

PCR および質量分析計を用いた *Campylobacter jejuni* 型別法の検討

赤瀬 悟^a, 上原 さとみ^a, 浅山 睦子^a, 岡田 若葉^a, 前田 雅子^a, 齊木 大^a, 門間 千枝^a,
尾畑 浩魅^a, 横山 敬子^a, 貞升 健志^b

Campylobacter jejuni / *coli*による食中毒は、東京都内で発生した細菌性食中毒において2005年～2020年まで16年連続で最多事件数を継続している。また現在、行政検査で用いている*C. jejuni*の血清型別法は、型別率が50%以下に低下しているため、菌株の疫学解析として十分な知見が得られていない。そこで、本研究では近年新たに開発されたPCRを用いた遺伝子型別法および病院等の臨床分野で微生物同定検査に汎用されているマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いたMS型別法を検討した。都内で散発下痢症患者、食中毒患者および鶏肉から分離された*C. jejuni* 1,375株を用いて、血清型別法、遺伝子型別法およびMS型別法を検討した結果、型別率は、血清型別法36.0%、遺伝子型別法95.9%だった。一方、MS型別法は、今回用いた前処理方法によるバイオマーカー解析方法では、血清型や遺伝子型のように同一菌種間における差異を型別することができなかったが、MALDI-TOF MSによる*C. jejuni*および*C. coli*の菌種同定はPCRと100%一致した。

キーワード：*Campylobacter jejuni*, 遺伝子型別, PCR, MALDI-TOF MS

はじめに

東京都内で発生した *Campylobacter jejuni* / *coli* による食中毒は、細菌性食中毒において 2005 年～2020 年まで 16 年連続で最多事件数を継続している¹⁾。本食中毒患者から分離される *Campylobacter* 属菌は、95%以上が *C. jejuni* であるが、従来から用いられている血清型別法の型別率は、近年では50%以下に低下しており、菌株の疫学解析として十分な役割を果たしていない²⁾。一方、近年、PCR を用いた遺伝子型別法が開発され³⁾、我々が検討した結果、90%以上の型別率であることを報告した⁴⁾。

本研究では、散発下痢症患者、都内食中毒患者および鶏肉から分離された *C. jejuni* 1,375 株を用いて血清型別および遺伝子型別の型別率を比較した。さらに、検査法として簡易性および迅速性に優れており、病院等の臨床現場を中心に微生物の迅速同定機器として汎用されているマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（Matrix-assisted desorption ionization time of flight mass spectrometry, 以下 MALDI-TOF MS）^{5,6)}による *C. jejuni* の菌種同定および MS 型別法の有用性も検討した。

実験方法

1. 供試菌株

2017年～2019年に病原体レファレンス事業により都内病院から搬入された散発下痢症患者由来の332株、都内保健所を通じて搬入された食中毒患者および鶏肉検体由来の1,043株、合計1,375株の*C. jejuni*を供試した。また、MALDI-TOF MSによる菌種同定およびMS型別に供するため、血清型標準株44株、食中毒患者等由来の*C. jejuni* 171

株および*C. coli* 13株を用いた。

2. *C. jejuni*の培養法および菌種同定法

1) 培養法

都内病院から搬入された散発下痢症患者由来株は、5%馬脱線維血液を添加したブルセラ寒天平板（以下、血液寒天培地）に再分離した。食中毒患者ふん便は、CCDA（SEL, Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, 関東化学）培地に塗布し、42°C、48 時間、微好気培養（ガス組成：O₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%）した。CCDA 培地上に発育した疑わしいコロニーを位相差顕微鏡で鏡検し、コルクスクリュー様運動をするらせん菌を確認して、当該コロニーを血液寒天培地に再分離した。

鶏肉等の食品検体は、搬入された検体量に応じて 20～100 g を無菌的に採取し、3～5 mL の滅菌生理食塩水を加えて濃厚に振り出した懸濁液 1 mL を Preston 培地（関東化学）9 mL に加えて、42°C、24 時間、微好気培養した。その後、増菌培養液 0.1 mL を CCDA 寒天培地（SEL, 関東化学）に塗布し、42°C、48 時間、微好気培養を行った。微好気培養後の CCDA 平板上に発育したコロニーは上記同様に取扱った。

2) PCR による菌種同定法

血液寒天培地で純培養した菌は、アルカリ熱抽出法で鋳型 DNA を回収し、既報⁴⁾の各菌種に特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法で *C. jejuni* および *C. coli* を同定した。PCR 反応条件は後述の 4.遺伝子型別法のとおりである。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

3. 血清型別法 (Penner法)

血液寒天培地に純培養した菌を滅菌生理食塩水 0.5mL 中に濃厚に浮遊させた菌液を調製し、市販の「カンピロバクター免疫血清」(デンカ生研)を用いて血清型別を行った⁷⁾。なお、試験手順は添付説明書に従って実施した。

