

厚生労働科学研究費補助金「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」（平成 25～27 年度）

カンピロバクター Penner PCR 型別法の確立と有用性の検証

今野貴之 高橋志保 熊谷優子

カンピロバクターの血清型別法は、一般に Penner 法と呼ばれる受身血球凝集反応法により行われているが、型別率の低さが問題となっている。本研究では、Penner 法が対象にしている抗原遺伝子の特異性をもとにした PCR 型別法を確立した。また、従来法で型別不能もしくは複数血清型に型別された 21 株のうち 19 株を PCR 型別法により型別した。さらに、食中毒を疑う集団感染事例においても型別不能となった菌株の型別に活用し、行政対応上の有用性を示した。

1. はじめに

カンピロバクターによる食中毒の事件数は、細菌性食中毒の中で最も多く、ノロウイルスと並んで頻度の高い食中毒の病因物質となっている。カンピロバクターに起因する健康被害の防止対策には、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、菌の病原性解析などの細菌学的な研究など様々な取り組みが必要であり、血清型別による疫学的な解析がこれに役立っている。また、食中毒発生時においても、患者等から分離された菌株間の関連性を解明する上で、血清型別は有効な手段となっている。

カンピロバクターの血清型別法は、一般に Penner 法と呼ばれる受身血球凝集反応法により行われているが、型別率の低さが問題となっている¹⁾。本研究では Penner 法の型別率の低さを補うため、Penner 法が対象としている抗原について遺伝子の特異性をもとに分類可能な PCR 型別法を検討した。さらに、その有用性について検証するため、従来法で型別不能もしくは複数血清型に型別された菌株を用いて型別可能か検討した。また、実際の食中毒疑い事例の解析に活用し、菌株間の関連性について検討した。

2. 方法

2.1 Penner 法による血清型別試験

カンピロバクターの菌種の確認は、PCR 法により行った^{2,3)}。Penner 法の血清型別試験は、市販のキット（デンカ生研）を用い、受身血球凝集反応法により 25 種類の血清群に分類した(表 1)。

2.2 Penner PCR 型別法による抗原遺伝子の解析

Penner PCR 型別法は、Poly et al.⁴⁾の方法をもとに一部改変して行った。

3. 結果と考察

3.1 Penner PCR 法の確立

Poly らは、カンピロバクターの *C. jejuni* について、その主要な抗原遺伝子を 14 対のプライマーを用いた 2 つの Multiplex PCR により分類する方法を提唱した⁴⁾。この方法では、Penner 法の対象とする抗原遺伝子を HS1, HS2, HS3, HS4-complex, HS6, HS8/HS17, HS10, HS15/HS31, HS23/36, HS41, HS42, 及び HS53 に型別可能である。しかしながら、PCR に使用する Polymerase として Ex-taq HS (Takara), Multiplex PCR assay kit (Takara)を用いたところ、HS4-complex と HS41 に対する PCR の効率が著しく低下した。そこで、PCR の反応系を 2 つから 4 つに分割した。この際、国内の Penner 法で対象としていない HS42 について除外した。また、HS2 の PCR 増幅断片が 62 bp と小さく、検出感度が低かったことからプライマーの末端に 20 塩基ずつアデニンを付加し、増幅断片を 102 bp になるように変更した(図 1)。

国内の Penner 法の検査キットでは、その抗原を A 群から Z7 群まで一部抗原性の類似した型をまとめた血清群として検出している。そこで、対象としている抗原とそれに類似する抗原に対する PCR の特異性をカンピロバクターレファレンスセンター保有の標準株を用いて確認した。その結果、PCR 型別法で対象にしている抗

表1 Penner 法で型別可能な血清群の種類と含まれる抗原因子

| 血清群 | 抗原因子(HS) | 血清群 | 抗原因子(HS) | 血清群 | 抗原因子(HS) |
|-----|-------------------|-----|------------|-----|----------|
| A群 | 1, 44 | K群 | 12 | Y群 | 37 |
| B群 | 2 | L群 | 15 | Z群 | 38 |
| C群 | 3 | N群 | 18 | Z2群 | 41 |
| D群 | 4, 13, 16, 43, 50 | O群 | 19 | Z4群 | 45 |
| E群 | 5 | P群 | 21 | Z5群 | 52 |
| F群 | 6, 7 | R群 | 23, 36, 53 | Z6群 | 55 |
| G群 | 8 | S群 | 27 | Z7群 | 57 |
| I群 | 10 | U群 | 31 | | |
| J群 | 11 | V群 | 32 | | |

□ : PCR 型別法で検出可能だった抗原因子

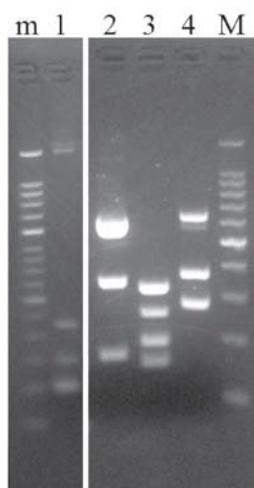


図1 Penner PCR 型別法

Lanes, m: 50 bp DNA size ladder, 1: 上から HS10, HS3, HS2, 2: HS1, HS8/HS17, HS23/36, 3: HS15/HS31, HS53, HS6, HS44, 4: HS4B, HS4A, HS41, M: 100bp DNA size ladder.

原因子を含む血清群のうち、D群ではHS50、R群ではHS53でPCRの増幅ができなかった。ただし、HS53については分離株を用いた解析で検出可能であることが確認されている。標準株のHS53が検出できなかった理由としては、レファレンスセンター保有の標準株とPoly et al⁴⁾が使用している標準株が異なっており、抗原遺伝子に違いがある可能性が考えられた。実際、分離株で検出されたPCRの増幅断片をシーケンス解析したところ、Poly et al⁴⁾の標準株と一致した。また、PCR型別法ではHS4-complexをHS4AとHS4Bの2つのPCRで検出しているが、HS4、HS13、HS43はHS4Aでのみ検出され、

HS16は両方のPCRで検出可能であった。

また、PCR型別法ではA群のHS1とHS44やR群のHS23/36とHS53はそれぞれの抗原因子として検出可能であり、従来のPenner法と同等以上の特異度で主要な抗原因子を検出可能であることが示された(表1)。

3.2 Penner PCR法の有用性の検証

平成26年に県内の医療機関から収集した散発下痢症患者由来47株と食肉から分離した13株について血清型別試験を行ったところ、21株が型別不能もしくは複数血清型に反応し、型別できなかった。そこで、これらの菌株についてPCR型別法を行ったところ、19株で型別が可能であった(表2)。PCR型別法により型別された19株の内8株はHS8/HS17であり特定の型の集積がみられた。この中には、鶏肉由来株もあり、汚染食品の流通の可能性が示唆された。

平成26年11月に発生した焼鳥店が原因施設と推定される食中毒疑い事例では、患者2名から分離された菌株のうち1株はG群に型別されたが、もう1株が型別不能となっていた。PCR型別法では、両株ともにHS8/HS17に型別され、菌株間の関連性を示すことができた。また、平成27年4月に発生した焼肉店が原因施設と推定された食中毒疑い事例では、PCR型別法により患者4名から分離された菌株がいずれも異なる型であることを明らかにした⁵⁾。カンピロバクターは食品中ではほとんど増殖できず、食品の汚染状況によっては同じ事例内で複数の血清型が確認されることもある。この事例においても単一食品の複数血清型の汚染を必ずしも否定することはできないが、カンピロバクター食中毒

においても共通の原因食品がある場合には、同一の血清型が分離される傾向にあることから、この事例においては施設による食品の衛生管理の不備による特定の汚染食品からの感染よりも複数の汚染食品の関与が想定された。

カンピロバクターの Penner PCR 型別法により、これまで問題となっていた Penner 法の型別率の低さを補うことが可能となり、より正確に菌株間の関連性を推定することができるようになった。これにより、集団感染の早期探知や食中毒等の事例対応時の原因究明に寄与することが期待でき、PCR 型別法の有用性が示唆された。

表 2 Penner 法と PCR 型別法の比較

| No. | 由来 | 血清型別試験 | Penner PCR型別法 |
|-----|----|--------|---------------|
| 1 | ヒト | B/S | HS2 |
| 2 | ヒト | B/L/S | HS2 |
| 3 | ヒト | — | HS2 |
| 4 | ヒト | — | HS2 |
| 5 | 鶏肉 | L/S | HS8/HS17 |
| 6 | 鶏肉 | L/S | HS8/HS17 |
| 7 | 鶏肉 | L/S | HS53 |
| 8 | 鶏肉 | L/S | HS2 |
| 9 | 鶏肉 | P/S | — |
| 10 | ヒト | G/S | HS8/HS17 |
| 11 | ヒト | — | — |
| 12 | ヒト | — | HS8/HS17 |
| 13 | ヒト | — | HS1 |
| 14 | ヒト | — | HS8/HS17 |
| 15 | ヒト | — | HS8/HS17 |
| 16 | ヒト | — | HS8/HS17 |
| 17 | ヒト | — | HS2 |
| 18 | ヒト | L/S | HS2 |
| 19 | ヒト | L/S | HS53 |
| 20 | ヒト | G/S | HS8/HS17 |
| 21 | ヒト | — | HS1 |

PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, *J Clin Microbial*, **35**, 1997, 2568–2572.

4) Poly F., Serichatalergs O., Schulman M., Ju J., Cates C.N., Kanipes M., Mason C., Guerry P.: Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR, *J Clin Microbial*, **49**, 2011, 1750–1757.

5) 今野貴之, 高橋志保, 檜尾拓子, 熊谷優子, 圓子隆信, 袴田知之, 金和浩: カンピロバクターの Penner PCR 型別が有用であった食中毒疑い事例への対応, *Infectious Agents Surveillance Report*, **36**, 2015, 161–162.

参考文献

- 1) 甲斐明美: カンピロバクターの型別方法の検討と分離菌株の特徴, 国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究平成 25 年度総括・分担研究報告書, 2014, 33–38.
- 2) Winters D.K., Slavik M.F.: Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes, *Mol Cell Probes*, **9**, 1995, 307–310.
- 3) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J., Stanley J.: