



# 酵素標識合成オリゴヌクレオチドプローブによる *Campylobacter jejuni/coli* の迅速検出

白川, 卓  
西山, 馨  
渡辺, 信  
田中, 路子  
寺本, 忠司

---

## (Citation)

神戸大学医療技術短期大学部紀要, 5:37-41

## (Issue Date)

1989

## (Resource Type)

departmental bulletin paper

## (Version)

Version of Record

## (JaLCD01)

<https://doi.org/10.24546/80070096>

## (URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/80070096>



## 酵素標識合成オリゴヌクレオチドプローブによる

*Campylobacter jejuni* / *coli* の迅速検出

白川 卓<sup>1</sup>, 西山 馨<sup>1</sup>, 渡辺 信<sup>1</sup>,  
田中路子<sup>1</sup>, 寺本 忠司<sup>2</sup>

## 緒 言

DNA プローブを用いた診断法は, 感染症の分野においても利用が進み<sup>1-3)</sup>, 種々の同定用プローブが市販されるようになってきた。酵素標識合成オリゴヌクレオチドプローブ (Enzyme labeled synthetic oligonucleotide probe: 以下 ESOP) は RI を使用しないだけでなく, ハイブリダイゼーションその他の処理時間が短いといった利点を持ち, 臨床検査への適用が容易と考えられる。純培養菌を用いたコロニーハイブリダイゼーションやドットプロットハイブリダイゼーションでは ESOP の有用性が認められているが<sup>4-6)</sup>, 臨床検体を用いた検出法はいまだ十分に検討されていない。今回, 臨床検体からの迅速検出を目的とし, 増菌培地を用いて培養したあと, ESOP で目的菌を検出する方法を検討した。

## 材 料 と 方 法

## 1. 使用標準菌株

*Campylobacter jejuni* GIFU 8734 を陽性対照として用いた。

## 2. 臨床検体

神戸市環境保健研究所に提出された Cary-Blair 培地中の便, 76検体を用いた。これらの検体中の *Campylobacter* 属の検出は, 従来法として, 検体を直接バツラー培地に接種し, 42℃, 微好気性培養を行い, 検出された菌に対して馬尿酸の水解試験を実施し, ESOP 法と比較した。

## 3. 菌液および模擬下痢便の調整

*C. jejuni* をブルセラブイオンに接種し, 微好気性環境下で42℃, 18時間振盪培養を行った。培養液は3,000rpm, 15分間遠心して集菌し, さらに生理的食塩水で2回洗浄したあと1/10ペプトン水で適当な濃度に調整した。全菌数は菌液をゲンチアナバイオレット液 (食塩1g, ホルマリン2ml, 5%ゲンチアナバイオレット5mlを蒸留水100mlに溶解したもの) で希釈染色し, Bürker-Türk の計算盤で測定した。また, 生菌数はハートインフュージョン寒天培地を用いた平板塗布法で測定した。菌液の調整は全菌数を基準に行った。模擬下痢便は1/10ペプトン水で希釈した *C. jejuni* の菌液を健康人の便に加えて作成し, 便1g中の菌数が $10^2-10^{11}$ 個になるように調整した。

## 4. 増菌培養

増菌培地として, *Campylobacter* 属の選択増菌培地である Hänninen 培地<sup>7)</sup> にリン酸水素2

1. 神戸大学医療技術短期大学部  
School of Allied Medical Sciences, Kobe University  
2. 神戸市環境保健研究所  
Public Health Research Institution of Kobe City

ナトリウムを1%加え、pHを7.2に調整し、緩衝能を持たせたものを使用した。小型プラスチックシャーレに培地8mlを入れ、検体を約0.08g接種し、42℃、微好気性条件下で、6時間、20時間、および44時間振盪培養した。Cary-Blair培地中の綿棒採取の臨床検体は、ペプトン水0.5mlで抽出し、これを全量増菌培地に接種し、20時間および44時間培養を行った。

#### 5. 検体の処理法

培養液は800rpm、5分間遠心し、残渣分を除去したあと、以下の処理を行った。1) 直接法：培養液をそのまま10 $\mu$ lをナイロンメンブラン (Genescreen plus : NEN リサーチ社) にドットした。2) 集菌法：マイクロチューブに培養液を1ml採取し微量遠心機 (クボタ KM15200) で11,000rpm、5分間遠心し、沈渣を生理的食塩水50 $\mu$ lに溶解し、その10 $\mu$ lをメンブランにドットした。3) フェノール抽出法：培養液1mlに10% SDSを1/10量加え軽く混和し、65℃で10分間放置したあと、微量遠心機で11,000rpm、5分間遠心し、上清を採取した。この上清0.7mlをマイクロチューブに移し、フェノール、クロロホルム等量混合液を等量加え200回激しく振盪し、DNAの抽出を行った。11,000rpm、5分間遠心し、この上清をさらにクロロホルムで200回激しく振盪した。11,000rpm、5分間遠心し上清を採取した。この上清0.5mlに2倍容のエタノールを加え、-80℃で30分間放置したあと、11,000rpm、5分間遠心し、沈渣を70%および純エタノールで洗浄し、最後にTEバッファー10 $\mu$ lに溶解し、メンブランに全量をドットした。

#### 6. ハイブリダイゼーション (ESOP 法)

遺伝子検出用プローブはSNAP ハイブリダイゼーションキット (DuPont社) *Campylobacter jejuni* / *coli* 検出用を用いた。このプローブは *C. jejuni* および *C. coli* の両遺伝子に特異的な塩基配列を持った合成オリゴヌクレオチドにアルカリ性ホスファターゼを標識したものである<sup>8)</sup>。使用法はキットの説明書に従った。メンブラン上の菌の溶菌およびDNAの変性はアル

カリ変性と蒸気処理を組み合わせた Maas の方法<sup>9)</sup>を一部改変<sup>5)</sup>して行った。判定は明かな発色を認めたものを陽性、弱い発色のものを弱陽性、発色が認められなかったものを陰性とした。

## 結 果

### 1. 各培養時間における ESOP の検出限界 (表-1)

ESOP で検出するために、培養前の便では1g中に10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>個の菌数が必要であった。この菌数は通常の臨床検体中の菌数に比較してはるかに多いことから、便中の目的菌を増殖させることが必要となった。実際、6時間培養を行うと、培養前の便1g中に10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>個/gの菌量まで検出可能で、検出限界が100倍上昇した。さらに、20時間、44時間と培養時間を延長することによって、それぞれ10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>個/g、10<sup>2</sup>~10<sup>3</sup>個/gまで検出可能となり、ESOPによる臨床検体中の菌の検出に十分な増幅となった。

### 2. 臨床検体からの検出 (表-2)

76検体中、従来法での陽性は6件で、いずれも *C. jejuni* であった。直接法、集菌法で陽性または弱陽性を示した6件はすべて従来法の結果と一致した。フェノール抽出法では20時間培養の陽性6件は、従来法と一致したが、44時間培養の陽性は7件となり従来法で陰性であった1件が陽性となった。また、フェノール抽出法では20時間培養で11件、44時間培養で9件の弱陽性が認められた。これら陽性および弱陽性を示した培養液はさらにバツラー培地で分離培養し、*C. jejuni* および *C. coli* の確認検査を行った。その結果、直接法、集菌法で陽性または弱陽性を示した6件およびフェノール抽出法で陽性を示した20時間培養液の6件と44時間培養液の7件からはすべて *C. jejuni* が検出された。またフェノール抽出で弱陽性を示した検体のうち、20時間培養の1件のみから *C. jejuni* が検出されたが、この検体は従来法で陰性、44時間培養で陽性となった検体と一致した。

表1 各培養時間における検出限界

| 培養時間    | (培養前の便1g中の添加菌数)  |                 |                  |                                  |
|---------|------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|
|         | 0時間              | 6時間             | 20時間             | 44時間                             |
| 直接法     | 10 <sup>11</sup> | 10 <sup>9</sup> | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>3</sup>                  |
| 集菌法     | 10 <sup>11</sup> | 10 <sup>9</sup> | 10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>2</sup> –10 <sup>3</sup> |
| フェノール抽出 | 10 <sup>10</sup> | 10 <sup>8</sup> | ≤10 <sup>4</sup> | ≤10 <sup>2</sup>                 |

表2 臨床検体からの検出

|     | 20時間培養 |     |     |       | 44時間培養 |     |       |
|-----|--------|-----|-----|-------|--------|-----|-------|
|     | 従来法*   | 直接法 | 集菌法 | フェノール | 直接法    | 集菌法 | フェノール |
| 陽性  | 6      | 3   | 5   | 6     | 3      | 4   | 7     |
| 弱陽性 | 0      | 3   | 1   | 11    | 3      | 2   | 9     |
| 陰性  | 70     | 70  | 70  | 59    | 70     | 70  | 60    |

\* バツラー培地で48時間培養後検出

## 考 察

ESOP 法では培養前の便1g中に10<sup>10</sup>–10<sup>11</sup>個の菌数が検出のために必要であった。この結果は便からの直接検出は困難であることを示している。そこで、増菌培養後の検出を試みた。*C. jejuni*の増菌培地は血液を含む培地が通常使用されるが、メンブランに培養液を直接ドットするため、血液を含まないHanninenの培地を使用した。その結果、6時間培養では、検出は不十分であったが、20時間培養を行えば、10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>個/gまで検出可能であり、臨床検体の下痢便からの検出には十分と思われた。さらに、44時間培養を行えば、10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup>個/gの菌数で検出可能であり、例えば食品に含まれる微量の*C. jejuni*の検出も可能と思われる。処理法については、直接法および集菌法は非常に簡便で、5–15分の処理でドットが終了したが、フェノール抽出法では約2時間を要した。しかし、検出感度はフェノール抽出法が他の2法に較べて10倍以上優れていた。また、直接法や集菌法ではドットの中央部で発色が弱く、周辺部で強

くなる傾向が見られたが、これは便中の食物残渣などの夾雑物が中央部で厚くドットされるため、その後の処理においてメンブランからの剥離がおこり、メンブランに固定されるべきDNA量が減少するためと思われる。

臨床検体を用いた結果では、従来法と20時間培養の結果が一致したことから、便からの*C. jejuni*検出のための増菌培養時間は20時間が適当と思われる。集菌法は直接法に比較しドットの発色が強く、判定が容易であった。結果の判定は直接法および集菌法では弱陽性も陽性とするのが妥当であったが、フェノール抽出法では強く発色したもののみを陽性とし、弱陽性のは、偽陽性反応の可能性が高いため陰性と判定するのが妥当であろう。しかし、従来法で陰性であった検体のうち1検体が、20時間培養で弱陽性、44時間培養で陽性を示したことから、弱陽性の判定には注意を要する。また、従来法で検出できないような微量の菌を検出する必要がある時は、44時間培養を行えば検出可能になると思われる。

以上の結果から、本プローブを用いた増菌培養後の検体からの検出では、操作が簡便で、偽陽性反応も認められず、検出結果も良好であった集菌法が優れていると思われる。また、本法を用いることにより、24時間で検体中の*C. jejuni*を検出できたことから、臨床材料中の*C. jejuni*および*C. coli*の迅速検出に利用できるものと考えられる。

## 結 語

1. 本法を用いることにより、通常の臨床検体(便)から増菌培養および検出を含め、24時間で*C. jejuni*/*coli*を検出することが可能であった。
2. 今回検討した培養液の処理法では、集菌後メンブランに菌液を直接ドットする方法が簡便で、検出結果も良好であった。

1. Tenover FC : Diagnostic Deoxyribonucleic Acid Probes for Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 1 : 82, 1988
2. 吉川昌之介 : 細菌感染症の DNA 診断 臨床検査 32 : 409, 1988
3. 高橋豊三 : DNA プローブを用いる感染症の診断法—理論, 方法と利点— 日本臨床増刊号 47 : 737, 1989
4. 白川卓, 西山馨, 浜野庸子他 : DNA プローブを用いた毒素原性大腸菌検出法の検討 兵臨誌 学術特集号 : 1, 1987
5. 白川卓, 西山馨, 浜野庸子他 : コロニーハイブリダイゼーション法による毒素原性大腸菌の検索 神大医短紀要 3 : 111, 1987
6. Nishibuchi M, Arita M, Honda T *et al* : Evaluation of a Nonisotopically Labeled Oligonucleotide Probe to Detect the Heat-Stable Enterotoxin Gene of *Escherichia coli* by the DNA Colony Hybridization Test. J Clin Microbiol 26:784, 1988
7. Hänninen ML : Comparison of Four Enrichment Media in the Recovery of *Campylobacter jejuni*. Acta Vet Scand 23:425, 1982
8. Jablonski E, Moomaw EW, Tullis RH *et al* : Preparation of Oligodeoxynucleotide-Alkaline Phosphatase Conjugates and Their Use as Hybridization Probes. Nucl Acids Res 14:6115, 1986
9. Maas R : An Improved Colony Hybridization Method with Significantly Increased Sensitivity for Detection of Single Genes. Plasmid 10 : 296, 1983

## The detection of *Campylobacter jejuni* / *coli* with the enrichment culture by the enzyme labeled synthetic oligonucleotide probe.

Taku Shirakawa<sup>1</sup>, Kaoru Nishiyama<sup>1</sup>, Makoto Watanabe<sup>1</sup>,  
Michiko Tanaka<sup>1</sup> and Tadasi Teramoto<sup>2</sup>

**ABSTRACT :** The synthetic oligonucleotide probe labeled by alkalinephosphatase is useful to detect the pure cultured bacteria. In this paper, the probe was used to detect *C. jejuni* / *coli* in feces for rapid diagnosis. Direct detection from feces was difficult. Therefore, feces were cultured in the enrichment medium (Hänninen medium) for 6, 20 and 44 hours. Then, the cultured medium was treated with the following methods. 1) Direct method : the cultured medium was directly blotted onto nylon membrane. 2) Centrifugation method : bacteria in the cultured medium was collected by the centrifugation and blotted onto nylon membrane. 3) Phenol extract method : DNA was extracted from the cultured medium by the conventional phenol extract method and blotted onto nylon membrane. And all of these blotted nylon membrane were used for hybridization.

This probe was applied to detect to *C. jejuni* / *coli* in 76 clinical specimens (feces in Cary-Blair medium). Among them, 6 specimens were proved positive in 24 hours, though the conventional system took 2-3 days to prove it. The phenol extract method was more sensitivity than other two methods, but some data were false positive. Concerning clinical specimens, the centrifugation method was more sensitive than the direct method and more specific than the phenol extract method.

Consequently, the centrifugation method was simple in process and satisfactory to detect *C. jejuni* / *coli* from the cultured medium.

**Key Words :** Synthetic Oligonucleotide Probe,  
Enrichment Culture,  
Clinical Specimen,  
*Campylobacter jejuni*,  
*Campylobacter coli*.

---

1. School of Allied Medical Sciences, Kobe University  
2. Public Health Research Institution of Kobe City