



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Development Rapid screening of Campylobacter spp. and the GyrA mutants using PCR-DNA Strip and real-time PCR(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	小島, 千明
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第1009号
Issue Date	2016-03-16
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/54565

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	小 島 千 明（神奈川県）
学位の種類	博 士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 1009 号
学位授与日付	平成 28 年 3 月 16 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Development Rapid screening of <i>Campylobacter</i> spp. and the GyrA mutants using PCR-DNA Strip and real-time PCR
審査委員	（主査）教授 出 口 隆 （副査）教授 前 川 洋 一 教授 小 倉 真 治

論文内容の要旨

Campylobacter は発展国において頻発に細菌性腸炎を引き起こす食中毒菌である。わが国でも *Campylobacter* による事例は細菌性食中毒の中でも数多く報告され、予防対策が重点的に行われてきた。本菌を食品から菌種レベルで検出・同定することは、感染経路の特定や被害拡大の防止などに繋がるが、従来の *Campylobacter* の同定法は約 1 週間を要することから迅速な検出・同定法が求められている。

また、薬剤耐性 *Campylobacter* の出現も近年大きな関心を集め、特にキノロン系抗菌薬に対する耐性株の増加は公衆衛生学上の重要な問題とされている。*Campylobacter* 食中毒の適切な治療のためにもキノロン抗菌薬への耐性化の有無を迅速に検出する技術の確立が必要である。しかし、従来の方法では薬剤耐性の判定に *Campylobacter* の検出同定から更に 3~4 日を要する。

そこで我々は、*Campylobacter* に汚染された食品を迅速に検査し菌種同定するための PCR-DNA ストリップ法およびキノロン耐性化に影響を及ぼす GyrA のアミノ酸置換を簡便かつ迅速にスクリーニングするための real-time PCR 法を開発し、それらの有用性を検討した。

【対象と方法】

Campylobacter 菌種の迅速同定法

Campylobacter の 3 菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*) と *Arcobacter butzleri* のそれぞれに特異的な primer を作製し同一チューブ内で PCR による遺伝子増幅を行い、PCR 産物を各菌種に特異的な DNA が固定された DNA ストリップと反応させることにより菌種を同定した。108 の鶏肉検体を対象として本法と従来法である Api Campy による 4 菌種の同定を試み、それらの同定結果を比較検討した。

gyrA 変異株のスクリーニング法

DNA ストリップ法により *C. jejuni* と同定された株について、従来法である E-test を用いてキノロン系抗菌薬に対する薬剤感受性試験を行った。キノロン耐性株と判定された株の全てにおいて *gyrA* 遺伝子をシーケンスし、GyrA タンパクの 86 位のアミノ酸配列が Thr から Ile へ置換していることを見出した。この置換領域を含む *gyrA* 遺伝子の一部を増幅する primer を作製し、real-time PCR および融解曲線分析にて GyrA タンパクのアミノ酸置換の有無の検出を行った。

【結果】

標準株 4 菌種に対して PCR 増幅産物を DNA ストリップで反応させた結果、すべてが予定の位置に反応し各菌種を特異的に検出できることを確認した。また、108 の鶏肉検体より 44 株の *C. jejuni* と 6 株の *C. coli* を検出することができ、Api Campy による検出結果と同等であった。*C. fetus* と *A. butzleri* は今回のサンプルからは検出されず、Api Campy の同定結果と同様の結果であった。

検出した 44 株の *C. jejuni* に対して E-test を行った結果、26 株(63.4%)がキノロン耐性と判定された。このうち 14 株の耐性株と 19 株の感受性株に対して、real-time PCR にて増幅後に融解曲線分析を行った。これにより得られた Tm 値を耐性株と感受性株とで比較した結果、両者に約 1.4°C の違いがあり、GyrA のアミノ酸置換の有無を明確に識別することが可能であった。

【考察】

本研究では、同一チューブ内で PCR を行い DNA ストリップで増幅産物を確認する方法により *Campylobacter* 属と *Arcobacter* 属の 4 菌種を迅速同定することが可能であった。また、本方法は、溶血液も炭酸ガスも用いない増菌培地である FPE ブイヨンと併用することで検体の培養から同定まで約 24 時間で行うことができ、従来法と比較して迅速に同定することが可能であった。

また、*C. jejuni* と同定された株において感受性試験によりキノロン系抗菌薬耐性と判定された株に対して、*gyrA* 遺伝子の変異をシークエンスにより確認した。全ての耐性株に 86 番目のアミノ酸置換が見られたことから、*gyrA* 遺伝子の変異はキノロン耐性化に大きく影響することが確認された。さらに、real-time PCR により *gyrA* 遺伝子の一部の増幅と融解曲線分析を行うことで、GyrA タンパクのアミノ酸置換の識別によるキノロン耐性菌株のスクリーニングが可能であった。

【結論】

PCR 法および DNA ストリップを用いることで、培養液の処理から菌種同定までを約 24 時間で行うことが可能となった。さらに *C. jejuni* が検出された際には、real-time PCR 法でキノロン耐性に関与する GyrA タンパクのアミノ酸置換を約 30 分間でスクリーニングすることが可能であった。本研究によって、*Campylobacter* の菌種同定からキノロン薬耐性のスクリーニングまでを迅速かつ簡易に行う有用な新規手法を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

申請者 小島 千明は、PCR 法を応用することにより、細菌性食中毒の原因菌のトップを占める *Campylobacter* 属の菌種を迅速に同定する方法とキノロン耐性に関与する GyrA タンパクのアミノ酸置換を迅速かつ簡便にスクリーニングする方法を開発した。これらの成果は、*Campylobacter* による食中毒の予防およびその被害の拡大防止に役立ち、臨床細菌学の発展に寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Chiaki KOJIMA, Michiru KISHIMOTO, Machiko MIYATA, Sayumi NOMURA and Takayuki EZAKI :
Development Rapid screening of *Campylobacter* spp. and the *GyrA* mutants using PCR-DNA Strip
and real-time PCR

Japanese journal of food microbiology (in press).