

偏性嫌気性菌 *Clostridium difficile* の遺伝子診断による産生毒素に関する研究

日大生産工(院) 水谷英理子

日大生産工 神野英毅

【緒言】

*Clostridium difficile*は、芽胞を形成しやすい偏性嫌気性のグラム陽性桿菌で、酸素に極めて感受性が高く、空気に触れると容易に死滅する。また抗生物質が効かない薬剤耐性菌のため、クリンダマイシンやアンピシリンなどの抗生物質を投与することにより他の菌が死滅すると、この菌だけが生き残り異常増殖を起こし二つの毒素であるenterotoxin (toxin A) と、cytotoxin (toxin B)を産生するようになる。産生された二つの毒素が腸管粘膜に障害を起こし、*C.difficile* 関連下痢症 (CDAD)、出血性腸炎、偽膜性大腸炎を発症する¹⁾。*C.difficile*で特に問題となっているのは、耐気性のある芽胞のかたちで医療スタッフの手指や医療機器などを含む環境に生存し続け、院内感染を引き起こすことである。この*C.difficile*を検出する方法として、微生物培養及び、CDチェック・1法として知られているラテックス凝集法、そして毒素検出には現在日本では酵素免疫法によるtoxin A検出キットが利用できる。しかしこのキットは迅速かつ簡便であるが、感度が高くないことと、toxin A陰性toxin B陽性菌株が検出されないという問題点があり、CDADや腸炎が見過ごされる恐れがある²⁾。

そこで、toxin A 及び toxin B の毒素産生遺伝子の特異的に検出する方法として、遺伝子増幅法であるPCR及びReal-Time PCRに注目した。Real-Time PCRは非常に迅速に反応系を加熱・冷却することでPCR反応の結果を得るまでにかかる時間を短縮し、PCR産物の増

幅する様子をインターカレーター (SYBR Green)を用いてリアルタイムにオンラインで観察することができるため、電気泳動法と比較してより高感度にPCR産物の検定が可能となった。本研究では、*C.difficile*を迅速かつ簡便に検出するためにReal-Time PCRを行い、さらに迅速で高感度な遺伝子検出による診断法の確立を目指し検討を行った。

【実験】

C.difficile GAI 10029株及び97288株をBHK寒天培地で嫌気培養を行い、得られた黄色のコロニーを釣菌し、3%BHI培地で4~6日間嫌気培養したものをを用いてDNAを抽出した。DNA抽出は、Proteinase Kを作用させた後、フェノール・クロロホルム法により行った。

PCRは、toxin A及びtoxin B由来のprimerを用いて熱変性を94℃、アニーリングを54℃、伸長反応を72℃の各々1分間、全30サイクルで行った。その際、PCRの反応液組成は25mM MgCl₂ 10μl、10×PCR buffer (Mg free) 10μl、Taq polymerase (5U/μl) 0.5μl、dNTP Mixture (2.5mM each) 8μl、DNAサンプル10μl、primer1,2各2.5μl、DEPC処理超純水56.5μl、合計100μlであった。その後得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

Real-Time PCRは、蛍光検出法としてSYBR Greenを用い、熱変性を95℃、アニーリングを55℃、伸長反応を72℃の各々10秒間、全45サイクルで行った。最後のPCRサイクルの後、産物を95℃で変性し、55℃でアニー

Studies on *Clostridium difficile* Toxin A and Toxin B Gene

Based on Real-Time PCR Technology

Eriko MIZUTANI, Hideki KOUNO

リングさせた後、65 から 95 までゆっくり加熱することで融解曲線分析を行い、増幅された産物の配列の確認を行った。

【結果・考察】

C.difficile GAI 10029 株において、toxin A 由来の NK2-NK3 primer 及び toxin B 由来の NK104-NK105 primer を用いて RCR を行った結果、各々の primer の検出感度は、14.4ng/ml 及び 1.44ng/ml であった。同様に 97288 株では、8.35ng/ml 及び 0.835ng/ml であった。それに対して Real-Time PCR では、既知濃度の DNA サンプルをスタンダードとし、立ち上がりのサイクル数を考慮し、増幅曲線 (Fig.1) から検量線 (Fig.2) を引いた結果、10029 株における各々の primer の検出感度は、14.4pg/ml 及び 140pg/ml であった。同様に 97288 株では 8.35pg/ml 及び 87.7pg/ml であった。さらに検量線から未知試料サンプル (Sample A ~ E) の濃度を導き出した。また融解曲線分析から目的産物の確認ができた (Fig.3)

以上のことより PCR で使用している NK2-NK3 primer、NK104-NK105 primer を用い、Real-Time PCR においても *C.difficile* を検出することができた。さらに Real-Time PCR は PCR と比較し、NK2-NK3 primer では 1000 倍、NK104-NK105 primer では 10 倍ほど感度が高く、迅速かつ簡便であることから *C.difficile* の検出法として有用であるといえる。

【参考文献】

- 1) Naoki Kato,Chin-Yih Ou,Haru Kato,*Junal of Microbiology*,29, (1991) , pp.33-37
- 2) 加藤はる,加藤直樹,*Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査,日本臨床微生物学雑誌,12, (2002) , pp.115-121
- 3)Simon D.Belanger,MauriceBoissinot,*American Society for Microbiology*,41, (2003) ,pp.730-734

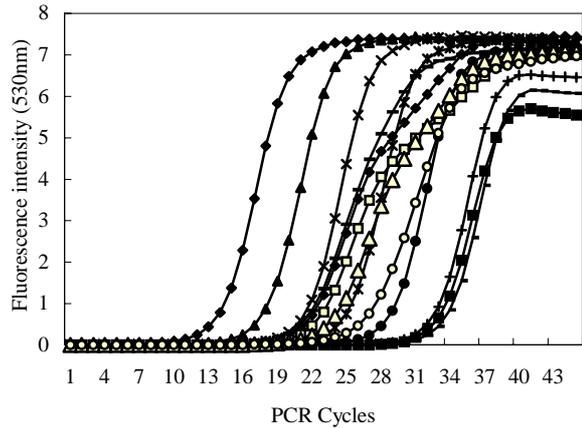


Fig.1 Amplification Curves

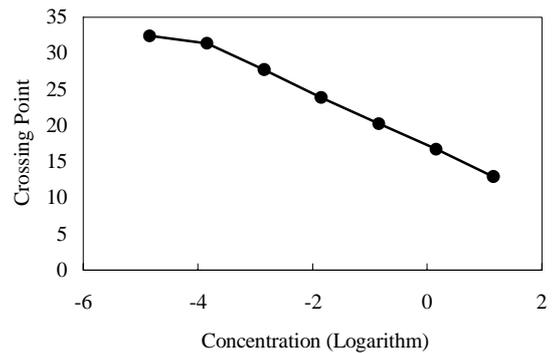


Fig.2 Standard Curve

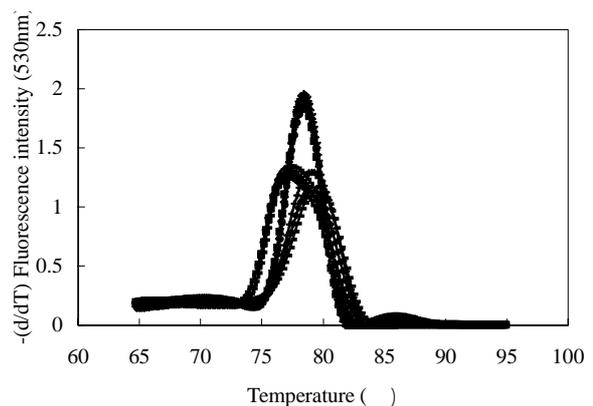


Fig.3 Melting Peaks

