

## multiplex PCR による黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の検出

藤本, 秀士  
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

小島, 夫美子  
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

<https://doi.org/10.15017/319>

---

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 29, pp.109-113, 2002-02. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン :

権利関係 :

## multiplex PCR による黄色ブドウ球菌 エンテロトキシン遺伝子の検出

藤本 秀士, 小島 夫美子  
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

### Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins

Shuji Fujimoto and Fumiko Kojima.

Department of Medical Technology, School of Health Sciences, Kyushu University

#### Abstract

A multiplex PCR assay for detection of genes for Staphylococcal enterotoxins A to E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*) was developed. The multiplex PCR assay combined the primers for *sea* to *see* in one set. Validation of the assay was performed using five enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus*. This assay offers a very specific, quick, reliable and inexpensive alternative to conventional PCR assay used in clinical laboratories to identify staphylococcal enterotoxin genes.

key words: multiplex PCR, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin gene

#### I. 緒言

黄色ブドウ球菌は、ミクロコッカス科に属するグラム陽性通性嫌気性球菌で、医学上重要な病原菌である。黄色ブドウ球菌による代表的な疾患のひとつに食中毒がある。2000年6、7月に大阪を中心に発生した本菌による食中毒事例（雪印事件）は、国内で戦後最大のものとなった。ブドウ球菌食中毒は毒素型食中毒で、食品中で繁殖した黄色ブドウ球菌が、耐熱性の腸管毒（staphylococcal enterotoxin: SE）を産生し、産生されたSEを食品とともにヒトが摂取して発症する。SEの産生は菌株に依存するため、黄色ブドウ球菌菌株がSEを産生するか否かを調べることは大変重要である。

SEは、分子量約26～29kDaのペプチドであり<sup>1)</sup>、その抗原性や生化学的性状の違いによりSEA、SEB、SEC、SED、SEEの5種類がよく知られている<sup>2)</sup>。また、SEは、毒素性ショック症候群の原

因毒素であるTSST-1と同様にスーパー抗原ファミリーに属する。SEの検出には様々な方法が開発されていて、なかでも逆受け身ラテックス凝集法（reversed passive latex agglutination: RPLA）によるものと酵素抗体法（enzyme immuno assay: EIA）はキット化され最も一般的に広く実施されている方法である。これらの方法では、各SEに特異的な抗体を用いて検出するが、SEBとSEC、およびSEAとSEEのアミノ酸配列の類似による交差反応が報告されている<sup>2,3)</sup>。さらに、培養上清中に検出のために十分な量の毒素が含まれる必要があるが、毒素の産生には時間が必要で、かつ、pHや添加物などの培養条件に影響される<sup>4)</sup>。

そこで今回、SE遺伝子をmultiplex PCRで検出することを試みた。multiplex PCRは1回のPCRで多種類の遺伝子を検出する。同一反応系の中に複数の遺伝子を増幅するためのプライマーセットを入

れるmultiplex PCRは、反応の条件設定が難しいが、反応系が確立されれば、一度に多くのサンプルを検査でき、時間と費用が軽減できる。今回、SEA～SEEの5種類の毒素の遺伝子（*sea*～*see*）を一度に検出するmultiplex PCRの系を確立することを目的にその反応条件を検索した結果を報告する。

## II. 材料ならびに方法

### A. 使用菌株と染色体DNAの分離

黄色ブドウ球菌のSEA産生菌株、SEB産生菌株、SEC産生菌株、SED産生菌株、SEE産生菌株を陽性コントロールとして、表皮ブドウ球菌を陰性コントロールとして実験に使用した。これらの菌株は福岡市保健環境研究所および東京都立衛生研究所より分与された。各菌株をtryptic soy agar (TSA) (栄研) に塗布し、好気条件にて、37℃、24時間培養し、染色体DNAの分離に使用した。染色体DNAはGES法<sup>5)</sup>を改良して分離し、PCRに用いる鋳型DNAとして使用した。分離した染色体DNAは、150  $\mu$ lのTEバッファー (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.8) に溶解し、PCRに使用するまで、-20℃に保存した。

### B. single PCR

本研究で使用したプライマーを表1に示す。各プライマーは、既に発表された黄色ブドウ球菌毒素遺伝子の塩基配列<sup>6,7,8,9,10)</sup>に基づき、委託合成された。PCR反応は、通常、10x反応液 (Mgイオン濃度30mM) 1  $\mu$ l, 25mM dNTP 1  $\mu$ l, 1種類のプライマーセット (forwardおよびreverse) 1  $\mu$ l (20pM), 鋳型DNA 1  $\mu$ l, *Taq* DNAポリメラーゼ (Klen *Taq*, シグマ) と滅菌水を加えて全量10  $\mu$ lで行った。反応には、Rapid Cyclor (Idaho Technology)を使用し、熱変性94℃30秒に引き続き、94℃ 0秒、アニーリング 0秒、伸長反応72℃ 15秒を35サイクル行い、最後に72℃ 1分の伸長反応を加えて標準サイクルとした。反応液のMgイオン濃度、アニーリング温度は、各実験に応じて変化させた (結果参照)。

### C. multiplex PCR

multiplex PCRは、10x反応液 (Mgイオン濃度30mM) 1  $\mu$ l, 25mM dNTP 1  $\mu$ l, 混合プライマー

4  $\mu$ l (20 pM), 鋳型DNA 2.5  $\mu$ l, Klen *Taq*と滅菌水を加えて全量10  $\mu$ lで行った。反応には、Rapid Cyclor (Idaho Technology)を使用し、熱変性 94℃0秒、アニーリング 50℃2秒、伸長反応 72℃15秒を35サイクル行った。最後に72℃ 1分の伸長反応を加えた。

### D. アガロースゲル電気泳動

PCR終了後、各増幅産物の5  $\mu$ lについて、2%MS 8 アガロースゲル (コスモ・バイオ) を用いて電気泳動を行った。泳動終了後にゲルをエチジウムブロミド (EtBr) で染色後、UVライト照射下に観察し、写真撮影した。分子量マーカーには、100bp ladder (GibcoBRL) を用いた。

## III. 結果

### A. Single PCRによる各SE遺伝子の検出

黄色ブドウ球菌のSE産生株 (陽性コントロール) から抽出した染色体DNAを鋳型DNAとして用いてsingle PCRを行い、反応条件を検索するとともに増幅産物の特異性を確認した。普通、*Taq* DNAポリメラーゼの活性は反応液中のMgイオン濃度に依存する。しかし、Klen *Taq* DNA polymeraseの場合には活性のMgイオン濃度への依存は少ないと言われている。今回、アニーリング温度45℃の条件で、Mgイオン濃度を、1.0mM, 2.0mM, 3.0mM, 4.0mMに変化させて増幅産物を比較した。その結果、いずれの菌株、いずれのプライマーにおいても、1.0mMでは増幅産物は見られず、2.0mMでも識別に十分な量が得られなかった。一方、3.0mM, 4.0mMでは*sea*～*see*の5種類すべての増幅産物が得られ、両者の間ではバンドの特異性に優劣はなかった。その為、以後の検索は、Mgイオン濃度3.0mMで行うことにした。アニーリング温度45℃の場合、*sec*を除く4種類のPCRでは、目的遺伝子のみが増幅された。一方、*sec*の場合、予想される分子サイズの他に低分子の産物が認められた (データ示さず)。アニーリング温度50℃の場合、*sea*～*see*全てのsingle PCRで、1種類の増幅産物のみが観察された。各増幅産物の分子量サイズは表1に示す予想サイズと同じであった。各PCR産物のアガロースゲル電気泳動を

表 1. 実験に使用したプライマー

標的遺伝子	名 称	機 能	塩基配列 5'-3'	PCR産物 サイズ(bp)
<i>sea</i>	SEA-1	forward primer	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	120
	SEA-2	reverse primer	GAACCTTCCCATCAAAAACA	
<i>seb</i>	SEB-1	forward primer	TCGCATCAAACCTGACAAACG	478
	SEB-2	reverse primer	GCAGGTACTCATTAAGTGCC	
<i>sec</i>	SEC-1	forward primer	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257
	SEC-2	reverse primer	AAATCGGATTAAGATTATCC	
<i>sed</i>	SED-1	forward primer	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	317
	SED-2	reverse primer	TAATGCTATATCTTATAGGG	
<i>see</i>	SEE-1	forward primer	TAGATAAAGTTAAAAGAAGC	170
	SEE-2	reverse primer	TAACCTACCGTGACCCTTC	

図 1. 黄色ブドウ球菌の各毒素遺伝子を標的にした single PCR のアガロースゲル電気泳動像



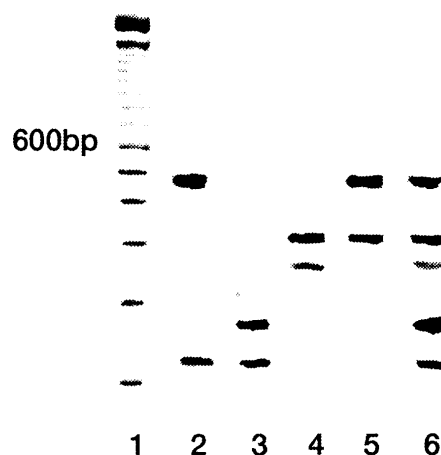
各菌株より分離した染色体DNAを鋳型として表1に示した各プライマーでPCRを行った。各レーンは、1: 100bp ladder, 2: SEA産生菌株と*sea*用プライマー, 3: SEB産生菌株と*seb*用プライマー, 4: SEC産生菌株と*sec*用プライマー, 5: SED産生菌株と*sed*用プライマー, 6: SEE産生菌株と*see*用プライマーを使用したPCRの増幅産物。

行った結果を図1に示す。

### B. Multiplex PCRによるSEの検出

10種類全てのプライマーを同等に混ぜた混合プライマーを用いてmultiplex PCRを行った。Mgイオン濃度3.0mM, アニール温度50℃にて、黄色ブドウ球菌の毒素産生株から抽出した染色体DNAを鋳型とした。各陽性コントロール菌株からの染色体DNAを単独で用いて行ったmultiplex

図 2. 黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン遺伝子を標的にしたmultiplex PCRのアガロース電気泳動像



各菌株より分離した染色体DNAを鋳型として表1に示した全プライマーを混合してPCRを行った。各レーンは、1: 100bp ladder, 2: SEA産生菌株とSEB産生菌株, 3: SEA産生菌株とSEE産生菌株, 4: SEC産生菌株とSED産生菌株, 5: SEB産生菌株とSED産生菌株, 6: 上記5種類の菌全て。

PCRでは、各菌株の産生する毒素に応じた遺伝子産物が増幅された（データ示さず）。つぎに2種類の染色体DNAを混合して、multiplex PCRを行った。PCR産物の分子サイズが最も離れた*sea*と*seb*において、いずれの産物も増幅された（図2レーン2）。また、PCR産物の分子サイズが最も近い*sea*と*see*, および*sec*と*sed*においても、それぞれの目的産物が増幅された（図2レーン3と4）。5種類全ての染色体DNAを混合して行ったmultiplex PCRにおいても、各毒素遺伝子のPCR増幅産物を示す5本のバンドが見られ、それぞれ識別可能で

あった(図2レーン6)。これらの各増幅産物の分子量サイズは表1に示す予想サイズと同じであった。一方、陰性コントロールとして表皮ブドウ球菌の染色体DNAを用いた場合、増幅産物は認められなかった(データ示さず)。

#### IV. 考 察

SEは、分子量27000前後の蛋白で、抗原性の違いによりA～Eの5種類に分けられ、C型は等電点の違いによりC1, C2, C3の3型に分けられているが、免疫学的には同一である。この5種類のエンテロトキシンは、それぞれsea～seeの5つの遺伝子によってコードされている。菌株によって所有する毒素遺伝子が異なっており、遺伝子の存在と毒素産生とは、ほぼ相関すると言われている<sup>11)</sup>。現在、SE検査には、毒素を高純度に精製し、ウサギを免疫して特異性の高い抗血清を作製し、それを用いて毒素を検出する免疫学的な手法が利用されている。ゲル内沈降反応、逆受身赤血球凝集反応、ラジオイムノアッセイ、酵素抗体法、逆受身ラテックス凝集反応等が開発され<sup>2,11)</sup>、キットが市販されるようになった。これらのSE検査キットの検出感度は0.2～2ng/mlであるが、検出限界に近い濃度の毒素量を正確に検出することは困難である。また、毒素は対数増殖期に産生されるためサンプルの調整に時間がかかり、培養条件に左右されるのが欠点である。

一方、PCRの登場によって、微量のDNAから目的遺伝子を短時間で増幅できるようになり各方面で利用されている。今回、sea～seeを標的にした5つのプライマーセット(合計10種類のプライマー)を一個のPCRチューブの中で混合してPCRを行うmultiplex PCRを試みた。multiplex PCRは、プライマーの競合などにより反応の条件設定が難しいが、いったん反応系が確立されれば、各遺伝子を個別にPCRで検査する従来の方法に比べ、5種類のSE遺伝子を一度に検出でき、時間と費用が軽減できる。同じ時間と経費で従来の5倍のサンプルを検査できる。今回使用した各プライマーセットは、SE産生菌株のゲノムDNAをテンプレートにしたsingle PCRにおいて、各々予測され

たサイズの産物のみが増幅され、標的遺伝子以外の副産物は見られなかった(図1)。これらのプライマーを組み合わせたmultiplex PCRにおいてもその特異性・信頼性が保たれ、複数種類のゲノムDNAを混合した場合においても効果的に各SE遺伝子が検出可能であった(図2)。

#### V. 結 語

SE multiplex PCR法は、簡便なPCR技術で可能であり、鋳型となるゲノムDNAも微量ですみ、迅速かつ簡便に行える。本法は、ブドウ球菌食中毒の原因であるSE遺伝子を迅速・簡便に検出し、かつ、多検体を一度に処理可能なことから、食中毒原因菌株の同定のみならず、検査室などでの分離菌株の異同の判定や院内感染の実態調査の疫学にも有用であり、臨床微生物検査室におけるルーチン検査として適していると思われる。黄色ブドウ球菌では、同じゲノタイプの黄色ブドウ球菌が同じ外毒素産生能を持つことが報告されており<sup>12)</sup>、SE遺伝子の検出は、コアグラゼ遺伝子型別などと共にゲノタイプの解析にも応用可能である。SE multiplex PCR法は、黄色ブドウ球菌感染流行に際しての感染制御の為の疫学調査などに大変有用な方法である。

#### 文 献

- 1) Marrack P and Kappler J: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:1066,1990
- 2) Iandolo JJ: Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology* 43:375-402,1989
- 3) Spero L and Morlock BA: Cross-reaction between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C. *Jornal of Immunology* 122:1285-1289,1979
- 4) Gomez-Lucia E, Goyache J, Orden A, et al.: Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcal aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1447-1451,1989

- 5) Pitcher DG, Saunders NA, and J. OR: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbio.* 18:151-156, 1989
- 6) Betley MJ and Mekalanos JJ: Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170:34-41., 1988
- 7) Jones CL and Khan SA: Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 166:29-33, 1986
- 8) Bohach GA and Schlievert PM: Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.* 209:15-20, 1987
- 9) Bayles KW and Iandolo JJ: Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171:4799-4806., 1989
- 10) Couch JL, Soltis MT, and Betley MJ: Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170:2954-2960, 1988
- 11) Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, et al.: Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29:426-430, 1991
- 12) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, and Takeuchi J: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 29:2690-2695, 1991