

## 令和5年度（第18回）秋田県健康環境センター調査研究発表会抄録

衛生微生物技術協議会レファレンスセンター事業

## カンピロバクターレファレンスセンター

○今野貴之

## 1. はじめに

レファレンスセンターは、国立感染症研究所等の国の機関と地方衛生研究所で組織される衛生微生物技術協議会による病原体検査における施設間ネットワークの中心施設である。現在17あるレファレンスセンターでは、検査技術を維持するために機器や試薬等の整備、マニュアルの作成、精度管理の他、検査法の開発などの調査研究を担っている場合もある。健康環境センターではカンピロバクター、百日咳及び薬剤耐性菌の3つについて北海道・東北・新潟ブロックのレファレンスセンターを担当している。

カンピロバクターレファレンスセンターでは、長年、国内の血清型別システムを構築するための検討を行ってきた。カンピロバクターは、細菌性食中毒の主要な病因物質である。その健康被害の防止には、汚染源の把握やサーベイランスによる集団感染事例の早期探知などが必要であり、精度の高い疫学解析が求められる。今回、カンピロバクターレファレンスセンターでは、カンピロバクターの血清型をPCRによる遺伝子検査によって型別する改良Penner PCR型別法を開発したので、その概要をこれまでの活動を振り返りながら紹介する。

## 2. カンピロバクター

グラム陰性のらせん状に湾曲した形態を示す細菌で、家禽や家畜等に広く分布している。1970年代に入りヒトにも腸炎を起こすことが判明し、1982年には国内でも食中毒起因菌としてカンピロバクター・ジェジュニとカンピロバクター・コリが指定された。特に、カンピロバクター・ジェジュニは原因菌として分離頻度が高い。

感染した場合の症状としては、発熱、腹痛、下痢、血便を伴う腸炎症状がみられる。まれにギランバレー症候群等の神経症状を合併する場合があります、注意が必要である。

## 3. 血清型別システム開発の歴史

## 3.1 統一血清型別システムの要望

1970年代にカンピロバクターの優れた選択分離培地が考案され、世界各国でカンピロバクターに関する調査がされるようになった。それに伴い、より詳細に分析するための血清型別法についても、異なるシステムによる多くの研究報告がされるようになった。しかしながら、異なる方法では相互に型別結果を比較できないため、国際的に統一の血清型別システムが望まれるようになった。1981年にカンピロバクター国際型別委員会が設立され、1985年にはスライド凝集反応法による「Lior法」及び受身血球凝集反応法による「Penner法」の2種類が統一システムの基礎となることと決定した。

## 3.2 国内における研究の開始

1979年には、東京都において国内で初めて集団事例が確認され、原因食品の推定や汚染経路の調査に活用するための血清型別システムの開発が国内でも求められるようになった。1985年には厚生科学研究費補助金による「微生物検査におけるレファレンス・システムに関する研究」の分担研究として、カンピロバクター血清型別システムの開発に関する研究が立ち上がった。その中では、8か所の地方衛生研究所（秋田県、東京都、愛知県、大阪府、神戸市、広島県、山口県、熊本県）から成るワーキンググループが結成され、東京都で独自に開発された血清型別法（TCKシステム）を基に型別法の評価並びに血清型の分布状況について調査を進めることとなり、現在のレファレンスセンターの基盤となった。

## 3.3 レファレンスセンター活動の開始

1989年に厚生省感染症予防対策費の中に希少感染症診断技術向上事業費が計上され、秋田県

表 国内のカンピロバクター血清型別法

	Lior法	Penner法	改良Penner PCR
抗血清	自家調製	市販品	—
標的	易熱性抗原	耐熱性抗原	HS抗原遺伝子
種類	30	25	27
原理	スライド凝集法	受身血球凝集反応法	PCR
操作性	容易	煩雑	やや煩雑
型別率	約70%	約50%	約95%

を含めワーキンググループを構成していた地方衛生研究所を中心にカンピロバクターレファレンスセンターが発足した。Lior法及びPenner法の2種類が、国際的にカンピロバクターの血清型別システムとして採用されたことを受け、これまで実施してきたTCKシステムをベースに、手法として類似するLior法を国内の血清型別システムとすべく活動が行われた。これまでの成績を踏まえて、Lior法血清型標準株26種に加えて、国内で高頻度に分布するTCKシステムの血清型標準株4種の計30種に対する血清セットを分担作製し、各センターでブロック内の検査を請け負うことが活動の中心となった。

### 3.4 Penner法への移行

Penner法については、1993年に「カンピロバクター免疫血清」として25種類の型別血清が市販された。Lior法は、性能や操作性の面で優れた方法であったが（表）、市販されていないため、全国的に普及させることが難しかった。また、多くの地方衛生研究所で組織改編されたり、担当職員の人事異動等により、レファレンスセンター内で行ってきた診断用血清の自家調製もマンパワー不足等で困難となった。Penner法が市販されたことにより、本法による型別法を採用する施設が多くなり、国際的な論文報告でもPenner法よるものが大半となった。2009年にはレファレンスセンターとしてもLior法を廃止してPenner法に移行する方針が決まり、2016年にはLior法用血清の供給も完全に停止した。

### 4. 改良Penner PCR型別法

レファレンスセンターでの型別状況の調査では、2013年から2015年の間、Lior法では70%近い型別率をキープできていたが、Penner法で

は半数以上型別できない事態となっていた。そのため、国内の血清型別システムとしてPenner法を採用するにあたっては、その型別率の低さが大きな課題となっていた。しかし、この頃にはPenner法の対象としている抗原が莢膜多糖であることが明らかとなり、それらの遺伝子を対象にしたPCRによる型別が可能となっていた。そこで、レファレンスセンターでは国内で行われてきたPenner法に即した形にPCRによる型別法を改良するべく、PCRに用いるプライマーの選別・改良、試薬の変更等を行い、改良Penner PCR型別法を開発した

改良Penner PCR型別法を従来のPenner法による血清型別試験と比較した場合、ほとんどの血清型で良好な成績が得られ、結果の一致率は96.5%であった。また、従来、型別不能となっていた178株を調査したところ、93.3%にあたる166株が型別され、15の血清群に分類することができた。改良Penner PCR型別法を導入することにより、これまで課題となっていたPenner法の型別率の低さを補うことが可能となり、国内の血清型別システム構築への道が開けた。

### 5. さいごに

食中毒疑い事例の検査において、すでにくつかの事例では改良Penner PCR型別法の結果を保健所等に情報提供し、対応の参考にしてもらっている。また、本法は日本食品微生物学会雑誌に掲載され、それらを参考にレファレンスセンター以外の施設でも導入が進んでいる。レファレンスセンターでは、陽性コントロールとなるDNA試薬の配布などにより検査を支援しており、今後も国内の血清型別システム構築にむけて活動していく予定である。