

パルスフィールドゲル電気泳動法によるコミュニティプラント排水中の腸球菌の分子生物学的解析

宮崎大学大学院工学研究科 ○高橋 寛敬(学)

宮崎大学工学部 鈴木 祥広(正)

宮崎大学農学部 吉田 照豊

1. はじめに

細菌の遺伝子型別手法は、細菌の保有する遺伝子の構造や、制限酵素を用いて DNA 切断パターンを解析する手法であり、細菌の検出・同定に極めて有効な手法の一つである。細菌の遺伝子解析に広く用いられている PCR 法は、短期間で細菌の検出や菌種の同定が可能である。しかしながら、ある特定の遺伝子配列をターゲットとしているため、同一菌種間の遺伝子構造を解析することは困難である。PCR 法に対して、院内感染の感染源追及に用いられているパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)は、一回の解析には一週間ほど時間を要するものの、同一菌種間の遺伝子構造の比較が可能であり、感染ルートや感染源の特定が可能である。そこで、PFGE を水環境に適用し、ふん便性細菌の汚染追跡手法に利用することを検討している。本研究では、人畜のふん便汚染指標細菌である腸球菌(*Enterococci*)に着目し、ヒト由来の生活排水を対象として、腸球菌の単離および同定法を行った後、PFGE を適用して、同一菌種間の類似性、相同性の解析を行った。

2. 実験方法

2.1 腸球菌採取

ヒト由来の腸球菌を単離するため、ペット保有が禁じられている住宅団地のコミュニティプラント処理排水(プラント排水)を採取した。プラント排水は滅菌生理食塩水を用いて希釈し、メンブランフィルターでろ過した。ろ過したメンブランフィルターをレンサ球菌選択培地(Difco, KF *Streptococcus* 寒天培地:KF 培地)に乗せ、この KF 培地を 37°C, 48 時間培養した。KF 培地に形成された赤またはピンク色のコロニーを腸球菌と判定した。この試料について、シングルコロニーを釣菌し、Todd Hewitt 培地(Difco, TH 培地)に単離して、37°C, 48 時間培養した。

2.2 ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による菌種の同定

TH 培地で単離した各菌株を TH 培地に植種し、37°C, 24 時間培養して各菌株を増殖させ、続いて、Insta Gene Matrix 液(Bio Rad)を用いて DNA 抽出を行った。次に、16S rDNA 領域を特異的に増殖するプライマー^{1), 2)}を用いて PCR 法による菌種の同定を行った。

2.3 レンサ球菌同定キットによる菌種の同定

菌種同定は、レンサ球菌同定キット api 20 Strep(BIOMERIEUX)を用いた。測定操作法に従い、37°C, 24 時間好機条件下で培養した。培養した後、判定表に従って判定し、apiweb(BIOMERIEUX)で菌種を同定した。

2.4 パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

PFGE はジーンパスグループ 1 試薬キット(Bio Rad)のプロトコールに準じたマニュアルを一部変更して実施した。*Sma* I 制限酵素(Bio Rad)により、染色体 DNA を切断し、泳動装置 CHEF DR II (Bio Rad)において、6.0V/cm、スイッチタイムを 5.3 秒から 34.9 秒、泳動時間 20 時間、14°Cの泳動条件で行った。PFGE の泳動パターンは、遺伝子解析用ソフト Gene Profiler(Scanalytic)を用いて解析し系統樹を作成した。

3. 実験結果

3.1 PCR 法および性状試験の同定

KF 培地で形成されたコロニーから単離した菌株 100 株について PCR 法による同定をおこなった。図1に *E.faecium* および *E.faecalis* と同定された菌株の割合を示す。PCR 法において、*E.faecium* が 76 株(76%)と最も多く存在し、*E.faecalis* は 4 株(4%)であった。また KF 培地で形成したコロニーの 20%は *E.faecium* と *E.faecalis* 以外の菌種であった。

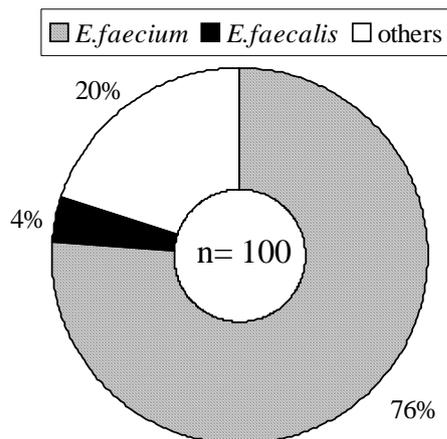


図1 PCR 法による *E. faecium* と *E. faecalis* の菌株の割合

キーワード: *E. faecalis*, *E. faecium*, 菌種同定, PFGE

連絡先: 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1 宮崎大学 Tel 0985-58-7339

3.2 api 20 Strep 試験による菌種の同定

PCR 法によって *E.faecium* と *E.faecalis* と同定された 80 株について, api 20 Strep 試験による同定を行った。api 20 Strep を用いた同定試験において, *E.faecium* が 63 株(79%)と最も多く分離され, *E.faecalis* が 4 株(5%)となった(図 2)。PCR 法によって同定された *E.faecium* 76 株のうち, api 20 Strep 試験では 63 株(83%)が陽性と判別され, 13 株(17%)が陰性と判別された。*E.faecalis* においては, 4 株のすべてが陽性と判別された。陰性と同定された 13 株についてみると, *E.avium* や *Aerococcus viridans*, *Leuconostoc* spp と同定された。

KF 培地に形成されるコロニーのうち, *E.faecium* が 63%で最も多く, 次いで *E.faecalis* が 4%となった。環境水から検出される腸球菌としては *E.faecium* が最も多いことが報告されている³⁾。プラント排水中の主要な腸球菌は *E.faecium* であることがわかった。*E.faecium* が環境水中に多く分布していることが推測されることから, ふん便汚染の指標細菌として最も適当であると判断し, 遺伝子型別解析手法に適用することにした。

3.2 PFGE 解析

PCR 法と api 20 Strep 試験のいずれの試験において *E.faecium* と同定された 25 株について, PFGE の泳動パターンの相同性を解析した(図 3)。他の PFGE 泳動パターン⁴⁾と比較すると類似した泳動パターンを示した。遺伝子的相同性 50%で検討すると, 8 つのタイプに分類された。その中でも, タイプ I が 6 株, タイプ III が 6 株と最も多かった。さらに, 相同性 20%で検討すると, 2 つの異なるタイプが検出され, プラント排水中の *E.faecium* はこれら 2 つのタイプに分けられることが言える。ヒト由来の同一菌種と同定された *E.faecium* において, 泳動パターンの違いから分類や特徴づけが可能であることが明らかとなった。

4. まとめ

- (1) KF 培地で形成されるコロニーのうち, *E.faecium* が 63%を占めた。プラント排水中の腸球菌の主要菌種は *E.faecium* である。
- (2) プラント排水から分離された *E.faecium* は, 泳動パターンの違いから 8 つのタイプに分類された。相同性を 20%として大まかに分類すると 2 つのタイプに分けられた。
- (3) PFGE による泳動パターンを解析することによって, 同一菌種についても分類・特徴づけが可能である。

参考文献

- 1) Dongyou, L., Clinling, W., Swiatlo, E.J. and Lawrence, M.L.: PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*, *Research in Microbiology*, vol.156, pp. 944-948, 2005.
- 2) Shuqiu C., McCleskey, F.K., Gress, M.J., Petroziello, J.M., Rui, L., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A. and DelVecchio, V. G.: A PCR Assay for Identification of *Enterococcus faecium*, *Journal of Clinical Microbiology*, pp.1248-1250, 1997.
- 3) 国府島泉: 水質汚染指標としての腸球菌の菌種分類, *日本水処理生物学会誌*, Vol.27, pp.107-110, 1991.
- 4) 満田年宏: 感染対策のための分子疫学入門, メディカ出版, pp.119-121, 2002.

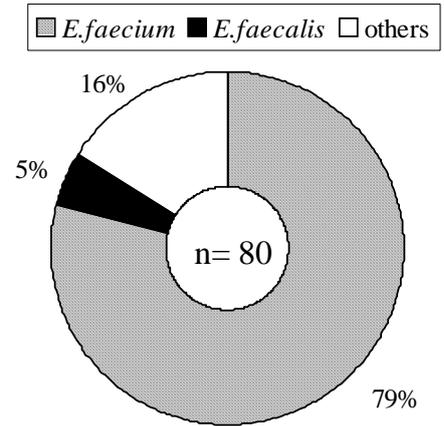


図 2 PCR 法によって菌種同定された 80 株における api 20 Strep 試験による *E.faecium* と *E.faecalis* の菌株の割合

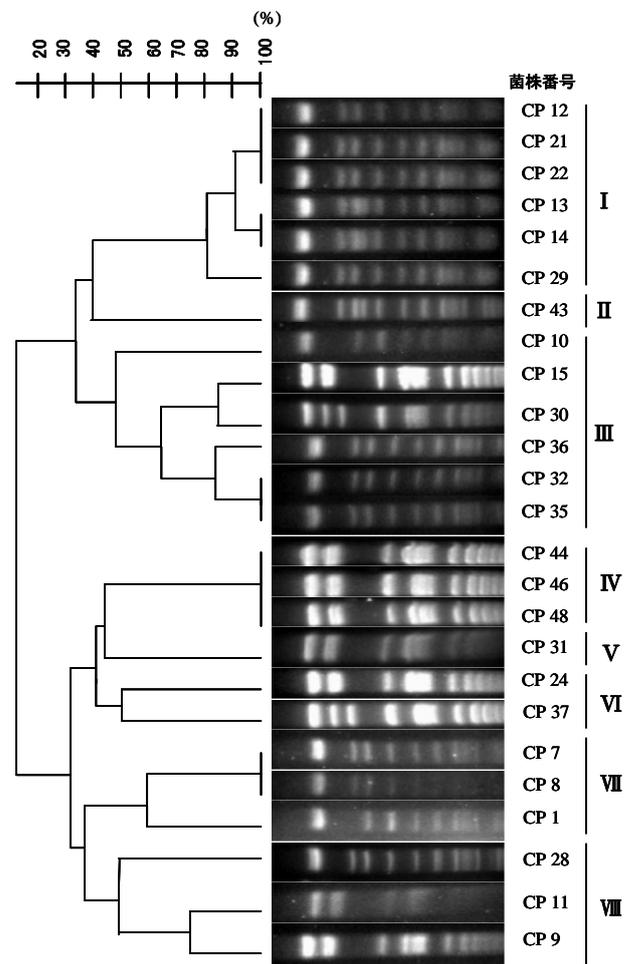


図 3 *E.faecium* の系統樹