

リアルタイム PCR 法を用いた手指細菌叢の解析

山口 仁孝・中尾 陽香・安達由里香・野上麻耶香

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第61号抜刷）

リアルタイム PCR 法を用いた手指細菌叢の解析

Real-time PCR analysis for hand microbiota

山口仁孝^{i)†}・中尾陽香ⁱⁱ⁾・安達由里香ⁱⁱ⁾・野上麻耶香ⁱⁱ⁾

キーワード：手指細菌叢、*tuf* 遺伝子、Real-time PCR (RT-PCR) 法

要 旨

手指細菌叢を構成する6菌種 (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Propionibacterium acnes*) について、Real-time PCR (RT-PCR) 法を用いての定量解析を試みた。これら6菌種について *tuf* 遺伝子をターゲットとした primer を設計し、標準株を用いて増幅の特異性・検出感度を確認後、菌数 (= copy 数) - Cq 値について回帰直線・回帰式を得たのち、学生および社会人 (74 名) を対象に、アンケートおよび手指細菌叢の定量を行い、アンケート項目 (手洗い回数/日、水作業時間) および対象6菌種の菌量を独立変数、手荒れの程度を従属変数とした主成分分析を行った結果、手荒れの程度との関連が高いと考えられたのは、水作業時間および *Micrococcus luteus* で正の、*Propionibacterium acnes* で負の相関が考えられた。

はじめに

健全な皮膚においては、常在細菌叢が構成され、皮膚表面の湿度や pH を保ち、病原菌の付着・侵入バリアとしての機能を有し、これらの常在細菌叢を構成する数十種の菌のバランス異常は、宿主の免疫機能に影響を及ぼし、慢性的な皮膚の炎症 (手荒れ) と関連があると考えられている¹⁾²⁾。

しかしながら、これらの細菌叢を構成する個々の菌の解析については、従来の培養法による分離・同定作業では多くのコストや労力、時間等を必要とするため、容易には実施されていない。

そこで、今回我々は、皮膚細菌叢を構成する主要な6菌種³⁾⁴⁾ (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus*,

Acinetobacter johnsonii, *Propionibacterium acnes*) について、*tuf* 遺伝子を特異的に増幅・定量することで、低コスト、低労力、短時間で正確な定量解析ができないか検討を行い、実際にヒトの手指から菌のサンプリングを行うとともに、手荒れに関するアンケートおよび手荒れの程度分けを実施し、手荒れの程度とアンケート結果および細菌量との関連について解析を行った。

材料と方法

1) 標準菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (nite) バイオテクノロジーセンターより標準菌株 (NBRC 株) を購入し、解析に使用した (表1)。

2) 標準菌液の作成および菌数確認

個々の菌株について、nite が推奨する培地および

i)† 美作大学生活科学部食物学科

ii) 美作大学生活科学部食物学科学生

市販培地を用いて、好気培養または AnaeroPack® (Mitsubishi gas chemical co., inc, Tokyo, Japan) を用いたガスバック法による嫌気培養を行った (表 2)。各標準菌株の培養液について、1 ml を滅菌生理食塩水 9 ml に入れ 10 倍段階希釈し、SPC (Standard plate count) 法により菌数の確認を行った。

3) DNA 抽出

DNA の抽出は、アルカリ熱抽出法⁵⁾により行った。すなわち、培養液 1 ml をマイクロチューブにとり、12000 rpm 2 分間遠心分離後、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 850 ul を添加して 100°C で 10 分間加熱処理した。その処理液に滅菌した 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 150 ul を加えて中和後遠心分離

(12000 rpm、2 分間)した上清を DNA Template とした (図 1)。抽出した DNA は氷上で静置後 -30°C で保存し、PCR 使用時には再び 100°C 5 分間再加熱して、氷温急冷後使用した。

4) Primer 設計および PCR、RT-PCR

NCBI gene データベースから標準菌株の sequence を参照し、菌種間での保存性が高く、染色体上に低コピー (1 または 2 コピー) で存在する、タンパク質伸長因子 Tu (*tuf*) 遺伝子の配列をターゲットとした Primer pair を遺伝子解析ソフト Genetyx® ver.6.1 (Genetyx corp., Tokyo, Japan) を用いて菌種ごとに設計し、株式会社 FASMACH (Kanagawa, Japan) にて Oligo DNA を委託合成した (表 1)。

表 1 標準菌株 (NBRC 株) および PCR amplicon size.

Reference strain	NBRC No.	Abbreviations	NCBI Accession No.	PCR amplicon size (bp)
<i>Staphylococcus aureus</i>	100910	Sa	NZ_JOPS01000017	198
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100911	Se	NC_004461	198
<i>Micrococcus luteus</i>	3333	MI	M17788	174
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	102197	Aj	APPZ010000003	219
<i>Propionibacterium acnes</i>	107605	Pra	NC_006085	174
<i>Streptococcus mutans</i>	13955	Sm	AP010655	142

表 2 標準菌株の培養条件

菌種	液体培地	寒天平板培地	培養条件	培養時間(h)
Sa	Tryptic Soy Broth (TSB) (BBL 211768)	Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco 236950)	好気	24
Se	MgSO ₄ ・7H ₂ O 0.1 % 加 TSB	MgSO ₄ ・7H ₂ O 0.1 % 加 GAM (日水製薬 05426)	好気	72
MI	TSB	TSA	好気	72
Aj	MgSO ₄ ・7H ₂ O 0.1 % 加 TSB	MgSO ₄ ・7H ₂ O 0.1 % 加 GAM	好気	48
Pra	ABCM (栄研化学 53101)	GAM	嫌気	96
Sm	Yeast extract 0.3 % 加 TSB	Yeast extract 0.3 % 加 TSA	嫌気	48

※標準菌株については純培養後、単一コロニーを釣菌して増菌培養した。

†Pra、Sm についてはアネロパック (三菱ガス化学) を用いて嫌気培養した。

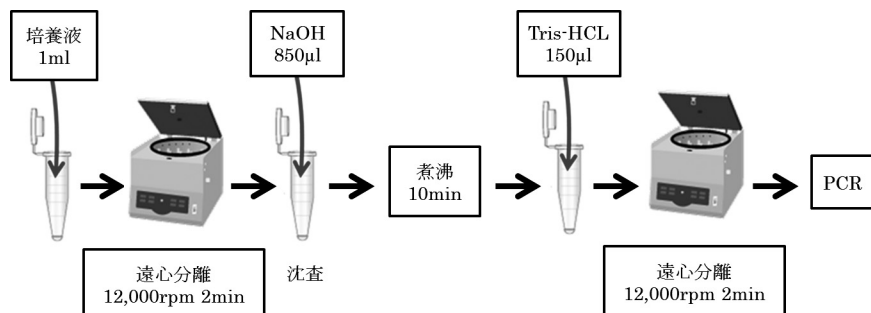


図1 アルカリ熱抽出法

表3 PCRおよびRT-PCRcondition

PCR (EX-Taq)			RT-PCR (FastStart SYBR Green Master)		
Pre-heating	95°C	5 min	Pre-heating	95°C	10min
Denaturation	95°C	30 sec	Denaturation	95°C	15sec
Annealing	55°C	30 sec	Annealing	55°C	30sec
Extension	72°C	30 sec	Extention	72°C	30sec
} 35 cycles			} 40cycles		

PCR用試薬の調整は、EX Taq HS (Takara)、RT-PCR用試薬の調整は、FastStart SYBR Green Master (Roch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用い、メーカー指示書に従い調整後、RT-PCR装置 PikoReal 96 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) にて遺伝子を増幅して解析した(表3)。

5) *tuf* 遺伝子の増幅確認 (PCR法-アガロースゲル電気泳動法)

a) 特異性の確認

各Primer setの特異性について、非特異増幅断片が認められず、増幅遺伝子断片長が設計どおりであることをPCR-アガロースゲル電気泳動法にて確認した。DNA Templateとしては、Positive control (ターゲット菌種のDNA template)、Positive mix control (ターゲット菌種を含む8菌種のDNA Template mix)、Negative mix control (ターゲット菌種を含まない5菌種のDNA Template mix)、Negative control (DNA Template なし) を用いた(表4)。Ex Taq HS (Takara) を用いてPCRを実施後、EtBr加 Agarose gel にて電気泳動を行った後、ゲルを Transilluminator (TFML-20: フナコシ) に乗せ

てUV (302 nm) を照射し、ポラロイドカメラ (CD-300: フナコシ) で撮影し増幅バンドを確認した。

b) 検出感度試験

各Primer setの検出感度について、各菌種のPositive control DNA Templateの10倍段階希釈液を用いて、RT-PCR法により検出感度を確認し、同様の実験を3回繰り返した。また、1 tubeあたりPCRにかけることが可能なTemplate量(5 ul)から、一般に 10^3 copy/ml以下の濃度では検出が出来ないと考えられているため、今回の実験では 10^3 copy/ml (= cfu/ml: *tuf* 遺伝子を増幅した場合) を希釈限界とした。

6) 検量線および回帰式の作成

各菌種のPositive control DNA Templateの5倍段階希釈液を用いたRT-PCRを独立して3回実施し、菌量-Cq (Quantification Cycle: 陽性と判定されたときのサイクル数) 値の標準曲線および回帰式を得た。解析にあたってはGraphPad Prism ver.6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) を用いた。

7) 手指細菌サンプル

a) 倫理的配慮

表 4 DNA Template

Target species	Positive control (details)	Positive mix control (details)	Negative mix control (details)	Negative control
Sa	P(Sa)	Pm(Sa,Se,MI,Aj,Pra,Sm,Ec [†] ,Bs [†])	Nm(Se,MI,Aj,Pra,Sm)	None DNA template
Se	P(Se)	as above	Nm(Sa,MI,Aj,Pra,Sm)	as above
MI	P(MI)	as above	Nm(Sa,Se,Aj,Pra,Sm)	as above
Aj	P(Aj)	as above	Nm(Sa,Se,MI,Pra,Sm)	as above
Pra	P(Pra)	as above	Nm(Sa,Se,MI,Aj,Sm)	as above
Sm	P(Sm)	as above	Nm(Sa,Se,MI,Aj,Pra)	as above

[†]Ec : *Escherichia coli* : NBRC 102203、Bs : *Bacillus subtilis* : NBRC 13719

本研究における、手荒れサンプルの採取に当たっては、研究の必要性、詳細な実施要領ならびにインフォームドコンセント、個人情報の保護等について、本学倫理委員会の審査・承認（受付番号 27-5）を得た手順・方法で実施した。

b) 調査対象およびアンケート

本学栄養学科、食物学科学生および職員（53名）および2事業所従業員（21名）について、書面によりボランティア協力の承諾を得た合計74名について、基本事項（年齢、性別等）、水作業（時間/日、就業年数）、手荒れ（程度・分布、治療の有無等）、手洗い（回/日、洗剤等）について個別記述式アンケートを行った。

c) 手荒れ度の判定

特に手荒れがあった対象者については、資料⁶⁾を参考に、手荒れの程度をそれぞれ0~4度に分類し判定した（表5）。

8) 細菌叢の定量

a) 手指細菌液の採取および培養

ナイロン手袋（フジポリグローブ、FUJINAP）に滅菌生理食塩水を5 ml入れたものを両手にはめ、2分間手をこすり合わせた後、15 ml tube に液を取り出し、菌液サンプルとした。

直接サンプル：上記菌液1 ml からDNAを抽出した。
増菌サンプル：上記菌液300 μlを好気培養でTSB、嫌気培養でABCM(各3 ml)に移し、37 °C 48 hr 培養後、各増菌液1 mlよりDNAを抽出した。

b) DNA Template の作成

手指細菌液の各サンプルについて、直接および増菌後（好気、嫌気）の各菌液からアルカリ熱抽出法によりDNAを抽出し、PCR用Templateとした。

c) RT-PCR

今回作成した primer を用い、標準株を解析した方法のとおり手指細菌叢を構成する6菌種について、*tuf* 遺伝子をターゲットとしたRT-PCRを行い菌数（≒ Copy 数）を定量した。

9) 統計学的解析

アンケート結果から、手荒れ度と各項目について重

回帰分析、細菌叢定量結果から、手荒れ度別の優位菌種について主成分分析および一部について重回帰分析をSPSS® Statistics ver. 22 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて行った。

結 果

1) 菌数確認

SPC 法により各菌種培養液の菌数（希釈前原液）を計測した（表 6）。

2) *tuf* 遺伝子の増幅確認

a) 特異性の確認（PCR-アガロースゲル電気泳動法）

いずれの Primer set においても Positive control DNA Template が入っているサンプル（Positive、Positive mix）では、目的サイズの増幅バンドが 1 本のみ検出され、Negative mix および Negative では増幅バンドは確認されなかった（表 7、図 2-1,2）。

また、同様の実験を 3 回行った結果、同様に種特異的増幅を確認することができた。

b) 検出感度試験（RT-PCR 法）

RT-PCR 法による検出感度試験では、いずれのサンプルにおいても DNA Template 濃度が、 10^3 cfu/ml のとき、陽性と判定される Cq 値が 35 サイクル以下であることから、 10^3 cfu/ml で有効な検出感度があることを確認した（図 3 および表 8）。

表 5 手荒れ度の基準

手荒れ（度）		主な症状
手荒れなし	0	症状なし
手荒れ初期	1	乾燥、さかむけ
手荒れ注意期	2	皮剥け、ひび割れ
手荒れ進行期	3	著しいひび割れ、あかざれ
手荒れ重症期	4	著しい皮剥け、手の腫れ、出血による痛み・かゆみ

表 6 菌数確認

菌種	菌数 (cfu/ml)
Sa	3.9×10^8
Se	3.8×10^7
MI	1.1×10^8
Aj	1.0×10^7
Pra	1.3×10^8
Sm	3.8×10^6

表 7 特異性確認 1

Target	Positive	Positive mix	Negative mix	Negative
Sa	3/3	3/3	0/3	0/3
Se	3/3	3/3	0/3	0/3
MI	3/3	3/3	0/3	0/3
Aj	3/3	3/3	0/3	0/3
Pra	3/3	3/3	0/3	0/3
Sm	3/3	3/3	0/3	0/3

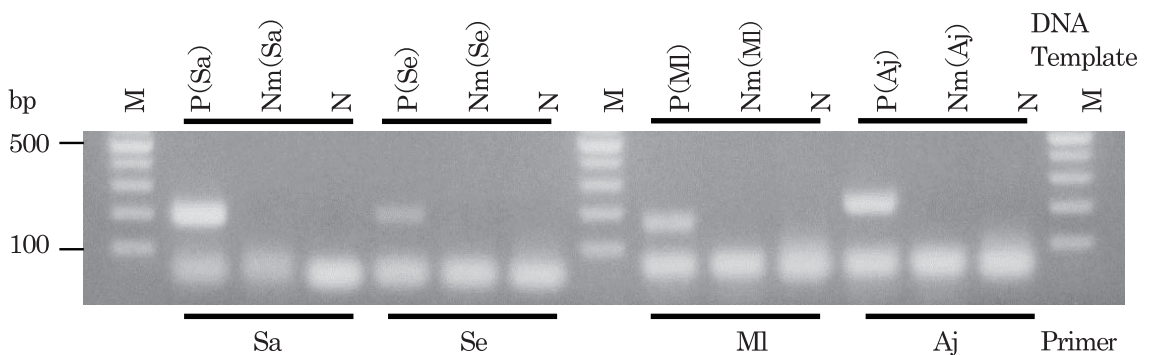


図 2-1 特異性確認 2

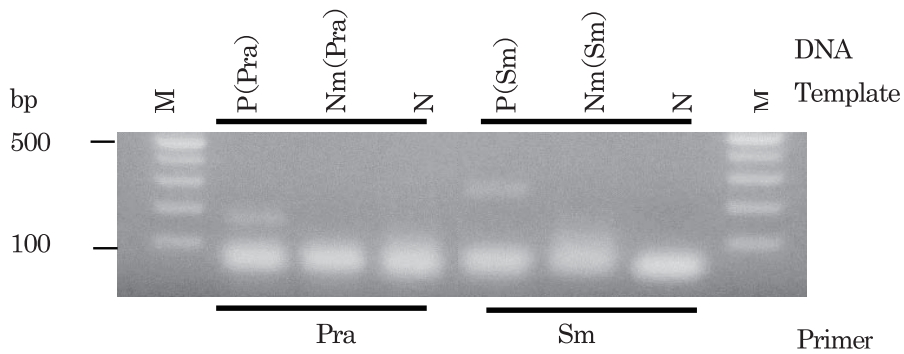


図 2 - 2 特異性確認 2

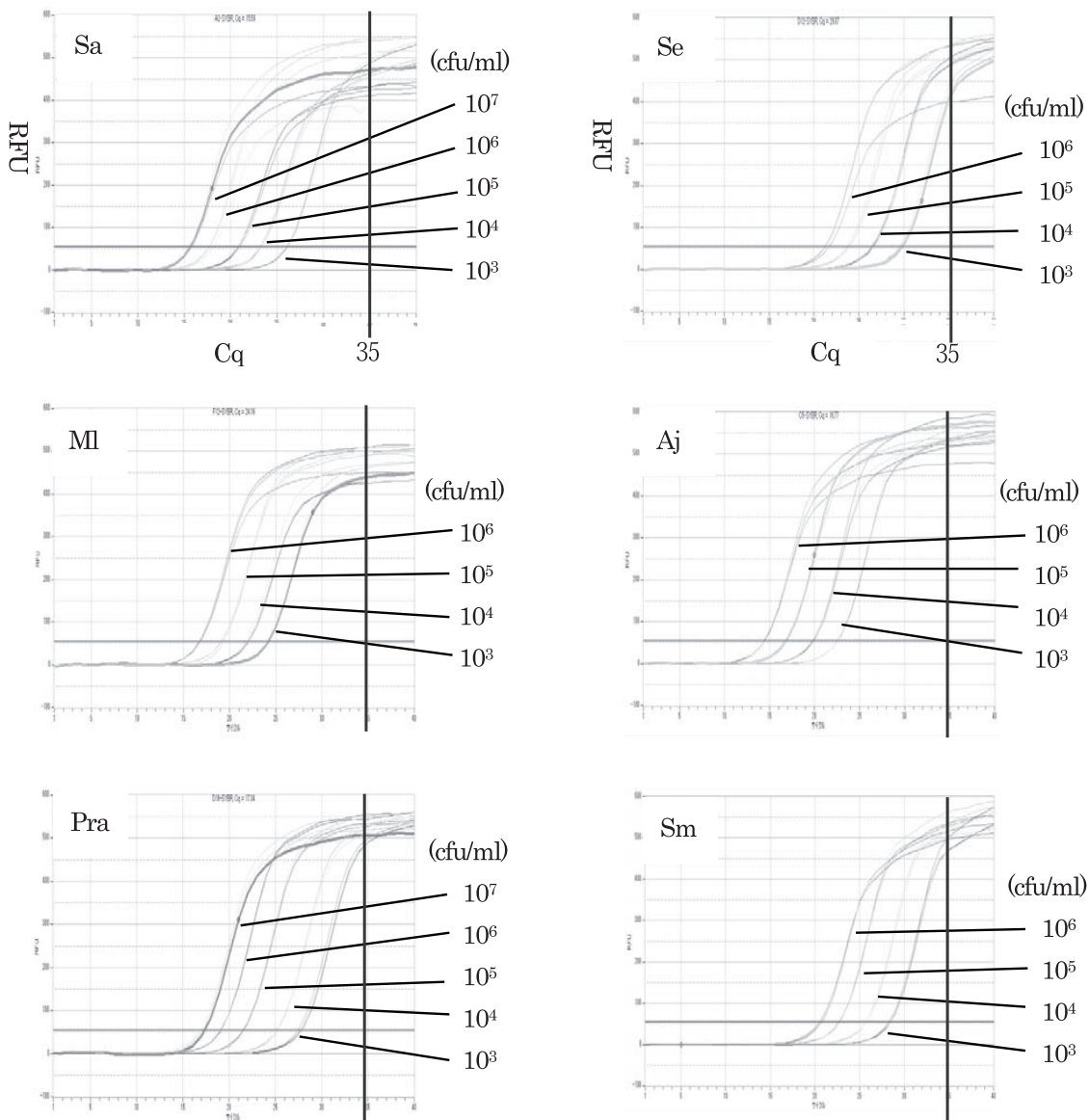


図 3 検出感度試験 (RT-PCR 法) による増幅曲線

表 8 検出感度試験結果（検出限界および Cq 値）

Target species	菌量 (cfu/ml)	Cq 値
Sa	10 ³	27
Se	10 ³	30
Ml	10 ³	29
Aj	10 ³	23
Pra	10 ³	28
Sm	10 ³	28

3) 回帰式・回帰直線

各菌量(cfu/ml)既知の菌液原液の DNA Template し、得られた Cq 値（平均値±標準偏差）から回帰式・
を希釈した液について独立して 3 回 RT-PCR を実施 回帰直線を得た（図 4）。

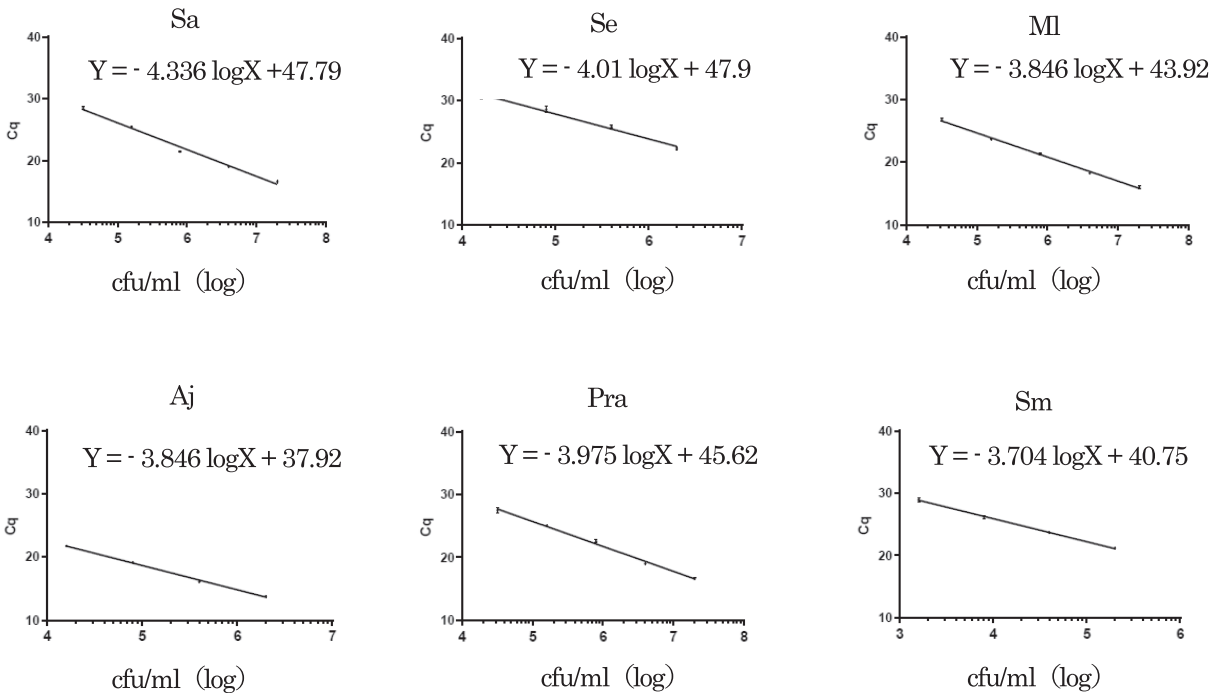


図 4 回帰式・回帰直線

4) アンケート結果および手荒れ度の判定

74 サンプルの内、手洗い回数の外れ値を除いた合計 70 サンプルから数値化できるものについて、記述統計量 (表 9) と手荒れのグレード別人数 (表 10) を示す。

5) アンケート解析

外れ値のサンプルを除いた合計 70 サンプルで、手荒れ度とアンケート項目のうち有効と思われた 4 項目 (手洗い回数、ハンドクリームの使用頻度、水作業の時間、水作業継続年数) を独立変数とし、手荒れ度を従属変数として、重回帰分析を行った結果、全体では、解析の精度を説明する決定係数、t 値、有意確率、相関係数が著しく低く、全体的には手荒れとアンケート結果について有意な説明をすることができなかった。そこで、全体での手荒れ人数 22 名のうち、外れ値を除いた 18 名を重回帰分析にかけた結果、ここでは決定係数は 0.546 と高い数値を示した。アンケート項目のうち、水作業の時間は相関係数が 0.762、有意確率は 0.041 を示し、手荒れ度との関係が高いことが考えられた (表 11)。

6) 手指細菌叢解析

a) 直接菌液サンプル

増菌しない直接サンプルでは、定量に十分な菌量を得られず、遺伝子増幅が困難であったため、菌量は個人で大きく異なっており、手荒れ度との相関は認められなかった。

b) 増菌サンプル

主成分分析解析

増菌後も細菌数が少ないサンプルが多く、解析に有用なデータが少なかったため、好気および嫌気定量結果を統合したデータを用いた。欠測値が多かった Aj と Sm を除き、手荒れ 2~4 度 (n=12) の人について主成分分析を行った (表 12)。

主成分分析の累積%の値から、第 2 主成分までで、約 81% のデータが集約されていた (表 12)。また、成分 (因子負荷) プロット (図 5) では、第 1 主成分では、Sa、Se、Ml がプラス側に位置し、Pra がマイナス側に位置していた。

表 9 記述統計量

項目	最小値	最大値	平均値±SD
年齢 (歳)	18	75	29.5±17.5
水作業時間 (時間/日)	0	8	1.7±2.9
水作業年数 (年)	0	50	5.8±12.1
手洗い回数 (回/日)	3	20	6.9±4.3

表 10 手荒れのグレード別人数

手荒れ度		人数	計
手荒れなし	0	52	52
手荒れ初期	1	7	22
手荒れ注意期	2	8	
手荒れ進行期	3	4	
手荒れ重症期	4	3	

表 11 重回帰分析統計表 (n=18)

重回帰分析 アンケート結果 手荒れのみ (n=18)

モデル	R	R ² 乗	調整済 R ² 乗	推定値の標準誤差
		(決定係数)	(調整済決定係数)	
1	0.812	.660	.546	.749

係 数

モデル	t	有意確率	相関 ゼロ次
1 (定数)	2.979	.035	
水作業の時間	2.283	.041	.762
水作業年数	.052	.959	.589
ハンドクリームの 使用頻度	1.309	.215	-.239
手洗い回数	-1.466	.168	-.443

表 12 主成分分析統計表 (n=12)

主成分分析 手荒れ 2~4 度 (n=12) Sm、Aj なし

成分	初期の固有値			抽出後の負荷量平方和		
	合計	分散の %	累積 %	合計	分散の %	累積 %
1	1.947	48.680	48.680	1.947	48.680	48.680
2	1.297	32.416	81.096	1.297	32.416	81.096
3	.503	12.586	93.682			
4	.253	6.318	100.000			

考 察

今回、手指細菌叢を構成する6菌種を対象とし、RT-PCR法による定量解析を試みた結果、効率的に定量を行うことができた。具体的には、培養が不要で、総検査時間を1時間程度と短くすることができた。また、多検体同時解析が容易であるため、細菌叢などの複数の菌株についての解析に非常に有効と考えられた。また、機械類を除くコストは試薬1検体あたり培養法の約1/5（培養法：300円、遺伝子定量法：60円）で行うことが可能であった。

一方、注意点として、遺伝子を取り扱う作業はコンタミネーションがないように丁寧に行うことや、数 μ オーダーの正確な試薬調製が必要なため、器具の取り扱い等に多少の技術が必要と思われた。また、今回は実際的手指菌液サンプルについて、直接培養法との比較を行っていないため、精査する必要があるものと考えられた。

今回のRT-PCR法による細菌定量解析において、Cq値の標準偏差(SD)が非常に狭く、精密な定量が可能であることが確認されたことから、今後は、腸内・口腔内細菌叢などの解析のみならず、mRNAの定量解析など幅広く活用できるものと考えられた。

また、実際の人手荒れサンプルでの応用においては、十分な菌量が得られず解析が全体的に困難であった。アンケート解析の結果においては、重回帰解析結果(表11)より水作業時間が手荒れ度に最も影響していると考えられた。また、12サンプルを用いた主成分

分析(図5)では、第1主成分では、Sa、Se、MIがプラス側に位置し、Praがマイナス側に位置することから、第1主成分は好気状態で増殖しやすい菌の量を表していると解釈した。

一方、菌量が著しく少なかったAjを除いた、5菌種と手荒れ度についての重回帰分析(n=14)を行った結果(データ未記載)、手荒れのある人ではMIの菌量と手荒れ度とに正の相関が認められたことから、第2主成分は、手荒れを起こしていない人に多い菌量を表していることが考えられた。さらに、PraとMIは原点対象のエリアにあったことから、反比例の関係になっており、手荒れが進んでいくとPraが減少し、MIが上昇するという関係が考えられた。

その他に、特にSaとSeは両主成分でもプラス側で近い位置にあることから、この2菌種の菌量は相関している、手荒れのないヒトの好気性の菌量と関連していると思われた。

今回解析した手指細菌叢構成菌6種類のうち、増菌後、定量に十分な菌量があったものはSa、Se、MI、Praの4種類のみであったことから、有用な解析データが少なくなったと考えられた。今後は、解析指標を増やすため、指標菌の選定(Primer設計)について再検討する必要があると思われた。

参考文献

- 1) 鈴木 敏幸ら.手指皮膚とハンドケアの科学.手指衛生のためのCDCガイドライン. (株)花王 花王ハイジーンソリューション. 6-9. 2013
- 2) 日置 祐一ら.手荒れと手指衛生の科学.手指衛生のためのCDCガイドライン. (株)花王 花王ハイジーンソリューション. 18-21. 2013
- 3) Itaru Dekio et al., Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. J Med Microbiol. Dec ; 54(Pt 12) : 1231-8. 2005
- 4) Katarina Chiller et al., Skin microflora and bacterial infections of the skin. J

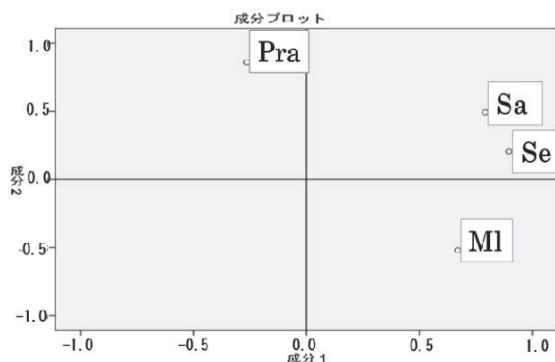


図5 成分(負荷因子)プロット

Investig Dermatol Symp Proc. Dec ; 6(3) :
170-4. 2001

- 5) 厚生労働省通知「腸管出血性大腸菌 O 26, O 111
及び O 157 の検査法について」食案監発第 3 号.
2012.
- 6) ユースキン製薬株式会社.皮膚科医に聞く手荒れ
症状別アドバイス
(http://www.yuskin.co.jp/yuskin_a/advice/)