

原 著

## ブドウ球菌エンテロトキシンを網羅的に検出するmultiplex PCR

狩野真由子 重茂克彦 品川邦汎

### 要 約

ブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxin, SEs) はブドウ球菌食中毒の原因毒素である。SEsはSEA-SEEの5型に加え、さらに16種のSEsあるいはブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 (staphylococcal enterotoxin-like toxins, SEIs) が存在する。本研究では、19種類のSE/SEI遺伝子を網羅的に検出するためのmultiplex PCRシステムを確立した。さらに、食中毒事例由来株49株および健康ヒト鼻腔由来株124株を対象にSE/SEI遺伝子の保有状況を調査した。その結果、新型SE/SEI遺伝子は黄色ブドウ球菌集団中に広く分布していること、また、最も新しい毒素であるSESおよびSETのブドウ球菌集団中における頻度は極めて小さいことが明らかになった。

キーワード：ブドウ球菌エンテロトキシン，細菌毒素，multiplex PCRシステム，食中毒

ブドウ球菌食中毒の原因毒素はブドウ球菌エンテロトキシン (staphylococcal enterotoxins, SEs) であり、黄色ブドウ球菌が食品中で増殖する際に産生されたSEsを摂食することにより、嘔吐を主徴とする食中毒を発症する。また、SEsは嘔吐活性とは別にスーパー抗原活性を有し、毒素性ショック症候群にも関与することが知られている [1]。従来、SEsは複数の型が存在することが知られており、以前はその抗原性によりSEA, SEB, SEC, SED, SEEの5型の存在が報告されていた。しかし、近年ブドウ球菌の遺伝子解析・ゲノム解析の進展に伴って従来から知られていたSEsと類似する遺伝子の存在が次々と明らかにされ、新型SEsとして報告された。2004年には、International Nomencla-

ture Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature (INCSSN) によりブドウ球菌の産生するスーパー抗原性毒素の命名規約が提出された [2]。この規約によれば、SEsと類似した蛋白質で、スーパー抗原活性を有し、さらに霊長類への経口投与により嘔吐活性が証明されたものを“staphylococcal enterotoxin ブドウ球菌エンテロトキシン”と命名し、霊長類の嘔吐実験で嘔吐活性陰性のもの、あるいは未だ嘔吐実験が行われていないものは“staphylococcal enterotoxin-like (SEI) ブドウ球菌エンテロトキシン様毒素”と命名することとなっている。現在までにSEH, SEG, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SER, SEIUおよびSEIVが報告されてい

る [1, 3, 4]. これらの新型SEs/SEIsの食中毒への関与については未だ明らかではないが, SEA-SEEによる食中毒はブドウ球菌食中毒の95%とされており, 残る5%の型別不明食中毒はこれら新型毒素によって発生している可能性がある.

本研究では, 以前にOmoeら [5] が報告したSE/SEI遺伝子を検出するためのmultiplex PCRを改良し, 新たに報告されたSEsも検出できる系を確立すると共に, 本法を用いて食中毒事例株および健康ヒト鼻腔分離株のSE/SEI遺伝子保有状況の調査を行った.

#### 材料および方法

**菌株:** 本研究で使用した標準菌株を表1に示した. これらの標準菌株は, サザンプロットあるいはゲノム全塩基配列決定によりその保有するSE/SEI遺伝子が同定されているものである.

また, multiplex PCRによるSE/SEI遺伝子の検索には, 岩手大学農学部獣医学課程食品安全学研究室で保管している黄色ブドウ球菌菌株(食中毒事例由来株49株および健康ヒト鼻腔由来株124株)を用いた.

**ブドウ球菌の培養とDNA精製:** 黄色ブドウ球菌からのtotal DNA精製は, QIAamp DNA mini kitを用いて精製した. 黄色ブドウ球菌をBHI broth (Difco) で1夜振とう培養し, 培養液0.5mlを10Krpm, 30秒間遠心菌体を回収した. 菌体を180  $\mu$ lの20mM Tris/HCl pH 8.0/2 mM EDTA/1.2% Triton X-100/100  $\mu$ g/ml lysostaphin (SIGMA) に懸濁し, 37°C, 30分間処理して細胞壁を消化した後, キットのマニユ

アルに従ってDNAを回収した.

PCRに供する黄色ブドウ球菌は, HI agar (Difco) で一夜培養し, コロニーを形成させた. コロニーから滅菌爪楊枝で菌体を微量採取し, Lyse-N-Go PCR reagentを用いて溶菌後, PCRを行った.

**multiplex PCR:** multiplex PCRに用いたprimerの塩基配列とprimer set, および増幅産物のサイズを表2に示す. Omoeら [5] が報告したmultiplex PCR primersのうち, sen primersとfemB primersを新しい配列に変更し, 新たにses primersをset 1に, set primersをset 3に加えた. PCR反応はQIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用い, 0.2ml PCR tube中で総液量50  $\mu$ lの系で行った. PCR master mixは, 1 X Multiplex PCR mix/0.2  $\mu$  M each primerとし, 1-4 setのprimerを含むmaster mixを4種類調製した. 0.2ml PCR tubeにLyse-N-Go PCR reagent を5  $\mu$ l分注しておき, これに滅菌爪楊枝で菌体を微量懸濁し, サーマルサイクラーを用いて65°C, 30sec; 8°C, 30sec; 65°C, 90sec; 97°C, 180sec; 8°C, 60sec; 65°C, 180sec; 97°C, 60sec; 65°C, 60sec; 80°C, >180secの処理を行うことにより, 溶菌反応を行った. 溶菌終了後, 直ちにPCR master mixを添加し, 95°C15分を1サイクル, (1)94°C30sec(2)57°C90sec(3)72°C60secを35サイクル, 72°C10分を1サイクルのPCR反応を行った. PCR産物は4%アガロースゲル電気泳動後, 0.5  $\mu$ g/ml EtBrで染色してバンドの検出を行った. 泳動バッファーは0.5×TBE, アガロースはNuSieveR 3:1 agarose (CAMBREX),

表1 黄色ブドウ球菌標準菌株のSE/SEI遺伝子型

| 菌株        | SE/SEI遺伝子型   | Reference |
|-----------|--|-----------|
| 196E      | <i>sea, sed, selj, ser</i>                                   | 5         |
| S6        | <i>sea, seb, selk, selq</i>                                  | 5         |
| FRI 361   | <i>sec, sed, seg, sei, selj, sell, selm, seln, selo, ser</i> | 5         |
| FRI 326   | <i>see, selq</i>   | 5         |
| FRI 569   | <i>seh</i>   | 5         |
| N315      | <i>sec, seg, sei, sell, selm, seln, selo, selp, tst-1</i>    | 9         |
| Mu50      | <i>sea, sec, seg, sei, sell, selm, seln, selo, tst-1</i>     | 9         |
| MW 2      | <i>sea, sec, seh, selk, sell, selq</i>                       | 10        |
| Fukuoka 5 | <i>selj, ser, ses, set</i>                                   | 5         |
| RN4220    | <i>no se/sel gene</i>  | 5         |

マーカーは  $\phi$  x174/*Hae* III digest (TAKARA) を用いた。

### 成績および考察

種々のSE/SEI遺伝子を保有する標準菌株を用い、今回新たに設計したプライマーセットを加えたmultiplex PCRの正当性を確認した。今回改変を加えたプライマーセットによって検出された標準株のバンドパターンは、すべての株で全ゲノム塩基配列決定あるいはサザンブロットにより決定されたそれぞれの株のSE/SEI遺伝子型に完全に一致した(表1, 図1)。新たに加えた*ses*および*set*検出プライマーにより、*ses/set* 保有株 (Fukuoka 5株) のみに予測されるサイズの特異的なバンド (*ses*: 201 bp, *set*: 114 bp) が検出され、非保有株ではバンドは認められなかった。また、以前報告されたプライマーセットではバンドの蛍光強度が弱くなる傾向が見られた*seln* (448 bp) および*femB* (101 bp) のバンドも、今回改変したプライマーセットでは他のバンドの蛍光強度と同等のシグナルが観察された。

次いで、本multiplex PCRを用いて食中毒事例由来および健康ヒト鼻腔由来の黄色ブドウ球菌を対象に、SE/SEIおよび*tst-1* 遺伝子の保有状況を調査した。食中毒由来黄色ブドウ球菌49

株は全てがSE/SEI遺伝子を保有しており、11パターンのSE/SEI遺伝子型が観察された(表1)。これらの株のうち、従来食中毒に関与することが多いとされていた*sea*を保有する株は30株(61.2%)と、やはり今回の調査でも多数を占めていた。しかしながら、*sea*~*see*を保有しない食中毒由来株も11株存在し、新型SEs/SEIsによる食中毒事例の存在が示唆された。*ses* および *set* が検出されたのはHiroshima 3株, Hiroshima 10株, Hiroshima 13株(いずれも同一事例由来)の計3株であった。これらの菌株は、同時に*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*を保有していた。健康ヒト鼻腔由来株124株では96株(77.4%)にSE/SEI遺伝子が検出された。*sea*を保有する株は11株(8.9%)であり、SE/SEIs遺伝子型は32パターンの存在が確認された。食中毒由来株に比して、*sea* 遺伝子頻度が低く、さらにその遺伝子型は極めて多様性に富むことが明らかになった。しかしながら、健康ヒト鼻腔由来株では*ses* および *set* は検出されなかった(表3)。食中毒事例株、健康ヒト鼻腔由来株共に、複数のSE/SEI遺伝子を保有する株が多く、最大11種のSE/SEI遺伝子を保有する株も見られた。

今回、4系列のmultiplex PCRを同時に行うことにより、19種のSE/SEIと*tst-1* 遺伝子を網羅的に検出することのできるmultiplex PCRシステムを確立した。本システムは、内部陽性対照として*S. aureus*に特異的な*femA*あるいは*femB*遺伝子検出プライマーを各セットに加えることにより、DNA抽出の失敗や菌体に含まれるTaq polymerase阻害因子の影響により発生する偽陰性を排除することを可能としている。以前開発された方法では、*femB*を検出するプライマーセットの設計上、*femB*増幅産物のサイズが651 bpと大きく、増幅に安定性を欠く場合が見られた。今回、新たに設計した*femB*プライマーセットにより、安定した内部陽性対照評価が可能となった。また、黄色ブドウ球菌は菌体にTaq polymerase阻害因子を含み、単なる熱処理によるDNA抽出では偽陰性が発生する機会が多いことから、市販のスピンカラム

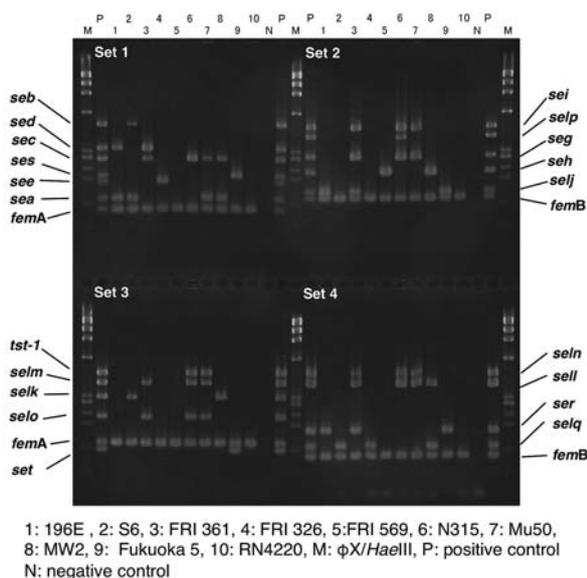


図1 multiplex PCRによる黄色ブドウ球菌標準株のSE/SEI 遺伝子検出

等を用いて精製したDNAをサンプルとして用いる必要があった [5]. 今回, DNA抽出ステップに市販の溶菌試薬であるLyse-N-Go PCR reagentを用いることにより, 簡易かつ短時間

にmultiplex PCRを行うことが可能になった. 本法を用いることにより, 黄色ブドウ球菌の保有するスーパー抗原性毒素遺伝子を簡易かつ短時間で同定することができる. 近年, SEA-SEE

表2 Multiplex PCR primerの塩基配列と増幅産物

| Gene         | Primer      | sequences (5' - 3')           | PCR product(bp) | PCR set | Reference  |
|--------------|-------------|-------------------------------|-----------------|---------|------------|
| <i>sea</i>   | SEA 3       | CCTTTGGAACGGTTAAAACG          | 129             | 1       | 11         |
|              | SEA 4       | TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC        |                 |         |            |
| <i>seb</i>   | SEB 1       | TCGCATCAAACCTGACAAAACG        | 479             | 1       | 11         |
|              | SEB 4       | GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC       |                 |         |            |
| <i>sec</i>   | SEC 3       | CTCAAGAAGTAGACATAAAAGCTAGG    | 273             | 1       | 11         |
|              | SEC 4       | TCAAAATCGGATTAACATTATCC       |                 |         |            |
| <i>sed</i>   | SED 3       | CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG   | 321             | 1       | 11         |
|              | SED 4       | TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC |                 |         |            |
| <i>see</i>   | SEE 3       | CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC | 180             | 1       | 11         |
|              | SEE 2       | TAACTTACCGTGGACCCTTC          |                 |         |            |
| <i>seg</i>   | SEG 1       | AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC        | 289             | 2       | 5          |
|              | SEG 2       | AGAACCATCAAACCTCGTATAGC       |                 |         |            |
| <i>seh</i>   | SEH 1       | GTCTATATGGAGGTACAACACT        | 215             | 2       | 5          |
|              | SEH 2       | GACCTTACTTATTTTCGCTGTC        |                 |         |            |
| <i>sei</i>   | SEI 1       | GGTGATATTGGTGTAGGTAAC         | 456             | 2       | 5          |
|              | SEI 2       | ATCCATATTCTTTGCCTTACCAG       |                 |         |            |
| <i>selj</i>  | SEJ 1       | ATAGCATCAGAACTGTTGTTCCG       | 152             | 2       | 5          |
|              | SEJ 2       | CTTTCTGAATTTTACCACCAAAGG      |                 |         |            |
| <i>selk</i>  | SEK 1       | TAGGTGTCTCTAATAATGCCA         | 293             | 3       | 5          |
|              | SEK 2       | TAGATATTCGTTAGTAGCTG          |                 |         |            |
| <i>sell</i>  | SEL 1       | TAACGGCGATGTAGGTCCAGG         | 383             | 4       | 5          |
|              | SEL 2       | CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC        |                 |         |            |
| <i>selm</i>  | SEM 1       | GGATAATTGACAGTAACAG           | 379             | 3       | 5          |
|              | SEM 2       | TCCTGCATTAATCCAGAAC           |                 |         |            |
| <i>seln</i>  | sen forward | GCTTATGAGATTGTTCTACATAGCTGC   | 448             | 4       | 12         |
|              | sen reverse | CATTAACGCCTATAACTTTCTCTTCATC  |                 |         |            |
| <i>selo</i>  | SEO 1       | TGTGTAAGAAGTCAAGTGTAG         | 214             | 3       | 5          |
|              | SEO 2       | TCTTTAGAAATCGCTGATGA          |                 |         |            |
| <i>selp</i>  | SEP 3       | TGATTTATTAGTAGACCTTGG         | 396             | 2       | 5          |
|              | SEP 4       | ATAACCAACCGAATCACCAG          |                 |         |            |
| <i>selq</i>  | SEQ 1       | AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC        | 122             | 4       | 5          |
|              | SEQ 2       | TTGTATTCGTTTTGTAGGTATTTTCG    |                 |         |            |
| <i>ser</i>   | SER 1       | GGATAAAGCGGTAATAGCAG          | 166             | 4       | 5          |
|              | SER 4       | GTATTCCAAACACATCTAAC          |                 |         |            |
| <i>ses</i>   | SES-kanoS   | TCGGAATATACTATGGGGCAAA        | 201             | 1       | This study |
|              | SES-kanoAS  | GGTCTAACTCTTGAATTGTAGGTTC     |                 |         | This study |
| <i>set</i>   | SET-kanoS   | GGTTGGTGATTATGTAGATGCTTG      | 114             | 3       | This study |
|              | SET-kanoAS  | GTAGGCTTGTCTAAAGGGCTATG       |                 |         | This study |
| <i>tst-1</i> | TST-3       | AAGCCCTTTGTTGCTTGCG           | 447             | 3       | 11         |
|              | TST-6       | ATCGAACTTTGGCCATACTTT         |                 |         |            |
| <i>fem A</i> | femA 1      | AAAAAAGCACATAACAAGCG          | 134             | 2, 3    | 12         |
|              | femA 2      | GATAAAGAAGAAACCAGCAG          |                 |         |            |
| <i>fem B</i> | femB-3      | CACATGGTTACGAGCATCAT          | 101             | 1, 4    | This study |
|              | femB-4      | TGTTTCGGGTGTTTTACCTT          |                 |         | This study |

表3 食中毒事例由来および健康ヒト由来黄色ブドウ球菌のSE/SEI遺伝子保有状況

| SE/SEI遺伝子型   | 黄色ブドウ球菌       |                 |                  |
|--|---------------|-----------------|------------------|
|  | 食中毒<br>n = 49 | 健康ヒト<br>n = 124 | Total<br>n = 173 |
| <i>sea</i>   | 4             | 1               | 5                |
| <i>sea, seb, selk, selq</i>  | 2             | 0               | 2                |
| <i>sea, seb, seh, selk, selq</i>                                   | 15            | 0               | 15               |
| <i>sea, sec, sell</i>  | 0             | 3               | 3                |
| <i>sea, sed, selj, ser</i>   | 2             | 1               | 3                |
| <i>sea, seg, sei, selm, seln, selo</i>                             | 0             | 1               | 1                |
| <i>sea, seg, sei, seln, tst-1</i>                                  | 2             | 0               | 2                |
| <i>sea, seg, seln, sell, tst-1</i>                                 | 0             | 1               | 1                |
| <i>sea, seg, seln, tst-1</i>                                       | 0             | 1               | 1                |
| <i>sea, seg, tst-1</i>   | 0             | 1               | 1                |
| <i>sea, seh, selk, selq</i>  | 5             | 2               | 7                |
| <i>seb</i>   | 0             | 2               | 2                |
| <i>seb, seg, sei, selm, seln, selo</i>                             | 0             | 7               | 7                |
| <i>seb, seh</i>  | 4             | 2               | 6                |
| <i>seb, selk, selq</i>   | 0             | 2               | 2                |
| <i>seb, selk, selp, selq</i>                                       | 0             | 1               | 1                |
| <i>seb, selp</i>   | 4             | 8               | 12               |
| <i>seb, selk, selp, selq</i>                                       | 0             | 1               | 1                |
| <i>sec, sel, seg, sei, selm, seln, selo</i>                        | 0             | 3               | 3                |
| <i>sec, sell, seg, sei, selm, seln, selo, tst-1</i>                | 0             | 1               | 1                |
| <i>sec, sed, seg, sei, selj, sell, selm, seln, selo, selp, ser</i> | 0             | 1               | 1                |
| <i>sed, seg, sei, selj, selm, seln, selo, selp, ser</i>            | 0             | 5               | 5                |
| <i>seg, sei</i>  | 0             | 1               | 1                |
| <i>seg, sei, selm, seln</i>  | 0             | 2               | 2                |
| <i>seg, sei, selm, seln, selo</i>                                  | 4             | 26              | 30               |
| <i>seg, sei, selj, selm, seln, selo, ser, ses, set</i>             | 3             | 0               | 3                |
| <i>seg, sei, selm, seln, selo, selk, tst-1</i>                     | 0             | 1               | 1                |
| <i>seg, sei, sell, selm, seln, selo, selp</i>                      | 0             | 1               | 1                |
| <i>seg, sei, selm, seln, selo, selp</i>                            | 4             | 2               | 6                |
| <i>seg, sei, seln</i>  | 0             | 1               | 1                |
| <i>seg, sei, seln, tst-1</i>                                       | 0             | 7               | 7                |
| <i>seg, tst-1</i>  | 0             | 1               | 1                |
| <i>seh</i>   | 0             | 1               | 1                |
| <i>selm, selo</i>  | 0             | 1               | 1                |
| <i>seln</i>  | 0             | 1               | 1                |
| <i>selp</i>  | 0             | 7               | 7                |
| no SE gene   | 0             | 28              | 28               |

を産生しない株によるブドウ球菌食中毒事例が国内外で報告されていることから [6-8], 本法はブドウ球菌食中毒の原因究明に有用であると考えられる。

#### 引用文献

- [ 1 ] Uchiyama T, Imanishi K, Miyoshi-Akiyama T, Kato H : Staphylococcal superantigens and the diseases they cause, Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, J. E. Alouf et

- al. eds, 3rd ed., 830–843, Academic Press, Burlington, MA (2006)
- [ 2 ] Lina G, Bohach GA, Nair SP et al. : Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis, 189, 2334–2336 (2004)
- [ 3 ] Thomas DY, Jarraud S, Lemercier B et al. : Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun, 74, 4724–4734 (2006)
- [ 4 ] Ono HK, Omoe K, Imanishi K et al. : Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. Infect Immun, 76, 4999–5005 (2008)
- [ 5 ] Omoe K, Hu D-L, Takahashi-Omoe H et al. : Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiol Lett, 246, 191–198 (2005)
- [ 6 ] Jorgensen HJ, Mathisen T, Lovseth A et al. : An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol Lett, 252, 267–272 (2005)
- [ 7 ] 牛水真紀子, 高畑寿太郎, 熊谷正憲 他. エンテロトキシンA～E非産生の黄色ブドウ球菌が原因と推定された家庭内食中毒事例—仙台市. 病原微生物検出情報 26, 20–21 (2005)
- [ 8 ] Omoe K, Hu D-L, Takahashi-Omoe H et al. : Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun, 71, 6088–6094 (2003)
- [ 9 ] Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I et al. : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet, 357, 1225–1240 (2001)
- [10] Baba T, Takeuchi F, Kuroda M et al. : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet, 359, 1819–1827 (2002)
- [11] Becker K, Roth R, Peters G : Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* : Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol, 36, 2548–2553 (1998)
- [12] Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ et al. : Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPI<sub>bov</sub> are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. J Med Microbiol, 54, 401–411 (2005)
- [13] Mehrotra M, Wang G, Johnson WM : Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol, 38, 1032–1035 (2000)