

カンピロバクター属菌のPFGE法（パルスフィールドゲル電気泳動法）を用いた疫学に関する試験研究事業 — 最終報告 —

○木澤千里，相原義之，山本和則，増子京子

要旨

本研究は茨城県で分離された *Campylobacter* 属菌についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）による分子疫学解析を実施し，汚染源究明に向けた科学的根拠を提供することを目的に，平成 24 年度から平成 27 年度までの 4 年間の計画で実施された。

平成 24 年度から平成 26 年度にかけて，*C.jejuni* および *C.coli* を対象とした PFGE 法の条件を検討し，プロトコルを決定した。このプロトコルを用いて平成 24 年度から平成 26 年度に収集した *C.jejuni* 408 株，*C.coli* 41 株に PFGE 法を実施し，疫学情報と併せて茨城県で分離された *Campylobacter* 属菌のデータベースを作成した。*C.jejuni* では異なる事例から分離された菌株の PFGE 型が一致した例が複数存在した。また，*C.jejuni* は遺伝的多様性が高く，菌株の入れ替わりが激しいことが分かった。

平成 27 年度は新たに分離された菌株に対して速やかに PFGE 法を実施し，結果とデータベースを比較して，過去に分離された菌株との関連を調べた。今後もデータベースを活用し，現場に迅速な情報提供を行いたい。

キーワード：*C.jejuni*，*C.coli*，PFGE 法，分子疫学解析，特別電源所在県科学技術振興事業

はじめに

カンピロバクター食中毒は，日本および茨城県において近年最も多く発生している細菌性食中毒であり^{1),2),3)}，従来の衛生細菌学的制御法の適用により多くの細菌性食中毒事例が著しく減少しているにも関わらずカンピロバクター食中毒はなかなか減少していない⁴⁾ことから，より積極的な対策が求められている。

茨城県衛生研究所では食中毒事例や収去食品，認定小規模食鳥処理場の衛生状況調査などの検査において *Campylobacter* 属菌の分離・同定試験を実施している。しかし，カンピロバクター食中毒は散发事例が多いこと，潜伏期が長いために原因不明となることが多い²⁾ことから，広域な *Campylobacter* 汚染の実態やその汚染源を把握することは難しい。

そこで本研究は，茨城県における

Campylobacter 属菌の汚染源究明に向けた科学的根拠を提供することを目的に，細菌の遺伝子型解析法として普及しているパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）を実施した。

材料および方法

(1) *Campylobacter* 属菌の収集・保存

平成 24 年度から平成 26 年度までに茨城県衛生研究所で分離あるいは搬入された *Campylobacter* 属菌について，菌種の同定を行った後 10% スキムミルクに懸濁して -80℃ で保存した。菌種の分離および同定は食品衛生検査指針⁵⁾に従い，馬尿酸加水分解試験で陽性の菌株を *C.jejuni*，陰性または弱陽性の菌株については Multiplex PCR 法⁶⁾により *C.jejuni* *hipO*，

Campylobacter 23SrRNA のバンドが確認された場合を *C.jejuni*, 馬尿酸加水分解試験で陰性かつ Multiplex PCR 法⁶⁾で *C.coli glyA*, *Campylobacter* 23SrRNA のバンドが確認された場合を *C.coli* と同定した。

(2) *C.jejuni* および *C.coli* の PFGE 法について

カンピロバクター食中毒の原因菌は、*C.jejuni* および *C.coli* が 90%以上を占めると報告されている⁷⁾。そこで本研究では、平成 24 年度から平成 26 年度にかけて *C.jejuni* および *C.coli* を対象にした PFGE 法の条件検討を行った。まず、*C.jejuni* を対象とした既報の PFGE 法を検討した。八尋らの方法⁸⁾に準じて PFGE 法を実施したところ、良好な結果が得られた。しかし、実験に 5~6 日を要したため、より短時間で結果が出せるようプロトコルを検討することにした^{9),10)}。

検討の結果、制限酵素は *Kpn I* を 1 サンプルあたり 40U で 2~4 時間反応させることにした。PFGE 法の制限酵素以外の条件は項目ごとに八尋らの方法⁸⁾と CDC の方法¹¹⁾を組み合わせで検討した(表 1)。その結果、実験は 3~4 日で済むよう改良できた。プラグの洗浄では Pefabloc SC の代わりに蒸留水を用いることで、より経済的に結果が出せるようになった。また、改良法でも既報に準じた結果と変わらない結果が出ることを確かめた。同様に *C.coli* についての PFGE 法を検討し、最終的に決定したプロトコルを図 1 に示した。

