

4) カンピロバクターの分子疫学解析の検討

八尋 俊輔 宮坂 次郎 中島 龍一

はじめに

カンピロバクターは、家畜の流産あるいは腸炎原因菌として獣医学分野で注目されていた菌で、ニワトリ、ウシ等の家きんや家畜をはじめ、ペット、野鳥、野生動物などあらゆる動物が保菌している。1970年代に下痢患者から本菌が検出され、ヒトに対する下痢原性が証明された。ヒトの下痢症から分離される菌種は*Campylobacter jejuni*がその95～99%を占め、その他*Campylobacter coli*なども分離される。カンピロバクターによる食中毒の発症件数は、近年最も多く、患者数もノロウイルス、サルモネラに続いて多い。原因食品としては、鶏肉関連が多く報告されているが、井戸水による水系感染の報告もある。食中毒の原因調査として、分子疫学解析は重要であるが、わが国において、カンピロバクターの分子疫学解析の有用性を比較した文献は少ない。

今回、我々はカンピロバクターの分子疫学的解析の方法としてパルスフィールドゲル電気泳動（以下、PFGEとする。）法と鞭毛遺伝子*flaA*を利用したPCR-RFLP法の2種類の有用性を比較したので報告する。

対象と方法

平成17～18年に九州各地研で分離された由来の異なる分離株22株（*Campylobacter jejuni*：20株、*Campylobacter coli*：2株）を用いた（表1）。同定は各地研で実施されており、当所ではPCR¹⁾を用いて菌種を確認した。Pennerの血清型は、A群、B群、C群、R群が1株ずつ、D群が6株、L群が4株、O群が3株、UTが3株であった（残り2株は*Campylobacter coli*）。

1 PFGE法

PFGE法は、パルスネット九州地区マニュアル²⁾に基づいて実施した。すなわちスキンミルクで-80℃に保存されていた菌株をBrucella Broth (Difco) で48時間増菌し、Brucella Agar (Difco) に塗抹し24時間培養した。そのBrucella AgarよりPBSにマックファーランド5程度になるように菌を懸濁し、等量の1%SeaKem Gold Agarose (Camblex) と混合し、プラグを作成した。プラグを1mg Proteinase K / 0.5M EDTA (1%N-lauroylsarcosine) 1ml で50℃、18時間処理後、プラグを4mM Pefabloc SC

表1 検討に用いた菌株

菌種	血清群 (Penner)	株数
<i>Campylobacter jejuni</i>	A	1
	B	1
	C	1
	D	6
	L	4
	O	3
	R	1
	UT	3
<i>Campylobacter coli</i>	—	2
合計		22

／ TE bufferで2回、TE bufferで3回洗浄し、各制限酵素で切断した。制限酵素はSma I (TaKaRa社)、Kpn I (TaKaRa社) 及びSma IとKpn Iによるdouble digestionの3通りによる比較を行った。Sma I, Kpn Iはそれぞれ30 unit/plug を用い、Sma IとKpn Iによるdouble digestionは各30 unit/plug混和して使用し、反応時間は3時間とした。泳動は1% SeaKem Gold Agaroseを用い、泳動条件は6.0V / cm, 6.8 to 38.4 sec, 19時間、チラー温度12.0℃で行った。解析は、Advanced Quantifier ver.2.1 (Bioimage社) で行い、バンドトレランス値は2.5で実施した。

2 PCR-RFLP法

PCR-RFLP法はNachamkinら³⁾の方法を改変した山口ら⁴⁾の報告に従い実施した。使用Primer, PCR条件は表2, 3に示す。その反応液を制限酵素Dde I (Roche社), Alu I (TaKaRa社), Hinf I (WAKO社)の3種類で切断後その泳動像を比較した。泳動は3% Seakem GTG Agarose:Nusieve GTG Agarose (1:2, ともにCamblex社)を用い、解析はPFGE法と同様にAdvanced Quantifier ver.2.1で行った。

表2 使用Primer

Primer	Sequence	Product Size(bp)
mfla1	5'-CTTTAAGCAGACTTAGTTCAGGTC-3'	1658
mfla2	5'-GCTTTAGAGTAGTTTGCCTCTC-3'	

表3 PCR条件

PreDenature	94°C, 7min.	} 35cycles
Denature	94°C, 30sec.	
Annealing	60-55°C, 45sec.	
(0.5°C decrease by 1cycle for first 10cycle)		
Extension	72°C, 100sec.	
ProExtension	72°C, 10min.	

結果

1 PFGE法

制限酵素の検討を3通り実施した結果, Sma Iで16パターン, Kpn I及びSma I +Kpn Iで19パターンに分類された。泳動パターンが同一になったものはSma Iでは5組(うち1組が3株, 残り4組が2株ずつ), Kpn I及びSma I +Kpn Iでは3組(2株ずつ)であった(図1~3, 表4)。泳動パターンが同じになったものはSma Iの1組を除き, 同じPenner型であった。

2 PCR-RFLP法

制限酵素の検討を3通り実施した結果, Dde Iで13パターン, Alu Iで11パターン, Hinf Iで5パターンに分類された(図4~6, 表4)。

表4 それぞれのパターン数

方法	制限酵素	パターン数
PFGE	Sma I	16
	Kpn I	19
	Sma I +Kpn I	19
PCR-RFLP	Dde I	13
	Alu I	11
	Hinf I	5

まとめ

カンピロバクターの分子疫学解析は米のCenters for Disease Control and Prevention (CDC) のPulseNet⁵⁾ や欧のCampynet⁶⁾ などでProtocolと有用性が報告されているが, 国内でProtocolやその有用性を示した文献は少ない^{7), 8)}。今回の検討の結果, PFGEの制限酵素Kpn Iを使用した場合と, Sma I +Kpn Iを使用した場合が最も多いパターンを示した。しかし, 制限酵素Kpn Iを使用した場合と, Sma I +Kpn Iを使用した場合のパターン数は同じであったことから, コスト面を考慮にいれるとKpn I単独での処理が最も効果的であった。同様の報告をGilpinら⁹⁾ も行っている。一方, PCR-RFLPはPFGEに比べ, パ

ターン数は減ったが, Dde I, Alu I 処理群はPennerの型別(8種類 +coli)に比べ, 多いパターンを示し, PFGEよりも迅速に行えることから, 血清型別以降の簡便な分子疫学解析の手法として有用であると思われる。

この研究は厚生労働科学研究新興・再興感染症研究事業“広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究”班の「*Campylobacter jejuni*の分子疫学解析の検討」の一部として実施した。

謝辞

菌株を送付いただいた九州各県の衛生研究所の担当者の皆様, 本研究に協力いただいた福岡県保健環境研究所 堀川氏, 長崎県環境保健研究センター 山崎氏, 鹿児島県環境保健センター 上野氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) Stephen L. W. On and Penelope J. Jordan : J.Clin.Microbiol., **41**, 330 (2003).
- 2) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美: 広域における食品由来感染症を迅速に探知するための必要な情報に関する研究 平成18年度総括・分担研究報告書, 219 (2007) .
- 3) Irving Nachamkin K.B, Charlotte M. Parron : J.Clin.Microbiol., **35**, 1531 (2003).
- 4) 山口仁孝, 山崎省吾, 八尋俊輔, 松雪星子: 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 平成16年度総括・分担研究報告書, 197 (2005) .
- 5) Centers for Disease Control and Prevention : PulseNet [online] <http://www.cdc.gov/pulsenet/>
- 6) Campynet [online] <http://campynet.vetinst.dk/CONTENTS.HTM>
- 7) 石村勝之, 毛利好江, 橋渡佳子, 山本美和子, 佐々木敏之, 古田喜美, 萱島隆之, 河本秀一, 平崎和孝, 蔵田和正, 児玉実, 伊藤文明, 笠間良雄, 山岡弘二, 荻野武雄: 広島市衛生研究所年報, **21**, 41 (2001) .
- 8) 依田清江, 横山栄二, 内村眞佐子: 感染症誌, **80**, 694 (2006) .
- 9) Brent Gilpin, Angela Cornelius, Beth Robson, Naomi Boxall, Alan Ferguson, Carolyn Nicol, Tom Henderson : J.Clin. Microbiol., **44**, 406 (2006).

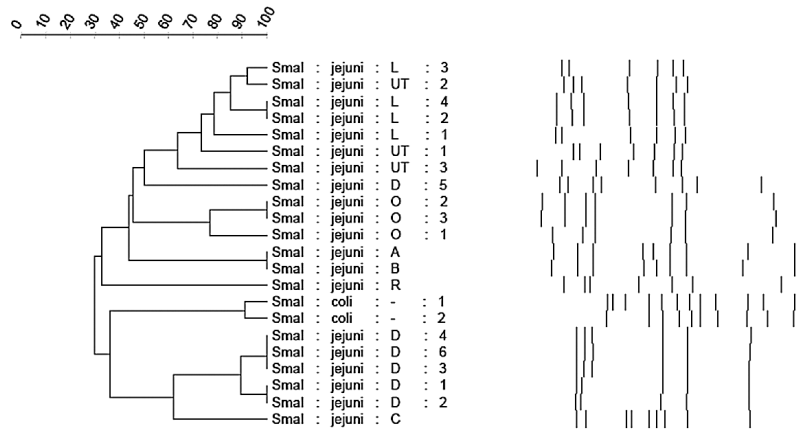


図1 Sma I 処理 (PFGE)

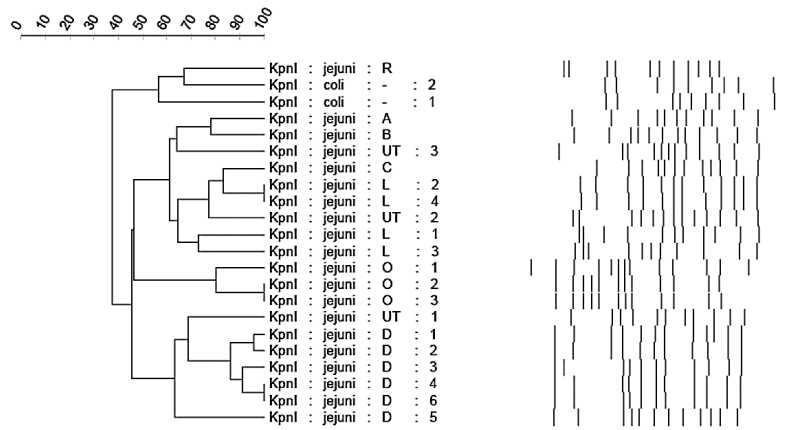


図2 Kpn I 処理 (PFGE)

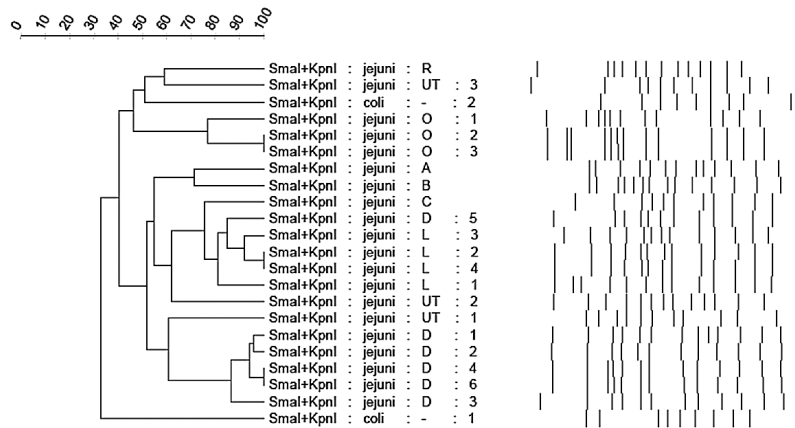


図3 Sma I + Kpn I 処理 (PFGE)

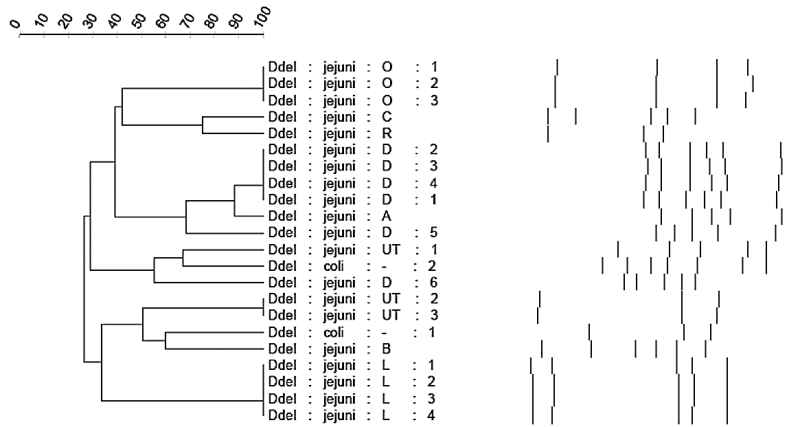


図4 Dde I 処理 (PCR-RFLP)

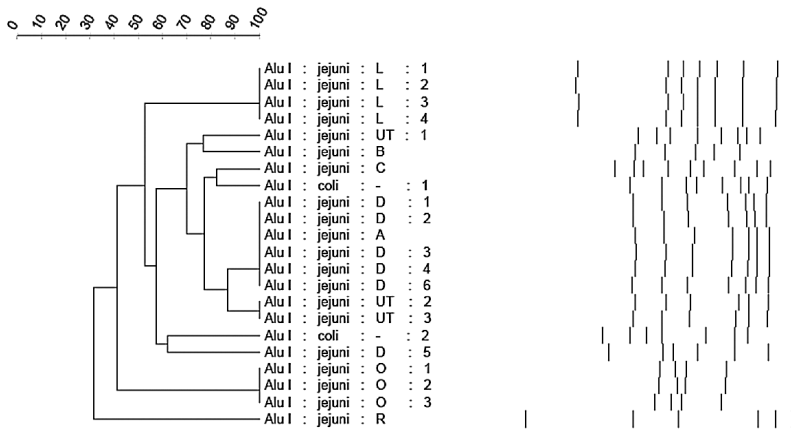


図5 Alu I 処理 (PCR-RFLP)

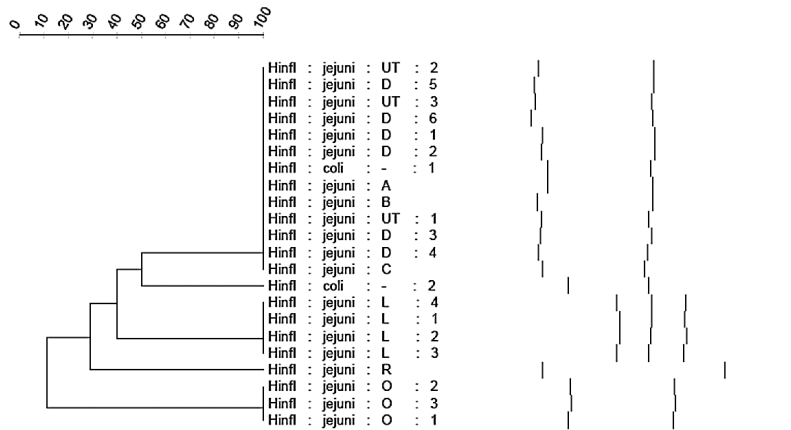


図6 Hinf I 処理 (PCR-RFLP)