

1. 供試菌株

PFGEの標準菌株として、感染研から分与された腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 5株(表1)を使用した。

表1. 精度管理に使用した標準菌株

番号	分離年	分離府県	市・町	VT型	<100kb	100-350kb	>350kb
1	1996	広島県	東城町	1+2	I a	I	I
2	1996	大阪府	堺市	1+2	II a	II b	I
3	1998	宮崎県	宮崎市	1+2	II b	II b	I
4	1997	埼玉県	上尾市	2	III a	ND	ND
5	1994	神奈川県	記載なし	2	III b	ND	III

2. PFGE 方法

PFGE方法は、図1に示す方法で実施した。図2は感染症研究所から配布された方法を基に各手技について注意点を加え作成した。

3. PFGE 像の取込方法

エチジウムブロミドでの染色・脱色後のPFGEゲルからの画像取込は、各機関によりそれぞれの方法で行った。ゲルから画像をCCDカメラで直接取り込む機関は、4機関であった。またその他の7機関では、一旦ゲルを写真撮影した後、写真をスキャナー(6機関)またはCCDカメラ(1機関)で画像に取り込んだ。

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、DNA解析ソフトFingerprinting II (BIO-RAD, 日本語版)で解析した。

C. 研究結果

1) 画像保存について

各研究協力機関から福岡県保健環境研究所に電子メールで送信された。メールの添付ファイルの画像がそのまま使用できたのは4地研のみであった。添付画像がそのまま使用できない原因は、イメージモードがグレースケールではなくRPGあるいはインデックスカラーである場合とファ

イルが圧縮されている場合あるいはその両方による場合であった。画像のサイズについては特に指定していなかったため、地研により画像サイズが0.3~1.2 MBとまちまちであった。画像サイズの大きい解像度の高い画像の方が良好な解析が得られるため、画像サイズについても指定が必要と考えられた。一方、ゲルを直接CCDカメラで取り込んだ画像は、ゲルを写真撮影しスキャナー等で取り込んだ場合に比べ、安定した良好な画像が得られていた。

2) *S. Braenderup* H9812株を用いた自作マーカー

S. Braenderup H9812株は本条件で泳動すると、19本のバンドに分かれる。19本目のバンドはCDCでサイズが提示されていないので、Gold standardから除いた。また、17本目のバンドは自動バンド検索では識別できなかったため、Gold standardから除いた。最終的にGold standardのバンド数は17本とした。一方で各地研から送信されてきた画像からマーカーを自動バンドし、明らかなゲル中の汚れやノイズを削除した。各地研及び感染研のスタンダードを比較したところ、図3のデンドログラムとなった。スタンダードの類似性は全体で95.12%、第2のクラスターで97%であった。100%一致しなかった理由は、1地研の分離度が非常に良く、17番目のバンドが検出できたことと、1地研の過泳動となり、19番目のバンドがなかったためである。

5株の精度管理株の結果は図3-6に示した。各菌株の一致率は、85.95-90.75であった。

D. 考察

平成15年度はPFGEマーカーが薄いことや分離度が悪い等の問題があった。また、泳動そのものに問題があるケースがあったが、当年度は改善が見られ、15年度より良好な結果が得られた。しかし、泳動時間が同一であっても泳動距離が異なるのは、泳動環境温度、バッファーの差や泳動装置の状況によりかなり異なる。これら諸条件は、統一マニュアルでは乗り越えられない問題である。来年

度は各地研での条件作りを行なう必要がある。

E. 結論

1. 泳動距離の確認作業

各地研で泳動距離に関する管理を行なわなければならない。

2. DNA 消化の検討

迅速法により DNA の制限酵素による消化が不十分であると考えられるケースが多く、菌量と酵素濃度、反応時間など検討する必要がある。

3. PFGE 機器チェックと基準作りの必要性

- ①PFGE 機器の管理と保守点検
- ②バッファー量と温度による移動度のチェック
- ③バンド認識の基準策定
- ④画像取込の改善

F. 研究発表

1. 論文発表

堀川和美, 村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 石黒靖尚, 荒川英二, 渡邊治雄, 近藤正治, 森田 繁, 原 一美, 江崎泰之, *Vibrio cholerae* O8 感染事例—福岡県, 病原微生物検出情報, 2004, 1(287), 25.

図 1. パルスフィールドゲル電気泳動法マニュアル

大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

九州ブロックマニュアル

第 1 日目 (菌の培養)

3ml の TSB に菌を接種し、35-37°C、16-18 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 で保温する。
- 3) 1.5ml のマイクロチューブに培養液を 1000 μ l とり、12,000 rpm で 5 分間冷却遠心する。
- 4) 上清を除去後、滅菌生理食塩水または PBS1,000 μ l を加え混和後、12,000 rpm、5 分間冷却遠心する。
- 5) 4) の操作を繰り返す(2 回洗浄)。
- 6) 上清を除去後、滅菌超純水 500 μ l を加え、懸濁する。
S. Braenderup H9812 は滅菌超純水 250 μ l を加え、懸濁する。
- 7) 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。
- 8) 7) のチューブに 3) の 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 500 μ l 入れ混和する。
S. Braenderup H9812 は 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 250 μ 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 回每替える。
- 9) 8) を 1) のサンプルプラグキャスター(0.7mm)に 100 μ l 注入する。
- 10) 9) を氷上で固める。15-30 分間放置。

↓

(ProtenaseK 処理)

- 1) ProtenaseK 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。
- 2) 固化したアガーブロックを 50°C に保温した 1) 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。
- 3) 50°C で 2h - 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ると、寒天が締まり作業しやすい。
以下の作業でも同様。

↓

(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、メスやカバーグラスを使って泳動時用の大きさにカットする。
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。

- 2) 500 μ づつ分注した 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 ProtinaseK 液を不活化する (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 0.5ml 加え 50°C 20 分間以上振盪する (2 回目)。
- 4) 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 週間いなくても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)

- 1) アガーブロックを TE 液からパラフィルムなどの上に取り出し、コーム幅 \times 約 2-3mm に整形する。
- 2) 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。
- 3) スライスしたアガーブロックを 2) に入れ 37°C で 20 分以上振盪する。
- 4) 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。
- 5) 制限酵素の入った buffer (XbaI, 30unit / sample plug) を 100 μ l チューブに入れ、37°C 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。保存したアガー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。)

↓

(アガロースプラグ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、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。

- 1) 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。
- 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。
* 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。
- 3) 37°C の恒温水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。
- 4) 15 穴コームを装着し、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。
- 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) コームにある余剰の液をキムワイパーで除き、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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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、は 6.0V/cm, 2.2 to 54.2 sec, 21 時間、14°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 (1.5cm) のところにくるように時間を設定する。



