

‡ 研究紹介 ‡

マイクロアレイ技術を応用した薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出法 (CAMERA 法)

酪農学園大学 獣医学群 白井 優・館野 翔・田勢 準也・田村 豊
 北海道大学 人畜共通感染症リサーチセンター 中島 千絵・鈴木 定彦
 関東化学株式会社 小野崎 正修・大曾根 司郎

1. はじめに

カンピロバクター属菌による食中毒は世界中で多く発生しており、日本においても過去10年以上にわたって細菌性食中毒の原因として最も多く報告されています(厚生省)。日本におけるカンピロバクター食中毒の原因食品として最も多いのは鶏肉であるとされています。カンピロバクター食中毒は、健康な成人であれば、抗菌薬による治療が必要となることは通常はありませんが、幼児や老人などに対しては抗菌薬による治療が行われることがあります。近年、下痢性食中毒の治療薬として重要となフルオロキノロン (FQ) 系抗菌薬に対して耐性を示す鶏肉由来カンピロバクターが増加傾向にあり (NARMS, NVAL)、これら FQ 耐性カンピロバクターにより食中毒になった際には、抗菌薬による治療効果が得られない可能性があり影響が懸念されます。また、下痢性食中毒の際によく使用されるマクロライド (ML) 系抗菌薬に対して耐性を示すカンピロバクターが出現していることも公衆衛生上の

大きな懸念となっています (Keller, J and Perreten, V. 2006)。これら、FQ 系抗菌薬や ML 系抗菌薬は農場の鶏に対しても使用されることがあり、近年の鶏肉由来薬剤耐性カンピロバクターの増加の原因としてこれら抗菌薬の鶏農場での使用が関連している可能性があります。そこで、鶏由来薬剤耐性カンピロバクターの実態を明らかにし鶏由来薬剤耐性カンピロバクターに対して対策を立てるため、鶏糞便を調べることによる農場レベルでのモニタリング及び市販鶏肉を調べることによる販売レベルでのモニタリングが必要となります。しかし、薬剤耐性カンピロバクターを調べるには、分離培養を行い、薬剤感受性を調べるしかありませんでした。カンピロバクター属菌は微好気性細菌 (空気に触れると死んでしまう) であるため、培養に特殊な機器が必要なだけでなく、増殖速度も大腸菌などに比べて遅いため、分離培養から薬剤感受性の判定まで 5 日程度かかります。そのため、カンピロバクター属菌のモニタリングは難しく、デー

gyrA 遺伝子 (フルオロキノロン耐性株) *rrl* 遺伝子 (マクロライド耐性株)
C. jejuni (73株) *C. coli* (36株) *C. jejuni* (3株) *C. coli* (27株)



図1 国内で鶏、牛、豚から分離された薬剤耐性カンピロバクター139株の薬剤感受性にかかわる一塩基変異の位置



- ① DNA抽出
- ② Multiplex PCRによる標的DNAの増幅
- ③ DNAマイクロアレイ (プローブとのハイブリダイゼーション、primer extension, 発色)

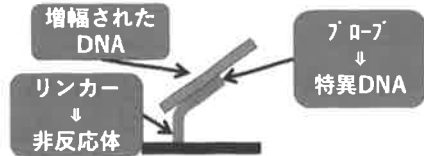


図2 原理と模式図

タの蓄積が少ないのが現状であり、迅速な薬剤耐性カンピロバクターの検出法が必要とされてきました。そこで今回、薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出・モニタリングを行うため、DNA マイクロアレイ技術を応用したCAMERA (CAMpylobacter Express Resistance detection Array) 法を開発し、その有用性を確認しました。

2. カンピロバクター属菌の薬剤耐性機構

FQ系抗菌薬は、細菌のDNAの転写・複製に関与するDNA gyraseに結合し、DNAの転写・複製を阻害し殺菌的に作用します。また、ML系抗菌薬は細菌のリボソームに結合し、細菌のタンパク質合成を阻害することで作用します。カンピロバクター属菌の両薬剤に対する耐性機構は、それぞれの標的部位(*gyrA*及び*rrl*遺伝子)の一塩基変異により両薬剤が作用しにくくなることによります。食中毒の主な原因となるカンピロバクター属菌である*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*の過去の疫学情報(国内で分離された139株)を調べたところ*C. jejuni*及び*C. coli*の両薬剤に対する耐性株の、一塩基変異の位置は*gyrA*遺伝子のC257Tと*rrl*遺伝子のA2075Gに集約していることがわかりました(図1)。このことは、薬剤耐性カンピロバク

ターのモニタリングをするには、この箇所の変異を検出すれば良いということを示します。

3. CAMERA法の原理

図2にCAMERA法の原理を示します。微小なアレイシートに、FQ系薬剤及びML系薬剤の標的部位の遺伝子の野生型及び変異型(*gyrA*はC257Tと*rrl*遺伝子のA2075G)を検出するためのプローブを配置しました。なお、*C. jejuni*と*C. coli*で*gyrA*遺伝子の配列が異なるため、それぞれの菌種に対応したプローブを配置します。これにより、菌種(*C. jejuni*と*C. coli*)の判定も可能となります。実際の方法としては、最初にサンプルからDNAを抽出し、標的DNAを対象としたマルチプレックスPCRを行います。次に、PCR増幅産物と先に作成したアレイシートでハイブリダイゼーションを行った後、primer extension反応、発色反応を行うことで、肉眼により薬剤感受性及び菌種同定が可能となります。実際の発色パターンについて、図3に示します。

4. 菌液添加試験によるCAMERA法の有用性評価

CAMERA法により、実際のサンプル(鶏の盲腸便及び鶏肉)からカンピロバクターがど

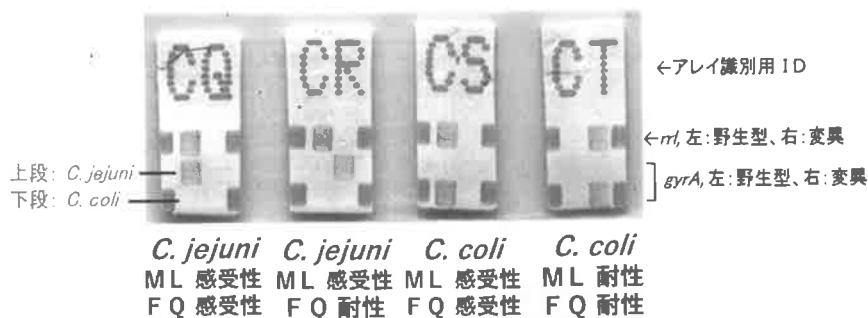


図3 CAMERA法の発色パターン

の程度の時間、どの程度の感度で検出できるかを明らかにするため、それぞれのサンプルへ希釈したカンピロバクター菌液を添加しCAMERA法を実施しました。

①カンピロバクター菌液を添加した鶏盲腸便からカンピロバクターをCAMERA法により検出するには6時間かかり検出限界は104~105CFU/gでした。

②一方、カンピロバクター菌液を添加した鶏肉からカンピロバクターをCAMERA法により直接検出したところ、前培養なしでは検出することができませんでした。そこで、鶏肉を24時間の前培養後、前培養培地からDNAを抽出してCAMERA法を実施したところ、高感度に検出(検出限界=10CFU/g)することが可能となりました。検出時間は前培養も合わせて30時間でした。

カンピロバクターに汚染されている鶏の盲腸便は、一般的に高濃度のカンピロバクターが含まれており(Stern, N J.ら 1995)、今回の検出限界(104~105CFU/g)はモニタリングに十分であると考えられました。また、鶏肉からのCAMERA法による検出については、前培養が24時間必要となるものの、従来の検査時間(約5日)に比べて大幅な検査時間の短縮が可能になり、モニタリングに有用であることが考えられました。そこで、次に野外サンプルを用いた応用試験を行いました。

5. 鶏農場糞便への応用試験

51鶏舎の鶏盲腸便を対象として、分離培養

法・薬剤感受性試験とCAMERA法の比較を行いました。分離培養法では、鶏糞便51サンプル中24サンプル(47%)でカンピロバクターが分離されました。CAMERA法ではそのうち、22サンプル(92%)が陽性を示しました。また、CAMERA法による薬剤感受性の判定と分離培養法で分離された菌の薬剤感受性は一致しました。両試験の一致から、CAMERA法は鶏盲腸便からの薬剤耐性カンピロバクターのモニタリングに十分な感度であることが示唆されました。

6. 市販鶏肉への応用試験

市販鶏肉100検体を対象として鶏糞便と同様に分離培養法・薬剤感受性試験とCAMERA法の比較試験を行いました。結果、分離培養法では100サンプル中17サンプル(17%)でカンピロバクター属菌が分離されました(表1)。CAMERA法ではそのうち、16サンプル(94%)が陽性を示しました。カンピロバクターが分離されなかったサンプルでは、CAMERA法も陰性を示しました。また、CAMERA法による薬剤感受性の判定と分離菌株の薬剤感受性は一致しました。両試験の一致から、CAMERA法は鶏肉からの薬剤耐性カンピロバクターのモニタリングに十分な感度であることが示唆されました。

7. おわりに

鶏盲腸便、鶏肉のいずれにおいても、CAMERA法は薬剤耐性カンピロバクターを

表1 市販鶏肉に対する分離培養法とCAMERA法の比較

CAMERA法の結果	分離培養法	
	分離陽性	分離陰性
<i>C. jejuni</i> FQS-MCS (n=5)	5	0
FQR-MCS (n=10)	10	0
<i>C. coli</i> FQR-MCR (n=1)	1	0
陰性 (n=84)	1	83
合計 (n=100)	17	83

FQS, フルオロキノロン感受性、FQR, フルオロキノロン耐性、MCS, マクロライド感受性、MCR, マクロライド耐性

従来の5日間から6時間または30時間まで短縮し、モニタリングに十分な感度で検出することができました。今後、CAMERA法を用いて農場レベル、販売レベルでのモニタリングを実施し、薬剤耐性カンピロバクターのデータを蓄積することが鶏由来薬剤耐性カンピロバクターの耐性・制御につながると考えています。

引用文献

厚生労働省、available at http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
 NARMS. NARMS reports and data, available at <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalA>

ntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM453398.pdf

NVAL. National Veterinary Assay Laboratory, Forestry and Fisheries. 2012. A report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System 2008 to 2011. available at http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/jvarm2008_2011.pdf.

Keller J. and Perreten V. 2006. Genetic diversity in fluoroquinolone and macrolide-resistant *Campylobacter coli* from pigs. *Vet Microbiol*, 113, 103-8.

Stern N J., Clavero M R., Bailey J S., Cox N A. and Robach M C. 1995 *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poult Sci*, 74, 937-41.