

免疫磁気ビーズ法を用いた大便からの *Helicobacter pylori* の検出

神戸市環境保健研究所・細菌部 黒川 学

目的

Warren & Marshall によって発見された *Helicobacter pylori* は胃炎の原因菌で、発見以来、胃潰瘍を始めとする種々の胃疾患との関連が注目されている。現在、本菌の検出は主に生検組織から直接行われているが、生検の実施が困難な患者においては、感染診断をよりいっそう困難にさせている。本菌は食物の消化過程において、胃粘膜の脱落とともに大便中へ排泄すると推測されるが、非侵襲的かつ検体採取が容易な大便からの感染診断は、血清抗体価などの間接的証明法と異なり、検査時点での感染を証明する有効な手段と言えよう。

検出原理

大便をバッファーに浮遊させて、濾過後に得られた細菌叢から、免疫磁気ビーズ法を用いて *H.pylori* を選択的に集菌し、PCR法および培養法で検出をおこなうものである。大便からPCR法を行なうときには、これに含まれるPCR阻害物質の影響を考慮しなければならない。しかしながら、免疫磁気ビーズ法を組み合わせた検出法では、阻害物質の含まれる検体中から、標的物質を選択的に分離かつ濃縮することが可能である。言いかえるならば、本法は、容易に阻害物質を除去する手段とも考えられる。これによって安定したPCR法による高感度検出が可能となる。

用意する試薬および器材

- 1) Dynabeads M-280 TosylactivatedやDynabeads M-280 Sheep anti Rabbit IgGなど
- 2) 抗*H.pylori*抗体 (表面抗原など)
- 3) 0.01% Tween20を加えた1/100M PBS pH7.2
- 4) 0.005% Triton X-100および1mg/mL にProteinase-Kを加えたTE buffer pH8.0
- 5) PCR反応試薬および機器
- 6) スキロー培地
- 7) 微好気培養用ガス発生剤 (AnaeroPack Campylo:三菱ガス化学)
- 8) Magnetic particle concentrator MPC-E (Dynal)
- 9) 1.5 mL エッペンドルフチューブ
- 10) 0.5 mL PCRチューブ
- 11) ガラス棒, 滅菌ガーゼまたは粗い紙, ディスポーザブルのプラスチック漏斗
微量高速遠心機, ロータリーミキサー, ボルテックスミキサー など

検出手技

① 大便の処理

0.01% Tween20を加えた1/100M PBS pH7.2 に大便を加えて、ガラス棒およびボルテックスミキサーを用いて均等に混和する。大便中の菌量が少ないことが予想されるので、大量の大便(親指大以上)を処理することが望ましい。つぎに、滅菌ガーゼまたは粗いろ紙で濾過をして、固形物および粘液を除去する。とくに粘液が残存していると、これに磁気ビーズが補足されて回収率が極端に悪くなる。つぎに、濾過後のサンプルを12,000rpm (8,900 x g) 5分間遠心をおこなって得られた沈渣を、先ほどのバッファーで3回洗浄して、沈渣を10倍量のバッファーに再浮遊させたものをサンプルとします。

② 抗体の選択および磁気ビーズ試薬の調整

胃粘膜中にラセン状桿菌として認められる本菌は、発育環境が悪化すると容易にcoccoid formと呼ばれる球状体に変化することが知られています。大便中のH.pyloriは、そのほとんどがcoccoid formであると報告されています。この両者は表面の抗原構造が異なり、さらに、coccoid form状態になるとウレアーゼ活性も消失するとの報告があります。市販されている表面抗原に対するポリクロナール抗体は、ラセン状桿菌に対しては十分な力価を有するものの、coccoid formに対しては低いことがあります。磁気ビーズに抗体を感作させる前に、あらかじめ、coccoid formに対して十分な力価があるかを検定*1しておく必要があります。ウサギ抗H.pylori表面抗原ポリクロナール抗体(ラセン状桿菌およびCoccoid formで免疫したものを混合)をDynabeads M-280 Tosylactivated にDyna社の推奨法に従って抗体を感作させた磁気ビーズ試薬を調整しました。

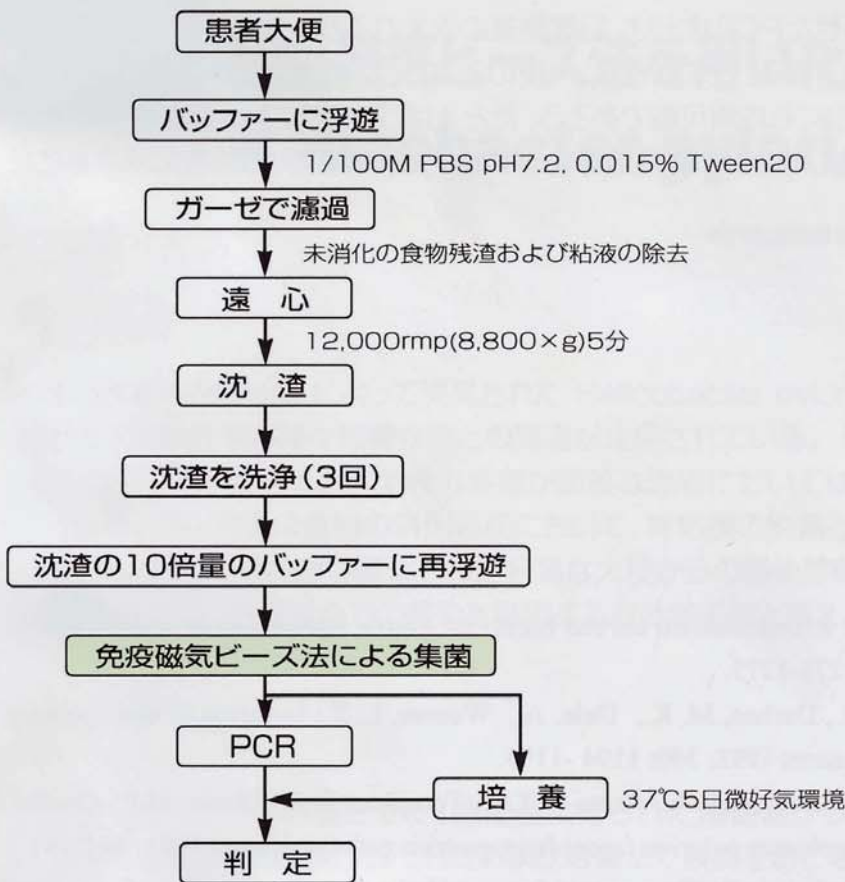
*1 [検定方法]: 96穴マイクロプレートに、上記バッファーで倍々希釈した抗体25 μ Lを加えます。つぎに、coccoid formおよび比較対象としてラセン状桿菌のH.pylori株をMacFarland 3 (OD:0.75, 550nm)の濃度でバッファーに浮遊させたものを25 μ Lずつ加えます。プレートミキサーで混和後、一晚室温で反応させます。凝集が認められた最高の希釈倍率の逆数をタイターとしました。タイターは菌株によって大きく異なるために、数株のH.pylori株を測定して、全ての菌株に対して最もタイターの高いものを選択します。32倍以上あれば良好です。

③ 大便からの免疫磁気ビーズ法による選択的集菌

1.5mLのエピペンドルフチューブに1mLのサンプルおよび50 μ Lの磁気ビーズ試薬*2を加えて、37 $^{\circ}$ C 30分、ロータリミキサー上で反応させます。ここで得られた磁気ビーズとH.pyloriの免疫複合体を、カンセントレーター MPC-Eを用いて回収します。そして、上記のバッファーで3回洗浄します。

*2: 粘液便から得られたサンプル中には、ろ過後においてもわずかながら粘液が残存する。このために、磁気ビーズの回収率が悪くなることが予想されるので80 μ L~100 μ Lの試薬を使用する。

免疫磁気ビーズ法を用いたHelicobacter pyloriの検出手法



4 検出

[PCR法]：回収された磁気ビーズとH.pyloriの免疫複合体を0.5mLのPCRチューブに加えて、さらに、0.005% Triton X-100 および 1mg/mLにProteinase-K を加えた TE buffer pH8.0 を50 μ L加えて、60 $^{\circ}$ C 15分、94 $^{\circ}$ C 10分 サーマルサイクラーで反応させて、DNAを抽出します。

ウレアーゼAジーンを標的とするプライマーHPUA-1: 5'-GCC-AAT-GGT-AAA-TTA-GTT-3'(場所:304-321)および HPUA-2: 5'-CTC-CTT-AAT-TGT-TTT-TAC-3'(場所:714-697),サンプル10 μ L, Taq-Polymeraseなどを加えて、全量100 μ Lの反応溶液を調整します。PCR条件は、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒, アニーリング42 $^{\circ}$ C 60秒, 伸長 72 $^{\circ}$ C 90秒を40サイクル行なった。アガロース電気泳動後に エチジウムブロマイドで染色してUV光源下で判定した。411bpの増幅バンドが認められたものを陽性とした。大便中の菌量は極めて少なく、免疫磁気ビーズ法を用いて濃縮した後でも、検出感度以下であることも推測される。このことから、高感度Taq-Polymerase (Z-Taq;TaKaRa)を用いて、サンプル20 μ Lで、PCR条件:熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒, アニーリング42 $^{\circ}$ C 60秒, 伸長 72 $^{\circ}$ C 10秒(1~30サイクル目), 15秒(31~40サイクル目), 20秒(41~50サイクル目)で50サイクルの反応をおこなうことで、検出率の増加を期待できる。また、ネストPCR法の応用も有効な手段である。

[培養法]：サンプル10 μ Lをスキロー培地に塗布して37 $^{\circ}$ C 5日間 微好気培養をおこなって判定します。アフリカでは大便から多くの分離例の報告がありますが、わが国においても、わずかながら消化性潰瘍患者大便からの分離が報告されています。

結 語

免疫磁気ビーズ法を組み合わせたPCR検出は、阻害物質の含まれるサンプル中から、効率良く目的菌を濃縮して分離が可能である。このことは、大便のみならず、*H. pylori*がごく微量含まれると推測される材料からの検出にも応用可能であろう。たとえば、河川水にも本菌が極めて微量含まれるとの報告があるが、遠心もしくは濾過処理後のサンプルに対して、本法を応用することも可能と考えられる。

参考文献

- 1) Warren, J. R. & Marshall, B. J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 321: 1273-1275.
- 2) Thomas, J. E., Gibson, G. R., Darboe, M. K., Dale, A., Weaver, L. T.: Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; 340: 1194 -1195.
- 3) Mapstone, N.P., Lynch, D.A.F., Lewis, F.A., Axon, A.T.R., Tompkins D.S., Dixon, M.F., Quirke, P.: PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients, *Lancet* 1993; 341:447.
- 4) Bode, G., Mauch, F. & Malfertheiner, P.: The coccoid form of *Helicobacter pylori*, Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 1993; 111: 483-490.
- 5) Benaissa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y. & Fauchere, J.L.: Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigen during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect. Immun.* 1996; 64: 2331-2335.
- 6) Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. & Megraud, F.: Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces - *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 995-998.
- 7) 黒川 学, 南出 正之, 貫名 正文, 仲西 寿男, 三木 寛二, 富田 周介, 藤堂 彰男
春田 恒和: 消化性潰瘍患者大便からの *Helicobacter pylori* 検出に対するPCR法診断の有用性.
感染症誌 1997; 71: 1168-1171.

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門2-7-14 八洲ビル
TEL(03)3593-3211 [代] FAX(03)3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.or.jp
<http://www.veritastk.co.jp/>

RDBL-2137
(99.08.05)PT