

なることを明確にする必要がある。

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

F. 研究発表

なし

表1 カンピロバクター菌株の IAM 遺伝子および cdtABC 遺伝子保有状況

| 検体 番号 | 検体名 | 分離機関 | 菌名 | 遺伝子保有状況 | |
|----------|------------|------|--------------------------------------|---------|--------|
| | | | | IAM | cdtABC |
| 1 | 鶏ミンチ肉 | 山形県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 2 | 国産鶏ミンチ | 長崎県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 3 | 鶏ミンチ肉 | 山形県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 4 | 鶏ミンチ肉 | 山形県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | - |
| 5 | 若鶏むね挽肉(国産) | 岡山県 | <i>Campylobacter coli</i> | - | + |
| 6 | 国産鶏ミンチ | 長崎県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 7 | 若鶏モモミンチ | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 8 | 国産砂肝 | 長崎県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 9 | 若鶏ムネミンチ | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 10 | 鶏ミンチ肉 | 山形県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 11 | 吉借高原若鶏きも | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | + | - |
| 12 | 鶏ミンチ肉 | 山形県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 13 | 国産牛レバー焼肉用 | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 14 | 鶏ミンチ | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 15 | 牛レバー | 岡山県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 16 | 国産若鶏むね挽肉 | 岩手県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 17 | 国産若鶏挽肉 | 岩手県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 18 | 若鶏挽肉 | 岩手県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 19 | むね挽肉 | 岩手県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 20 | 牛レバー(加熱用) | 福岡市 | <i>Campylobacter coli</i> | + | - |
| 21 | 生牛レバー | 福岡市 | <i>Campylobacter jejuni/coli</i> | - | + |
| 22 | 鶏タタキ | 福岡市 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |
| 23 | 鶏ミンチ | 長崎県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | + | - |
| 24 | 国産鶏ミンチ | 長崎県 | <i>Campylobacter jejuni</i> | - | + |

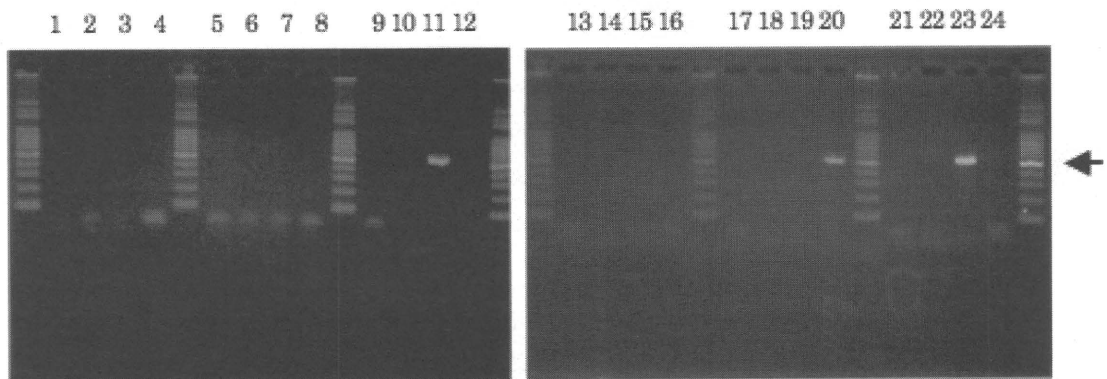


図1 PCR法によるカンピロバクター菌株のIAM遺伝子増幅

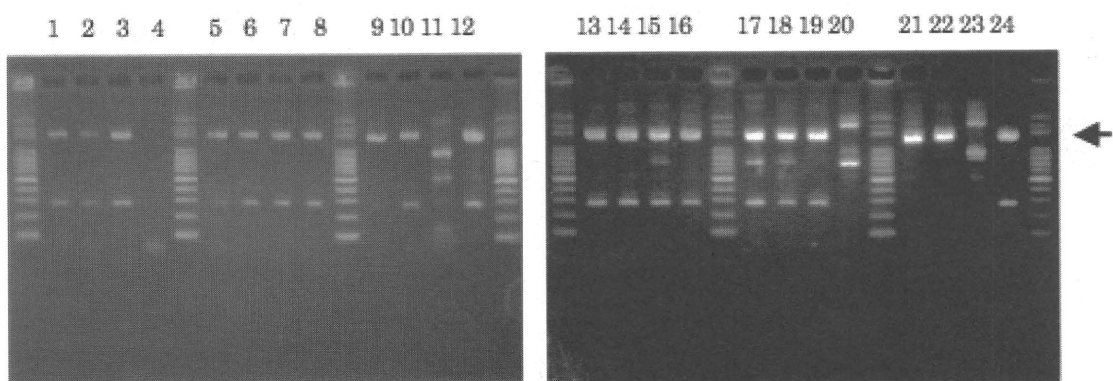


図2 PCR法によるカンピロバクター菌株のcdtABC遺伝子増幅

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)

疫学指標としての *Campylobacter jejuni* 病原関連遺伝子に関する研究 分担研究報告書

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院 農学生命科学研究科
協力研究者 森田 幸雄 東京家政大学 栄養学科
古茂田恵美子 東京家政大学 栄養学科

要旨

簡易的な分子疫学的手法を開発するための一助として、PCR法を用いて食品由来 *Campylobacter jejuni* 16株に対する12種の病原遺伝子 (*flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *CfrA*) の検索をした。*cadF*遺伝子は16株の全て(100%)が保有していた。次いで *cdtC*が15株(75%)、*cdtB*が14株(88%)、*flaA*が13株(81%)、*dnaJ*と *cdtA*が12株(75%)ずつ、*racR*が11株(69%)、*pldA*が10株(63%)、*CfrA*が9株(56%)、*wlaN*が1株(6%)であった。*virB11*と *ciaB*はいずれの株も保有していなかった。*C. jejuni*16株は10のProfile (I~X) に型別され、多くの多様性が認められた。これらのことから、PCRによる病原性の保有を特徴とした分子疫学的解析手法を確立できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

2009年の厚生労働省の食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>)によると、細菌性食中毒発生件数で *Campylobacter* は第1位(345件)であり食品衛生上重要な細菌である。*Campylobacter* は食鳥と体や市販鶏肉から高率に分離されており、その多くが *C. jejuni* であること¹⁾、*C. jejuni* は冷蔵庫内でも長期間生存すること、比較的少量の菌量の摂取でも食中毒を発症すること、そして食中毒のみならずその後ギランバレー症候群(末梢神経麻痺性疾患)を発症する事例もあること等から食品衛生上のみならず医学的にも注目されている。

Campylobacter は感染型食中毒菌であり、

多くの病原遺伝子の関与が報告されている。

吸着と増殖関連遺伝子としては *flaA*

(Nuijten et al:2000)、*CadF* (Ziprin et al:2001)、*racR* (Bras et al:1999)、*dnaJ* (Ziprin et al:2001)、侵襲性遺伝子としては *virB11* (Bacon et al:2000)、*ciaB*: (konkel et al:1999, Rivera-Amill et al:2001)、*pldA* (Ziprin et al:2001)、細胞毒素産生関連遺伝子としては *cdtA*、*cdtB*、*cdtD* (以上、Puedy et al:2000, Lara-Tejero & galan, 2001)、ギランバレー症候群に関連する遺伝子としては *wlaN*: (Linton et al, 2000)、エンテロバクチン第二鉄受容器に関連する遺伝子としては *CfrA* (Zeng et al:2009) 等が報告されている。

Campylobacter の分子疫学的解析はパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が用いられることが多いが、PFGE は時間や手間がかかり、その他の分子疫学的解析手法が望まれている。そこで、簡易的な分子疫学的手法を開発するための一助として、食品由来 *Campylobacter* について 12 種の病原遺伝子の保有の有無を確認した。

B. 研究方法

1. 供試検体

供試した 21 株の検体番号、No.、由来名、分離機関を表 1 に示した。鶏肉由来は 17 株で、牛肝臓由来は 4 株であった。

2. *Campylobacter* 属および菌種の検査法

菌からの DNA 遺伝子の抽出は InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) を用いた。*Campylobacter* 属・種の同定については表 2 に示したプライマーについて、図 1 の調整条件、図 2-1 の増幅温度条件で標的遺伝子を増幅した。

3. 病原遺伝子検索の検査法

菌からの DNA 遺伝子の抽出は InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) を用いた。12 種の病原遺伝子の検索については表 2 に示したプライマー、図 1 の調整条件、図 2-1~3 の増幅温度条件で標的遺伝子を増幅した。

C. 研究結果

1. *Campylobacter* 属および菌種

表 1 の供試検体について、*Campylobacter* 属および菌種の検査を実施したところ、表 4 の結果が得られた。*C. jejuni* と同定された株は 17 株 (菌株番号 1~14、15、16、17) であった。

2. 病原遺伝子保有状況

C. jejuni と同定された 17 株のうち菌株番号 10 を除く 16 株の 12 種の病原遺伝子 (*flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN*, *CfrA*) の保有の有

無が判明した (表 5)。

供試 16 株は I~X の 10 の Profile に型別された。最も多い菌株である 6 菌株が該当したものは Profile I で *flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *pldA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *CfrA* の 9 つの遺伝子を保有するものであった。次いで、2 株が該当した Profile II で Profile I に加え *wlaN* を保有し、計 10 の遺伝子を保有するものであった。Profile III~X は全て 1 株ずつであり、病原遺伝子の 8~1 つを保有していた。牛肝臓由来株である菌株番号 12 と 18 はそれぞれ、profile X と II に該当した。

供試した 16 株中 *cadF* は 16 株の全て (100%) が保有していた。次いで *cdtC* が 15 株 (75%)、*cdtB* が 14 株 (88%)、*flaA* が 13 株 (81%)、*dnaJ* と *cdtA* が 12 株 (75%) ずつ、*racR* が 11 株 (69%)、*pldA* が 10 株 (63%)、*CfrA* が 9 株 (56%)、*wlaN* が 1 株 (6%) であった。*virB11* と *ciaB* はいずれの株も保有していなかった。

D. 考察

C. jejuni による食中毒は発生件数、発生患者数が多く、食品衛生学上重要な感染型食中毒菌で、本菌の人への発症には様々な病原遺伝子の関与が報告されている。Datta ら (2003) は人由来 56 株、鳥由来 21 株、鶏肉由来 21 株、牛糞便由来 13 株、計 111 株の *C. jejuni* について 11 種の病原遺伝子を検索し、由来毎に病原遺伝子の保有率の偏りはないことを報告している。今回、鶏肉と牛肝臓由来株 16 株について 12 種の病原遺伝子の検索をしたところ Profile I~X に型別された。また、今回の病原体保有状況は Datta ら (2003) の報告と若干異なる傾向であったものの、保有病原遺伝子の多様性が示唆された。

Campylobacter の分子疫学的解析は PFGE が用いられることが多いが、PFGE は時間や手間がかかる。今回の調査によって食品由来 *Campylobacter* は保有病原遺伝子の多様性

が示されたことから、PCRによる病原性遺伝子の保有の有無を特徴とした分子疫学的解析手法を確立する可能性が示唆された。

E. 結論

鶏肉と牛肝臓由来株 *C. jejuni* 16株についてPCR法により12種の病原遺伝子の検索をしたところ10のProfile (I~X) に型別され、多くの多様性が認められた。これらのことから、PCRによる病原性の保有を特徴とした分子疫学的解析手法を確立する可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 供試検体

| 菌株番 | | 菌株情報等 | | | |
|-----|---------|------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 号 | 検体番号 | 由来名 | 分離機関 | カンピロバクター | |
| 1 | 19 | 若鶏むね挽肉(国産) | 岡山県備前保健所検査課 | <i>C. coli</i> | |
| 2 | 118 | 吉備高原若鶏きも | 岡山県備前保健所検査課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 3 | No.2 | 国産鶏ミンチ | 長崎県央振興局保健部(県央保健所)環境課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 4 | No.3 | 国産鶏ミンチ | 長崎県央振興局保健部(県央保健所)環境課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 5 | 230 | 鶏ミンチ肉 | 山形県庄内保健所検査室 | <i>C. jejuni</i> | |
| 6 | 231 | 鶏ミンチ肉 | 山形県庄内保健所検査室 | <i>C. jejuni</i> | |
| 7 | No.8-2 | 鶏ミンチ肉 | 山形県置賜保健所検査課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 8 | 301 | 若鶏ムネミンチ | 岡山県美作保健所(岡山県環境保健センター) | <i>C. jejuni</i> | |
| 9 | 302 | 若鶏モモミンチ | 岡山県美作保健所(岡山県環境保健センター) | <i>C. jejuni</i> | |
| 10 | 316 | 国産牛レバー焼肉用 | 岡山県美作保健所(岡山県環境保健センター) | <i>C. jejuni</i> | |
| 11 | 11-1 | 鶏ミンチ | 岡山県美作保健所(岡山県環境保健センター) | <i>C. jejuni</i> | |
| 12 | 12-1 | 牛レバー | 岡山県美作保健所(岡山県環境保健センター) | <i>C. jejuni</i> | |
| 13 | 4 | 国産若鶏むね挽肉 | 岩手県環境保健研究センター | <i>C. jejuni</i> | |
| 14 | 5 | 国産若鶏挽肉 | 岩手県環境保健研究センター | <i>C. jejuni</i> | |
| 15 | 6 | 若鶏挽肉 | 岩手県環境保健研究センター | <i>C. jejuni</i> | |
| 16 | 8 | むね挽肉 | 岩手県環境保健研究センター | <i>C. jejuni</i> | |
| 17 | CAM-821 | 牛レバー(加熱用) | 福岡市保健環境研究所保健科学課 | <i>C. coli</i> | |
| 18 | CAM-622 | 生牛レバー | 福岡市保健環境研究所保健科学課 | <i>C. jejuni/coli</i> | |
| 19 | CAM-523 | 鶏タタキ | 福岡市保健環境研究所保健科学課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 20 | 11 | 鶏ミンチ | 長崎県央振興局保健部(県央保健所)環境課 | <i>C. jejuni</i> | |
| 21 | 菌株 1 | 国産鶏 ミンチ | 長崎県央振興局保健部(県央保健所) | <i>C. jejuni</i> | |

表 2 菌種標的遺伝子プライマー

| 同定 | 標的 遺伝子 | Primer | DNA sequence(5'-3') | Product size(bp) | 文献 |
|---|------------------------|----------------|------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>Campylobacter</i> 属 | 16Sr RNA | CA12F | GGATGACACTTTTCGGAGC | 836 | Linton et al(1996) |
| | | C1228R | CATTGTAGCACGTGTGTC | | |
| <i>C. hyointestinalis</i> <i>s. subsp.</i> <i>Hyointestinalis</i> | 23S r RNA | HYO1F | ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG | 611 | Inglis & Kalischuk (2003) |
| | | HYOEFT23S R | GCTTCGCATAGCTAACAT | | |
| <i>C. coli</i> | <i>ask</i> | CC18F | GGTATGATTTCTACAAAGCGAG | 502 | Linton et al. (1997) |
| | | CC519R | ATAAAAGACTATCGTCGCGTG | | |
| <i>C. fetus</i> | <i>cstA</i> | MG3F | GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT | 359 | Hum et al. (1997) |
| | | CF359R | AGCCAGTAACGCATATTATAGT AG | | |
| <i>C. lari</i> | <i>glyA</i> | CLF | TAGAGAGATAGCAAAGAGA | 251 | Wang et al. (2002) |
| | | CLR | TACACATAATAATCCCACCC | | |
| <i>C. jejuni</i> | <i>cj</i> 0414 5 | C-1 | CAAATAAAGTTAGAGGTAGAAT GT | 161 | Wang et al. (1992) |
| | | C-3 | CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT | | |
| <i>C. upsaliensis</i> | <i>lpxA</i> | CU61F | CGATGATGTGCAAATTGAAGC | 86 | Yamazaki-Matsu ne et al(2007) |
| | | CU146R | TTCTAGCCCCTTGCTTGATG | | |

表 3 病原関連遺伝子のプライマー

| 標的遺伝子 | Primer | DNA sequence(5'-3') | Product size(bp) | 病原遺伝子 | 増幅温度条件 | 文献 |
|---------------|-----------|-----------------------------|------------------|--|--------|-----------------------|
| <i>fla A</i> | flaA664 | AATAAAAAATGCTGATAAAAACAGGTG | 855 | | 図 2-1 | Datta et al(2003) |
| | flaA1494 | TACCGAACCAATGCTGCTCTGATT | | | | |
| <i>cad F</i> | cadF-F2B | TTGAAGGTAATTTAGATATG | 400 | 吸着と増殖 に関連する | 図 2-3 | Konkel et al(1999) |
| | cadF-R1B | CTAATACCTAAAGTTGAAAC | | | | |
| <i>racR</i> | racR-25 | GATGATCCTGACTTTG | 584 | 遺伝子 | 図 2-3 | Datta et al(2003) |
| | racR-593 | TCTCCTATTTTTACCC | | | | |
| <i>dnaJ</i> | dnaJ-299 | AAGGCTTTGGCTCATC | 720 | | 図 2-3 | Datta et al(2003) |
| | dnaJ-1003 | CTTTTTGTTCATCGTT | | | | |
| <i>virB11</i> | virB-232 | TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT | 494 | | 図 2-1 | Datta et al(2003) |
| | virB-701 | CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC | | | | |
| <i>ciaB</i> | ciaB-403 | TTTTTATCAGTCCTTA | 986 | 侵襲性に関 連する遺伝 子 | 図 2-3 | Datta et al(2003) |
| | ciaB-1373 | TTTCGGTATCATTAGC | | | | |
| <i>pldA</i> | pldA-84 | AAGCTTATGCGTTTTT | 913 | | 図 2-3 | Datta et al(2003) |
| | Pld-981 | TATAAGGCTTTCTCCA | | | | |
| <i>cdtA</i> | DS-18 | CCTTGTGATGCAAGCAATC | 370 | | 図 2-2 | Hickey et al(2000) |
| | DS-15 | ACACTCCATTTGCTTTCTG | | | | |
| <i>cdtB</i> | cdtB-113 | CAGAAAAGCAAATGGAGTGTT | 620 | 細胞毒素産 生性関連遺 伝子 | 図 2-2 | Datta et al(2003) |
| | cdtB-713 | AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT | | | | |
| <i>cdtC</i> | cdtC-192 | CGATGAGTTAAAACAAAAGATA | 182 | | 図 2-2 | Datta et al(2003) |
| | cdtC-351 | TTGGCATTATAGAAAATACAGTT | | | | |
| <i>wlaN</i> | wlaN-DL39 | TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG | 672 | Guillan-Barre syndrome に 関連する遺 伝子 | 図 2-2 | Limton et al(2000) |
| | wlaN-DL41 | CCATTTGAATTGATATTTTTG | | | | |
| <i>CfrA</i> | CfrA-F | GAGATGTTGCAGAGGCTATCG | 527 | エンテロバクテ リ第二鉄受容 器遺伝子 | 図 2-1 | Zeng et al(2009) |
| | CfrA-R | TGCCTTTGTAGGACTTTGAGC | | | | |

表4 供試検体菌種の確認

| 菌株 番号 | 由来名 | 分離機関での同定結果 | 今回の同定結果 |
|----------|------------|-----------------------|------------------|
| 1 | 若鶏むね挽肉(国産) | <i>C. coli</i> | — 1) |
| 2 | 吉備高原若鶏きも | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| 3 | 国産鶏ミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 4 | 国産鶏ミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 5 | 鶏ミンチ肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 6 | 鶏ミンチ肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 7 | 鶏ミンチ肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 8 | 若鶏ムネミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 9 | 若鶏モモミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 10 | 国産牛レバー焼肉用 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 11 | 鶏ミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 12 | 牛レバー | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 13 | 国産若鶏むね挽肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 14 | 国産若鶏挽肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 15 | 若鶏挽肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 16 | むね挽肉 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 17 | 牛レバー(加熱用) | <i>C. coli</i> | <i>C. coli</i> |
| 18 | 生牛レバー | <i>C. jejuni/coli</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 19 | 鶏タタキ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| 20 | 鶏ミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| 21 | 国産鶏 ミンチ | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |

1) 標的遺伝子が増幅しなかったため、未同定

表5 供試16株の病原遺伝子保有状況とプロファイル

| 該当菌株番号 | 菌株数 | 病原遺伝子 | | | | | | | | | | | Profile | |
|---------------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|
| | | <i>flaA</i> | <i>cadF</i> | <i>racR</i> | <i>dnaJ</i> | <i>virB11</i> | <i>ciaB</i> | <i>pldA</i> | <i>cdtA</i> | <i>cdtB</i> | <i>cdtC</i> | <i>wlaN</i> | | <i>CfrA</i> |
| 3,6,14, 15,19,21 | 6 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | + | I |
| 7,18 ¹⁾ | 2 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | II |
| 5 | 1 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | III |
| 16 | 1 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + | IV |
| 4 | 1 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | + | V |
| 9 | 1 | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | VI |
| 13 | 1 | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - | - | VII |
| 8 | 1 | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | VIII |
| 11 | 1 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | IX |
| 12 ¹⁾ | 1 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X |
| | | 16 | 13(81%) | 16(100%) | 11(69%) | 12(75%) | 0(0%) | 0(0%) | 10(63%) | 12(75%) | 14(88%) | 15(94%) | 1(6%) | 9(56%) |

1) 菌株番号12と18は牛レバー由来

図1

| | | |
|------------------------|------|----|
| Green Master Mix、2X | 12.5 | μl |
| Primer INVA-1 (10pmol) | 1.0 | μl |
| Primer INVA-2 (10pmol) | 1.0 | μl |
| Nuclease-Free Water | 9.5 | μl |
| DNA Template | 1.0 | μl |
| Total | 25.0 | μl |

図2-1

| | | | |
|----------------------|-------|--------|-------------|
| Initial denaturation | 95 °C | 2 分間 | |
| Denaturation | 95 °C | 1 分間 | } 30 cycles |
| Annealing | 55 °C | 1 秒間 | |
| Extension | 72 °C | 1.5 分間 | |
| Cooling | 4 °C | 5 分間 | |

図2-2

| | | | |
|----------------------|-------|--------|-------------|
| Initial denaturation | 95 °C | 2 分間 | |
| Denaturation | 95 °C | 1 分間 | } 30 cycles |
| Annealing | 50 °C | 1 秒間 | |
| Extension | 72 °C | 1.5 分間 | |
| Cooling | 4 °C | 5 分間 | |

図2-3

| | | | |
|----------------------|-------|--------|-------------|
| Initial denaturation | 95 °C | 2 分間 | |
| Denaturation | 95 °C | 1 分間 | } 30 cycles |
| Annealing | 45 °C | 1 秒間 | |
| Extension | 72 °C | 1.5 分間 | |
| Cooling | 4 °C | 5 分間 | |

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)

細菌の分子疫学に関する基礎研究

分担研究報告書

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

要旨

本研究班では、多様化・広域化している食品流通に対して、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するため、公衆衛生上重要な有害微生物に関しての科学的知見を集約し、各関連機関の間で効率的かつ効果的な情報共有システムの構築を目指している。その中で、本分担研究においては、主としてヒトからの食中毒細菌を対象にライブラリーシステムの構築を図ることを目的とする。また、より効果的な分子疫学解析手法の開発・検討も本分担研究の目的の一つである。本年度は後者の目的に沿い、サルモネラの O 群型別に関する解析手法の検討を行った。

A. 研究目的

2009 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 6,700 名であった。このうち、23%にあたる 1,518 名がサルモネラによるものであった。サルモネラ食中毒は 1990 年代と比較して減少しているが、上記データはいまなお本菌が公衆衛生上の重要な位置を占めていることを示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別の検出頻度で第一位を占めている。

同じく *Salmonella* Typhimurium は、*S. Enteritidis* が台頭してくる以前は血清型別で最も多く検出されていた。*S. Typhimurium*

は現在でもなお、血清型別検出頻度の上位を占めている。

近年では *S. Infantis* が鶏肉から高率に分離され、またヒトからの分離頻度も血清型別の上位にランクしている。

サルモネラでは血清型の決定は、O 抗原と 2 種類 (相) の H 抗原の検出による。O 抗原は菌体表面のリポ多糖 (LPS)、H 抗原はべん毛である。H 抗原はタンパク質からなり、大きさ約 1.5kb の *fliC* および *fljB* 遺伝子にコードされている。一方、O 抗原は糖鎖であり、その主たる合成遺伝子群は染色体上の *gnd-yegH* 遺伝子の間、約 50kb 上にある。

H 抗原の遺伝子配列に関しては 280 のアレルの報告がなされるなど主要な型の配列については入手可能な状況にある。一方、O 抗原

合成に関する遺伝子群に関してはゲノム解読が行われた数株を除いて、その多くが解析されていない。

そこで本研究では、O 抗原合成遺伝子領域を簡便に区別する方法を考案、検討した。

B. 研究方法

ゲノム配列が有用な血清型 (Enteritidis, Paratyphi A, Typhi, Choleraesuis, Newport, Agona, Typhimurium 等) について、Genbank からゲノム配列を入手し、*gnd-yegH* 遺伝子間の配列を抽出した。得られたゲノム配列を Mauve ソフトウェアにて解析し、各血清型の合成遺伝子群の構造を比較した。

Mauve によって得られた比較情報から *gnd-galF* の約 20kb が血清型によって固有の構造をしていることが示唆されたので、*gnd* および *galF* 遺伝子を標的に共通プライマーを設計した。KOD FX Neo を用いて長鎖 PCR を行った。得られた増幅産物を精製した。

また上記ゲノム配列の比較から、上記増幅産物を切断した場合に 0.1kb~10kb 程度の断片を生じ、血清型毎に泳動パターンが異なることが期待された制限酵素を選定した。

上記増幅産物を選択した *AfeI*, *EcoRV*, *MfeI*, *MluI*, *SphI* で消化し 1%アガロースゲルで分離した。得られた泳動パターンを目視で比較すると共に、BioNumerics ソフトウェアに取り込み、クラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

図 1 に血清型 Enteritidis、Agona、Choleraesuis の O 抗原合成遺伝子領域を Mauve で比較した結果を示す。それぞれの O 群は O9、O4、O7 である。共通な遺伝子構造は色つきで示されており、この結果から各 O 群に固有の構造はおおよそ 20kb であることが示された。多様性を示す白抜きの領域をはさむ遺伝子は *gnd* および *galF* であり、当該遺伝子領域を O 群に関わりなく増幅可能なプライマーとして *gnd* および *galF* 遺伝子内にプライマーを設計した (図 1 矢印)。

設計したプライマーを用いて長鎖 PCR を試みた。最終的に KOD FX Neo を使用した際に最も増幅効率がよかった。得られた増幅産物を精製し、制限酵素 *AfeI*, *EcoRV*, *MfeI*, *MluI*, *SphI* でそれぞれ消化し電気泳動を行った。図 2 および図 3 にその例を示す。Enteritidis および Typhimurium に関してはそれぞれのゲノム株から予想された断片が観察された。Infantis については Choleraesuis から断片を予想したが、一部の制限酵素 (*MluI*) において予想と異なるバンドパターンを示したものの、他の制限酵素については予想通りのバンドパターンを示した。

上記 5 つの制限酵素によるバンドパターンを BioNumerics 上で組み合わせてクラスター解析を行ったところ、O 群によってグループが形成された。

D. 考察

長鎖 PCR 産物からの RFLP 解析を行うことで、比較的簡便に O 群別を実施する遺伝子解析システムを考案した。分離株を用いた場合でも

ゲノム株から予想された制限断片を得ることができた。また、同じO群でも血清型によって多少ばらつきが生じることがわかったので、その点については母数を増やして検討する必要があると考えられる。BioNumerics による解析では 10kb 以上のバンドの認識に問題があるものの、制限酵素をいくつか組み合わせることで、上記欠点を補えることが示唆された。

通常は血清を使用してO群を決定することが定法である。しかしながら、ラフ化していたり、あるいは市販血清で対応できないものもあるので、本研究のような遺伝子を用いたシステムを構築して選択肢を増やしておくべきである。今後、さらに多くのO群の株について本システムの有用性を検討していきたい。

E. 結論

長鎖PCR産物からのRFLP解析を行うことで、比較的簡便にO群別を実施する遺伝子解析システムを考案した。

F. 研究発表等

とくになし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

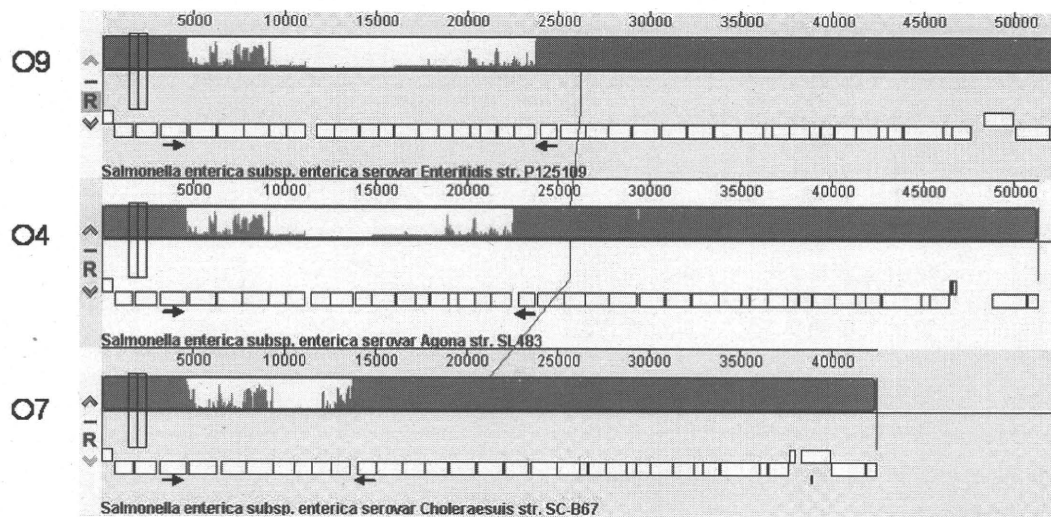


図1. Mauve による O 抗原合成遺伝子領域の比較 (例)。矢印は共通プライマーを表す。

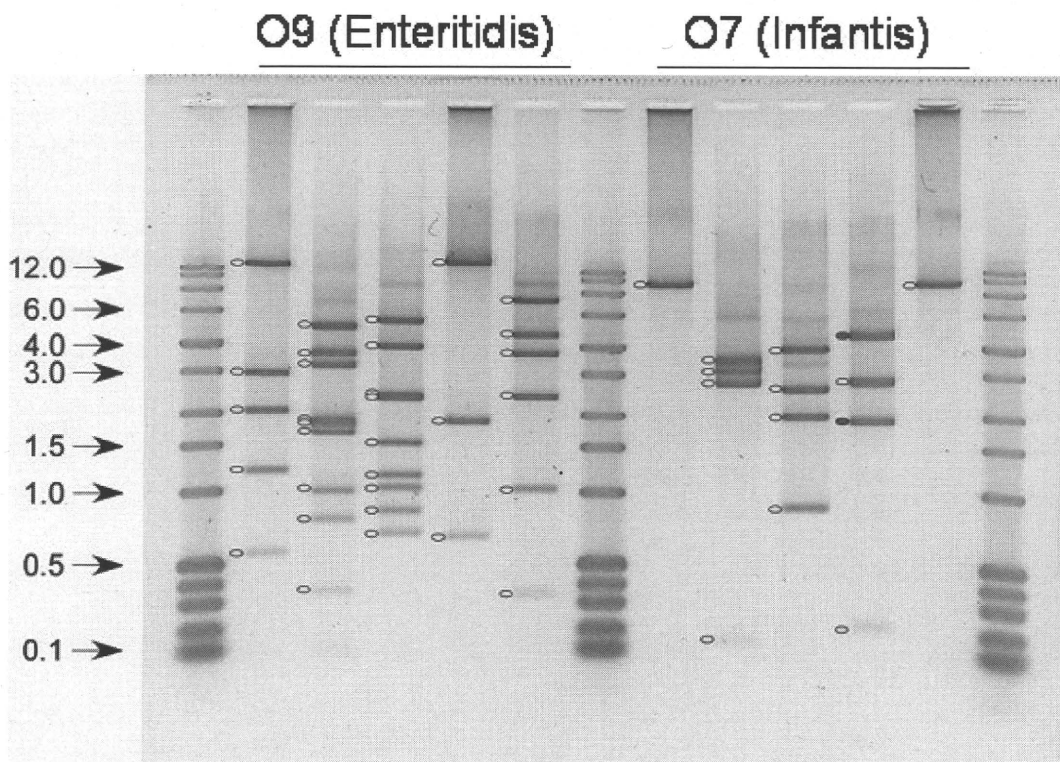


図2. Enteritidis (O9) および Infantis (O7) の長鎖 PCR-RFLP 泳動パターン。それぞれ左から *AfeI*, *EcoRV*, *MfeI*, *MluI*, *SphI* 消化による泳動パターンを表す。黄印を付したバンドはゲノム株から予想されたバンドと一致するもの、赤印を付したバンドは予想と異なるものを表す。左側の矢印はサイズマーカーの大きさ (kb) を示す。

O4 (Typhimurium)

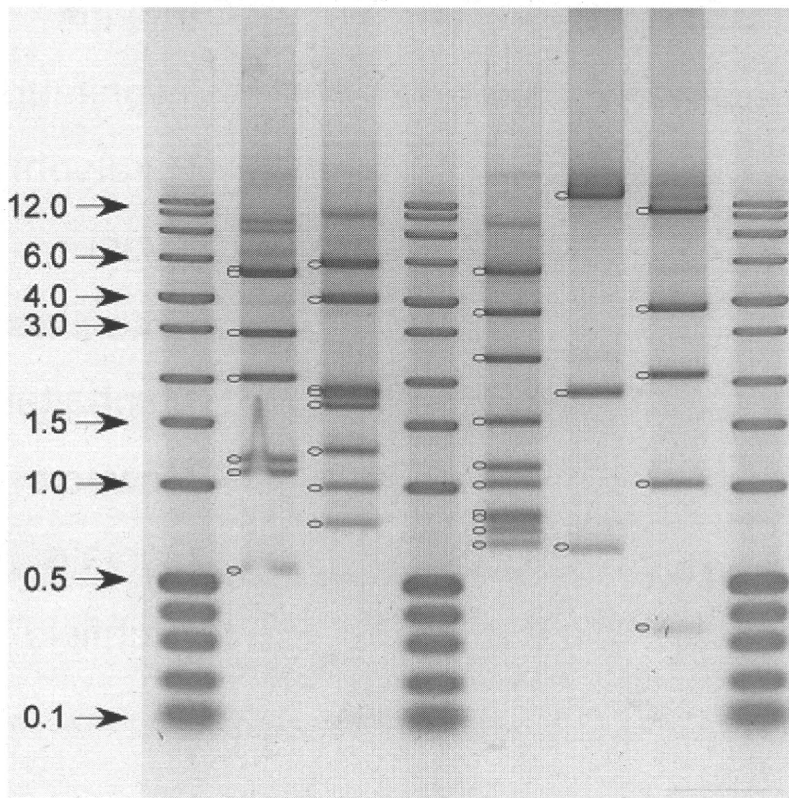


図3. Typhimurium(O4)の長鎖PCR-RFLP泳動パターン。それぞれ左から *AfeI*, *EcoRV*, *MfeI*, *MluI*, *SphI* 消化による泳動パターンを表す。黄印を付したバンドはゲノム株から予想されたバンドと一致するものを表す。左側の矢印はサイズマーカーの大きさ (kb) を示す。

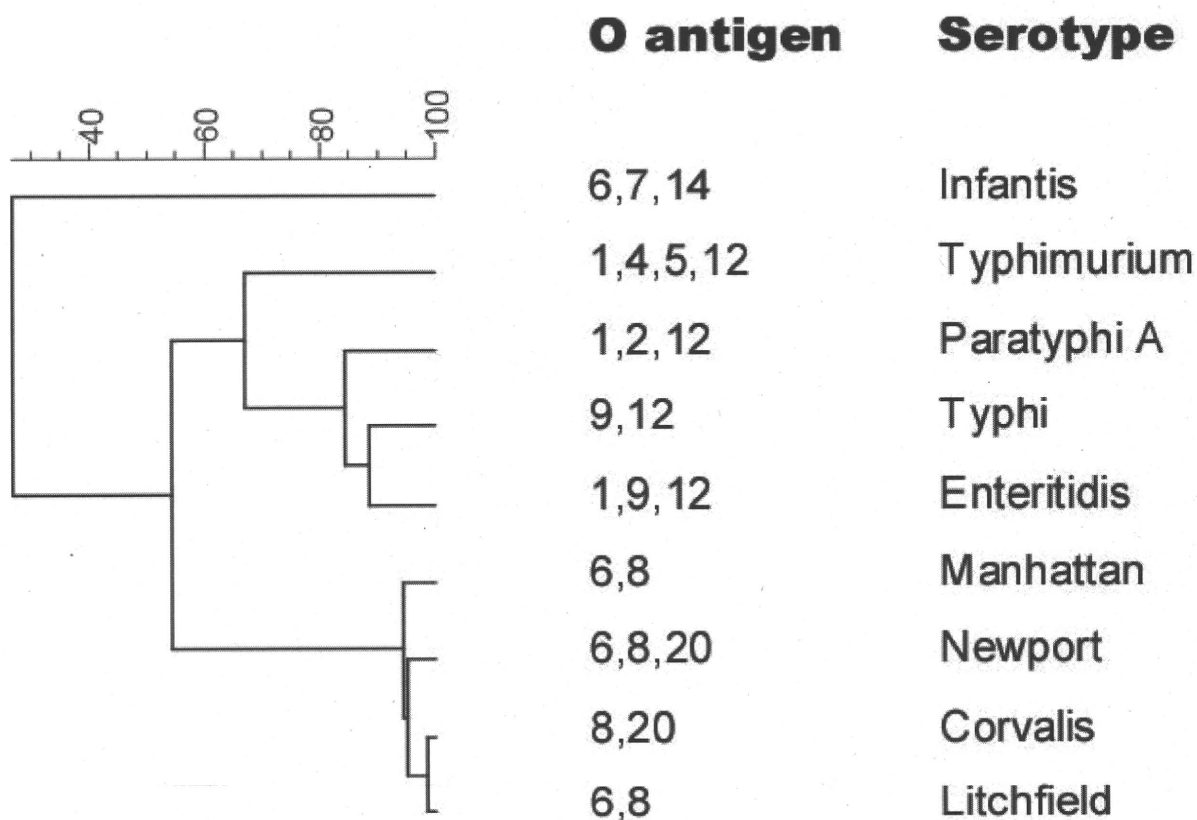


図4. 5種類の長鎖PCR-RFLPの泳動パターンから解析したクラスター。右に血清型、中央に対応するO抗原の構造式を表す。

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)

米国における食中毒細菌のタイピング法の現状
協力研究報告書

研究分担者 小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

要旨

米国における最新の食中毒細菌のタイピング法の情報を収集するために、平成 22 年 12 月 1 日から 12 月 14 日にかけて米国食品医薬品局の食品安全・応用栄養センター (CFSAN) の視察を行った。今回はマイクロアレイ、オプティカルマッピング、フェノタイプアレイの 3 手法を中心に情報収集を行った。CFSAN のマイクロアレイのチームでは *Escherichia coli*、*Salmonella*、*Shigella* に関するマイクロアレイの開発を行っていた。特に *E. coli* O157:H7 に関しては全ゲノムの約 1% に相当する 60 の遺伝子座 (約 60000 bp) の一塩基多型 (SNPs) を検出できるアレイ開発していた。また *E. coli*、*Shigella* 合わせて 140,524 の遺伝子のうち 23,092 の遺伝子発現を定量するアレイも開発しており、SNPs 情報と遺伝子発現パターンを組み合わせると菌株のタイピングを行っていた。オプティカルマッピングはガラススライド上に固定された細菌のゲノムを制限酵素で切断し、スキャナーで DNA 断片の長さを測定し、その情報をもとにコンピューター上でゲノム全長の制限酵素地図を作成する手法である。パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) は電気泳動によって DNA 断片を分離するため、分離できるのは 10 断片程度であるが、オプティカルマッピングではそのような制限がないため 700 以上の断片を分離でき、ゲノム上の欠失やフェージなどの挿入、遺伝子の逆位なども検出できるため、非常に高解像度の情報を得ることができた。フェノタイプアレイは窒素源、炭素源、浸透圧、イオン強度、pH など細菌の発育条件や薬剤感受性など約 2000 種の表現型を 1 度の培養で解析する手法である。フェノタイプアレイのチームでは、得られた表現型の違いをパターン化し、菌株のタイピングに利用していた。今回情報収集した手法はいずれもコスト的な問題から広く普及するには至っていないが、日本で主に行われている PFGE 法による菌株タイピングの問題点をほぼ克服できるため、今後の普及が期待される

A. 目的

食中毒が発生した場合、食中毒菌の感染ルートを特定するためには、患者から分離された菌株と食品から分離された菌株とが同一のものであるか調査する必要がある。この目的のために、これまでに様々な菌株のタイピング技術が開発されてきた。遺伝子解析技術が発達する以前では、血清型によるタイピングが広く行われてきた。しかし、血清型のように細菌が持つ多くの表現型のうち1つの形質に着目して分類を行う方法では分離能が不足しており、さらに精度の良い方法が求められてきた。また、血清が入手できない（作成されていない）細菌に関しては、タイピングを行えないため、血清型によるタイピングに代わる技術が必要であった。そういった状況の中でDNA シークエンスやPCR法などを中心とした遺伝子解析技術が急速に発達して来たため、遺伝子解析によるタイピング技術の開発が進められてきた。

遺伝子解析技術を応用したタイピング方法でも普及している手法の1つとしてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）が挙げられる。PFGE法は細菌のゲノムを制限酵素で切断し、DNA断片をPFGE電気泳動装置にかけて分離し、DNA断片の分離パターンを比較することによってタイピングを行う手法である。通常のアガロースゲル電気泳動では20 kbpのDNAを分離するのが限界であるが、PFGE電気泳動装置では2方向から電気パルスを一定時間毎に交互に流すことで巨大なDNA分子をゲル内で方向転換させ、アガロース分子の間をDNAが通過しやすくしている。この方法により通常のアガロースゲル電気泳動では分離できないような20 Mbp程度までのDNAの分離を可能とした。しかし、電気泳動と

いう原理的な制限からPFGE法には以下のような問題点が存在する。

- 大腸菌のゲノムをXbaIで切断すると50程度の断片に分かれるが、ゲル上で確認できるのは10程度である。
- 分離パターンの相違だけからゲノム上での程度の変異が生じているのか読み取るのが難しい。
- 各断片のゲノム上での位置を特定するのが難しい。
- 複数の研究機関が結果を共有・比較する場合には使用する機器、試薬、電気泳動条件を細かくそろえる必要がある。
- 長時間の電気泳動時間、解析時間を必要とする。

これらのうち最初に挙げた解像度の不足は特に問題で、複数の菌株の分離パターンを比較したときに、一見同じような分離パターンに見えても、DNA断片同士が重なっていて分離できていない場合や、ゲノム上の別々の場所に由来する断片がたまたま同じ移動度で分離されている場合があるため、PFGE法で得られた結果の信用性はそれほど高くないと思われる。また、複数の研究機関で結果の共有が非常に困難であることも、致命的な欠点となっている。このように我が国でも最も普及しているPFGE法の信用性、汎用性が非常に劣っていることから、これに代わる新しい手法の開発・導入が急務となっている。そこで、平成22年12月1日から12月14日にかけてアメリカ食品医薬品局（FDA）の食品安全・応用栄養センター（CFSAN）の視察を行い、食中毒細菌のタイピングに関する最新の情報を収集した。今回はマイクロアレイ、オプティカルマッピング、フェ