

資

料

Polymerase Chain Reaction (PCR) による 百日咳菌および髄膜炎菌の同定

八柳 潤 齊藤志保子 木内 雄 佐藤 宏康 森田 盛大

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) および髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の同定を目的とした PCR 法について検討した。百日咳毒素 (Pertussis toxin: PT) オペロンの promoter region のうち, 186bp を特異的に増幅するプライマーとして, Houard の報告したプライマーを1部改変した PTJY-1, および PTJY-2 により *B. pertussis* が特異的に検出された。

N. meningitidis の Class 1 omp をコードする porA をターゲットとする, Kertesz たちが報告したプライマーに加えて porA, omp, H8omp, Class I pillin をターゲット遺伝子とするプライマー7組を設計し, 合計8組のプライマーの有用性について検討したところ, omp と porA をターゲットとしたプライマーが *N. meningitidis* の同定に有用であった。一方, H8omp の塩基配列は菌株により異なることが示唆され, このことは, H8omp 遺伝子が *N. meningitidis* の検出と同時に型別を実施することが可能である PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) のターゲット遺伝子として適用できる可能性を示すと考えられた。

キーワード: 百日咳菌, 百日咳毒素オペロン promoter region, 髄膜炎菌, omp, porA, PCR

I はじめに

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) により惹起される, 特有な痙攣性咳嗽を主徴とする急性呼吸器感染症である。1980年に5,033人であった全国の百日咳患者届出数は改良ワクチンが導入された1981年以降激減し, 1994年, 1995年にはそれぞれ145人, および226人となった。一方, 流行性脳脊髄膜炎は髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) により惹起される法定伝染病である。全国の流行性脳脊髄膜炎患者届出数は1945年には4,384人であったが1995年には3人に激減した。このように, 近年, 発生が殆ど見られなくなった感染症の診断技術を持続することは, 培地などの資材, 材料の確保を含めて困難を伴うことが多い。実際, 我々は秋田県内で6年振りに発生したジフテリア患者¹⁾, および21年振りに発生したボツリヌス食中毒²⁾ の検査においてこの問題に直面した。

我々は, 発生が稀となった感染症の原因細菌の同定技術の確保と迅速診断の目的でPCR法などの遺伝子診断を積極的に導入し, 昨年はジフテリア毒素の構造遺伝子をターゲットにしたジフテリア菌同定用PCRの導入を試みた³⁾。今回は *B. pertussis*, および *N. meningitidis* 同定用PCRについて検討したのでその成績を報告する。

B. pertussis の標準株として日本細菌学会より分与を受けた IID 510株を使用した。PCRの特異性の検討には臨床分離 *Streptococcus pyogenes* 5株 (93002: A群 T-1, 93004: A群 T-12, 93005: A群 T-12, 93009: A群 T-12, 93010: A群 T-12), 臨床分離 *Escherichia coli* 1株を使用した。

2) PCR

百日咳毒素 (Pertussis toxin: PT) オペロンの promoter region のうち, 186bp を特異的に増幅するプライマーとして, Houard⁴⁾ の報告したプライマーを1部

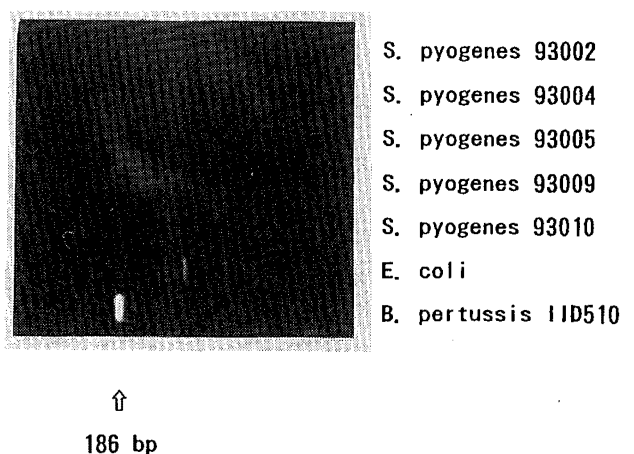


図1 PCRによるPTオペロン

promoter region の検出

II 材料と方法

1. *B. pertussis* の同定

1) 菌株

改変した PTJY-1 : 5'-aac-gcg-cat-gcg-tgc-aga-tt-3', および PTJY-2 : 5'-tct-gcg-ttt-tga-tgg-tgc-ct-3' を使用した. 反応液の組成は既報⁵⁾ のとおりとし, ヒートサイクルは94℃30秒, 55℃30秒, 72℃30秒25回とした. 増幅断片の検出には3%アガロースゲルを使用した. なお, テンプレートには被検菌の生理食塩液懸濁液を100℃10分間加熱した後, 氷冷したものを使用した.

2. *N. meningitidis* の同定

1) 菌株

N. meningitidis の標準株として日本細菌学会より分与を受けた IID 854株 (Group A) 及び IID 855株 (Group C) を使用した. PCRの特異性の検討には細菌性髄膜炎からの分離頻度が高い菌種である *Staphylococcus epidermidis* 2株 (臨床分離8011株, 8014株: 秋田組合総合病院より分与), *Streptococcus pneumoniae* 2株 (臨床分離7018株, 8059株: 秋田組合総合病院より分与), MRSA 1株, *E. coli* 2株 (臨床分離12278株, および EHEC EDL-931株) を使用した.

2) PCR

①プライマー

N. meningitidis 同定用プライマーには, 表1に示す4種類の遺伝子をターゲットとした8組を試用した.

②反応液の組成, ヒートサイクル, テンプレートの調製は前記 *B. pertussis* の場合と同様としたが, 増幅断片の検出には2%アガロースゲルを使用した.

III 結果および考察

1. 百日咳菌

プライマー PTJY-1, および PTJY-2 を使用した PCRによる PT オペロンの promoter region 検出の特異性について検討した結果を図1に示した. 供試した

B. pertussis IID 510株からは予測される 186bp の DNA断片が増幅されたのに対して, 同時に供試した *S. pyogenes* 5株と *E. coli* 1株のいずれからとも 186bp の DNA断片は増幅されなかった. PTは百日咳菌のビルレンスファクターであり, その産生は5つの遺伝子領域からなるオペロンにより支配されている⁴⁾. *B. pertussis* と同属の *B. bronchiseptica* と *B. paraptussis* もPTオペロンを保有するが, PTは産生しない. このことは, これら2菌種のオペロンの promoter 領域に変異があることに起因することが知られている⁴⁾. Houard たちはPTオペロンをターゲットとしたプライマーがPCRによる *B. pertussis* の特異的同定に有用であることを報告している⁴⁾. 我々も今回, Houard たちが報告したプライマーを一部改変したプライマーが *B. pertussis* に特異的であることを確認した. なお, 今回導入したPCRは, 平成8年に秋田県大館市で発生した百日咳患者から分離された *B. pertussis* の同定に応用した.

2. 髄膜炎菌

N. meningitidis IID 854株 (Group A), および IID 855株 (Group C) をテンプレートとして, 8組のプライマーを試用した結果を図2に示した. それらのうち, omp をターゲットにした NM-1/NM-2, NM-3/NM-4 と porA をターゲットにした NMPorA/NMPorS, PorNMA/PorNMS では Group A の IID 854株, Group C の IID 855株のどちらからとも予測されるサイズのDNA断片が増幅された. これに対して, H8omp をターゲットとしたプライマーのうち NM7/NM8 では IID 854株と IID 855株から予測されるDNA断片が増幅されたものの, NM9/NM10では IID 855株からDNA増幅断片が得られなかった. この

