

PCR法による *Campylobacter jejuni* の血清型別法の検討Examination of the Serotyping of *Campylobacter jejuni* Using the PCR Method

岩下 陽子 関 和美 福田 千恵美 西山 由加里
Yoko IWASHITA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA Yukari NISHIYAMA

要 旨

Campylobacter jejuni の菌株を用いて Penner 型別における PCR 法の有用性について検討を行った。平成 25 年度から 30 年度に分離された菌株 41 株のうち、従来用いていた受身血球凝集反応法 (PHA 法) で型別可能であった株は 11 株 (26.8%) のみであったが PCR 法を用いることで 37 株 (90.2%) に向上した。また、平成 20 年度から 30 年度に分離された菌株のうち、PHA 法で型別可能であった 23 株について PCR 法を用いて型別したところ、19 株 (82.6%) は二つの方法で一致した。PCR 法を用いることにより、これまで課題となっていた型別率の低さを補うことができ、食中毒等の感染源の究明に有用である。今後もさらに多くの血清型の株を用いて検討を進めていきたい。

キーワード: *Campylobacter jejuni* 血清型 Penner PCR 法

I はじめに

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) は、食中毒や細菌性下痢症の主要な原因菌である。その感染経路や推定原因食品の汚染経路を追求するための手法として血清型別が有用である。*C. jejuni* の血清型別法には Penner 型別法や Lior 型別法が知られているが、そのうち現在は試薬類が市販されている受身血球凝集反応法 (PHA 法) を用いた Penner 型別法を行っている。しかし、平成 25~29 年度に鶏肉から分離された株の 69.7% が型別不能となるなど型別率が低く型別率の向上が望まれることを前報で報告した¹⁾。近年 PCR を用いた遺伝子解析が報告され²⁾、従来法では型別不能であった株も型別が可能となる事例が報告されるなど、その有用性が期待されている³⁾。疫学調査の質の向上と検査の効率化に資することを目的に、今回これらの方法の検討と有用性についての評価を行った。

II 方法

1 供試菌株

(1) 型別率

平成 25 年度~30 年度に、カンピロバクター等汚染実態調査事業の検体として採取された鶏肉から分離された *C. jejuni* の菌株 41 株。

(2) 型別一致率

平成 20 年度~30 年度に、カンピロバクター等汚染実態

調査事業の検体として採取された鶏肉から分離された *C. jejuni* の菌株のうち、PHA 法で型別可能であった菌株 23 株。

2 検査方法

(1) PCR 法

供試菌株 1~3 コロニーを 5% キレックス溶液 200 μ l に懸濁し、100°C 10 分加熱後、15000rpm 90 秒遠心分離した上清をテンプレートとした。

Poly F らの方法²⁾ に準拠し、マルチプレックス PCR 法で遺伝子増幅を行い、得られた増幅産物をアガロース電気泳動法により検出を行った。プライマーの組み合わせは衛生微生物技術協議会リファレンスセンターで検討を行っている秋田式簡便法 (非公開)⁴⁾ に準拠した。

(2) PHA 法

感作血球調整試薬 (デンカ生研) およびカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いて PHA 法による Penner 型別を行った。

PCR 法、PHA 法で型別できる抗原因子と血清群の組み合わせを表 1 に示す。

III 結果

1 型別率

菌株 41 株のうち、PHA 法で型別可能であったのは 11 株 (26.8%) のみであり、残りの 30 株は市販されている 25 種類のどの血清にも凝集せず型別不能であった。型別可

能であった株はL群4株、C群3株、B群1株、N群1株、Y群1株、Z₆群1株であった(図1)。PCR法で型別可能であったのは37株(90.2%)であった(図2)。型別可能であった株は、G群/HS17(HS8/HS17)が8株、B群(HS2)が7株、A群(HS1が4株、HS44が1株)が5株、L群/HS58(HS15/HS31)が5株、C群(HS3)が3株、D群(HS4A+HS4B)が3株、E群(HS5/HS31+HS45)が3株、R群(HS53)が1株、U群(HS5/HS31+HS15/31)が1株、Y群(HS37)が1株であった(図2)(表2)。また、PHA法で型別不能株30株のうち28株(93.3%)はPCR法で型別することが可能であった(図3)。PHA法のみで型別可能であったのは2株で、N群1株とZ₆群1株であった。

2 型別一致率

菌株23株の結果を図4に示す。23株中19株(82.6%)はPHA法とPCR法の結果が一致した。PCR法では型別不能となった株が2株(N群1株、Z₆群1株)、PHA法とPCR法の結果が不一致となった株は2株であった。不一致となった株は、PHA法でC群であったがPCR法ではL/HS58であった株が1株、PHA法ではN群であったがPCR法ではL/HS58であった株が1株であった。

表1 検出対象とした抗原因子と血清群の組み合わせ

抗原因子(HS)	血清群(群)	抗原因子(HS)	血清群(群)
2	B	6	F
3	C	53	R
10	I	32	V
55	Z ₆	37	Y
19	O	38	Z
18	N	41	Z ₂
23/36	R	4A	D
8/17	G/HS17	4B	
1	A	15/31	L/U/HS58
44		5/31	E/U
57	Z ₇	45	E/V/Z ₄ /HS60
12	K	52	Z ₅
27	S	11	J
		21	P

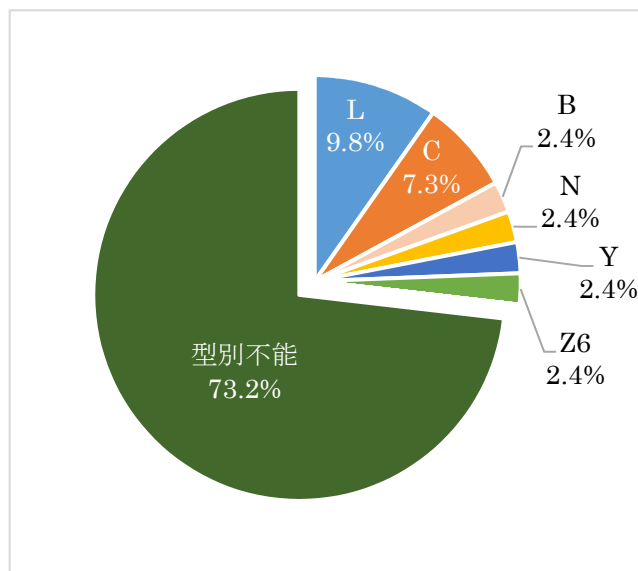


図1 PHA法の型別結果 (平成25年度~30年度)

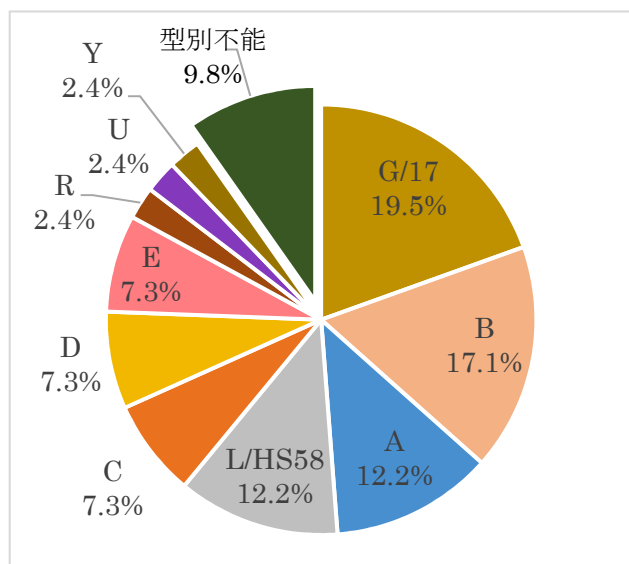


図2 PCR法の型別結果 (平成25年度~30年度)

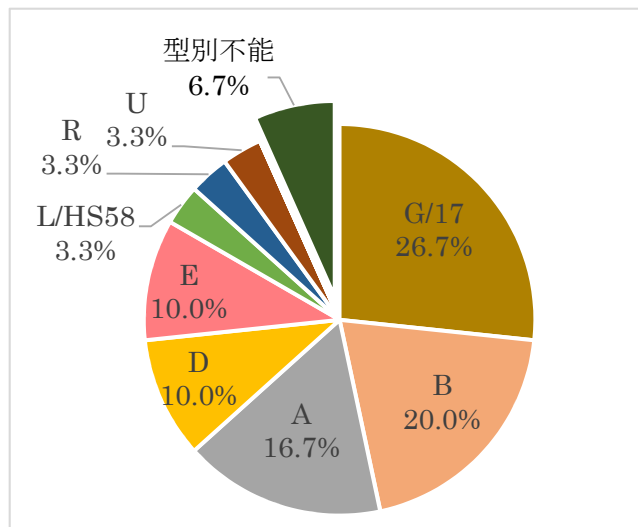


図3 PHA法で型別不能であった株のPCR法の型別結果 (平成25年度~30年度)

表2 PCR法の型別結果(平成25年度~30年度)

血清型 (群)	株数		
	全菌株	PCR法で のみ検出 可能	PCR, PH A法両方で 検出可能
G/17	8	8	0
B	7	6	1
A	5	5	0
L/HS58*	5	1	4
C	3	0	3
D	3	3	0
E	3	3	0
R	1	1	0
U	1	1	0
Y	1	0	1
型別不能	4	2	2
合計	41	30	11

※ HS58は抗原因子

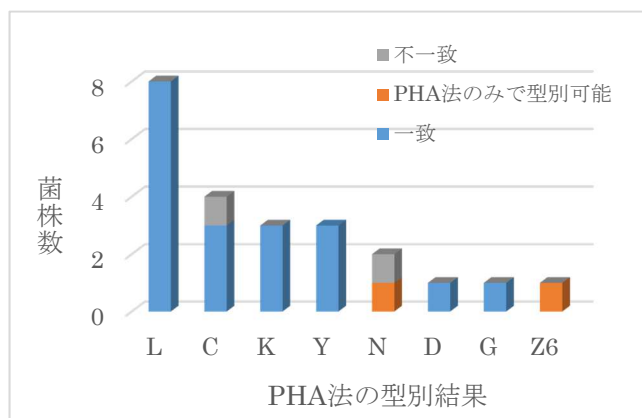


図4 PHA法とPCR法の型別結果の一致、不一致数
(平成20年度~30年度)

IV 考察

型別率の比較のために用いた41株のうち、PHA法で型別可能であった株は11株(26.8%)であったが、PCR法では37株(90.2%)と型別率が向上した。PHA法のみで型別可能であった株はN群1株、Z₆群1株の2株であった。PCR法でC群、Y群と型別された株はすべてPHA法でも型別可能であった。A群、D群、E群、G群、R群、U群はすべてPHA法では型別不能であった。L群は5株中4

株、B群は7株中1株がPHA法では型別可能であった(表2)。

型別結果の比較で用いた23株のうち、PHA法とPCR法で不一致であった2株はPHA法ではC群、N群であったがいずれの株もPCR法ではL/HS58であった。

PCR法を用いることにより、これまでのPHA法での型別率の低さを補うことができ、食中毒等の感染源の究明に有用であると考え、PHA法のみで型別可能であった例もあるので、PHA法の必要性も含めて検討していきたい。

V まとめ

PHA法では型別可能株は26.8%のみであったが、PCR法を用いることで90.2%が型別可能となり型別率が向上した。

PHA法で型別可能であった株の82.6%はPCR法と型別が一致した。不一致であった2株はPHA法ではC群とN群が1株ずつであったが、いずれの株もPCR法ではL/HS58であった。

PCR法を用いることにより、これまで課題となっていた型別率の低さを補うことができ、食中毒等の原因究明に有用であると考え。

今後もPHA法の必要性も含めて検討していきたい。

文献

- 1) 岩下陽子 他:鶏肉における *Campylobacter jejuni* の検出状況 第3報 香川県環境保健研究センター所報, 17 79-85(2018)
- 2) Poly F et al. :Updated *Campylobacter jejuni* capsule PCR multiplex typing system and its application to clinical isolates from South and Southeast Asia, PLoS One, 10(12), e0144349 (2015)
- 3) 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—秋田県 IASR Vol. 36 p. 161-162: 2015年8月号
- 4) 衛生微生物技術協議会第40回研究会(熊本) レファレンスセンター等報告
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/reference.html>