

短報

*Campylobacter jejuni*および *Campylobacter coli*混合 感染事例における 遺伝子学的手法の活用

鈴木理恵子^{1*}, 今井良美^{2**}, 後藤喜子²,
安田哲夫^{2**}, 新川隆康¹

Study of Genetic Technique in a Mixture Infection by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Rieko SUZUKI, Yoshimi IMAI, Yoshiko GOTO,
Tetsuo YASUDA and Takayasu NIKKAWA

はじめに

Campylobacter jejuni/coli (以下*C. jejuni*, *C. coli*)を起因菌とするカンピロバクター腸炎は、昭和57年に食中毒起因菌として指定されて以降、厚生労働省統計表データベースシステム食中毒統計調査には毎年20件以上の発生報告がされている。平成15年以降、国内における細菌性食中毒発生検査数ではサルモネラや腸炎ビブリオの発生件数を上回りカンピロバクター腸炎が最も多く、平成16年には558件の報告例があった。

平成17年神奈川県内(横浜市・川崎市・横須賀市・相模原市を含む)の食中毒発生例のうちカンピロバクターによる事例は13件であった。しかし、食中毒として取り扱いはされなかったもののカンピロバクターによる食中毒疑い例や有症苦情例は多数発生している。

今回、食中毒疑い例より検出された *Campylobacter jejuni/coli* について、従来の生物学的手法による同定および遺伝子学的手法による同定を併用し、確実に迅速な菌種同定法について検討を行った。また、検出された *Campylobacter* 属菌についてパルスフィールドゲル電気泳動法¹⁾による疫学解析をあわせて行ったので報告する。

検査材料および方法

1. 検査材料

平成17年10月、A市内の事業所所員40名うち8名が下痢、嘔吐等の食中毒様症状を呈しているとの通報により保健福祉事務所が調査したところ、症状を呈した所員はいずれも、A市内の飲食店2施設で会食をしていることが確認され、原因施設と推定される2施設の検食16件、施設内拭き取り18件、従事者便10件および患者便11件(計55件)を検査材料として用いた。

2. 食中毒起因菌の分離

各々の検体について、定法²⁾に準じて食中毒起因菌の調査を実施した。*Campylobacter jejuni/coli*の検索は、カンピロバクター選択分離培地としてSkirrow培地(Oxoid)およびCCDA培地(Oxoid)を用い、検体を塗抹後、42℃48時間、微好気培養を行った(直接培養)。

またPreston培地(Oxoid)に検体を接種し、42℃18~24時間、微好気培養後、直接培養と同様の培地で分離培養を行った(増菌培養)。

Skirrow培地およびCCDA培地上で*Campylobacter*様の集落の発育が認められた場合、集落を複数釣菌し従来の生物学的手法および遺伝子学的手法による同定検査を併せて実施した。

3. *Campylobacter*属菌の同定

生物学の同定は、グラム染色性、好気下の発育テスト、25℃および42℃における発育テスト、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、馬尿酸加水分解試験および薬剤感受性試験(セファロシン、ナリジクス酸)を行った。

遺伝子学的手法は、JohnらのマルチプレックスPCR法³⁾により*Campylobacter*菌種特異的遺伝子の検索を行った。検索遺伝子は、ヒトからの検出率が高くカンピロバクター腸炎の原因菌である*C. jejuni*, *C. coli*および生化学性状が*C. coli*と類似する*C. lari*の菌種特異的遺伝子を対象とした。

*C. jejuni*と同定された株については、カンピロバクター免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動

分離株を5%ウマ溶血球加Blood Agar Base No.2培地(OXOID)で微好気培養後、精製水200 μ lに懸濁し、等量の1%Seakem Gold Agarose (Cambrex)を加え菌体包埋プラグを作製した。作製したプラグは1mg/ml Lysozyme, 0.5M EDTA (pH8.0)溶液で溶菌後、1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine添加0.5M EDTA (pH8.0)溶液で処理し、制限酵素*Sma* Iを用いDNAを切断後、パルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)を行った。また、*Sma* Iおよび*Xho* Iの2種類の制限酵素でDNAを切断し、同様にPFGEパターンの比較を行った。

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
* 現 地域調査部
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp

2 神奈川県衛生研究所 地域調査部
** 現 藤沢市保健所

表1 菌株の生化学性状・薬剤感受性・血清型別および遺伝子検索結果

菌株No.	来由	グラム染色・形態 ¹⁾	微好気条件での発育	好気条件での発育	発育		オキシダーゼ試験	カタラーゼ試験	馬尿酸加水分解試験	薬剤感受性試験		C. jejuni 群別 ³⁾	菌種特異的遺伝子
					25℃	42℃				セフトロキシム(30μg) ²⁾	ナリジククス酸(30μg) ²⁾		
1	患者1	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
2		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
3		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
4		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
5		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
6		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
7	患者2	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
8		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
9		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
10		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
11		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
12		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
13	患者3	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
14		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
15		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
16		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
17		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
18		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
19	患者4	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
20		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
21		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
22		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	S	UT	C. jejuni
23		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
24		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
25	患者5	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
26		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
27	患者6	GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
28		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
29		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
30		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
31		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
32		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
33	患者7	GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
34		GNR	+	-	-	+	+	+	-	R	R	NT	C. coli
35	従業員1	GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
36		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni
37		GNR	+	-	-	+	+	+	+	R	R	O群	C. jejuni

1) GNR: グラム陰性桿菌
 2) S: 感受性, R: 耐性
 3) NT: 試験せず, UT: 型別不能

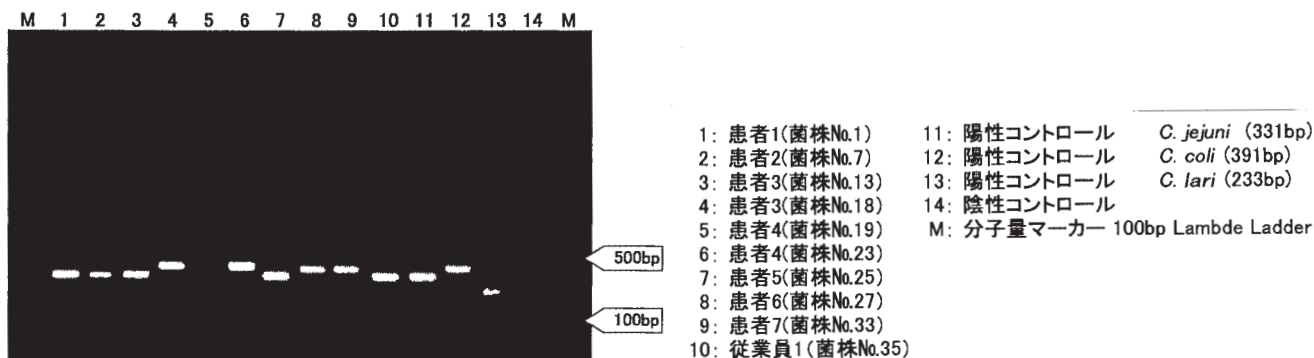


図1 マルチプレックスPCRによるCampylobacter菌種特異遺伝子の泳動図

結果

検査(16件)、ふき取り(18件)、従事者便(10件)および患者便(11件)の計55件について食中毒菌の検索を行ったところ、患者便7件、従業員便1件(計8件)より直接培養および増菌培養のいずれにも、カンピロバクター選択分離培地(Skirrow寒天平板、CCDA寒天培地)上に*Campylobacter*様の集落の発育が認められた。検査および施設内拭き取りからは食中毒原因菌は検出されなかった。

各々の検体の分離平板から*Campylobacter*属菌と推定される集落を複数釣菌し、延べ37株(8件)について従来の生物学的手法および遺伝子学的手法による同定検査を併せて実施した。

生物学的手法では、いずれの分離株もグラム陰性らせん状桿菌、微好気発育性(+), 好気発育性(-), 25℃発育(-), 42℃発育(+), オキシダーゼ試験(+), カタラーゼ試験(+)を示した。馬尿酸加水分解試験は、陽性26株(6件)、陰性11株(4件)、薬剤感受性試験は、セファロシン耐性・ナリジクス酸耐性33株(9件)、セファロシン耐性・ナリジクス酸感受性4株(1件)であった。馬

尿酸加水分解試験陰性株は、セファロシンおよびナリジクス酸耐性株であった。

従来法と併せて実施したマルチプレックスPCR法では、*C. jejuni* 遺伝子保有株は26株(6件)、*C. coli* 遺伝子保有株11株(4件)であった。

