

散発下痢症患者由来からのカンピロバクター検出状況及び疫学解析

Epidemiological Study of *Campylobacter* Isolated from Patients with Sporadic in Miyagi

小林 妙子 小泉 光 坂上 亜希恵 中村 久子 渡邊 節
Taeko KOBAYASHI, Hikari KOIZUMI, Akie SAKAGAMI,
Hisako NAKAMURA, Setu WATANABE

平成 27 年 4 月から平成 28 年 3 月までの期間に、検査機関で分離された散発下痢症患者由来のカンピロバクター属菌 246 株について、患者の年齢分布、検出状況、薬剤耐性および疫学解析を実施した。年齢構成は、20 代が全体の 30% と最も多く 30 代以下が全体の約 60% を占めた。検出状況では、期間を通して検出されたが 6 月～10 月に多かった。血清型は 16 種類に分類され複合型に汚染していた。菌種別耐性率では、*Campylobacter jejuni* は 206 株中 100 株 (48.5%)、*Campylobacter coli* は 38 株中 26 株 (68.4%) と *C.coli* の耐性率が高かった。薬剤別では、ナリジクス酸、ノフロキサシン、オフロキサシンに対して約 40% と高い耐性を示した。特に *C.coli* で 3 剤以上耐性株が耐性菌全体の約 7 割を占めていた。*C.jejuni* 血清型 D 群の疫学解析結果では、分離時期の異なる一部の株で遺伝子パターンが一致したことから患者間で同一の暴露を受けた可能性があるものと推察された。

キーワード：カンピロバクター；血清型；薬剤耐性；パルスフィールドゲル電気泳動

Key words : *Campylobacter* ; serotyping ; drug resistance ; PFGE

1 はじめに

近年の食品流通の広域化により食中毒事件は大規模化している。厚生労働省が公表している食中毒統計によると、カンピロバクター食中毒は増加傾向にあり、鶏肉やレバー等肉類に起因する食中毒が多数発生しており、細菌性食中毒事件数の第 1 位となっている¹⁾。カンピロバクター食中毒の発生時期は夏季をピークに多くなっているが、冬季に発生した事例もあり、年間を通じて散発事例も多い。

本県のカンピロバクター食中毒事件数は、平成 23 年に 1 件、平成 24 年に 3 件、平成 25 年に 1 件発生でさほど多い印象はない。当所では、平成 26 年 8 月から民間検査機関で分離した散発下痢症患者由来のカンピロバクター属菌株の分与を受け、県内でも多くの散発下痢症患者が発生していることを確認している。このように、集団発生事例でないカンピロバクターの発症についてはほとんど把握されていないのが現状である。食中毒事例は多いものの、カンピロバクター食中毒は感染菌量が少量 (約 500～800 個) で成立すること、潜伏期間が 2～5 日と長いことや本菌が乾燥条件に弱いことなどの特徴から、感染源の特定が困難である。さらに、近年ニューキノロン系薬剤に対しては耐性化が進んでおり、薬剤耐性の監視も必要となっている。

今回の調査は、年間を通じて散発下痢症患者からの本菌の分離状況を把握することを目的とし、さらにニ

ューキノロン系薬剤耐性菌の出現状況を確認し、疫学データの解析から散発下痢症患者間の関連性について調査した。

2 対象および方法

2.1 対象期間

平成 27 年 4 月から平成 28 年 3 月

2.2 対象菌株

民間検査機関で県内の散発下痢症患者から分離されたカンピロバクター属菌 246 株を対象とした。

2.3 菌種の同定

分与された菌株を血液寒天培地に純培養し、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) を用いて性状確認を行い、PCR 法により *C.jejuni* / *coli* の鑑別を行った。

2.4 血清型別試験

C.jejuni と同定された 206 株については、カンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いて Penner の血清型別試験を実施した。

2.5 薬剤感受性試験

血液寒天培地で純培養した菌株を BHI ブイヨンで 42℃、24 時間微好気培養した。その培養液を 5% 馬血液加ミューラーヒントン寒天培地に塗抹後、KB ディスク (栄研) を用い、37℃、48 時間微好気培養後阻止円を測定した。薬剤は、ナリジクス酸 (NA)、ノフロキサシン (NFLX)、オフロキサシン (OFLX)、テトラ

サイクリン (TC) およびエリスロマイシン (EM) の 5 剤を用いた。

2.6 パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 解析

C.jejuni の血清型 D 群 32 株を対象に PFGE を実施した。分離菌株を血液寒天培地で 42°C, 24 時間培養後、平板上の集落を HI ブイヨンで McFarland5 程度に懸濁し、八尋ら⁷⁾の方法に準じて PFGE 用プラグを作成した。プラグは制限酵素 *Sma* I および *Kpn* I で処理し、CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いて電気泳動を行い、泳動後、PFGE 結果を FingerPrinting II で解析した。泳動条件は、6.0V/cm, パルスタイム 6.8~38.4 秒で泳動時間 17 時間である。

3 結果

3.1 年齢構成および月別検出状況

患者の年齢構成は、20代が全体で 75 人 (30.5%) と多く、次いで 10代が 39 人 (15.9%)、30代が 32 人 (13.0%) で、30代以下が全体の約 60%を占めた (図 1)。月別検出状況は、期間を通して分離されたが、特に 6月~10月に多く、冬季にも発生がみられた (図 2)。

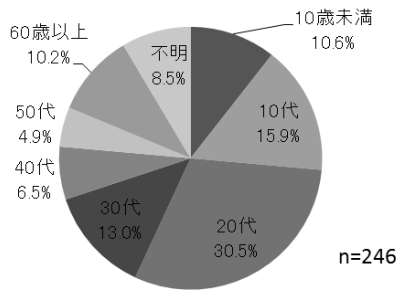


図 1 年代別検出状況

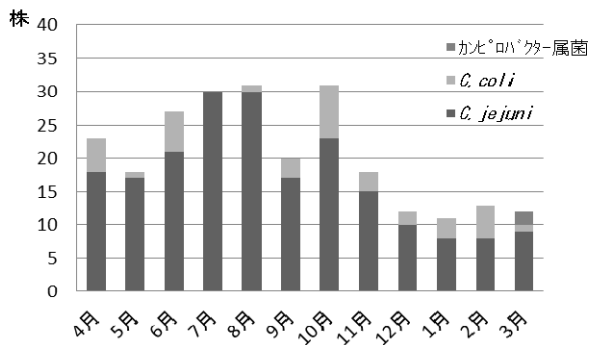


図 2 月別検出状況

3.2 分離状況と血清型別結果

菌種を同定した結果、*C.jejuni* 206 株 (83.8%)、*C.coli* 38 株 (15.4%)、他の *Campylobacter* 属菌 2 株 (0.8%) であった (表 1)。

表 1 菌種の同定結果

菌種	株数	(%)
<i>C.jejuni</i>	206	(83.8)
<i>C.coli</i>	38	(15.4)
他の <i>Campylobacter</i> 属菌	2	(0.8)

菌株の血清型は 16 種類に分類され、型別不能 (UT) を除いて D 群 42 株 (20.4%) が最も多かった。次いで O 群 20 株 (9.7%)、R 群 12 株 (5.8%)、F 群 11 株 (5.3%) で、UT は 74 株 (35.9%) 認められた (表 2)。D 群はこれまでの食中毒事例などからも多く分類されており主要な血清型である。

表 2 *C.jejuni* の血清型

血清型	株数	血清型	株数
A群	1	K群	1
B群	9	L群	4
C群	6	O群	20
D群	42	P群	8
E群	1	R群	12
F群	11	Y群	2
G群	7	Z ₆ 群	3
J群	5	UT	74

3.3 薬剤感受性試験結果

菌種別薬剤耐性菌の出現状況では、*C.jejuni*の耐性率は100株 (48.5%)、*C.coli*の耐性率は26株 (68.4%)と *C.coli*の耐性率が高かった (表 3)。

薬剤別耐性率では、NA, NFLX, OFLX に対して *C.jejuni*, *C.coli* 共に約 40%と高い耐性を示したが、TC については *C.coli* が 42.1%と高かった (図 3)。またカンピロバクター下痢症治療の第一選択薬である EM に対する耐性株は、*C.coli* の 10 株 (26.3%) に対し *C.jejuni* は 1 株 (0.5%) であった。

表 3 菌種別の薬剤耐性菌出現状況

	<i>C.jejuni</i> 株数	<i>C.jejuni</i> 耐性率 (%)	<i>C.coli</i> 株数	<i>C.coli</i> 耐性率 (%)
1剤	20	48.5	7	26.3
2剤	1	0.5	1	3.8
3剤	42	100	8	30.8
4剤	37	92.5	5	19.2
5剤	0	0	5	19.2
合計	100	48.5	26	68.4

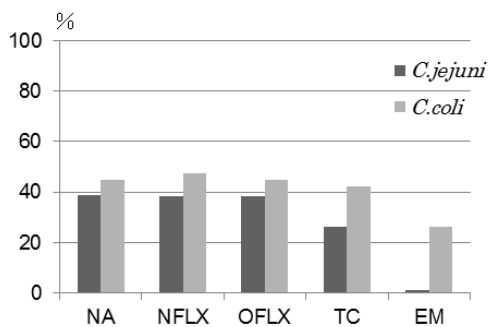


図3 薬剤別耐性率

次に、*C.jejuni*で薬剤耐性率の高い上位3血清型(D群, G群, O群)とUT及び*C.coli*について、薬剤耐性状況を示した(表4)。*C.jejuni*では、UTが3剤、

4剤の耐性株が多く、G群はすべて耐性株であった。一方*C.coli*では、5剤耐性が5株分離され、3剤以上耐性株が耐性菌全体の約7割を占めており多剤耐性化が進んでいる。

3.4 PFGE 解析結果

散発下痢症患者間の関連性を見るために、分離の多かった*C.jejuni*血清型D群32株を対象にPFGEを実施した(図4)。制限酵素*Sma*I切断によるPFGE結果では、85%の相同性で4グループ7パターンに分類された(図4)。さらに*Kpn*I切断を行ったところ6グループ14パターンに分類された(図5)。このうち、図5の*Kpn*I切断パターンで100%同一のパターンを示した5株については、*Sma*Iでも同一のパターンを示していた。

表4 血清型別薬剤耐性状況(抜粋)

耐性パターン	<i>C.jejuni</i>				<i>C.coli</i>	
	D群 株数 (%)	G群 株数 (%)	O群 株数 (%)	UT (型別不能) 株数 (%)	株数 (%)	株数 (%)
5剤 NA・NFLX・OFLX・TC・EM					5 (19.2)	
4剤 NA・NFLX・OFLX・TC	4 (40.0)	1 (14.3)	1 (16.6)	18 (43.9)	2 (7.7)	
NA・NFLX・OFLX・EM					3 (11.5)	
NA・NFLX・TC・EM				1 (2.4)		
3剤 NA・NFLX・OFLX	3 (30.0)		4 (66.6)	17 (41.5)	6 (23.0)	
NFLX・OFLX・TC					1 (3.8)	
NFLX・OFLX・EM					1 (3.8)	
2剤 TC・EM					1 (3.8)	
NA・OFLX				1 (2.4)		
1剤 TC	3 (40.0)	6 (85.7)		4 (9.8)	7 (27.0)	
NA			1 (16.6)			
合計	10 (100)	7 (100)	6 (100)	41 (100)	26 (100)	

