

胃腸炎患者由来 *Campylobacter jejuni* の分子疫学的検討

徳島県保健環境センター

下野 生世・石田 弘子・宇佐美 實

Molecular Epidemiological Examination of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Gastroenteritis in Tokushima Prefecture

Ikuyo SHIMONO, Hiroko ISHIDA and Minoru USAMI

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

要 旨

2006年～2010年9月までの期間に徳島県内の胃腸炎患者から分離された *Campylobacter jejuni* について、パルスフィールド・ゲル電気泳動法（以下 PFGE）を実施し、泳動パターンの比較を行った。あわせて、血清型別、薬剤感受性試験を行い、疫学関連性について検討した。

事例ごとの食中毒由来菌株について PFGE パターンを比較したところ、同一事例では、同一パターンを示す菌株が多かったものの、パターンの異なる菌株が存在する事例も認められた。一方、散発事例において、分離時期、PFGE パターン、血清型別、薬剤感受性パターンの一致する株も認められたが、疫学関連性を特定するには至らなかった。

Key words: カンピロバクター ジェジュニ *Campylobacter jejuni*, パルスフィールドゲル電気泳動 PFGE
血清型 serovar, 薬剤耐性 drug resistance

I はじめに

PFGE 法は、遺伝子型疫学マーカーの一種であり、現在最も汎用されている識別法の一つである。ポピュラーなものとしては、腸管出血性大腸菌があり、国立感染症研究所で泳動パターンの解析、解析結果のデータベース化が行われ、食品を介した diffuse outbreak を迅速に探知する試みがなされている。また、サルモネラ、カンピロバクター等、他の細菌についても、各地方衛生研究所で検討がなされているところがある¹⁾。今回、徳島県において、分離頻度の最も高かったカンピロバクターについて、PFGE 及び細菌学的疫学マーカーである血清型別、薬剤感受性による型別を実施し、疫学関連性を検討したので報告する。

II 材料および方法

1 供試菌株

2006年～2010年9月までの期間に、県内医療機関において感染性胃腸炎患者（散発事例）から分離された *Campylobacter jejuni* 31株、及び当センターにおいて集団食中毒患者から分

離した *Campylobacter jejuni* 22株の計53株を対象とした。

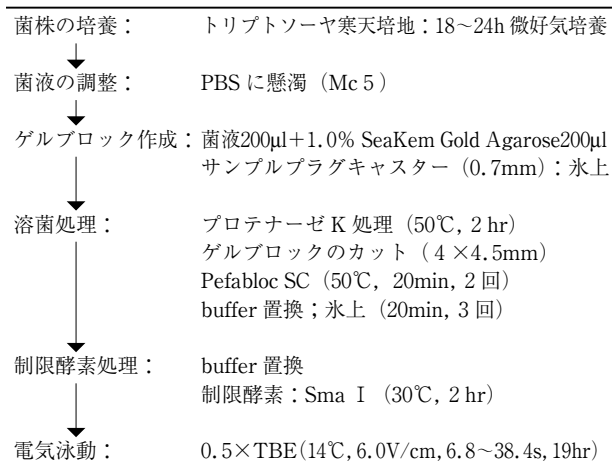
2 検査方法

(1) パルスフィールド・ゲル電気泳動

地方衛生研究所・九州ブロックで作成された *Campylobacter* PFGE マニュアル²⁾を参考にして、図1の手順で実施した。すなわち、トリプトソーヤ寒天培地で培養した菌を PBS に Mc 5 となるように調整し、1.0% SeaKem Gold Agarose で包埋し Protease K で50℃ 2時間菌体処理後、Pefabloc SC で不活化した。その後、制限酵素 Sma I で30℃ 2時間処理し、泳動用プラグとした。マーカーには *Salmonella* Braenderup H 9812を使用し、6.0V/cm、パルスタイム6.8～38.4秒で19時間泳動を行った。得られた画像は、画像解析ソフト Lane Multi Screener ver.3（アトー株式会社）を用いデータベース化し解析を行った。

(2) Penner の血清型別（耐熱性抗原型）

純培養した菌株を感作血球調整試薬（デンカ生研）で処理し、カンピロバクター免疫血清（デンカ生研）を使



図－1 PFGE の手順

用し実施した。なお、いずれの免疫血清にも凝集しない場合は型別不能（UT）とし、複数の血清に凝集する場合は複合型と判定した。

(3) 薬剤感受性試験

アンピシリンナトリウム（ABPC），セファゾリンナトリウム（CEZ），硫酸カナマイシン（KM），硫酸ゲンタマイシン（GM），塩酸テトラサイクリン（TC），塩酸ドキシサイクリン（DOXY），エリスロマイシン（EM），クロラムフェニコール（CP），コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム（CL），ナリジクス酸（NA），オフロキサシン（OFLX），ホスホマイシンナトリウム（FOM）の12剤を用いKBディスク®“栄研”による1濃度ディスク法で実施した。

Ⅲ 結果及び考察

PFGE を実施したところ、スマアが解消されない菌株が存

在し、バンドが確認できた43株について画像のデータベース化を行った。画像データベースからデンドログラムを作成したところ、図2に示すとおり28パターンに分類された。

Penner の血清型別では、表1に示すとおり菌株は14群に分類され、C 群と F 群の複合型が1株、型別不能（UT）の株が15株（28.3%）に認められ、特に散発事例由来で UT を示す菌株が多く認められた。

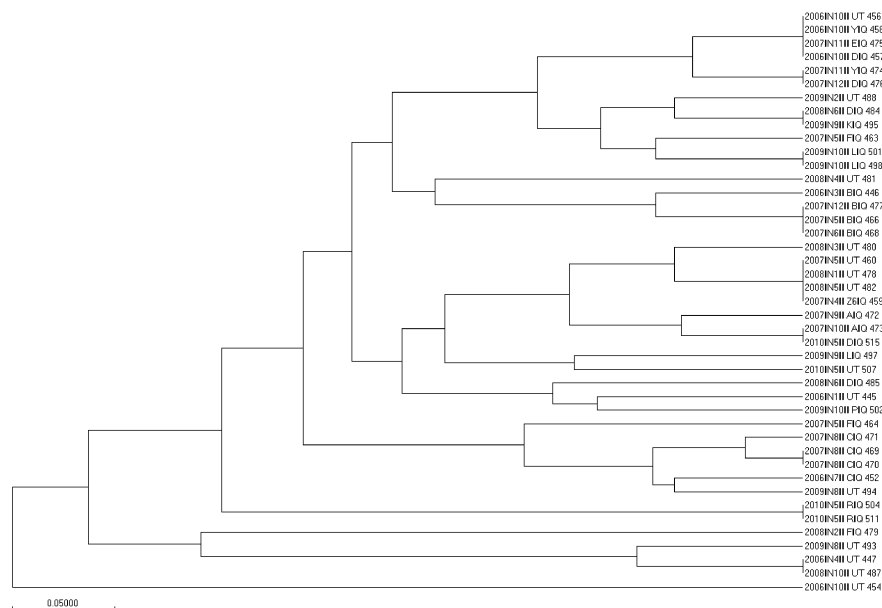
薬剤耐性パターンは、27グループに分類された。

PFGE 同一パターンを示した10組及び食中毒関連菌株について、菌株の由来、血清型別及び薬剤耐性をまとめたのが表3である。

表－1 胃腸炎患者由来菌株の血清型別（Penner）

血清群	散発由来菌株数(%)	食中毒由来菌株数(%)	Total(%)
F	2(6.5)	5(22.7)	7(13.2)
D	3(9.7)	2(9.1)	5(9.4)
B	4(12.9)	－(0.0)	4(7.5)
C	1(3.2)	3(13.6)	4(7.5)
L	1(3.2)	2(9.1)	3(5.7)
O	－(0.0)	3(13.6)	3(5.7)
Y	2(6.5)	1(4.5)	3(5.6)
A	2(6.5)	－(0.0)	2(3.8)
R	－(0.0)	2(9.1)	2(3.8)
E	1(3.2)	－(0.0)	1(1.9)
K	1(3.2)	－(0.0)	1(1.9)
P	－(0.0)	1(4.5)	1(1.9)
Z ₆	1(3.2)	－(0.0)	1(1.9)
Other*	1(3.2)	－(0.0)	1(1.9)
UT	12(38.7)	3(13.6)	15(28.3)
Total	31(100)	22(100)	53(100)

*C, F 群複合型



図－2 *C. jejuni* の制限酵素 Sma I によるデンドログラム（UPGMA 法）

PFGE パターンと血清型別は必ずしも一致せず、また、集団食中毒 5 事例中 3 事例（食中毒③、⑥、⑦）において、複数のパターンを示す菌株の存在が認められた。このことは、依田らの報告³⁾と同様であった。依田らは、単独酵素による PFGE よりも、Double-digestion 法を用いた PFGE の方が血清型別、疫学調査結果とよく関連したと報告している。

一方、食中毒事例ごとの分離菌株の血清型別では、表 2 に示すとおり、同一事例において複数の血清群を認める事例があった。横山らの記述⁴⁾によれば、同一事例において複数の血清型の菌が分離されることは、カンピロバクター食中毒の特徴の一つであり、要因として原因食材がすでに複数の血清型の菌に汚染されていることを考察している。今回の集団食中毒事例も推定原因食品として、ササミのたたき等、加熱不十分な鶏肉が挙げられているものが多くあり同様のことが推察された。

散発事例から分離した菌株については、表 3 に示すとおり同一の PFGE パターンを示す株が 7 グループ（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅹ）認められ、そのうち血清型別が一致し、分離時期、薬剤耐性パターンのよく似ているⅤの 2 株について

表－2 食中毒由来菌株の血清型別（Penner）

事例	血清群（Penner）	備考
①	U T（1）	<i>C.coli</i> （2）
②	D 群（1）、Y 群（1）、U T（1）	
③	F 群（5）	
④	C 群（3）	
⑤	O 群（3）	
⑥	L 群（2）、P 群（1）	<i>C.coli</i> （1）
⑦	R 群（2）、D 群（1）、U T（1）	

（ ）内は菌株数
同一検体から分離された同一血清型の複数の菌株は 1 と計上

表－3 PFGE で同一パターンを示した菌株の比較

PFGE パターン	菌株の由来	血清型別	薬剤耐性パターン
Ⅰ	2006年10月 食中毒②	U T	ABPC, CEZ, TC, NA, OFLX, CL
	2006年10月 食中毒②	Y 群	CEZ, TC, DOXY, NA, OFLX, CL
	2006年10月 食中毒②	D 群	CEZ, TC, NA, OFLX, CL
	2007年11月 散発	E 群	ABPC, CEZ, TC, NA, OFLX, LVFX, CL
Ⅱ	2007年11月 散発	Y 群	ABPC, CEZ, CL
	2007年12月 散発	D 群	ABPC, CEZ, CL
Ⅲ	2008年 6 月 散発	D 群	CEZ, TC
	2009年 9 月 散発	K 群	ABPC, CEZ, TC, CL
Ⅳ	2009年10月 食中毒⑥	L 群	ABPC, CEZ
	2009年10月 食中毒⑥	L 群	ABPC, CEZ
Ⅴ	2007年 5 月 散発	B 群	ABPC, CEZ, TC, NA, OFLX, LVFX
	2007年 6 月 散発	B 群	ABPC, CEZ, TC, NA, OFLX, LVFX, CL
	2007年12月 散発	B 群	ABPC, CEZ, NA, OFLX, LVFX, CL
Ⅵ	2007年 4 月 散発	Z 6 群	ABPC, CEZ, TC, DOXY
	2007年 5 月 散発	U T	ABPC, CEZ, TC, DOXY, CL, KM
	2008年 1 月 散発	U T	ABPC, CEZ, TC, CL, KM
	2008年 5 月 散発	U T	ABPC, CEZ, TC, CL, KM
Ⅶ	2007年10月 散発	A 群	ABPC, CEZ, TC, DOXY, NA, OFLX, LVFX, CL, KM, CP
	2010年 5 月 食中毒⑦	C 群	ABPC, CEZ, TC, KM, FOM
Ⅷ	2007年 8 月 食中毒④	C 群	CEZ,
	2007年 8 月 食中毒④	C 群	ABPC, CEZ, NA, OFLX, LVFX, CP
Ⅷ'	2007年 8 月 食中毒④	C 群	CEZ
Ⅸ	2010年 5 月 食中毒⑦	R 群	ABPC, CEZ
	2010年 5 月 食中毒⑦	R 群	ABPC, CEZ, NA, OFLX, LVFX
Ⅹ	2006年 4 月 散発	複合型	ABPC, CEZ, NA, OFLX
	2008年10月 散発	U T	ABPC, CEZ, TC, NA, OFLX, LVFX, CL
備考			
Ⅺ	2007年 5 月 食中毒③	F 群	ABPC, CEZ, NA, OFLX, LVFX, CL
Ⅻ	2007年 5 月 食中毒③	F 群	ABPC, CEZ, TC
ⅫⅢ	2009年10月 食中毒⑥	P 群	ABPC, CEZ, TC

では、疫学関連性がある可能性が考えられた。また、血清型別で UT を示す株の中には、本来の血清型を示していない株があることが報告されており³⁾、VI の 2 株についても疫学関連性の可能性が考えられた。

散発事例も含め、鶏肉等が推定原因食品の主体を占める現在のカンピロバクター胃腸炎において、疫学関連性を判断するには、詳細な聞き取り調査の分析と複数の疫学マーカーを用いた菌株の識別結果を総合的に判断することが重要であると考えられた。

Ⅳ まとめ

- (1) 胃腸炎患者由来 *Campylobacter jejuni* 43 株について、制限酵素 Sma I を用いて PFGE を実施したところ 28 パターンに分類された。
- (2) 集団食中毒事例由来菌株は、同一事例にもかかわらず複数のパターンを示すものが認められた。この理由として、原因食品が既に複数のパターンの菌株で汚染されていることが推察された。
- (3) 散発事例由来菌株では、分離時期、血清型別、薬剤耐性パターンの類似している株が認められたが、疫学関連性を判断するには至らなかった。
- (4) 以上のことから、胃腸炎患者由来 *Campylobacter jejuni* について、疫学解析を実施するには、詳細な聞き取り調査析

と複数の疫学マーカーを用いた菌株の識別結果を総合的に判断することが重要であると考えられた。

謝辞

今回の調査を行うにあたり、菌株の提供にご協力いただきました医療機関関係者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) 研究代表者 寺島淳：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 平成 20 年度 総括・分担研究報告書及び平成 18 年～20 年度 総合研究報告書
- 2) 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，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 平成 18 年度 総括・分担研究報告書 222－223
- 3) 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．感染症誌，80，694－700，2006
- 4) 横山敬子，高橋正樹：Campylobacter jejuni/coli. 食品由来感染症と食品微生物 中央法規，361－362