

レンサ球菌を対象としたリアルタイムPCR検出系の確立

久保田 寛顕^a, 奥野 ルミ^a, 畠山 薫^a, 貞升 健志^a, 甲斐 明美^b

A群溶血性レンサ球菌として知られている*Streptococcus pyogenes*は咽頭炎をはじめとする呼吸器系感染症の起原菌であり、飛沫感染が主な感染経路と考えられている。一方、*Streptococcus salivarius*および*Streptococcus agalactiae*もまたレンサ球菌の一種であり、口腔内常在菌として知られている。レンサ球菌を原因とする集団感染の発生リスクを算定するためには、検査材料からの病原体の検出、食品や飲料水をはじめとする生活環境に含まれる同菌種の存在量に関する情報が重要であると考えられる。そこで、これらの3菌種の検出・定量を目的とし、リアルタイムPCR検出系の確立を試みた。

その結果、どの検出系においても特異的に目的菌種を検出するのみならず、各菌種について幅広いダイナミックレンジ（1試料あたり 10^1 から 10^6 コピー）で菌数を定量することが可能であった。今後、臨床材料、食品をはじめとする生活環境中の飛沫汚染を調査するツールとして、本検出系の有効性が期待される。

キーワード：レンサ球菌，口腔内細菌，リアルタイムPCR，飛沫感染

はじめに

レンサ球菌はグラム陽性球菌の一種であり、病原性、非病原性のものを含めてその多くが口腔内に存在し¹⁾、また、常在する口腔内細菌の大部分をレンサ球菌が占めることが知られている^{2,3)}。このため、口腔内から採取される検体からは複数種のレンサ球菌が多量に検出される⁴⁾。

レンサ球菌の中でもA群溶血性レンサ球菌（GAS: Group A Streptococci）は、咽頭炎をはじめとする呼吸器系感染症の起原菌である一方、重篤な劇症型レンサ球菌感染症を引き起こす場合もある。咽頭炎については「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」の感染症発生动向調査における小児科定点把握疾患として、劇症型レンサ球菌感染症は5類全数疾患として発生动向の把握が行われている。

また、GASは食品や環境中での生存や増殖が認められており、実際に食品を媒介とした大規模な集団感染事例もしばしば見られることから⁵⁾、感染症の発生を防ぐためには、食品従事者における診断、生活環境における存在状況等を調査することが重要である。

一方、非病原性もしくは日和見感染性のレンサ球菌*Streptococcus salivarius*については、検出の有無自体が問題として取り上げられることは稀である。しかし、過去の報告において、すべての唾液中中に存在していることから⁶⁾、食品や飲料水をはじめとした生活環境における飛沫汚染実態を明らかにしていく目的で、汚染指標として一定の効果を示すことが期待される。また、B群溶血性レンサ球菌（GBS: Group B Streptococci）として知られている*Streptococcus agalactiae*は、腸内・膈内の常在菌である一方、口腔内における存在も知られている^{4),7)}。

このため、本研究ではA群レンサ球菌感染症起原菌の中でも国内外における検出割合が9割以上を占める*Streptococcus pyogenes*についてリアルタイムPCR検出系を構築するとともに、*S. salivarius*と*S. agalactiae*についても定量手段として、特異的定量を可能とするリアルタイムPCR検出系の確立を試みた。

実験方法

1. 増幅領域とプライマー・プローブの設計

3種のレンサ球菌（*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. agalactiae*）について、それぞれ特異的に保有する遺伝子領域を対象として、TaqManプローブによる蛍光検出を基盤としたリアルタイムPCR検出系を構築した。

*S. pyogenes*については、同菌種が特異的に有する毒素遺伝子*speB*の一部を増幅するconventional PCR検出系が報告されている⁸⁾。本研究においては同報告にあるプライマーを利用し、その増幅領域である257塩基対の中にTaqManプローブを配置することにより、TaqMan法による検出を可能とした。*S. salivarius*については、特異的配列を有するDextranase遺伝子（*dex*）領域を対象とすることとした。過去の文献では*dex*領域を対象としたconventional PCR検出系を構築しているが⁹⁾、本研究においてはTaqMan検出系に適用するために、同遺伝子配列から180塩基対を抽出し、検出領域とした。*S. agalactiae*については、細胞外に放出するタンパク質（CAMP因子）をコードする*cfb*遺伝子領域の一部を対照とした、2本の蛍光プローブを用いたリアルタイムPCR検出系（上流のプローブの3'末端にドナー色素、下流のプローブの5'末端にアクセプター色素を結合した状態で蛍光共鳴エネルギー転移を誘発する方式）が過去に構築

