感染症の分子疫学

—パルスフィールドゲル電気泳動法による病原細菌の型別—

一 山 智

京都大学大学院医学研究科医学部 臨床生体統御医学講座 臨床病態検査学
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

〔受理：1999年4月10日〕

はじめに

HIV, C型肝炎ウイルスなど新たな病原微生物の登場, 高齢者や慢性疾患患者の増加, さらにMRSAなど薬剤耐性菌による院内感染症の問題など, 感染症を取り巻く環境は変貌している。感染症の疫学は, 市中あるいは病院内における感染症の存在, 流行様式, 感染経路, 病原体保菌者の存在などを調査し, 疾病の予防に貢献することを目的とする。臨床微生物学に携わる研究者は, これらの微生物の病原性の理解とともに, 感染症の疫学的な解析も必要になってくる。

感染症疫学の研究は病原微生物の同定と株間の相互識別をもとに, 感染の伝播様式を明かにしていく。従来よりの微生物の生物学的な表現型にもとづく同定識別方法のほかに, 最近では分子生物学的な手法を導入して, 微生物の遺伝情報を解析することによって, より詳細な疫学的理解が得られるようになった。遺伝型にもとづく疫学的解析は分子疫学(Molecular Epidemiology)と呼ばれ,

病原微生物の遺伝情報を解析することにより, 菌種の同定あるいは個々の菌株の識別を行い, さらに菌の遺伝型と病態との間の理解を目指すものである。

本講では分子疫学に使われる手法のなかで, 病原細菌の解析に用いられるパルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE)によるゲノムDNAの制限酵素切断パターン(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)を中心に, 主として我々がこれまで行ってきた感染症の臨床疫学的アプローチについて述べる。

ゲノムDNAの制限酵素切断パターン(RFLP)

微生物のDNAを種々の制限酵素を用いて切断し, アガロースゲル電気泳動で切断DNAを分離したのち, エチジウムブロミドで染色し, その切断パターンの異同を肉眼的に判定するものである。Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)と呼ばれ, 細菌, 真菌, DNAウイルスなどほとんどすべての微生物の解析に応用可能である。

対象となる微生物のゲノムDNAのサイズとG+C%, および用いる制限酵素によって, 生ずる切断DNAのサイズと数は異なる。例えばゲノムDNAのG+C%が高く, 用いる制限酵素の認識塩基にGCが多く含まれていれば, 数多くの小さな

Satoru ICHIYAMA
Molecular Epidemiology
—Molecular Typing of Pathogenic Bacteria Using Pulsed-field Gel Electrophoresis—
Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Post Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507

い断片に切断されることになる。理論上、切断サイトが多いほど、より正確に株間の識別ができるが、実際肉眼でその違いを認識できるのは、せいぜい50断片以下である。

ゲノムサイズの小さい DNA ウイルスでは、通常のアガロースあるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動で、切断 DNA の分離は可能である。単純ヘルペスウイルスをはじめとするヘルペスウイルスの疫学によく用いられているが、そのほかアデノウイルス、パピローマウイルスなど多くの DNA ウイルスに適応されている (6, 13)。

一方、ゲノムサイズの大きい一般細菌、抗酸菌、真菌などでもこの方法が用いられるが、ウイルスに比し切断 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。20~40程度の DNA 断片の RFLP が解析するには理想的である。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。黄色ブドウ球菌を例にとると、ゲノムサイズが約 2,780 kb で、G+C% は約32~36%である。この場合、使用する制限酵素の認識塩基の GC が多ければ、理論上切断サイトが少ないために生ずる DNA 断片の数は少なくなる。図 1 に MRSA のゲノムを制限酵素 *Sma*I (CCCGGG) で切断し電気泳動したものを示す。生じた DNA 断片の数は15~20本でサイズは約 30~600 kb に分布する。これらの DNA 断片の RFLP の違いから個々の菌株を容易に識別できる。DNA 断片のサイズがこのように大きいために、通常の電気泳動では分離は不可能で、パルスフィールド電気泳動 (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。このように個々の菌株が識別できれば、黄色ブドウ球菌による院内感染の集団発生事例において感染源、感染経路の特定が可能となる。PFGE による RFLP は黄色ブドウ球菌 (1, 9, 10, 12) のみならず、緑膿菌 (5)、腸球菌 (8) などほとんどすべての病原細菌、抗酸菌、および真菌に適応され、分子疫学の手法のなかで最もよく用いられるものの一つである。対象となる菌種の G+C% と、それに最も適した制限酵素および切断後の DNA 断片の数とサイズは、専門書を参考にすればよい (7)。

MRSA 院内感染における感染経路の解明

MRSA の院内感染の感染経路の解析は、従来より主として抗菌薬感受性パターン、コアグラゼ型別、エンテロトキシンや TSST-1 などの毒素産生性など、いわゆる細菌の表現型によってなされてきた。これらの方法は詳細な菌株型別ができないことや型別不能株が見られることなどの欠点があった。PFGE による DNA 型別はこれらの欠点を補うものであり、MRSA の院内感染の感染経路を調査するための疫学的解析に応用されるようになった。

1990年に名古屋大学病院で起きた MRSA 院内感染の集団発生事例の疫学的解析に PFGE 法を応用した (1)。2~9月の間に18名の MRSA 感染症患者の発生があったが、このうち17名が手術後感染症で、IVH カテーテル挿入にともなう

図 1. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による黄色ブドウ球菌の DNA 制限酵素切断パターン。

図2. 11人の患者の MRSA 院内集団感染症事例における感染排菌状況。患者2, 3, 4, 8, 17は重篤な基礎疾患と MRSA 感染によって死亡している。点線は入室期間, 実線は MRSA 排菌期間を示す。○は MRSA タイプ1, ●は MRSA タイプ2, □は MRSA タイプ4, ■は MRSA タイプ5, +は死亡例を示す。

菌血症，創感染，および肺炎などであった。それぞれの患者から分離された MRSA を PFGE によって型別したところ，9 種類のタイプに分類された。これらのうち 4 種類のタイプの MRSA が，ICU および外科系 4 病棟に入院していた 13 名の患者から分離された。13 名の患者の入院場所，入院期間，および排菌された MRSA の DNA 型と排菌時期について図 2 に示す。それぞれの病棟において複数の患者に特定の MRSA が感染していることが明らかにされた。

劇症型 A 群 β 溶連菌感染症の疫学的解析

1980年代より米国あるいはヨーロッパにおいて、急激な経過でショックに至り致命率の高い劇症型 A 群 β 溶連菌感染症 (Toxic Shock-Like Syndrome: TSLS) が見られるようになった。我が国においても1990年初めより関東地区の中心に症例の報告が見られるようになり、現在では全国から症例が報告されている。TSLS の病態は現在なお不明であり、A 群 β 溶連菌感染症の重篤化が菌側の要因によるのか宿主側の要因によるのか、結論は得られていない。

1992～1994年の間に、我が国でみられた TSLS あるいはその他の重症 A 群 β 溶連菌感染症 (Other Invasive Streptococcal Infection: OISI) の合計42例より得られた42株について、PFGE による DNA 型別を行った (11)。併せて咽頭炎などの軽症例 (Noninvasive Streptococcal Infection: NISI) から得られた70株についても同様の検討を行った。TSLS あるいは OISI の42株は16種類の PFGE 型に分類され、NISI の70株は10種類に分類された。TSLS あるいは OISI の16の PFGE 型のうち、3つは NISI の株と同一の PFGE 型を示した。すなわち、ある特定の PFGE 型を示す菌株が TSLS あるいは OISI を起こすものではないことが示唆された。

次に、解析した TSLS, OISI, および NISI の合計112株から得られた23の PFGE 型について、Solltech 社の DENDRON™(Macintosh コンピューターに対応)を用いて、各々の PFGE 型間での遺伝学的な近縁関係を調べた。PFGE 型のパターンを画像処理してコンピューターに取り込み、DNA 断片の一致率を計算して株間の近縁関係を数値化するものである。図3に A 群レンサ

図3. A 群溶連菌23株の M タイプと PFGE による DNA タイプの系統樹。NT は nontype を意味する。遺伝的相関性は S_{AB} で示される。例えば A 株と B 株の遺伝型が一致すれば1.0であり、その値が小さければ遺伝的に関連が薄いことを意味する。

球菌の PFGE 型と血清型 (M タイプ) との関係を示す。TSLS あるいは OISI を起こした菌株の PFGE 型は I 型～XVI 型であり、これら各々の PFGE 型で近縁関係は認められなかった。一方、同一の血清型に属する菌株は遺伝型も非常に近縁であり、近縁関係を示す系統樹(デンドログラム)において、いわゆる房 (クラスター) を形成した。このように菌株間の遺伝学的な近縁関係を数値化することにより、血清型、薬剤耐性、あるいは病原性などの解析に役立つ可能性が考えられた。

さらに、TSLS 患者の家族内で A 群 β 溶連菌が伝播しているかどうか検討した (2)。4 家族において患者の病巣と家族の咽頭から A 群 β 溶連菌が分離され、これらの菌株について PFGE 型別を行った。図4に示すように、各々の家族内において分離された A 群 β 溶連菌は同一の PFGE 型であった。TSLS 以外の家族ではほとん

どが軽症の咽頭炎であったが、1 人が重症咽頭炎、1 人が肺炎、1 人が胎児死亡 (血液から A 群 β 溶連菌が分離された) に至った。A 群 β 溶連菌感染症の重症化の病態が解明されていないこと、発病すれば致死率の高いことから、家族あるいは医療従事者においてはペニシリンの予防投与の必要性が示唆された。

Mycobacterium kansasii 感染症の疫学的解析

抗酸菌のうち結核菌を除く非結核性抗酸菌の感染経路は、一般的に環境からといわれている。*Mycobacterium avium* complex は土壌や埃に存在し、それを吸引することによって肺感染症を起こすが、*M. kansasii* のエコロジーおよびヒトへの感染経路はよく解っていない。環境からの菌の検出が困難なことから、本菌を詳細に型別する有効な方法がなかったからである。

図4. A 群溶連菌の SmaI 切断後の PFGE による DNA パターン。レーン1, 5, 11, 16は TSLS 患者からの分離株で、その他のレーンはそれぞれの家族から分離された株である。同一家族内で同一の菌が分離されている。

表1. 分離場所ごとに示した *Mycobacterium kansasii* の PFGE による DNA パターン

制限酵素 type		分離場所ごとの分離株数					
VspI	SpeI	関東	中部	近畿	中国	九州	Total
A	a		1		1		2
B	b		1	6			7
C	c	6	1	1			8
D	d		3		1	3	7
E	d			1			1
F	e			1			1
G	f			1			1
H	g			1			1
I	h	2	2		3		7
J	i			1			1
K	j			2			2
L	g	1	1	2		3	7
M	g		2	4	15	1	22
N	g		1		4		5
O	k					1	1
P	l				1		1
Q	g					2	2
R	d	1					1
R	m	1				1	2
S	n					1	1
T	o					1	1
U	p	3					3

1960～1995年の間に全国国立療養所を中心に収集保存された患者由来 *M. kansasii* 84株について、PFGE 型別を行いその疫学的解析における有用性を検討した (4)。表 1 に制限酵素 *VspI* および *SpeI* で切断した時の PFGE 型と、それぞれの PFGE 型の地域別分布を示す。84株は *VspI* で 21 の PFGE 型に分類されたが、そのうち中国地方において M 型が 15 株検出された。さらに、そのうち 11 株は 1982～1993 年の間に岡山県水島工業地帯の工場に勤務している 11 名より分離された。M 型の *M. kansasii* が工場内の埃あるいは工業用水などから、勤労者に感染した可能性を示唆するものと考えている。

Campylobacter fetus 菌血症の感染経路の解明

Campylobacter fetus は稀ではあるがヒトに菌血症や髄膜炎を起こす。家畜の生肉や肝臓を食することによって感染すると考えられているが、その細菌学的な解析はほとんどなされていない。培養がそれを目的として十分行われなかったことと、やはり詳細な菌の型別方法がなかったためである。

1995年に愛知県で *C. fetus* による菌血症をとまなう下肢の蜂窩織炎を 3 例経験した (3)。それぞれの症例は SLE あるいは肝硬変を基礎疾患として有しており、発症前にいずれも生肉あるいは肝臓を食していた。1 例では便、血液および蜂窩織炎病巣部よりの吸引液より *C. fetus* が培養され、他の 2 例においても便と血液から *C. fetus* が培養された。図 5 に 3 例から分離された *C. fetus* の PFGE 型を示す。各々の症例間では異なる PFGE 型であるが、同一症例においては便と血液 (あるいは吸引液) からの *C. fetus* は同一の PFGE 型を示した。経口感染した *C. fetus* が腸管より血中に侵入し、さらに下肢の蜂窩織炎を起こしたのと考えられた。

お わ り に

感染症の様相は病原微生物、宿主および医療環境の変化とともに変貌した。疫学的研究手段も表現型の解析から遺伝型の解析へと進み、より信頼性のある結果が得られるようになった。病原微生物のゲノムの構造を解析し、同一菌種内の株間で

図 5. 3 人の菌血症患者から分離された *Campylobacter fetus* の PFGE による DNA パターン (制限酵素は *SmaI*)。レーン 1 と 2 は患者 1 の下肢の吸引組織液および便からの分離株、レーン 3 と 4 は患者 2 の血液および便からの分離株、レーン 5 と 6 は患者 3 の血液および便からの分離株である。各々同一のパターンを示している。

の多様性を感染症の疫学研究に応用する分子疫学は、感染症の地域的および経時的な広がりを知ることを可能にした。今後は遺伝型と微生物の病原性、あるいは感染症の病態との関係にまで研究の分野が発展することが予想される。

文 献

- 1) Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., Takeuchi, J. (1991): Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **29**, 2690-2695.
- 2) Ichiyama, S., Nakashima, K., Shimokata, K., Ohta, M., Simizu, Y., Ooe, K., Murai, T. (1997): Transmission of *Streptococcus pyogenes* causing toxic shock-like syndrome among family members

- and confirmation by DNA macrorestriction analysis. *J. Infect. Dis.* **175**, 723–726.
- 3) Ichiyama, S., Hirai, S., Minami, T., Nishiyama, Y., Shimizu, S., Simokata, K., Ohta, M. (1998): *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* cellulitis associated with bacteremia in debilitated hosts. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 252–255.
- 4) Iinuma, Y., Ichiyama, S., Hasegawa, Y., Shimokata, K., Kawahara, S., Matsushima, T. (1997): Large-restriction-fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 596–599.
- 5) Jalel, B., De Montalembert, M., Gaillard, J.L., Gobin, J., Grimont, F., Girault, D., Veron, M., Berche, P. (1991): Outbreak of gut colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in immunocompromised children undergoing total digestive decontamination; analysis by pulsed-field electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2068–2071.
- 6) Kidd, A.H. (1984): Genome variants of adenovirus 41 (subgroup G) from children with diarrhoea in South Africa. *J. Med. Virol.* **14**, 49–59.
- 7) Maslow, J.N., Slutsky, A.M., Arbeit, P.D. (1993): Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., et al. (ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM, Washington DC, pp 563–572.
- 8) Murray, B.E., Singh, K.V., Heath, J.D., Sharma, B.R., Weinstock, G.M. (1990): Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2059–2063.
- 9) Nada, T., Ichiyama, S., Iinuma, Y., Inuzuka, K., Washida, H., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., Nakashima, N. (1996): Types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with high mortality in patients with bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 340–343.
- 10) Nada, T., Ichiyama, S., Osada, Y., Ohta, Y., Shimokata, K., Kato, N., Nakashima, N. (1996): Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates. *J. Hosp. Infect.* **32**, 305–317.
- 11) Nakashima, K., Ichiyama, S., Hasegawa, Y., Ohta, M., Ooe, K., Shimizu, Y., Igarashi, H., Murai, T., Shimokata, K. (1997): A clinical and bacteriologic investigation of invasive streptococcal infections in Japan. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 260–266.
- 12) Obayashi, Y., Fujita, J., Ichiyama, S., Hojo, S., Nagayama, K., Takasha, C., Miyawaki, H., Tanabe, T., Yamaji, Y., Kawanishi, K., Takahara, J. (1997): Investigation of nosocomial infection caused by arbekacin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 53–59.
- 13) Umene, K. (1987): Restriction endonucleases recognizing DNA sequences of four base pairs facilitate differentiation of herpes simplex virus type 1 strains. *Arch. Virol.* **97**, 197–214.