

ウェルシュ菌の新型毒素遺伝子を検出する マルチプレックス qPCR の構築

Multiplex Quantitative PCR to Detect the Novel Toxin Gene of *Clostridium perfringens*

大野 祐太 小川 恵子 池田 徹也 伊藤 政彦*

Yuta OHNO, Keiko OGAWA, Tetsuya IKEDA and Masahiko ITO

Key words : *bec/cpile* ; *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) ; enterotoxin (エンテロトキシン) ; qPCR (quantitative PCR)

緒 言

ウェルシュ菌は生体内毒素産生型の食中毒細菌であり、毒素遺伝子 *cpe* にコードされるエンテロトキシンが食中毒の原因となる。ウェルシュ菌には *cpe* を保有しない株も多数存在し、常在性の腸内細菌でもあることから、ウェルシュ菌による食中毒の調査では *cpe* の検出が重要になる¹⁾。一方、1997年から2010年に *cpe* を保有しないウェルシュ菌による食中毒が東京、大阪、栃木で発生しており、新型毒素の遺伝子として *bec/cpile* が報告された^{2,3)}。また、2017年には北海道の胃腸炎患者においても *bec/cpile* を保有するウェルシュ菌が分離されている⁴⁾。今後、北海道内の保健所においても *bec/cpile* の検査が簡便に実施できるよう、*cpe* と *bec/cpile* を同時に検出でき、さらにインターナルコントロールとしてウェルシュ菌の指標となる α 毒素の遺伝子 *plc* を検出できるマルチプレックス quantitative PCR (qPCR) 検査系を構築したので報告する。

方 法

National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されていた24株分の *cpe* 全長配列 (GenBank: AB236338, AF416450, AJ000766, CP000312, FJ205886, GQ225713, GQ225714, GQ225715, GQ225716, KP739976, KU711833, KU711834, M98037, MG456813, MG456815, MH900564, MK118949, NC_007772, NC_007773, NZ_CP013039, NZ_CP013042, X71844, X81849, Y16009)、14株分の *plc* 全長配列 (GenBank: MH900551, MH900552, MH900553, MH900554, MH900555, MH900556, MH900558, MH900559, MH900560, MH900561, MH900562, MH900563, MK902768, MK902769) 及び1株分の *bec/cpile* 全長配列 (GenBank:

MH900565) を参照した。*cpe* と *plc* は BioEdit⁵⁾ を用いてそれぞれアライメントを行って保存領域を特定した。3つの遺伝子の配列について、それぞれPCRプライマー設計ツールの primer3⁶⁾ でプライマーを設計した。設計したプライマーは、反応試薬として TB Green[®] Premix DimerEraser (タカラバイオ(株)) を用いた20 μ L 反応系で増幅反応を行い、qPCR装置 Thermal Cycler Dice[®] Real Time System III (タカラバイオ(株)) における増幅と融解曲線分析を確認して適切なプライマー濃度のバランスを検討した。

構築したプライマー及び既報⁷⁾ の *cpe* のプライマーを用いて、ヒトもしくは動物検体から分離されたウェルシュ菌の抽出DNAに対してqPCRを実施した。DNA抽出は厚生労働省通知⁸⁾ で示されたアルカリ熱抽出法で実施した。菌株は2013年8月から2023年4月までに分離された計264株を用いた。

bec/cpile が検出された場合及び *plc* が検出されなかった場合には全ゲノム解析を実施した。全ゲノム解析は既報の手順⁹⁾ に沿って MiSeq (Illumina) 及び MinION Mk1c (Oxford Nanopore Technologies) でシーケンシングした後、Unicycler¹⁰⁾ を用いてハイブリッドでアセンブルを行った。また、*plc* の解析においては BWA MEM¹¹⁾ を用いて既知の *plc* 全長配列にマッピングし、SAMtools¹²⁾ を用いてマッピングされた領域を特定し、アセンブルされた配列から *plc* の全長配列を抜き出した。抜き出した配列は、プライマー設計時に参照した14株分の *plc* 配列と比較し、BioEdit を用いて各配列間における塩基の不一致を検出した。

結 果 及 び 考 察

構築したプライマーの配列、反応液中の濃度及び増幅産物の大きさと Tm 値を表1に示す。また、反応液の組成及び温度条件を表2に示す。なお、*plc* の増幅産物の Tm 値

* 札幌臨床検査センター

表1 プライマーリスト

名称	配列	プライマー終濃度	PCR 産物	
		(nmol/L)	鎖長 (bp)	Tm 値* (°C)
qPLC-F1	TCAAAAGAATATGCAAGAGGTTTT	200	50	67.5
qPLC-R1	TAGTATATTGATTTTCCTGTTTTAGCA	200		
qCPiLE-a-F3	TTGCCAACTAATACTCCAGCA	300	99	74.0
qCPiLE-a-R3	TGATAATCCAGTGGCTTTTAAACT	300		
qCPE-F1	TGAAACTGGTGAAAGATGTGTTTT	200	173	77.0
qCPE-R1	GCTTTTGAGTCCAAGGGTATG	200		

* Tm 値は 0.5°C 単位での値。

表2 qPCR 実験条件

試薬調製 [20 µL 反応系]			
2x DimerEraser	10 µL		
20x Primer Mix	1 µL		
Eva Green Dye, 20x in Water	1 µL		
Distilled water	7 µL		
Sample DNA	1 µL		
温度条件			
初期変性	95°C	30 秒	
a) 変性	95°C	10 秒	
b) 結合	55°C	30 秒	
c) 伸長	72°C	50 秒	
a-c: 30 サイクル			
融解曲線分析	初期設定		

が 67.5°C となったため、機器の初期設定である 72°C の伸長反応で蛍光強度を測定する場合、*plc* の増幅産物は 72°C で一本鎖に解離しているため蛍光色素 Eva Green と結合せず、増幅曲線に反映されない仕様となった。これにより、増幅曲線の立ち上がりが認められる場合に融解曲線分析を待たず *bec/cpile* もしくは *cpe* の増幅が予想できる。このことは、食中毒事例対応などの際に少しでも早く結果を知り、次の作業を始められるという点で利点となる。一方、55°C の結合反応中に蛍光強度を測定するよう機器の設定を変更することで *plc* の増幅を増幅曲線に反映させることも可能である。

構築した qPCR 検査系で 264 株のウェルシュ菌を試験したところ、63 株で *cpe* が陽性となった。このすべての検査結果は既報⁷⁾ のプライマーで検査した場合も同様であった。このことから、新たに構築した qPCR 検査系は、*cpe* の検出という側面において既存の qPCR 検査系⁷⁾ と同等の感度及び特異度を持ち、従来の検査系から置き換えることができると考えられた。

また、インターナルコントロールとした *plc* は、2022 年 10 月分離の 1 株を除く 263 株 (99.6%) で検出できたため、十分に機能していたと考えられた。*plc* が検出されなかった 1 株 (当所における菌株番号 HIPH24238) については、卵黄加ブルセラ HK 培地においてウェルシュ菌に典型的な

卵黄反応が認められ、羊血液寒天培地においても β 溶血が認められたため活性を示す α 毒素の存在が示唆された。

HIPH24238 において *plc* が検出できなかった原因を調べるために全ゲノム解析を実施したところ、プライマー設計時に参照した 14 株分の *plc* 配列と 83% 以上一致する配列が特定された。この配列は、*plc* の全長配列 1197 塩基に対して 195 カ所から 198 カ所の塩基不一致及び連続する 3 塩基の欠失が認められた。アミノ酸配列に変換すると、80 カ所から 82 カ所の不一致であり、一致率は 79% であった。

以上のように HIPH24238 の *plc* は他のウェルシュ菌の *plc* とは大きく異なっており、加えて塩基やアミノ酸の不一致は遺伝子全体に分散していたことから、プライマーの標的領域を調整しても両者を同時に検出できるプライマーは設計できなかった。しかしながら、この株において *cpe* や *bec/cpile* が陰性であったことや、その他の株で *plc* が検出できていることから、当該プライマーを用いてインターナルコントロールを検出することは十分に妥当性があると考えられた。

bec/cpile については、2013 年 8 月に分離された HIPH13612 でのみ陽性となった。なお、*cpe* は陰性であった。この株について全ゲノム解析を実施した結果、*bec/cpile* の全長配列が確認され、それが 54,530 塩基で構成されるプラスミド上に存在すると明らかになった。プラスミドの全長配列を NCBI の BLAST で検索したところ、2009 年に大阪府で発生したウェルシュ菌新型毒素による食中毒事例で分離されたウェルシュ菌のプラスミド (GenBank: AP013033) と 99.8% 一致した。このことから、構築した qPCR で検出した *bec/cpile* が既報^{2,3)} の遺伝子と一致し、バクテリアであるプラスミド全体についても既報²⁾ の配列と高度に一致していたと確認された。

以上のことから、本研究で構築した qPCR 検査系は、*cpe* に関する既存の qPCR 検査系と同等の感度と特異度を持ち、さらに新型毒素遺伝子 *bec/cpile* 及びインターナルコントロール *plc* を同時に検出できることが示された。同様の遺伝子を対象とした PCR 検査系¹³⁾ が既に報告されているが、本研究では電気泳動が不要となる qPCR 検査系を構築しており、迅速性や実験室内の汚染防止の観点から需要が見込まれる。*bec/cpile* の検出数は 264 株中 1 株と

少なかったが、2013 年の時点で既に北海道内の患者から *bec/cpile* を保有するウェルシュ菌が分離されていたことが明らかとなり、保健所において検査体制を整備しておく意義が強調された。

なお、本研究で構築した qPCR 検査系のプライマー及び陽性対照 DNA は既に北海道内の保健所に配布済みであり、今後も必要に応じて再配布する。

文 献

- 1) Czecculin JR, Collie RE, McClane BA: Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. *Infect Immun.*, **64**(8), 3301-3309 (1996)
- 2) Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T: BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect. Immun.*, **82**(6), 2390-2399 (2014)
- 3) Irikura D, Monma C, Suzuki Y, Nakama A, Kai A, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Yoshinari T, Sugita-Konishi Y, Kamata Y: Identification and characterization of a new enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning outbreaks. *PLoS One*, **10**(11), e0138183 (2015)
- 4) Matsuda A, Aung SM, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Nakamura M, Horino Y, Ito M, Habadara S, Kobayashi N: Prevalence and genetic diversity of toxin genes in clinical isolates of *Clostridium perfringens*: coexistence of alpha-toxin variant and binary enterotoxin genes (*bec/cpile*). *Toxins*, **11**(6), 326 (2019)
- 5) Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98 (1999)
- 6) Primer3, <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (2023 年 5 月 9 日確認)
- 7) Kawase J, Etoh Y, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K: An improved multiplex real-time SYBR green PCR assay for analysis of 24 target genes from 16 bacterial species in fecal DNA samples from patients with foodborne illnesses. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **69**(3), 191-201 (2016)
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」, 平成 26 年 11 月 20 日
- 9) 大野祐太, 山崎康司, 葛西直人, 落合崇浩, 池田徹也: と畜検査で発見された慢性型豚丹毒と生ワクチンの関連. *日獣会誌*, **76**(8), e187-e192 (2023)
- 10) Wick RR, Judd ML, Gorrie LC, Holt EK: Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.*, **13**(6), e1005595 (2017)
- 11) Li H, Durbin R: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**(14), 1754-1760 (2009)
- 12) Samtools, <http://www.htslib.org/> (2023 年 5 月 12 日確認)
- 13) Yonogi S, Kanki M, Ohnishi T, Shiono M, Iida T, Kumeda Y: Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*. *J. Microbiol. Methods*, **127**, 172-175 (2016)