

カンピロバクター・コリによる食中毒事例

Food Poisoning by *Campylobacter coli*

名村 真由美 千葉 美子 那須 務*
川野 みち 梅津 幸司 秋山 和夫
鈴木 隆

Mayumi NAMURA, Yoshiko CHIBA, Tsutomu NASU
Michi KAWANO, Koshi UMEZU, Kazuo AKIYAMA
Takashi SUZUKI

キーワード：カンピロバクター・コリ，PCR-RFLP法，食中毒事例

Key Words : *Campylobacter coli* , PCR-RFLP Method , Food Poisoning

平成14年に本県で発生したカンピロバクター・コリによる集団食中毒事例において、*C. jejuni* と *C. coli* の同定に応用したPCR-RFLP法は、カンピロバクターの同定が迅速に判定できる有用な鑑別法であることを確認した。また、PFGEにより分離菌株の遺伝子パターンを比較し、複数のパターンの菌株が検出された。

1 はじめに

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*)及び、*Campylobacter coli* (*C. coli*)は、家畜や鳥類などに広く分布する細菌¹⁾であるが、ヒトには常在せず、主要な食中毒細菌の一つである。

しかしこれらの菌は、他の食中毒原因菌の場合と比べ、検体からの菌分離・同定に時間を要している。これを短縮する目的で、菌種の決定にはしばしば、生化学性状試験より薬剤感受性等を利用した簡便法が用いられてきた²⁾。

平成14年10月に発生した食中毒事件は、*C. coli*による本県で初めて確認できた集団食中毒事例であった。本事例では、菌種の鑑別にPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法を導入して同定を行った。その結果、この方法は*C. jejuni* と *C. coli* の区別が迅速かつ正確に判定でき、日常の検査に有用であることが確認できたので、その概要について報告する。

2 食中毒事件の概要と検査方法

2.1 事例概要

平成14年10月29日に、S保健所管内の医療機関からカンピロバクターによる食中毒の届け出があった。聞き取り等調査の結果、同月21日に焼き肉屋で食事をした高校生30名中23名が、同月23～25日にかけて下痢や腹痛・発熱などの食中毒症状を呈していた。そのうちの1名が医療機関を受診、検査の結果、便よりカンピロバクターが

* 現 仙南仙塩広域水道事務所

検出され、原因食品究明のため、同一の食事をした摂取者の便、及び拭き取り等の細菌検査を実施した。概要を表1に、発症者の臨床症状を図1に示した。

表1 食中毒事件の概要

摂食日	10月21日
発症日	10月23日～10月25日
摂食者数	30名
発症者数	23名(76.7%)
患者数	1名

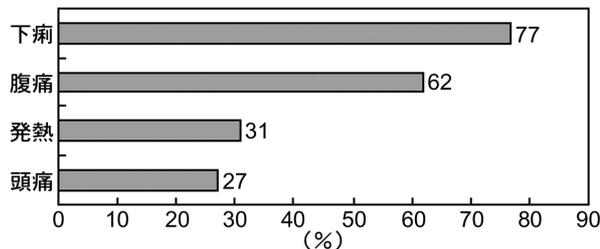


図1 発症者の臨床症状

2.2 細菌検査

細菌検査は発症者便及び非発症者便31件(5名重複)、拭き取り6件、飲料水(水道水含む)9件及び、本件の発症者便から民間検査機関で分離された菌株1株について行った。

検査は、通常の食中毒検査時の方法に従い、直接塗抹培養及び増菌培養で食中毒原因菌の検索を行った。カンピロバクター検査方法を図2に示した。検体をスキロー培地で直接好気培養(42℃), プレストン培地で増菌好気培養(42℃)を行った。スキロー培地上で疑わしいコロニーを釣菌し、血液寒天培地で純培養後、ラテックス法によるカンピロLA(デンカ生研)で属種を決定し、さらに菌種同定のためその他生化学性状試験を行った。

