

表8 同一 PFGE 型を示した株の IS 型

施設 菌株	1st set Primer Mix																2nd set Primer Mix																PFGE型				
	01	02	03	04	05	06	ea	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15		16	stx2	stx1	
No.8-5	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	247	
No.8-7	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	247	
No.8-10	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	a254		
No.8-11	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	a254	
No.8-12	0	0	w	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	a258	
No.8-13	0	0	w	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	a258	
No.8-14	0	0	w	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	a258	
No.5-7	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	a388	
No.5-9	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	a388	
No.5-10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	a388	
No.8-3	1	0	w	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	a401	
No.8-4	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	a401	
No.5-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	b102	
No.5-4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	b102	
No.5-3	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	b102	
No.5-8	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	b104	
No.5-12	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	b104	
No.11-9	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	b272	
No.11-10	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	b272	
No.11-11	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	b272	
No.11-20	1	0	2	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	b272	
No.5-23	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	b518		
No.5-24	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	b518	
No.11-2	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	b58	
No.11-7	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	b58	
No.5-17	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	b58

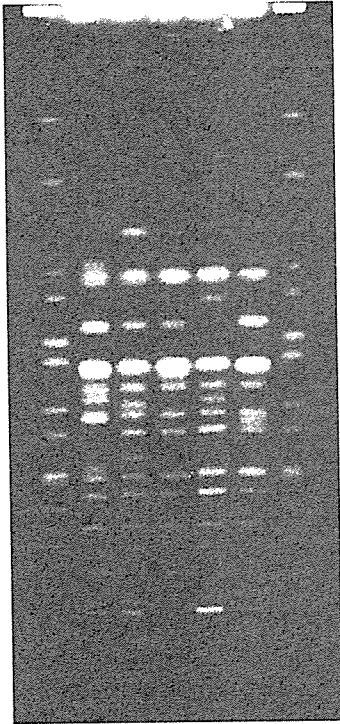
表9 異なる PFGE 型で IS 型が一致した株

施設 菌株	1st set Primer Mix																2nd set Primer Mix																PFGE型			
	01	02	03	04	05	06	ea	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15		16	stx2	stx1
No.10-2	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	b32
No.11-12	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	a119
No.11-1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	b59
No.11-4	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	b276
No.5-23	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	b518	
No.5-24	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	b518	
No.5-16	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	b101	
No.11-14	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	Deg	
No.11-18	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	Deg	
No.11-15	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	Deg	
No.11-16	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	Deg

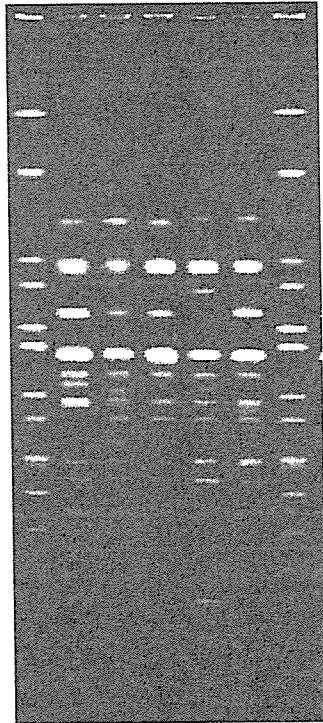
表10 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像解析における配布株の近似度と認識バンド数

菌株 番号	<i>Sma</i> I			<i>Kpn</i> I		
	100%一致 画像数	近似度(%)	認識 バンド数(本)	100%一致 画像数	近似度(%)	認識 バンド数(本)
6	5, 3	98.2	9	2	85.7	12, 13, 14, 15
7	8	100	8	2	84.2	10, 11, 12, 14

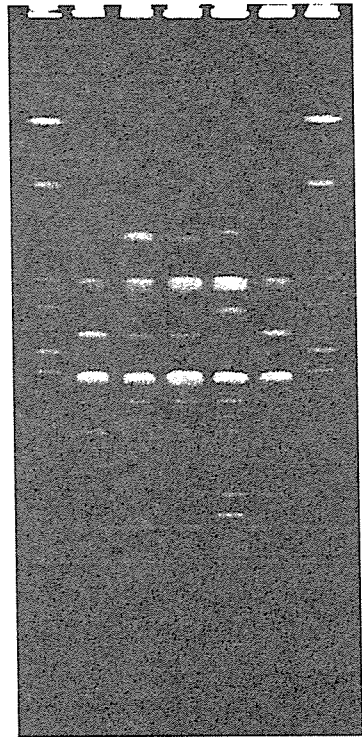
施設 1



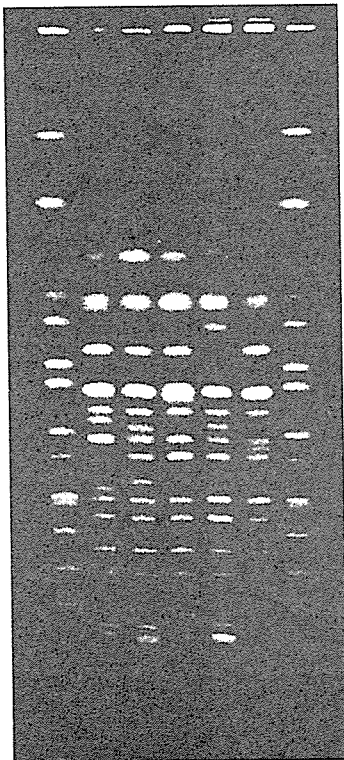
施設 2



施設 3



施設 4



施設 5



施設 6

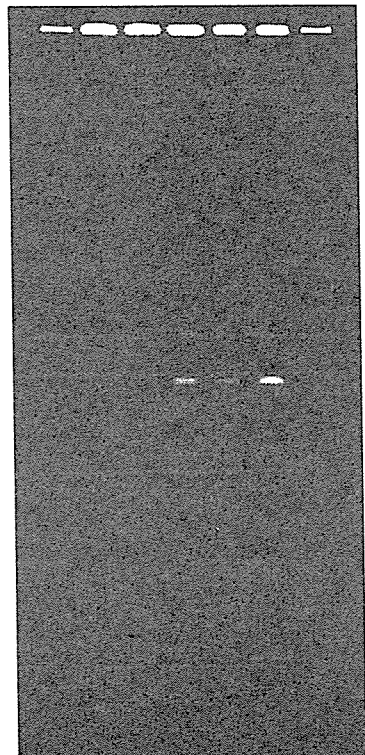
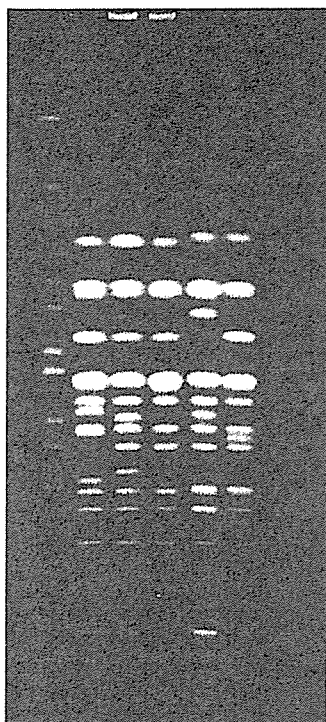
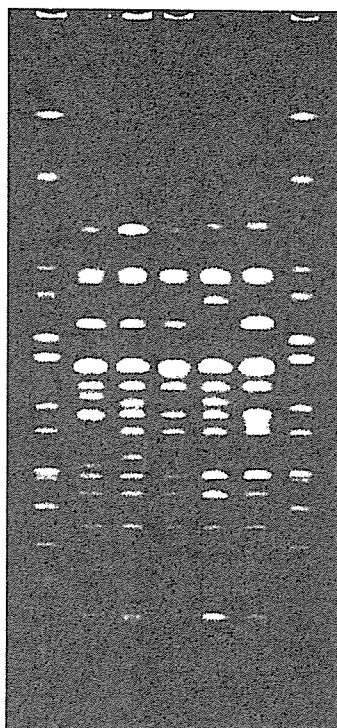


図1 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像

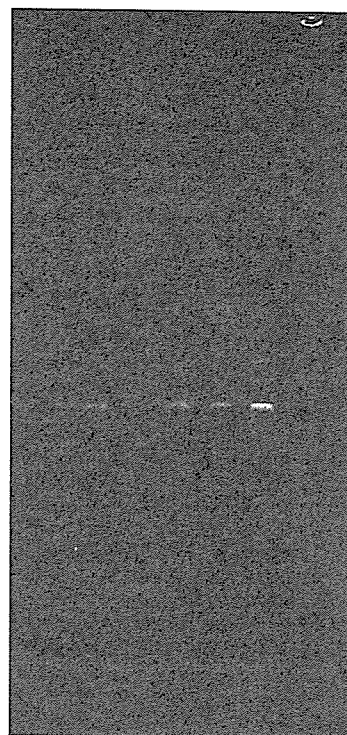
施設 7



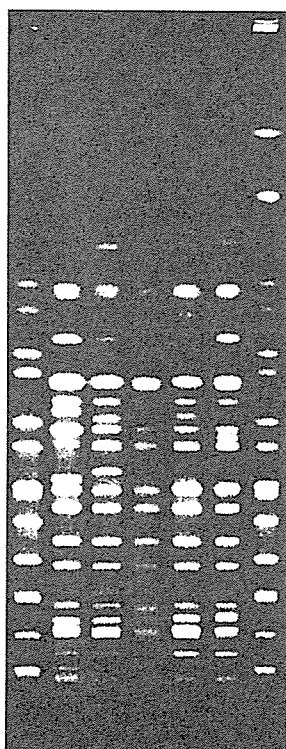
施設 8



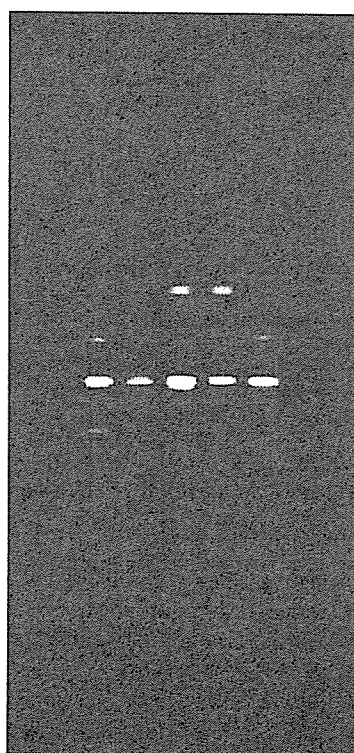
施設 9



施設 10



施設 11



左から

- 1 Marker
- 2 菌株 1
- 3 菌株 2
- 4 菌株 3
- 5 菌株 4
- 6 菌株 5
- 7 Marker

図1 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像 (つづき)

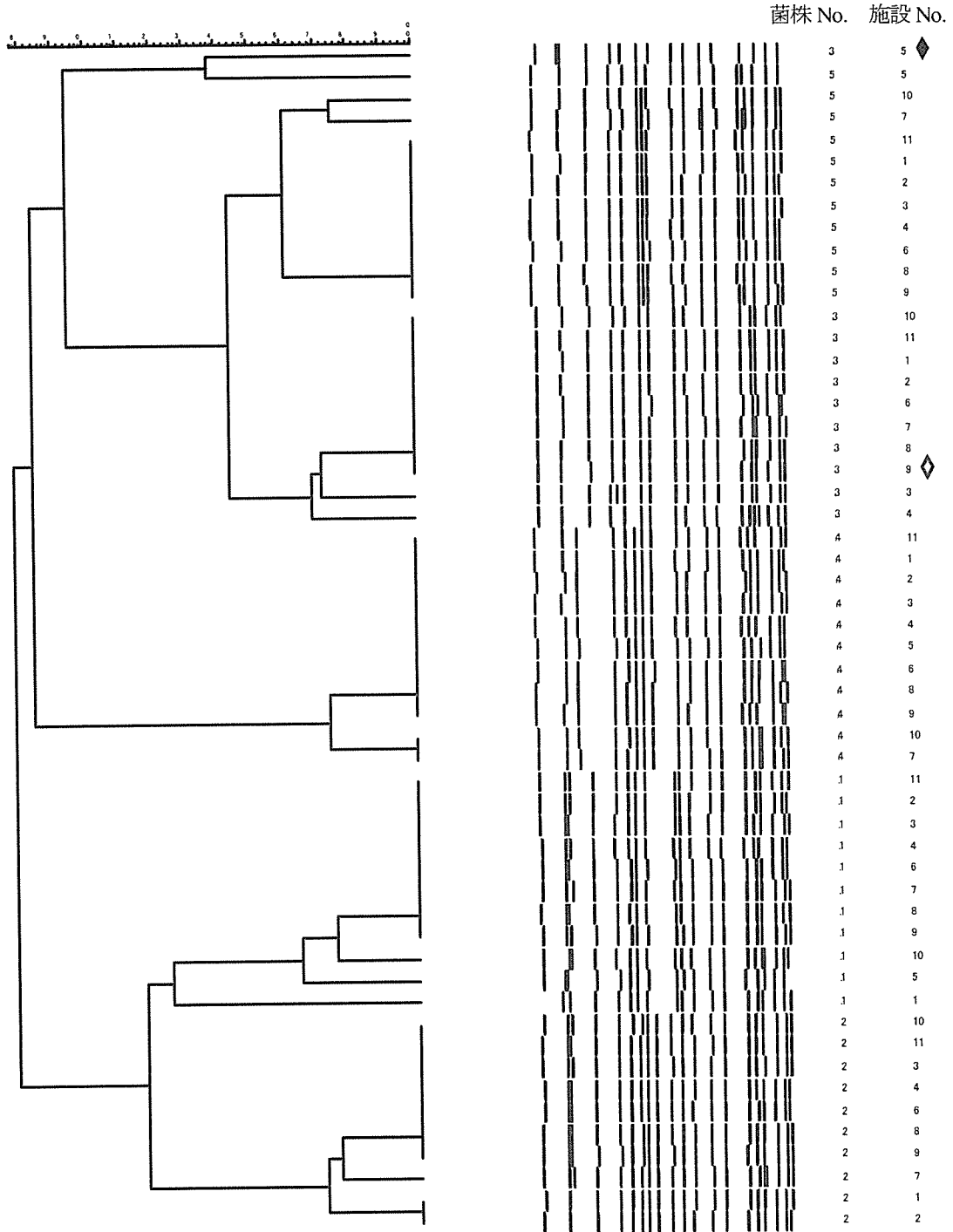


図2 A 解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

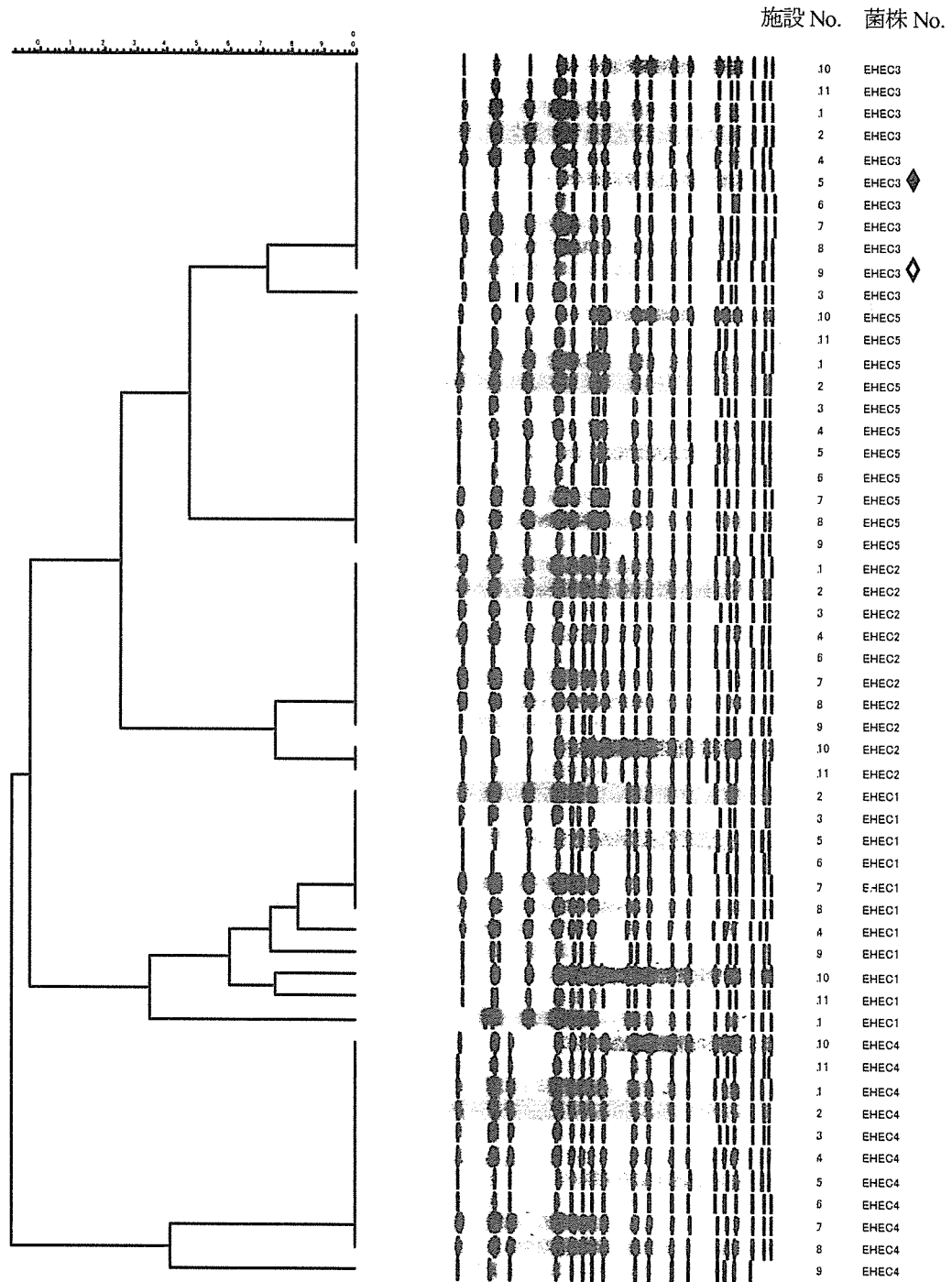


図3 B解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

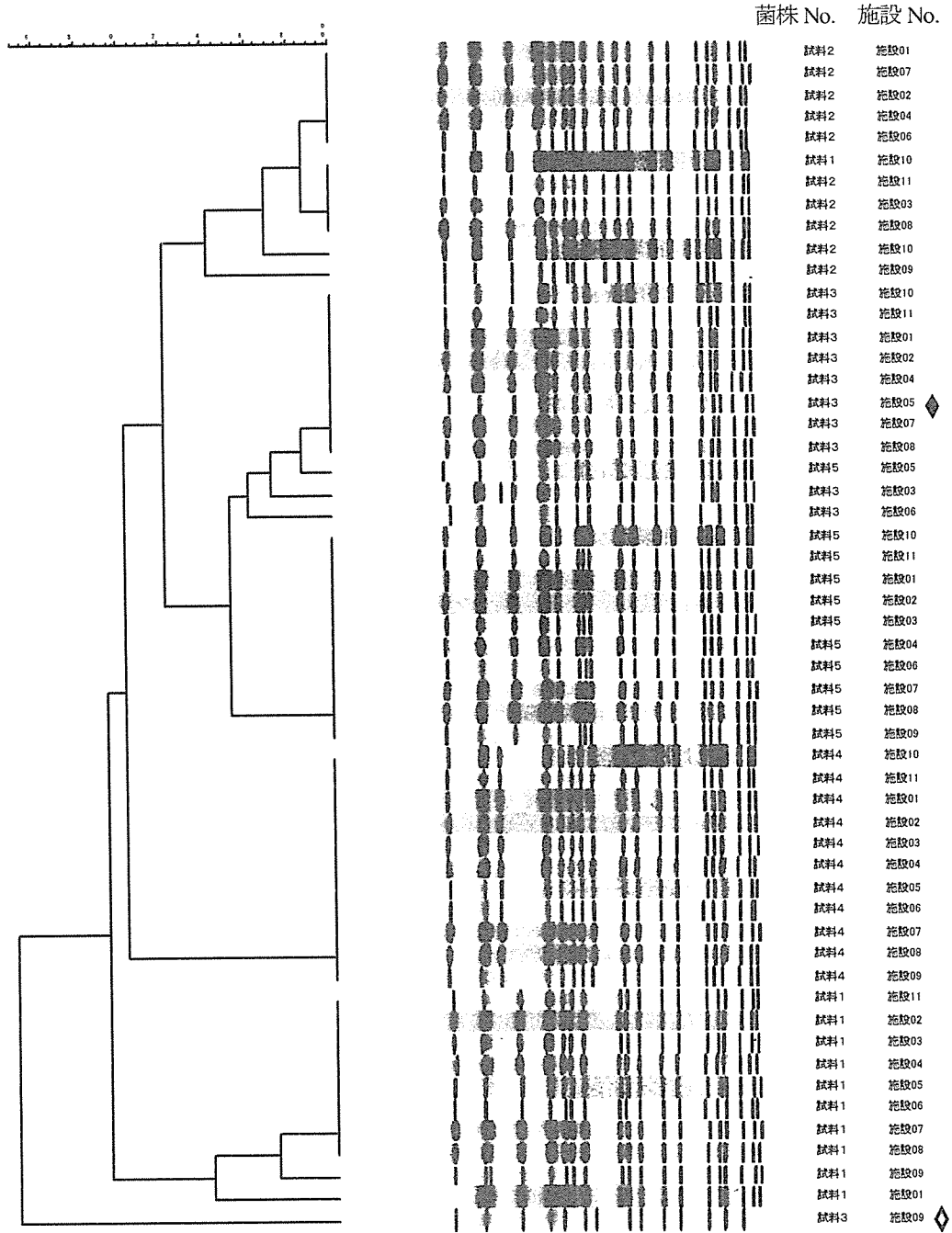
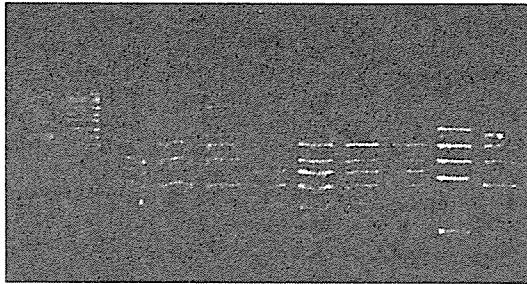


図4 C解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

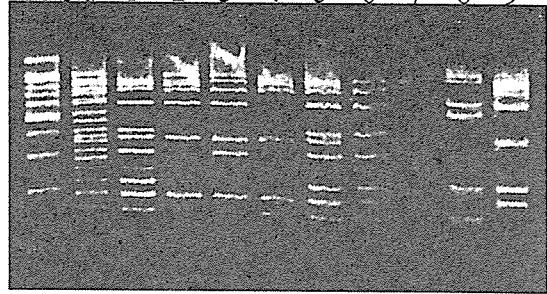
施設 4 1st set

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9



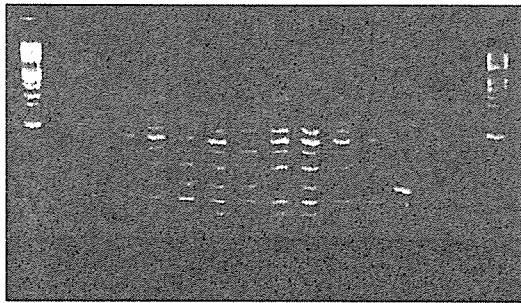
2nd set

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9



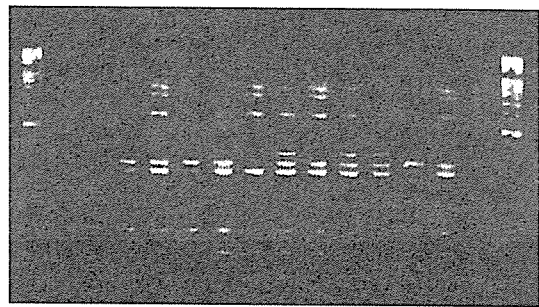
施設 5 1st set

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Std M

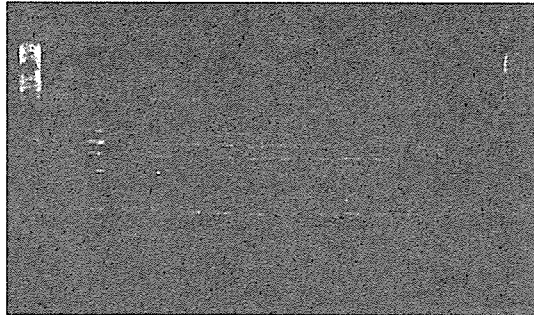


2nd set

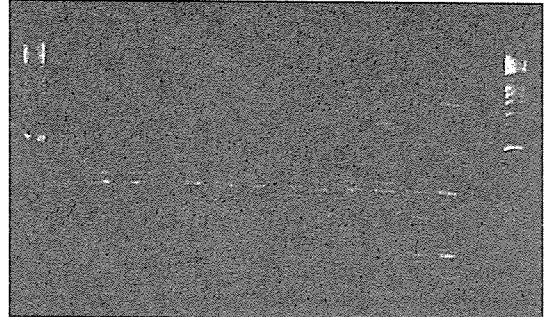
M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Std M



M Std 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 Std M



M Std 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 Std M



施設 10

1st set

2nd set

M Std 1 2 3 4 5 6 M 1 2 3 4 5 6 Std M

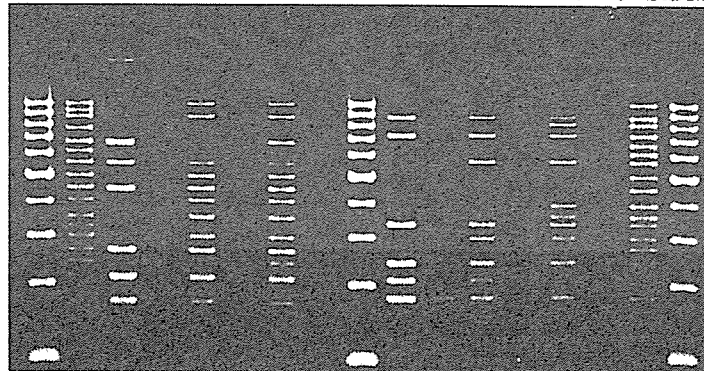


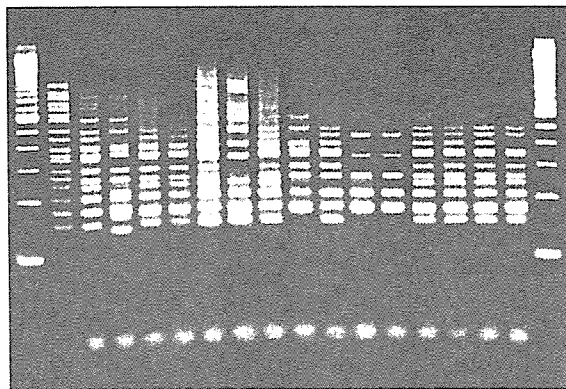
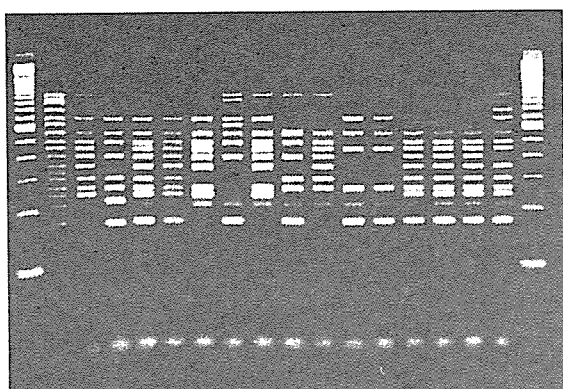
図5 EHEC O157 の IS printing System 画像

施設 8 1st set

2nd set

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

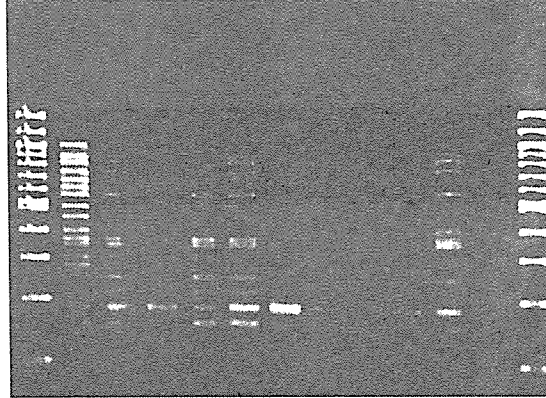
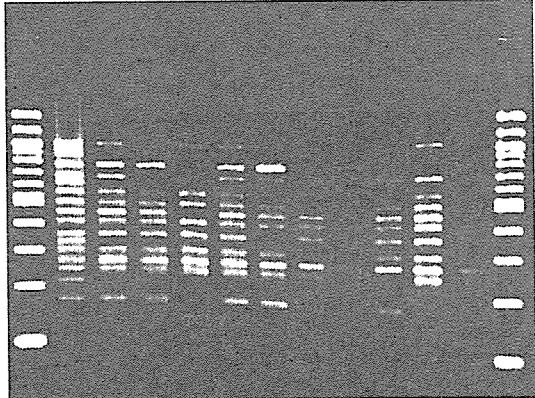


施設 11 1st set

2nd set

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

M Std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



M Std 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 M

M Std 10 11 1 2 13 14 15 16 17 18 19 20 21 M

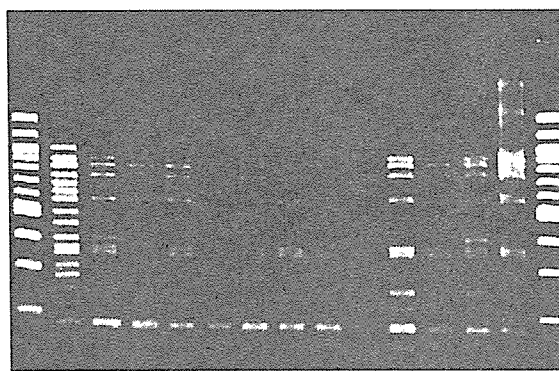
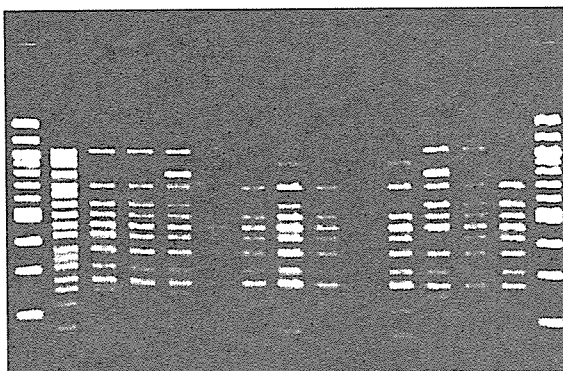
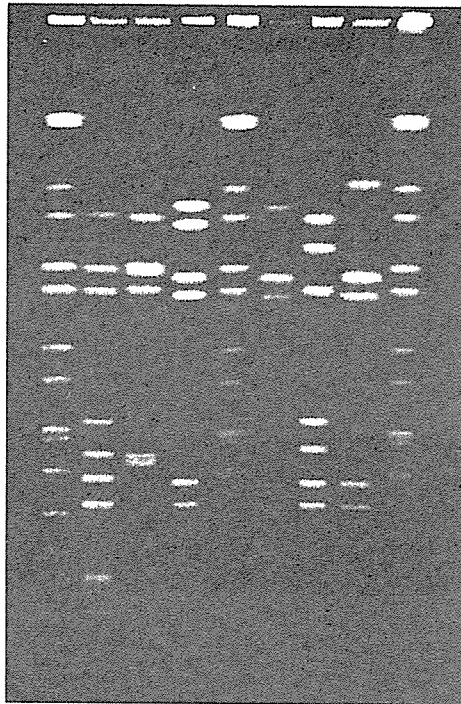
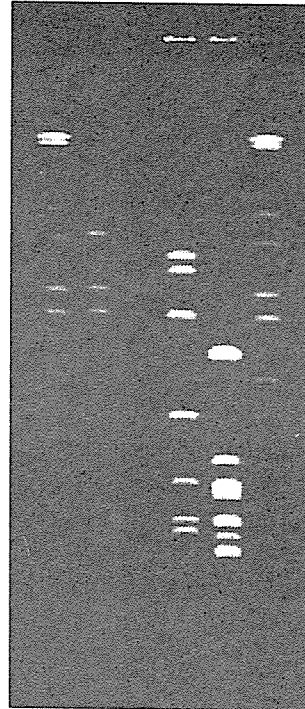


図5 EHEC O157 の IS printing System 画像 (つづき)

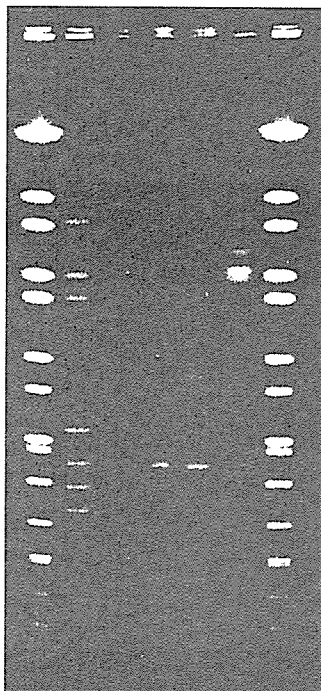
施設 1



施設 2



施設 3



施設 4

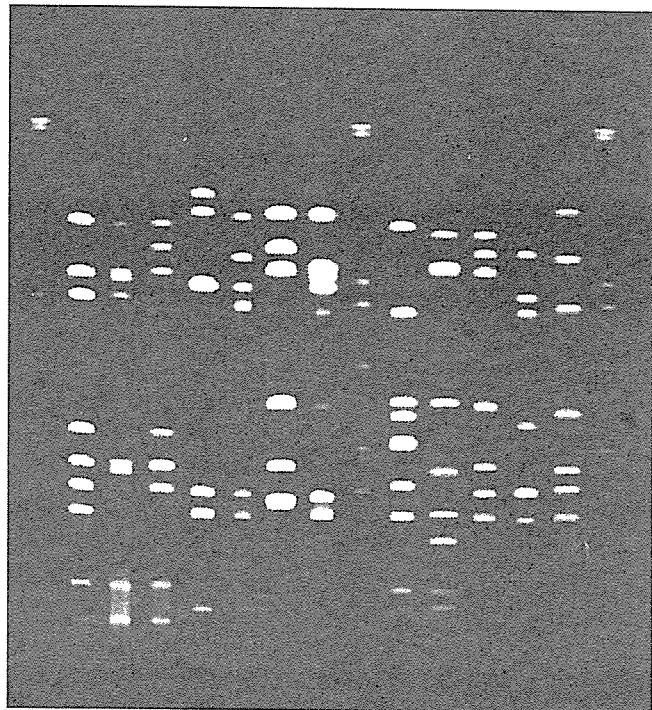
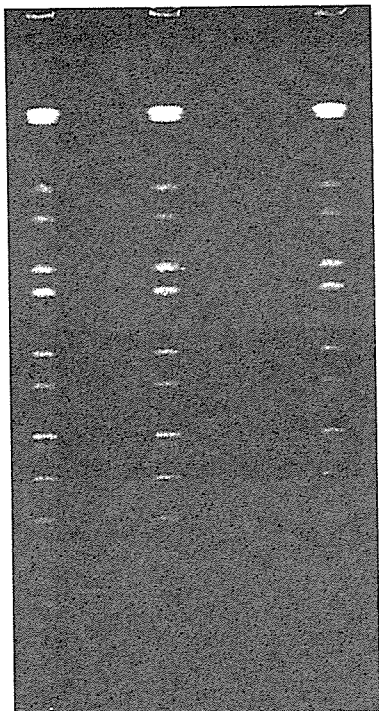
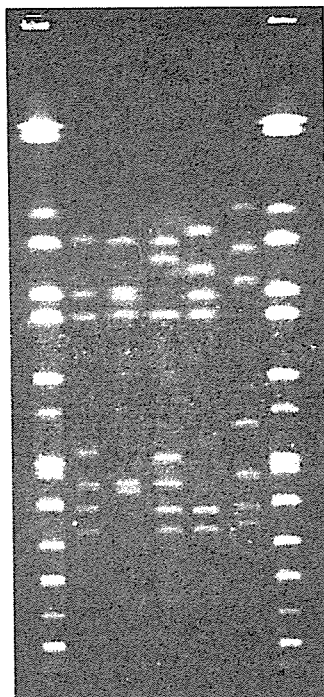


図 6 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像—*Sma*I 切断

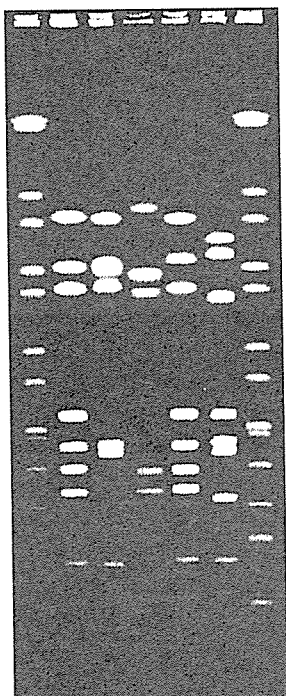
施設 8



施設 9



施設 10



施設 11

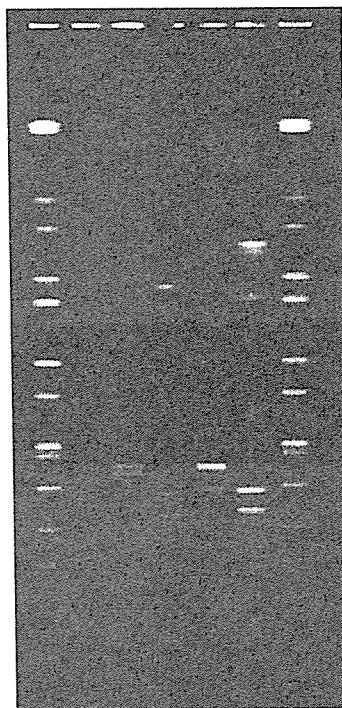


図 6 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像—*Sma*I 切断 (つづき)

Dice (Tol 1.2%~1.2% (H)0.0% S)0.0% (0.0%~100.0%)
CampSmaI

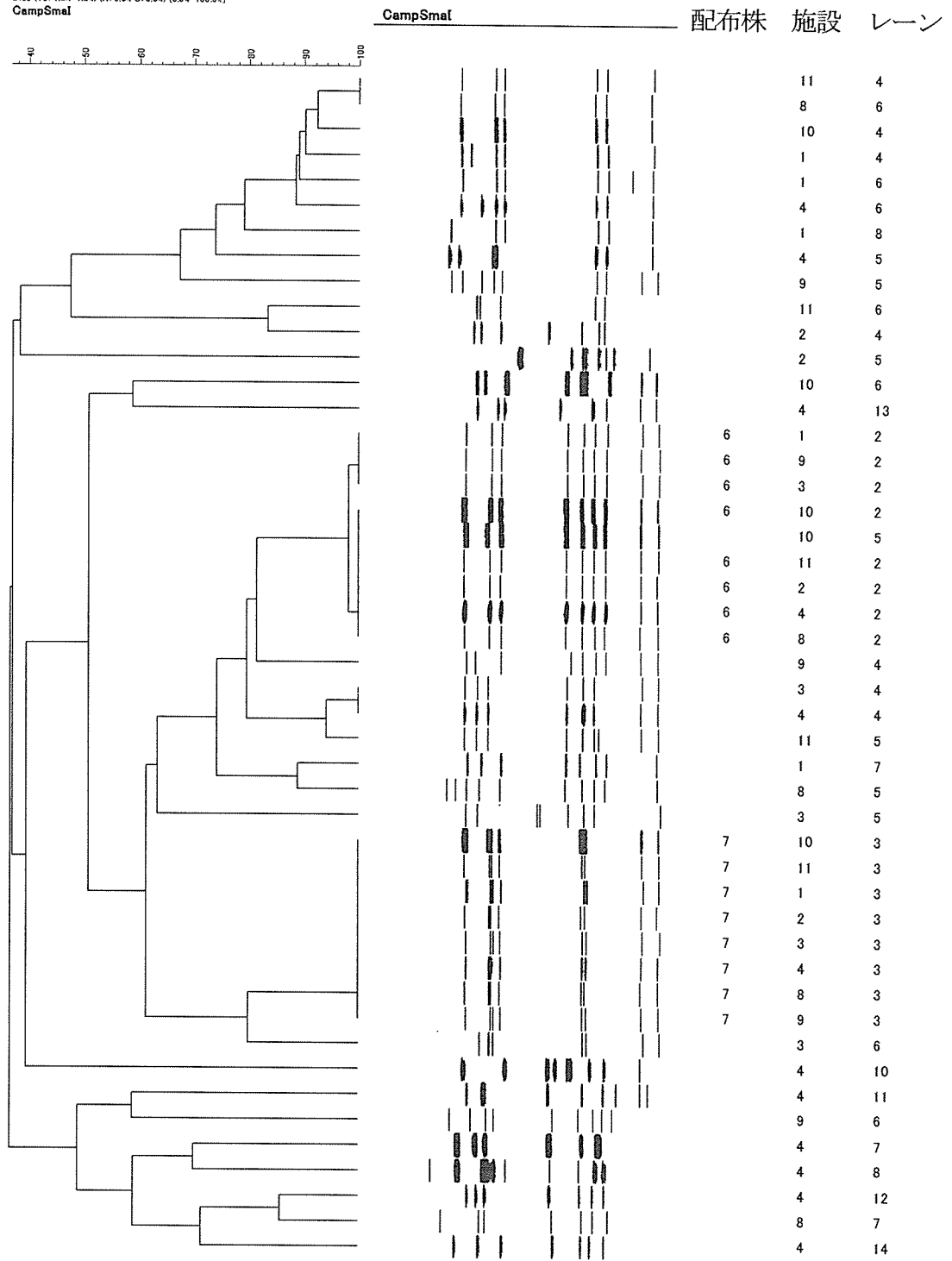


図7 A 解析者作成 *Campylobacter jejuni* のデンドログラム—SmaI 切断

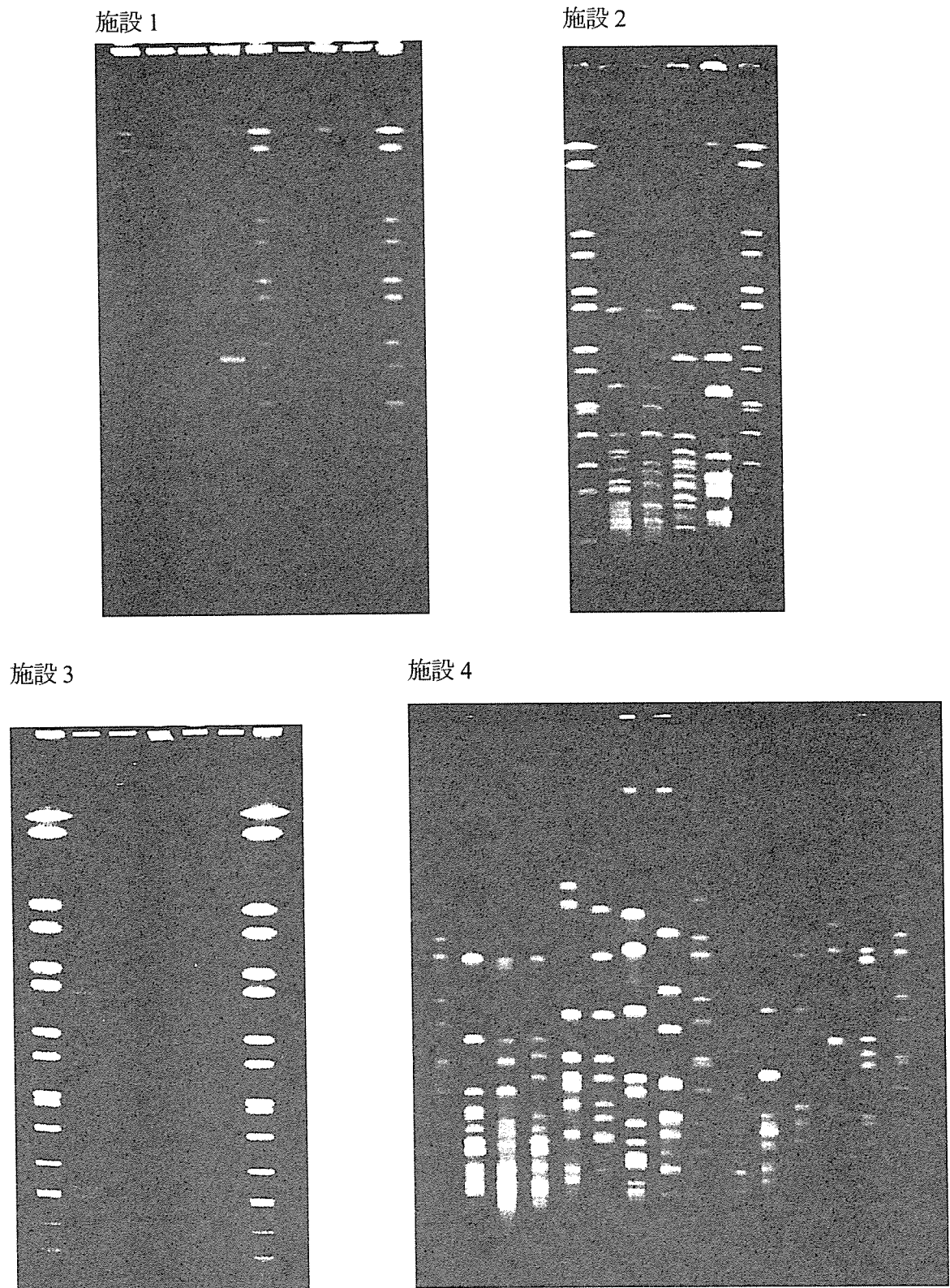
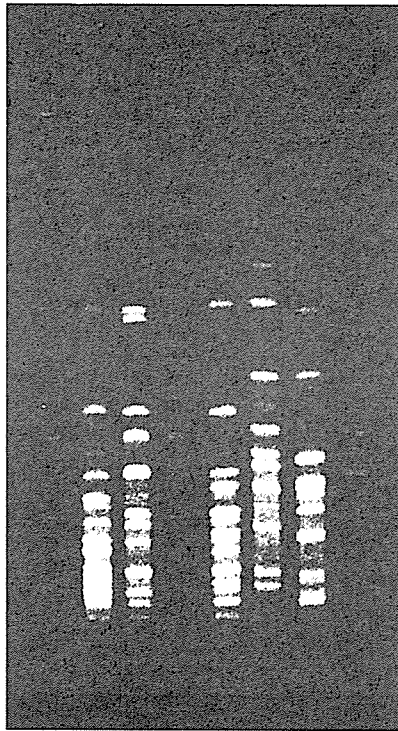
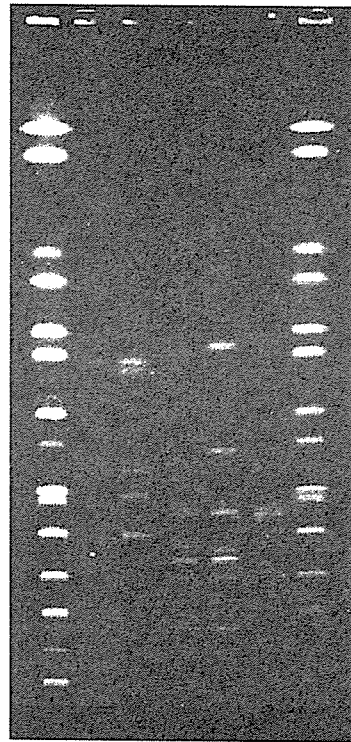


図 8 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像—*KpnI* 切断

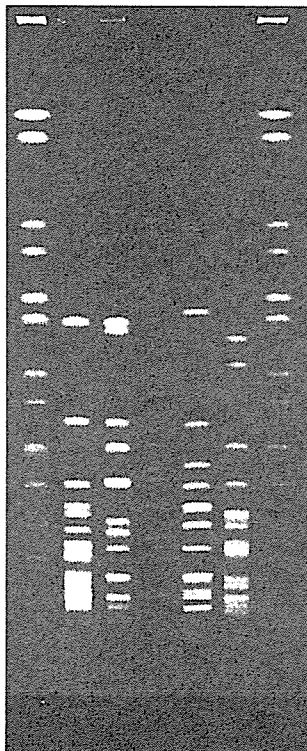
施設 8



施設 9



施設 10



施設 11

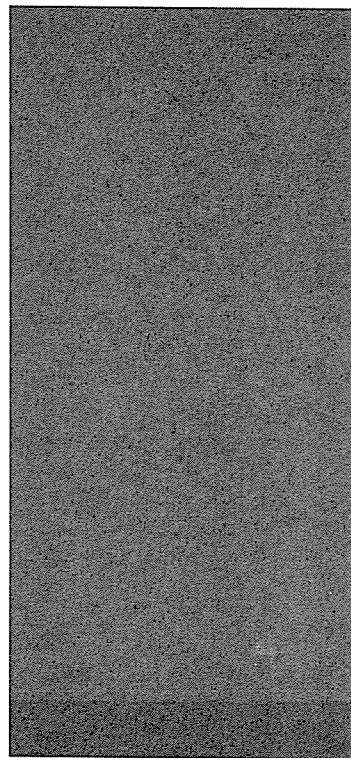


図 8 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像—*KpnI* 切断 (つづき)

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
CampKpnI

CampKpnI

配布株 施設 レーン

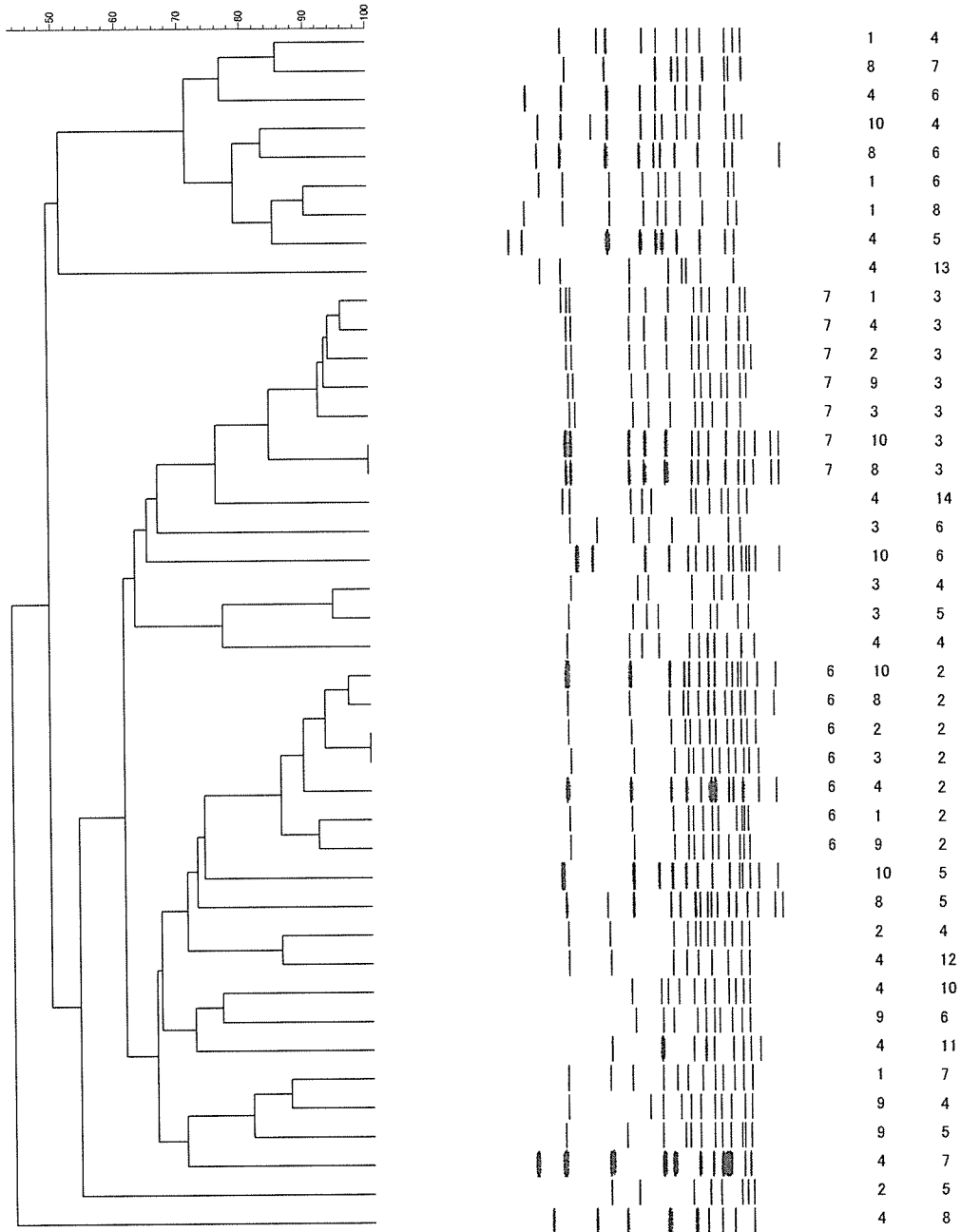


図9 A 解析者作成 *Campylobacter jejuni* のデンドログラム—KpnI 切断

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

レジオネラ症患者発生に伴うレジオネラ属菌の PFGE 解析

協力研究者 藤原恵子 京都府保健環境研究所 細菌・ウイルス課
江崎久雄 京都府保健環境研究所 細菌・ウイルス課
森垣忠啓 京都府保健環境研究所 細菌・ウイルス課

研究要旨

平成 18 年 2 月、京都府内にある温泉を利用した者が呼吸器不全に陥り、レジオネラ尿中抗原が検出されたことによりレジオネラ症と診断された。その患者の喀痰から *Legionella pneumophila* 1 群が分離された。そこで、患者が利用した温泉の環境調査を行い、浴槽水を含む環境中からレジオネラ属菌の分離を試み、*L. pneumophila* 1 群が 3 株分離された。患者由来株と環境由来株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析を行った。その結果、患者のレジオネラ属菌感染は当該施設の露天風呂の利用に原因があったと推察された。

A. 研究目的

レジオネラ症患者の感染源・感染経路を特定するために、患者が利用した温泉の環境調査を行った。浴槽水を含む環境中からのレジオネラ属菌の分離を試み、患者由来株と環境由来株について PFGE 解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

患者由来株の *L. pneumophila* 1 群 1 株と環境由来株の *L. pneumophila* 1 群 3 株を使用した。

(1) 患者由来株

患者由来株は、名古屋市衛生研究所から分与を受けた。

(2) 環境由来株

患者が利用した入浴施設で使用する源泉水、

内湯浴槽水、露天風呂浴槽水、貯湯タンク水の計 4 検体、更にヘアーキャッチャー、内湯循環水吸込口、内湯循環水吐出口、内湯レベル管又は連絡管、露天風呂吸込口、露天風呂吐出口、内湯板天井の拭取りの計 7 検体、合わせて 11 検体を採取し、「新版レジオネラ症防止指針」及び国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」に基づいて環境から *L. pneumophila* の分離を試みた。

2. レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）

PFGE 解析は、国立感染症研究所の方法に準じた「PFGE New Protocol-Kinki」を参考に、以下の方法で行った（図 1）。

(1) 菌液の調製

患者由来株と環境由来株は、シスチン添加 BCYE α 寒天培地にコンラージ棒で塗布し、37°C で3日間湿箱の中で培養した。マイクロチューブに滅菌生理食塩水1 mL入れ、10 μ Lループの白金耳でコロニーを掻き取って浮遊した。その後14000rpm・10分間遠心し、上清を除去した。再び滅菌生理食塩水1 mLで再浮遊し、試料原液とした。これを滅菌生理食塩水で階段希釈して用いた。

(2) 菌のアガロースブロックの作製

PFGE用のアガロースブロックの作製は、サンプルプラグキャスター (0.7mm) を用い、SeaKem Gold Agarose (最終濃度: 0.5%) で作製した。

(3) DNAの抽出

アガロースブロックを1 mg/mL Proteinase K、1 %N-Lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) 中で、50°C・2時間以上浸透し溶菌した。

(4) 制限酵素の前処理

DNA抽出処理したアガロースブロックを4 mM Pefabloc SC in TE溶液中で、50°C・20分以上反応させ、Proteinase Kを失活させた。

(5) 制限酵素処理

制限酵素は*Sfi* I (30unit/sample) を使用し、50°C・一晚反応させた。サイズマーカーとして使用した*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain (標準株) は*Xba* I を使用し、37°C・一晚反応させた。

(6) 電気泳動

制限酵素処理したアガロースブロックの電気泳動は、SeaKem Gold Agarose (1%) を用い、サイズマーカーとして*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain (標準株) を使用した。電気泳動条件は、6 V/cm (200V)、5~50秒、18時間、Buffer温度14°Cとした。

(7) 染色・写真撮影

0.2 μ g/ mLのエチジウムブロマイド溶液で20分間染色を行い、バンドを可視化した。その後、画像を取り込んだ。

3. PFGE画像の解析

滋賀県衛生科学センターの協力を得て、PFGE画像の解析を行った。

PFGEのゲルの写真は画像解析装置で取り込み、画像データ (TIFF形式、グレースケール、8ビット) に変換し、Fingerprinting II ソフトウェア (BIO-RAD) を用いて解析した。解析条件は解析係数Dice、Band-Tolerance値は1.20%、最適化値は0.00%とした。