馬尿酸加水分解陽性26株は、いずれも*C. jejuni* 遺伝子保有株であり、陰性11株は、*C. coli* 遺伝子保有株であった。

生物学的手法と遺伝子学的手法の結果を併せてみると、馬尿酸加水分解陽性で*C. jejuni*遺伝子保有株を*C. jejuni*とし血清型別を実施したところ、O群22株(5件、いずれもセファロシン耐性・ナリジクス酸耐性)、型別不能4株(1件、セファロシン耐性・ナリジクス酸感受性)であった。

以上より今回の事例で検出された食中毒原因菌は、*C. jejuni* (O群) 単独検出4件(患者3件、従業員1件)、*C. coli* 単独検出2件(患者)、*C. jejuni* (O群) および*C. coli*、*C. jejuni* (型別不能) および*C. coli*の同時検出各1件(いずれも患者)と同定された(表1, 図1)。

また検出された代表株について制限酵素*Sma* Iを用い

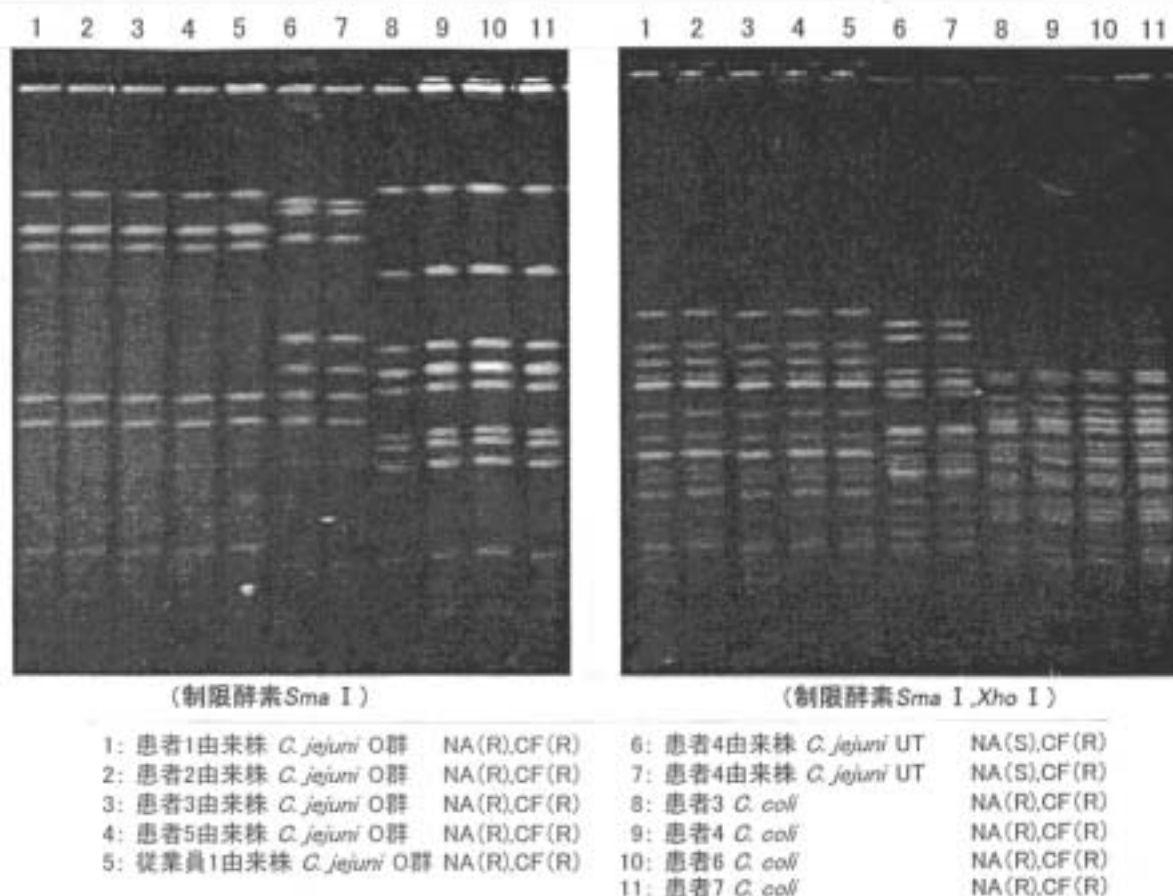


図2 *C. jejuni* および *C. coli* の PFGE 泳動図

PFGEを行ったところ、*C. jejuni* (O群) 5件、*C. coli* 4件のPFGEパターンは各々同一であった。*C. jejuni* (型別不能) 1件 (2株) とO群のPFGEパターンと異なっていた。2種類の制限酵素 (*Sma* I, *Xho* I) で処理を行ったところ、DNAの切断箇所は増えPFGEパターンは複雑となったが、菌種および血清型間の結果は*Sma* Iと同様であった (図2)。

