

パルスフィールドゲル電気泳動法の迅速・簡便化の検討

阿部有利・新宮聡美・廣野未来

福岡市保健環境研究所保健科学課

Examination of Rapid and Simplified Protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Yuri ABE, Satomi SHINGU and Miku HIRONO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

分子疫学解析法として有用なパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法について、検査の簡便化と迅速化を図るため、プラグ作製及び溶菌酵素処理方法の改良を行った。福岡市において検査需要の高い疾病の病原体のうち 8 疾病 13 菌種を対象とし、グラム陰性菌は改良非酵素法、グラム陽性菌は改良した溶菌酵素処理方法と改良非酵素法を組み合わせた迅速法で PFGE 解析を行い、適用菌種の確認を行った。その結果、全ての対象菌種で明瞭なバンドが得られ、従来の方法と比較して検査工程の簡便化と時間短縮が可能となり、危機事案発生時により迅速に解析結果を還元できるようになった。

Key Words : 分子疫学解析 Molecular epidemiological analysis, パルスフィールドゲル電気泳動法 Pulsed-field gel electrophoresis protocol, 非酵素法 Nonenzymatic protocol, DNA 抽出 DNA extraction

1 はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法は細菌の分子疫学解析法の一つで、福岡市保健環境研究所では薬剤耐性菌の院内感染疑い事例や腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症等の集団事例が発生した際、分離菌株の異同や菌株間の関連性を調べるために実施している。

PFGE 法は、識別能が高く、汎用性が高いという利点がある一方、検査工程が煩雑で、結果が得られるまでに時間（4～5 日間）を要するという問題点がある。近年、煩雑な工程の一つである DNA 抽出に酵素（プロテナーゼ K 等）を使用せず、高濃度の尿素と界面活性剤を使用する非酵素法が開発され¹⁾、一部の菌種で適用が報告されている²⁾。また、この非酵素法を改良し、より簡便で迅速化された方法（改良非酵素法）が開発され、PFGE 法の問題点である検査時間の長さ、検査工程の煩雑さの改善が期待されているが、適用の報告は、グラム陰性菌の一部菌種に限定されている³⁾。

そこで、分子疫学解析が必要な危機事案発生時に備え、

福岡市において検査需要の高い薬剤耐性菌感染症や感染性胃腸炎等の病原体のうち、グラム陰性菌について改良非酵素法が適用可能であるか確認を行った。また、グラム陽性菌について、従来の溶菌酵素処理方法の改良を行い、改良非酵素法と組み合わせた迅速法が適用可能であるか検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 供試菌株

薬剤耐性菌感染症 6 疾病の病原体（カルバペネム耐性腸内細菌目細菌：CRE、薬剤耐性緑膿菌：MDRP、薬剤耐性アシネトバクター：MDRA、バンコマイシン耐性腸球菌：VRE、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌：VRSA、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌：MRSA）、腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症及び感染性胃腸炎の病原体を対象とし、当所の保存菌株及び標準菌株の 13 菌種 39 株を供試菌株とした。菌種の内訳を表 1 に示す。

表1 供試菌株

疾病	菌種	株数
CRE 感染症	<i>Enterobacter cloacae</i>	4
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
	<i>Serratia marcescens</i>	3
	<i>Citrobacter freundii</i>	3
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
MDRA 感染症	<i>Acinetobacter baumannii</i> (標準菌株)	3
MDRP 感染症	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (標準菌株)	3
EHEC 感染症	<i>Escherichia coli</i>	4
感染性胃腸炎	<i>Salmonella Stanley</i>	3
VRE 感染症	<i>Enterococcus faecium</i>	2
	<i>Enterococcus faecalis</i> (標準菌株)	2
MRSA 感染症	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
VRSA 感染症		