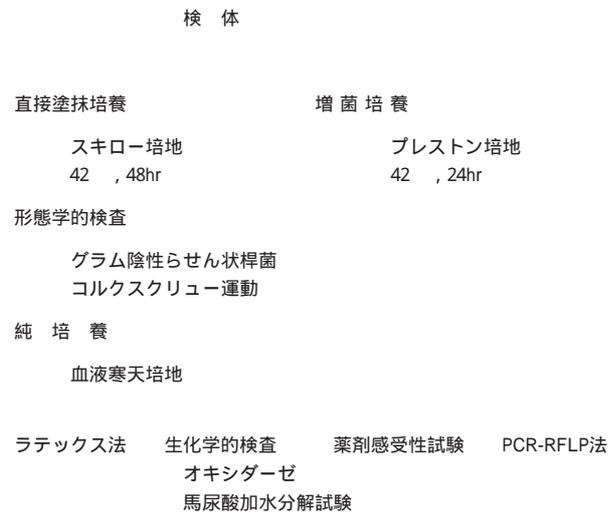


図2 *Campylobacter* 属菌の検査手順

2.3 薬剤感受性試験

分離菌株の薬剤感受性試験は、ナリジクス酸(NA)およびセファロチン(CET)はモノディスク法で、アンピシリン(ABPC),ピペラシン(PIPC),セファゾリン(CEZ),セフトラジウム(CAZ),セファクロル(CCL),フロモキシセフ(FMOX),セフポドキシム(CPDZ),アズトレオナム(AZT),イミペネム(IPM),メロペネム(MEPM),ゲンタミシン(GM),アミカシン(AMK),ミノサイクリン(MINO),ホスホマイシン(FOM),ST合剤(ST),レボフロキサシン(LVFX)の16種類について微量液体希釈法(ドライプレート:栄研化学)で行いMICを求め、結果をNCCLSの基準に準じて感受性(S),中間(I)及び耐性(R)とした。

2.4 PCR-RFLP法

各菌株を滅菌蒸留水にけん濁後、96℃6分加熱し、10,000rpmで遠心した上清をそれぞれ菌株のテンプレートとした。PCRはReady to Go(アムシャム社製)のPCR Beads tubeを用い、サーマルサイクラー(ABI 9700)で反応を行った。PCR終了後、制限酵素Alu Iで1時間処理し、電気泳動及び染色により反応生成物を確認した。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法

各菌株をBHIブイヨンで2晩培養後、加温溶解した1%アガロースゲルを混合し、1×5×8mmの大きさに固化(プラグ)した。プラグをリゾチーム処理した後、制限酵素Sma IでDNA断片処理を行い、更にアガロース

ゲルに埋め込みパルスフィールド法で電気泳動を行った。電気泳動はBIO-RADの装置を使用し、電圧6V/cm,角度120度,1-23sec:18.5hrの条件で行った。泳動後はPCR-RFLP法と同様にDNAのバンドを確認した。

3 結果

便検体26名分について菌検索を行い、15名よりカンピロバクターを検出した(検出率57.7%)(表2)。検体からその他の食中毒菌は検出されなかった。分離したそれぞれの菌株についての生化学性状を検査した結果、馬尿酸加水分解が陰性であり、*C. coli*と推定した。なお、*C. jejuni*及び*C. coli*と比較して表3に示した。

表2 *C. coli*の検出状況

検体	検査件数	検出数
便	26*	15(57.7%)
拭き取り	6	0(0.0%)
飲料水	9	0(0.0%)
計	41	15(36.6%)

*5名の重複除く

表3 *Campylobacter*属菌・分離菌株の生化学性状

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	分離菌株
オキシダーゼ	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+
グルコース分解	-	-	-
TT抵抗性	+	+	+
硫化水素産生性(TSI)	-	-	-
馬尿酸加水分解	+	-	-
酢酸インドキシル加水分解	+	+	+
ナリジクス酸感受性	S	S	S・R
セファロチン感受性	R	R	R

カンピロバクターの特異遺伝子領域の23rRNAをターゲットとし、それぞれの分離菌株および対照とした*C. jejuni*, *C. coli*についてFermerのプライマー³⁾でPCRを行い、更にPCR生成物を制限酵素Alu Iで処理した。各々のPCR生成物及び酵素処理後の検体を電気泳動・染色した結果を図3に示した。PCR生成物は491bpの位置にバンドが認められた。Alu I処理後では、対照の*C. jejuni*は200,160,120bpの3本のバンドが、*C. coli*は290,200bpに2本のバンドが認められた。一方、分離菌株全てが*C. coli*と同じ位置にバンドが認められ、*C. coli*であることが分子生物学的に確認できた。

それぞれの分離菌株について、16薬剤に対する感受性試験結果を表3に示した。全ての菌株はCCL, CPDZ, AZTのセファロスポリン,セフェム系に耐性を示したが、ニューキノロン系のLVFXに対しては耐性を示す菌株,感受性を示す菌株が認められた。また、モノディスク法

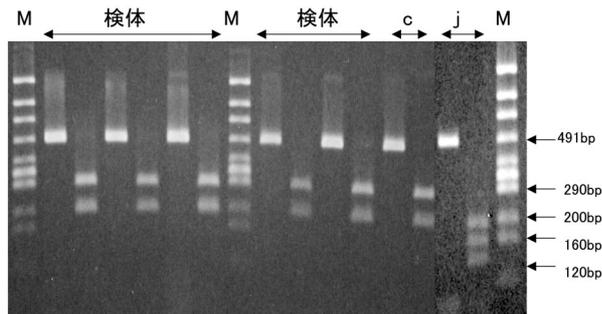


図3 PCR-RFLP画像

Mはマーカー, cは*coli*, jは*jejuni*を示す

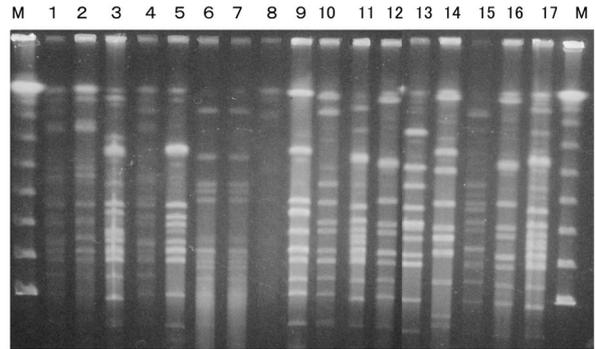


図4 分離菌株のPFGEパターン

表4 薬剤感受性試験

	ABPC	PIPC	CEZ	CAZ	CCL	FMOX	CPDZ	AZT	IPM	MEPM	GM	AMK	MINO	FOM	ST	LVFX
1	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
2	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
3	S	I	S	I	I	S	R	R	S	S	S	S	I	S	I	S
4	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	R
5	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	I	S
6	S	S	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S
9	S	I	S	I	I	S	R	R	I	S	S	S	R	S	I	R
10	S	S	S	S	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S
11	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S
12	S	I	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
13	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	S	R	R
14	S	I	S	S	R	S	R	I	S	S	S	S	I	S	R	R
15	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S
16	S	I	S	S	I	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R
17	S	I	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S

S: 感受性, R: 耐性, I: 中間

でもキノロン剤のNAに対して約半数が耐性を示した。このことから, 17菌株は同一の感受性を示す菌株でないことが示唆された。

それぞれの菌株を*Sma* Iで行ったPFGE解析の結果の画像を図4に示した。15名から分離した17菌株(重複2菌株)のPFGE画像において1と2, 6と7, 11と17, 12と16はそれぞれ同一パターンを示したが, 17菌株全ての画像は一致せず, 遺伝子型が異なる複数の*C. coli*が混在していることが示された。

4 考 察

今回の食中毒事例で導入したPCR-RFLP法では, *C. jejuni*と*C. coli*の菌種の鑑別が2~3日で同定できることから, 迅速診断法として日常検査に有用であることが確認できた。

*C. jejuni*による食中毒では, 複数の血清型による混合

感染を示す事例が多く報告されている²⁾。本事例は*C. coli*による事例ではあるが, 薬剤感受性及びPFGE解析の結果から, 複数の遺伝子型による混合感染であったと考えられた。

通常, カンピロバクター属菌の同定には日数を要することから, 簡易同定法が日常検査に広く用いられている。特に, *C. jejuni*と*C. coli*の簡易同定法として, NA, CETに対する薬剤感受性及び馬尿酸水解能の有無による鑑別法が行われる。しかし, 近年カンピロバクターの薬剤感受性は変化し, NA耐性の菌株が増加傾向にある。

*C. coli*による本事例を経験し, カンピロバクター食中毒検査について新たな取り組みの必要性が求められ, 今後, カンピロバクター食中毒の検査には, PCR-RFLP法の導入が重要であると思われる。また, 薬剤感受性試験は, 菌種の同定用としてより耐性菌動向の監視に有用であり, 実施すべき検査項目と思われた。

5 謝 辞

本事例に関係しました保健所の皆様に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 坂崎利一ほか：食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版（200），p336 - 362
- 2) 荒井富雄ほか：カンピロバクターによる食中毒事例，宮城県保健環境センター年報（1998），p39 - 41
- 3) Fermer .C et al : Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic Campylobacters , *Campylobacter jejuni* , *C.coli* , *C.lari* , and *C.upsaliensis* , J.Clin. Microbiol . 37 ,(1999) p3370 - 3373