

Multiplex real-time PCRを用いた黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別法

平井 昭彦, 加藤 玲, 上原 さとみ, 池内 容子, 岸本 泰子, 仲真 晶子, 甲斐 明美

Development of a Multiplex Real-time PCR Test for Staphylococcal Coagulase Typing

Akihiko HIRAI, Rei KATOU, Satomi UEHARA, Youko IKEUCHI,
Yasuko KISHIMOTO, Akiko NAKAMA and Akemi KAI

[研究年報 第 62 号 (2011) 正誤表 Errata]

東京健安研セ年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **62**, 85-89, 2011

Multiplex real-time PCR を用いた黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別法

Development of a Multiplex Real-time PCR Test for Staphylococcal Coagulase Typing

Page 89 authors 著者

[誤 Error]

, Rei KATOU^a

[正 Correct]

, Rei KATOH^a,

Multiplex real-time PCR を用いた黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別法

平井 昭彦^a, 加藤 玲^a, 上原 さとみ^a, 池内 容子^a, 岸本 泰子^a, 仲真 晶子^a, 甲斐 明美^a

黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別を行う multiplex real-time PCR 法を開発した. コアグララーゼ I~VIII 型それぞれの *coa* 遺伝子領域を標的とし, 特異的配列部位に基づいた 8 対の型別用プライマーを設計した. 各プライマーを 2 あるいは 3 種類混合した 3 種類のマスターミックスを作製し, real-time PCR を行った結果, 増幅された PCR 産物の Tm 値によりコアグララーゼ型を判定することが出来た. 従来法で型別不能であった 15 株全ての型別も可能であったことから, 本法は従来法と比べ簡易・迅速かつ精度の高い型別法として有効であることが判明した.

キーワード: コアグララーゼ型別, multiplex real-time PCR, CYBR Green, 黄色ブドウ球菌, *Staphylococcus aureus*

はじめに

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を原因とする食中毒は全国で 40~70 件発生しており, 毎年平均 1,200 名が発症している. 件数, 患者数共に食中毒事件全体の 4%程度を占めており, 未だに重要な食中毒起因菌である¹⁾.

一方, 健康人であっても 21.1%程度が鼻腔内, 17.1%程度が手指などに黄色ブドウ球菌を保有しており²⁾, 環境ふき取り材料からも 0.6%程度分離されている³⁾. このため, 患者材料 (吐物, 糞便) と推定原因食品から黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SE) 産生能を有する本菌が検出され, これらの SE 型およびコアグララーゼ型が一致することが本食中毒の判断基準となる.

従来からのコアグララーゼ型別試験法は免疫血清を用いた血漿凝固作用の中和反応を用いており⁴⁾, 菌株によっては血漿凝固作用が弱く判定に数日程度の時間がかかり, 時として型別不能となるなど困難が伴うものもある. 一方近年は multiplex PCR を用いたコアグララーゼ型別試験法が報告されており^{5,6)}, 増幅された PCR 産物のサイズの違いにより型別が試みられている. PCR を用いたコアグララーゼ型別は特異的遺伝子領域により判定することから, 従来法では型別困難あるいは型別不能であった株についても型別が可能となることが期待されている.

また, 食中毒事件の疫学調査では, 多種・多数の検体から分離された菌株を短時間の内に処理し, 迅速に疫学情報を得る必要がある. PCR 法では, DNA の増幅後生成産物をアガロースゲルにより電気泳動し, ゲルを染色して PCR 産物のサイズ測定を必要とする. これに対し real-time PCR 法では, ゲルによる操作すなわち電気泳動や染色による DNA サイズの測定等が必要無く, PCR 法に比べてさらに簡易・迅速化が可能と考えられる.

そこで, CYBR Green を用いた real-time PCR 法による黄色ブドウ球菌コアグララーゼ型別法を試み, さらに簡易・迅速化を目指して, PCR 産物の融解温度 (Tm 値) の差によりコアグララーゼ型の同定を行う multiplex real-time PCR を

検討した.

材料および方法

1. 供試菌株

Staphylococcus aureus 標準株: NBRC 102135 (コアグララーゼ I 型), NBRC 102136 (コアグララーゼ II 型), NBRC 102137 (コアグララーゼ III 型), NBRC 102138 (コアグララーゼ IV 型), NBRC 102139 (コアグララーゼ V 型), NBRC 102140 (コアグララーゼ VI 型), NBRC 102141 (コアグララーゼ VII 型) および NBRC 102142 (コアグララーゼ VIII 型) を供試した.

