

## 分子疫学的手法によるセラチア菌の識別と その精度に関する研究

～ ICN への導入の視点から～

上田京佳<sup>1)</sup>, 佐藤美友紀<sup>1)</sup>, 片田裕子<sup>1)</sup>, 今西信子<sup>2)</sup>, 落合 宏<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 富山医科薬科大学医学部看護学科人間科学1

<sup>2)</sup> 同医学部和漢診療学講座

### 要 旨

環境汚染菌による病院感染において、その感染に関わった最終的な汚染器具や医療行為は特定された例があるが、それに至る汚染源や伝播経路が明らかにされた例は極めて少ない。このようなことは病院感染対策上重要であり、感染管理看護師（ICN）も病院感染対策チームの一員として協力することが期待される。そこで、環境汚染菌の代表的存在であるセラチア菌16菌株を対象として伝播経路追求法として有用なRandom amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) 法, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 法とInfrequent restriction site PCR (IRS-PCR) 法の3つの方法を、看護分野への導入の視点から、主として簡便性と識別精度の点から比較検討した。その結果、供試16菌株は、最多で15タイプ（RAPD-PCR法、プライマー1）、最少で7タイプ（RAPD-PCR法、プライマー3）に識別された。RAPD-PCR（プライマー1）とPFGE法（13タイプ）の間で識別精度では大きな差は無かったものの、検査に要する時間では両法間に大きな差があった（前者2日と後者7日）。また、手技の簡便性でも、制限酵素処理や複雑な電気泳動を必要としない点で前者に有利性が認められた。これらのことから、少なくともセラチア菌による病院感染流行発生時、その対策構築に協力するICNの立場から、汚染源・伝播経路追求をとしてRAPD-PCR（プライマー1）を採用することが推奨された。

### キーワード

セラチア菌, 分子疫学, 環境汚染, 感染看護

#### 1 はじめに

今日の日本の医療現場で最も多く遭遇し、臨床的にも問題とされる院内（病院）感染の原因菌はメチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）であるが、これに対し、最近数年間に我が国でセラチア菌による特異な集団院内感染事例が連続して発生した。一般には耳慣れないこの細菌による感染症は、現代の医療体制の盲点、問題点を突いた極めて示唆

的な事件であったといえる<sup>1)</sup>。

セラチア菌はグラム陰性短桿菌であり、元来赤色の色素prodigiosinを産生し、ペニシリン系や第一世代セファロsporin系抗生物質に感受性が低いという特性を示す<sup>2,3)</sup>。正常宿主に対する病原性は極めて低く、最初は河川や泥中から分離される非病原性細菌とみなされていたが、1960年代に入りヒトの病原体として認識されるようになった<sup>1)</sup>。益井らは血液分離菌の動向を調べ、グラム

陰性菌では大腸菌が減少傾向を示し、セラチア菌が増加傾向にあると報告している<sup>4)</sup>。能登らの菌血症例の報告でも、グラム陰性菌の中ではセラチア菌が多い<sup>5)</sup>。このことから、セラチア菌の院内感染症における重要度は増してきていることが指摘されている<sup>6)</sup>。セラチア菌は10菌種に分類されるが、臨床的に最も多くみられるのは *Serratia marcescens* であり、問題となる感染症は呼吸器、尿路、血流（菌血症／敗血症）などの感染症である<sup>1,7)</sup>。その感染源としては、洗面台、食物、花、植物、スポンジ、接着テープ、蒸留水、手洗い用消毒液、ひげそりのブラシと石鹸、コンタクトレンズの洗浄溶液、採血管、採尿管、レスピレーター機器、間欠的陽圧呼吸（IPPB）機器、ネブライザー、静脈カテーテル、動脈圧モニター、気管支鏡、注射液、血漿製剤、輸血、生理食塩水ボトル、ネイルブラシ、吸入機具、搾乳器、そして石鹸などが報告されている<sup>4)</sup>。これらは病院等で日常にみられ、使用頻度も高いものであることは注目すべきことである。

最近、東京、大阪、愛知の病院でセラチア菌病院感染の事例が相次いで報告されてきた<sup>8)</sup>。調査によれば点滴ラインの最終的感染源はヘパリン液あるいはアルコール綿であるとされている。しかし、セラチア菌感染の源として、どこかでこの菌が増殖している場所が存在していたに違いない。病院感染において、その感染に関わった最終的な汚染器具あるいは医療行為は上記のように特定されてきた例がある。しかしながら、ほとんどの場合、最初の汚染源からどのような経路を経て、この菌が伝播してきたのかが明らかにされておらず、感染源・伝播経路の追求は、このように慢性的に繰り返して起こる病院感染の再発防止のためにも重要であると考え<sup>8)</sup>。その方法として従来より、色素産生性、血清型、バクテリオシン（マルセッシン）型、ファージ型、薬剤感受性パターンなどの生物型別による分析が主流を占めてきた<sup>7)</sup>。感染源・伝播経路追求の原理は、個々の菌株を識別することにあるが、これらの方法は識別精度の上で難点があった。その欠点を補うものとして、遺伝子塩基配列の相違識別に基づく分子疫学的手法の有用性が立証されてきている<sup>9~10)</sup>。

近年全国の病院に病院感染対策のために、医師・看護師・薬剤師・検査技師・事務系職員などからなる感染予防委員会が設置されてきた。これらの構成メンバーの中でも、患者に接する機会が多く現場に精通している看護師には、感染予防に関する全ての活動において中心的な役割を担うことが求められている。また、新たな検査技術の導入が単に検査技師への負担増となっては、役割分担の不均衡を生むばかりか医療チームの機能は半減してしまうであろう。この点を考慮して2001年より発足した日本のICN（感染管理認定看護師）の教育課程には、実践能力を高めるために分子疫学を含めた微生物実習・演習が組み込まれている<sup>12)</sup>。このような背景のもと、感染源・伝播経路の追求に有用とされている分子疫学的手法を看護領域の視点から追求することは意義あるものと考え、本研究ではセラチア菌を対象として、分子疫学的手法であるRandom Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction（RAPD-PCR）法、Pulsed Field Gel Electrophoresis（PFGE）法とInfrequent Restriction Site PCR（IRS-PCR）法の3つの方法を、看護分野への導入の視点から、主として簡便性と識別精度の点から比較検討した。

## II 研究材料と方法

### 1 供試セラチア菌とその培養

セラチア菌は、新潟大学農学部仲川洋治先生より分与を受けた臨床材料由来の計16株を用いた。供試菌株はミューラー・ヒントン・ブローズ（MHB, DIFCO）を液体培地に接種し、37℃で一晩培養して使用した。得られた新鮮培養液の一部は、その1mlに80%グリセロール250μlを加えて80℃で凍結保存した。また、MHBに寒天（Agar Noble, Difco）を1.5%に加えた寒天培地をコロニー選択に用いた。

### 2 セラチア菌からのDNAの抽出

寒天培地で一晩培養した菌から、1コロニーを

選択し、滅菌楊枝の先端で釣菌し、マイクロチューブに入った proteinase K (PK) buffer (PK, 144  $\mu$ g/ml) 500  $\mu$ l に接種し、50°C 数時間にて溶菌させた。その後、約 100  $\mu$ l のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液 (25:24:1) を加え、ボルテックス後遠心 (1200回転, 20分間) し、上清を新しいマイクロチューブに移した。採取した上清の 1/10倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5倍量の 100%エタノール (EtOH) を加え、充分混和し -80°C で 30分以上放置した。その後、遠心 (1200回転, 20分) し、上清を捨て、100%EtOH 200  $\mu$ l を加え、同様に混和後遠心し、上清を除いた。その後、Tris-EDTA (TE) buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, pH8.0) 50  $\mu$ l に溶かし、4°C で保存した。そのうちの 1  $\mu$ l を用いて核酸の濃度測定を行い、その結果を基に、DNA濃度が 1  $\mu$ g/ml になるよう調製した。

### 3 RAPD-PCR法

抽出されたDNAを用いてPCR反応を行った。PCRに用いたランダムプライマーは、既報に、

基づき下記のように設定した<sup>13)</sup>。

Primer 1 : 5'-GCGATCCCCA-3'

Primer 2 : 5'-CCGCAGCCAA-3'

Primer 3 : 5'-CCCGGGATAA-3'

