

マルチプレックス PCR 法による *Campylobacter jejuni* の 血清型別の検討

青田 達明 千神 彩香 田内 敦子*¹ 池田 伸代
井澤 麻由*² 清水 裕美子 坂本 綾 京塚 明美
松室 信宏 石村 勝之

はじめに

Campylobacter 属菌のうち、腸炎の原因菌となる主な菌種は、*Campylobacter jejuni*(以下 *C. jejuni*)と *Campylobacter coli*の2菌種である。当所では、カンピロバクターの血清型別は、受身血球凝集反応を利用した Penner 法(以下 PHA 法)及びスライド凝集反応を利用した Lior 法で行っている。しかし最近、市販されているキットによる PHA 法では約半数の株が型別不能株(以下 PennerUT 株)となることが知られている¹⁾。また Lior 法は検査の継続が困難な状況にある。

そこで今回、Penner 血清群のうち 10 種類の血清群の判別が可能とされる耐熱性抗原(以下 HS 抗原)を標的としたマルチプレックス PCR 法(以下 PCR 法)²⁾の検討を行い、その型別能を評価した。

方法

1 供試菌株

2015 年に市内医療機関から分与された菌株(散発下痢症患者由来株)及び食中毒、有症苦情事例の糞便、食品から分離された *C. jejuni* 166 株のうち、PHA 法において PennerUT となった 83 株及び、凝集反応が弱く、その結果の判定に迷った 22 株(以下曖昧株)の計 105 株を使用した。

2 マルチプレックス PCR 法

供試菌株からアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。10 種類の Penner 血清群は 13 種類の HS 抗原の組み合わせにより遺伝子型別を行うことができるため、表 1 のとおり 3 種類又は 4 種類の遺伝子型を検出できるよう各プライマーを組み合わせ、4 種類のマルチプレックス PCR を行った。プライマーの組み合わせ、反応条件等については秋田県健康環境センターの方法(未発表)に準拠し行った。各増幅産物について電気泳動を行い、目的サイズにバンドが検出された場合を陽性とし、遺

伝子型別を行った。

結果

1 PCR 法による型別率

供試した 105 株のうち、マルチプレックス PCR 法で型別ができたものは 82 株(約 78%)、型別不能なものは 23 株であった。

2 型別結果内訳

マルチプレックス PCR 法によって判別できた血清群(カッコ内は標的とした耐熱性抗原番号を示す)の内訳を表 2 に示す。PennerB(HS2)が 60 株、PennerR(HS53)及び PennerG(HS8 and HS17)が 5 株、PennerL and U(HS15 and HS31)が 4 株、PennerA(HS1)、PennerF(HS6)及び PennerD(HS4B)が各 3 株、PennerD(HS4A)が 2 株、PennerR(HS23/36)が 1 株であった。なお、複数の血清群へ判別された株はそれぞれの血清群へ計上した。

3 PHA 法とマルチプレックス PCR 法で異なる血清群に型別された曖昧株

曖昧株のうち、PHA 法で PennerD 群とした 2 株のうち 1 株が PCR 法で PennerB 群に判別された。PennerL 群とした 2 株が PCR 法では PennerB 群に判別された。また、PennerF 群とした 1 株が PCR 法で型別不能株となった。

考察

PCR 法を用いることで、供試した 105 株のうち 82 株(約 78%)の血清群を判別することができた。内訳は約 70%が PennerB 群であった。このことから、何らかの原因により PHA 法による B 群への型別能が低下していることが確認された¹⁾。

PHA 法と PCR 法を併用した結果、2015 年に分与及び分離された *C. jejuni* 株のうち、計 143 株(約 86%)の Penner 血清群が明らかとなった。一方で、どちらの方法でも型別不能となった株が 23 株みられた。この原因として、今回使用したプライマーは、10 種類の血清群のみが判別できるものであ

*1: 現 健康福祉局保健部食品指導課

*2: 現 健康福祉局保健部食肉衛生検査所

り, この 23 株がそれらの血清群に含まれていない可能性があることなどが考えられる。

この度マルチプレックス PCR 法が改良され 47 種類の Penner 血清群全てを判別できる方法が報告された³⁾。今後, この方法での血清型別の有用性について更に検討を進めたいと考えている。

謝 辞

この調査にご協力頂きました医療機関及び保健所の関係各位, 多くのご助言を頂きました秋田県健康環境センター 今野貴之先生に深謝致します。

文 献

- 1) 甲斐明美 他:カンピロバクターの型別方法の検討と分離株の特徴, 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～平成 27 年度 総合研究報告書, 41～49(2016)
- 2) Poly F et al.: Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by Multiplex PCR, J Clin Microbiol, 49(5), 1750～1757(2011)
- 3) 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)

表 1 標的 HS 抗原とプライマー配列

Mix	Penner type recognized	Forward sequence(5' →3')	Reverse sequence(5' →3')	Product size(bp)
1	HS2 (PennerB)	CAGCATTGGAGGATTTACAATATAT	CATCCTAGCACAACTCACTTCA	62
	HS3 (PennerC)	GGTAAGGTGATTCTGGGTTAAT	AGATTAGCCAAGCAATGATAA	149
	HS10 (PennerI)	TCTTATGCAGCAGCTGAT	CAAATTCATCGACTAGCCACT	229
2	HS6 (PennerF)	CATACATTTGCTTTCAGATTCCTTAC	ACACGCCTATTGTTGTTGTTTC	185
	HS15 and HS30 (PennerL and PennerU)	ACAGGTAATAAAATGTGCGAGTTT	ATGCATCTGCAACATCATCC	325
	HS44 (PennerA)	AGAAGATGCACTAGGCTCTAG	GCTATCTAATCCATCCCTG	148
	HS53 (PennerR)	AGGCAAGCAGGAATTGTTT	TTAATTGCTCTTTGGCAATCTT	251
	HS4A (PennerD)	TATATTTGGTTAGGGATCCA	CCTAACATATCATACACTACGGT	370
3	HS4B (PennerD)	GTGGACATGGAAGTGGGACT	AAAACGTTTAAAGTCAGTGGA	652
	HS41 (PennerZ2)	CTTACATATGCTGGTAGAGATGATATG	TGCAATCTCTAAAGCCCAAG	279
	HS1 complex (PennerA)	TTGGCGTAAGTTTTTGAAGA	GCAAGAGAAACATCTCGCCTA	607
4	HS8 and HS17 (PennerG)	TTCACGTGGAGGATTATTGG	TTGAACATTTATGTGTTATCCCTA	342
	HS23/36 (PennerR)	GCTTGGGAGATGAATTTACCTTTA	GCTTTATATCTATCCAGTCCATTATCA	161

表 2 型別できた Penner 血清群と内訳

Penner 群(HS 抗原)	株数
PennerB (HS2)	60
PennerR (HS53)	5
PennerG (HS8 andHS17)	5
PennerL and PennerU (HS15 and HS31)	4
PennerA (HS1)	3
PennerF (HS6)	3
PennerD (HS4B)	3
PennerD (HS4A)	2
PennerR (HS23/36)	1