

表6 ウェルシュ菌(CPE-とCPE+)とその共雑菌(クロストリジア属)を食品に添加した際のウェルシュ菌(CPE+)の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	比較した培地		
	S7	+ S9		ECW	CCP	TSC
				S7+S9	S7+S9	S7+S9
食品1	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 ³	3	4	1
	2650	2150	C. sporogenes, 9.0x10 ³	0	-	0
	265	215	C. difficile, 1.8x10 ²	-	-	0
	27	22	C. sordellii, 2.9x10 ⁴	-	-	0
	3	2		-	-	0
食品2	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 ³	0	0	2
	2650	2150	C. sporogenes, 9.0x10 ³	0	2	0
	265	215	C. difficile, 1.8x10 ²	-	1	0
	27	22	C. sordellii, 2.9x10 ⁴	-	-	0
	3	2		-	-	0
食品3	26500	21500	C. bifermentans, 4.1x10 ³	1	1	3
	2650	2150	C. sporogenes, 9.0x10 ³	2	1	0
	265	215	C. difficile, 1.8x10 ²	-	-	0
	27	22	C. sordellii, 2.9x10 ⁴	-	-	0
	3	2		-	-	0

(1濃度から4集落約菌してPCRでCPE(+を確認)
(-、発育を認めず)

表7 ウェルシュ菌のみを便に添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

培地名 菌株名	対照(GAM)		比較した培地					
	S7	S9	ECW		CCP		TSC	
			S7	S9	S7	S9	S7	S9
便1	875,000	125,000	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)	1 (0%)	2 (0%)	0 (0%)
便2	875,000	125,000	39,167 (4.48%)	7,000 (5.60%)	64,500 (7.37%)	30,500 (24.4%)	132,500 (15.1%)	6,000 (4.80%)
便3	875,000	125,000	433 (0.05%)	8 (0.01%)	8,000 (0.91%)	1,850 (1.48%)	67,500 (7.71%)	1,625 (1.30%)

(単位、cfu/g、便)

表8 ウェルシュ菌とその共雑菌(クロストリジア属)を便に
添加した際のウェルシュ菌の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	C.perfringensの発育状況					
	S7	S9		ECW		CCP		TSC	
				S7	S9	S7	S9	S7	S9
便1	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 ¹	-	-	-	-	-	-
便2	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	+	-	+	+	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 ¹	-	-	-	-	-	-
便3	875,000	125,000	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
	8750	1250	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
	88	13	C. difficile, 9.9x10 ¹	-	-	-	-	-	-

(++, 10~99集落)
(+, 1~9集落)

表9 ウェルシュ菌(CPE-とCPE+)とその共雑菌(クロストリジア属)を
便に添加した際のウェルシュ菌(CPE+)の回収試験結果

添加材料	C.perfringens 添加濃度 (cfu/g)		共雑菌として添加した 近縁菌 (cfu/g)	比較した培地		
	S7+	S9		ECW	CCP	TSC
				S7+S9	S7+S9	S7+S9
便1	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	0	0	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 ¹	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 ⁵	0	0	0
	3	2		0	0	0
便2	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	0 (1)	0 (2)	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 ¹	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 ⁵	0	0	0
	3	2		0	0	0
便3	26500	21500	C. bifermentans, 8.1x10 ⁵	0	1 (2)	0
	2650	2150	C. sporogenes, 4.3x10 ⁵	0	0	0
	265	215	C. difficile, 9.9x10 ¹	0	0	0
	27	22	C. sordellii, 1.3x10 ⁵	0	0	0
	3	2		0	0	0

(1濃度から4集落約菌してPCRでCPE(+)を確認)

(括弧内は1濃度から10集落約菌してPCRでCPE(+)を確認)

(-, 発育を認めず)

分 担 研 究 報 告 書

地方衛生研究所のネットワーク構築：
健康者由来黄色ブドウ球菌の遺伝子型別及び
POT 法のコラボ試験について

齊藤 志保子

平成 27 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

地方衛生研究所のネットワーク構築：黄色ブドウ球菌の遺伝子型別法の検討

－POT 法のコラボ試験について－

研究分担者	齊藤志保子	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	曾根 美紀	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	加藤 直樹	（さいたま市健康科学研究センター）
研究協力者	黒木 俊郎	（神奈川県衛生研究所）
研究協力者	久米田裕子	（大阪府立公衆衛生研究所）
研究協力者	余野木伸哉	（大阪府立公衆衛生研究所）
研究協力者	世良 暢之	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	前田詠里子	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	今野 貴之	（秋田県健康環境センター）
研究協力者	高橋 志保	（秋田県健康環境センター）

各自治体が行う食中毒事例や食品等の食中毒菌のサーベイランスに活用できるタイピング方法を検討するため、黄色ブドウ球菌の遺伝子型別法について、これまで POT 法、MLVA 法、PFGE 法を検討した結果、POT 法が簡便、有用と考えられた。このことから、今年度は異なる機関における黄色ブドウ球菌の POT 法による遺伝子型の判定結果について検討するため、地方衛生研究所 5 機関においてコラボ試験を実施した。その結果、供試 10 株中 1 株における 2 つのバンドの判定に不一致が認められたが、9 株についてはすべての機関の判定結果が一致した。POT 法はサーベイランス等の活用に非常に有用な遺伝子型別法と考えられた。ただし、広域の重要事例等の場合は POT 型の数値に加えて写真情報の相互確認も必要と考えられた。

A. 研究目的

食中毒菌のうち黄色ブドウ球菌を対象とし、各自治体において実施可能なタイピング方法について検討することを目的に、これまで市販鶏肉や食中毒例由来の黄色ブド

ウ球菌株について POT 法、MLVA 法、PFGE 法により遺伝子型別を実施してきた。その結果、POT 法及び MLVA 法は PFGE 法と同等の解析力を持つことが確認された。特に POT 法は結果が数値表示であり、またキットと

して市販され簡便に使用できることから、POT 法をサーベイランス等に活用するにあたり、異なる機関における結果判定の差異を検討するため、同じ黄色ブドウ球菌株について複数の機関によるコラボ試験として POT 法による遺伝子型別を実施した。

B. 研究方法

1. 参加機関

さいたま市健康科学研究センター、福岡県保健環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、秋田県健康環境センターの 5 機関

2. 供試株

鶏肉由来株 5 株、ヒト糞便由来株 5 株計 10 株 (表 2) を供試した。新鮮培養菌を蒸留水にマックファーランド 3 程度に浮遊させ、沸騰水中で 2 分加熱したものを冷蔵で各機関あて平成 27 年 9 月 28 日に送付した。POT 型別試験は各機関で 10 月 8 日までに実施した。

3. 方法

5 機関とも同一ロットの関東化学株式会社のシカジーニクス DNA 抽出試薬、シカジーニクス分子疫学解析 POT キット (黄色ブドウ球菌用) を使用し、キットの取り扱い説明書に従い型別試験を実施した。

POT 法は菌株ごとに異なる ORF の保有パターンを Multiplex PCR によって検出する方法である。シカジーニクス DNA 抽出試

薬を用いて新鮮培養菌を 70°C20 分、94°C3 分処理によりテンプレートを作成し、黄色ブドウ球菌用シカジーニクス分子疫学解析 POT キットを用いて PCR を行った。POT 型への変換方法例 (表 1) に示すようにターゲットとする 22 領域の増幅バンドの有無から POT 型の数値に変換し、POT1-POT2-POT3 の 3 つの数値により型を標記した。

C. 研究結果

No. 1~10 の供試株 (表 2) の各機関の POT 型別 PCR の泳動結果を図 1~5、POT 型数値については表 3 に示す。POT 型別は 10 株中 9 株について 5 機関すべてで一致した。供試株 No. 3 については 3 機関で 6-0-84 と判定したが、機関 C では POT2-1 (係数 128) をバンド有りとし、6-128-84 と判定、機関 D では POT1-7 (係数 1) をバンド有りとし 7-0-84 と判定した。POT2-1 のバンドを有りとした機関 C の泳動写真 (図 3) を見ると全体的にバンドが非常に明るく、POT2-1 付近に薄いバンドが確認できる。陽性コントロールに比較し非常に薄く、他の機関の泳動像では確認できなかった。POT1-7 は機関 D (図 4) の泳動像では陽性コントロールに比べて薄くまたやや幅が狭いバンドが認められる。機関 B、E の泳動像でも非常に薄い像が認められるがバンドとして判定しなかった。

D. 考察

今回実施した POT 法のコロボ試験においては、供試した 10 株中 9 株がすべての機関で一致した。使用した試薬はキット化され、操作も簡便であり、結果も迅速に得られた。ただし、陽性コントロールにおいて非常に薄いバンドがあり、そのバンドは検体でも薄めの傾向があった。また、薄いエキストラバンドが認められる場合があったことから、試験実施時はそれらの特徴を把握しておく必要があると考えられた。実際、薄いバンドの判定において、今回のコロボ試験でも供試株中 1 株の 2 つのバンドについて判定が機関により異なった。このことから広域事例等において複数の機関による型別結果を比較する場合は、できるだけ写真情報も共有し各機関で確認する必要があると考えられた。

E. 結論

POT 法についてコロボ試験を実施した結果、一致率は良好であったが、場合によっては写真情報の相互確認も必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 参考文献

1) K. omoe et al., Comprehensive analysis

of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates., FEMS Microbiology Letters 246, p191-198 (2005)

2) A. Sabat et al., New Method Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates., JCM, Vol. 41, No. 4, p1801-1804 (2003)

3) N. Malachowa et al., Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed Field Gel Electrophoresis, *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates., JCM Vol. 43, No. 7, p3095-3100 (2005)

4) 食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究 平成 25 年度 総括・分担研究報告書

5) 食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究 平成 26 年度 総括・分担研究報告書

表1 POT型への変換方法例

	POT ナンバー	bp	POT 係数	結果	POT ポイント	小計
Reaction Mixture1	femA	601		1		
	POT1-1	530	64	×	0 = 0	0 a
	POT1-2	449	32	×	0 = 0	
	POT1-3	355	16	×	0 = 0	
	POT2-1	304	128	×	1 = 128	144 b
	POT2-2	271	64	×	0 = 0	
	POT2-3	228	32	×	0 = 0	
	POT2-4	197	16	×	1 = 16	
	POT2-5	161	8	×	0 = 0	
	POT2-6	131	4	×	0 = 0	
	POT2-7	104	2	×	0 = 0	
	POT2-8	81	1	×	0 = 0	
	Reaction Mixture2	femA	601		1	
POT1-4		477	8	×	0 = 0	6 c
POT1-5		388	4	×	1 = 4	
POT1-6		320	2	×	1 = 2	
POT1-7		273	1	×	0 = 0	
POT3-1		243	64	×	1 = 64	81 d
POT3-2		197	32	×	0 = 0	
POT3-3		171	16	×	1 = 16	
POT3-4		140	8	×	0 = 0	
POT3-5		115	4	×	0 = 0	
POT3-6		95	2	×	0 = 0	
POT3-7	78	1	×	1 = 1		

結果: バンド陽性(+)は1、バンド陰性(-)は0として入力

POT-1 : a+c=6
 POT-2 : b=144
 POT-3 : d=81

表2 POT法コラボ試験 供試株一覧

No	保存株No	由来	分離年
1	2012ST04	鶏肉	平成24年
2	2012ST18	鶏肉	平成24年
3	2012ST46	鶏肉	平成24年
4	2012ST50	鶏肉	平成24年
5	2012ST57	鶏肉	平成24年
6	MR538	ヒト糞便	平成25年
7	MR548	ヒト糞便	平成25年
8	MR552	ヒト糞便	平成25年
9	MR554	ヒト糞便	平成25年
10	MR556	ヒト糞便	平成25年

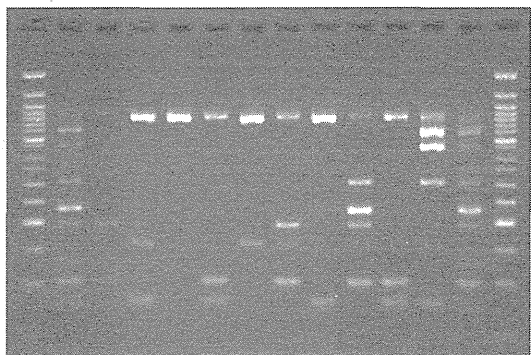
表3 H27年度 POT型別コロバ試験結果一覧表

機関		検体No										コメント
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	関東化学社製のDNA抽出試薬の工程が簡便であった。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
B	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	すでにキットとして販売されていることもあり、試験の実施には特に問題はないと思う。 非特異的な増幅産物が見られること或いはバンドの濃さ等を考慮した詳細な判定基準があると精度がさらに高まると思われる。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	40	1	80	
C	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	Reaction mixture 1でPCのバンドがPOT1-3とPOT2-5で極めて薄かった。
	POT2	18	25	128*	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
D	POT1	4	0	7**	0	4	4	2	6	0	106	・陽性コントロールのバンドで非常に薄いバンドがあった。(POT2-5) ・サンプルのバンドで、非常に薄くて、バンドの有無の判断に困るようなものがあった(ノンスペナのか目的バンドなのかはっきりしないバンド)。このようなバンドについて、今回はサイズが比較的小さいバンド以外は極力0と判定した。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	
E	POT1	4	0	6	0	4	4	2	6	0	106	・コントロールのPOT2-2、POT2-5のバンドが薄かった。 ・検体No.2 のPOT2-4のバンドが薄かったが1と判定した。
	POT2	18	25	0	3	8	26	1	186	3	137	
	POT3	16	80	84	1	80	0	0	42	1	80	

*: POT2-1(係数128) バンド有と判定

** : POT1-7(係数1) バンド有と判定

Reaction1



Reaction2

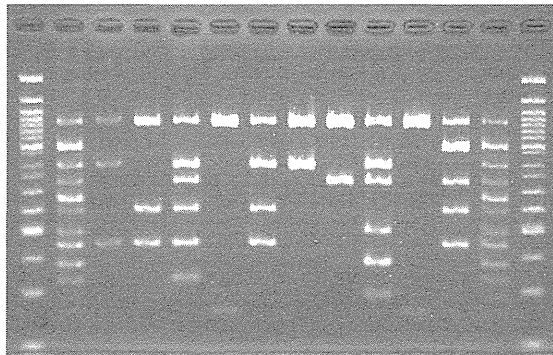
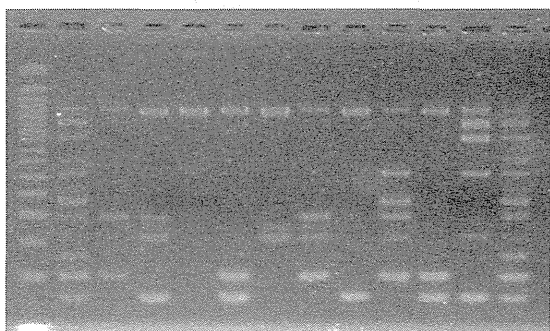


図1 機関 A マーカー, R1, 検体 1~10, R1, マーカー マーカー, R2, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1



Reaction2

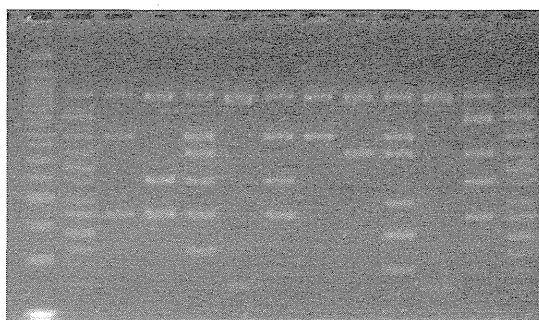


図2 機関 B マーカー, R1, 検体 1~10, R1 マーカー, R2, 検体 1~10, R2

Reaction1

Reaction2

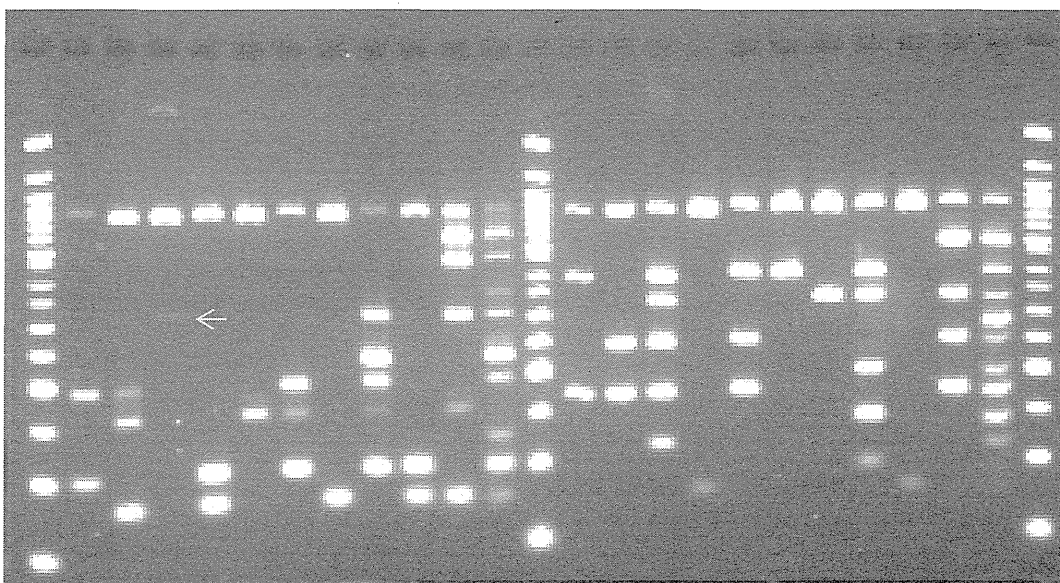


図3 機関 C マーカー, 検体 1~10, R1, マーカー, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1

Reaction2

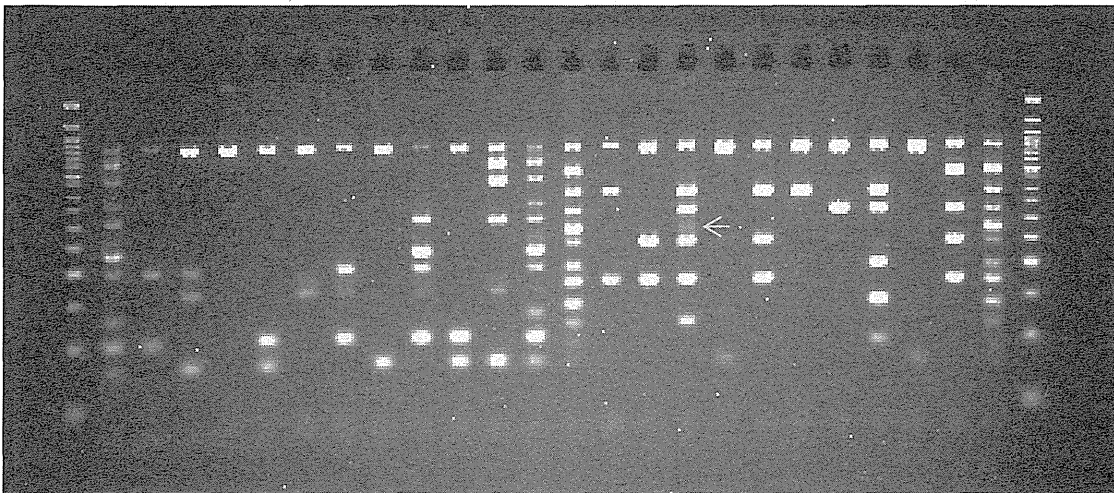


図4 機関D マーカー, R1, 検体 1~10, R1, R2, 検体 1~10, R2, マーカー

Reaction1

Reaction2

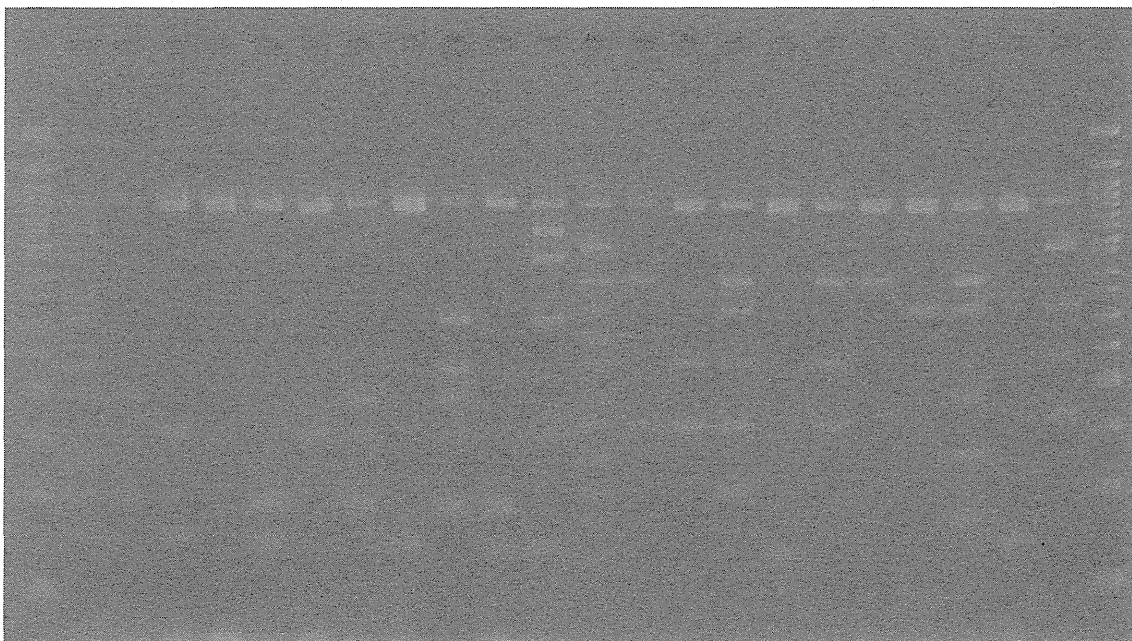


図5 機関E マーカー, R1, 検体 1~10, R2, 検体 1~10, マーカー

マーカー : 50bp DNA Ladder

R1 : Reaction Mixture1 の陽性コントロール

R2 : Reaction Mixture2 の陽性コントロール

分 担 研 究 報 告 書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

黒木 俊郎

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 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）

研究協力者 鈴木 美雪（神奈川県衛生研究所 微生物部）

Campylobacter jejuni の型別法として開発された CGF40 を疫学解析に導入するために、PCR の設定条件の検討と、型別法としての評価を PFGE と比較することで実施した。CGF40 の実施に最も適した taq polymerase を選ぶために、4 種の市販の taq polymerase を比較検討したところ、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 により最も多くのバンドが得られた。しかし、一部のバンドを得ることが出来なかった。鶏肉から分離した *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* を CGF40 及び PFGE により型別し、薬剤感受性及び鶏肉の産地のデータと合わせてクラスタ解析したところ、CGF40 は PFGE と同等の識別能力を示し、特定の菌グループが薬剤耐性あるいは生産地域との関連性があることが示された。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni および *C. coli* の遺伝子型別法 comparative genomic fingerprinting (CGF) 40 がカナダの研究者により開発された（文献 1）。*C. jejuni* 株における保有頻度と「SNP が無いこと」から 40 の ORF が選ばれた。CGF40 はこれらの 40 の ORF の有無により型別を行う。CGF40 は対象にする 40 の ORF を 5 つごとに分け、8 組の multiplex PCR により ORF の有無を

解析し、この結果により型別を行う。これまでの検討では multiplex PCR により本来検出されなければならないバンドが得られない事象がみられたため、複数の taq polymerase を用いて、適切に結果が得られるかを評価した。さらに、鶏肉からの分離株を用いて、菌株の薬剤感受性と鶏肉の生産地域のデータと合わせて、CGF40 と PFGE によりクラスタ解析を行った。

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」において、市販鶏肉からの分離した株 *C. jejuni* 65 菌株および *C. coli* 9 菌株を用いた。

2) CGF40

CGF40 の条件は、既報を参照した (文献 1)。CGF40 における Taq polymerase の検討では、Emerald Amp PCR Master Mix (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ) および KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye (Kapa Biosystems) を用いた。PCR 条件は 94°C、2 分から 94°C、30 秒、55°C、60 秒、72°C、60 秒を 30 サイクル繰り返し後、最終を 72°C、5 分とした。

3) PFGE

PFGE は既法 (文献 2) に従い、一部変更して実施した。各菌株の DNA は、40U の SmaI により 30°C で 5 時間作用させた。CHEF MAPPER (Bio-Rad) を用い、PFGE の条件はパルスタイムを 6.76~35.38 として 12°C、200V で 18 時間泳動とした。ゲルは

0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色し、UV 下で観察した。 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812 をコントロール株として用いた。

4) 薬剤感受性測定

K-B 法により、アンピシリン (10 μ g)、テトラサイクリン (30 μ g)、ストレプトマイシン (10 μ g)、クロラムフェニコール (30 μ g)、エリスロマイシン (15 μ g)、カナマイシン (30 μ g)、ST 合剤 (23.75/1.25 μ g)、ナリジクス酸 (30 μ g) およびシプロフロキサシン (5 μ g) (Becton Dickinson) を用いて薬剤感受性を測定した。

5) CGF40 および PFGE パターンのクラスタ一解析

CGF40 のパターンと PFGE パターンは Bionumerics software version 6.6.3 (Applied Maths) を用いて、デンドログラムを作成した。

CGF40 と PFGE の識別能力を比較するために、Simpson の多様度指数 (Simpson's index) (文献 3) を算出した。

C. 研究結果

1) Taq polymerase の比較評価

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 (MP1 から MP8) 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 MP1 から MP8 のセットの中で MP2、MP3 及び MP4 では、いずれの taq

polymerase を用いても PCR によりバンドが得られないものがあった (図 1~4)。MP5、MP6 及び MP7 において、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 を用いた場合にのみ得られたバンドがあった (図 2 及び図 4、矢印)。この結果から、CGF40 の実施には、比較対象とした taq polymerase の中では Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 の使用が適していることが示された。

2) CGF40 と PFGE のクラスター解析

C. jejuni 65 株および *C. coli* 9 株の合わせて 74 株は、PFGE により *C. jejuni* は 55 パターンおよび *C. coli* は 7 パターンに分けられ、*C. jejuni* の Simpson の多様度指数は 0.9947 であり、74 株は 6 クラスターに分けられた。*C. coli* が 1 つのクラスターを形成し、*C. jejuni* は 5 クラスター (cluster P1~P5) を形成した (図 5)。Cluster P4 はさらに 4 クラスター (subcluster I~IV) に分けられた。

Cluster P1 の株はすべてキノロン感受性、cluster P2 の株はすべてアンピシリン耐性およびニューキノロン感受性で、4 株中 3 株はカナマイシン耐性であった。Cluster P3 の半数の株はアンピシリン、テトラサイクリン、キノロンに耐性であった。Cluster P4 ではサブクラスターにより薬剤に対する態度は異なり、Subcluster I の 1 株を除く全株はキノロン感受性で、7 株中 4 株は九州由来であった。Subcluster II の 10 株中 8 株はキノロン耐性で、多くの株はアンピシリンおよびカナマイシン感受性で、すべ

ての株がストレプトマイシン感受性であった。10 株中 6 株は東北由来であった。Subcluster III および IV の 10 株中 6 株はアンピシリン耐性で、1 株を除くすべての株はキノロン感受性であった。Cluster P5 の 8 株中 4 株はアンピシリン、テトラサイクリンおよびキノロンに対して耐性であった。

CGF40 では *C. jejuni* は 49 パターンおよび *C. coli* は 6 パターンに分けられ、*C. jejuni* の Simpson の多様度指数は 0.9889 であり、74 株は 7 クラスターに分けられた (図 6)。*C. coli* が 1 つのクラスターを形成し、*C. jejuni* は 5 クラスター (cluster C1~C6) を形成した。

Cluster C1 の 2 株はアンピシリン、ST 合剤およびキノロン耐性であった。Cluster C2 の 8 株中 4 株はアンピシリン耐性で、7 株はキノロン感受性であった。Cluster C3 の 8 株はテトラサイクリン耐性で、10 株はキノロン耐性で、これらの多くはアンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン感受性であった。Cluster C3 の 8 株は東北由来であった。Cluster C4 の約半数の株はアンピシリン、カナマイシン、キノロン耐性であった。Cluster C4 には近畿地方由来の 6 株が含まれ、これらはアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリンに対する多剤耐性菌であった。Cluster C5 の 9 株は九州由来であった。Cluster C6 の株は多剤耐性菌であった。

Simpson の多様度指数を比較すると、PFGE が CGF40 よりもわずかに高かったが、ほぼ

同じであった。クラスター解析において、CGF40のほうがPFGEよりも、菌株の地域的由来あるいは薬剤耐性といった特徴がクラスターとよく関連しているように見受けられた。

D. 考察

比較検討を行った4種のtaq polymeraseの中で、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2によるPCRの結果がもっとも良好であった。これはそれぞれのtaq polymeraseの特性がCGF40で設定された条件と相性が異なることによると考えられる。CGF40では、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2を用いても本来得られるべきバンドが得られないものもあり、今後さらに検討が必要である。

鶏肉からの分離株をCGF40により解析したところ、従来から用いられているPFGEと同様に、CGF40は菌株間の遺伝学的関連性を解析するための有効なツールであることが示された。

クラスター解析では、特定のクラスターでは遺伝子型と薬剤耐性や地理的分布との関連性が示された。この結果は、薬剤耐性が遺伝学的型別と関連しており、特定の地域に分布する特定の遺伝グループに薬剤耐性が広がっていることを示唆している。

E. 結論

結論として、Multiplex PCR Assayにより型別を行うCGF40では、PCRに用いるtaq polymeraseを適切に選択する必要がある。CGF40を用いたクラスター解析では、遺伝

子型と薬剤耐性との間に関連性があり、また、特定のクラスターに属する菌グループが特定の地域に分布し、薬剤耐性を示すものもあることが示された。

F. 謝辞

研究班の調査において分離された菌株を解析に使用することをご了解いただきました麻布大学 小西良子先生並びに国立医薬品食品衛生研究所 大西貴弘先生、鶏肉からの*C. jejuni*及び*C. coli*分離株をご分与いただきました、秋田県健康環境センター 齊藤志保子先生、さいたま市健康科学センター 小林昭彦先生、滋賀県衛生科学センター 林賢一先生、福岡県保健環境研究所 堀川和美先生に深謝いたします。

G. 参考文献

1. Taboada, E.N., Ross, S.L., Mutschall, S.K., *et al.* (2012). Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 50, 788-797.
2. Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., *et al.* (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 3, 59-67.

3. Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988).
Numerical index of the
discriminatory ability of typing
systems: an application of Simpson's
index of diversity. J Clin Microbiol
26, 2465-2466.

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

J. 健康危険情報

なし

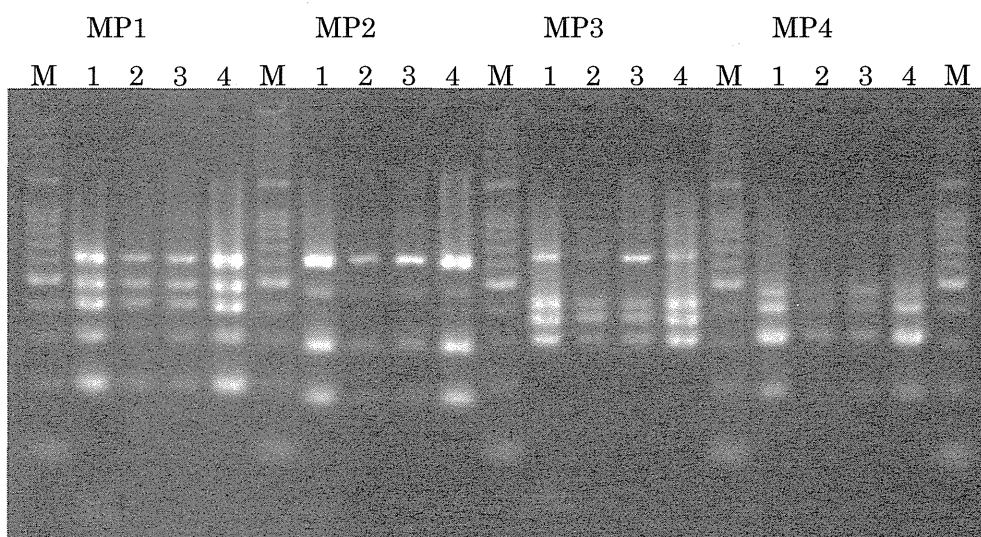


図1 *Campylobacter jejuni* ATCC700619 に対して4種の taq polymerase により得られた CGF40 の MP1 ~MP4 の結果 1: Emerald Amp PCR Master Mix, 2: Multiplex PCR Assay Kit, 3: Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2, 4: KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye

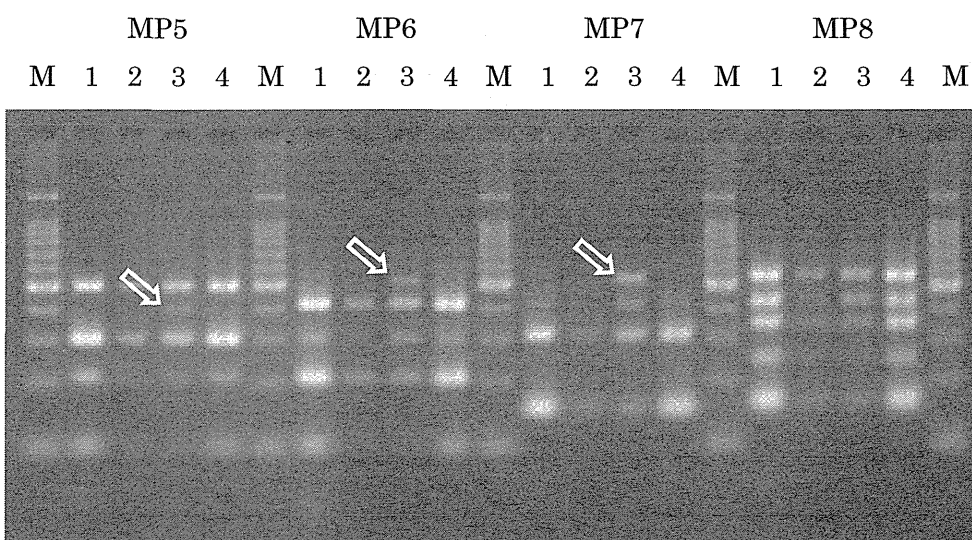


図2 *Campylobacter jejuni* ATCC700619 に対して4種の taq polymerase により得られた CGF40 の MP5 ~MP8 の結果 1: Emerald Amp PCR Master Mix, 2: Multiplex PCR Assay Kit, 3: Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2, 4: KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye
 白の矢印は Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 により得られたバンドを示す。

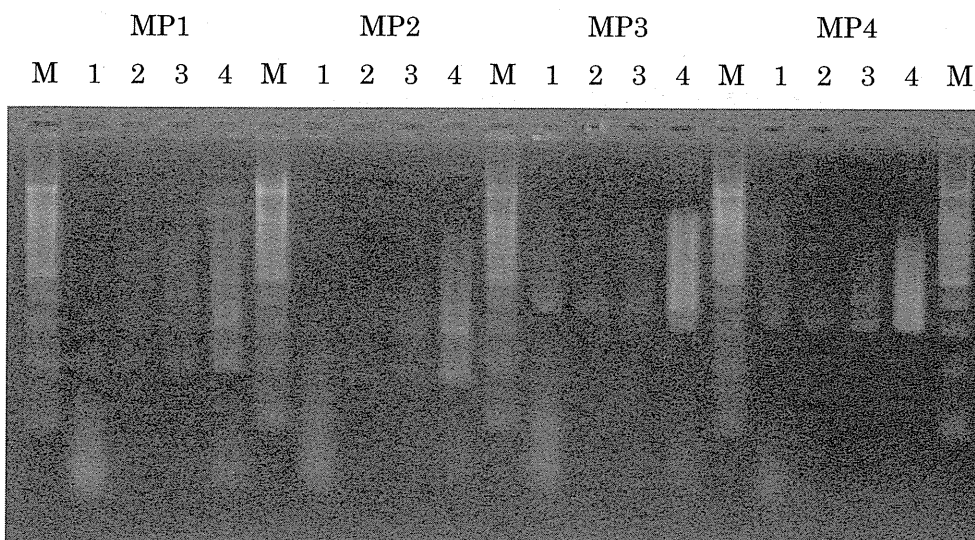


図3 *Campylobacter jejuni* ATCC BAA-1062 に対して4種の taq polymerase により得られた CGF40 の MP1~MP4 の結果 1: Emerald Amp PCR Master Mix, 2: Multiplex PCR Assay Kit, 3: Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2, 4: KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye

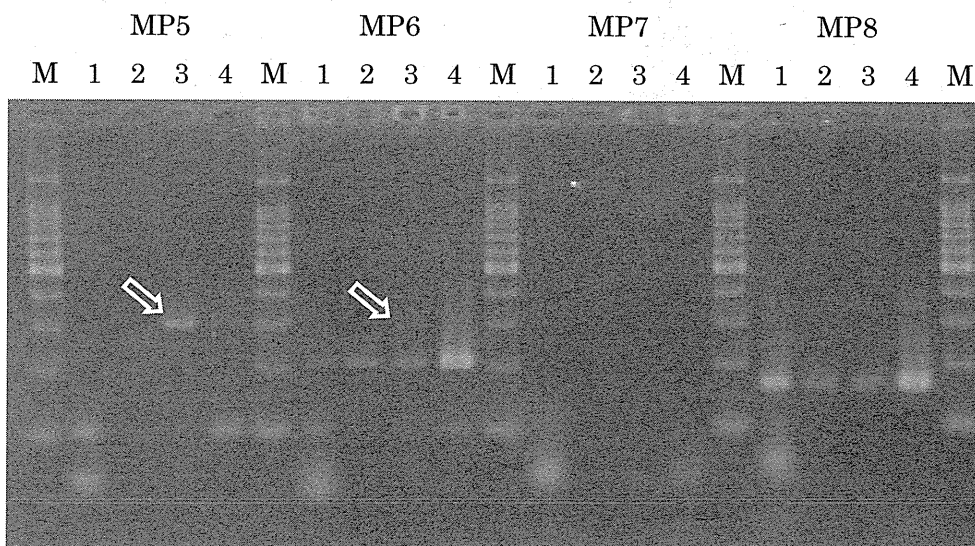


図4 *Campylobacter jejuni* ATCC BAA-1062 に対して4種の taq polymerase により得られた CGF40 の MP5~MP8 の結果 1: Emerald Amp PCR Master Mix, 2: Multiplex PCR Assay Kit, 3: Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2, 4: KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye 白の矢印は Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 により得られたバンドを示す。

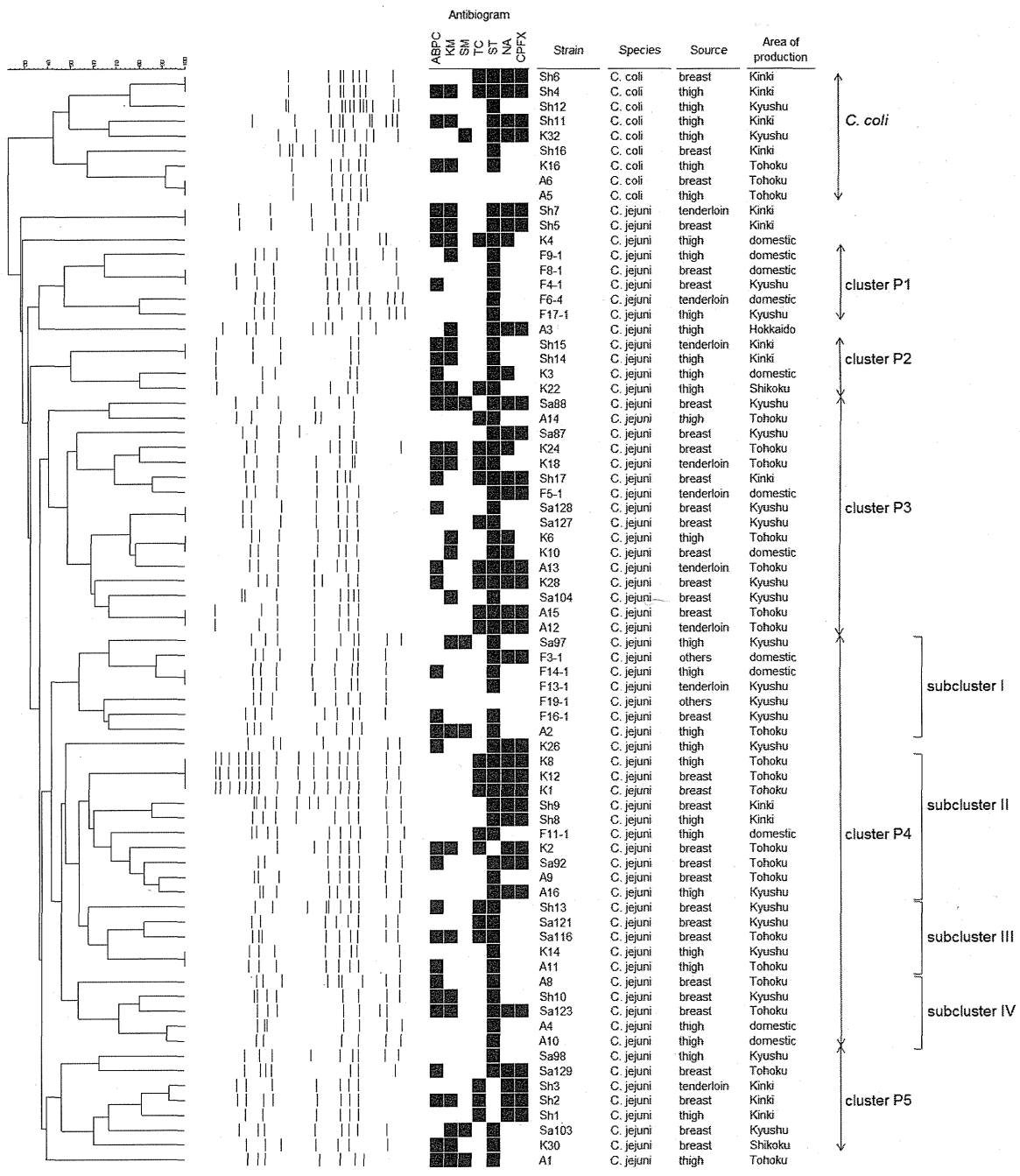


図5 鶏肉由来 *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の PFGE パターンのデンドログラム

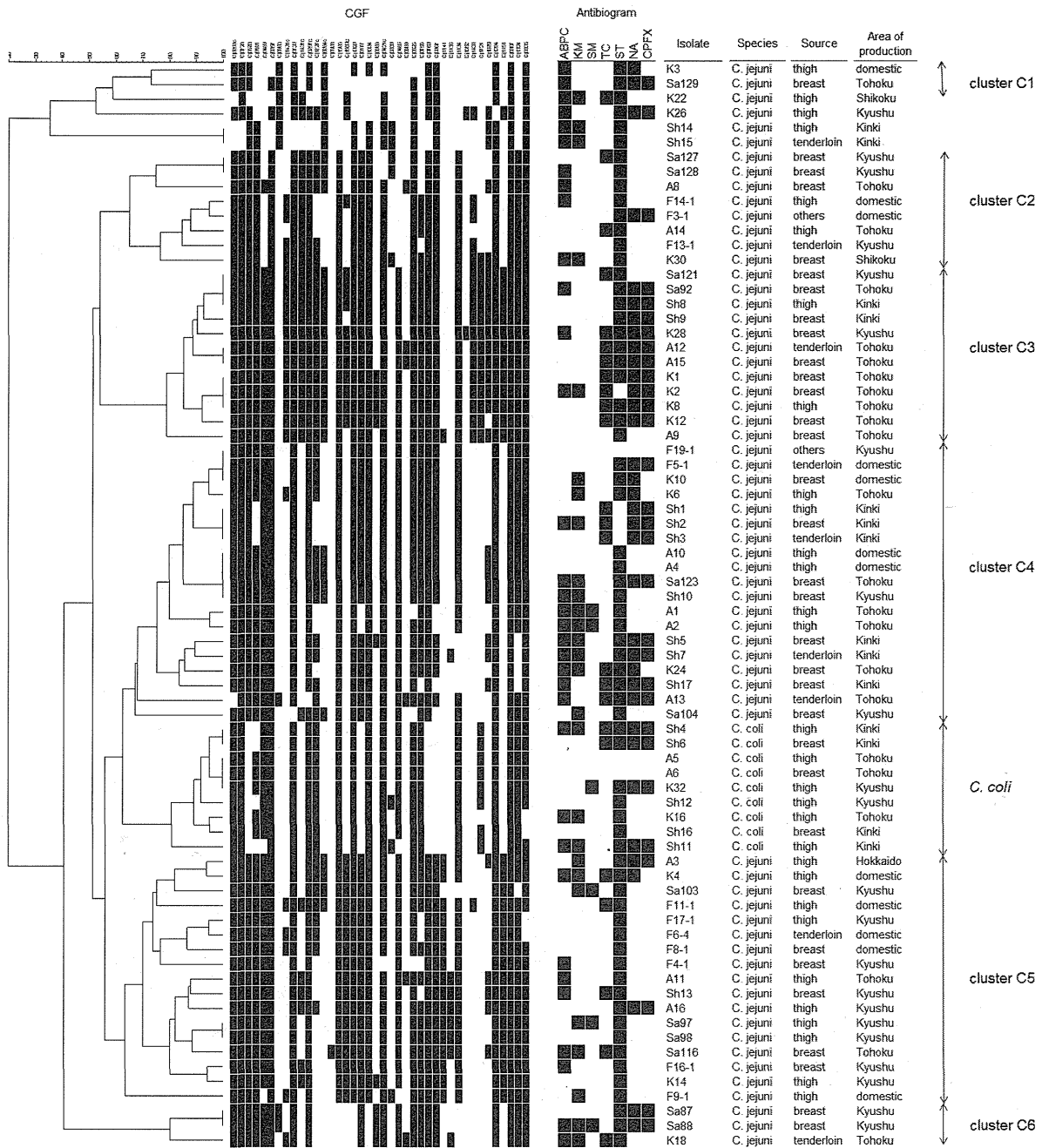


図6 鶏肉由来 *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の CGF40 パターンのデンドログラム