

資 料

非酵素法で行うパルスフィールド・ゲル電気泳動の適用菌種の検討

野田万希子, 古田紀子, 門倉由紀子, 白木 豊, 小林香夫

要 旨

タンパク分解酵素の代わりに高濃度の尿素と界面活性剤を用いて DNA を抽出する非酵素法でのパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 解析について, その適用菌種の検討を行った。その結果, 非酵素法は, 今までに検討されていなかったカンピロバクター属菌やレジオネラ属菌に加え, 当所で検査する機会の多い O157 以外の腸管出血性大腸菌や *S. Enteritidis* 以外のサルモネラでも適用可能であった。*S. Saintpaul* では, 酵素法と同様に, バンドがスメア状になるが, 泳動バッファーにチオ尿素を添加することでスメア化を防ぐことができた。非酵素法がより多菌種・多血清型で適用可能であったことよって, PFGE 解析をより簡便・経済的・安全に行うことができることが示唆された。

キーワード: PFGE, カンピロバクター属菌, レジオネラ属菌, 腸管出血性大腸菌, サルモネラ

1 はじめに

パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 解析はその識別能力の高さから, 多くの菌種において分子疫学解析の標準法となっている。PFGE プロトコールでは, 可能な限り物理的な断片化を防いで細菌の細胞内に存在していた時の状態に近い状態で巨大分子の染色体を回収することが必要なため, アガロースブロックに菌体を包埋した状態で後の処理を行う。通常, このアガロースに包埋した状態の菌体から染色体 DNA を抽出する方法として, 溶菌酵素 (リゾチーム) やタンパク分解酵素である proteinase K などの酵素類が用いられる (以下, 「酵素法」と略す)。国立感染症研究所が提示している酵素法プロトコールはアメリカ疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) の方法に準じて改良され, 現在は簡便化されてリゾチーム処理を省略した方法¹⁾になっているが, proteinase K や, proteinase K の活性を失活させるために使用する PefablocSC は高価な試薬であり, 費用がかかることが問題である。また, タンパク阻害剤である PefablocSC は人体に有害であり, 取り扱いに注意を要する。

近年, 酵素を使わず高濃度の尿素や界面活性剤を使って簡便かつ経済的に PFGE 用の DNA を調製する方

法 (以下, 「非酵素法」と略す) が開発され, 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) *Aeromonas* 属菌, 腸管出血性大腸菌 O157, サルモネラ (*Salmonella* Enteritidis), 赤痢菌 (*Shigella sonnei*), 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6) で適用できることが報告されている²⁻⁵⁾。今回, 西海らが報告した高濃度の尿素と安価な界面活性剤である Triton X-100 を含む EDTA バッファーを用いた非酵素法が⁵⁾, 他のグラム陰性菌にも適用可能ではないかと考え, 当所で検査を行う機会が多いカンピロバクター属菌およびレジオネラ属菌について検討を行った。また, 腸管出血性大腸菌とサルモネラについては, 報告されている O157 や *S. Enteritidis* 以外の血清型でも適用可能か検討した。さらに, 腸管出血性大腸菌については非酵素法での DNA 調製時の保温時間短縮の検討を行うとともに, サルモネラの中でスメア化して解析不能となることが知られている *S. Saintpaul* については, チオ尿素を添加した条件下での比較も行った。

2 材料と方法

2.1 供試菌株

岐阜県下で分離されたカンピロバクター属菌, レ

ジオネラ属菌，腸管出血性大腸菌，サルモネラの
合計 84 株を供試した（表 1）。

表 1 供試菌株

菌 種	血 清 型	株 数
<i>Campylobacter jejuni</i>		8
<i>C. coli</i>		2
<i>Legionella pneumophila</i>	血清群 1	2
	血清群 5	1
<i>L. micdadei</i>		2
<i>L. oakridgensis</i>		1
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	O157	49
	O26	8
	O111	1
<i>Salmonella enterica</i>	Braenderup *	1
	Enteritidis	1
	Newport	1
	Saintpaul	2
	Schleissheim	1
	Stanley	1
	Typhimurium	1
	O4:i:-	2

* H9812 PFGE マーカース株

2.2 PFGE

2.2.1 アガロースブロック作製

カンピロバクター属菌，レジオネラ属菌ではそれぞれ血液寒天培地（栄研化学），BCYE α 寒天培地（栄研化学）上で培養したコロニーを滅菌蒸留水 150 μ L に懸濁した。腸管出血性大腸菌，サルモネラは Tryptic Soy Broth（BD）で一晩増菌し，増菌液 150-200 μ L を生理食塩水 1 mL に添加して 13,000 rpm，10 分間遠心した後，上清を捨てて 150 μ L の滅菌蒸留水に再懸濁した。それぞれの懸濁液に，等量（150 μ L）の 1% SeaKem Gold Agarose（Lonza）を加え，0.7 mm 厚のプラグモールド（Bio-Rad）で固化させた（図 1）。

2.2.2 酵素法による DNA 抽出

国立感染症研究所の改良法¹⁾に従って行った（図 1）。方法 2.2.1 で固化させたブロックを 1 mg/mL proteinase K（和光純薬）と 1% N-lauroylsarcosine（和光純薬）を含む 0.5 M EDTA (pH8.0) に入れ，50 で 2 時間から一晩保温した。レジオネラ属菌は，常らの改良法⁶⁾に従い，proteinase K 濃度を 0.1

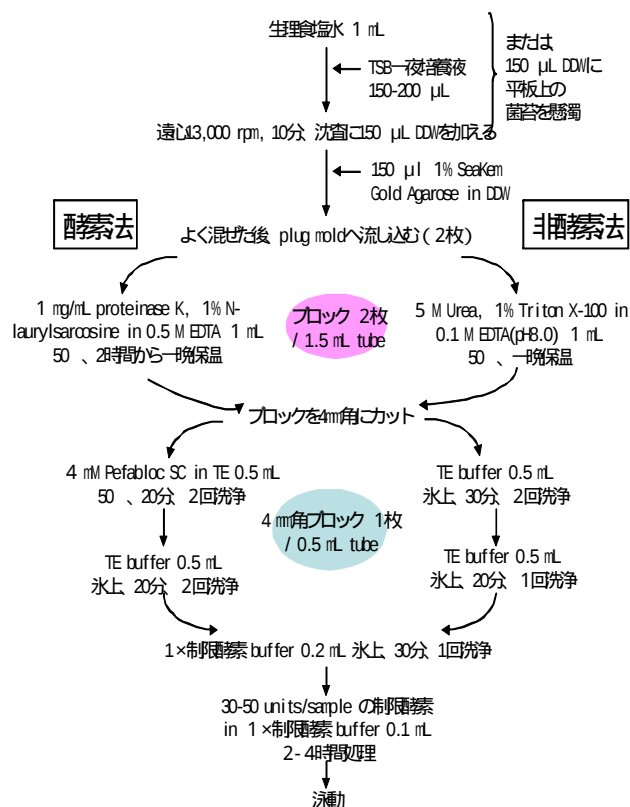


図1 PFGEプロトコル

mg/mL に，50 での保温時間を 1 時間で実施した。proteinase K 処理したブロックを 4 mm 角にカットし，4 mM Pefabloc SC（Roche）を含む TE バッファーに移し 50 で 20 分間の保温を 2 回繰り返すことにより proteinase K を失活させた。次に TE バッファーにブロックを移し氷上で 20 分間平衡化した。

2.2.3 非酵素法による DNA 抽出

西海らの方法⁵⁾に従って行った（図 1）。具体的には，方法 2.2.1 で固化させたブロックを 5 M 尿素（Pharmacia Biotech），1% TritonX-100（和光純薬）を含む 0.1 M EDTA (pH8.0) に入れ，50 で一晩保温した。保温後のブロックを 4 mm 角にカットし，TE バッファーで氷上 30 分間の洗浄を 2 回実施した後，新しい TE バッファーに置換して氷上で 20 分間平衡化した。

2.2.4 制限酵素処理及び電気泳動

方法 2.2.2 または 2.2.3 で処理を行ったブロックを制限酵素バッファーに移し氷上で 30 分間平衡化した後，カンピロバクター属菌は 1 ブロックにつき 30 U の *Sma*（Roche）で，レジオネラ属菌は 50 U の *Sfi*（Roche）で，腸管出血性大腸菌，サルモネ

ラは30 Uの *Xba* (Roche) で、各2-4時間処理した。処理温度は *Sma* では25℃, *Sfi* では50℃, *Xba* では37℃で実施した。処理後のブロックをコームに載せた後、1% SeaKem Gold Agarose とともに固化させ泳動用ゲルを作製した。泳動マーカーは *S. Braenderup* H9812 を *Xba* 処理したブロックを使用した。電気泳動はCHEF DR (Bio-Rad) 泳動槽にて0.5×TBE バッファー、電圧6 V/cm、パルスタイム2.2-54.2秒、泳動時間19時間で行った。チオ尿素を添加する場合は、0.5×TBE バッファーに200 μMの濃度になるように添加して泳動を実施した。泳動後、エチジウムブロマイドにより染色し、切断パターンを観察した。

3 結 果

3.1 カンピロバクター属菌

Campylobacter jejuni 8株, *C. coli* 2株を非酵素法で解析したところ、約20-500 kbpの範囲に8-14本の明瞭なバンドが認められた。その切断パターンを酵素法と比較したところ、抽出方法によるパターンの差は認められなかった(図2)。

3.2 レジオネラ属菌

Legionella pneumophila 3株, *L. oakridgensis* 1株では、非酵素法で約20-1,100 kbpの範囲に11-22本のバンドが認められた。その切断パターンを酵素法と比較したところ、多少のバンドの濃淡の違いはあるものの、酵素法と同じパターンが得られた(図3)。一方, *L. micdadei* では、2株中1株で非酵素法のバンドが非常に薄く認識できなかった(図3のレーン2)。

3.3 腸管出血性大腸菌

腸管出血性大腸菌0157(49株), 026(8株), 0111(1株)を非酵素法で解析したところ、すべての株で約20-800 kbpの範囲に17-22本の明瞭なバンドが認められた。そのうち、0157(2株)の切断パターンを酵素法と非酵素法で比較したところ、バンド位置はすべて一致した(データ省略)。さらに、0157(3株)について、非酵素法の50℃での保温時間を2時間と一晚(約19時間)とで比較したところ、3株ともに一晚の保温では明瞭なバンドが認められたが、2時間の保温ではバンドが得られなかった(図4)。

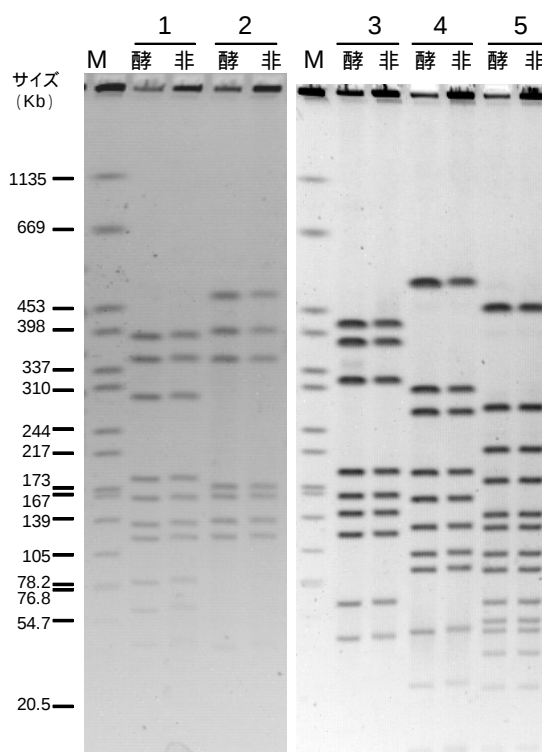


図2 カンピロバクター属菌のPFGE解析像
レーン1, 2, 3: *C. jejuni*
レーン4, 5: *C. coli*
酵: 酵素法, 非: 非酵素法
M: *S. Braenderup*マーカー株

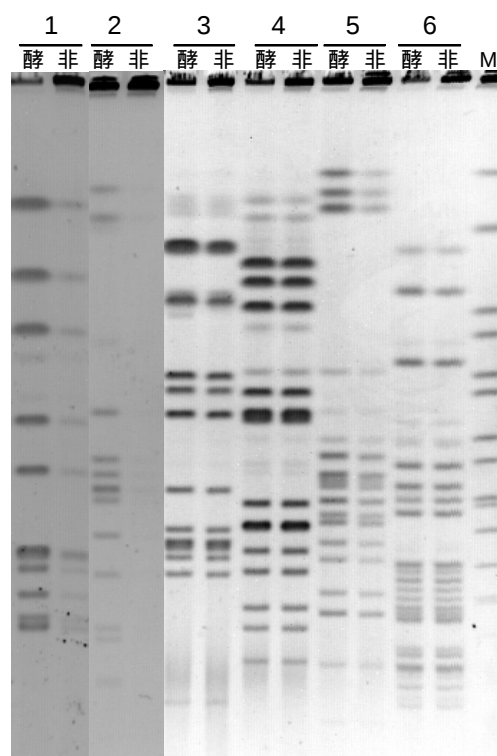


図3 レジオネラ属菌のPFGE解析像
レーン1, 3, 4: *L. pneumophila*
レーン2, 5: *L. micdadei*
レーン6: *L. oakridgensis*
酵: 酵素法, 非: 非酵素法
M: *S. Braenderup*マーカー株

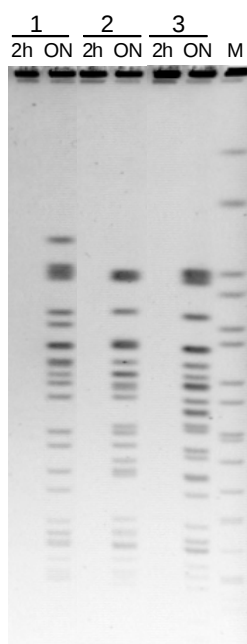


図4 腸管出血性大腸菌O157 (3株)
保温時間による違い (非酵素法)
2h: 保温時間2時間
ON: 保温時間一晚 (約19時間)
M: *S. Braenderup* マーカー株

3.4 サルモネラ

サルモネラ10株では、非酵素法で約20-1,100 kbpの範囲に11-18本のバンドが認められ、そのうち7株 (*S. Saintpaul* 2株, *S. Schleisseim* 1株, *S. Stanley* 1株, *S. Typhimurium* 1株, *S. spp.* 04:i:- 2株) のバンドパターンを酵素法と比較したところ、その泳動位置は一致していた。また、*S. Saintpaul* 2株, *S. Schleisseim* 1株, *S. Stanley* 1株の合計4株について、泳動のTBE バッファーにチオ尿素を無添加時と添加時とで比較したところ、*S. Schleisseim* と *S. Stanley* では抽出方法の違いやチオ尿素添加の有無によって差は認められなかった。一方、*S. Saintpaul* では、チオ尿素無添加条件では酵素法、非酵素法ともにスメア状となったが、チオ尿素添加条件下では明瞭なバンドが認められた (図5)。

表2にPFGEマーカー株である *S. Braenderup* について、ブロック作製日、*Xba* 処理日および最終使用日をまとめた。作製したブロックは尿素と TritonX-100を含むEDTA溶液中での冷蔵保存で1年以上、*Xba* 処理後のブロックも制限酵素を含むバッファーをTEバッファーに置換し冷蔵した状態で少なくとも6カ月間は解析可能であった。

