

表7 感染研パターンと繰り返し回数

感染研Pt	株数	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
292	3	48	6	5	7	3	7	4	6	6	6
292	2	48	5	5	7	3	7	4	6	6	6
292	1	48	6	5	7	3	7	4	6	5	6
292	1	48	5	5	7	3	7	4	6	6	6
b107	2	43	5	5	7	3	7	4	6	6	6
b107	1	43	6	5	7	3	7	4	0	5	6
b107	1	43	6	5	7	3	7	4	6	6	6
a259	1	25	10	9	12	8	0	17	0	4	12
a259	1	26	4	9	12	8	12	4	4	5	6
a259	1	26	7	9	11	4	6	4	4	5	19
a259	1	43	4	9	12	8	0	4	0	5	6
a259	1	43	4	9	12	8	7	4	4	5	6
a27	1	23	5	10	8	8	9	12	0	0	28
a27	1	23	0	10	8	8	8	12	0	0	28
a27	1	23	4	12	8	8	3	4	6	0	7
a70	1	30	5	8	3	5	3	2	4	5	8
a70	1	30	5	8	3	5	3	2	4	5	8
a590	1	16	3	9	8	6	7	3	6	4	7
a590	1	16	4	9	8	6	7	3	0	4	7
b216	1	20	4	10	9	6	7	3	7	4	7
b216	1	20	5	10	9	6	7	3	7	4	7
b452	1	25	5	7	13	31	4	4	6	5	7
b452	1	25	4	0	13	6	8	4	6	5	7
変異株 *	—	1	8	2	1	2	6	2	4	3	3

* : 同一感染研 Pt内で、繰り返し回数が異なる一部の株の数

感染研 Pt“a259”の Vh1 において、繰り返し回数 26 回と 43 回の 2 つは、eq-TR とみなした。

感染研 Pt“292”の Vh2 において、繰り返し回数 5 回と 6 回の 2 つは、cl-TR とみなした。

感染研 Pt“a590”, “b216”, “b452”において、異なる繰り返し回数の 2 株は、変異株数 1 とした。

表 8 感染研パターンとプライマーの組合せ

感染研Pt	一致度		一致する組合せ eq-TR	分類度 (種類)	細分する組合せ cI-TR						
	菌株	種類	Vh1-Vh4-TR4		Vh2	-	TR3	-	K11	-	K37
292	7/7	4/4	48-7-4	3/4	$\begin{pmatrix} 5 \\ 6 \end{pmatrix}$	-	7	-	$\begin{pmatrix} 5 \\ 6 \end{pmatrix}$	-	6
b107	4/4	3/3	43-7-4	3/3	$\begin{pmatrix} 5 \\ 6 \end{pmatrix}$	-	7	-	$\begin{pmatrix} 5 \\ 6 \end{pmatrix}$	-	6
a259	4/5	3/5	26-12-4 43-12-4	5/5	$\begin{pmatrix} 4 \\ 7 \\ 10 \end{pmatrix}$	-	$\begin{pmatrix} 0 \\ 6 \\ 7 \\ 12 \end{pmatrix}$	-	$\begin{pmatrix} 4 \\ 5 \end{pmatrix}$	-	$\begin{pmatrix} 6 \\ 12 \\ 19 \end{pmatrix}$
a27	2/3	2/3	23-8-12	3/3	$\begin{pmatrix} 0 \\ 4 \\ 5 \end{pmatrix}$	-	$\begin{pmatrix} 3 \\ 8 \\ 9 \end{pmatrix}$	-	0	-	$\begin{pmatrix} 7 \\ 28 \end{pmatrix}$
a70	2/2	2/2	30-3-2	1/2	5	-	3	-	5	-	8
a590	2/2	2/2	16-8-3	2/2	$\begin{pmatrix} 0 \\ 3 \end{pmatrix}$	-	7	-	4	-	7
b216	2/2	2/2	20-9-3	2/2	$\begin{pmatrix} 4 \\ 5 \end{pmatrix}$	-	7	-	4	-	7
b452	2/2	2/2	25-13-4	2/2	$\begin{pmatrix} 4 \\ 5 \end{pmatrix}$	-	$\begin{pmatrix} 4 \\ 8 \end{pmatrix}$	-	5	-	7
b106		1	43-7-4	1	5	-	7	-	6	-	6
b129		1	34-8-4	1	2	-	9	-	6	-	6
703		1	14-11-5	1	6	-	4	-	0	-	3
708		1	45-7-4	1	5	-	7	-	6	-	6
261		1	37-7-14	1	10	-	6	-	3	-	30
382		1	48-0-3	1	3	-	3	-	10	-	11
589		1	19-11-3	1	6	-	7	-	0	-	8
664		1	28-3-3	1	5	-	7	-	5	-	7
709		1	0-7-4	1	6	-	7	-	0	-	6
933		1	15-0-11	1	0	-	5	-	0	-	29
934		1	30-8-4	1	6	-	7	-	5	-	7
a63		1	46-7-4	1	6	-	9	-	0	-	6
a77		1	0-0-10	1	4	-	5	-	24	-	31
b45		1	0-0-4	1	5	-	8	-	5	-	7
b52		1	0-9-4	1	5	-	3	-	7	-	4
b56		1	28-7-5	1	5	-	7	-	6	-	7

種類：母数は、全ての Pr-P の組合せによるパターン数

表9 感染研パターンと繰り返し回数 (平成17)

感染研Pt	株数	Vh1	Vh2	Vh3	Vh4	Vh7	TR3	TR4	TR7	K11	K37
ND,2a,ND	26	48	5	6	7	3	7	4	6	6	6
ND,2a,ND	1	48	5	6	7	3	7	4	6	5	6
2a,2a,1	12	41	5	6	7	3	7	4	6	6	6
2a,2a,1	1	41	2	6	7	3	7	4	6	6	6
2a,ND,1	9	49	5	6	7	3	7	4	6	6	7
2a,ND,1	1	49	5	5	7	3	7	4	6	6	7
2a,ND,1	8	45	5	5	8	3	8	4	6	6	7
2a,ND,1	1	45	5	4	8	3	8	4	6	6	7
2a,ND,1	1	46	5	5	8	3	8	4	6	6	7
2d,2b,ND	9	24	4	6	12	6	7	4	6	7	8
2d,2b,ND	1	25	4	6	12	6	7	4	6	7	8
2c,ND,1	4	39	4	6	9	5	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	39	4	6	9	7	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	40	4	6	9	5	7	4	7	5	7
2c,ND,1	1	37	4	6	9	5	7	4	7	5	7
3k,ND,3	3	0	1	0	0	15	6	2	9	14	4

Vh : V h e c

表10 感染研パターンとプライマーの組合せ (平成17)

感染研Pt	一致度		一致する組合せ eq-TR	分類度 (種類)	細分する組合せ cl-TR
	株数	種類	Vh1 - Vh4 - TR4		Vh2 - TR3 - K11 - K37
ND,2a,ND	27/27	2/2	48 - 7 - 4	2/2	5 - 7 - (5, 6) - 6
2a,2a,1	13/13	2/2	41 - 7 - 4	2/2	(2, 5) - 7 - 6 - 6
2a,ND,1	19/20	4/5	45 - 8 - 4	2/5	5 - (7, 8) - 6 - 7
			49 - 7 - 4		
2d,2b,ND	9/10	2/2	24 - 12 - 4	1/2	4 - 7 - 7 - 8
2c,ND,1	5/7	2/4	39 - 9 - 4	1/4	4 - 7 - 5 - 7
3k,ND,3	3/3	1/1	0 - 0 - 2	1/1	1 - 6 - 14 - 4

種類：母数は、全てのPr-Pの組合せによるパターン数

表 11 事例と感染研パターン、繰り返し回数の組み合わせ

No	VT型	事例	感染研Pt	Vh1-Vh4-TR4	Vh2-TR3-K11-K37	Vh3	Vh7	TR7
5	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	6- 7- 6- 6	5	3	6
6	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	6- 7- 5- 6	5	3	0
7	1+2	25-A	b107	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
8	1+2	25-B	b107	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
9	1+2	25-B	b106	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	5	3	6
12	1+2	25-C	b129	34- 8- 4	2- 9- 6- 6	5	22	6
11	1+2	26-子	a259	25-12-17	10- 0- 4-12	9	8	0
10	1+2	26-母	a259	43-12- 4	4- 0- 5- 6	9	8	0
20	1+2	27-A	a259	43-12- 4	4- 7- 5- 6	9	8	4
13	1+2	27-B兄	a259	26-11- 4	7- 6- 5-19	9	4	4
14	1+2	27-B弟	a259	26-12- 4	4-12- 5- 6	9	8	4
57	1+2	19	a27	23- 8-12	5- 9- 0-28	10	8	0
58	1+2	20-兄	a27	23- 8-12	0- 8- 0-28	10	8	0
59	1+2	20-弟	a27	23- 8- 4	4- 3- 0- 7	12	8	6
54	2	16-子	a70	30- 3- 2	5- 3- 5- 8	8	5	4
53	2	16-父	a70	30- 3- 2	5- 3- 5- 8	8	5	4
61	1+2	21-姉	a590	16- 8- 3	3- 7- 4- 7	9	6	6
60	1+2	21-弟	a590	16- 8- 3	4- 7- 4- 7	9	6	0
18	1+2	30-子	b216	20- 9- 3	4- 7- 4- 7	10	6	7
17	1+2	30-母	b216	20- 9- 3	5- 7- 4- 7	10	6	7
32	1+2	5-姉	703	14-11- 5	6- 4- 0- 3	8	1	10
33	1+2	5-妹	708	43- 7- 4	5- 7- 6- 6	13	6	6

V h : V h e c

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)

分担研究報告書

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み

— IS-printing System に関する基礎的研究 —

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者

瓜生 佳世	福岡市保健環境研究所	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	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
植木 信介	長崎市保健環境試験所	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
杉谷和加奈	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
河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所	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	小野塚大介	福岡県保健環境研究所

大岡 唯祐¹、林 哲也^{1,2} 宮崎大学・¹医学部、²フロンティア

楠本 正博 東洋紡績・バイオフィロンティアプロジェクト推進室

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 18 年度は 1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) 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 *Legionella pneumophila* serogroup 1 の PFGE による比較解析、3) *Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討の 3 課題について実施した。本稿では 1) について以下報告する。

平成 18 年 9 月 30 日、九州ブロックにおける「IS-printing System に関する研修会」を行ない、IS-printing System の原理および技術について習得した。また、当年度は IS printing system の実用化するため、DNA 抽出条件、DNA ポリメラーゼ量や PCR 条件等について、最適条件検討を行った。その結果に基づき、分離菌株についてその有用性を検討した。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動された DNA パターンを比較するには、「安定した PFGE マーカーの泳動、良好な PFGE および良好な画像の保存」などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに 3 日以上を要し、やや迅速性に欠ける。これらの理由から PFGE 実施前にスクリーニングとして使用可能な細菌

学的疫学情報が望まれている。宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株のゲノム構造多型を有効に利用し、デジタル化可能な検査結果を得ることの出来る菌株識別システムの開発が行われ、一部実用化された。

そこで、平成 18 年度における九州ブロックの取り組みは、「O157 感染症における細菌学的情報の迅速還元」を達成するため、IS-printing System に関する基礎的研究を行った。

B. 研究方法

研修会を行ったのち、IS-printing System に用いる一連の行程を各施設で検証した。次に標準菌株3種を用い、IS-printing System によるPCRの再現性の確認を行った。各施設での分離株を用い、IS-printing System の有用性について検討した。また、検討に使用したPCR機器、泳動槽および画像取り込み装置は、表1のとおりであった。

1. 各施設での至適 PCR 条件の検討

PCR 条件の検討のため、全バンドが検出できる1st set および2nd set 用 template mix を用いて、DNA ポリメラーゼ量および PCR サイクル数について、計12条件について検討した(表2)。

2. 標準株を用いた DNA 濃度等の検討

標準菌株は、1st set および2nd set のプライマー作製に用いられた菌株の一部である Sakai、#7 および#8 の3株を用いた。-80℃で保存した標準菌株をLB寒天培地に直接塗抹し、一夜培養した直径約1mmおよび2mmのフレッシュなコロニーを準備した。50 μ lの25mM NaOH 水溶液に菌を懸濁後、95℃で5分間加熱し、4 μ lの1M Tris-HCl水溶液(pH 7.0)を加えて中和した。処理液を12,000 rpm、5分間遠心し、その上清1 μ lをPCR templateとした。また、再度あわせてDNA ポリメラーゼ量についても検討した。検討条件は、計12とおりであり要約を表3に示した。

3. IS-printing System の有用性について検討

各地研で保有されていた計230株を用い、IS-printing System の有用性について検討した。PCR 条件は、本研究での結果を基に設定した。解析には、解析ソフト Stata を用いた。また、近似度の計算は Matching 法、クラスター解析は Ward 法で実施した。

C. 研究結果

1. PCR 条件の検討結果

- (1) IS-printing System キットの取扱説明書と同条件の KOD Dash 量(0.5 μ l)およびサイクル数(20 サイクル)において、template DNA 量が 10^6 copies の場合に増幅バンドが Standard DNA (スタンダードマーカー)と同等となった(図1、2)。
- (2) 1)の条件において増幅効率が悪い場合でも KOD Dash 量を2倍(50 μ lのPCRあたり1.0 μ l)にすると、やや増幅が良くなりバンドが明瞭になる(図1、2)。
- (3) 20 サイクルより25 サイクルの方が、明らかに増幅が良くなり、この場合、同程度の増幅に必要な template DNA 量が1/10以下になると考えられた。しかし、スメアー状のバンドが目立ち、分離が悪くなる場合が多い(図2、3)。
- (4) 電気泳動は、機種により大きく泳動時間が異なるため、少なくともスタンダードマーカーの各バンドが明瞭に分離されるように、事前に泳動時間を設定しなければならない。
- (5) 泳動用のゲルは、PFGE 同様にゲルにより、泳動の良否が左右され、バンド認識に大きく影響した。今回の検討結果から、ゲルの作製および泳動方法について、図3のように統一した。

2. 標準株を用いた DNA 濃度等の検討結果

- (1) 直径1mm および2mm のコロニーから作製した template DNA 量の違いとエキストラバンドの出現との関連性は大きくなかった(図4)。
- (2) DNA ポリメラーゼは、50 μ lのPCR反応溶液あたり0.5 μ lの方が、1.0 μ lよりエキストラバンドの生成が少なかった(図5)。
- (3) エキストラバンドが生成され易い菌株がある可能性が示唆された(図6)。

3. IS-printing System の有用性について

各地研において、野外株を用いて IS-printing System での解析を試行した。そこで、判定および IS-printing System 上の問題点とその有用性についての評価に分けて述べる。

[判定および IS-printing System 上の問題点]

(1) 1st primer set に関して

- 1) 1kb 付近の 3 本のバンドの判定が困難である。
- 2) *eae* 遺伝子(495bp)のバンドの検出感度が他と比べて低い。
- 3) 220bp 付近(211bp と 241bp の間)にエキストラバンドが検出されやすい。