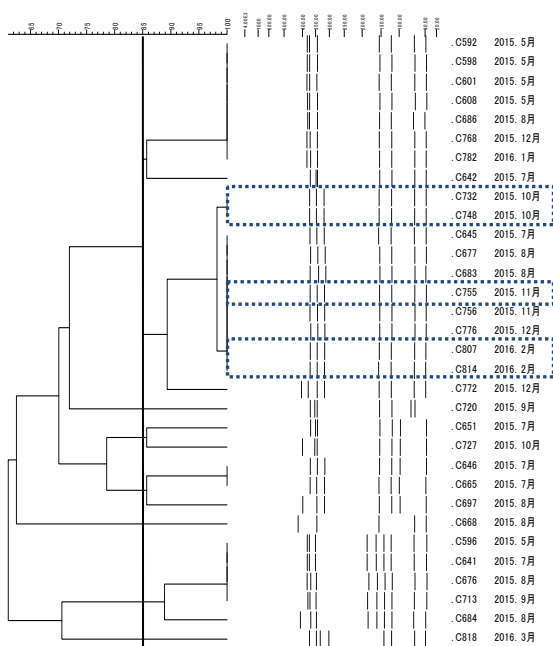


図4 *C.jejuni* D群のPFGEパターン (*Sma*I)

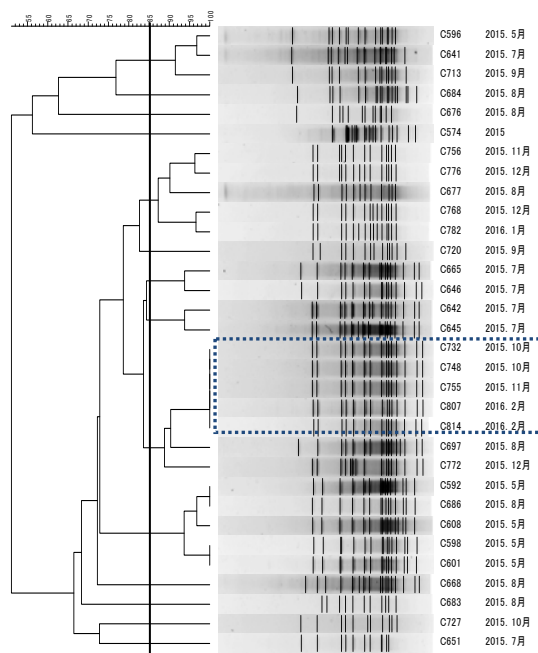


図5 *C.jejuni* D群のPFGEパターン (*Kpn*I)

4 考察

カンピロバクターによる散発下痢症患者は近年増加傾向にある。患者の年齢構成では、20代が全体の30%と最も多く、10歳未満の小児も11%見られた。一般にカンピロバクターは小児下痢症の原因菌とされているが、今回の調査で20代、30代の成人患者から分離が多い状況を把握することができた。東京都の調査でも、カンピロバクターによる入院患者は20代以下が多く、食中毒患者の7割は20代、30代が占めているとの報告がある²⁾。このことは、若い年代に食肉をタタキや刺身等の生で食べる割合が多いこと、生食による食中毒や感染症のリスクを認識していないことなどが原因であると考えられる。カンピロバクターの検出時期は夏季に多い傾向はあるものの、年間を通じて多い特徴を確認することができた。

平成26年の全国における散発下痢症由来のPenner血清型別成績では、UTが201株(51.8%)と半数を占め、次いでO群、G群、B群、L群、D群で複数の血清型が報告されている。全国と県内を比較すると、UTの割合が多い傾向は同じであるが、県内ではD群の分離が特に多かった。また、カンピロバクター食中毒の場合は同一の血清型が⁴⁾、散発下痢症の場合は特定の型に偏ることなく複数の血清型が分離されるとの報告があり⁵⁾、本調査によっても散発下痢症患者から同様の結果が判明した。

近年、細菌性胃腸炎の治療にはニューキノロン系薬剤が投与されるのが一般的であるが、この薬剤に耐性を示すカンピロバクターが増加している。「カンピロバクター・レファレンスセンター報告(2009~2014)」によると、ニューキノロン系薬剤(NFLX・OFLX・シプロキサシン(CPX)・NA)に対する耐性率は、2014年に*C.jejuni*が57.1%、*C.coli*が82.4%となっており増加傾向を示している³⁾。今回の調査でもニューキノロン系薬剤に耐性を示す株が126株(51.2%)分離されており、特に*C.coli*が*C.jejuni*よりも耐性率が高かった。

