

健康危機に対応するための微生物検査手法強化に関する研究

【保健衛生室】

花原 悠太郎 上田 豊 浅野 康子 井田 正己*

細菌性食中毒検査の迅速化を図るため、DNAの精製を省略し、糞便検体から直接リアルタイムPCR法により病原遺伝子を検出することが可能かどうか検証した。糞便検体に *Campylobacter jejuni* を懸濁した菌液から100°C10分の熱抽出法によりDNAを抽出した。これをPCRの鋳型にしたところ、酵素にBIOTAQ HS、DNA増幅阻害物質を中和する試薬としてAmpdirect plusを用いることで、遺伝子の検出が可能であった。この条件下で、 1.68×10^6 cfu/mlの菌液を測定したところCt値は19.21であった。細菌性食中毒の急性期の糞便には10⁶cfu/gの菌が排菌されることから、含有菌量の多い急性期の糞便が入手できれば、今回我々が選択した方法により病原遺伝子を検出可能であると示唆された。

1 はじめに

細菌性食中毒の検査は培養法が基本であり、患者便から直接分離培養及び増菌培養等を行い、原因菌を分離・同定する。しかし培養法では、直接分離培養でも原因菌の分離に1~2日間、更に分離された菌の確認検査に1~2日要しており、時間短縮が求められている。

近年福島らは、分離培養は行わず患者便から直接DNAを抽出し病原遺伝子を検出するmultiplexリアルタイムPCR法を報告した¹⁾。この方法では1日以内に病原遺伝子の有無を判定できることから迅速性の点で有用であると考えられる。一般的に糞便中にはDNA合成を阻害する物質が大量に含まれるため、これを除去するため福島らはDNAの抽出・精製にQIAamp DNA Stool Mini Kit(キアゲン)を用いている。しかしこのキットは糞便の計量からカラムによる精製までいくつものステップがあり、多検体を同時に処理するとかなり煩雑である。

一方、Ampdirect plus(島津製作所)やMightyAmp for Real Time(タカラバイオ)などクルードサンプルでもDNAの増幅、検出のできる製品が開発された。

そこでこれらの製品を用いてDNAの精製を省略し、糞便検体から直接リアルタイムPCR法により病原遺伝子を検出することが可能かどうか検証した。

2 材料と方法

(1)菌株

当所で分離された *Campylobacter jejuni* を用いた。

(2)試薬

遺伝子増幅阻害物質を中和する効果のある試薬としてAmpdirect plus(島津製作所)を^{2) 3)}、リアルタイムの酵素として当所で通常使用しているSYBR Premix EX Taq(タカラバイオ)に加え、Ampdirect plusの推奨酵素のBIOTAQ HS(日本ジェネティクス)、さらに増幅阻害物質を含んでも目的遺伝子を強力に増幅する酵素のMighty Amp for Real Time(タカラバイオ)、を用いた。

蛍光色素には、SYBRGreen I(ライフテクノロジー社)あるいは酵素に添付されているものを用いた。

(3)方法

- 1) 糞便菌液の調製：生理食塩水に菌を 1.68×10^6 cfu/mlになるように調製した。食中毒菌が陰性であることを確認している糞便を100mg計量し、そこに菌液を1ml加えた。
- 2) DNA抽出：調製した糞便菌液100 μ lを1.5mlチューブに分注し、100°C10分の熱抽出を行った。次いで、4°C下で12,000rpm3分遠心し、上清を粗抽出DNAとした。またDNAを精製する場合と比較するため、調整した糞便菌液200 μ lをQIAamp DNA Stool Mini Kit(キアゲン)を用いて精製し、抽出DNAを得た。
- 3) リアルタイムPCR：Applied Biosystems 7500 Real

※現 鳥取県食肉衛生検査所

Time PCR System を使用し、インターカレーター法により測定した。プライマーは *Campylobacter jejuni* の標的因子 *gyrA*^b (5' TGGGTGCTGTATAGGTC GT 3') を使用した⁴⁾。表 1 に各反応液の組成および反応条件を示す。1 つの実験条件についてそれぞれ 5 回ずつ実施し、平均 Ct 値を算出した。また融解曲線分析のため、実験に供試した菌株を精製水に希釈後、100°C10 分で熱抽出し、ポジティブコントロールを作製した。各実験条件について、Tm 値がポジティブコントロールの±1°C以内のものを試験成立とした。

DNA 精製の有無、中和試薬、酵素の組み合わせにより、表 2 に示した 6 種類(A~F)の実験を行なった。

3 結果

DNA 精製を行なった抽出 DNA と、酵素に SYBR Premix EX Taq を用いたところ、Ct 値の平均は 25.03 だった(実験番号 A)。次いで、精製 DNA から DNA 精製を省いた粗抽出 DNA に変更したところ、Ct 値の平均は 35.61 に大きく増加した(実験番号 B)。しかし、遺伝子増幅阻害物質を中和するため、ここに Ampdirect plus を加えたところ、蛍光シグナルを検出することが出来なった(実験番号 C)。

一方、粗抽出 DNA に対し、酵素を Mighty Amp for Real Time に変更したところ、Ct 値の平均は 23.56 だった(実験番号 D)。しかし、Ampdirect plus を添加したところ、Ct 値の平均は 25.96 に増加した(実験番号 E)。粗抽出 DNA に対し、酵素を BIOTAQ HS に変更し、Ampdirect plus を添加した場合、Ct 値の平均は 19.21 まで減少した(実験番号 F)。

4 考察

通常糞便中には増幅阻害物質が含まれていると言われている。今回の実験で、SYBR Premix EX Taq を用いて比べたところ、DNA を精製する場合の平均 Ct 値は 25.03 だったのに対し、精製を省いた場合の平均 Ct 値は 35.61 となり Ct 値が約 10 増加した。これは、阻害物質の影響が考えられ、精製を省いた場合には SYBR Premix EX Taq は当所の通常の実験条件下では使用出来ないと思われる。

そこで、DNA 精製を省いた場合の感度を上げるため、

増幅阻害物質を中和する Ampdirect plus を添加したが、蛍光シグナルを検出できなかった。これは、Ampdirect plus を添加することで、SYBR Premix EX Taq の活性が抑制されたためと考えられる。

増幅阻害物質を含んでいても強力に目的遺伝子を増幅する酵素である Mighty Amp for Real Time を用いたところ、Ct 値が 23.56 となり、DNA の精製を行なう方法より感度が良かった。さらに感度を上げるため、Ampdirect plus を加えたところ、Ct 値は 25.96 となり感度が落ちた。このことから Ampdirect plus は SYBR Premix EX Taq だけでなく、Mighty Amp for Real Time の活性も抑えてしまったと考えられた。したがって、Ampdirect plus を使用するためには、PCR 活性が抑制されにくい酵素の選択が必要であると考えられた。

この結果を受け、酵素を Ampdirect plus の推奨酵素である BIOTAQ HS に変更したところ、精製を行わない粗抽出 DNA であっても Ct 値の平均は 19.21 となり、今回の実験では一番良い結果となった。これは、Ampdirect plus の増幅阻害物質の中和作用が働いたことと、Ampdirect plus による酵素の抑制が抑えられたことの相乗効果によると考えられる。

さらに、DNA を精製に使用するカラムは吸着できる DNA 量に制限があるため、最終的に回収可能な DNA 量には限りがある。今回カラム精製をしない実験で Ct 値が最も小さいという結果が得られたのは、精製過程での DNA のロスが少なかったためと考えられる。

今回の実験では、 1.68×10^6 cfu/ml の濃度の菌液を使用した。一般に、食中毒患者の急性期の糞便には 10^6 cfu/g 以上の原因菌が排菌されることから⁵⁾、急性期患者の糞便が入手できれば、糞便の粗抽出 DNA から病原遺伝子の検出は可能であると考えられる。しかし、試験成立の判断基準として、本実験ではポジティブコントロールの Tm 値と試験試料の値の誤差を±1°C以内としたが、病原遺伝子の同定としてこの値が妥当性であるか検討する必要がある。

病原遺伝子の検出の正確性を担保するには、Tm 値による判断の必要が無い Taq Man Probe 法も選択肢として挙げられる。しかし、Taq Man Probe 法はランニングコストがインターカレーター法よりも割高なため、導入するにはマルチプレックス化まで考える必要がある。今回、インターカレーター法による粗抽出 DNA を用いたリアルタイム PCR の系を作出することで、マル

チプレックス Taq Man Probe 法への応用が容易になったと考えられる。

5 まとめ

DNA の精製を省略し、糞便検体から直接リアルタイム PCR 法により病原遺伝子を検出するには、酵素に BIOTAQ HS、中和試薬として Ampdirect plus を用いることで可能と分かった。現時点で、含有菌量が多い急性期の便が入手できれば、糞便の粗抽出 DNA から病原遺伝子の検出は可能であると考えられた。今後は Taq Man Probe 法の導入に向けた検討を進める予定である。

6 参考文献

- 1) 福島 博 : 食中毒菌の 24 標的遺伝子を一斉検出するための multiplex リアルタイム SYBR Green PCR 法. 島根県保健環境科学研究所所報, 第 50 号, 41-51(2008)
- 2) Naoyuki NISHIMURA, Satoshi YOMOTA, et al. : Suppressing Effects of Ampdirect (new reagent cocktail, for semipurified DNAs,) upon Residual Amplification-Inhibiting Substances in Extracted DNAs. 島津評論, 第 61 巻, 第 1/2 号, 85-89(2004)
- 3) Anusak Kerdsin, Ryuichi Uchida, et al. : Development of Triplex SYBR Green Real-time PCR for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella spp.* without Extraction of DNA. Japanese Journal of Infectious Diseases, 63, 3, 173-180(2010)
- 4) 福島 博, 角森 ヨシエ : リアルタイム PCR 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症学雑誌, 第 79 巻, 第 9 号, 644-655(2005)
- 5) Rahn K, De Grandis SA, Clarks RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, et al. : Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes, 6, 271-279(1992)

SYBR Green Real-Time PCR for detecting *Campylobacter jejuni* without DNA purification

Yutaro HANABARA, Yutaka UEDA, Yasuko ASANO, Masami IDA

Abstract

Laboratory inspection for a food poisoning caused by bacteria is commonly a very time-consuming process because of using bacterial culture. In order to improve this problem, various methods for the detection of bacterial virulence genes have been developing in recent years. To detect the bacterial virulence gene as rapidly as possible, we examined the real-time PCR method without DNA purification. In this study, we prepared the mixture of the bacterial culture (*Campylobacter jejuni*) and a healthy human stool. The templates of DNA were extracted by the thermal treatment at 100°C for 10min. In our real-time PCR method, the templates were reacted with Ampdirect plus as a reagent to neutralize PCR inhibitors and BIOTAQ HS as the most suitable enzyme. It is the best combination for the determination of *C.jejuni*. Therefore, if we can get human stool in foodborne outbreak, our real-time PCR method could be the useful tool to detect bacterial virulence gene.

表 1)反応液組成と反応条件

実験番号	反応液	容量 (μ l)	反応条件	温度(°C)	時間	サイクル数
A	SYBR Premix EX Taq	10	Holding	95	30 秒	1
	PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4		95	5 秒	
	PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4	Cycling	55	30 秒	40
	ROX Reference Dye II	0.4		72	30 秒	
	dH ₂ O(滅菌蒸留水)	6.8		95	15 秒	
	合計	18	Melt Curve	60	1 分	1
	テンプレート	2		95	15 秒	
	総合計	20		60	15 秒	
B	SYBR Premix EX Taq	10	Holding	95	30 秒	1
	PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4		95	5 秒	
	PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4	Cycling	55	30 秒	40
	ROX Reference Dye II	0.4		72	30 秒	
	dH ₂ O(滅菌蒸留水)	6.8		95	15 秒	
	合計	18	Melt Curve	60	1 分	1
	テンプレート	2		95	15 秒	
	総合計	20		60	15 秒	
C	SYBR Premix EX Taq	10	Holding	95	30 秒	1
	PCR Forward Primer(10 μ M)	0.6		95	5 秒	
	PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.6	Cycling	55	30 秒	40
	ROX Reference Dye II	0.4		72	30 秒	
	Amp direct	6.4		95	15 秒	
	合計	18	Melt Curve	60	1 分	1
	テンプレート	2		95	15 秒	
	総合計	20		60	15 秒	
D	MightyAmp for Real Time	10	Holding	98	2 分	1
	PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4		98	10 秒	
	PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4	Cycling	60	15 秒	40
	ROX Reference Dye II	0.4		68	1 分	
	dH ₂ O(滅菌蒸留水)	6.8		95	15 秒	
	合計	18	Melt Curve	60	1 分	1
	テンプレート	2		95	15 秒	
	総合計	20		60	15 秒	

実験番号	反応液	容量 (μl)	反応条件	温度(°C)	時間	サイクル数
E	MightyAmp for Real Time	10	Holding	98	2分	1
	PCR Forward Primer(10 μM)	0.6		98	10秒	
	PCR Reverse Primer(10 μM)	0.6	Cycling	60	15秒	40
	ROX Reference Dye II	0.4		68	1分	
	Amp direct	6.4		95	15秒	
	合計	18	Melt Curve	60	1分	1
	テンプレート	2		95	15秒	
総合計	20	60		15秒		
F	Amp direct	25	Holding	95	10分	1
	BIOTAQ HS (5U/μl)	0.5		94	30秒	
	PCR Forward Primer(10 μM)	1.5	Cycling	55	30秒	45
	PCR Reverse Primer(10 μM)	1.5		72	1分	
	125×SYBRGreen I	1		95	15秒	
	dH2O(滅菌蒸留水)	19.5		60	1分	
	合計	18	Melt Curve	95	15秒	1
テンプレート	2	72		7分		
総合計	20					

表 2)試験結果

実験番号	DNA 精製の有無	中和試薬	酵素	Ct 値平均
A	○	—	SYBR Premix EX Taq	25.03
B	—	—	SYBR Premix EX Taq	35.61
C	—	○	SYBR Premix EX Taq	UD
D	—	—	MightyAmp for Real Time	23.56
E	—	○	MightyAmp for Real Time	25.96
F	—	○	BIOTAQ HS	19.21

※中和試薬は Ampdirect plus を指す

※UD は検出不可能