C. 研究結果

露天風呂浴槽水から *L. pneumophila* 1群が10CFU/100mL 検出された。また露天風呂吸入口と吐出口から *L. pneumophila* 1群が、ヘアークャッチャーから *L. pneumophila* 型別不能菌が検出された。(表1)

PFGE 画像解析の結果は、患者由来株と露天風呂浴槽水及び露天風呂吐出口からの分離株との近似度は100%、患者由来株と露天風呂吸入口からの分離株との近似度は90%であった。(図2、3)

D. 考察

PFGE 画像解析の結果から、患者由来株、露天風呂浴槽水、露天風呂吐出口及び露天風呂吸入口由来株の近似度は90~100%であった。

このことから、患者のレジオネラ属菌感染は、当該施設の露天風呂の利用に原因があったと推察された。

また、ろ過器にはろ過材に麦飯石が使用されていた。これが生物膜の形成に寄与し、レジオネラ属菌の増殖を促進させる要因の一つとな

ったと推察された。

E. 結論

患者由来株と環境由来 3 株の PFGE 画像解析を行った結果から、患者のレジオネラ属菌感染は、当該施設の露天風呂の利用に原因があったと推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤原恵子、森垣忠啓：レジオネラ症患者発生に伴うレジオネラ属菌の PFGE 解析、平成 18 年度日本獣医公衆衛生学会(近畿) (2006 年 10 月、堺)

藤原恵子、江崎久雄、森垣忠啓：レジオネラ症患者発生に伴うレジオネラ属菌の PFGE 解析、第 33 回地研近畿支部 細菌部会研究会 (2006 年 11 月、和歌山)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

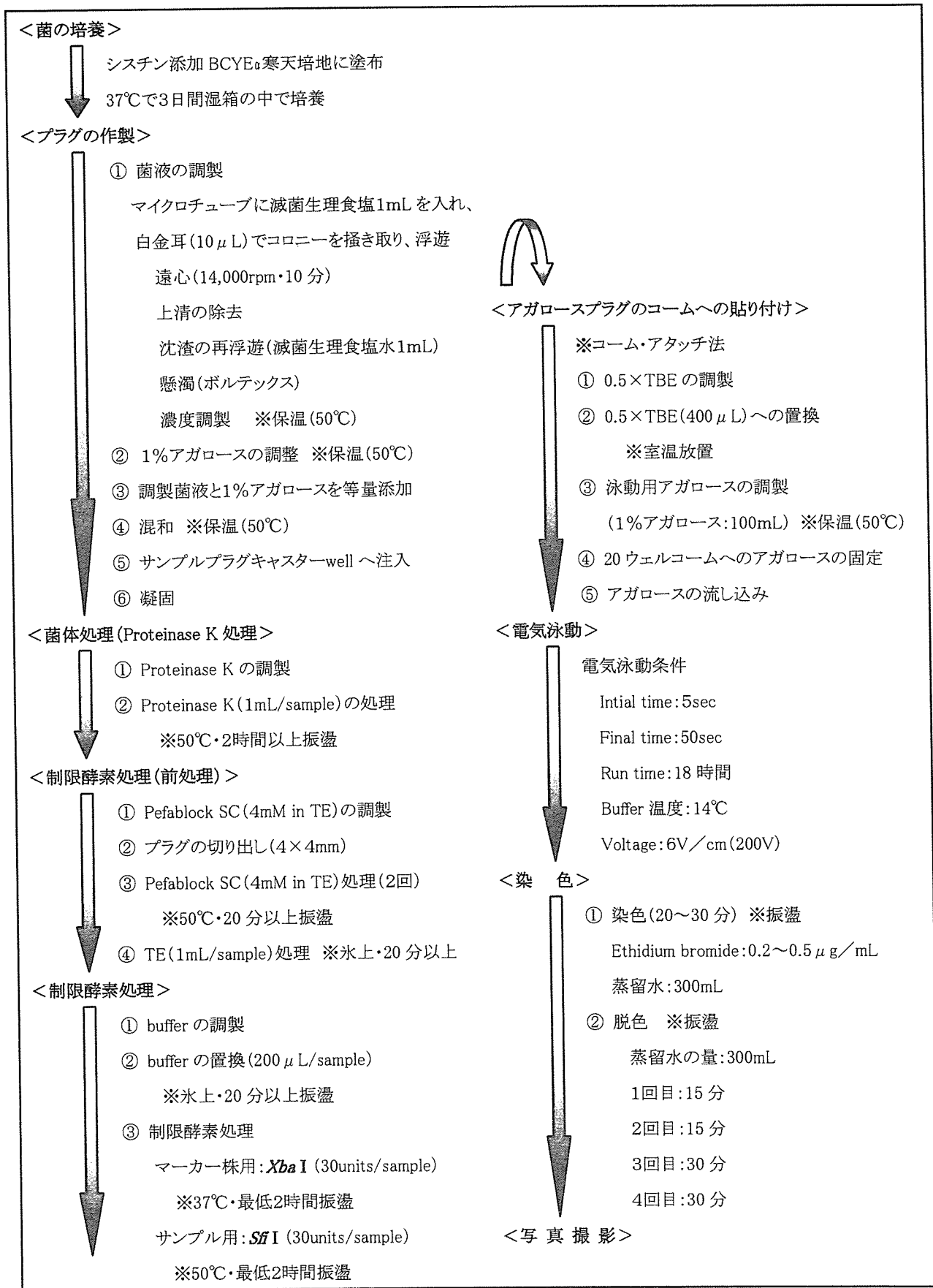
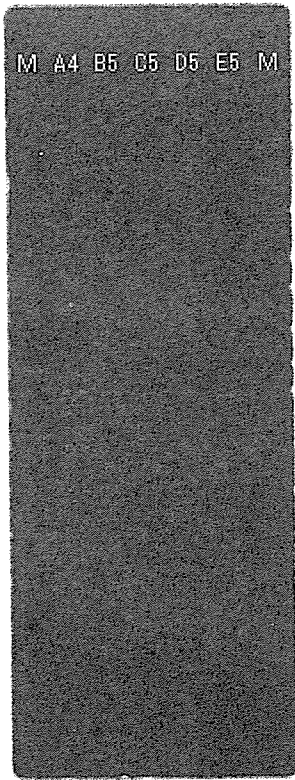


図1 レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法

表1 レジオネラ属菌の検出結果

検体 番号	検 体 名	レジオネラ属菌の検出結果		
		定 性 試 験	定 量 試 験	血 清 型
1	源 泉 水		<10 CFU/100mL	
2	貯 湯 タ ン ク		<10 CFU/100mL	
3	内湯 浴 槽 水		<10 CFU/100mL	
4	露天風呂 浴槽水		10 CFU/100mL	<i>L.pneumophila</i> 1群
5	内湯 循環水吸込口	検 出 し な か っ た		
6	内湯 循環水吐出口	検 出 し な か っ た		
7	内湯 レベル管 または連絡管	検 出 し な か っ た		
8	内湯 板 天 井	検 出 し な か っ た		
9	露天風呂 吸込口	検 出 し た		<i>L.pneumophila</i> 1群
10	露天風呂 吐出口	検 出 し た		<i>L.pneumophila</i> 1群
11	ヘアーキャッチャー	検 出 し た		<i>L.pneumophila</i> 型別不能



A4: 露天風呂 浴槽水

B5: 露天風呂 吸込口

C5: 露天風呂 吐出口

D5: 露天風呂 吐出口

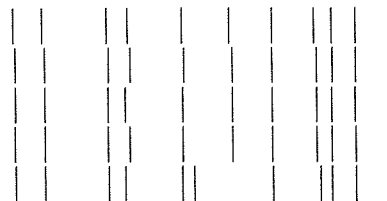
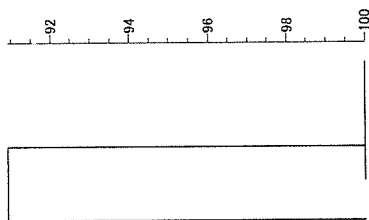
E5: 患者由来株

M: *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain
(標準株)

図2 *L.pneumophila* 分離株の PFGE パターン (*Sfi* I)

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
レジオネラ

レジオネラ



A4
C5
D5
E5
B5

図3 *L.pneumophila* 分離株のデンドログラム