

原 著

広島県内で分離された*Campylobacter jejuni* (Penner血清型B群)の分子疫学的検討

東久保 靖, 井上 佳織, 竹田 義弘, 小川 博美

Molecular Epidemiological Investigation of *Campylobacter jejuni* Penner Serogroup B Isolated in Hiroshima Prefecture

YASUSHI TOUKUBO, KAORI INOUE, YOSHIHIRO TAKEDA and HIROMI OGAWA

(Received Sept. 9, 2001)

Molecular Epidemiological investigation of *Campylobacter jejuni* Penner serogroup B isolated from June 1998 to March 2001 in Hiroshima Prefecture was performed. In this investigation, the epidemiological marker of PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), and PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) were evaluated to analyze the relativity of the isolates. As a result, PCR-RFLP (*flaA*) was found not to be very discriminative methods. PFGE was found to be the most discriminatory. PCR-RFLP (*flaA*) and RAPD were performed better than PFGE in regard to the simplicity and rapidity of discriminatory. Accordingly, by using both methods jointly, the screening discriminatory of respective isolates was supposed to be valuable. The poultry isolates of the B poultry slaughterhouse and the patient isolates of the outbreak were respectively identical patterns according to three methods, suggesting that they were the identical origin.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, PCR-RFLP, RAPD, PFGE.

緒 言

カンピロバクター (*Campylobacter*) は人畜共通感染症原因菌の1つで、鶏などの家禽、牛、豚などの家畜、犬、猫などのペット、野生鳥類など多種の動物が保菌している [1-3]。ヒトへの感染は、主にこれらの動物の糞便によって汚染された食肉、生乳、水などの摂取や調理時の二次汚染によって起こるといわれている [1, 2, 4]。カンピロバクターによる食中毒は増加傾向にあり、絶えず件数、患者数で上位を占めており、2000年は件数で4位、患者数で7位であった [5]。また、小児を中心とした散発下痢症の起因菌としても、サルモネラと並んで多く検出されている [1, 5]。

1998年6月～2001年3月の間に、広島県内の各種動物についてカンピロバクターの汚染状況を調査した。その結果、鶏や牛を主とする各種動物からカンピロバクターが分離され、そのほとんどは*Campylobacter jejuni* (Cj)であった。分離されるCjのPenner血清型はD群、B群、A群、C群などが多いと報告されている [6, 7] が、今回の調査では型別不能(UT)、R群、B群が多く分離された。また、この調査期間中に、県内で学校給食を原因と

するカンピロバクター食中毒が発生し、Penner血清型B群のCj(CjB)が分離された。そこで、分離された動物由来および食中毒由来CjBについて、菌株相互の関連性を解析するために、PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)パターン、RAPD (random amplified polymorphic DNA)パターンおよびパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)パターンの各疫学マーカーによる検討を行ったので報告する。

材料および方法

1 供試菌株

1998年6月～2001年3月の間に県内で分離されたCjB 9株(A食鳥処理場鶏由来2株、牛由来2株、B食鳥処理場鶏由来2株、食中毒由来3株)、対照として牛由来Cj(Penner R群)1株、Cj標準株(Penner B群)1株および*C.coli*標準株1株の計12株を用いた。

2 カンピロバクターの同定

常法に従い、生化学的性状試験によりカンピロバクターの同定を行った。また、市販のカンピロバクター免疫

血清（デンカ生研）を用いて、血清型別試験を行った。

結 果

3 PCR-RFLP(*flaA*)パターン

PCR-RFLPは, Boerらの方法に準じて行った[8]. ただし, *flaA*遺伝子のPCRには, Wassenaarらの総説に記述のある forward primer (5'-ATGGGATTTTCGTATTAACAC-3') および reverse primer (5'-CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG-3') を合成して使用した [9]. なお, 増幅条件は, 変性 94℃ 1分, アニーリング 55℃ 1分, 伸長 72℃ 2分 で 35 サイクルとした.

得られたPCR産物を 10U/sample の *Dde* I および *Hinf* I で 37℃, 3 時間 反応させ切断した. 切断されたPCR産物の RFLPパターンを電気泳動後, 染色して観察した [8].

4 RAPDパターン

RAPD-PCRは, 既報のとおり行った [10,11]. ただし, プライマーには, Makinoらが報告した AP41 (5'-GCGATCCCCA-3'), AP43 (5'-GTGGATGCGA-3') および Mazurierらが報告した HLWL85 (5'-ACAACCTGCTC-3') を合成して使用した [12,13]. なお, HLWL85の増幅条件はアニーリング温度を 38℃ とした.

