

図17 *tdh*あるいは*trh*保有株の由来の違いによるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

腸管出血性大腸菌および *Campylobacter* の分子遺伝子学的手法を用いた
型別法の有用性の検討
分担研究報告書

研究分担者 熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科
協力研究者 加藤行男 麻布大学 獣医学部公衆衛生学第二研究室
岡谷友三アレシヤンドレ 麻布大学 獣医学部公衆衛生学第二研究室

要旨

本研究の目的は、PFGE、MLST ならびに塩基配列による反復数の特定および安価なサブマリン方式の電気泳動法を用いて MLVA 法を行い、食中毒由来 *E. coli* 0157 菌株識別能および疫学的調査での有用性の検証を行うことにある。ヒトから分離された同一食中毒由来 30 株および散発患者由来株の 2 株の *Escherichia coli* 0157:H7、ならびに地方衛生研究所あるいは保健所で分離された鶏肉あるいは牛レバー由来等の *Campylobacter* 24 株を用い、各菌の PFGE を、制限酵素としてそれぞれ *Bln*I または *Sma*I を用いて行った。MLST は、*aspC*、*clpX*、*fadD*、*icdA*、*lysP*、*mdh* および *uidA* の 7 つの遺伝子領域を基に行った。腸管出血性大腸菌の MLVA は、Murphy らの方法 (以下、MLVA-TR 法) により DNA の 7 つの反復領域 (VNTR 領域: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7) を用い、また、Kawamori の方法 (以下、MLVA-VR 法) により DNA の 8 つ VNTR 領域 (VR1, VR2, VR3, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8) を用いそれぞれ行った。PFGE パターンの系統樹解析を行なった結果、腸管出血性大腸菌については 1 事例の食中毒由来 30 株は、90%以上の類似性を示し同一のクラスター I に分類され、散発患者由来菌株の S389 および S392 はそれぞれ異なる PFGE パターンを示し、また系統樹解析でも類似度は 85%以下であり関連は認められなかった。*Campylobacter* 24 株については、18 のクラスターに分かれ、パターンが一致していた株は同一クラスターの菌株で 4 つの組み合わせのみで、その他の株は一致していなかった。MLST の結果、食中毒由来 30 菌株は全て同じシーケンスタイプ 2 (ST2) に、散発患者由来の 2 株は 2 型に型別された。MLVA-TR 法では、30 菌株中 28 菌株は同一の TR type A に、残り 2 菌株は TR type B に分類された。MLVA-VR 法ではさらに多数の型に分類された。以上より、MLVA-VR の型別能が最も高く、PFGE では菌株間の関連性の判定が難しかった腸管出血性大腸菌 3 菌株の他の菌株との差異が明確になった。また、多くの菌株について PFGE の結果を確定するものとなった。このことから、電気泳動時間や使用する泳動媒体等の改良の余地はあるものの、この通常の電気泳動法は迅速な菌株識別法としての有用性が確認された。

A. 研究目的

細菌性感染症や食中毒の疫学調査をより迅速ならびにより正確に行うため、様々な分子遺伝学手法が菌株識別に用いられるようになった。現在、分子遺伝学的手法としては Pulsed field gel electrophoresis 法（以下、PFGE）が最も浸透し、異なる地域で分離された菌株を比較する目的で米国をはじめ多くの国や地域で PFGE のデータベースシステム（PulseNet）が構築されている。また、近年の遺伝子解析技術の著しい進化により、Multi-locus sequence typing 法（以下、MLST）のように菌株の複数の遺伝子部位の塩基配列解析による菌株識別法なども用いられるようになってきている。しかし、PFGE は手技が煩雑で結果を得るまでに数日間かかるなどの短所が挙げられ、MLST では多くの断片の塩基配列を決定する費用と手間がかかり、さらに *Escherichia coli* 0157 では菌株識別能が低いとも報告されている³⁾。

一方、DNA の反復領域を複数特定し、各反復領域の反復数の差異により菌株識別を行う Multi-locus variable number of tandem repeat analysis 法（以下、MLVA）が多菌種で有用な菌株識別法として注目され、*E. coli* 0157 の菌株識別および疫学調査に有用性が報告されている^{2, 3, 5, 6, 8, 10)}。本法では PCR 産物の塩基配列を基に各領域の反復数を算出する方法ならびに PCR 産物を電気泳動し、その産物の大きさから反復数を算出する方法がある。MLVA の電気泳動による PCR 産物の算出には、作業の簡略化および PCR 産物の分離能の高さから、多くの場合にキャピラリー電気泳動装置が用いられる⁵⁾。このように、PCR 産物を泳動し、反復数を算出して差異を比較するため、

MLVA 法は PFGE などと比べその迅速性が大きな長所としてあげられる。しかし、用いる反復領域で変異の頻度に差があり識別能に差異が生じる場合ならびに電気泳動を用いた PCR 産物の大きさの特定で機器や方法により結果に差異が生じるなどの問題点が指摘されている^{2, 3)}。

本研究では、PFGE、MLST ならびに塩基配列による反復数の特定および安価なサブマリン方式の電気泳動法を用いて MLVA 法を行い、食中毒由来 *E. coli* 0157 菌株識別能および疫学的調査での有用性の検証を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株

腸管出血性大腸菌は、腸管出血性大腸菌による食中毒 1 事例の患者および保菌者から分離された 30 株（食中毒由来株、ECM01~30）および散发事例の患者から分離された 2 株（散发患者由来株：S389、S392）の計 32 株の *Escherichia coli* 0157:H7 を用いた。

Campylobacter は、4 県 1 市（岩手県、山梨県、岡山県、長崎県、福岡市）の地方衛生研究所あるいは保健所で分離された、鶏肉あるいは牛レバー由来等の *Campylobacter* 24 株を用いた（表 1）。

2) PFGE 法

腸管出血性大腸菌 0157 はトリプトソイ寒天培地（TSA）に塗抹し、37℃、24 時間培養後、プラグ作製に用いた。プラグの作製は PulseNet の方法に準じて行った¹⁾。制限酵素は *Bln* I を用い、25U/プラグ断片で、3 時間酵素処理を行った。電気泳動は CHEF DRIII を用い、電圧 6V/cm、パルスタイム 2.2~54.2 秒、泳動時間 18 時間、バッファー温度 14℃

で行った。

Campylobacter は Butzler 寒天培地で継代し、42°C、48時間、微好気培養後、プラグの作製に用いた。プラグの作製は、Ribotら⁹⁾の方法に準じて行った。制限酵素は *Sma* I を用い、25U/プラグ断片で、3時間酵素処理を行った。電気泳動は CHEF DR-III を用い、電圧 6V/cm、パルスタイム 0.5~44.0秒、泳動時間 22.5時間、バッファー温度 14°Cで行った。

PFGE の解析は、Bionumerics 5.1 を用い、Dice 系数による UPGMA 法にて行った。

3) Multilocus sequence typing (MLST) 法

MLST は、EcMLS

(<http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/index>) の方法に準じ、*aspC*、*clpX*、*fadD*、*icdA*、*lysP*、*mdh* および *uidA* の 7 つの遺伝子領域を基に行った。各遺伝子は、PCR 法により増幅した。DNA の抽出は、Instagene Matrix (Bio-Rad) を用いて行ない、PCR は、反応液 (10×Reaction buffer 2μl、Ex Taq 2.5U、dNTP mixture 250μM、各プライマー 1μM) 19μl にテンプレート DNA を 1μl 加え用いた。PCR 反応は、94°C で 10 分を 1 回、92°C で 1 分、58°C で 1 分、72°C で 30 秒を 35 回、72°C で 5 分を 1 回により行った。

PCR で増幅した各遺伝子のシーケンシングは ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。各遺伝子のシーケンス解析は、シーケンス解析ソフト MEGA4 を用い、各遺伝子の対象領域を精査した塩基配列を CLC Main Workbench (CLC Bio) に取り込み CLC MLST Module で各菌株の Sequence type (ST) を確定した。その ST を基に PubMLST で BURST 解析によりグルー

プ解析を行った。

4) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法

MLVA は 2 種類のプロトコールを用いて行った。

(1) Murphy ら⁷⁾ の方法 (以下、MLVA-TR 法)

各菌株の DNA の 7 つの反復領域 (VNTR 領域: TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7) を用いた。PCR で目的領域を増幅し、上記同様に ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer で各領域のシーケンスを行い、塩基配列を決定した。そのシーケンスから反復数を算出し、それぞれの TR type に分類した。

(2) Kawamori ら⁴⁾ の方法 (以下、MLVA-VR 法)

各菌株の DNA の 8 つ VNTR 領域 (VR1, VR2, VR3, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8) を用いた。PCR で目的領域を増幅し、増幅産物は、3% アガロースゲル、電圧 8V/cm、15°C で 3 時間電気泳動し、染色後に撮影した。DNA サイズマーカーとして 25bp DNA ラダーを用いた。電気泳動像を Bionumerics 5.1 に取り込み、マーカーを基準に各 VNTR 領域の増幅産物の大きさを測定し、反復数を算出してそれぞれの VR type に分類した。

C. 結果

1) 腸管出血性大腸菌の PFGE

腸管出血性大腸菌の PFGE パターンおよびその系統樹を図 1 に示した。

1 事例の食中毒由来 30 株は、PFGE パターンの系統樹解析を行なったところ、90% 以上の類似性を示し同一のクラスター I に分類された。このことより、これらの菌株は近縁のもので、今回の事例の食中毒は、同一由来株に

よるものと考えられた。散发患者由来菌株の S389 および S392 はそれぞれ異なる PFGE パターンを示し、また系統樹解析でも類似度は 85% 以下であり、関連は認められなかった。

クラスター I に分類された食中毒由来 30 株中 26 株は PFGE のバンドの位置が完全に一致した同一の PFGE パターン (P-A) であったが、残りの 4 株はそれぞれバンドの位置が若干異なる PFGE パターン (P-B、P-C、P-D、P-E) を示した。

2) *Campylobacter* の PFGE

Campylobacter の PFGE パターンおよびその系統樹を図 2 に示した。

食肉由来の *Campylobacter* 24 株は、90% 以上の相同性を基準として、PFGE パターンのクラスター解析を行うと、18 のクラスターに分かれた (図 2)。PFGE パターンが一致していた株は、同一クラスターの菌株で菌株番号の 3 と 4、5 と 7、8~10、17 と 18 のみで、その他の株は一致していなかった。

PFGE パターンが一致していた株の多くは、同じ場所から分離された株 (菌株番号 3 と 4 は長崎県、5 と 7 は山梨県、9 と 10 は岡山県、17 と 18 岩手県) であったが、菌株番号 8 の山梨県の分離株は 9 と 10 の岡山県の分離株と一致していた。

3) 腸管出血性大腸菌の MLST

MLST の結果は表 2 に示した。ECM 株 30 菌株は全て同じシーケンスタイプ 2 (ST2) に型別され、散发患者由来の S389 菌株は ST 3、S392 菌株は ST4 に型別された。しかし、BURST 解析では、ECM 株 30 菌株と散发患者由来株の S392 菌株は同一の Clonal Complex1 (CC1) に分離された。S389 菌株は単独の CC2 に分類さ

れた。

4) 腸管出血性大腸菌の MLVA

MLVA-TR 法の結果は表 3、MLVA-VR 法の結果は表 4 に示した。

(1) MLVA-TR 法

MLVA-TR 法の TR2 領域は PCR で複数の増幅産物が出現し、シーケンスが不明瞭であったため、TR2 を除く 6 領域の反復数を特定し、菌株型別を行った。ECM 株 30 菌株中 28 菌株は同一の TR type A (以下、TR-A) に分類され、残り 2 菌株 (ECM28 および ECM30) は TR type B (以下、TR-B) に分類されたが、その差異は TR1 領域の一反復の差異のみであった。散发患者由来の S389 株は TR-C、S392 株は TR-D に分類され、S389 株は ECM 株と 4 領域で差異が見られ、その差異も 1 から 18 反復であった。S392 株は S389 株とほぼ同様の TR type を示したが、TR5 領域で S382 で増幅産物が得られなかったのに対し、S392 は 6 反復を示し、TR7 領域では 1 反復の差異が見られた。

(2) MLVA-VR 法

MLVA-VR 法では、ECM 株 30 菌株中 18 菌株は VR type A (以下、VR-A) : 18, 1, 8, 9, 3, 6, 10, 6、7 菌株は VR-B : 18, 1, 7, 9, 3, 6, 10, 6、1 菌株が VR-C : 18, 1, 7, 9, 3, 6, 10, 5、1 菌株が VR-D : 18, 1, 7, 9, 2, 6, 10, 6、2 菌株が VR-E : 18, 1, 7, 9, 2, 6, 10, 5、1 菌株が VR-F : 18, 1, 7, 8, 2, 6, 10, 5 に分類された。

表 5 に供試した計 32 菌株の PFGE、MLST および MLVA の結果をすべて合わせたものならびに図 2 には PFGE 法の系統樹を示した。ECM 株 30 菌株の中、ECM09、ECM13 および ECM20 が PFGE 法および MLVA-VR 法の二つの方法で他の ECM 菌株と異なるパターンを示した。これら以外の ECM 菌株で一つ以上の方法で異なる

パターンを示した菌株は見られなかった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌の PFGE のクラスター解析の結果、PFGE パターンは 4 株で異なっていたものの、今回供試した 1 事例の食中毒由来 30 株は、同じクラスター(クラスター I)に分類された。PFGE パターンが異なっていた菌株のうち、菌株 ECM13 は小さなバンドが二つ消え、大きなバンドが一つ増えている。また、ECM20 および ECM27 はパターンが異なるが、2 菌株とも大きなバンドが一つ消え、二つのバンドが現れている。Tenover ら¹¹⁾ は DNA の変異により、切断部位が消失した場合は二つのバンドがそれらを足した大きさの一つのバンドになり、切断部位が表れた場合には大きなバンドが二つのバンドになる。また、DNA 断片の欠損あるいは追加により、一つのバンドの位置が変化するとしている。これらのことから、1~3 バンドが異なる菌株は同一のクローンであると考えられるとしている。したがって、これらの菌株は、何らかの変異により異なるパターンを示したが、起源が同じクローンであるとの解釈が可能であり、同一の食中毒事例で分離された菌株であることから疫学的にもその結果は裏付けられる。

ECM09 の PFGE パターンは他の菌株のものと比較しても上記解釈の DNA 断片の挿入あるいは欠落によるバンドサイズの変更などにあてはまるような変化が目視的には確認できず、この菌株の PFGE パターンの変異は Tenover ら¹¹⁾ の解釈では説明が出来ない。また、クラスター解析では 90%以上の類似度を示したことから、他の菌株と近縁の菌株と思われるが、MLVA-VR では異なる菌株と判定された。

Campylobacter の PFGE については、様々な

場所で分離された 24 株のうち 1 株を除いて、分離場所が異なればクラスターが異なっており、ほとんどの菌株で地域と菌株の関連が明確になった。ただし、山梨県で分離された 1 株については、岡山県で分離された株と同じ PFGE パターンを示し、それら菌株の関連性について興味を持たれ、*Campylobacter* の感染の原因として最も多い鳥肉等からの分離菌株を含めた疫学調査が必要と考えられた。また、PFGE 法のみならず大腸菌のように MLVA 法などを用いて検討することも考慮すべきであろう。

本研究の腸管出血性大腸菌で用いた二つの MLVA 法では、同一の食中毒事例から分離された ECM 株 30 菌株と散发事例の分離菌株は、明確に分類された。MLST 法では、ECM 株と散发事例の菌株の ST は異なったものの、S392 菌株は ECM 菌株の同等の CC1 に分類され、時系列的には近い可能性を示した。しかし、この菌株は二つの MLVA 法で ECM 株とは全く異なる菌株であることが明らかになった。

MLVA 法では、一領域で一回復の違いのみのものから、最大で 18 回復の差異また 4 領域で各 1 回復の差異が見られた。Hyytia-Trees ら³⁾ は、MLVA を用いた疫学的解析では、一領域で 1 回復の差異あるいは 2 領域でそれぞれ 1 回復の差異であれば、同一の起源を持つ菌株とみなすことが出来るとしている。

MLVA-TR では、ECM 株 30 株中、ECM28 および ECM30 が TR1 領域で他の菌株より 1 回復少ないのみであり、この方法ではこれら菌株は同一の起源を持つ菌株とみなされた。

MLVA-VR では、VR type A に比べ、VR-B を示した ECM04, 05, 14, 15, 16, 17 および ECM20 は一領域で 1 回復の差異のみ、VR-C および VR-D は 2 領域でそれぞれ 1 回復のみの差異で

あった。また、ECM20 菌株は PFGE パターン P-D を示したが、いずれの方法においても同一の起源を持つ菌株に分類された。一方、VR-E では 3 領域でそれぞれ 1 反復、VR-F では 4 領域でそれぞれ 1 反復の差異が見られた。したがって、MLVA-VR の結果を単独で見た場合には、ECM 株 30 菌株中、27 菌株は同一の起源を持つ菌株であり、VR-E に分類された ECM10 および ECM13 ならびに VR-F を示した ECM09 は異なる起源を持つ菌株と推測された。また、これら 3 菌株の PFGE パターンでは、ECM10 は最も多いパターン P-A を示したが、ECM13 は PFGE パターン P-C を示し、ECM09 は PFGE パターン P-B を示した。

これらの結果から、食中毒事例と分離菌株の関連を迅速に判断しなくてはならない場合に、通常の電気泳動装置を用いた MLVA-VR 法は有用な方法であることが改めて確認された。しかし、同一食中毒事例であるのにも関わらず、異なる起源を持つ可能性を示す結果が得られ、Hyytia-Trees^{2,3)} の定義を用いることで、関連のある菌株を誤って除外する可能性は軽減できるが、結果の解釈は慎重に行う必要がある。

また、一バンドの差異ではあるが特異的 PFGE パターンを示した ECM20 菌株が他の菌株と最も異なる MLVA-VR パターンを示し、他の菌株とは異なる起源を持つことが明らかになった。このことから、*E. coli* 0157 食中毒事例に異なる起源を持つ複数の菌株が含まれる場合には、MLVA 法を用いることでより詳細な疫学解析が可能になると考えられた。

E. 結論

本件研究では MLVA-VR の型別能が最も高く、PFGE では菌株間の関連性の判定が難しかった

ECM09 菌株を含む 3 菌株の他の菌株との差異が明確になった。また、多くの菌株について PFGE の結果を確定するものとなった。このことから、電気泳動時間や使用する泳動媒体等の改良の余地はあるものの、この通常の電気泳動法は迅速な菌株識別法としての有用性がこれらの菌株でも確認された。

しかし、疫学的には、この ECM09 菌株は他の菌株と関連性が高いと思われ、MLVA-TR および MLST では他の菌株と同等のパターンを示した。昨今、食中毒事例の菌株識別は PFGE で行われ、異なる地域で起こった事例で関連性が示されて来た。しかし、*E. coli* 0157 での上記の様な結果は Hyytia-Tree^{2,3)} も報告しており、今後はこのような状況がどの様な頻度で起こるのかなど広範囲で継続的なデータ収集が必要であり、得られたデータからこのような結果の解釈を検討していく必要がある。また、このような現象は *E. coli* 0157 のみではなく、*Campylobacter* などでも起こる可能性考えられる。

F. 研究発表

なし

G. Reference

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2004). One day (24-28h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.

2. Hyytiä-Trees, E., Lafon, P., Vauterin, P., and Ribot, E. M. (2010). Multilaboratory validation study of standardized multiple-locus variable-number tandem repeat analysis protocol for shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: a novel approach to normalize fragment size data between capillary electrophoresis platforms. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7:1-8.
3. Hyytiä-Trees, E., Smole, S. C., Fields, P. A., Swaminathan, B., and Ribot, E. M. (2006). Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog. Dis.*, 3:118-131.
4. Kawamori, F., Hiroi, M., Harada, T., Ohata, K., Sugiyama, K., Masuda, T., and Ohashi, N. (2008). Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeats analysis and PFGE. *J. Med. Microbiol.*, 57:58-63.
5. Lindstedt, B-A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26:2567-2582.
6. Lindstedt, B-A., Brandal, L. T., Aas, L., Vardund, T., Kapperud, G. (2007). Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and Shigella isolates for use in a genotyping assay. *J. Microbiol. Methods*, 69:197-205.
7. Murphy, M., Minihan, D., Buckley, J. F., O' Mahony, M., Whyte, P., and Fanning S. (2008). Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle: uncovering strain dissemination routes. *BMC Vet. Res.*, 4:2.
8. Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Pacheco, A. G. F., Boxrud, D. J., and Harrison, L. H. 2003. Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41:5389-5397.
9. Ribot, E. M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., and Barret, T. J. (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 39:1889-1894.
10. Sperry, K. E. V., Kathariou, S., Edwards, J. S., and Wolf, L. A. (2008). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 46:1435-1450.

11. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33:2233-2239.

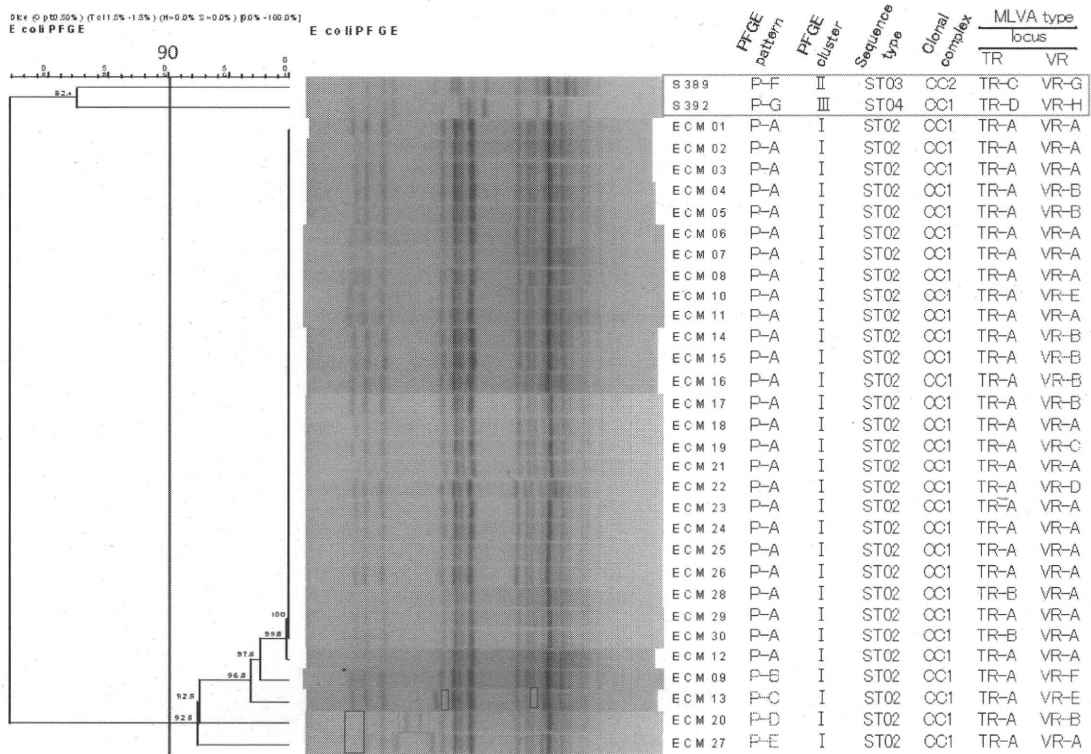


図1. 食中毒事例由来 *E. coli* 0157 30 株 (ECM 株) および散発患者由来 *E. coli* 2 株 (S 株) の PFGE 法による系統樹解析、MLST および MRVA (TR 及び VR 領域) による菌株型別

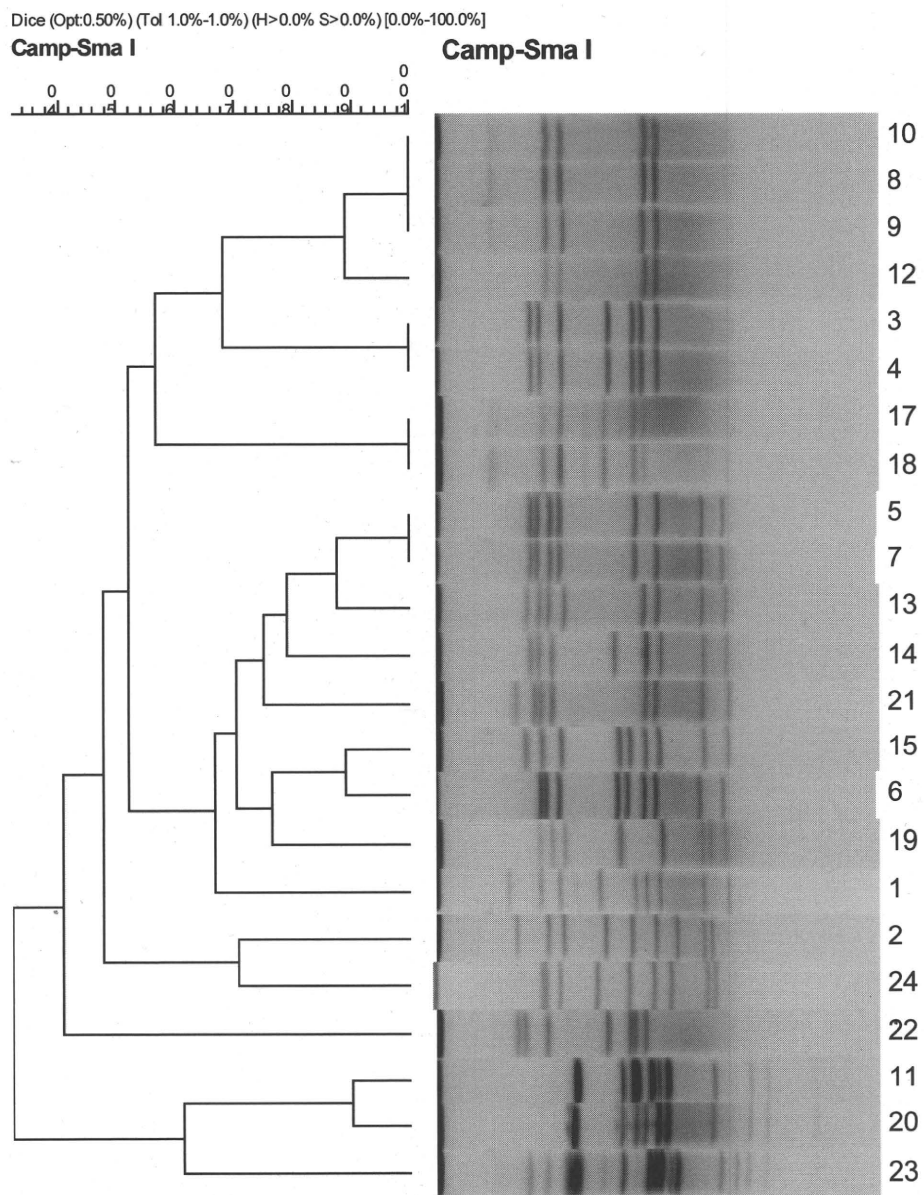


図 2. 食肉由来 *Campylobacter* の PFGE パターンと系統樹解析

表1. 供試した *Campylobacter* 株

菌株番号	検体番号	No.	菌種	検体名	採材場所
1	19	10-10-12-1	<i>C. jejuni</i>	若鶏むね挽肉(国産)	岡山県吉備
2	No.1	10-9-28-1	<i>C. jejuni</i>	国産 砂肝	長崎県
3	No.2	10-9-28-2	<i>C. jejuni</i>	国産 鶏ミンチ	長崎県
4	No.3	10-9-28-3	<i>C. jejuni</i>	国産 鶏ミンチ	長崎県
5	229	10-10-6-1	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ肉	山梨県庄内
6	230	10-10-6-2	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ肉	山梨県庄内
7	231	10-10-6-3	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ肉	山梨県庄内
8	No.6-1	10-10-27-1	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ肉	山梨県置賜
9	301	10-10-29-1	<i>C. jejuni</i>	若鶏ムネミンチ	岡山県美作
10	302	10-10-29-2	<i>C. jejuni</i>	若鶏ムネミンチ	岡山県美作
11	118	10-10-12-2	<i>C. jejuni</i>	吉備高原若鶏きも	岡山県吉備
12	No.6-2	10-10-27-2	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ肉	山梨県置賜
13	316	10-10-29-3	<i>C. jejuni</i>	国産牛レバー焼肉用	岡山県美作
14	11-1	10-10-29-4	<i>C. jejuni</i>	鶏ミンチ	岡山県美作
15	12-1	10-10-29-5	<i>C. coli</i>	牛レバー	岡山県美作
16	4	10-11-4-1	<i>C. jejuni</i>	国産若鶏むね挽肉	岩手県
17	5	10-11-4-2	<i>C. jejuni</i>	国産若鶏挽肉	岩手県
18	6	10-11-4-3	<i>C. jejuni</i>	若鶏挽肉	岩手県
19	8	10-11-4-4	<i>C. jejuni</i>	むね挽肉	岩手県
20	CAM621	10-11-22-1	<i>C. jejuni</i>	牛レバー(加熱用)	福岡市
21	CAM622	10-11-22-2	<i>C. jejuni</i>	生牛レバー	福岡市
22	CAM623	10-11-22-3	<i>C. jejuni</i>	鶏タタキ	福岡市
23	11	10-11-1	<i>C. jejuni</i>	国産 鶏ミンチ	長崎県
24	菌株 1	10-11-17-1	<i>C. jejuni</i>	国産 砂肝	長崎県

表 2. 食中毒事例由来 *E. coli* O157 30 株 (ECM 株) および散発患者由来 *E. coli* O157 2 株 (S 菌株) の 7 つの遺伝子を用いた MLST プロファイル

菌株	遺伝子領域及び allele type							
	ST	aspC	clpX	fadD	icdA	lysP	mdh	uidA
ECM01	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM02	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM03	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM04	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM05	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM06	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM07	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM08	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM09	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM10	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM11	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM12	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM13	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM14	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM15	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM16	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM17	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM18	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM19	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM20	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM21	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM22	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM23	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM24	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM25	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM26	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM27	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM28	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM29	2	1	1	2	2	2	2	2
ECM30	2	1	1	2	2	2	2	2
S389	3	1	2	3	3	2	3	4
S392	4	1	1	2	2	2	2	3

EcMLST の K12 菌株の MLST type (ST:1, profile:1-1-1-1-1-1-1) を対象とした

表3. 食中毒事例由来 E. coli 0157 (ECM 株) 30 株および散发患者由来 E. coli 0157 (S 株) 2 株の MLVA (TR 領域)

菌株	VNTR 領域及び反復数					
	TR1	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7
ECM01	9	6	4	18	2	8
ECM02	9	6	4	18	2	8
ECM03	9	6	4	18	2	8
ECM04	9	6	4	18	2	8
ECM05	9	6	4	18	2	8
ECM06	9	6	4	18	2	8
ECM07	9	6	4	18	2	8
ECM08	9	6	4	18	2	8
ECM09	9	6	4	18	2	8
ECM10	9	6	4	18	2	8
ECM11	9	6	4	18	2	8
ECM12	9	6	4	18	2	8
ECM13	9	6	4	18	2	8
ECM14	9	6	4	18	2	8
ECM15	9	6	4	18	2	8
ECM16	9	6	4	18	2	8
ECM17	9	6	4	18	2	8
ECM18	9	6	4	18	2	8
ECM19	9	6	4	18	2	8
ECM20	9	6	4	18	2	8
ECM21	9	6	4	18	2	8
ECM22	9	6	4	18	2	8
ECM23	9	6	4	18	2	8
ECM24	9	6	4	18	2	8
ECM25	9	6	4	18	2	8
ECM26	9	6	4	18	2	8
ECM27	9	6	4	18	2	8
ECM28	8	6	4	18	2	8
ECM29	9	6	4	18	2	8
ECM30	8	6	4	18	2	8
S389	10	3	4	0	2	6
S392	10	3	4	6	2	5

ゼロ(0):PCR 反応において当該領域の増幅産物が得られなかった

表4. 食中事例由来E. coli 0157 30株 (ECM株) および散发患者由来E. coli 0157 2株 (S株) のMLVA (VR領域)

菌株	VNTR 領域及び反復数							
	VR1	VR2	VR3	VR4	VR5	VR6	VR7	VR8
ECM01	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM02	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM03	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM04	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM05	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM06	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM07	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM08	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM09	18	1	7	8	2	6	10	5
ECM10	16	1	7	9	2	6	10	5
ECM11	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM12	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM13	18	1	7	9	2	6	10	5
ECM14	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM15	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM16	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM17	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM18	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM19	18	1	7	9	3	6	10	5
ECM20	18	1	7	9	3	6	10	6
ECM21	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM22	18	1	7	9	2	6	10	6
ECM23	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM24	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM25	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM26	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM27	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM28	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM29	18	1	8	9	3	6	10	6
ECM30	18	1	8	9	3	6	10	6
S389	0	6	6	11	8	7	9	3
S392	6	4	5	9	6	6	9	3

ゼロ(0):PCR 反応において当該領域の増幅産物が得られなかった

表 5. 食中毒事例由来 *E. coli* O157 30 株 (ECM 株) および散発患者由来 *E. coli* O157 2 株 (S 株) の PFGE パターンと系統樹解析、MLST、MLVA (TR 及び VR 領域) による型別

菌株	PFGE		MLST			MLVA-TR		MLVA-VR	
	Cluster	PFGE pattern	CC	ST	Profile	TR type	Profile	VR type	Profile
ECM01		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM02		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM03		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM04		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM05		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM06		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM07		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM08		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM09		P-B		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-F	(18-1-7-8-2-6-10-5)
ECM10		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-E	(18-1-7-9-2-6-10-5)
ECM11		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM12		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM13		P-C		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-E	(18-1-7-9-2-6-10-5)
ECM14		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM15	I	P-A	CC1	ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM16		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM17		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM18		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM19		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-C	(18-1-7-9-3-6-10-5)
ECM20		P-D		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-B	(18-1-7-9-3-6-10-6)
ECM21		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM22		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-D	(18-1-7-9-2-6-10-6)
ECM23		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM24		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM25		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM26		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM27		P-E		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM28		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-B	(8-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)
ECM29		P-A		ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-A	(9-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)

ECM30		P-A	ST02	(1-1-2-2-2-2-2)	TR-B	(8-6-4-18-2-8)	VR-A	(18-1-8-9-3-6-10-6)	
S389	II	P-F	CC2	ST03	(1-2-3-3-2-3-4)	TR-C	(10-3-4-0-2-6)	VR-G	(0-6-6-11-8-7-9-3)
S392	III	P-G	CC1	ST04	(1-2-2-2-2-2-3)	TR-D	(10-3-4-6-2-5)	VR-H	(6-4-5-9-6-6-9-3)

ゼロ(0):PCR 反応において当該領域の増幅産物が得られなかった

ST: Sequence type

CC (Clonal complex): PubMLST (<http://pubmlst.org/>) で BURST を用い、5 つ以上の ST の類似により菌株の分類を行った結果

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

食品から分離されたカンピロバクター菌株の病原因子保有状況
分担研究報告書

研究分担者 熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科
研究協力者 三輪憲永 東海大学短期大学部

要旨

カンピロバクターの食中毒発生子防に有用なリスク管理手法を確立するため、食品等から分離されるカンピロバクターを対象に、病原性に関連すると考えられている 2 種類の因子、invasion-associated marker (IAM) および cytolethal distending toxin (cdtABC) の遺伝子保有状況を調査し、これらの情報がカンピロバクターの効率的なライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であるか検討した。供試菌株 24 株のうち 3 株 (12.5%) が IAM 遺伝子を、20 株 (83.3%) が cdtABC 遺伝子を保有していた。また、23 株は、どちらか一方の遺伝子のみを保有しており、両遺伝子を保有している株はみられず、1 株は両遺伝子ともに保有していなかった。カンピロバクター分離株における IAM 遺伝子および cdtABC 遺伝子の保有は、菌株によって差が認められ、これらの遺伝子の保有状況により、カンピロバクター菌株をさらに詳細に分類することが可能であり、ライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であると考えられた。

A. 研究目的

近年の国内の食中毒発生状況を見ると、カンピロバクターによる食中毒の発生件数は上位にあり、本食中毒は予防対策上重要な食中毒と考えられる。カンピロバクターの食中毒発生子防に有用なリスク管理手法を確立するために、本菌に関する科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関（国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所）と地方衛生研究所（地研）等の食品安全関係機関が連携

して、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することは急務である。

本研究では、食品等から分離されたカンピロバクターを対象に病原性に関連すると報告されている遺伝子の保有状況を調査し、これらの情報がカンピロバクターの効率的なライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であるか検討した。

B. 研究方法

1. 菌株

全国の保健所および地方衛生研究所等が国内に流通する食品から分離したカンピロバクター24株を供試した。菌株は分離機関で純培養した後冷凍保存し、国立医薬品食品衛生研究所に集められ、血液寒天培地で十分発育が確認されたものについて InstaGene Matrix (BIO-RAD) を用いて DNA を抽出した。

2. 病原因子保有状況調査

カンピロバクターの病原性に関連している可能性があるとして報告されている2種類の因子、invasion-associated marker (IAM) および cytolethal distending toxin (cdtABC) を対象とし、PCR法により遺伝子保有状況を調査した。IAMについては、Carvalho et al. の報告 (J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 1353-1359) に準じて、IAM 遺伝子の 316 から 834 までの 518 bp の DNA fragment の増幅を目的とし、IAM-1 (5' -GCG CAA AAT ATT ATC ACC C-3') および IAM-2 (5' -TTC ACG ACT ACT ATG CGG-3') のプライマーを用いて実施した。反応液の組成は、プライマー (IAM-1 および IAM-2) それぞれ 15 pmol, dNTP 0.2 mM, Taq polymerase (Takara Ex Taq, タカラバイオ株式会社) 0.5U、液量 20 μ L とした。cdtABC については、Bang et al. の報告 (Genome Letters 2003; 2, 62-72) に準じて、cdt-1 (5' -GGA AAT TGG ATT TGG GGC TAT ACT-3') および cdt-2 (TTG CAC ATA ACC AAA AGG AAG-3') のプライマーを用い、1215 bp の DNA

fragment の増幅を目的として実施した。反応液の組成は、プライマー (cdt-1 および cdt-2) それぞれ 8 pmol, dNTP 0.2 mM, Taq polymerase (Takara Ex Taq) 1U、液量 20 μ L とした。PCR 反応は、GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem) により、IAM 遺伝子の増幅は、92°C 30 秒、52°C 1 分、72°C 1 分を 30 サイクル、final extension 72°C 5 分の条件で実施した。cdtABC 遺伝子の増幅は、94°C 1 分、42°C 2 分、72°C 3 分を 30 サイクルの条件で実施した。増幅された DNA は、ミニゲル電気泳動システム (ミューピッド-2、株式会社アドバンス) を用いて、2%寒天ゲル (Agarose S, 株式会社ニッポンジーン) により電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色後、312 nm の紫外線検出器 (アト株式会社) により観察した。

C. 結果

供試したカンピロバクター菌株の由来、分離機関、菌名および遺伝子保有状況を表 1 に示した。また、PCR 反応の電気泳動の結果を図 1 および図 2 に示した。供試菌株 24 株のうち 3 株 (12.5%) が IAM 遺伝子を、20 株 (83.3%) が cdtABC 遺伝子を保有しており、IAM 遺伝子を保有する株は少なく、cdtABC 遺伝子を保有している株が多い結果であった。供試菌株のうち、1 株は両遺伝子ともに保有しておらず、残りの 23 株は、どちらか一方の遺伝子のみを保有していた。両遺伝子を保有している株はなかった。また、遺伝子の保有状況と由来食品および分離地域との関連はみられなかった。

電気泳動の結果では、IAM 遺伝子については非特異的なバンドは見られず、明瞭な 518 bp のバンドが観察された(図 1)。一方、cdtABC 遺伝子の電気泳動の結果では、非特異的なバンドが見られたが、目的とする 1215 bp の DNA fragment を明確に確認することが可能であった(図 2)。

D. 考察

カンピロバクターの病原性に関連している可能性のある因子についてはいくつかの報告が見られる。Carvalho et al. (2001) は、子どもの下痢症患者から分離されたカンピロバクター菌株では 85% が IAM 遺伝子を保有しているのに対し、典型的症状のみられないヒトから分離された株では 20% しか IAM 遺伝子を保有していないことから、IAM は病原性に関連している可能性が高いと報告している。一方、Rozynek et al. (J. Medical microbiol. 2005; 54, 615-619) は IAM 遺伝子の保有はバラツキがあり、必ずしも子どもの下痢患者から分離された株の IAM 遺伝子保有率が高くないことから、IAM は普遍的な病原因子とは考えられないと報告している。今回の結果では、IAM 遺伝子の保有率は 24 株中 3 株(12.5%) と低い結果であった。今回の対象株は食品からの分離株であり、病原性については不明であるが、Rozynek et al. (2005) の報告にみられるように、IAM 遺伝子を保有している株は少ないと考えられた。

Rozynek et al. (2005) は種々の由来から

分離されたカンピロバクター菌株は高率に cdtABC 遺伝子を保有していると報告している。また、Bang et al. (2003) も種々の由来から分離されたカンピロバクター菌株の 90% 以上が cdtABC 遺伝子を保有していると報告している。今回の結果では、24 株中 20 株(83.3%) が cdtABC 遺伝子を保有しており、これまでの報告と同様高い保有率であった。また、cdtABC 遺伝子の増幅で非特異的なバンドが多数観察されたことは、annealing の温度が 42°C と低い設定であったことが影響しているものと考えられた。

今回は供試菌株数が少ないため、明確なことはいえないが、IAM 遺伝子と cdtABC 遺伝子の保有状況を調査することにより、カンピロバクター菌株をさらに詳細に分類することが可能と考えられ、これらの遺伝子の保有状況はライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であることが示唆された。

E. 結論

カンピロバクター分離株における IAM 遺伝子および cdtABC 遺伝子の保有は、菌株によって差が認められた。これらの遺伝子の保有状況により、カンピロバクター菌株をさらに詳細に分類することが可能と考えられ、これらの遺伝子の保有状況はライブラリーシステム構築のためのデータベースとして利用可能であることが示唆された。今後は、さらに菌株数を増やして検討し、有用なデータベースと