

## オートシーケンサーを用いたPCR産物の遺伝子解析

はじめに

従来まで遺伝子配列の解析は放射性物質を使用するため特殊な施設を必要とし、またその放射性物質の半減期のため短期間のうちに使用しなければならなかった。近年、放射性物質に換わり蛍光物質を使用するオートシーケンサーが開発された。コンピューターを使用することにより、蛍光ラベルした反応生成物を電気泳動するだけで遺伝子配列の読みとりまで自動的に解析を行うことが可能となった。放射性物質を使用しないため一般の研究室にも設置が可能で、蛍光物質は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存すれば長期間の使用にも耐え、サンプル数の少ない研究室でも経済的に遺伝子解析が行えるようになった。また、近年の分子生物学の進歩によりPCRとこのオートシーケンサーを組み合わせることによって短期間に多数のサンプルの遺伝子解析を可能にした。平成8年度より当衛生研究所にもオートシーケンサーが設置されそれを使用した遺伝子解析が今後期待されるが、今回はオートシーケンサーを用いたPCR産物の遺伝子解析方法について紹介する。

### PCR産物の遺伝子解析

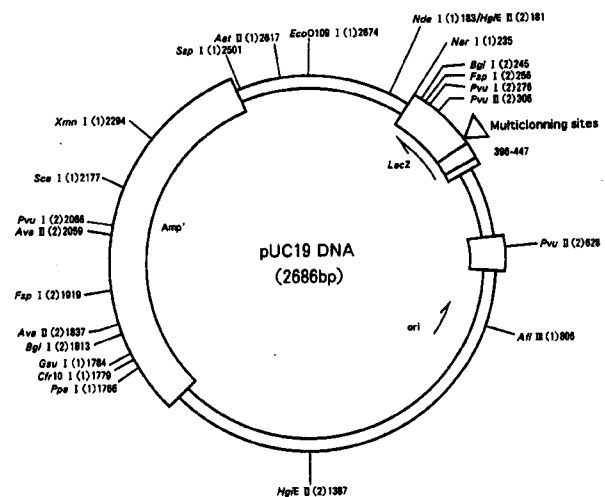
#### 1. PCR産物の精製

PCRは $50\mu\text{l}$ の系を用いて実施する。PCR法の原理については衛研、技術情報VOL.15 No.1を参照されたい。PCRの後、少量のPCR産物をアーガロスゲル電気泳動を行い目的のバンドを確認する。PCR産物が目的とするバンド1本の場合は通常フェノール、クロロホルム処理を行いエタノール沈殿の後、少量のTris-EDTA(TE)に溶解し遺伝子解析のサンプルとする。目的とするバンド以外にバンドが存在する場合はPCR産物全量をアーガロスゲル電気泳動を行い目的のバンドを切り出し、市販のDNA精製キット(タカラEasy Trap等)を用いて精製する。

#### 2. PCR産物のプラスミッドベクターへの単離(クローニング)

(1)PCR産物のプラスミッドベクターへの挿入(ライゲーション)

PCR産物のシーケンスを行うためのプラスミッドベクターの条件は 1)大腸菌に対して複製開始点を持つ 2)薬剤耐性遺伝子を持つ 3)クローニングサイトとシーケンスのためのプライマーサイトを持つ3つの条件が必要である。プラスミッドは大腸菌に認識される複製開始点を持つため独立して菌体内で増殖することができる。この性質を利用すれば本来大腸菌とは無関係なDNA断片をプラスミッドに挿入し、求めるDNA断片をプラスミッドとともに大腸菌に複製させることが可能となる。プラスミッドを大腸菌に入れる場合プラスミッドが入っていない大腸菌の方が圧倒的に大多数なので、その中にごくわずかだけ含まれるプラスミッド保持菌を選択的に増殖させる必要がある。そこでアンピシリンなどの薬剤耐



#### Multicloning sites

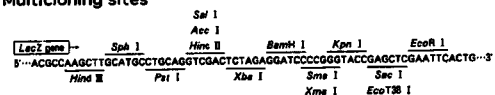


図1 pUC19プラスミッドDNA

性遺伝子を持ったプラスミッドを使用する。クローニングサイトとは人工的にプラスミッドに導入された制限酵素配列でこの部位に外来のDNAが挿入される。さらにクローニングサイトの切断に用いる制限酵素配列はプラスミッド中に1カ所しか存在しないということも重要である。現在、実用化されているベクターの多くはこのような条件を満たす多数の制限酵素配列を1カ所に集めたマルチクローニングサイトを持っているものが普通である。また、外来DNAの入ったプラスミッドと挿入のないプラスミッドを簡単に区別できるようにマルチクローニングサイトがβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)の中に作られているベクターも多い(図1)。β-ガラクトシダーゼは、基質となるX-gal(5-Bromo-4Chloro-3Indolyl-β-D-Galactoside)とその誘導物質であるIPTG(Isopropyl-β-thiogalactopyranoside)が培地中に存在するとX-galが加水分解され大腸菌のコロニーを青色に変化させる。β-ガラクトシダーゼ遺伝子の中に外来DNAが入るとβ-ガラクトシダーゼが不活化されコロニーは白色となりプラスミッド中に外来遺伝子が入っていることを目で確

認できる。PCR産物をクローニングベクターに挿入する場合、PCR産物中にマルチクローニングサイトに存在する制限酵素部位が両端に必要となる。PCR産物の遺伝子配列中に適当な制限酵素配列がない場合PCRに使用するプライマー中に制限酵素配列を導入し再度PCRを行い人工的に制限酵素配列をPCR産物の両端に作成する(図2)。

最近、Taq DNAポリメラーゼで増幅したPCR産物の3'末端にはA(アデニン)塩基を1つ付加するという性質を持つことが明らかになった。この性質を利用してベクターをマルチクローニングサイト中の平滑末端を形成する制限酵素で切断し、その3'末端にT(チミン)塩基を付加したベクターが市販されている。このベクターはTベクターと呼ばれPCR産物のクローニングには好んで使用される。

(2)形質転換(トランスフォーメーション)

ベクターを用いて大腸菌に新たな遺伝情報を導入する技術のことで、塩化カルシウムで処理されたコンピテントセルと呼ばれる特殊な大腸菌を使用する。ベクターを導入された大腸菌はベクターの持つ遺伝情報をそのまま発現する。X-gal、IPTG、アンピシリンを含んだLB寒天培地に大腸菌を塗布すればトランスフォーメーションされた大腸菌だけがコロニーを形成しブルー、ホワイトセレクションにより外来遺伝子を導入されたコロニーかどうか容易に区別できる。外来遺伝子を導入されたホワイトコロニーを釣菌し、アンピシリンを含んだ培養液で37℃1晩振盪培養し、DNAを抽出しシーケンスサンプルとする。

3.シーケンス

DNAの塩基配列の決定は、初期にはマクサム、ギルバート(Maxam-Gilbert)法と呼ばれる塩基特異的の化学修飾とピペリジン分解とを組み合わせた方法で決定されていた。現在では、ヌクレオチドアナログとDNAポリメラーゼを用いたダイデオキシ(dideoxy)法で決定するのが一般的である。ダイデオキシ法の原理を図3に示した。DNAポリメラーゼの伸長反応は4種類のデオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)のアナログであるダイデオキシヌクレオチド3リン酸(ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)が3'末端に付加すると伸長反応は停止する。それぞれのダイヌクレオチドアナログとdNTP混合液、DNAポリメラ

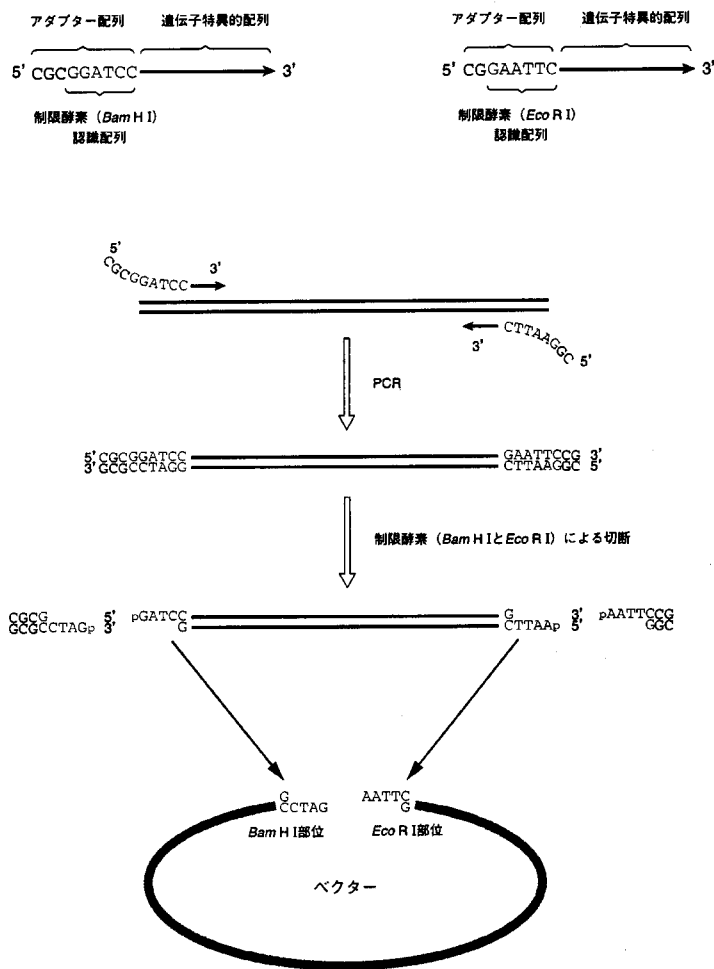


図2 PCR産物への制限酵素部位の導入

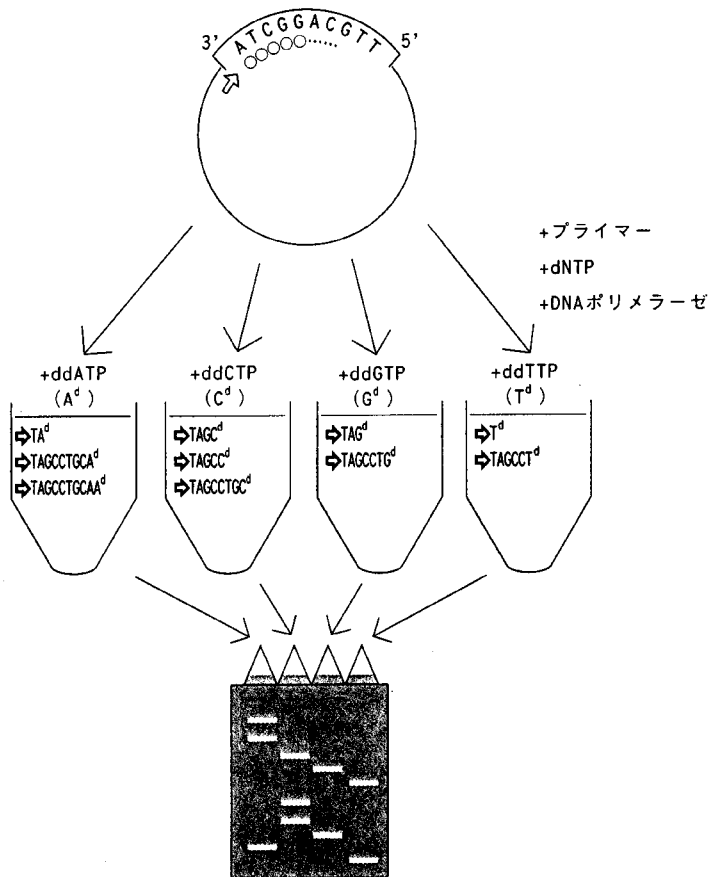


図3 ダイデオキシ法の原理

一ゼ、プライマーを含むチューブを4本作りDNAの伸長反応を行う。DNAの伸長反応の際にダイデオキシヌクレオチドが少量含まれていると伸長反応の途中でダイデオキシヌクレオチドが、ある確率で取り込まれ伸長が停止し、いろいろな長さの合成産物ができる。すなわち、ダイデオキシヌクレオチドを1種類ずつ含む各チューブでは、それぞれのダイデオキシヌクレオチドを3'末端に持ついろいろな長さのDNA鎖が合成される。それらの断片を1塩基の長さの違いを区別できる変性ポリアクリルアミドゲルにてA, C, G, Tの各チューブごとに電気泳動を行い塩基配列を決定する。放射性物質を使用する従来までのシーケンスでは、DNA伸長反応の際に取り込まれるdCTPに放射性物質をラベルし、反応の途中でDNA鎖に取り込ませる。電気泳動終了後にゲルをX線フィルムに露光させ現像後、その泳動パターンから塩基配列を決定する。オートシーケンサーによるシーケンスでは、放射性物質の代わりに5'末端を蛍光物質でラベルしたプライマーを使用しDNAの伸長反応を行う。蛍光でラベルされたシーケンス反応の生成物は電気泳動中に泳動層に組み込まれたレーザーと蛍光検出器と組み合わせて、