ニューキノロン系薬剤は1990年代に牛、豚、鶏等の家畜への使用が認められた。ニューキノロン系薬剤はそれ以前から人の細菌性胃腸炎治療薬として使用されてきたが、人由来*C.jejuni*の耐性菌はほとんど検出されなかったこと、治療歴のない患者から検出されることから、人から分離される耐性菌の多くが家畜由来耐性株と言われている⁸⁾。

カンピロバクターは薬剤耐性に関する遺伝子の点変異があることが知られており、牛・豚・鶏を調査した研究でも、薬剤耐性率が高いことが報告されている⁶⁾。今回の調査では、第一治療薬のEMについて十分な感受性があることが判明した。全国的にもEM耐性は低い傾向にあるが、今後も薬剤耐性菌の動向を把握しておくことは

必要であり、治療薬を選択する際の貴重なデータになると考える。

疫学解析により散発例において一致するパターンを示す場合は何らかの共通要因があると推定される。*Sma*Iおよび*Kpn*Iの2種類の制限酵素を併用してPFGEを行った結果、分離の異なる時期の一部の株において遺伝子パターンが一致した。このことは、患者間で同一の暴露を受けた可能性があるものと推察される。患者の行動や食中毒事件との関連については不明であるが、outbreakがあったことが示唆された。県内においてもカンピロバクターが広域的に発生し、複合型に汚染が浸潤していることを把握できた。なお、*Sma*Iはバンド数が7~8本と少なく菌株間の比較は不十分であるが、バンド数が多い*Kpn*Iを併用することにより、一部の菌株間の比較が有効であった。さらに、2種類の制限酵素(*Sma*Iおよび*Kpn*I)を組み合わせたDouble-digestion法によるPFGE解析の有効性についても確認する必要があると思われる^{4) 9)}。

カンピロバクター感染の予後については、二次感染や健康保菌者になることはないが、乳幼児では重症化する場合や母親から乳児への垂直感染例が報告されている。また*C.jejuni*感染後、稀に自己免疫性末梢神経疾患であるギラン・バレー症候群(GBS)を起こすことが報告されている。

カンピロバクターは家畜やペットの消化管に広く分布し、環境中からも分離されている。本菌の生化学性状や病原因子は研究半ばで菌の制御方法は確立していない。食中毒事件が多発し、GBSやニューキノロン系薬剤に耐性を獲得している現状を踏まえ、今後も継続して疫学データを蓄積し、食肉や内臓肉の生食リスクを県民に広く伝えていき、食中毒及び感染症予防対策の資料としたい。

今回の調査を行うにあたり、菌株を提供していただきました宮城県医師会健康センターに感謝いたします。

本研究は、平成27年度宮城県公衆衛生研究振興基金の研究助成により行われたものです。

参考文献

- 1) 平成27年食中毒発生状況：厚生労働省食中毒統計調査
- 2) 東京都食品安全情報評価委員会報告：食肉の生食による食中毒防止のための効果的な普及啓発の検討(2009)
- 3) 衛生微生物技術協議会第36回研究会：カンピロバクター・レファレンスセンター報告(2015)
- 4) 高橋恵美ほか：宮城県保健環境センター年報，27，44-47(2009)
- 5) 下野生世ほか：徳島保環セ年報，28，11-14(2010)

- 6) 国立感染症研究所感染症疫学センター：家畜由来カンピロバクターにおける薬剤耐性の動向，病原微生物検出情報，vol.31，17-18(2010)
- 7) 八尋俊輔ほか：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探知するために必要な情報に関する研究」219-230(2007)
- 8) 三澤尚明：日本食品微生物学会雑誌，30(2)，108-111(2013)
- 9) 依田清江ほか：感染症学雑誌，第80巻(6)，694-700(2006)