

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

下田由布子・田村佐和子*・新宮聡美・阿部有利

福岡市保健環境研究所保健科学課

*港湾空港局港湾計画部みなと環境政策課

Examination of the Molecular Epidemiological Analysis Method by Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Antimicrobial Resistant Bacteria

Yuko SHIMODA , Sawako TAMURA* , Satomi SHINGU and Yuri ABE

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Port Environment Section, Port Planning Department, Port & Airport Bureau

要約

福岡市内における薬剤耐性菌の院内感染事例の発生に備え、伝播経路の解明等に有用なパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による分子疫学解析の検査条件の検討を行った。感染症法における5類全数報告対象の薬剤耐性菌感染症のうち、市内発生例があるカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）感染症及びバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）感染症の2疾病について、市内発生数が多いCRE7菌種及び国内発生例があるVRE2菌種を対象とした。福岡市保健環境研究所で従来保有していたPFGE装置を用いて、対象菌種の泳動条件等を検討し、至適検査条件を確定した。また、装置の違いによる影響を確認するため、新規導入したPFGE装置を用いて、従来保有装置で確定した検査条件でPFGE法を実施し、泳動画像の比較を行った。比較の結果、当所保有の新旧2台のPFGE装置は、同じ検査条件で解析可能であった。対象菌種についてPFGE法の検査マニュアルを作成し、分子疫学解析の検査法を整備した。

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, カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 Carbapenem-resistant Enterobacterales, バンコマイシン耐性腸球菌 Vancomycin-resistant Enterococci

1 はじめに

薬剤耐性菌による院内感染事例は国内で度々発生がみられ問題となっている。福岡市では感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、「感染症法」とする。）における5類全数報告対象の薬剤耐性菌感染症の発生数が多く、院内感染事例の発生リスクが高い。院内感染は発生すると終息までに時間を要し、病原体や状況によっては致死的にもなりうるため、感染拡大防止措置等に迅速な対応が求められる。また、施設内の感染状況把握及び伝播経路の解明には、患者の疫学調査と病原体の分子疫学調査が不可欠であるため、福岡市保健環境研究所での分子疫学解析の検査対応が求められている。

薬剤耐性菌の分子疫学解析はパルスフィールドゲル電気泳動（以下、「PFGE」とする。）法が有用であるが、その泳動条件は菌種や装置の設置状況等により異なるため、統一されたマニュアルがなく、各施設で保有する装置の至適条件を検討しておく必要がある。そこで、院内感染事例発生時に迅速に分子疫学解析を実施し、感染拡大防止措置等に役立てるため、本市で発生数が多いカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（以下、「CRE」とする。）感染症の7菌種及び国内発生例のあるバンコマイシン耐性腸球菌（以下、「VRE」とする。）感染症の2菌種について、当所保有の装置におけるPFGE法の至適検査条件の検討を行った。

2 実験方法

2.1 供試菌株

CRE 感染症は本市で発生数の多い7 菌種, VRE 感染症は国内発生例のある2 菌種を対象とした. 市内で分離された CRE 7 菌種 35 株, VRE 1 菌種 (*E. faecium*) 4 株及び腸球菌 (*E. faecalis*) の標準菌株 3 株を供試菌株とした. 菌種の内訳を表 1 に示す.

2.2 PFGE 法

2.2.1 検査手順

PFGE 法は国立感染症研究所(以下, 「感染研」とする.) のプロトコール¹⁾ 及び研修配布資料^{2), 3)} に準じて実施した. 検査手順を表 2 に示す.

表 1 供試菌株

疾病	菌種	菌株数
CRE 感染症	<i>Enterobacter cloacae</i>	5
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
	<i>Serratia marcescens</i>	6
	<i>Citrobacter freundii</i>	5
	<i>Escherichia coli</i>	5
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4
VRE 感染症	<i>Enterococcus faecium</i>	4
	<i>Enterococcus faecalis</i> (標準菌株)	3

