

## PCR 法による *Vibrio cholerae* O1 生物型別の検討について

小澤奈美 渡邊奈々子 小黒祐子 須釜久美子 大竹俊秀  
微生物グループ

### 要 旨

*Vibrio cholerae* O1 について、核酸増幅法の 1 つである Polymerase Chain Reaction 法を用いて生物型別を実施した。rtxA, rtxC, hlyA 遺伝子を標的とした Primer によって目的の遺伝子を増幅させた結果、hlyA で良好な結果が得られた。生化学的性状確認で判定してきた *Vibrio cholerae* O1 の生物型別を、今後は PCR 法で検査し、有用な情報として迅速に提供できるものとする。

キーワード： *Vibrio cholerae* O1, 生物型別, PCR 法

### はじめに

コレラは代表的な経口感染症の 1 つで、コレラ菌 (*Vibrio cholerae* 以下“*V.cholerae*”とする) で汚染された水や食物を摂取することによって感染が起きる。*V.cholerae* は O 抗原の違いによって、現在 200 種類以上に分類されている。さらに、*V.cholerae* O1 は小川型、彦島型、稲葉型の 3 つの血清型に分けられ、生化学的性状の違いにより、クラシカル型 (またはアジア型) とエルトール型の 2 つの生物型に分けられる。

*V.cholerae* O1 の生物型は、過去には生化学的性状によって確認していたが、今回 2 カ所の遺伝子領域を Polymerase Chain Reaction (以下“PCR”とする) 法を用いて生物型別の決定を試み、検討の結果有用性を確認したので報告する。

### 材 料

*V.cholerae* O1 は、生化学的性状確認にて生物型を決定後、当所に保管していたクラシカル型 3 株、エルトール型 9 株、2007 年 7 月に当所に搬入された生物型不明の 1 株の計 13 株を用いた。

### 方 法

#### 1 DNA抽出

TSA 培地に培養した *V.cholerae* O1 コロニーを用いた。滅菌蒸留水で懸濁液を作成後、

100 °C で 10 分間加熱処理をした。その後、12,000rpm で 5 分間 4 °C の条件で遠心し、上清をテンプレートとした。

#### 2 PCRプライマー

##### 1) RTX 毒素遺伝子領域

Chow らの文献に基づき<sup>1)</sup>、rtxA を標的としたプライマー (rtxA-F および rtxA-R) と rtxC を標的としたプライマー (rtxC-F および rtxC-R) を用いた (表 1)。

##### 2) 溶血素遺伝子領域

Rivera らの文献に基づき<sup>2)</sup>、hlyA を標的としたプライマー (489F, 744F, 1184R) を用いた (表 1)。hlyA を標的とした PCR は、3 つのプライマーを混合した Multiplex PCR であるが、非特異反応を避けることおよび感度を上げる目的で単一バンド検出の PCR に変更した。489F と 1184R の組み合わせを hlyA1, 744F と 1184R の組み合わせを hlyA2 とした。

#### 3 PCR反応

反応液の総量は 25  $\mu$  L とし、テンプレートと PCR 試薬およびプライマーを混合した。EX Taq polymerase at 5U/ $\mu$  L (TaKaRa) を 0.2  $\mu$  L, 10  $\times$  Ex Taq Buffer を 2.5  $\mu$  L, dNTP Mixture at 2.5mM を 2.0  $\mu$  L, Primer (20pmol/ $\mu$  L) を 0.5  $\mu$  L ずつ、滅菌蒸留水を 18.3  $\mu$  L, Template DNA を 1.0  $\mu$  L で調

表1 プライマーの塩基配列

primer	sequences (5'to 3')	Amplicon size (bp)	PCR conditions
rtxA-F	CTG AAT ATG AGT GGG	417 (El Tor)	55-1
rtxA-R	GTG TAT TGT TCG ATA TCC GCT ACG		
rtxC-F	CGA CGA AGA TCA TTG ACG AC	263 (El Tor)	
rtxC-R	CAT CGT CGT TAT GTG GTT GC		
489F	GGC AAA CAG CGA AAC AAA TAC C	489F + 1184R : hlyA1	60-1
744F	GAG CCG GCA TTC ATC TGA AT	738/727 (El Tor/Clas)	
1184R	CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT A	744F + 1184R : hlyA2 481 (El Tor)	

PCR condition : Temperature of annealing (°C) —time of extension (min)

製した。PCR増幅装置はiCycler (BIORAD)を使用した。反応条件は、rtxAおよびrtxCが94℃1分、55℃1分、72℃1分で30サイクル、hlyA1およびhlyA2が94℃2分、60℃1分、72℃1分で30サイクル後、72℃10分 final extension stepを設定した。

#### 4 増幅産物の確認

PCR産物を2%アガロースゲル (TaKaRa Nusieve3:1) で電気泳動後、エチジウムブロマイドにて後染色し、目的とする塩基サイズのバンドを確認した。クラシカル型がRTX毒素遺伝子を欠損しているため、エルトール型のみrtxAおよびrtxCのバンドが検出される。rtxAでは417bp、rtxCでは263bpにDNA断片が増幅される。hlyA1ではエルトール型が738bp、クラシカル型が727bpにDNA断片の増幅が確認され、hlyA2ではエルトール型のみ481bpにDNA断片が増幅される。

### 結果

#### 1 RTX毒素遺伝子領域 (rtxA, rtxC)

結果を図1および図2に示す。図中1~9がエルトール型菌株、10~12がクラシカル型菌株、13がネガティブ・コントロールである。rtxAおよびrtxCで目的とする塩基サイズのバンドが確認できた。しかし、RTX毒素遺伝子を欠損した本来バンドが出ないクラシカル型にも、rtxAで塩基サイズが異なる

非特異バンドが数本出現した。プライマーの濃度変更や、テンプレートDNA作成の調製などを実施したが、非特異バンドは消失しなかった。

#### 2 溶血素遺伝子 (hlyA)

結果を図3および図4に示す。エルトール型でhlyA1およびhlyA2に目的とする塩基サイズのバンドが認められた。クラシカル型においてはhlyA1にバンドが確認でき、hlyA2はバンドは陰性であった。hlyA2でクラシカル型に非特異バンドは出現せず、hlyA1、hlyA2ともに良好な結果となった。

なお、図には示さないが、2007年7月に搬入された生物型不明の*V.cholerae* O1は、rtxAおよびrtxC、hlyA1およびhlyA2に目的とする塩基サイズのバンドが確認でき、エルトール型と判明した。

### 考察

rtxAでクラシカル型に非特異的バンドが出現したことを考慮すると、当所における*V.cholerae* O1の生物型別にはhlyAを標的としたPCR法が最適と思われる。

今回PCR法による*V.cholerae* O1生物型の検討を行った背景には、生物型別に用いられてきた生化学的性状では、両型の性状に例外を示す株や反応が弱い株があり、判定が困難な場合が生じるためである。そのため、複数の性状確認検査を実施しなければ生物型を確

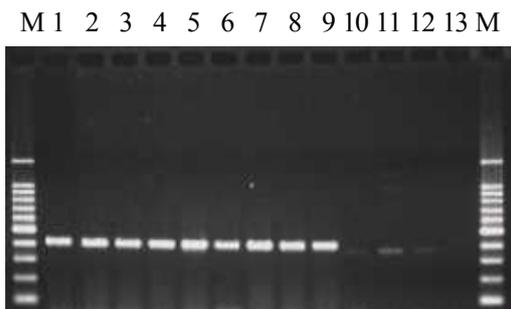


図1 rtxA遺伝子PCR産物電気泳動図



図2 rtxC遺伝子PCR産物電気泳動図



図3 hlyA1遺伝子PCR産物電気泳動図



図4 hlyA2遺伝子PCR産物電気泳動図

- 1～9：エルトール型
- 10～12：クラシカル型
- 13：ネガティブ・コントロール
- M：100bp DNA ラダー

定することができなかった。さらに、検査の事前準備や試薬の調製、培養時間など迅速性に欠けてしまうという課題があった。

現在の感染症法におけるコレラの届出基準は、コレラ毒素（CT）産生性の *V.cholerae* O1 および O139 と確認された症例と定義している。すなわち生物型別結果の有無は問われていない。しかし、病原性が強いとされるクラシカル型コレラ菌や、感染力が強いとされるエルトール型コレラ菌の情報は、臨床においても行政においても有益な情報と思われる。したがって、PCR 法によって、安定かつ迅速に生物型を決定することは有用性が高いと思われる。

#### 引用文献

- 1)Chow KH, Ng TK, Yuen KY, et al. Detection of RTX Toxin Gene in *Vibrio cholerae* by PCR, *Journal of Clinical Microbiology* 2001 ; 39 : 2594 - 2597
- 2)Rivera NG Irma, Jongsik chun, Anwar

Huq, et al. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*, *Applied and Environmental Microbiology* 2001 ; 67 : 2421 - 2429