RAPD 法による牛由来 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別

小野一晃[†] 斎藤章暢 大塚佳代子 土井りえ 正木宏幸

埼玉県衛生研究所 (〒338-0824 さいたま市上大久保639-1)

(2000年8月28日受付・2001年3月9日受理)

要 約

埼玉県内のと畜場に搬入された5県・20農場の牛107頭の盲腸内容物からカンピロバクターの分離を行ったところ、47株の *Campylobacter jejuni* が分離された。それらはRAPD法により27種類に型別され、牛由来の *C. jejuni* の疫学的解析に本法が有効であることが示唆された。キーワード: *Campylobacter jejuni*, 牛, RAPD.

----- 日獣会誌 54, 639~642 (2001)

Campylobacter jejuni は世界各国におけるヒトの主要な下痢症の起因菌で [3, 28, 29], わが国でも本菌による集団発生例が多数報告され [14, 26], 近年増加する傾向にある [15]. *C. jejuni* は動物の腸管内に広く分布しているが, カンピロバクター食中毒の原因食品としては鶏肉が特に重要視されている [1, 6, 8]. しかしながら *C. jejuni* は鶏 [23] のほか, 牛の腸管 [22] から高率に分離され, 牛レバーの生食に起因すると思われる集団発生例も報告されている [13].

一方, カンピロバクターの集団発生の場合にはその感染源や感染経路を明らかにするために血清型別を用いた疫学調査が広く行われているが [16, 25], 血清型では動物由来株において型別不能となる場合も多く [11], 食中毒事例等の原因究明のための疫学調査に支障が生じることが多い. そのため, 血清型別に代わる疫学マーカーとして種々の分子生物学的手法の応用が試みられている [5, 7, 10, 20, 30]. そこで, 簡便で迅速性に優れ, 食中毒患者由来株や鶏由来株の遺伝子型別に有効であった RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 法 [24] を用いて牛由来の *C. jejuni* を型別した.

材 料 お よ び 方 法

1. 牛の盲腸内容物からのカンピロバクターの分離

1996年11月と1997年2月に埼玉県内のと畜場(1カ所)に健康畜として搬入された肥育牛の盲腸内容物を滅菌綿棒で採取し, 冷蔵状態で検査室に搬入した. 検体を直接CCDA培地^{a)} [3] に塗抹後, 微好気状態(N₂: 85%, CO₂: 10%, O₂: 5%)で37℃で48時間培養した. 培養後カンピロバクターと疑われた集落については, グラム染色, 位相差顕微鏡による運動性の確認, オキシダーゼ試験等による1次スクリーニングを行い

[21], 最終的には伊藤ら [9] の方法に基づきカンピロバクターの種の同定を行った.

2. RAPD 法による遺伝子型別

1) 供試菌株

供試菌株として上記2回の検査において分離・同定した *C. jejuni* 47株と理化学研究所標準株JCM2013の計48株を用いた.

2) RAPD 法

供試した *C. jejuni* からのDNAの抽出はSambrookら [27] の方法に準じて行った. プライマーはFayosら [4] の報告にある10塩基(5'-CAATCGCCGT-3')のものをを用い, PCRの反応条件は, Makinoら [18] の方法に準じ, 94℃・5分, 36℃・5分, 72℃・5分を4サイクル, 次に, 94℃・1分, 36℃・1分, 72℃・2分を30サイクル行った. また, PCR反応が正確に行われたかを確認するためJCM2013株を用いた. PCR反応産物を2.0%アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, UV光下で観察した.

成 績

1996年11月に埼玉県のと畜場において牛から分離されたカンピロバクターは *C. jejuni* が31/54 (57.4%), *C. coli* が1/54 (1.9%), *C. fetus* subsp. *fetus* が4/54 (7.4%) であった. 一方, 1997年2月の検査では, *C. jejuni* が25/53 (47.2%), *C. coli* が1/53 (1.9%), *C. fetus* subsp. *fetus* が4/53 (7.5%) であった. このうちの *C. jejuni* 47株のRAPD法による型別(以下, RAPD型)とおもなDNAバンドを表1に示し, また, 図1にRAPD法による電気泳動パターンを示した. RAPD法に

a) Oxoid, U.K.

[†] 連絡責任者: 小野一晃 (埼玉県衛生研究所)

〒338-0824 さいたま市上大久保639-1 ☎048-853-7196 FAX 048-840-1041

RAPD 法による牛由来 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別

表 1 牛由来 *Campylobacter jejuni* 47 株の RAPD 型とおもな DNA バンド

No.*	採材年月	農場	RAPD 型	RAPD 法によるおもな DNA バンド (kbp)
S1	96年11月	a	CR1	3.8, 3.0, 1.7, 1.6, 1.2, 1.1, 0.9
S2	〃	a	CR2	3.8, 3.0, 1.7, 1.4, 1.2, 1.1, 0.9
S3	〃	a	CR3	3.8, 3.0, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 0.9
S4	〃	a	CR4	3.8, 3.0, 1.6, 1.4, 1.3
S5	〃	a	CR2	
S6	〃	a	CR5	3.8, 3.0, 1.7, 1.5, 1.4, 1.2, 1.1, 0.8
S7	〃	b	CR6	3.8, 1.7, 1.5, 1.2, 1.1, 0.9
S8	〃	c	CR6	
S9	〃	c	CR6	
S10	〃	d	CR6	
S11	〃	d	CR6	
S12	97年2月	e	CR7	3.8, 1.9, 1.7, 1.3, 1.1, 0.9
S13	〃	e	CR8	3.8, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0, 0.9
S14	〃	f	CR9	3.8, 2.2, 1.7, 1.3, 1.1, 0.9
S15	〃	f	CR10	3.8, 3.0, 1.7, 1.4, 0.6
S16	〃	g	CR11	3.8, 2.2, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 0.9
S17	〃	h	CR12	3.8, 3.0, 2.5, 1.9, 1.7, 1.4, 0.6
I1	96年11月	i	CR1	
I2	〃	i	CR1	
I3	〃	i	CR13	3.8, 3.0, 1.7, 1.6, 1.3, 1.2, 1.1, 0.9
I4	〃	i	CR14	3.8, 3.0, 1.7, 1.5, 0.9
I5	〃	i	CR13	
I6	〃	j	CR15	3.8, 2.2, 1.7, 1.6, 1.2
I7	〃	j	CR16	3.8, 3.0, 1.7, 1.6, 1.5, 1.3
I8	〃	j	CR17	3.8, 3.0, 2.5, 1.7, 1.6, 1.3, 1.2, 0.7
I9	〃	j	CR18	3.8, 3.0, 2.5, 1.7, 1.6, 1.3, 1.2, 1.1, 0.9
I10	〃	j	CR18	
I11	〃	k	CR19	3.8, 3.4, 3.0, 2.8, 1.7, 1.3, 0.6
I12	97年2月	l	CR12	
T1	96年11月	m	CR20	3.8, 3.0, 1.7, 1.3, 0.6
T2	〃	n	CR21	3.8, 3.0, 2.2, 2.0, 1.8, 1.6, 1.3, 1.2, 0.9, 0.7, 0.6, 0.5
T3	〃	n	CR22	3.8, 1.7, 1.6, 1.3, 1.2
T4	〃	n	CR21	
T5	97年2月	o	CR23	3.8, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0
T6	〃	p	CR24	3.8, 1.7, 1.3
T7	〃	q	CR9	
T8	〃	q	CR25	3.8, 1.7, 1.5, 1.3
T9	〃	q	CR12	
G1	96年11月	r	CR1	
G2	〃	r	CR1	
G3	〃	s	CR1	
G4	〃	s	CR1	
G5	〃	s	CR1	
C1	97年2月	t	CR26	3.8, 2.5, 2.2, 1.9, 1.7, 1.5, 1.3, 0.9
C2	〃	t	CR12	
C3	〃	t	CR27	3.8, 1.7, 1.5, 1.1
C4	〃	t	CR11	

* S: 埼玉産 (n=17), I: 茨城産 (n=12), T: 栃木産 (n=9), G: 群馬産 (n=5), C: 千葉産 (n=4).

よる DNA バンドの電気泳動パターンから、供試したすべての株の型別が可能であり、牛由来 *C. jejuni* 47 株は CR1 ~ CR27 の 27 種類に分類された。農場 c, d, r および s から分離した菌株は 1 つの型に分類されたが、多くの農場では複数の型に分類され、千葉産の同じ農場の

牛 4 頭からは 4 種類の異なる型の菌が分離された。一方、CR1 や CR12 のように産地（農場）が異なる場合でも同じ RAPD 型に分類される場合もみられ、群馬産の 2 つの農場の牛、計 5 頭からはすべて同じ型の菌が分離された。

図1 RAPD法による牛由来 *Campylobacter jejuni* の電気泳動パターン

1: 栃木産 (農場o) CR23, 2: 埼玉産 (農場e) CR7, 3: 埼玉産 (農場e) CR8, 4: 埼玉産 (農場f) CR9, 5: 埼玉産 (農場f) CR10, 6: 埼玉産 (農場g) CR11, 7: 栃木産 (農場p) CR24, 8: 栃木産 (農場q) CR9, 9: 栃木産 (農場q) CR25, 10: 栃木産 (農場q) CR12, 11: 茨城産 (農場l) CR12, 12: 埼玉産 (農場h) CR12, 13: 千葉産 (農場t) CR26, 14: 千葉産 (農場t) CR12, 15: 千葉産 (農場t) CR27, 16: 千葉産 (農場t) CR11, J: 理化学研究所 *C. jejuni* 標準株 JCM2013, M: λ フェージ *Hind* III digest.

考 察

カンピロバクターの疫学マーカーとしては、最近では *C. jejuni* の特定遺伝子あるいはDNA全体を制限酵素で分解して比較する、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法 [10, 20] やパルスフィールド電気泳動法 (PFGE; pulsed-field gel electrophoresis) [5, 30] により型別するなど、*C. jejuni* の分子生物学的手法を用いた型別法に関する報告が多数みられる。しかし、これらの方法は複雑で、結果を得るには時間がかかる。一方、RAPD法は簡便で迅速性に優れ [12], PCRを行える研究室ですぐに導入できる等の利点がある。そこでFayosら [4] の手法に準じ、RAPD法により牛由来の *C. jejuni* の分類を行ったところ、すべての菌株の分類が可能であった。多くの場合、同じ農場の牛から複数の型の菌が分離され、千葉産の牛の場合には同一農場の4頭からすべて異なる型の菌が分離された。一方、RAPD法でCR1, 9, 11および12に分類された型の菌は複数の産地から分離され、広い範囲に分布しているものも認められた。限られた例数ではあるが、関東地方5県・20農場由来の菌株を比較したところ、複数の県 (農場) の牛から共通のRAPD型の菌が得られたことは興味深い。

RAPD法はヒト、動物や環境由来のカンピロバクターの型別に応用されているが [7, 17, 19], 一方、同じ反

応でも増幅の温度条件やPCR試薬によっても結果が異なることから、それぞれ条件が違う多数の施設で応用するには標準法の確立に難点があることが指摘されている [12]。今後、PFGE法等ほかの遺伝子型疫学マーカーとの比較検討を重ね、その有効性を確認したい。

検体採取に御協力くださった埼玉県中央食肉衛生検査センターの方々に感謝する。

引 用 文 献

- [1] Annan-Prah A, Janc M : J Food Prot, 51, 562-564 (1988)
- [2] Blaser MJ, LaForce FM, Wilson NA, Wang WLL : J Infect Dis, 141, 665-669 (1980)
- [3] Bolton FJ, Hutchchinson DN, Coates D : J Clin Microbiol, 19, 169-171 (1984)
- [4] Fayos A, Owen RJ, Hernandez J, Jones C, Lastovica A : Epidemiol Infect, 111, 415-427 (1993)
- [5] Gibson JR, Fitzgerald C, Owen RJ : Epidemiol Infect, 115, 215-225 (1995)
- [6] Harris NV, Weiss NS, Nolan CM : Am J Public Health, 76, 407-411 (1986)
- [7] Hernandez J, Fayos A, Ferrus MA, Owen RJ : Res Microbiol, 146, 685-696 (1995)
- [8] 伊藤 武 : 食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 350-354, 中央法規出版, 東京 (1999)
- [9] 伊藤 武, 甲斐明美, 高橋正樹, 斎藤香彦, 高野伊知郎, 柳川義勢, 大橋 誠 : 都衛研年報, 35, 8-17 (1984)
- [10] Jackson CJ, Fox AJ, Wareing DRA, Hutchinson DN : Epidemiol Infect, 117, 233-244 (1995)
- [11] Jones DM, Abbott JD, Painter MJ, Sutcliffe EM : J Infect, 9, 51-58 (1984)
- [12] 小林一寛 : 食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 40-41, 中央法規出版, 東京 (1999)
- [13] 国立感染症研究所 : 病原微生物検出情報, 20(1), S3 (1999)
- [14] 国立感染症研究所 : 病原微生物検出情報, 20(5), 107-110 (1999)
- [15] 厚生省生活衛生局食品保健課 : 食品衛生研究, 50, 118-195 (2000)
- [16] Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P : J Clin Microbiol, 15, 761-768 (1982)
- [17] Madden RH, Morgan L, Scates P : Lett Appl Microbiol, 23, 167-170 (1996)
- [18] Makino S, Kurazono T, Okuyama Y, Shimada T, Okada Y, Sasakawa C : FEMS Microbiol Lett, 126, 43-48 (1995)
- [19] Mazurier S, A van de Giessen, K Heuvelman, K Wernars : Lett Appl Microbiol, 14, 260-262 (1992)
- [20] Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM : J Clin Microbiol, 31, 1531-1536 (1993)
- [21] 仲西寿男, 貫名正文, 村瀬 稔 : 食品衛生研究, 31, 459-471 (1981)
- [22] Ono K, Masaki H, Tokumaru Y : J Vet Med Sci, 57, 1085-1087 (1995)
- [23] Ono K, Yamamoto K : Int J Food Microbiol, 47, 211-219 (1999)

- [24] 小野一見, 山本勝彦, 丹羽 章: 日本細菌学雑誌, 53, 519-529 (1998)
- [25] Penner JL, Hennessy JN: J Clin Microbiol, 29, 680-688 (1980)
- [26] 坂井千三, 伊藤 武: 日本細菌学雑誌, 40, 563-580 (1985)
- [27] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning; a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- [28] Tauxe RV: *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends, Nachamkin I, et al eds, 9-19, American Society for Microbiology, Washington, DC (1992)
- [29] Taylor DN: *Campylobacter jejuni*: Current Status and Future Trends, Nachamkin I et al eds, 20-30, American Society for Microbiology, Washington DC (1992)
- [30] Yan W, Chang N, Taylor DE: J Infect Dis, 163, 1068-1072 (1991)

Typing of Cattle-derived *Campylobacter jejuni* by Means of Randomly Amplified Polymorphism DNA Based on Polymerase Chain Reactions

Kazuaki ONO[†], Akinobu SAITOH, Kayoko OHTSUKA, Rie DOI and Hiroyuki MASAKI

Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiohkubo, Saitama 338-0823, Japan

SUMMARY

By the examination of *Campylobacter* species, 47 *Campylobacter jejuni* strains were isolated from 107 cattle cecal specimens obtained in a Saitama slaughterhouse brought from 20 farms in 5 prefectures. On the basis of the PCR-based randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method, the isolates were divided into 27 types. This method is recommended for discriminating strains of *C. jejuni* isolated from cattle for the purposes of epidemiological study. — Key words: *Campylobacter jejuni*, cattle, RAPD.

[†] Correspondence to: Kazuaki ONO (Saitama Institute of Public Health)

639-1 Kamiohkubo, Saitama 338-0823, Japan TEL 048-853-7196 FAX 048-840-1041

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 639 ~ 642 (2001)

日本獣医公衆衛生学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎萩原 敏且 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
○金子 賢一 (東京農工大学農学部)
近藤 房生 (宮崎大学農学部)
諏佐 信行 (北里大学獣医畜産学部)
山本 茂貴 (国立感染症研究所食品衛生微生物部)

伊藤 壽啓 (鳥取大学農学部)
高鳥 浩介 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)
辻本 元 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
藤瀬 浩 (麻布大学獣医学部)

【編集幹事】

町田 登 (東京農工大学農学部)

(◎委員長, ○副委員長)

【専門審査委員】

新城 敏晴 (宮崎大学農学部)
神尾 次彦 (動物衛生研究所原虫病研究室)
杉本 千尋 (帯広畜産大学原虫病研究センター)
小久江栄一 (東京農工大学農学部)
田浦 保穂 (山口大学農学部)

編集人 日本獣医公衆衛生学会
会長 植村 興