

Real Time PCR を用いた夾雑試料からの Bacillus cereus 迅速検出法の検討

古田 喜美 橋渡 佳子 佐々木敏之 毛利 好江
石村 勝之 萱島 隆之 河本 秀一 平崎 和孝

バイオテロへの対応としての Light Cycler™(Roche)を用いた Real Time PCR の適用性と迅速性を、B.cereus 芽胞をモデル菌として検証した。塩化マグネシウム濃度は 4mM と設定し SYBR Green I 法と Taq Man プローブ法の 2 種類の反応系の検討を行った。SYBR Green I 法および Taq Man プローブ法でのプライマーは B.cereus の下痢型毒素(hbl 遺伝子)から設計した 2 種類のものを用いた。両プライマーによる SYBR Green I 法による Tm 値 81.8 および 78.4 の増幅産物を得られた。また Taq Man プローブ法においては、9 種類の夾雑物質を用いて増幅反応への影響と増菌培養の効果を検討した。各夾雑物質により明らかな DNA 量の差が認められた。しかし、このような DNA 増幅を阻害する物質を用いても、短時間の増菌培養を行うことで安定した DNA の検出が可能となった。

また、総合的な検査所要時間は、従来の機器を使用した場合と比較して 2 時間あまり短縮され、バイオテロ時においてもより速く検査結果を確認することができると考えられた。

キーワード： バイオテロ，Real Time PCR，Light Cycler，夾雑物質，検査所要時間

はじめに

2001 年に発生した炭疽菌郵便物混入テロ事件での『白い粉』は世界中を不安にさせた。本市においても『白い粉』に関する苦情・問い合わせが寄せられ、当衛生研究所では、2001 年 10 月から 2002 年 1 月にかけて 12 件の『白い粉』の検査を実施した¹⁾。従来の PCR 機器を使用した場合、炭疽菌の検査方法は、判定まで約 5 時間を要し、より迅速な手法が必要と思われた。

Light Cycler™(Roche) は、2002 年度に当衛生研究所へ導入されたが、その特性は、短時間での PCR 反応が可能であり、さらに汚染菌量も測定可能となる。

そこで今回の研究では、バイオテロへの対応としての Light Cycler の適応性と迅速性を検証することを目的とした。しかし、炭疽菌を通常の実験室で使用することはできないため、モデル菌として炭疽菌に近縁の土壌常在細菌である Bacillus cereus 芽胞を使用した。検討内容は、SYBR Green I 法での反応系の設定と増幅および Tm 値の確認、

Taq Man プローブ法での反応系の作成および増幅確認、定量用の標準 DNA 液の調製、検量線

の作成、で得られた条件での増幅反応における夾雑物質の影響と増菌培養法の効果の検討、実際の検査での所要時間の測定、である。

方 法

1 使用機器

Real Time PCR には Light Cycler を、塩基配列解析には ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer)を用いた。

2 材料

(1) 供試芽胞

表 1 プライマー及びプローブ

a	SYBR Green I PCR用プライマー HBLA-5:TAGCAGAATTACGTGAGACC(20bp) HBLA-3:TTATTCCTTCTTTTAATGTA(20bp) 増幅産物の大きさ：300 bp
b	Taq Man PCR用プライマー HBLA-F:CTTGATGATGCTATT AACGCTCTTACTT(28bp) HBLA-R:CCCTAGAACGCCCGAATATTG(21bp) 増幅産物の大きさ：81 bp
c	TaqManプローブ HALA-TP:ATGTCCACGCAGTGCATG ATTTAGATTC(29bp)

表2 SBGR Green I 法での反応液の調整

試薬	容量 (μl)/チューブ	最終濃度
Light Cycler FastStart SYBR Green I KIT	2	
MgCl ₂ stock solution (25mM)	2.4	4mM
Primer (HBLA-5 , HBLA-3 , 50 μ M each)	0.2+0.2	0.5 μ M each
H ₂ O	13.2	
Total volume	18	

名古屋市衛生研究所から供与された B.cereus (ATCC14579) 芽胞を用いた。

(2) プライマーおよびプローブ

表1のとおり、大阪市立環境科学研究所から供与された B.cereus ATCC14579 の下痢型毒素(hbl 遺伝子)²⁾ から設計したプライマーとプローブを用いた。

