道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 71, 61–66（2021）

カンピロバクターを簡易的に組分けするマルチプレックス qPCR の構築

Multiplex Quantitative PCR for Simple Genetic Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

大野　祐太　　池田　徹也

Yuta Ohno and Tetsuya Ikeda

Key words：*Campylobacter*（カンピロバクター）；MLST（multilocus sequence typing）；ST（sequence type）；qPCR（quantitative PCR）

緒　　言

カンピロバクター食中毒は *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli*（以下、カンピロバクター）を原因とする細菌性食中毒であり、厚生労働省の食中毒統計[1]によれば、2003 年以降、国内、北海道内ともにみられる細菌性食中毒のうちで最も発生頻度が高い。北海道においては、カンピロバクター食中毒発生時に推定原因食品と患者間の関連性の調査が行政上必要となった場合、道内保健所にて分離された菌株を衛生研究所に送付し、Multilocus sequence typing（MLST）によって決定される遺伝子型（sequence type：ST）から系統推定を行っている。

カンピロバクターの MLST は 2021 年 7 月現在 11,000 を超える ST が定義されており、同一種内の菌株を詳細に分類できるため解析手法として有用である[2-4]一方、MLST を実施する上で必要な DNA シークエンサーが道内保健所に配備されていないため、菌分離の直後に迅速に MLST を実施できない。

そこで、道内保健所でも簡易的にカンピロバクター分離株を比較できるよう、quantitative PCR（qPCR）を用いた検査系を構築したので報告する。本検査系は、蛍光色素を用いたマルチプレックス qPCR における融解曲線分析においてどのようなピークパターンが検出されるかによって、ST 全体を幾つかの組に分ける仕組みである。

方　　法

2008 年から 2019 年に発生した食中毒、市販の食肉（牛、豚、鶏）、家畜（牛、豚、めん羊、鶏）から分離されたカンピロバクター及び 2018 年から 2019 年に医療機関から分与を受けたカンピロバクターを供試した。これらについて PubMLST で公開されている方法[5,6]に基づき MLST を実施し、得られた結果を集計して、北海道において分離された主たる ST を調査した。なお、同一事例や同一検体から同じ ST が分離された場合に重複を避け、*C. jejuni* 147 株、*C. coli* 60 株について以下の解析に用いた。

北海道において分離された主たる ST を明らかにした後、それらを qPCR で識別するために必要な遺伝子の候補を絞り込むために、PubMLST の Plugin である Gene presence を用いて、PubMLST 登録株の中から該当する ST の各株が保有する遺伝子のリストを収集した。検索対象とした Loci（遺伝子座）は、Gene presence において選択可能な全項目（2054 遺伝子座）とした。また、Parameters/options（類似度設定）において Min % identity と Min % alignment の 2 つの抽出パラメータを共に 100% に設定した。これは、Gene presence により PubMLST の登録株が当該遺伝子を保有していると判定された場合に、必ずアレル番号が割り当てられるようにするためである。

Gene presence で出力されたリストから遺伝子数が 100 以上あるものを全ゲノムデータ登録株として選別し、ST ごとに各登録株が保有する遺伝子のリストを並列させ、ST 内で保有率が 95% 以上の遺伝子と 10% 以下の遺伝子を選別した。それらの中から、遺伝子の有無によって ST を互いに区別できる組み合わせを検討した。選出した遺伝子を保有する株であっても、すべての株において同一の塩基配列ではなくアレルに多様性があるため、それらの遺伝子について PubMLST 登録株ごとのアレル番号を収集した。ST ごとに、各アレル番号に該当する登録株数を計上し、該当株数の多い順に、各 ST 内で該当株数が 95% 以上になる数だけアレルを選び出した。それらのアレルの塩基配列をダウンロードした後にアライメントして、変異のみられない領域にプライマーを設計した。プライマーの設計には Primer 3[7]を用いた。

表 1-1　検出された *Campylobacter jejuni* の ST と由来する検体

ST	患者		食品		家畜				小計
	食中毒	病院	牛	鶏	牛	めん羊	豚	鶏	
19	2				1				3
21	2				3				5
22	6	1		4	4				15
42	7					5	1		13
45	7				1			5	13
50	6				5			1	12
51				1					1
58					1				1
61	4				1				5
132	1								1
137	1	2							3
222	2								2
354	1								1
508	1								1
658	2								2
806	2				12				14
824	1								1
918	1								1
922	2		1		9				12
929				1					1
933	1								1
982					2				2
1244	1				1	1			3
2343	1								1
3727				1					1
4016					2				2
4022	1								1
4063	2	2							4
4325				1					1
4526	3								3
5731	1								1
5801	1								1
7954				1					1
UT*	7	1		2	2			6	18
合計	66	6	1	11	44	6	1	12	147

下線：qPCR 構築過程で全ゲノム検索を実施した ST
*UT は PubMLST に登録がなく ST の番号を定義できなかったものであり、互いに同一の遺伝子型とは限らない。

設計したプライマーは複数の濃度を組み合わせて qPCR を繰り返し、融解曲線分析において対象とした遺伝子のすべてが同時に検出できる濃度比を求めた。検査試薬については、Thunderbird SYBR qPCR Mix（東洋紡）、Luna Universal qPCR Mix（New England Biolabs Japan）、Ampdirect Plus（島津製作所）、TB Green Premix DimerEraser（タカラバイオ）の 4 つを比較した。

最後に、構築した qPCR を用いて、ST が既知の食中毒由来菌株を検査し、どのような組分けになるのか調べた。

なお、DNA の抽出は厚生労働省通知[8]で示されたアルカリ熱抽出法で実施し、供試菌株はスキムミルクに保存していたものを羊血液寒天培地に塗抹して 24 時間から 48 時間微好気培養して得た単一コロニーを用いた。

表 1-2　検出された *Campylobacter coli* の ST と由来する検体

ST	患者		食品		家畜			小計
	食中毒	病院	牛	豚	牛	めん羊	豚	
827					6			6
854	4					1	1	6
887							2	2
890							1	1
899							1	1
1068	2	1			15			18
1097				1				1
1107	1							1
1112	1				1			2
1142	1							1
1434							1	1
1450							1	1
1464		1						1
1543							1	1
1556							1	1
1579							1	1
1624	1							1
1836							1	1
3241				1				1
4172	1			1			2	4
5844							1	1
UT*	1		1	1			4	7
合計	12	2	1	4	22	1	18	60

下線：qPCR 構築過程で全ゲノム検索を実施した ST
*UT は PubMLST に登録がなく ST の番号を定義できなかったものであり、互いに同一の遺伝子型とは限らない。

結果及び考察

本研究においては、最初に、当所保有のカンピロバクター菌株について MLST を実施した。解析対象としたカンピロバクターの ST について、*C. jejuni* は表 1-1 に、*C. coli* は表 1-2 に示した。*C. jejuni* の患者由来株では ST 22、ST 42、ST 45、ST 50、ST 61、ST 4063 の 6 つの ST が多く見られ、これらで約半数を占めた。特に ST 22、ST 42、ST 45、ST 50 は分離された食中毒の事例が多かったが、発生時期に偏りはなく、持続的に分離されていた。また、ST 22 は市販の鶏肉からも 4 株分離されており、ST 4063 を除く 5 つは家畜からも分離されていた。家畜においては ST 806 と ST 922 が多く分離されており、これらは食中毒事例から 2 株ずつ分離されていたほか、ST 922 は市販の牛肉からも 1 株分離されていた。

C. coli の患者由来株では ST 854 と ST 1068 が複数の患者から分離されており、そのうち ST 854 はめん羊と豚からも 1 株ずつ、ST 1068 は牛からも 15 株分離されていた。*C. coli* は食中毒の事例数が少なく、患者から分離された ST は限られていたが、その中で ST 1112 は患者と牛で 1 株ずつ、ST 4172 は患者と豚肉で 1 株ずつと豚から 2 株分離されていた。

以上の結果から、北海道において分離される *C. jejuni*

表 2　本研究で利用した PubMLST 登録株数

ST	登録株数	
	総株数	全ゲノムデータ登録株数
C.jejuni		
22	1092	750
42	1139	539
45	4002	1872
50	3873	2268
61	1716	918
806	661	614
922	571	467
4063	6	2
C.coli		
854	502	157
1068	1160	945
1112	13	6
4172	1	0

の主たる ST として、ST 22、ST 42、ST 45、ST 50、ST 61、ST 806、ST 922、ST 4063 の 8 つを選定した。*C. coli* では全体数が少ない中での判断にはなるが、ST 854、ST 1068、ST 1112、ST 4172 の 4 つが上位に該当すると判断した。よって、これらを本研究における qPCR 構築の対象 ST とした。

続いて、それらの ST を qPCR によって組分けする指標となる遺伝子を選定した。組分け対象の 12 の ST について、PubMLST 登録株の保有遺伝子を検索したところ、表 2 に示す結果となった。このうち、*C. jejuni* の ST 4063 は全ゲノムデータ登録株が 2 株、ST 4172 は全ゲノムデータ登録株がなかったため、どちらも解析対象から除外した。*C. coli* の ST 1112 については全ゲノムデータ登録株が 6 株と少なかったが、*C. coli* では対象となる ST が少ないことから、除外せず解析対象とした。

次に、構築する qPCR で標的となり得る遺伝子座を検討した。ST ごとに選別した全ゲノムデータ登録株について、各遺伝子座における遺伝子の保有率を計算し、*C. jejuni* の 7 つの ST もしくは *C. coli* 内の 3 つの ST においてすべての ST が保有するもしくは保有しない遺伝子座について除外した結果、*C. jejuni* では 70 の遺伝子座が、*C. coli* では 4 つの遺伝子座が残った。

その中から最も効率的に ST を組分けできるパターンとして *C. jejuni* では CAMP 0047、CAMP 0389、CAMP 0794、CAMP 1215 の 4 つの遺伝子座を選出した。4 つの遺伝子座における遺伝子の有無により 15 の組に分けることが可能であるが、ST 50 と ST 806 は保有している遺伝子の組み合わせが類似していたため、これら 4 つの遺伝子座の組み合わせでは区別できなかった。残り 5 つの ST は異なる組に分けることができた。*C. coli* は候補となる遺伝子座が限られていたが、3 つの ST を区別するには 2 つの遺伝子座があれば十分であり、CAMP 0617 と CAMP 1873 を選出した。ただし、どちらの遺伝子も検出されないという結果は検査が失敗した場合と区別が難しいため、3 つの ST すべてが保有する遺伝子座の CAMP 0594 を対照として加えた。

それらの遺伝子座に対し、それぞれ複数組のプライマーを設計し、増幅に適した組み合わせとプライマー濃度を変えながら試行を繰り返したところ、表 3-1 に示す配列と濃度及び表 3-2 で示す反応条件で最も明瞭に融解曲線を描出できた。実験試薬については方法に示した 4 種類を検討したが、*C. jejuni* の検査系での融解曲線分析において 4 つの遺伝子すべての増幅が同時に確認できる（図 1）ものとしては Ampdirect Plus のみが有用であった。また、Ampdirect Plus は *C. coli* の検査系においても、融解曲線分析で 3 つすべての増幅を同時に確認することができた（図 2）。

以上のとおり、当初の目標としていたように、qPCR 構築の対象 ST については ST 50 と ST 806 の区別を除き qPCR による組分けが達成された。そこで今度は、プライマー設計の際に対象としなかった ST のカンピロバクターについて、構築した qPCR を適用するとどのように組分けされるかを調べた。表 4-1 に示すとおり、*C. jejuni* では qPCR 構築の対象 ST を含めて計 25 の ST 及び PubMLST に登録がなく定義できなかった ST（UT）があったが、それらは 11 の組に分けられた。プライマー設計の段階で用いた 7 つの ST のうち ST 50 を除く 6 つは想定とおりの組に分けられた一方、ST 50 については CAMP 0047、CAMP 0389、CAMP1215の3つが検出されると想定していた（図1、Group No.14）が、CAMP 0047 が検出されない株（図 1、Group No.10）も、CAMP 0794 を含む 4 つの遺伝子すべてが検出される株（図 1、Group No.15）も存在していた。これらの結果は、ST 50 における CAMP 0047 の保有率が 100% ではないこと（データベース登録株の 98.7%）及び CAMP 0794 の保有率が 0% ではないこと（同 0.4%）に起因すると考えられる。

C. coli では全部で 7 つの ST 及び UT があったが、それらは 3 つの組に分けられた。ただし、表 4-2 に示すとおり ST 1112 については対照とした CAMP 0594 が検出されず、逆に CAMP 0617 が検出された。これは、本研究ではデータベース登録株が全 6 株しかない中で ST 1112 を qPCR 構築の対象 ST としたので、ST 内の遺伝子の多様性において偏りがあり、当所保有の株とは遺伝子の保有パターンが一致しなかったためと考えられた。また、qPCR 構築の対象とした ST 以外の食中毒由来株についてはすべて Group No.6 に該当したことから、他の ST を加えて新たな遺伝子座を改めて選定するなどの方法で、多くの ST が異なる組に分散する組み合わせについて検討を続ける必要がある。*C. coli* については北海道における事例数が少ないなどデータ量に限りがあるため、本検査系の利便性を向上させるためには、引き続き北海道内の *C. coli* について調査するほか、データベースへの登録株が増加した後に改めて選定遺伝子座を再考する必要がある。

表 3-1　プライマーリスト

プライマー名	配列	終濃度（nM）	PCR 産物	
			大きさ（bps）	Tm 値*（℃）
C.jejuni				
CAMP 0794_F 4	AAAATTGTTGAACTAACTGCGAAA	1000	60	73.0
CAMP 0794_R 4	AATACTTTTGATTTGATCCTCATTAGC	1000		
CAMP 0047_F 4	GGGAAAATATTCGGACTTGATGAAAGTA	500	109	75.5
CAMP 0047_R 4	GGATTTTTCTATTTTATTGGGGTCTTTT	500		
CAMP 0389_F 3	GGATCGCGGATATGGTGATTTT	400	105	78.5
CAMP 0389_R 3	CCTTCAAATTCTGGCATACCATCTT	400		
CAMP 1215_F 4	GCGGGCGGGCTCAAGCTGTTTTGGAAAGGA	150	285	82.5
CAMP 1215_R 4	GGCGGGCGGGGCCGCACGATTTCATTTATC	150		
C.coli				
CAMP 1873_F 3	AGAAACAGCGGTTATTTTTAAAGG	500	70	72.5
CAMP 1873_R 3	ATCATCTAAATAACGAATATCTTCAGG	500		
CAMP 0594_F 1	GCTTTGACAAACAAGGAGCTG	250	136	77.0
CAMP 0594_R 1	TGTGTGACAATCGGAAGTGAAAAA	250		
CAMP 0617_F 2	AATGAAAAGTCGTGGCTGCT	150	165	81.0
CAMP 0617_R 2	TCAGGCGAGAACCAATAACC	150		

*Tm 値は Ampdirect Plus 使用時の実測値（0.5℃ 単位）

表 3-2　qPCR 実験条件

試薬調製	［20 μL 反応系］	
2 x Ampdirect Plus	10 μL	
BIOTAQ HS DNA Polymerase	0.1 μL	
Primer Mix	1 μL	
Eva Green Dye, 20 X in Water	1 μL	
Distilled water	6.9 μL	
Sample DNA	1 μL	
温度条件		
Preheating	95℃	10 min
a）Denature	95℃	5 sec
b）Annealing	55℃	15 sec
c）Extension	72℃	30 sec
a－c：30 cycles		
融解曲線分析	default	default

以上の結果から、本研究で構築したプライマーセットを用いることで、*C. jejuni* については食中毒事例で分離された計 25 の ST を qPCR で簡易的に組分けすることができ、*C. coli* については事例数が少なく今後も検討の必要があるが、qPCR 構築の対象とした 3 つの ST においては異なる組に分けることができた。

カンピロバクターによる食中毒事例においては、1 事例の中で複数の ST が関与する場合がいくつも報告されており[9]、本研究で扱った 51 の食中毒事例でも、疫学的に同一の事例でありながら複数の ST が分離された事例が 9 事例あった（詳細は省略）。それらの事例の 1 つで、患者 2 名で ST 45 と ST 50 の *C. jejuni* が混在する食中毒事例があったが、その事例では一方の患者から分離した 5 つのコロニーが ST 45 で、他方の患者から分離した 4 つのコロニーは ST 45 と ST 50 が 2 つずつという検査結果であった。同様の事例が発生した場合、寒天培地上のコロニーそれぞれについて本研究で示すプライマーセットで qPCR することで、増幅結果から各コロニーを Group No. 1 もしくは 14 に属する ST として区別することが可能である。最終的に ST を確定させるには MLST を実施する必要があるが、異なる組に属するコロニーでは MLST を実施する以前に異なる ST であることが明らかであるため、保健所において「検査したカンピロバクター分離株の遺伝子型は不一致である」という結果が得られる。その上で、疫学情報から、検査対象となった患者同士（もしくは患者と食品）の関連が強く疑われる場合には、同一食中毒事例において複数の ST のカンピロバクターが関与していると想定されるので、まず本研究で構築した qPCR において同じ組に属するコロニーを双方の検体からスクリーニングすることで、共通する ST のカンピロバクターを選び出せる可能性が高まるだろう。

このように、本研究で構築した検査系は、食中毒の調査などで患者便や食材などを検査する際、双方に同じ ST のカンピロバクターが存在している可能性を簡易的に調べる上で有効であると考えられる。

本研究のほかにも、簡便な方法によるタイピングは既に行われており、カンピロバクターにおいては Cornelius らの Binary Typing[10] 及びそれを multiplex PCR 化した検査法[11,12] が挙げられるが、病原遺伝子に着目した Binary Typing と ST に着目した組分けでは方向性が異なり、北海道の保健所においては qPCR による遺伝子検査が一般的に行われているという点において、本研究で示す検査法がより有

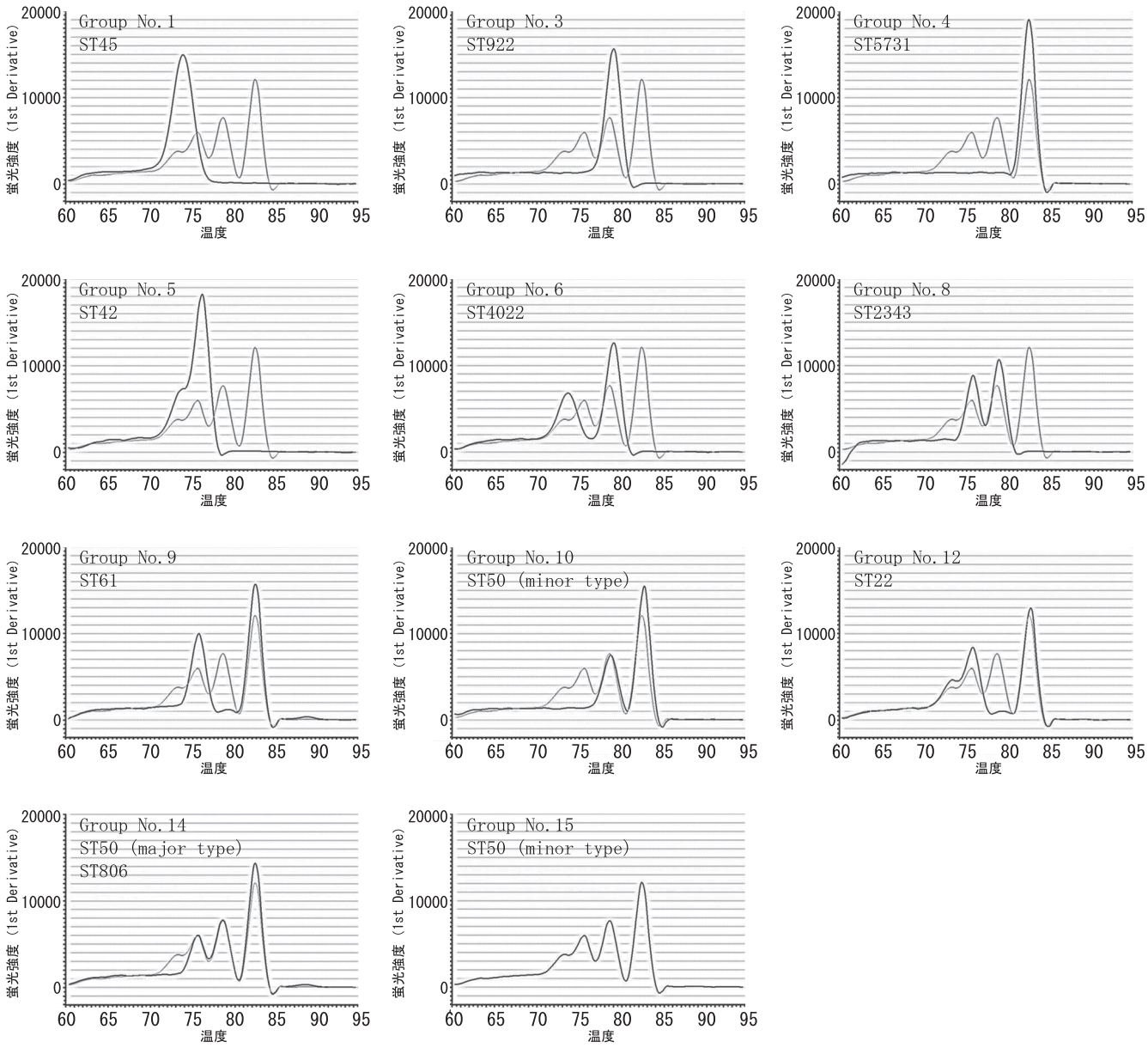

図1　本研究で構築した *C.jejuni* 検査系（qPCR）における融解曲線分析（1st Derivative）

Group No. 1～14 の灰色の波形はすべての遺伝子が検出された Group No. 15 の結果

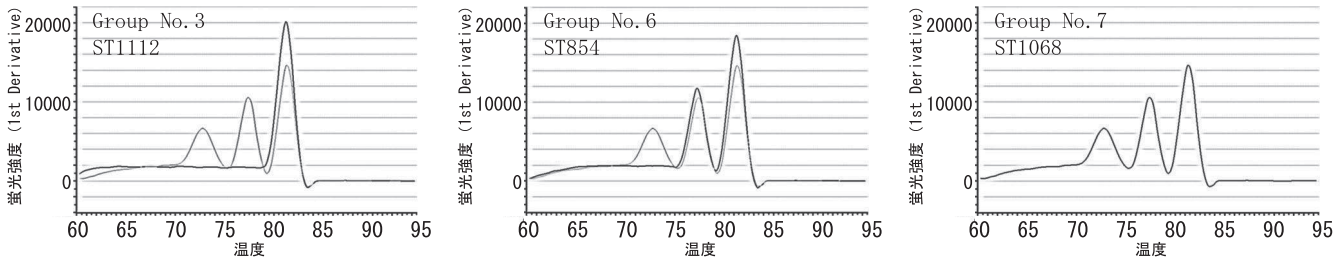

図2　本研究で構築した *C.coli* 検査系（qPCR）における融解曲線分析（1st Derivative）

Group No. 3、6 の灰色の波形は全ての遺伝子が検出された Group No. 7 の結果

表 4–1　食中毒事例で分離された *C. jejuni* において実際に見られた qPCR パターンと該当する ST

Group No.[a]	qPCR パターン				該当する ST	
	CAMP 0794	CAMP 0047	CAMP 0389	CAMP 1215	主要な ST	食中毒事例で見られた他の ST
1	＋	－	－	－	45	132, 137, 354, 508, 4063, UT[c]
3	－	－	＋	－	922	UT[c]
4	－	－	－	＋		5731, 5801
5	＋	＋	－	－	42	
6	＋	－	＋	－		4022
8	－	＋	＋	－		2343, UT[c]
9	－	＋	－	＋	61	933, 1244
10	－	－	＋	＋	50[b]	824
12	＋	＋	－	＋	22	
14	－	＋	＋	＋	50[b], 806	19, 21, 222, 658, 918, 4526
15	＋	＋	＋	＋	50[b]	

[a] 遺伝子の保有パターンが＋、－、－、－を 1 として順に、本研究で未検出のパターンにも番号を割り振った。
[b] ST 50 は Group No. 14 が大多数であったが、株によって No. 10 や No. 15 の組に該当する場合もあった。
[c] UT は PubMLST に登録がなく ST の番号を定義できなかったものであり、互いに同一の遺伝子型とは限らない。

表 4–2　食中毒事例で分離された *C. coli* において実際に見られた qPCR パターンと該当する ST

Group No.*	qPCR パターン			該当する ST	
	CAMP 1873	CAMP 0594	CAMP 0617	主要な ST	食中毒事例で見られた他の ST
3	－	－	＋	1112	
6	－	＋	＋	854	1107, 1142, 1624, 4172, UT
7	＋	＋	＋	1068	

*遺伝子の保有パターンが＋、－、－を 1 として順に、本研究で未検出のパターンにも番号を割り振った。

用であろう。

本検査系を有事の際に有効に活用するため、今後も当所において菌株の収集や MLST を継続することに加え、各保健所に本検査系を普及し、qPCR による組分けが実際の事例で機能するか検証を続ける必要がある。

文　　献

1）厚生労働省食中毒統計資料，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html（確認 2021 年 9 月 27 日）
2）Wieczorek K, Wo?kowicz T, Osek J: MLST-based genetic relatedness of *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and humans in Poland. PLoS One, **15**(1), e 0226238（2020）
3）Noormohamed A, Fakhr MK: Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Various Retail Meats by MLST and PFGE. Foods, **3**(1), 82–93（2014）
4）Parsons BN, Cody AJ, Porter CJ, Stavisky JH, Smith JL, Williams NJ, Leatherbarrow AJH, Hart CA, Gaskell RM, Dingle KED, Dawson S: Typing of *Campylobacter jejuni* isolates from dogs by use of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol., **47**(11), 3466–3471（2009）
5）PubMLST, https://pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli/primers（確認 2021 年 11 月 8 日）
6）Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJL, Urwin R, Maiden MCJ: Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., **39**(1), 14–23（2001）
7）Primer 3,https://bioinfo.ut.ee/primer 3-0.4.0/（確認 2021 年 11 月 8 日）
8）厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」，平成 26 年 11 月 20 日
9）Sails DA, Swaminathan B, Fields IP: Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., **41**(10), 4733–4739（2003）
10）Cornelius AJ, Gilpin B, Carter P, Nicol C, On SLW: Comparison of PCR binary typing（P-BIT），a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and multilocus sequence typing methods. Appl. Environ. Microbiol., **76**(5), 1533–1544（2010）
11）Yamada K, Ibata A, Suzuki M, Matsumoto M, Yamashita T, Minagawa H, Kurane R: Designing multiplex PCR system of *Campylobacter jejuni* for efficient typing by improving monoplex PCR binary typing method. J. Infect. Chemother., **21**(1), 50–54（2015）
12）中村寛海，山本香織，藤原淳史，平山照雄，秋吉充子，梅田　薫，小笠原準：食中毒患者，ニワトリおよびウシ由来カンピロバクターの multiplex PCR binary typing 法による型別．日本食品微生物学会雑誌，**37**(3)，132–142（2020）