

## リアルタイムPCRによる黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素 遺伝子の検出

小島, 夫美子  
九州大学医療技術短期大学部

藤本, 秀士  
九州大学医療技術短期大学部

<https://doi.org/10.15017/321>

---

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 29, pp.121-126, 2002-02. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン :

権利関係 :

# リアルタイムPCRによる黄色ブドウ球菌 表皮剥脱毒素遺伝子の検出

小島夫美子, 藤本 秀士

九州大学医療技術短期大学部

## Staphylococcal Exfoliative Toxin Genes Detection Using Real-time PCR Technique

Fumiko Kojima and Shuji Fujimoto

### Abstract

Rapid detection of virulence factors of pathogens is important in diagnosis and treatment of infectious diseases. Certain strains of *Staphylococcus aureus* express either or both of two related, but immunologically distinct, exfoliative toxins (ETA and ETB). These toxins cause staphylococcal scalded-skin syndrome (SSSS). We describe here the development of a real-time PCR detection method for the genes for ETA and ETB. We believe this method is useful for rapid and reliable identification of ET producing *S. aureus*.

key words: real-time PCR, exfoliative toxin gene, *Staphylococcus aureus*

### I 緒言

感染症をめぐる問題は重大かつ多彩である。感染症の診断, 治療や予防を含めた感染症対策において, 起炎菌を迅速に検出し, その病原遺伝子保有の有無を正確に調べることが必要である。現在, 感染症の迅速検査においては免疫学的な検出法と遺伝子検査法が主として用いられている。なかでも, 遺伝子工学や分子生物学の発展により, PCRを利用した遺伝子診断が普及し, 感度や特異性が高いという点からも検査の主流になりつつある。実際に目的遺伝子のPCRによる検出は迅速検査のみならず, 遺伝子の解析を行う研究や臨床検査において広く利用されている。しかしながら, これまでのPCRは, 反応を行った後にゲル電気泳動で遺伝子増幅産物を検出しなければならず, 迅速性および操作上の煩雑さという点で問題がある。ま

た通常のPCRで定量を行う場合には, 増幅産物が必ずしも元のDNA量を反映しておらず, 正確に測定することは理論上困難である。

これに対して, リアルタイムPCRは, サーマルサイクラーと蛍光検出器が一体化されてコンピュータで制御できる装置を使用する。DNAに結合する蛍光物質あるいは蛍光標識プローブを用いることで, PCR反応中にPCR産物の増幅量をリアルタイムにモニターすることが可能である。そして増幅が指数関数的に起こる領域で, 一定の増幅産物になるサイクル数 (threshold cycle; Ct) を求めることができる。よって電気泳動による増幅産物の検出が不要であり, さらに得られた増幅曲線から反応速度論に基づいた正確な定量解析が可能である。また, PCR終了後に増幅産物の融解曲線を分析してその融解温度 (melting tempera-

ture; Tm) を決定することにより、増幅産物の特異性を確認することができる<sup>1,2,3)</sup>。

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や鼻腔に常在するグラム陽性球菌で、せつやようなど化膿性皮膚疾患や骨髄炎、敗血症の原因となる<sup>4)</sup>。また、各種の毒素を産生し、それによって食中毒や種々の疾患をひき起こすことがある。毒素には溶血毒、白血球毒、腸管毒、毒素性ショック症候群毒素、表皮剥脱毒素などがあり、毒素産生は菌株が毒素遺伝子を持つか否かによる<sup>5)</sup>。

このうちブドウ球菌熱傷様皮膚症候群(staphylococcal scalded skin syndrome: SSSS)の原因毒素として表皮剥脱毒素Exfoliative toxin (以下ETと略す)が明らかにされている<sup>6)</sup>。ETはさらに抗原性の違いによりETAおよびETBに分けられ、それぞれが遺伝子*eta*, *etb*を持つ黄色ブドウ球菌菌株によって産生される。SSSSは主に小児に好発する疾患で、特に新生児に感染し、びまん性の発赤、浮腫から浅在性の水疱を形成し表皮剥脱を起こさせる感染症である。今回、ETAおよびETB産生黄色ブドウ球菌を対象に、SYBR Green Iを用いたインターカレーター法により、リアルタイムPCRによる遺伝子の検出および融解曲線分析による遺伝子の識別さらにmultiplex PCRを試み、この方法の有用性について検討した。

