

Clostridium perfringens 毒素産生遺伝子検出法の検討

日大生産工(院) 篠崎 温子
日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

1 緒言

偏性嫌気性菌 *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) 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、産生する主要タンパク毒素4種の産生能により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、菌の有する毒素産生部位の遺伝子のみを増幅・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、研究を行った。

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 *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)にて3~4日間嫌気培養したものをを用いて模擬糞便を作成し、その後菌の単離を行うことなくDNA抽出を行った。10時間37℃で保温した模擬糞便より、熱処理及び Proteinase K を作用させ、フェノール・クロロホルム法及びアルコール沈殿法を用いた。

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 100µl をサーマルサイクラーを用いて、まず94℃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℃に下げprimerのannealingを行い、最後に72℃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

本法は一度に5種のprimerを加えることにより得られるバンドの違いにより、菌株ごとのタイプを調べることが出来る。今回の実験には、alpha-、Beta-、Epsilon-、iota-toxin及び enterotoxin 由来の primer を用い、annealing 温度を55℃に設定し実験を行った。

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 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

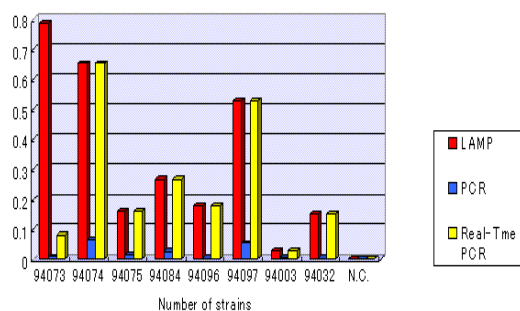
検出感度を比較すべく、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて実験を行った。LAMP 法とは 1 種類の酵素のみを使用して、一定温度で効率的に遺伝子を増幅させる方法である。増幅領域の一方と相補的な配列を 3' 末端にもち、5' 末端にその DNA 鎖の内側の領域と同じ配列を持つ特徴的な primer を使用することにより、自己ループ構造をとり連続的に伸長反応を繰り返し、多量に DNA を増幅することが出来る。今回の実験では温度を 63℃ に設定し、実験を行った。増幅反応は 100℃ で 15 分間過熱し、酵素を失活させ、停止させた。

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 (LA-200) を用いて検出を行った。

3 結果及び考察

まず、今回始めて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、バンドは検出されなかったことから、

成功したと言える。次に、Multiplex PCR 法により全 8 サンプルの菌タイプを調べたところ、enterotoxin 産生性に違いは生じたが、全て、A タイプであることが確認できた。次に、上にあげた 3 検出法の検出限界濃度を比較したグラフを Fig.1 に示した。



結果としてPCR法は最高でも 1.53×10^{-9} の検出感度であり、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、 1.53×10^{-10} 、 1.27×10^{-10} と比較し10分の1の感度に留まった。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要因が挙げられる。以上のことより、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り、今後も更なる改良を要することが確認できた。さらに、LAMP 法は簡便さ・検出時間において Real-Time PCR 法に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有用であると言える。

4 参考文献

- 1) Titball RW et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens* Infection and Immunity, 57 1989 367-37

