

資

料

# Polymerase Chain Reaction による ジフテリア毒素遺伝子の検出

八柳 潤 齊藤志保子 佐野 健 佐藤 宏康 森田 盛大

ジフテリア菌の迅速同定を目的として、ジフテリア毒素遺伝子を検出するPCRについて検討した。Pallenの報告したプライマーを一部改変したプライマー(C. di-1, C. di-2)を使用したPCRにより、Gravis型ジフテリア菌(IID526株)、Mitis型ジフテリア菌(IID527株)、秋田県内で分離された臨床分離ジフテリア菌5株の計7株の全てからジフテリア毒素の構造遺伝子に由来する246bpのDNA増幅断片が得られた。Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, E. coliを使用して検討した範囲では、本PCRはジフテリア菌に特異的であった。本法の感度は反応チューブ当たり約 $1.8 \times 10^5$  CFUであった。なお、一旦PCRを実施した反応液の一部を検体として新たな反応チューブに加え、再びPCRを実施した場合、ジフテリア菌の検出感度は反応チューブ当たり約1.1 CFUまで上昇し、ジフテリア菌を咽頭スワブから直接検出できる可能性が示唆された。しかし、検体採取の過程で咽頭スワブに何らかの妨害物質が混入する可能性が否定しきれないことから、現時点では、分離株がジフテリア毒素遺伝子を保有するか否かを知る目的のみに本法を適用するのが適切であると考えられた。

キーワード：ジフテリア、ジフテリア菌、ジフテリア毒素構造遺伝子、PCR

## I はじめに

ジフテリアは乳幼児に多い疾病であったが、近年、その発生は激減し、全国での届出患者数は1991年にわずか2名であった。秋田県では1992年に6年ぶりの患者発生があったが、当所でジフテリア菌の分離、同定を実施した際、ジフテリア菌の同定経験のあるスタッフが既に定年退職してしまっていたこと、検査に必要な培地や試薬が常備されていなかったことなど、検査の遂行上いくつかの問題<sup>1)</sup>を経験した。

ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)はグラム陽性で異染小体を有する好気性桿菌であり、強力な菌体外毒素を産生する。ジフテリア菌の同定にはジフテリア毒素の産生性を確認する必要がある。ジフテリア毒素の生物活性が特異抗毒素により中和されることから、従来、ウサギや培養Vero細胞を使用したバイオアッセイ<sup>2)</sup>により毒素の産生性が検査されていた。しかし、ジフテリア検査のために培養細胞や動物を常備することは困難であること、また、バイオアッセイの結果を得るには最長で5日間を要することなどがジフテリア防疫対策上の障害となっていた。

我々は今回、ジフテリア菌の迅速同定を可能とする目的でPCRによるジフテリア毒素遺伝子の検出法について検討したので、得られた成績について報告する。

## II 材料と方法

### 1. 菌株

C. diphtheriae Gravis型の標準株にはIID526株、Mitis型の標準株にはIID527株を使用した。また、臨床分離株としては秋田県の事例で分離されたKS株、RF株、KA株、DS株、IS株を使用した。

PCRの特異性確認には臨床分離Staphylococcus aureus、臨床分離Streptococcus pyogenes 936株(A群T-1)、937株(A群T-12)、938株(A群T-12)、939株(A群T-12)、9310株(A群T-12)、Escherichia coli EDL-931株を使用した。

### 2. PCR

ジフテリア毒素の構造遺伝子のうち、246bpを特異的に増幅するプライマーとして、Pallenの報告したプライマー<sup>3)</sup>を一部改変したC. di-1: 5'-ctt-tta-gtg-ctg-cga-gaa-cc-3'、およびC. di-2: 5'-aaa-ctt-ttc-ttc-gta-cca-cg-3'を使用した。反応液の組成、ヒートサイクルは既報<sup>4)</sup>のとおりとしたが、増幅されたDNA断片の検出には2.5%アガロースゲルを使用した。プレートには、被検菌の生理食塩液懸濁液を100°C10分間加熱した後、氷冷したものを使用した。

## III 結果および考察

プライマーC. di-1、およびC. di-2を使用したPCRによるジフテリア毒素遺伝子検出の特異性について

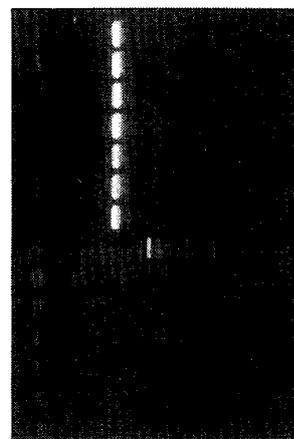
て検討した結果を図1に示す。供試したジフテリア菌の標準株2株、臨床分離株5株のいずれからもジフテリア毒素遺伝子に由来する246bpのDNA断片が増幅された。これに対して、同時に検討したE. coli EDL-931株や、咽頭から分離される可能性の高いS. aureus, S. pyogenesのいずれからも246bp DNA断片は増幅されなかった。なお、データは示さなかったが、本法によるジフテリア菌検出感度は、反応チューブ当たり約 $1.8 \times 10^5$  CFUであった。また、一旦PCRを実施した反応チューブ内の反応液の一部を検体として新たな反応チューブに加え、再びPCRを実施した場合、ジフテリア菌の検出感度は著しく上昇し、反応チューブ当たり約 $1.1 \times 10^5$  CFUの菌数でDNAの増幅断片が認められた。

Pallenは、ジフテリア菌の毒素産生株と毒素非産生株の識別に関して、PCR法とElek法の成績を比較し、両法による成績が一致すること<sup>3)</sup>を報告している。我々が今回供試した臨床分離ジフテリア菌5株は、いずれもウサギを使用した中和反応によりジフテリア毒素の産生性が確認されており、PCRによっても毒素遺伝子陽性と判定された。従って、今回の我々の成績もPallenの成績と同様にPCRの有用性を示すものと考えられた。一方、PallenはPCRの特異性と感度については報告していない。我々が今回検討した範囲においては、本PCRによるジフテリア毒素遺伝子の検出は毒素産生性ジフテリア菌に特異的であった。また、ジフテリア菌の検出感度は、PCRを2段階実施した場合、反応チューブ当たり $1.1 \times 10^5$  CFUであることが確認され、この結果は、検出感度のみを考慮した場合には、PCRによる咽頭スワブからの毒素遺伝子保有ジフテリア菌の直接検出の可能性を示唆するものと考えられた。しかし、検体採取の過程で咽頭スワブに何らかの妨害物質が混入する可能性も否定できず、結果が陰性であった場合、その結果が妨害物質の影響により生じた偽陰性である可能性を否定することは極めて困難であると推測された。従って、本法は、現時点では、分離株についてジフテリア毒素遺伝子の有無を知る場合のみ適用するのが適切であると考えられた。

現在、ジフテリアの発生が稀となったためか、荒川培地などのジフテリア菌分離用の乾燥培地については国産品の製造が中止されている。加えて、ジフテリア菌が疑われるコロニーのスクリーニングに極めて有用な、DS確認培地は国内、国外共に製品がなく、自作する以外に入手することができない。受注生産システムなどによってもこれらの培地の製造を継続することは、地方衛生研究所や医療機関におけるジフテリア検査態勢の整備、充実を図る上で絶対に必要であると考えられる。

#### IV 文 献

- 1) 齊藤志保子 他：6年ぶりに発生したジフテリアと反省点、病原微生物検出情報、1993；14：146-147.
- 2) 厚生省（監修）：微生物検査必携—細菌検査第3版、日本公衆衛生協会、1987.
- 3) Pallen, M. J. : Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction., J. Clin. Pathol., 1991；44：1025-1026.
- 4) 八柳 潤 他：平成3年に秋田県で分離された腸管出血大腸菌について、秋田県衛生科学研究所報、1992；36：43-47.



C. diphtheriae IID526  
 C. diphtheriae IID527  
 C. diphtheriae KS  
 C. diphtheriae RF  
 C. diphtheriae KA  
 C. diphtheriae DS  
 C. diphtheriae IS  
 E. coli EDL-931  
 S. aureus  
 S. pyogenes 936 (A群T-1)  
 S. pyogenes 937 (A群T-12)  
 S. pyogenes 938 (A群T-12)  
 S. pyogenes 939 (A群T-12)  
 S. pyogenes 9310 (A群T-12)

↑  
246 bp

図1 PCRによるジフテリア毒素遺伝子の検出