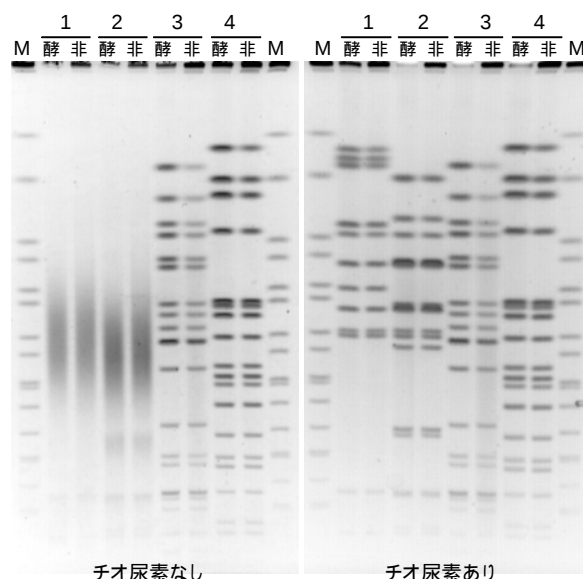


図5 チオ尿素有無の検討
レーン1, 2: *S. Saintpaul*, レーン3: *S. Schleisseim*, レーン4: *S. Stanley*
酵: 酵素法, 非: 非酵素法
M: *S. Braenderup* マーカー株

表2 *S. Braenderup* マーカー作製・使用年月日

ブロック作製 (1)	<i>Xba</i> 処理 (2)	最終使用 (3)
2010.6.11	2010.7.8 2010.8.19	2010.10.27 2011.2.3
2010.6.18	2010.8.19	2011.1.19
2010.7.1	2010.12.17 2011.2.2	2011.2.16 2011.8.11
2010.7.8	2011.6.20 2011.8.25	2011.8.25 2011.8.25

1 一晚保温処理後、冷蔵した日

2 処理後、制限酵素を含む溶液をTEに置換して冷蔵保存した日

3 泳動開始日

4 考 察

今回、我々は非酵素法の検討が行われておらず、かつ当所で検査する機会が多いカンピロバクター属菌、レジオネラ属菌、腸管出血性大腸菌およびサルモネラの7菌種84株で検討を行った。その結果、*L. micdadei* 1株では非酵素法のバンドが非常に薄く認識できなかったものの、それ以外の83株では明瞭なバンドが得られ、酵素法と比較したすべての株においてバンドパターンが一致した。このことから、非酵素法は、これらの菌種・血清型で酵素法の代替法として解析可能であることが示唆された。

通常、PFGE解析においてバンドが得られない現象

は、今回検討を行った *S. Saintpaul* のように血清型固有の性質であると考えられているもの⁷⁾以外に、菌株によって内在性 DNA 分解酵素の作用で DNA が分解されることが報告されているもの^{8, 9)}などが考えられる。今回、*S. Saintpaul* では非酵素法においても酵素法での報告¹⁰⁾と同様に、泳動バッファーにチオ尿素を添加することでスミア化を防ぐことが可能であった。一方、バンドが非常に薄く解析不能であった *L. micdadei* 1 株については、原因が菌種や株の性質によるものなのかを明らかにするために、今後再現性を確かめるとともに、より多くの菌株について解析を行う必要がある。

酵素法のプロトコールでは、proteinase K 処理を 50 で 2 時間から一晩実施する¹⁾のに対し、西海らが行った非酵素法では、保温時間は一晩で行っている⁵⁾。McEllistrem らは、酵素を使わず EDTA と N-lauroylsarcosine を含む バッファー中で *Streptococcus pneumoniae* から DNA 抽出を行う非酵素法の検討で、保温時間は少なくとも 6 時間以上必要であったと述べている²⁾。今回の検討でも、腸管出血性大腸菌 0157 (3 株) で保温時間を 2 時間にして実施したところ、バンドが得られず DNA 抽出が不十分であることが判明した。また、今回の検討ではブロック作製時の菌液の濃さは酵素法と非酵素法で同じにしたが、全体的に酵素法より非酵素法の方がバンドが薄い傾向にあった。これらのことより、非酵素法は酵素法よりも DNA 抽出効率が低い可能性が考えられた。しかしながら、高価な試薬類を使わない非酵素法は 1 サンプル当たりの DNA 抽出工程の試薬コストを 1/20 程度に縮減することができる上に、操作が簡便になることや、毒性のある薬品との接触機会が減ることなど、優れた点が多い。今後はこれらのメリットを保ちつつ、より効率的な抽出試薬組成の検討も必要かもしれない。