2.2 改良非酵素法の適用菌種の確認（グラム陰性菌）

2.2.1 検査手順

PFGE 法はグラム陰性菌 10 菌種を対象とし、既報^{3, 4)}に準じて実施した。検査プロトコルを表 2、検査条件を表 3 に示す。

2.3 溶菌酵素処理方法の改良及び迅速法の適用菌種の確認（グラム陽性菌）

2.3.1 プラグ作製及び溶菌酵素処理方法の改良

グラム陽性菌 3 菌種を対象とし、プラグ作製及び溶菌酵素処理の方法は国立感染症研究所の研修配布資料^{5, 6)}を参考にして改良した。

2.3.2 迅速法の適用菌種の確認

PFGE 法は対象 3 菌種について、2.3.1 で改良した溶菌酵素処理方法と改良非酵素法を組み合わせた方法(迅速法)で実施した。検査プロトコルを表 4、検査条件を表 5 に示す。

表2 改良非酵素法の検査プロトコール

工程	改良非酵素法
1 日目	菌株の準備 - 供試菌を MH 寒天培地に塗抹し、36℃で 12～18 時間培養する。 菌液調整及びプラグ作製 - 菌を滅菌 TE(pH8.0)に懸濁し、マクファーランド 3～4 程度に菌液を調整する。 - 菌液を 1%Seakem Gold Agarose (Lonza)ゲル液に等量加えて混和後、プラグモールド (Bio-Rad)に入れ、氷上で固化させる。 菌体処理 - 菌体処理液 (5 M 尿素, 1% Triton X-100 in 0.1 M EDTA(pH8.0), 121℃ 15 分間オートクレーブ) 1 mL にプラグを入れ、80℃で 1 時間静置する。(振盪不可)
2 日目	洗浄 - チューブを氷冷後、プラグを泳動用の大きさにカットする。 - カットしたプラグを TE(pH8.0) 1 mL に入れ、途中チューブを 1 回転倒混和し、室温で 5 分間洗浄する。 制限酵素処理 - FastDigest 制限酵素 (Thermo Fisher Scientific) 溶液 50 µL (酵素量 5 µL) にプラグを入れ、37℃で 15 分間反応させる。 泳動 - プラグをコームに貼付け、1%Seakem Gold Agarose in 0.5×TBEで固めて泳動用ゲルを作製し、各菌種の泳動条件で泳動する。
3 日目	染色及び撮影 ゲルを 0.3 µg/mL エチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色後、UV 下で撮影する。

表3 グラム陰性菌の PFGE 検査条件

疾病	菌種	制限酵素の条件※		泳動条件	
		制限酵素	反応温度 (°C)	スイッチング時間 (sec)	泳動時間 (h)
CRE 感染症	<i>Enterobacter cloacae</i>	FastDigest BcuI	37	12.6～40.1	19
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	FastDigest XbaI			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FastDigest XbaI			
	<i>Serratia marcescens</i>	FastDigest BcuI			
	<i>Citrobacter freundii</i>	FastDigest XbaI			
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	FastDigest XbaI			
MDRA 感染症	<i>Acinetobacter baumannii</i>	FastDigest ApaI	37	1.79～21.79	19
MDRP 感染症	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FastDigest BcuI	37	2.98～30.82	19
EHEC 感染症	<i>Escherichia coli</i>	FastDigest XbaI	37	12.6～40.1	19
感染性胃腸炎	<i>Salmonella</i> Stanley	FastDigest XbaI	37	12.6～40.1	19

表4 迅速法の検査プロトコール

工程		迅速法
1 日目	菌株の準備	・ 供試菌を MH 寒天培地に塗抹し, 36°C で 18～24 時間培養する.
	菌液調整	・ 菌を滅菌 TE(pH8.0) に懸濁し, マクファーランド 4～5 程度に菌液を調整する.
2 日目	プラグ作製及び 溶菌酵素処理	<i>E. faecium</i> / <i>E. faecalis</i> ・ 菌液 200 µL にリゾチーム液 (20 mg/mL in TE(pH8.0)) を 10 µL 加え, 50°C で 15 分間振盪する.
		<i>S. aureus</i> ・ 菌液 300 µL にリゾスタフィン溶液 (1mg/mL in TE(pH8.0)) を 4 µL 加える.
	菌体処理	・ 1.2% Seakem Gold Agarose ゲル液に菌液を等量加えて混和後, プラグモールド (Bio-Rad) に入れ, 氷上で固化させる.
		・ 溶菌酵素用 buffer (0.1 M NaCl, 0.5% N-lauroylsarcosine in 0.1 M EDTA(pH8.0)) 1 mL にプラグを入れ, 37°C で 1 時間振盪する.
	洗浄	・ チューブを氷冷後, プラグを泳動用の大きさにカットする.
	制限酵素処理	・ FastDigest 制限酵素 (Thermo Fisher Scientific) 溶液 50 µL (酵素量 5 µL) にプラグを入れ, 37°C で 15 分間反応させる.
3 日目	泳動	・ プラグをコームに貼付け, 1% Seakem Gold Agarose in 0.5×TBE で固めて泳動用ゲルを作製し, 各菌種の泳動条件で泳動する.
		・ ゲルを 0.3 µg/mL エチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色後, UV 下で撮影する.

表5 グラム陽性菌の PFGE 検査条件

疾病	菌種	制限酵素の条件※		泳動条件	
		制限酵素	反応温度 (°C)	スイッチング時間 (sec)	泳動時間 (h)
VRE 感染症	<i>Enterococcus faecium</i>	FastDigest SmaI	37	2.98～17.33	20
	<i>Enterococcus faecalis</i>			2.16～26.29	21
VRSA 感染症 MRSA 感染症	<i>Staphylococcus aureus</i>	FastDigest SmaI	37	2.98～35.38	19

3 実験結果

3.1 改良非酵素法の適用菌種の確認（グラム陰性菌）

対象 10 菌種について改良非酵素法で解析したところ、全ての株で明瞭なバンドが認められた。各菌種の泳動像を図 1 に示す。

3.2 溶菌酵素処理方法の改良及び迅速法の適用菌種の確認（グラム陽性菌）

対象 3 菌種について、溶菌酵素処理方法を改良し、改良非酵素法と組み合わせた迅速法で解析したところ、全ての株で明瞭なバンドが認められた。各菌種の泳動像を図 2 に示す。

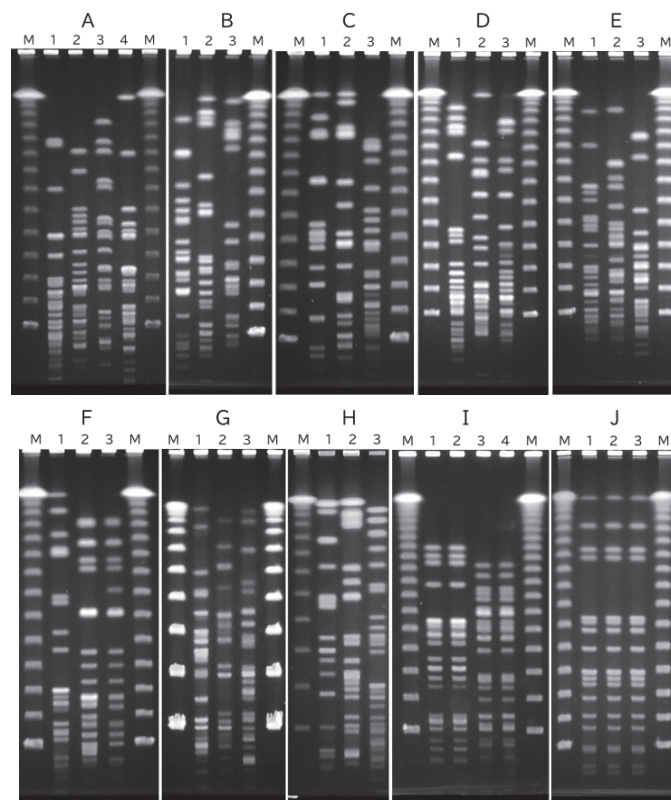


図1 PFGE 泳動像（グラム陰性菌）

A : *Enterobacter cloacae* (1～4), B : *Klebsiella aerogenes* (1～3), C : *Klebsiella pneumonia* (1～3),
D : *Serratia marcescens* (1～3), E : *Citrobacter freundii* (1～3), F : *Klebsiella oxytoca* (1～3),
G : *Acinetobacter baumannii* (1～3), H : *Pseudomonas aeruginosa* (1～3),
I : *Escherichia coli* (1～4), J : *Salmonella Stanley* (1～3),
M : Lambda Ladder (Bio-Rad)

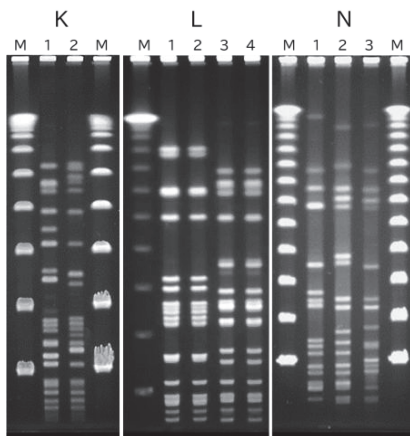


図2 PFGE 泳動像（グラム陽性菌）

K : *Enterococcus faecium* (1~2),

L : *Enterococcus faecalis* (1~4),

N : *Staphylococcus aureus* (1~3),

M : Lambda Ladder (Bio-Rad)

4 まとめ

薬剤耐性菌の院内感染事例発生時には、感染状況把握や伝播経路解明等のため迅速な PFGE 検査対応が求められる。また、患者等からの菌分離が長期間にわたることが多く、煩雑な検査工程で時間がかかる従来の方法では、これらに逐次対応することは困難であった。今回、検査需要が高い疾病の病原体を対象として、改良非酵素法及び改良した溶菌酵素処理方法と組み合わせた迅速法が適用可能であるか検討を行った。その結果、全ての菌種について明瞭なバンドが得られ、これらの検査法が適用可能であることが確認された。

今回検討した方法を導入することで、従来の方法では結果が得られるまでにグラム陰性菌で4日間、グラム陽性菌で5日間要していたが、今回検討した方法ではいずれも3日間で結果が得られ、検査工程の簡便化と時間短縮により、連日でも迅速な検査対応が可能となった。また、プロティナーゼ K 等の高価な試薬や有害性のあるプロティナーゼ不活化剤 (Pefabloc SC) を使用しないため、従来の方法より低コストで安全な検査が可能となった。今後も危機事案発生時に備えて、必要に応じて適用菌種の確認を行い、検査体制の強化に努めていきたい。

文献

- 1) 西海弘城, 他: パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出, 兵庫県立健康環境科学研究所紀要, 4, 40~43, 2007
- 2) 野田万希子, 他: 非酵素法で行うパルスフィールド・ゲル電気泳動の適用菌種の検討, 岐阜県保健環境研究所報, 19, 5~10, 2011
- 3) 白木豊: 非酵素法の改良による迅速・簡便なパルスフィールドゲル電気泳動法の開発, 獣医公衆衛生研究, 22, 71~74, 2019
- 4) 下田由布子, 他: パルスフィールドゲル電気泳動法による薬剤耐性菌の分子疫学解析法の検討, 福岡市保健環境研究所報, 49, 86~90, 2024
- 5) 国立感染症研究所: 令和元年度 薬剤耐性菌の検査に関する研修タイピングコース I 配布資料, 2019年9月25日
- 6) 国立感染症研究所: 平成22年度 薬剤耐性菌解析機能強化技術研修 配布資料, 2010