第3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(時間厳守)振盪・染色。
アルミフویل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。
例) 10分、10分、20分、20分、20分、20分。特に最初が肝心。
アルミフویلなどで槽に蓋をする。
- 4) 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。

パワーポイント参照

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枚目は写真は最低限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。

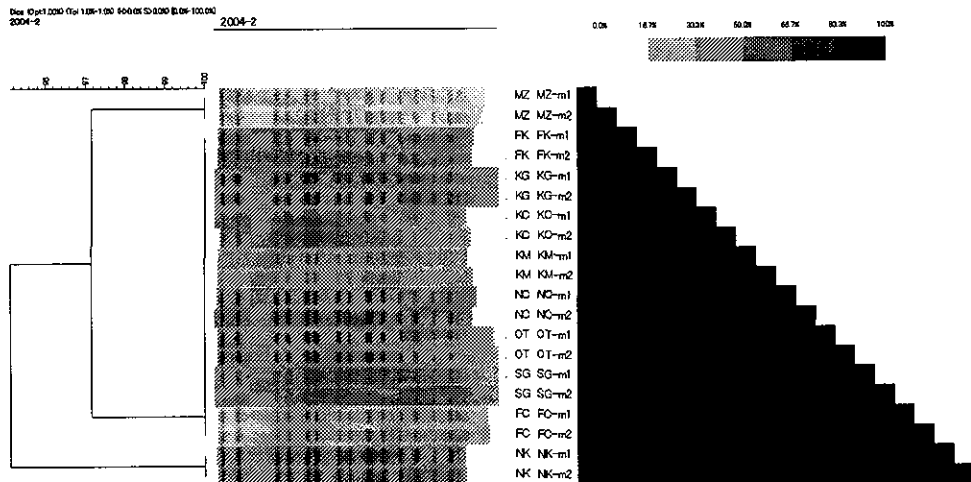


図2. PFGE サイズマーカーの解析結果

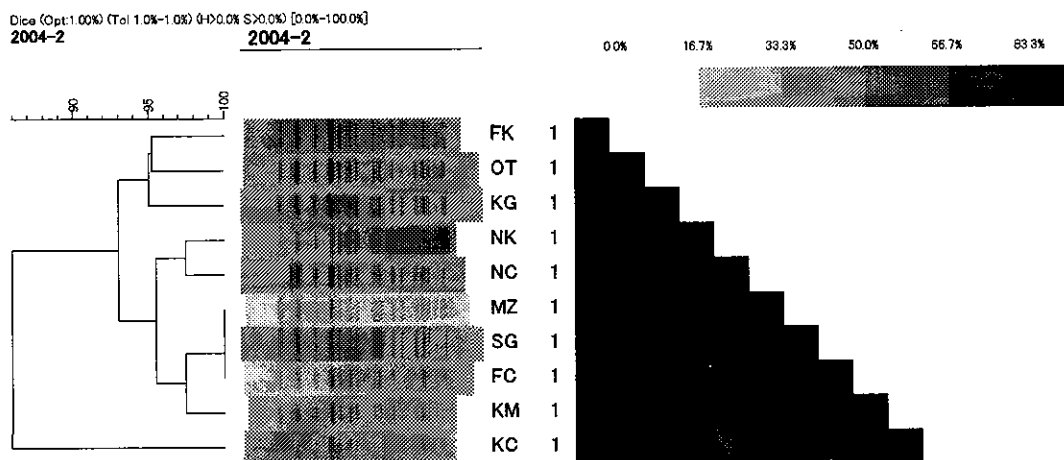


図3. 精度管理菌株1の解析結果

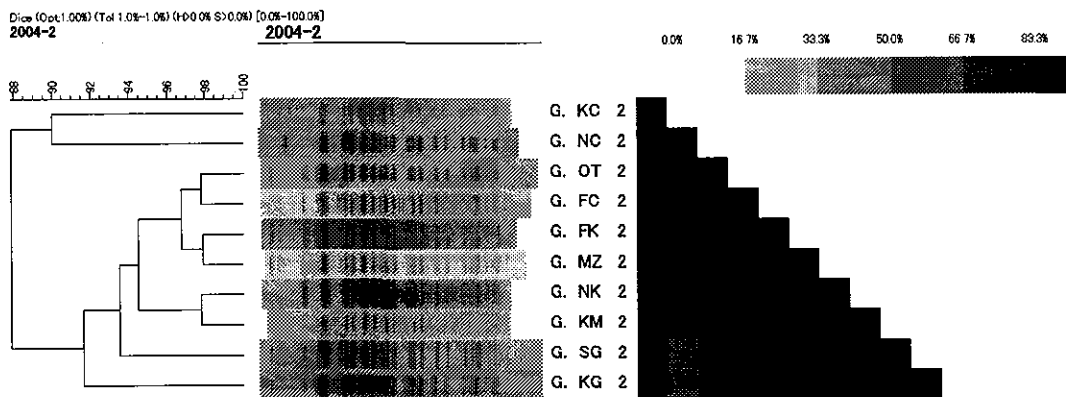


図4. 精度管理菌株2の解析結果

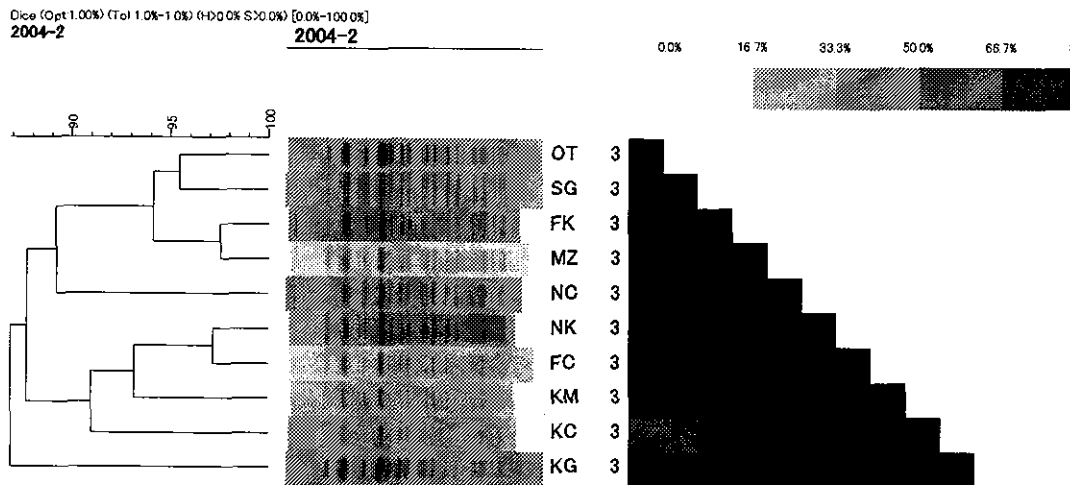


図5. 精度管理菌株3の解析結果

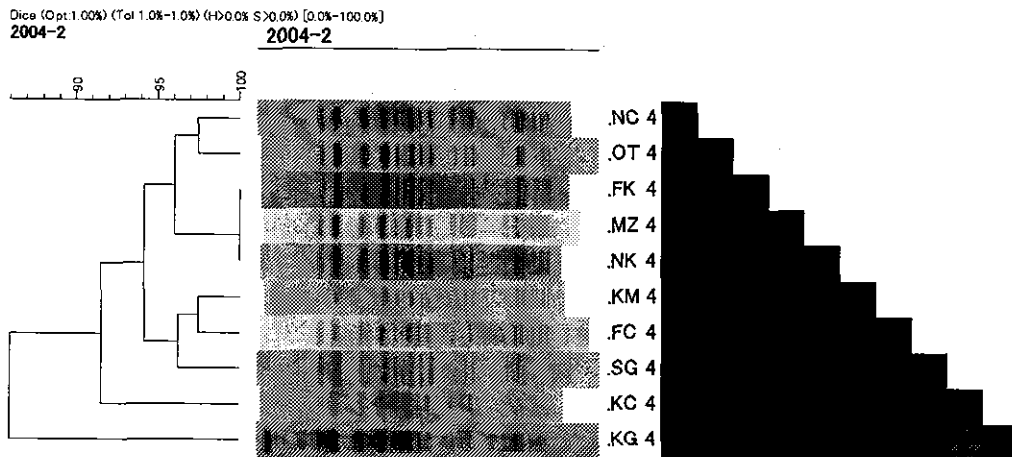


図6. 精度管理菌株4の解析結果

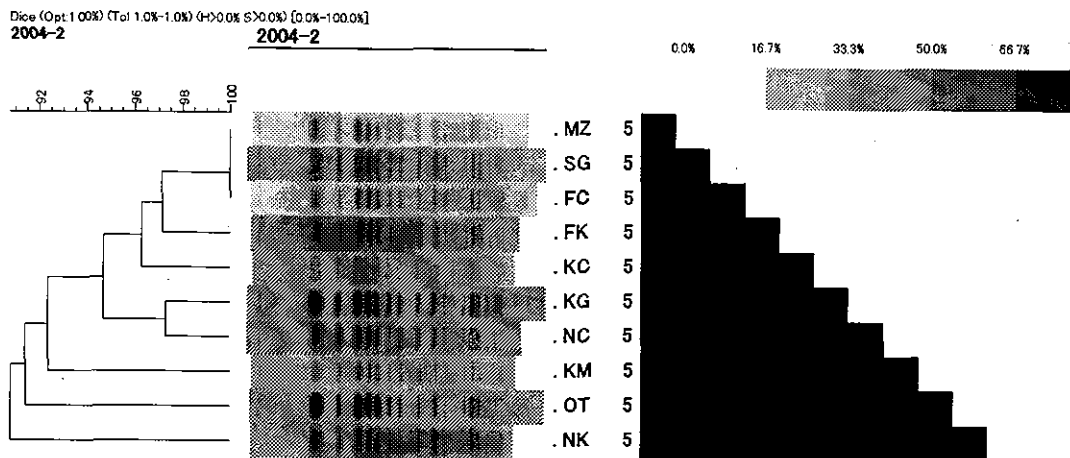


図7. 精度管理菌株5の解析結果

黄色ブドウ球菌の食中毒由来株と病院由来株の比較

研究協力者	東根 秀明	長崎市保健環境試験所
	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
	瓜生 佳世	福岡市保健環境研究所
	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
	緒方喜代子	大分県衛生環境研究センター
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター
	堀川 和美	福岡県保健環境研究所

研究要旨

