

食中毒検査から分離されたカンピロバクター菌株の解析結果

Characteristics of Campylobacter species derived from food poisoning cases

高橋 恵美 佐々木美江*¹ 有田 富和
加藤 浩之 小林 妙子*² 畠山 敬
菅原 優子 谷津 壽郎*³ 御代田恭子

Emi TAKAHASHI, Mie SASAKI, Tomikazu ARITA
Hiroyuki KATO, Taeko KOBAYASHI, Takashi HATAKEYAMA
Yuko SUGAWARA, Juro YATSU, Yasuko MIYOTA

我が国で食中毒事件数が最も多いカンピロバクター属菌について、平成18年度～20年度に宮城県の食中毒検査で分離された株の薬剤感受性試験、及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による分子疫学解析と制限酵素の組み合わせによる解像力の比較検討を行った。

キーワード：カンピロバクター属菌；血清型；薬剤感受性試験；パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）；制限酵素

Key words : Campylobacter species ; Serum groups ; Drug susceptibility test ;

Pulsed field Gel Electrophoresis (PFGE) ; Restriction enzyme

1 はじめに

カンピロバクター属菌は、我が国では食中毒の原因菌として発生件数が最も多い。患者数としても、ノロウイルスに次いで2番目（2008年）に多い¹⁾。この食中毒は、飲食店を原因とすることと、少数事例が多いという特徴がある。

カンピロバクター属菌は、家禽や牛の腸管に常在しており、流通している鶏肉の半数以上はこの菌に汚染されているとの報告がある。主に鶏肉や牛レバーなどの生食や不十分な加熱での喫食、汚染された飲料水の摂取、保菌動物との接触によって感染する。また、比較的少ない菌量でも感染が成立するため、鶏肉調理後の手指、まな板や包丁の不十分な洗浄による2次汚染が問題とされる。さらに、潜伏期間が2～7日と長いため、原因食品が判明しない事例も多い。主な症状は下痢、腹痛、発熱、嘔吐などであり、多くは1週間程度で治癒するが、まれに重症化し、感染の数週間後に手足の麻痺などを起こすギラン・バレー症候群を発症することもある。

当所でも、平成18年度から20年度の3年間に食中毒及びその関連調査として検査した93事例のうち、13事例からカンピロバクター属菌が検出され、7事例が宮城県内で発生した食中毒事件であった。

近年、カンピロバクター属菌は薬剤耐性化が進んでおり、キノロン系薬剤耐性株の割合が30～40%という報告がある²⁾。養鶏場でのキノロン系薬剤の多用との関連が指摘されており、鶏の腸管内ではこの菌は高頻度に変異を起こしやすいことも一因であるといわれている。

そこで、宮城県で分離されたカンピロバクター属菌の

種類及び薬剤耐性菌の傾向と、事例間の関連性を比較するため、これらの菌株の遺伝子解析を行ったので結果を報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

平成18年度から20年度の3年間に食中毒検査より検出したカンピロバクター属菌83株（人由来79株、食材由来4株）

2.2 方法

2.2.1 カンピロバクター属菌の分離同定

当所の食中毒検査マニュアルに基づき、便からの分離は、直接選択培地はCCDA培地を、増菌培養についてはポルトン培地を使用し、42℃で1晩微好気培養後、CCDA培地で分離培養した。食材については、等量のPBSで1分間ストマッカー処理を行った乳剤の1mlをポルトン培地に接種し、同様に42℃で1晩微好気培養後、CCDA培地により分離培養した。CCDA培地はいずれも42℃、2日間微好気培養を行った。CCDA培地上に発育した疑わしいコロニーをグラム染色・オキシダーゼテスト・カンピロバクターLA（デンカ生研）を用いて性状を確認し、PCR-RFLP（Fermerのプライマーと制限酵素Alu I使用）により菌種同定を行った。

2.2.2 血清型別

*C. jejuni*と同定された菌株について、市販のカンピロバクター診断用免疫血清（デンカ生研）を使用し血清型を決定した。

2.2.3 薬剤感受性試験

*C. jejuni*及び*C. coli*について、一濃度ディスク法でナリジクス酸（NA）・ノルフロキサシン（NFLX）（KBディスク：栄研化学）に対する薬剤感受性試験を実施した。

* 1 現 仙南・仙塩広域水道事務所

* 2 現 大崎広域水道事務所

* 3 現 食肉衛生検査所

2.2.4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学解析

制限酵素 *Kpn* I を用いて同一事例株間の相同性と、異なる事例間での関連性を確認した。プロトコルは八尋ら³⁾の方法を参考とした。

2.2.5 制限酵素の併用による解析 (PFGE 法)

Kpn I で同一又は類似する PFGE パターンを持つ株に対して、他の制限酵素との組み合わせによる検討も行った。追加した制限酵素は *Sma* I とし、*Kpn* I と *Sma* I を同時に同量使用した処理 (*Kpn* I + *Sma* I) と、*Kpn* I 処理後に *Sma* I 処理 (*Kpn* I ~ *Sma* I) を行った場合を比較した。なお、*Kpn* I ~ *Sma* I 処理は依田ら⁴⁾の方法 (double-digestion 法) を参考とした。

電気泳動には BIO-RAD 社製 Chef Mapper (パルスタイム 6.8~38.4 秒、泳動 19 時間) を用い、遺伝子パターンの解析には Fingerprinting II (Dice) を使用した。

3 結果

3.1 カンピロバクター属菌の分離同定

菌種の同定結果を表 1-1 に、菌種の検出事例数を表 1-2 に示した。また、事例毎の分離同定数を図 1 に示した。

表 1-1 菌種の同定結果

菌種	検出事例数	株数
<i>C. jejuni</i>	11	48
<i>C. coli</i>	6	31
<i>C. lari</i>	1	4

表 1-2 菌種の検出事例数

検出された菌種	検出事例数
<i>C. jejuni</i> のみ	7
<i>C. coli</i> のみ	2
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	3
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	1

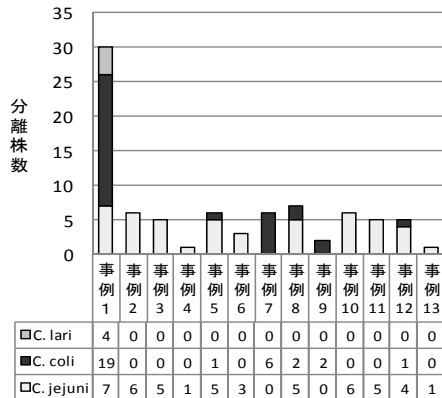


図 1 事例毎の分離株数と菌種

13 事例のうち 11 事例 (85%) から *C. jejuni* が検出され、*C. lari* も 1 事例から分離された。また、約 1/3 の 4 事例から複数の菌種が検出された。そのうち、事例 1 では 1 人から 2 菌種検出された例もあった。

3.2 血清型別

分離された *C. jejuni* の血清型は 8 種類であった。48 株中、R 群が 3 事例 15 株 (事例 1, 8, 10)、D 群が 2 事例 9 株 (事例 5, 12)、A 群が 2 事例 6 株 (事例 3, 13)、分類不能 (UT) が 10 株であった (表 2)。

3.3 薬剤感受性試験

C. jejuni 及び *C. coli* の薬剤感受性試験の結果は図 2-1, 2 に示すとおりであった。いずれの菌株も、NA 耐性株は NFLX にすべて耐性であった。*C. coli* では NA 耐性株が 35%、NFLX 耐性株が 32%であった。*C. jejuni*

表 2 血清型の種類

事例	血清型	株数	事例	血清型	株数
1	R, UT	4, 3	8	F・R	5
2	UT	6	10	R	6
3	A	5	11	0	5
4	UT	1	12	D	4
5	D	5	13	A	1
6	C, B, I (各 1 株)				

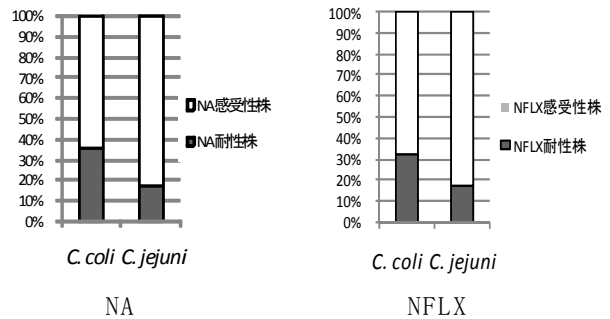


図 2-1 薬剤耐性株の割合

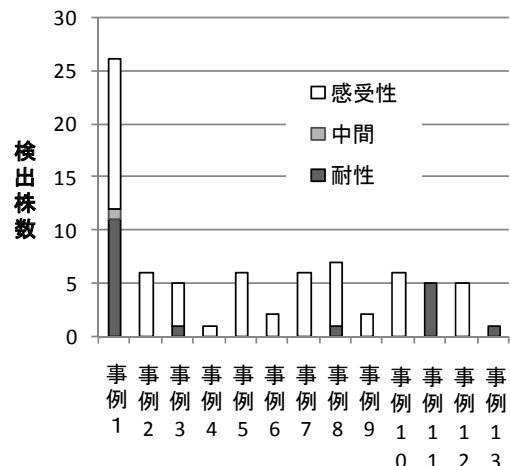


図 2-2 事例毎の耐性株数

ではNA耐性株、NFLX耐性株とも17%であった。

事例でみると、事例1で26株中11株(42%)がNA耐性株であった。その内訳は、*C. coli*で約50% (19株中10株)、*C. jejuni*の血清型R群で25% (4株中1株)であったが、UTでは認められなかった。また、事例3と8でも耐性株と感受性株が混在していた。

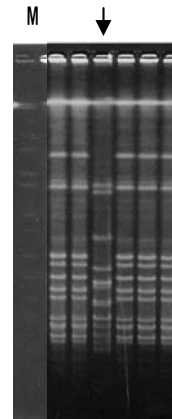
3.4 PFGE法による分子疫学解析

同一事例内で同じ血清型を持つ*C. jejuni*株は、遺伝子パターンに若干の変異が見られた事例1を除き、それぞれ相同性は85%以上であり、異なる事例間での相同性は認められなかった(図3-1)。また、血清型UTの事例では全く異なるパターンの株が出現した(図3-2)。

3.5 制限酵素の併用による解析(PFGE法)

2種類の酵素(*Kpn*I, *Sma*I)を併用することにより、*Sma*Iのみ使用した場合の約2倍数のバンドが出現した。

図4-1は*Kpn*Iで同じパターンであった、事例7(*C. coli*)の同食材由来の株(1, 2)と人由来の株(3~6)を*Sma*I, *Kpn*I+*Sma*I, *Kpn*I~*Sma*Iで処理したものである。その結果、*Kpn*Iで同じパターンのものは、

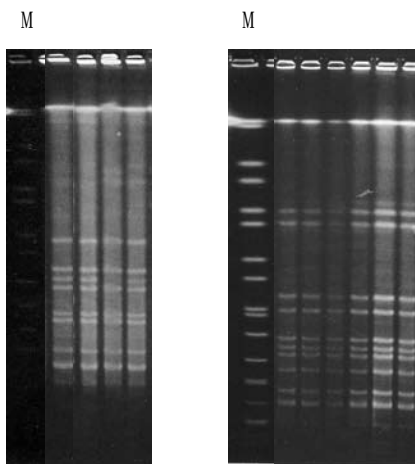


事例2 (血清型 UT)

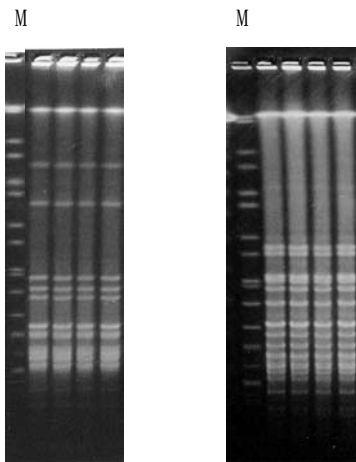
図3-2 1本のみ異なるパターンが出現した事例

他の3処理でも違いは認められなかった。

図4-2は、*Kpn*Iで明瞭ではないが、数本のバンドの違いが認められた事例8の同食材由来2株(*C. coli*)である。同様に*Sma*I, *Kpn*I+*Sma*I, *Kpn*I~*Sma*I処理でも確認を行った結果、同様に違いが認められた。



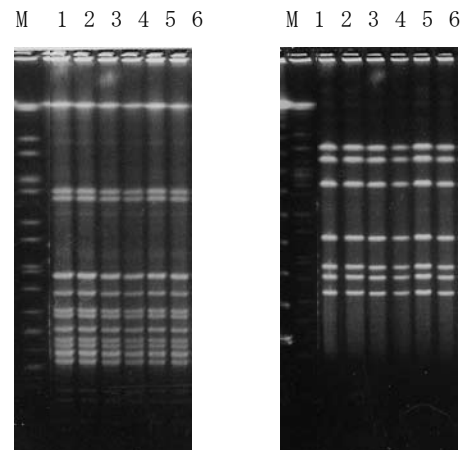
事例1 (血清型 R 群) 事例10



事例5 (血清型 D 群) 事例12

M: *S. Braendrup*

図3-1 異なる事例間での相同性の比較

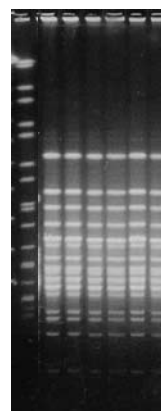


*Kpn*I 処理

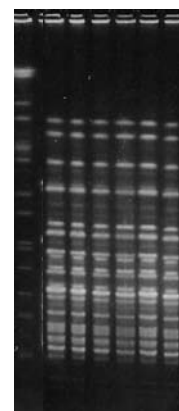
*Sma*I 処理

M 1 2 3 4 5 6

M 1 2 3 4 5 6



*Kpn*I + *Sma*I



*Kpn*I ~ *Sma*I

処理

処理

図4-1 制限酵素の併用による解像力の比較 (同一パターン: *C. coli* 株)

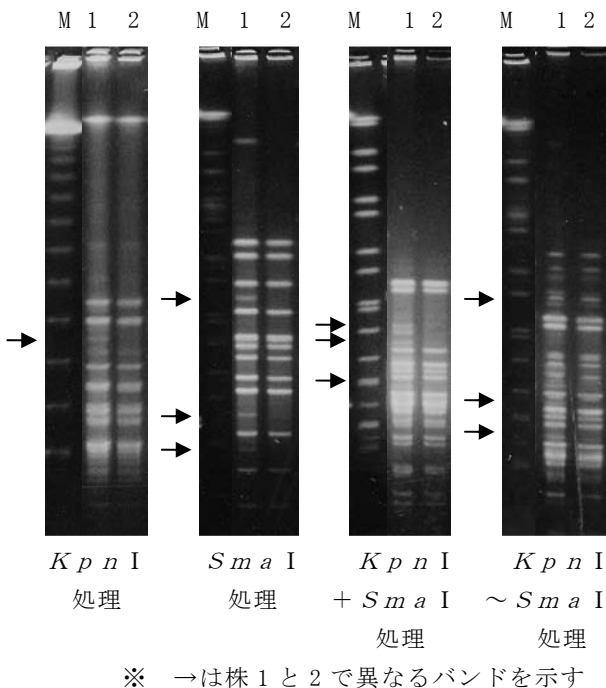


図4-2 制限酵素の併用による解像力の比較
(違いが出現したパターン：C. coli 株)

4 考察

カンピロバクター属菌が検出された13事例中11事例(85%)からC. jejuniが原因菌として検出されており、宮城県でも全国の傾向⁵⁾と同様の結果を得た。しかし、分離菌の血清型は様々で、一般に多いと言われているB群、D群の優位性は明らかではなかった。また、同一事例でも複数の菌種が検出された事例(4事例)もあり、原因となった食材が複数菌種に汚染されていたことが推察された。

薬剤感受性試験については、NA耐性株がC. jejuniで17%と、全国の傾向²⁾よりやや低めであり、NFLXにもすべて耐性であった。また、同一事例で血清型、遺伝子パターンが同じ株でも、薬剤耐性に違いが認められる株が存在した。キノロン系薬剤は養鶏場で使用されており、比較的耐性を獲得しやすいと考えられるが、今後はキノロン系薬剤だけでなく、治療の第一選択剤であるエリスロマイシンやテトラサイクリン等の薬剤を含め、耐性化の動向を調査していくことが重要であると考えられる。PFGE法による解析では、県内の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。また、同一事例で遺伝子パターンが全く異なるC. jejuniもしくはC. coliが検出された

事例もあった(事例1, 2)。これらの事例はC. jejuniは血清型UTであり、C. coliは型別血清がないため、現状ではPFGE法以外に区別の方法がない。

さらに、同一事例で遺伝子パターンが微妙に変化したと思われる株も認められ、原因となった食材もしくは人の体内で比較的早く遺伝子変化が起きている可能性を示している。このような株では単独酵素処理だけでなく、double-digestion法でより詳細な比較解析を行うべきであると考えられた。

5 まとめ

- ・宮城県の平成18年～20年度の食中毒由来のカンピロバクター属菌は3菌種に分類され、複数菌種の感染例も認められた。
- ・C. jejuniの血清型は8種類検出されたが、鶏や牛から多く検出されるB, D群の優位性は認められなかった。
- ・NA・NFLXに対する薬剤耐性株は約25%の割合で認められた。
- ・PFGEの結果、県内の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。また、同一事例でも複数遺伝子パターンのC. jejuniもしくはC. coliに汚染されている事例や、同一事例内の遺伝子パターンが微妙に変化した事例も検出された。後者の類似株については、SmaIと、2種類の酵素を使用するdouble-digestion法でも解析を行う方が、より詳細な比較解析が可能になると推察された。

参考文献

- 1) 平成20年食中毒発生状況：厚生労働省食中毒統計
- 2) 国立感染症研究所 感染症情報センター 病原微生物検出情報；27, 173-175 (2006)
- 3) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美：Campylobacter jejuni分子疫学解析の検討：厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 広域における食品由来感染症を迅速に察知するために必要な情報に関する研究 平成18年度 総括・分担研究報告書
- 4) 依田清江, 横山栄二, 内村眞佐子：制限酵素 double-digestion法によるpulsed-field gel electrophoresis法を用いたCampylobacter jejuni集団食中毒の分子疫学的解析例：感染症雑誌 第80巻 第6号
- 5) 国立感染症研究所 感染症情報センター 感染症の話 カンピロバクター感染症