

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

嫌気性菌 *Clostridium perfringens* の毒素産生遺伝子による診断法に関する研究

神野英毅（応用分子化学科） 岩村道子（東邦大・理）

松本宏治郎（東邦大・薬）

1 緒言

医学、薬学領域の進歩や高度な医療技術により、感染症の問題はほとんど解決されると予想されてきた。しかしながら、現代社会の中にはまだまだ新しい課題が投げかけられている。その一つに、院内感染や日和見感染症が挙げられる。これは、高度医療により抵抗力の弱い易感染性患者や老人が増加したためと考えられる。また、輸送手段の発達による物流移動のスピード化と大規模輸送により、感染症の拡散は短時間で、広範囲に及ぶようになった。そこで、被害の拡散を最小限に抑える為にも、原因を早期解明し、正しい対策を確立することが重要である。

感染症における原因菌の一つに、*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*, Fig.1) が挙げられる。本菌は、グラム陽性桿菌の一種で、動物の腸内や土壤中に広く分布している常在菌である。また、嫌気条件における増殖が早い為、臨床的に感染から腸炎発症まで短時間で進行するという特徴を有する。本菌による症状は、主要タンパク毒素4種の産生性により5種類のタイプに分類され、ヒトではガス壊疽、食中毒、壊死性腸炎など発症する¹⁾。現存の診断方法としては、生物学的検査法・免疫学的検査法・遺伝子検出法などが挙げられるが、本菌の毒素産生機序は未だ不明な点が多く、どの方法も診断結果が得られる前に日数を要する。また、特殊な培地や培養方法を用いてもタンパク毒素が産生されにくく、毒素タンパクによる検出法を含め、現在の迅速診断法には改善点が多く挙げられる。そこで、複雑な培養を必要とせず、菌が保有する毒素産生部位の遺伝子のみを標的として増幅・検出する遺伝子検出法の有用性に注目し、遺伝子レベルでの迅速かつ簡便な検出法の確立を目指して研究を行った。

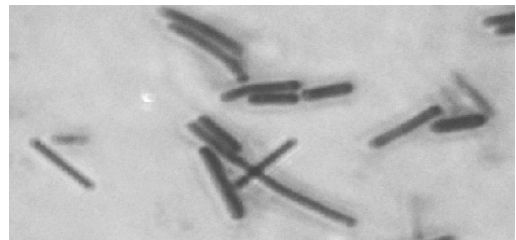


Fig.1 Gram stain of *C. perfringens*

2 実験方法

2-1 DNA抽出

実験には、岐阜大学 生命科学総合実験センター嫌気性菌実験分野より供与された臨床分離株 *C. perfringens* GAI (94073, 94074, 94075, 94084, 94096, 94097, 94003, 94032) の8菌株を用いた。

まず、前培養として3% BHI 液体培地 (Difco) で3~4日間嫌気培養を行い純培養した後、5%卵黄液を含む変法 GAM 寒天培地 (日水製薬) または CW 寒天培地 ‘栄研’ (栄研化学) にて3~4日間嫌気培養した。DNA抽出法は、コロニーにからの Boiling 法と、Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol による分離の後、Ethanolにより精製する方法の2種類を用いた。

2-2 模擬糞便からのDNA抽出

本菌における臨床診断は通常、患者より得られた糞便を特殊な培地を用いて分離培養し、菌体の検出を行う。菌の培養には少なくとも1日を要するため、迅速性にかける。そこで今回、菌の単離を行うことなく、模擬糞便から直接DNAを抽出する方法を考案した。

まず、PBS(-)を加えたマウスの乾燥糞便を一定時間37°Cで培養し、そこに菌体を加えることでマウス模擬糞便を作成した。そして、遺伝子抽出では、桿菌の硬いペプチドグリカン層と不要なタンパクを分解するため、抽出溶液中にガラスビーズを加えるとともに、酵素によるタンパク分解の前に熱による分解を

行った。以後の抽出法はコロニーからの DNA 抽出法と同様にした。

2-2 遺伝子増幅法

2-2-1 PCR 法

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 サイクル繰り返した。そして、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。

2-2-2 Multiplex PCR 法

Multiplex PCR 法は同一反応系に 5 種の primer を加え、得られたバンドの違いにより菌型を調べることが出来る。今回の実験には、 α -、 β -、 ϵ -、 ι -toxin 及び enterotoxin 由来の primer を用い、annealing 温度を 55°C に設定し実験を行った²⁾。

2-2-2 Real-Time PCR 法

Real-Time PCR 法の増幅原理は PCR 法と同様であるが、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。今回は反応試料溶液に、蛍光標識として 2 本鎖 DNA の副溝にのみ結合する SYBR Green I を加えて実験を行った。そうすることで、PCR 法と同様の primer を用いて増幅させることが出来る。検出は、増幅曲線の立ち上がりと線の角度、及び、融解曲線によりにより増幅産物の確認を行った。そして更に、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。

2-2-3 LAMP 法

検出感度を比較すべく、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて実験を行った。LAMP 法とは 1 種類の酵素のみを使用して、一定温度で効率的に遺伝子を増幅させる方法である。増幅領域の一方と相補的な配列を 3' 末端にもち、5' 末端にその DNA 鎖の内側の領域と同じ配列を持つ特徴的な primer を使用することにより、自己ループ

構造をとり連続的に伸長反応を繰り返し、多量に DNA を増幅することが出来る。今回の実験では温度を 63 °C に設定し、実験を行った。増幅反応は 100°C で 15 分間過熱し、酵素を失活させ、停止させた。

検出は目視で行うことも可能ではあるが、増幅反応の過程における副産物としてピロリン酸マグネシウムが増幅産物と比例して産生されることから、増幅産物の量が非常に多い本法では増幅反応中リアルタイムで反応液の濁度を測定し、遺伝子増幅を確認することができる。今回は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (富士通システムソリューションズ LA-200) を用いて検出を行った。

3 結果及び考察

3-1 菌型の判定

Egg-York 法を利用して毒素産生性を確認した菌体を、ボーリング法により DNA 抽出を行い、alpha-toxin 産生遺伝子由来の primer を用いて PCR を行った。そして、シングルバンドの検出を確認した後、さらに、Alpha-、Beta-、Epsilon-、Iota-toxin 産生遺伝子由来の primer を一度に反応系に用いて multiplex PCR 法により各菌体のタイプを判定した。その結果、324 bp 付近にシングルバンドが確認され、8 菌体全てが Alpha-toxin のみを産生する A 型菌であることが判明した。A 型菌は食中毒以外にガス壊疽の原因菌である。

3-2 enterotoxin 産生性

食中毒の原因毒素であるとされる enterotoxin 産生能の有無はタイプに関わらず出現する。今回、enterotoxin 産生遺伝子由来の primer を用いて産生能を調べた結果、235 bp 付近にシングルバンドを確認することができ、GAI 94073、94075、94084 株が enterotoxin 産生株であることが判明した。

enterotoxin は通常、加熱処理により耐熱芽胞が形成された際に産生され、その後芽胞の形成が進み、菌体が自己融解した時に菌体外に放出される。本毒素は食中毒の原因菌とされているが、その発症は、食物とともに摂取された 10⁸/g 程度の enterotoxin 産生菌が小腸で芽胞を形成するときに毒素を産生して起こる³⁾。

3-3 模擬糞便からの検出

今回試みた模擬糞便からの DNA 抽出は、比較サンプルとして菌体を混入させない糞便を Negative control として用いた結果、目的の位置にバンドは検出されなかったことから、模擬糞便からの検出に成功したと言える。

3-4 検出感度の検討

3-4-1 PCR 法による検出感度比較

マウス模擬糞便からの遺伝子抽出操作により得られたサンプルを alpha-toxin 産生遺伝子由来の primer を用いて PCR により増幅・検出し、検出限界感度を測定した。検出の結果、GAI 94074 株では増幅前の DNA 濃度で $1.53 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで、検出を確認することができた。

3-4-2 Real-Time PCR 法による検出感度比較

Fig. 4 の増幅曲線の立ち上がりと線の平行性、及び、融解曲線の負の一次微分を用いることで視覚化した Melting peak (Fig. 5) の位置により目的の Alpha-Toxin 産生遺伝子部位の増幅を確認した。そして、各菌体における検出感度を比較した結果、増幅前の濃度で $1.53 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の感度まで、検出を確認することができた。

3-4-3 LAMP 法による検出感度比較

今回、新たに行った LAMP 法における primer の設計は、Alpha-toxin 産生遺伝子のうち、他の 2 方法との検出感度を比較するために、PCR 法に用いた primer の位置とほぼ同位置から少し下流を用いて設計した。その結果、増幅反応中リアルタイムで反応液の濁度を測定 (波長: 650nm) することにより増幅を確認することができた。また、得られた増幅産物をゲル電気泳動した場合、様々な長さで増幅される為、ラダーバンドになって検出された。しかし、primer 設計に用いた遺伝子配列を参考に、ターゲット遺伝子の中央にあたる部分を制限酵素 (*Hinf*1) で処理することにより、シングルバンドに収束することができた (Fig. 6)。

3-4-4 遺伝子増幅法の検出限界感度比較検討

結果として PCR 法は最高でも増幅前の DNA 濃度で示すと $1.53 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の検出感度であ

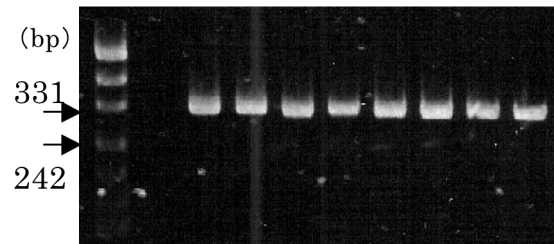


Fig.2 Detection of *C.perfringens* amplified in Multiplex PCR

M : Marker 11(pUC19/ Msp I digest)

N : Negative control, 1 : GAI 94073, 2 : GAI 94074, 3 : GAI 94075, 4 : GAI 94084, 5 : GAI 94096, 6 : GAI 94097, 7 : GAI 94003, 8 : GAI 94032

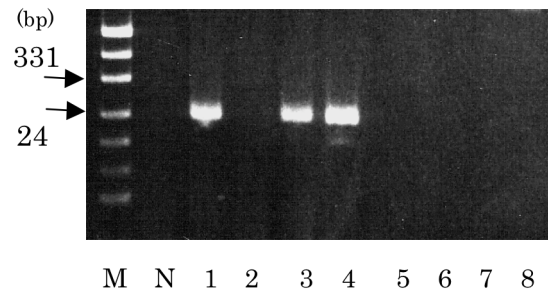


Fig.3 Detection of *C.perfringens* toxin amplified in PCR products amplification of *cpe* primer.

M : Marker 11(pUC19/ Msp I digest)

N : Negative control, 1 : GAI 94073, 2 : GAI 94074, 3 : GAI 94075, 4 : GAI 94084, 5 : GAI 94096, 6 : GAI 94097, 7 : GAI 94003, 8 : GAI 94032

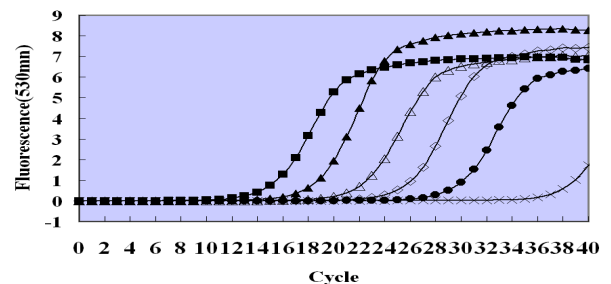


Fig.4 Mplification curves

- × 1 : Negative control
- 2 : $1.53 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- ▲ 3 : $1.53 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- △ 4 : $1.53 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- ◇ 5 : $1.53 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 6 : $1.53 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$

り、Real-Time PCR 法により得られた検出感度及び、LAMP 法により得られた検出がそれぞれ最高、 $1.53 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $1.27 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ と比較すると10分の1の検出感度に留まった。これは、他の2方法と比較し、操作が複雑である上に時間を要するなどの人為的要因により増幅が阻害されているためと考えられるほか、目視による検出法の限界を示していると考えられる。

4 結言

以上のことより、primer の特異性を活かし、動物模擬糞便からの DNA 抽出が可能である事が証明できた。今後は、ヒト糞便からの検出を行い、実際の診断法として用いられるよう、さらなる検討を重ねたい。

PCR 法は最も利用されている遺伝子増幅法ではあるが、操作法・検出感度など多数問題点があることが確認できた。それと比較すると、今回自ら primer を設計し、検出を行った LAMP 法は検出時間が15分から30分と非常に短時間で、一定温度で反応を進行させることができるという簡便性をもつ。よって、PCR 法の改善法として注目されている Real-Time PCR 法と比較して引けを取らないだけでなく、感度においても優れており、*C. perfringens* 毒素産生遺伝子の検出において大変有用であることが明らかとなった。

今後、primer の高い特異性を活かし、菌株の違いによる遺伝子の違いを検出するなど、更なる応用法を検討していきたい。

5 参考文献

- 1) W Titball, S E Hunter, K L Martin, B C Morris, A D Shuttleworth, T Rubidge, D W Anderson, and D C Kelly : Infection and Immunity, 57 (2) , (1989) , 367-376.
- 2) 矢野郁也, 内山武彦, 熊沢義雄 : 病原微生物学, 東京化学同人 (2002) , 106

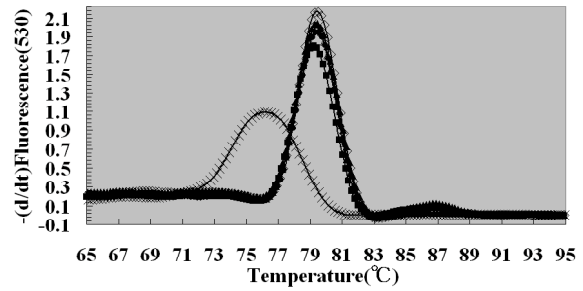


Fig. 5 Melting peaks

- ×— 1 : Negative control
- 2 : $1.53 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- ▲— 3 : $1.53 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- △— 4 : $1.53 \times 10^{-7} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- ◇— 5 : $1.53 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 6 : $1.53 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$

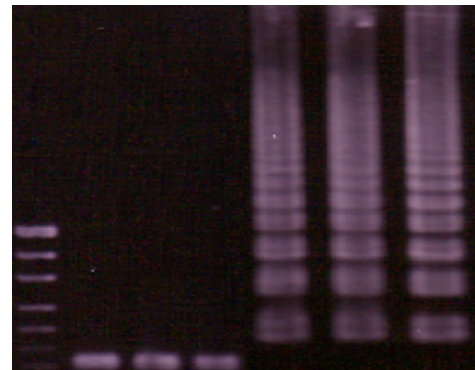


Fig. 6. LAMP products obtained amplification of *cp-alpha toxin*

Lane 1 to 3 are treatment of LAMP products. Lane 4 to 6 are LAMP products

M : Marker 11 (pUC19/ Msp I digest)

1 and 4: $1.53 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 and 5: $1.53 \times 10^{-9} \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3 and 6 : $1.53 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{l}$

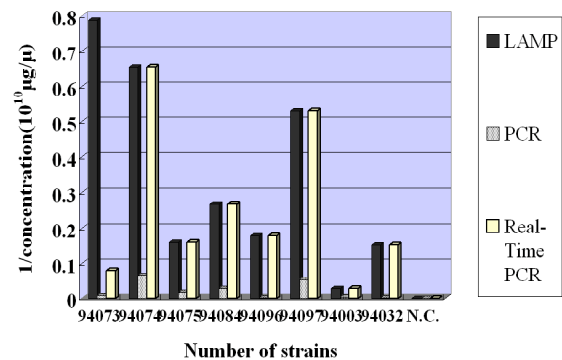


Fig.7 Comparison of sensitivity in detections