表2 PFGE法の検査手順

	CRE	VRE
菌株の準備	<ul style="list-style-type: none"> 供試菌をミュラーヒントン寒天培地に塗抹し, 濃密塗抹部分にセフトジジムディスクを置き, 36°Cで12~18時間培養する. 	<ul style="list-style-type: none"> 供試菌をミュラーヒントン寒天培地に塗抹し, 濃密塗抹部分にバンコマイシンディスクを置き, 36°Cで18~24時間培養する.
菌液調整及びプラグ作製	<ul style="list-style-type: none"> 菌を滅菌水に懸濁し, 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, プラグモールドに入れ, 氷上で固化させる. (1検体につきプラグ2枚作製) 	<ul style="list-style-type: none"> 菌を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. 菌液を1.2% InCert Agarose (Lonza)ゲル液に等量加えて混和後, プラグモールドに入れ, 氷上で固化させる. (1検体につきプラグ2枚作製)
リゾチーム処理	なし	<ul style="list-style-type: none"> プラグ2枚を2 mg/mLリゾチーム溶液1 mLに入れ, 37°Cでover night 振盪する. TE(pH8.0)で, 2~3回プラグとチューブを洗浄する.
プロティナーゼK処理	<ul style="list-style-type: none"> プラグ2枚を1 mg/mL プロティナーゼK, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5 M EDTA(pH8.0) 2 mLに入れ, 50°Cでover night 振盪する. 	<ul style="list-style-type: none"> 1 mg/mL プロティナーゼK, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5 M EDTA(pH8.0) 2 mLを加え, 50°Cでover night 振盪する.
プロティナーゼK不活化処理	<ul style="list-style-type: none"> プラグを4 mM Pefabloc SC(Roche)in TE(pH8.0) 2 mLに入れ, 50°Cで20分間振盪を2回行う. プラグとチューブをTE(pH8.0)で洗浄する. TE(pH8.0)を入れ替え, 50°Cで20分間振盪を2回行い, プラグを洗浄する. プラグを泳動用の大きさにカットする. 	<ul style="list-style-type: none"> プラグを4 mM Pefabloc SC(Roche)in TE(pH8.0) 2 mLに入れ, 50°Cで20分間振盪を2回行う. プラグとチューブをTE(pH8.0)で洗浄する. TE(pH8.0)を入れ替え, 50°Cで20分間振盪を2回行い, プラグを洗浄する. プラグを泳動用の大きさにカットする.
制限酵素処理	<ul style="list-style-type: none"> カットしたプラグを制限酵素用Buffer 300 µLに入れ, 使用する酵素の反応温度で20分間振盪する. Bufferを除去し, 制限酵素液(30 U/プラグ)200 µLを加え, 使用する酵素の反応温度で3時間振盪する. 0.5×TBEに入れ替え, 泳動まで室温で静置する. 	<ul style="list-style-type: none"> カットしたプラグを制限酵素用Buffer 300 µLに入れ, 使用する酵素の反応温度で20分間振盪する. Bufferを除去し, 制限酵素液(30 U/プラグ)200 µLを加え, 使用する酵素の反応温度で3時間振盪する. 0.5×TBEに入れ替え, 泳動まで室温で静置する.
泳動	<ul style="list-style-type: none"> プラグをコームに貼付け, 1% Seakem Gold Agarose in 0.5×TBEで固め, 泳動用ゲルを作製する. 各菌種の泳動条件で泳動する. 	<ul style="list-style-type: none"> プラグをコームに貼付け, 1% Seakem Gold Agarose in 0.5×TBEで固め, 泳動用ゲルを作製する. 各菌種の泳動条件で泳動する.
染色及び撮影	<ul style="list-style-type: none"> 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. 	<ul style="list-style-type: none"> 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.

2.2.2 泳動条件の検討

泳動には、平成 24 年度に導入した CHEF Mapper XA システム (Bio-Rad) (装置 1) を用いた。泳動は感染研の研修配布資料^{2, 3)}の検査条件を参考に実施した。泳動像において、レーン全体にバンドがシャープに分離され、最下段のバンドがゲル下端から 1~1.5 cm 程度に収まるようにスイッチング時間及び泳動時間を調整し、各菌種の至適泳動条件の検討を行った。その他の泳動条件は、感染研の研修配布資料^{2, 3)}を参考に、電圧：6 v/cm, 泳動 buffer：0.5×TBE, 泳動 buffer 温度：14℃, 電圧角度：120° とし、対象菌種全て同じ条件で実施した。

2.2.3 新規導入装置での解析

令和 5 年度に新規導入した CHEF Mapper XA システム (Bio-Rad) (装置 2) を用いて、装置 1 で確定した至適検査条件で PFGE 法を実施した。各菌種について、装置