黄色ブドウ球菌の細菌学的疫学指標は、表現型と遺伝子型に大別される。表現型指標としてコアグララーゼ型別及びエンテロトキシン型別が、遺伝子型指標としてパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別が、一般的に使用されている。これら型別法の疫学的指標としての有用性について検討を行なった。また、黄色ブドウ球菌の分離由来（食中毒と病院）に分けて解析した。さらに薬剤耐性パターン及びメチシリン耐性遺伝子についても併せて検討した。その結果、コアグララーゼ型別とエンテロトキシン型別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、パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別が不可欠であることが分かった。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌の細菌学的疫学指標のデータベースを構築する上で、表現型並びに遺伝子型別法について検討することが必要である。これまで病院から分離された黄色ブドウ球菌と食中毒から分離された黄色ブドウ球菌について表現型と遺伝子型別法を用いて比較解析した報告は少ない。本研究では九州地区で発生した食中毒及び院内感染関連で分離された黄色ブドウ球菌を用いて各種細菌学的疫学指標の有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 使用菌株

鹿児島県環境保健センター、大分県衛生環境研究センター、熊本市環境総合研究所、福岡市保健環境研究所、長崎県衛生公害研究所、福岡県保健

環境研究所及び長崎市保健環境試験所が保有する黄色ブドウ球菌株（食中毒由来株 28 株、病院由来株 61 株）合計 89 株を使用した。また、標準菌株は、ATCC12228 (MSSE)、ATCC29887 (MRSE)、ATCC25932 (MSSA)、ATCC33591 (MRSA) 及び IFO 12732 (MSSA) を使用した。

2. 表現型別方法

① コアグララーゼ型別

コアグララーゼ型別試験には、ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清（デンカ生研）を使用した。1 検体につき小試験管 9 本を用意し、全ての試験管に試験用抗原液（培養液 3,000rpm30 分後の上清）を 0.1ml 入れた。

第 1 管に I 型免疫血清、第 2 管に II 型免疫血清と以下同様に III～VIII 型の免疫血清を 0.1ml 入れ、ミキサーで攪拌後、37°C1 時間反応させた。

