

広島市の散発性カンピロバクター食中毒における 分離菌株の疫学的解析手法と解析結果の検討

石村 勝之 毛利 好江 橋渡 佳子 山本美和子
佐々木敏之 古田 喜美 萱島 隆之 河本 秀一
平崎 和孝 蔵田 和正^{*1} 児玉 実^{*2} 伊藤 文明^{*1}
笠間 良雄^{*1} 山岡 弘二^{*2} 荻野 武雄

広島市におけるカンピロバクター食中毒の発生状況と各種の疫学的解析手法の有効性を評価することを目的として、1999年および2000年の散発性食中毒由来 *Campylobacter jejuni* 178株について検討した。血清型は Lio4型が最も多く、次いで Lio7, Lio1, Lio27, Lio36型等が多く分離されたが、Lio1, Lio27は両年で分離数の増減がみられた。薬剤感受性試験は、TC 単独耐性が25%にみられ、最も多い耐性型であった。NFLX, CPFX, OFLX のフルオロキノロンに耐性を示す株も15%に認められた。Lio4型と Lio27型株について鞭毛遺伝子 *flaA* の PCR-RFLP 解析, *flaA* 遺伝子塩基配列分析, パルスフィールドゲル電気泳動の各分子疫学的解析法を加え検討した結果、薬剤感受性試験では差異の認められない菌株もその多くはいずれかの疫学マーカーに差異を認め、異なる菌株と判断された。このことから、市内の散発事例は多様な菌により起きていることが示された。しかし、これらの分子疫学マーカーでも差異の認められない菌株も一部にみられ、これらの事例間には何らかの関連性がある可能性も考えられた。今回検討した分子疫学的手法は、血清型別、薬剤感受性試験では区別できない菌株間も識別できたことから、疫学的調査における分析手法として使用可能と考えられた。しかし、個々の手法の単独使用では識別できない菌株もみられたことから、散発性食中毒由来の *C.jejuni* の異同の判定は、複数の疫学マーカーの結果を総合して行う必要があると考えられた。

キーワード： カンピロバクター、散発性食中毒、血清型別、薬剤感受性、分子疫学的解析

はじめに

カンピロバクター腸炎(食中毒)は、日本および欧米において最も多く認められる食品媒介性の細菌感染症である。米国ではその約99%が散発事例であり、それらの疫学的調査からはニワトリが最も共通する感染源であることがFDAの報告に示されている¹⁾。また、鶏肉(生および冷凍物)の消費や台所での鶏肉の取り扱い上の不備、バーベキューにおけるソーセージの喫食、あるいは家屋内でのイヌとの共生などがrisk factorとなることが北欧でのcase-control研究²⁾でも報告されている。このような状況から、特に「鶏肉中のカンピ

ロバクターのリスクアセスメント」は世界的な課題となっており、2000年末よりFAO(国連世界農業機構)およびWHOにおける専門委員会においてアセスメント作業が開始され、わが国でも、そのための科学的根拠となる exposure assessment や hazard identification などのデータ収集研究が進行している。

広島市でも、カンピロバクターは毎年多数の散発性食中毒の届出がある病原細菌であり、平成12年にはサルモネラをぬいて第1位の届出数となった。そのため、本市としてもこの発生要因を探り、効果的な減少策を図る必要性から、保健所において平成12年の聞き取り調査結果が集計・検討された。その結果からは散発性カンピロバクター食中毒患者は肉類を喫食している割合が高い

*1：社会局保健部食品保健課

*2：現 社会局保健部食肉衛生検査所

ことなどが改めて示された³⁾。一方、具体的な予防・減少策を策定するためには、その原因菌がどのような病原的および生態・疫学的特性を有しているかを知り、それによる感染要因の究明と感染防止・減少対策に迫るアプローチも大変重要である。そこで、今回は、疫学解析手法の有効性と実用性を評価するとともに、広島市における本菌食中毒の疫学的特徴を把握することを目的として、散発事例菌株の解析手法とその解析結果の検討を行ったので報告する。

方 法

1 供試菌株

1999年および2000年に主に広島市立舟入病院から分与されたカンピロバクター菌株178株を供試した。供試菌株は、使用まで-80℃で保存した。

2 同定方法

馬尿酸加水分解試験で陽性を示した菌株を *Campylobacter jejuni* と同定した。弱陽性および陰性の菌株については、高橋らの報告した PCR 法⁴⁾により *C.jejuni* の菌種を確認した。

3 疫学的解析試験

(1) 血清型別

衛生微生物技術協議会のリファレンスセンター配布抗血清 (Lior(Lio)型別および TCK 型別抗血清) を用い、常法⁵⁾ に準じてスライド凝集反応法で行った。

(2) 薬剤感受性試験

6種の抗生物質 (EM, TC, NA, NFLX, OFLX, CPFX) について、sensi-disc(BD)を用いた一濃度ディスク法により試験した。

(3) 分子疫学的解析

2000年分離株の *C.jejuni* Lio4型21株、Lio27型5株について、下記の3種類の分子疫学的解析を行った。

a 鞭毛遺伝子 *flaA* の PCR および PCR-RFLP 分析

テンプレート DNA は、アルカリ溶解法により抽出した DNA を用いた。PCR は、Bour, P. らの報告した *flagellin A* 遺伝子の 5'領域から 1495 bp を増幅するプライマー⁶⁾を用い、Takara 社製の LA PCR Kit Ver. 2 で添付のプロトコールに従って反応液を調製した。増幅は変性 94℃, 45 秒, 55℃, 45 秒, 72℃, 120 秒で 45 サイクル行った。増幅産物の確認は、エチジウムブロマイド加×0.5TBE を泳動バッファーとする 2%アガ

