

平成 26 年度 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）
食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究
研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

研究分担者 黒木俊郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）
研究協力者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）
研究協力者 相川勝弘（神奈川県衛生研究所 微生物部）
研究協力者 古川一郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

Campylobacter jejuni の型別法として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）は広く普及しており、食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析に用いられている。しかし、PFGE 法は操作が煩雑、結果を得るまでに 3～4 日を要する、複数の機関間での結果の比較が必ずしも容易ではないといった問題がある。カナダの研究者は、PCR 法を用いた新たな型別法である comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)を開発した。この CGF40 の国内での導入を目指し、評価を行った。今年度は、*C. jejuni* の標準株を用いて PCR 条件の設定の検討を行った。さらに、*C. jejuni* の分離株を CGF40 により型別を行い、PFGE 法との比較を行った。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni による細菌性食中毒の発生時には、原因物質の特定や食中毒の規模の把握等の疫学調査が実施される。疫学マーカーとして、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法等が利用されている。このうち、識別能の高さなどの理由から PFGE 法が最も普及している。しかし、PFGE 法には結果を得るまでに 3～4 日を要するため、迅速に結果を得ることができない、フラグメント解析

法であるために複数の機関が実施した解析結果を比較することが必ずしも容易ではないといった課題がある。

本研究では、カナダの研究者が開発した、PCR 法を用いる型別法：comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40)（文献 1,2）の国内への導入を目的として、CGF40 の操作法の検討ならびに評価を行った。

B. 研究方法

1) 菌株

CGF40 に用いる PCR 法の条件設定

の検討には、CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062) を用いた (文献 1)。 *C. jejuni* および *C. coli* 分離株の CGF40 による解析には、平成 24 年度に「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」(主任研究者 小西良子)において、市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株を用いた。

2) CGF40 の PCR 法の条件の検討

CGF40 の条件は、既報を参照した (文献 1, 2)。CGF40 の原法では、対象とする 40 の遺伝子を 5 つずつの 8 セットに分け、各 5 つの対象遺伝子は multiplex PCR により同時に検出する。今回の検討では、taq polymerase の選択、マルチプレックスあるいはシングルでの PCR 反応の実施、および PCR での伸長反応とアニーリングの温度および時間の設定を行った。PCR 法の条件を表 1 に示した。Taq polymerase は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) および Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応後に 3.0 % NuSieve™ 3:1 アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線下で観察した。

3) PFGE は CDC の方法に従い、制限酵素として *Sma*I を用い、鶏肉分離菌株について解析した。

4) 結果の解析

CGF40 および PFGE で得られた結果は、BioNumerics (Applied Maths) を用いて Pearson の相関係数で類似度を算出し、UPGMA によりクラスター解析を行った。

C. 研究結果

CGF40 による型別結果が公表されている標準株 2 株を用いて、表 1 に示した PCR 条件を設定し、それぞれの条件での結果の検討を行った。NCTC11168 を対象にして Ex Taq Hot Start Version を用いた条件 1~4 では、条件 1 では 10 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR で実施した条件 2 では得られなかったバンドが 3 本に減少した。さらに、アニーリングと伸長の時間を 60 秒にした条件 3 でも 3 本のバンドが得られなかった。シングル PCR で実施した条件 4 でも 2 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして Multiplex PCR Assay Kit を用い、マルチプレックス PCR で実施した条件 5 では、7 本のバンドが得られなかった。NCTC11168 を対象にして EmeraldAmp PCR Master Mix を用いてマルチプレックス PCR で実施した条件 6 では、2 本のバンドが得られなかったが、シングル PCR ではバンドを得ることができた (表 2)。

RM1221 を対象にした場合は、条件

1 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 2 では 1 本のバンドが得られなかった。条件 3 および 4 では、RM1221 の公表された結果と一致した。条件 5 では 2 本のバンドが得られなかったが、条件 6 および 7 では RM1221 の公表された結果と一致した（表 2）。

以上の結果から、CGF40 の PCR 条件の設定の検討において、PCR 反応液として EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定を 94℃, 5 分 → (94℃, 30 秒 → 55℃, 60 秒 → 72℃, 60 秒) × 35 サイクル → 72℃, 5 分に設定した場合に最も良い結果が得られた。PCR 反応条件について、原法の温度と時間の設定では基準株である NCTC11168 および RM1221 の結果において、検出できないバンドがみられたが、アニーリングと伸長反応を原法の 30 秒に対してそれぞれ 60 秒とした条件により結果に改善がみられた。

市販鶏肉から分離された *Campylobacter* について CGF40 を実施した結果、*C. jejuni* 74 菌株は 49 パターン、*C. coli* 8 菌株は 5 パターンに分けられた。これに対し PFGE では、*C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。CGF40 において同一パターンとなった *C. jejuni* および *C. coli* の菌株のグループは 13 グループ認められ、このうち 7 つのグループでは PFGE パターンが異なる菌株が含まれていた（図 1）。さらに、PFGE による解析から同一パターンとなった菌株のグ

ループも 13 グループ認められ、このうち異なる CGF40 パターンが含まれる菌株のグループは 3 グループであった（図 2）。

CGF40 は *C. jejuni* の識別に開発された方法であるが、*C. coli* 8 菌株を識別することができる結果が得られたことから、本法は食中毒菌に指定される *C. jejuni* および *C. coli* の 2 菌種について解析が可能と思われる。今後、株数を増やして検討する必要がある。

D. 考察

昨年度の報告書で述べたように、*Campylobacter* の型別法には、血清型別や薬剤耐性パターンによる型別があり、さらに遺伝学的手法を用いた型別法として PFGE 法、RFLP 法、リボタイピング、AFLP 法、RAPD 法、MLST 法、*fla* typing 法、SNP 解析法が開発され、利用されている。保健所や地方衛生研究所等で実施される食中毒の疫学調査では、操作性や簡易性等の理由から PFGE 法が最も多用されている。PFGE 法には多くの利点があるが、結果を得るのに 3～4 日を要することや、フラグメント解析法であるために複数の機関での結果の比較に限界があるといった課題もある。そこで、より短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法として、CGF40 の評価を行った。

昨年度の検討結果から、PCR 法に用いる taq polymerase により PCR の結果が異なることが明らかとなっ

ていた。そこで、今年度は CGF40 による型別結果が既知の標準株 NCTC11168 および RM 1221 を用い、CGF40 に適した PCR 条件の検討を行った。その結果、EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定条件として 94 , 5 分 → (94 , 30 秒 → 55 , 60 秒 → 72 , 60 秒) x35 サイクル → 72 , 5 分とした場合に、もっとも良い結果が得られた。しかし、未だにマルチプレックス PCR ではバンドが得られにくいところが 2 か所あり、今後の検討が必要である。

鶏肉由来株 (*C. jejuni* 74 菌株および *C. coli* 8 菌株) を用いた CGF40 と PFGE 法による型別の比較では、CGF40 では *C. jejuni* 74 株は 49 パターン、*C. coli* 8 株は 5 パターンに分けられたが、PFGE 法では *C. jejuni* は 59 パターン、*C. coli* は 6 パターンに分けられた。さらに、CGF40 のパターンが一致する菌株間で異なる PFGE パターンである場合や、PFGE のパターンが一致する菌株間で異なる CGF40 のパターンを示す場合も認められ、互いの手法で異なる結果が得られるなど、CGF40 は PFGE 法とほぼ同等の識別能を有していることが示され、この結果は既報(文献 1,2)とほぼ同様であった。

E. 結論

C. jejuni の型別法として導入することを目的に、CGF40 の操作法の検討と評価を行った。CGF40 の操作法として、EmeraldAmp PCR Master

Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定条件を既報の条件から変更することで良好な結果が得られた。マルチプレックス PCR では得られにくいバンドがあるため、さらに PCR 条件を検討する必要がある。CGF40 による型別を PFGE 法による型別と比較したところ、ほぼ同等の識別能が得られた。

F. 参考文献

1. Taboada EN, Ross SL, Mutschall SK, Mackinnon JM, Roberts MJ, Buchanan CJ, Kruczkiewicz P, Jokinen CC, Thomas JE, Nash JH, Gannon VP, Marshall B, Pollari F, Clark CG. Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):788-97.
2. Clark CG, Taboada E, Grant CC, Blakeston C, Pollari F, Marshall B, Rahn K, Mackinnon J, Daignault D, Pillai D, Ng LK. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):798-809.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

I. 健康危険情報
なし