考 察

カンピロバクター腸炎の診断については臨床症状から判断することは困難で、便等からの菌分離が確実な方法となるが、培養には微好気培養が必要なことや培養日数が他の食中毒菌に比べ長く、培養に要する時間のみで2日以上、さらに同定には数日を要す。また近年では、セファロシン、ナリジクスの両薬剤に対する耐性株の出現により、薬剤感受性試験を同定の指標とすることが困難になってきた⁴⁾。今回の事例においても馬尿酸加水分解試験陰性株は*C. coli*であると推察されたが、ナリジクス耐性株であったことから生物学的手法のみでは*C. coli*と決定することはできなかった。このように分離された*C. jejuni*、*C. coli*に耐性株の出現が多く認められることから、従来の生化学性状および薬剤感受性試験の手法のみでは、*C. jejuni*以外の菌種同定は困難である。今回、従来の同定作業を行うとともに、遺伝子診断技術であるマルチプレックスPCR法を分離平板上に集落が形成された段階で併用することで、培養終了後数時間で確実な菌種同定が可能であった。以上のことから迅速に原因菌の確定を行うためには、PCR法等の遺伝子診断技術を導入する必要がある。

カンピロバクター食中毒は*C. jejuni*を原因とする事例が多く、*C. jejuni*では単独の血清型による事例、また複数の血清型による事例の報告がされている。

今回の事例における*C. jejuni*の血清型は、O群 (5件) と型別不能 (1件) であった。同一事例の中で血清型別不能株が血清型別された株のPFGEパターンが一致する場合があることから、これらの分離株のPFGEを実施しその異同について検討したところ、O群株と型別不能株は異なったPFGEパターンを示し、血清型別と同様の成績であった。また、同一血清型間では制限酵素の変更や複数の制限酵素により処理することでPFGEパターンが細分化される場合があるためPFGEを実施したが、い

ずれの方法でもPFGEパターンは一致しており、同一血清型間の異同は認められなかった。

*C. coli*による食中毒報告は稀でPFGEの比較対照株を保有していなかったことから制限酵素 (*Sma* I) に加え、複数の制限酵素による処理 (*Sma* I, *Xho* I) を試みたが、いずれの*C. coli*分離株も同一のPFGEパターンを示した。

今回の事例は、遺伝子学的同定に加え、遺伝子学的疫学解析を行い複数の血清型の*C. jejuni*と*C. coli*によりカンピロバクター腸炎が引き起こされた混合感染例であることが明らかになった。しかし、従業員から患者と同じ*C. jejuni* O群が検出されたものの、食品から菌が検出されず感染源は不明であった。

カンピロバクター食中毒の特性は、大規模事例よりも散発的な事例数が多いことが挙げられる。大規模事例では遺伝子学的疫学解析も重要となる場合もあるが、散発的事例ではまず菌種同定を迅速に行うことが重要である。現在の検査法でカンピロバクターが原因菌と決定するまでに3日～5日以上、血清型別等を実施するためにはさらに時間を必要とする。このような同定に要する時間の長さが行政判断を行う上で大きな問題であった。菌種同定に遺伝子診断法であるPCR法を導入することにより、より迅速な行政対応が可能になると思われた。

(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) 伊藤喜久治:我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究. 平成10年度厚生科学研究費補助金 <新興・再興感染症研究事業>分担研究報告書, 51-56(1999)
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解2005, pp55-101, 金原出版, 東京(2005)
- 3) John D.Klena, Craig T.Parker, Krista Knibb, J.Claire Ibbitt, Phillippa M.L.Devane, Sharon T.Horn et al. : Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the lipid A Gene *lpxA*, J.Clin. Microbiol., 42, 5549-5557(2004)
- 4) カンピロバクター腸炎1995-1999, 病原微生物検出情報, 20, 5(1999)