

B-48 パルスフィールドゲル電気泳動法による ふん便性細菌の汚染源の追跡に関する基礎的検討

○高橋 寛敬^{1*}・鈴木 祥広²・吉田 照豊³

¹宮崎大学大学院工学研究科(〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1)

²宮崎大学工学部土木環境工学科(〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1)

³宮崎大学農学部生物環境科学科(〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1)

* E-mail : takahashi1823@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

世界的に見ても水質保全技術・管理が最も進んでいる我が国の水環境において、ふん便に由来する病原性細菌・ウイルス汚染による人間への感染・発症リスクは、それほど低くないことが報告され始めてきており、早急の汚染防止対策が求められている。一見、清浄と見られる水環境においても、細菌学的には高いリスクに遭遇している可能性を否定できない。真に安心して生活できる水環境を構築するためには、水環境におけるふん便性細菌の汚染源を追跡できる手法の開発が強く望まれる。現在用いられている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極めて困難である。PCR 法に対して、パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-field Gel Electrophoresis : PFGE)は、細菌の DNA を回収し、特定の DNA を制限酵素処理後、DNA を電気泳動により分離することによって、同一菌種間の遺伝子構造の解析・比較が可能である。すでに PFGE 法は、院内感染の感染源・感染ルートを追跡する分子疫学的手法の標準解析手法として広く適用されている。

著者らは、PFGE 法を水環境に適用し、ふん便性細菌の汚染追跡手法に適用可能かどうか検討している。そこで本研究では、人畜のふん便汚染指標細菌である腸球菌(*Enterococcus*)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

ヒトの腸球菌を単離するため、ペットの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、0.45μm 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℃、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 100 株を釣菌し、Todd Hewitt 培地(Difco, TH 培地)に単離して、37℃、48 時間培養した。

2.2 菌種同定フロー

(1) 腸球菌同定手順

PFGE において、同一菌種間の電気泳動パターンを比較し、相同性、類似性を解析するためには、明確に同定された菌種が必要となる。そこで、今回行った菌種同定手順に従って菌種同定および PFGE 解析を行った(図 1)。

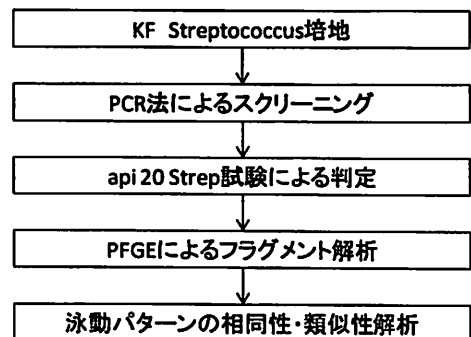


図 1 菌種同定手順

(2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によるスクリーニング

単離した菌株 100 株を、PCR 法による *E. faecium* と *E. faecalis* の 2 つの菌種に分離した。すなわち、TH 培地で単離した各菌株を TH 培地に植種し、37°C、24 時間で培養して各菌株を増殖させ、続いて、Insta Gene Matrix 液を用いて DNA 抽出を行った。次に、16S rDNA 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR 法による菌種の同定を行った(表 1)。増幅プログラムの条件は次のとおりである。前熱変性、94°C、2 分；熱変性、94°C、20 秒；アニーリング、62°C、20 秒；伸張反応、72°C、45 秒を 30 サイクル；最終伸張反応を 72°C、2 分を行った。電気泳動は 1% アガロースゲル、1× Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer で行い解析した。それぞれの菌種特異の PCR 産物の増幅を確認して同定した。

(3) グラム陽性球菌同定キット (連鎖球菌用) による判定

菌種同定は、グラム陽性球菌同定キット (連鎖球菌用) api 20 Strep(BIOMERIEUX)を用いた。測定操作法に従い、37°C、24 時間好気条件下で培養した。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。

2.3 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) のプロトコルに準じたマニュアルを一部変更して実施した。すなわち、2 つの同定試験によって菌種同定された菌株について、TH 培地に 37°C、24 時間培養した。培養した菌株をアガロースゲルで菌を包埋し、サンプルプラグを作成した。サンプルプラグをリゾチーム/リゾスタフィン溶液およびムタノリジン溶液 (Sigma) において 37°C、1 時間反応させ、菌体の細胞壁を破壊した。1× Wash Buffer でサンプルプラグを洗浄後、プロテナーゼ K 処理を 50°C、20 時間で行い、細胞壁および細胞質膜を消化した。1× Wash Buffer で 4 回洗浄後、1 プラグあたり 300 μl の Sma I Buffer に 5 unit の Sma I を添加し、25°C、20 時間反応させた。Sma I 制限酵素によって得られた DNA フラグメントサンプルプラグを 0.5× TBE Buffer を用い、1% の Pulsed Field Certified Agarose ゲル中に包埋し、スイッチタイムを 5.3 秒から 34.9 秒、泳動時間 20 時間、泳動用緩衝液温度 14°C の条件で泳動装置 CHEF DR II (Bio Rad) を用いて電気泳動を行った。電気泳動終了後、アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下、CCD カメラを用いて画像データを取り込んだ。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. 結果・考察

3.1 PCR 法による菌種のスクリーニング

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 法による同定を行った。図 2 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 培地で形成されたコロニーの 20% は、*E. faecium* と *E. faecalis* 以外の菌種であった。

表 1 菌種同定用 Primer 配列

Primer 配列 ^a	
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹⁾	F: 5'-GCCACTATTTCTCGGACAGC-3' R: 5'-GTCGTCCCTTTGGCAAATAA-3'
<i>E. faecium</i> ²⁾	F: 5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3' R: 5'-TATGACAGCGACTCCGATTCC-3'

^a F, forward primer; R, reverse primer

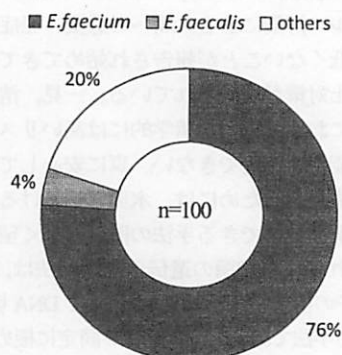


図 2 PCR 法による *E. faecium* と *E. faecalis* の菌株の割合

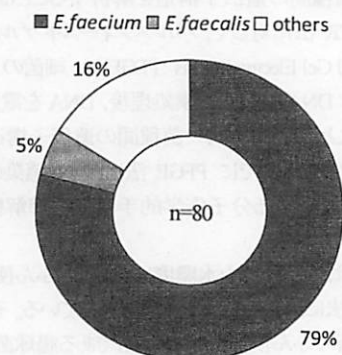


図 3 PCR 法によって菌種同定された 80 株における api 20 Strep 試験による *E. faecium* と *E. faecalis* の菌株の割合

3.2 グラム陽性球菌同定キットによる菌種の判定

PCR法によって*E. faecium*および*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試験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3)。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 viridians*、*Leuconostoc spp*と同定された。

KF培地に形成されるコロニーのうち、PCR法とapi 20 Strep試験いずれの試験においても、同一菌種として同定された株は、*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⁾。コミュニティ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*が水環境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、PFGE法に適用することにした。

3.3 PFGE泳動パターン解析

PCR法とapi 20 Strep試験のいずれの試験においても*E. faecium*と同定された63株について、PFGEの泳動パターンの相同性を解析した。図4に、代表となるPFGE泳動パターンを示す。遺伝子の相同性50%で検討すると、4つのタイプに分類された。中でもAタイプが6パターンと最も多かった。さらに他のPFGE泳動パターン⁴⁾と比較するとAタイプが類似した泳動パターンを示した。10のPFGEタイプの分布について、表2に示す。A6タイプが21株(33%)と最も多く存在し、次いでA1タイプが16株(25%)であった。プラント排水中の*E. faecium*は、A1タイプおよびA6タイプが多く分布した。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、相同性を50%として大分類すると4つのタイプに分類された。相同性95%では泳動パターンの違いから10のPFGEタイプに分類された。

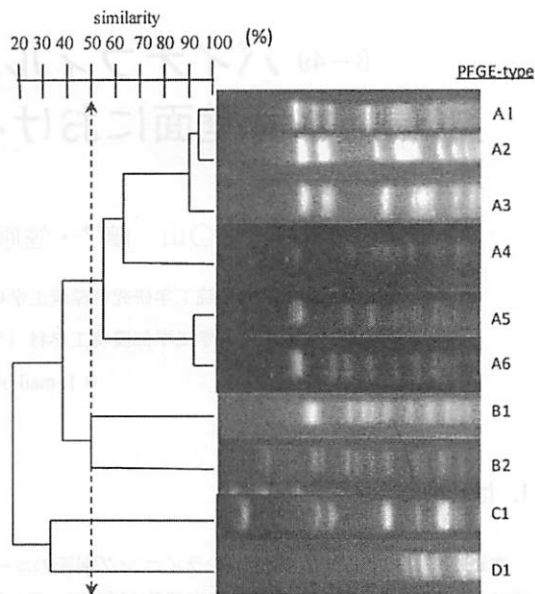


図4 *E. faecium* の系統樹

表2 *E. faecium* の PFGE タイプの分布

PFGE-type	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	C1	D1	Total
菌株数	16	10	2	1	6	21	1	4	1	1	63
割合(%)	25	16	3	2	9	33	2	6	2	2	100%

- (3) プラント排水中の*E. faecium*は、2つのPFGEタイプ(A6, A1)が多く分布していることがわかった。
- (4) 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.