

細胞膨化致死毒素遺伝子を標的とした multiplex PCR 法による *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の同定について

植松 香星 柳本 恵太

Detection and identification of *Campylobacter jejuni/coli* by *cdt* gene
multiplex PCR

Kosei UEMATSU, Keita YANAGIMOTO

キーワード : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *cdt genes*,
multiplex PCR,

全国の細菌性食中毒件数及び患者数は、*Campylobacter jejuni*、*C. coli* による食中毒が最も多く¹⁾、県内においても同様な傾向である²⁾。

分離頻度が比較的高い *Campylobacter* 属検査法の問題点は、検査に長い日数が必要なことである。糞便の場合、分離培養に 2 日～3 日を要し、さらに同定には純培養も含めると 3～4 日が必要である。また、食品の場合は最初に増菌培養を行うのでさらに 1 日多くなり、7 日間を要する。

近年、*C. jejuni*、*C. coli* 及び *C. fetus* の迅速同定手法として multiplex-PCR 法が Asakura ら³⁾ により確立された。同属病原因子の一つとして知られている細胞膨化性致死毒 (Cytolethal Distending Toxin) 遺伝子 *cdtB* 及び *cdtC* を標的とした PCR 法である。

今回は、*C. jejuni* 及び *C. coli* について、生化学的性状試験を省略して 1～2 日間の検査期間を短縮することを目的として、細胞膨化性致死毒を標的とした multiplex-PCR 法について特異性及び検出感度について検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

- (1) *cdtB* プライマー及び *cdtC* プライマーを用いた PCR 法の感度、特異度の検討
C. jejuni については、2005 年 4 月から 2012 年

3 月の 8 年間で分離されたヒト糞便由来株のうち凍結保存に耐えた 38 株を用いた。

C. coli は、2003 年に分離されたヒト食中毒由来株 2 株及び 2011 に鶏盲腸内容物から分離された 27 株、合計 29 株を用いた。

陰性対象株は、全てヒト糞便由来で、*E. coli* 30 株 (腸管出血性大腸菌 18 株、毒素原生大腸菌 4 株、腸管凝集性大腸菌 4 株及び非病原性株 4 株) 及びサルモネラ属菌 14 株を用いた。

- (2) *cdt* プライマーを用いた PCR 法の検出感度の検討

菌株は、食中毒患者由来株 09-5-Camp を用いた。

2. 遺伝子抽出法

- (1) *cdtB* プライマー及び *cdtC* プライマーを用いた PCR 法の感度、特異度の検討と検出感度の検討

C. jejuni 及び *C. coli* の保存株については、血液寒天培地に 42℃48 時間好気培養後に生じたコロニーを用いた。

陰性対象の保存株 44 株については、35℃24 時間培養後に生じたコロニーを用いた。

生じたコロニーについては、懸濁液を調製し、10 分間の煮沸後、15,000 回転 10 分間遠心し、得られた上清を鋳型 DNA とした。

- (2) *cdt* プライマーを用いた PCR 法の検出感度の検討

5%馬血液加 Nutrient broth No. 2 (Oxoid) で 42°C 24 時間培養後、Nutrient broth No. 2 で 10 倍希釈系列を調製し、遺伝子抽出を行った。同時に血液寒天培地に希釈菌液を接種し、菌数算定を行った。

3. PCR 条件

cdt 遺伝子の検出は、TaKaRa の Perkin-elmer /cetus DNA Thermal Cycler を用い TaKaRa の *Campylobacter* (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit を使用し、説明書に従って行った。

PCR 産物の検出は、2%アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行った。

cdtB プライマーを使用した場合、714bp の大きさに増幅された株を *C. jejuni* と判定し、413bp の大きさに増幅された場合を *C. coli* と判定した。

cdtC プライマーを使用した場合、524bp の大きさに増幅された株を *C. jejuni* と判定し、313bp の大きさに増幅された場合を *C. coli* と判定した。

4. 生化学的性状による *C.jejuni* 及び *C.coli* の同定

生化学的性状試験については、常法⁴⁾により、ナリジクス酸 30 μ g ディスク及びセファロシン 30 μ g のディスク (日本ベクトンデッキンソン(株)) を用いて薬剤感受性を行った。

ナリジクス酸感受性、セファロシン耐性株について馬尿酸塩加水分解試験を行い、陽性であった株について、*C. jejuni* とし、陰性であった場合、*C. coli* とした。

結果

1. *cdtB* プライマー及び *cdtC* プライマーを用いた PCR 法の感度、特異度の検討

検討した 111 株の PCR 法の結果を表 1 に示した。*cdtB* プライマーでの *C. jejuni* の感度は、100% であり、*C. coli* の感度は、41.4% であった。*cdtC* プライマーでの *C. jejuni* の感度は、97.4% であり、*C. coli* の感度は、100% であった。

C. jejuni 及び *C. coli* 以外の菌株については、特異度が 100% であった。

2. *cdt* プライマーを用いた PCR 法の検出感度の検討

C. jejuni の *cdt* プライマーを用いた PCR 法の検出感度の検討結果を図 1 に示した (*C. coli* については、図を省略)。 *C. jejuni* 及び *C. coli* 共に両プライマーで 1 反応あたり 10¹ cfu まで検出可能であった。

表 1 *cdt* プライマーによる PCR 陽性株数

菌種	菌株数	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
<i>C.jejuni</i>	38	38	37
<i>C.coli</i>	29	12	29
腸管出血性大腸菌	18	0	0
毒素原性大腸菌	4	0	0
腸管凝集性大腸菌	4	0	0
非病原性 <i>E.coli</i>	4	0	0
サルモネラ属菌	14	0	0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



図 1 *cdtB* 及び *cdtC* プライマーを用いた PCR 法の検出感度の結果 (*C. jejuni*)

レーン M: 100bp DNA ladder

レーン 1~5: *cdtB* プライマーによる PCR

レーン 6~10: *cdtC* プライマーによる PCR

レーン 1, 6: 10⁴ cfu; 2, 7: 10³ cfu; 3, 8: 10² cfu;

4, 9: 10¹ cfu; 5, 10: 10⁰ cfu

考察

C. jejuni 及び *C. coli* の迅速診断を目的に朝倉ら³⁾が開発したプライマーを用いて感度、特異度及び検出感度について検討した。

C. coli については、*cdtB* プライマー陰性で *cdtC* プライマーが陽性となる株が多かった。理由は、不明だが、分離培養や保存中に標的部位が変異又は脱落したか、鶏盲腸内容に元来変異株が存在していることが考えられた。今後、*C. coli* については、ヒト由来株や鶏盲腸内容由来株の菌株数を増やして検討していく必要がある。*C. jejuni* 及び *C. coli* の同定には、*cdtB* 及び *cdtC* プライマーの 2 組を用いる

必要がある。

生化学的性状試験による *C. jejuni* 及び *C. coli* の同定は、ナリジクス酸、セファロチンの感受性及び馬尿酸水解試験を行う⁴⁾。近年ナリジクス酸耐性株が報告されているが^{5~7)}、これらの耐性株が分離された場合、同定は困難となる。また、馬尿酸水解試験では、馬尿酸水解酵素の活性が低い株や十分な菌量が接種できなかつた場合、陰性と判定され、*C. jejuni* を *C. coli* と誤同定する可能性がある。multiplex-PCR 法は、ナリジクス酸耐性株や馬尿酸加水分解酵素の活性が低い株において有用であると思われた。

cdtB および *cdtC* プライマーを用いた PCR の検出感度の検討を行ったが、Yamazaki らの報告³⁾ と同様な結果であった。PCR の阻害物質の存在を無視すれば、 10^1 cfu/ml の検出感度は、食品培養液からの PCR 法による検出は、十分可能と考えられた。

今回、データに示さなかつたが、鶏ささみ肉に *C. jejuni* を 300cfu/g となるように接種し、プレストン培地及びボルトン培地で培養後、培養液から遺伝子抽出し（煮沸法及びフェノール・クロロホルム法）、PCR を試みたが、PCR 産物の検出はできなかつた。

その原因として食品中や増菌培地中の PCR 阻害物質の存在が考えられた。Yamazaki ら⁸⁾ は、阻害物質の除去に three-step centrifugation procedures を考案したが、今後、阻害物質除去方法のひとつとして採り入れる必要がある。

まとめ

1) Asakawa らが開発したプライマーについて感度及び特異度について検討した。*C. jejuni* の感度は、*cdtB* プライマーで 100%、*cdtC* プライマーで 97.4% であった。*C. coli* の感度は、*cdtB* プライマーで 41.4%、*cdtC* プライマーで 100% であった。

C. jejuni 及び *C. coli* 以外の 44 株については、100% の特異度であった。このことからコロニーからの同定に本法を用いる場合、*cdtB* プライマー及び *cdtC* プライマーの両方を用いる必要があると思われた。

2) *C. jejuni* 及び *C. coli* の *cdtB* プライマー、*cdtC* プライマーの検出感度は、*C. jejuni* 及び *C. coli* とともに 2 種プライマーで 1 反応あたり 10^1 cfu であった。このことから増菌培養液中に 2×10^3 cfu/ml あれば検出可能と思われた。

3) コロニーから PCR 法による同定が可能なることから従来法よりも 2~3 日検査日数を短縮することが可能となった。

謝辞

この研究をするにあたり、鶏盲腸内容物由来 *C. coli* を分与していただいた山梨県食肉衛生研究所の諸氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 平成 20 年食中毒統計：厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課
- 2) 厚生労働省ホームページ：
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>
- 3) Masahiro, A. et al. : Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*, FEMS Immunol. Med. Microbiol, 52, 260-266 (2008)
- 4) 厚生省監修：微生物検査必携細菌真菌検査, 第 3 版, 日本公衆衛生協会, 東京 (1987)
- 5) 大沼正行ら：簡易水道水が原因とされたカンピロバクター食中毒事例, 49, 24~27 (2005)
- 6) 小嶋由香ら：カンピロバクター・ジェジュニの薬剤感受性および薬剤耐性因子の検出, 川崎市衛生研究所年報, 43, 57~58 (2007)
- 7) 花木陽子ら：散发事例および食肉由来 *Campylobacter jejuni* の血清型および薬剤感受性 (2009 年), 広島市衛研年報, 29, 105~107 (2010)
- 8) Wataru, Y. et al. : Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Conventional Culture Methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Naturally Contaminated Chicken Meat Samples Appl. Environ. Microbiol. 75, 1597-1603 (2009)