

A群溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 検査 マニュアル

(劇症型溶血性レンサ球菌感染症起因株を含む)

目 次

はじめに

I. 分離法・同定法

1. 分離法・検体の採取
2. 増菌培養法
3. 分離培養法
4. 培養性状
 - 1 血液寒天平板上の溶血環と集落の形態
 - 2 液体培養所見
5. 同定法
 - 1 レンサ球菌属の確認
 - 2 Lancefieldの血清群別
 - 3 生化学的性状
 - 4 迅速診断法

II. A群溶レン菌の型別法

1. T型別
 - 1 抗原液の作製
 - 2 型別試験
2. M型別
 - 1 沈降反応によるM型別
 - 2 M蛋白遺伝子 (*emm*) のシーケンスによるM型別
3. 発赤毒素型別

1 ラテックス凝集反応によるSPEの検出

2 *spe*遺伝子のPCR法による検出

III. サンプルの送り方

IV. 病原体の保存法

1. 凍結保存法

2. ゼラチンディスク法

1 ゼラチンディスク保存液

2 機材

3 ディスクの調整法

V. 引用文献

VI. 検査依頼先

VII. 執筆者一覧

A群溶血レンサ球菌

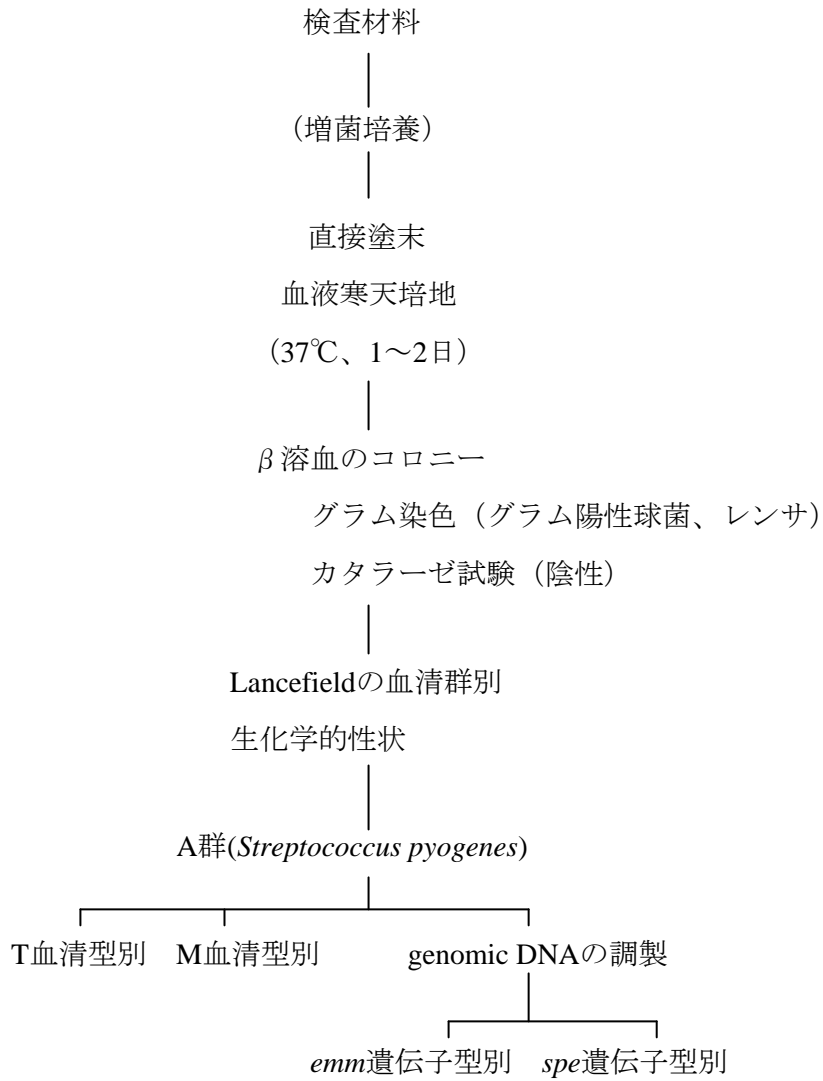
はじめに

A群溶血レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*, *Streptococcus pyogenes*、以下A群溶レン菌) は、グラム陽性球菌であり、様々な疾患を引き起こす。A群溶レン菌が関与する感染症は多種多様で、本菌を原因とする代表的な疾患は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱、丹毒、蜂窩織炎、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱等であり、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う重篤な症状を呈す劇症型溶血性レンサ球菌感染症も本菌による疾患として注目されている。A群溶レン菌は、健康な人の咽頭、皮膚などにも存在する。

「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 (感染症法)」において、A群溶レン菌が引き起こす疾患として、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎と劇症型溶血性レンサ球菌感染症が含まれる。これらの疾患は5類感染症に属し、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎は小児科定点把握疾患、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。

本菌は、国立感染症研究所病原体安全管理規程のバイオセーフティレベル2に属する病原体である。検体もしくは菌体を扱う場合は、安全キャビネット内で取り扱う。また、検体から本菌の分離・同定までに1~3日、型別にはさらに1~2日必要である。

本稿では、A群溶レン菌の検査法の標準法および菌の解析のための検査法について記載した。劇症型溶血性レンサ球菌起因株も同じレンサ球菌であるので、同じ方法に準じて行う。



I. 分離法・同定法

1. 分離法・検体の採取

検体の採取には綿棒を用いる。綿棒の材質は、菌に対する毒性が少ない化学繊維が望ましく、採取用綿棒を用意する場合は、綿棒をM/15リン酸緩衝液 (pH 7.4) で数秒煮沸し、乾燥後高圧滅菌して用いる¹⁾。また、輸送培地とセットの市販品 (チャコール添加アミーズ輸送培地 : BBL, CultureSwab™ Transport system Amies Medium : Difco labo., シードスワブ2号、3号 : 栄研化学) も利用できる。

検体として最も多いのは咽頭拭い液である。扁桃の白色斑点部、腺窩部および咽頭後部を拭って採取する。皮膚の開放創では滲出液を採取する。膿皮症の場合、痂皮をアルコール綿で消毒後はがし、その深部を拭う。このほかに膿分泌物、尿、血液、髄液等が用いられるが、通常の細菌検査に準じる。

2. 増菌培養法

通常、A群溶レン菌は直接培養で分離可能であるが、抗生物質投与後、ブドウ球菌やナイセリア等が多数混在すると思われる検体、疫学調査などで菌数が少ない健康者等の検体では、増菌培養が必要である。

増菌培地には、脱繊維血液を加えるPike培地 (Difco)、Q(キノリン)培地 (市販品なし) と血液を用いないSEB培地 (日水) 等がある²⁾。SEB培地には、アジ化ナトリウムおよびクリスタルバイオレットが選択剤として含まれており、グラム陰性桿菌、ブドウ球菌、ナイセリア等の発育を抑制し、選択増菌効果が優れているうえ、検体の保存・輸送および分離株の保存にも使用できる。検体採取後の綿棒、あるいは直接培養に塗抹後の綿棒を2 mlのSEB培地に投入し、37℃、一夜増菌し、分離培養する。

3. 分離培養法

分離培養には、ヒツジまたはウマの脱繊維血液を5%の割合に添加した血液寒天平板培地を用いる。血液の濃度が3%より低い場合は α 溶血と β 溶血の区別がしにくい場合がある。基礎培地として、Trypticase Soy Agar II (BBL)、ハートインフュージョン寒天 (栄研化学) 等が適している。また、選択性を持たせた培地としてグラム陰性細菌の発育抑

制のためにコリスチンおよびナリジキシン酸を添加したCNA血液寒天培地やアジ化ナトリウムを添加したアザイド血液寒天培地がある。

平板上に塗抹する方法は、綿棒の各方面を平板上の一隅に十分に塗りつけ、白金耳で全面に塗抹する。増菌培養の場合には、一白金耳を培地全面に塗抹する。いずれの場合にも塗抹の最後に白金耳を平板の一カ所に突き刺し³⁾(Streak-stab culture)、深部集落の溶血環を観察する。

4. 培養性状

1. 血液寒天平板上の溶血環と集落の形態

レンサ球菌を鑑別する上で最も重要な性状である溶血性は、 α 、 β 、 α' (α プライム) および γ 溶血に分けられる。A群レンサ球菌の多くは、1日培養で α' 溶血、2日目に β 溶血となるのが特徴である。しかし、基礎培地の種類および脱繊維血液のメーカーの違いなどにより、1日の培養では、 α 溶血を示す場合や、溶血がみられない場合もある。いずれの場合も培養時間を延長することにより鮮明な β 溶血となっていく。溶血環は、C、G群（主に β 溶血）ほど大きくなく輪郭も鮮明でないが、B群レンサ球菌（主に α' 溶血を示すが β 溶血へ移行しない）よりは鮮明である。まれではあるが、A群レンサ球菌にも γ 溶血（非溶血）の株もあるので注意したい。以下に血液寒天平板上での溶血環の鑑別法を述べる。

α 溶血：発育集落の周囲に緑色で、不透明な小さな溶血環を認められる。血液の緑変がなく退色により褐色に見える場合もある。鏡検すると非溶血の凝集した赤血球が認められる。

β 溶血：発育集落の周囲が完全に透明な溶血環が認められ、透明部を鏡検しても赤血球を認めない。

α' 溶血： β 溶血に比べると、溶血環は小さくなく、透明度や輪郭の鮮明さが劣る。鏡検すると非溶血の血球の凝集が残っているが、血球の緑変は見られない。

γ 溶血：非溶血で全く溶血環を認めない。

集落形態は、多様であるが、最も多く観察されるのは“glossy”型で、直径0.5~1.0 mm位の小型、灰白色、やや不透明、湿潤、正円形を示す。その他には“mucoid”型という

露滴状または粘性様の辺縁のなめらかな集落がある。また、A群レンサ球菌の集落はおおむね堅く、白金線で釣菌すると1個分全てが平板からはがれたり、集落が割れたりする場合がある。以上、典型的なA群レンサ球菌における集落の特徴について述べたが、菌株および培養条件（血球濃度、寒天平板の厚さ等）によってもその性状は多様であり、集落形態のみで群を決定することは困難であるため、群別（I-5-2）は必ず実施する。

2 液体培養所見

血液寒天平板上の集落を継代するには、ハートインフュージョンブイヨン培地（栄研、Difco）、Todd-Hewitt Broth（Difco、BBL）等の液体培地を用い、37℃、一夜培養する。A群レンサ球菌はほとんど例外なく、雲絮状の沈殿か、顆粒状で管底や壁面に付着するような発育を示し、培養液上部は清澄である。C、G群も同様に、混和しても底部に沈みやすい。B、D群レンサ球菌は培養液が一様に濁って発育し、管底にボタン状の沈殿を示すのが特徴である。

5. 同定法

1 レンサ球菌属の確認

レンサ球菌は、グラム陽性、連鎖状または双球状の配列を形成し、カタラーゼ陰性である。液体培養液からグラム染色およびカタラーゼ試験を行い被検菌がレンサ球菌属であることを確認する。

1) グラム染色標本

グラム陽性および特徴的な菌の配列を観察する。連鎖の長さは、C、G群が長く、次いでA群、B、D群は短い傾向にあり、肺炎球菌は双球菌を形成する。

2) カタラーゼ試験

清浄なスライドグラス上に、培養液1滴を載せ、3%過酸化水素水溶液を加え、気泡形成の有無を確認する。この方法以外に、液体培養液1滴を試験管に取りそれに3%過酸化水素水溶液を滴下する方法や、固形培地上に発育した集落に3%過酸化水素水溶液をふりかけたりする方法もある。陽性対照として、ブドウ球菌を用いるとよい。操作には、ニクロム線等の鉄製品を用いると判定を誤るおそれがあるために用いてはならない。また、

赤血球にはカタラーゼ活性が存在するため、血液寒天培地上で本試験を行うことは望ましくない。

2 Lancefieldの血清群別

Lancefieldの血清群別は、Rebecca Lancefieldによって菌体の多糖体抗原の免疫学的差異により証明され⁴⁾、現在では、A群からZ群（I群およびJ群は除く）（W群からZ群は暫定的）まで分類されている⁵⁾。A群溶レン菌を同定していく過程で、このLancefieldの血清群別は、他の β 溶血レンサ球菌と区別できるため重要である。

検査室では、市販品群別用キットを用いる群別が一般的である。市販キットは、簡便な共同凝集反応（ファデバクト ストレプトコッカス キット：ファルマシア）や特異性に優れた感作ラテックス凝集反応（プロテックス「アスカ」レンサ球菌：アスカ純薬、セロアイデンストレプトキット：栄研化学、ストレプトLA「生研」：デンカ生研）があり、A、B、C、G群の4種または、D、F群を含む6種類の群別が可能なキットもあり、容易に群別ができる。1987年、SchleiferとKilpper-Balzにより報告されたレンサ球菌の分類⁶⁾では、Lancefield血清群別でD群抗原を保有する腸球菌を*Enterococcus*属、N群を*Lactococcus*属として新たに独立させている。

3 生化学的性状

生化学的性状の代表的な試験として、ピロリドニルアリルアミダーゼ活性（PYR）、バシトラシン感受性、CAMP試験、馬尿酸分解性等がある。また、API strep 20（バイオメリュー）や短時間で同定可能なAPI Rapid strep 32（バイオメリュー）等のキットも有用である。

1) ピロリドニルアリルアミダーゼ活性（PYR）

β 溶血をするレンサ球菌のなかで、本酵素活性を有するのは*S. pyogenes*（A群）のみである。市販品（Dry Slide PYR Kit：Difco、ストレップ-A-チェックキット：E.Yラボラトリーズ）は、発色基質（L-ピロリドニル- β -ナフチルアミド）を含有するスティックの濾紙部分に数個の集落を塗布し、発色試薬を滴下して赤色の発色を確認する。腸球菌（D群）も本活性を有するので、 β 溶血を示す株について鑑別が必要となる³⁾。

2) バシトラシン感受性

本薬剤を含有するディスクが市販されており平板上で判定ができる。A群レンサ球菌のほとんどがバシトラシン感受性であるが、 β 溶血を示すC、GおよびL群レンサ球菌の中にも感受性の株がある。

3) CAMP試験⁷⁾

ミューラー・ヒントン寒天培地 (Difco) に脱繊維血液 (ヒツジ、ウマ) を5%の割合に加えた血液寒天平板をもちいる。被検の培養菌液と β 溶血素産生性のブドウ球菌 (ATCC49444) の培養菌液を接触しないよう直角に塗布する。矢印状の透明溶血帯が形成されれば反応陽性とする。 β 溶血素産生性のブドウ球菌に変わって β 溶血素をしみこませたディスク (Beta Lysin Disk : remel) も市販されている。この反応は、*S. agalactiae* (B群)で陽性である。

4) 馬尿酸分解試験 (グリシン法) ^{1, 2)}

1%馬尿酸ナトリウム水溶液 0.4 mlに血液寒天平板上の菌をかき取り、濃厚菌液を調製して、37°C 2時間培養しニンヒドリン試薬 (アセトン、ブタノール等量混合液にニンヒドリンを3.5%に加える) 0.2 mlを加え、37°C、10分間反応させ、濃紫色に発色するとグリシン陽性である。B群レンサ球菌は馬尿酸を分解して安息香酸とグリシンを産生する。

4 迅速診断法

A群溶レン菌の感染症に対しては適切な化学療法剤による治療を早期に行えば、重症化を防ぐとともに続発症の発症を予防することができる。しかし、通常の培養法では検査結果判明までに24~48時間を要するので、初診時には適切な医療の提供ができない場合がある。そこで培養法に変わる迅速診断として、培養によらない簡便迅速な検出方法が開発、実用化されている^{8, 9, 10)}。

検査法の原理は免疫学的手法による抗原検出であり、検査材料から酸または酵素を用いて多糖体抗原を抽出し、特異抗体により検出している。

市販のキットとしては以下のものがある。

AストレプトAD「生研」 (デンカ生研)

ストレプトAテストパック・プラス OBC (三和化学)

ディップスティック ‘栄研’ ストレプトA (栄研化学)

クリアビューEZ ストレップA (アリーア・メディカル)

BinaxNOW ストレップA (アリーア・メディカル)

イムノカードEX ストレップA (テイエフビー)

エルナス ストレップA (テイエフビー)

ラピッドテスタ ストレップA (積水メディカル)

クイックビューDipstick StrepA (DSファーマバイオメディカル)

イムノファインストレップA (ニチレイバイオサイエンス)

これらはいずれも10分以内にA群溶レン菌感染の診断が可能であり、培養との一致率、特異性に優れ、検体あたり $10^4 \sim 10^5$ CFU以上で陽性となる。

II. A群溶レン菌の型別法

A群溶レン菌の菌体表層には、群多糖体のほかにM、RおよびT蛋白等が存在しており(表1)、型別に利用されている。M蛋白は、耐熱性、トリプシン感受性、型特異的であり100以上の型が知られている¹¹⁾。M蛋白は、抗オプソニン作用^{12,13)}を有し、細胞への接着にも関与しており、病原因子として知られている。分離株のM型別を行うことは病因との関連を知る上で重要であるが、継代による蛋白の脱落が生じることや市販血清がないことから、M型別の実施は困難であり、一部の機関でのみ行われている。近年、M型別を血清学的方法ではなく、M蛋白遺伝子の領域を明らかにし、型別する試みもなされている¹¹⁾。一方、T蛋白は病原性と無関係とされているが、T型別とM型別の菌型は相対すること¹⁴⁾、トリプシン耐性、型特異的、M蛋白に比べ安定性があり、さらに、継代に耐えうることから、疫学調査の手段として用いられ、多くの施設で実施されている。R蛋白は、病原性と無関係とされていることや、型も少ないことから利用されることは少ない。

表1 A群溶レン菌の菌体表層蛋白

	M protein	T protein	R protein
boiling (pH 7)	stable	destroyed	stable
boiling (pH 2)	stable, extracted	destroyed	stable, extracted
trypsin	destroyed	stable	R3: destroyed R28: stable
pepsin	destroyed	stable	destroyed
virulence	virulence factor	not relate to	not relate to
	antiphagocytic action	virulence	virulence
protection	antibody confers type specific protection	antibody not protective	antibody not protective

1. T型別

T蛋白による型別は、Griffith¹⁵⁾が凝集反応を用いて実施したことに始まる。T型別は当初4つの血清型に分類されていたが、その後増加し、また整理されて、現在は22の血清型が認められている。このうち、5、27、44型および14、49型はcomplexとしてそれぞれ1

つにまとめられている。そのため抗血清としては19種類である。T型別試験は、腭エキス抽出抗原とT型別免疫血清を用いて、スライド凝集反応を行う。操作上の注意点として、被検菌の培養を30℃で培養することにより、自然凝集の少ない抗原が得られる。消化中のpH修正は酸性側に傾かないようにする。T蛋白は、腭エキス消化に対し耐性であるが、長時間消化することにより凝集性は低下する。凝集反応は、弱い場合もあり、反応までの時間は長い、特異的な反応であれば陽性である²⁾。特異的な反応を示さない場合、および、凝集反応が見られない場合は、「型別不能」として取り扱う。抽出試薬および型別用免疫血清はデンカ生研より市販されている。

1 抗原液の作製

1. THB 10 mlに菌を接種し、30℃で一夜、静置培養する。
2. 9,800 x g、10分遠心分離する。
3. 沈さにブタ腭臓エキス4滴を加え、次いで0.02%フェノールレッドを1滴加えて十分に混和する。
4. pH補正液を加えてpH 8.0-8.5（菌液が赤紫色）になるように修正し、37℃、1時間消化する。消化途中でpHの変化が認められる場合はその都度pHを修正、また均一に消化するように時々振り混ぜる。
5. 菌液を1.5 ml容サンプリングチューブに移し、17,000 x g、30秒遠心分離する。
6. 沈さに0.5 ml PBSを加え、ミキサーを使用して均一な浮遊液を作製し、抗原液とする（このとき自然凝集していたら、再度遠心して沈さに0.5 ml PBSを加え、けん濁する）。

2 型別試験

1. 自然凝集がないことを確認後、菌液とT型多価血清を混和し、凝集の有無を確認する。
2. 多価血清の1つに凝集が認められたら、その多価血清を構成するT型単価血清を用いて凝集反応を行い、T抗原の血清型を決定する。

2. M型別

M型別は、Swiftら¹⁶⁾によって毛細管沈降反応法により始められた。その後、多くの血清型が発見され、Johnsonら¹⁴⁾は1993年にM81までの型、約74の血清型があることを報告した。その後も、新しい型が確認され、現在では100以上の型があるとされている¹¹⁾。

M型別は、塩酸抽出抗原¹⁾とM型別抗血清を用いてゲル内沈降反応で行われているが、市販のM型別用抗血清がないので簡単には実施できない。しかし、分離頻度の高い1, 3, 4, 6, 12型の抗血清を準備しておけば、50-60%以上の菌株について型別が可能である^{17, 18)}。

さらに多くのA群菌についてM型を決定するためには、より多くの種類の抗血清を準備しておく必要があるが、上述したように市販のM型別用抗血清がないために非常に困難である。しかし、M蛋白については多くの遺伝子がクローニングされ、その塩基配列はデータベースとして存在する。そのデータベースはCDCにより公開されているので¹¹⁾、菌のM蛋白をコードする遺伝子(*emm*)のシーケンスを行い、そのデータと比較することにより遺伝学的なM型別は可能である。

1 沈降反応によるM型別

1) 沈降反应用抗原液の抽出

沈降反應用抗原の作製法としては、酸加熱抽出法のほうがオートクレーブ法より明瞭な沈降線が得られるので本検査法では、酸加熱抽出法について記載する。M蛋白の発現はCO₂存在下で上昇することから、被検菌をCO₂インキュベーター内で培養する。

1. 細胞培養用25cm²フラスコ内のTHB 10 mlに接種し(1菌体につき2本(計20 ml))、37°Cで一夜、CO₂インキュベーター内でキャップを少し緩めて静置培養する(このフラスコを用いることでCO₂が培地に行き渡りやすくなる)。
2. 12 ml容アシストチューブに移し、9,800 x g、10分遠心分離する。
3. 上清を捨て、残った上清と菌体をサスペンドし、1.5 ml容ねじつきサンプリングチューブに移す。
4. 17000 x g、15秒間遠心し、上清を捨てる。
5. 沈さに0.2 M HClを100 μl加え、ミキサーで混和する。
6. 100°C、10分間煮沸した後、急冷する。