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

表1 各検出系におけるプライマーとプローブの配列

<i>S. pyogenes</i>	Forward primer	5'-GTCAACATGCAGCTACAGGA-3'
	Reverse primer	5'-AATACCAACATCAGCCATCA-3'
	TaqMan probe	FAM-CCCTAACAAAGGGTTGAAAGAC-TAMRA
<i>S. agalactiae</i>	Forward primer	5'-TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA-3'
	Reverse primer	5'-GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT-3'
	TaqMan probe	FAM-AAGCCCAGCAAATGGCTCAAA-TAMRA
<i>S. salivarius</i>	Forward primer	5'-CTGTCAAAGAAGCCACTGGTTCAACTACTG-3'
	Reverse primer	5'-GATTCAATCACTACACCAGCTTCAGAGGC-3'
	TaqMan probe	FAM-GATTCTGAAATTGCTGTCTGTCG-TAMRA

されている^{10,11)}。本研究ではこれをTaqMan検出系用に改変し、上流のプローブの両端にそれぞれレポーター（ドナー）色素とクエンチャー（アクセプター）色素を結合したプローブを用いる方法を構築することとした。

2. スタンダードDNAの作成

TAクローニング法により各検出領域を導入したプラスミドDNAをリアルタイムPCR検出時のスタンダードDNAとして、用いた。まず、各菌株 (*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. agalactiae*) からDNAを抽出し、それぞれのリアルタイムPCRに使用するプライマー（表1）を用いて対象領域を増幅した。次に、得られた増幅産物をQIAquick PCR purification kit（キアゲン）にて精製した後、pMD20ベクター（タカラバイオ）と混合し、Ligation high ver. 2（東洋紡績）を用いてライゲーション反応を行った。反応産物により形質転換したコンピテントセル*E. coli* JM109（タカラバイオ）を50 µg/mLアンピシリン含有LB寒天培地上で培養した後、そこから得られたクローンをそれぞれ個別に液体培養し、QIAprep spin mini prep kit（キアゲン）を用いてプラスミドを抽出した。最後に、回収したプラスミドの吸光度比（Abs 260 nm/Abs 280 nm）が1.8から2.0の間にあることを分光光度計により確認した後、それぞれDNAシーケンサー3130 Genetic Analyzer（ライフテクノロジーズジャパン）の分析に供することにより、目的とする検出領域が導入されていることを確認した。

得られたスタンダードDNAからリアルタイムPCR反応における検量線を作成するために、それぞれのスタンダードDNA溶液に含まれるコピー数をあらかじめ算出した。まず、pMD20ベクターの塩基数（2,736塩基対）に検出領域の塩基数を加えた値（*S. pyogenes* : 2,993塩基対, *S. salivarius* : 2,916塩基対, *S. agalactiae* : 2,889塩基対）に330Da/塩基対を乗じて得られた値を各スタンダードの分子量とし、アボガドロ数 6.023×10^{23} copies/molを乗じることにより単位グラムあたりのコピー数を算出した後、分光光度計により得られた260nmの吸光度に50 µg/mLを乗じて得られる数値をDNAの濃度（µg/mL）とし、これらに乗じることにより単位容量あたりのコピー数（copies/µL）を算出した。

3. リアルタイムPCR反応

各菌種ともに、×2 TaqMan Universal PCR Master Mix（ライフテクノロジーズジャパン）25 µLに、0.4 µMのフォワードプライマー、0.4 µMのリバースプライマー、0.3 µMのTaqManプローブ（ライフテクノロジーズジャパン）を加え、滅菌蒸留水で45 µLにした後、検体5 µLを加えることにより全量50 µLの反応液とし、それぞれを96wellプレート（ライフテクノロジーズジャパン）の各wellに添加した。検量線作成のためのスタンダード希釈液については、前段落において算出したコピー数をもとに、5 µL中に 10^0 から 10^6 コピー含まれるようにTE bufferで希釈した段階希釈系列を用い、検体5 µLと同様にこれらの希釈系列のそれぞれ5 µLを加えた。なお、各検体およびスタンダード希釈系列についてはそれぞれ3 well調製し、検体については各wellの平均を実測値として取り扱う一方、検量線作成にはスタンダードの各wellを平均化せず、それぞれ1プロットとして直線近似を行った。

検出は、Applied Biosystems 7900HTリアルタイムPCRシステム（ライフテクノロジーズジャパン）により行った。*S. pyogenes*, *S. salivarius*については50°Cで2分、95°Cで10分を各1回の後、95°C 15秒、55°C 1分を60回、*S. agalactiae*については、50°Cで2分、95°Cで10分を各1回の後、95°C 15秒、55°C 1分を50回という温度サイクルを設定した。増幅後、同システムの自動解析により、Ct (Threshold cycle) 値を定め、定量を行った。

4. リアルタイムPCR検出の特異性

各検出系がそれぞれ特異的に目的の菌種のみを検出するものであることを確認するために、それぞれの検出系において、複数の菌種の分離株から抽出したDNAに対して検出反応を行った。試験には、*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. agalactiae*のほか、口腔内に存在するグラム陽性球菌であり、互いに近縁な菌種である、*Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Gemella haemolysans*からの抽出DNAを供した。

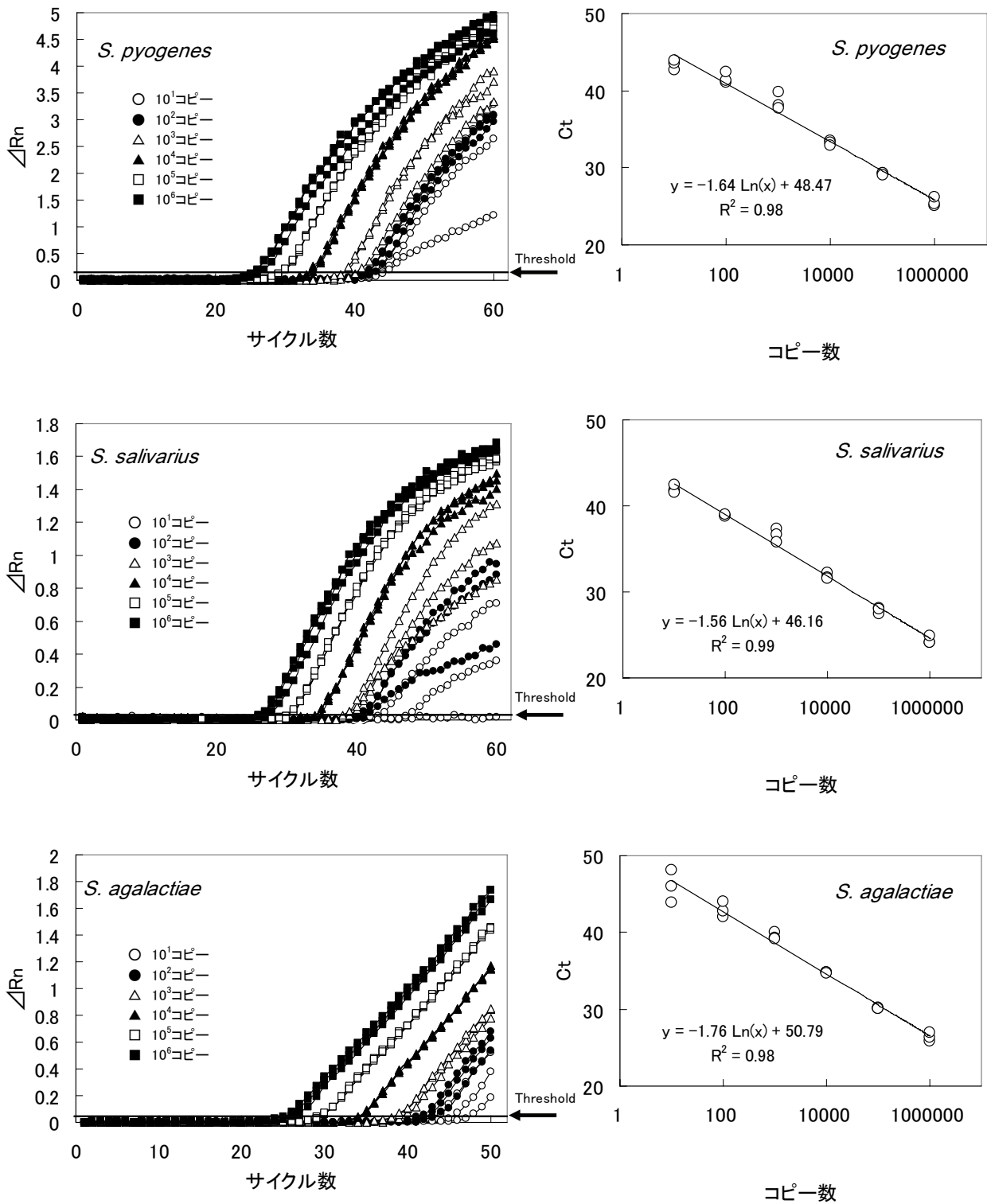


図1 レンサ球菌3種に対するリアルタイム検出系における増幅曲線と検量線

結果及び考察

1. 検出の特異性

各検出系ともに、目的とする菌種 (*S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. agalactiae*) を除き、増幅反応は見られなかった。これにより、本検出系を用いることで、複数の細菌が混在した検体等であっても、各目的菌種を特異的に検出することが可能であると考えられた。

2. スタンダードDNAを用いた検量線

本研究においては、試料に含まれる菌量を定量するためのスタンダードDNAとして、対象とする増幅領域が導入されたプラスミドDNAを用いた。通常、このようなスタンダードDNAは培養が困難な菌種やウイルスを定量する際に用いられる方式であり、菌体から直接抽出したDNAと増幅効率が必ずしも一致するとは限らないが、菌種によ

らず同一の作業（プラスミド抽出，分光光度計による濃度測定，段階希釈系列の作成等）を実施すればよいという点だが，本研究のような複数のリアルタイムPCR反応系を確立する際において有用であると考え選択した。

段階希釈により各wellにおいて 10^0 から 10^6 コピーまで含まれるようにスタンダードDNAを調製し，得られた増幅曲線を図1左段に示した．上からそれぞれ*S. pyogenes*，*S. salivarius*，*S. agalactiae*の検出系を表したグラフであり，増幅曲線においては，○，●，△，▲，□，■の順にそれぞれ， 10^1 ， 10^2 ， 10^3 ， 10^4 ， 10^5 ， 10^6 コピーのスタンダードDNAによる検出を示している． 10^1 コピーにおいても*S. salivarius*は2 well（陽性率2/3），*S. pyogenes*，*S. agalactiae*は3 well全て（陽性率3/3）で増幅が見られた．いずれの菌種でも 10^0 コピーの検出は見られなかった。

一方，リアルタイムPCRシステム附属ソフトウェアの自動解析によりCtを決め，検量線を作成した．図1右段に示すようにそれぞれ決定係数が0.98（*S. pyogenes*），0.99（*S. salivarius*），0.98（*S. agalactiae*）となり，概ね線形性は取れているものと考えられた。

3. リアルタイムPCRによるレンサ球菌の検出

本研究により，レンサ球菌*S. pyogenes*，*S. salivarius*，*S. agalactiae*を対象とするリアルタイムPCR検出系を確立し，各菌種について幅広いダイナミックレンジ（1試料あたり 10^1 から 10^6 コピー）で菌量を定量することが可能となった．以上のことから，感染症発生動向調査における患者検体での応用や食品をはじめ環境中の飛沫汚染状況を知るための指標菌としての利用が期待できる。

食品をはじめとする生活環境中の存在量を調査するためには，通常，直接平板培養により菌量を測定し，菌数をカウントするために検体あたり適当な濃度（1枚の平板あたり数十から数百コロニー）とするための段階希釈と，それぞれの培養作業が必ず必要となる．これに対し，本法において 10^1 から 10^6 コピーまでの検量線を作成したように，リアルタイムPCR検出系はダイナミックレンジが幅広いため，平板培地で培養し測定するよりも簡便で迅速な検査が可能となる。

しかし，その一方でリアルタイムPCRが検出するものは遺伝子，すなわち物質としてのDNAであることにも注意しなくてはならない．寒天平板培地を利用した方法は生菌数を直接測定するものであるが，PCRにおいては死菌であっても検出する可能性が十分にある．このため，リアルタイムPCR検出系については，利点と欠点を踏まえた使用方法を選出するのが望ましい．例えば生菌数を測定するため

に平板培地での培養試験の前段階として，どのようなオーダーに菌数があるかをスクリーニングする用途において強い力を発揮するものと考えられる．また，検体中の生菌を保存しておくのは極めて困難であるが，検体から抽出したDNAは冷凍保存しておくことができる．このため，過去の汚染状況を知るために，保存しておいたDNAに対してリアルタイムPCR反応を行うことも可能であり，生菌測定で限界となる部分を補うツールとして有用であろう．

ま と め

*S. pyogenes*の集団感染の迅速診断や，発生リスクを評価することを目指し，同菌種の存在量を定量するためのリアルタイムPCR検出系の確立を試みた．同時に，生活環境における飛沫汚染の指標菌としての可能性を探るために，*S. salivarius*，*S. agalactiae*についてもリアルタイムPCR検出系の確立を試みた．結果，どの検出系においても特異的に目的菌種を検出するのみならず，幅広いダイナミックレンジ（1試料あたり 10^1 から 10^6 コピー）で菌量を定量することが可能であった。

文 献

- 1) 塩川勇一，吉岡守正，浜田茂幸：レンサ球菌感染症—その基礎と臨床（中），483-490，1992，廣川書店，東京．
- 2) Zaura, E., Keijer, B.J., Huse, S.M., et al.: *BMC Microbiol.*, **9**, 259, 2009.
- 3) Hsiao W.W., Li, K.L., Liu, Z., et al.: *BMC Genomics*, **13**, 345, 2012.
- 4) 飯村達，天野祐次，松江隆之，他：感染症学雑誌，**75**(4), 314-325, 2001.
- 5) 池田嘉子，椿本亮，財津修一，他：福岡市保環研報，**24**, 60-64, 1997.
- 6) Nakanishi, H., Kido, A., Ohmori, T., et al.: *Forensic Sci. Int.*, **183**, 20-23, 2009.
- 7) 滝沢慶彦，坂本裕美子，オリベラ恵，他：感染症学雑誌，**75**(3), 174-180, 2001.
- 8) Tyler, S.D., Jhonson, W.M., Huang, F. E., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **30**(12), 3127-3131, 1992.
- 9) Igarashi, T., Yano, Y., Yamamoto, A., et al.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**(6), 394-397, 2001.
- 10) Bergeron, M.G., Ke, D., Ménard, C., et al.: *N. Engl. J. Med.*, **343**(3), 175-179, 2000.
- 11) Ke, D., Ménard, C., Picard, F.J. et al.: *Clin. Chem.*, **46**(3), 324-331, 2000.

Real-Time Quantitative PCR Detection of *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, and *Streptococcus agalactiae*

Hiroaki KUBOTA^a, Rumi OKUNO^a, Kaoru HATAKEYAMA^a,
Kenji SADAMASU^a and Akemi KAI^a

Streptococcus pyogenes, a group A streptococcus, causes respiratory diseases, including pharyngitis. The most probable infection route of *S. pyogenes* is droplet transmission. On the other hand, the streptococcus species *S. salivarius* and *S. agalactiae* are oral residents. To estimate the potential risks of mass infection by streptococci, we require information regarding pathogen detection in clinical samples and the presence of streptococci in the living environment, including in food and drinking water. Thus, we developed real-time PCR detection methods for *S. pyogenes*, *S. salivarius*, and *S. agalactiae*, and examined the specification and quantification ability of these methods. The specificity of the developed methods to the 3 streptococcus species was confirmed, with a wide dynamic range of detection of these bacteria (10^1 – 10^6 copies/PCR). Hereafter, these detection methods will be expected to be useful as a tool for investigating droplet contamination of streptococci in the living environment containing clinical materials and foods.

Keywords: Streptococcus, oral bacteria, real-time PCR, droplet transmission

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