## II 材料と方法

### 1. 菌染色体DNAの分離および抽出

ETAおよびETB産生黄色ブドウ球菌の菌株(東京都立衛生研究所より分与)を用いた。それぞれの菌株をTryptic Soy Agarに塗抹し、37℃で24~48時間培養した。培養後、生えてきた菌のコロニーを滅菌綿棒でぬぐい取り、TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.8)に溶解して、菌の懸濁液を作製した。この懸濁液にライソゾームを加えて24時間反応した後、GES法により染色体DNAを分離した<sup>7)</sup>。抽出したDNAはTE buffer (150  $\mu$ l)で、4℃にて一晩かけてゆっくりと溶解した後、反応に用いるまで-20℃で保存した。

### 2. リアルタイムPCRによるET遺伝子の検出

リアルタイムPCRはSmart Cycler (Cepheid,

Sunnyvale, CA, USA)を用いて行った。プライマーは、*eta*の検出にはETA1; 5'-CTAGTG-CATTTGTTATTCAA-3' (forward), ETA2; 5'-TGCATTGACACCATAGTACT-3' (reverse)を、*etb*の検出にはETB1; 5'-ACGGCTATATACATTCAATT-3' (forward), ETB2; 5'-TCCATC-GATAATATACCTAA-3' (reverse)を用いた。各PCR増幅産物の予想サイズは、*eta*で119bp, *etb*で200bpである。

PCR反応は市販のPCRビーズ Ready-To-Go (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)を用い、これにSYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (最終濃度が20,000倍), プライマー, 25mM MgCl<sub>2</sub> およびテンプレートDNAを混合し、滅菌水を加えて全量が25  $\mu$ lになるように調整した。

PCRは95℃30秒の熱変性後、95℃3秒, 51℃5秒, 72℃30秒を45サイクル行い、PCR終了後、増幅産物の融解温度(Tm)を求めるために60℃~95℃間を0.2℃/秒の速度で温度が上昇するように設定した。

反応液組成中のMgイオン濃度を1.5mM, 2.5mM, 3.5mMの各濃度で、またアニーリング温度を48℃, 51℃, 54℃, 57℃の各温度で*eta*, *etb*のそれぞれに対してPCR条件の最適化を行った。

### 3. multiplex PCR

*eta*および*etb*を標的にした各プライマーセットを1本の反応チューブに入れて同時にPCR反応を行うmultiplex PCRを行い、それぞれのPCR増幅産物の識別を融解曲線分析により検討した。この時のPCRはMgイオン濃度3.5mM, アニーリング温度51℃の反応条件で、上記2で設定した反応プログラムに準じて行った。

## III 結果

### 1. Mgイオン濃度の検討

反応液中のMgイオン濃度が1.5mM, 2.5mM, 3.5mMの各条件でETA産生菌の染色体DNAと*eta*プライマーもしくは、ETB産生菌の染色体DNAと*etb*プライマーを用いてPCRを行い(それぞれ*eta*-PCR, *etb*-PCRと略す), その最適化を検討し

た。1.5mMでは*eta*-PCR, *etb*-PCRともに増幅産物は見られなかった。Ctは, *eta*-PCRにおいては2.5mMで25.83, 3.5mMで23.73, *etb*-PCRにおいては2.5mMで28.50, 3.5mMで23.58であった。Mgイオン濃度が低いところでは産物が検出されず, 濃度のより高い方がCtが短いことが示された。また, 各Mgイオン濃度におけるPCR産物のTmは, *eta*-PCRにおいては1.5mMで82.05℃, 2.5mMで80.93℃, 3.5mMで81.24℃, *etb*-PCRにおいては1.5mMで79.61℃, 2.5mMで77.13℃, 3.5mMで77.42℃であった (表1)。アガロースゲル電気泳動で, *eta*-PCR, *etb*-PCRともに1.5mMにおいてバンドは検出されず, 2.5mM, 3.5mMでは, *eta*-PCR, *etb*-PCRそれぞれに増幅物が認められ, 目的遺伝子の増幅産物であることを確認した (データ示さず)。

## 2. アニール温度の検討

Mg濃度3.5mM, 48℃, 51℃, 54℃, 57℃の各アニール温度で*eta*-PCRもしくは*etb*-PCRを行い, その最適化を検討した。

*eta*-PCRにおいて48℃で23.50, 51℃で25.83, 54℃で25.90, 57℃で25.30, また*etb*-PCRにおいて

表1. Mgイオン濃度変化によるPCR増幅効率への影響

Mgイオン濃度 (mM)	<i>eta</i> -PCR		<i>etb</i> -PCR	
	Ct	Tm(℃)	Ct	Tm(℃)
1.5	***	82.05	***	79.61
2.5	25.83	80.93	28.50	77.13
3.5	23.73	81.24	23.58	77.42

リアルタイムPCRを行って得られたCtとTmの値より各Mgイオン濃度におけるPCR増幅効率を比較した。

\*\*\*は値が得られなかった。

表2. アニール温度変化によるPCR増幅効率への影響

アニール温度 (℃)	<i>eta</i> -PCR		<i>etb</i> -PCR	
	Ct	Tm(℃)	Ct	Tm(℃)
48	23.50	81.57	18.78	77.86
51	25.83	81.16	20.16	77.45
54	25.90	81.47	21.62	77.59
57	25.30	81.74	***	77.88

リアルタイムPCRを行って得られたCtとTmの値より各アニール温度におけるPCR増幅効率を比較した。

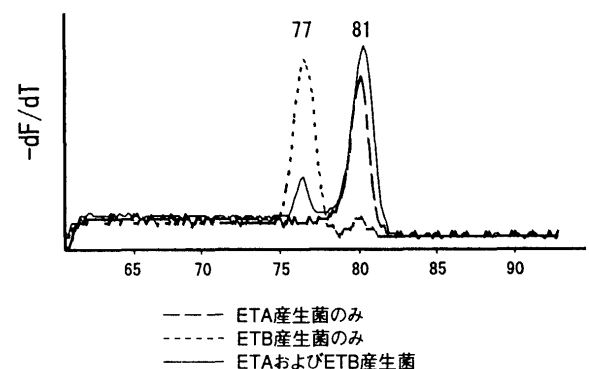
\*\*\*は値が得られなかった。

は48℃で18.78, 51℃で20.16, 54℃で21.62のCtがそれぞれ得られたが, 57℃ではCtは得られなかった。48℃, 51℃, 54℃, 57℃の各アニール温度による*eta*-PCR産物のTmは81.57℃, 81.16℃, 81.47℃, 81.74℃であった。また*etb*-PCR産物においてはそれぞれ77.86℃, 77.45℃, 77.59℃, 77.88℃であった (表2)。電気泳動で確認したところ, アニール温度57℃の*etb*-PCRでは増幅産物のバンドが検出されず, その他は*eta*-PCRではおよそ119bpに, *etb*-PCRで200bpの位置にすべて一致して検出された (データ示さず)。今回のPCR反応における至適なアニール温度は54℃以下であることが確認された。

## 3. multiplex PCR の融解曲線分析による識別

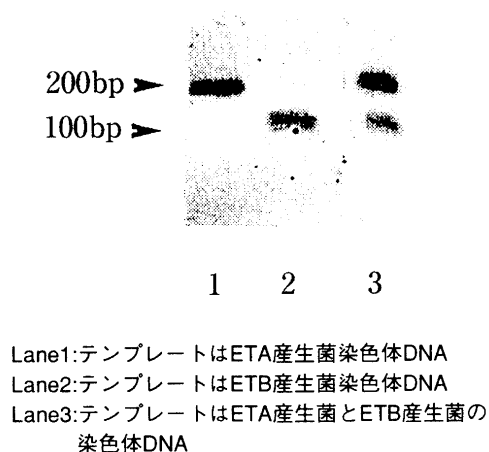
*eta*, *etb*の検出プライマーを1本のPCRチューブに入れて同時に両遺伝子を検出するmultiplex PCRを試み, Tmによる増幅産物の識別を検討した。テンプレートとして, ETA産生菌株のDNAのみ入れたもの, ETB産生菌株のDNAのみ入れたもの, ETA, ETBのDNA両方を入れたものの3種類について検討した。Mgイオン濃度3.5mM, アニール温度51℃のPCR条件において, いずれも増幅産物が認められた。融解曲線を分析した結果, PCR産物のTmは, テンプレートがETA菌DNAのみの場合は80.82℃に, ETB菌DNAのみの場合は77.02℃にそれぞれピークが出現した。これに対してテンプレートにETA, ETB菌のDNAを両方入れて行ったものは77.00℃と81.20℃の2点においてピークが見られ遺伝子産物の識別が可能

図1. リアルタイムmultiplex PCR産物の融解曲線分析



60~95℃まで0.2℃/秒で変化させ(横軸), PCR産物の蛍光強度の変化を温度変化で除したもの(-dF/dT)で計測した(縦軸)。PCR産物のTmは-dF/dTが最大となる温度で示される。

図2. リアルタイムmultiplex PCR産物の電気泳動におけるバンドパターン



能であった (図1)。アガロースゲル電気泳動で、ETA菌DNAあるいはETB菌DNAのみをテンプレートとしたものは、それぞれにバンドが1本 (ETA菌では119bpに、ETB菌では200bpに)、またETA菌、ETB菌両方のDNAをテンプレートとして入れたものにはバンドが2本 (119bp、200bp) 検出され、PCR産物が識別されたことを確認した (図2)。

#### IV 考察

感染症の診断・治療において起炎菌の病原因子保有の有無は重要でありかつ、その検出には迅速性が要求される。ブドウ球菌熱傷様皮膚症候群 (SSSS) は、1878年Ritterが生後1ヵ月以内の新生児に見られた剥脱性皮膚炎を新生児剥脱性皮膚炎として発表し (リッター病Ritter's disease)、1898年Winternitzがブドウ球菌感染が原因であると確認したものと同一疾患であり、toxic epidermal necrolysis (TEN) と呼ばれたこともある<sup>8)</sup>。本症は、皮膚および体内に感染した黄色ブドウ球菌から産生される菌体外毒素：表皮剥脱毒素exfoliative toxinの全身の中毒反応として、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生じる疾患である。これまで、SSSSの原因毒素であるETAならびにETBを検出する方法として免疫拡散法、ゲル内沈降反応、ELISA (酵素結合免疫吸着体検定法)、ラジオイムノアッセイ法などの方法が用いられてきた<sup>9)</sup>。

しかしこれらの方法は煩雑で時間がかかるため、最近では免疫学的な簡易検出法が使用されている<sup>10)</sup>。しかし、この方法でも、菌を培養してその上清に含まれる毒素を検査するため、迅速とは言い難い。そこで最近では、毒素そのものではなく、毒素をコードする遺伝子を検査する方法の検討が行われている<sup>11)</sup>。

今回、我々は、リアルタイムPCRによる毒素遺伝子 $eta$ 、 $etb$ の検出を試み、その有用性を確認した。DNAを単に増幅することが目的であったこれまでのPCR法は、感度の点では非常に優れているが、増幅産物の検出あるいは定量のためにさらにゲル電気泳動を必要とし、迅速性という点で劣っている。その上、測定工程上のコンタミネーションも起こりうる可能性が高い。また、プラトー効果により、定量に制限がかかるため、単純に増幅産物から鋳型量を推定すると、誤った結果を得ることになり、正確な定量が行えない。一方、今回用いたリアルタイムPCRは増幅産物の解析にゲル電気泳動を必要とせず、その増幅量をサイクル毎に反応を中断することなくモニターすることができる。このため従来のPCRに比べ、迅速性と定量性に優れている。通常、リアルタイムPCRでは、そのモニターは蛍光試薬を用いて行う。蛍光モニター法には幾つかの方法 (インターカレーター法、Taq Manプローブ法、Molecular Beacon法、dual hybridization probe法など) が考案されており、今回の実験はインターカレーター法で行った<sup>12)</sup>。インターカレーター法は、反応の過程で増加してくる2本鎖DNAに特異的な蛍光性のインターカレーター (SYBR Green I) が取り込まれ、PCR産物量に応じた蛍光シグナルが観察される。この蛍光強度を検出することで増幅産物の生成量をモニターでき、Ctが算出され、検体中の遺伝子量の推定が可能である。そしてPCR終了後に増幅DNAの融解温度を測定することによって産物の特異性の確認を行うことも可能である。今回の検討で、図1に示すように $eta$ 、 $etb$ のそれぞれのPCR産物は特有の $T_m$ を示した。

この $T_m$ の違いを利用して、 $eta$ 、 $etb$ の両毒素遺伝子をターゲットにしたリアルタイムmultiplex

PCRを試みた。multiplex PCRは、複数の遺伝子を同時に1本の反応チューブ内で増幅するために個々の毒素遺伝子について別個にPCRを行うよりも、時間と経費を短縮できる。これまでに、黄色ブドウ球菌の産生する種々の毒素遺伝子に対するmultiplex PCRに関して、幾つかの研究がすでに報告されている<sup>13,14,15)</sup>。しかし、これらの方法は、どの遺伝子が増幅されたのかをゲル電気泳動におけるPCR産物のサイズの違いで識別するものであり、今回のようにリアルタイムPCRを用いてmultiplex PCRを行い、そのPCR産物のT<sub>m</sub>によって識別を行った研究は今まで報告されていない。

PCR反応を行う上で反応条件を最適化しておくことは重要である。特に、multiplex PCRを行う場合、標的遺伝子が複数なので複数のプライマーを同時に反応させる。そのため、プライマー間の相互作用が起こりやすい。各プライマーが競合せず、効率よく増幅されるために、プライマーの設計および組み合わせにおいては、できるだけ相同な塩基配列を避ける必要があるのに加えて、リアルタイムPCRで増幅産物の特異性を決定するT<sub>m</sub>もそれぞれが有意に識別できる温度になるようにするなど、条件の厳密な設定が必要不可欠である。また、PCRの増幅効率に影響する要因のひとつにMgイオン濃度がある。Mgイオン濃度はPCR反応の際に、酵素活性、プライマーのアニーリング、合成されたDNAの忠実性、プライマーダイマーの形成などに関与していると言われている。一般にMgイオン濃度が高くなるとDNA合成の忠実性に影響を及ぼすだけでなく、2本鎖DNAの変性を起こしにくくしたり、Taqポリメラーゼも阻害を受ける。また、低すぎると産物が得られない。通常、PCR反応では1.5~2.5mMのMgイオン濃度が必要とされる。今回の結果で、*eta*、*etb*ともに1.5mMでは増幅産物は検出されず、2.5mMよりも3.5mMの濃度において、より早い遺伝子の増幅が行われたことが示された。これより、このPCR反応においてMgイオン濃度は3.5mMが至適濃度であると考えられた。また、*eta*-PCRはおよそ81℃に*etb*-PCRはおよそ77℃にそれぞれの特異的産物(目的遺伝子の増幅産物)のT<sub>m</sub>が出現し、1.5mM

に得られた非特異的産物のT<sub>m</sub>との間に明らかな違いが見られた。これは電気泳動による確認の結果とも一致した。このことから、T<sub>m</sub>を使って目的遺伝子とそうでない非特異的産物の識別が可能であると考えられ、融解曲線分析の有効性が示された。さらに、プライマーのアニーリング温度もまたPCR反応を左右する要因となる。C<sub>t</sub>の結果より、*eta*-PCR、*etb*-PCRの両方においてアニーリング温度の一番低い45℃が最も早く増幅が行われることがわかった。*eta*-PCRは48~54℃間では増幅効率にそれほど大きな違いは見られず、比較的安定していた。*etb*-PCRはアニーリング温度が上がるに連れて増幅効率が悪くなる傾向があり、57℃では増幅されなかった。アニーリングの温度はプライマーの配列によって異なるので、その違いが結果として現れたのかもしれない。結果より至適アニーリング温度は48~51℃であると考えられるが、特異性の高い反応を行うためにはできるだけアニーリング温度は高い方がよいので、51℃が最も至適であると思われた。これらの最適条件下で行われたリアルタイムmultiplex PCRは、ETA、ETB遺伝子を単独でも混合でも、その増幅産物のT<sub>m</sub>の違いによって特異的に識別可能であることが示された。

## V 結 語

今回リアルタイムPCRを用いてのmultiplex PCRによる遺伝子識別の可能性が示唆された。黄色ブドウ球菌は多種類の毒素を産生し、感染症をひき起こす。故に、この疾患を診断する場合、菌体を分離するだけでなく、その毒素産生の有無を調べることが不可欠であると考えられる。今後は黄色ブドウ球菌が産生するその他の毒素、腸管毒(Staphylococcal enterotoxin; SE)あるいは毒素性ショック症候群毒素(TSST-1)などについても検討を重ね、さらに臨床検体を対象に試みたうえで、実際に臨床検査室でも使用可能なリアルタイムPCRによる迅速検査の確立を目指し研究していきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Johanna Pietila, Qiushui He, Jarmo Oksi, and Mattik. Viljanen : Rapid Differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Strict by LightCycler Fluorescence Melting Curve Analysis of a PCR Product of the recA Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7):2756-2759, 2000
- 2) J.M. Akey, D. Sosnoski, E. Su, C. Bonilla, L. Jin, and M.D. Shriver: Melting curve Analysis of SNPs (McSNP) : A Gel-Free and Inexpensive Approach for SNP Genotyping *BioTechniques* 30(2):358-367, 2001
- 3) T.H.S. Woo, B.K.C. Patel, M. Cinco, et al. : identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogenous detection of rapid cycle PCR product *Journal of Microbiological Methods* 35:23-30, 1999
- 4) T. Oono, H. Kanzaki, T. Yoshioka and J. Arata : Staphylococcal Scalded Skin Syndrome in an Adult. *Dermatology* 195:268-270, 1997
- 5) 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 (9), 893-899, 1999
- 6) 桜井進 : ‘とびひ’ の病原因子 : 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素と毒素の産生調節. *日本細菌学雑誌*, 51 (3), 813-822, 1996
- 7) Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8:151-156, 1989
- 8) Shamez Ladhani, Christopher L. Joannou, Denise P. Lochrie, Robert W. Evans, and Susan M. Poston : Clinical, microbial, and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 12(2):224-242, 1999
- 9) 室野晃一 : Staphylococcal Scalded Skin Syndrome の原因となる黄色ブドウ球菌の表皮剥脱毒素 ( Exfoliative Toxin ) 産生と生物学的性状についての研究—毒素検出用ラテックス試薬の作製と臨床分離株への応用—. *日本小児科学会雑誌*, 91 (1), 48-58, 1987
- 10) 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
- 11) K. Gilligan, M. Shipley, B. Stiles, T. L. Hadfield and M. Sofi Ibrahim : Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes by PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes* 14:71-78, 2000
- 12) 川口竜二, 梶山直毅 : リアルタイムPCR. *臨床検査*, 42 (7), 808-811, 1998
- 13) Manisha Mehrotra, Gehua Wang, and Wendy M. Johnson : Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3):1032-1035, 2000
- 14) Karsten Becker, Ricarda Roth, and George Peters : Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 36(9):2548-2553, 1998
- 15) Naresh K. Sharma, Catherine E. D. Rees and Christine E. R. Dodd : Development of Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4):1347-1353, 2000