病原細菌の分離・同定と病原因子の検索

日 時：平成 8 年11月12日から15日

場 所：岡山大学医学部細菌学教室

主 催：日本細菌学会教育委員会

世話人：小熊恵二

目 次

A. ボツリヌス毒素・中毒の検索

I. ボツリヌス中毒の診断

- 1. 菌の分離・同定（小熊） 1056
- 2. 毒素の検出（小熊） 1056
- 3. PCR 法（藤永） 1058

II. ボツリヌス毒素の解析；毒素の精製，SDS-PAGE，N 末端アミノ酸配列の決定

- 1. ボツリヌスの progenitor toxin の精製（井上） 1060
- 2. SDS-PAGE，ウェスタンブロッティング；N 末端アミノ酸配列の決定（井上） ... 1063

III. ボツリヌス毒素の消化管での吸収機構の解析；免疫組織染色法

- 1. *in vivo* 試験（藤永） 1066
- 2. *in vitro* 試験（藤永） 1067

IV. その他

- 1. ボツリヌス毒素に対するモノクローナル抗体（マウス）の作製（小熊） 1068
- 2. 遺伝子のクローニングから大腸菌における蛋白質発現まで（藤永） 1069

B. ヘリコバクター・ピロリ菌の検索

I. 菌の分離・同定，パルスフィールド，MIC

- 1. 培養（平井） 1070
- 2. 検体からの菌の分離・同定（横田） 1073
- 3. 染色体 DNA フィンガープリント（パルスフィールド電気泳動法）（平井） 1074
- 4. MIC 測定法（平井） 1076

II. 病原因子の検索

- 1. VacA による培養細胞空胞化（平井） 1079
- 2. SDS-PAGE，ウェスタンブロッティングによる各蛋白の証明（横田） 1080
- 3. Heat Shock Protein の同定（横田） 1082
- 4. PCR 法による各遺伝子の検出（横田） 1083
- 5. ELISA 法による抗体価の測定（横田） 1084
- 6. 脂質抽出・検出法（特に cholesteryl glucosides）（平井） 1086

A ボツリヌス毒素・中毒の検索

1. ボツリヌス中毒の診断

中毒の診断のためには、食品、糞便、胃・腸内容物などより菌を分離し、毒素を証明することが必要である。現在、筆者らが行っている方法を図1に示した。以下、各項目につき説明する。

1. 菌の分離・同定

検体より菌を分離する時には、芽胞の耐熱性を利用し、まず60℃、15分程加熱する。次いで増菌および分離培養を行う。通常増菌にはクックドミート (cooked meat) 培地を、分離には血液寒天か卵黄寒天を用いる。コロニーは厚さが薄く、rough型であり、溶血環を示す。卵黄寒天では、リパーゼ (G型菌以外はリパーゼを産生する) による真珠層を形成する。純培養した後、毒性試験およびその中和試験を行い毒素型を決定する。

《注意事項》

1. オートクレーブ後、長期間保存したクッ

クドミート培地は使用しないこと。1日以上保存したものを使用する時は直前に煮沸し、急冷した後 (培地中に溶存しているO₂を除く)、使用すること。

2. 平板も当日作製したものか、嫌気条件下で保存したものを用いる。
3. 菌の同定はその生化学性状、揮発性脂肪酸の種類や遺伝子の相同性などからもなされるが、通常は上記のことのみで判定される。

2. 毒素の検出

毒素の検出法としては、通常、マウスを用いたbioassay、毒素に対する特異抗体を用いた逆受身凝集反応や酵素抗体法が用いられる。

1) マウスによるbioassay；毒性試験・中和試験

筆者らが行っているのは試料を数倍量の、ゲラチンを0.2%に加えた0.2Mリン酸緩衝液 (pH6.0) に懸濁させ、3000×g、20分遠心し、上清を2倍あるいは10倍階段希釈した後、

図1 ボツリヌス中毒の検索法

0.5mlをマウスの腹腔内に投与し(図2-a), その生死で判定する方法である(毒性試験)。マウスが特有の麻痺症状を呈して死亡した時は, その10MLD (minimum lethal dose, 最小致死量) 液と等量の型特異抗体とを37℃, 1時間反応させた後, マウスに接種し毒素型を決定する(中和試験)。精製毒素1mgは約 10^8 (A型) $\sim 10^7$ (C, D, トリプシン処理後のE型など) MLD/mlを示す(従ってマウスの1MLDは10p ~ 100 pgである)が, 通常, 食品や糞便1g中には $10^4 \sim 10$ MLDほどの毒素が証明される。なお, 血清以外の検体の場合は, 蛋白非分解菌の産生する毒素を活性化させるため, 以下のようにトリプシン処理を行う。上記の0.2Mリン酸緩衝液にDifco社の1:250トリプシンを1%に溶解したものと等量の毒素液を混ぜ, 37℃, 1時間反応させる。その後, トリプシンインヒビターを加えるか, そのまま10倍以上の希釈をし毒性試験を行う。

なお, 高力価の毒素を測定する時は, 毒素液0.1mlをマウスの尾静脈に注射し, その致死時間から毒素価を推察する方法(time to death test)もある。筆者らはマウスの固定装置を考案し, アルコールやキシレンで静脈を怒張させた後, 注射を行っている(図2-b, c)。

〈注意事項〉

マウスの尾には4本の血管があるが, マウスを正面に固定した時, 上下の2本が動脈, 横(左右)の2本が静脈である。アルコールやキシレンにより静脈は怒張され, 青黒く見える。

2) 逆受身凝集反応

ヒツジ赤血球(SRBC)やラテックスに抗毒素抗体を結合させたものを検体と反応させ, 凝集の有無により判定するものである。

3) 酵素抗体法

通常マイクロプレートを用いる。まず, 抗毒素抗体を固相化し, これに検体を作用させた後, 標識抗体を反応させる“Sandwich法”と, 固相化した抗体に検体を作用させた後, まず未標識の一次抗体(これは固相化した抗

図 2-a

マウスの首と前肢の付け根の間を親指と人差し指で, また尾を小指と薬指で掴み固定する。

図 2-b マウス固定器具

筆者らは, マウスを筒の内に固定し, スライドする扉(バネを利用)より尾のみを出せる固定器をアクリル板で作製し, 使用している。

図 2-c

尾を少し捻り, 静脈を中心にして注射する。

体とは異種の動物で作製したもの)を反応させ、次いで標識した二次抗体を反応させる“Double Sandwich法”がある。

逆受身凝集反応、酵素抗体法とも感度はマウスのbioassayよりも低く、最小検出量は1～10ng程である。しかし、bioassayでは1) 検体中に毒素以外の致死物質が混在している、2) 保存中に毒素活性が消失する、などのこともある故、また動物施設や動物愛護の点からも、bioassayのみに頼るのは問題がある。

3. PCR法

毒素の一次構造が決定されるに伴い、PCR (polymerase chain reaction) 法により菌の存在(毒素遺伝子の有無)を検索する方法が開発された。筆者らはA型～F型毒素の軽鎖をコードしている遺伝子の中から、各毒素型に特異的な領域の塩基配列をプライマーにし、300bp程を増幅させ、かつ、その増幅物を特定の制限酵素で切断したパターンからも容易に“毒素型”を決定出来るPCR法を開発し、実際の中毒例で使用している。

1) 試料の調整

食品などの試料10g (-30℃で保存)を40mlのTE緩衝液(10 mM トリス塩酸, 1mM EDTA, pH8.0)中でホモジナイズし、95℃, 10分加熱する。その後10,000×gで10分遠心し、上清25μlをPCRに用いる。

2) PCR

下記の反応液を調整し、PCRを行う。

(Model PJ 2000, Perkin-Elmer Cetus社を使用)

- ・ ×10緩衝液
(500 mM KCl, 100 mM トリス塩酸
pH8.3, 15 mM MgCl₂, 1mg/ml gelatin)
10μl
- ・ 各2 mM dNTPs混液 10μl
- ・ 10 μM センスプライマー (表1参照) 1μl
- ・ 10 μM アンチセンスプライマー

(表1参照)	1μl
・ 5 u/ μl AmpliTaq™ (Perkin-Elmer Cetus社)	0.5μl
・ H ₂ O	52.5μl
・ 試料 ¹	25μl
	100μl

増幅の条件は以下のとおりである。

変性	94 ℃	1分	
アニーリング	55 ℃	1分	25サイクル
伸長反応	72 ℃	1分	

反応後、10μlをアガロース電気泳動に用い、泳動後、エチジウムブロマイド染色により増幅DNAを検出する。

3) PCR産物の制限酵素による切断および電気泳動

PCR反応液をエタノール沈殿した後、10μlのTEに溶解する。そのうち1μlを図3に示す酵素で37℃にて1hr 反応させ、10μlをアガロース電気泳動に用いる。エチジウムブロマイド染色により増幅DNAを検出する。

4) 感度について

本PCR法の感度は、エチジウムブロマイド染色の場合、ボツリヌス菌DNA 2.5 pg である。必要に応じて、型特異的のプロープを用いたサザンハイブリダイゼーションと組み合わせることにより、少なくともさらに100倍ほど感度を上昇させることができる。

〈注意事項〉

1. コンタミネーションによる擬陽性を防ぐため、試料は最後に加えるのが望ましい。PCR法の一般的な注意点として、なるべく使い捨ての器具を用いる、フィルター付きのチップを用いる、器具などにUVを照射し、DNAのコンタミネーションを防ぐ(オートクレーブは、培養した菌の後処理などに使われている場合、装置自体が汚染されており擬陽性の原因になることがあるので注意を要する)、などが

図3 各型のボツリヌス毒素遺伝子の増幅と制限酵素による切断

レーン1, BioMarker™ Low (Funakoshi, Japan); レーン2, A型 (A-190) の増幅産物 (283 bp); レーン3, レーン2の増幅産物を *Hpa* I処理; レーン4, B型 (B-Lamanna) の増幅産物 (315 bp); レーン5, レーン4の増幅産物を *Ssp* I処理; レーン6, C型 (C-ST) の増幅産物 (290 bp); レーン7, レーン6の増幅産物を *Rsa* I処理; レーン8, D型 (D-South African) の増幅産物 (497 bp); レーン9, レーン2の増幅産物を *Rsa* I処理; レーン10, E型 (E-Iwanai) の増幅産物 (266 bp); レーン11, レーン2の増幅産物を *Aha* III処理; レーン12, F型 (F-Langeland) の増幅産物 (332 bp); レーン13, レーン2の増幅産物を *Aha* III処理

表1 PCRに用いるプライマー

型	プライマー名	配列	位置*	PCR産物 (bp)
A	AS-11	5'-TGCAGGACAAATGCAACCACT-3'	78-98	283
	AS-22	5'-TCCACCCCCAAAATGGTATTCC-3'	340-360	
B	BS-11	5'-CCTCCATTTGCGAGAGGTACG-3'	70-90	315
	BS-22	5'-CTCTTCGAGTGGAACACGTCT-3'	364-384	
C	CS-11	5'-ATACACTAGCTAATGAGCCTG-3'	80-100	290
	CS-22	5'-TGGAGTATTGTTATTCCCAGG-3'	349-369	
D	DS-11	5'-GTGATCCTGTTAATGACAATG-3'	32-52	497
	DS-22	5'-TCCTTGCAATGTAAGGGATGC-3'	508-528	
E	ES-11	5'-CAGGCGGTTGTCAAGAATTTTA-3'	68-89	266
	ES-22	5'-ATTAGCTTTTGACAGTTCTTC-3'	313-333	
F	FS-11	5'-CAATAGGAACGAATCCTAGTG-3'	152-172	332
	FS-22	5'-ATCAGGTCCTGCTCCCAATAC-3'	463-483	

* 位置を示す数字は各遺伝子の開始コドン (ATG) のAを1としている。

上段はセンス, 下段はアンチセンスプライマーである。

挙げられる。また常に陽性と陰性のコントロールをおくことも重要である。

[参考文献]

- 1) Notermans, S., Kozaki, S., Kamata, Y., and Sakaguchi G. (1984): Use of monoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of botulinum type B toxins. Japan. J. Med. Sci. Biol 37, 137-140.
- 2) Oguma, K., Syuto, B., Kubo, S., and Iida, H. (1985): Analysis of antigenic structure of *Clostridium botulinum* type C₁ and D toxins by monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies against bacteria 2, 159-184.
- 3) 小熊恵二 (1989): ボツリヌス中毒の新たな問題点とモノクローナル抗体を用いた診断キットと治療用抗体の開発. BIO MEDICA 4 (4), 61-66.
- 4) Doellgast, G. J., et al. (1994): Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes with dual-label antibodies. J. Clin. Microbiol. 32, 105-111.
- 5) Fujinaga, Y., Takeshi, K., Inoue, K., Fujita, R., Ohyama, T., Moriishi, K., and Oguma K. (1995): Type A and B neurotoxin genes in a *Clostridium botulinum* type AB strain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 737-745.
- 6) Takeshi, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., Nakajima, H., Oguma, K., Ueno, T., Sunagawa, H., and Ohyama, T. (1996): Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain

reaction. Microbiol. Immunol. 40, 5-11.

- 7) 小熊恵二, 藤永由佳子, 井上 薫, 武士甲一 (1996): ボツリヌス症. 化学療法の領域 12 (4), 607-616.

II. ボツリヌス毒素の解析: 毒素の精製, SDS-PAGE, N末端アミノ酸配列の決定

1. ボツリヌスprogenitor toxinの精製

*C. botulinum*が産生する神経毒素は菌の培養上清中では無毒成分と会合して複合体(progenitor toxin)を形成している。この項では *C. botulinum* A型菌(A-NIH)の培養上清から3種類のprogenitor toxin(19 S毒素, 16 S毒素, 12 S毒素)を精製する方法を述べる。

1) 菌の培養

i) 培地

①クックドミート培地

1%プロテオースペプトン, 1%ポリペプトン, 1%イーストエキストラクト, 1%ラクトアルブミン水解物, 0.1%L-システイン塩酸塩一水和物を蒸留水に溶解し, 水酸化ナトリウムでpHを7.2に合わせた後, 50mlの培地溶液に約5gのクックドミートを加え, 沸騰湯浴内で15分間加熱する。加熱後, 流水中で10分間急冷し, 121℃で15分オートクレーブした後, 濾過滅菌した50%グルコース溶液0.5mlを加える。

②透析チューブ培養法用培地

a) 透析外液:

1%ペプトン, 2%ポリペプトン, 2%ラクトアルブミン水解物, 1%イーストエキストラクトを蒸留水に溶解し, 水酸化ナトリウムでpHを7.2に合わせる。

b) 透析内液:

10%グルコース, 5%塩化ナトリウム, 1%L-システイン塩酸塩を蒸留水に溶解する(この時蒸留水をスターリングバーで

回しながらグルコースを少しずつ加えないと、グルコースが固まってしまうので注意する)。

ii) 方法

50mlのクックドミート培地に1mlほどの菌液を植え、35℃で一晩培養する。毒素精製のための大量培養には、透析チューブ法(1)を用いる。図4に示したように、培養用ガラス管の中に培養外液を注ぎ、直径7.5cmの透析チューブをU字型にセットし(このとき透析チューブの一端にガラス棒を差し込み、もう一端にゴム栓についているガラス管を差し込むようにする)、ガラス管をシリコ栓でふさぎ、回りにアルミホイルを巻き121℃で15分オートクレープする。別に培養内液を調整し濾過滅菌した後、50mlずつに分注しておく。オートクレープ後、クリーンベンチ内で内液をガラス管から透析チューブ内に注ぎ込む。この状態で一晩放置した後、クックドミート培地で培養した菌液を1ml程度ずつ植える。35℃で5日間培養した後、精製を始める。

2) progenitor toxinの精製

i) 集菌, 硫安分画

培養用ガラス管から透析チューブを取り出し、揉みほぐすことによって、チューブに貼り付いた菌体を落とす。培養内液をビーカーに集め、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で透析チューブ内を洗い、その溶液もビーカーに加える。集めた溶液を15,000×gで20分間遠心して菌体を除き、得られた上清をグラスウールで濾過し、60%飽和になるように固形硫酸アンモニウムを加える。この時培養上清を穏やかにスターリングバーで回しながら少しずつ硫酸アンモニウムを加えるようにする。硫酸アンモニウムが完全に溶けてからスターリングバーを取り出し、4℃で一晩放置する。その後15,000×gで20分間遠心分離を行い、硫安沈殿を得る。すぐに精製を行わない場合は、沈殿を-20℃で保存する。この状態で数カ月間保存可能である。

図4 透析チューブ法による
ボツリヌス菌の大量培養

ii) 透析, プロタミン処理

硫安分画により得られたサンプルには多量のRNAが含まれている。このRNAは酸性条件下でprogenitor toxinと共沈してしまうため、精製を進める前にプロタミン処理によりRNAを除く必要がある。

得られた硫安沈殿を50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に一晩透析した後(透析外液は一度取り替える)、2%プロタミン硫酸溶液を0.4%になるように加える。室温に20分間放置している間に白い沈殿が生じてくるので、これを遠心により取り除く。得られた毒素溶液5μlをトランスイルミネーターの上に敷いたサラップ上で、等容量の2μg/mlエチジウムブロマイド(TEに溶解したもの)溶液と混合する。UVを照射して観察される蛍光が50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)とエチジウムブロマイドを混合した場合と同じ程度になるまでプロタミン処理を繰り返す。こうしてプロタミン処理によりRNAを除いた毒素溶液を50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.2)に一晩透析する。

iii) SP-Toyopearl 650Mによる陽イオン交換クロマトグラフィー

SP-Toyopearl 650Mはあらかじめカラム (1.4×26cm) につめ、50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2)で平衡化しておく。透析後遠心により不溶物を除去した毒素溶液をカラムにアプライし、50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2) でカラムから溶出される溶液の280nmにおける吸光度が0.05以下になるまでカラムを洗う。その後50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2) 150mlと0.5M塩化ナトリウムを含んだ50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.2)150mlを用いて溶出溶液中の塩濃度を徐々に上げてゆき、蛋白を溶出する。溶出液はフラクションコレクターを用いて2mlずつ分画する。

iv) 溶出パターンの作製と毒素活性及び血球凝集活性の測定

各分画の280nmにおける吸光度を測定し、溶出パターンを作製する。溶出パターンから適当なフラクションを選び出し、毒素活性及び血球凝集活性を測定する。毒素活性の測定に関しては毒素の検出の項の毒性試験を参考にされたい。血球凝集活性の測定には96穴の丸底のマイクロタイタープレートを使用する。このプレート上で各フラクションをPBSで2倍ごとに希釈し、等量の2%血球を加える。各フラクションが赤血球を凝集させる (図5) 最

低濃度を活性とする。

A型ボツリヌス菌を用いた場合のSP-Toyopearl 650Mによる陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを図6に示す。塩化ナトリウムの濃度勾配により5つの蛋白のピークが溶出する。これらのピークのうち、ピーク4とピーク5のフラクションにマウスに対する致死活性が観察される。一方、ピーク3とピーク4に血球凝集活性が観察される。そこでピーク4とピーク5のフラクションをそれぞれ集め、80%飽和の硫酸アンモニウム溶液に対して透析を行う。この方法によりサンプルの体積を増やすことなく蛋白を濃縮することができる。遠心により沈殿を集め、50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2) に沈殿を懸濁するか同緩衝液に透析する。

v) Sephacryl S-300によるゲル濾過

Sephacryl S-300はあらかじめカラム (1.9×54cm) につめ、50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2), 0.5M塩化ナトリウムで平衡化しておく。硫酸アンモニウムで濃縮したサンプル(ピーク4とピーク5由来のサンプルについてそれぞれ別々にゲル濾過を行う)をカラムにアプライし、クロマトグラフィーを行う。溶出液はフラクションコレクターを用いて1.6mlずつ分

図6 SP-Toyopearl 650Mによる陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターン

ボツリヌスA型菌の培養上清を硫酸分画、プロタミン処理した後SP-Toyopearl 650Mにアプライした。

(○)280nmにおける吸光度, (▲)血球凝集活性, (---)塩化ナトリウム濃度

活性がある場合には、沈降した赤血球はウェル底部に広がり(+), 活性がない場合には、沈降した赤血球は小さな点となる(-)。

図5 赤血球凝集活性の見分け方

画する。マウスに対して致死活性を示すフラクションを集めて硫酸アンモニウムで濃縮した後、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.2)に透析する。

vi) ショ糖密度勾配遠心

ポリカーボネート製の5mlの遠心管に50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0), 5%ショ糖溶液2.5mlをいれる。遠心管の底部まで注射器の針を差し込み、50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0), 20%ショ糖溶液2.5mlを注入する。遠心管にゴム栓で蓋をし、Gradient Master 106-200B(東和科学)にセットして、機器のプログラムに従いショ糖密度勾配を作製する(図7)。このショ糖密度勾配の上部にゲル濾過後濃縮したサンプルを重層し、123,000×gで6時間遠心分離する。遠心後、遠心管の底に針で穴をあけ、遠心管の底から約250 μ lずつ溶液を分画する。それぞれのフラクションの280nmにおける吸光度を測定する。ピーク4由来のサンプルは19 S毒素と16 S毒素の2つのピークに分離する。一方、ピーク5由来のサン

プルは12 S毒素のみを含む1つのピークとして沈降する。

【参考文献】

- 1) Stern, M., and Wentzel, L M. (1950) : A new method for the large scale production of high-titer botulinum formol-toxoid types C and D. J. Immunol. 65, 175-183.
- 2) Sugii, S., and Sakaguchi, G. (1975) : Molecular construction of *Clostridium botulinum* type A toxins. Infect. Immun. 12, 1262-1270.
- 3) Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K., and Oguma, K. (1996) : Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. Infect. Immun. 64, 1589-1594.

2. SDS-PAGE, ウェスタンブロッティング; N末端アミノ酸配列の決定

図7 ショ糖密度勾配の作製と分画

図8 A型ボツリヌスprogenitor toxinのSDS-PAGEパターンの模式図

精製したprogenitor toxinを β -MEの存在下で、100℃で7分間加熱した後、5-20%アクリルアミドグラジエントゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルはCBB R-250で染色した。

1) SDS-PAGE

図8に精製した19 S毒素, 16 S毒素, 12 S毒素の電気泳動パターンの模式図を示した。SDS-PAGEはLaemmliの方法に従って行った。ただしN末端アミノ酸配列を調べる場合には0.1Mチオグリコール酸ナトリウム, 20%グリセロール, 0.05%ブロムフェノールブルーを含む溶液をサンプルより先に泳動し, この溶液が濃縮ゲル中に入ったことを確認してからサンプルを泳動する。この時サンプルと混合する緩衝液(SDS, 2-MEなどを含む)にはブロムフェノールブルーを加える必要はない。

2) エレクトロブロッティング

ブロッティング装置にはタンク式とセミドライ式のものがあるが, ここではセミドライブロッティング装置を用いたエレクトロブロッティングについて述べる。エレクトロブロッティング後にウェスタンを行う場合の操作に関してはヘリコバクター菌の病原因子の検索の項を参照されたい。この項ではN末端のアミノ酸配列を解析する場合の操作を中心に述べる。ブロッティング溶液は平野らの報告に従って調整している。

i) 試薬

- ・ブロッティング溶液A: 0.3M トリス, 10% メタノール
- ・ブロッティング溶液B: 25mM トリス, 10% メタノール
- ・ブロッティング溶液C: 25mM トリス, 40mM 6- ϵ -アミノ-n-カプロン酸, 10% メタノール

以下の試薬はN末端アミノ酸配列解析の場合のみで使用

- ・洗浄液: 10mM ホウ酸, 25mM 塩化ナトリウム

これらの試薬を蒸留水に溶解した後水酸化ナトリウムでpHを8.0に合わせる。

- ・PVDF膜染色液: 40% メタノール, 10% 酢酸, 0.1% クーマシーブリリアントブルー
- ・PVDF膜脱色液: 50% メタノール

ii) 方法

- ①電気泳動終了後, ゲルをブロッティング溶液Cに浸し5分間ほど穏やかに振盪する。
- ②ブロッティング溶液Cを入れ替え, 更に5分間ほど穏やかに振盪する。この時メタノールに10秒ほど浸したPVDF膜をゲル

と共に容器に入れ、振盪する。

- ③適当な大きさに切ったろ紙2枚をブロッキング溶液Aに浸し、1枚ずつ転写版（陽極電極）の上に重ね合わせる。この時ろ紙を溶液に浸しすぎないように注意する。ろ紙が溶液で湿る程度で十分である。ろ紙を重ね合わせて行く際には転写版とろ紙、あるいはろ紙同士の間には気泡が入らないよう注意する。
- ④③と同様にろ紙2枚をブロッキング溶液Bに浸し、③のろ紙の上に1枚ずつ重ねる。
- ⑤振盪していたPVDF膜とゲルを順次重ねる（図9参照）。
- ⑥少し大きめに切ったろ紙2枚をブロッキング溶液Cに浸し、ゲルの上に1枚ずつ重ねる。
- ⑦陰極側の転写版を重ね、 $1\sim 2\text{mA}/1\text{cm}^2$ ゲルの定電流で、90分間転写を行う。ウェスタンを行う場合はこの後ブロッキングを行う。
- ⑧転写終了後PVDF膜を取り出し、洗浄液中で5分間振盪する。
- ⑨蒸留水中で振盪する(5分間×2回)。
- ⑩染色液に浸し1分間穏やかに振盪する。
- ⑪脱色液に浸し、蛋白のバンドが見えるようになるまで数回脱色液を交換しながら振盪する。
- ⑫蒸留水中で振盪する(5分間×3回)。
- ⑬PVDF膜をろ紙に挟んで一晩乾かす。
- ⑭シーケンスを解析するまでPVDF膜は冷

蔵庫に保存する。シーケンスを行う際には目的の蛋白のバンドをハサミあるいはナイフで切りだし、シーケンサーのホルダーにセットする。N末端アミノ酸配列の解析にはpulsed-liquid phase sequencer (model 477-A; Applied Biosystems)を使用している。

【参考文献】

- 1) Hirano, H., and Watanabe, T. (1990): Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrixes from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein. *Electrophoresis* 11, 573-580.

III. ボツリヌス毒素の消化管での吸収機構の解析；免疫組織染色法

ボツリヌス食中毒は食物などに存在するボツリヌス progenitor toxinを経口摂取した後、巨大分子である毒素が小腸より吸収されることにより引き起こされる。我々は毒素の消化管での局在およびそれに引き続き起こる吸収の過程を明らかにする目的で、*in vivo*（結紮腸管）および*in vitro*（腸管の切片）の系を用いた免疫組織染色法を行っている。

図9 セミドライブロッキング装置を用いた
エレクトロブロッキング

1. *in vivo* 試験 (結紮腸管にボツリヌス progenitor toxinを注入し局在を観察する方法)

毒素を注入した腸管ループを取り出し、腸管内をPBSで軽く2回洗浄した後は、通常の免疫組織染色の方法と同様の操作を行う。

1) 試薬・材料

- ・ボツリヌス精製C型神経毒素 (15万), progenitor12 S毒素 (30万), 16 S毒素 (50万)

- ・モルモット (6・8 w 齢)

- ・PLP固定液:

A液: 1.83 gのリジン塩酸塩 (L-リジン塩酸塩 特級 ナカライ) を50 mlの蒸留水に溶かす。次いで0.1 Mのリン酸二ナトリウムでpHを7.4に調製し, 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて100mlとする。4℃保存。

B液: 8 gの parahorm aldehyde (電顕用 ナカライ) を65℃くらいに加熱した100 mlの蒸留水に攪拌しながら溶かし, 1NのNaOHを3~5滴加えて, 溶液が透明になったところで止める。濾過後, 4℃保存。

使用直前にA:Bを3:1の割合で加え, メタ過ヨウ素酸ナトリウム (特級 ナカライ) を21.4mg/10 mlの割合で加え, 溶解後使用液とする。この固定液はA液, B液ともできるだけ新しいほうがよく, 週に1度は作り替えた方がよい。

- ・0.3% H₂O₂加メタノール: メタノール100 mlに30% H₂O₂を1 mlの割合で加える。

- ・PBS (0.01 M リン酸緩衝食塩水):

下記の0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) 50 mlにNaCl 8.5 gを加え, さらに蒸留水を加えて全量を1000 mlとする。

0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)

A液: 0.2 M NaH₂PO₄ · 2H₂O

15.6 g/500ml

B液: 0.2 M Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.6 g/l

B液にA液を加えてゆきpH 7.4とする。

- ・DAB-H₂O₂ 反応液:

0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) 100 mlに3,3'-ジアミノベンチジン 25 mgを加え攪拌溶解する。使用直前に30% H₂O₂を50 μlの割合で加えて反応液とする。

2) 方法

24時間絶食したモルモットをネンブタールなどで麻酔後, 開腹

↓

腸管各部を結紮し3~4 cmのループを作り, C型16S毒素¹を27ゲージ針にて投与

室温1時間

↓

腸管内をPBS (pH 6.0) で2回, 軽く洗浄

↓

PLP固定², 水中5時間

↓

パラフィン包埋

↓

5μm切片をAPSコートスライドに拾う

↓

45℃の恒温槽で乾燥

↓

37℃の恒温槽で乾燥

↓

脱パラフィン

↓

PBSにつける

↓

0.3% H₂O₂加メタノール処理³ 室温30分

↓

0.1%トリトン加PBSで洗浄

↓

1 M グリシン⁴, 0.1%トリトン加PBS処理
室温1時間

↓

0.1%トリトン加PBSで洗浄

↓

3%正常ヤギ血清, 0.1%トリトン加PBSで

処理 室温1時間

↓

一次抗体⁵ 4℃一晚

↓

0.1%トリトン加PBSで洗浄 室温10分×2回

↓

ビオチン化二次抗体^{5, 6} 室温1時間

↓

0.1%トリトン加PBSで洗浄 室温10分×6回

↓

アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体⁶ 室温30分

↓

0.1%トリトン加PBSで洗浄 室温10分×3回

↓

DAB-H₂O₂ 反応液⁷

↓

流水水洗

↓

ヘマトキシリンで核染色

↓

脱水, 透徹, 封入

〈注意事項〉

1. C型16S毒素は20µg/ml になるように0.2% gelatin加0.02 M リン酸緩衝液 (pH6.0)で希釈し, 0.3~0.5 ml を注入。陰性コントロールとして, 0.2% gelatin加0.02M リン酸緩衝液 (pH6.0)のみを別のループに同様に注入。
2. 固定を4%パラホルムアルデヒド (PFA)で行っても同様の結果が得られたが, PLP固定の方がより強く染色された。
3. 内因性ペルオキシダーゼを失活させるために行う。
4. 遊離のアルデヒド基をブロックすることによりバックグラウンドを下げる。
5. 抗体の希釈はすべて最終濃度3%の正常ヤギ血清を含む0.1%トリトン加PBSを用いる。また一次抗体としては, C型16S毒素に対するポリクローナル抗体を4×10³倍

に希釈して用いた。

6. Vector社製Vectastain Elite ABCキットのものをを用いる。希釈率はキットの説明書に従う。
7. 顕微鏡で観察しながら, 適当なところで反応を止める。

3) 結果

本実験により①ボツリヌスC型16S毒素は, 小腸上部の上皮細胞の刷子縁に強く結合するが, 胃および大腸にはほとんど結合しないこと, ②C型12Sおよび7S毒素は, 胃, 小腸および大腸の上皮細胞には結合しないことが明らかとなった。

2. *in vitro* 試験 (固定した腸管組織切片を用いる方法)

免疫組織染色の方法は1. の項と同様であるが操作の順番が異なることがあるので注意する。

1) 試薬

- ・ 4%パラホルムアルデヒド固定液 (PFA固定液) :

パラホルムアルデヒド4gを約90mlの0.1M リン酸緩衝液pH7.4に加え, 60℃以下の恒温槽中で攪拌して溶かす。冷水中で冷却後, 濾過し, 同緩衝液で100mlとし4℃保存。1週間ほど保存可能であるが, できるだけ新鮮なほど良い。

2) 方法

24時間絶食したモルモットを麻酔後, 小腸各部を2 cmほど切り出す

↓

PFA固定, 4℃24時間

↓

パラフィン包埋

↓

5µm切片をAPSコートスライドに拾う

↓

45℃の恒温槽で乾燥

↓

37℃の恒温槽で乾燥
↓
脱パラフィン
↓
PBSにつける
↓
1 M グリシンを含むPBS-0.1%Triton X-100
で処理 室温1時間
↓
PBS-0.1%Triton X-100で1回洗浄
↓
16S毒素 (1μg/ml in PBS, pH 6.0) 処理
室温1時間
(negative controlとしてPBSのみで処理した
切片も用意する。)
↓
PBS-0.1%Triton X-100で洗浄
室温10分×6回
↓
0.3% H₂O₂加メタノール処理 室温30分
↓
PBS-0.1%Triton X-100で1回洗浄
↓
3%正常ヤギ血清を含むPBS-0.1%Triton
X-100で処理 室温1時間
↓
一次抗体¹ 4℃一晩
↓
PBS-0.1%Triton X-100で洗浄
室温10分×2回
↓
ビオチン化二次抗体 室温1時間
↓
PBS-0.1%Triton X-100で洗浄
室温10分×6回
↓
アビジン-ビオチン-ペルオキダーゼ複合体
室温30分
↓
PBS-0.1%Triton X-100で洗浄

室温10分×3回
↓
DAB-H₂O₂ 反応液
↓
流水水洗
↓
ヘマトキシリンで核染色
↓
脱水, 透徹, 封入

〈注意事項〉

1. 一次抗体としては, 1 の項で述べたC型
16S毒素に対するポリクローナル抗体を
4×10³倍に希釈して用いた。

3) 結果

in vitro の実験により①ボツリヌスC型16S
毒素は, 小腸の上皮細胞の刷子縁および粘液
細胞中の粘液顆粒に強く結合するが, 胃およ
び大腸の組織には, ほとんど結合しないこと,
②C型12Sおよび7S毒素は, 胃, 小腸および大
腸の組織にほとんど結合しないこと, ③さら
に切片をノイラミニダーゼ処理 (3U/ml, 37
℃, 12時間) すると, 16S毒素による染色は観
察されなくなることから, 16S毒素の結合には
細胞側のシアル酸が重要であることが示され
た。

以上, *in vivo*と*in vitro*の2つの実験系によ
り, ボツリヌスC型16S毒素は消化管において
は, 小腸 (上部) に特異的に結合すること,
および16S毒素中のHA成分がprogenitor 毒素
の腸管への結合性を付与していることが明ら
かとなった。

IV. その他

1. ボツリヌス毒素に対するモノクローナ ル抗体 (マウス) の作製

毒素を精製し, これをセロハン膜に入れた
後, ホルマリンを最終濃度0.4~0.6%に加えた
リン酸緩衝液¹で, 室温で1週間程透析しトキ

ソイド化する。50 μ g/ml程の濃度のトキシイド 0.5ml²を、2週間程の間隔でBALB/cマウスの腹腔内に投与し基礎免疫を行う。その後2週間以上経てから、抗原0.1mlを静注しブースターを行った後、3日目に屠殺し脾臓を得る。その後他の実験書に記載されているように、脾臓細胞(B細胞)とミエローマ細胞をポリエチレングリコールで融合させ、HAT培地で選択し、融合細胞を得る。抗体産生融合細胞をELISA法で選び、これを限界希釈法でクローニングし、モノクローナル抗体産生細胞を確立する。細胞をマウスの腹腔内に投与し、腹水を得ることにより高力価の抗体が得られる。腹水よりIgGを得るには腹水を0.1M トリス塩酸緩衝液(pH7.4)で透析し、これをDE52カラムに流し、カラムに結合しない部(pass-through fraction)を集め、50%硫酸分画をすると良い。毒素(抗原)を結合させたカラム(アフィニティーカラム)を用いると抗原特異的な抗体が得られる。その他、protein Aのカラムも利用できる。

〔注意事項〕

1. A, E型毒素はpH6.0の, C, D型毒素はpH8.0の緩衝液を用いる。またホルマリン液は数回取り替えること。
2. 必要に応じ、アジュバントと混ぜても良い。

〔参考文献〕

- 1) Oguma, K., Agui, T., Syuto, B., Kimura, K., Iida, H., and Kubo, S. (1982): Four different monoclonal antibodies against type C₁ toxin of *Clostridium botulinum*. Infect. Immun. 38, 14-20.
- 2) Oguma, K., Murayama, S., Syuto, B., Iida, H., and Kubo, S. (1984): Analysis of antigenicity of *Clostridium botulinum* type C1 and D toxins by polyclonal and monoclonal antibodies. Infect. Immun. 43, 584-588.

- 3) Tsuzuki, K., Yokosawa, N., Syuto, B., Ohishi, I., Fujii, N., Kimura, K., and Oguma, K. (1988): Establishment of a monoclonal antibody recognizing an antigenic site common to *Clostridium botulinum* type B, C₁, D, and E toxins and tetanus toxin. Infect. Immun. 56, 898-902.

2. 遺伝子のクローニングから大腸菌における蛋白質発現まで

毒素遺伝子群はC型の場合、ファージゲノム中に存在しているので、c-stファージよりDNAを抽出し、 λ gt 11に組込みライブラリーを作製した。スクリーニングは神経毒素、および nontoxic-nonHAに対するモノクローナル抗体を用い、常法に従って行った。大腸菌における蛋白質発現は毒素複合体の各コンポーネントの遺伝子をPCR(プライマー部分に適当な制限酵素認識部位を挿入)で増幅したのち、pGEX-5X-3ベクター(Pharmacia)に組込み、大腸菌DH-5 α に形質転換させた系で行っている。目的蛋白質を発現させた後のカラム精製およびフュージョン蛋白の切り出しは、常法に従って行っている。

〔参考文献〕

- 1) Fujinaga, Y., Inoue, K., Shimazaki, S., Tomochika, K., Tsuzuki, K., Fujii, N., Watanabe, T., Ohyama, T., Inoue, K., and Oguma, K. (1994): Molecular construction of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and its gene organization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 1291-1298.
- 2) Oguma, K., Fujinaga, Y., and Inoue, K. (1995): Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. Microbiol. Immunol. 39, 161-168.
- 3) Fujita, R., Fujinaga, Y., Inoue, K.,

Nakajima, H., Kumon, H., and Oguma, K. (1995): Molecular characterization of two forms of nontoxic-nonhemagglutinin components of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. FEBS letters 376, 41-44.

B. ヘリコバクター・ピロリ菌の検索

1. 菌の分離・同定, パルスフィールド, MIC

1. 培養

*H. pylori*はラセン状もしくは湾曲した桿菌状のグラム陰性細菌であり、微好気性の菌である。ただし、over growthになると菌体は球状化(coccoid form)し、培養不能となる。

微好気性で培養するためにガスチャンバー、ジャー、CO₂ インキュベーターが使用されるが、通常大気に曝すことなく継代可能なガスチャンバーの使用が最も望ましい。まず、使用培地および各環境での増殖状況を述べ、次いで実際に行っている筆者らの方法を具体的に記載する。

1) 培地

基本的には血液成分の添加された培地を使用するが無血清培地でも増殖し、合成培地も報告されている。

i) 血液成分添加培地

寒天平板培地としては5-10% 血液もしくは血清添加培地が一般的に用いられているが、最も頻用されているのは7%馬血液添加ブルセラ培地である。基礎培地としてBrain heart infusion (BHI) 培地やコロンビア培地も用いられる。液体培地では5~10%血清(馬もしくはウシ胎児)添加の上記培地が用いられる。我々は5%馬血清添加の培地を標準的に使用している。これらの基礎培地では、*H. pylori*は馬血清では3%以上の添加で問題なく増殖するが、

1%以下になると増殖しづらい。

ii) 無血清培地

*H. pylori*の増殖には血液成分は必須でなく、炭末、BSA、デンプン、dimethyl- β -cyclodextrinなどを添加すると血液成分の添加なく増殖する。しかし、多くのものは増殖支持能は低く、長期の継代は困難である。ただ、dimethyl- β -cyclodextrin (Teijin)の増殖支持能は高く、0.1~0.2%に添加するとほとんどの株で恒常的に継代可能であり、培地に馴化すると増殖性も血液成分添加培地とさほど変わらない(これは添加後オートクレープして使用すればよい)。メチル化されていない β -cyclodextrinの増殖支持能はdimethylに比べるとかなり低い。

iii) 合成培地

Glucoseを多量に含む合成培地が報告されているが、これでもBSAの添加は必要である。詳しくは論文を参照されたい。

〈注意事項〉

寒天培地は微好気環境で静置培養すれば良いが、液体培養では静置培養を行うと、十分な増殖が得られにくく、さらに凝集したcoccoid formの菌体が底面に早期から沈殿しやすい。均一なラセン状菌体を得るためには振盪培養が必要である。また、振盪程度が弱いと凝集状で増殖することも多いため、培地全体が攪拌されており、かつ泡があまりできない程度に振盪されたい。

2) 各環境における増殖状況

i) ガスチャンバー

嫌気培養用ガスチャンバー(グローブボックス)内を混合ガス(庫内環境ガス)で微好気にして使用する。混合ガスは5% O₂, 10~15% CO₂, 残り N₂である(我々は10% CO₂)。嫌気培養用ガスチャンバーには庫内に小型インキュベーターが設置してある機種とチャンバー全体が温度コントロール可能な機種がある。*H. pylori*では液体培養に振盪が必要であるため、我々はチャンバー全体が温度コントロー

図10 ガスチャンバー内 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, at 37°C) での
H. pylori NCTC11638の5%馬血清ブルセラ液体培地における増殖

ル可能な機種に小型振盪器を設置して使用している。この環境では大気に曝すことなく継代可能であり、最も安定した増殖が得られる。

この環境で振盪培養した5%馬血清添加ブルセラ液体培地での*H. pylori* (NCTC 11638株)の増殖を図10に示した。これは3代振盪液体培養で継代した菌をあらかじめ1日間チャンバー内でガス・温度を平衡化した液体培地に1/100接種し、経時的に菌数を測定したものである。接種菌はほぼfull growthの状態で菌体は長く、軽く凝集を認めた。6hで急に菌数が増加しているが、この時の菌体は短く、接種された長い菌体が一時に分裂したため菌数が増加したと思われる。その後菌数は順調に増加し、翌日(24h後)には培地は明らかに濁るが、菌体は菌数の増加とともに長くなった。30h後にはほぼfull growthとなり、菌体長も接種菌と同程度となった。3日後まではcoccoid bodyはほぼ観察されないが、以後少しずつ増加していった。5日後まではfull growthの菌数を維持していたが、6日後以降はcoccoid bodyの増加とともに生菌数は減少した。なお、coccoid bodyは凝集して観察されることが多かったが、凝

集菌体がcoccoid化しやすいのか、coccoid bodyが凝集しやすいのかは不明である。

以上述べたごとく、ガスチャンバーでは増殖は他の環境に比べて早く、coccoid化は遅い。しかし、この増殖曲線は長期に継代された標準株のものである。新鮮分離株では増殖はほぼ標準株と変化はないものの、以後のcoccoid化は早く、3日後にはほぼすべての菌がcoccoid bodyとなる菌株がほとんどで、2日後にはかなりcoccoid bodyが観察される株も多い。また、寒天培地においてはcoccoid化は遅く、1週間以上10日前後まではかなりの生菌を維持している(十分に継代可能)。

ii) ジャー

各社から市販されている嫌気培養用のジャーにキャンピロバクター用ガスバックを入れ培養するもので、一般的に用いられている。製造会社としてはBBL, Oxoid, 三菱ガス化学(発売;シンテック)がある。BBL, Oxoid製ジャーは合成樹脂製の円筒状であるが、内容量はOxoid製がやや多い。三菱ガス化学製には多種あり、円筒状合成樹脂製やマイクロプレートの入る角型のものがある。ただ、三菱ガス

化学円筒状合成樹脂製ジャーは簡易タイプであり、10数回使うと穴あきにより培養に失敗することがある。

微好気用(キャンピロバクター用)ガスバックも各社から市販されているが、BBL, Oxoid製は蒸留水を加えて使用する。三菱ガス化学製は包みを開けてそのまま使用するが、寒天培地培養では別シャーレか底面に紙などを置き水を加えておく。また、シャーレ2枚が培養可能なポーチ式のものもある(BBL, 三菱ガス化学)。

液体培養ではこれらジャーの中に培地を入れ、ジャーごと振盪して培養する。ただ、培地量があまり深くなるとガス交換がうまくできないためか、増殖が悪い。我々は500mlのフラスコに200ml以下の培地を入れ、振盪培養している。同一ジャーに多数の小容量フラスコを極力水平に詰め、振盪してもよい。なお、振盪培養ではBBL, 三菱ガス化学製容器が良い。Oxoid製は最も頑丈で壊れ難く、寒天培地静置培養には適しているが、フタが金属製で重く重心が高いため、振盪時転倒しやすい。

このジャーでの培養は大気中で継代操作を行うため、バックをいれてから微好気状態になるまである程度の時間を要するため、ガスチャンバーに比べると増殖はやや遅い。しかし、液体培地では大気中操作を手早く行い、1/40～1/50量程度を接種すれば24hで明らかに濁るまで増殖する(前培養菌の状態にもよるが、2日を要すること多い)。寒天培地でも同様の理由で、生菌数はガスチャンバーに比べるとやや低めで増殖も1日程度遅れるため、継代時は濃いめに菌を塗布されたい(特に新鮮分離株では)。また、full growth以後のcoccoid化は早く、液体培養では3日後(濁りはじめてから2日後)にはかなりのcoccoid formを認める。従って、この環境でラセン状菌体を得たい時は、液体培養の場合では濁りはじめてから24h以内には集菌されたい。寒天培地での継代でも1週間培養すると、継代できないことがある。

継代は3～5日毎に行うことが望ましい。なお、ジャーを用いた培養で、嫌気培養用触媒(白金・パラジウム含有)を使わず、嫌気培養用バックのみを使用する方法もある。

iii) 細胞培養用 炭酸ガス培養器

通常細胞培養に用いられる炭酸ガス培養器で炭酸ガス濃度を10～15%にして*H. pylori*を培養する方法である。内部で振盪を行うことは困難なため、寒天培地での培養用として使用できる。菌株の出入が簡便で、培養途中での増殖も観察できるため便利である。

胃生検などの臨床材料からの分離では増殖しない株もあるため、これには推奨できない。我々は標準株および増殖の良い臨床分離株の継代に使用している。ただし、full growth以後のcoccoid化は早く、1週間培養を続けると継代不能になる株は多く、5日以内の継代が必要である。

iv) ローソク培養

古く、*Nisseria gonorrhoeae*の培養に用いられたcandle jar methodである。この方法でも臨床材料からの分離は可能である。わが国で用いることはないと思われるが、応急時もしくは海外での菌分離には使用でき得る。これに使用できる市販ジャーはフタが金属製であるoxoidのものが良い。

[参考文献]

- 1) Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciard, S., Rappuoli, R., Bayeli, P. F., Abate, L., Sposito, E., De Gregorio, L., Aziz, J., Basagni, C., and Figura, N. (1993): Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. J. Clin. Microbiol. 31, 160-162.
- 2) Marchini, A., d'Apolito, M., Massari, P., Atzeni, M., Copass, M., and Olivieri, R. (1995): Cyclodextrins for growth of *Helicobacter pylori* and production of vacuolating cytotoxin. Arch. Microbiol.

生検材料

滅菌生理食塩水中

冷蔵保存 (最高2時間まで, 出来る限り早く処理するのが望ましい)

図11 検体からの菌の分離

164, 290-293.

- 3) Reynolds, D. J., and Penn, C.W. (1994): Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. Microbiology (Reading) 140, 2649-2656.

2. 検体からの菌の分離・同定

以下に筆者らが行っている方法を記載する。

1) 検体

菌を分離するための検体は, 内視鏡による胃生検材料を用いる。唾液, 歯垢, 糞便などから分離されることもあるが検出率は低い。

通常, 検体は幽門前庭部, 胃体部の二カ所より採取され, それぞれを滅菌したホモジナイザー, 乳鉢などですり潰し培地に塗る (図

11)。

2) 培地

- ・基礎培地: Brucella agar, Brain Hart Infusion agar, Columbia agarなど
- ・添加物: 馬脱繊維素血または馬血清, 5~10%。
- ・抗生物質: Vancomycin 10 μg/ml, Polymyxin B 2.5I.U./ml, Trimethoprim 5 μ/ml, (Amphotericin B 10 μg/mlを抗カビ剤として加えても良い)

筆者らは臨床検体からの初代培養には Brucella agarを基礎培地に7%馬血液, 上記抗生物質を加えた培地と, これより抗生物質を除いた培地の2枚を併用している。

3) 培養条件

微好気条件, 37℃, 5~7日間培養する。市販のガスバックジャーを用いた場合, ガ

ス発生袋にはカンピロバクター用と嫌気性菌用があり、嫌気性菌用を用いる場合にはカタリスト（触媒）を外して使う。

4) 同定

約1週間培養後、直径約1mmスモース型のコロニーが観察される。グラム染色をして、螺旋菌であることを確認する。生化学性状は、強いウレアーゼ活性（市販の腸内細菌用尿素培地に菌を懸濁すると数分で反応が観察される）、チトクロームオキシダーゼとカタラーゼ陽性を確認する。

選択剤として抗生物質が添加された培地でも他の菌の増殖が認められる事があるが、ヘリコバクターのコロニーに比べ大きなコロニーができ容易に鑑別できる。培地に生育する他の菌としては、カンジタ、ブドウ球菌、好気性グラム陰性桿菌が多い。慣れてくるとコロニーの形態だけで推察できる。

〈注意事項〉

1. 希ではあるがヘリコバクターが培地に添加した抗生物質により発育が良くない時があり、又他の雑菌の有無も調べられるので、選択剤の入っていない培地を分離培養時に併用したほうがよい。
2. カンピロバクター用のガス発生袋を用いて初代培養した場合、培養不能か、植え継ぎが出来ない時がある。嫌気用ガスパックにカタリストを外して培養したほうが良い結果を得られる時がある。
3. 感染の診断には、培養に加えウレアーゼテスト、組織病理診断、血清診断を併用し総合的に判断する。

3. 染色体DNAフィンガープリント (パルスフィールド電気泳動法)

現在細菌においては個々の菌株同定は遺伝子の比較によって行われる。これを行うには種々の方法があるが、代表的なものが染色体DNAの制限酵素切断パターンである。DNAを

切断部位の多い酵素（Hind III）で処理すると、染色体DNAは多くの小断片になるため通常のアガロース電気泳動で泳動可能であるが、断片数が多くパターン比較が困難である。このため染色体DNAを約10～20断片にする制限酵素で処理すると容易にパターン比較が可能であるが、個々の断片が長いためパルスフィールド電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis: PFGE）が必要となる。また、この方法では染色体DNAの機械的損傷をさけるため、菌体をagaroseに封入してすべての処理を行うので各過程が長時間を要し、制限酵素も多量必要である。

この方法は*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*など多くの菌種で行われており、溶菌法・制限酵素種などの系が確定すれば当然ながら同一菌種の菌株はすべてパターン比較が可能である。しかし、*H. pylori*では制限酵素としてNot I, Nru Iが多く使用されているが、切断されない菌株がある程度存在する（この点については後でも述べる）。従って*H. pylori*の現時点でのPFGEによる染色体DNAパターン比較法は完成されたものではない。

我々が行っている方法は荻田らのものを基にしているが、やはり切断されない菌株は存在する。ここでは我々が使用している機器（CHEF-DR II, BioRad）での方法を記述する。

1) 菌株培養

- ①7%馬血液添加ブルセラ寒天培地で3～5日培養。
- ②5%馬血清添加ブルセラ液体培地に培地が濁る程度に菌を植え、2日振盪培養。（バイアル瓶、小フラスコなどで小規模でよい。）
- ③同上液体培地に1/50量を接種し、1日振盪培養（最終培養：15ml程度。例えば、50mlフラスコに15mlの培地で培養する）。

〈注意事項〉

報告では寒天培地から掻き取った菌体も使用されているが、我々が行った限りでは液体

培養菌でしかも菌体の短い中期対数増殖期までのものが適当であった。

上記はガスチャンバー内での方法であるが、ジャーでも行える。大気中の環境で植え継いでも、手早く行えば1日で明らかに濁るまで増殖する(この場合はできればもう一代継代した方がよい)。振盪が弱いと凝集しやすいため培地全体が確実に攪拌されるようにする。

2) 菌液調製

- ① 最終培養液と等量の冷10%glycerol液(蒸留水中)を混ぜ、遠心
- ② 冷 glycerol 緩衝液 (1M NaCl, 10mM Tris, 10% glycerol, PH 7.5) にて2〜3回遠心・洗浄する。
- ③ 最終的にglycerol 緩衝液にて濁度をMcFarland 1〜3程度に懸濁する。

3) ゲルブロック作製

- ① ヒートブロックを60℃程度にして、エッペンドルフチューブをセットしておく。
- ② 加温溶解した(電子レンジなどで)2% agarose (Bio Rad: low melt preparative grade or PFGE用) / TE 緩衝液中(後述)を55℃に保温。
- ③ エッペンドルフチューブ内で調製菌液と agarose を1:1に混合する(計200-300 μ l あればよい)。
- ④ ゲルブロックボックスに注入し、冷却・固化する(100 μ l / well, 10well が1set)。

〈注意事項〉

この過程はagaroseが固まりやすいため、手早くする。

4) 溶菌および酵素による切断

以下の過程での反応および洗浄は、断らない限り緩やかに振盪しながら行う。

- ① 24well 細胞培養用プレートに 10mg/ml lysozyme / EC 緩衝液中(後述)を0.5ml ずつ分注し、この中にゲルブロックボックスからはずしたブロックを入れ、37℃で24h 反応させる(溶菌)。
- ② 0.5ml のESP 緩衝液 (0.5M EDTA, 1%

SDS, 1mg/ml proteinase K) に取り替え、55℃で24h 置く(蛋白分解：ここは振盪せず、静置で反応)。

- ③ 1mM PMSF (TE 緩衝液中) に取り替え、30min置く(この過程は省いてもよい)。
- ④ TE 緩衝液 で液を取り替えながら(3回以上) 4h 以上洗浄する(この過程は丁寧に言う)。
- ⑤ 制限酵素用緩衝液で約1h 洗浄(1回液替え)。
- ⑥ *Not* I 50Units (各製品で指定された緩衝液中) /well を入れ、37℃で24h 置く(制限酵素切断)。
- ⑦ 50mM EDTA (pH 8.0) で約1h 洗浄する(2-3回液替え)。

〈注意事項〉

ゲルブロックは作成後すぐもしくは制限酵素切断前TE 緩衝液 中の時に2〜3個に切断しておく。制限酵素切断前TE 緩衝液 中のゲルブロックは4℃でかなり長期に保存可能である。

5) ランニングゲル作成

- ① PFGE用agarose を 1% になるように2倍(0.5 $\times$)に希釈したTBE 緩衝液 (5倍濃縮 TBE 緩衝液のstock solutionを10倍希釈して使用；後述) に入れ、加熱溶解。
- ② ランニングゲル作成トレイに120mlを流し、comb (20穴用が適当) を装着し、固化する(約30〜60min, ゲルの深さが厚すぎると泳動時に過剰電流が流れやすいため、120mlは越えないように)。
- ③ ゲルを枠からはずし、4)で作成したゲルブロック(2〜3個に切断したもの)をwell に差し込む。

6) 電気泳動および観察

- ① 機器に0.5 $\times$ TBE 緩衝液を2〜3 l 入れ、泳動槽での深さが12mm程度に調整する(ランニングゲルがかろうじて緩衝液に浸かる程度。深さが15mmを越えると泳動時に過剰電流が流れやすいく、電極が切れやすい)。

- ② 冷却器を作動させ、緩衝液温度を13℃にする。
- ③ 5)で作成したゲルブロック入りランニングゲルを泳動槽の所定の位置に設置し、電気泳動を行う。泳動条件は initial; 10sec, final; 50sec, 200V, 26h である。また、泳動時緩衝液温度は13℃に保つ(温度は少なくとも15℃以下に保つこと)。
- ④ 泳動終了後、ランニングゲルを 0.5 μ g/ml の ethidium bromide に浸し、約1h 染色する。
- ⑤ UV transilluminater にて観察・撮影を行う。

7) 緩衝液

- ・ TE 緩衝液 (pH 7.5) : 10mM Tris, 5mM EDTA
- ・ EC 緩衝液 (pH 7.6) : 6mM Tris, 1M NaCl, 100mM EDTA, 1% N-lauroylsarcosine, 0.2% sodium deoxycholate
- ・ 0.5×TBE 緩衝液 (working solution) : 45mM Tris-borate, 1mM EDTA
- ・ 5×TBE 緩衝液 (stock solution) (per liter) : 54g Tris base, 27.5g boric acid, 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

【参考文献】

- 1) 荻田幹夫, 吉松健夫, 沖田 極, 尾内一信 (1993): パルスフィールド電気泳動法を用いた *Helicobacter pylori* DNA の解析. 日本臨床. 51, 3102-3107.
- 2) Taylor, D.E., Eaton, M., Chang, N., and Salama, M. (1992): Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. J. Bacteriol. 174, 6800-6806.
- 3) Takami, S., Hayashi, T., Tonokatsu, Y., Shimoyama, T., and Tamura, T. (1993): Chromosomal heterogeneity of *Helicobacter pylori* isolates by pulse-field

gel electrophoresis. Zbl. Bakt. 280, 120-127.

4. MIC 測定法

H. pylori においても通常の細菌で行われている MIC 測定法 (ディスク法, 薬剤希釈法) を施行することは可能であるが, *H. pylori* が増殖に長期を要することなどから変更される点もある。以下に *H. pylori* の MIC 測定においての特殊事項を中心に測定法を述べる。なお, *H. pylori* の MIC 測定用培地としては血液もしくは血清の添加されたものを使用することが多く, ここでも血液成分の添加培地を用いた方法を記述するが, 薬剤によっては血液成分の添加・無添加で大きく MIC が異なってくる薬剤も多いため注意が必要である。

1) ディスク法 (E-test)

一般的に患者分離株の MIC は 1 濃度ディスクで行われることが多いが, *H. pylori* に対しては信頼性はないとされている。現在世界的に行われているディスク法として epsilometer test (E-test; AB Biodisk 社, Solna, Sweden. 日本ではアスカ純薬が輸入申請中) がある。これはストリップ (5mm×61mm) に薬剤を濃度勾配をつけて含有させたもので, 100 枚単位 (10 枚×10) である。一般細菌用に開発されたものであるが, *H. pylori* に対しても薬剤希釈法 (寒天平板) と良く相関するとされており, 以下にこれを用いた方法を述べる。

- ① 7% 馬血液添加ブルセラ寒天培地に一面に菌を接種し, 2~3 日培養する (ここではラセン状の菌体を保持している増殖中の菌を使用することが重要であり, coccoid 状の菌体が多いと濁度はあっても実際の試験で十分な菌増殖が得られないことが多い。このため短期培養にとどめる)。
- ② 菌体を掻き取り, ブルセラ液体培地 (with or without 5% 馬血清) に McFarland 比濁標準 No1~2 濃度に調製する。
- ③ 滅菌綿スワブを菌液に浸した後, 試験管

図12 E-test (metronidazoleのストリップ) での *H. pylori* 増殖阻止状況の模式図

壁に押しつけ余分な液を落とす。

- ④ 7%馬血液添加ブルセラ寒天培地に一面に菌を塗布する。
- ⑤ 培地面から水がなくなった後、薬剤ストリップを置く。
- ⑥ 3日 (72h) 培養する。
- ⑦ シャーレを開け、増殖阻止帯を観察し、阻止帯がストリップに交叉する部位のストリップ上濃度を読みとる。この数値をMICとする (図12参照)。

〈注意事項〉

我々はガスチャンバー内で全過程を行っており、これを標準に記述した。作業を大気中で行い、ジャー中で培養する場合は接種スワブの液量を少なくして早く培地表面が乾くようにすること。また、接種菌濃度はMcFarland 比濁標準 No3~4にして高濃度の菌液を作成されたい。

ストリップが約6cmと長いため、通常の9cm径シャーレでは1種類のストリップしか置けない。14~15cm径シャーレでは6種類が可能である。しかし、この大シャーレだと培養にガスチャンバーが必要となる。三菱ガス化学社製

造(シンテック 発売)の嫌気性菌・キャンピロバクター培養用器材でマイクロプレート用角型ジャー (底面 115mm×175mm, 高さ 62mm) が市販されており、これに入る角型シャーレ (ニッスイ角シャーレ2号など) を使用すれば数種のストリップを置くことが可能である。

2) 薬剤希釈法

この方法には寒天平板希釈法と(微量)液体希釈法とがあり、どちらも *H. pylori* に使用されているが、寒天平板希釈法が多い。基本的には一般細菌と同じであるが、ここでは我々が行っている寒天平板希釈法を記述する。

- i) 段階希釈薬剤含有寒天平板作製
使用器具はあらかじめ滅菌しておく

- ① 設定培地量の85%の蒸留水にブルセラ寒天培地を溶かし、オートクレーブを行う。(設定が400mlだと340mlの蒸留水に400ml分の培地を溶かす。)
- ② 培地を混ぜ、恒温槽にて55℃に保温する。
- ③ 設定培地量の5%の馬血清を添加し、培地攪拌後、55℃に保温する。
- ④ 別に薬剤を1mg/mlになるよう滅菌蒸留水で溶解する。(薬剤によっては蒸留水に難

溶なものも多く、酸やアルカリを添加したり、DMSOで溶解することもある。例えばオメプラゾールはDMSOで10mg/mlに溶かし、滅菌蒸留水で1mg/mlに調製する。)

- ⑤ 上記薬剤液 (1mg/ml) を滅菌試験管で滅菌蒸留水を用いて2倍希釈系列を作る。
- ⑥ シャーレに2mlの各希釈薬剤をいれる。
- ⑦ シャーレに55℃に保温してある5%馬血清添加培地を18ml入れ、こぼれないように混ぜる。
- ⑧ クリーンベンチ中でシャーレのふたを少しずらして冷却し、培地を固化する (固化し、培地表面が乾燥してからも20分程度は放置しておき、よく水分をとばす)。

これが段階希釈薬剤含有寒天平板であるが、1mg/ml薬剤液から100 μ g/ml含有培地が作製され、以下50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39(0.4), 0.2, 0.1となる。通常は100 μ g/mlから0.1 μ g/mlの範囲で測定するがAMPCやCAMはMICが低いため、さらに希釈する必要がある(ただし、高濃度側を行う必要はなく、AMPCやCAMでは我々は3.13 μ g/mlから0.003 μ g/mlまでの範囲で行っている)。

薬剤含有寒天平板はMIC施行当日に作成する。

ii) 菌液調製およびMIC施行

- ① 7%馬血液添加ブルセラ寒天培地で3~5日培養。
- ② 5%馬血清添加ブルセラ液体培地に培地が少し濁る程度に菌を植え、2日振盪培養(バイアル瓶などで小規模でよい)。
- ③ 同上液体培地に1/50量を接種し、1日振盪培養。
- ④ 同上液体培地で菌液の濁度をMcFarland比濁標準 No1 濃度程度に調製する。
- ⑤ 菌液を使用レプリケーターに適合した容器に移す(筆者らの場合は小ガラス管)。
- ⑥ レプリケーターで菌を上記作製した段階希釈薬剤含有寒天平板に薬剤濃度の低い

方から接種する(最初にコントロールとして薬剤を含んでいない培地に接種しておく。使用レプリケーターにより一時に接種できる菌株数は異なるが、我々のものでは27菌株である)。

- ⑦ 接種液が培地に吸い込まれるまで置く(薬剤含有寒天平板を作製時によく乾燥しておかないとここで時間を要する)。

- ⑧ 3日間培養し、判定する。

〈注意事項〉

我々は段階希釈薬剤含有寒天平板は大気中クリーンベンチ内で作成するが、培養・接種などはすべてガスチャンバー内で行っている。すべての作業を大気中で行い、ジャーで培養することも可能であるが、この場合は接種菌濃度の高くし、手早く行うことが必要となる。また、E-testと同様に7%馬血液添加ブルセラ寒天培地短期培養菌(2~3日)を掻き取り、接種菌液を作成してもよいが、多種の菌株を行うと長時間を要し、菌が死滅しやすい。

培養の項でも述べたが液体振盪培養では振盪が弱いと菌が凝集しやすいため、培地全体が確実に攪拌されるよう振盪されたい。また、新鮮臨床分離株はover growthするとcoccoid formになりやすく、培養菌液の濁度は十分でも培養可能菌数は非常に少ない状況となることも多いため注意を要する。

【参考文献】

- 1) Baker, C. N., Stocker, S. A., Culver, D. H., and Thornsberry, C. (1991): Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J. Clin. Microbiol. 29, 533-538.
- 2) Glupczynski, Y., Labbe, M., Hansen, W., Crokaert, F., and Yourassowsky, E. (1991): Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility

testing of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 29, 2072-2075.

- 3) Knapp, C. C., Ludwig, M. D., and Washington, J. A. (1991): In vitro activity of metronidazole against *Helicobacter pylori* as determined by agar dilution and agar diffusion. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1230-1231.

II. 病原因子の検索

1. Vac A による培養細胞空胞化

H. pylori は種々の酵素・毒素を産生・放出することが知られている。この中で代表的なものが空胞形成毒素 (vacuolating toxin, cytotoxin, Vac A) である。Vac A は分子量約90,000の蛋白で培養細胞に空胞化起こす。消化性潰瘍患者由来株は胃炎患者由来株に比べてVac A (およびCag A) を産生するものが多いとの報告が多いが、差がないとの報告もあり、確定的ではない。ただし、*H. pylori* 保有者の血中から抗Vac A 抗体は検出されており、胃内で産生されていることは確実である。

H. pylori 株培養上清の培養細胞空胞化活性は様々であり、活性のほとんどない株もある。vac A 遺伝子はほとんどすべての株が保有しているがdiversity (不均一性) は高い。PCR によるvac A 遺伝子の検出, diversityの検討はPCRの項に述べ、ここでは培養細胞を用いた培養細胞空胞化活性の検出について基本的な方法を述べる。

1) Vac A 活性検出用培養細胞

培養細胞のVac A 感受性は様々であるが、ほとんどすべての細胞で空胞化は起こる。検出用培養細胞には感受性の高いHeLa細胞が多く使用されているが、Intestine 407細胞も感受性が高く、神谷らはRK-13細胞が高感受性と報告している。Vero細胞は感受性はHeLaより少し低いものの空胞化は観察しやすい。我々は

Vac A 活性のおおまかな検出にはVero細胞を使用し、活性測定にはHeLa細胞を用いている。また、シート状に増殖した培養細胞よりも細胞間の空間が残存している時期の細胞が多少空胞化は起こしやすい様である。

細胞の培養液には通常のDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) が5~10%FCS添加で多く使用されている。また、弱塩基(特にammonium塩)が存在すると細胞の空胞化が起こりやすいため、細胞培養液に10mM 塩化アンモニウムを添加してVac A 活性を調べてもよい。

2) Vac A 活性測定用 *H. pylori* 培養上清

Vac A 活性 (培養細胞空胞化活性) は *H. pylori* 培養上清に認められ、菌体の水抽出液中にも存在するが、超音波破碎菌体では非常に低い。従って、Vac A 活性測定には培養上清が用いられる。この時の培養は通常血清添加培養であり、無血清培養(dimethyl cyclodextrin 添加)では培養上清中にある程度の活性が認められる株もあるが、おおむね低い(血清添加培養から無血清培養に継代した1代目ではある程度活性が残る)。また、神谷らは培養上清中の空胞化活性は(1週間程度までは)培養日数に従い高くなると報告している。我々は通常5%馬血清添加ブルセラ液体培地で48~72h培養した遠心上清を使用している。

空胞化活性測定には培養上清そのものを用いることも可能であり、この場合は48~72h培養の遠心上清を0.2 μ m径のフィルターで濾過滅菌し使用する。しかし、培養上清そのものを使用すると活性を示さない株も多い。培養上清の濃縮使用が多いが、その方法は様々である。単に凍結乾燥し、蒸留水で溶かし最終的に原液の5~10倍に調整してもよいが、塩濃度が高いため細胞障害がしやすい。限外濾過法で濃縮すると塩類など低分子物質が除け、30倍程度まで濃縮可能である。また、Vac A は50%飽和硫酸で沈殿するため、これを利用してよい。

我々は硫安沈殿を行っている。まず培養上清に50%飽和量の硫安粉末を加え、1h程度攪拌しながら室温で放置し、その後室温で遠心して沈殿を得る。これを少量の20mM phosphate 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、透析チューブに入れ、同緩衝液に4℃で一夜、透析する。これを同緩衝液にて最終的に原液の1/10量に調整する(10倍濃縮になる)。培養上清濃縮液(限外濾過もしくは透析処理したもの)では培養細胞の空胞化とともに細胞の紡錘化など空胞化以外の細胞障害もある程度は認められる。しかし、硫安沈殿濃縮液ではほぼ空胞化のみが観察される。いずれの方法でも培養上清もしくは濃縮液を-30℃以下で保存可能である。

3) Vac A 活性測定

通常は濃縮した培養上清もしくは硫安沈殿濃縮液の2倍希釈系列を作成し、培養細胞に加えれば良い。希釈液には細胞培養液を用いるが、PBSなどの緩衝液でも良い。通常の培養細胞では緩衝液で希釈されても50%の細胞培養液濃度があれば、少なくとも24hは形態変化は起こさない。10倍濃縮液を原液とすると最終的に64倍希釈まで測定すれば十分である。反応容器は細胞培養用96穴マイクロプレートでよいが、永久標本を作成する時はチャンバースライドを用いる。

Vac A を含む液が培養細胞に添加されると3~4h後から徐々に細胞の空胞化が起こる。通常18~24h後に観察・判定を行う。観察には無染色でも行えるが小空胞は見逃しやすいため、ギムザ染色などを行う。判定は50%以上の細胞が空胞化している最大希釈倍率とすることが多い。なお、通常培養時の細胞でも極少数のものは空胞を持っており、コントロール細胞に空胞を持つものが多い場合は再検となる。また、判定にnutral red の空胞への取り込みを利用する方法もあるが、これについてはCoverらの論文を参照されたい。

【参考文献】

- 1) Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., and Morgan, D. R. (1988): Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J. Med. Microbiol. 26, 93-99.
- 2) Cover, T. L., Vaughn, S. G., Cao, P., and Blaser, M. J. (1992): Potentiation of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin activity by nicotine and other weak bases. J. Infect. Dis. 166, 1073-1078.
- 3) Cover, T. L., Cao, P., Lind, C. D., Tham, K. T., and Blaser, M. J. (1993): Correlation between vacuolating toxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. Infect. Immun. 61, 5008-5012.
- 4) Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1991): Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. Infect. Immun. 59, 1264-1270.

2. SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングによる各蛋白の証明

1) ヘリコバクター抗原に対する患者血清のウェスタンブロッティング

ヘリコバクターは胃に感染するが、血清中のIgG抗体価が上昇する事が知られている。菌のどのような蛋白分子に対して、抗体が反応しているのかウェスタンブロットにより検索することが出来る。ここでは患者血清を使ったヘリコバクター抗原に対するウェスタンブロット法について述べる。

i) 抗原の調製

筆者らは、SDS-PAGE及びウェスタンブロットに使われる抗原として、菌体の超音波破碎抗原を使用している。また細胞表面の蛋白を浸透圧ショックを利用して分離した水抽出抗原を用いることもある。

(a)超音波破碎抗原 (20S抗原)

① 液体培養した菌体（培養の項参照）を遠心洗浄し、菌体 1 g を 10 ml の蒸留水に懸濁する。

② 蛋白分解酵素阻害剤として

Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)* を終濃度 1~4 mM/ml 加える。

*PMSF は水に溶けにくいので 100% メタノールに 100 mM/ml に溶かし -20℃ に保存。

③ 超音波破碎。

氷冷し懸濁液にかけられる最大パワーで 10 分間処理、10 分冷却、さらに 10 分間処理する。

④ 遠心分離 20,000 × g, 30 分

未破壊の細胞、不溶性の成分を取り除く。

⑤ 上清を分離し、抗原として使用 (20S 抗原と命名)。

蛋白量を測定、この方法で 10~20 mg/ml の抗原が得られる。

この抗原には細胞質成分、細胞膜成分が含まれる。DNA, RNA など含まれるが SDS-PAGE には影響はない。気になるなら酵素処理して除く。

(b) 水抽出抗原

① 液体培養した菌体（培養の項参照）0.5 g を 10 ml の蒸留水に懸濁。

② 数分間ボルテックスミキサーで攪拌。

③ 遠心分離 20,000 × g, 30 分

この操作でウレアーゼを含む細胞表層の抗原、約 5 mg/ml が得られる。

ii) SDS-PAGE と膜への転写

① 抗原は SDS-PAGE サンプリング緩衝液と

1:1 で混ぜ、終濃度 5% になるように 2-ME を加える。

100℃ で 2 分間加熱後、100 µg / 0.5~1 cm の量をゲルにのせる。

② 電気泳動後、PVDF 膜に転写する。

iii) 抗体反応

① 転写した PVDF 膜を PBS 中で 5 分間震盪し洗浄、3~4 回。

表 2 ヘリコバクター・ピロリの主要蛋白抗原

分子量 (kDa)	蛋白名	遺伝子クローニングの有無
110~128	CagA	+ (cagA)
87	VacA	+ (vacA)
66 (62, 54)	HSP	+ (hsp)
60~65	ウレアーゼ B	+ (ureB)
63	アドヘジン	-
60	カタラーゼ	+
56	フラジェリン	+ (flaA)
30	ウレアーゼ A	+ (ureA)
26	ピロリ特異抗原	+
20	アドヘジン	+ (hapA)

② 10% スキムミルク・PBS でブロッキング、室温 1 時間。この状態で冷蔵庫に入れ、4℃ で 1~2 週間保存可能。

③ 膜をガラス板の上に置き、乾かないように注意しながら、3~5 mm の短冊にする。

④ インキュベーショントレイに入れ、10% スキムミルク・PBS で 50~100 倍に希釈した血清 3~5 ml を反応させる。室温 2~3 時間。

⑤ Tween 20 (0.5%)・PBS, 5 ml で 3 回洗浄、PBS で 1 回洗浄。

⑥ 10% スキムミルク・PBS で希釈した酵素標識した 2 次抗体* (抗ヒト IgG) 5 ml を 2~3 時間反応させる。

*抗体により希釈倍率は異なる。

⑦ Tween 20 (0.5%)・PBS, 5 ml で 3 回洗浄、PBS で 1 回洗浄。

⑧ 基質液 (1 mg/ml DAB, 0.5% H₂O₂ in PBS) を入れバンドの発色状態を見ながら反応させる。

⑨ 反応を止め、水洗。濾紙の上で乾燥させる。

iv) 結果の判定

ヘリコバクターの病原因子としてはこれまで多くの蛋白が同定されてきた、表 2 にその主なものを示した。蛋白の多くは、ヒトの抗体とウェスタンブロッティングで反応する。病状や疾患との関連は、現在研究中である。

2) SDS-PAGEから抽出した蛋白抗原に対する抗体の作製

上記蛋白の主なものの遺伝子はクローニングされ、塩基配列（アミノ酸配列）も決定されているものが多い。SDS-PAGE後、N-端のシーケンスを決定すれば蛋白の同定も容易である（本稿N末端アミノ酸配列の決定の稿参照）。

これら同定した蛋白を、SDS-PAGEより電気抽出し、兎に免疫してポリクローナル抗体を作製する方法について述べる。

i) 抗原

前述の抗原の作製参照。

ii) SDS-PAGE

- ① ゲルはミニゲルではなく、分離ゲルの長さが10cm以上、出来ればゲル厚2mmあるものを使用する。試料は蛋白量2～3mgを泳動する。目的の蛋白の分子量によって分離度を考えてゲル濃度を設定する。
- ② クマシーブリリアントブルーで染色し、メタノール40%、酢酸10%、水50%の脱色液で脱色する。
- ③ 目的の蛋白バンドを切り出す。
- ④ ガラス板上で細かく切り、ガラスホモジナイザーで擦り潰す。
- ⑤ 電気抽出の装置にかける（BioRad, S&Sなどの装置）。
 - ・ 抽出緩衝液：Tris-glycine 緩衝液（Tris 3g, glycine 14.4g, H₂O 1l）
200 V, 約18時間抽出
 - ・ 泳動した蛋白量：バンドの量にもよるが数10～数100 μ gの蛋白量が得られる。

iii) 兎への免疫

- ① 抽出した液を、生理食塩水で透析する。
- ② 50～100 μ g / 1 mlの抗原と等量のFreund's incomplete adjuvantとともにウサギの背面皮下に数カ所に分けて注射する。
- ③ 1カ月後、耳採血し抗体価をELISAおよびウェスタンブロットングで確認する。
- ④ 抗体価が上昇していれば、ブースターを

行い、全採血する。

iv) 結果

得られた血清はELISAやウェスタンブロットングで、特異性と抗体価を調べ、-30℃で保存する。患者血清中の特異抗原に対する抗体価測定（Ag-capture ELISA）やウェスタンブロットングの抗原解析に使える。

3. Heat Shock Proteinの同定

熱ショックタンパク質（heat shock protein；HSP）はストレスタンパク質ともいわれ、細胞が、熱、重金属、アルコールなどの有害なストレスに曝されたときや、ウイルス感染、炎症、腫瘍化等の状態におかれたときに産生される蛋白で、その分子量から、HSP90, HSP70, HSP60ファミリー等が存在する。

細菌の種によっては熱処理した菌体をSDS-PAGE後クマシー染色するだけで、HSPを同定できるが、ヘリコバクター・ピロリはこの方法では観察できない。ヘリコバクターのHSPを同定するために、RIを使い蛋白を標識する方法をここでは述べる。

1) 熱処理によるHSPの誘導及び同定

- ① 寒天平板上で培養した対数増殖期の菌を0.5mlのmethionine-freeのRPMI1640培地にOD₅₅₀=1の濃度で懸濁し、4本のエッペンドルフチューブに分注する（約5×10⁸CFU）。
- ② 4本のエッペンドルフチューブに150 μ Ciの³⁵S-Methionine（アマシヤム製, cell labelling grade）を加え、3本を直ちに42℃の恒温槽に漬ける。残り1本は37℃の恒温槽に入れる。
- ③ 3本のエッペンドルフチューブをそれぞれ5, 10, 30分後に取り出し、37℃の恒温槽に入れる。1時間反応させた後、遠心により菌体を集める。PBSで2～3回洗浄、遠心する。
- ④ 集めた菌体に蒸留水を30 μ l加え、等量のSDS-PAGE sampling 緩衝液を加え、100

℃, 2分間処理し, 溶菌させる。

⑤SDS-PAGEを行い, クマシーブルーで染色 (固定) し, ゲル乾燥機で乾かす。

⑥乾いたゲルを, X-rayフィルムに感光させ, バンドを検出する。

ii) 結果

筆者らはこの方法でヘリコバクター・ピロリのHSPを同定し, またアミノ酸のN末端の配列からも66kDaの蛋白がHSPであることを確認した。現在遺伝子の解析から, ヘリコバクター・ピロリは*groEL*, *groES*の2つのHSPを持つことが知られている。我々の方法では低分子量の*groES*の位置に熱処理により誘導されてくる蛋白は認められなかった。いまのところヘリコバクターの菌体内でこれらHSPがどのような働きをし, 分布をとっているのかは不明なところが多い。

【参考文献】

- 1) Yokota, K., Hirai, Y., Haque, M., Hayashi, S., Isogai, H., Sugiyama, T., Nagamachi, E., Tsukada, Y., Fujii, N., and Oguma, K. (1994): Heat shock protein produced by *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 38, 403-405.
- 2) Suerbaum, S., Thiberge, J. M., Kansau, I., Ferrero, R. L., and Labigne, A. (1995): *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Molecul. Microbiol.* 14, 959-974.

4. PCR法による各遺伝子の検出

これまでヘリコバクター菌の診断や菌株の多様性を検索するため, PCR法は使われてきた。検体からのヘリコバクター菌の同定には, rRNAをターゲットとしたPCRを, また菌株の多様性の検索にはウレアーゼや*vacA* (空胞形成毒素, サイトトキシン), *cagA* (サイ

トトキシン関連蛋白) の遺伝子をターゲットとしたPCRが用いられてきた。ここでは*vacA*の遺伝子をPCR法で同定する方法を具体的に述べる。

1) 方法

i) プライマーの設定

図13に*vacA*遺伝子の構造を示した。プライマーはN端側の612bpと, ORFの中間で菌株により多少配列が異なることが予想される1,154bpの領域に設定した。

primer 1----atggaatatacaacaacacaca

primer 2---ctccagaacccacacgatt

primer 3---aggagaaacaatgactaacg

primer 4---gatgggacacccaacttgtg

ii) 核酸の抽出

① 培養菌体 (OD₅₅₀=0.5~1) をTE緩衝液 (10mM Tris, 100mM EDTA) 400~500 μ lに懸濁する。

② Lysozyme (final 100 μ g/ml) 処理1時間。

③ SDS (final 1%) 加え, 60℃, 30分処理。

④ 37℃に冷やし, Proteinase K (50~100 μ g/ml) 溶液にて37℃, 1時間処理。

⑤ 液量と等量のphenolを加え転倒混和。

⑥ 12,000×gで遠心, 上清を新しいチューブに移す。

⑦ phenol-chloroformを加え転倒混和。

⑧ 12,000×gで遠心, 上清を新しいチューブに移す。

⑨ chloroformを加え転倒混和を3回。

⑩ エタノール沈殿, 乾燥。

iii) PCR

① 10×Taq緩衝液 2 μ l, dNTP 1.6 μ l, 50 pg/ μ lの primer -1 μ l, H₂O 13.3 μ l, 5U/ μ lの Taq 0.1 μ lをチューブに入れる。

② PCR, 94℃-30秒, 50℃-30秒, 72℃-30秒の条件で30サイクル。

③ 電気泳動で確認する。

iv) 結果

図13を参照。空胞形成毒素は, *vacA*遺伝子があっても細胞空胞化が起こらないこともあ

vacA遺伝子

図13 VacA遺伝子のPCR

るので、毒素活性は培養細胞を使い確認する。

【参考文献】

- 1) Clayton, C. L., Kleanthous, H., Coates, P. J., Morgan, D. D., Tabaqchali, S. (1992) : Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol 30, 192-200.
- 2) Ho, S. A., Hoyle, J. A., Lewis, F. A., Secker, A. D., Cross, D., Mapstone, N. P., Dixon, M. F., Wayatt, J. I., Tompkins, D. S., Taylor, G. R. (1991) : Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. J. Clin. Microbiol. 29, 2543-2549.
- 3) Engstrand, L., Nouyen, A. M., Graham, D. Y., el Zaatari, F. A. (1992) : Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter* species. J. Clin. Microbiol. 30, 2295-2301.
- 4) Telford J., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Commanducci, M., Burrioni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z. (1994) : Gene structure of *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J. Exp. Med. 179, 1653-1658.
- 5) Cover T. L., Timmuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A., Blaser, M. J. (1994) : Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strain. J. Biol. Chem. 269, 10556-10573.
- 6) Schmitt, W., Hass, R. (1994) : Genetic analysis of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: structural similarities with the IgA protease type of exported proteins. Mol. Microbiol. 12, 307-319.

5. ELISA法による抗体価の測定

これまでの研究でヘリコバクターに対する血中抗体価は、IgG、IgA抗体が主体で、IgM抗体の産生は少ないことが明らかになっている。このうちIgG抗体の測定が最も使われ、臨床的に有用と考えられている。市販の血清抗体測定キットはすべてIgGを測定している。

1) 抗原

抗原は、精製された蛋白に対する抗体価を測定するより、精製不十分な粗抗原のほうが、感染の診断には有用であるといわれている。筆者らは抗原は超音波破碎抗原（20S抗原）を通常使っている(前述の抗原の作製参照)。さら

図14 3種類のELISA法

に特異抗原に対する抗体をCapture ELISA法で測定するときには、20S抗原をさらに超速心(100,000 $\times$ g, 30分)した上清(膜成分を除いた抗原; 100S抗原と命名)を用いている。

2) ELISA

筆者らの行っている3種類のELISA; ①粗抗原を用いたDirect ELISA, ②特異蛋白抗原に対するAntigen capture ELISA, ③胃液中のIgA抗体価測定のためのAntibody capture ELISA, について原理, 方法を図14に示した。なおいずれのELISAを行う時にも以下のものを用いた。

- ・ブロッキング液: 10% スキムミルク・PBS
- ・洗浄液: 0.05% Tween 20-PBS
- ・酵素反応基質液: ペルオキシダーゼ・1 mg OPDA in PBS

3) 結果の解釈

市販のキットではCUT OFF値が決められており, 陽性, 陰性を判定できる。しかし自家製のELISAでは, はじめに陰性の血清を使いCUT OFF値を設定し, また測定のプレートを変えたときにも, データが比較できるように, 陽性, 陰性のコントロール血清を用意する。

自家製のELISAを行うときは, 抗原は自由

に選べる事、またCapture ELISAを用いて、特定の抗原に対する抗体価の測定も行えるので、ウェスタンブロッティングと併用すると、患者血中抗体の詳細な検討が出来る。

【参考文献】

- 1) 横田憲治, 小熊恵二, 吉田博清, 高山義一, 杉山敏郎, 矢花 剛, 谷内 昭, 榎林陽一, 磯貝 浩, 磯貝恵美子(1990): 胃壁中の*Campylobacter pylori*の同定法の検討と血中抗菌抗体価の測定. 感染症学雑誌 64, 597-603.
- 2) 高山義一, 杉山敏郎, 横田憲治(1992): 胃液*Helicobacter pylori*抗体の慢性胃炎における臨床的意義 札幌医学雑誌 61, 2, 1-12.
- 3) Yokota, K., Hayashi, S., Fujii, N., Yoshikawa, K., Kotake, S., Isogai, E., Ohono, S., and Oguma, K. (1992): Antibody response to oral Streptococci in Behçet's disease. Microbiol. Immunol. 36, 812-822.
- 4) Hayashi, S., Yokota, K., Takizawa, Y., Tomozawa, I., Nejime, T., and Oguma, K. (1993): Development and evaluation of capture enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin G and M antibodies to group A. Microbiol. Immunol. 37, 271-279.
- 5) Hayashi, S., Sugiyama, S., Hisano, K., Awakawa, T., Kurokawa, I., Yachi, A., Isogai, H., Isogai, E., Yokota, K., Hirai, Y., Oguma, K., and Fujii, N. (1996): Quantitative detection of secretory immunoglobulin A to *Helicobacter pylori* in gastric juice: antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Labo Anal. 10, 74-77.

6. 脂質抽出・検出法

(特にcholesteryl glucosides)

*H. pylori*は特殊糖脂質としてcholesteryl glucosides (CGs)を3種保有している。この項ではCGs抽出確認を中心に基本的脂質抽出・精製法, 検出法とthin-layer chromatography (TLC)を用いて菌体から直接にCGsを検出する方法を述べる。

1) 基本的脂質抽出・精製法

i) 脂質抽出法

- ① 液体培養より生理食塩水(4℃)で3回遠心・洗浄した菌体沈渣もしくは寒天培地より掻き取り後同様に操作した菌体沈渣を用意する(この時、湿菌量を測定しておくこと)。
- ② 遠心管から湿菌量の約7倍量(v/w)のメタノールを用いて菌体をフラスコ(ガラス製)に移す(メタノールを投入すると菌体沈渣が固まるため一度目の投入時にはすぐ懸濁すること)。
- ③ フラスコに約14倍量のクロロホルムを加える(最終的に約20倍量のクロロホルム・メタノール混液(2:1)に懸濁する。最初からクロロホルム含有液を加えると合成樹脂製遠心管が損傷される)。
- ④ スターラーで攪拌しながら室温で2～4時間放置し抽出する(フラスコはアルミホイルもしくはガラス共栓でフタをしておく)。
- ⑤ 遠心(ガラス製遠心管)もしくは濾過で抽出液を得る(筆者らはガラス製濾過滅菌用ユニットに通常の濾紙をはさんで濾過している)。
- ⑥ 上記抽出操作を3度繰り返す(濾過した場合は残渣を濾紙ごと抽出する。ほとんどの脂質は2度で抽出される)。
- ⑦ 抽出液をすべてロータリーエバポレーター用丸底フラスコに入れ、完全に溶媒を除去し、乾固する。
- ⑧ 乾固した脂質を再度クロロホルム・メタノール混液(2:1)に溶解し、ロータリーエバポレーター用小容量フラスコ(重量を

測定しておく) に入れ, 上記と同様に乾固する。さらに, デシケーター中で真空ポンプで吸引し, 完全に溶媒を除去する。最終的に乾燥重量を測定する。これが抽出粗脂質である。

〈注意事項〉

この抽出粗脂質は脂質以外の疎水性物質も含んでいる。

Lipopolysaccharide (LPS) はクロロホルム・メタノール混液では抽出されないため, この粗脂質には含まれていない。

クロロホルムを使用するため, 合成樹脂製の器具は使用できない。

ii) 精製法

精製法には通常Folchらの静置法と振盪法がある。静置法は脂質成分の損失は少ないが長時間を要する。急ぐ場合や少量の場合は振盪法でよい。

(1) 静置法

- ① 粗脂質をクロロホルム・メタノール混液 (2:1) で約2mg/ml程度に溶かし, 約2~3倍容量のビーカーにいれる。
- ② 脂質溶液の20倍以上の容量のある容器の底に上記ビーカーを置く。
- ③ 0.5%食塩水 (蒸留水でも良い) を静かに脂質溶液に重層する。
- ④ 最終的に20倍容量の食塩水を満たす。
- ⑤ 4℃で一夜放置する(この間にメタノールとともに夾雑物が水層に拡散する)。
- ⑥ ほとんどの水層を捨て, ピペットでクロロホルム層をロータリーエバポレーター用フラスコに回収する(クロロホルム層上のフラッフ(fluff)は極力入らないように。2~3回少量のクロロホルムを加えて, 回収操作を繰り返す)。
- ⑦ 完全に溶媒を除去し, 重量を測定する。これが総脂質もしくは抽出可能脂質 (total lipid or total extractable lipid) である。

(2) 振盪法

- ① 上法と同様に粗脂質をクロロホルム・メタノール混液 (2:1) で約2mg/ml程度に溶かし, 分液ロートもしくはガラス製共栓付き遠心管にいれる。
- ② 0.2容の0.5%食塩水 (蒸留水でも良い) を加え, よく振盪する。
- ③ 遠心もしくは静置して層を分ける。
- ④ 下層のクロロホルム層を回収する。
- ⑤ 以下は静置法に同じ。

〈注意事項〉

これら精製により糖鎖の長い糖脂質 (ガングリオシドなど) は水層に逃げるが, 細菌でこのようなものを持つものはほとんどない。

2) 検出法

ここではTLCでの検出法を述べる。TLC plate はシリカゲル粉末を購入し, 作製することもできるが, 市販品も多いため作製法は省略する。

また, TLCには1次元展開と2次元展開がある。我々は展開溶媒系として, 1次元展開ではクロロホルム(C)・メタノール(M)・蒸留水(W) 70:30:5を使用し, 2次元展開では1次に C:M:W 65:25:4, 2次に C:M:7N NH₄OH 60:35:4.5 を使用している。ここでは1次元展開のみを述べる。

- ① 総脂質をクロロホルム・メタノール混液 (2:1もしくは1:1) で3~10mg/ml程度の濃度に調製する。
- ② TLC plate の下から1.5cm 程度のところに脂質液をキャピラリー管 (10 μ l用) でスポットする。
- ③ ドライヤーで溶媒をとばす。
- ④ 使用前に展開層内垂直面にはりつくように濾紙を入れ, 溶媒 (C:M:W 70:30:5) を5~7mm程度の深さになるように入れる。
- ⑤ TLC plate を展開槽にいれ, はば上端まで展開する。
- ⑥ 溶媒をとばす。
- ⑦ オルシノール硫酸試薬 (0.2% orcinol in 11.4% sulfuric acid) を噴霧する。
- ⑧ ホットプレートで120℃, 10分程度加熱する(糖脂質が赤紫色になるまで)。

図15 一次元TLCにおける*H. pylori*総脂質の展開模式図

(溶媒系; chloroform-methanol-water 70:30:5)
30%硫酸を噴霧し加熱すると図示した全てが検出されるが、オルシノール硫酸試薬(糖含有脂質検出試薬)を噴霧し加熱すると cholesteryl glucosides (CGs; CAG, CGL, CPG) のみが検出される。ただし、試薬を噴霧しすぎたり、加熱しすぎると free cholesterol や phosphatidyl ethanolamine も検出される(色調は異なるか)。

- ⑨ *H. pylori* の総脂質では3本のバンド(すべてCGs)が確認される。中央のバンド(Rf 0.59)は基本構造物 cholesteryl- α -D-glucoside (CGL)であり、上方バンドはCGLに脂肪酸が結合したもの(CAG, Rf 0.78), 下方バンドはCGLにphosphatidyl基が結合したもの(CPG, Rf 0.41)である(図15参照)。

〈注意事項〉

溶媒をとばす過程および試薬噴霧からの過程(③, ⑥, ⑦以降)はドラフト内で行うこと。

オルシノールは物質名としては3, 5-Dihydroxytoluene monohydrate である。

他の検出試薬を使用すれば様々な脂質を検出できる(リン脂質にはデイトマー試薬噴霧, すべての脂質には30~50%硫酸を噴霧後加熱,

など)。

上記は通常のTLC plate (20cm×20cm)で行う方法である。ただし、この大きさで行う必要はなく、展開槽としてスライドガラス用タテ型染色壺を使用し、これに入る大きさにTLC plateを切って行ってもよい。この方法では槽内面には濾紙を入れない。ただし、展開距離が短い(通常8cm弱)こと、濾紙を入れないことからRfは異なる。しかし、短時間で行え、溶媒も少なくすむ。

3) 菌体から直接にCGsを検出する方法

この方法はTLC plate 上で菌体からの脂質抽出・検出を行うもので、松山らの方法をヘリコバクターに応用したものである。

この場合も小TLC plateでスライドガラス用タテ型染色壺を展開槽として行える。ここでは一例としてこの方法を述べる(展開槽は2つ必要)。

- ① スライドガラス用タテ型染色壺に入る大きさにTLC plateをガラス切りで切る。
- ② plateの下から1.2cm程度のところにループまたは爪楊枝で掻き取った遠心菌体もしくは寒天培地上の菌体をていねいに付着させる。この時菌体は盛り上げず、平たく付着させる。菌量は多くなくてよいが、plate上で盛り上がりかわかる程度に。
- ③ 展開槽(染色壺)にクロロホルム・メタノール混液(2:1)を深さ4~5mm程度に注ぎ、plateを入れる。
- ④ plateの高さの1/2弱(1/3~1/2)まで展開する(この過程で菌体に溶媒が浸透し、菌体は透明化し、脂質が抽出される)。
- ⑤ ドライヤーでplateから溶媒をとばす。
- ⑥ 別の展開槽にクロロホルム・メタノール・蒸留水 70:30:5の混合溶媒を③と同様に注ぎ、③と同様の方向にplateを入れる。
- ⑦ plateの上端近くまで展開する(展開過程)。
- ⑧ ドライヤーでplateから溶媒をとばす。
- ⑨ 以下は2)と同様にオルシノール硫酸試薬を噴霧、加熱発色させる。

この方法ではRfは大きく異なるが, あらかじめ用意した*H. pylori* 標準株の総脂質もしくは菌体をコントロールとして用いれば, 臨床菌株の確認に十分使用できる。

〈注意事項〉

原則として2) に同じ。

〔参考文献〕

- 1) Kates, M. (1986) : Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipid. (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology vol. 3 part 2), (Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H., eds.), Elsevier, New York.
その他, 一般的脂質分析法の本としては生化学実験講座の脂質関連のものおよび脂質分析法入門(生物化学実験法9, 藤野安彦 著, 学会出版センター, 1978)がある。
- 2) Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T. and Oguma, K. (1995) : Unique cholesteryl glucosides in *Helicobacter pylori*: composition and structural analysis. J. Bacteriol. 177, 5327-5333.
- 3) Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., and Oguma, K. (1995) : Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp. J. Bacteriol. 177, 5334-5337.
- 4) Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., and Oguma, K. (1995) : Lipid profiles of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* grown in serum-supplemented and serum-free media. Acta Med. Okayama 49, 205-211.
- 5) Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y., and Oguma, K. (1996) : Lipid profile of *Helicobacter* spp.:

presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. J. Bacteriol. 178, 2065-2070.

- 6) Matsuyama, T., Sogawa, M., and Yano, I. (1987) : Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1186-1188.

謝辞

本稿の作成にあたり, 協力して頂いた濱田きよみさんに感謝致します。