5 PFGEパターン

PFGEは, 既報のとおり行った [10,11]. ただし, 制限酵素には, *Sma* I および *Sal* I を用いた. なお, *Sma* I の反応温度は 25℃ で行った. PFGE泳動条件は, 1% PFCアガロースゲル, 0.5×TBE (14℃), 電圧 6 V/cm, パルス角度 120°, スイッチタイム 0.47~44.69秒, 泳動時間 20時間 18分 とした.

1 PCR-RFLP(*flaA*)パターン

PCR-RFLPパターンの結果は, Table 1 および Fig. 1 に示した. 供試 12 株は, *Dde* I で 5 種類, *Hinf* I で 6 種類のパターンが認められた. *Dde* I では, A 食鳥処理場鶏由来株および牛由来株の間と, B 食鳥処理場鶏由来株および食中毒由来株の間は, それぞれ同一のパターンを示した. これら由来株および対照株の間では, 異なったパターンを示した. *Hinf* I では, さらに A 食鳥処理場鶏由来株および牛由来株の間で異なったパターンを示した (Table 1 および Fig. 1).

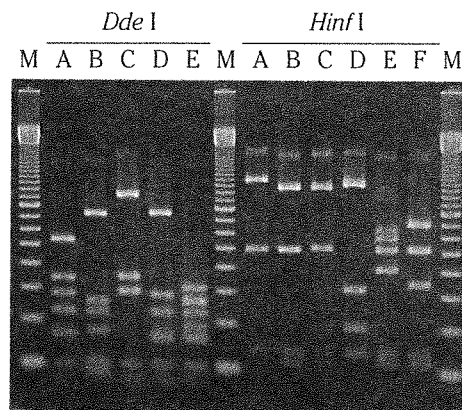


Fig.1. PCR-RFLP (*flaA*) patterns (*Dde* I and *Hinf* I) of *C.jejuni* Penner serogroup B isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M : 100 Base-Pair Ladder marker. (*Dde* I) Lanes A : strain No. 1 to 4, B : strain No. 5 to 9, C : strain No.10, D : strain No.11, E : strain No. 12. (*Hinf* I) Lanes A : strain No.1, 2, B : strain No.3, 4, C : strain No. 5 to 9, D : strain No.10, E : strain No.11, F : strain No. 12.

Table 1. Epidemiological analysis results of *C.jejuni* Penner serogroup B isolates in Hiroshima prefecture.

Strain	PCR-RFLP (<i>flaA</i>) patterns		RAPD patterns			PFGE patterns	
	<i>Dde</i> I	<i>Hinf</i> I	AP41	AP43	HLWL85	<i>Sma</i> I	<i>Sal</i> I
1 ¹⁾	A	A	i	i	i	I	I
2 ¹⁾	A	A	i	i	i	I	I
3 ²⁾	A	B	ii	ii a	ii	II a	II a
4 ³⁾	A	B	ii	ii b	ii	II b	II b
5 ⁴⁾	B	C	iii	iii	iii	III	III
6 ⁴⁾	B	C	iii	iii	iii	III	III
7 ⁵⁾	B	C	iii	iii	iii	III	III
8 ⁵⁾	B	C	iii	iii	iii	III	III
9 ⁵⁾	B	C	iii	iii	iii	III	III
10 ⁶⁾	C	D	iv	iv	iv	IV	IV
11 ⁷⁾	D	E	v	v	v	V	V
12 ⁸⁾	E	F	vi	vi	vi	VI	VI

1): poultry isolate of A poultry slaughterhouse, 2): cattle isolate (isolated in 1999), 3): cattle isolate (isolated in 2000), 4): poultry isolate of B poultry slaughterhouse, 5): patient isolate of the outbreak, 6): cattle isolate of *C.jejuni* Penner serogroup R, 7): control of *C.jejuni* Penner serogroup B, 8): control of *C.coli*.

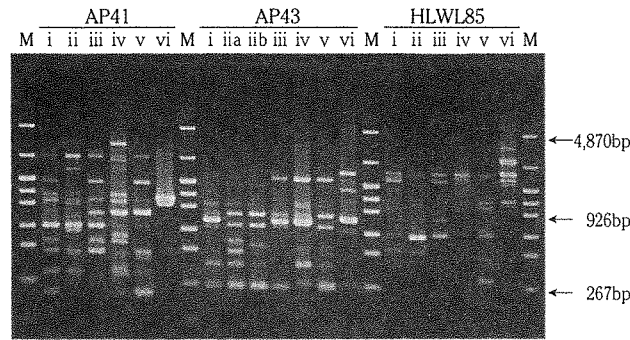


Fig. 2. RAPD patterns (AP41, AP43 and HLWL85) of *C. jejuni* Penner serogroup B isolates in Hiroshima prefecture. Lanes M: pHY Marker. (AP41) Lanes i: strain No.1, 2, ii: strain No.3, 4, iii: strain No.5 to 9, iv: strain No.10, v: strain No.11, vi: strain No.12. (AP43) Lanes i: strain No.1, 2, ii a: strain No.3, ii b: strain No.4, iii: strain No.5 to 9, iv: strain No.10, v: strain No.11, vi: strain No.12. (HLWL85) Lanes i: strain No.1, 2, ii: strain No.3, 4, iii: strain No.5 to 9, iv: strain No.10, v: strain No.11, vi: strain No.12.

2 RAPDパターン

RAPDパターンの結果は、Table 1 およびFig. 2 に示した。供試12株は、AP41およびHLWL85で6種類、AP43で7種類のパターンが認められた。AP41およびHLWL85では、B食鳥処理場鶏由来株および食中毒由来株は同一のパターンを示した。それ以外の由来株および対照株は由来ごとに異なったパターンを示した。AP43では、さらに牛由来2株の間で異なったパターンを示した (Table 1 およびFig. 2)。

3 PFGEパターン

PFGEパターンの結果は、Table 1, Fig.3および4に示した。供試12株は、*Sma* I および *Sal* I で7種類のパターンが認められた。B食鳥処理場鶏由来株および食中毒由来株は、同一のパターンを示した。それ以外の由来株および対照株は、由来ごとに異なったパターンを示した。さらに、牛由来2株の間では、1~2バンド程度の相違ではあるが、異なったパターンを示した (Table 1, Fig.3 および4)。

考 察

カンピロバクターの疫学的調査の手段としては、従来から血清型別、薬剤感受性パターンなどの疫学マーカーが用いられている [6, 7, 14, 15]。動物由来株における血清型は型別不能になることも多く、同じ血清型に型別されてもその由来が同一であるとの確証は必ずしも高くない。薬剤感受性試験は簡便であるが、継代などの要因によって菌株の特性を安定的に保持することが難しい。近年はこれらの疫学マーカーに加えて、PCR-RFLP (*flaA*) パターン、RAPDパターンおよびPFGEパターンなどが用いられている [3, 4, 8, 9, 13, 15, 16]。PCR-RFLP (*flaA*) 法およびRAPD法は、手法的にも簡便で迅速性に優れ、PCR機器さえあればどの実験室でも実施が可能である。

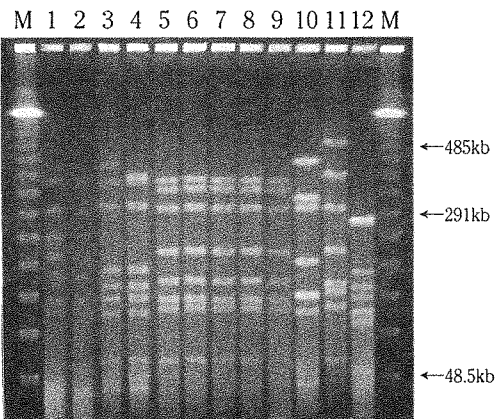


Fig. 3. PFGE patterns (*Sma* I) of *C. jejuni* Penner serogroup B isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M: lambda ladder marker, 1, 2: poultry isolate of A poultry slaughterhouse, 3: cattle isolate (isolated in 1999), 4: cattle isolate (isolated in 2000), 5, 6: poultry isolate of B poultry slaughterhouse, 7 to 9: patient isolate of the outbreak, 10: cattle isolate of *C. jejuni* Penner serogroup R, 11: control of *C. jejuni* Penner serogroup B, 12: control of *C. coli*.

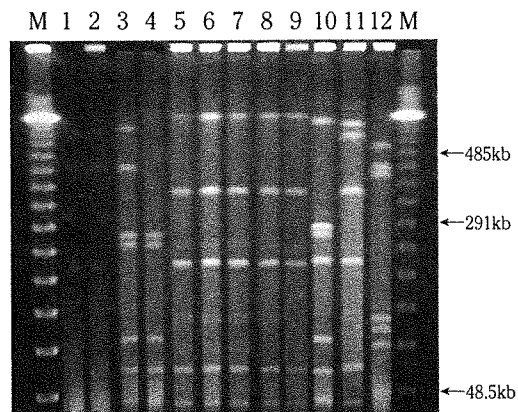


Fig. 4. PFGE patterns (*Sal* I) of *C. jejuni* Penner serogroup B isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M: lambda ladder marker, 1, 2: poultry isolate of A poultry slaughterhouse, 3: cattle isolate (isolated in 1999), 4: cattle isolate (isolated in 2000), 5, 6: poultry isolate of B poultry slaughterhouse, 7 to 9: patient isolate of the outbreak, 10: cattle isolate of *C. jejuni* Penner serogroup R, 11: control of *C. jejuni* Penner serogroup B, 12: control of *C. coli*.

PFGE法は高価な機器が必要であり, 経済性や簡便性でも前法に劣るが, 全ゲノムDNAを対象とした解析が可能で菌株間の識別能が高い。

PCR-RFLP(*flaA*)法は, 海外ではカンピロバクターの疫学的解析に汎用され, 有用であると報告されている [4, 8, 9, 16]. 今回の結果では, 他の2法でパターンが異なった由来株間でも同一パターンを示すものもあり, 識別能はあまり高くないと考えられた。しかし, 対照株とは明確にパターンが異なっていたことから, 複数の適切な制限酵素を用いることにより, 疫学マーカーとしては有用と考えられた。

RAPD法も, カンピロバクターの疫学的解析に有用であると報告されている [9, 13, 15]. 今回の結果でも, 由来ごとに明確に識別することが可能であった。しかし, RAPD法では, 増幅の温度条件やPCR試薬によって結果が異なる場合や, プライマーによっても遺伝的に異なる菌株間で類似したパターンを示す場合もある。さらにPCR条件, プライマー等の検討は必要であるが, 疫学マーカーとしては非常に有用と考えられた。

PFGE法は, カンピロバクターの疫学的解析に最も汎用されており, 他の疫学マーカーと比べてもより高い識別能を有すると報告されている [3, 8, 9, 15, 16]. 今回の結果でも, 検討した疫学マーカーの中では識別能が最も高いと考えられた。しかし, PFGE法でも, 用いる制限酵素によっては遺伝的に異なる菌株間でも類似したパターンを示す場合もあり, 複数の制限酵素を用いた解析手法も必要であると考えられた。

このように, PFGE法はより精度の高い識別法として重要であるが, 手技の煩雑さと迅速性に難点がある。従って, 菌株相互の関連性を解析するためには, PCR-RFLP(*flaA*)法とRAPD法の2法を併用することにより, 簡便で迅速な識別が可能であると考えられた。今回の供試菌株のうち, 3法でそれぞれ同一パターンであったB食鳥処理場鶏由来株および食中毒由来株は同一由来であり, それ以外の株はそれぞれ由来が異なるものと推察された。

また, 牛由来2株は, PFGEでも1~2バンドの相違がみられるだけであることから, 遺伝的に近縁であると考えられた。鶏由来株では, 同一処理場内でも分離時期が異なる場合, 菌株のPFGEパターンに相違がみられると報告されている [16]. 今回の牛由来2株も分離時期が異なることから, これを追認するものであった。

今後, カンピロバクターを原因とする食中毒, 散発下痢症のさらなる増加が予想されることから, 汚染源およ

び汚染経路を解明するため, さらに多くの菌株(血清型別不能株を含む)を供試して精査する必要があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 検体採取にご協力いただいた広島県および福山市食肉衛生検査所の職員の方々に感謝します。

文 献

- [1] 伊藤 武(2000): 食水系感染症と細菌性食中毒(新訂), 336-362, 東京, 中央法規出版。
- [2] 伊藤 武, 高橋正樹, 斉藤香彦他(1988): 感染症誌, 62, 17-25.
- [3] Hänninen, M. L., Hakkinen, M., and Rautelin, H. (1999): Appl. Environ. Microbiol., 65, 2272-2275.
- [4] Nachamkin, I., Bohachick, K., and Patton, C. M. (1993): J. Clin. Microbiol., 31, 1531-1536.
- [5] 厚生省生活衛生局食品保健課(2001): 食品衛生研究, 51(9), 110-195.
- [6] 伊藤 武, 斉藤香彦, 新垣正夫他(1988): 臨床と微生物, 15(1), 88-96.
- [7] 椿本 亮, 財津修一, 池田嘉子他(1998): 福岡市保環研報, 23, 41-45.
- [8] Boer, P., Duim, B., Rigter, A., et al. (2000): J. Clin. Microbiol., 38, 1940-1946.
- [9] Wassenaar, T. M. and Newell, D. G. (2000): Appl. Environ. Microbiol., 66, 1-9.
- [10] 東久保 靖, 竹田義弘, 小川博美(1999): 日獣会誌, 52, 189-193.
- [11] 東久保 靖, 竹田義弘, 小川博美(2000): 広島県獣医学会雑誌, 15, 98-101.
- [12] Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., et al. (1994): J. Clin. Microbiol., 32, 65-69.
- [13] Mazurier, S., Giessen, A., Heuvelman, K., et al. (1992): Lett. Appl. Microbiol., 14, 260-262.
- [14] Bopp, C. A., Birkness, K. A., Wachsmuth, I. K., et al. (1985): J. Clin. Microbiol., 21, 4-7.
- [15] 小野一晃, 大塚佳代子, 斎藤章暢他(2000): 埼玉衛研所報, 34, 52-56.
- [16] Wassenaar, T. M., Geilhausen, B., and Newell, D. G. (1998): Appl. Environ. Microbiol., 64, 1816-1821.