

黄色ブドウ球菌の表皮剥奪毒素遺伝子，毒素性 ショック症候群毒素遺伝子，メチシリン耐性遺伝子 のmultiplex PCR による迅速検出

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/10.15017/320>

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 29, pp.115-120, 2002-02. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン：

権利関係：

黄色ブドウ球菌の表皮剥奪毒素遺伝子, 毒素性ショック症候群毒素遺伝子, メチシリン耐性遺伝子 のmultiplex PCRによる迅速検出

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

Rapid and Specific Detection of *Staphylococcus aureus* exfoliative Toxin Genes, Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene, and Methicillin Resistance Gene Using multiplex PCR.

Shuji Fujimoto and Fumiko Kojima.

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

Abstract

A multiplex PCR assay was developed for detection of *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin 1 gene (*tst*), exfoliative toxin A and B genes (*etaA* and *etaB*), and intrinsic methicillin resistance gene (*mecA*). This multiplex PCR system offers an alternative method for the rapid, specific, sensitive, and simultaneous detection of the clinically important exotoxin potency of *S. aureus* isolates for diagnostic purposes as well as research studies.

key words: multiplex PCR, *Staphylococcus aureus*, toxic shock syndrome toxin 1 gene, exfoliative toxins genes, methicillin resistance gene (*mecA*).

I. 緒言

黄色ブドウ球菌は、ヒトや環境に常在しており、最も分離頻度の高い病原細菌の一つである。本菌は、ブドウ球菌属の中で最も病原性が高く、その病態は多彩で、一般化膿症、“とびひ”（伝染性膿痂疹impetigo）、食中毒、敗血症、ブドウ球菌熱傷様皮膚症候群(staphylococcal scalded skin syndrome: SSSS)、毒素性ショック症候群 (toxic shock syndrome: TSS) 等の疾患の病原菌である。黄色ブドウ球菌は多くのタンパク性外毒素を産生し、そのいくつかは上記の疾患の病原因子である¹⁾。

表皮剥奪毒素 (exfoliative toxin: ET) は、SSSSおよび“とびひ”の要因である^{2,3)}。SSSSは主に10

歳以下の小児に好発する疾患で日常遭遇する機会が多く、さらに新生児や基礎疾患のある小児が感染した場合、死亡することがある、重要な黄色ブドウ球菌感染症の一つである。ETはデスモゾームを破壊して皮膚剥離を引き起こす²⁾。ETには、抗原性と安定性の違いによってETA, ETBの2種類が存在し、どちらも上記疾患発症に関与している^{4,5)}。ETA, ETBの遺伝子*eta*, *etb*は既に明らかにされている⁶⁾。

毒素性ショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin 1: TSST-1)は、毒素性ショック症候群 (TSS) の原因毒素である⁷⁾。TSSは1978年に新しい型の黄色ブドウ球菌感染症として見いだされ

た。TSSは高熱、嘔吐や下痢、意識障害に加えて、肝臓や腎臓障害を呈する。TSSの発症機序は、TSST-1のスーパー抗原活性によるT細胞の過剰活性化に起因すると考えられている。さらに1996年にはTSST-1による新たな新生児発疹性疾患が報告され問題となっている⁸⁾。TSST-1は、菌染色体上に存在する遺伝子*tst*によってコードされている。

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による院内感染が社会的な問題となっている⁹⁾。MRSAの薬剤耐性機序は、*mecA*遺伝子にコードされた分子量78kDaのペニシリン結合蛋白 (penicillin binding protein: PBP) PBP2aに起因しており¹⁰⁾、分離菌株の*mecA*遺伝子の有無は治療薬剤選択に際し大きな意味を持つ。さらに、最近、毒素産生MRSA菌株の拡大が憂慮されており、MRSAによる上記疾患の発症にも注意が必要となっている。

これらの疾患の診断・治療には、原因菌株の毒素産生の有無を調べることが不可欠であり、また、人体や環境から分離された黄色ブドウ球菌菌株がこれらの毒素を産生するか否かを調べることは、感染流行時の疫学調査や感染予防対策上大変重要である。特に最近では、新生児収容施設での毒素産生MRSAの集団発生が問題になっており、院内における定着状態のサーベイランスが対策に必須である。現在、特異抗体による毒素検出法が一般的に行われているが、この方法では培養上清中に検出に十分な量の毒素が含まれる必要がある。毒素は対数増殖期に産生されるためサンプルの調整には時間が必要である。しかも、毒素産生はpHや添加物などの培養条件に影響される¹¹⁾。

今回、我々は、黄色ブドウ球菌の毒素遺伝子および薬剤耐性遺伝子をmultiplex PCRで検出する系の確立を試みた。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。今回の検討で、黄色ブドウ球菌の*eta*, *etb*, *tst*, *mecA*の各遺伝子を一度に検出するmultiplex PCRは信頼性と特異性ともに十分であることがわかった。

II. 材料ならびに方法

A. 使用菌株と菌ゲノムDNAの分離

黄色ブドウ球菌のTSST-1産生菌株、ETA産生菌株、ETB産生菌株およびMRSA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。毒素産生菌株は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°C、24時間培養し、鋳型DNAの作製に使用した。PCRに用いる鋳型DNAとしてゲノムDNAをGES法¹²⁾を改良して分離した。分離したゲノムDNAは、150 μ 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°C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^{6,10,13)}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 μ l, 25mM dNTP 1 μ l, 1種類のプライマーセット (forward および reverse) 1 μ l (20 pM), 鋳型DNA 1 μ l, *Taq* DNAポリメラーゼ (KlenTaq, シグマ) と滅菌水を加えて全量10 μ lで行った。反応には、Rapid Cyclor (Idaho Technology)を使用し、熱変性94°C30秒に引き続き、94°C 0秒、アニーリング 0秒、伸長反応 72°C 15秒を35サイクル行い、最後に72°C 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 μ l, 25mM dNTP 1 μ l, 混合プライマー 4 μ l (20 pM), 鋳型DNA 2.5 μ l, KlenTaqと滅菌水を加えて全量10 μ lで行った。反応には、Rapid Cyclor (Idaho Technology)を使用し、熱変性 94°C 0秒、アニーリング 50°C 2秒、伸長反応 72°C 15秒を35サイクル行った。最後に72°C 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 μ 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

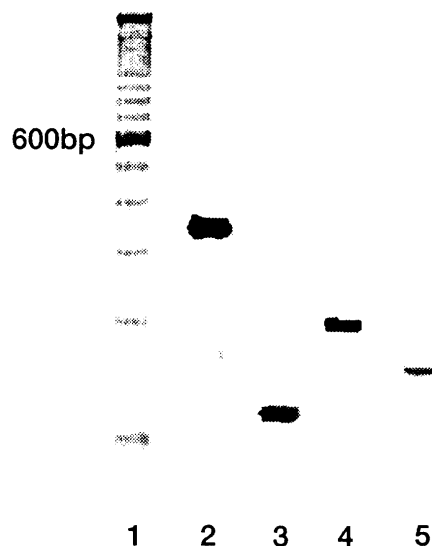
A. Single PCRによる各SE遺伝子の検出

黄色ブドウ球菌の毒素産生株とMRSA菌株から抽出した染色体DNAを陽性コントロールとして用いてsingle PCRを行い, 各プライマーの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, *KlenTaq*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なかった。一方, 2.0mM, 3.0mM, 4.0mMでは4種類すべての増幅産物が得られ, 各々のバンドの特異性に優劣はなかった (データ示さず)。その為, 以後の検索は, Mgイオン濃度2.0mMで行うことにした。アニーリング温度50℃の場合も, *tst*, *eta*, *etb*, *mecA*の全てのsingle PCRで, 1種類の増幅産物のみが観察された。各PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果を図1に示す。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。

B. Multiplex PCRによるSEの検出

8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2.0mM, アニーリング温度50℃にて, 黄色ブドウ球菌の毒素産生株およびMRSA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 PCRでは, 各菌株の性状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*eta*

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

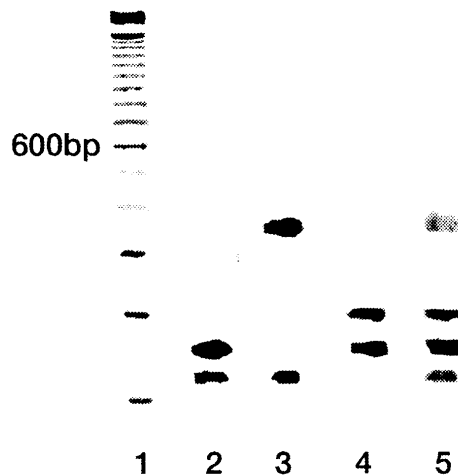


各菌株より分離した染色体DNAを鋳型として表1に示した各プライマーでPCRを行った。各レーンは, 1: 100bp ladder, 2: TSST-1産生菌株と*tst*用プライマー, 3: ETA産生菌と*eta*用プライマー, 4: ETB産生菌と*etb*用プライマー, 5: MRSA菌株と*mecA*用プライマーを使用したPCRの増幅産物。

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>tst</i>	TSST-1	forward primer	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350
	TSST-2	reverse primer	TTTCCAATAACCCCGTTT	
<i>eta</i>	ETA-1	forward primer	CTAGTGCATTGTTTATTCAA	119
	ETA-2	reverse primer	TGCATTGACACCATAGTACT	
<i>etb</i>	ETB-1	forward primer	ACGGCTATATACATTCAATT	200
	ETB-2	reverse primer	TCCATCGATAATATACCTAA	
<i>mecA</i>	MRS-1	forward primer	TAGAAATGACTGAACGTCCG	150
	MRS-2	reverse primer	TTGCGATCAATGTTACCGTAG	

図2. 黄色ブドウ球菌の毒素・薬剤耐性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: ETA産生菌とMRSA菌株, 3: ETA菌株とTSST-1菌株, 4: ETB菌株とMRSA菌株, 5: 上記4種類の菌全て。

と *tst* において、いずれの産物も増幅された (図2レーン3)。また、PCR産物の分子サイズが最も近い *eta* と *mecA*、および *etb* と *mecA* 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2と4)。4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4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5)。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

SSSSは、リッター病Ritter's diseaseやtoxic epidermal necrolysis (TEN) と同一疾患であり、黄色ブドウ球菌の皮膚および体内感染巣から産生される菌体外毒素ETの全身的中毒反応として、表皮ときに粘膜に水疱形成および表皮剥離、びまん性紅斑などの皮膚変化を特徴とする疾患である。皮膚疾患患者577名からの黄色ブドウ球菌944株の調査では、その5.1%がET産生株であり、その多くはSSSS患者より分離されている¹⁴⁾。ETは、血行

性に表皮顆粒層に達し、顆粒層と有棘層の間を切断して病変を起こすと考えられている。ETAは、抗原性の違いでA, Bの2種類に分けられ、ETAが分子量30kDa, ETBが29.5kDaの蛋白である。黄色ブドウ球菌臨床分離株の中には、ETAのみ産生、ETBのみ産生、ETAとETBを産生するものが存在する。そして近年、ETAとETBの遺伝子 (*eta*, *etb*) が明らかになった⁶⁾。

TSSは、高熱、消化器症状 (嘔吐や下痢)、神経症状 (頭痛や意識障害)、皮膚症状 (発疹、落屑) などの急性全身症状、さらに肝臓や腎臓障害など多臓器不全を呈する重篤な疾患である。黄色ブドウ球菌由来TSST-1がその原因毒素と考えられている。TSST-1は、スーパー抗原ファミリーに属し、特定のVβ領域を有するT細胞を活性化して各種サイトカインを誘導して、発熱、発疹、血小板減少などの症状をきたす¹⁵⁾。さらに血中毒素量が多い場合には、過剰サイトカイン血症となり多臓器不全に陥る場合がある¹⁵⁾。

MRSAはメチシリンなどのペニシリナーゼに安定なペニシリン剤、セフェム剤などのβ-ラクタム剤のみならず、アミノ配糖体剤、マクロライド剤などの多くの薬剤に対し多剤耐性を示す。MRSAは、突然変異によってβ-ラクタム剤の親和性が低いPBP-2aと呼ばれる78 kDaの特殊なペニシリン結合タンパクを産生する。PBP-2aは *mecA* 遺伝子によりその産生が制御されている。MRSAはMSSAと同様にTSST-1やETなどの毒素を産生し、外科手術後の患者や免疫不全患者、長期抗菌薬投与患者などに院内感染症を惹起させる。このため、とくに病院 [内] 感染対策が重要となっている。

現在、ETA, ETB, TSST-1の毒素検査には、特異抗体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。しかし、これらの方法では、菌を一晩以上培養してその培養上清を用い、十分な毒素が産生されている必要がある。しかも、毒素の産生は培養条件によって左右される。また、MRSAかどうかの判定には薬剤感受性試験が一般的で、やはり培養して判定する必要がある。

一方、PCRによる遺伝子検査の場合、微量の

DNAから目的遺伝子を短時間で増幅できる。今回、それぞれの毒素と薬剤耐性をコードする遺伝子 (*tst*, *eta*, *etb*, *mecA*) を標的にした4つのプライマーセット (合計8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。しかし、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、4種類の病原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4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、陽性コントロール菌株のゲノム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遺伝子が検出可能であった (図2)。

V. 結 語

今回行ったmultiplex PCR法による黄色ブドウ球菌の毒素および薬剤耐性遺伝子の検出は簡便な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、SSSSや“とびひ”の原因であるETA・ETB, TSSなどの原因であるTSSST-1, およびMRSAの薬剤耐性の各遺伝子を迅速・簡便に検出し、かつ、多検体を一度に処理可能なことから、これらの感染症の診断に有効と考える。また、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¹⁶⁾、これら病原遺伝子の検出は、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、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と考える。

文 献

- 1) Iandolo JJ: Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. Annual Review of Microbiology 43:375-402, 1989
- 2) Resnick SD: Staphylococcal toxin-mediated syndromes in childhood. Seminars in Dermatology 11:11-18, 1992
- 3) Bailey CJ, Lockhart BP, Redpath MB, and Smith TP: The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. Medical Microbiology & Immunology 184:53-61, 1995
- 4) Kondo I, Sakurai S, and Sarai Y: New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains, belonging to phage groups other than group II, isolated from patients with impetigo and Ritter's disease. Infection & Immunity 10:851-861, 1974
- 5) Kondo I, Sakurai S, Sarai Y, and Futaki S: Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome. Journal of Clinical Microbiology 1:397-400, 1975
- 6) Lee CY, Schmidt JJ, Johnson-Winegar AD, Spero L, and Iandolo JJ: Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 169:3904-3909, 1987
- 7) Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, and Davis JP: A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndorome *Staphylococcus aureus* isolates. Lancet i:1017-1021, 1981
- 8) 岡田隆滋, 古川正強, 三和敬史, 酒井ルミ子, 杉山純一: 毒素産生黄色ブドウ球菌による新たな新生児発疹性疾患—分離菌の外毒素産生性と抗毒素抗体保有状況について—。日本感染症学雑誌 73:893-899, 1999
- 9) Haley RW, Hightower AW, Khabbaz RF, et al.: The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals. Possible role of the house staff-patient transfer circuit. Annals of Internal Medicine 97:297-308, 1982
- 10) Hartman BJ and Tomasz A: Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam

- resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 158:513-516,1984
- 11) 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
 - 12) Pitcher DG, Saunders NA, and J. OR: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbio. 18:151-156,1989
 - 13) Blomster-Hautamaa DA, Kreiswirth BN, Kornblum JS, Novick RP, and Schlievert PM: The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. J. Biol. Chem. 261:15783-15786.,1986
 - 14) Elsner P and Hartmann AA: Epidemiology of ETA- and ETB-producing staphylococci in dermatological patients. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 268:534,1988
 - 15) 桜井 進,河野 緑,町田勝彦: リッター病および膿痂疹から分離した黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素の簡易検出試薬の検討. 臨床と微生物6:767-771,1996
 - 16) 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