4. 遺伝子型別法

Poly らにより報告³⁾された Penner 法の血清型関連遺伝子の特異的に検出できる 37 種類のプライマーを用い、*C. jejuni* の遺伝子型別を行った。また、既報⁴⁾のように、菌種同定と同じアルカリ熱抽出法で遺伝子抽出を行い、PCR は α (アルファ 11 種類)、 β (ベータ 10 種類)、 γ (ガンマ 8 種類)、 δ (デルタ 8 種類)の 4 グループに分けてマルチプレックス PCR を実施した。次に PCR 増幅産物のサイズを電気泳動により確認して遺伝子型別を行った。なお、血清型別法および遺伝子型別法の比較を容易にするため、遺伝子型別法の結果は本文および Table 中すべて血清群 (Serogroup) で表記した。

5. MALDI-TOF MSによる菌種同定法およびMS型別法

1) 前処理方法 (エタノール・ギ酸抽出法)⁵⁾

滅菌蒸留水を 150 μ L 入れた 1.5 mL チューブに、血液寒天平板上に発育した菌を 1~2 白金耳分量かきとって懸濁したのち、無水エタノール (丸石製薬) を 450 μ L 加えてボルテックスで十分に攪拌した。この懸濁液を 13,000 rpm 2 分遠心して上清を捨てたのち、沈渣に 70%ギ酸 (WAKO) 40 μ L とアセトニトリル (メルク) 40 μ L を加えてピペッティングしながら菌塊を溶解させた。この溶解液を 13,000 rpm 2 分遠心し、上清 1 μ L を専用のターゲットプレートに添加して自然乾燥させた後、マトリックス試薬 (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid : HCCA, Bruker) 1 μ L を添加して、再度自然乾燥させた。

2) MALDI-TOF MS による菌種同定法

前述のエタノール・ギ酸抽出法で調製したターゲットプレートは、Microflex LT(Bruker)を用いて質量分析を行い、Biotyper ver3.1 (Bruker)の既存ライブラリーで菌種同定を行った⁵⁾。

3) *C. jejuni* 分離株等を用いた独自ライブラリーの作成

血清型標準株 44 株および遺伝子型を決定した食中毒患者等由来分離株 184 株の合計 228 株を用いて、エタノール・ギ酸抽出法で独自ライブラリー登録用サンプルを調製した。1 株あたりターゲットプレートに 8 スポットし、それら全てのスポットを flexControl (Bruker) で 3 回繰り返し測定して、計 24 本のスペクトルデータを収集した。得られたスペクトルデータは、flexAnalysis (Bruker) でピークシフトやコンタミネーションの有無を確認した後、MBT Compass Explorer (Bruker) を用いて独自ライブラリーを作成した。

4) MS 型別法

バイオマーカー解析用ソフトウェア Clinprotocols 3.0

(Bruker)^{8,9)}を用いて、*C. jejuni* の MS 型別法を検討した。具体的には、独自ライブラリーとして登録した遺伝子型が明らかな *C. jejuni* および *C. coli* のスペクトルデータを用いて、異なる遺伝子型を複数株ずつ選択し、それらのスペクトルデータのピークを統計学的に計算処理した。計算処理方法として、ソフトウェアで基本設定されている 4 つのアルゴリズム (①SVM:Support Vector Machine, ②GA:Genetic Algorithm, ③SNN:Supervised Neural Network, ④QC:Quick Classifier) を用いて、今回の MS 型別のために最適な計算条件を検討した。また、型別の比較対象とする遺伝子型の種類数 (2~10 種類) と菌株数 (遺伝子型 1 種類につき 1~5 株) についても、様々な条件を設定して上記①~④のアルゴリズムで計算処理し、最適な MS 型別条件を探索した。

結果及び考察

1. 血清型および遺伝子型の型別結果

散発下痢症患者由来株 (332 株) および食中毒検体 (患者ふん便、鶏肉等) 由来株 (1,045 株) の合計 1,375 株における血清型別率および遺伝子型別率は、それぞれ 36.0% (495 / 1,375) および 95.9% (1,319 / 1,375) であった (Table 1)。血清型別で型別不能 (Untypable : UT) は全 1,375 株中 880 株 (64.0%) で、各血清型の検出状況に大きな差異は認められず、検出割合はそれぞれ 0.1~5.2%程度であった。一方、遺伝子型別では、B 群 243 株 (17.7%)、D 群 223 株 (16.2%)、R 群 150 株 (10.9%)、O 群 118 株 (8.6%)、G 群 110 株 (8.0%) などが多く検出された。遺伝子型別できた上位 10 種類の型 (B 群、D 群、R 群、O 群、G 群、C 群、A 群、Y 群、F 群、Z4 群) で全体の 83.6% (1,149 / 1,375) を占めていた。遺伝子型別における UT (全てのプライマーで特異的な増幅が認められなかった菌株) は、1,375 株中 56 株 (4.1%) であった。また、血清型別と遺伝子型別において、型別結果が不一致であった菌株が 12 株あった。そのうち 11 株は、血清型別が Z 群、遺伝子型別が UT で、他 1 株は血清型別が Z 群、遺伝子型別が C 群であった⁴⁾。以上の結果から、遺伝子型別法は、血清型別法との一致率は高く、さらに型別率が 95.9%と非常に高い型別法であることがわかった。

血清型別法と異なり、遺伝子型別法では大量の純培養菌は必要ない。つまり、検体から分離した菌が少量でも型別可能であるため、検査日数の短縮化の観点からも大きな利点である。しかし、わずかであるが、遺伝子型別で型別不能となる菌株や、血清型と不一致となる菌株も存在した⁴⁾。これらの型別不能株については、新血清型 (新遺伝子型) の可能性だけでなく、プライマーの再設計や PCR 反応条件の再検討なども含めて、今後の検討課題としたい。

2. MALDI-TOF MS による菌種同定および MS 型別の検討

C. jejuni の血清型標準株 44 株、食中毒患者等由来の *C. jejuni* 171 株および *C. coli* 13 株の全 228 株について、

MALDI-TOF MS による菌種同定結果は PCR による菌種同定結果とすべて一致した。しかし, *C. jejuni* 228 株のスペクトルデータをもとに作成した独自ライブラリーによる

Table 1. Comparison between serotype and genotype of *Campylobacter jejuni*

Serogroup	HS*	Number of isolate (%)	
		Serotyped	Genotyped
A	1	9 (0.7)	71 (5.2)
B	2	26 (1.9)	243 (17.7)
C	3	71 (5.2)	96 (7.0)
D	4c**	69 (5.0)	223 (16.2)
E	5	0 (0.0)	3 (0.2)
F	6,7	36 (2.6)	42 (3.1)
G	8	15 (1.1)	110 (8.0)
H	9	0 (0.0)	7 (0.5)
I	10	13 (0.9)	26 (1.9)
J	11	12 (0.9)	11 (0.8)
K	12	25 (1.8)	25 (1.8)
L	15	25 (1.8)	32 (2.3)
N	18	2 (0.2)	5 (0.4)
O	19	59 (4.3)	118 (8.6)
P	21	33 (2.4)	33 (2.4)
R	23c***	47 (3.4)	150 (10.9)
S	27	0 (0.0)	3 (0.2)
T	29	0 (0.0)	9 (0.7)
U	31	3 (0.2)	4 (0.3)
Y	37	31 (2.3)	54 (3.9)
Z	38	12 (0.9)	0 (0.0)
Z2	41	0 (0.0)	0 (0.0)
Z3	42	0 (0.0)	3 (0.2)
Z4	45	0 (0.0)	42 (3.1)
Z5	52	1 (0.1)	0 (0.0)
Z6	55	5 (0.4)	7 (0.5)
Z7	57	1 (0.1)	2 (0.1)
UT****	-	880 (64.0)	56 (4.1)
Total		1375 (100)	1375 (100)

* HS: Heat-Stable

**HS4c: HS4complex(HS4, HS13, HS16, HS43, HS50, HS62, HS64, HS65 and CG8486)

***HS23c: HS23complex(HS23, HS36 and HS53)

****UT: Untypable

MS 型別の検討では, バイオマーカー解析ソフトウェア (Clinprotools 3.0) を用いて, 様々な統計処理方法で型別条件を検討してみたが, 血清型や遺伝子型のように同一菌種間における差異を型別できるような条件を見出すことはできなかった。

C. jejuni の血清型別法や遺伝子型別法は, 菌体表面の膜構造 (莢膜多糖類やリポオリゴサッカライド等) そのものか, それらをコードする遺伝子の差異を標的とする型別法である¹⁰⁻¹²⁾。一方, MS 型別法は, 今回の前処理方法で用いたエタノール・ギ酸抽出法の場合, 主に菌体のリボソームタンパク質が抽出されるため, 同一菌種間の比較解析においては, 型別可能なタンパク質構成の差異を検出できなかったと考えられた。今後, 菌体表面の膜タンパク質のみを特異的に抽出する方法やシナピン酸を用いた前処理方法などの検討が必要かもしれない。

また, 異なる遺伝子型のスペクトルデータの差異を比較するために, バイオマーカー解析ソフトウェア (Clinprotools 3.0) を用いて, *C. jejuni* の各遺伝子型のスペクトルデータの差異を検索した。しかし, 各遺伝子型の比較のために Clinprotools 3.0 に含まれるアルゴリズム (統計処理条件) を設定しても, 型別可能な条件を見出すことができなかった。おそらく, 同一菌種のリボソームタンパク質を主体とするスペクトルデータでは, 詳細な型別が困難であったためと推察された。近年, いくつかの細菌では, MALDI-TOF MS を用いて同一菌種間で型別する方法 (Proteotyping) が報告されている^{13,14)}。菌株の前処理方法や MALDI-TOF MS で得られたスペクトルデータの解析方法など, 様々な工夫が試みられた成果も報告¹⁵⁾されているので, *C. jejuni* でも応用できるかを含め今後検討していきたい。

ま と め

東京都内で分離された散発下痢症患者, 食中毒患者および鶏肉由来の *C. jejuni* 1,375 株を用いて, 血清型別, 遺伝子型別, MALDI-TOF MS を用いた菌種同定および新たな型別法として MS 型別を検討した。その結果, 血清型別法は 36.0%, 遺伝子型別法は 95.9% の型別率だった。一方, MALDI-TOF MS においては, *C. jejuni* および *C. coli* の菌種同定は PCR と 100% 一致したものの, 血清型や遺伝子型のように同一菌種間における差異を MS 型別することはできなかった。遺伝子型別法は, 都内で分離される *C. jejuni* の型別状況が詳細に把握できただけでなく, 非常に型別率が高いため, 行政検査の精度向上に大きく貢献する検査法である。

文 献

- 1) 東京都福祉保健局: 食品安全アーカイブス, 食中毒発生状況.
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/foods_archives/foodborne/status/index.html

(2021年8月18日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

- 2) 赤瀬 悟：東京都微生物検査情報, **38**, 34-35, 2017.
- 3) Poly, F., Serichantalergs, O., Kuroiwa, J., *et al.*: *PLoS ONE*, **10**, e0144349, 2015.
- 4) 赤瀬 悟, 原田幸子, 前田雅子, 他：日食微誌, **37**, 69-74, 2020.
- 5) 上原さとみ, 高橋由美, 小林真紀子, 他：東京健安研セ年報, **68**, 101-108, 2017.
- 6) Clark, A. E., Arora, A., Wolk, D. M., *et al.*: *Clin. Microbiol. Rev.*, **26**, 547-603, 2013.
- 7) Penner, J.L., Hennessy, J.N.: *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 732-737, 1980.
- 8) Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., *et al.*: *BMC Research Notes*, **7**, 330, 2014.
- 9) Huang, C. H., Li, S. W., Huang, L., *et al.*: *Frontiers in Microbiol.*, **9**, 1974, 2018.
- 10) 天野憲一, 京野かおり, 柴田淑子：日細菌誌, **50**, 547-550, 1995.
- 11) Day, C. J., Semchenko, E. A., Korolik, V.: *Frontiers in Cell. And Infect. Microbiol.*, **2**, 1-8, 2012.
- 12) Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., *et al.*: *Molecular Microbiol.*, **35**, 529-541, 2000.
- 13) Ojima-Kato, T., Yamamoto, N., Suzuki, M., *et al.*: *PLoS ONE*, **9**, e113458, 2014.
- 14) Fukuyama, Y., Ojima-Kato, T., Nagai, S., *et al.*: *J. Mass. Spectrom.*, **54**, 966-975, 2019.
- 15) 田村廣人：日農薬会誌, **42**, 223-234, 2017.

Application for Bacterial Typing Methods of *Campylobacter jejuni* via PCR and MALDI-TOF MS

Satoru AKASE^a, Satomi UEHARA^a, Chikako ASAYAMA^a, Wakaba OKADA^a, Masako MAEDA^a, Dai SAIKI^a, Chie MONMA^a,
Hiromi OBATA^a, Keiko YOKOYAMA^a and Kenji SADAMASU^a

In the past 16 years, food poisoning incidents due to *Campylobacter jejuni* / *coli* have consecutively occurred in most of all bacterial agents in Tokyo. Epidemiological studies of *C. jejuni* isolates, have typically used the conventional Penner's serotyping method which has been decreased the typing ratio by 50% or less, this does not provide adequate epidemiological data to understand the prevalence of *C. jejuni* isolated from patients and poultry meat in Tokyo. Recently, a novel genotyping method using PCR was reported. Moreover, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is frequently used as a microbiological identification tool in clinical fields. In this study, we examined 1,375 *C. jejuni* isolates from sporadic diarrheal patients, food poisoning specimens using serotyping, genotyping and mass spectrometry (MS) typing to compare their sensitivity and time to identification. The typing ratios were 36.0% serotyped and 95.9% genotyped, respectively. Although MS typing was less precise among the same bacterial species, it was in complete accordance with the PCR identification of *C. jejuni* and *C. coli* via MALDI-TOF MS.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, Genotyping, PCR, MALDI-TOF MS.

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan