

- Microbiol. 78:3361-3368. 2012.
- Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. Int. J. Food Microbio. 157:95-101, 2012.
2. 学会発表
- 1) 長尾清香, 李 謙一, 小西良子, 工藤由起子, 志賀毒素産生性大腸菌が保有する病原因子と血清群との関連性の解析, 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 平成 24 年 10 月, 福岡
- H. 参考文献
1. Mainil JG, Daube G (2005) Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? J Appl Microbiol 98: 1332-1344.
 2. 喜多英二 (2004) 病態への志賀毒素の役割. 化学療法の領域 20: 67-73.
 3. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, et al. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 41: 4930-4940.
 4. Wang G, Clark CG, Rodgers FG (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J Clin Microbiol 40: 3613-3619.
 5. Schmidt H, Plaschke B, Franke S, Russmann H, Schwarzkopf A, et al. (1994) Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing eae genes. Med Microbiol Immunol 183: 23-31.
 6. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, et al. (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. J Infect Dis 188: 719-729.
 7. Toma C, Martinez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, et al. (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 42: 4937-4946.
 8. Bustamante AV, Sanso AM, Lucchesi PM, Parma AE (2011) Multiplex PCR assay for the detection of five putative virulence genes encoded in verotoxigenic *Escherichia coli* plasmids. Curr Microbiol 62: 1411-1415.
 9. Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, et al. (2001) Prevalence and characteristics of shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl Environ Microbiol 67: 484-489.
10. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 69: 6999-7009.
 11. Heck KL, Vanbelle G, Simberloff D (1975) Explicit calculation of rarefaction diversity measurement and determination of sufficient sample size. Ecology 56: 1459-1461.
 12. Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10: 564-567.
 13. Hard D, Clark A (1997) Population substructure. In: Hard D, Clark A, editors. Principles of population genetics. Sunderland, MA.: Sinauer Associates. pp. 111-162.
 14. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
 15. Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics 23: 1801-1806.
 16. 国立感染症研究所感染症情報センター (2012) 腸管出血性大腸菌感染症 2012年4月現在. 病原微生物検出情報 33: 115-116.
 17. Chart H, Perry NT (2004) The serological response to Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in patients with haemolytic uraemic syndrome. Lett Appl Microbiol 38: 351-354.
 18. Seto K, Taguchi M, Kobayashi K, Kozaki S (2007) Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. J Vet Med Sci 69: 1215-1222.

平成 22-24 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

分担研究報告書

「細菌の分子疫学に関する基礎研究」

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
研究協力者	林 賢一	滋賀県衛生科学センター

研究要旨：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する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。本研究では、サルモネラを対象に、O 群型別に関する手法の検討、標準法であるパルスフィールドゲル電気泳動法による多様な血清型に関するライブラリーの作成、病原因子パネルの検討および作成を行った。

A. 研究目的

2011 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 10,948 名（前年比 +26%）であった。このうち、28%にあたる 3,068 名（同+24%）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*、以下 SE）による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別での検出頻度で第一位を占めている。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血清型

としては Typhimurium、Infantis などがあり、とくに Infantis は鶏肉から高頻度に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては、その感染と食品の結びつきが大変強く、ヒトのライブラリーシステムを整備することで、食品由来のサルモネラとの照合を図りやすくすることが本研究の目的である。

本研究では、上記目的のための指標の検索、およびライブラリーの構築を目指す。

B. 研究方法

1) O 抗原決定遺伝子領域の解析：

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 *fliB* 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* 遺伝子間、約 50kb 上にある。

H 抗原の遺伝子配列に関しては 280 のアリ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。

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-gaIF* 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 *gaIF* 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。

2) PFGE 解析:

細菌において分離菌株の異同を比較解析するための標準法である PFGE を用いて様々な血清型のサルモネラ分離株を解析した。実施条件は、米国パルスネットの標準法に準じて行った。得られた泳動パターンを上記 BioNumerics によって解析した。
(<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>)

3) 病原因子パネルの検討

サルモネラには多くの病原因子あるいは病原因子と推測されている産物をコードする遺伝子が報告されている。Huehn ら (AEM, 2009, 75, 1011-1020.) は血清型 4:d:-株に着目し、Salmonella Pathogenicity Island 等の病原因子などを指標としたマイクロアレイを行い、菌株特異的な病原因子レパートリーの抽出を行った。本研究では、上記に挙げられた病原因子等および、Pathogenicity Island データベース (PAI) 等を参考に、指標となりうる 69 種類の遺伝子を選択し、それに対応する PCR プライマーを設計し、PCR による (病原) 因子パネルの作成を試みた。PCR は 1 反応あたり 2-3 遺伝子を検出するマルチプレックス PCR で行った。

C. 研究結果および考察

1) 0 抗原決定遺伝子領域の解析：

血清群 A から I に属す菌株 14 株および亜種 IV に属す 1 株を供試し、解析した。

図 1 に PCR-RFLP の泳動例を示す。07 については *Choleraesuis* をモデルとしたため、*MluI* については予想と異なるパターンを示したが、他の血清群については、ゲノム情報が入手可能なものに関して、予想通りのバンドパターンを示した。これらのパターンを Bionumerics 上で組み合わせてクラスター解析を行ったところ、0 群ごとのグループが形成された (図 2)。

2) PFGE 解析：

研究協力者より供された約 250 株のサルモネラ分離株について *XbaI* 消化による PFGE 解析を行った。得られたパターンをクラスター解析した結果を図 3 に示す。供試菌株の中では血清型 *Enteritidis*、*Infantis*、*Oranienburg* が多く、それぞれが血清型に特異的なクラスターを形成した。それ以外の血清型に関しても、ほぼ血清型ごとに互いに異なる特徴を示し、それぞれに小さなクラスターを多数形成した。サルモネラは *XbaI* 消化により 20 本強のバンドを生じるが、たとえば、*Enteritidis* のクラスターにおいては最も異なる場合で 8 本程度、*Infantis* では 13 本程度、*Oranienburg* では 5 本程度と、血清型ごとに多少の違いがみられた。*Infantis* では上記他の 2 血清型に比べて多様性が高いことが窺えた。

1) および 2) とともに、遺伝子解析に基づく 0 群型別、あるいは血清型別の可能性を示唆す

るものである。サルモネラは血清型を知ることが重要なステップであり、ラフ化するなど一般的な血清による凝集型別が実行不可能な場合もある。上記方法は、こうした点を補える利点を有している。PFGE はさらに、血清型内の多様性を知るうえで重要なライブラリーを提供しうる。

3) 病原因子パネルの検討

表 1 に今回標的とした遺伝子群を表す。*invA* など SPI に含まれる代表的な遺伝子のほか、SGI1 (*Salmonella Genomic Island-1*) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロフェージ、線毛などの遺伝子も含まれた。

およそ 30 血清型からなる 150 株について、上記方法により試験した。陽性・陰性を電気泳動で判定し、陽性を 1、陰性を 0 として Bionumerics ソフトウェアに取り込み、クラスター解析を行った。結果を図 4 に示す。

invA などの主要な SPI に含まれる遺伝子は全ての株に共通に保有されていた。亜種 IV に属す株では *sseC* などが欠けており、最も離れたグループを形成した。

Enteritidis、*Saintpaul* など複数株試験した血清型の大半は、血清型ごとにクラスターを形成したが、中には *Agona* のように、少し離れた位置にくるものもあった。これらの血清型についてはより多くの菌株を試験し、典型的なグループを見出していく必要があると考えられる。

Infantis も血清型特異的なクラスターを形成した。*Infantis* のクラスターには、*irp2* 遺伝子の有無によって分けられる 2 つのグループの存在が示唆された (図 5)。*Irp2* (*iron*

regulated protein) は、エルシニアで Yersiniabactin というシデロフォアを合成する遺伝子群に含まれていたものであり、鉄獲得に関連している。

D. 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。本法は広範な血清群に対しても有効であることが示唆された。

標準的な分子疫学解析手法である PFGE によるライブラリーの作成を行った。ライブラリーからクラスター解析を行ったところ、血清型ごとにクラスターを形成し、本法によっても血清型の推定に寄与しうることが示唆された。また、血清型内でも多少の差はあるが、パターンの多様性が観察され、場合によっては、今後の食品株との比較にも寄与しうることが示唆された。

病原因子パネルの検討を行い、いくつかの血清型については特異的クラスターを形成することが示唆された。また、Infantis には 2 つのグループが存在することが示唆された。今後、さらにライブラリーを拡充することで、新たな指標が得られることが期待される。

サルモネラにおける菌株解析では、血清型を決定することが重要なステップである。抗血清による凝集試験が定法であるが、これをサポートする遺伝学的な解析法も重要である。本研究で検討された手法はいずれも、血清型の推定、ならびに血清型内の型別において有用であり、今後も検討を続け、より有用性の高い手法の開発につながることを期待される。

E. 研究発表等

H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe, A. Kai, T. Kurazono, M. Taguchi, T. Asai, M. Akiba, Y. Matsumoto, and Y. Tamura: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg. Infect. Dis.* (in press)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

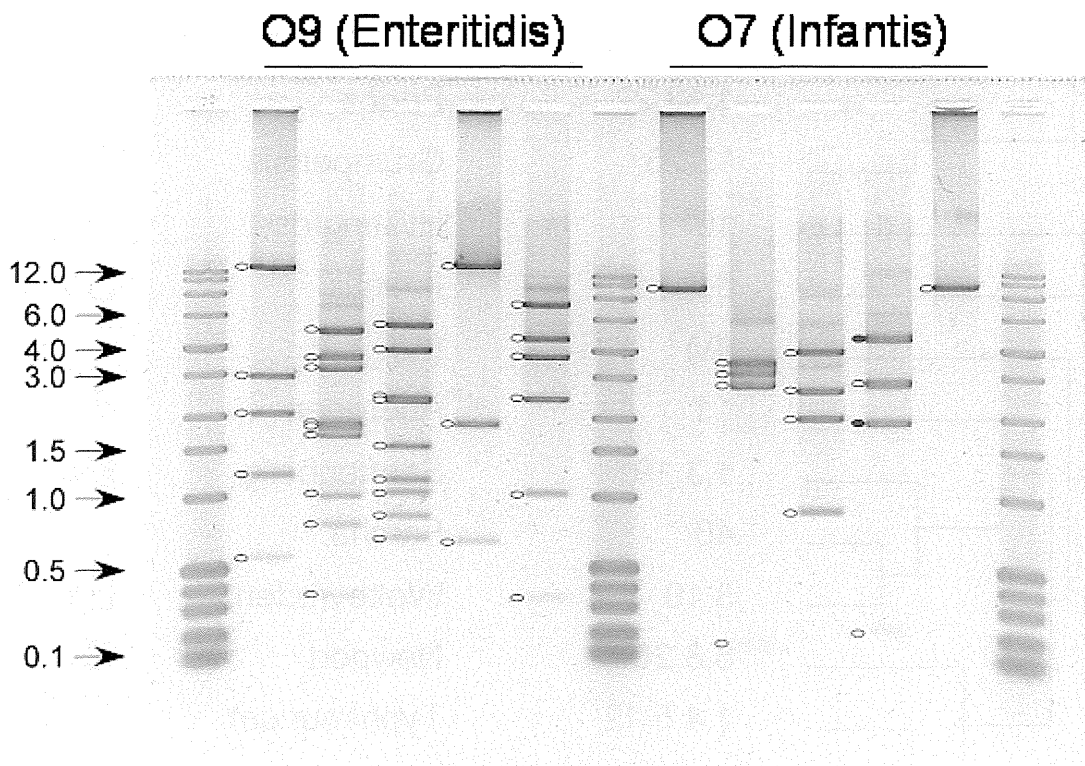


図1. Enteritidis (09) および Infantis (07) の長鎖PCR-RFLP泳動パターン。それぞれ左から *AfeI*, *EcoRV*, *MfeI*, *MluI*, *SphI* 消化による泳動パターンを表す。黄印を付したバンドはゲノム株から予想されたバンドと一致するもの、赤印を付したバンドは予想と異なるものを表す。左側の矢印はサイズマーカーの大きさ (kb) を示す。07の予想は、*Choleraesuis* による。

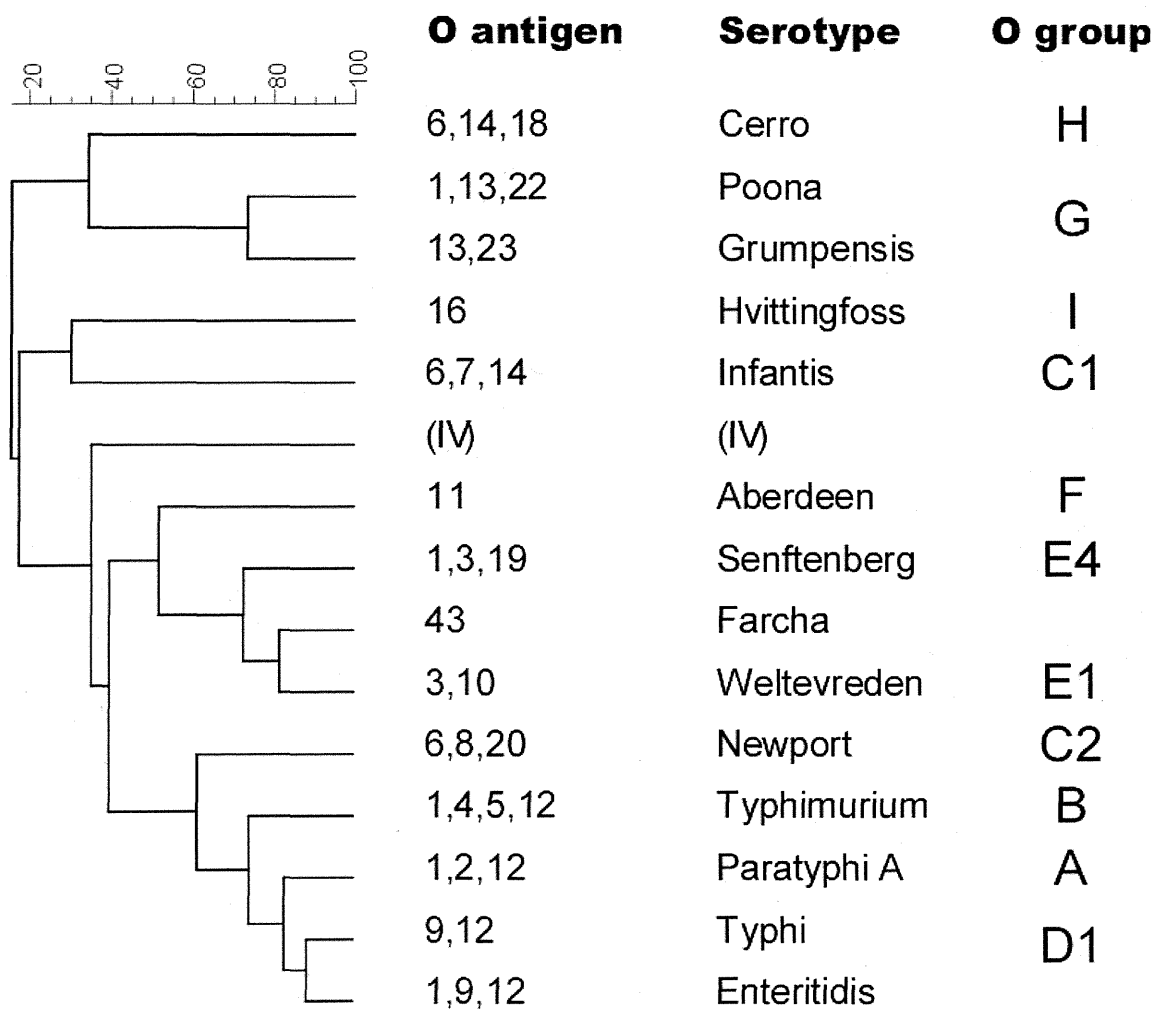


図2. 5種類の長鎖PCR-RFLPの泳動パターンからのクラスター解析。右にO抗原の構造式、血清型、そしてO群の略記を表す。

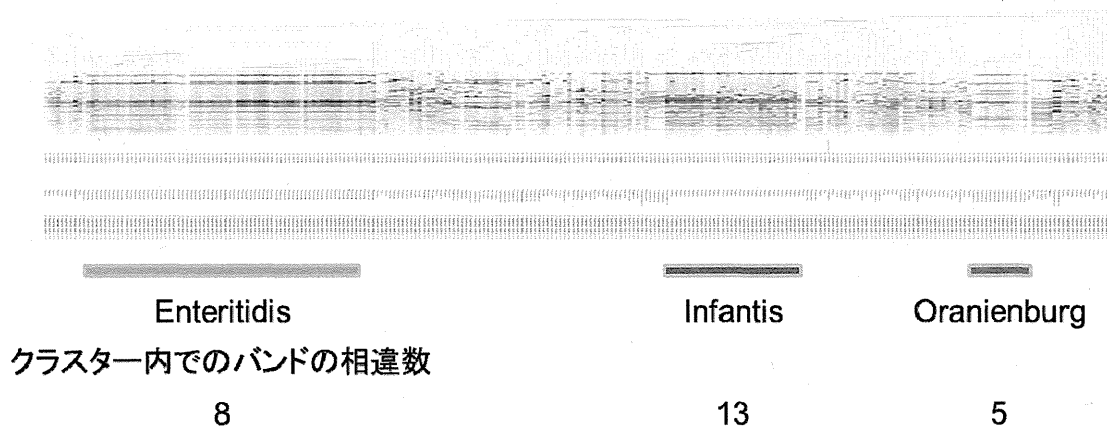


図3. *Xba*I消化PFGEパターンによるクラスター解析。下に主要な血清型のクラスターの位置、並びにクラスター内でのバンドの相違数（最も高い場合）を示す。

mp01	mp02	mp03	mp04	mp05	mp06	mp07	mp08	mp09	mp10	mp11	mp12	mp13	mp14	mp15	mp16
sefC	hlyE	sopB	prpZ	irp2	stfE	SGI1	stdB	viaB	gtrC	sodC1	siif(spi4_R)gipA	fimA	sopE1	stjB	
ruhM	staA	sugR	pefA	gp36	uidA	safA	msgA	sfaS	bim2	rrtT	ST64b	pefB	gtrA16	xylE	artA
pagJ	STY3280gtrA17	gtrB	allR												
mp17	mp18	mp19	mp20	mp21	mp22	mp23	mp24	mp25	mp26	mp27	mp28	mp29	mp30	mp31	mp32
sopE2	stgA	steB	stcC	bcfC	stiC	safC	lpfD	STY3343invAh	allB	prot6E	gogB	stkC	SPI15	mgtC	
narP	invA	Fels-2	cdtB	K88	spiC	pltA	gpiA	spvB	STM2697sefA	tcfA	sseC	agfA	csgA	STM4595	

表 1. 試験に使用した、病原性に関連する遺伝子および病原性に関連が疑われる遺伝子。設計したマルチプレックス PCR (mp 番号) ごとに分かれている。invAh は invA と同じ遺伝子でプライマーが異なる。

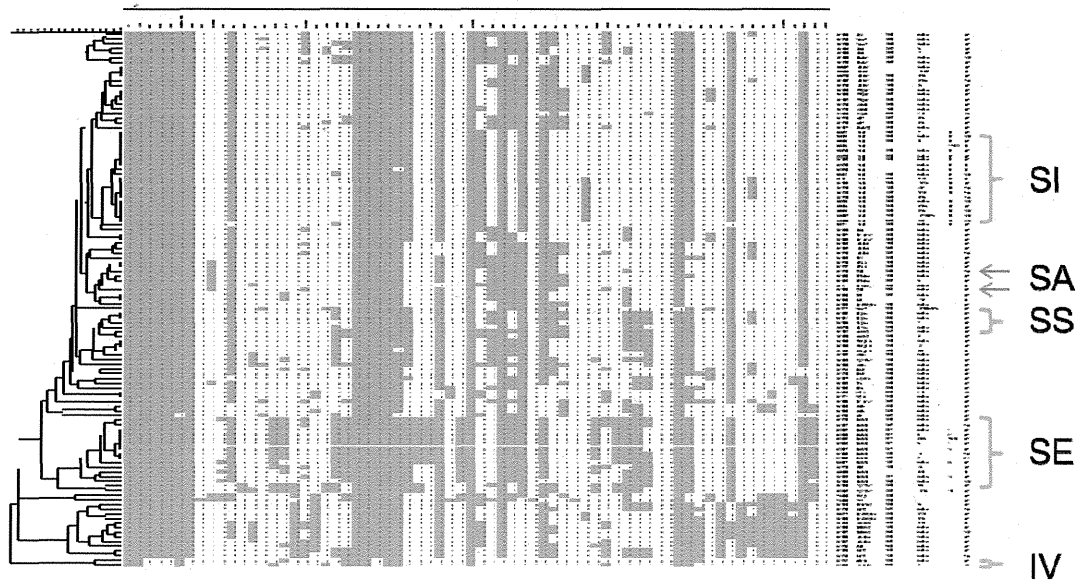


図 4. 因子パネルの結果に基づくクラスター解析。

SI、Infantis。SA、Agona。SS、Saintpaul。SE、Enteritidis。IV、亜種 IV を表す。

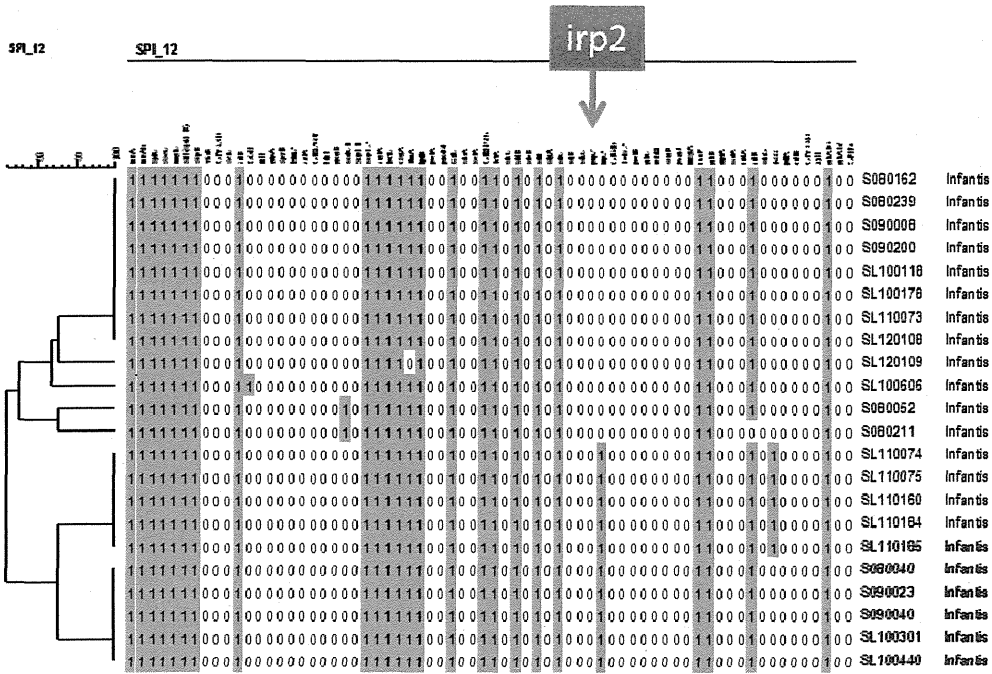


図5. 因子パネルの結果に基づくクラスター解析。

Infantis の結果のみを表す。Irp2, iron regulated protein 2.

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

国内動物由来カンピロバクター・ジェジュニの
ヒト食中毒への関連性に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	川本 恵子	帯広畜産大学	動物・食品衛生研究センター
	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析センター
	関塚 剛	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析センター

研究要旨

2005-2006年の間に国内のニワトリ及びウシより分離された *Campylobacter jejuni* 計 112 株について、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法による遺伝子型別を行い、国内ヒト臨床分離株 100 株との比較を通じて、ヒト食中毒との関連性について検討をおこなった。ヒト臨床分離株と同様、動物分離株でも ST-21 clonal complex (CC) が最も多数を占めたが、ST-353CC, 354CC, ST-445CC はニワトリ・ヒト由来株でのみ認められ、これらの多くがニワトリに由来して（鶏肉を介して）ヒト食中毒を引き起こしていると目された。また、ST-51 は国内のウシに高い宿主適応性を示す一方で、ヒト食中毒との関連性は低いことが明らかとなった。ST-21CC の中で、ST-4526 は国内のヒト臨床及びニワトリ由来株で多数認められたが、海外での分離報告はなかった。進化系統解析により ST-4526 は日本で独自に進化を遂げた可能性が示唆され、更に比較ゲノム解析と表現形質解析を通じて ST-4526 菌株は外来 DNA の取り込みに重要な役割を担う 2 型分泌装置の機能性を喪失していることが明らかとなった。これらの成績は、本遺伝子型がゲノム構造の安定的保持を基盤としてヒト・ニワトリ宿主に流行を遂げたことを示している。以上より、国内ヒト食中毒に関連性を示す *C. jejuni* は遺伝形質に一定の宿主特異性を示すことが明らかとなり、その中でも由来の明確な一群を見出すことができた。本手法はカンピロバクター食中毒事例における原因究明の一助として有効であり、更に流行を示す菌株の特定とその流行原因の解明に資する情報源ともなることを、ST-4526 型を一例として捉えることで実証できた。

A. 研究目的

Campylobacter 属菌は微好気性・グラム陰性のらせん状菌であり、ヒトの下痢原性病原細菌として現在では広く知られている。本属菌は 1982 年に食中毒細菌に指定された比較的新しい腸管系病原菌であり、これまでに 18 菌科種 6 亜種 3 生物型に分類されている。このうち、ヒトの下痢症と最も関連性が高いのは *C. jejuni* 及び *C. coli* である。

厚生労働省・食中毒統計によると、*C. jejuni*・*C. coli* による食中毒は、近年わが国で発生する細菌性食中毒の中で最も発生件数が多く、その約 9 割は、*C. jejuni*、残りの 1 割は *C. coli* により発生している。また、散発事例の割合が高いのも、本菌による食中毒の特徴の 1 つであり、感染患者では 2-5 日とやや長い潜伏期間を経た後、下痢、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、倦怠感等の臨床症状を呈する。

細菌性食中毒が発生した場合、患者及び原因推定食品より原因菌を捕捉することが、原因食品を特定する為の前提条件となる。しかしながら、本菌は大気中で生存できない、乾燥に弱い等の細菌学的形質を有しており、食中毒が疑われた時点で既に凍結等の処理を経た食材では、生存性を喪失しやすいと考えられている。2006-2009年の厚生労働省・食中毒統計によると、原因食品が特定された *C. jejuni* 食中毒事例は、僅か12%に留まっている。

昨年度の分担研究においては、国内ヒト臨床由来 *C. jejuni* 計 100 株を収集し、Multilocus Sequence Typing (MLST) 法による遺伝学的特徴付けを行うことで、(i) わが国の発生動向を海外情勢と比較すると共に、(ii) 国内における *Campylobacter jejuni* 食中毒の発生要因（原因食品）の推定を試みた。この手法の適用により、一定の原因推定が可能となり、食中毒発生に伴い困難となる原因究明に際しての一助として有効なツールとなりうる可能性が示唆された。しかしながら、そこで得られた推定結果は、主に海外情報に基づくものであり、国内における主要感染源と目される動物由来株の MLST 解析情報の収集が国内状況の把握と推定結果の有効性に関する知見を得るために必要と考えられた。

こうした背景をもとに、本研究では特にヒト食中毒との関連性が高いと推定された、ニワトリ及びウシ由来株計 112 株を収集し、その遺伝学的特徴を MLST 法により解析することとした。国内ヒト臨床分離株との相互比較を通じ、我が国における、これら家畜・家禽のヒト・カンピロバクター食中毒への関連性について検討し、国内に蔓延するカンピロバクターの遺伝学的特徴を明らかにすると共に、同手法の原因究明にあたっての有効性について考察を行ったので報告する。

更に、海外では報告事例がないが、国内のヒトおよびニワトリ分離株中で多数認められた

ST-4526 型株については、その流行性を鑑み、その原因を知るべく、より詳細な検討をすべき対象として選択した。進化系統解析を通じて、日本を含むアジア地域に広く進化・定着を遂げた遺伝子型であり、その流行原因が外来遺伝子の取り込みに関わる二型分泌装置が破綻をきたしたためであることをゲノム解読・表現形質解析により明らかにしたので併せて報告する。

B. 研究方法

1. 菌株及び培地

2005-2006 年の間に国内のニワトリおよびウシより分離された *C. jejuni*、各 61 株および 51 株を供試菌株とした。培養には Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA) (BD Bioscience) 又は Mueller-Hinton broth (MHB) (BD Bioscience) を用い、微好気条件下で実施した。

2. DNA 抽出および PCR

MHA 上で一夜培養した供試菌株より、DNA easy Tissue kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。MLST 解析対象となる 7 遺伝子 (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glnA*, *pgm*, *tkk*, *uncA*) を表 1 に示すプライマーを用いて PCR 反応により増幅させた。増幅断片は脱塩・精製後、BigDye Terminator Ver.3.1 を用いた Cycle sequencing により、塩基配列を決定した。

3. MLST 解析

上記により得られた計 1,568 のアレル配列サンプルについて、定法に従いアセンブルした。各遺伝子配列のアレル型は PubMLST homepage (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) に登録された配列情報を参照することで、各菌株としての ST (Sequence Type) ・ CC (Clonal Complex) を決定した。同データベースに未登録の配列については、新規に登録を行った。

4. 分離株の由来推定法

PubMLST Isolate database (http://pubmlst.org/perl/bigsgdb/bigsgdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_isolates) において、ST 型ごとに分離由来履歴を

収集し、ニワトリ、ウシおよびその他（ブタ・綿山羊・環境等）に分類してそれぞれの割合を集計した。これを各供試菌株にプロットすることで、由来宿主の推定確率を求めた（表 1）。

5. 統計・系統解析

供試株母集団の Complexity を検証するため、LIAN 3.5 を用いてアレル分布を、START ver. 2.2 を用いて dN/dS 比を算出した。Cluster 分類には最尤法を用いた。遺伝子型毎の系統樹作成にあたっては ClonalFrame を用いた。また、ST-21CC 内における有根進化系統樹は、Concatenate 配列を基に、Minimum evolution tree 法により作成した。

6. ゲノム解析

Illumina Genome Analyzer II を用いて、ST-4526 型を示す代表株 3 株 (H_0002, H_0089, P_0053) のゲノム配列を解読した。抽出 ORF 配列を並列化し、NCTC11168 株 (ST-43) を参照配列とする SNP (Single Nucleotide polymorphism) 解析を行うことで、NCTC11168 株とは異なるが ST-4526 株間で共通性を示す塩基を抽出し、本遺伝子型に特徴的な ORF を特定した。

7. DNA 取り込み試験

各供試菌株を PBS で洗浄後、Nick translation kit (Roche) で標識した pRY109 DNA と 30 分間共培養し、PBS で洗浄後、菌体中に含まれる標識物を測定した。計 3 回の独立した試験結果を基に、平均値 \pm 標準誤差を算出し、NCTC11168 の数値を 1.0 とした場合の相対値により、菌株間の DNA 取り込み能を評価した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト臨床情報を包含しておらず、またゲノム情報は分離微生物に関するもののみであるため、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

1. MLST データの系統解析と食中毒関連性

本研究では、ニワトリ由来 61 株、ウシ由来 51 株の *C. jejuni* を研究対象とした。MLST 解析により、これらはヒト臨床分離株を併せて計 62 の Sequence Type (ST 型) と 19 の Clonal Complex (CC) に分類された (表 1)。全供試菌株を母集団とした場合の各遺伝子のアレル数は $n=11-23$ であり、アレル内の塩基変異率は、*uncA* で最も高く (14.9%)、*gtA* で最も低い値 (3.0%) を示した (表 2)。 dN/dS 比は、0.0106-0.065 であった (表 2)。これらの数値はアメリカにおけるデータとほぼ一致しており (データ未載)、国内情報を勘案するにあたって、一定の有効性を指し示すデータと考えられた。

ニワトリ由来 62 株は 28 の ST 型を含む 10 の CC (Clonal Complex) に分類された (うち、8 種の ST 型 (ST-4615~ST-4618, ST-4620~ST-4623) については新規遺伝子型としてデータベース上へ登録を行った) (表 1)。一方、ウシ由来株計 51 株は、11 の ST 型を含む 8 の CC に分類された (表 1)。ヒト臨床分離株を含めて、各種由来株の CC 構成を見たところ、いずれの由来株も ST-21CC の割合が高い傾向を示し、ヒト由来株では 27.0%、ニワトリ由来株では 16.4%、ウシ由来株では 27.5% を占めていた (図 1、表 1)。

アレル情報を基に最尤法による系統解析を行ったところ、ヒト・動物由来株計 212 株より検出された、計 62 の ST 型は計 5 群 (Cluster 1-5) に大別された (図 2)。更に、個別塩基配列を用いた ClonalFrame 解析の併用により、Cluster I および II は更に subtype A, B に分類された (図 3)。

Cluster I-a には、ST-21CC を示すヒト・ニワトリ・ウシ由来株計 51 株が含まれた。このうち、ヒト由来株では ST-50 (9 株)、ST-4526 (7 株)、ST-21 (4 株) が多数を占めたのに対し、ニワトリ由来株では ST-4621 (4 株)、ST-4526 (3 株)、ST-50 (3 株)、ウシ由来株では ST-806 (8 株)、

ST-21 (4 株)、ST-50 (2 株) であった (表 1)。

Cluster I-b には、ヒトおよびニワトリ由来株のみが含まれた。ST-443CC に属する ST-440 はヒト・ニワトリ由来株内に共通に認められた。ST-4615 はニワトリにのみ認められた新規 ST 型であった。

Cluster II-a には、ヒト (12 株)・ニワトリ (5 株)・ウシ (9 株) 各由来株が認められた。これらの多くは、ST-460CC および ST-257CC に属しており、新規 ST 型は含まれなかった。

Cluster II-b には、ヒト (13 株) およびニワトリ由来株 (13 株) のみが含まれた。同 Cluster 内には、ST-353CC および ST-354CC を中心として計 12ST 型が含まれた。

Cluster III には、ヒト (23 株)・ニワトリ (9 株) およびウシ (9 株) 由来株が含まれた。これらは ST-48CC および ST-22CC を中心とした計 9ST 型からなっていた。

Cluster IV には、ST-2276 および ST-4612 のみが独立して分類された。これらはいずれもヒト分離株においてのみ認められた。

Cluster V は、ST-42CC および ST-45CC を含む計 10 の ST 型からなっており、ヒト (15 株)・ニワトリ (11 株) およびウシ (12 株) 由来株が含まれた。

このほか、ウシ由来計 8 株で認められた ST-58 は独立した分岐を示した。本 ST 型はヒト臨床分離株では認められず、データベース照合により、国際的にもヒトからの分離歴がないことが明らかとなった。

2. 動物由来株の宿主特異性

2010 年度末迄に日本国内のニワトリ由来およびウシ由来株として *C.jejuni* MLST データベース上に登録されたものは、ニワトリ由来が 10 株あったが、ウシ由来株の登録は皆無であった。本研究において解析を行った菌株についての情報はしたがって国内の動物宿主における *C.*

jejuni の群集構造を明らかにする上で初めての試みといえる。

ニワトリ分離株を構成する ST 型について個別にその分離履歴を *C.jejuni* MLST データベースを参照したところ、概してニワトリ分離履歴が高い割合を示した (表 1)。ST-4600 については、その他由来として分離履歴には記載を行ったが、これは本遺伝子型の分離が過去に 1 株のみであることに因るものであり、宿主特異性をはかるには母集団の少なさから至っていない。

ウシ分離株を構成する ST 型については、全体としてはウシ宿主に特異性が高い傾向を示したが、ST-50 や ST-257 等はニワトリに対してより高い特異性を示す傾向が認められた (表 1)。これらの結果は、ニワトリ宿主に由来する菌株の一部は広く環境に拡散・分布するため、その過程でウシ等の他宿主体内に侵入・通過しうることを示唆している。

このように、国内のニワトリ・ウシ由来株は概して分離宿主に特異性を示す傾向を示すことが明らかとなり、MLST 法による原因食品推定への有効性が示された。

3. ST-4526 の進化系統解析

ST-21CC に属する ST-4526 はヒト臨床分離株 7 株とニワトリ由来 3 株から検出された (表 3)。PubMLST データベース上での分離履歴を検索したところ、同じく日本のニワトリから分離されていた一方で、海外からの報告は皆無であった。個別の疫学情報を整理したところ、分離地域・分離年月は偏っていなかったが、LIOR の血清型は多くが LIO4 を示すなど、菌株の均一性が示唆された (表 4)。このように、日本国内における固有・均一性と多数の検出数を示したことから、我々は本遺伝子型がどのように我が国に侵入し、流行を示すようになったか疑問を抱いた。

ST-21CC として、日本、韓国、中国の 3 カ国より PubMLST データベースへ登録された ST 型

について検索したところ、19 の ST 型が登録されていることが判明した。これらを、ST-21 を起源として有根進化系統樹を作成したところ、ST-4526 はその他の複数の ST 型と共に一つの Cluster を形成した (図 4A)。それらの多くは、上記 3 カ国でのみ報告のある遺伝子型であった (図 4A) ことから、これらが東アジア地域で進化を遂げた可能性が示唆された。また、それらの多くはニワトリから検出される遺伝子型であったことから考えて、ニワトリ宿主が本菌の遺伝的進化の場として機能している可能性が示唆された。

4. ST-4526 は DNA 取り込み能を喪失した形質を有する。

NCTC11168 株 (標準株) のゲノムを参照配列として、ヒトおよびニワトリ由来 ST-4526 株、計 3 株 (H_0002, H_0089, P_0053) のゲノム配列を比較した。その結果、他株に比べて、ST-4526 型 3 株間のゲノム相同性は極めて高いことが明らかとなった (データ未載)。また、SNP 解析を通じて、本遺伝子型を示す 3 株はいずれも 2 型分泌装置関連遺伝子に変異を生じていることが示された (表 5)。実際に、同装置の主機能である DNA 取り込み能について検討したところ、他の ST 型株に比べて、ST-4526 型株は著しい減少を示した (図 4B)。以上の結果より、ST-4526 型は遺伝子変異に関わる DNA 取り込み機能を喪失したため、極めて Clonal な流行を示したと考えられた。

D. 考察

国内で発生するカンピロバクター食中毒では、「生、或いは加熱不足状態の肉の喫食」或いは「器具や手指を介した二次汚染」が、原因食品からの病原体伝播を助長する主な環境要因と考えられており、その衛生管理手法による制御には、加熱殺菌が最も有効な方法であることはい

うまでもない。

高汚染率を根拠として、鶏肉はわが国において多発するカンピロバクター食中毒の最も重要な原因食品と目されてきた。しかしながら、食中毒事例との直接的関連性を示す科学的データは限定的であったため、昨年度は国内で発生する本食中毒において鶏肉が原因として占める割合を国内ヒト臨床分離株に関する遺伝情報を解析することで推定する試みを行った。しかしながら、その推定根拠として用いた各種動物由来菌株の遺伝情報は国内情報の不足により海外情報を参照せざるを得ない状況であったため、その推定値が国内の食中毒に直接的に適用できるかについては疑問が残った。

こうした背景を受けて、本研究では国内のウシおよびニワトリ由来株計 112 株を対象としてその遺伝情報の収集につとめ、ヒト臨床分離株との比較を通じて、各動物由来株の食中毒との関連性を検討し、MLST による原因推定手法が一定の有効性を示すことを実証した。

分離由来に関わらず、最も多数を占めた CC は、ST-21CC であった。このほか、ニワトリ由来株では、ST-45CC、ST-574CC、および ST-607CC が、ウシ由来株では、ST-42CC や ST-61CC が高い割合を示した。英国における全国調査によると、ウシより分離される *C. jejuni* の中で、ST-21CC と共に ST-61CC および ST-42CC が高い割合を示すことが報告されており、本研究におけるウシ由来株の CC 構成に関する知見は、国に因らず、ウシ宿主に適応する遺伝子型の存在を示唆している。

ST 型別毎の分布を比較すると、ニワトリ由来株で多数を占めた ST-21CC では ST-4621 および ST-4526、ST-45CC では ST-3727、ST-574CC では ST-305 が中でも優勢であった。特に ST-4526 については、ヒト由来株でも 100 株中 7 株と高い割合で認められた一方、海外での報告がなかったことから、その流行性に注目して検討を行うこととした (後述)。ウシ由来株についてみると、

ST-42CC の中では ST-42、ST-21CC では ST-806 および ST-21CC、ST-61CC では ST-61、および何れの CC にも属さない ST-58 が優勢であった。ST-21 や ST-806、ST-61 はヒトからも多数検出される遺伝子型であり、特に ST-61 はヒト以外ではウシ・ヒツジ等反芻獣に分離が限定されることから、本遺伝子型はウシに由来するヒト食中毒の原因菌であると考えられた。一方、ST-58 はデータベース情報を含め、ヒトからの分離歴がなく、ウシからのみ検出された状況を鑑み、ウシ宿主への高い適応性を示すが、ヒト食中毒との関連性が低い遺伝子型として位置付けられた。

このように宿主特異性を示す遺伝子型の特定を通じて、ヒトの食中毒に関わる *C.jejuni* 群集を推定し得たことは、国内食中毒事例における原因究明の一助として、本手法が一定の有効性を示すことを実証している。今後は、宿主特異性を規定する遺伝子或いは機能性因子の同定をはかることで、ヒト食中毒への関連性を明確にし、以て食中毒関連群集（注視すべき病原体集団）の集中的制御を通じた食肉・食鳥肉の衛生管理の充実を図りたいと考える。

本手法は、更に国内のヒト及びニワトリに流行性を示す一群（ST-4526）の特定とその流行要因の解明にも功を奏した。*C.jejuni* の地理的特異性については未だ情報に乏しいが、ニュージーランドでは ST-474（ST-48CC）が当該国全域でニワトリ宿主に流行を示すとの報告があり、日本においても同様に ST-4526 が全国的な流行菌株である可能性が考えられた。ゲノム解読と表現形質解析を通じ、本遺伝子型の流行要因がゲノム構造の安定化であることが特定された。一般的に *C.jejuni* は遺伝子変異が高頻度に生じるため、菌株間のゲノム多様性に富み、結果として、様々な環境変化に適応しうる群集を創出する、いわば生存戦略の一つとして解釈されているが、今回解読した ST-4526 型 3 菌株間のゲノム構造は極めて高い相同性を示した。ニワトリは、温

湿度等がコントロールされた安定的環境で飼育されるため、本遺伝子型はゲノム変化という術を生存に必ずしも必要とせず、むしろ安定的増殖を繰り返すことで宿主内での優位性を保ってきたのではないかと考えられる。

最後に、本研究ではこれまでの疫学的知見並びに昨年度行った MLST 推定結果を裏付けるように、国内のカンピロバクター食中毒の多くはニワトリおよびウシに起因していることが国内分離株の遺伝情報を把握することで確認できた。特に、重要なヒト食中毒の原因と目されるニワトリに関しては、養鶏段階での効果的な本菌の制御法が確立されていない現状を踏まえると、流通・消費段階における衛生管理の徹底が実行可能な予防法と考えられる。今後は、加熱殺菌に加え、特に注視すべきと結論づけられた遺伝子型の菌株（ヒト食中毒との関連性が高い遺伝子型菌株）の衛生管理による制御法について検討することで、ヒト食中毒の低減に資する食肉の安全性に関する知見の集積を図りたい。

E. 結論

本研究では国内動物由来 *C.jejuni* 株に関する菌株収集と MLST 法に基づく遺伝学的特徴付けを行うことで、ヒト食中毒との関連性を示す一群の同定を行うと共に、本手法の原因推定への有効性を明らかにした。更に、ST-4526 が国内に限局する遺伝子型であり、ゲノム安定性を要因として国内のニワトリ・ヒト間に広く流行していることを明らかにした。今後は、ここで挙げられた注視すべき遺伝形質を有する菌株について、衛生管理手法を用いた制御について検討を行うことでヒト健康危害の低減へと繋がる食肉の安全性推進化を図りたい。

F. 健康危険情報

（総括報告書にまとめて記載）

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

2. 学会発表

- ・朝倉宏、江川智哉、五十君静信. *Campylobacter jejuni*国内分離株の遺伝学的多様性解析. 第4回日本カンピロバクター研究会総会. (2011. 12.)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

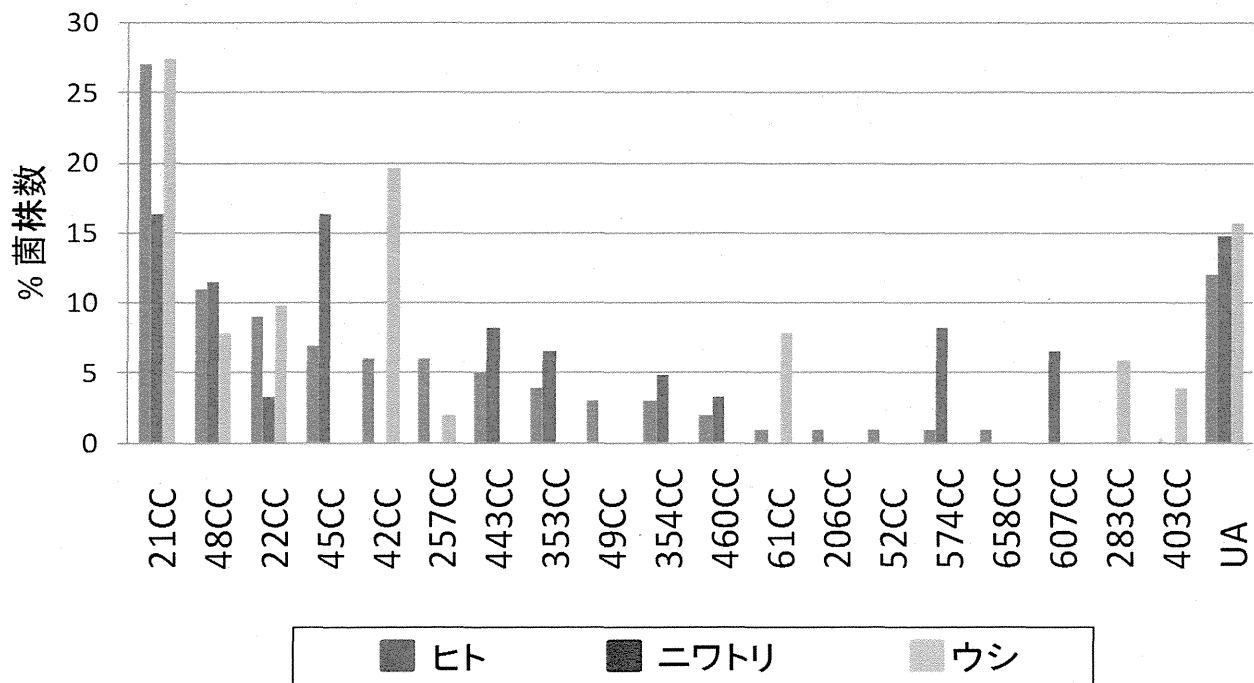


図1. 国内ヒト臨床及び動物由来*C. jejuni*におけるClonal Complex (CC)の構成
 国内ヒト由来(東京・大阪分離株各50株)、ニワトリ由来(61株)、およびウシ由来(51株)の*C. jejuni*計212株について、分離由来毎に構成するClonal Complex (CC)を累計した。Y軸は、分離菌株数の割合%を示している。

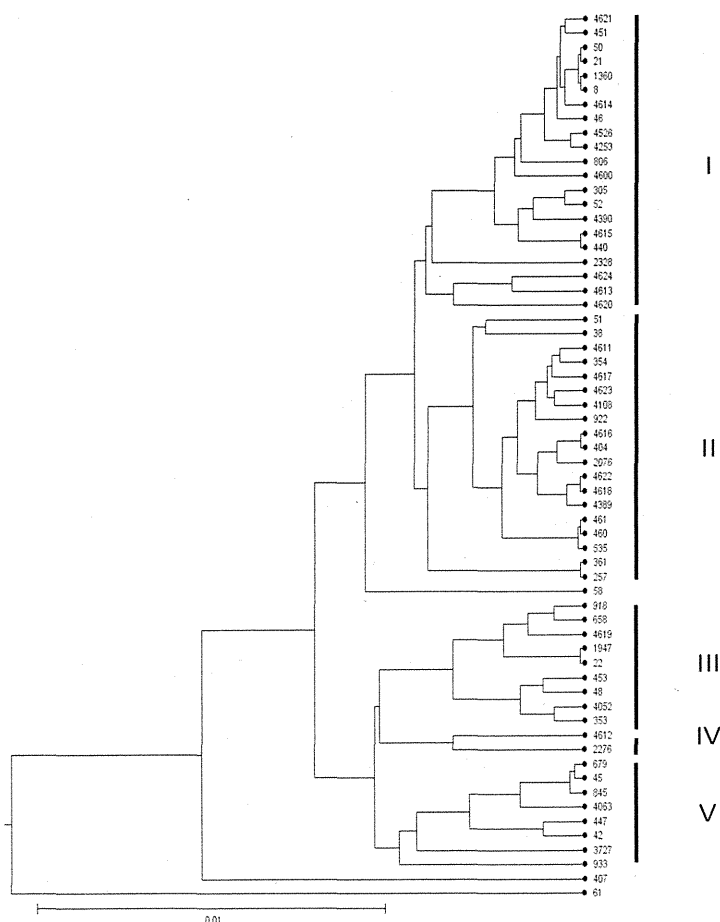


図2. START ver.2.2を用いた国内ヒトおよび動物由来*C. jejuni*株の系統解析
 計62種のST型について、各アレル番号をもととした最尤法系統解析を行った。右側にはCluster番号を表示した。

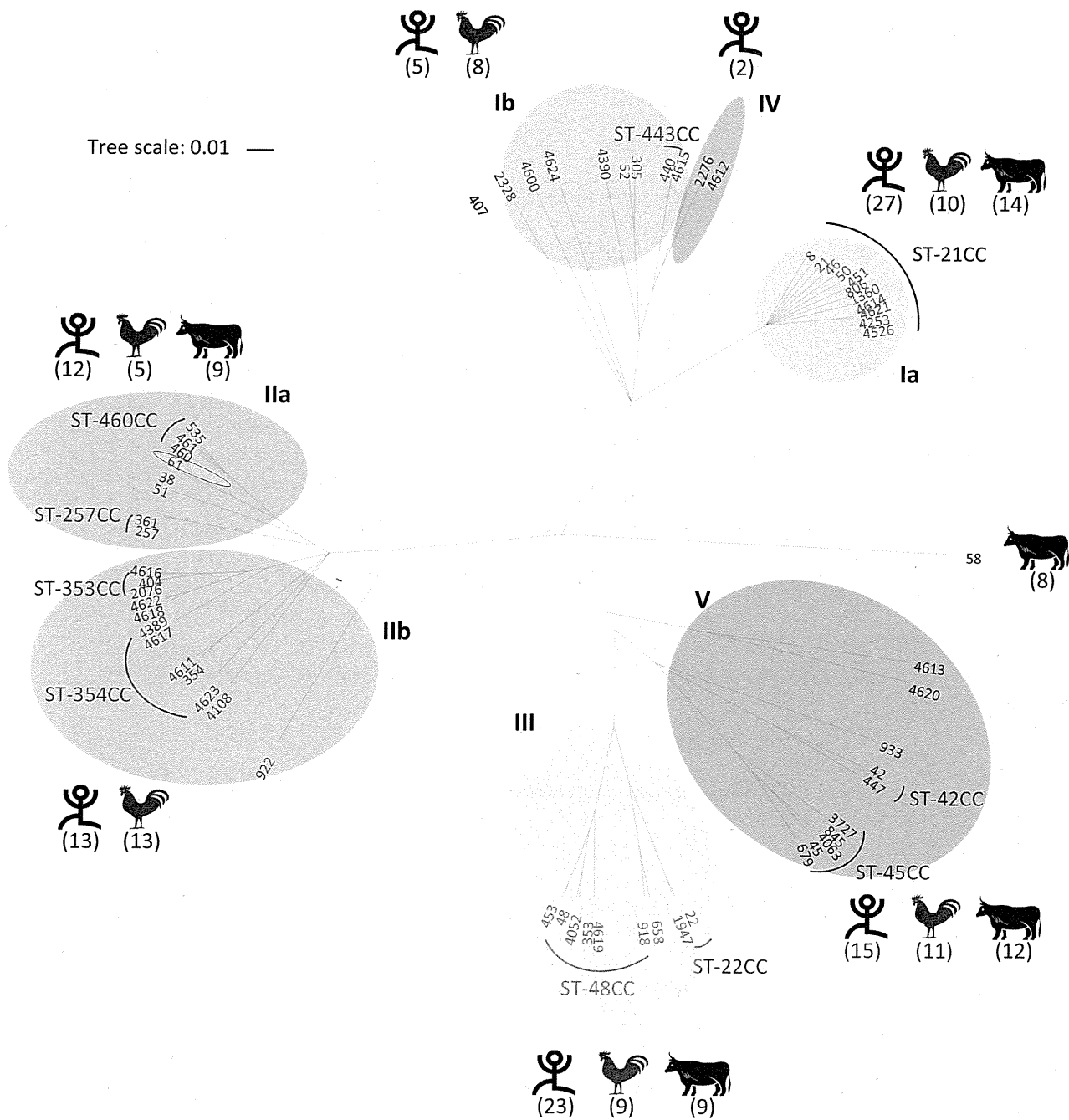
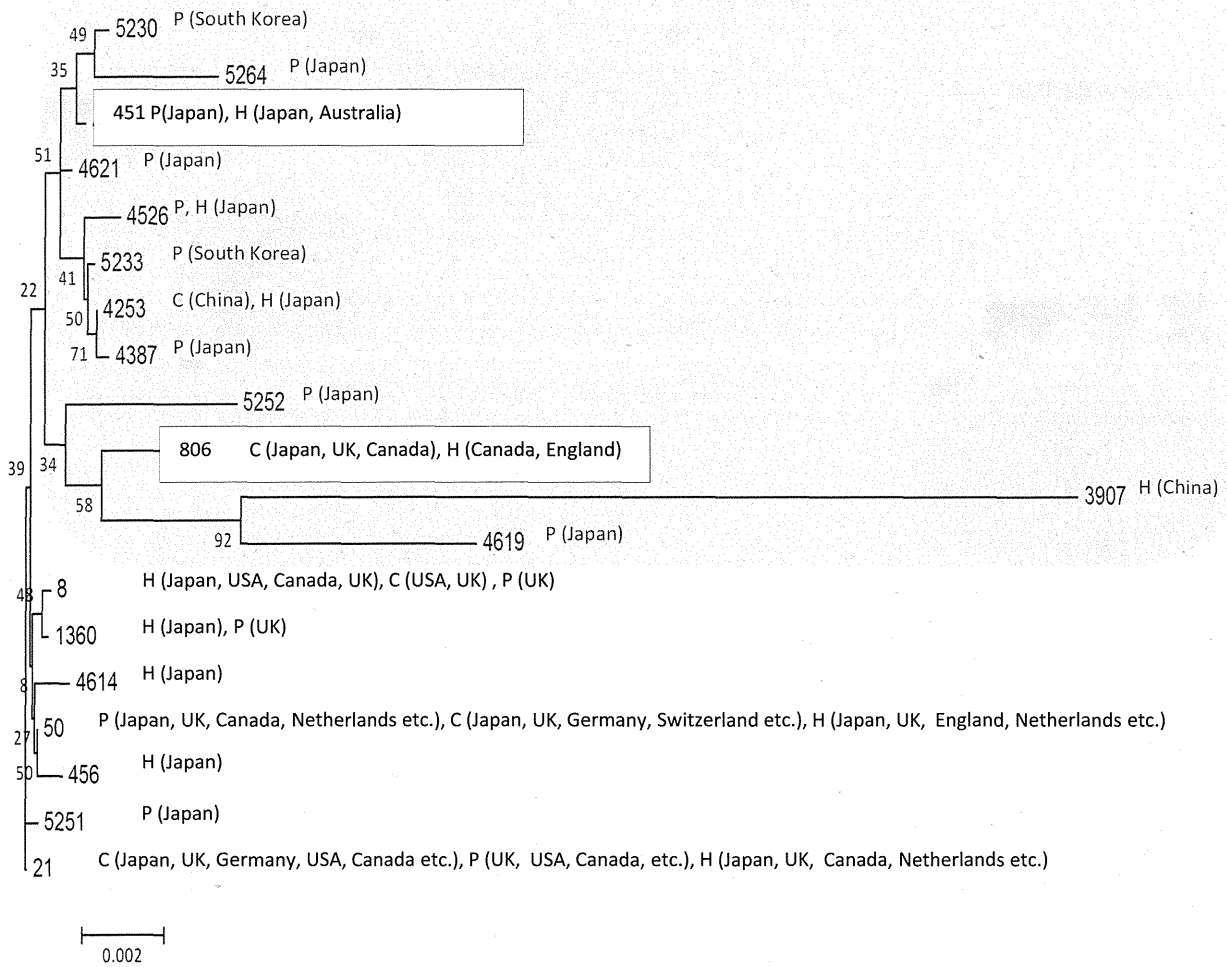


図3. Clonal Frameを用いた国内ヒトおよび動物由来*C. jejuni*株の系統解析

計62種のST型について、アレル別配列を基とする系統樹を作成した。代表的ST集団についてはCCを表示した。また、Cluster毎に分離由来宿主を図示した(ヒト・ニワトリ・ウシ)(括弧内は菌株数を示す)。

A

東アジア偏在性を示すグループ



B

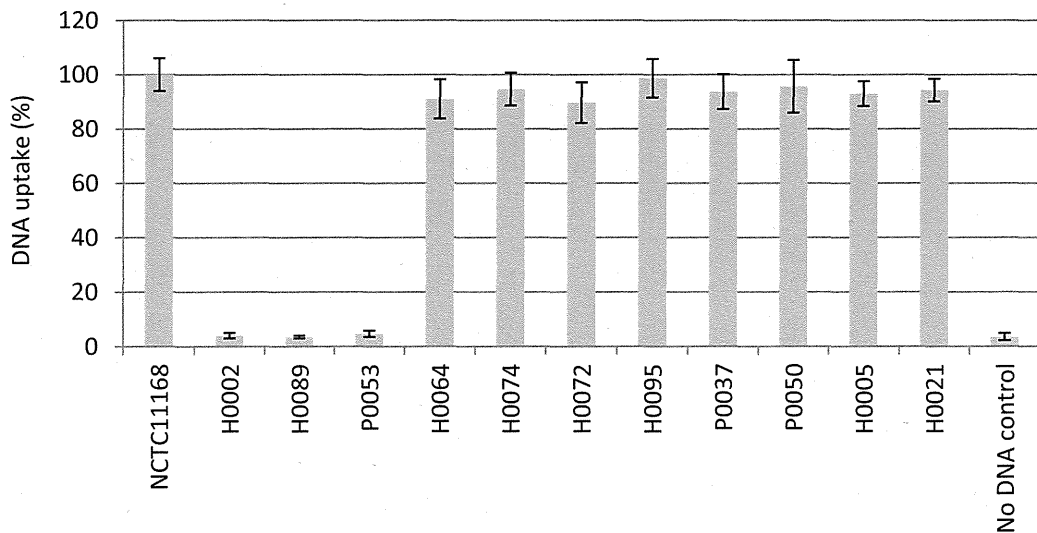


図4. ST-4526の進化と表現形質

(A) 東アジア地域(日本、中国、韓国)においてPubMLSTデータベースに登録されたST-21CC所属ST型(n=19)について、最尤法による進化系統樹を作成した。赤背景は、東アジアに特異的な分布を示す遺伝子型集団を示す。(B) *C.jejuni*代表株のDNA取り込み能を評価した。Y軸は、NCTC11168株の数値を100(%)とした相対値を示す。