1 及び装置 2 の泳動画像を比較した。

3 実験結果

3.1 PFGE 法の検査条件

装置 1 を用いて各菌種の泳動条件の検討を行い、確定した PFGE 法の検査条件を表 3 に示す。

3.2 新旧装置における泳動像の比較

装置 2 を用いて、3.1 で確定した検査条件で PFGE 法を実施し、装置 1 及び装置 2 の泳動画像を比較した結果、全ての菌種においてバンドの位置に大きな差は認められなかった。装置 1 及び装置 2 における各菌種の泳動像を図 1~図 9 に示す。

表3 PFGE法の検査条件

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>	SpeI	37	12.6~40.1	19
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	SpeI	37	2.98~21.79	20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	XbaI	37	12.6~40.1	19
	<i>Serratia marcescens</i>	SpeI	37	12.6~40.1	19
	<i>Citrobacter freundii</i>	XbaI	37	12.6~40.1	18.5
	<i>Escherichia coli</i>	XbaI	37	12.6~40.1	19
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	XbaI	37	12.6~40.1	19
VRE感染症	<i>Enterococcus faecalis</i>	SmaI	30	2.16~26.29	21
	<i>Enterococcus faecium</i>	SmaI	30	2.98~17.33	20

※制限酵素の濃度及び反応時間は全菌種同じ条件で実施。(濃度：30 U/プラグ, 反応時間：3時間)

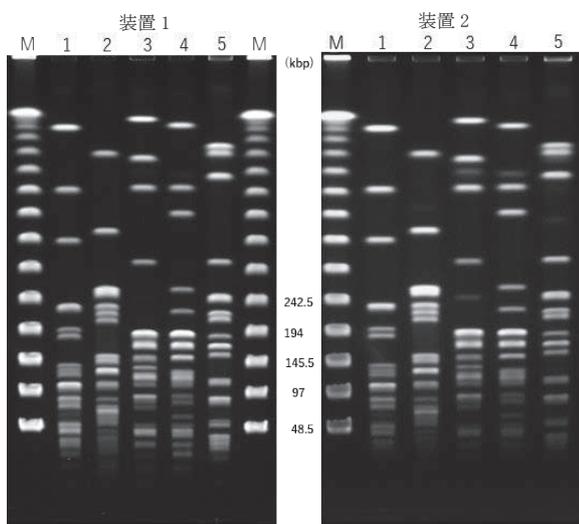


図 1 *Enterobacter cloacae* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~5 : *Enterobacter cloacae*

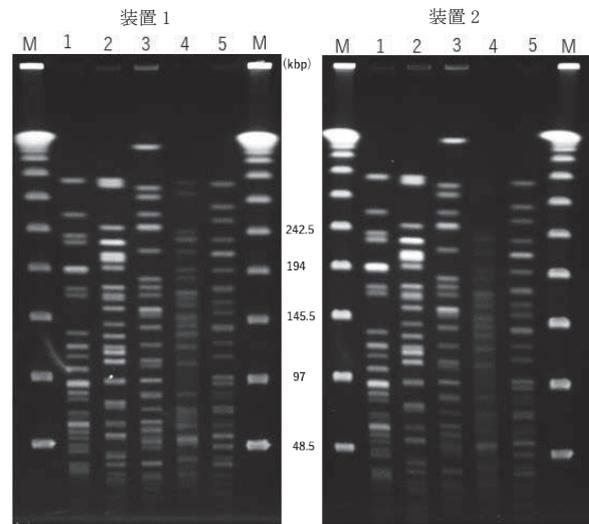


図 2 *Klebsiella aerogenes* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~5 : *Klebsiella aerogenes*

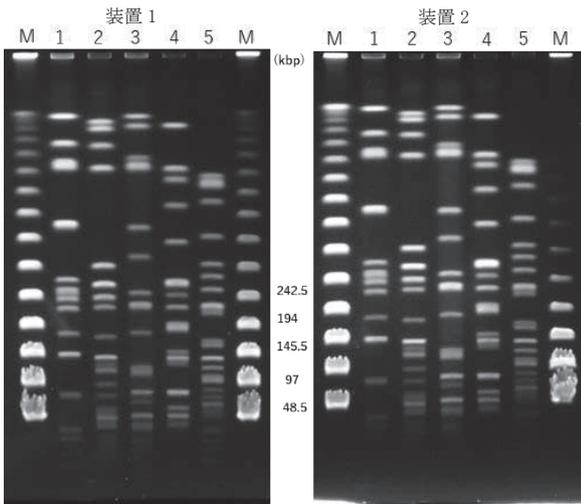


図3 *Klebsiella pneumoniae* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~5 : *Klebsiella pneumoniae*

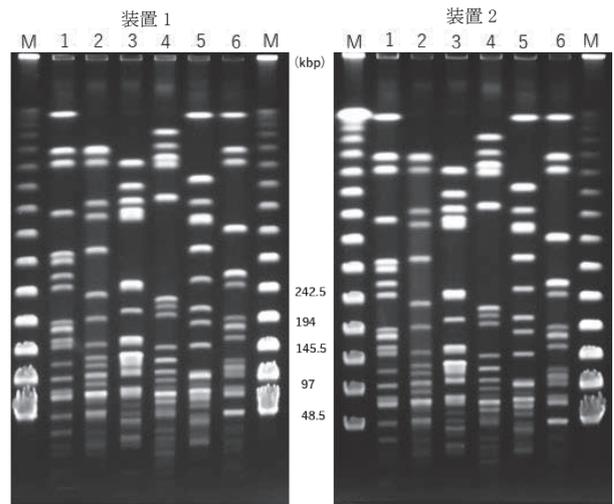


図4 *Serratia marcescens* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~6 : *Serratia marcescens*

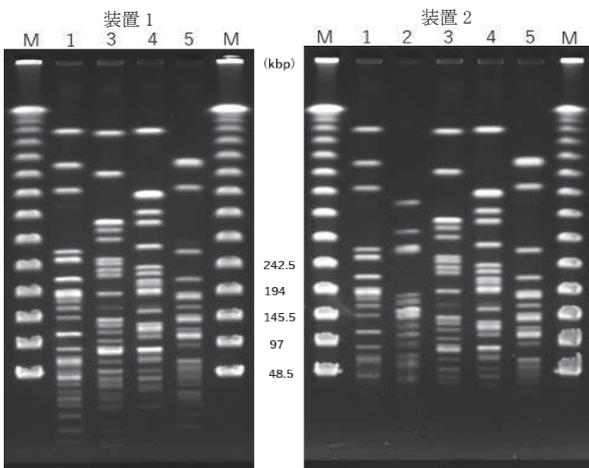


図5 *Citrobacter freundii* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~5 : *Citrobacter freundii*

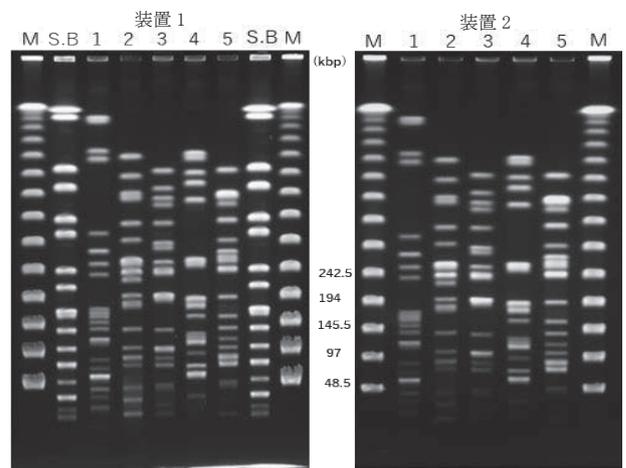


図6 *Escherichia coli* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
S.B : *Salmonella Braenderup* (マーカー菌株)
1~5 : *Escherichia coli*

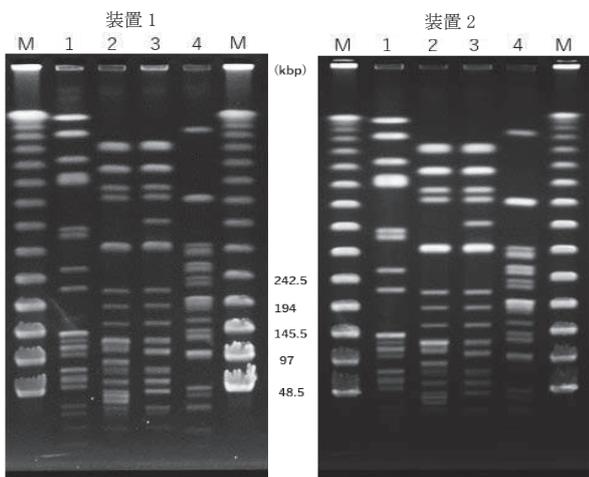


図7 *Klebsiella oxytoca* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~4 : *Klebsiella oxytoca*

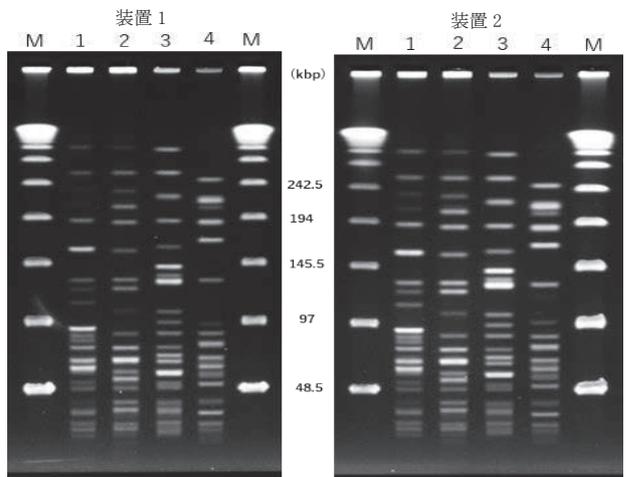


図8 *Enterococcus faecium* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~4 : *Enterococcus faecium*

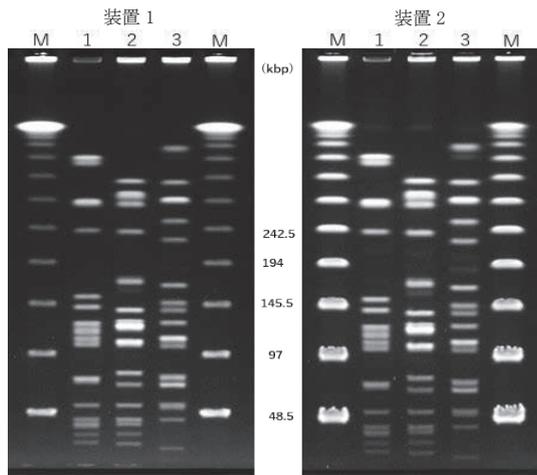


図9 *Enterococcus faecalis* の PFGE 泳動像
M : Lambda Ladder(Bio-Rad)
1~3 : *Enterococcus faecalis*

4 まとめ

本市での薬剤耐性菌の院内感染事例発生に備えて、市内発生数が多いCRE感染症の7菌種及び国内発生例のあるVRE感染症の2菌種について、PFGE法による分子疫学解析法の検査条件の検討を行った。

PFGE法は感染研のプロトコール^{2, 3)}で実施し、リゾチーム、プロテイナーゼK及び制限酵素の酵素類については、感染研の検査条件で問題なく処理できることを確認した。しかしながら、泳動については、当所保有の装置を用いると、ほぼ全ての菌種の泳動像でバンドがゲル下端からはみ出してしまい、感染研の検査条件では泳動時間が長すぎる結果となった。そのため、レーン全体にバンドが分離し、最下段のバンドがゲル下端から1~1.5cm程度に収まる泳動像となるよう、スイッチング時間と

泳動時間を調整し、泳動条件の検討を行った。

泳動条件の検討の結果、感染研と当所で至適泳動時間は大きく異なったが、これは装置の違いが要因の一つではないかと考えられた。そこで、装置の違いによる影響を確認するため、当所保有の従来装置と新規導入装置の2台について、同じ検査条件での泳動像を比較したところ、全ての菌種で両装置のバンドの位置に大きな差は認められなかった。PFGE法の泳動条件に影響を与える要因には、泳動装置以外に泳動bufferの流速等が考えられるが、今回、当所保有の2台の装置については同じ検査条件で解析可能であった。対象菌種について、当所保有装置におけるPFGE法の検査条件が確定し、疾病別に検査マニュアルを作成した。

本市では薬剤耐性菌による院内感染事例の発生リスクが高いため、薬剤耐性菌対策の強化が課題である。今回、市内発生リスクの高い疾病・菌種を対象にPFGE法による検査条件を確定し、事例発生時に備えた検査体制を整備することができた。今後は、国内発生例のあるその他の薬剤耐性菌感染症についても検査法を整備し、薬剤耐性菌の検査体制の強化に努めていきたい。

文献

- 1) 国立感染症研究所：パルスフィールドゲル電気泳動法 PFGE プロトコール，2010年11月
- 2) 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
- 3) 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年