(2) 2nd primer set に関して

- 1) 480bp 付近(449bp と 499bp の間)及び 230bp 付近(211bp と 240bp の間)にエキストラバンドが非常に高頻度に検出される。
- 2) 1kb 付近の上にエキストラバンドが出やすい傾向がある。
- 3) VT 1、2 については、各地研からの情報と同じであり、PCR コントロールとして十分に機能している。

(3) 電気泳動に関して

- 1) 1kb 付近のバンドはスタンダードマーカーと比べ、移動度が異なる(少し下に検出される)ことが多い。
- 2) 100bp ladder と IS サンプル(スタンダードマーカーも含めて)との移動度が異なる場合が多かった。

(4) 判定に関して

- 1) バンドが全体的に薄いあるいは濃い場合があり、判定基準を一定にすることが難しい。
- 2) 判定にばらつきがあるバンドに集積性があった(1st: 974、905、839、405 bp、2nd: 987、861、801、499 bp など)。

[IS-printing System の有用性]

解析方法は、疫学的関連性の詳細が判明している野外株群を用い [近似度計算: Dice 法、クラスター解析: UPGMA 法] と [近似度計算: Matching 法、クラスター解析: Ward 法] について、比較検討した。その結果、後者の方法が実情を反映した結果と考えられたので、後者の解析方法を採用した。

(1) 12 地研全体の解析

1st primer set *eae* 遺伝子(495bp)の検出にばらつきが見られた結果を除いた 178 株について解析した。解析の結果、115 パターンの PFGE Type の株が、IS Type では 66 パターンに分類され、同一パターンを示す IS Type は A から Cc の 29 種類のパターンがあった。解析の結果、大きく VT1+2 と VT2 のクラスターに分類された(図 7)。VT1+2 のクラスター 105 株には VT2 が 9 株と VT1 が 1 株含まれ、VT2 のクラスター 78 株には 4 株の VT1+2 株が含まれていた。IS Type と感染研で実施された PFGE Type について、図 8 に関連性を示した。PFGE Type と IS Type が完全に一致するパターンは 7 パターンで他 22 種類は複数の PFGE Type が含まれていた。しかし、同一の PFGE Type はいずれかの IS Type に含まれ、IS Type が同じであれば同じ PFGE Type であった。

(2) 疫学情報が判明している株についての解析

46 株は、VT1+2 と VT2 株の大きなクラスターに分類された(図 9)。10 株の VT2 グループには VT1 が 1 株、36 株の VT1+2 グループには 3 株の VT2 株が含まれていた。一方、疫学情報から関連性が判明している 11 グループのうち、7 グループは PFGE Type と IS Type が一致した。PFGE Type では、同一ではないが、IS Type が同一である 4 グループは、同一家族であった。また、PFGE Type および IS Type が異なるが、IS

Type によるクラスター解析において近似度の近いクラスターに分類された 2 グループは、患者とその家族であった。

D. 考察

1st set *eae* 遺伝子(495bp)検出 primer set は、一部の PCR 機器では増幅率が悪く、改良の必要性が認められた。また、1st set の 1kb 付近の 3 種 primer set で増幅された PCR 産物のサイズが近似しているため、分離が十分でなく判定が困難である場合が多く、primer set の再検討が望まれた。2nd primer set で 480bp 付近(449bp と 499bp の間)及び 230bp 付近(211bp と 240bp の間)にエキストラバンドが検出される場合が多いため、判定の際に注意を要することが明らかとなった。一方、1kb 付近のバンドがスタンダードマーカールとずれる点に関しては、判定に関わる問題であるため、マーカールとサンプルの塩濃度を含めた組成を同じにすることが望まれた。また、100bp ladder と IS サンプル(スタンダードマーカールも含めて)との移動度の違いについては、ladder 添付の loading buffer 等の組成の違いなどによると考えられるが、サイズ判定にはスタンダードマーカールを基準として用いるため、ladder は泳動のコントロールとして参考程度に使用の方がよいと思われる。鋳型 DNA 過多により PCR 産物量が多く、増幅バンドの移動度に影響を及ぼしている可能性がある場合には、例えば泳動するサンプル量を減らし、該当するバンドの移動度を再確認するなどの対応が必要になると考えられる。一方、検出バンドが薄い場合、個人によって判定が異なる可能性が高くなることから、偽陰性を防ぐためにも、反応時には standard template DNA を PCR コントロールとして加え、サンプル

との増幅効率を比較するなど、再検の必要性の有無を的確に判定する基準を設ける必要がある。なお、判定に関しては、上述の点を改良し、PCR 増幅・泳動パターン等、一定の条件を満たした上で、「スタンダードマーカールと同じサイズのもの(+)、全体のバンドと比べて明らかに薄いバンド(?)とする」などの判定基準を設ける必要がある。

IS-printing System については改良すべき点はあるが、本法の試行解析では PFGE Type とすべて一致した。また、IS Type は PFGE Type より大きく分類されるため、クラスター解析結果と疫学情報の相関性が良かった。IS-printing System を用いた解析は、PFGE 法と異なり、1 日でデジタルデータが得られ、結果は随時過去のデータとの解析が容易である点で優れ、現場における細菌学的情報提供に適した解析方法であると考えられた。

E. 結論

IS-printing System キットに含まれる primer set については、一部改良の必要性が認められた。また、安定的かつ多機関間でのデータ交換のためには、IS-printing System キット使用に関する手技について、各施設の PCR 機器等に応じた至適条件(PCR サイクル数や DNA ポリメラーゼ濃度、泳動条件など)を検討するフローチャート式の詳しいマニュアルを作成する必要がある。

IS-printing System を用いた解析は、PFGE 解析を実施する前のスクリーニングとして、有望な方法であり、得られた結果は行政的還元しうるものと判断される。

F. 研究発表 なし

表1 IS-printing System に使用した周辺機器

地研番号	PCR機種名		泳動槽		画像取り込み装置	
	メーカー	型式	メーカー	型式	メーカー	型式
1	ABI	GeneAmp 9600	ADVANCE	Mupid-2	Kodak	EDSA 290
2	BIO-RAD	iCycler	Elchom	SEA 2000	BIO-RAD	Gel Doc EQ
3	ASTEC	PC 320	ADVANCE	Mupid	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	ABI	GeneAmp 9700	WARNING	MG 105	フナコシ	フナロイドカメラ
5	BIO-RAD	iCycler	ADVANCE	Mupid	POLAROID	MP-4
6	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	TOYOBO	FAS-III
7	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid- α	Biolmage	Gel Print 2000i
8	ABI	GeneAmp 2700	ADVANCE	Mupid-2 plus	POLAROID	MP-4
9	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	Biolmage	Gel Print 2000i
10	ABI	GeneAmp 9600	ADVANCE	Mupid-Ace	フナコシ+Nikon	TDH-20+coolpix 4500
11	ASTEC	PC800	ADVANCE	Mupid- α	BIO-RAD	Gel Doc 2000
12	ABI	2720 Thermal Cycler	ADVANCE	Mupid	EPSON	GT-8400UF

表2 PCR 条件検討項目

項目	条件
テンプレート量	1st set および2nd set用の template mix を 10^7 、 10^6 および 10^5 copies/ μ l 3濃度
DNAポリメラーゼ量	DNAポリメラーゼ (KOD Dash) をPCR反応液50 μ lあたり0.5および1.0 μ l 2濃度
PCRサイクル数	1st set および2nd setそれぞれについて、PCR反応を20および25 2条件

表3 標準株を用いた DNA 濃度等の検討

項目	条件
菌株	Sakai、#7、#8 3菌種
テンプレート量	コロニー1mmおよび2mm 2濃度
DNAポリメラーゼ量	DNAポリメラーゼ (KOD Dash) をPCR反応液50 μ lあたり0.5および1.0 μ l 2濃度