反応後全ての試験管に希釈正常ウサギ血漿 0.2 ml 加え、ミキサーで攪拌後、37°Cで反応させた。

判定は1時間後に行い、型別が確定しない場合は更に反応時間を2時間、4時間、24時間と延長して判定した。

② エンテロトキシン型別

エンテロトキシン型別試験は、RPLA法とPCR法で行なった。RPLA法はSET-RPLA「デンカ生研」を使用し、添付説明書に従って実施した。PCRは菌株No. 41~60の検体を行なった。Template DNAの作成はBHIに培養後、沈渣を滅菌生理食塩水で2回洗浄した後さらにDNase, RNase, free waterで2回洗浄した後、上清を100°C10分間処理、10,000rpm1分間遠心し、上清をTemplate DNAとして使用した。TaKaRaのPrimerSEA-1/2(エンテロトキシンA遺伝子)、SEB-1/2(エンテロトキシンB遺伝子)、SEZ-1/2(エンテロトキシンC遺伝子)、SED-1/2(エンテロトキシンD遺伝子)、SEE-1/2(エンテロトキシンE遺伝子)を使用した。反応液組成はTaKaRaの×10添付Buffer 5μl, dNTP Mixture (2.5mM each) 4μl, Primer-1, 2各0.5μl, Template DNA 5μl, TaKaRa Taq 0.25μl, 滅菌蒸留水 34.75μl Total 50μl使用した。PCR条件は熱変性 94°C 1分間、アニーリング 55°C 1分間、伸長 72°C 1分間、35サイクルで行なった。

③薬剤耐性試験

薬剤耐性試験は、ドライプレート「栄研」(栄研化学)を用い、17薬剤についてマニュアルに従い最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、メーカーが示す感受性(S)、中等度感受性(I)、耐性(R)のカテゴリーに分類した(表1)。

2. 遺伝子型別法

①PCR

Perez-Roth¹⁾らとLouie²⁾の方法を参考に、*mecA*(methicillin耐性遺伝子)、*ileS-2*(mupirocin耐性遺伝子)及び*femB*と*nucA*(*S. aureus*特異遺伝子)の各Primerを用いてのMultiplex PCRを実施するとともに、今回新たに設計した*femB* primerを用いて、食中毒由来株(24株)及び病院由来株(36株)についてNew Multiplex PCR (New

MPCR, 図1)を実施した。今回実施したNew MPCRについては、予めATCC株を用い、特異性および感度について、Perez-Rothらの方法と比較した(図2)。

②PFGEによる遺伝子解析

PFGEは一山³⁾らの方法を改変して実施した。

菌液の調整: Trypticase Soy Brothで培養(37°C, 一夜静置培養)後、菌塊が入らないように培養液を遠心管に採り、3,000rpm 20分間遠心した。遠心後Pett IVで3,000rpm 20分間3回洗浄する。Pett IVで軽く攪拌し、OD_{610nm}=3.0付近に調整した。なお、菌濃度については次の検討を行なった。

予備実験として菌液を2倍希釈でOD値2.0から等比2で希釈を5段階行なった(図2)。

OD 2.0 1.0 0.5 0.25 0.12

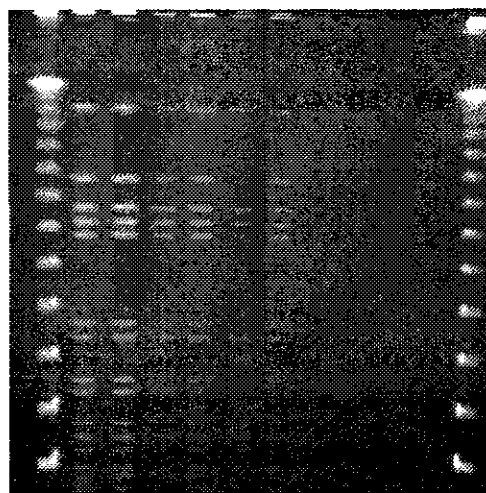


図2. 菌濃度予備実験

予備実験を踏まえ、OD値3以上を原液として最終的に原液の4倍まで希釈し、4株について各アガロースブロック2枚泳動した。4菌株共にOD値が3.0付近で作製したアガロースブロックを泳動した結果が小さなバンドまで確認することが可能であった(図3, 4)。

アガロースブロック作成: Pett IVに1.0%になるようにSeakem Gold (SKG) agaroseを加え、加熱溶解した。その後50°Cで保温して置いたアガロース100μlに調整菌液100μl加えて混和後、予め冷蔵庫で冷やしたPlug mold(サンプルプラグキャスター, 0.7mm)に注入し、冷蔵庫で約15分冷却

固化した。

OD 3.3 2.9 2.5 1.5 0.8 3.4 3.1 2.1 1.2 0.6

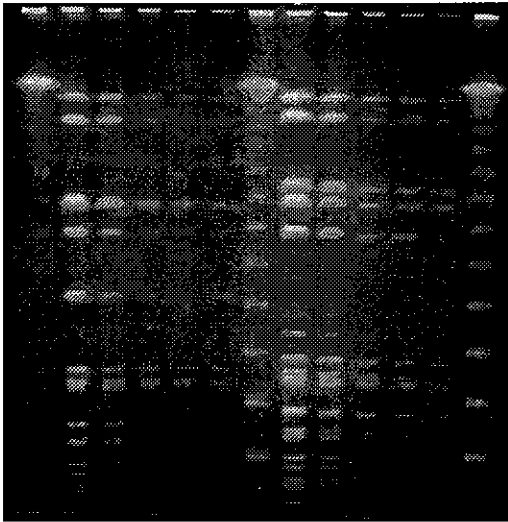


図3. 菌濃度の検討：菌株1（写真右），菌株2（写真左）

OD 3.1 2.8 1.6 0.8 3.4 3.1 2.2 1.3 0.7

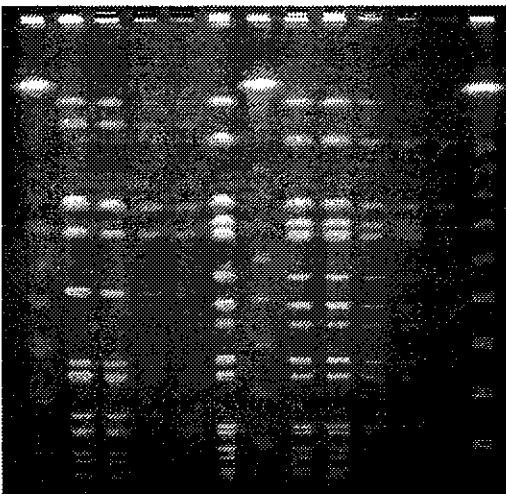


図4. 菌濃度の検討：菌株3（写真右），菌株4（写真左）

溶菌：Achromopeptidase 4mg/ml と Lysostaphine 40 unit/ml が入った Lysis buffer 500 μ l にアガロースブロックを入れ、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽で一夜振盪反応した。ブロックを ES buffer で1回洗浄し、Proteinase K 0.5mg/ml が入った ES buffer 900 μ l に入れ 50 $^{\circ}$ Cの恒温槽で一夜振盪反応した。

制限酵素で切断：ブロックを 1.0 mmの幅に切り出して TE buffer で洗浄後、1mM の PMSF を加えた TE buffer 500 μ l に入れ室温、4~6時間、振盪した。切り出したブロックを TE buffer で4回洗浄

して、PMSF を除去した後、制限酵素溶液（蒸留水 45 μ l, 10 \times 酵素用 buffer 5 μ l, *Sma* I 10~20unit）にいれて、30 $^{\circ}$ Cの恒温槽で一夜振盪反応した。

泳動用寒天作成：SKG agarose 1.0 g を 0.5 \times TBE buffer 100ml で加熱溶解後 55~60 $^{\circ}$ Cに保温した。コームにプラグを貼り付け、10分間ほど乾燥させた。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した。ゲル作成台のコーム反対側から保温して置いたアガロースを流し込んだ。泳動槽に 0.5 \times TBE buffer を注ぎ入れ、14 $^{\circ}$ Cに予冷しておいた。コームを固化したアガロースから抜き、泳動槽に装着し、泳動した。泳動条件は「電圧 6.0/cm, 5.3-34.9, 泳動時間 20時間」で行なった。

染色：泳動後、ゲルを 0.3 μ g/ml のエチジウムブロマイドで 30分、振盪、染色した後、ゲルを蒸留水で shaking しながら 2時間以上洗浄した。特に最初はこまめに蒸留水を換えた。

画像解析：DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD, 日本語版) を用いて行なった。

C. 研究結果

1. 表現型別結果（表 2, 3）

①コアグラーゼ型別

食中毒由来株では II 型, III 型, IV 型, VI 型, VII 型を示し特に IV 型と VII 型が多く、病院由来株では I 型, II 型, III 型, IV 型, V 型を示し特に II 型が多かった。

②エンテロトキシン型別

今回おこなった試験結果では食中毒由来株は A 型, B 型, C 型, A+B 型, A+C 型を示したが、75%の株が A 型であった。病院由来株は C 型, A 型, B+C 型, A+C 型, 型別不能で、61%が C 型であった。

③薬剤耐性

食中毒由来株（28株）は PCG 及び ABPC に対して耐性率が高く（75%, 75%）、MINO, CEZ, CTM, FOM, VCM, TEIC, IPM 及び LVFX に対しては、すべての株で感受性であった。その他の薬

剤については7-11%の耐性率であった。病院由来株(61株)はVCM及びTEICに対しては、すべての菌株が感受性であった。また、MIPICに対するMICが4 μ g/ml未満の株は1株(1.6%)のみであった。ABK及びMINOに対しては8%の株が耐性であった。その他の13薬剤については56-98%が耐性で、5剤-14剤に対して耐性が認められた。

2. 遺伝子型別結果(表2, 3)

①PCR

New MPCRを実施した60株において、*ileS-2*(mupirocin耐性遺伝子)は、いずれの株も保有していなかった。一方、*femB*(*S. aureus*特異遺伝子)については、すべて陽性であった。

全体については、食中毒由来株(28株)中*mecA*陽性株が1株(3.6%)認められ、薬剤感受性試験においてもMIPICのMICは4 μ g/ml以上であり、MRSAと考えられた。また、病院由来株(61株)については、*mecA*陽性株が46株(75.4%)で、*mecA*陰性15株中3株は、MIPICのMICが4 μ g/ml以上であった。

②PFGEと遺伝子解析

菌液調製の結果: 予備試験で菌液の濃度検討を行なった。PFGEで菌の濃度 $DO_{610nm}=3.0$ は高濃度であるが、細く切り出すことにより、制限酵素の働きを十分に利用でき、またシャープな画像になった。

PFGE解析結果: 89株を全体、食中毒、病院と分けて解析を行なった。全菌株の解析の結果、遺伝子型群とコアグラマーゼ型と一致していたが、エンテロトキシン型は一部の例外が認められた(図6)。食中毒由来株について詳しく解析するとコアグラマーゼ型別とエンテロトキシン型で食中毒の由来をほぼ特定することができるが、食中毒由来株で多く検出される[IV, A]及び[VII, A]の組み合わせの株では由来を特定するにはPFGEが必要であった(図7)。一方、3病院由来の61株の遺伝子解析の結果は、2病院由来46株の一群と他1病院の3群計4群に分かれた。後者1病院15株は、2名の

看護師から注射液を汚染し患者が発生した事例の関連調査で分離された株で、1株を除き14株はメチシリン感受性であり、コアグラマーゼ型別ではっきりと由来が判明した事例であった。しかし、前2病院で分離された46株は、45株がメチシリン耐性遺伝子を保有し、40株がコアグラマーゼII型、37株がエンテロトキシンC型であった。コアグラマーゼ型とエンテロトキシン型では由来の特定は全く出来ず、PFGEによる遺伝子解析が不可欠であった(図8)。

D. 考察

・PCR

今回実施したNew MPCR法は、*mecA*および*femB*について検出感度、特異性ともに優れ、今後MRSAのスクリーニングとして有用と思われる。

mupirocinについては今回の検体では陽性は認められなかったが、今後耐性株が出現することが予想されるため、注意する必要があると思われる。一部薬剤耐性試験結果と異なる結果が出たことから、今後は*mecA*以外の薬剤耐性遺伝子についても検討する必要がある。

・薬剤耐性

食中毒由来株について多剤耐性菌が多く認められ、1株(3.6%)がMRSAであったことから、今後ブドウ球菌食中毒の検査・治療にあたっては、十分に注意が必要と思われる。

・各型別試験結果の相関

食中毒由来株と病院由来株について、PFGE遺伝子型、コアグラマーゼ型、エンテロトキシン型の3種の型別方法の比較解析を行なった結果、食中毒由来株はコアグラマーゼ型及びエンテロトキシン型ともに多型性を示し、PFGEは必ず必要でない場合もあるが、病院由来株は両型別法で多型性を示さずPFGE解析が必須の場合が多いと考えられた

E. 結論

①PCR

今回、MRSAのスクリーニングに有用なNew MPCR

法を開発した。

②薬剤耐性試験

黄色ブドウ球菌においては、薬剤耐性パターンは疫学指標としては必ずしも適さない。

③各型別試験の有用性

食中毒関連調査では、PFGEにさきがけて実施するコアグラマーゼ型別及びエンテロトキシン型別試験が疫学的指標として有用と考えられた。しかし、特にコアグラマーゼⅡ型による病院内感染例では、PFGEによる遺伝子解析が非常に有用であると考えられた。