コアグララーゼ型別不能株: 従来のコアグララーゼ型別試験で型別不能と判定された有症苦情由来株 15 株を供試した.

2. real-time PCR 用プライマーの設計

黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ構成タンパクをコードする *coa* 遺伝子配列 AB042574 (コアグララーゼ I 型), NC002745 (コアグララーゼ II 型), CP000253 (コアグララーゼ III 型), AB158550 (コアグララーゼ IV 型), AB042589 (コアグララーゼ V 型), AB158552 (コアグララーゼ VI 型), NC003923 (コアグララーゼ VII 型) および AB158553 (コアグララーゼ VIII 型) をもとに Clustal W プログラムを用いて, *coa* 遺伝子領域を比較し, 各コアグララーゼ型に特異的な配列部位, すなわち可変領域を検討した. この領域情報を基に Primer3-web プログラム (インターネットフリーソフトウェア, <http://primer3.sourceforge.net/>) により各コアグララーゼ型用プライマーを設計し (Table 1.), 各プライマーは SIGMA 製薬に合成を依頼した. 各型のコアグララーゼ検出用プライマーを用いて Master Mix を作成し, 対応するコアグララーゼ型の DNA テンプレートが real-time PCR で検出できることを確認した.

3. 標準 DNA の作成

各コアグララーゼ型の標準菌株を BHI ブロスに接種し 35°C で一夜培養後, 培養液 100μL を分取し, 15,000rpm で

^a 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

Table 1. Oligonucleotide primers used for coagulase typing by real-time PCR

Target gene	primer	Nucleotide sequence (5' → 3')	position	Size of PCR product (bp)	Tm value (°C) (Calculated value)
<i>coa 1</i>	coa1f	tggaagagaaggctactgctaga	536-558	150	79.1
	coa1r	gcgggtttatcctcatcacct	666-685		
<i>coa 2</i>	coa2f	aggcacaatttactggagca	182-201	89	76.8
	coa2r	tgtcatcaatctatctttcgcttc	247-270		
<i>coa 3</i>	coa3f	tgcagcagaagaagataaagca	528-549	104	77.6
	coa3r	cgtgctccccataatcctta	612-631		
<i>coa 4</i>	coa4f	tgatgaagcaactgaaaatcg	525-545	64	74.6
	coa4r	tgtgtcaatctcgcaacaa	569-588		
<i>coa 5</i>	coa5f	aaatatgattcgccaatgtcaa	127-148	69	75.2
	coa5r	tgcaaattgtgactccaagg	176-195		
<i>coa 6</i>	coa6f	gatgcggaagaagatttcg	454-473	128	78.5
	coa6r	tcaacttcggctacaagatcg	561-581		
<i>coa 7</i>	coa7f	gaaagcgaagaagaacagca	529-549	87	76.7
	coa7r	tgcattctgtaacgtaggcaaa	595-615		
<i>coa 8</i>	coa8f	gcatagagaaggctttgatgct	825-846	71	75.4
	coa8r	tccaagattcgctcagccttt	876-895		

2 分間遠心した。遠心後上清を捨て、沈渣に 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 10mM EDTA (T10E10) バッファー100μL および lysostaphin (2mg/L) 5μL を加え 37°C で 1 時間、酵素処理した。処理後は QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用し、使用説明に従って DNA を抽出して溶離液 100μL (DNA テンプレート) を得た。

4. real-time PCR 用反応液 (Master Mix) の調整

DNA テンプレート 3μL を加えた Master Mix は総量 25μL とし、濃度は 1x SYBR Green Realtime PCR Master Mix Plus (東洋紡ライフサイエンス), 0.1x Plus solution, 0.4μM 各プライマーとした。

5. 使用機器

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (アプライドバイオシステムズジャパン) を使用した。サイクルは 95°C1 分間の後、30 サイクルの 95°C10 秒、60°C1 分間を行い、その後 60°C~95°C で融解曲線を作成して Tm 値を測定した。

6. コアグララーゼ型別用プライマーの特異性検討

各コアグララーゼ型検出用 Master Mix を用いて、コアグララーゼ I 型からコアグララーゼ VIII 型の DNA をテンプレートとして real-time PCR を行った。すなわち、コアグララーゼ I 型検出用 Master Mix を用いて、DNA テンプレート I 型から VIII 型の検出を試み、コアグララーゼ I 型のみ検出するか否

かを検討した。同様の操作をコアグララーゼ II 型から VIII 型検出用 Master Mix を用いて検討した。

7. real-time PCR の multiplex 化の検討

各コアグララーゼ検出用プライマーによる PCR 産物の Tm 値の差を基に、PCR の multiplex 化を試みた。Tm 値が異なるプライマー数種類を等量に混合した Master Mix の作成を検討した。これらの multiplex 用 Master Mix を用いて、前述の条件で real-time PCR を実施し、DNA テンプレートの検出および Tm 値の違いによる同定が可能か検討した。

8. 従来法で型別不能であった株についての検討

従来法で型別不能となった有症苦情由来株等 15 株について、PCR 法によるシカジーニウス コアグララーゼ検出セット (関東化学) と今回開発した multiplex real-time PCR によるコアグララーゼ型別結果の比較を試みた。

結果および考察

1. プライマーの設計

コアグララーゼ I~VIII 型株についてコアグララーゼ遺伝子間の比較を行ったところ、*coa* 遺伝子領域は相同性が高かったが、各型に特異的な領域がそれぞれ 244bp~453bp の範囲で確認された。そこでこれらの領域内で型別用プライマーの設計を試みた。特異的領域が短いこと、また PCR 反応の効率化を考慮して PCR 生成物が 150bp 以内のサイズとなるよう各プライマーを設計した。

2. 各プライマーの特異性確認

各コアグララーゼ型用プライマーを用いて, 対応する DNA テンプレートを特異的に検出できるか否か検討した結果, 各コアグララーゼ型検出用 Master Mix は対応するコアグララーゼ型の DNA テンプレートのみで増幅が認められ, 他の型のコアグララーゼ DNA では増幅が認められなかった. また, 融解曲線により単一のピークを示した.

3. multiplex real-time PCR によるコアグララーゼ型別

各プライマーによる PCR 産物の T_m 値は, 理論値上 74.6°C ~ 79.1°C の間に分布し (Table 1.), 4.5°C の間に 8 種類の T_m 値が存在した. このため, 全てのプライマーを混合して型別を行うことは不可能であったため, 2~3 種類の Master Mix を作成することとした. 混合するプライマーの組み合わせは, T_m 値の差およびコアグララーゼ型ごとの食中毒事件数を考慮した. 近年食中毒起因菌のコアグララーゼ型は, IV 型および VII 型が両者とも約 30%, 次が III 型で約 10%, 他の型は数%程度である⁷⁾. このことから, 事件数の多い IV 型と VII 型は別の Master Mix に分けることとした. 以上の条件を基に検討した結果, 各プライマーの組み合わせは, Master Mix 1 としてコアグララーゼ I 型および VII 型, Master Mix 2 にコアグララーゼ II 型, VI 型および VIII 型, Master Mix 3 にコアグララーゼ III 型, IV 型および V 型とした.

Master Mix 1 で I 型および VII 型の DNA テンプレートを, Master Mix 2 で II 型, VI 型および VIII 型の DNA テンプレートを, Master Mix 3 で III 型, IV 型および V 型の DNA テンプレートを, それぞれ multiplex real-time PCR 反応を行ったところ, 全ての DNA テンプレートで増幅が認められ, また, T_m 値の差によりコアグララーゼ型の型別が可能であった (Fig. 1).

さらに, Master Mix 1~3 の real-time PCR 反応は同一条件で行うことから同時反応が可能であり, 機器による型別に必要な時間は約 1 時間半であった.

4. 型別不能株のコアグララーゼ型別

従来法でコアグララーゼ型別が不能であった 15 株について, 市販キットによる PCR 法および今回検討した multiplex real-time PCR により型別を試みたところ, 両法とも全ての株が型別可能であった. 型別されたコアグララーゼ型は, IV 型が 3 株, VI 型が 3 株, VII 型が 3 株および VIII 型が 6 株であった. また市販キットと multiplex real-time PCR で型別されたコアグララーゼの型は全て一致した.

multiplex real-time PCR によるコアグララーゼ型別は約 1 時間半で判定ができ, またアガロースゲルによる泳動操作, エチジウムブロマイド染色が必要無いなど, 簡易・迅速化が可能であった. 今後供試菌株を増やして従来法, PCR 法と比較検討を続ける必要があるものと考えられた.

まとめ

黄色ブドウ球菌コアグララーゼ型別法として, CYBR Green を用いた real-time PCR 法を検討した. *coa* 遺伝子領域で各コアグララーゼ型に特異的なプライマーを設計した. これらのプライマーを 2~3 種類混合し, 3 種類の master mix により real-time PCR の multiplex 化を試みた結果, 各コアグララーゼ型を判定することが出来た. また従来法で型別不能であった 15 株について, 市販キットによる PCR 法および本法により型別を試みたところ, 両法とも全ての株が型別可能であり, 両者の型は一致した. multiplex real-time PCR によるコアグララーゼ型別は, 機器による判定時間が約 1 時間半で, 簡易・迅速化が可能であった.

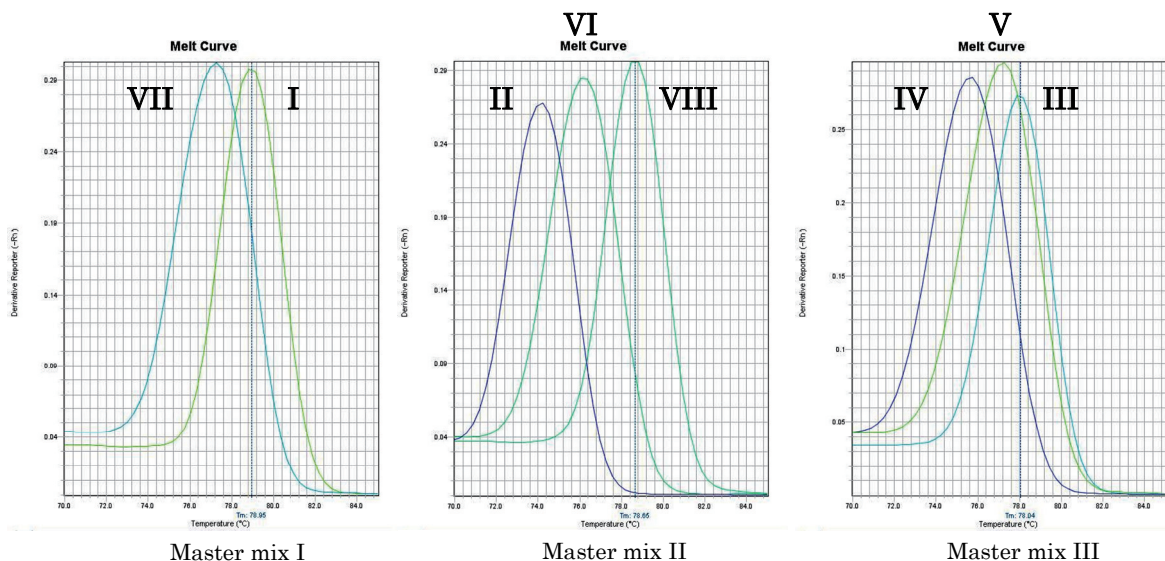


Fig. 1. Melt curve of coagulase I to coagulase VIII

文献

- 1) 厚生労働省：食中毒発生状況,
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html> (2011 年 7 月 14 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 2) 入倉善久, 池島伸至, 平田一郎, 他：東京衛研年報, **38**, 145-149, 1987.
- 3) 森田師郎：食品衛生研究, **47**(8), 59-67, 1997.
- 4) 潮田弘：検査と技術, **19**(6), 555-561, 1991.
- 5) Sakai, F., Takemoto, A., Watanabe, K., et al. : *J. Microbiol. Methods*, **75**, 312-317, 2008.
- 6) Hirose, M., Kobayashi, N., Ghosh, S., et al. : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **63**, 257-263, 2010.
- 7) 平井昭彦, 新井輝義, 加藤玲, 他：日本食品微生物学会 30周年記念学術総会講演要旨集, 116, 2009.

Development of a Multiplex Real-time PCR Test for Staphylococcal Coagulase Typing

Akihiko HIRAI^a, Rei KATOU^a, Satomi UEHARA^a, Youko IKEUCHI^a, Yasuko KISHIMOTO^a, Akiko NAKAMA^a and Akemi KAI^a

Staphylococcal coagulase typing is an important epidemiologic marker for food poisoning caused by *Staphylococcus aureus*. A multiplex real-time PCR method using SYBR Green was developed for coagulase typing. Specific primers targeting *coa* genes of *Staphylococcus aureus* were designed for coagulase type I to VIII. Three master-mixes, including 2 or 3 primer pairs each, were prepared. Coagulase types were classified by T_m values of melting curves. Fifteen strains which were not characterized by serological method were successfully identified using multiplex real-time PCR. The multiplex real-time PCR method was simpler and more rapid than serological methods, making it an effective procedure.

Keywords: coagulase typing, multiplex real-time PCR, SYBR Green, *Staphylococcus aureus*

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan