

さらにレジオネラ属菌の由来別検出状況調査は、参加県又は市で分離されたレジオネラ属菌を対象とした。

### 3. PFGE の方法

PFGE の方法は国立感染症研究所のプロトコルを一部変更して実施した(平成 17 年度報告書)。試験にあたって変更した点は 昨年度まで用いていた  $\lambda$  ラダーの使用を取りやめ、*Salmonella* Braenderup H9812 株を用いたことである。その他は昨年と同様、菌は発育 3 日以内の新しい菌を用いること、泳動時間は 19-21 時間を目安としサイズマーカーの最後のバンドが泳動ゲルの末端から、1-1.5cm 前後の所まで泳動するように調整することとした。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、平成 18 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、6 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、各機関の PFGE パターン間で 90%以上の相同性が見られ、そのうち 1 菌株では 100%一致した。

### 2. 分離株の PFGE パターン比較解析

6 機関で分離された *L. pneumophila* SG1 90 株について PFGE を実施し、得られた画像を比較解析した結果を図 2 に示した。100%の相同性を示す菌株が 12 グループあったが、そのうち 8 グループは同じ施設から分離された株であり、他の 4 グループも同じ県の分離株であったことから、由来が同一又は関連がある可能性が考えられた。逆に、同じ施設からの分離株でも、浴槽の違い、貯湯タンクの違いなどで、異なる PFGE パターンを示した(図 2、B10 関連株)。その他の由来の関連のない株は、株間で概ね 85%以下の相同性で、PFGE 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、クラスターが異なる傾向が

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

6 機関から送付された平成 18 年のレジオネラ属菌検出状況調査表を集計し、その結果を表 2~7 に示した。その結果、循環式公衆浴場、掛け流し式公衆浴場、冷却塔水、修景水、及び患者から、九州全体で 7 菌種(その他に菌種不明有り)、そのうち *L. pneumophila* については 12 血清群(その他に血清群不明有り)が検出された。今年度は冷却塔水から最も多くの菌種、*L. pneumophila*、*L. anisa*、*L. erythra*、*L. jamestowiensis*、*L. rubrilucensi*、*L. spiritensis* が検出された。公衆浴場では、主として、*L. pneumophila* が検出されたが、掛け流し式浴場で、2000 年からの調査開始以来、初めて *L. bosemanii* が検出された。また、患者からは、2 機関で、*L. pneumophila* SG1 が検出された。

## D. 考察

これまで 3 年間 PFGE の方法を検討してきたが、その結果、 $\lambda$  ラダーの画像に問題がある場合が多く、従って比較解析に影響を及ぼすことが問題となっていた。そのため、今回、 $\lambda$  ラダーに換え、*Salmonella* Braenderup H9812 株を用いたところ、各機関で、安定したサイズマーカー画像が得られ、精度管理の結果も昨年度より良好な結果を得た。しかし、精度管理で用いた 3 株の PFGE パターンは、各機関間で 3 株とも 100%一致という結果にはならなかった。原因は、主に、40kb 以下のバンドがばらついて検出されたことであつた。これらは判定に迷うような薄いバンドであり、機関によって検出/検出されないというばらつきが見られた。原因として、菌量の違いや画像取り込みの際の解像度の違いによる影響が推測された。

異なる機関間で比較する場合、各機関で常に安定した PFGE 画像を得ることが必要条件であるが、そのためには、最適な前処理条件、泳動条件を確立するほかに、機器のメンテナンスや技術者の訓練の必要性が考えられた。

また、*L. pneumophila* SG1 分離株の PFGE で、同一のパターンを示す株は、同じ施設由来か、同じ県内の施設からの分離株であり、何らかの関連性があるものと考えられた。また、同時期の同一施設由来 *L. pneumophila* SG1(図 2、B10 関連株)が 8 種類の異なった PFGE パターンを示したことから、同一施設の同じ血清型であっても複数の遺伝子型が存在することが示唆された。また、由来の関連のない株は、概ね 85%以下の相同性しかなく PFGE パターンが多型を示したことから、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。

さらに、*L. pneumophila* SG1 分離株は、昨年度も浴槽水由来株と冷却塔水由来株の PFGE パターンが、異なるクラスターに分類される傾向があったが、今回、同様な結果が得られた。

2000～2006 年のレジオネラ属菌検出状況調査で、17 菌種の九州地区での分布が確認されたことは興味深い知見である。

#### E. 結論

PFGE のサイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株を用い、各機関で同一のレ

ジオネラ属菌について PFGE を実施したところ(精度管理)、各機関の PFGE パターンは、概ね 90% 以上の相同性が得られ、昨年度の解析結果より改良された。しかし、各機関で 100% に近い相同性のある PFGE パターンを得るためには、一層の技術的検討や訓練及びそのための相互的な情報交換を要すると考える。

#### F. 研究発表

なし

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	NIIB0138	<i>Legionella pneumophila</i>	SG3	臨床分離株
2	NIIB0233	<i>Legionella pneumophila</i>	SG4	環境分離株
3	NIIB0095	<i>Legionella micdadei</i>		臨床分離株