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

参考文献

1. E. Perez-Roth, F. Claverie-Martin, S. Mendez -Alvarez: Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance, J. Clin. Microbiol., 39, 4037-4041 (2001).
2. L. Louie, S. O. Matura, E. Choi, M. Louie, AND A. E. Simor: Evaluation of Three Rapid Methods for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., 38, 2170-2173 (2000).
3. 一山 智: パルスフィールド電気泳動法を使った黄色ブドウ球菌MRSA株のタイピング, 日本細菌学雑誌, 49, 850-852 (1994)

Target gene	Primers	Sequense (5' →3')	Amplicon size
<i>ileS-2</i>	MupA	TAT ATT ATG CGA TGG AAG GTT GG	456 bp
	MupB	AAT AAA ATC AGC TGG AAA GTG TTG	
<i>femB</i>	FemB-m1	CCG TGA GAA TGA TGG CTT TG	375 bp
	FemB-m2	CAT CGT ACT TGG CTC GAT GT	
<i>mecA</i>	MecA1	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310 bp
	MecA2	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	

PCR condition

Taq: EX Taq HS (Takara)

94°C 7min.

94°C 30sec.

58°C 30sec.

72°C 30sec.

72°C 7min.

4°C ∞

35 cycle

Electrophoresis

2% Agarose gel : 100V, 30min.

図1 New Multiplex PCR

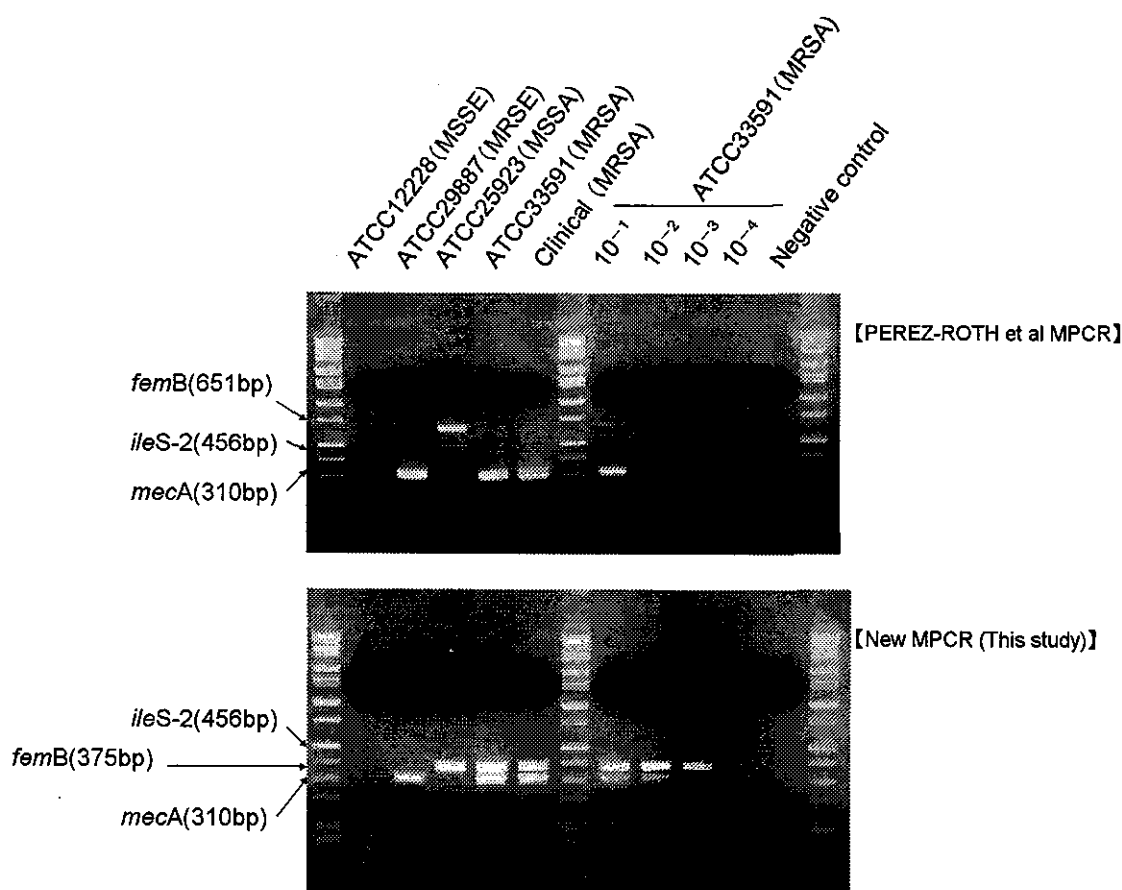


図2 Specificity and Sensitivity of New MPCR

表1. 使用薬剤名とその感受性カテゴリー

区分	略号	一般名	感受性カテゴリー*	
			耐性値 数値以上	感受性値 数値以下
ペニシリン系	PCG	ペニシリン	0.25	0.12
	MPIPC	オキサシリン	4	2
	ABPC	アンピシリン	0.5	0.25
セフェム系	CEZ	セファゾリン	32	8
	CTM	セファタキシム	32	8
	CCL	セファクロル	32	8
	FMOX	フロモキシセフ	32	8
カルバペネム	IPM	イミペネム	16	4
アミノグリコシド系	GM	ゲンタマイシン	16	4
	ABK	アルベカシン	16	4
テトラサイクリン系	MINO	ミノサイクリン	16	4
マクロライド系	EM	エリスロマイシン	8	0.5
リンコマイシン系	CLDM	クリンダマイシン	4	0.5
その他	VCM	バンコマイシン	>16	4
	TEIC	テイコプラニン	>16	8
	FOM	ホスホマイシン	32	8
キノロン系	LVFX	レボフロキサシン	8	2
ST合剤	ST	スルファメキサゾール・トリメトプリム	76/4	38/2

* 耐性値(R)と感受性値(S)の間がある場合は中間値(I)である。

表2. 食中毒由来株のコアグラマーゼ型、エンテロトキシン型及び薬剤耐性試験結果

No.	Coagu- lase	Entero- toxin	β-lactam:PC Group			β-lactam:Cefem Group				Glycopeptide		FOM	IPM	Aminoglycoside		TC	MLs	CLDM	LVFX
			PCG	ABPC	MPIPC	CEZ	CCL	CTM	FMOX	VCM	TEIC			GM	ABK				
1	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
2	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
3	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
4	III	A+C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	I	S	S
5	III	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
6	III	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	I	S	S
7	IV	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
8	IV	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S
9	VI	B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S
10	II	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S
11	VII	A+B	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S
12	III	C	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S
13	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S
14	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S
15	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	I	S
17	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
18	VII	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
19	VII	A	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
20	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
21	IV	A	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
22	IV	A	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
23	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
24	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
25	IV	A	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
87	IV	A+C	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
88	IV	A+C	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
89	IV	A+C	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
90	IV	A+C	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S

表3. 病院由来株のコアグラーゼ型, エンテロトキシン型及び薬剤耐性試験結果

No.	Coagu- lase	Entero- toxin	β -lactam:PC Group			β -lactam:Cefem Group				Glycopeptide		FOM	IPM	Aminoglycoside		TC	MLs	OLDM	LVFX
			PCG	ABPC	MPIP	CEZ	CCL	CTM	FMOX	VCM	TEIC			GM	ABK				
41	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
42	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R
43	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
44	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	S	S	R	R	R
45	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
46	II	B+C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R
47	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
48	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
49	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
50	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
51	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
52	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
53	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
54	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	I	I	R	R	R
55	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
56	II	B+C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R
57	II	B+C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R
58	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R
59	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	S	S	R	R	R
60	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
61	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R
62	II	UT	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
63	II	C	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
64	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R
65	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R
66	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R
67	II	C	R	R	R	R	R	I	R	S	S	R	S	S	I	I	R	R	R
68	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
69	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S
70	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R
71	II	UT	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	I
72	III	UT	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	I	S	R	S	R
73	UT	UT	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
74	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
75	III	C	R	R	R	I	R	S	S	S	S	I	S	R	S	S	I	S	S
76	III	C	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S
77	II	A	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	I	R	R	R
78	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	I	I	R	R
79	UT	A+C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R
80	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
81	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R
82	III	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
83	UT	C	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	S	R
84	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
85	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R
86	II	C	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R
26	I	UT	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
27	I	UT	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
28	V	UT	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
29	I	UT	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
30	IV	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
31	V	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
32	I	UT	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	S	S	I	I
33	I	UT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
34	V	UT	R	R	R	I	S	R	I	S	S	R	S	S	I	S	R	R	I
35	V	UT	R	R	S	S	I	R	R	S	S	R	S	S	R	S	I	R	S
36	V	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
37	IV	A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
38	IV	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	I	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
40	I	UT	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

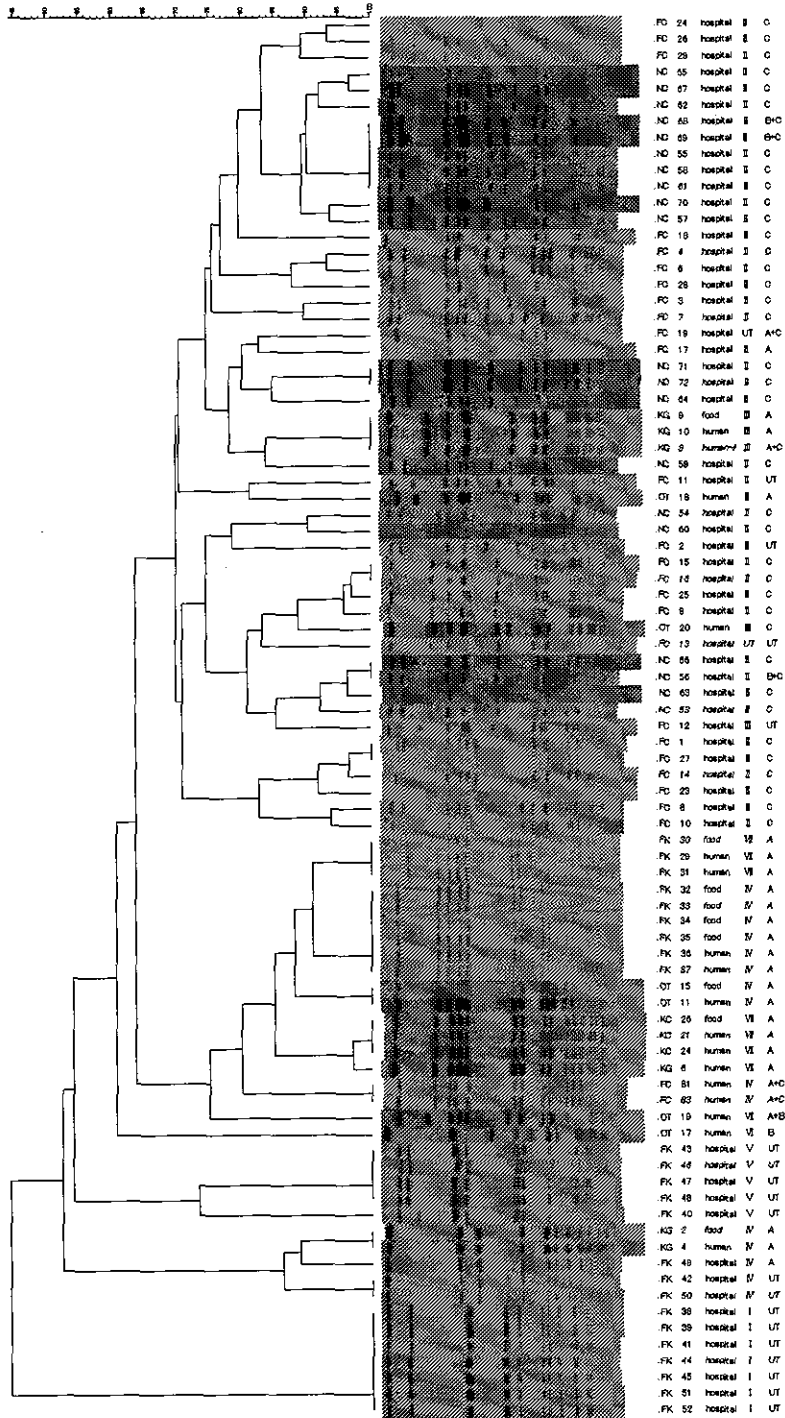


図 6. 全菌株の遺伝子解析結果

Day (Case) (Col) (Tel) (06-1-00) (06-0085000) (06-10000)

