

《原著》

黄色ブドウ球菌の AP-PCR 法による遺伝子多型解析

岸本 満* 大澤 絵理* 谷口 由季* 森西 加奈*

要旨

簡便かつ短時間で解析可能な *S. aureus* 型別法開発を目的に AP-PCR 法による遺伝子多型解析を行った。菌体 DNA は熱抽出法と DNA 抽出キット「Gen とるくん」による抽出法で抽出、10塩基のオリゴヌレオチドプライマー 3 種で増幅を行い、増幅産物のバンドパターンより型別した。

型別成功率はプライマー A-03で最も高く (95.8%)、次いでプライマー-272 (93.1%)、プライマー F-04 (84.7%) の順だった。しかし、熱抽出法ではプライマー-272が最も高かった (97.2%)。

「Gen とるくん」による抽出法に対し熱抽出法は増幅産物のバンド本数が少ない傾向があったが型別成功率は同等だった。熱抽出法でも高率に型別できることがわかった。安価で簡便な熱抽出法は食品工場、給食施設における食中毒菌の伝播実態調査にも利用できる。本型別法は汚染源調査の一次スクリーニングに有用である。さらに型別成功率および再現性を高めるため、熱抽出法の標準化、型別成功率の高いプライマーの設計、PCR 条件の調整が望まれる。

索引用語： 黄色ブドウ球菌、AP-PCR、遺伝子型別、汚染源調査、二次汚染

緒言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; 以下 *S. aureus*) による食中毒は1984年までは年間200事例以上、細菌性食中毒全体の約30%を占める発生が見られた¹⁾が、漸次減少し2007年は70事例で全体の9.6%を占める²⁾。しかし、2000年には加工乳が原因で大規模な事例が発生³⁾、またおにぎり、弁当などが原因で多数の患者を出す事例も毎年報告されている。*S. aureus* は自然界に広く分布し、人の常在菌でもある。したがって、衛生的食品取扱評価の指標菌として、リスク管理に利用することができ⁴⁾、調理環境で分離された *S. aureus* の遺伝子型別 (ジェノタイプング) から、調理従事者の行動を検証し、有効な対策を講じることが可能である。*S. aureus* の遺伝子多型解析は食中毒予防上、衛生管理上、有用な手法の

ひとつである。

S. aureus の遺伝子多型解析に関する報告はメチシリン耐性 *S. aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*; 以下 MRSA) に関するものが多い⁵⁻⁹⁾。世界的にはパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field Gel Electrophoresis; 以下 PFGE 法) による多型解析が多用される⁸⁻¹¹⁾。しかし PFGE 法は、分離解析能は優れるものの、高価な電気泳動装置が必要なうえ、結果を得るまでに数日を要する。また、DNA 抽出法においては熱抽出法と市販 DNA 抽出キットによる方法が普及しているが、DNA 抽出キットによる方法は熱抽出法と比較して操作手順が多く、煩雑である。そのため、一次スクリーニング法として食品工場や給食の現場で日常的に導入しにくく、実用的であるとはいえない。

著者ら⁴⁾ は AP (Arbitrarily Primed)-PCR 法について、PFGE 法に比べて識別能は劣る

*名古屋学芸大学 管理栄養学部

が、解析にかかる時間が少なく、操作も簡便であることを報告し、その特徴を生かして汚染源調査の一次スクリーニングへの活用を示唆した。また、長谷川ら¹²⁾は、熱抽出したDNAをAP-PCR法およびポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いることでPFGE法よりも簡易にMRSAの遺伝子多型解析ができることを報告した。

本研究は簡便かつ短時間で解析可能な型別法の開発という観点から、熱抽出法、AP-PCR法およびアガロースゲル電気泳動法を組み合わせた*S. aureus*の遺伝子多型解析を行い、一次スクリーニング法としての有効性を評価、検証した。

材料および方法

1. *S. aureus* の分離、培養

大学生6名の鼻腔をふき取り、卵黄加マンニット食塩寒天培地〔日水製薬〕で35℃、48時間培養、増殖した集落のうち黄色で光沢があり周囲に白濁環を示すコロニーを釣菌、純培養を行った。また、グラム染色(B&M山中変法;〔MerkJapan〕)、コアグラージェ試験(ウサギプラズマ栄研;〔栄研化学〕)、同定キット(APISTAPH;〔Biomerieux〕)を用いて*S. aureus*と同定された-80℃保存菌株11株を純培養した。

2. AP-PCR法

(1) 使用プライマー

10塩基のオリゴヌレオチドプライマーA-03(5'-AGTCAGCCAC-3')、272(5'-AGGGGGCCAA-3')、F-04(5'-GGTGATCAGG-3')を使用した。

(2) ゲノムDNAの調製

分離した*S. aureus*をトリプトソーヤ寒天培地〔日水製薬〕に塗抹し、35℃、24時間培養後形成した集落一白金耳分(約10 μ l)を採取し、熱抽出法¹³⁾およびDNA抽出キット(Genとるくん™(酵母用)〔TaKaRa〕;以下「Genとるくん」)を用いてDNAを分離した。

①熱抽出法

集落一白金耳分を滅菌蒸留水540 μ l中に混濁し、95℃の湯水中で5分間加熱した後、12,000rpm、4℃にて10分間遠心分離を行い、上清を回収した。

②DNA抽出キットによる抽出法

「Genとるくん」の操作手順にしたがい抽出したDNAを50 μ lのTE-Bufferに溶解した。

(3) PCR反応

AmpliTaq®Gold DNA Polymerase [Applied Biosystems] 1U、2mM GeneAmp®dNTP MIX [Applied Biosystems] 2 μ l、GeneAmp 10× PCR Buffer [Applied Biosystems] 2 μ l、DNA 1 μ l、20pMのプライマー 1 μ lに、蒸留水を加え総量20 μ lとした。PCR反応はEZcycler〔EZC-96:旭テクノグラス〕を用い、長谷川らの方法に準じた。すなわち、94℃10分のhot startを行った後、熱変性94℃1分、アニーリング41℃2分、伸長反応72℃2分を40サイクル行い、最後に伸長反応72℃10分を行った。

PCR増幅物の確認は1.5%アガロースゲル(NuSieve®3:1Agarose〔Lonza〕)で電気泳動(1×TAE Buffer、100V30分、分子量マーカー:PCRMarkers 50-2000bp〔Novagen:TaKaRa〕)し、エチジウムブロマイド溶液(1 μ g/ml)で30分間染色し、撮影(プリントグラフ®AE-6914;〔ATTO〕)により行った。

純培養、ゲノムDNA調製、PCR反応の一連の操作は同一の菌株、抽出法、プライマーごとに3回行った。

結果

1. *S. aureus* の分離

大学生の鼻腔内ふき取り6検体のうち1検体から*S. aureus*が分離された(ID No.001)。保存菌株(ID No.002~012)はトリプトソーヤブイヨン培地〔日水製薬〕で一晩増菌培養後、卵黄加マンニット食塩培地で35℃、48時間培養し、*S. aureus*であることを確認した。

2. 遺伝子多型解析

増幅バンドパターンをもとに分類型別した結果を表1に示す。出現したバンドは、熱抽

出法の場合、プライマー A-03で150～2000bp 間に4～11本、プライマー272で100～2000bp 間に3～10本、プライマー F-04で100～2000bp 間に1～7本であった。「Gen とるくん」による抽出法の場合、プライマー A-03で50～2000bp 間に5～15本、プライマー272で3～10本、プライマー F-04で2～11本のバン

ドが出現した。バンドパターンによる分類型別を試みたところ、熱抽出法の場合、プライマー A-03で10～12、プライマー272で10～12、プライマー F-04で9～11に型別された。同様に「Gen とるくん」による抽出法の場合、プライマー A-03で11～12、プライマー272で10～11、プライマー F-04で8～11に型別された。

表1 AP-PCR 法による型別

使用プライマー	株のID No.	熱抽出法			Genとるくんによる抽出法		
		1回	2回	3回	1回	2回	3回
A-03	001	a1	a'1	a''1	A1	A'1	A''1
	002	a2	a'2	a''2	A2	A'2	A''2
	003	a3	a'3	a''3	A3	A'3	A''3
	004	a4	a'4	a''3	A4	A'4	A''2
	005	a5	a'5	a''4	A5	A'5	A''4
	006	a6	a'6	a''5	A6	A'6	A''5
	007	a7	a'7	a''6	A7	A'7	A''6
	008	a8	a'8	a''7	A8	A'8	A''7
	009	a9	a'9	a''8	A9	A'9	A''8
	010	a10	a'10	a''9	A10	A'10	A''9
	011	a11	a'11	a''10	A11	A'11	A''10
	012	a12	a'12	a''9	A12	A'12	A''11
	計		12型	12型	10型	12型	12型
型別成功率※		94.4%			97.2%		
272	001	b1	b'1	b''1	B1	B'1	B''1
	002	b2	b'2	b''2	B2	B'2	B''2
	003	b3	b'3	b''3	B3	B'3	B''3
	004	b4	b'4	b''4	B4	B'4	B''4
	005	b5	b'5	b''5	B5	B'5	B''5
	006	b6	b'6	b''6	B6	B'6	B''6
	007	b7	b'7	b''7	B7	B'7	B''7
	008	b8	b'8	b''8	B4	B'8	B''8
	009	b9	b'9	b''9	B4	B'9	B''9
	010	b10	b'10	b''10	B8	B'10	B''10
	011	b11	b'11	b''11	B9	B'2	B''11
	012	b12	b'12	b''10	B10	B'11	B''8
	計		12型	12型	11型	10型	11型
型別成功率※		97.2%			88.9%		
F-04	001	c1	c'1	—	C1	C'1	C''1
	002	c2	c'2	c''1	C2	C'2	C''2
	003	c3	c'3	c''2	C3	C'3	C''3
	004	c4	c'4	c''3	C2	C'4	C''2
	005	c5	c'5	c''4	C4	C'5	C''4
	006	c6	c'6	c''5	C5	C'6	C''5
	007	c7	c'7	c''6	C2	C'7	C''6
	008	c8	c'1	c''7	C6	C'8	C''7
	009	c9	c'1	c''3	C7	C'9	C''8
	010	c10	c'8	c''8	C8	C'10	C''9
	011	c11	c'9	c''9	C2	C'11	C''10
	012	c2	c'10	c''8	C6	C'12	C''11
	計		11型	10型	9型	8型	12型
型別成功率※		83.3%			86.1%		

※) 型別成功率は3回の型別数の平均を12で除して算出した。
例) プライマーA-03で熱抽出法を行ったときの型別成功率

$$\frac{(12 + 12 + 10)}{3} \div 12 \times 100 = 94.4\%$$

また、各プライマーの型別成功率は、熱抽出法ではプライマー A-03で94.4%、プライマー 272で97.2%、プライマー F-04で83.3%だった。同様に「Gen とるくん」による抽出法ではプライマー A-03で97.2%、プライマー 272で88.9%、プライマー F-04で86.1%だった。

しかし、同一条件で3回行った結果を比較すると、バンドパターンの再現性は低く、最も再現性よくバンドパターンが得られた場合でも3回とも同一パターンが得られた株は12株中1株、3回中2回に同一パターンが得られた株は5株だった。

考 察

S. aureus 12株の型別成功率はプライマー A-03を用いた時に最も良好で、次いで272、F-04の順だった。A-03は熱抽出法、「Gen とるくん」による抽出法ともに型別成功率が高く、先行研究⁴⁾で示されたように型別に適したプライマーであると考えられた。272は2つのDNA抽出法間で型別成功率にもっとも大きな差(8.3%)が見られた。F-04は型別成功率が最も低かった。今後さらに型別精度の高いプライマーの探索、検討が望まれる。

増幅産物の泳動バンド濃度から推測して、熱抽出法では「Gen とるくん」による抽出法と同等のDNA量が得られたと思われた。しかし、抽出ごとにバンドパターンは異なり、熱抽出法ではバンド本数に少ない傾向がみられた。熱抽出法は抽出液に菌体由来の Taq polymerase inhibitor が含まれることがあり、これがバンドパターンおよびバンド本数に影響したと考えられた。しかし、バンドパターンおよびバンド本数は異なったものの、試験ごとに判定すれば型別数および、型別成功率に大きな差は生じなかった。熱抽出法は特別な試薬を必要とせず操作も簡便なため「Gen とるくん」による抽出法よりも安価でより迅速にDNAを抽出することが可能であり、熱抽出法を用いた型別法の精度を高めていく方向で本手法の改良が望まれる。

また、増幅バンドが不鮮明またはバンド本

数が異なるものもあり再現性が良いとはいえなかった。長谷川ら²⁾は、テンプレートDNA量を2.5 μg/μlに調整して用いたことにより、安定した結果を得た。しかし、DNA量測定をプロトコルに組み込むことは、本研究の目的と合致しないのでDNA量測定を実施しない手順で検討した。しかし、テンプレートDNA量が一定でないことが再現性を妨げている要因の1つだと考えられた。

AP-PCR法は1種類の短いプライマーを用いて低いアニーリング温度でPCRを行う方法である。そのため、複数のランダム領域に対してプライマーが結合するので、PCR条件や試薬組成などによって影響を受けやすい¹⁴⁻¹⁵⁾。しかし、AP-PCR法は解析にかかる時間が少なく、操作も簡便であることが特徴で、食品製造現場や厨房における伝播実態調査に活用可能な方法である。加えて、熱抽出法と組み合わせることで、より迅速かつ安価で実用的な型別法を確立することができる。本研究で型別成功率90%を越える結果が得られたので熱抽出法とAP-PCRを用いた型別法が汚染源調査の一次スクリーニングに有用であることがわかった。今後熱抽出法における加熱時間、PCR条件、および泳動条件等の検討を行い、再現性および型別成功率の向上が図られることを期待する。

参考文献

- 1) 小田隆弘:ブドウ球菌食中毒の最近の動向. 食品衛生学雑誌, 1998, 39, J179-J185
- 2) 厚生労働省食中毒統計資料:過去の食中毒発生状況, 2007,
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>
- 3) 厚生省生活衛生局:「雪印低脂肪乳」等による黄色ブドウ球菌食中毒の経緯, 2000,
<http://www.mhlw.go.jp/topics/0101/tp0119-2.html>
- 4) 岸本 満, 鈴木匡弘, 森田妃美子他:調理施設から採取された黄色ブドウ球菌のRAPD-PCR, BSFGE および PFGE による遺伝子多型解析. 日食微誌, 2004, 21(3), 193-200
- 5) Bingen, E., Barc, M., Brahimi, N., et al :Randomly

- amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcus bacteremia isolates in pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33, 1657-1659
- 6) Blanc, D., Francioli, P., Le Coustumier, A. et al : Reemergence of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in France: a phylogenetic approach. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, 2287-2290
- 7) Jones, T., Kellum, M., Porter, S. et al: An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect. Dis.*, 2002, 8, 82-84
- 8) Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. et al : Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31, 982-985
- 9) Prevost, G., Jaulhac, B. and Piemont, Y. : DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30, 967-973
- 10) Hollis, R., Bruce, J., Fritschel, S. et al: Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, 34, 263-268
- 11) Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H. et al: Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, 3746-3749
- 12) 長谷川秀浩, 金子陽子, 阿部多実子他 : Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の疫学的解析法の有用性. *厚生連医誌*, 2007, 16(1), 35-39
- 13) 厚生労働省監修 : 食品衛生検査指針微生物編, 社団法人日本食品衛生協会, 2004 : 246
- 14) 向川 純, 柳川義勢, 山田澄夫 : 結核集団感染疑似事例における分子疫学的解析法としての AP-PCR 法及び VNTR 法の比較検討. *東京健安研セ* 年報, 2006, 57, 55-58
- 15) 半田宏 . わかりやすい遺伝子工学 . 株式会社昭晃堂, 1997 : 123-124

Abstract**Genotyping of *Staphylococcus aureus* Based on Arbitrarily Primed PCR****Michiru Kishimoto^{*}, Eri Ohsawa^{*}, Yuki Taniguchi^{*} and Kana Morinishi^{*}**

To develop the simple and short time genotyping method, we optimized DNA extract methods and PCR primers.

Twelve *Staphylococcus aureus* isolated from the nasal of students were genotyped by Arbitrarily Primed PCR method. The genomic DNA were extracted by heat method and DNA Extraction Kit. Three kinds of oligonucleotide primers were used for PCR. The results were compared with primer. The accuracy of typing was 95.8% by Primer A-03, 93.1% by primer 272 and 84.7% by primer F-04. However, according to the accuracy of the extraction method, primer 272 was the highest in the heat method (97.2%). The heat method was almost equal to DNA Extraction Kit method, though the number of the band of the amplification product had tended to be a few compared with the Kit. This suggests heat method can used typing of for *Staphylococcus aureus*.

The heat method is low-cost and simple, can be used also for the spread investigation of actual conditions of the food poisoning bacterium in the food factory and the kitchen. This typing protocol is useful for the first screening the polluter investigation.

^{*} School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences