

that's
GOOD
science!

遺伝子解析法による微生物同定法

—レジオネラ属菌の
生菌迅速検出法を例にとって—

2013年9月11日

防菌防黴学会第40回年次大会

タカラバイオ(株) 吉崎美和

本日の内容

- **遺伝子解析法について**
 - 遺伝子解析法の種類と用途
 - 遺伝子解析法の特徴
- **PCRによる生菌検出法について**
 - EMA-PCR法の原理
 - LC EMA-qPCR法によるレジオネラ生菌検出
- **遺伝子解析法の活用例**

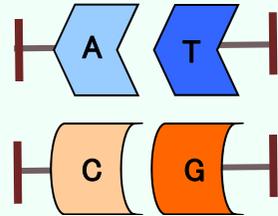
遺伝子とは

DNA: デオキシリボ核酸
||
遺伝子

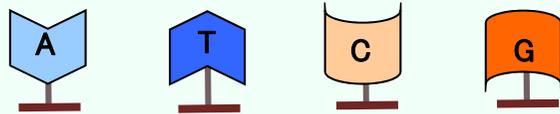
DNA

バクテリア
(O157、サルモネラ、セレウス菌 等)

相補結合



4種の物質

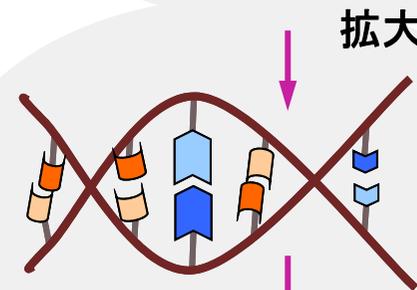


アデニン チミン シトシン グアニン

細菌ゲノムや毒素遺伝子は、4種物質の並び配列が異なり、固有配列をもつ領域がある。その固有配列を検出することで特定の微生物検出ができる。

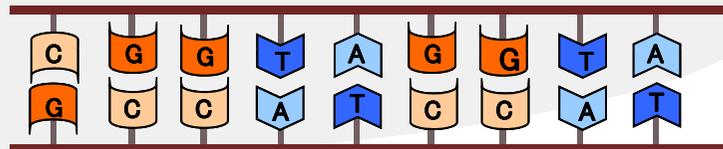


DNA二重らせん構造

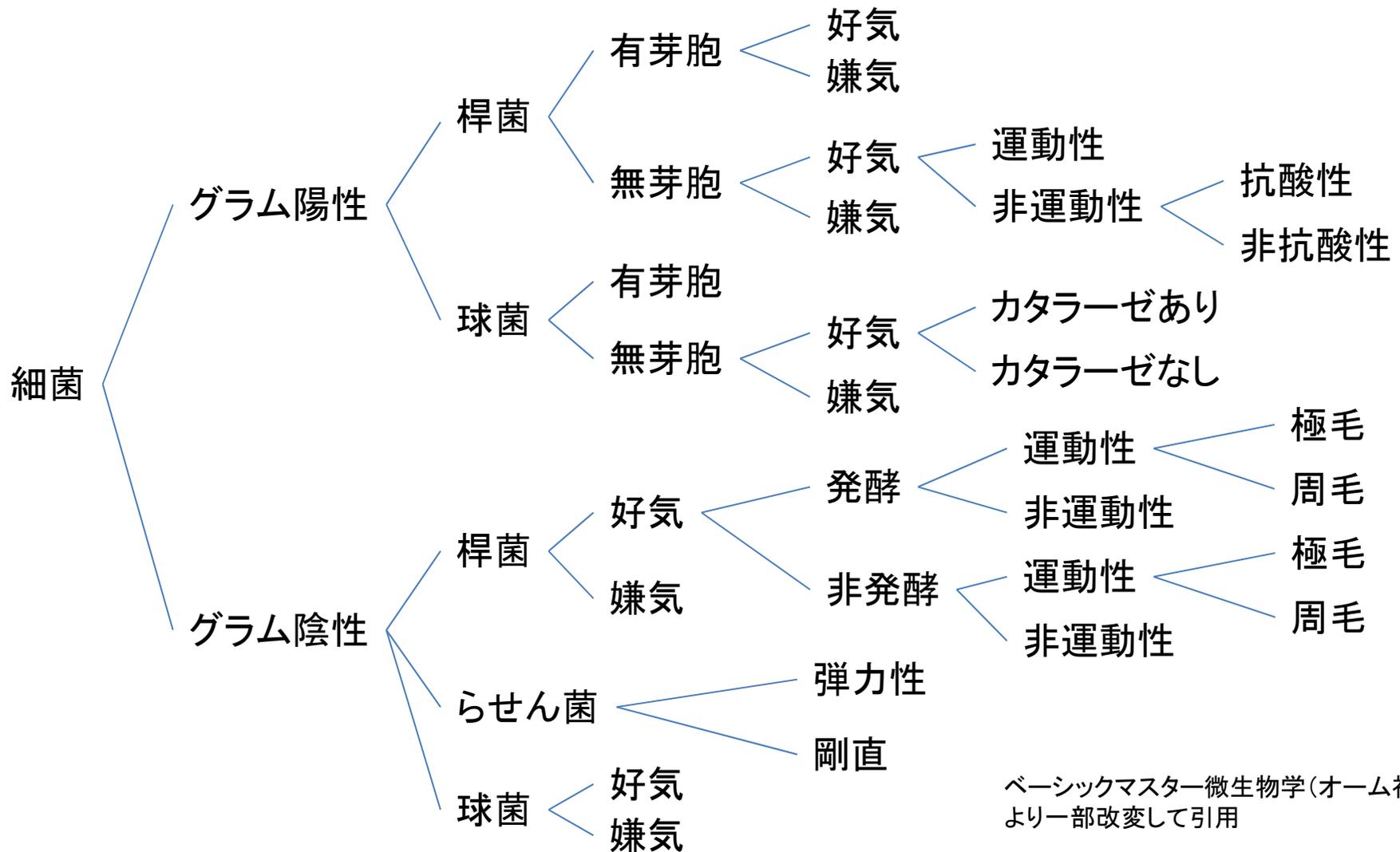


拡大

4種の物質からなるポリマー(重合体)



培養や生理試験による同定



ベーシックマスター微生物学(オーム社)
より一部改変して引用

培養法による検出

Species-Specificな手法

細菌A → 増菌培養 → 選択増菌培養 → 分離培養 → 同定試験

細菌B → 増菌培養 → 選択増菌培養 → 分離培養 → 分離培養 → 同定試験

細菌C → 選択増菌培養 → 分離培養 → 同定試験

細菌D → 増菌培養 → 選択増菌培養 → 選択増菌培養 → 分離培養 → 同定試験

- 検出対象の菌種によって、使用する培地や手順が異なる。

遺伝子解析法による検出1

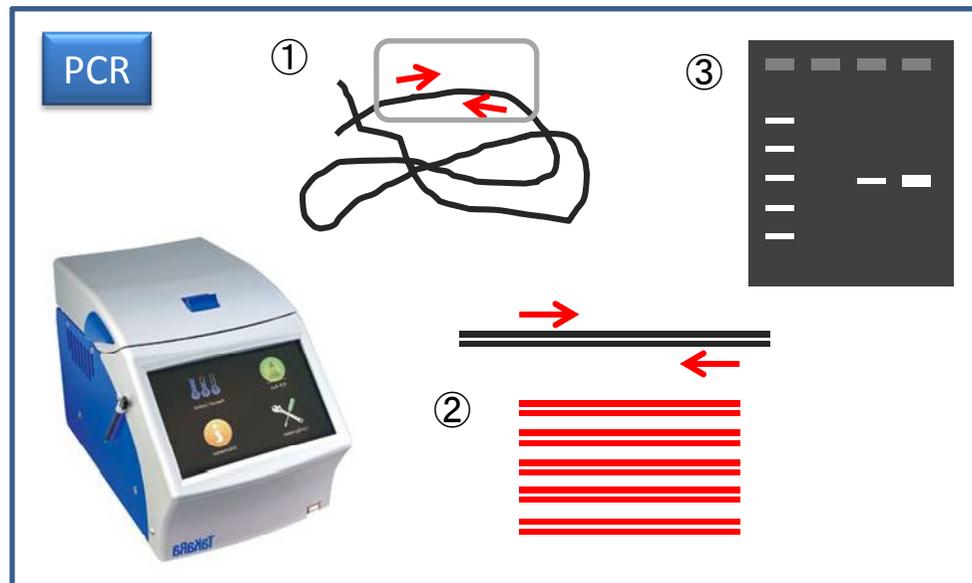
【対象菌種】

- 1種類
- 検出目的の菌種が1種類に特定される場合

“Universal” な手法

【解析手法】

- PCRやリアルタイムPCR法による対象菌種特異的な検出



遺伝子解析法による検出2

【対象菌種】

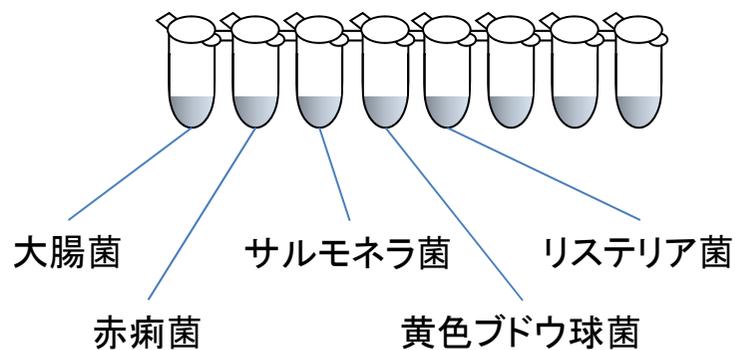
- 数種類
- 状況から数種の菌種に絞り込める場合

【解析手法】

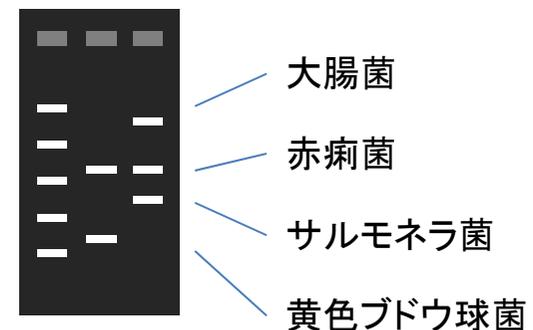
- PCRやリアルタイムPCR法による対象菌種特異的な検出

- 遺伝子解析は **Universal** な手法
→ 複数の菌種を同じ手法で検出可能

複数のPCR反応で複数菌種を同時検出



あるいは、
Multiplex PCRでも



遺伝子解析法による検出3

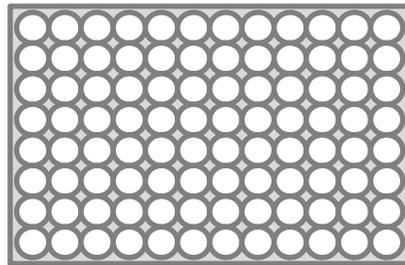
【対象菌種】

- 数10種類～
- 食中毒菌全般など

【解析手法】

- 各種アレイ技術を応用して多数の菌種をスクリーニング

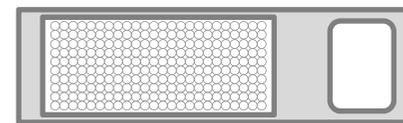
Primer Array



例えば・・・

- ✓ リアルタイムPCR用のプライマーを配置
- ✓ 最大96種を同時検出

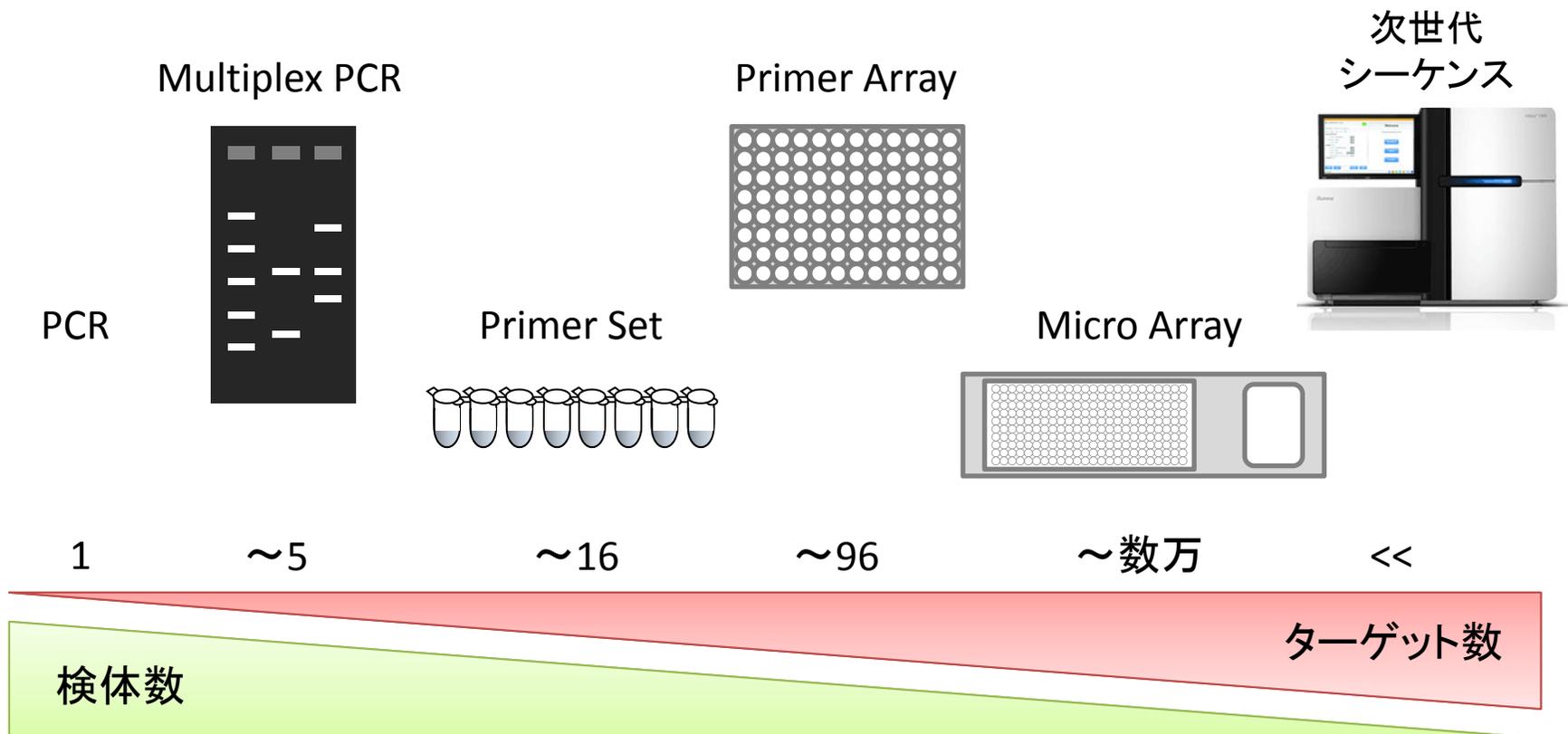
Microarray



マイクロアレイなら、
数万のターゲットをスクリーニング可能

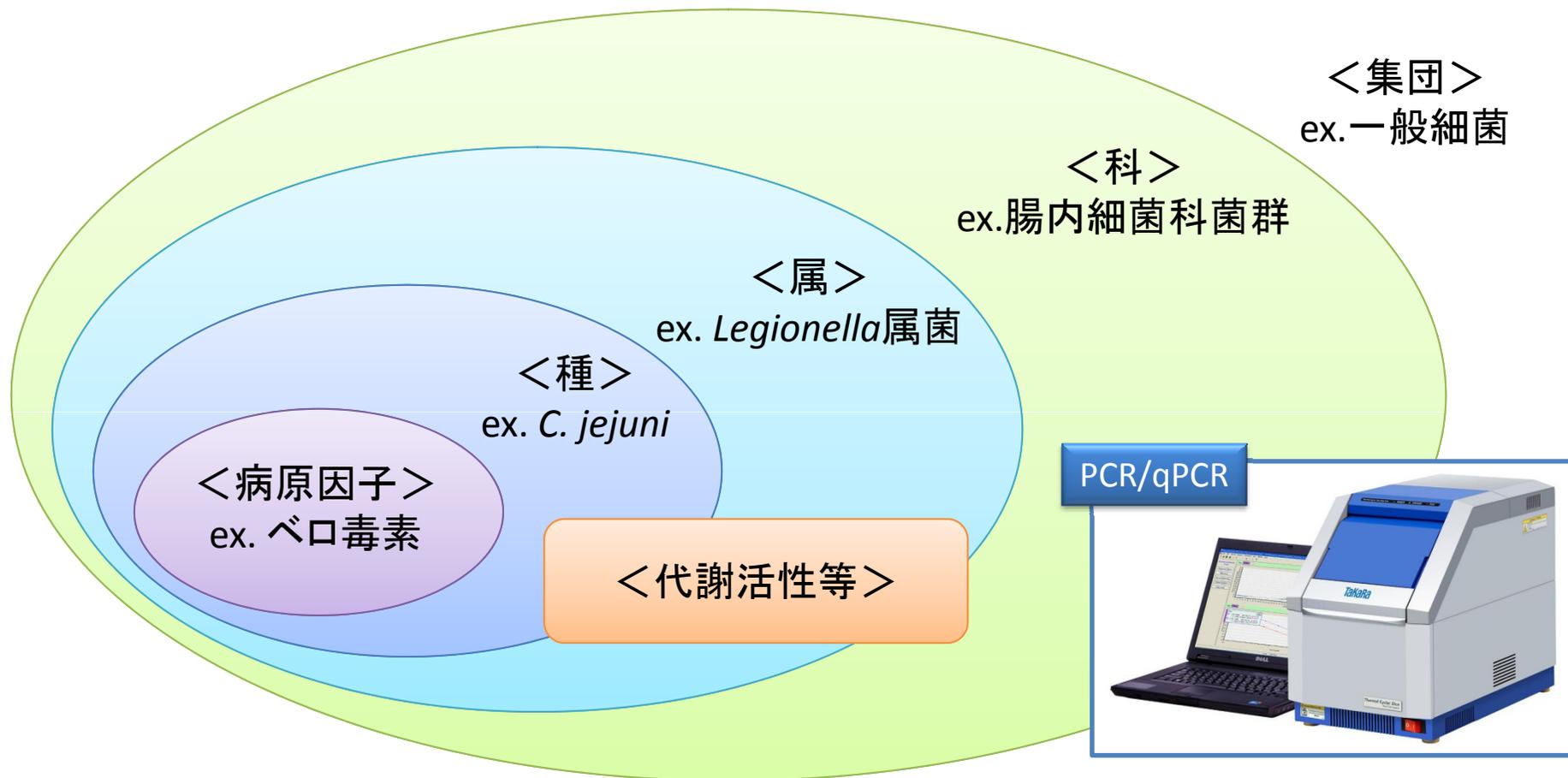
単一菌種の検出からスクリーニングまで

- 複数種の病原体を一括してスクリーニング可能。



特定遺伝子から集団まで

- 遺伝子の類似性で規定できる集団は、一括検出可能。



遺伝子解析法による同定

【対象菌種】

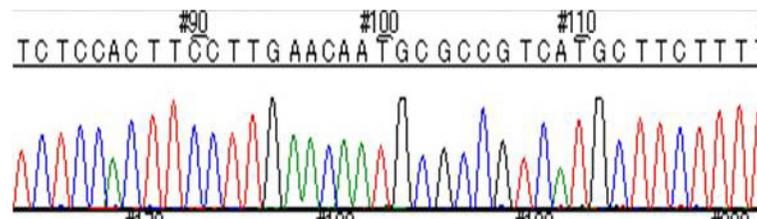
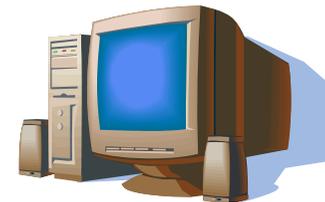
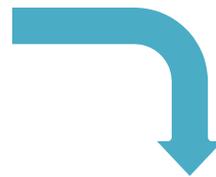
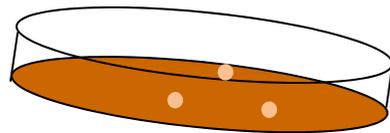
- — (Unknown)
- 対象菌種を絞り込めない場合

- 遺伝子解析は **Universal** な手法
→ 対象菌種を特定できない場合や
未知の菌種も解析可能

【解析手法】

- Ribosomal RNA領域の配列解析による微生物種の推定

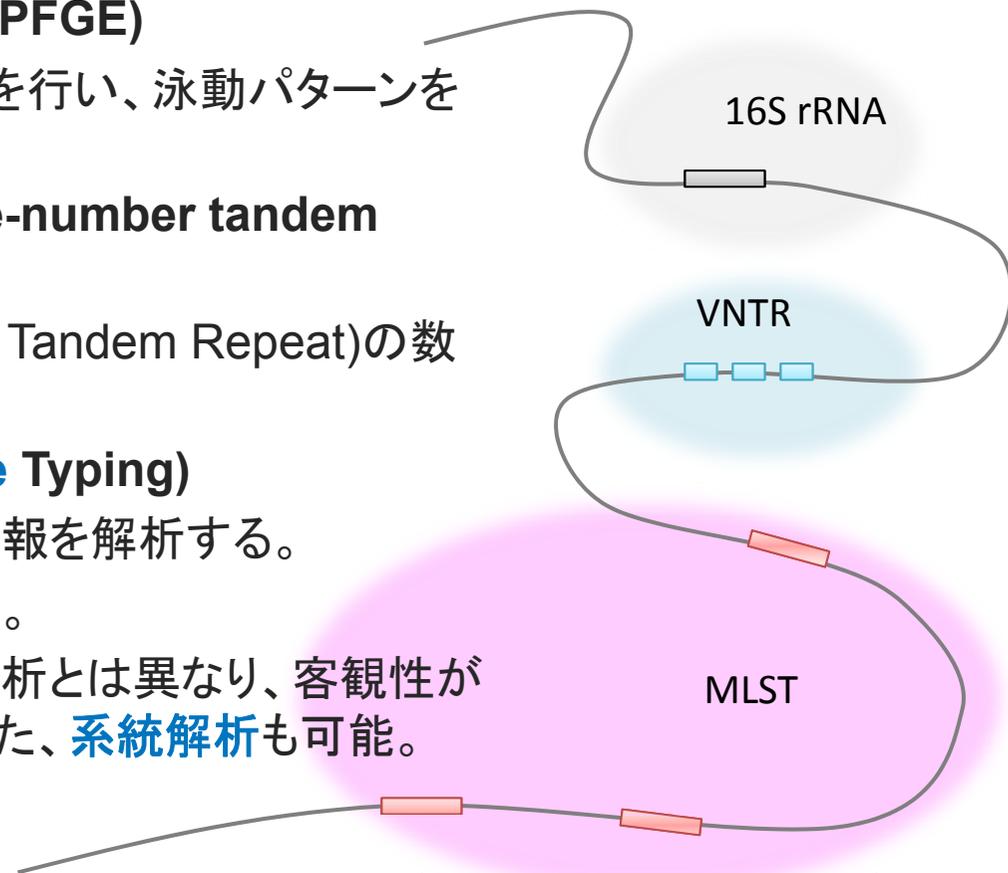
このコロニーは何？



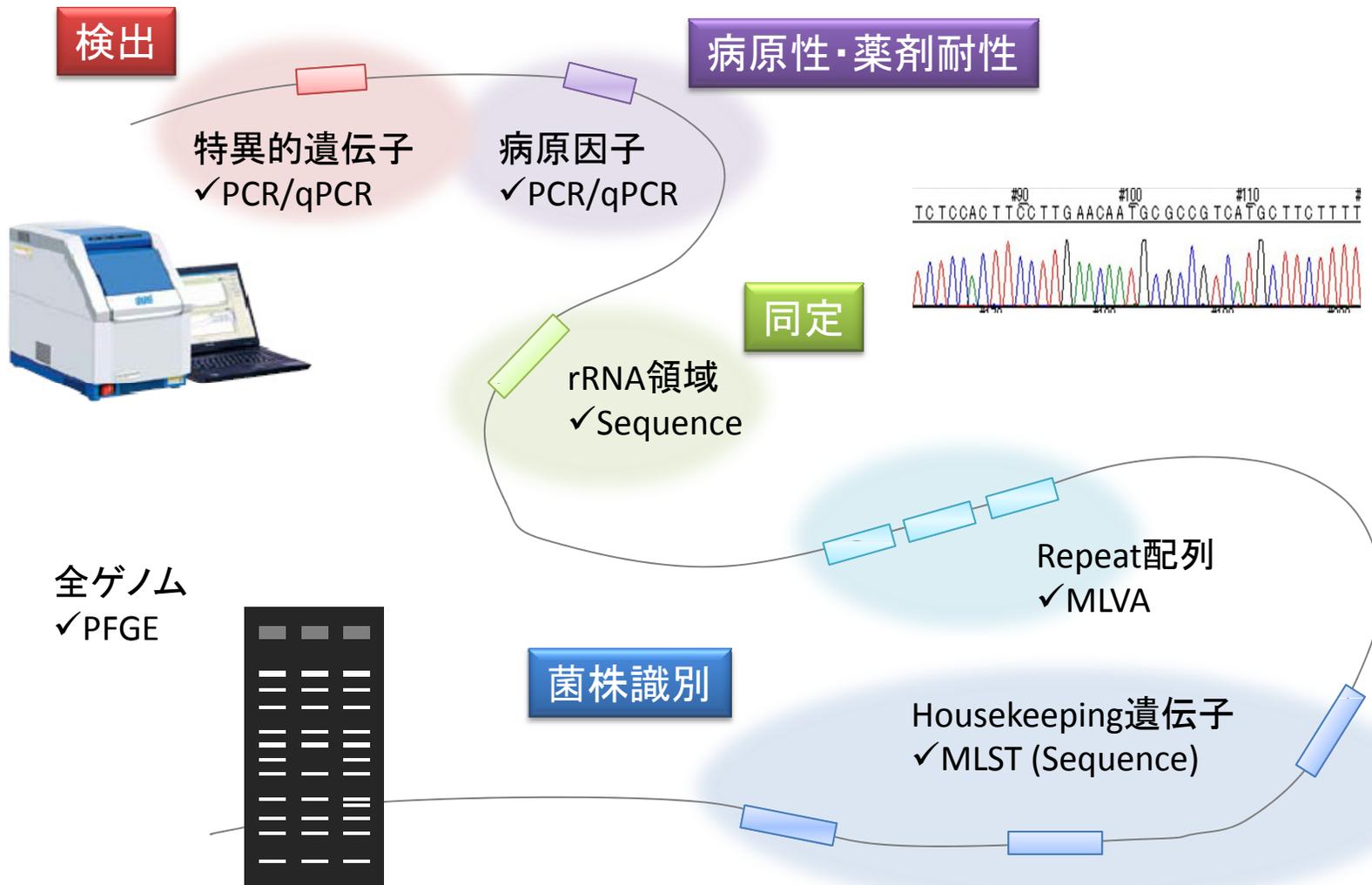
遺伝子解析法による菌株の識別

- 16S rRNA (**Sequence**, Mass)
 - 近縁種や菌株の識別は難しい。
- パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)
 - 制限酵素処理後、電気泳動を行い、泳動パターンを比較する。
- MLVA(Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis)
 - VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)の数を比較する。
- MLST (Multi Locus **Sequence** Typing)
 - 複数の遺伝子領域の配列情報を解析する。
 - Sequence Type (ST)を同定。
 - PFGEのようなフラグメント解析とは異なり、客観性が高く、情報の共有が容易。また、**系統解析**も可能。

- 遺伝子配列の**詳細情報**を利用すると菌株の識別も可能



遺伝子解析法のまとめ

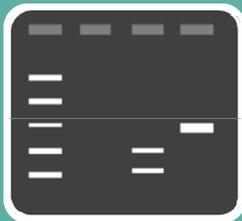


主な遺伝子解析手法



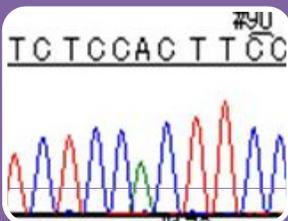
PCR/Real time PCR

- 病原因子遺伝子の検出
- シーケンス対象領域の増幅



制限酵素処理／電気泳動

- パルスフィールドゲル電気泳動
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)



シーケンス解析

- 16S rRNA配列解析による菌種の推定
- MLSTによる菌株の識別

- 遺伝子解析手法の多くは、これらの組み合わせ。
- **“Universal”** な方法で、多様な菌種の解析に対応可能。

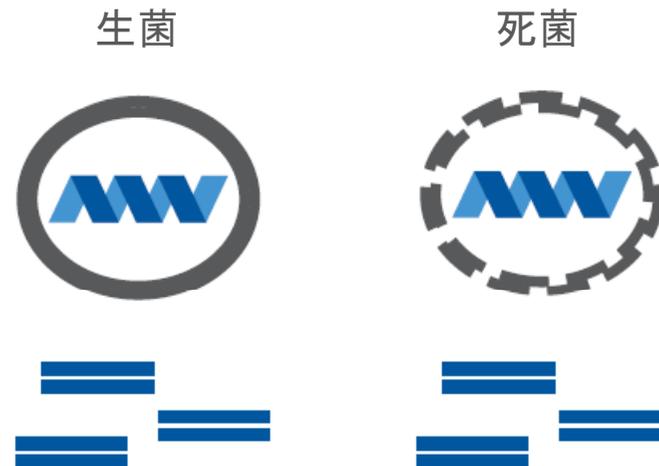
遺伝子解析法の特徴

長所

- 迅速・簡便・客観的
- 多種類の菌種を同時に検査できる。
- 遺伝子配列の詳細な解析により、菌種や菌株の識別も可能。

短所

- 通常、生菌と死菌を区別することはできない。
- 毒素量などを測定することはできない。

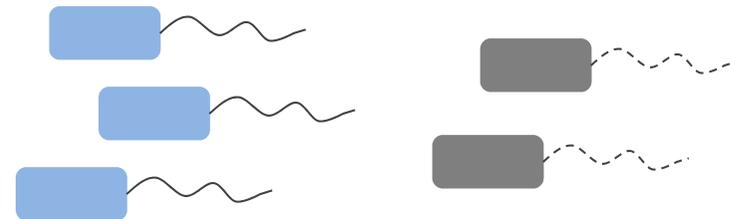


生きていても、
死んでいても、
DNAは存在する。

どちらもPCR結果は陽性・・・。

PCRによる生菌検出法 「EMA-PCR法」について

EMA-PCRは、PCRにより生菌を
選択的に検出できる画期的な
方法です。



Live or Dead ??

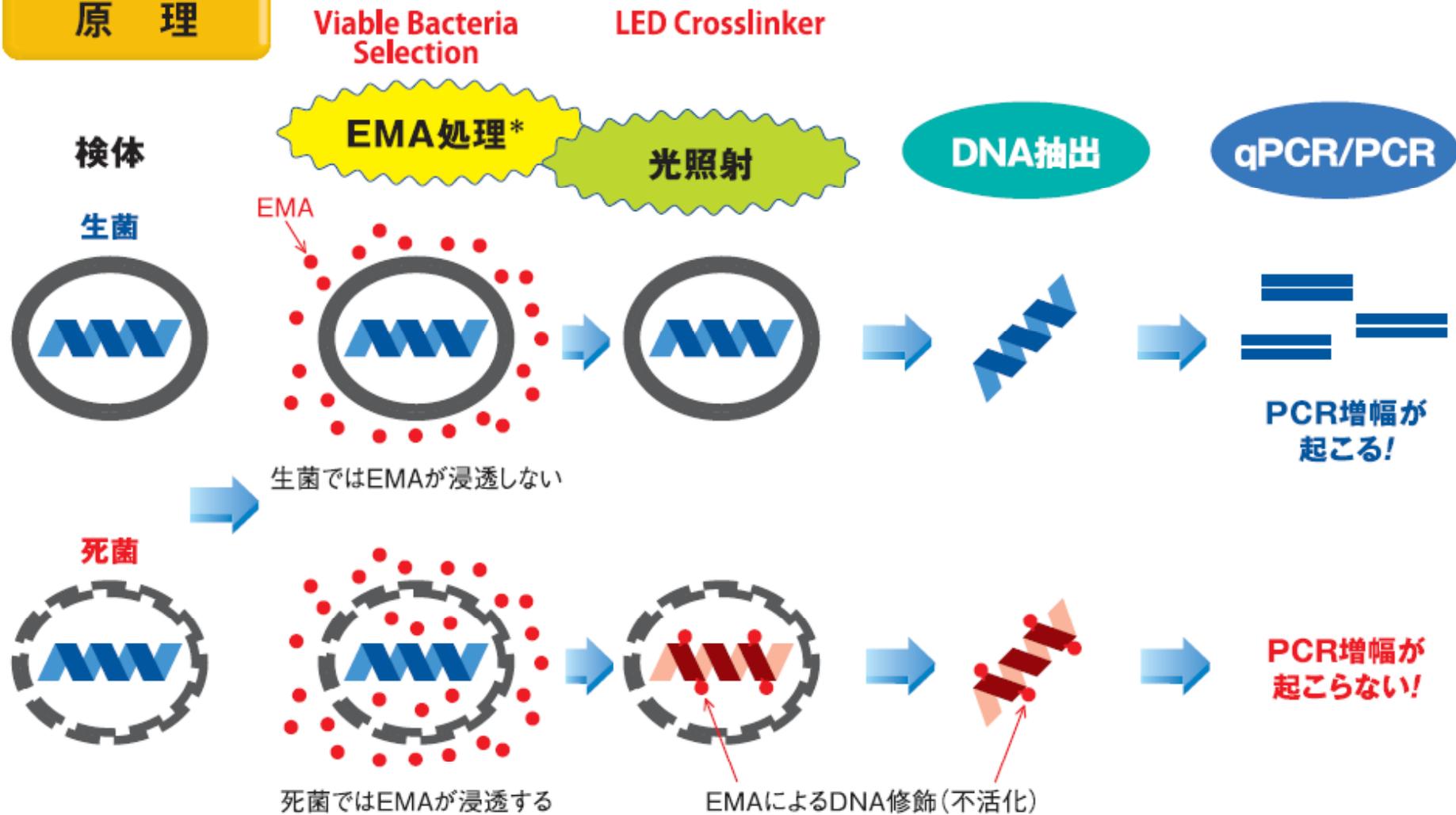


EMA-PCR法とは？

- **EMAとは？**
 - Ethidium monoazide
 - 可視光の光照射によりDNAに共有結合するインターカレート色素
- **EMA-PCR法とは？**
 - EMAの生菌と死菌への作用の違いを利用して、PCRにより生菌由来DNAを選択的に検出する方法。
 - 2003年にNogva HKらが報告 (Biotechniques.;34(4):804-813)
 - 細菌に対してEMA処理を行うと、
 - 生菌では、細胞膜に阻まれてEMAは菌内部に浸透しない。
 - 細胞膜が損傷している死菌には、EMAが浸透する。
 - つまり、死菌のDNAのみEMAによる修飾を受け、PCR増幅不能となる。

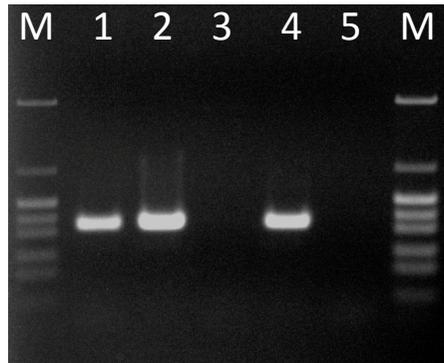
EMA-PCR法の原理

原理



EMA-PCR法の実験例： 生菌選択的な検出（エンドポイントPCR）

E. coli 生菌および死菌についてEMA処理の効果を確認



M: pHY Marker

1: 生菌 EMA処理(+)

2: 生菌 EMA処理(-)

3: 死菌 EMA処理(+)

4: 死菌 EMA処理(-)

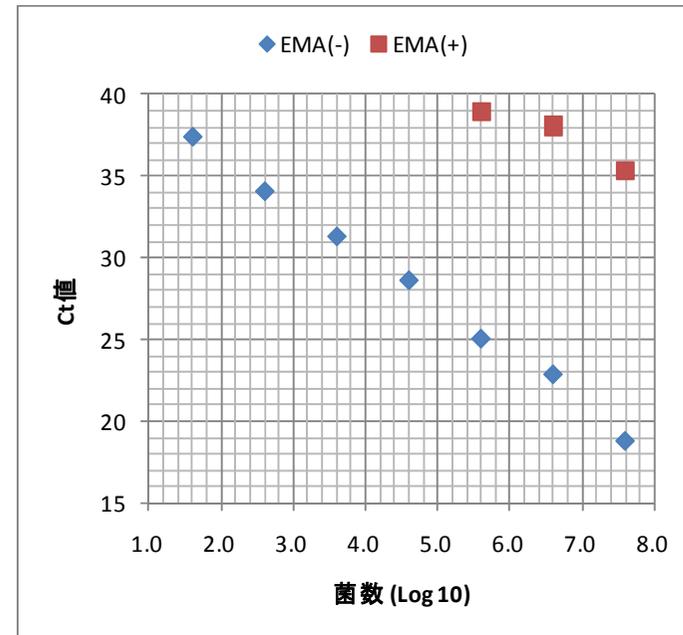
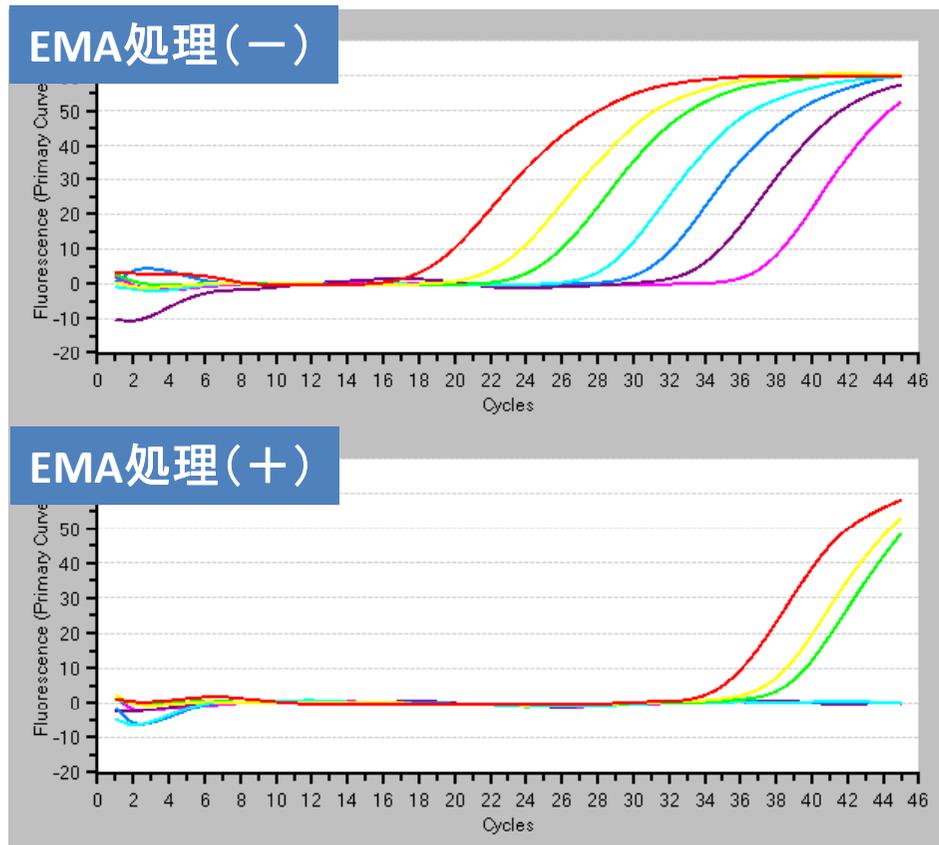
5: Negative Control

E. coli 生菌または死菌: 2×10^7 個
EMA処理 (Viable Bacteria Selection Kit 使用)
DNA抽出 (NucleoSpin Tissue XS使用)
PCR検出 (TaKaRa Ex Taq HS使用)
増幅サイズ: 1002bp

★EMA処理により、死菌由来のDNA増幅が抑制され、生菌のみが検出された。

EMA-PCR法の実験例： 死菌の抑制効果（リアルタイムPCR）

レジオネラ死菌についてEMA処理の効果を確認

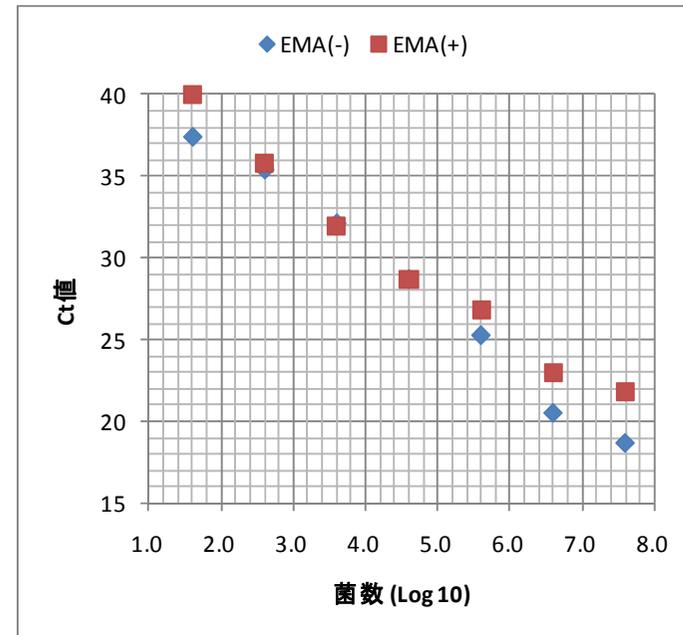
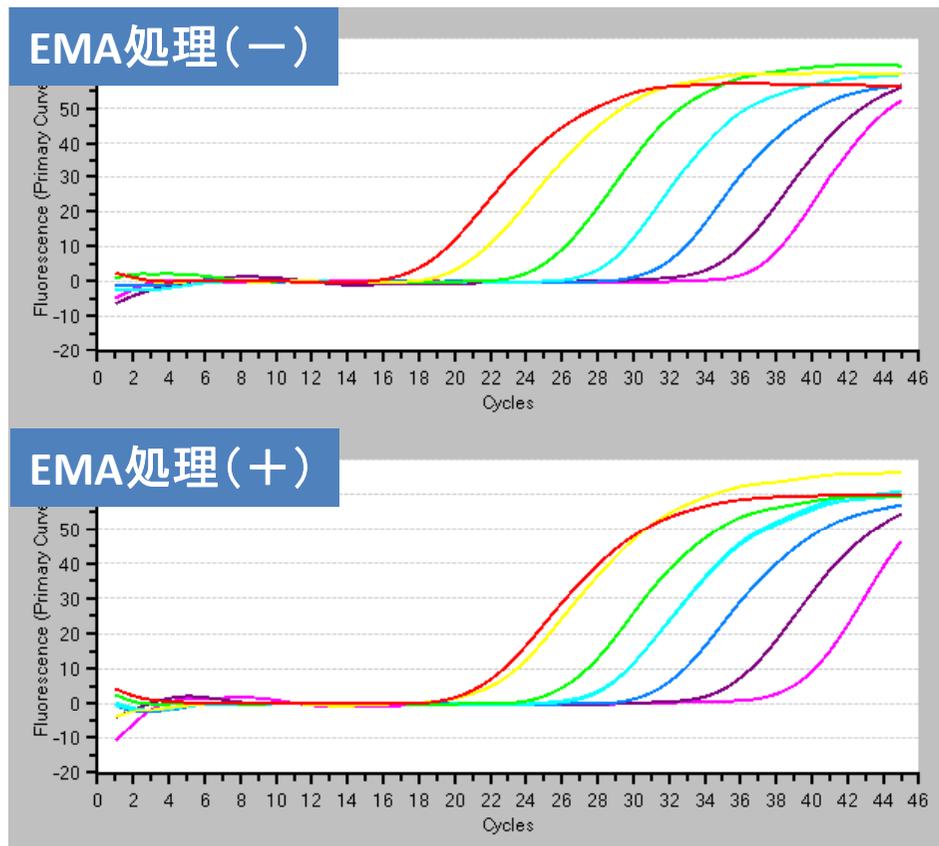


レジオネラ死菌： $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^7$ 個
EMA処理 (Viable Bacteria Selection Kit 使用)
DNA抽出 (NucleoSpin Tissue XS使用)
qPCR検出 (CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA)
Detection Kit Ver.2.0使用)

★少なくとも 4×10^4 個の死菌由来DNAの増幅を完全に抑制できることが確認された。

EMA-PCR法の実験例： 生菌への影響評価（リアルタイムPCR）

レジオネラ生菌についてEMA処理の影響を確認



レジオネラ生菌： $4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^7$ 個
EMA処理 (Viable Bacteria Selection Kit 使用)
DNA抽出 (NucleoSpin Tissue XS使用)
qPCR検出 (CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA)
Detection Kit Ver.2.0使用)

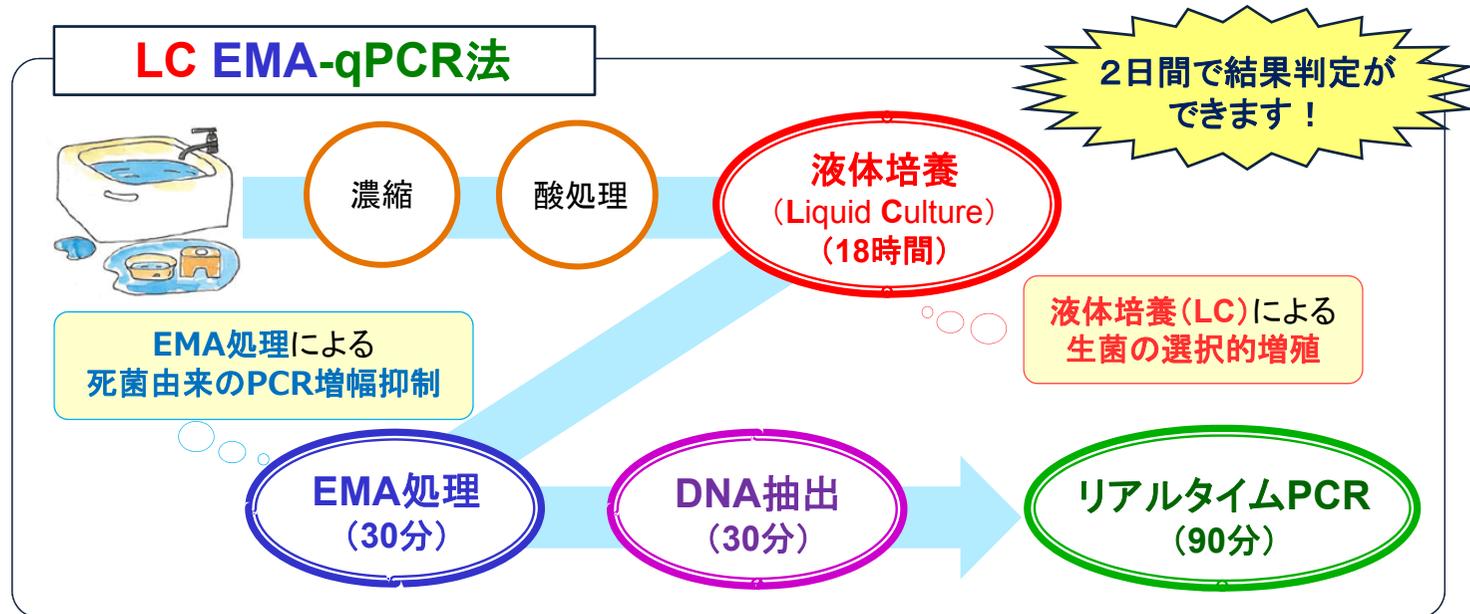
★EMA処理による検出感度の低下は認められなかった。

さらに確実かつ高感度に 「LC EMA-qPCR法」について

～レジオネラ属菌生菌迅速検出法への応用～



LC EMA-qPCR法とは？

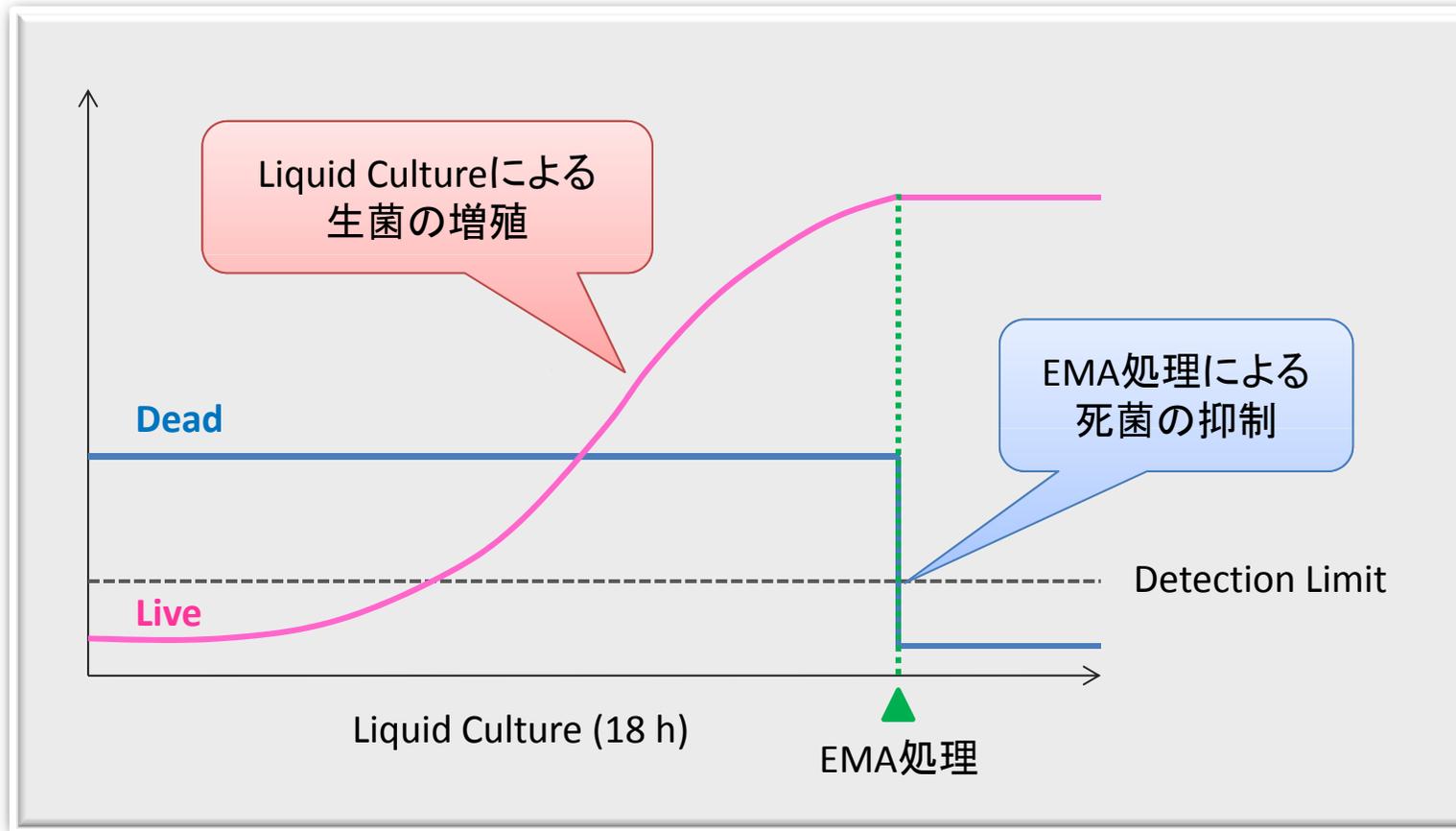


リアルタイムPCRと2つの技術

- ① 液体培養 (LC: Liquid Culture) による生菌の選択的増殖
- ② EMA処理による死菌由来DNAからのPCR増幅抑制

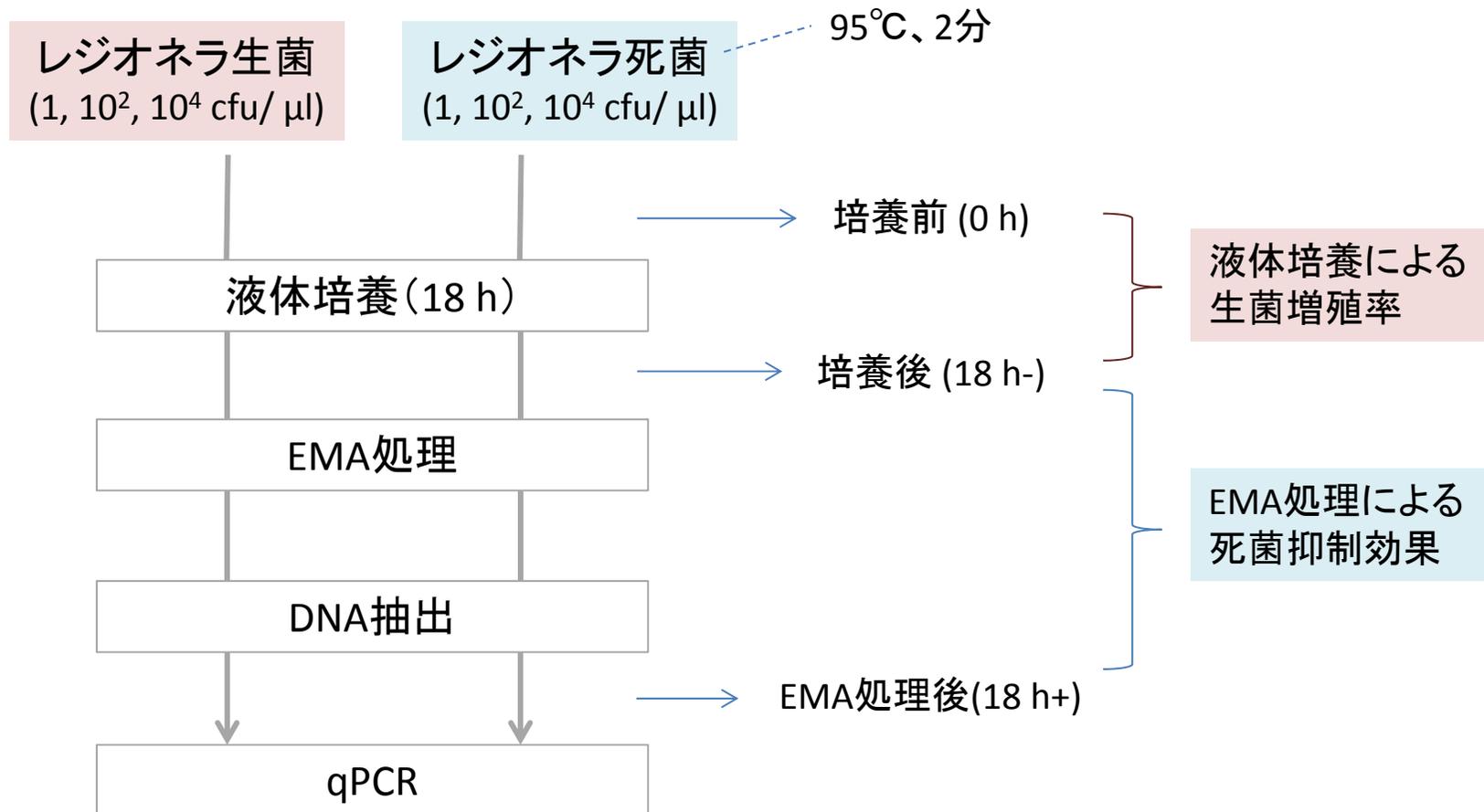
を組み合わせた確実かつ高感度な“生菌遺伝子迅速検査法”です。

LC EMA-qPCR法の原理



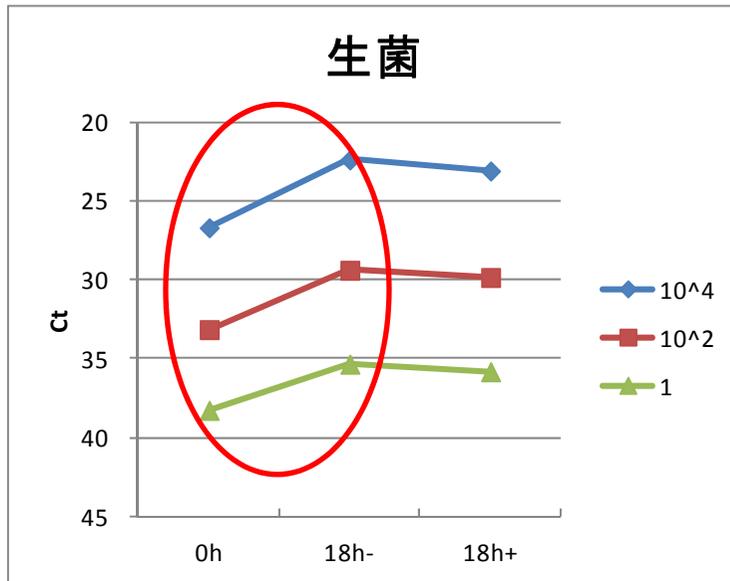
- 生菌は、液体培養により増殖し、EMA処理では変化しない。
- 死菌は、液体培養により増殖せず、EMA処理で抑制される。

レジオネラ純培養菌を用いたモデル実験

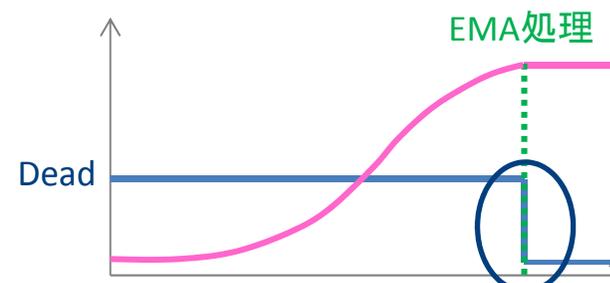
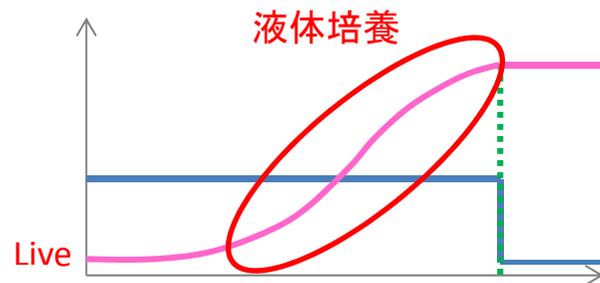
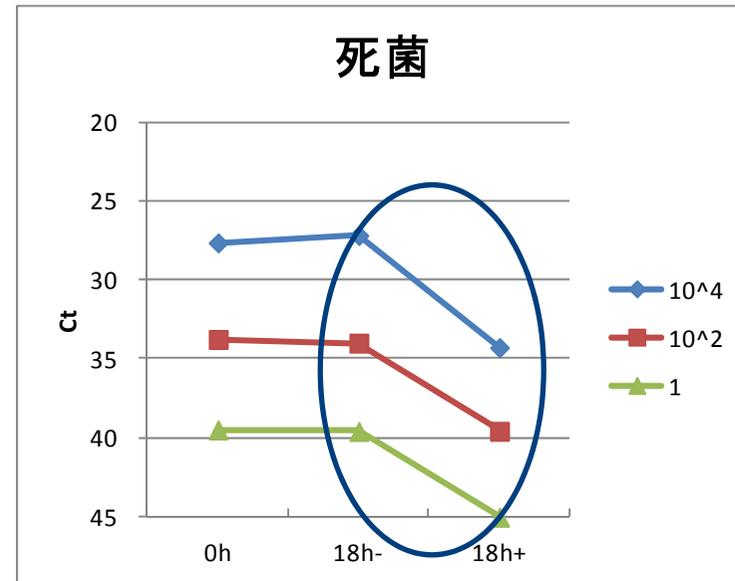


液体培養とEMA処理の効果

液体培養による生菌の増殖



EMA処理による死菌の抑制



評価試験結果のご紹介

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究
研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

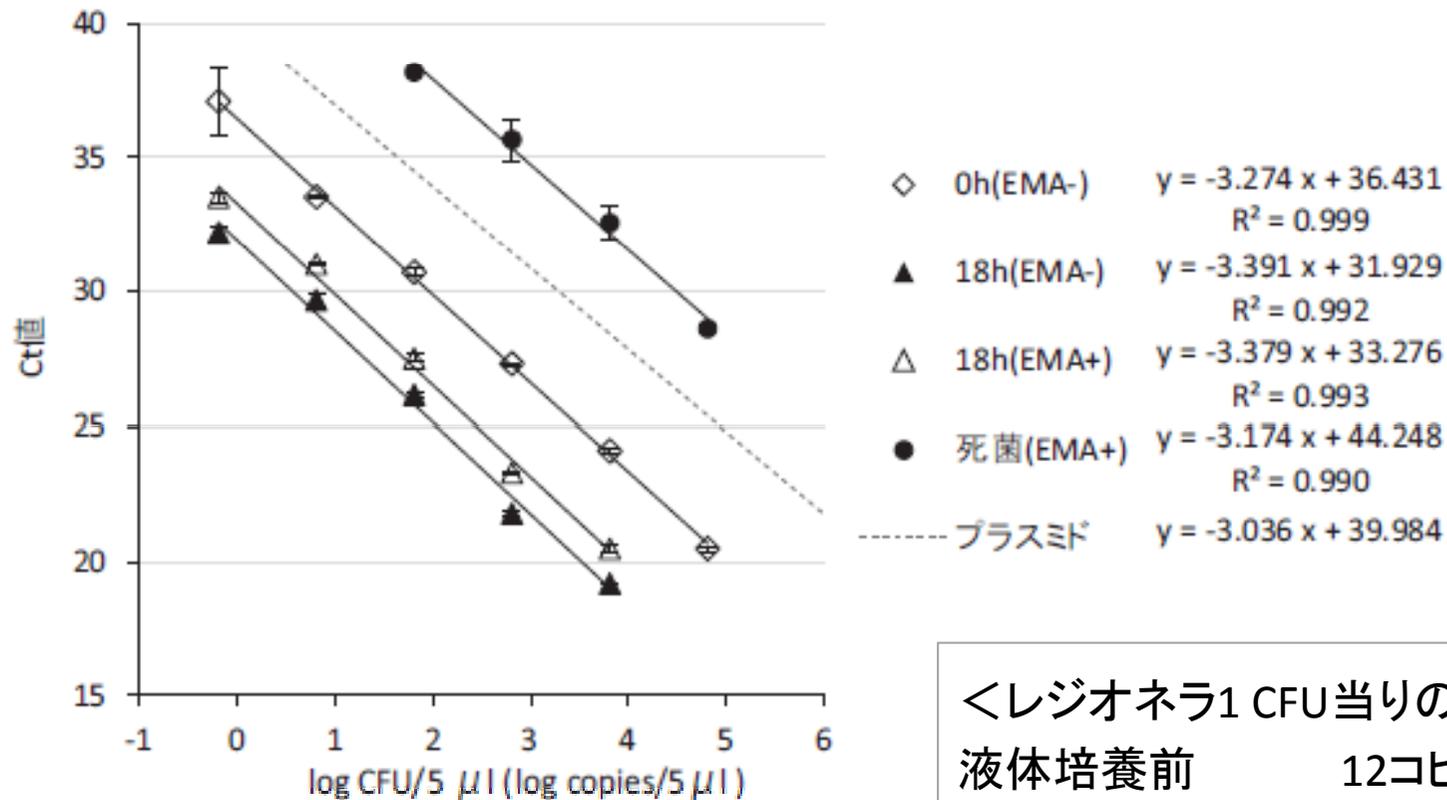
分担研究報告書

「液体培養(Liquid Culture)EMA-qPCR法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討」

研究分担者	○ 烏谷 竜哉	愛媛県立衛生環境研究所
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
研究協力者	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター
	金谷 潤一	富山県衛生研究所
	吉崎 美和	タカラバイオ(株) ドラゴンジェノミクスセンター

評価試験結果1

アメーバ培養レジオネラを用いた検量線



<レジオネラ1 CFU当りのコピー数>

液体培養前	12コピー
18時間培養後	270コピー
EMA処理後	100コピー

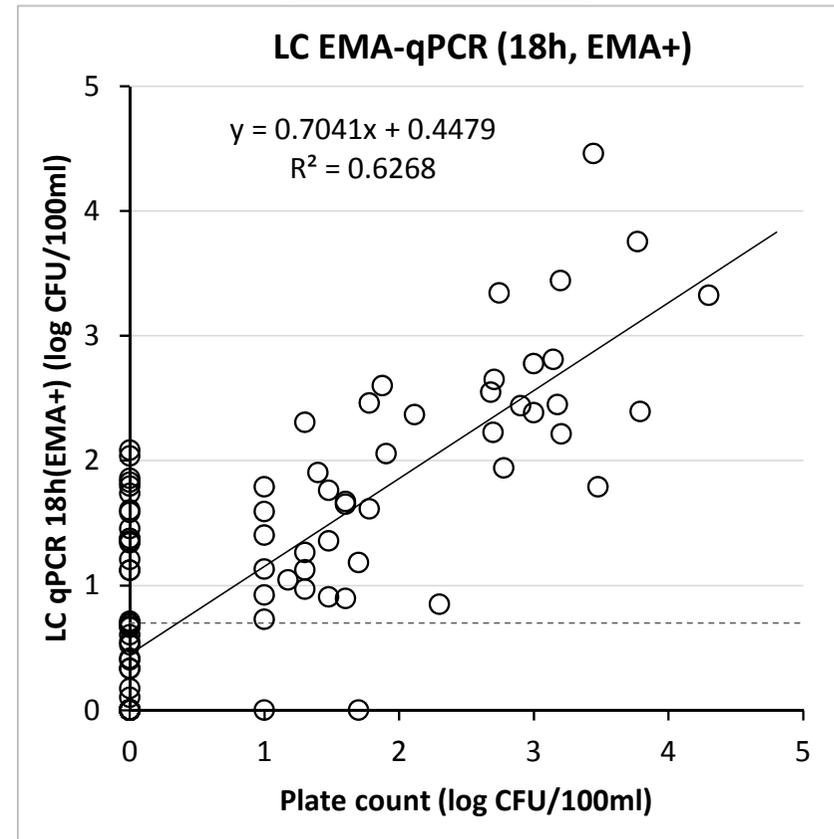
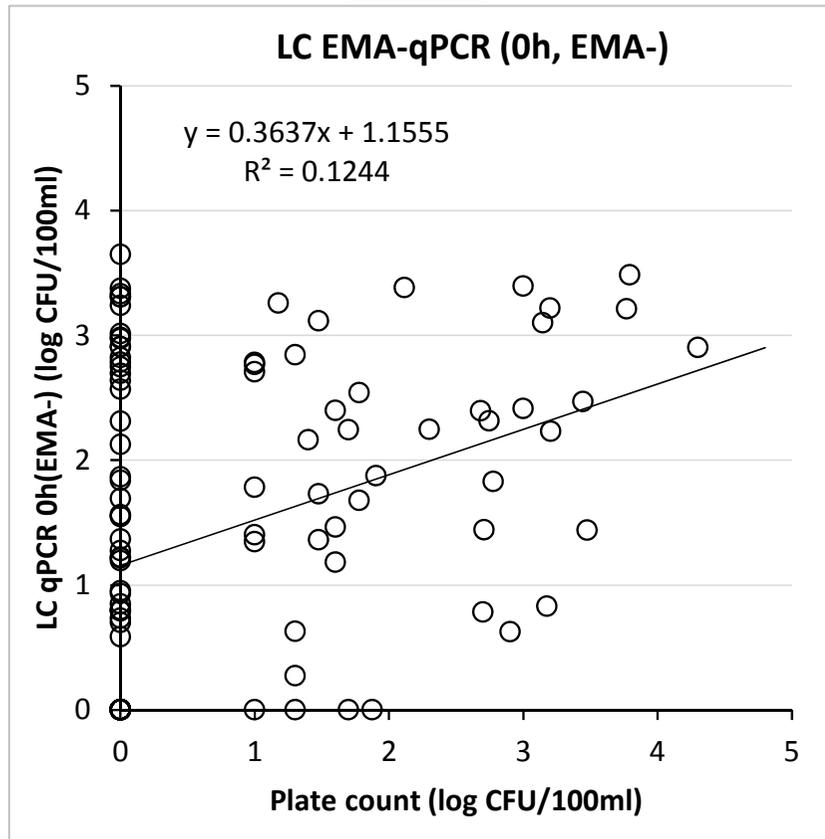
厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 分担研究報告書より引用

評価試験結果2

浴槽水等における平板培養法との比較(1)

qPCR

LC EMA-qPCR



厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等における
レジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 分担研究報告書より引用

評価試験結果2

浴槽水等における平板培養法との比較(2)

(件)

		平板培養法 (CFU/100 ml)		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA-qPCR (CFU/100 ml)	≥ 5	42	17	59
	< 5	2	52	54
計		44	69	113

感度 95.5% 特異度 75.4%

- 浴槽水等113件について、平板培養法とLC EMA-qPCR法を比較
- LC EMA-qPCR法の定量結果について、5 CFU/100 ml以上を陽性とする、
感度95.5%、特異度75.4%の良好な結果が得られた。

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究 分担研究報告書より引用

レジオネラ属菌の遺伝子検出法のまとめ

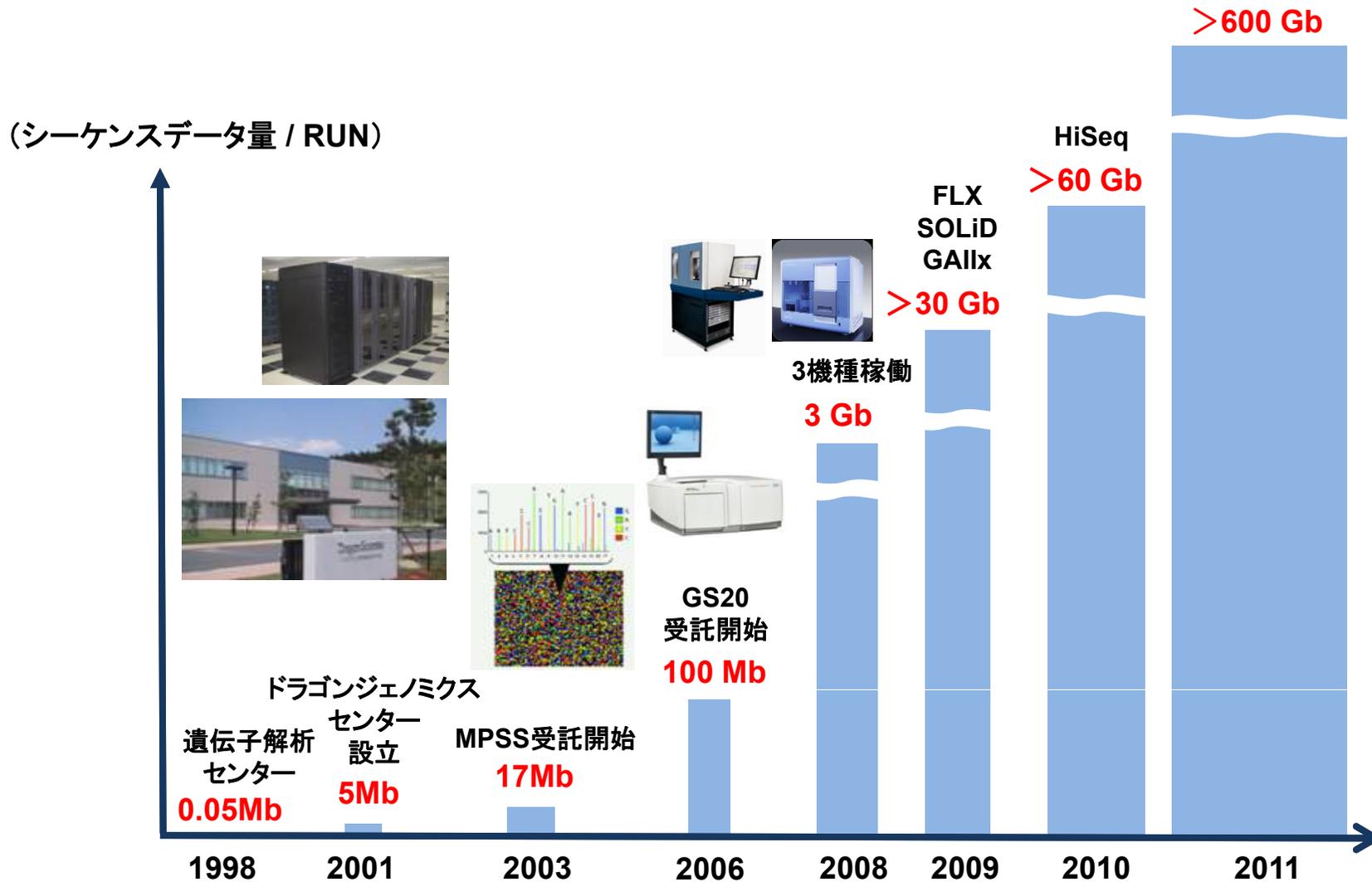
検査法	迅速性	生菌選択性	用途
平板培養法	×	◎	標準法
qPCR	◎	×	衛生状態の把握など*
EMA-qPCR	◎	○	迅速スクリーニング検査など
LC EMA-qPCR	○	◎	迅速スクリーニング検査など

<使い分けのポイント>

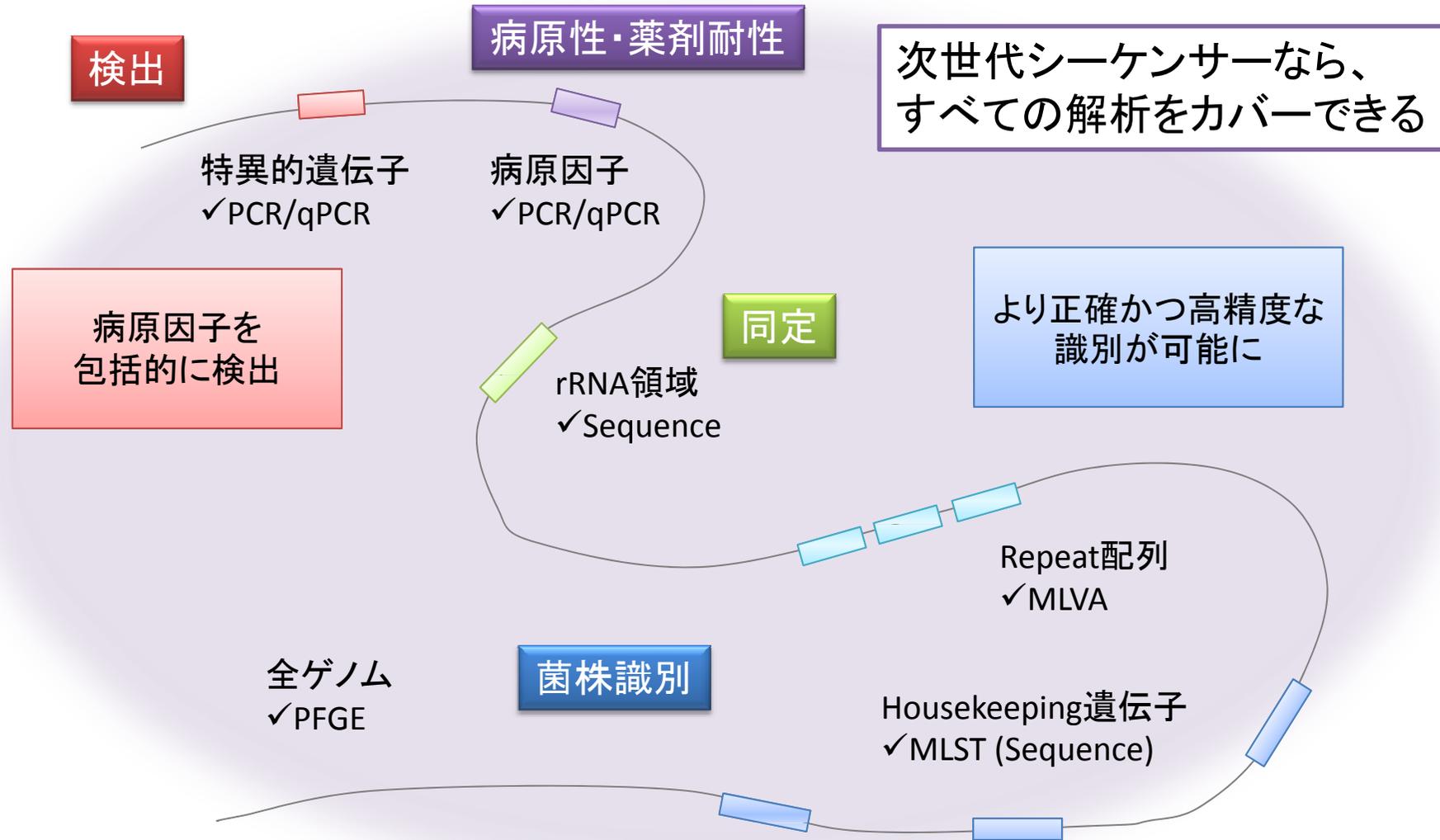
平板培養法が標準法であるのに対し、遺伝子検査法は、その迅速性を活かして、スクリーニング検査等への利用が期待されている。

* 死菌の検出については衛生の不備と解釈することで、結果を管理に反映させることが可能である。(第3版レジオネラ症防止指針より)

タカラバイオにおけるシーケンスデータ量推移



次世代シーケンサーによる遺伝子解析



次世代シーケンサーの実用例1

腸管出血性大腸菌 O104

- O104:H4による欧州での大規模感染
 - 2011年にドイツを中心に発生。HUS発症患者の割合が高く、死亡者は53名に上った。感染源はスプラウトとされている。
- 原因菌の解析
 - 次世代シーケンサーにより、3日でdraft sequenceが得られ、さらに2日後には、first assemblyが完了。
 - これらの配列情報を解析した結果、原因菌は新規のO104:H4変異株で、Stx2遺伝子を持つファージの感染により毒素産生性を獲得したと推測された。

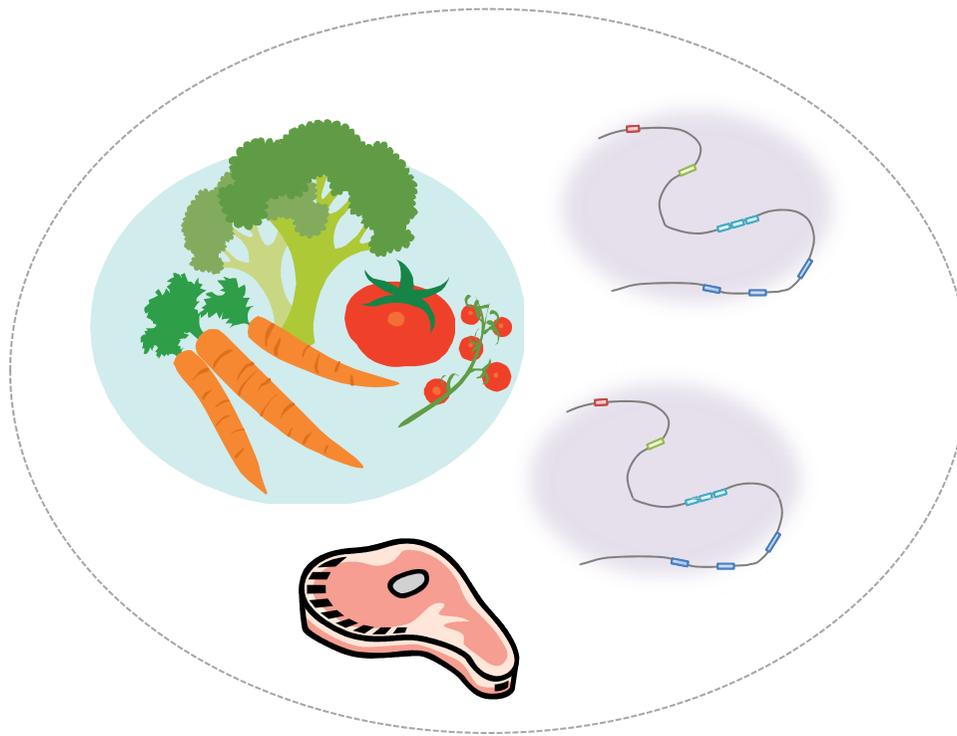
Nat Rev Genet. 2012 Sep;13(9):601-12.

次世代シーケンサーにより、原因菌の病原性因子等を迅速に特定。

“Future direction”

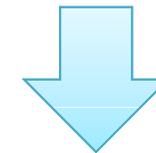
メタゲノム解析

増菌培養などを行わず、
検体に含まれるすべてのDNAを解析する。



次世代シーケンサーの進化

- ✓ 低コスト化
- ✓ Throughputの向上
- ✓ 解析技術の発展



- 培養なしでの解析
- 培養が困難な菌の検出
- 菌叢解析

Nat Rev Genet. 2012 Sep;13(9):601-12.

まとめ

< 遺伝子解析法 >

解析目的	手法
検出・スクリーニング	PCR, Real time PCRなど
病原因子の検出	PCR, Real time PCRなど
菌種の推定	16S rRNA解析など
菌株の識別	MLST, PFGEなど

New! EMA-PCR法による生菌検出

New! 次世代シーケンサーによる包括的な解析

- SimpleでUniversalな解析法であるが故に、適・不適もある。
- 過信もせず、毛嫌いもせず、目的に適した手法を上手く活用するのがコツ。