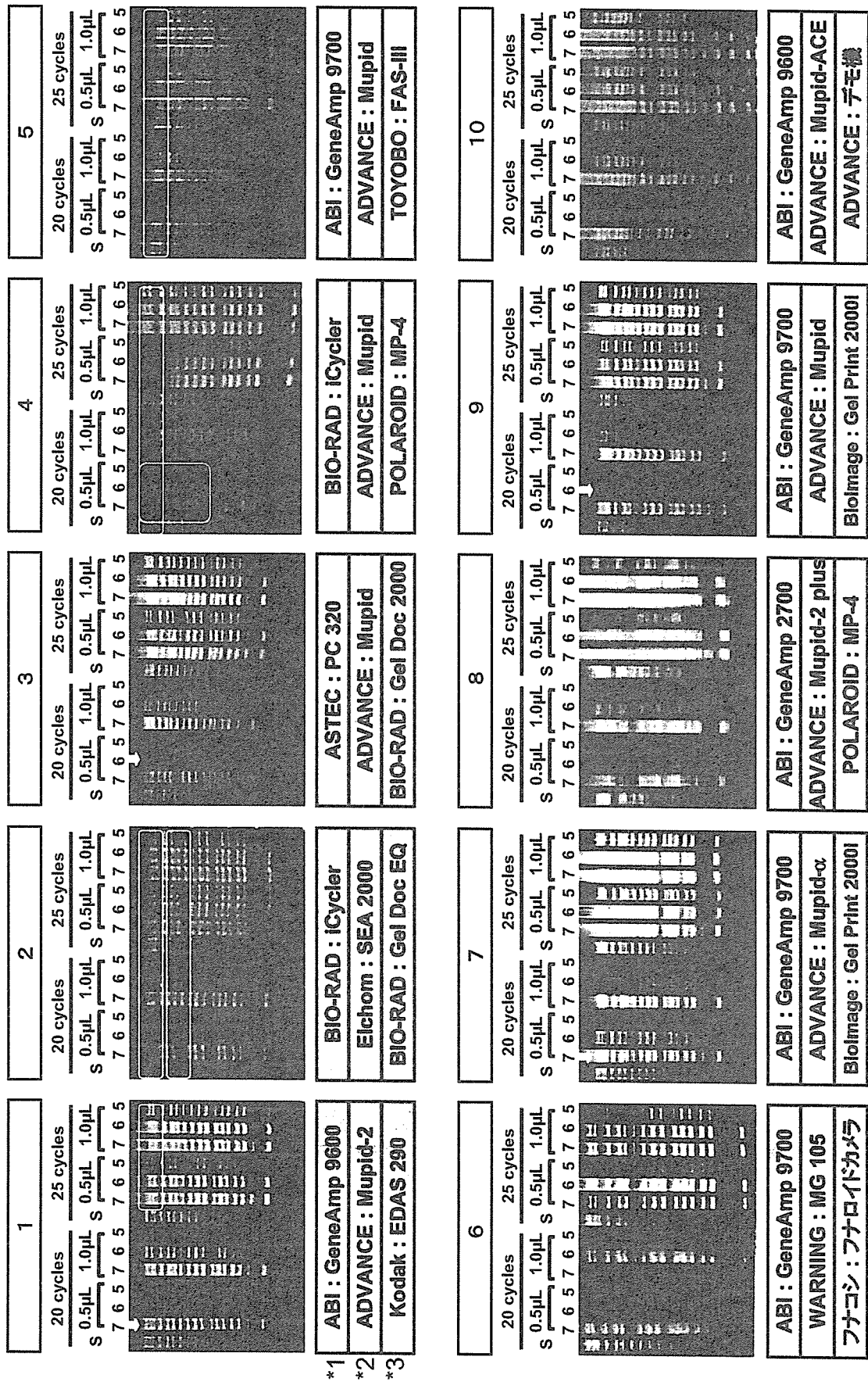
表4 DNAポリメラーゼ量とTemplate DNAの作製

地研番号	KOD Dash量 1反応あたり	Template DNA				
		培地名	コロニー数	培養時間	培養後、使用まで 冷蔵庫等での保存の有無(時間)	DNA保存時間
1	0.5 μ l	普通寒天	大1	20h	無	1週間、-20°C
2	1.0 μ l	HI	大1.5~2	20h	無	
3	0.5 μ l	血液寒天	大1	20h	無	
4	0.5 μ l	BHI	大1	18h	無	
5	0.5 μ l	TSA	大1	20h	無	1週間、-20°C
6	0.5 μ l	普通寒天	2mm	20h	無	検査終了まで
7	0.5 μ l	TSA(Difco)	大1	20h	無	
8	1.0 μ l	LB寒天培地	大1	15h	有(1時間)	
9	0.5 μ l	普通寒天	小2-3	24h	有(24h)	
10	0.5 μ l	普通寒天	大1	20h	無	
11	1 μ l	VT2はクロモアガーO157 VT1+2は普通寒天	大1	20h	無	一部 2日間、4°C
12	0.5 μ l	BHI寒天	大1	18h	無	1週間、4°C

表5 電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

地研番号	泳動時間	TBE Buffer		サイズマーカー		
		メーカー	品番	メーカー	品番	Lording Dye
1	60分	日本ジーン	318-90041	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
2	135分	invitrogen	15581-044	TOYOBO	DNA-130	- -
3	62分	ナカライ	35342-41	TaKaRa	3407A	TaKaRa添付の6×Loading Buffer
4	70分	SIGMA	T4415-1L	Fermentas	# SM0243	TOYOBO RE-DYE
5	70分	bio-rad		invitrogen	10488-058	なし なし
6	60分	BIO-RAD	161-0733	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
7	約50分	TaKaRa	T905	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
8	65分	TaKaRa	T905	TaKaRa	3407A	TaKaRa添付の6×Loading Buffer
9	65分	日本ジーン	318-90041	TaKaRa	3407A	TOYOBO ISキット添付のもの
10	60分	BIO RAD	161-0733	TOYOBO	DNA-030	同左付属品
11	65分	日本ジーン	318-90041	TOYOBO	DNA-130	TOYOBO RE-DYE
12	61-77分	日本ジーン	318-90041	TaKaRa	3407A	TaKaRa添付の6×Loading Buffer

図1 1st set : サイクル条件 (20、25) ・ Template Mix量 (10⁷、10⁶、10⁵ copies / 50 μ l PCR) ・ KOD Dash量 (0.5、1.0 μ l / 50 μ l PCR)



機種名 *1 PCR、*2 泳動槽、*3 画像取り込み装置

図2 2nd set: サイクル条件(20、25)・Template Mix量(10^7 、 10^6 、 10^5 copies / 50 μ l PCR)・KOD Dash量(0.5、1.0 μ l / 50 μ l PCR)

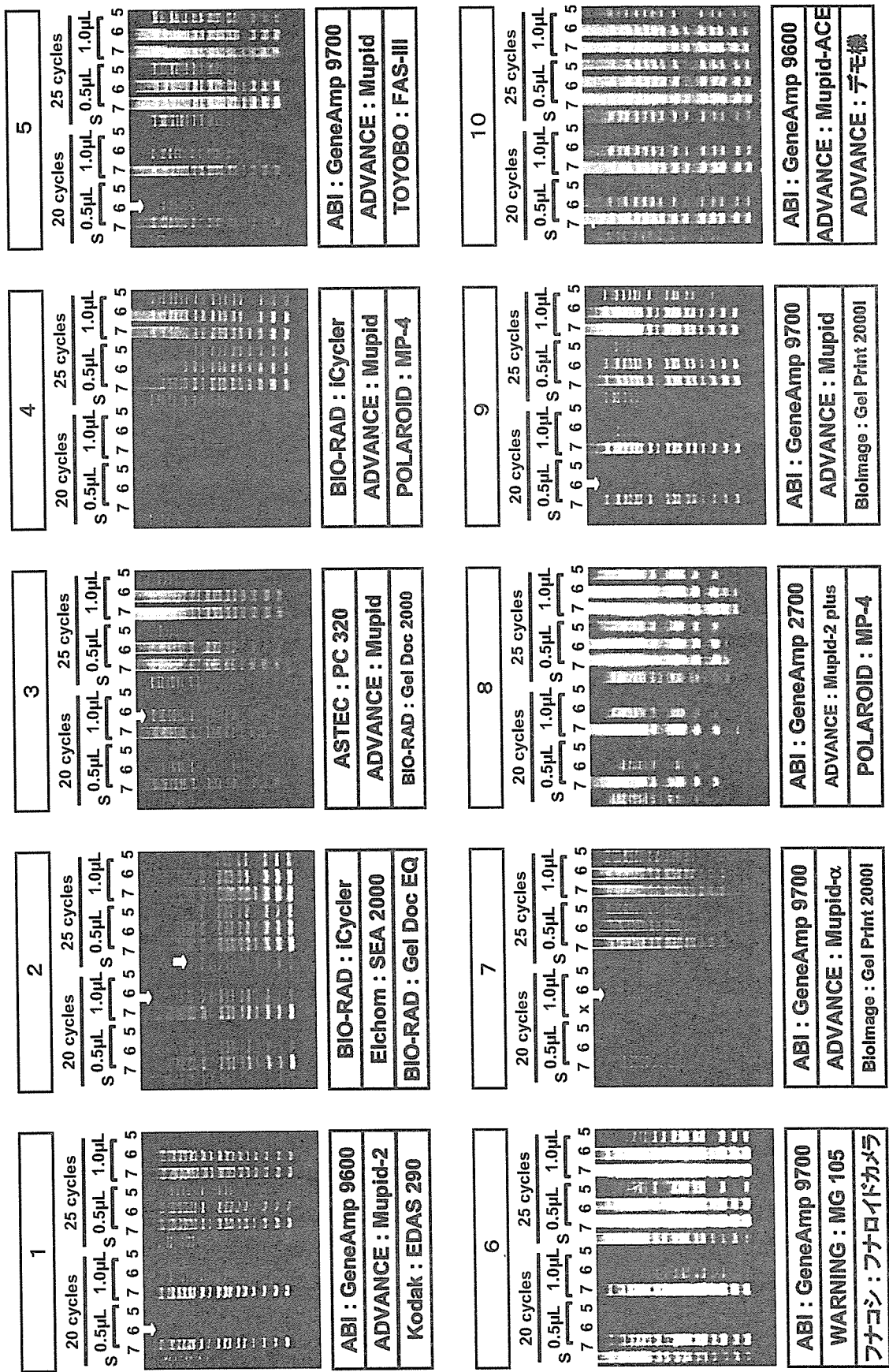


図 3. 3%アガロースゲルの作製

●0.5×TBE

●NuSieveGTG agarose

●SeaKemGTG agarose

100 ml の場合

1. 0.5×TBE を 100 ml, 300 ml コニカルビーカーに測り入れる.
2. NuSieveGTG agarose を 2 g 秤量後, 1 に入れる.
3. SeaKemGTG agarose を 1 g 秤量後, 1 に入れる.
4. ガラス棒で全体を攪拌し, Agarose の固まりがない状態にする.
5. 電子レンジを数回かけて, 溶解する.
6. ゲルメーカーにコームをセットする.
※コームがゲルメーカーに接着している場合は, コーム両端にテープをはるなどして高さを調節する.
※コームのセットは Agarose 溶液を流し込んだ後の方が, 高温の Agarose 溶液によるコームの損傷を防がれる. また, Agarose 溶液をゲルメーカー全体に展開しやすい.
7. ゲルメーカーの中心部に水準器を置き, 水平であることを確認する.
8. ゲルメーカーセットに Agarose 溶液を流し込む.
※通常 Agarose 溶液を 70°C程度に保温してゲルメーカーセットに流し込むが, ゲル濃度が高いので, ほどほどで流し込む.
※Mupid の場合, ゲルメーカー板大で, 約 25 ml
9. 直ちにスパーテルなどで板と台の間の空気や表面の気泡を取り除く.
10. 室温のまま放置し, 固化させる. 充分固化させる.
※固化後, 氷上で冷却してもよい.
11. 0.5×TBE をコーム周囲に注ぎ, 静かにコームを引き抜く.
※使用時にコームを抜く, ゲルを保存する場合はゲルメーカー全体に 0.5×TBE を注ぎ, ラップをして冷蔵庫で保存する.

泳動について

- 泳動槽中央部に水準器を置き, 水平確認をする.
- Loading Dye に粘性があるので, PCR産物を混和する際, ピペッティングを充分して, サンプル溝に注入する.

図4

1st set:

菌株

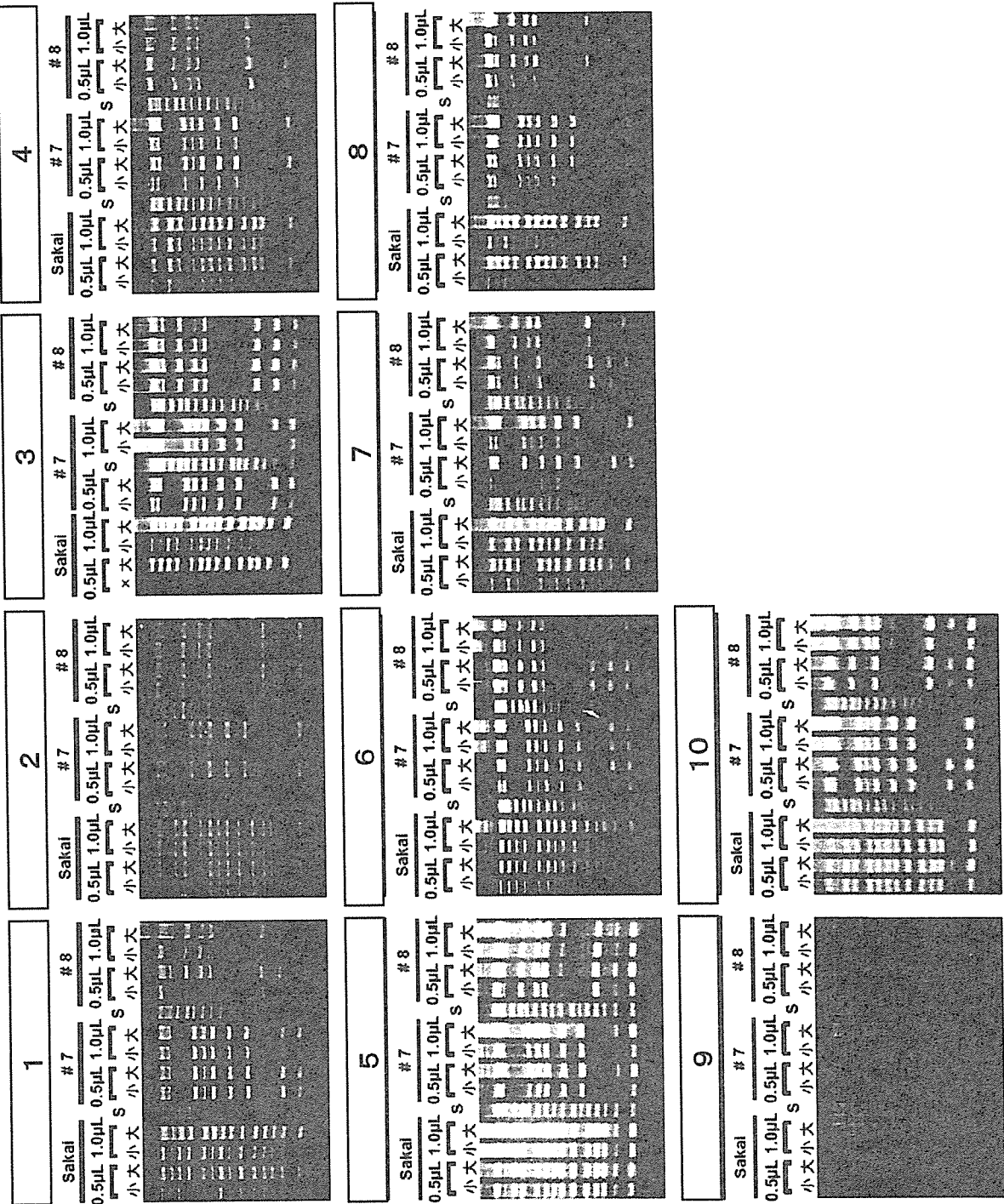
(Sakai or #7 or #8)

KOD DashⅡ

(0.5 or 1.0 μL / 50 μL PCR)

コロニーの大きさ

(小=1mm or 大=2mm)



1st set	primer size (bp)	Sakai	#7	#8
1-01	974			
1-02	905			
1-03	839			
1-04	742			
1-05	645			
1-06	595			
eae	547			
1-07	495			
1-08	442			
1-09	405			
1-10	353			
1-11	325			
1-12	300			
1-13	269			
1-14	241			
1-15	211			
1-16	171			

図5

2nd set :

菌株
(Sakai or #7 or #8)
KOD Dash量
(0.5 or 1.0 μ L / 50 μ l PCR)
コロニーの大きさ
(小=1mm or 大=2mm)

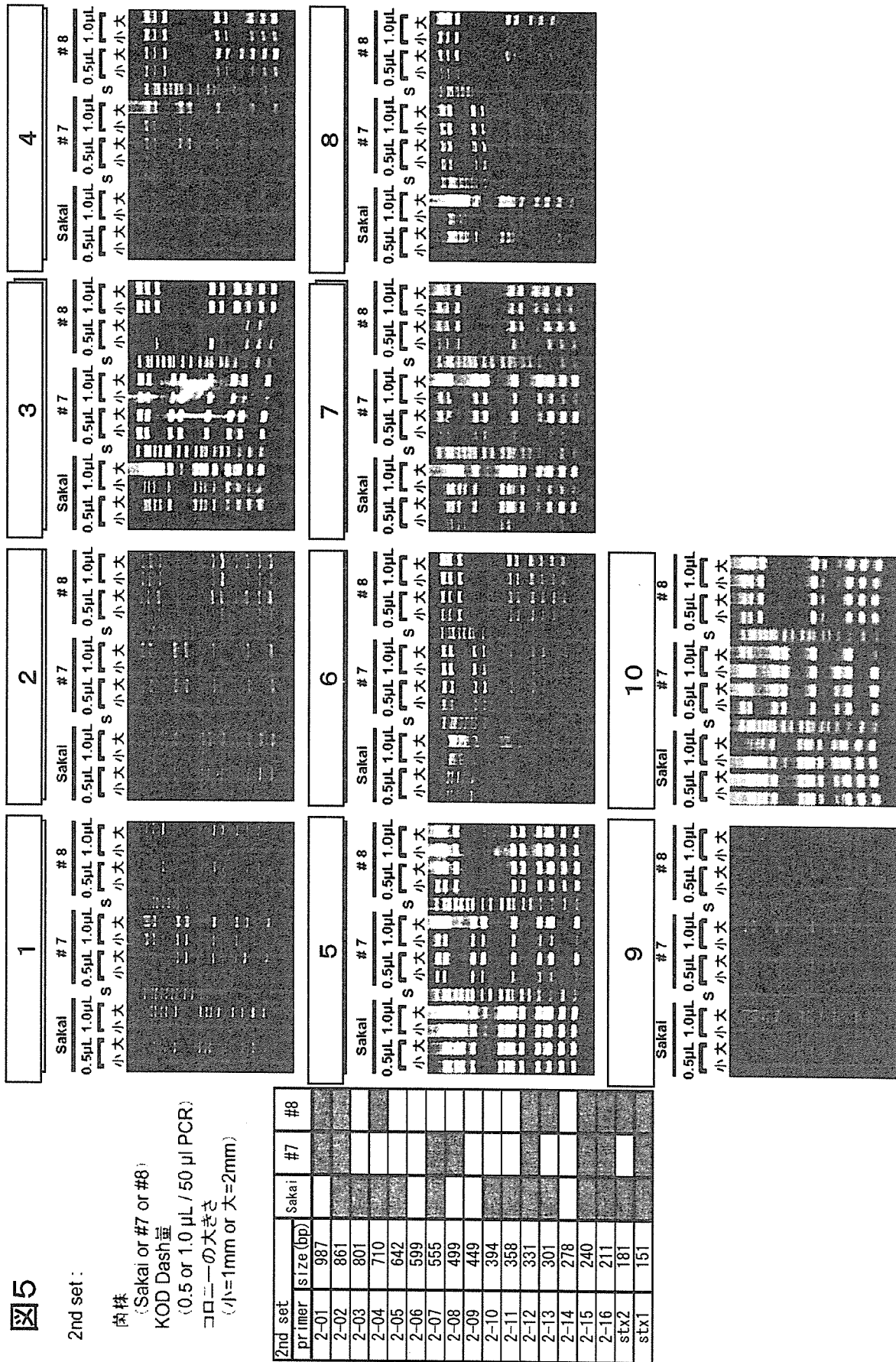
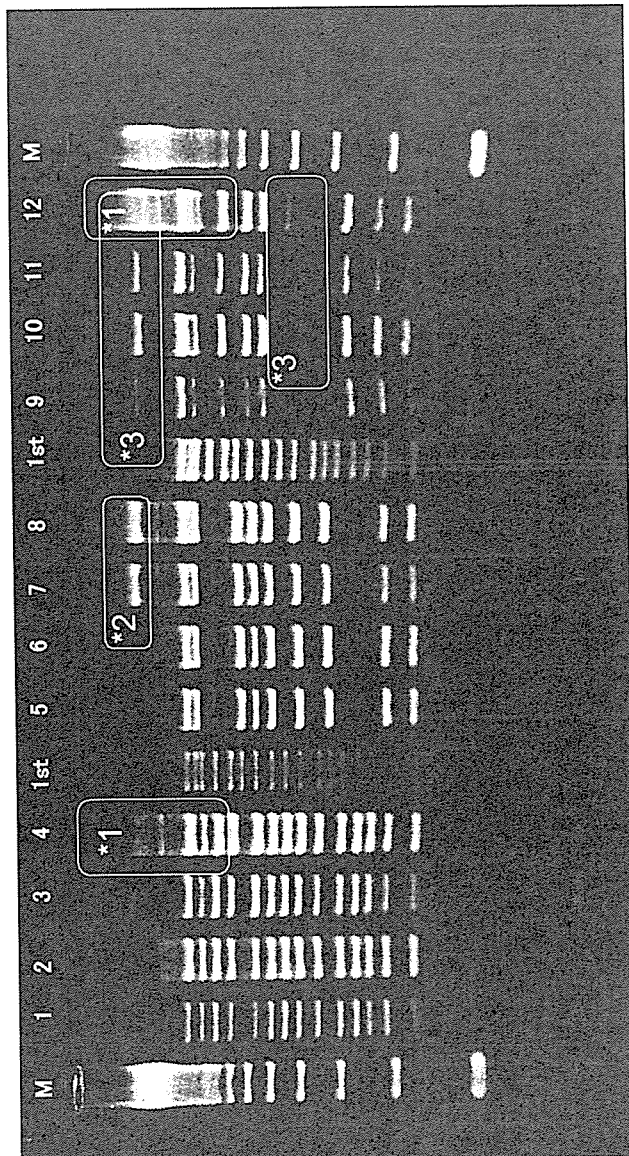


図6



1st set :

- *1 DNAポリメラーゼの量が多いとスミア一状になる傾向がある。
- *2 DNAポリメラーゼの量が多いとエキストラバンドがやすい。
- *3 株によってはエキストラバンドがでる。

菌株	Sakai				#7				#8			
	0.5 µl		1.0 µl		0.5 µl		1.0 µl		0.5 µl		1.0 µl	
DNAポリメラーゼの量												
コーニ-の大きさ	1 mm	2 mm	1 mm	2 mm	1 mm	2 mm	1 mm	2 mm	1 mm	2 mm	1 mm	2 mm
レーン番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

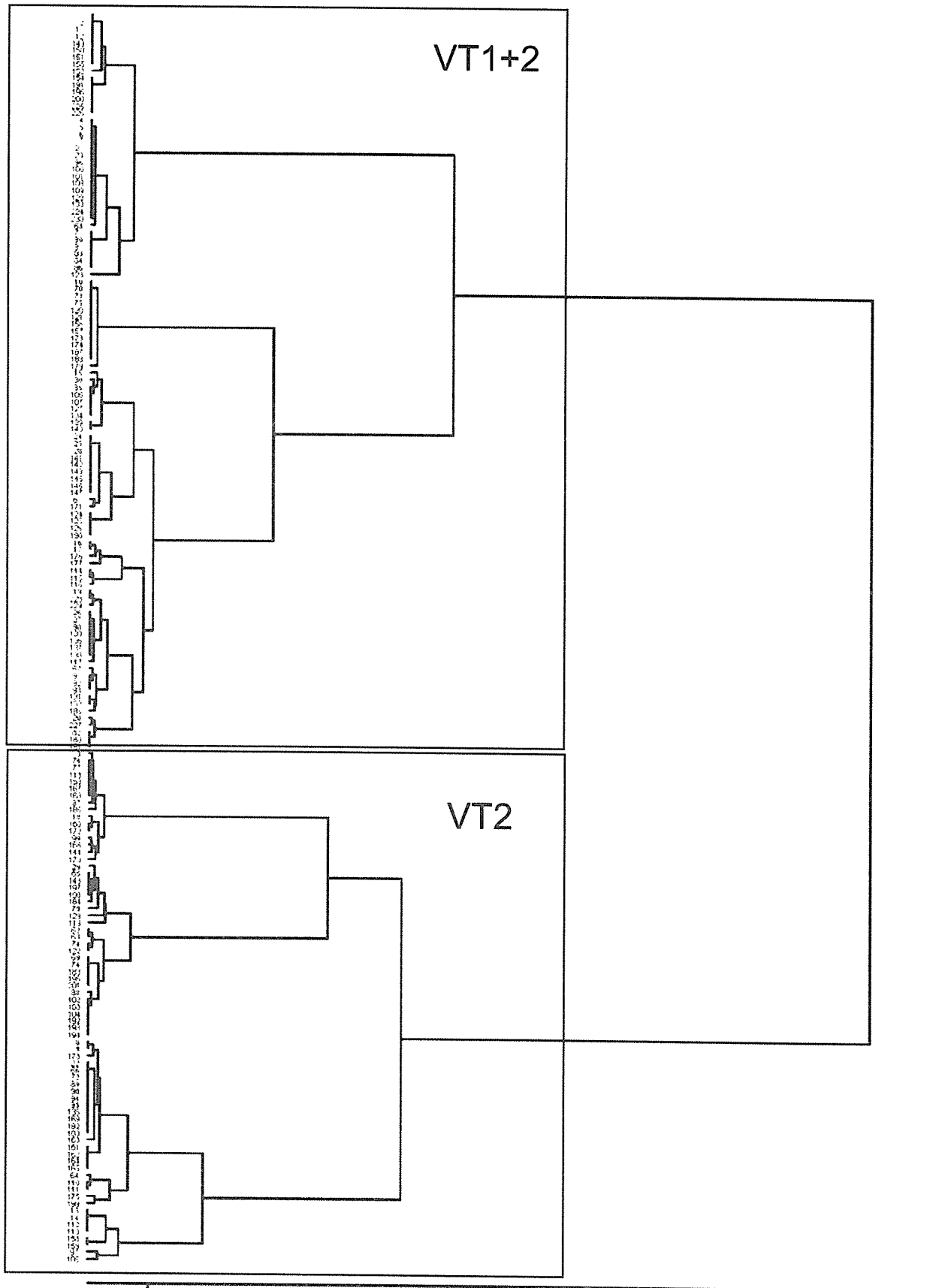


図7 IS-printing Systemによるクラスター解析1

IS Type	IS Type																										other type no.				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z		Aa	Bb	Cc	
b561	2																													2	
b575	2																													2	
a206	4																													4	
b800		2																												2	
b564			2																											2	
b565				2																										2	
b212					2																									2	
a139			4																											4	
b679				2																										2	
b689					2																									2	
a259						10																								10	
b330							2																							2	
b501								2																						2	
b354									2																					2	
b328							8																							8	
b183								4																						4	
b222									2																					2	
b177										2																				2	
b210											2																			2	
b358												4																		4	
b359													2																	2	
b31														2																2	
a119															2															2	
b343																2														2	
a122																	2													2	
b91																		2												2	
b55																			2											2	
b639																					2									2	
b700																														2	
a222																														2	
b695																														2	
b112																														2	
a900																														2	
b228																														2	
b179																														2	
b26																														2	
other	4	5	2	3	1																									2	
total	8	6	15	6	12	5	2	9	4	2	3	2	7	3	2	3	6	2	4	2	2	5	6	2	11	3	2	4	2	140	

b185	b472	b338	b690	b550	b176	b363	a109	b691	b676	b110	820	b346	b712	b571	b664	a899	b646
b341	b366	b693	b360					b687	b656	b656	b198	b344	b572	b337	b645		
b709	b485		b294					b172									
b708	b799							b641									
	b796							a897									
								a896									

図8. IS Type と PFGE Type の関連性

			発症日or 菌検出日	VT	PFGE
06E001	4/10生レバー	N市	H18.4.7	2	b179
06E002	4/6焼肉	NK市	H18.4.20	2	b179
06E032	8/3焼肉、ユッケ	KS市	H18.8.8	2	a222
06E010	5/28焼肉	KR市	H18.5.29	1	b180
06E015		AS市	H18.7.4	2	b198
06E049	9/15焼肉、ユッケ	T郡	H18.9.17	2	b656
06E023		KR市	H18.7.25	2	b349
06E009	保菌者、調理員	KM市	H18.6.25	2	b172
06E058	保菌者、給食従事者検便	KR郡	H18.10.30	2	b641
06E043		N市	H18.9.5	2	b474
06E005	5/14焼肉、5/15馬刺し	KR市	H18.5.17	1+2	b176
06E006	5/14焼肉、5/15馬刺し、06E005の妹	KR市	H18.5.27	1+2	b177
06E007	5/14焼肉、5/15馬刺し、06E005の祖母	KR市	H18.5.25	1+2	b177
06E008	5/13焼肉喫食	I市	H18.5.31	1+2	b175
06E025	06E008の母	I市	H18.6.11	1+2	b363
06E034	06E033の兄	O市	H18.8.21	1+2	b358
06E033	06E034の弟	O市	H18.8.14	1+2	b359
06E035	8/14ホルモン、ユッケ8/15焼肉	Y市	H18.8.15	1+2	b359
06E026	06E027の夫	KR市	H18.8.13	1+2	a119
06E027		KR市	H18.8.4	1+2	a119
06E021		O市	H18.7.21	1+2	b360
06E030	7/30焼き肉	KS郡	H18.7.31	1+2	b294
06E038	8/16焼き肉	N市	H18.8.30	1+2	b354
06E039	06E038の祖父	N市	H18.9	1+2	b354
06E017	7/17ホルモン、7/24入院	N市	H18.7.18	2	b183
06E018	06E017の父	N市	H18.7.28	2	b183
06E020		KS郡	H18.7.29	2	b183
06E040	9/2焼肉	N市	H18.9.4	1+2	b328
06E041	9/2焼肉	N市	H18.9.6	1+2	b328
06E042	9/2焼肉	N市	H18.9.4	1+2	b328
06E045	9/2焼肉	N市	H18.9.21	1+2	b328
06E046	9/2焼肉	N市	H18.9.14	1+2	b328
06E047	9/2焼肉	N市	H18.9.6	1+2	b328
06E016	06E022の夫	KR市	H18.7.30	1+2	b184
06E022		KR市	H18.7.18	1+2	b366
06E029		O市	H18.7.16	1+2	b485
06E059	(孫はHUSで入院)	KM市	H18.10.25	1+2	b185
06E016	06E022の夫	KR市	H18.7.30	1+2	b184
06E022		KR市	H18.7.18	1+2	b366
06E029		O市	H18.7.16	1+2	b485
06E059	(孫はHUSで入院)	KM市	H18.10.25	1+2	b185
06E054	06E056の父、9/12焼肉	K郡	H18.10.22	1+2	a206
06E056	9/12焼肉喫食	K郡	H18.10.16	1+2	a206
06E060		NK市	H18.10.22	1+2	a206
06E055	06E057の母、9/13生ゼンマイ	I市	H18.10.22	1+2	a206
06E057	9/13生ゼンマイ	I市	H18.10.17	1+2	b649

PFGE同し
家族・集団発生
(S同し/無関係)

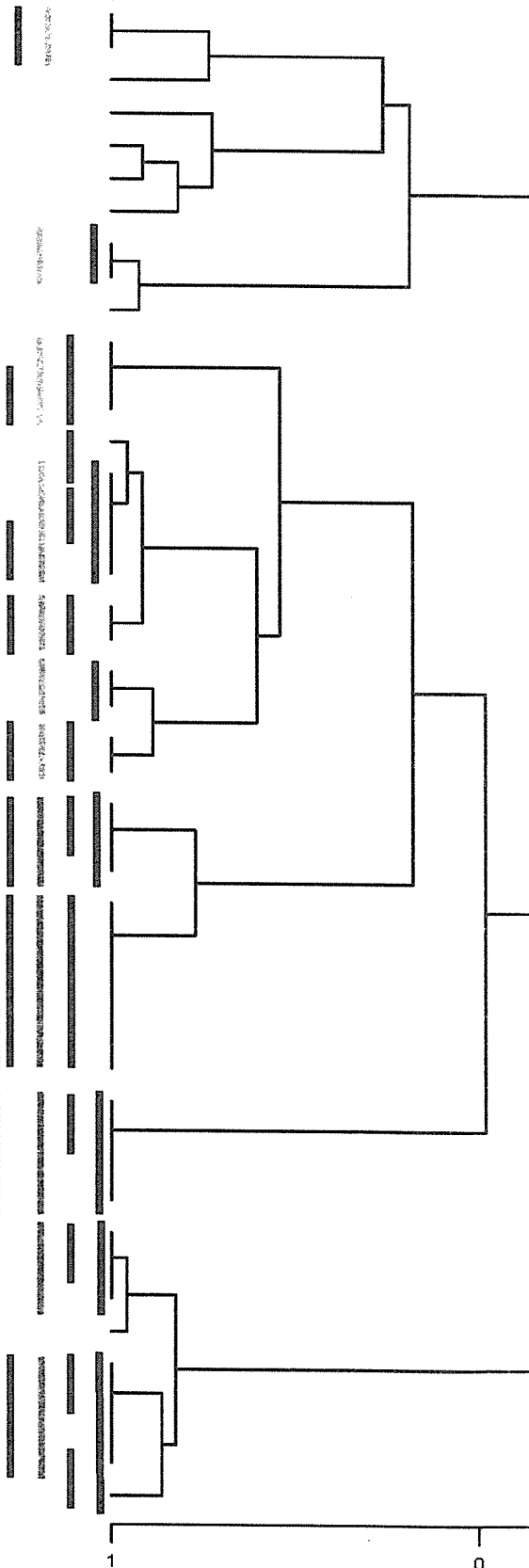


図9 IS-printing Systemによるクラスター解析3

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
Legionella pneumophila serogroup 1 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、江原 裕子	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
	杉谷 和加奈、松岡由美子	熊本市環境総合研究所
	上野 伸広、久保園祥子	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 平成 15,16,17 年度に、標準菌株 3 株を用いて PFGE の精度管理を実施したが、それぞれの菌株で 80%以上の相同性しかなく、この結果は満足できるものではなかった。この原因がサイズマーカーとして λ ラダーを使用していたためと推測されたため、今年度は、サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株を用い、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、平成 18 年のレジオネラ属菌由来別検出状況を参加機関から収集した。参加機関は 10 機関で、全部の調査、又はいずれかの調査に参加した。

その結果、精度管理を実施した標準菌株 3 株の PFGE パターンは、6 機関間で 90%以上の相同性が見られ、 λ ラダーを使った昨年度よりも良い結果が得られた。しかし、40kb 以下のバンドの検出が、ばらついたことにより、100%の相同性が得られなかった。従って、菌量の違いによるバンドの濃淡、画像取り込みの際の解像度の問題など技術的なことを今後も検討していく必要がある。

また、各機関で PFGE を実施した *Legionella pneumophila* serogroup (SG) 1 分離株の総数は 90 株で、比較解析の結果、90%以上の高い相同性を示す株はその由来が同一、又は関連があると推定される株であった。その他の由来の関連のない株では、概ね、85%以下の相同性であり、このことから、制限酵素 *Sfi*I を使用した PFGE パターンは、由来が異なれば多型を示し、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 7 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 12 血清型(その他に血清群不明有り)が検出された。

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。そのため、患者発生が広域に亘る場合も多いレジオネラ症事例において、異なる機関間で連携し PFGE を有効活用するための研究を平成 15-17 年度に行ってきた。その結果を鑑み、PFGE の方法を検討し、今年度も九州地区 10 機関で、レジオネラ標準菌株の精度管理、各機関で分離された *L. pneumophila* SG1 の PFGE 画像相同性比較、及び平成 18 年のレジオネラ属菌の由来別検出状況を調査した。

B. 研究方法

1. 参加機関

標準株を用いた PFGE の精度管理、各機関で分離された *L. pneumophila* SG1 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 機関がそれぞれ可能な調査項目に 6 機関ずつ参加し調査を行った。

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 を実施した菌は、今年度は *L. pneumophila* SG1 のみとし、総菌株数は 90 株であった。