表1 *N. meningitidis* 同定に試用したプライマー

ターゲット 遺伝子	Gene Bank Accession No.	プライマー名称	塩基配列 (5'-3')	増幅サイズ
omp	M80593	NM1 NM2	cag-tct-gaa-gct-caa-att-cc ata-cgc-aca-cta-ttg-cct-gc	446 bp
		NM3 NM4	tat-aca-tcg-ctt-tct-gaa-gc caa-acg-aca-aga-att-tct-gc	295 bp
H8omp	Y00530	NM7 NM8	ggt-ttg-tta-atg-gcg-gtt-gc ttc-agc-age-agg-agt-tgc	172 bp
		NM9 NM10	ggt-cac-aac-ctt-gtg-att-gc ttc-ata-aaa-gca-ccg-tga-cc	227 bp
Class 1 Pollin	L22636	NMPILS NMPILA	gat-tgt-gat-tgc-cat-cgt-cg gaa-ccg-ttt-tga-cgc-ttg-gc	324 bp
		NMPIL2S NMPIL2A	gag-ctg-atg-att-gtg-att-gc cgg-ctg-att-ttt-gac-ctt-cg	127 bp
porA	X57180 X52995	NMPorS NMPorA	aag-ggc-tga-agg-ctg-ttt-gg aaa-ccg-gca-tat-cgt-cgt-gg	237 bp
		PorNMA ⁸⁾ PorNMS ⁶⁾	tga-ttt-cgg-ctc-gtt-tat tgg-aaa-aat-cat-aat-caa	860 bp

ことは、H8omp の塩基配列が菌株により異なることを示唆していた。一方、Class I pillin をターゲットとした2組のプライマーによっては予測されるDNA増幅断片が全く得られなかった。以上の結果に基づき、omp をターゲットにした NM-1 / NM-2, porA をターゲットにした PorNMA / PorNMS の2組のプライマーについて更に特異性の検討を実施した。図3にその結果を示した。いずれのプライマーによっても、供試した *S. epidermidis* 2株, *S. pneumoniae* 2株, MRSA 1株, *E. coli* 2株のいずれからでもDNA増幅断片が得られなかった。

PCRにより細菌を同定する場合、毒素の構造遺伝子などその細菌に特有の病原因子をコードする遺伝子をターゲットとすることが望ましいが、*N. meningitidis* に特有な病原因子の詳細は不明である。Kertesz⁶⁾ たちは Class 1 outer membrane protein をコードする porA 遺伝子をターゲット遺伝子に選定し、PCR-RFLP による *N. meningitidis* の型別法を確立した。我々は Kertesz たちのプライマーに加えて porA, omp, H8omp, Class I pillin をターゲット遺伝子とするプライマー7組、合計8組のプライマーの有用性について検討したところ、ターゲット遺伝子として適切であったのは omp と porA であった。一方、H8omp の塩基配列は菌株により異なることが示唆された。今後、多数の株

について H8omp 遺伝子の塩基配列を解読、比較することによって、PCR-RFLP法のターゲットとして適切な領域が見いだされる可能性があるものと考えられた。

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，14，146-147（1993）
- 2) 八柳 潤 他：県内初のA型ボツリヌス食中毒の概要と当所の検査対応－秋田県，病原微生物検出情報，14，171-172（1993）
- 3) 八柳 潤 Polymerase Chain Reaction によるジフテリア毒素遺伝子の検出，秋田県衛生科学研究所報，39，29-30（1995）
- 4) Houard, S. et. al., Specific Identification of *Bordetella pertussis* by the Polymrase Chain Reaction., Res. Microbiol., 140, 477-487（1989）
- 5) 八柳 潤 他：平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について，秋田県衛生科学研究所報，36，43-47（1992）
- 6) Kertesz, D. A. et. al., Characterization of *Neisseria meningitidis* by Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Digestion of the porA gene., J. Clin. Microbiol., 31, 2594-2598（1993）

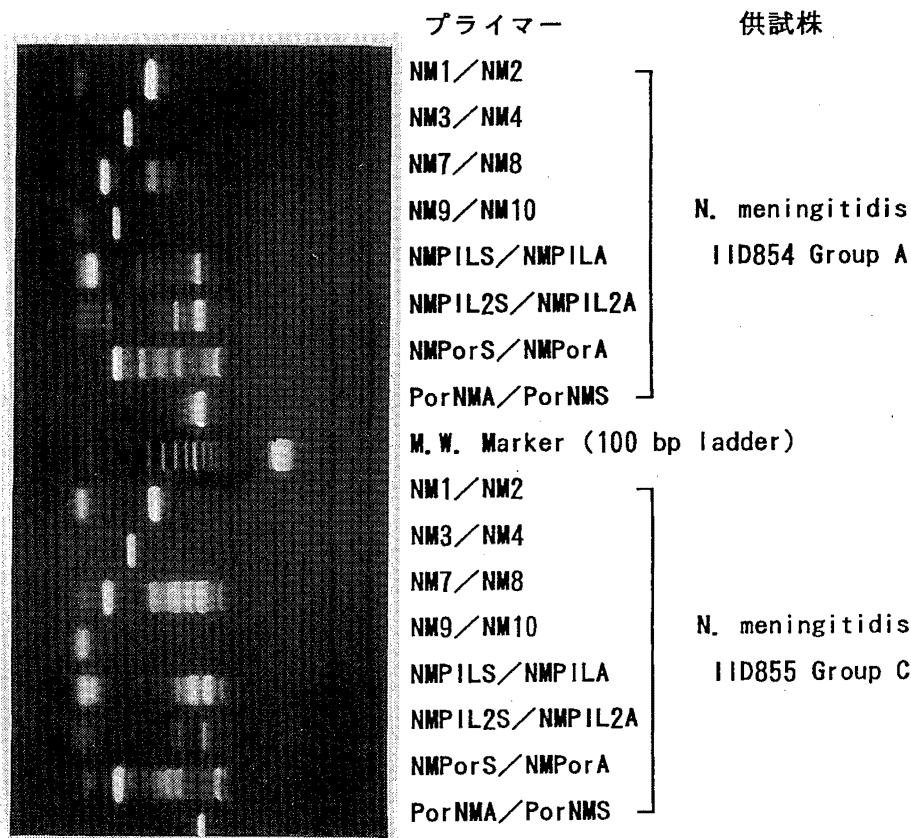
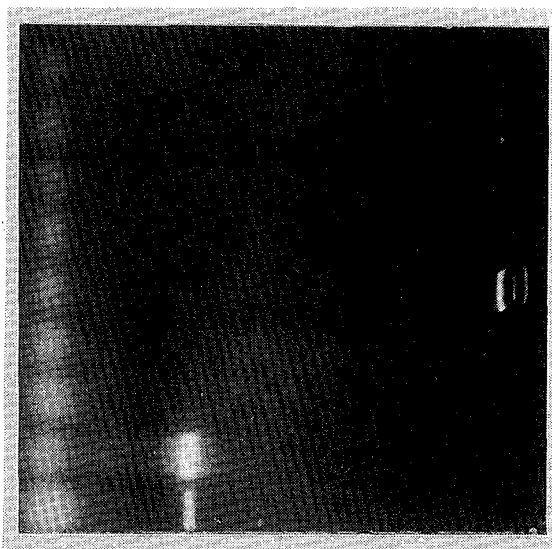


図2 omp, H8omp, Class 1 pillin, PorA 遺伝子をターゲットとしたプライマーを使用したPCR結果

プライマー NM1/NM2



↑
446 bp

S. epidermidis 8011
S. epidermidis 8014
S. pneumoniae 7017
S. pneumoniae 8059
 MRSA
E. coli 12278
E. coli EDL-931
N. meningitidis IID 854
N. meningitidis IID 855

プライマー PorNMS/PorNMA



↑
860 bp

S. epidermidis 8011
S. epidermidis 8014
S. pneumoniae 7017
S. pneumoniae 8059
 MRSA
E. coli 12278
E. coli EDL-931
N. meningitidis IID 854
N. meningitidis IID 855

図3 プライマー NM1/NM2, PorNMS/PorNMA を使用したPCRの特異性