

PCR法による *Campylobacter jejuni* の血清型別法の検討 (第2報)Examination of serotyping method of *Campylobacter jejuni* by PCR method (2<sup>nd</sup> Report)

岩下 陽子 多田 郁美 関 和美 福田 千恵美  
Yoko IWASHITA Ikumi TADA Kazumi SEKI Chiemi FUKUDA

## 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 20 年 4 月から 30 年 3 月に鶏肉から分離された菌株 54 株と平成 30 年 4 月から令和 2 年 3 月の間にヒトから分離された菌株 23 株を加えた 77 株について実施した。従来法である PHA 法で型別可能であったのは 77 株中 32 株(41.6%)であったが、PCR 法では 72 株(93.5%)に向上し、カンピロバクター感染症や食中毒事例の疫学調査の精度向上が期待される。

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

## I はじめに

*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) はグラム陰性らせん状桿菌であり、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り、現在は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が、型別率が低く型別率の向上が望まれている。近年 PCR を用いた遺伝子解析が報告され<sup>1)</sup>、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、型別率が向上することにより有用性が期待されている<sup>2,3)</sup>。前報<sup>4)</sup>で、鶏肉より分離された *C. jejuni* を用いて PHA 法とマルチプレックス PCR 法の両方法の結果を比較し報告したが、今回はこれに加え、ヒト糞便から分離された菌株 23 株を加え有用性についての評価を行ったので報告する。

## II 方法

## 1 供試菌株

平成 30 年 4 月から令和 2 年 3 月の間に感染症発生动向調査および有症苦情事例の検体として当センターに搬入されたヒトの糞便から分離された *C. jejuni* 23 株に、前報<sup>4)</sup>で報告した平成 20 年 4 月～30 年 3 月に、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 54 株を加えた合計 77 株。

## 2 検査方法

## (1) PHA法

感作血球調整試薬 (デンカ) およびカンピロバクター免疫血清 (デンカ) を用い、添付説明書に従って PHA 法による Penner 型別を行った。本セットに含まれている 25 種類の免疫血清のどの型にも特異的凝集が見られなかったものは型別不能 (UT: Untypable) とした。

## (2) PCR法

供試菌株 1～3 コロニーを釣菌し 5%キレックス溶液 200  $\mu$ l に懸濁し、100°C 10 分間加熱後、15000rpm 90 秒遠心分離した上清を鋳型 DNA とした。

Poly らの方法<sup>1)</sup>に準拠し、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)<sup>5)</sup>を用いて、Mix 1、Mix 2、Mix 3、Mix 4 の 4 グループに分け (表 1)、マルチプレックス PCR 法で遺伝子増幅を行った。得られた増幅産物はアガロースゲル電気泳動法により検出を行った。いずれのプライマーにも増幅が確認できなかったものを型別不能 (UT: Untypable) とした。

## III 結果

## 1 PHA法

供試菌株 77 株のうち、型別可能であったのは 32 株 (41.6%) であり、残りの 45 株は型別不能であった。型別可能であった株は多い順から L 群 14 株、C 群 4 株、K 群 3 株、Y 群 3 株、N 群 2 株、B 群 1 株、D 群 1 株、F 群 1 株、G 群 1 株、P 群 1 株、Z<sub>6</sub>群 1 株であった (表 2)。

## 2 PCR法

供試菌株 77 株のうち、型別可能であったのは 72 株

(93.5%)であった。型別不能であった株は5株であった。(表2)

型別可能であった株は、多い順からG群/HS17 (HS8/H S17) 19株、L群/HS58 (HS15/HS58) 18株、B群 (HS2) 8株、A群5株 (A群に含まれる因子のうちHS1 4株、HS4 4 1株)、D群 (HS4A またはHS4B) 4株、C群 (HS3) 3株、E群 (HS5/HS31+ E/V/Z<sub>4</sub>/HS60) 3株、K群 (HS12) 3株、Y群 (HS37) 3株、R群 (HS53) 2株、F群 (HS6/HS7) 1株、I群 (HS10) 1株、U群 (HS5/HS31+HS15/31) 1株、Z群 (HS38) 1株であった(表2)。

また、PHA法で型別不能株45株のうち43株(95.6%)はPCR法で型別することが可能であった(表3)。PHA法のみで型別可能であったのは3株で、N群1株、P群1株とZ<sub>6</sub>群1株であった。

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株は鶏肉由来菌株2株であり、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。今回新たに追加したヒト由来菌株23株には不一致となった株はなかった。