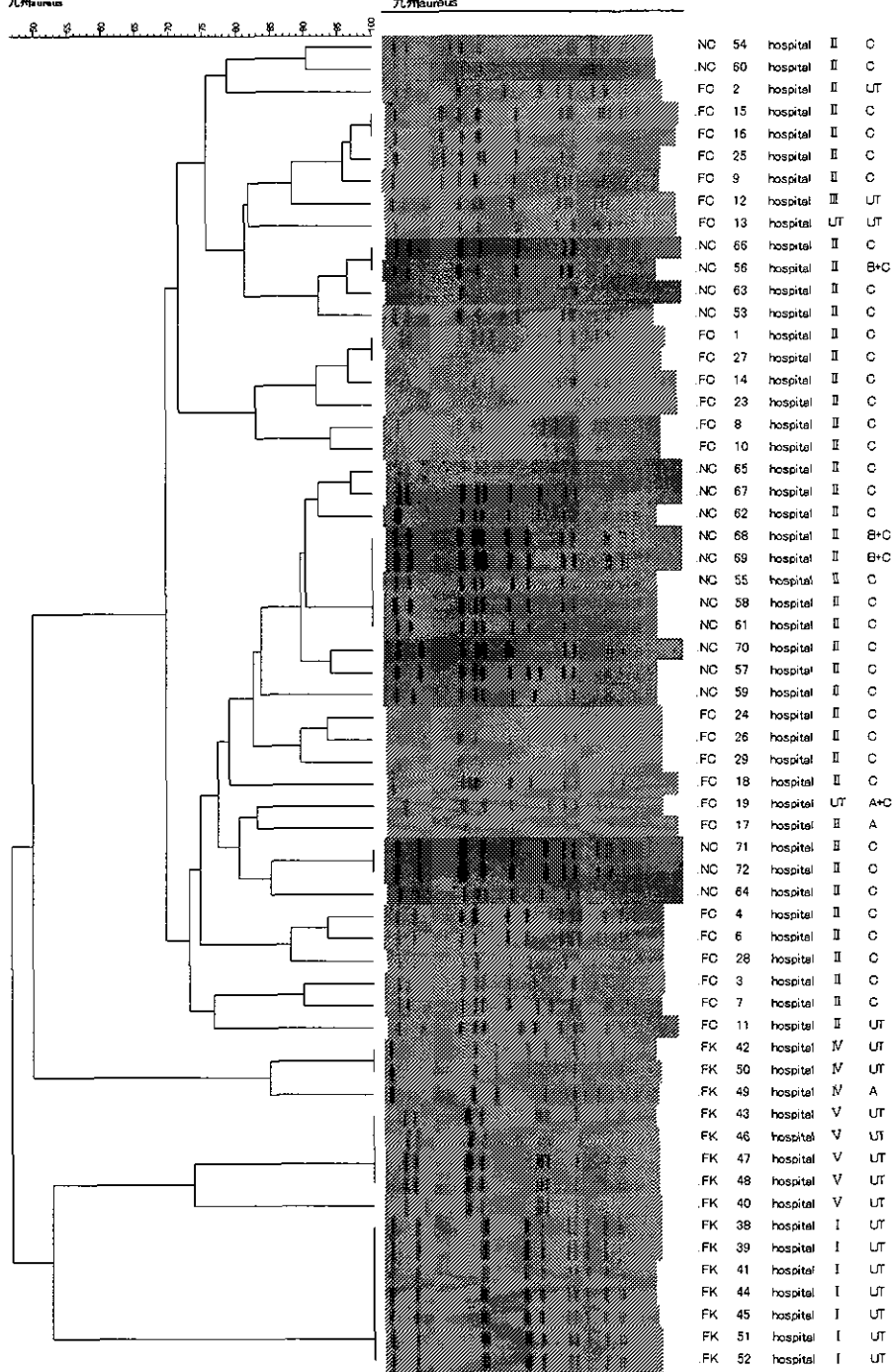


図 8. 病院由来株の遺伝子解析結果

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	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 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。今回、由来が異なる A 群溶レン菌株について、PFGE の方法、その有用性について検討するとともに、発赤毒遺伝子型（以下、*spe* 型）についても併せて検討した。

その結果、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I とともに *Mutanolysin* 処理した方が明瞭なバンドが得られた。制限酵素により泳動パターンに違いが認められたことより、*Sma* I および *Sfi* I の 2 種類の制限酵素を組み合わせる解析することが望ましいものと考えられた。また、T-B3264 は *speB* 遺伝子を保有し、T-28 は *speB*, *C* 遺伝子を保有しており、由来による差は認められなかった。

A. 研究目的

A 群溶血レンサ球菌（以下、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（TB3264）、1998 年に熊本市（T28）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

い液由来株について、PFGE 法の分子疫学的解析の有用性を検討し、発赤毒遺伝子型（以下、*spe* 型）についても併せて検討した。

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 6 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 方法

PFGE の方法は、図 1 に示す方法で実

施した。「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、①溶菌液の工夫、②使用する制限酵素、③泳動条件について検討した。

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。つまり、被検菌を Todd-Hewitt ブロスで 36°C、16-20 時間培養した菌液 1,000 μ l を 1.5ml の滅菌チューブに分取する。12,000rpm5 分遠心後、沈渣に滅菌蒸留水を 1,000 μ l 加えよく混和後、12,000rpm5 分遠心する。沈渣に滅菌蒸留水を 100 μ l 加えよく混和後、100°C、10 分加熱して溶菌し、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 6,7,9) (T-B3264) 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) の泳動パターンを図 2,3,4,5 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 でも咽頭ぬぐい液由来の 3 株とは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 T-28 と同一の咽頭ぬぐい液由来の 3 株は、*Sma* I では同一パターンを示したが、*Sfi* I では集団事例由来株と咽頭ぬぐい液由来株との間で異なるパターンを示した。

このことから A 群溶レン菌の PFGE 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と思われた。

2. Mutanolysin 処理と Lysozyme 処理の比較

各々の泳動パターンを図 2,3,4,5 に示した。Lysozyme 処理に比べ Mutanolysin で処理をした方が明瞭なバンドを得ることができ、より正確な解析が可能と考えられた。

3. PCR 法による *spe* 遺伝子保有状況

T-B3264 の福岡市事例由来 4 株と咽頭ぬぐい液由来の 3 株は *speB* 遺伝子を保有し、T-28 の熊本市事例由来 2 株と咽頭ぬぐい液由来の 3 株は *speB*、*C* 遺伝子を保有しており、由来による差は認められなかった。

D. 考察

疫学的解析方法の手段として、PFGE 法のほか、T 型別や *spe* 遺伝子型などがあるが、同じ T 型や *spe* 遺伝子型を有する株においても PFGE 法が異なることが確認され、その分子疫学的解析の有用性が示された。A 群溶レン菌の PFGE 法で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が、*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。しかし、*Sma* I については、今回の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。また、制限酵素を作用させる前の溶菌処理は明瞭なバンドを得るために重要であり、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が示されたが、Mutanolysin は高価であり、その適切な使用量について検討する必要がある。

E. 今後の課題

1. Mutanolysin の濃度の検討
2. *Sma* I の泳動条件の改良
3. PFGE 法の確立と応用