リアルタイムに泳動パターンを検出する。検出されたデータはコンピューターによって画像処理され、モニターに泳動パターンを映し出すとともに塩基配列のデータもプリントアウトすることができる(図4)。

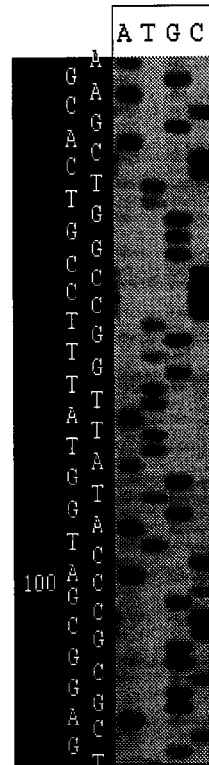


図4 オートシーケンサーによる遺伝子の解析画像

#### まとめ

今回紹介したようにPCRとオートシーケンサーを組み合わせることにより、PCRでうまく遺伝子を増幅させることができればウイルスだけではなくどのような遺伝子も塩基配列の決定が可能である。我々はHIV、インフルエンザ、小型球形ウイルス(愛知株)の遺伝子解析に使用しているが、それによってもたらされる情報は多い。ウイルスの由来や系統関係を明らかにすることは疫学や垂直感染、水平感染などの感染経路の解明に重要な情報を提供し、防疫対策に寄与する情報も多い。

現在、病原性大腸菌0157のベロトキシン遺伝子の解析を検討中であるが、今後、ウイルスにとどまらず様々な分野での遺伝子解析の応用が期待される。

#### (参考文献)

- 1) ラボマニュアル遺伝子工学 丸善株式会社
- 2) バイオ実験イラストレイテッド 秀潤社

(ウイルス部 森下高行)

# 腸管出血性大腸菌による食中毒

## はじめに

本年の5月以降、腸管出血性大腸菌O157による集団食中毒が岡山県、広島県、岐阜県、愛知県、堺市等で相次いで発生した。また、これに前後して多数の散発患者の発生も報告されている。この食中毒の特徴は下痢にともなって血便を訴え、場合によっては溶血性尿毒症候群(HUS)を呈し、重篤となる。この食中毒による死者も各地で報告されてきており、多数の重症患者と合わせて、大きな社会問題となっている。厚生省では問題の解決に向けて研究班を設置し、感染経路の解明、全国で発生した菌株のDNAの解析等を行い、食中毒の解明に乗りだしている。そこで今回は、腸管出血性大腸菌O157の食中毒について現在までの知見の概略等を紹介する。

## 腸管出血性大腸菌

腸管出血性大腸菌は、いわゆる病原大腸菌に属している。病原大腸菌は感染機序の違いによって、4つに分類される。即ち、血清型病原大腸菌(enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC)、毒素原性大腸菌(enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)、組織侵入性大腸菌(enteroinvasive *E. coli*: EIEC)の3種類と腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC)又はベロ毒素産生性大腸菌(Verocytotoxin producing *E. coli*: VTETC)と呼ばれるものを加えた4種類である。

大腸菌はO抗原とH抗原の組合せから血清型別が行われているが、血清型と4つの病原大腸菌の間には密接な関係がある。表に日本における1991年1月～1995年12月末日までに病原微生物検出情報事務局に報告された、腸管出血性大腸菌の発生状況のまとめを示した。各血清型の中でO157:H7は81.5%となり、他の血清型より断然多く検出されている。次いで多いのはO111:H-、O157:H-及びO157:HNTの血清型であり、その他の血清型もO26:H11を始めとして11の血清型が報告されている。これらは報告数では少ないものの今後の検出には注意が必要である。欧米において発症した腸管出血性大腸菌の血清型の

種類はさらに多く、30種類以上のものが報告されている。

腸管出血性大腸菌の発見の歴史は比較的新しく、1982年に米国で起こった食中毒事件例から見出されたのが始めといわれる。日本における集団発生例は1990年2月から3月にかけて発生した、埼玉県浦和市の某幼稚園における事例が最初のもので報告されている。その後、発生例はそれ程多くはないものの年に2～6例の発生が報告されてきた。

平成8年5月以降、腸管出血性大腸菌による集団食中毒が全国的に発生した。5月に岡山県邑久町で食中毒が発生してから全国各地で発生が報告され、7月には堺市の大集団発生が起きている。特に、堺市の発生は6,000人を越える患者の発生があり、死者や多くの重症患者が出ている。また、集団食中毒ばかりでなく、散発患者の発生も全国で連日のごとく報道されている。

## 感染源について

1982年の米国での腸管出血性大腸菌による集団食中毒の原因食品がハンバーガーと推定されて以来、カナダ、米国及び英国等では、ハンバーガーの他に、牛肉、生牛乳、ローストビーフ、七面鳥肉サンドイッチ等が原因食品として報告されている。しかしながら、他の食中毒事例においては、原因食品が特定されていない事例も多い。日本における腸管出血性大腸菌による食中毒では、1990年に発生した埼玉県の事例が井戸水と推定されているものの、他の事例においては特定されていなかった。本年度の全国における集団食中毒においても、原因食品不明が多かったなかで、わずかに岐阜県における発生ではサラダから、神奈川県での散発事例では生レバー肉から腸管出血性大腸菌O157が検出された。しかしながら、感染経路については、この2つの事例においても不明のままのようである。

このように腸管出血性大腸菌O157の原因食品は不明の場合が多い。この理由のひとつは腸管出血性大腸菌の食中毒の潜伏時間が4～10日と長く、給食等の食品が保存されていない場合が多いことがあげられる。また、少しの菌量の摂取でも発症するという感染力の強さから考えると、調理後の保存期間が短く、食品を汚染した腸管出血性大腸菌の十分な増殖がなくても、感染発症が成立することになる。原因食品を解明し、食中毒の予防を確立するためのひとつの手段として、給食食品等の保存期間の延長がこの度決められた。

## 二次感染

表 Verotoxigenic大腸菌の血清型と毒素型

血清型	毒素型(1991～1994年)				1991	1992	1993	1994	1995年*
	VT1	VT2	VT1+VT2	型別せず					
O157:H7	3	55	281	14	52	60	112	129	26
O157:H-	-	5	10	1	9	1	4	2	3
O157:HNT	-	4	8	5	1	1	7	8	-
O1:H20	1	-	-	-	-	-	-	1	-
O26:H-	-	-	1	-	-	-	-	-	4
O29:H11	4	-	-	-	2	1	-	2	-
O29:HNT	1	-	-	-	-	-	-	-	-
O29:H11	2	-	-	-	-	-	-	2	-
O114:HNT	3	3	15	1	22	-	-	-	-
O114:HNT-19	-	-	-	-	-	-	-	1	-
O115:HNT	1	-	-	-	-	-	1	-	-
O115:HNT-10	-	-	-	-	-	-	-	1	-
O115:HNT-2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
O128:H19	-	4	-	-	4	-	-	-	-
O128:H19	-	-	-	-	-	1	-	-	-
OUT:H-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
OUT:HNT	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	72	316	21	92	65	125	148	35

(病原微生物検出状況 第191号より)

\*:1995年12月25日現在報告数

今年度の腸管出血性大腸菌の患者発生に伴って、原因食品の給食を摂取していないと考えられる患者家族の中にO157の感染者が報告される場合が多く、これらの人々は二次感染者ではないかと考えられている。サルモネラや腸炎ピブリオ等の多くの食中毒菌の場合、食中毒の発症のための菌量は百万個或いはそれ以上が必要と考えられているのに対し、O157はそれよりはるかに少量の菌の摂取でも感染し発症するのではないかとされている。従って、たとえ汚染された食品を摂取しない場合でもヒトからヒトへの感染の機会はあると思われる。

#### ペロ毒素

腸管出血性大腸菌はペロ細胞に対してcytotoxicに働く毒素(ペロ毒素、VT)を産生する。ペロ毒素はVT1(Shiga-like toxin I)とVT2(Shiga-like toxin II)の志賀赤痢菌の毒素に類似した2種類があり、さらにVT2にはVT2vhとVT2vpがある。このうち、ヒトから分離された腸管出血性大腸菌が産生するのはVT1、VT2及びVT2vhである。VT2vp産生菌はブタの浮腫病から分離されている。

VT1はA及びBの2つのサブユニットから構成されており、Aサブユニットは酵素活性を持ち、Bサブユニットは細胞膜へ結合する。VT1は60Sリボゾームでの蛋白合成を阻害する。VT2もVT1と同一の生物活性と作用機序を示す。VT1は抗志賀毒素血清によって中和されるが、VT2はVT1とは異なり中和されない性質を持っている。腸管出血性大腸菌O157はVT1とVT2を同時に産生する株や、VT1又はVT2のどちらかの毒素を産生する株がある。

#### 腸管出血性大腸菌の分布

先に示したように、諸外国における腸管出血性大腸菌O157の食中毒の原因食品は食肉、あるいは食肉製品又は乳製品等である。米国やカナダ等の研究者の牛の保菌に関する調査では、O157がそれ程高い率ではないが検出されることを報告している。O157以外の腸管出血性大腸菌の保菌率はかなり高く、10~20%の報告もある。多くの研究者は成牛よりも仔牛の方が、高頻度に検出されることを指摘している。

我国における調査結果では腸管出血性大腸菌が牛や豚から検出されること、そのなかにはO157も含まれることが報告されている。

#### 検査法

患者の大便はDHL寒天、SIB寒天培地等の選択培地に塗抹し培養する。疑わしい多くの集落について大腸菌の生化学的性状及びOとH抗原について血清学的な検査を行い、O157の同定をする。同時に、ペロ毒素の産生性を逆受身ラテックス凝集反応、及びペロ毒素遺伝子の有無をPCR法等を用いて測定する。腸管出血性大腸

菌の決定にはペロ毒素の産生性の確認が絶対条件となる。

食品等からの検出には増菌培地にノボビオシンを添加したm-E C培地を用い、大便の場合と同様に選択培地を用いて検査を行う。食中毒の原因食品でも、O157の食品中の菌数は少ないと考えられるので、出来る限り多くの集落を釣菌して検査する必要がある。場合によっては、増菌培地等からのPCR法の応用を行い、O157の存在の可能性を確かめて、可能性のある場合には選択培地からの釣菌数を増して検査する必要がある。一般の食品の場合は食中毒の原因食品に比して、O157の菌数はさらに少ないと考えられることから、食品中のO157を効率よく検出する方法が米国等で考案され、多くのキットとして市販されてきている。これらのキットは食中毒の検索時にも応用される場合がある。

#### 予防対策

これまでに経験したこともないような、大規模な、また全国的な腸管出血性大腸菌O157による食中毒が発生していることから、往々にして特異的な予防対策が必要なのではないかと考え勝ちである。しかしながら、予防対策の基本は、あくまでも通常の食中毒の予防対策を実施し、O157の特異性から伝染病原菌における対策を取り入れていくことになる。食中毒予防対策の第1はこの病原菌を食品に汚染させないことにある。生肉の調理に使用したまな板は次の食品を扱う前に十分に洗浄し、場合によっては消毒をする。洗浄の十分でないまな板を他の食品、特に生で食する食品に使用しないことが大切である。第2には汚染しているかもしれない病原菌を増やさないこと。調理後の食品はすぐに摂食する。どうしても保存しなければならない場合には冷蔵庫に保存するが、冷蔵庫に入れば大丈夫と過信しないことが必要である。第3は食品を汚染しているかも知れない病原菌を殺菌する。O157は比較的熱には弱いと言われているが、食品の種類によっては食品の成分が熱から細菌を守るように働く場合があるので、十分な加熱調理が必要である。

次に、感染症菌としてのO157に対処するため、特に二次感染の防止のために、調理時は当然のこと排便後や食事の前には石けんを用いて流水にて手洗いを十分に行ない、下痢患者と幼児の混浴等をさけること、及び下痢発生時の患者大便が汚染した衣類等は十分に消毒する必要がある。

日本における腸管出血性大腸菌O157の異常な発生は、まもなく終息するかも知れない。しかしながら、腸管出血性大腸菌はO157のみではなく、この他にもO111やO26等と多彩である。今後、これらの動きも充分監視していく必要がある。(細菌部 齋藤 眞)

# サンプル数の決定法 (1)

全数調査が実施できない場合、調査対象からいくつかのサンプルを抽出して標本調査を行えばよいだろうか。

調査数を決める場合に考慮しなければならない要因は3つある。第1は調査対象(母集団)の大きさである。調査対象が1万以上であればサンプルを抽出しても残りの母集団の調査したい特性値、たとえばり患率が変わらない無限母集団とみなすことが出来る。1万未満であれば有限母集団からの抽出数を用いたほうがサンプル数を少なくすることが出来る。第2は、母集団の特性値の予想値である。以前に調査されていれば、その値を参考にしたり、本調査の前に小規模な予備調査を行って推定する。これらの情報が得られない場合には、安全性を考えてり患率を50%としてサンプル数を計算する。この場合必要なサンプル数が一番多くなる。第3は、特性値をどの程度の精度で求めるか、言い換えると土何%の誤差を認めるかである。精度を±2%以下にするには非常に多くのサンプル数が必要となる。ここで述べるサンプル数は、調査した後で回収した有効調査数のことで、実際に調査する数は回収率を考慮して決める。

## 1. 無限母集団からの抽出

り患率  $p$  ( $0 < p < 1$ ) の無限母集団からサンプル  $n$  人を抽出する場合、り患率は二項分布に従い、期待値  $np$ 、分散  $np(1-p)$  である。許容する誤差を  $e$  ( $0 < e < 1$ ) に設定すると、許容誤差範囲は  $ne$  となる。期待値が5より大きい場合は、正規分布で近似でき、95%の信頼度で式1を満足する。

$$ne \leq 1.96 \sqrt{np(1-p)} \quad (1)$$

従って、サンプル数は式2より求められる(表1)。

$$n \leq (1.96/e)^2 p(1-p) \quad (2)$$

なお、り患率が5%以下の場合は、二項分布を用いて正確なサンプル数を計算した。

また、表1の△印の場合は  $n$  が0人である確率が2.5%より大きいので、左片側検定を用いた。

## 2. 有限母集団からの抽出

母集団の人数を  $N$  とすると、り患率は超幾何分布に従う。期待値は二項分布と同じ  $np$  であるが分散が式3となる。 $(N-n)/(N-1)$  を有限修正項という。全数調査を行えば分散は0となりり患率は確定するが、抽出調査では曖昧さが残り、これが抽出誤差である。

$$\frac{N-n}{N-1} np(1-p) \quad (3)$$

$$n \leq \frac{N}{(N-1)(e/1.96)^2/p(1-p)+1} \quad (4)$$

$p=10$ 、 $e=2\%$  の時、無限母集団ではサンプル数は865人であるが、母集団が4,000人であればサンプル数は711人である(表2)。

表2 サンプル数(n)の決定 -有限母集団-

有限母集団 N	り患率 p	誤差 e	サンプル数 n
500	10%	2%	317
1,000	10%	2%	464
2,000	10%	2%	604
4,000	10%	2%	711
8,000	10%	2%	781
16,000	10%	2%	821
32,000	10%	2%	842

表1 サンプル数(n)の決定 -無限母集団-

p \ e	±1%	±2%	±3%	±4%	±5%	±6%	±7%	±8%	±9%
1%	△ 251								
2%	801	△ 126							
3%	1,151	301							
4%	1,501	401	184						
5%	1,851	490	230	126					
6%	2,167	542	241	136					
7%	2,501	626	278	157	100				
8%	2,828	707	315	177	114				
9%	3,147	787	350	197	126				
10%	3,458	865	385	217	139				
15%	4,898	1,225	545	307	196	137	100		
20%	6,147	1,537	688	385	246	171	126	101	
25%	7,203	1,801	801	451	289	201	147	113	
30%	8,068	2,017	897	505	323	225	165	127	
35%	8,740	2,185	972	547	350	243	179	137	108
40%	9,220	2,305	1,025	577	369	257	189	145	114
45%	9,508	2,377	1,057	595	381	265	194	149	118
50%	9,604	2,401	1,067	601	385	267	196	151	119

p:り患率(%) e:サンプル誤差(%) △:左片側検定 ※信頼度95% (保健情報室)