表1 マルチプレックスPCR法のプライマーの組み合わせ

Mix1		Mix2		Mix3		Mix4	
血清群	抗原因子	血清群	抗原因子	血清群	抗原因子	血清群	抗原因子
B	HS2	R	HS23, 36	A	HS44	Z <sub>2</sub>	HS41
C	HS3	G/HS17*	HS8/17	F	HS6, 7	D	HS4A
I	HS10	A	HS1	R	HS53	D	HS4B
Z <sub>6</sub>	HS55	Z <sub>7</sub>	HS57	L/U/HS58*	HS15/31/58	E/V/Z <sub>4</sub> / HS60*	HS5/32/45/ 60
O	HS19	K	HS12	V	HS32	Z <sub>5</sub>	HS52
N	HS18	S	HS27	Y	HS37	J	HS11
E/U	HS5/31			Z	HS38	P	HS21

※カンピロバクター免疫血清(デンカ)には含まれてない因子

#### IV 考察およびまとめ

前報で鶏肉から分離された54株についてPHA法とPCR法の比較を行い報告したが、今回は更にヒトから分離された23株を追加してPCR法の有用性について検討した。供試菌株77株のうち、PHA法で型別可能であった株は32株(41.6%)であったが、PCR法では72株(93.5%)が型別可能であった。PHA法で型別できなかった45株のうち43株はPCR法で型別可能であり、型別率が向上した。PCR法でC群、Y群、K群、F群と型別された株はすべてPHA法でも型別可能であった。また、L群も18株中14株が型別可能であり、PHA法での型別率が高い。逆にA群、E群、R群、U群、I群、Z群はすべてPHA法では型別できなかった。また、G群では19株中18株が、B群

では8株中7株が型別不能となりPHA法とPCR法との間で顕著な差が見られた。(表2)。

このことより、今後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、これらを組み合わせることにより精度の向上と、食中毒等の感染源の究明に有用であると考えられる。

またギランバレー症候群は急性に発症する四肢筋力低下や深部腱反射消失を主徴とする末梢神経疾患であるが、*C. jejuni*感染症との関連性が認められている。その中でもO群(HS19)の*C. jejuni*はギランバレー症候群の患者便から多く検出され、ギランバレー症候群を誘発する可能性があることが報告されていることから<sup>6,7)</sup>、今後ギランバレー症候群の調査にも応用されることが期待で

きる。

表2 型別結果

合計					内訳			
PCR 法			PHA 法		PHA 法			
血清群 (HS 抗原 因子)	HS 抗原 因子	株数	型	株数	(鶏)		(ヒト)	
					血清群	株数	型	株数
A(1, 44)	1	4	UT	4	UT	4		
	44	1	UT	1	UT	1		
B(2)	2	8	B	1	B	1		
			UT	7	UT	6	UT	1
C(3)	3	3	C	3	C	3		
D (4A, 4B)	4A, 4B	4	D	1	D	1		
			UT	3	UT	3		
E (5)	5	3	UT	3	UT	3		
G/HS17 (8, 17)	8, 17	19	G	1	G	1		
			UT	18	UT	8	UT	10
K (12)	12	3	K	3	K	3		
			L	14	L	8	L	6
L/HS58 (15, 58)	15, 58	18	C	1	C	1		
			N	1	N	1		
			UT	2	UT	1	UT	1
R (53)	53	2	UT	2	UT	1	UT	1
U (31)	31	1	UT	1	UT	1		
Y(37)	37	3	Y	3	Y	3		
F(6, 7)	6, 7	1	F	1			F	1
I (10)	10	1	UT	1			UT	1
Z(38)	38	1	UT	1			UT	1
UT	UT	5	UT	2	UT	2		
			N	1	N	1		
			Z <sub>6</sub>	1	Z <sub>6</sub>	1		
			P	1			P	1
		77		77		54		23

※ UT (Untypable)

表3 PHA法でUTとなった菌株のPCR法の結果

血清群 (HS 遺伝子型)	株数		
	株数	内訳(株数)	
		鶏	ヒト
A(1, 44)	5	5	
B(2)	7	6	1
D (4A, 4B)	3	3	
E (5)	3	3	
G/HS17(5, 17)	18	8	10
I(10)	1		1
L/HS58(15, 58)	2	1	1
R(53)	2	1	1
U(31)	1	1	
Z(38)	1		1
UT	2	2	
計	45	30	15

## 文献

- 1) 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, DOI:10.1371/journal.pone.0144349 December 2 (2015)

- 2) 今野貴之他：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 36, 161-162 (2015)
- 3) 赤瀬悟他：東京都内で分離された *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別法と血清型別法の比較, 日本食品微生物学会誌, 37(2), 69-74 (2020)
- 4) 岩下陽子 他：PCR法による *Campylobacter jejuni* の血清型別法の検討, 香川県環境保健研究センター所報, 18, 104-106 (2019)
- 5) 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>
- 6) Craig T. Parker, et al. : Comparison of *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharide Biosynthesis Loci from a Variety of Sources, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 43(6), 2771-2781 (2005).
- 7) 仲西寿男, 丸山務 監修：食品由来感染症と食品微生物, 351-352 中央法規出版, 東京, (2009)