頭ぬぐい液由来株に加えて、近年大分県内で流行が認められる A 群溶レン菌 T-1 型（小児の咽頭ぬぐい液由来株）について、PFGE 法の分子疫学的解析の有用性を検討し、*spe* 型についても併せて実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

1997 年 5 月に福岡市、1998 年 9 月に熊本市で発生した集団感染由来株、計 18 株と溶レン菌感染症と診断された小児の咽頭ぬぐい液由来株、計 20 株について検討した。同定方法は、馬血液寒天培地上で明らかな β 溶血を示し、カタラーゼ陰性、グラム陽性球菌