

**PCR 法及び Real-Time PCR 法による
Clostridium perfringens 毒素産生遺伝子検出法の研究**

日大生産工（院） ○ 篠崎 温子
日大生産工 神野 英毅

1 緒言

Clostridium perfringens (*C.perfringens* 図1) は, 芽胞を形成する偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種で, 鞭毛を持たないため運動性がなく, 増殖時にガスを発生する, という特徴を有する。

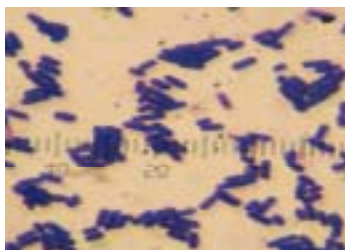


図1 *C.perfringens* (スケール1 μm)

本菌はヒトを含む動物の腸管内, 土壌, 下水, 河川など自然界に広く分布している。一般に, ヒトの体皮や腸管内に常在する細菌類は常在細菌叢を形成しているが, 何らかの原因によりその菌叢がくずれることで芽胞を形成する。*C.perfringens*は芽胞形成時に数多くの毒素タン

パクを産生する。そのうち, 以下に示した4つの主要毒素産生能により菌種はA~E型に分類される。

現在行われている診断法として, 細胞培養試験, ウサギやマウスを用いた腸管結紮試験, マウス致死性試験などの生物学的検査法のほかに, 逆受け身ラテックス凝集反応や enzyme-linked immunosorbent assay 法などの免疫学的検査法などが挙げられる。しかし, これらの検査方法では診断結果が得られるまでに日数を要するうえ, 芽胞を形成させる為の特殊な培地を用いても, 毒素タンパクがうまく生成されず, 検出は必ずしも容易ではない。そこで, 特殊な培養を行うことなく, 目的の産生株を検出・同定する方法として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて目的の毒素産生部位のみの遺伝子を増幅することによる, 迅速診断法の確立を目指して実験を行った。

本方法であれば, 毒素タンパクを生成していなくとも, 毒素産生能を持つ菌体の有無により診断を行うことができるため, 迅速かつ簡便な検査法である。そのうえ, 誤診の可能性を減少させることができ, 病原体の不明なままでの広範囲の細菌に有効な抗生物質の投与を削減し, 範囲を特定した治療法を選択することが可能であると考えられる。

表1 産生毒素による菌種分類

	α toxin	β toxin	ϵ toxin	ι toxin
A型	+			
B型	+	+		
C型	+	+	+	
D型	+		+	
E型	+			+

**Study on *Clostridium perfringens* Toxin-Producing Gene
by PCR and Real-Time PCR
Atsuko SHINOZAKI and Hideki KOHNO**

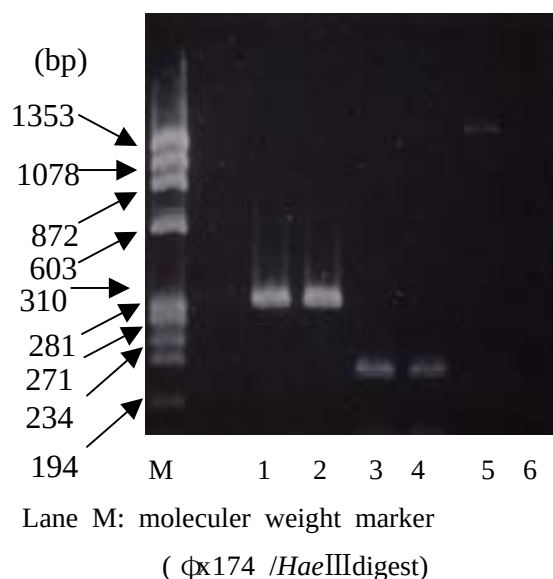
2 実験方法

使用菌株は GAI 96293 株及び、GAI 98052 株を 3 % Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地を平均 4 日間培養したものを用いた。得られた菌体をフェノール - クロロホルム抽出法・アルコール沈殿法などを用いて DNA を抽出し、得られた DNA を PCR 法により増幅した。0.5ml マイクロチューブ中で調製した PCR 反応液 100 μ l をサーマルサイクラーを用いて、まず 94°C に加熱し DNA の熱変性を行い 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に解離させ、次に温度を 55°C に下げ primer の annealing を行い、最後に 72°C にして伸長反応させるという操作を 33 サイクル繰り返すことにより、理論上では 2³³ 倍の増幅産物を得た。得られた増幅産物を 2.0% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色した後、紫外線照射用ポラロイドカメラを使用して、ゲルを撮影した。

また、同じく得られた DNA を用いて Real-Time PCR を行った。この方法の増幅原理は PCR 法と同様であるが、反応試料溶液に 2 本鎖 DNA の副溝にのみ結合する SYBR Green I を用いることで、反応を行いながら結果をリアルタイムで観察できるうえに、ゲル電気泳動を行う必要がない。また、反応系全体の温度を変化させることで実験操作自体にかかる時間を短縮することができるという利点をもつ。しかし、今回は増幅結果を比較する為に、Real-Time PCR 後の増幅産物も PCR 法と同様にアガロースゲルによる電気泳動を行った。

3 結果及び考察

DNA 抽出によって得られた *C. perfringens* GAI 96293 株を吸光光度計 (波長 260nm) を用いて濃度を測定した結果、DNA 濃度は 48 μ g/ml であった。得られた DNA sample を各 toxin 由来の primer を用いて DNA を増幅し、アガロースゲル電気泳動を行った結果



Lane 1: negative control

Lane 2: α -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

Lane 3: α -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

Lane 4: β -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

Lane 5: β -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

Lane 6: ϵ -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

Lane 7: ι -toxin primer 4.8×10^{-1} μ g/ml

図 2 PCR amplification of the *C. perfringens* GAI 96293 DNA using each primer

を図 2 に示した。

その結果、 α -toxin、 β -toxin 由来の primer にのみ、バンドを検出することができ、同定の結果、GAI 96293 株は B 型毒素であると判断できた。また、Real-Time PCR 法においても同様の結果が得られた。その結果、両者を比較すると、検出感度、操作の迅速かつ簡便さの点から見て、Real-Time PCR 法は PCR 法以上に迅速診断法として有用であるといえる。

参考文献

- 1) Titball RW et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens* I infection and Immunity ,57 1989 367-376
- 2) 加藤直樹 他 Polymerase Chain Reaction によるエンテロトキシン産生性 *Clostridium perfringens* の同定 感染症学雑誌 第 67 巻 第 8 号 1991 724-729