(3) 夾雑物質

濾材のセライト(和光純薬),海砂20~35メシユ(和光純薬),活性白土(和光純薬)およびシリカゲル(kieselgel J60,70~230メシユ(Merk),粉末食品のかたくり粉,コーンスターチ,てんぷら粉,白玉粉およびスキムミルクを用いた。

3 芽胞染色および菌数測定

供与された B.cereus 芽胞粉末に蒸留水 1ml を加え、けん濁液としたものを芽胞原液とした。

芽胞数は、芽胞液 100 μl を蒸留水 900 μl で 10 倍階段希釈し、その 100 μl を NGKG 寒天培地に接種して、35 °C 24 時間培養後に菌数測定し、算出した。

芽胞の確認は、グラム染色および Wirtz 法³⁾を用いた。

表3 SYBR Green I 法での反応条件

	サイクル数	温度 (°C)	時間 (秒)	昇温率 (°C/秒)	蛍光測定モード	
変性	1	95	600	20	None	
増幅	変性	95	15	20	None	
	アニリング	45	55	5	20	None
	伸張	72	12	4	Single	
		95	0	20	None	
融解曲線	1	60	15	20	None	
		95	0	0.3	Step	
冷却	1	40	30	20	None	

表4 TaqMan プローブ法での反応液の調製

試薬	容量 (μl)/チューブ	最終濃度
Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probe	2	
MgCl ₂ stock solution (25mM)	2.4	4mM
Primer (HBLA-F , HBLA-R , 50 μ M each)	0.2+0.2	0.5 μ M each
TaqMan probe(HBLA-TP10 μ M)	0.5	0.25 M
H ₂ O	12.7	
Total volume	18	

4 PCR 用 DNA テンプレートの調製

芽胞原液の 10 倍希釈芽胞液 10 μl に 20% 夾雑物液 50 μl を加えて混合し、12,000rpm、5 分間遠心分離後、沈渣を蒸留水で 100 μl としたものを夾雑物混合芽胞液とした(芽胞数 220CFU/μl)。

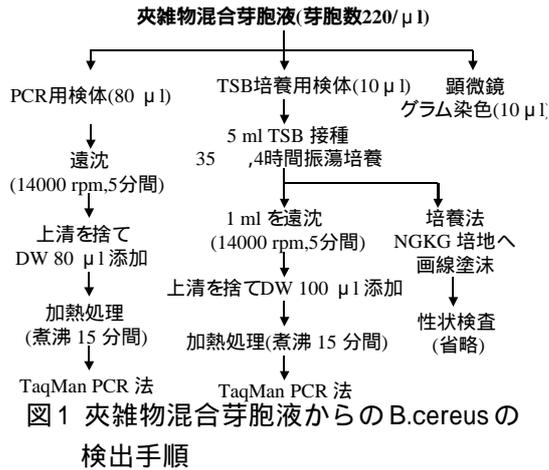
DNA テンプレート作製法は、煮沸抽出法によった。10 倍階段希釈された各希釈段階の芽胞液または夾雑物質混合芽胞液 100 μl を 15 分間煮沸後、12,000rpm、5 分間遠心分離した上清を直接抽出 DNA テンプレートとした。また、TSB 培地 5ml に夾雑物混合芽胞液 10 μl を接種して 35 °C、4 時間振盪培養後、培養液 1ml を遠心分離した沈渣を、同様に蒸留水 100 μl 加えて 15 分間煮沸した後、12,000rpm、5 分間遠心分離した上清を増菌培養抽出 DNA テンプレートとした。

5 SYBR Green I 法による PCR

反応液調製は、至適塩化マグネシウム濃度を 4mM と設定した後、Light Cycler Fast SYBR Green I KIT(Roche)を用い、テンプレートを 2 μl とし、表2のとおりに調製した。増幅の確認は、芽胞希釈液から目的遺伝子領域を表3の反応条件により増幅し、融解曲線分析により Tm 値を測定するこ

表5 TaqMan プローブ法での Real Time PCR の増幅条件

	サイクル数	温度 (°C)	時間 (秒)	昇温率 (°C/秒)	蛍光測定モード	
変性	1	95	600	20	None	
増幅	変性	95	15	20	None	
	アニリング	45	60	5	20	Single
冷却	1	40	30	20	None	



とにより行った。さらに、増幅産物をエチジウムプロマイド加 0.5% TBE を泳動バッファーとして 2% アガロースゲルで泳動後、紫外線照射下で分子サイズを確認した。

6 TaqMan プローブ法を用いた PCR

(1) PCR の増幅条件

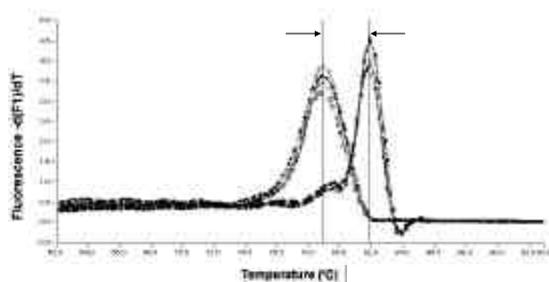
SYBR Green I 法と同様に、至適塩化マグネシウム濃度を 4mM に設定した。その後、Light Cycler Fast Start DNA Master Hybridization Kit(Roche) を使用して、添付マニュアルに従いテンプレートを 2 μl として、反応液を表 4 のとおりに調製した。

増幅はアニーリング温度を 57℃ とし、より迅速性の優れた伸張反応の無い 2 ステップ増幅法を用いた。反応条件は表 5 に示した。

(2) 増幅産物定量のための標準 DNA 液の作成

10 倍希釈した芽胞原液と定性用プライマーを用いて SYBR Green I 法で増幅した DNA バンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen) で抽出したものを標準 DNA 液とした。

260nm での吸光度 1 を DNA 50 μg/ml 相当とし、次の計算式⁴⁾により得られた値を増幅 DNA の分子量(MW)としてコピー数を推定した。



Taq Man PCR用プライマーでのTm値 78.4
SYBR Green I用プライマーでのTm値 81.8

図2 融解曲線解析結果



図3 アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認

計算式： $MW=(nA \times 313.2)+(nC \times 289.2)+(nG \times 329.2)+(nT \times 290.2)-61.9$ (A: アデニン, C: シトシン, G: グアニン, T: チミン, n: 塩基数)

標準 DNA 液の階段希釈液は、1 チューブ(1ml) あたり $10^1 \sim 10^7$ コピーとなるように調製した。

(3) 夾雑物質からの B.cereus の検出と検査所要時間の測定

従来の検査法における所要時間と、本法を使用したときの検査所要時間との比較を行うために、Real Time PCR を実際の検査手順に導入した場合の検査所要時間を測定した。

所要時間の比較には、濾材混合芽胞液 4 検体、粉末食品混合芽胞液 5 検体、陰性コントロール 1 検体、標準 DNA 希釈液 3 段階分の合計 13 検体を用いた。Real Time PCR の反応条件は、非特異反応を減少させるためにアニーリング温度を 60℃ とした。