PCRの条件は、初回のみ94°C 5分で熱変性を行い、続けて変性94°C 1分、アニーリング39°C 1分、伸長72°C 2分を30サイクル行い、72°C 7分の後、4°Cで保存した。反応終了後、サンプル 10  $\mu$ l を1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後トランスイルミネーターで増幅産物のバンドを確認し写真撮影した。

### 4 PFGE 法<sup>14)</sup>

物理的なDNAの切断を避けるため、操作は細菌をアガロースゲル内に包埋して行った。約 109 colony forming units (CFU)/ml に調製した菌液を 1.2%低融点アガロースゲル内に固めたブロックを用い、エッペンドルフチューブ内で溶菌操作及び制限酵素によるDNAの切断を行った。溶菌のため、チューブにアクロモペプチターゼ (5mg/

表1 パルスフィールドゲル電気泳動法試薬一覧

- 1) Washing sol.  
15mM NaCl, 1mM EDTA(pH8.0)
- 2) PettIV sol.  
10mM Tris-HCl(pH8.0), 1M NaCl
- 3) Lysis sol.  
10mM Tris-HCl(pH8.0), 1M NaCl, 100mM EDTA(pH8.0)  
0.5% sodium lauroyl sarcosine, 2.0 deoxycholate, 0.5% Brij-58
- 4) 1.2%LMTアガロースゲル  
PettIV sol.にて溶解
- 5) ES sol.  
0.5M EDTA(pH8.0), 1.0% sodium lauroyl sarcosine
- 6) Pefabloc sol.  
0.36mg/ml: TE bufferで溶かす
- 7) TE buffer.  
10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA(pH8.0)
- 8) 酵素液 (楊枝調整)  
滅菌蒸留水 45  $\mu$ l, 10 $\times$ 酵素用 buffer 5  $\mu$ l, 制限酵素Spe I 5U
- 9) 1.0%アガロースゲル  
0.5 $\times$ TBEにて溶解
- 10) 10 $\times$ TBE  
1M Tris ase, 1M boric acid, 20mM EDTA(pH8.0)
- 11) エチジウムブロマイド水溶液  
0.5 $\times$ TBE11にエチジウムブロマイド50  $\mu$ lを加える

ml: Lysis 液 で溶かす) 400  $\mu$ l と リゾスタフィン (Takara) 20  $\mu$ l を加え, 37°C で一晩作用させた. 翌日 PK 液 (0.5mg/ml ES 液 で溶かす) 800  $\mu$ l の入った新しいエッペンドルフチューブにブロックを移し, さらに 50°C で一晩放置した. 溶菌操作後, 新しいエッペンドルフチューブを用い Pefabloc にて PK を不活化し, さらにブロックを TE buffer で洗浄後, 制限酵素液 (Spe I: Boehringer Mannheim) 50  $\mu$ l を加え, 37°C で一晩反応させ DNA の切断を行った. 酵素処理が終わった時点で 1.0% 低融点アガロースゲルにブロックを埋め込み, 隙間には 0.5% 同アガロースゲルを少量注ぎ 4°C で固化した. パルスフィールド電気泳動装置の泳動槽に  $\times 0.5$  Tris-borate EDTA (TBE) buffer を入れ, 冷却循環装置で泳動温度を 10°C にした後, ゲルを沈め, パルスタイム 3 ~ 80 秒, 電圧 200V で 23 時間泳動した. 泳動終了後エチジウムブロマイド染色液で染色し,  $\times 0.5$  TBE buffer で脱色し, 観察・撮影した. 尚, 本法に使用した試薬は表 1 に一覧した.

## 5 IRS-PCR法

IRS-PCR法は Mazurek らの方法<sup>15,16)</sup> を一部改変して行った. この方法原理を図1に示した.

本方法に特有なものとしてアダプターがあるが, それらの Oligonucleotides の配列は以下の通りである.

AH1: 5'-AGA ACT GAC CTC GAC TCG CAG G-3'

AH2: 5'-TGC GAG T-3'

AX1: 5'-PO<sub>4</sub> CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3'

AX2: 5'-GCC AGT A-3'

PX: 5'-AGA GTC TGC CAG TAC TAG A-3'

制限酵素 Hha I のアダプター (AH) は, AH1 と AH2 からなっており, 各 10 pmol/ $\mu$ l になるよう TE buffer に溶かし, 1 時間以上かけて 80°C から 4°C に冷やした. 制限酵素 Xba I のアダプター (AX) は AX1 と AX2 からなっており, AH と同

様に処理した. これらのアダプターは使用するまで -20°C で保存した. 実施にあたり, まず抽出 DNA を, 10U の Hha I と 15U の Xba I を用いて 37°C 1 時間で切断し, その後, Rapid DNA ligation kit (Boehringer Mannheim) を用い, AH と AX を常温 30 分で結合 (ligation) した. その後, 再編成された DNA 断片を再び Hha I, Xba I を用いて切断した. 続いて, プライマーとして AH1 と PX を用いて PCR 反応を行った. PCR の条件は, 初回のみ 95°C 5 分の熱変性を行い, 続けて変性 94°C 1 分, アニール 60°C 1.5 分, 伸長 72°C 1.5 分を 40 サイクル行い, さらに 2°C 7 分放置の後, 4°C で保存した. 反応終了後, サンプル 10  $\mu$ l を 3.0% アガロースゲルにて電気泳動し, PFGE 法同様に増幅産物のバンドを確認し, 写真撮影した.

## III 結果

### 1 RAPD-PCR法によるセラチア菌分離菌株の識別

#### (1) プライマー 1

プライマー 1 を用いた RAPD-PCR 法のパターンを図 2 に示した. 検出されたバンド数は菌株により 6 ~ 13 本に分布し, それらの泳動度から, 16 菌株は 15 タイプに分類され, タイプ A ~ O とした. 6 本バンドのタイプには 4 菌株が属したが, 2 菌株はバンドが同一位置に検出されたため, タイプ A ~ C の 3 タイプに分類した. 7 本バンドが検出された 1 菌株はタイプ D とした. 8 本バンドが検出された 3 菌株は各々独自のバンドパターンを示し, それぞれタイプ E ~ G とした. 9 本バンドが検出された 2 菌株もバンドの位置は互いに異なり, それぞれタイプ H とタイプ I とした. 10 本バンドが検出されたものには 4 菌株あったが, その内の 2 菌株はバンドが同一位置に検出された. その他は各々独自のバンドパターンを示し, それぞれタイプ J ~ M とした. 13 本バンドが検出された 1 菌株はタイプ N とした. 複数株が属したものはタイプ M のみであった.

## (2)プライマー-2

プライマー-2を用いたRAPD-PCRのパターンを図3に示した。検出されたバンド数は菌株により6～15本に分布し、それらの泳動度から、16菌株は13タイプに分類でき、タイプA～Mと命名した。6本バンドが検出された5菌株のうち、3菌株のバンドは同一位置に検出されタイプA～Cとした。7本バンドが検出された1菌株はタイプDとした。8本バンドが検出されたものに2菌株が

あったが、そのバンドの位置は互いに異なり、それぞれタイプE、タイプFとした。9本バンドが検出された1菌株はタイプGとした。10本バンドが検出された2菌株は、各々バンドの位置が異なり、それぞれタイプH、タイプIとした。13本バンドが検出された1菌株はタイプJとした。14本バンドが検出された3菌株のうち、2菌株のバンドは同一パターンを示し2タイプにまとめられ、タイプKとタイプLとした。15本バンドが検出さ

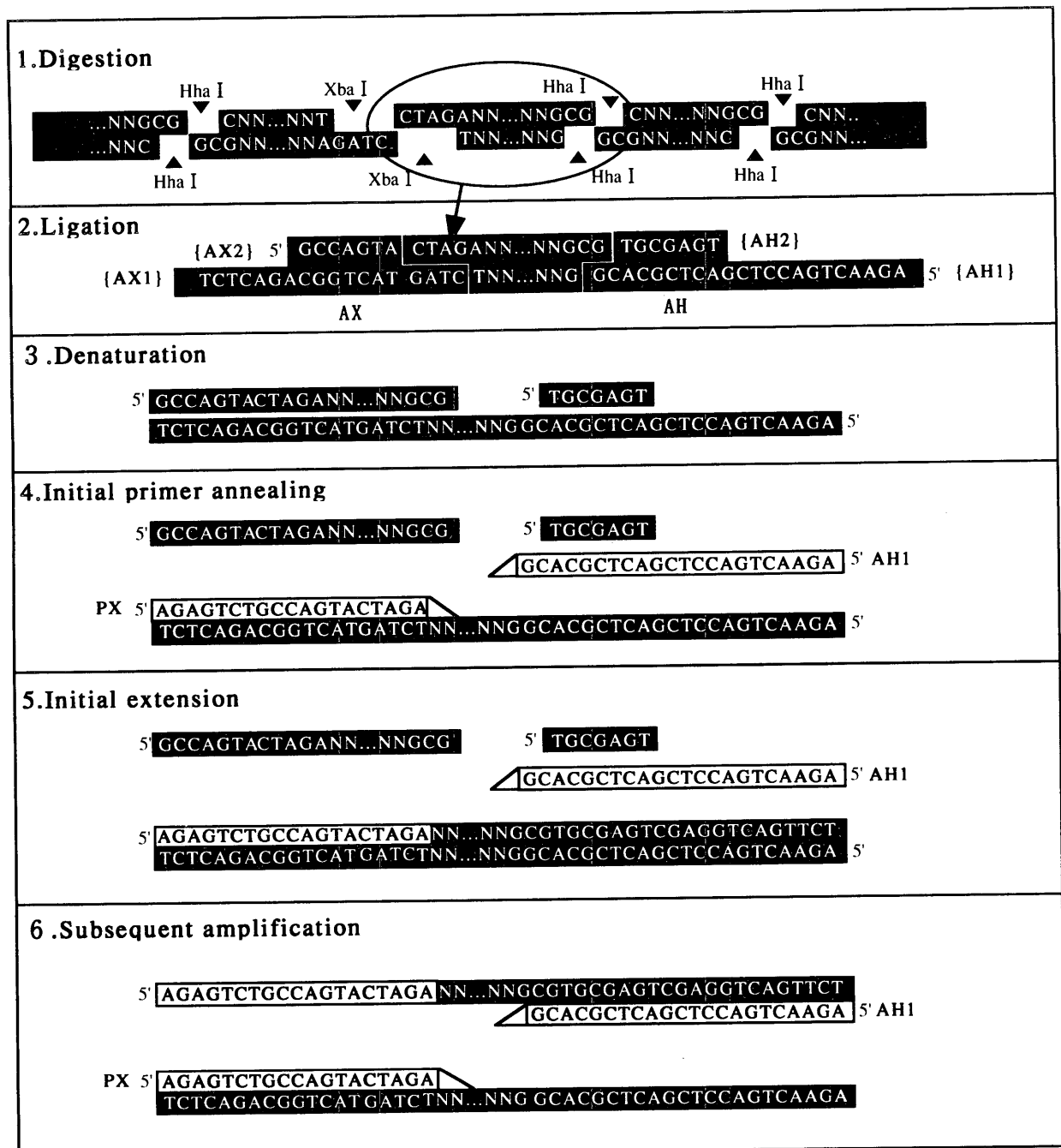
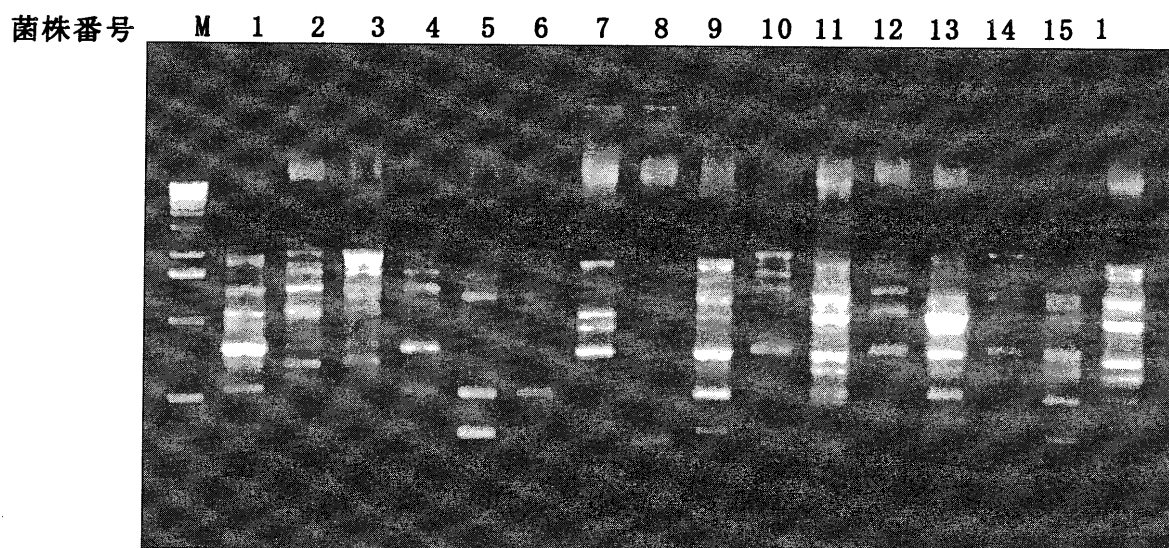
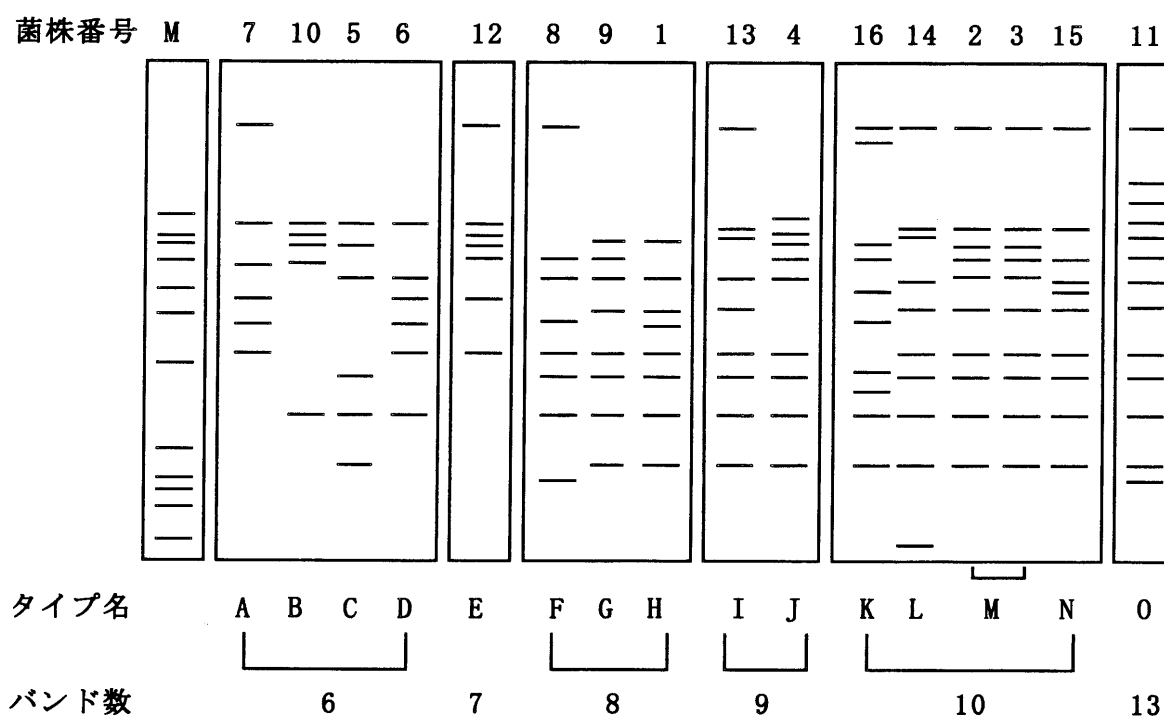


図1. IRS-PCRの方法原理 (文献15より)

A



B



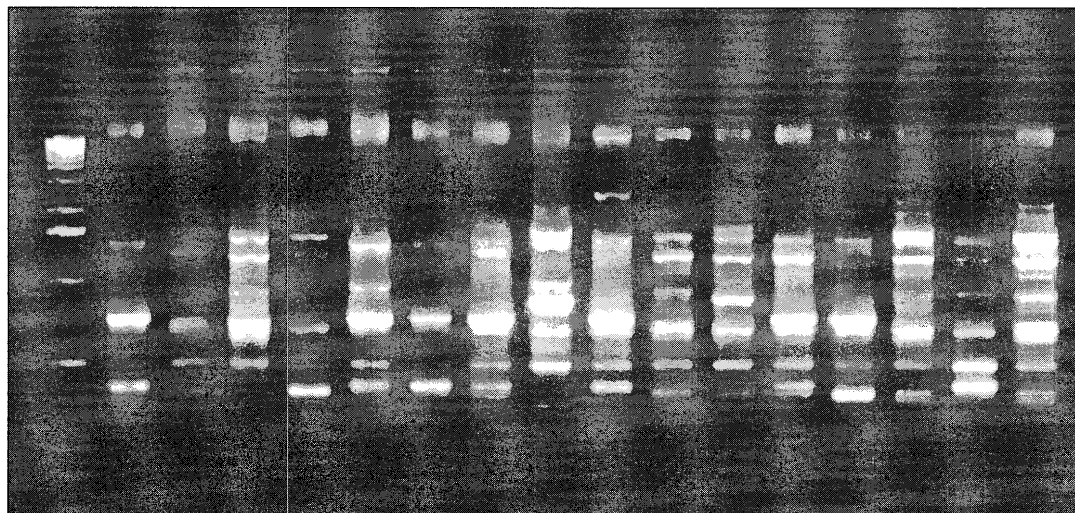
A: トランスイルミネーターでの観察によるRAPD-PCRパターン

B: 供試由来セラチア菌のRAPD-PCRパターンの模式図

図2 . RAPD-PCR法による菌株の識別 (プライマー1)

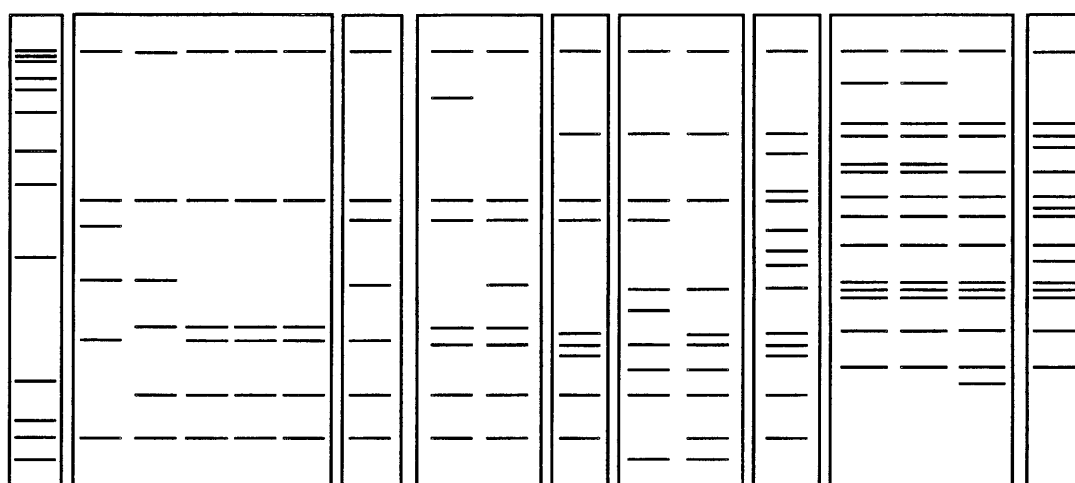
A

菌株番号 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



B

菌株番号 M 4 5 1 6 13 2 7 15 12 8 9 10 14 16 11 3



タイプ名

A B C D E F G H I J K L M

バンド数

6 7 8 9 10 13 14 15

A: トランスイルミネーターでの観察によるRAPD-PCRパターン

B: 供試セラチア菌のRAPD-PCRパターンの模式図

図3 . RAPD-PCR法による菌株の識別 (プライマー2)

れた1菌株はタイプMとした。複数株が属したものはタイプCおよびタイプKの2タイプであった。

### (3)プライマー3

プライマー3を用いたRAPD-PCRのパターンを図4に示した。検出されたバンド数は菌株により1～5本に分布し、それらの泳動度から、16菌株は7タイプ（タイプタイプA～G）に分類できた。1本バンドが検出されたタイプAには5菌株が属した。2本バンドが検出されたのは7菌株で、そのうち同じ位置にバンドが検出された6菌株をタイプB、その他をタイプCとした。3本バンドが検出された2菌株のバンドの位置は互いに異なり、タイプDとタイプEとした。5本バンドが検出された2菌株も各々異なるバンドパターンを示し、それぞれタイプF、タイプGとした。複数株が属したものはタイプAとタイプBの2タイプであった。

## 2. PFGE法によるRestriction fragment length polymorphism (RFLP) の検出

各セラチア菌16株のゲノムを制限酵素Spe I で切断して得られたDNA断片のPFGE後の検出パターンは、切断片の塩基長に依存して菌株に固有

のはしご状を呈した。撮影した写真を基に図5のように、生じたDNA断片のうち菌株の識別に適する明瞭なバンド6本に着目してI～IVグループと大別し、更に特定のグループを設定しタイピングを行った。その結果、Iで4タイプ（I-1～4）、IIは1タイプ、IIIは3タイプ（III-1～3）、IVは3タイプ（IV-1～3）、VとVIはそれぞれ1タイプの計13タイプに分類された。全く同一のPFLPを示したのはIII-3のみ（4株）であり、残りの12タイプには各1株のみが分布した。

## 3 IRS-PCR法による菌分離菌株の識別

得られたIRS-PCRパターンは図6に示した。検出されたバンド数は1～4本に分布し、それらの泳動度から、16菌株は9タイプに分類でき、タイプA～Iとした。1本バンドが検出された1菌株はタイプAとした。2本バンドが検出された2菌株は同一のバンドパターンを示し、タイプBとした。そのうち同じ位置にバンドが検出された6菌株をタイプB、その他をタイプCとした。3本バンドが検出された5菌株のうち、2菌株は同じ位置にバンドが検出されタイプC、タイプDとタイプEの3タイプに分類した。4本バンドが検出された8菌株のうち、2菌株と4菌株がそれぞれ同

表2 PAPD-PCR法, PFGE法, IRS-PCR法による遺伝子型別

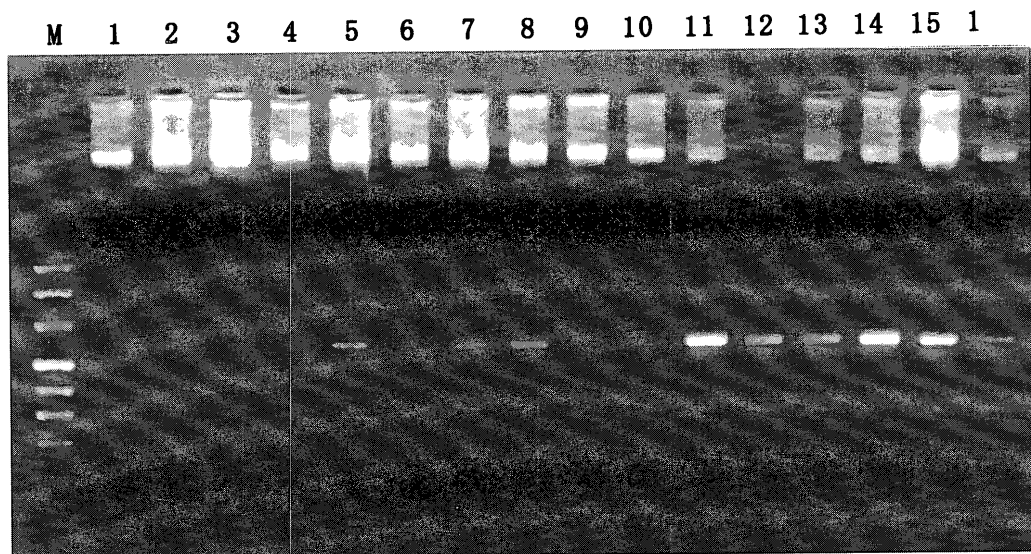
株番号	産生色素	遺伝子型名			PFGE法	IRS-PCR法
		プライマー1	プライマー2	プライマー3		
1	赤	H	C*	A*	III-1	C
2	ピンク	M*	D	A*	V	D*
3	赤	M*	M	B**	III-3*	D*
4	赤	J	A	E	III-3*	B**
5	赤	C	B	B**	I-4	A
6	無	D	C*	A*	III-2	G***
7	赤	A	E	G	III-3*	G***
8	赤	F	H	B**	III-3*	D*
9	赤	G	I	A*	I-1	G***
10	無	B	J	A*	IV-3	F
11	赤	O	L	D	I-3	I
12	赤	E	G	C	II-1	H
13	無	I	C*	F	IV-2	G***
14	赤	L	K**	B**	IV-2	E
15	ピンク	N	F	B**	I-2	B**
16	赤	K	K**	B**	VI	F
型別数		15	13	7	13	9

\*, \*\*, \*\*\*: それぞれ同じ遺伝子型を示す。



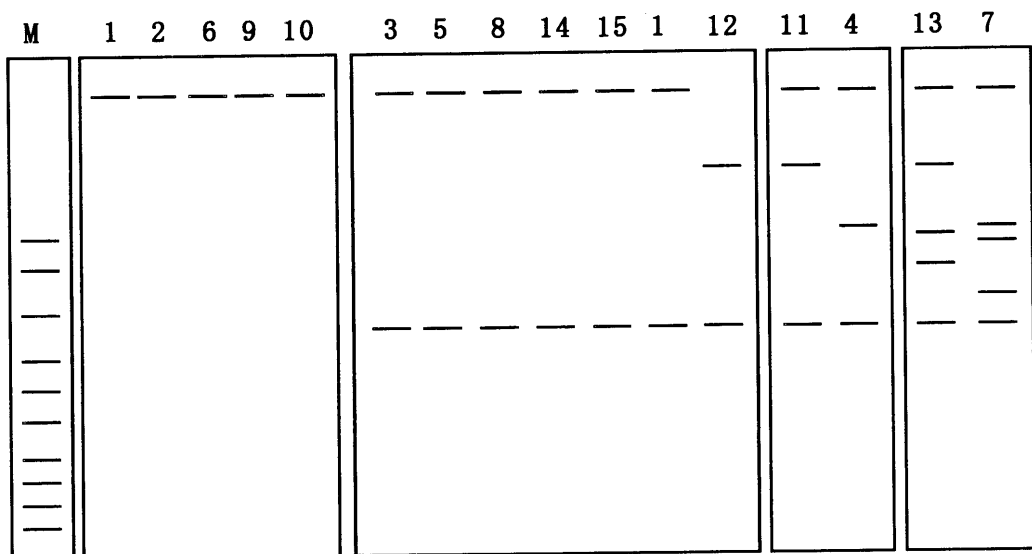
A

菌株番号



B

菌株番号



タイプ名

A

B

C

D

E

F

G

バンド数

1

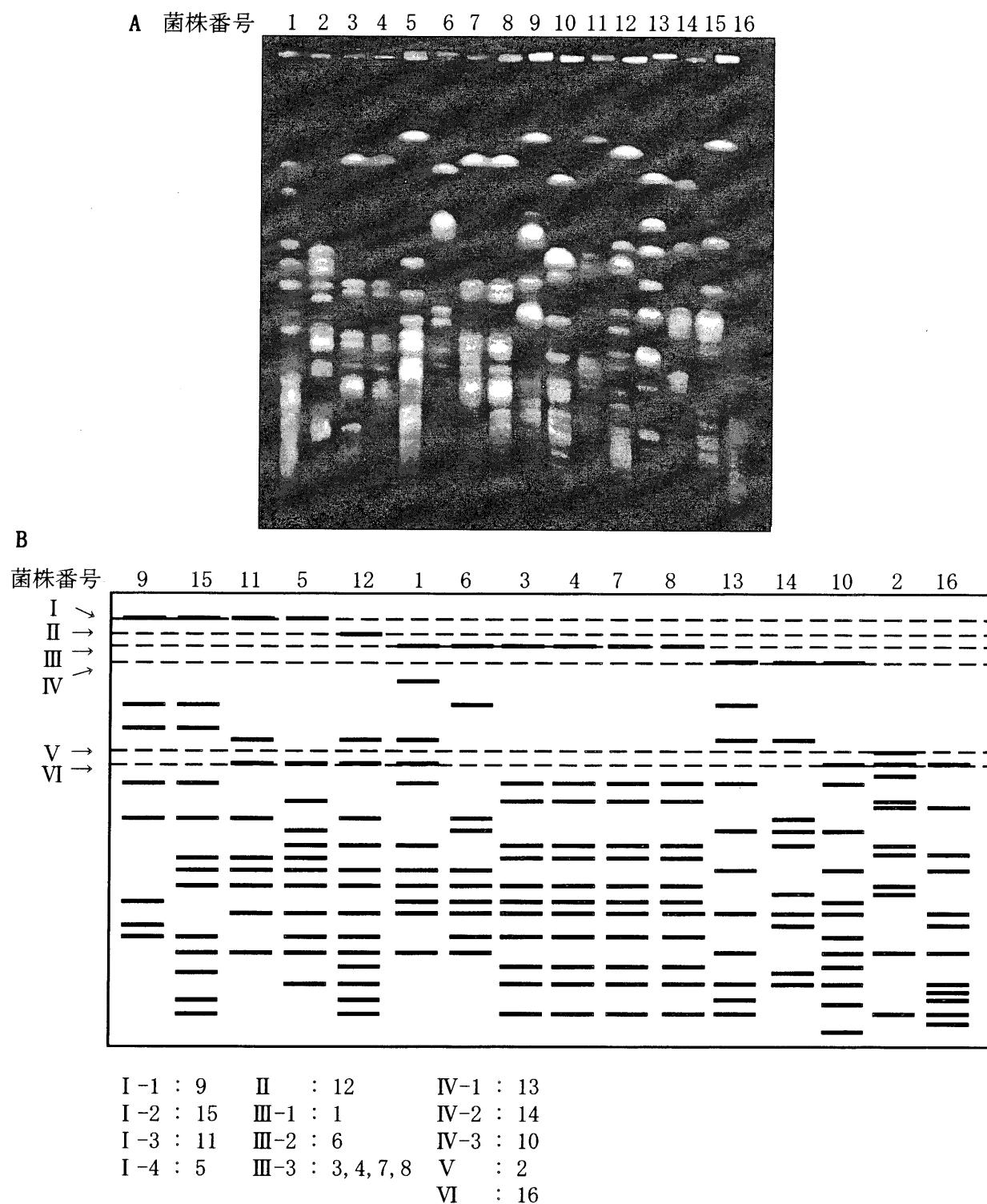
2

3

5

A: トランスイルミネーターでの観察によるRAPD-PCRパターン  
B: 環境由来セラチア菌のRAPD-PCRパターンの模式図

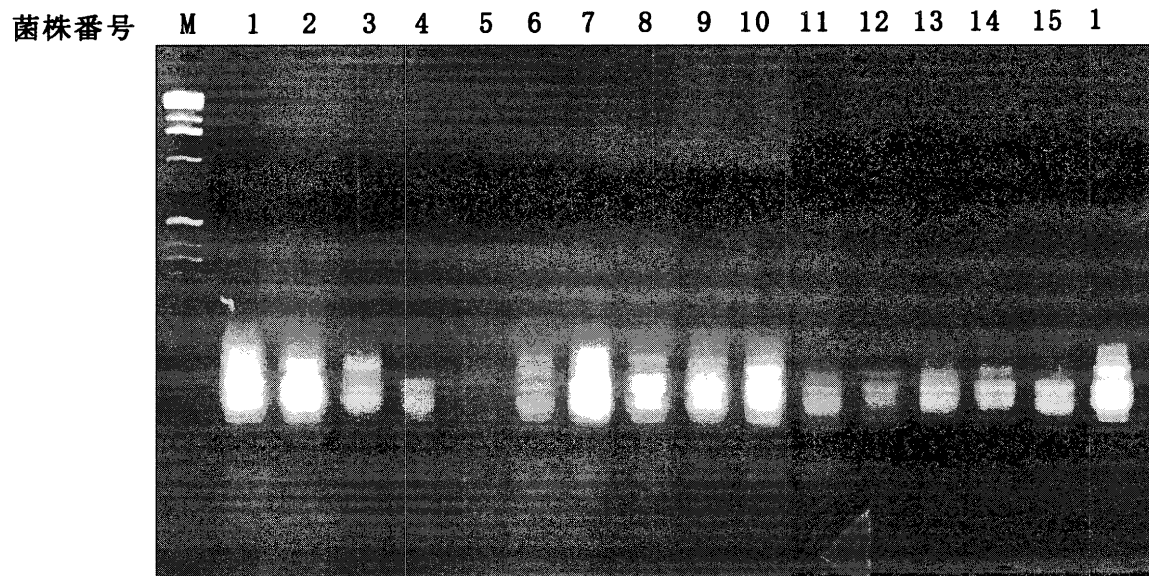
図4 . RAPD-PCR法による菌株の識別 (プライマー3)