S. Braenderup H9812 は CDC の PFGE プロトコールにおいて標準マーカー株として使用され、国立感染症研究所をはじめ全国の地方衛生研究所で使用されている。今回、この株においても非酵素法が適用可能であり、また、作製したブロックおよび *Xba* 処理後のブロックの長期保存が可能であったことは、マーカーの備えにかかる費用削減や作業の効率化に非常に効果があると考えられる。

今回、供試株数は少ないが、非酵素法がより多菌種・多血清型の菌において適用可能であることが判明した。今後さらに改良およびデータの蓄積を行い、安定した成績が得られることが確認されれば、PFGE 解析をより簡便・経済的・安全に行うことが可能になると考えられる。

謝 辞

本研究におきまして、非酵素法についてご教授くださいました兵庫県食肉衛生検査センター西播磨食肉衛生検査所の西海弘城氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 勢戸和子, 石川和彦, 藤原恵子, 竹上修平, 小笠原準, 横田正春, 西海弘城, 黒川学, 川西伸也, 中山章文, 金澤祐子, 田口真澄, 小林一寛: 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型別法の施設間変動について - 感染研新プロトコールの試用 -, 新興・再興感染症研究事業平成 15 年度総括・分担研究報告, 95-104, 2003.
- 2) McEllistrem M. Catherine, Stout Janet E., Harrison Lee H.: Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*, *J. Clin. Microbiol.*, 38, 351-353, 2000.
- 3) Lopez-Canovas, L., Sanchez-Alonoso, A., Higginson, D., Ariosa, C., Clark, H., Riverson, A. M., Javer, E., Fando, R., Noa, M. D.: Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis, *Electrophoresis*, 24, 1152-1158, 2003.
- 4) Lopez-Canovas, L., Bravo, L., Herrera, J., Riverson, A. M., Javer, E., Sanchez, A., Fando, R., Noa, M. D., Fernandez, A.: DNA fingerprinting of *Vibrio cholera* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis, *Electrophoresis*, 27, 2857-2864, 2006.
- 5) 西海弘城, 山岡政興: パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出, 兵庫県立健康環境科学研

- 究センター紀要, 4, 40-43, 2007.
- 6) 常 彬, 前川純子, 渡辺治雄: レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法の改良, 病原微生物検出情報, 29, 333-334, 2008.
- 7) Baggesen, D. L., Wegener, H. C., Christensen, J. P.: Typing of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul: an outbreak investigation, *APMIS*, 104, 411-418, 1996.
- 8) Gibson, J. R., Sutherland, K., Owen, R. J.: Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 357-358, 1994.
- 9) Maslanka, S. E., Kerr, J. G., Williams, G., Barbaree, J. M., Carson, L. A., Miller, J. M., Swaminathan, B.: Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations, *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2209-2214, 1999.
- 10) 沼田昇, 斎藤卓哉, 小黒美舎子, 早川安彦, 吉田菊喜: パルスフィールド・ゲル電気泳動におけるスメアー発生の防止—チオ尿素加トリス泳動バッファーを用いた電気泳動, 病原微生物検出情報, 23, 66-68, 2002.

Study to Extend the Range of Application of Nonenzymatic Protocol for Pulsed-field Gel Electrophoresis

Makiko NODA, Noriko FURUTA, Yukiko KADOKURA, Yutaka SHIRAKI, Yoshio KOBAYASHI

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan