

## 短報

# 散発性下痢症患者便から検出された カンピロバクター分離菌株の解析

伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎

## Epidemiological study of *Campylobacter* isolated from patients with sporadic diarrhea in Kanagawa Prefecture

Kumiko ITOH, Tomoe ISHIHARA  
and Toshiro KUROKI

### はじめに

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) はニワトリ, ウシ, ブタ, 水鳥などの腸管に分布し, 直接的あるいは間接的に食品や水を介して人に感染する. 細菌性食中毒の原因菌としても検出頻度の高い菌の一種であり, 特に乳幼児や学童の下痢症として重要である. カンピロバクターが原因の食中毒事件数は, 1997~1999年まではサルモネラと腸炎ビブリオに次いで多く, 2001年以降は首位を占めている<sup>1)</sup>. また, 1999~2005年にヒトから分離されたカンピロバクターの菌種のうち, *C. jejuni*は97%を占め *C. coli*は3%にも満たない<sup>1)</sup>.

当所では感染症の予防とまん延防止を目的として, 県域の協力小児科医療機関で感染性胃腸炎と診断された散発性下痢症患者便の腸管系病原菌検査を実施している. 著者らは散発性下痢症患者便から検出されたカンピロバクターの分離菌株について, 細菌学的および分子疫学的解析をしていくことは, 今後のカンピロバクター感染症の発生要因や感染経路を追求していく上で重要であると考える. 今回, 散発性下痢症患者便から検出された *C. jejuni* と *C. coli* の分離菌株について疫学データの基礎となる血清型別, 薬剤感受性試験およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析を実施したので報告する.

### 検査対象および方法

#### 1. 検査対象

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

平成19年4月から平成20年3月にかけて当所に搬送された散発性下痢症患者便168検体を検査対象とした.

#### 2. 方法

##### 1) 検出方法

カンピロバクターの検出には, 直接培養の分離培地として, プレストン寒天培地 (Oxoid) およびCCDA培地 (Oxoid) を用い, これらに検体を塗抹し, 42°C, 40~48時間微好気培養した. 増菌培養はプレストン液体培地 (Oxoid) に検体を接種し, 42°C, 18~24時間微好気培養後, 直接培養と同様に行った. 分離平板上の疑わしい集落を1検体あたり5~10集落釣菌し, 伊藤の記述した方法<sup>2)</sup> に準じて菌の同定を行い, Lintonら<sup>3)</sup> の報告したPCRにより菌種を確認した.

##### 2) 血清型別試験

*C. jejuni*と同定した菌株について, 市販のカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いてPennerの血清型別を行った.

##### 3) 薬剤感受性試験

供試薬剤はストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), アミノベンジルペニシリン (ABPC), クロラムフェニコール (CP), スルファメトキタゾール/トリメトプリム (ST), テトラサイクリン (TC), ノルフロキサシン (NFLX), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX), ナリジクス酸 (NA), エリスロマイシン (EM), ホスホマイシン (FOM) の12薬剤とし, Sensi-Disk (BBL) を用いてCLSI法 (米国臨床検査標準化協会) に準拠した一濃度ディスク法で実施した. すなわち, 検出された *C. jejuni* と *C. coli* の菌株について, 5%ウマ脱線維素血液加ミューラーヒントン培地 II (BBL) と上記ディスクを使用し, 42°C, 24時間微好気培養後, 感受性を判定した.

##### 4) PFGEによる解析

分離菌株を5%ウマ脱線維素血液加Blood Agar Base No.2培地 (Oxoid) で42°C, 24時間微好気培養後, 平板上の集落を精製水でMacFarland No.3程度に懸濁し, Ribotら<sup>4)</sup> の方法に準じてPFGE用のプラグを作製した. 作製したプラグはまず制限酵素 *Sma* I (Roche) で処理後, CHEF-Mapper (Bio-Rad) を用いて電気泳動を行い, 泳動後のPFGE解析はFingerPrinting II (Bio-Rad) を使用して行った. *Sma* I 処理によるPFGE解析で相互に同一のPFGEパターンを示した検体の分離菌株のプラグは, 次に2種類の制限酵素を使用して二重に処理するdouble-digestionにより *Sma* I と *Kpn* I (Roche) および *Sma* I と *Ksp* I (Roche) の組み合わせで, 泳動像の比較を行った. 泳動条件は単独処理および double-digestion共に電圧6V/cm, パルスタイム6.8秒から38.4秒, バッファー温度14°C, 泳動時間19時間で実施した.

表 カンピロバクターのPenner血清型および薬剤耐性パターン

検体 No.	菌種	Penner 血清型	薬剤耐性パターン (約菌集落数)
1	C.j	UT	NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST・TC(5) NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST(1)
	C.c	NT	NFLX・CPFX・OFLX・NA・TC・SM・KM(5)
2	C.j	G 群	ST・TC(6)
3	C.j	A 群	ST(6)
4	C.j	L 群	感受性(6)
5	C.j	B 群	NFLX・CPFX・OFLX・NA・ST(5) NFLX・CPFX・OFLX・NA(1)
		G 群	ST・TC(6)
7	C.j	C 群	ST(6)
8	C.j	D 群	ST(6)
9	C.j	Z <sub>6</sub> 群	ABPC(4)
10	C.j	Y 群	ABPC・ST・TC(6)
11	C.j	C 群	感受性(6)
12	C.j	R 群	感受性(1)
		UT	感受性(4)
13	C.j	D 群	TC(6)

C.j : *C. jejuni* UT: 型別不能C.c : *C. coli* NT: 血清型別試験実施せず

## 結 果

### 1) 検出状況

カンピロバクターは168検体中13検体(7.7%)から検出された。このうち12検体から *C. jejuni* が、1検体から *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された。

### 2) 血清型別試験

検出されたカンピロバクターのPenner血清型および薬剤耐性パターンを表に示した。 *C. jejuni* の血清型はPennerのC群、D群、G群が各2検体から検出された。その他A、B、L、R、Y、Z<sub>6</sub>群および型別不能が各1検体であった。同一検体の株は同じ血清型であったが、R群が検出された検体は型別不能の株も検出された。全てが型別不能となった検体は、 *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された1検体であった。

### 3) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は13検体から分離された株について行った(表)。この結果、3検体から分離された株は供試薬剤全てに感受性を示し、10検体から分離された株は供試薬剤のいずれか1剤以上に耐性を示した。耐性パターンは、単剤はSTが3検体、TCが1検体、ABPCが1検体、2剤はST・TCが2検体、3剤はABPC・ST・TCが1検体であった。4剤以上に耐性を示したのは2検体であり、これら2検体から分離された株は全てがNFLX・CPFX・OFLXのニューキノロン系薬剤とNAの4剤に耐性を示した。そのうちの1検体からはNFLX・CPFX・OFLXのニュー

キノロン系薬剤とNAの4剤耐性を示す株とニューキノロン系薬剤とNAおよびSTの5剤耐性を示す株が検出された。別の1検体は *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出された検体で、分離された *C. jejuni* 株はニューキノロン系薬剤とNAおよびSTの5剤耐性を示す株と、ニューキノロン系薬剤とNA およびST・TCの6剤耐性を示す株で、 *C. coli* 株はニューキノロン系薬剤とNAおよびTC・SM・KMの7剤耐性であった。

### 4) PFGEによる解析

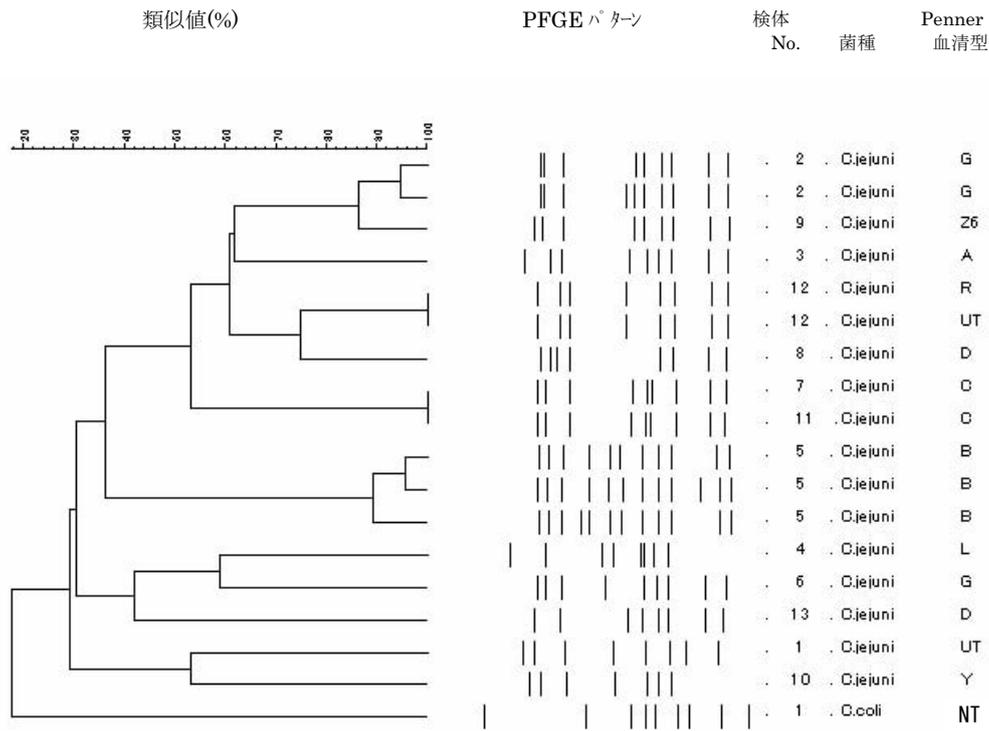
13検体から分離された株について、 *Sma* I 処理によるPFGEの結果をFingerPrinting II で解析した。検体別分離代表株のPFGEパターンと菌種およびPenner血清型を図1に示した。同一検体からの *C. jejuni* 分離菌株においては、11検体は同一パターンを示したが、検体No.2の分離菌株はバンド1本の違いで2種類のパターンが確認され、検体No.5の分離菌株はバンド1本の違いで3種類のパターンを示した。

今回の散発性下痢症患者便から分離された代表株のPFGE解析の中で、相互に同一のパターンを示した検体はNo.7と11の分離菌株で血清型もC群で同一であった。この2検体について、さらに *Kpn* I と *Sma* I および *Ksp* I と *Sma* I でdouble-digestionした結果を図2と3にそれぞれ示した。どちらの処理方法でも2検体から検出された分離菌株は同一パターンを示した。その他に血清型が同じであったのはG群の2検体(検体No.2と6) およびD群の2検体(検体No.8と13) からの分離菌株であったが、これらの菌株は検体ごとに異なったパターンを示した。その他、血清型A、B、L、Z<sub>6</sub> およびY群の各検体からの分離菌株は検体ごとに異なったパターンを示した。R群が検出された1検体(検体No.12) からは型別不能の株も検出されたが、PFGEパターンは同じであった。また、検体No.1から検出された *C. coli* の分離菌株は *C. jejuni* から分離された株と全く異なるパターンを示した。

## 考 察

カンピロバクターは168検体中13検体(7.7%)から検出された。このうち12検体から *C. jejuni* が、1検体から *C. jejuni* と *C. coli* が同時検出され、カンピロバクター腸炎の主な起因菌は *C. jejuni* であること<sup>1)</sup> が、あらためて確認された。

近年、細菌性の感染性胃腸炎が疑われた場合にはニューキノロン系薬剤が用いられることが一般的であるが、このニューキノロン系薬剤に耐性を示す *C. jejuni* が増加しており<sup>1)</sup>、ヒトの胃腸炎治療におけるニューキノロン系薬剤の使用により耐性菌が出現するとの報告がある<sup>5)</sup>。一方、ニューキノロン系薬剤耐性菌の増加はヒト由来株



UT:型別不能 NT:血清型別試験実施せず

図1 検体別分離代表株のPFGEパターン、菌種およびPenner血清型

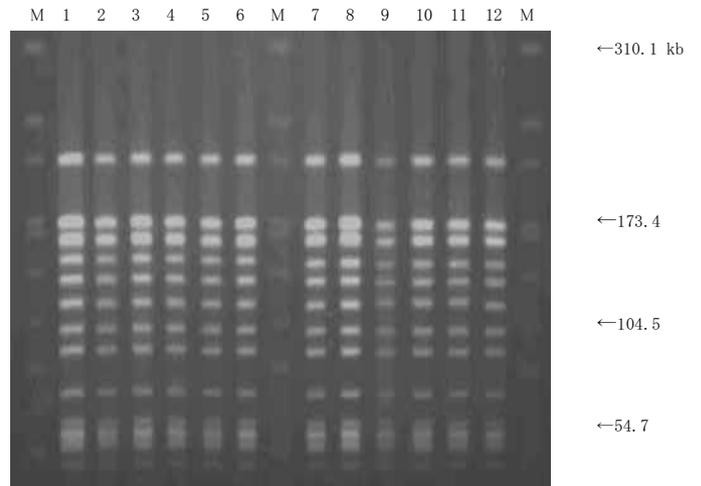
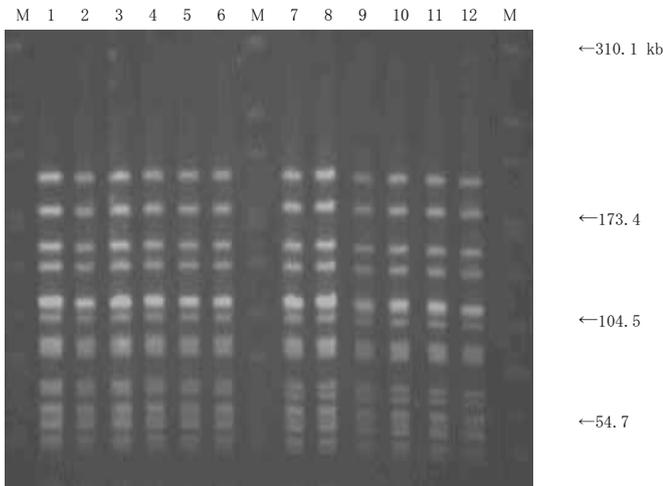


図2 Sma I と Kpn I の double-digestion による PFGE パターン

図3 Sma I と Ksp I の double-digestion による PFGE パターン

1 ~ 6 : 検体 No. 7 の分離菌株  
 7 ~ 12 : 検体 No. 11 の分離菌株  
 M : マーカー *Salmonella* Braenderup H9812

注釈は図2に同じ

のみならず、家畜由来株においても同様の傾向を示しており、ヒトから分離される耐性菌の多くは家畜由来の株であるとも考えられている<sup>6)</sup>。このように耐性菌出現の

背景が示されているなか、平成18年度は県域の散発性下痢症患者便からニューキノロン系薬剤に耐性を示す株は検出されなかったが<sup>7)</sup>、平成19年度は散発性下痢症患者

者便からニューキノロン系薬剤に耐性を示す株が13検体中2検体(15.4%)から分離されていることから、今後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。

*C. jejuni*のPenner血清型別試験の結果は、13検体のうち血清型が判定できたのは12検体で、1検体から分離された株は型別不能であった。PFGE法と同様に遺伝子型別法に利用されているflagellin genotypingは、血清型別との相関があるとの報告もあり<sup>8)</sup>、型別不能株の精査をする上でも今後検討する必要があると考える。

PFGE解析の結果、同一検体からの分離菌株でバンドの数が1本程度異なる事例が2検体から観察された。PFGE解析において、この程度の違いを同一株と見なすかどうかを分子疫学的に判断するには、より多くの株についての解析と同時に、分離菌株の疫学情報が重要となってくる。今後は、摂食状況等を伴う集団感染事例についての解析を行う必要があると考える。

菌株間の血清型とPFGEパターンが同一であった検体No.7とNo.11の分離菌株は*Sma*Iの単独処理と、*Sma*Iと*Kpn*Iおよび*Sma*Iと*Ksp*Iのdouble-digestionの3種類いずれの処理においてもPFGEパターンが一致した。この2検体の薬剤感受性試験を比較すると、検体No.7の株はST単剤耐性で、検体No.11の株は供試薬剤全てに感受性を示した。この2検体の共通性を判断するには、摂食状況等の疫学調査が必要であるが、検体が採取された時期は約2ヶ月の間隔があることなどから調査を実施できず、疫学的解明には至らなかった。

カンピロバクターのPFGE解析の方法は報告ごとに使用される制限酵素や泳動条件が異なるが、第一選択の制限酵素としては*Sma*Iが広く使用されている。しかし、菌株間の関連性の推測は*Sma*Iのみでは十分でなく、制限酵素の違いによるPFGEパターンの比較がなされている。今回試みたdouble-digestionは2種類の制限酵素を組み合わせ二重に切断する方法で、菌株間の分別能は単独処理より高くなると考えられており、食中毒事例においてその有効性を示唆した報告もなされている<sup>9)</sup>。PFGE法はサンプルがプラグに包埋されており、制限酵素の違いでパターンの多形成が観察できる点でdouble-digestion法は今後も利用度の高い検査法であると考えられる。

制限酵素で処理したプラグは泳動後に、菌株間のバンドパターンを観察して解析が行われるが、そのパターンは複雑で、目視による判断は難しい。しかし、解析ソフトを利用することで菌株間の比較が容易になり、異なった散発事例から同一パターンが高率に分離される場合は散発的集団発生が疑われ、これらの事例が同一感染源に由来するかどうかを調査することにより、感染拡大の予

防ができると考える。

今回の解析は散発下痢症患者便13検体から分離されたカンピロバクターについて行ったが、今後も継続して分離菌株の解析を実施し、疫学データとして集積していくことが必要と考えられる。

最後に、本調査にご協力いただきました小児科医療機関および県健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

## 参考文献

- 1) カンピロバクター腸炎1999~2005, 病原微生物検出情報, 27, 167-175 (2006)
- 2) 伊藤武:新訂 食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 中央法規出版, pp. 336-362, (2000)
- 3) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J. and Stanley J.: PCR detection, Identification to species level and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples, J.Clin.Microbiol., 35, 2568-2572 (1997)
- 4) Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B. and Barret, T.J.: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, J. Clin. Microbiol., 39, 1889-1894 (2001)
- 5) 小花光夫, 松岡康夫, 入交昭一郎, 殿岡弘敏: *Campylobacter* 腸炎患者の治療における問題点一特に、ニューキノロン剤使用後の耐性菌発現例に関しての検討一, 感染症学雑誌, 79, 169-175 (2005)
- 6) 三澤尚明: カンピロバクター感染症, モダンメディア, 51, 45-52 (2005)
- 7) 伊東久美子, 石原ともえ, 黒木俊郎: 県域の散発性下痢症患者から分離されたカンピロバクターの性状 (平成18年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 70-71 (2007)
- 8) Nachamkin, L., Bohachick, K., Patton, C.M.: Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis, J.Clin.Microbiol., 31, 1531-1536 (1993)
- 9) 依田清江, 横山栄二, 内村真理子: 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, 感染症学雑誌, 80, 694-700 (2006)