

であることを確認後、血清群別キットを用いて A 群抗原を保有することおよびピロリドニルアリルアミダーゼ活性試験（以下、PYR 試験）陽性であることで行った。

2. PFGE 法

PFGE の方法は、「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)」を参照に、図 1 に示す方法で実施した。

ただし、泳動条件を *Sma* I の場合は、6.0V/cm, 5 to 15sec, 10 時間、15 to 45sec, 12 時間、12℃とし、*Sfi* I の場合は、6.0V/cm, 15 to 80sec, 21 時間、12℃とした。

3. 発赤毒遺伝子型別法

A 群溶レン菌が保有する *speA*, *speB* および *speC* 遺伝子の検出を PCR 法で行った。被検菌を Todd-Hewitt ブロスで 36℃、16-20 時間、静置培養した菌液 1,000 μl を 1.5ml の滅菌チューブに分取し、12,000rpm 5 分遠心する。沈渣に滅菌蒸留水を 1,000 μl 加えよく混和した後、12,000rpm 5 分遠心する。沈渣に滅菌蒸留水を 100 μl 加え混和した後、100℃、10 分加熱し、遠心後その上清を PCR サンプルとした。プライマー、PCR 条件は国立感染症研究所より示された「A 群溶血レンサ球菌」に従って行った。

C. 研究結果

1. 各事例由来株の *Sma* I および *Sfi* I による切断パターン

福岡市事例由来 14 株中、代表 4 株（レーン 2,3,4,5）と T 型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株 3 株（レーン 6,7,8）(T-B3264 型) と熊本市事例由来株 4 株中、代表 2 株（レーン 10,11）と T 型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株 3 株（レーン 12,13,14）(T-28 型) の泳動パターンを図 2,3 に、咽頭ぬぐい液由来の T-1 型 12 株の泳動パターンを図 4,5 に示した。

Sma I および *Sfi* I とともに福岡市事例由来

4 株はいずれも同一パターンを示し、同じ T-B3264 型でも咽頭ぬぐい液由来の 3 株は全く異なるパターンを示した。

一方、熊本市事例由来 2 株と T 型別が同じ T-28 型の咽頭ぬぐい液由来の 3 株は、*Sma* I でよく似たパターンを示したが、*Sfi* I では明らかに異なるパターンを示した。

また、咽頭ぬぐい液由来の T-1 型は、*Sfi* I でよく似たパターンを示したが、*Sma* I では異なるパターンを示した。

2. PCR 法による *spe* 遺伝子保有状況

福岡市事例由来 4 株と咽頭ぬぐい液由来の 3 株の T-B3264 型は *speB* 遺伝子を保有し、熊本市事例由来 2 株と咽頭ぬぐい液由来の 3 株の T-28 型は *speB*, *C* 遺伝子を、咽頭ぬぐい液由来の T-1 型は 12 株のうち 11 株が *speA*, *B* 遺伝子を、1 株が *speB* 遺伝子のみを保有していた。T 型別、由来による差は認められなかった。

D. 考察

A 群溶レン菌の PFGE 法において、よく使用される制限酵素は *Sma* I であり、今回も明瞭なバンドが得られた。しかし、熊本市事例由来の T-28 型については、*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った。T-1 型においても *Sfi* I でよく似たパターンを示したが、*Sma* I では異なるパターンを示したことにより、A 群溶レン菌の PFGE 法には少なくとも 2 種類の制限酵素を用いて比較することが有用であると考えられた。

また、*speB* 遺伝子のみを保有していた T-1 型と *speA*, *B* 遺伝子を保有していた T-1 型の PFGE 法における泳動パターンにおいて、*Sfi* I ではよく似たパターンを示し区別できなかったが、*Sma* I では異なるパターンとなり（レーン 9）、その有用性が示された。

E. 結論

疫学的解析方法の手段として、T 型別や *spe* 遺伝子型などがあるが、同じ T 型の株や *spe* 遺伝子型を有する株においても PFGE 法による泳動パターンが異なることが確認され、PFGE 法の分子疫学的解析の有用性が確認された。さらに、より正確に解析するため、少なくとも 2 種類の制限酵素を用いて比較することが有用であると考えられる。

F. 研究発表

なし

図 1 溶レン菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

第 1 日目 (菌の培養)

5ml の Todd-Hewitt ブイヨンに菌を接種し、35-37°C、16-20 時間、静置培養

↓

第 2 日目 (集菌、アガーブロックの作製)

- 1) 予めアガロースブロック作成用ウエル(0.7mm のサンプルプラグキャスターを使用)にテープを貼り番号を付け、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で保温しておく。
- 3) 一夜培養した菌液(Todd-Hewitt ブイヨン)を 3,000rpm で 20 分間遠心する。
- 4) 上清を除去後、沈渣に滅菌蒸留水を 500 μ l 加え混和後、懸濁液とし、滅菌した 1.5ml のマイクロチューブに移す。
- 5) 菌の不活化と、ゲルとの混和準備のために、4)の菌液を 63°Cのアルミブロックで 10 分程度加温する。
- 6) 5)のチューブに 2)の 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 500 μ l 入れ混和する。
- 7) 6)を 1)のサンプルプラグキャスター(0.7mm)に約 100 μ l 注入する。
- 8) 7)を氷上で固める。15-30 分間放置。

↓

(Mutanolysin 処理)

- 1) Mutanolysin を 0.5MEDTA で 90 μ g/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、緩やかに振盪する。(30rpm程度)

↓

第 3 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、Mutanolysi 液を丁寧に抜き取る。
- 2) ProtenaseKを 1%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA で 1mg/ml となるよう溶解し、Mutanolysin 液を抜き取ったチューブに 1ml ずつ分注(1ブロック作製用)。
- 3) 50°Cで over night 緩やかに振盪する(30rpm程度)。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 4 日目 (ProtenaseKの不活化・洗浄)

- 1) アガロースブロックを取り出し、メスやカバーガラスを使って泳動時用の大きさにカットし、TE(シャーレ)をくぐらせ次の操作へ、残りは ProtenaseKに戻す。
- 2) 新しいチューブに 4mM Pefabloc in TE を 1ml 加え、1)のアガロースブロックを入れ、50°C1 時間振盪する(1 回目)。
- 3) 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 1ml 加え、50°C1 時間振盪する(2 回目)。
- 4) 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、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、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°Cの恒温水槽で20分ゆっくり振盪する。この操作を2回繰り返す。)

↓

(制限酵素による消化)

- 1) 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 μ l 分注する。
- 2) アガロースブロックを 1) に移し、氷上で1時間振盪する。
- 3) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (Sma I、30unit / sample plug または Sfi I 30unit / sample plug) を 200 μ l チューブに入れ、Sma I の場合は 30°C で、Sfi I の場合は 50°C で overnight 振盪反応する。(ここで止めても良い。作業を止める場合は、TE で 2 回洗浄した後 TE で保存する。保存した場合、泳動前に室温程度の温度の TE で 2 回洗浄する。)

↓

第5日目 (アガロースブロックのコームへの貼り付け)

- 1) 黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、2L の 0.5 \times TBE バッファーを泳動槽に注ぎ入れ、14°C に予冷する。
- 2) 0.5 \times 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。
- 3) 55–60°C の恒温水槽で溶解した 1% アガロースを保温する。
- 4) 恒温槽からチューブを取り出し、0.5 \times TBE バッファー (TE でも可) を 400 μ l 加え、氷冷する。
- 5) 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。
- 6) 泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き、順にブロックを貼り付けていく。
- 7) マーカーは λ ラダーを使用。 λ 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 程度入れた 1.5ml のチューブに入れ、37°C で 5 分温後、急冷し、他のサンプルと同じ方法で、コームに貼り付ける。
- 8) コームにある余剰の液をキムワイパーで除き、5~10 分間程度乾燥させる。
- 9) コームの先端が platform に接着するようコームをゲル作製台にセットする。
- 10) 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。
- 11) 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)

泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。

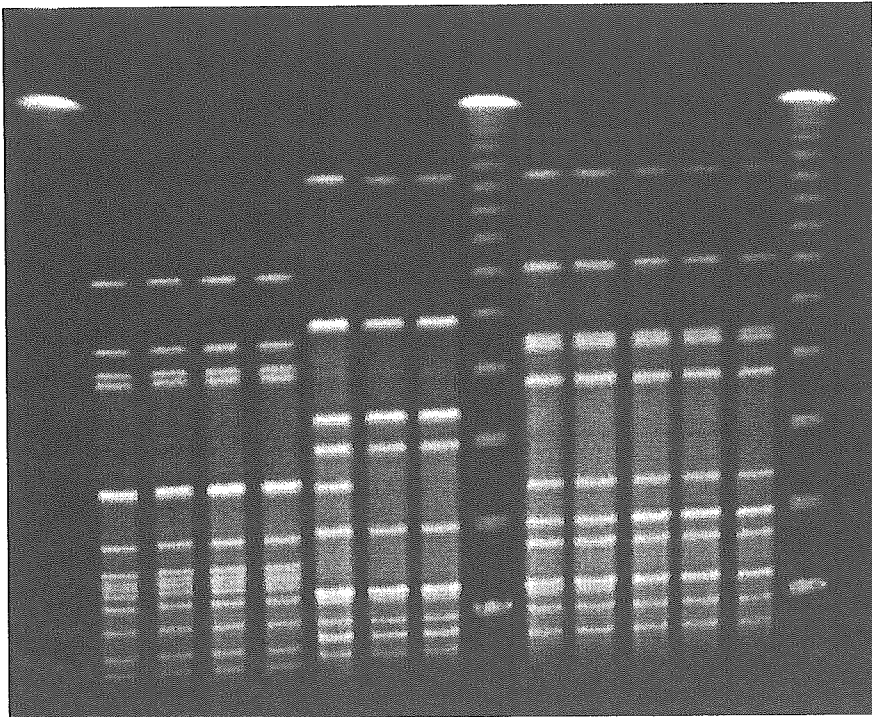
泳動条件は、Sma I の場合は 6.0V/cm, 5 to 15sec, 10 時間、15 to 45sec, 12 時間、12°C
Sfi I の場合は 6.0V/cm, 15 to 80sec, 21 時間、12°C

↓

第6日目 (染色・写真撮影)

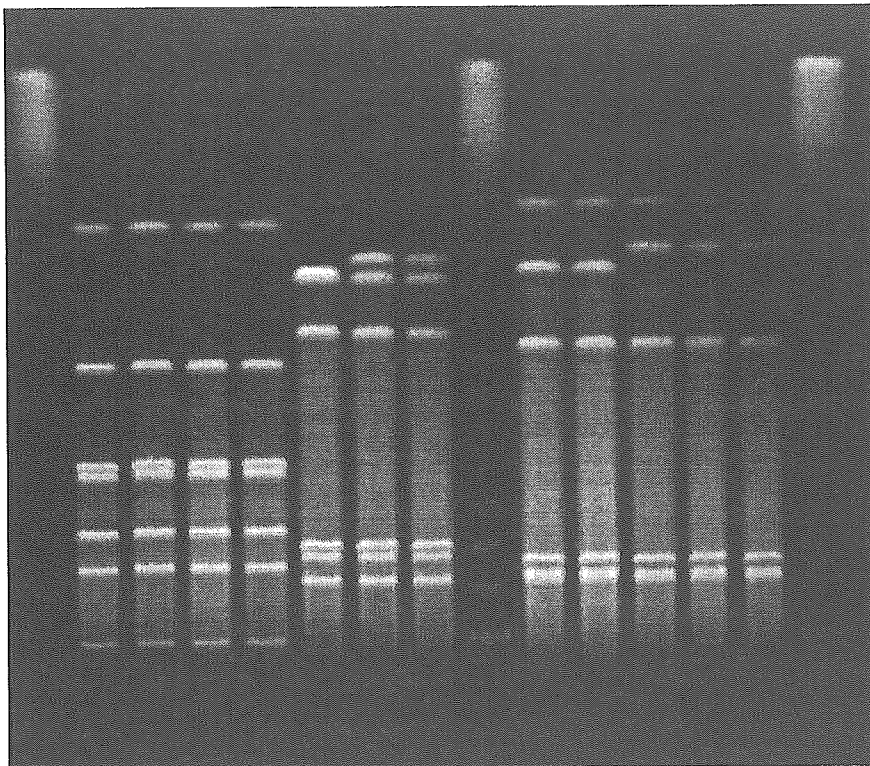
- 1) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は 2 度、2L の蒸留水で洗浄する。
- 2) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3 μ g/ml のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で 30 分、振盪・染色。
- 3) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら 2 時間洗浄。こまめに DW を替える。(例 10 分、10 分、20 分、20 分、30 分、30 分)
- 4) 写真撮影 : イルミネーターにサララップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真をとる。

図2 *Sma* I (T-B3264型、T-28型)



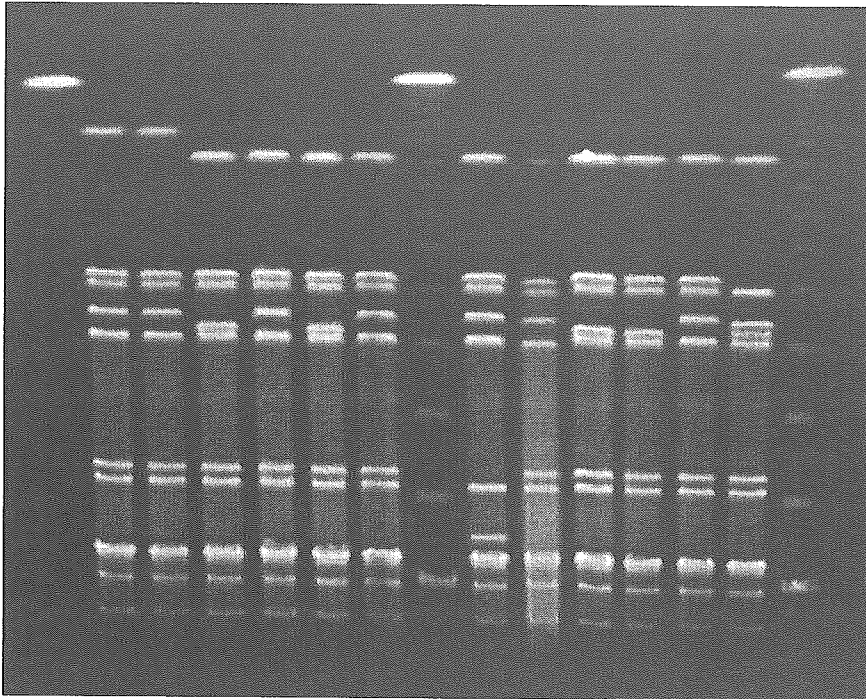
- レ-ン 1: マーカー
- レ-ン 2: 福岡市食中毒
- レ-ン 3: 福岡市食中毒
- レ-ン 4: 福岡市食中毒
- レ-ン 5: 福岡市食中毒
- レ-ン 6: 咽頭由来
- レ-ン 7: 咽頭由来
- レ-ン 8: 咽頭由来
- レ-ン 9: マーカー
- レ-ン 10: 熊本市食中毒
- レ-ン 11: 熊本市食中毒
- レ-ン 12: 咽頭由来
- レ-ン 13: 咽頭由来
- レ-ン 14: 咽頭由来
- レ-ン 15: マーカー

図3 *Sfi* I (T-B3264型、T-28型)



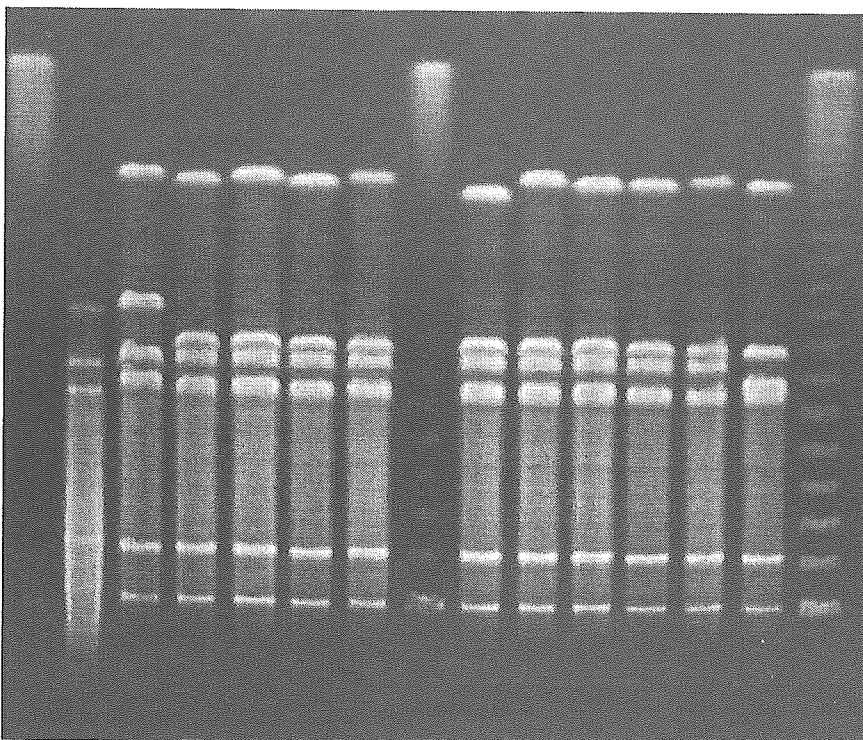
- レ-ン 1: マーカー
- レ-ン 2: 福岡市食中毒
- レ-ン 3: 福岡市食中毒
- レ-ン 4: 福岡市食中毒
- レ-ン 5: 福岡市食中毒
- レ-ン 6: 咽頭由来
- レ-ン 7: 咽頭由来
- レ-ン 8: 咽頭由来
- レ-ン 9: マーカー
- レ-ン 10: 熊本市食中毒
- レ-ン 11: 熊本市食中毒
- レ-ン 12: 咽頭由来
- レ-ン 13: 咽頭由来
- レ-ン 14: 咽頭由来
- レ-ン 15: マーカー

図4 *Sma* I (T-1型)



- レーン 1: マーカー
- レーン 2: 咽頭由来株
- レーン 3: 咽頭由来株
- レーン 4: 咽頭由来株
- レーン 5: 咽頭由来株
- レーン 6: 咽頭由来株
- レーン 7: 咽頭由来株
- レーン 8: マーカー
- レーン 9: 咽頭由来株
- レーン 10: 咽頭由来株
- レーン 11: 咽頭由来株
- レーン 12: 咽頭由来株
- レーン 13: 咽頭由来株
- レーン 14: 咽頭由来株
- レーン 15: マーカー

図5 *Sfi* I (T-1型)



- レーン 1: マーカー
- レーン 2: 咽頭由来株
- レーン 3: 咽頭由来株
- レーン 4: 咽頭由来株
- レーン 5: 咽頭由来株
- レーン 6: 咽頭由来株
- レーン 7: 咽頭由来株
- レーン 8: マーカー
- レーン 9: 咽頭由来株
- レーン 10: 咽頭由来株
- レーン 11: 咽頭由来株
- レーン 12: 咽頭由来株
- レーン 13: 咽頭由来株
- レーン 14: 咽頭由来株
- レーン 15: マーカー