(3) PFGE 解析とデータベースの作成

PFGE 法は図 1 に示したプロトコルに準拠し、サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。PFGE 法で得られた電気泳動像(以下、PFGE 型)は BioNumerics Ver6.6 (Applied Maths) を用いて解析した。また、同日に同一検体から分離された複数菌株のうち PFGE 型が一致したものは同一クロー

ン株として扱い、結果の重複を避けるために解析には 1 株のみ用いた。

解析に用いる *C.jejuni* について、カンピロバクター免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて Penner 血清型別を行った。いずれの抗血清にも凝集しない場合を untypable (UT) とし、UT となった株については Poly らの方法¹²⁾に準拠して PCR 法による血清型別を実施した。

解析に用いる *C.jejuni* および *C.coli* の疫学情報(分離された検体の種類と情報、時期、場所、事例の情報など)および生化学性状(*C.jejuni* の場合は血清型など)を収集し、PFGE 型と併せてデータベース化した。

結果および考察

(1) *Campylobacter* 属菌の収集・保存および PFGE 解析の結果

C.jejuni 408 株(食中毒事例由来 218 株, 認定小規模食鳥処理場由来 130 株, 市販鶏肉由来 60 株)(表 2) および *C.coli* 41 株(食中毒事例由来 16 株, 認定小規模食鳥処理場由来 8 株, 市販鶏肉由来 17 株)を収集、保存した。

PFGE 法の結果、全ての菌株で良好な画像が得られ(data not shown), 重複した菌株を除き、解析には *C.jejuni* 235 株, *C.coli* 22 株を用いた。

表 2: 収集した *C.jejuni* の由来

菌株の由来	菌株数
食中毒事例(県内26件、県外9件)	218
認定小規模食鳥処理場(県内12カ所)	130
鶏肉(県内産2,県外産12,産地不明15)	60
計	408

(2) *C.jejuni* の Penner 血清型について

Penner 式血清型別の結果を図 2 に示した。茨城県で分離された *C.jejuni* の血清型は HS2 (17%) が最も多く、次いで HS23,36,53 (13%), HS4c (11%), HS15 (10%) が多かった(図 2)。一方、HS1/44c は世界中で多く分離されてい

るが¹³⁾、茨城県では3%と少なかった。これらの特徴はアジアや日本において見られる傾向¹³⁾とよく一致していた。しかし、HS23,36,53が13%と多く分離されたことは、茨城県に特徴的にみられた傾向だった。

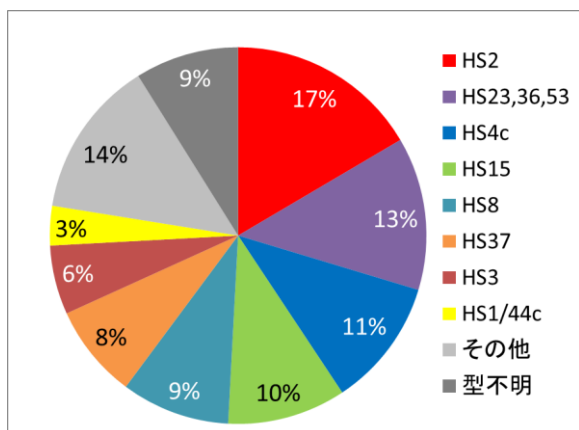


図2：茨城県で分離された *C.jejuni* 235 株の Penner 血清型

HS23,36,53 株の疫学情報を調べたところ、この血清型の菌株のみにみられる疫学的特徴は見出せず、茨城県で多く分離された理由は不明だった。今後も、茨城県で独自に多く分離される血清型に注目し、情報を集積していくことが重要だと思われる。

(3) *C.jejuni* の PFGE 解析について

当所で分離された *C.jejuni* は多様な PFGE 型を示し、分離された時期や由来検体の種類によって偏ったクラスターはみられなかった。市販鶏肉由来株は全て異なる PFGE 型に分類された。その理由として、本研究では様々な産地の鶏肉を調べたため、分離された菌株の遺伝的系統が多様だったことが考えられた。

一方、食中毒事例由来株および認定小規模食鳥処理場由来株は、異なる事例、異なる処理場から分離された菌株であるにも関わらず、PFGE 型が一致したものが複数認められた。具体的には、異なる認定小規模食鳥処理場由来

株で PFGE 型が一致した例が 6 例、異なる食中毒事例由来株で PFGE 型が一致した例が 3 事例（全て県内で発生した事例）、食中毒事例由来株と認定小規模食鳥処理場由来株の PFGE 型が一致した例が 1 例（県内で発生した事例）あった。

認定小規模食鳥処理場には県内および茨城県近隣で生産される鶏が搬入されてくるため、認定小規模食鳥処理場から分離される *C.jejuni* 株は県内および近隣県に分布する菌株の遺伝的系統をよく反映していると考えられる。今回、異なる処理場から分離された菌株の PFGE 型が一致した例が複数あったことから、県内および近隣県で共通の汚染源を持つ *C.jejuni* 株が何らかの経路によって拡散した可能性が示唆された。

異なる食中毒事例由来株で PFGE 型が一致した事例、食中毒事例由来株と認定小規模食鳥処理場由来株の PFGE 型が一致した事例については、疫学情報からはそれぞれの事例間の関連性を見出すことはできなかった。分離された *C.jejuni* 株がその時期に広く流行していた株だったか、あるいは事例間に何らかの間接的な共通点があったことが考えられた。

また、本研究において同じ PFGE 型の *C.jejuni* が長期間分離されることは稀であったことから、流行するクローン株は短期間に入れ替わっているのではないかと推察された。過去の研究から、*C.jejuni* は頻繁に組み換えが起こり、環境により適応した株が生じるとそのクローン株が一気に増加し、また次の適応株に入れ替わる現象が起こっていると推測されている¹⁴⁾。茨城県で分離された *C.jejuni* の解析でも、ある時期に多く見られた血清型や遺伝子型のクローン株が次の時期にはみられなくなり、また異なる性状のクローン株が分離されるという現象が起こっており、前述の推測

と一致している。

現在のところ病原性の特別強い菌株や長く流行している菌株はみられないが、今後も県内で分離される *C.jejuni* の分子疫学的系統の動向に注意したい。

(4) 平成 26 年度に食中毒事例から多く分離された *C.jejuni* HS15 株について

血清型 HS15 株はアジアで分離率が高い傾向にあると報告されている¹²⁾が、病原性に関する報告は特でない。そのため、血清型 HS15 株が特に病原性の高い *C.jejuni* かどうかは不明である。平成 26 年度は血清型 HS15 株が特に多く分離されていたため、過去に分離された HS15 株と比較するために、平成 24 年度から平成 26 年度に収集した *C.jejuni* HS15, 23 株の PFGE 解析結果を図 3 に示した。

平成 26 年度に県内で発生した集団下痢症事例(事例 1, 2, および 3)由来株は相同性 90%以上の同じクラスターに分けられた(図 3)。一方、平成 24 年に分離された菌株および平成 26 年度に県外産または産地不明の鶏肉から分離された菌株は異なるクラスターに分けられた(図 3)。事例間の直接的な共通点は不明だが、少なくとも平成 26 年 5 月から 10 月の間に共通の汚染源を持つ HS15 株が県内で拡散していた可能性が推測された。

(5) *C.coli* の PFGE 解析について

C.coli も *C.jejuni* と同様に多様な PFGE 型を示した。しかし、異なる事例由来株の PFGE 型が一致するような例はなかった。*C.coli* は分離される菌株数が少ないため、今後も積極的な菌株の収集とデータベースの充実が求められる。

(6) データベースの活用について

平成 27 年度には新たに分離された *Campylobacter* 属菌について速やかに PFGE 法を実施し、データベースと比較する試みを行っ

た。その結果、ある認定小規模食鳥処理場から分離された *C.jejuni* の PFGE 型がデータベースに登録されている PFGE 型と一致したため、この施設から過去に分離された *C.jejuni* についてより詳しく分析した。

その結果、平成 25 年度から平成 27 年度にかけてこの施設から分離された *C.jejuni* 16 株のうち 3 クラスター 13 株の PFGE 型が一致していた(図 4)。また、この施設からは血清型 HS55 の株が多く分離されており、HS55 はこの施設以外からはほとんど分離されていないことから、この施設に特徴的な株だと考えられた(図 4)。これらのことから、この施設は同じ汚染源から持続的に *C.jejuni* の汚染を受けている、あるいは施設内に長期間同じ *C.jejuni* 株が残存しているなどの可能性が考えられた。

本研究では汚染源の特定には至らなかったが、持続的に汚染をもたらしている存在、または汚染を拡大させている共通の媒介の存在が示唆されたことから、今後もデータベースの活用を進め、汚染源究明のための科学的根拠となるような情報提供を試みたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省:食中毒統計調査(Website)
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/112-1.html>
- 2) 仲西寿男ほか:食品由来感染症と食品微生物(2009), 中央法規出版, 347-364
- 3) 茨城県 保健福祉部 生活衛生課 食の安全対策室:食中毒発生状況(Website)
http://www.shoku.pref.ibaraki.jp/shokuchudo/ku/hassei_jyokyo/index.html
- 4) 中馬猛久ほか:カンピロバクター食中毒予防の現状と展望, 食品衛生研究, Vol.62, No.3, 7-15(2012)
- 5) 社団法人日本食品衛生協会:食品衛生検査指針 微生物編 2004, 225-235

- 6) Gehua Wang ほか: Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis*, and *C.fetus* subsp. *fetus*, JCM, 2002, Vol.40, No.12, 4744-4747
- 7) 国立感染症研究所 感染症情報センター: 病原微生物検出情報 Vol.27(2006), 167-175
- 8) 八尋俊輔ほか:厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」18 年度総括・分担研究報告書(2007), 219-230
- 9) 和田千里ほか:カンピロバクター属菌の PFGE 法(パルスフィールドゲル電気泳動法)を用いた疫学に関する試験研究事業-平成 25 年度報告-, 茨城県年報第 52 号(2014), 24-28
- 10) 木澤千里ほか: カンピロバクター属菌の PFGE 法(パルスフィールドゲル電気泳動法)を用いた疫学に関する試験研究事業-平成 26 年度報告-, 茨城県年報第 53 号(2015), 33-35
- 11) Centers for Disease Control and Prevention: PulseNet, Pathogens and Protocols, *Campylobacter jejuni* (Website)
<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/campylobacter.html>
- 12) Frederic Poly ほか: Discrimination of Major Capsular Types of *Campylobacter jejuni* by Multiplex PCR, JCM, 2011, Vol.49, No.5, 1750-1757
- 13) Brian L. Pike ほか: Global Distribution of *Campylobacter jejuni* Penner Serotypes: A Systematic Review, PLOS ONE, 2013, Vol.8 Issue6, e67375
- 14) Irving N. ほか: Molecular Population Genetic Analysis of *Campylobacter jejuni* HS:19 Associated with Guillain-Barre Syndrome and Gastroenteritis
- The Journal of Infections Disease, 2001, 184, 221-226

表1: 既報のPFGE法(*C. jejuni*, *Kpn I* を使用)の比較と本研究で用いた方法

PFGE法の作業内容		八尋らの方法 ⁸⁾	CDCの方法 ¹¹⁾	本研究で用いた方法
増菌	① Brucella Brothに菌を接種し、37-42°C, 18-24時間, 微好気培養 ② Brucella Agarに①の菌液を濃厚に接種し、37-42°C, 18-24時間, 微好気培養	① Brucella Brothに菌を濃厚に接種し、37°C, 14-18時間, 微好気培養	① Brucella Agarに菌を濃厚に接種し、42°C, 14-18時間, 微好気培養	Brucella Agarに菌を濃厚に接種し、42°C, 14-18時間, 微好気培養
プラグ作成	① 滅菌PBSに菌をMacFarland5程度に懸濁 ② ①の菌液500μlに1.0% SeaKem Gold Agarose 500μlを入れ混和する ③ サンプルプラグキヤスタターに約100μl注入し、固化させる	① 滅菌PBSに菌を浮遊させる(吸光度0.68, 610nm) ② ①の菌液400μlにProteinaseK(20mg/ml)を20μl加える ③ ②に1.0% SeaKem Gold Agaroseを400μl加える ④ サンプルキヤスタターに注入し、固化させる	八尋らの方法に準拠	八尋らの方法に準拠
溶菌処理	① 1.0%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTA 1ml + ProteinaseK 1mgに1アガロースブロックを浸す ② 50°C, 30rpm, 2-over night 振盪する	① 1.0%N-lauroylsarcosine加0.5M TE 5ml + ProteinaseK (20mg/ml) 25μlに1アガロースブロックを浸す ② 54-55°C, 150-175rpm, 1.5-2時間 振盪する	① 1.0%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTA 1ml + ProteinaseK 1mgに1アガロースブロックを浸す ② 50°C, 150-175rpm, 1.5-2時間 振盪する	① 1.0%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTA 1ml + ProteinaseK 1mgに1アガロースブロックを浸す ② 50°C, 150-175rpm, 1.5-2時間 振盪する
ProteinaseKの不活化	1mg/ml(4mM) PefablocSC in TEで50°C, 20分以上振盪を2回	なし	なし	なし
洗浄	TEで50°C, 20分以上振盪を2回	① 蒸留水で54-55°C, 10-15分振盪を2回 ② TEで54-55°C, 10-15分振盪を4回	CDCの方法に準拠	CDCの方法に準拠
制限酵素処理	① 制限酵素(<i>Kpn I</i>)用バッファア-で37°C, 20分以上振盪する ② <i>Kpn I</i> (30U/sample plug)の入ったバッファア-100μlで37°C, 2-over night 振盪する	① 制限酵素(<i>Kpn I</i>)用バッファア-で37°C, 10-15分振盪する ② <i>Kpn I</i> (40U/sample plug)+BSA(10mg/ml)の入ったバッファア-200μlで37°C, 4-6時間振盪する	① 制限酵素(<i>Kpn I</i>)用バッファア-で37°C, 10-15分振盪する ② <i>Kpn I</i> (40U/sample plug)の入ったバッファア-100μlで37°C, 2-4時間振盪する	① 制限酵素(<i>Kpn I</i>)用バッファア-で37°C, 10-15分振盪する ② <i>Kpn I</i> (40U/sample plug)の入ったバッファア-100μlで37°C, 2-4時間振盪する
ゲル作製	1.0% SeaKem Gold Agarose in 0.5 x TBEを加熱溶解し、ゲルを作製する	1.0% SeaKem Gold Agarose in 0.5 x TBEを加熱溶解し、ゲルを作製する	八尋らの方法, CDCの方法に準拠	八尋らの方法, CDCの方法に準拠
泳動条件	6.0V/cm, 6.8-38.4秒, 19時間, 12-14°C (泳動槽や温度, TBEのメーカーによって泳動距離が異なる)	6.0V/cm, 5.2-42.3秒, 18-19時間 (CHEF-DR III System(Bio Rad))	CDCの方法に準拠	CDCの方法に準拠
染色・撮影	① 0.3μg/mlのエチジウムブロミド in TBEで30分振盪 ② 蒸留水で振盪しながら2時間洗浄 (こまめに蒸留水を取り替える)	① 0.1μg/mlのエチジウムブロミド in TBEで30分振盪 ② 蒸留水で振盪しながら1-1.5時間洗浄 (こまめに蒸留水を取り替える)	CDCの方法に準拠	CDCの方法に準拠

-1 日目-

- ①カンピロバクターの増菌 ... ブルセラ基礎寒天培地に菌を濃厚に塗抹し、
42°C,14~18 時間,微好気培養する。

-2 日目-

- ②プラグ作成 ...①で培養した菌を滅菌綿棒でかきとり、
滅菌 PBS1ml に MacFarland5 程度に懸濁する。
滅菌 1.5ml チューブに菌液 500µl をとり、
1.0% SeaKem Gold Agarose 500µl を加える。
サンプルプラグキャストに約 100µl 注入し、固化させる。
- ③溶菌処理 ... 8ml 丸底チューブに溶菌液(1.0%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA + 1mg/ml
Protenase K)を 1ml とり、プラグを入れ、50°C, 150~175rpm で 1.5~2 時間
振盪する。
- ④洗浄 ... チューブから溶菌液を除去し、DW を 5ml 加え、50°C,150~175rpm で 10 分間
振盪してプラグを洗浄する。
これを DW でもう一度繰り返し、その後 TE buffer で同様の作業を 4 回行う。
(実験を中断する場合はここで 4°C保存する。)
- ⑤制限酵素処理 ...プラグを 2~2.5mm 幅にカットする。
制限酵素用 buffer 200µl を 1.5ml チューブにとり、カットしたプラグを
入れ、各酵素の至適温度で 10 分以上、30rpm 程度で振盪する。
チューブを氷で冷やした後、buffer を除去し、制限酵素を加えた
buffer を 100µl 加え、下記の条件で 30rpm で振盪する。
C.jejuni : Kpn I (40U,37°C,2~4 時間), *C.coli* : Sma I (40U,25°C,2 時間)
- ⑥ゲル作製 ... プラグをコームに貼付け、1.0% SeaKem Gold Agarose 100ml で固める。
- ⑦電気泳動 ... 下記の条件で泳動する。(CHEF-DR[®] III System(Bio Rad))
SW time Initial 5.2 秒 to final 42.3 秒, 19 時間, included angle 120°, 6.0V/cm, 14.0°C

-3 日目-

- ⑧染色・撮影 ... 1mg/ml エチジウムブロミドで 30 分染色した後、DW で 1.5 時間洗浄する。
洗浄中に DW をこまめに交換する。イルミネーターで撮影する。

図 1 : *Campylobacter* 属菌データベースの作成に用いた PFGE 法のプロトコール

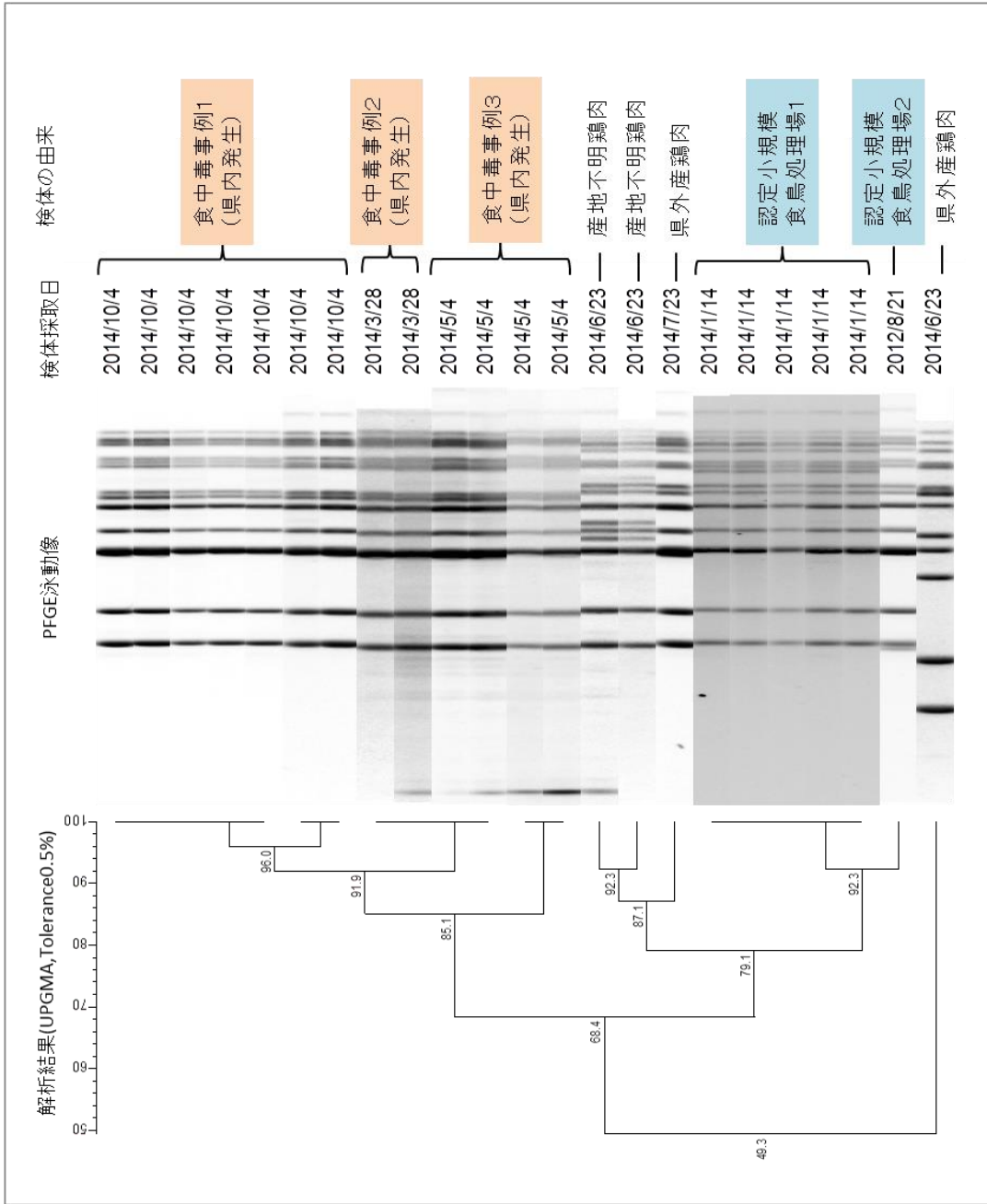


図3: 平成24年度～平成26年度に分離された*C.jejuni* HS15株のPFGE解析結果

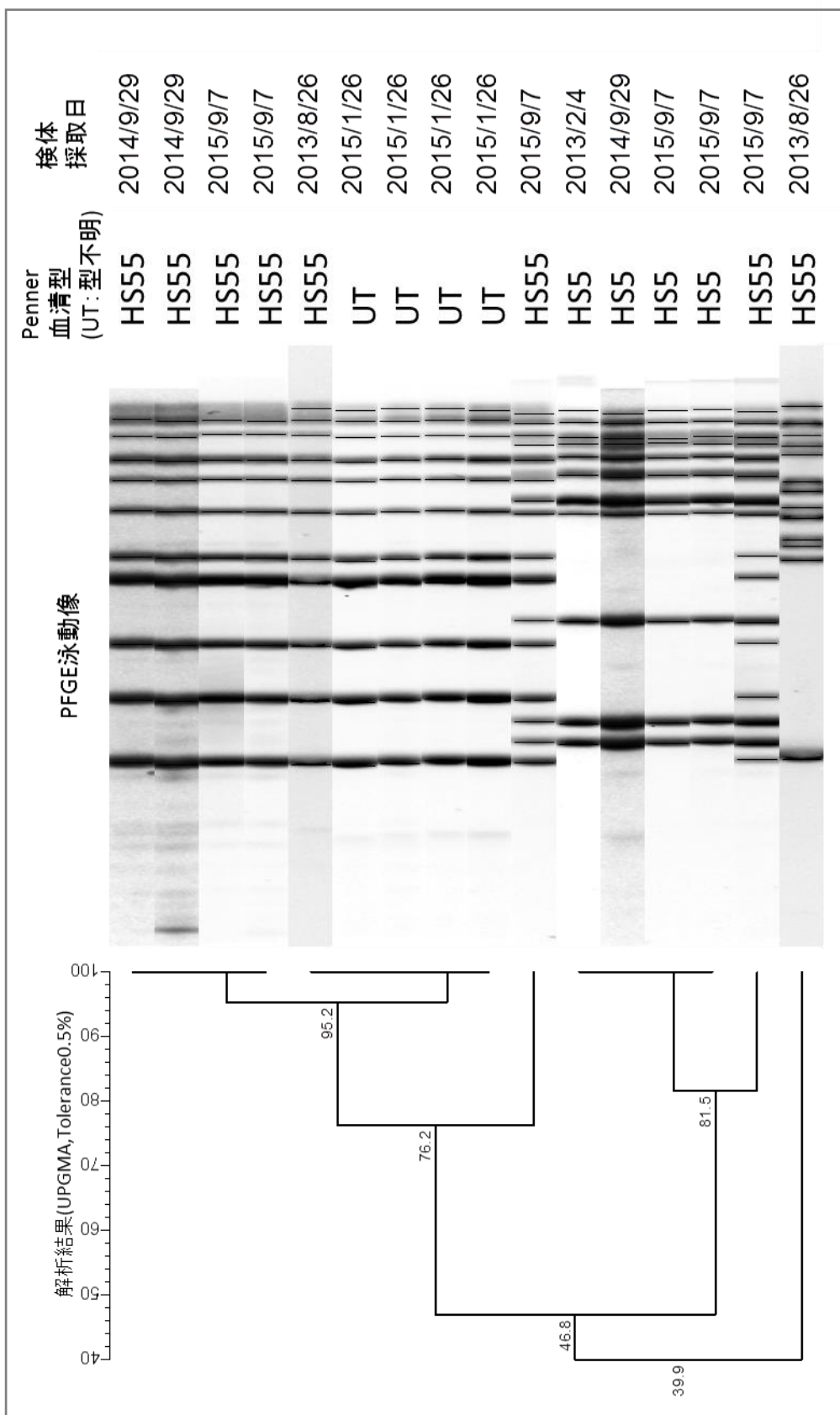


図4: 特定の認定小規模食鳥処理場から分離された*C.jejuni* のPFGE解析結果