図 1 PFGE精度管理

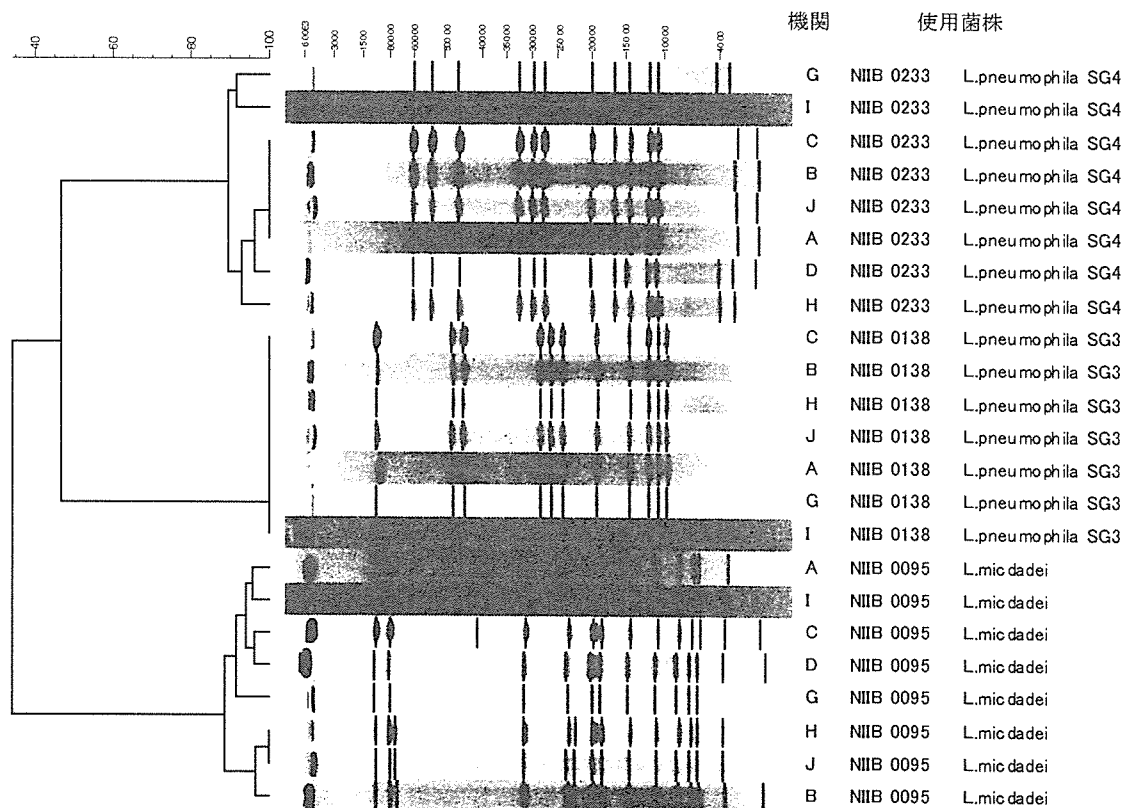


図2 *L. pneumophila* SG1の PFGEパターン

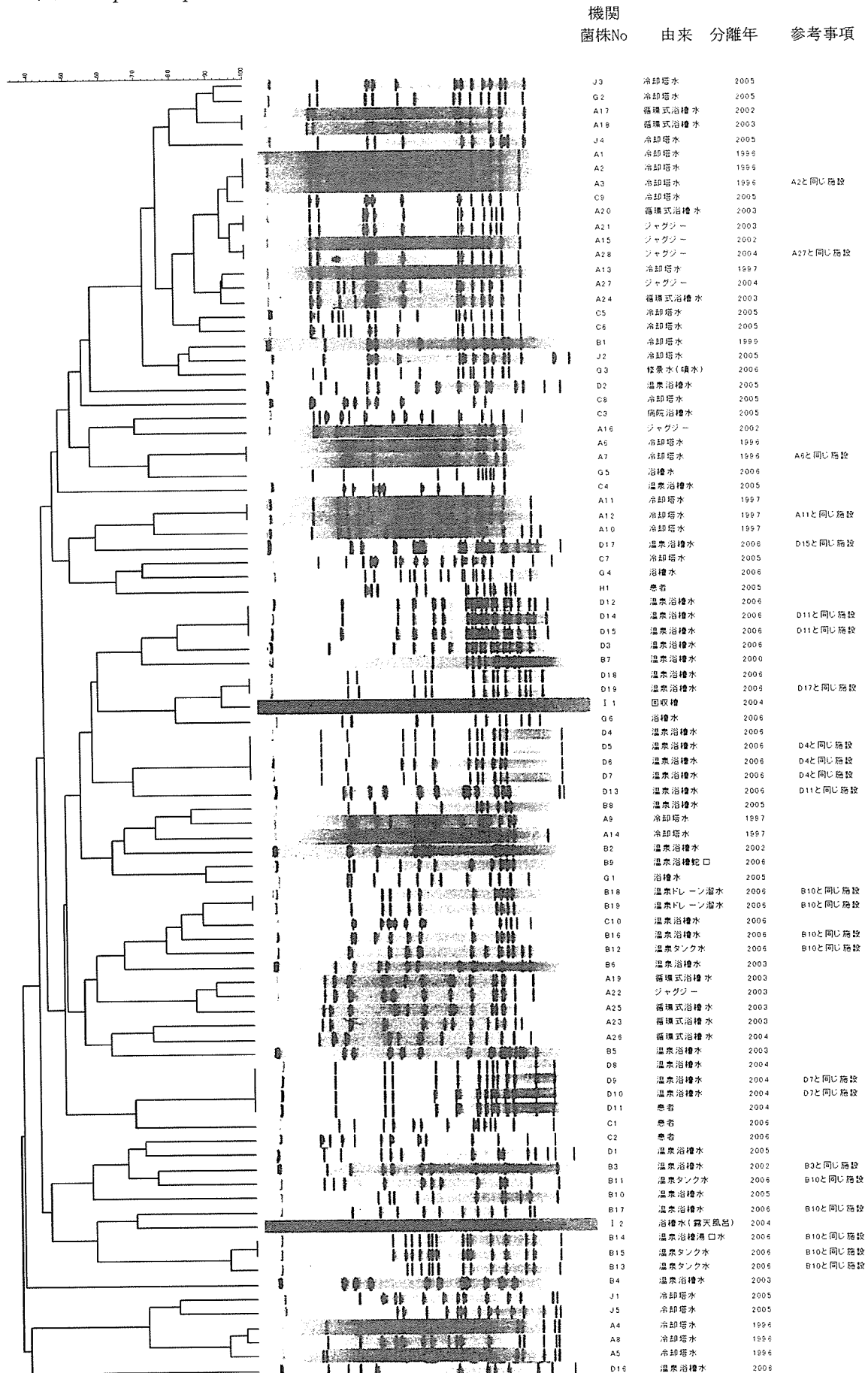


表2 九州地区における材料由来別レジオネラ属菌検出状況(2006年)

菌種・血清群	全体 (6 機関)	循環式 公衆浴 場 (6 機関)	掛け流し 式公衆 浴場 (2 機関)	冷却 塔水 (2 機関)	修景水 (1 機関)	患者 (2 機関)	(参考) 2000-2005 (10 機関)	参考: 患者から分 離報告のあ る菌*
<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> SG11							○	
<i>L. pneumophila</i> SG12								
<i>L. pneumophila</i> SG13	○			○				
<i>L. pneumophila</i> SG14	○			○			○	
<i>L. pneumophila</i> SG15	○		○				○	
<i>L. pneumophila</i> SGUT	○	○	○				○	
<i>L. anisa</i>	○	○		○			○	○
<i>L. bosemanii</i>	○		○					○
<i>L. cherrii</i>							○	
<i>L. dumoffii</i>							○	○
<i>L. erythra</i>	○			○			○	
<i>L. feeleii</i>							○	○
<i>L. gormanii</i>							○	○
<i>L. hackeliae</i>							○	○
<i>L. israelensis</i>							○	
<i>L. jamestowniensis</i>	○			○				
<i>L. londiniensis</i>							○	
<i>L. maceachernii</i>							○	○
<i>L. micdadei</i>							○	○
<i>L. oakridgensis</i>							○	○
<i>L. rubrilucens</i>	○			○			○	
<i>L. spiritensis</i>	○			○			○	
<i>L. spp</i>	○	○	○	○			○	

\*:レジオネラ症防止指針(ビル管理教育センター)に拠った。

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(2006年)

菌種・血清群	全 体 (6 機関)	北九 州市	長崎 市	大分 県	熊本 市	鹿児 島県	宮崎 県	(参考) 2000-2005 (10 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> SG11								○
<i>L. pneumophila</i> SG14								○
<i>L. pneumophila</i> SG15								○
<i>L. pneumophila</i> SGUT	○	○			○			
<i>L. anisa</i>	○	○						
<i>L. cherrii</i>								○
<i>L. dumoffii</i>								○
<i>L. erythra</i>								○
<i>L. gormanii</i>								○
<i>L. israelensis</i>								○
<i>L. londiniensis</i>								○
<i>L. maceachernii</i>								○
<i>L. micdadei</i>								○
<i>L. oakridgensis</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(2006年)

菌種・血清群	全体 (2機関)	大分県	鹿児島県	(参考) 2000-2005 (10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. bosemanii</i>	○	○		
<i>L. dumoffii</i>				○
<i>L. maceachernii</i>				○
<i>L. spp</i>	○	○	○	

表5 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(2006年)

菌種・血清群	全体 (2機関)	北九州市	長崎市	(参考) 2000-2005 (10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> SG13	○	○		
<i>L. pneumophila</i> SG14	○		○	
<i>L. pneumophila</i> SG15				
<i>L. pneumophila</i> SGUT				○
<i>L. bosemanii</i>				○
<i>L. hackeliae</i>				○
<i>L. anisa</i>	○	○		○
<i>L. erythra</i>	○	○		
<i>L. jamestowiensis</i>	○	○		
<i>L. rubrilucens</i>	○	○		
<i>L. spiritensis</i>	○	○		○
<i>L. spp</i>	○	○		

表 6 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 (2006 年)

菌種・血清群	全体 (1 機関)	長崎市	(参考) 2000-2005 (10 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> SG11			
<i>L. pneumophila</i> SG14			
<i>L. pneumophila</i> SG15			
<i>L. pneumophila</i> SGUT			
<i>L. anisa</i>			○
<i>L. erythra</i>			○
<i>L. feeleii</i>			○
<i>L. hackeliae</i>			○
<i>L. micdadei</i>			○
<i>L. rubrilucens</i>			○
<i>L. spp</i>			○

表 7 九州地区における患者からのレジオネラ属菌検出状況 (2006)

菌種・血清群	全体 (2 機関)	北九州市	宮崎県	(参考) 2000-2005 (10 機関)
<i>L. pneumophila</i> SG1	○	○	○	○
<i>L. pneumophila</i> SG5				○



*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討

研究協力者 八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所  
上野 伸広 鹿児島県環境保健センター  
山崎 省吾 長崎県衛生公害研究所  
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的に、平成 17 年度に引き続き、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、制限酵素の選択について九州地区 4 機関で検討を行った。

平成 18 年度は、平成 17 年度に作成したマニュアルを操作の簡略化のため一部改訂した。そのマニュアルに基づき精度管理試験を実施した結果、参加した 3 機関において高い相同性が得られた。また、由来の異なる分離株を用いて、*Campylobacter* の PFGE に広く使用されている制限酵素 *SmaI* に加え、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* を用いて処理後、その泳動パターンを比較した。その結果、*Campylobacter jejuni* の PFGE には、*SmaI* よりも *KpnI* または *SmaI+KpnI* を用いたほうが、バンドパターンの多形性の点で有効であることがわかった。

## A. 研究目的

*Campylobacter* の PFGE は、Ribot らの方法<sup>1)</sup>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使用されている感染研マニュアルを基準として *Campylobacter* PFGE マニュアルを作成した。

平成 17 年度の成績から制限酵素処理以前の過程での plug の処理方法が重要であることが示され、ホルマリン処理の有用性が示された。平成 18 年度は 17 年度版マニュアルを簡略化のため一部改訂し、以下の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

各機関が共通して使用する精度管理標準株として、熊本県(*Campylobacter* 九州地区レファレンスセンター)が保有する 3 株を使用した(表 1)。制

限酵素の検討では、九州各地研で分離された由来の異なる分離株 30 株(一部 *Campylobacter coli* を含む)を用いた。

### 2. 精度管理試験

送付された精度管理標準株 3 株について、新規マニュアルに従い各機関で PFGE(制限酵素 *SmaI*)を実施し、比較した。

### 3. 制限酵素の検討

九州各地研の分離株 30 株を用いて、*SmaI* 処理、*KpnI* 処理及び *SmaI* と *KpnI* による double digestion の 3 通りの制限酵素による泳動像の比較を行った(うち 8 株は *SmaI* 処理のみ実施)。*SmaI* と *KpnI* による double digestion は TaKaRa 社製の制限酵素を各 30 unit/plug 混和して使用し、反応時の buffer は TaKaRa 社の推奨に従い、T buffer+BSA を用いた。

### 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) 画像を福岡県保健環境研究所に電子メールで送信し、受信した画像は、必要に応じて Adobe Photoshop で 8 ビット、グレースケールおよび TIFF ファイル形式に修正し、DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD、日本語版) で解析した。解析は、バンド類似係数から解析する Dice 法で、デンドログラムタイプは平均距離法で行った。またバンド比較のトレランス値は 1.2 で行なった。

### C. 研究結果

#### 1. *Campylobacter* PFGE 新規マニュアルの作成

平成 17 年度の検討を踏まえ、感染研から示された腸管出血性大腸菌のマニュアルを一部変更したマニュアルを新たに作成した (図 1)。平成 17 年度版から改訂した項目は、簡略化のためのホルマリン処理の省略、それに伴う菌へのストレス減のための遠心洗浄操作の省略、の 2 点である。

#### 2. 精度管理結果

本年度新たに作成した新規マニュアルに基づき実施した精度管理標準株 3 株の解析について示す (図 2)。参加した 3 機関の相同性は 100% と高く、今年度のマニュアルが有効であることが示された。

#### 3. 制限酵素の検討

制限酵素の検討を 3 通り実施した分離株 22 株の結果、*SmaI* で 16 パターン、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* で 19 パターンに分類された (図 4~6)。泳動パターンが同一になったものは *SmaI* では 5 組 (うち 1 組が 3 株、残り 4 組が 2 株ずつ)、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* では 3 組 (2 株ずつ) であった。いずれの制限酵素処理でも同一パターンを示した菌株の組み合わせは、2 組 (2 株ずつ) であった。

### D. 考察

*Campylobacter* の PFGE においては、Proteinase K 処理前の段階の処理方法によって、バンドの背景がスマ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明らかとなり、その対処法としてホルマリン処理が有用であることが平成 17 年度までの検討で示された。本年度は、そのマニュアルを簡略化するため、Proteinase K 処理前の段階で熱をかけず、短時間で plug 作成まで行うことで、ホルマリン処理と同等の鮮明な泳動像を得ることができた。また、このマニュアルに従い、各地研の分離株 30 株を用いて PFGE を行った結果も鮮明な画像が得られたことから、株間、機関間によらず、一般的に有効な方法であることが示された。また、株数は少ない ( $n=2$ ) が *Campylobacter coli* においても本マニュアルで対応可能であった。しかし、1 機関において、長期継代した菌株を用いて PFGE を実施した結果、ホルマリン未処理群より、ホルマリン処理群の方が、鮮明なバンドパターンが得られた。したがって、菌が損傷または変異している可能性がある場合にはホルマリン処理が有効であると思われた (図 7)。

また、制限酵素の検討では、通常 *Campylobacter* の PFGE で使用されている *SmaI* に加え、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* を使用して比較を行ったが、*SmaI* よりも、*KpnI* または *SmaI+KpnI* を用いたほうが多形性に富み、*Campylobacter* の PFGE において有効であることが示された。また、*KpnI* 処理群と *SmaI+KpnI* 処理群の相同性はほぼ同様であったことから、コスト面を考慮すると *KpnI* が推奨された。このことは本検討と同様に *KpnI* での処理を推奨する報告<sup>2)3)</sup>でも裏付けされる。しかし、*SmaI* 処理群は、実施した 30 株すべてのバンドパターンが *KpnI* 処理群及び *SmaI+KpnI* 処理群の結果に比べ明瞭であったことから (図 3)、解析の容易さの

点では *SmaI* が推奨される。それに加え、*SmaI* 処理群では *Campylobacter coli* の泳動像は *jejuni* の泳動像に比べ特異的なパターンを示し、種間の判別が容易であった。

本検討では、由来が異なるにもかかわらず、どの処理群でも高い相同性を示す菌株が認められた。詳細な疫学調査がなされているわけではないが、他県で分離された株を使用しているため、同じ由来である可能性は低い。特に Penner 型別が同じ血清群の株は、同パターンか非常に類似したパターンを示した。したがって、*Campylobacter* の分子疫学解析を実施する場合、PFGE では *SmaI* や *KpnI* のみではなく他の制限酵素による解析を行うことが必要であり、また、PFGE とともに有用性が報告されている *flaA* 遺伝子の解析<sup>4)5)</sup>なども必要であると思われた。

#### E. 結論

本年度の検討で、ホルマリン処理なしでも良好な結果を得られることがわかり、マニュアルを簡略化することができた。また、*SmaI*、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* の3通りの制限酵素の比較において、*KpnI* での処理が最も有効であったが、由来の違う株でも高い相同性を示す場合があり、他の制限酵素の検討や他の解析の検討を行う必要があると思われた。

#### 参考文献

- 1) Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ : Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of

*Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 1889-94.

- 2) Rivoal K, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G : Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. Appl Environ Microbiol 2005 ; 71 : 6216-27.
- 3) Gilpin B, Cornelius A, Robson B, Boxall N, Ferguson A, Nicol C, Henderson T : Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. J Clin Microbiol 2006 ; 44 : 406-12.
- 4) Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM : Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 1531-6.
- 5) 渡辺治男 : 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金—新興再興感染症研究事業 平成 16 年総括・分担研究報告書 2005 ; 197-209.

#### F. 研究発表

なし。

図1 *Campylobacter* PFGE マニュアル

- 第1日目 (菌の培養)
- 1) 3mlのBrucella Broth (Preston, Boltonでも可) に菌を接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第2日目 (菌の培養)
- 2) Brucella Agar (TSA, BHIA, CCDAでも可) に1)菌液を濃厚に接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第3日目 (集菌, アガロースブロックの作製)
- 3) 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, 氷上で冷す。
- 4) 1.0% SeaKem Gold in滅菌超純水を電子レンジで溶かし, 50-55°Cで保温する。
- ↓
- 5) 試験管に1-2mlのPBSをいれ, 平板上の菌を滅菌綿棒でかきとり, MacFarland 5程度に懸濁する。調整した菌液の500µlを1.5mlチューブに取る。
- S. Braenderup H9812は大腸菌のマニュアルを参照にし, 菌液を調整する。
- 6) ゲルとの混和準備のために菌液を40°Cに温める。
- 7) 6)のチューブに4)の1.0% SeaKem Gold in滅菌超純水を500µl入れ混和する。
- 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。
- 8) 7)を3)のサンプルプラグキャスター(0.7mm)に約100µl注入する。
- 9) 氷上で固める。15-30分間放置。
- ↓
- (ProteinaseK 処理)
- 10) ProteinaseK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)。
- 1%N-lauroylsarcosineが溶けにくいので50°Cの恒温槽に入れておく。
- 11) 固化したアガロースブロックを50°Cに保温した10)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。
- 12) 50°Cで2時間~over night緩やかに振盪する(30rpm程度)。(72時間まで可)。
- \* 水槽の水位がチューブの中の溶液より上であることを確認する。
- (ここで止めても良い, ブロックの保存はこの状態で冷蔵保存する)
- 恒温槽から取り出したら氷上で一旦冷やした後, 次の操作にはいと寒天が締まり作業しやすい。
- ↓
- (ProteinaseKの不活化・洗浄)
- 13) 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ProteinaseK液(0.5mgProteinaseK in TE, 1%N-lauroylsarcosineは入れない)で保存する。
- 14) 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ProteinaseK液を不活化する(1回目)。
- 15) 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)。
- 16) 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)

- 17) 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。
- 18) 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 分注する。
- 19) 整形したアガロースブロックを 18) に入れ、各酵素の至適温度で 20 分以上振盪する。
- 20) 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。
- 21) 制限酵素の入ったbuffer (30unit / sample plug) 100 $\mu$ l をチューブに入れ、30 $^{\circ}$ C (Sma I), 37 $^{\circ}$ C (Kpn I, Sma I + Kpn I, 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、2.0L の 0.5×TBE バッファーを泳動槽に注ぎ入れ、12-14 $^{\circ}$ C に予冷する。

- 22) 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。
- 23) 55-60 $^{\circ}$ 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。
- 24) 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。
- 25) 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。
- 26) 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。
- 27) 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。

- 28) 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。
- 29) 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。
- 30) 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 $^{\circ}$ 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)

- 31) 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。
- 32) 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。
- 33) 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。
- 34) 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。

表 1 平成18年度精度管理に使用した *Campylobacter* 標準株

菌株 No.	菌種	Penner	Lior	由来
1	<i>C. jejuni</i>	UT	LIO11	患者便
2	<i>C. jejuni</i>	O	LIO7	患者便
3	<i>C. jejuni</i>	A	LIO2	患者便

図 2 精度管理の結果

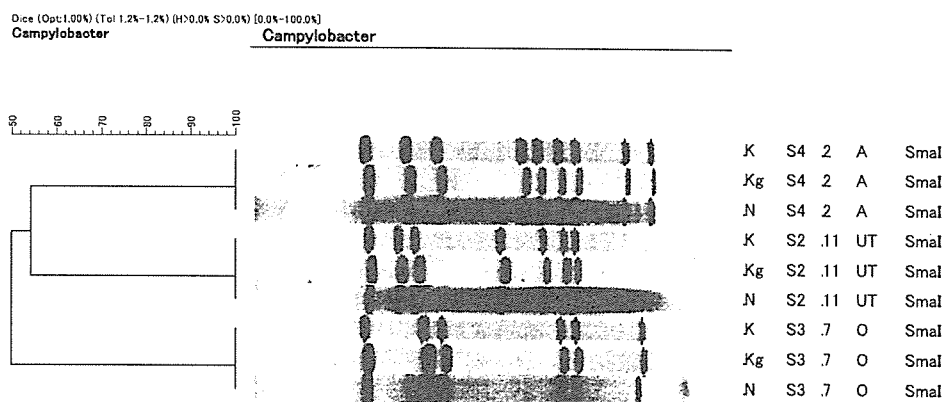


図3 各地研分離株の制限酵素 *Sma*I 処理の泳動像 (n=30)

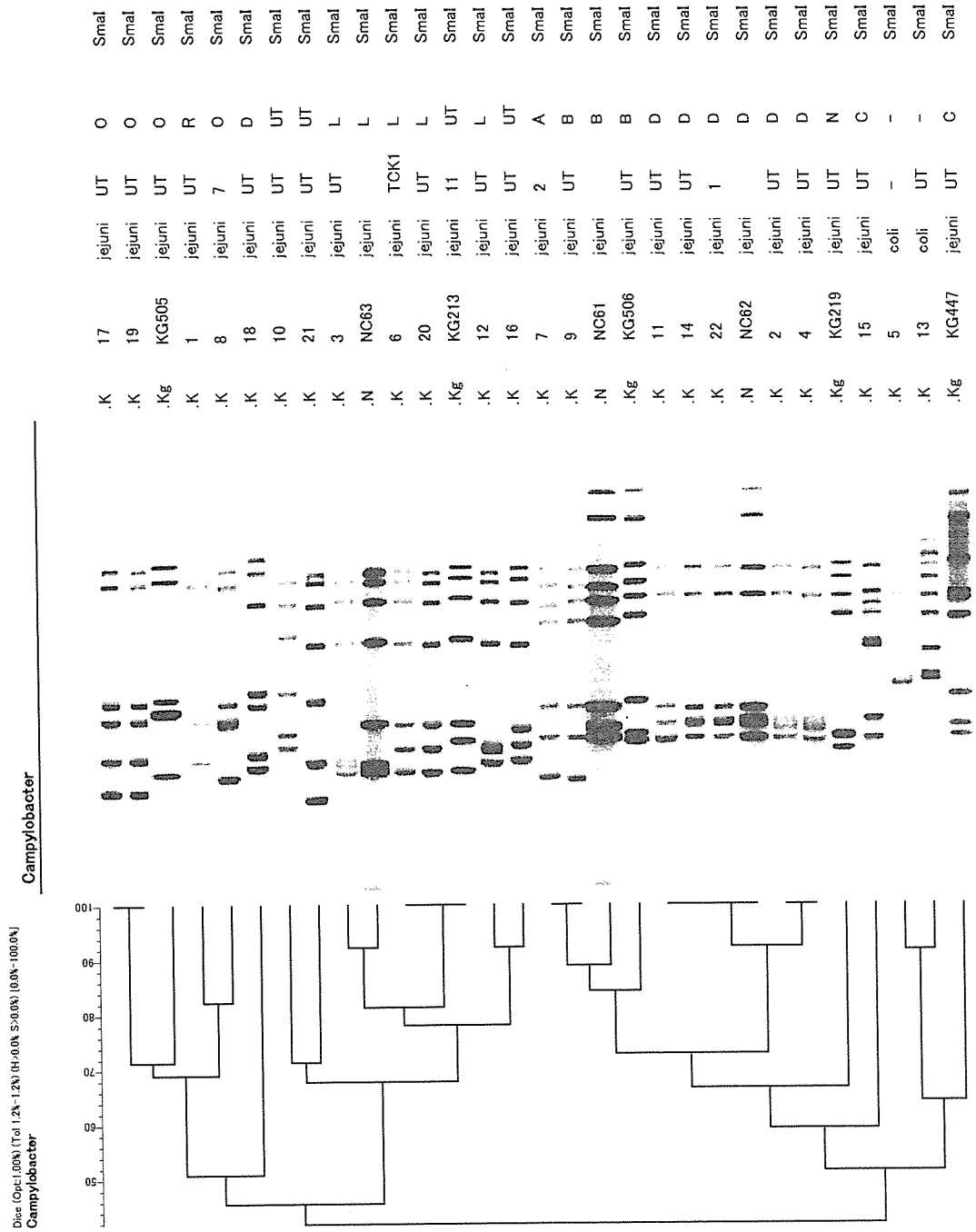




図4 各地研分離株の制限酵素 *Sma*I 処理の泳動像 (n=22)

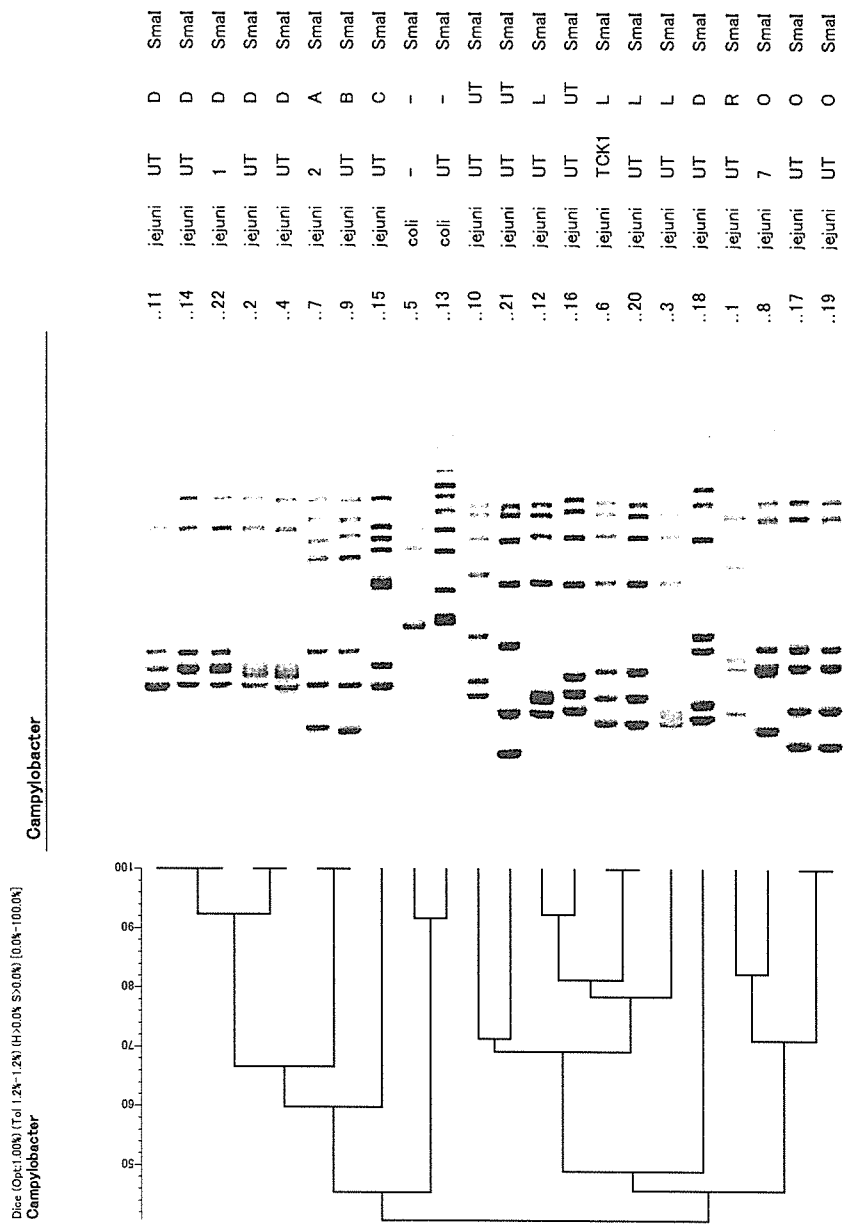


図5 各地研分離株の制限酵素 *KpnI* 処理の泳動像 (n=22)

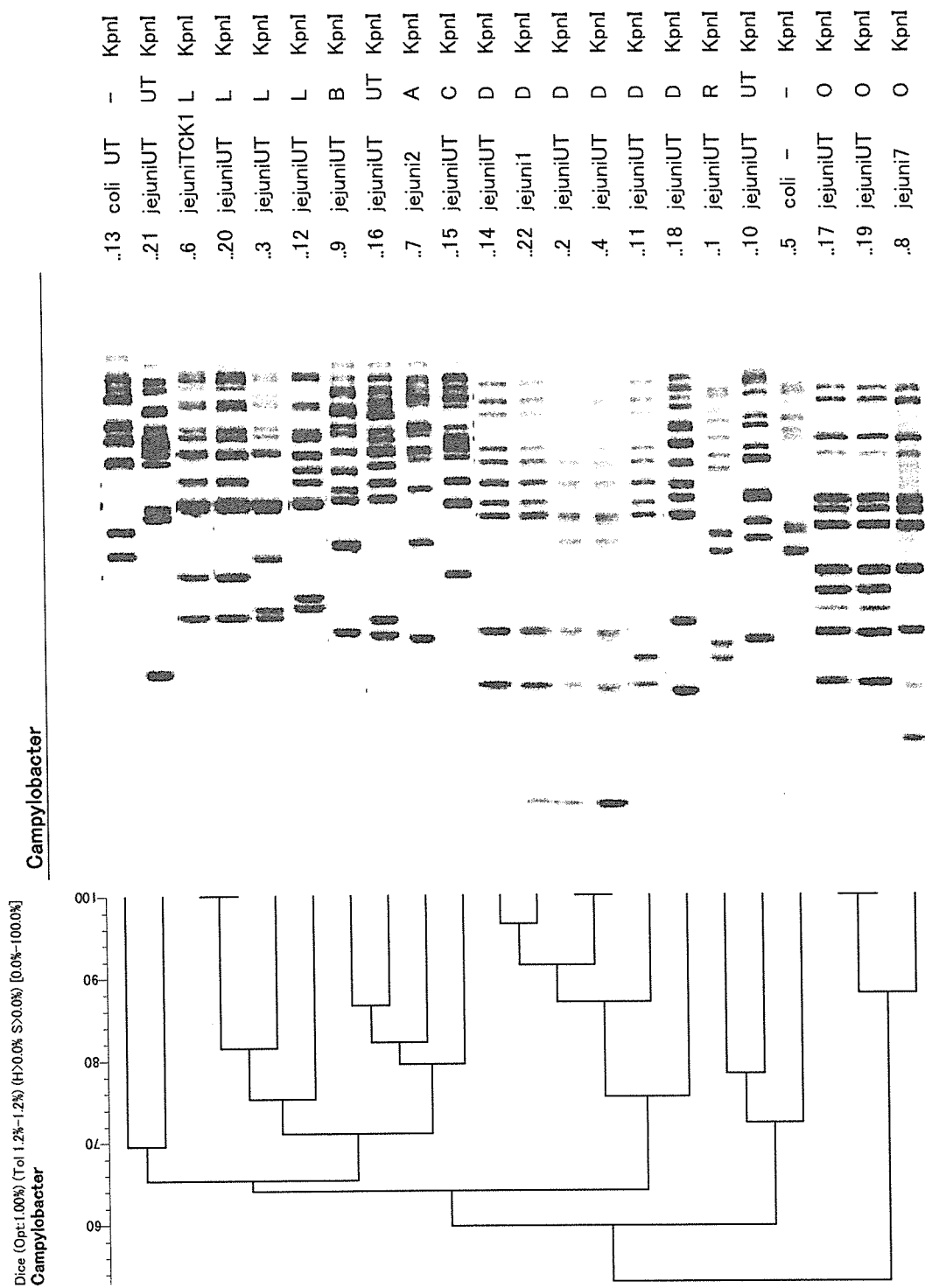


図 6 各地研分離株の制限酵素 *SmaI*+*KpnI* 処理の泳動像 (n=22)

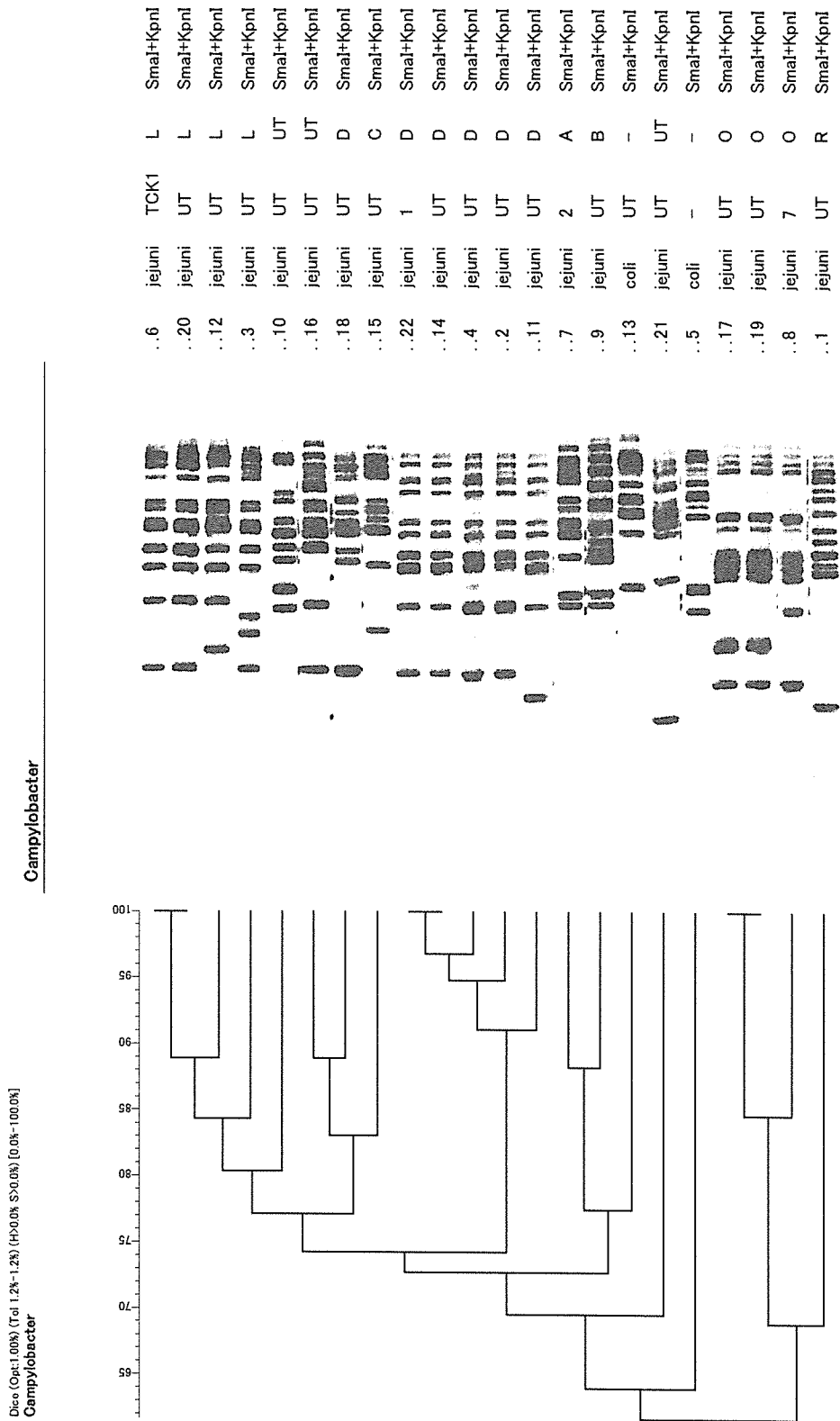


図 7 *Campylobacter* PFGE マニュアル(ホルマリン処理)

- 第 1 日目 (菌の培養)
- 1) 3mlの Brucella Broth (Preston, Boltonでも可) に菌を接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第 2 日目 (菌の培養)
- 2) Brucella Agar (TSA, BHIA, CCDAでも可) に 1)菌液を濃厚に接種し, 37-42°C, 18-24 時間, 微好気培養。
- ↓
- 第 3 日目 (集菌, アガロースブロックの作製)
- 3) 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, 氷上で冷す。
- 4) 1.0% SeaKem Gold in滅菌超純水 を電子レンジで溶かし, 50-55°Cで保温する。
- ↓
- (ホルマリン処理・洗浄)
- 5) 1.5mlのマイクロチューブに 5%ホルマリンPBS液 を 1000  $\mu$ l 入れ, 平板上の菌をマッチ棒の頭 1/3 程度掻き取り, Vortexを行った (MacFarland 3, OD<sub>600</sub> = 1.0 程度) 後, 12,000 rpm で 2 分間冷却遠心する (1 回目)。
- 6) 上清を除去後, 5%ホルマリンPBS 1,000  $\mu$ l を加え Vortex 後, 室温で 15 分間放置する (2 回目)。
- 7) 12,000 rpm, 2 分間冷却遠心して上清を除去後, PBS を 1000  $\mu$ l 加え Vortex 後, 12,000 rpm, 2 分間冷却遠心 (1 回目)。
- 8) 上清を除去後, PBS を 1000  $\mu$ l 加え Vortex 後, 12,000 rpm, 2 分間冷却遠心 (2 回洗浄)。
- 9) 上清を除去後, 滅菌超純水 500  $\mu$ l を加え, 懸濁する。
- S. Braenderup H9812* は滅菌超純水 250  $\mu$ l を加え, 懸濁する。
- 10) ゲルとの混和準備のために菌液を 40°C のウォーターバスで温める。
- 11) 10) のチューブに 4) の 1.0% SeaKem Gold in滅菌超純水 を 500  $\mu$ l 入れ混和する。
- S. Braenderup H9812* は 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 250  $\mu$ 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。
- 12) 11) を 3) のサンプルプラグキャスター (0.7mm) に約 100  $\mu$ l 注入する。
- 13) 氷上で固める。15-30 分間放置。
- ↓
- (ProteinaseK 処理)
- 以下, 平成 18 年度新規マニュアルに従って行う (図 1)。