B.cereus 検出手順は、図 1 に示すように、顕微鏡検査、Taq Man PCR 法および培養法の組み合わせで行い、それぞれの所要時間を測定した。

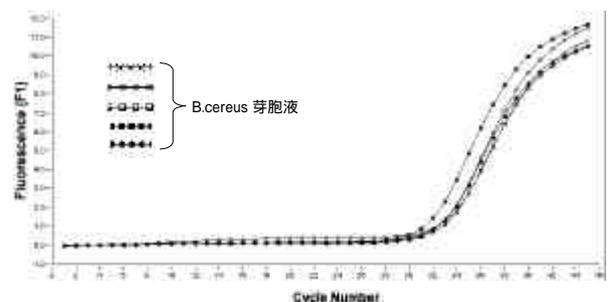


図4 TaqMan プローブ法の DNA 増幅

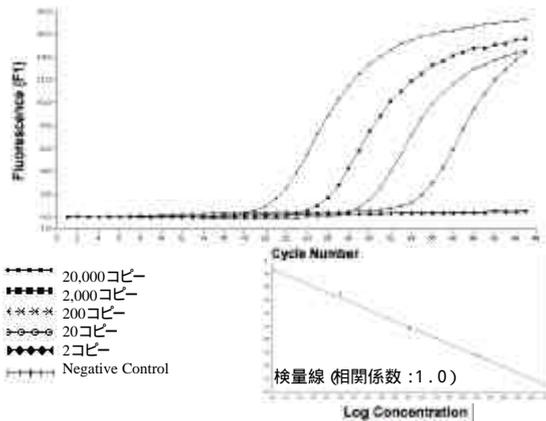


図5 標準 DNA 液による検量線

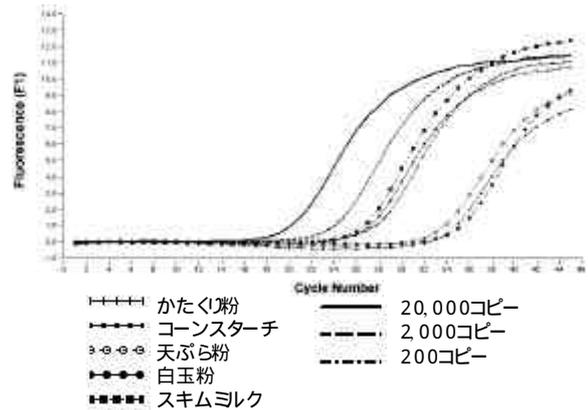


図7 粉末食品での阻害効果

7 PCR 産物の塩基配列解析

電気泳動で確認できた SYBR Green I PCR 産物および Taq Man PCR 産物をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)で DNA を抽出した。その後、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応にかけ、Auto Seq™ G-50 (Amersham Biosciences) で DNA 精製を行った。

精製された各 DNA は、PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) により塩基配列の解析を行った²⁾。

結 果

1 顕微鏡検査と B.cereus の確認および菌数の測定

芽胞原液のグラム染色および Wirzt 法による芽胞染色は、いずれも芽胞の確認は可能であったが、Wirzt 法が鮮明な緑色を呈した。NGKG 寒天培地では、レシチナーゼ陽性の扁平な集落を確認した。

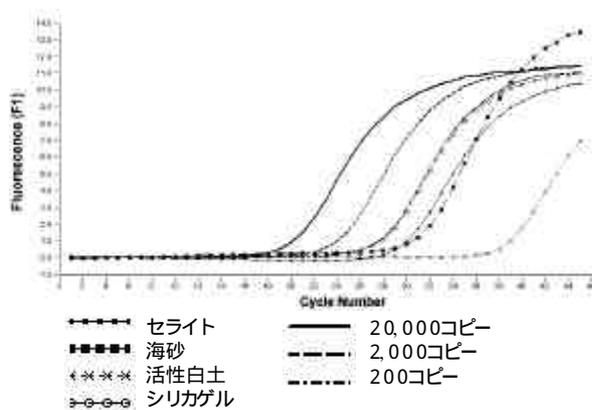


図6 濾材試料での阻害効果

その菌数は、 4.3×10^6 /ml であった。

2 SYBR Green I による PCR

(1) 定性 PCR での条件設定

SYBR Green I, Taq Man PCR 用のプライマーを用いて、各々での至適マグネシウム濃度と Tm 値を測定した結果、2mM では 2 峰性の Tm 値を示したが、3mM, 4mM, 5mM では 1 峰性のピークを示したことから、シャープなピークを示した 4mM を各 PCR 反応での塩化マグネシウム濃度に設定した。図 2 に塩化マグネシウム濃度 4mM での融解曲線解析結果を示した。Tm 値は、SYBR Green I 用プライマーでは 81.8 で、Taq Man PCR 用プライマーでは 78.4 であった。

(2) 増幅産物の確認

設定した条件で増幅した PCR 産物の電気泳動は、SYBR Green I 用プライマーの増幅産物では 300bp, Taq Man プロブ法用プライマーでは 81bp となり、設計どおりの泳動バンドを確認できた(図 3)。

3 Taq Man プロブ法による PCR

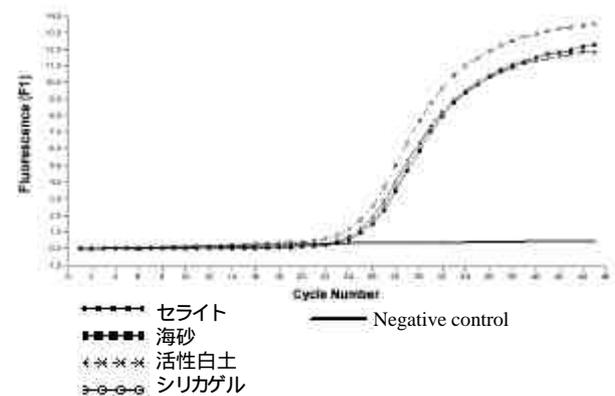


図8 濾材試料の増菌培養後の PCR 結果

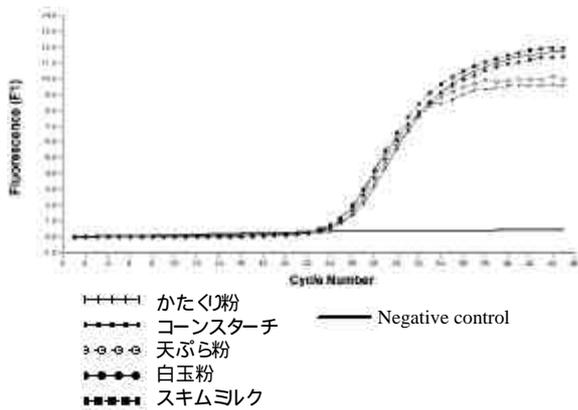


図9 粉末食品の増菌培養後のPCR結果

(1) 条件設定

塩化マグネシウム濃度 4mM の増幅曲線を図4に示した。この条件で安定した増幅曲線が描かれた。

(2) 標準DNA液の作成

推定DNAコピー数が1キャピラリーあたり2~20,000コピーとなる標準DNA各希釈液を増幅した結果、図5に示すように相関係数1.0の検量線が作成され、定量性が確認された。

(3) 夾雑物からの B.cereus の検出と所要時間の測定

標準DNA液、濾材混合芽胞液4検体および粉末食品混合芽胞液5検体をテンプレートとしてアニーリング温度60℃、2ステップ増幅法でのPCRを実施した。図6,7に示すように、すべての検体で増幅が認められたが、そのキャピラリー中の推定DNAコピー数に差がみられた。粉末濾材混合芽胞液では、添加量に比べ、シリカゲルが1/4量、セライトが1/10量、海砂が1/20量、活性白土が1/2,500量に減少した。粉末食品混合芽胞液では、スキムミルクと片栗粉が1/2量、コーンスターチ

```

1 gtggattata aagtaacctt aaatcggtga
31 gttggagttg cttacagtaa tattaatgaa
61 atgcacaagg cgcttgatga tgctattaac
91 gctcttactt *atattgccac gcagtgqcat
121 gatttagatt ctcaatattc gggcgttcta
151 gggcatattg agaatgcagc tcaaaaagcc
181 gatcaaaata aatttaaatt cttaaagcct
211 aatttaaagc cagcgaaaga cagttggaaa
241 acattacgaa cagatgctgt
  
```

* 部は、Taq Man プローブ法での増幅産物の解析部位(全30bp)

図11 PCR産物のシーケンス解析結果

と天ぷら粉が1/100量、白玉粉が1/250量に減少し。

一方、DNAを添加した夾雑物質を4時間増菌培養を行い、PCRを実施した結果は、図8,9に示すように、夾雑物質に関わらず同等のDNA増幅を認めた。

検査所要時間を図10に示した。直接のPCR法では3時間以内に判定可能であり、4時間の増菌培養を行った場合でも、総検査時間7時間以内に判定可能であった。

4 PCR産物の塩基配列解析結果

SYBR Green I PCRおよびTaq Man PCRのPCR産物の塩基配列解析結果を図11に示した。

SYBR Green I PCR用プライマーでの増幅DNAの塩基配列は(260bp)、B.cereusのhbl遺伝子の目的増幅領域の配列²⁾と98.3%の相同性を示し、4塩基異なっているだけだった。一方、Taq Man PCR用プライマーでの増幅DNA(30bp)は、100%の相同性を示した。

考 察

Light Cycler™を使用した時、PCR反応時間の短縮が可能な最大の理由は、PCR反応時に使用するキャピラリーが、熱伝導率の高いガラスキャピラリーである点と、チャンパー内の温度の上昇または下降の調節に空気が使用されている点にある。このことで、より短時間で反応温度の上昇または下降させることができる。更に、通常のPCR機器では、PCR反応後に、電気泳動によりDNAバンドの確認を必要とするが、Light Cycler™では、目的とするDNAの増幅が、蛍光強度測定によってPCR反応中にリアルタイムに確認することができる。

そこで今回の研究では、バイオテロが発生した

		0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	7 hr	8 hr	9 hr
作業行程	グラム染色										
	染色顕微鏡										
	PCR法										
	培養法										
直接法	今回採来法	テンプレート作成 5分	反応液調整 5分	PCR 160分	電気泳動 40分						
増菌培養法	今回採来法	増菌培養 35分	振盪培養 240分	PCR 160分	電気泳動 40分						
培養法						NGKG接種			通常培養		

図10 各検査手順での所要時間の比較

場合、検査時間をいかに短縮することができるかどうかを Light Cycler™ でモデル的に検討した。本器では SYBR Green I 法および Taq Man PCR 法の異なる二種類の PCR が可能である。SYBR Green I 法の特徴は、目的遺伝子領域用のプライマーさえあれば、容易に PCR 反応が可能であり汎用性があることである。一方、Taq Man プローブ法は、SYBR Green I 法とは異なり、Taq Man プローブを必要とするが、高い特異性を持つ。SYBR Green I 法と Taq Man PCR 法の違いは、SYBR Green I 法では、伸長反応において、DNA の 2 本鎖が形成されていくときに、塩基と塩基の間に蛍光色素の SYBR Green I が入り込んでいくことで、蛍光強度が増加する。そのため、95 から一定の間隔で温度を徐々に下げていけば、DNA の 1 本鎖が 2 本鎖になっていく間に、 T_m 値を測定することができる。それに対して、Taq Man プローブ法では、1 対の 2 本鎖 DNA がハイブリダイズすることにより蛍光が発せられ、そのコピー数が増えれば増えるほど、蛍光強度を増すものである。今回の感度試験では、両方とも 1 キュピラリーあたりの DNA コピー数が 20 コピーでも再現性よく検出可能であった。しかし、2 コピーでは、検出が不安定であった。これは、テンプレート量が 2 μ l と微量であることと 10 倍階段希釈時にバラツキが生じたためと考えられる。しかし、精製 DNA を用いた結果であり、実際の生菌からの検出とは異なることから、生菌数における感度との関連性については、今後の課題としたい。

SYBR Green I 法と Taq Man 法では、いずれも目的遺伝子の増幅が可能で、実際のバイオテロ事例に適用できると考えられた。しかし、SYBR Green I 法を検討した 2 つのプライマー反応系において、今回使用した *B.cereus* の場合、塩化マグネシウム至適濃度は、4mM であったが、至適化されていない場合、融解曲線が 2 峰性を示すことがあるので、事前の塩化マグネシウム濃度の設定の検討が必要であると考えられた。

一方、今回は『白い粉』バイオテロを想定し、夾雑物質の阻害効果を検討するため、粉末濾剤として、セライト、海砂、活性白土、シリカゲルを、粉末食品として、カタクリ粉、コーンスターチ、天ぷら粉、白玉粉、スキムミルクを用いた。粉末濾剤は細孔構造で、他の物質を吸着する作用を持つ性質に着目し、粉末食品は、身近で入手することができ、また、DNA 増幅の阻害作用が予測されるものとして検討した。その結果、各夾雑物質により明らかな増幅 DNA 量に差が認められた。特に、活性白土、白玉粉、コーンスターチおよび天ぷら粉は、著しく DNA 量が少なかった。このような物質は、PCR において直接 DNA 増幅を阻害すると考えられた。しかし、それらの問題も短時間の増菌培養を行うことで、安定した DNA の増幅が可能であったことから、実際的には、この増菌培養を行った後 Real Time PCR を行う方法が最善であると考えられた。

総合的な検査時間の検討に関しては、従来の機器を使用した場合と、Light Cycler™ による SYBR Green I 法または Taq Man 法の Real Time PCR を使用した場合では、2 時間あまりの差が認められ、バイオテロ時においてもより速く検査結果を確認することができると考えられた。

なお、本研究は厚生労働科学研究「バイオテロへの対応」の協力研究として行った。

文 献

- 1) 生物科学部：米国多発テロ後の広島市における炭疽菌検査、広島市衛研年報、21、87～88(2002)
- 2) Beecher DJ et al：Infect Immun、63、4423～4428(1995)
- 3) 東京大学医科学研究所学友会編：微生物学実習提要、75、丸善株式会社(1988)
- 4) 須摩春樹：細胞工学別冊目で見える実験ノート シリーズバイオ実験イラストレイテッド 本当にふえる PCR、26～30、秀潤社(1996)