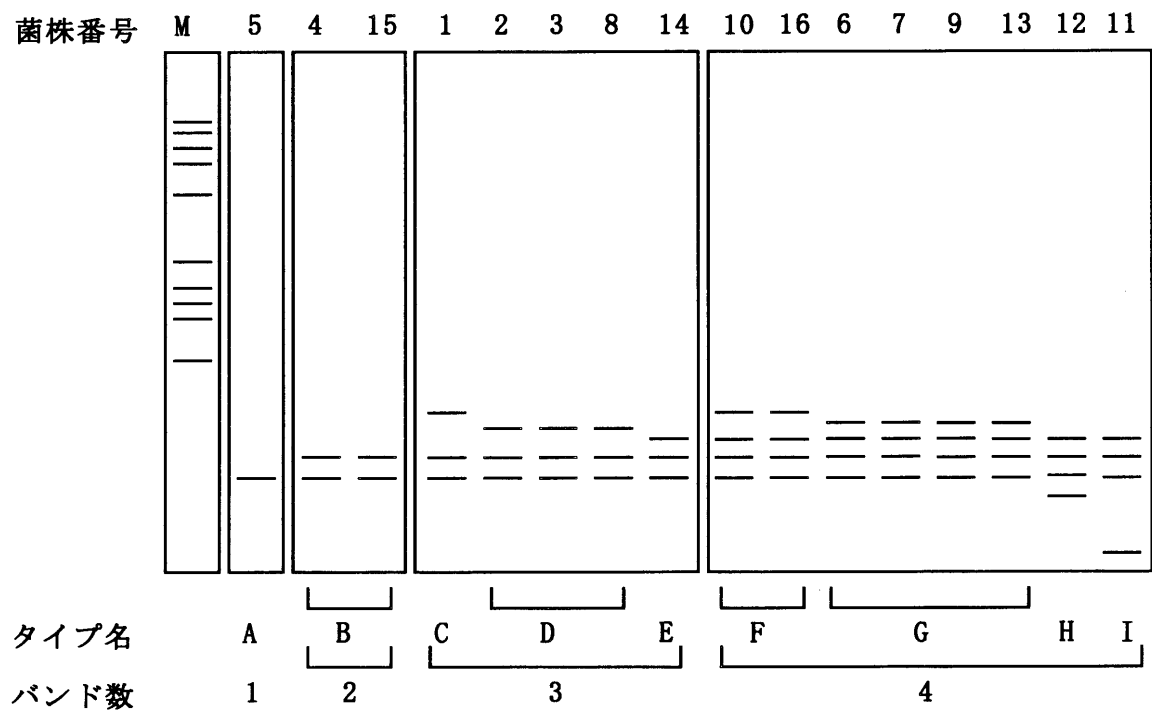
A: トランスイルミネーターでの観察によるRFLPパターン  
B: PFGEによるDNA断片泳動パターンに基づくRFLPのタイピング

図5. PFGE法による菌株の識別

A



B



A: トランスイルミネーターでの観察によるIRS-PCRパターン  
B: 供試由来セラチア菌のIRS-PCRパターンの模式図

図6. IRS-PCR法による菌株の識別

一のバンドパターンを示し、タイプFとタイプGとした。また、その他異なるバンドの位置を呈した2菌株をタイプHとタイプIとした、複数株が属したものはタイプB、タイプD、タイプFおよびタイプGの4タイプであった。

#### 4 3方法により識別された菌株の相互関係

上記のように、RAPD-PCR法のプライマー1, 2および3で、それぞれ15, 13および7タイプに識別された。また、PFGE法とIRS-PCR法でそれぞれ13および9タイプに識別された。これら3方法による識別の相互関係を表2に示した。

### IV 考察

本研究は、セラチア菌16株を対象に、分子疫学的手法（RAPD-PCR法、PFGE法、IRS-PCR法）を用い、分子疫学的手法の有用性を検証することを目的として菌株間の識別精度を、同時に看護分野への導入の視点から簡便性についても比較検討した。

セラチア菌による病院感染の発生要因として、第一に患者自身の保菌から感染が引き起こされる内因感染、第二に他の患者からの直接的あるいは医療従事者から間接的に起こる交差感染、そして第三に汚染された病院環境や医療機器などから発症する外因感染の3つが主なものとして挙げられている<sup>2), 17)</sup>。医療従事者および医療機器の関与する感染については、適切な対策によってある程度の予防は可能であるが、患者間で起こる直接的な交差感染では、ときに集団発生を引き起こすといった危険性が高いことが指摘されている<sup>18)</sup>。交差感染や外因感染を防ぐためには、抗生物質、消毒薬の適切な使用は無論のこと、さらに感染源および伝播経路を知るための有効な疫学調査が必要となる。このことは、感染源推定部位から最終的な患者にいたるまでに介在した全ての材料から分離されたすべての菌を識別することを意味している。感染源や伝播経路の特定のための方法としての分子疫学的手法は技術的・経済的な制約はあるが、優れた再現性と識別能を有した方法であり、アウ

トブレイク時の感染経路の追求法として非常に高い有用性が認められている<sup>19)</sup>。また、一度基礎技術を修得してしまえば原理的に分析精度に及ぼす熟練度の影響は少ない。このことは、看護師など初心者への普及には重要な要素である。実際、生物型別に依存した従来法に比べ効率良く、しかも高感度に細菌を型別できるようになってきた<sup>19)~21)</sup>。これらの手法は全て微生物に存在する遺伝子を解析するものであり、原理的にセラチア菌のみならず他菌種、真菌あるいはウイルスなど多くの微生物に適応できる利点がある<sup>18)</sup>。

今回行ったRAPD-PCR法とは、ランダムに設定されたプライマーがランダムに基質DNA上に結合し、結果的にランダムに増幅された産物同士を比較・観察・解析するという点に最大の特徴がある。標的DNA部位を特異的に検出する通常のPCR法では、限られたDNA塩基配列の有無・異同を調べるのに対して、RAPD法ではむしろ全DNA配列の違いを、より鋭敏に検出する点で根本的に異なっている<sup>20)</sup>。そのため、通常のPCR法では55℃近辺のアニーリングの温度を設定するが、対照的にRAPD法ではなるべく穏和な条件、すなわち36~39℃程度の温度に設定している。その結果、55℃位のアニーリングの温度では、プライマーの塩基配列が完全に一致しない限り基質DNAに結合しないが、穏和な温度条件でアニーリング反応を行うと、プライマーの塩基配列が基質DNAと一部一致するだけで基質DNAの両鎖にランダムに結合できる。その他の解離反応や伸長反応の温度は通常のPCR法と同じである<sup>20)</sup>。今回の実験では3種のプライマーを用いたが、各プライマーにおいて、使用したセラチア菌16菌株はそれぞれ15タイプ、13タイプおよび7タイプに識別することができた。プライマー3は7タイプであり、識別能は劣ったが、他の2種のプライマーにおいては識別精度の点において充分満足できる結果が得られた。RAPD-PCR法の利点は、①10~16塩基長のプライマーを1種類のみで可能、②その配列は全くランダムに選ばれるので、標的遺伝子の配列を知る必要がない、③多検体を一度に扱うことができる、④手技が簡便である、⑤基本的に、遺伝子増幅装置・電気泳動装置・PCR用試

薬類さえあればよいので経済的である、⑥宿主の各種制限および修飾作用に依存しない、⑦迅速性に優れている（本研究では2日間で実施）、ということに集約できた。一方で、諸条件により再現性が不安定であること、プライマーやプログラムなどを菌種ごとに設定し直さねばならないことがRAPD法の欠点として指摘されているが<sup>20)</sup>、条件を固定すれば同じ結果が再現性よく得られるので、RAPD法の持つ利点に比べれば大きな問題ではないといえよう。

識別精度が高いことが報告されているRFLPによるタイピングをPFGEによるパターン分析も検討した。PFGEは適当な制限酵素で切断された染色体DNAをアガロースゲル電気泳動法により比較し、菌株同士の類似性を明らかにする方法である。通常の電気泳動では、一定方向の単一な電場を負荷することにより、DNAは長く伸びた状態でアガロースゲル中を移動し、ゲルマトリックス分子のふるい効果により分離される。しかし、ゲルマトリックスのポアサイズより大きい20kb以上の巨大DNAには分子ふるい効果が働かないため分離はできない。ゲノムサイズの小さいDNAウイルスでは、切断されたDNAはサイズは小さく数も少ないため、通常の電気泳動分離が可能である。一方、ゲノムサイズの大きい一般細菌、抗酸菌、真菌などでは切断DNAの数が圧倒的に多くなるため、通常のアガロース・ゲル電気泳動で分離されたDNA断片のRFLPを肉眼で解析し株間の異同を識別することは困難である。10～30程度のDNA断片のRFLPが解析することが理想的であるとされている。そのため、対象とする菌のG+C%を参考に切断サイトの少ない制限酵素を選択し、用いる電気泳動は大きなサイズのDNA断片を分離できるものであることが必要である。DNA断片のサイズが大きい（メガbase pairに及ぶこともある）ために、通常の電気泳動では分離は不可能で、PFGE装置という大きなサイズのDNAを分離するための特殊な装置が必要である。この装置では、異なる2方向の電場を交互に負荷する（パルス）ため、DNAはその都度方向転換を受けることになる。巨大なDNAほどを方向転換に長い時間を要し、相対的に移動距離が短くな

り、DNAの大きさに依存して分離が可能となる<sup>22)～25)</sup>。この方法はほとんど全ての病原細菌、抗酸菌および真菌に適応され、分子疫学の手法の中でも最もよく用いられるものの一つである<sup>17)</sup>。セラチア菌で通常用いられる制限酵素はSpe IとXba Iであり<sup>26)～28)</sup>、本研究ではSpe Iを用いて行った。その結果、セラチア菌16菌株は13タイプに分類された。プライマー2を用いたRAPD-PCR法より識別能は劣る結果となったが、PFGE法のバンドは鮮明で、濃淡もあまりないため、解析はRAPD-PCR法より簡便であった。最近では一般的に行われる菌種については、すでに試薬キット（Gene Path試薬キット）が各種発売されており、泳動条件リストもキットに添付されている<sup>25)</sup>。しかし、設備に費用がかかること、検査を実施するのに約1週間もかかること、アガロースブロックを操作するために技術の熟達が必要であること等から実施機関が限られており、PFGE装置の設置はあまり進んでいないのが現状である<sup>25)</sup>。また、大量のDNAを要する、検体数が多く扱えない、処理行程が複雑である、制限酵素活性が宿主の各種修飾機構に影響をうける等多くの欠点もあることがあげられている<sup>25)</sup>。

これに対し、少し複雑になるが、DNAを2種類の制限酵素で切断した後、PCRを行う方法がIRS-PCR法である。この方法では、まず初めに頻度の低い塩基配列を切断する制限酵素Xba I（認識部位：T/CTAGA）と、頻度の高い塩基配列を切断する制限酵素Hha I（認識部位：GCG/C）を用いてDNAを切断する。次に、その切断断片の端に、二つのアダプター（AX, AH）を結合させる。二つのアダプターは、共に長短二つのOligonucleotideからなっているが、短いOligonucleotideは、その後の結合には関与しない。Hha Iのアダプター、AH中の長いOligonucleotide（AH1）はHha Iによって切断された断片の5末端に結合する。Xba IのアダプターAX中の長いOligonucleotide（AX1）は、切断断片の3末端に結合するためにリン酸化されるが、AH2はリン酸化していないため、切断断片には結合しない。PCRの間、Xba IのアダプターにプライマーPXが結合し、このプライマー

の伸長がプライマーAH1の結合部位を形成する。これにより、PCRの間、Xba I – Hha I 断片の特異的な増幅が可能となる<sup>15)</sup>。この方法では、PFGE法に比べて迅速性と再現性に優れ、低コスト、手技も簡便であると共に識別能はPFGE法にも匹敵するといわれている<sup>15),16)</sup>。また、IRS-PCR法ではほとんど全ての有機体に対し、同じ制限酵素、アダプター、プライマー、そしてPCRコンディションで適用可能である。実際今回のアダプターや実験条件は、他の多くの菌種にも使用されている<sup>15, 16, 29~31)</sup>。今回の結果では、セラチア菌16菌株は9タイプに識別され、迅速性、簡便性に関してはPFGE法に比して格段に優れているが、識別能としては他の2法より劣る結果となった。既報<sup>14, 15, 29~31)</sup>によると、泳動ゲルにはポリアクリルアミドゲルを用いるのが通常であるが、今回の実験ではバンドが検出されなかったため、アガロースゲルで代用した。このことが結果に影響を及ぼしていることも考えられた。更なる改良の結果、IRS-PCR法がPFGE法に匹敵する識別能を示せば、分子疫学的手法の中でも、感染源・伝播経路追求を行う際には非常に有益な方法となる可能性が考えられた。

RAPD-PCR法、PFGE法、IRS-PCR法の3方法で識別した結果を総合すると、今回使用した16菌株は全て異なる菌株であることが示唆された(例えば、RAPD-PCR法のプライマー1でMタイプに属した2株は他法では別タイプに分離していた)。このことから、16菌株全てが違うタイプに識別された場合を識別精度100%とすると、これらの方法のうち最も高い識別精度を示したのは、RAPD-PCR法のプライマー1で93.8%、最も低かったのはRAPD-PCR法のプライマー3で43.7%という値が得られた。識別精度が最も優れているといわれているPFGE法でも、異なる制限酵素を用いると、同じ泳動パターンを示したものでも異なる結果がでることがあることが報告されている<sup>22)</sup>。従って、どの方法においても、感染源・伝播経路追求を行う場合は、一つの方法のみではなく、いくつかを組み合わせることによりより正確な情報が得られるものと考えられる。実際の感染源・伝播経路の追求への応用として、ICNの協力

を加味しことを想定すると、検査部の方から情報が得られる間に、ICNが迅速なAPD-PCR法で情報を得おくなどの協力体制の確立も可能と考えられた。

疫学マーカーは、菌株間の識別能に優れ、再現性があるものが理想的である。また、多くの検体を扱うことから、簡便、迅速かつ安価で検出されるものが求められる。今回研究に用いた3法の特徴については表3に示した。本研究では、プライマー1を用いたRAPD-PCR法が最も詳細に菌株を識別することができた。同じRAPD-PCR法であっても、プライマー3においては菌株間の識別は困難であったが、プライマーの選定さえ適切であれば、RAPD-PCR法でも非常に高い識別精度が得られると考える。RAPD-PCR法の解析能力は一般的に至適化されたプライマーを用いても20~30型程度の多型性にとどまり、その少なさから、多くの場合スクリーニング目的の解析法として考えられているが<sup>32)</sup>、他の2法に比べて安価で、迅速性に優れている上に、技術的にも非常に簡便であったことからプロトコルをマニュアル化したものがあれば初心者でも簡単に行うことができ、看護への導入は難しくないと考える(実際、3法のプロトコルを作成し、今後成書化を予定している)。

病院感染が疑われた場合、その感染源・伝播経路の追求を全て検査技師に委任しては、検査部の業務は飽和状態になってしまい、役割分担の不均衡を生むばかりか医療チームの機能は半減してしまうことを危惧するものである。限られたマンパワーでいかに最良の感染管理を行えるかが課題である。今回の研究は、これらの業務をすべてICNが引き受けることを提案したものではなく、ICNと検査部との協力を強調・推奨したものである。感染源・伝播経路を追求する際に、一概に全てを検査部に任せるのではなく、チームとして取り組むことで、より効率的な対応が期待できる。また、データの読み方など、基本的事項を修得しておくことは非常に重要であると思われる。更に、その結果を目に見える形で表示すれば、病棟全体の感染管理への意識の向上につながる相乗効果もあると考える。

高度化し、専門化する医療のなかで、国民のヘルスケアニーズは多様化し、保健医療福祉分野における看護職の役割は大きく、その活動範囲は拡大している。ICNへの期待も大きく、専門的知識に加え高度な技術の修得により効果的な感染管理の実践が看護の質の向上につながるとされ、その中でも分子疫学的手法の実際の理解は演習も含め特に重要視されている<sup>12,33)</sup>。精度の高い疫学情報が得られる～従って、より適格な予防対策が講じられる～分子疫学的手法が感染看護の分野に積極的に導入されていくことに期待したい。感染管理先進国である欧米のICP/ICNの育成に学びつつICNの育成途上にある我が国においては、このような視点は、今後益々必要と考えている。

## V 結論

供試セラチア菌16菌株について、分子疫学的手法(RAPD-PCR法, PFGE法, IRS-PCR法)による遺伝子タイピングを行い以下の結果を得た。

1 RAPD-PCR法のプライマー1, 2および3で、それぞれ15, 13および7タイプに識別された。また、PFGE法とIRS-PCR法でそれぞれ13および9タイプに識別された。これらの結果を総合すると、今回使用した16菌株は、元来全て異なる菌株であることが示唆された。

2 16菌株がすべて識別された場合を100%の識別精度としたとき、3方法のうち最も高い識別精度を示したのはRAPD-PCR法のプライマー1で93.8%、最も低かったのはRAPD-PCR法のプライマー3で43.7%であった。

3 RAPD-PCR法の識別精度はプライマーの選定がキーポイントであり、適切なプライマーを用いれば非常に高い識別精度を得られることが示唆された。

4 RAPD-PCR法は、他2法に比べ、所要時間の短かさに加え、技術上の簡便さ、経済性から、看護分野への導入に有力な方法であると考えられ

た。

5 実際の感染源・伝播経路の追求への応用として、ICNの協力を加味しことを想定すると、検査部の方から情報が得られる間に、ICNが迅速なAPD-PCR法で情報を得おくなどの協力体制の確立も可能と考えられた。

## VI 謝辞

本研究にあたり、使用した菌株の分与を賜りました新潟大学農学部仲川洋治先生、パルスフィールド電気泳動に関して御指導下さりました富山医科薬科大学医学部看護学科吉井美穂先生に深く御礼申し上げます。本研究は、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究C 2, 課題番号15592225)により行われた。

## VII 参考文献

- 1) 増田剛太：セラチアを原因とする院内感染の集団発生. 臨床検査46:777-779, 2002.
- 2) 藪内英子：セラチア属菌. 細菌学(林 英生, 竹田美文編, pp384-387, 朝倉書店, 東京, 2002.
- 3) Yu VL: *Serratia marcescens*. Historical perspective and clinical review. N Eng J Med 300:887-893, 1979.
- 4) 安藤智恵, 向野賢治：セラチア. Infection Control 7:718-721, 1998.
- 5) 益井加代子, 角 敦子, 狩野京子: 過去12年間の血液培養分離菌の動向について. 松江赤十字病院医誌 8:16-21, 1996.
- 6) 能登 俊, 盛 暁生, 福原 敬：平成5年院内発生菌血症98例のまとめ. 市立旭川病誌27: 43-47, 1995.
- 7) 川名林治：セラチア感染症について. 臨床と微生物 27:562-563, 2000.
- 8) 大田豊隆：セラチア感染から始める感染対策. Infection Control 13:713-717, 2004.
- 9) 下方 薫, 一山 智：MRSAの遺伝子学的解析と分子疫学. 最新医学 49:1472-1474, 1994.

- 10) 一山 智: MRSAの臨床疫学.臨床病理 42: 441-445, 1994.
- 11) 西 順一郎, 西之原弘晃, 中島利博: mec-hypervariable regionの多型性によるMRSAの遺伝子タイピング. 42:1227-1233, 1994.
- 12) 洪愛子, 廣瀬千也子: 日本におけるInfection Control Nurse (ICN) の育成. Infection Control 4:56-63, 2001.
- 13) Paton TG, Katz S, Sobieski RJ, Crupper SS: Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of RCR-based methods. FEMS Microbiol. Letters 194: 19-25, 2001
- 14) 馬竹美穂, 落合 宏, 吉田郁子, 田澤賢次: 薬剤感受性, dru 塩基長および制限酵素断片分析の MRSA 菌株識別精度に関する研究. 富山医薬大看護学会誌 2: 151-160, 1999.
- 15) Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, Hass WH, Crawford JT: DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J Clin Microbiol 34:2386-2390, 1996.
- 16) Yoo J-H, Choi J-H, Shin W-S, Huh D-H, Cho Y-K, Kim K-M, Kang M-W: Application of infrequent-restriction-site PCR to clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens*. J Clin Microbiol 37: 3108-3112, 1999.
- 17) 一山 智, 太田美智男: パルスフィールドゲル電気泳動とその分子疫学研究への応用. 日本臨床 50特別号: 143-148, 1992.
- 18) 一山 智: パルスフィールドゲル電気泳動法 *Staphylococcus aureus*. 臨床と微生物 23: 626-629, 1996.
- 19) 豊川真弘: アウトブレイク時に役立つ型別法—パルスフィールド・ゲル電気泳動法—. Infection Control 12:717-719, 2003
- 20) 牧野壮一: ランダムプライムドPCR法, 原理と方法. 臨床と微生物 23:658-662, 1996.
- 21) Schaffer SD, Garzon LS, Heroux DL, Korniewicz (藤村龍子監訳): 感染管理看護の考え方と実際. 医学書院, 東京, 1999.
- 22) 一山 智: パルスフィールド・ゲル電気泳動法, 原理と方法. 臨床と微生物 23: 621-625, 1996
- 23) 満田年宏: パルスフィールドゲル電気泳動法の開発歴史と原理, 決め手はコレダ! . Infection control 10:828-835, 2001
- 24) 古谷大輔, 渡邊直樹: 感染源・感染経路究明とパルスフィールドゲル電気泳動法. 日本臨床 60:2062-2065, 2002.
- 25) 小口 晃: パルスフィールドゲル電気泳動法の細菌分子疫学解析への応用. 細胞 34:250-253, 2002.
- 26) Jang TN, Fung CP, Yang TL, Shent SH, Huang CS, Lee SH: Use of pulsed-field electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 48:13-19, 2001.
- 27) Dorsy G, Bornero HT, Sun SJ, Wells J, Steele L, Holand K, Perdreau-Remington F, Bangsberg DR: A heterogeneous outbreak of *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* infections in a surgical intensive care unit. Infect Contrl Hospt Epidemiol 21: 465-469, 2000.
- 28) Villari P, Crispino M, Salvadori A, Scarcella A: Molecular epidemiology of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. Infect Contrl Hospt Epidemiol 22: 630-634, 2001.
- 29) Handley SA, Regnery RL: Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. J Clin Microbiol 38: 3010-3015, 2000.
- 30) Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, Baggesen DL, Rementeria A, Vivanco A, Audicana A, Perales I: Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulse-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Appl Environ Microbiol 66:5273-5281, 2000.



- 31) Lancangeli C, Morabito S, Caprioli A, Achene L, Busani L, Mazzolini E, Fabris A, Macri A : Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela* subsp.piscicida isolated in Italy. *VeterinMicrobiol* 76: 273-281.2000.
- 32) 満田年宏：分子疫学ってナンダ！. *Infection Control* 10:390-398.2001
- 33) 満田年宏：分子疫学的解析手法を感染管理の現場でどう生かすか？. *Infection Control* 11: 590-601.2001.

# Comparative study of genotyping methods for tracking the sources and routes of *Serratia marscens*, a representative environmental bacteria, for introduction to the infection control nurses.

Kyoka Ueda<sup>1)</sup>, Miyuki Sato<sup>1)</sup>, Yuko Katada<sup>1)</sup>,  
Nobuko Imanishi<sup>2)</sup>, and Hiroshi Ochiai<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Departments of Human Science and

<sup>2)</sup> Oriental Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

## Abstract

To search the most convenient genotyping methods for the infection control nurses (ICN), three methods were compared from the aspects of time- and money-consumption, and methodological simplicity in addition to strain-differentiating efficiency using 16 strains of *Serratia marscens*, a representative environmental bacteria. Among the three methods, random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) using three different primers (primers 1 to 3), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and infrequent restriction site PCR (IRS-PCR) methods, 16 strains were distinguished from 15 types in PAPD-PCR (primer 1) to 7 types in PAPD-PCR (primer 3). In contrast to a small difference in typing efficiency between PAPD-PCR (primer 1) and PFGE (13 types), there were a large difference in time-consumption (2 days in the former versus 7 days in the latter). Furthermore, PAPD-PCR had a merit in methodological simplicity such as carrying out without restriction enzyme treatment and complex gel electrophoresis in PFGE which might be also reflected to money-consumption. In light of these findings, at least we can say that PAPD-PCR (primer 1) is recommended to the ICN in an attempt for tracking of sources and routes of outbreak of *Serratia marscens* infections in the health care facilities.

## Key words

*Serratia marscens*, molecular epidemiology,  
environmental contamination, infection control nurse