7. 0.02% フェノールレッド1滴を加えた後、0.2 M NaOHで中性付近(ピンク色)にpHを調整する。
8. 17,000 x g、1分遠心する。
9. 遠心エバポレーターを用いて2倍から3倍に濃縮する。
10. 上清を抗原液とする。

2) 寒天ゲル内沈降反応

1. 滅菌蒸留水にアガロースを1%の割合に加え、加熱溶解させる。
2. スライドグラスに厚さ2 mmになるように溶解したアガロースをのせ、凝固させる。
(溶解したアガロースを十分冷ます)
3. 鋳型で円形にアガロースをくり抜き、余分なアガロースを吸引により取り除く。
4. 中心のウェルに抗血清、周りのウェルに抗原を注入する。
5. 湿潤箱に収め、4°Cで一晩放置する。
6. 沈降線を観察し、型を決定する。

抗血清は、一般に未吸収のものを用いる。未吸収の血清はA群多糖体に対する抗体とM蛋白に対する抗体の両者を含むが、アガロース内では、M蛋白より分子量の小さいA群多糖体のほうが移動速度が速い。そのため、A群多糖体による沈降線は抗血清のウェルの近くに現れ、M蛋白による沈降線は抗血清と抗原の中間に現れるので、区別は可能である。

2 M蛋白遺伝子 (*emm*) のシーケンスによるM型別

M蛋白はN末よりhypervariable region、variable region、conserved regionに分けられる。PCRに用いるプライマーをデザインする場合、C末のconserved regionはその塩基配列も各型に共通な配列が存在して問題がないが、N末はhypervariable regionで、それぞれの型に特異的な領域であり、各型に共通な配列は存在しないことから、各菌株に共通なプライマーは設定できない。しかし、M蛋白は菌体外に突出した蛋白質であることから、菌体内で作られたときはそのM蛋白を菌体外に分泌するためのシグナルペプチドが存在する。このシグナルペプチドはN末からbasic region、hydrophobic region、cleavage regionに分けられ、その中でもbasic regionは各型に共通な配列が存在する¹⁹⁾。したがって、シグナル

ペプチドのbasic regionおよびconserved regionをコードする領域にプライマーを設定することにより、*emm*遺伝子の増幅が可能となる²⁰⁾。

1) Genomic DNAの抽出

方法1：

1. 血液寒天培地上の数コロニーをTE buffer (pH8.0) (10 mM Tris (pH8.0), 1 mM EDTA) 100 μ lに懸濁する。
2. ヒートブロックで95°C、10分間加温する。
3. 15,000 x g、5分間遠心する。
4. 遠心上清をPCRのtemplateとする。

方法2：

1. 血液寒天培地上の数コロニーをTris buffer (pH 8.0) 90 μ lにけん濁する。
2. 70°C、10分間ヒートブロックで加温する。
3. mutanolysin (1mg/ml) 10 μ l 添加する。
4. 37°C、1時間加温する。
5. High Pure PCR products purification kit (Roche)を用いてgenomic DNAを抽出する。
(方法は以下に示す)
6. Collection tubeにHigh pure spin filter tubeを差し込む。
7. High pure spin filter tubeの中にBinding buffer 500 μ lと mutanolysin処理液100 μ lを加え、ピペットマンでよく攪拌する。
8. 17,000 x g、30秒間遠心する。
9. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
10. Wash Bufferを500 μ l加える。
11. 17,000 x g、30秒間遠心する。
12. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
13. Wash Bufferを200 μ l加える。
14. 17,000 x g、30秒間遠心する。
15. High pure spin filter tubeを1.5 ml容サンプリングチューブに差し込む。
16. 10 mM Tris-HCl (pH8.0)を50 μ l加える。

17. 70°C、10分間加温する。
18. 17,000 x g、30秒間遠心する。
19. サンプリングチューブ内の溶液をPCRのtemplateとする。

2) PCRによる *emm* 遺伝子の増幅

プライマー ; emm-1: TAT T(C/G)G CTT AGA AAA TTA A
 emm-2: GCA AGT TCT TCA GCT TGT TT

3) PCR反応液

AmpliTaq Gold with PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)を用いる例を示す。

滅菌蒸留水	20.0 μ l
10 x PCR Gold buffer	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTPs mixture (2.5 mM each)	5.0 μ l
Primer emm-1 (10 pmol / μ l)	7.0 μ l
Primer emm-2 (10 pmol / μ l)	7.0 μ l
AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U / μ l)	0.25 μ l
Template	0.75 μ l

4) 反応条件

Pre : 95°C 10 min.

95°C 30 sec. 52°C 30 sec. 72°C 2 min. 30 cycles

Post : 72°C 5 min.

4°C storage

5) 増幅の確認

PCR反応液を5 μ lとり、電気泳動にてDNAが増幅されているかを確認する。

6) PCR産物の回収

High Pure PCR products purification kit (Roche)を用いる例を示す。

1. Collection tubeにHigh pure spin filter tubeを差し込む。
2. High pure spin filter tubeの中にBinding buffer 500 μ lとPCRサンプル50 μ lを加え、ピペットマンを用いてよく攪拌する。

3. 17,000 x g、30秒間遠心する。
4. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
5. Wash Bufferを500 μ l加える。
6. 17,000 x g、30秒間遠心する。
7. Collection tube内の溶液を捨て、High pure spin filter tubeを差し込む。
8. Wash Bufferを200 μ l加える。
9. 17,000 x g、30秒間遠心する。
10. High pure spin filter tubeを1.5 ml容サンプリングチューブに差し込む。
11. 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を50 μ l加える。
12. 17,000 x g、30秒間遠心する。
13. サンプリングチューブ内の溶液をシーケンス反応のtemplateとする。

7) シークエンス反応

シーケンス用プライマー

emmseq2 : TAA TCG CTT AGA AAA TTA AAA ACA GG

シーケンス反応試薬

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

を用いてシーケンス反応液を調製する。

PCRに用いたemm-1プライマーでもシーケンスは可能である。

8) 反応条件

Pre : 96°C 30 sec.

96°C 30 sec. 45°C 10 sec. 60°C 4 min. 25 cycles

4°C storage

9) シークエンス

解析には最低90 bpのデータが必要である。

10) シークエンスデータの解析および型別

Center for Disease Control and Prevention (CDC) の *Strep* HOME, *Streptococcus pyogenes* Database (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.htm>) よりBLAST-*emm*の項を開き、必要事項 (Requestor, Phone, Sample Identifier)、E-mail addressおよびシーケンスデ

ータを送付する。サーチ結果をメールで受け取る。

3. 発赤毒素型別

発赤毒素 (streptococcal pyrogenic exotoxin : Spe、あるいは、erythrogenic toxin : ET、Dick toxin)は、猩紅熱患者から分離されたA群溶レン菌株の培養濾液中に存在する病原因子として1924年Dickにより発見された²¹⁾。主なSpeとしては、SpeA、SpeB、SpeCがあり、それぞれの遺伝子(*spe*)はクローニングされ、塩基配列が決定されている^{22, 23, 24)}。*speA* は756 bp (分子量 : 25.8 kDa)、*speB* は1,197 bp (分子量 : 40.3 kDa)、*speC* は708 bp (分子量 : 24.4 kDa)である。これらの蛋白質は、それぞれ異なった性状を有することが知られている²⁵⁻²⁸⁾。

1 ラテックス凝集反応によるSPEの検出

五十嵐ら²⁹⁾は、ラテックス凝集反応による簡易・迅速なSpeA、SpeB、SpeC検出法を確立し、実用化した。試薬の作成方法としては、高純度のこれらの毒素を精製し、それをウサギに免疫して作製した血清から型特異的免疫グロブリンを調製し、最後にラテックス粒子に感作してラテックス凝集反応試薬を作製する。検出は、BHI液体培地で試供菌株を培養後、その上清とラテックス凝集反応試薬を反応させることによって行われる。非常に簡便であり、3時間程度で検出が行われるが、現在試薬は市販されていない。

2 *spe*遺伝子のPCR法による検出

speA、*speB*、*speC*それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを準備することにより、PCR法で簡便に遺伝子保有の有無を調べることができる。しかし、*spe*遺伝子の保有の有無とその菌が活性のあるSPEを産生しているかどうかは必ずしも相関しない可能性があるので注意を要する。

1) Genomic DNAの抽出

*emm*型別の項 (II-2-2-1)) と同様の方法でGenomic DNAを抽出する。

2) PCR法による *spe*遺伝子の増幅

プライマーは*speA*および*speB*については岸下らのデザインしたもの³⁰⁾を、*speC* については稲垣らのデザインしたもの³¹⁾を用いた。プライマーは各遺伝子の特異性を考慮し、

さらに、増幅されるDNA断片に大きさの違いを持たせ、アガロース電気泳動後の泳動位置を観察することによりいずれの遺伝子に由来するものかを容易に判別できるようにデザインされている。*spe*遺伝子検出に用いるプライマーの例を表2に示した。

表2 *spe*遺伝子増幅のためのプライマー

プライマー	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')	増幅されるDNA断片の大きさ(bp)
SPE-A1	GCTCAACAAGACCCCGATCC	
SPE-A2	TGATAGGCTTTGGATACCATCG	393
SPE-B1	GATCAAAACTTTGCTCGTAACG	
SPE-B2	AGGTTTGATGCCTACAACAGC	1113
SPE-C1	GACTCTAAGAAAGACATTTTCG	
SPE-C2	AGTCCCTTCATTTGGTGAGTC	540

3) PCR反応液

AmpliTaq Gold with PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)を用いる例を示す。

滅菌蒸留水	33.0 μ l
10 x PCR Gold buffer	5.0 μ l
25 mM MgCl ₂	5.0 μ l
dNTPs mixture (2.5 mM each)	4.0 μ l
Primer (10 pmol / μ l)	1.0 μ l
Primer (10 pmol / μ l)	1.0 μ l
AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U / μ l)	0.25 μ l
Template	0.75 μ l

4) 反応条件

Pre : 95°C 10 min.

95°C 30 sec. 52°C 30 sec. 72°C 2 min. 30 cycles

Post : 72°C 5 min.

4°C storage

5) 電気泳動による増幅産物の確認

1%アガロースを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、確認する。

III. サンプルの送り方

菌株の送付は、検体採取および輸送用の市販品（シードスワブ）、血液寒天培地、ゼラチンディスク（IV-2 参照）等であれば、常温で輸送可能である。

IV. 病原体の保存法

分離菌株を安定した状態で長期間保存することは、調査研究上重要であり、長期保存には凍結乾燥法が最も適した方法であろう。しかし、凍結乾燥法は、日常業務の中では煩雑で、高価な機器が必要となるためこれに代わる保存法を紹介する。

1. 凍結保存法

10% スキムミルク溶液に菌液を濃厚に懸濁、または、Todd-Hewitt Brothにて培養した菌体を遠心により回収し、新しいTodd-Hewitt Broth液で再浮遊後、セラムチューブ等で凍結保存(-80℃)する。凍結融解を行わなければ、10年以上保存可能である。

2. ゼラチンディスク法³²⁾

ゼラチンディスク法は凍結乾燥と同様、良好な保存状態が維持でき、輸送にも十分耐えうる。

1 ゼラチンディスク保存液

【A液】

Bacto dextrose	5.0%
Bacto skim milk	3.0%
charcoal activated	0.6%

よく混合して、スクリー試験管に分注し(5 ml)、110℃、10分間滅菌後、密栓して冷蔵庫で保存する。

【B液】

sodium L-ascorbate 5.0%

濾過滅菌後、少量(1 ml)ずつ分注し、密栓、遮光して凍結保存する。

B液の凍結融解は避ける。

【C液】

Bacto gelatin 20.0%

加熱溶解後、スクリー試験管に分注し(5 ml)、121℃、15分間滅菌後、密栓して冷蔵庫で保存する。

2 機材

[デシケーター]

吸引コックつきの真空用デシケーター

[シリカゲル(または五酸化リン)]

五酸化リンは、取り扱いおよび廃液処理が困難なため、現在は代用品としてシリカゲルを用いている。特に死滅しやすい菌以外はシリカゲルで代用できると思われる。

[パラフィン濾紙]

菌液を乾燥させるためパラフィン濾紙を作製する。直径7 cmの濾紙を固形パラフィンでコーティングするのが原法であるが、料理用のオーブンシート（リードクッキングペーパー等）を用いると便利である。オーブンシートをシャーレよりやや小さめにカットし、オートクレーブ滅菌後、乾燥する。使用時に一枚ずつ滅菌シャーレにとり使用する。滅菌シャーレはポリシャーレを使用することもできるが、ゼラチンディスク回収の際、静電気によりシャーレにディスクが張り付くことがある。

[真空ポンプ]

3 ディスクの調整法

菌株の準備：菌株の発育度に応じて1～数枚の非選択培地を用い、適した温度および方法で培養する（長時間培養したものは不適）。

[ディスクの作製]

1. 試薬A液をよく混合し、B液、C液は溶解しておく。
2. A液：B液：C液を1：0.2：1の割合で混合し、滅菌小試験管に分注しておく。
3. 平板に発育した菌体を白金耳でかき集め、試験管壁でよく混合し、均等な浮遊液とする。粘稠性の強い菌は、特に注意深く混合する。（浮遊したときの菌量は $10^9 \sim 10^{10}$ / ml以上とするが、菌量が多すぎるとゼラチン強度が低下しディスクが壊れやすくなるので注意する。レンサ球菌であれば、血液寒天平板1枚を0.5～1 mlに浮遊させると適当量であると思われる。）

4. 菌体浮遊液を滅菌パスツールピペットで気泡が入らないように滅菌シャーレ中のパラフィン濾紙上に適当な間隔をあけ滴下する。1 mlの浮遊液で約30滴滴下できる。
5. デシケーターの中に入れ、シャーレの蓋の間に滅菌ガラス棒を入れる。また、シャーレを器とし、シリカゲル（または五酸化リン）を数カ所にいれる。
6. デシケーターの蓋を閉じて真空ポンプで減圧する。（減圧しすぎると気泡を生じ、また、弱すぎても乾燥に時間がかかり生菌数も減少するので注意する。）
7. ディスクが平坦になり始めたら減圧を止め、室温に放置する。
8. 翌日には、乾燥したゼラチンディスクができあがる。

ディスクの保存

1. 乾燥したディスクは先の細いピンセットでパラフィン濾紙から剥がす。
2. 滅菌したセラムチューブに入れ、密栓し -20°C 以下の冷凍庫で保存する。また保存と同時に、作製したゼラチンディスク1枚を溶解し、平板に塗抹培養し生菌数が十分であることを確認する。

[ディスクの溶解]

使用するときには、ディスク1枚を取り出し、滅菌した液体培地0.1~0.2 ml程度に浮遊させる。溶解後はそのまま培養せず、平板に塗布後、分離培養を行う。この他、ディスクをそのまま寒天培地に置いて、数分放置し、寒天培地の水分でふやかしてから塗布することも可能である。

V. 引用文献

- 1) Rotta J, Facklam RR. 1980. Manual of Microbiological Diagnostic Methods for Streptococcal Infections and Their Sequelae. WHO/BAC/80.1
- 2) 児玉博英、永瀬金一郎、奥山雄介ほか. 1987. レンサ球菌. 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版、F2-F30、金井興美、赤尾頼幸、伊藤雅治ほか編、日本公衆衛生協会、東京。
- 3) Ruoff KL. 1995. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology sixth ed, 299-307, Murray PR *et al.* eds., ASM Press, Washington DC.
- 4) Lancefield RC. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 57: 571-95.
- 5) Facklam RR, Edwards LR. 1979. A reference laboratory's investigations of proposed M-type strains of *Streptococcus pyogenes*, capsular types of *S. agalactiae*, and new group antigens of streptococci. In: Parker M.T. (ed). Pathogenic Streptococci. Chertsey, Surrey: Reedbooks. 251-3.
- 6) Schleifer KH, Kilpper-Balz R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci, and Lactococci; A Review. Syst Appl Microbiol 10: 1-19.
- 7) Bae BHC, Bottone EJ. 1980. Modified Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) test for direct identification of hemolytic and nonhemolytic group B streptococci on primary plating. Can J Microbiol 26: 539-42.
- 8) Gerber MA, Spadaccini LJ, Wright LL, Deutsch L. 1984. Latex agglutination tests for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. J Pediatr 105: 702-5.
- 9) Drulak M, Bartholomew W, LaScolea L *et al.* 1991. Evaluation of the modified Visuwel Strep-A enzyme immunoassay for detection of group-A Streptococcus from throat swabs. Diagn Microbiol Infect Dis 14: 281-5.
- 10) Gerber MA, Randolph MF, DeMeo KK. 1990. Liposome immunoassay for rapid identification of group A streptococci directly from throat swabs. J Clin Microbiol 28: 1463-4.
- 11) Centers for Disease Control and Prevention Homepage. *Streptococcus pyogenes* database. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.htm>.
- 12) Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J *et al.* 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. Proc Natl Acad Sci USA 85: 1657-61.
- 13) Jacks-Weis J, Kim Y, Cleary PP. 1982. Restricted deposition of C3 on M⁺ group A streptococci: correlation with resistance to phagocytosis. J Immunol 128: 1897-902.
- 14) Johnson DR, Kaplan EL. 1993. A review of the correlation of T-agglutination patterns and M-protein typing and opacity factor production in the identification of group A streptococci. J Med Microbiol 38: 311-5.
- 15) Griffith F. 1935. The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. J Hyg 34: 542-84.

- 16) Swift HF, Wilson AT, Lancefield RC. 1943. Typing of group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. *J Exp Med* 78: 127-33.
- 17) 中島邦夫、奥山道子. 1988. レンサ球菌の分類と関連抗体。皮膚科MOOK 17: 47-56.
- 18) 勝川千尋、原田七寛. 1991. 大阪府下で分離されたA群溶血レンサ球菌の血清型と薬剤感受性について(1988～1989年)。感染症学雑誌 65: 945-52.
- 19) Katsukawa C. 1994. Cloning and nucleotide sequence of type 3 M protein gene (*emm3*) consisting of an N-terminal variable portion and C-terminal conserved C repeat regions: relation to other genes of *Streptococcus pyogenes*. *Kansenshogaku Zasshi*. 68: 698-705.
- 20) Beall B, Facklam R, Thompson T. 1996. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 34: 953-8.
- 21) Dick GF, Dick GH. 1924. A skin test for susceptibility to scarlet fever. *JAMA* 82: 265-6.
- 22) Week CR, Ferretti JJ. 1986. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. *Infect Immun* 52: 144-50.
- 23) Hauser AR, Schlievert PM. 1990. Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between the toxin and the streptococcal proteinase precursor. *J Bacteriol* 172: 4536-42.
- 24) Goshorn SC, Schlievert PM. 1988. Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infect Immun* 56: 2518-20.
- 25) Kim YB, Watson DW. 1970. A purified group A streptococcal pyrogenic exotoxin. *J Exp Med* 131: 611-28.
- 26) Barsumian EL, Cunningham CM, Schlievert PM *et al.* 1979. Heterogeneity of group A Streptococcal pyrogenic exotoxin type B. *Infect Immun* 20: 512-8.
- 27) Schlievert PM, Bettin KM, Watson DW. 1977. Purification and characterization of group A streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infect Immun* 16: 673-9.
- 28) McMillian RA, Bloomer TA, Saeed AM *et al.* 1987. Characterization of a fourth streptococcal pyrogenic exotoxin (SPE D). *FEMS Microbiol Lett* 44: 317-22.
- 29) 五十嵐英夫、柏木義勝、遠藤美代子、奥野ルミ. 1994. 劇症型A群レンサ球菌感染症。臨床と微生物 21: 638-47.
- 30) 岸下雅道、山崎伸二、竹田美文. 1992. A群溶連菌の産生する発赤毒素遺伝子のPCRによる型別判定。日本臨床 50: 326-32.
- 31) 稲垣善重、渡辺治雄. 1997. 発赤毒素spe遺伝子のPCRによる検出。劇症型A群レンサ球菌感染症ーヒト喰いバクテリアの出現ー、近代出版 193-7.
- 32) Obara Y, Yamai S, Nikkawa T *et al.* 1981. Preservation and Transportation of Bacteria by a Simple Gelatin Disk Method. *J Clin Microbiol* 14: 61-6.

VI. 検査依頼先

衛生微生物技術協議会溶血性レンサ球菌レファレンスシステムセンター窓口

A 群レンサ球菌の T, M 型別試験、および劇症型 A 群レンサ球菌感染症に関する情報についての窓口は以下の機関になっておりますので、お問い合わせをお願いいたします。

センター 国立感染症研究所細菌第一部 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1	TEL : 03-5285-1111 FAX : 03-5285-1163
北海道・東北・新潟ブロックセンター 福島県衛生研究所 〒960-8560 福島県福島市方木田字水戸内 16-6	TEL : 024-546-8047 FAX : 024-546-8364
東海・北陸ブロックセンター 富山県衛生研究所 〒939-0363 富山県射水市中太閤山 17-1	TEL : 0766-56-8142 FAX : 0766-56-7326
関東・甲信静ブロックセンター 神奈川県衛生研究所 〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1	TEL : 0467-83-4400 FAX : 0467-83-4457
東京都ブロックセンター 東京都健康安全研究センター 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1	TEL : 03-3363-3231 FAX : 03-3368-4060
近畿ブロックセンター 大阪府立公衆衛生研究所 〒537-0025 大阪府大阪市東成町中道 1-3-69	TEL : 06-6972-1321 FAX : 06-6972-0772
中国・四国ブロックセンター 山口県環境保健センター 〒753-0821 山口県山口市葵 2 丁目 5-67	TEL : 083-922-7630 FAX : 083-922-7632
九州ブロックセンター 大分県衛生環境研究センター 〒870-1117 大分県大分市高江西 2-8	TEL : 097-554-8984 FAX : 097-554-8987

VII. 執筆者一覧

池辺忠義：国立感染症研究所 細菌第一部

千葉一樹：福島県衛生研究所 微生物課

嶋 智子：富山県衛生研究所 細菌部

奥野ルミ：東京都健康安全研究センター 微生物部

大屋日登美：神奈川県衛生研究所 微生物部

勝川千尋：大阪府立公衆衛生研究所 感染症部

富永 潔：山口県環境保健センター 保健科学部

緒方喜久代：大分県衛生環境研究センター 微生物担当