ロースゲル電気泳動で泳動後、トランスイルミネーターによる UV 照射下でポラロイド撮影し、写真上のバンドの有無で行った。

PCR-RFLP 分析は、制限酵素 *Dde* , および *Alu* で消化後、その泳動パターンを 3%アガロースゲルで上記と同様に行い、比較した。

b *flaA* 遺伝子の塩基配列解析

Lio4 型菌株 21 株の *flaA* 遺伝子の PCR 増幅産物について、その塩基配列をダイレクトシーケンス法⁷⁾で決定し、比較した(*flaA*-seq.)。

増幅産物 25 μl を GFX™-PCR DNA Gel Band Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech.)にて精製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行った。反応液を Autoseq.G-50(Amersham Pharmacia Biotech.)で精製した後、Genetic analyzer 310(Applied Biosystems) にアプライし、塩基配列を決定した。

c パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による DNA 解析

供試菌株の DNA 構造の差異を制限酵素 *Sma* による PFGE 法で比較した。方法は、Ribot et al. の報告した方法⁸⁾ に準じて行った。

4 発症月日、患者年齢および喫食状況

カンピロバクター食中毒の届出の際、広島市保健所において聞き取り調査した結果を使用した。

結 果

1 血清型別結果

1999年および2000年に散発食中毒として届けられた事例由来菌株の血清型別結果を表1に示した。広島市では、1999年は Lio1, Lio7, Lio4, Lio36, TCK12 等が多く検出された。

一方、2000年は Lio4, Lio7, Lio36, Lio27 等が多く検出された。この結果、Lio4, Lio7 型のように2年とも多く検出された血清型と Lio1, Lio27 型のように増減した血清型が認められた。

2 薬剤感受性試験結果

表2に分離株の薬剤耐性パターンを示した。2年間合計で感受性株が101株(58%)と最も多かったが、耐性株も42%みられた。その耐性型は、TC 単剤耐性(25%)が最も多く、ついで NFLX, CPFX, OFLX などのフルオロキノロン系薬剤と NA, TC あるいは EM 多剤耐性株が15%に認められた。

表 1 血清型別結果

血清型	1999年		2000年	
	広島市	全国	広島市	全国
Lio 1	12 (63%)	19	3	30
Lio 2	1	15	3	28
Lio 4	8 (18%)	45	21 (37%)	57
Lio 5	1	4		6
Lio 9			3	12
Lio 7	11	45	10	54
Lio 11	1	14	4	21
Lio 19	1	5		4
Lio 26	3	8	2	6
Lio 27	1 (20%)	5	5 (33%)	16
Lio 36	6 (50%)	12	7 (24%)	29
Lio 50	4	11	2	13
T C K 1 2	5	31	3	13
T C K 1 3	1	5	1	6
T C K 2 6	1	29	3	19
その他	0	58	14	100
複数血清型	11	32	5	29
型別不能	15	136	10	190
計	82 (17.2%)	474	96 (15.2%)	628

全国：7 地方衛生研究所（秋田・東京・愛知・大阪・広島市・山口・熊本）

3 分子疫学的解析結果および肉類喫食状況

表 3 に血清型 Lio4 型の 2000 年分離株 21 株，表 4 に Lio27 型の 2000 年分離株 5 株について，薬剤感受性試験および分子疫学的解析法により検討した結果を発生月日順に示した。

それぞれの解析手法ごとに検討の行えていない菌株があるが，薬剤感受性試験では，Lio4 型は 10 種類，Lio27 型は 4 種類がみられた。一方，PCR-RFLP では 11 種類および 3 種類が，*flaA*-seq. では Lio4 のみであるが 13 種類が，そして PFGE では 10 種類および 3 種類が認められた。検討した菌株の多くはこれらの手法により差異が認められたものが多かった。しかし，この 3 手法でも差異の認められない菌株が，Lio4 型で 4 月 6，21 日および 11 月 6 日の事例で認められた。同様に Lio27 型でも 9 月 18，20 日の事例に認められた。肉類の喫食状況については，Lio4 型菌による事例では 21 事例中 5 事例のみが喫食ありと回答し，低率であった。Lio27 型菌は 5 事例中 2 事例が喫食ありと回答された。

考 察

広島市では，1997 年 9 月以来医療機関からの食中毒届出が急増し，2000 年は全国届出数の約

表 2 分離菌株の薬剤感受性

耐性パターン	1999年	2000年
TC	18	26
NA	1	1
EM・TC	0	1
NFLX・CPFEX	0	1
NFLX・CPFEX・OFLX・NA	7	4
NFLX・CPFEX・OFLX・NA・TC	2	9
NFLX・CPFEX・OFLX・NA・TC・EM	0	4
感受性	47	54
計	75	100

表 3 Lior 4 型菌の疫学的解析結果(2000年)

発症月日	年齢	肉類の喫食	血清型	薬剤感受性(mm)					PCR-RFLP		flaA-seq.	PFGE	
				NFLX	OFLX	CPFEX	NA	EM	TC	DdeI			AluI
4 3 29	N		Lio4	27	25	30	20	31	40	a	a	a	A
4 6 44	N		Lio4	36	37	35	23	35	0	b	a	b	B
4 21 26	N		Lio4	35	40	38	24	36	0	b	a	b	B
4 27 21	N		Lio4	26	34	23	26	38	34				c
5 8 10	不明		Lio4	20	26	21	15	30	26	a'	b	d	C
5 8 12	不明		Lio4	0	0	0	0	23	0	a	a''	e	A
6 13 8	Y(鶏肉)		Lio4	0	0	0	0	37	28	c	c	f	D
6 21 1	N(鶏料理)		Lio4	0	0	0	0	48	0	b	a'''	g	E
6 24 9	N		Lio4	40	34	31	28	41	34	c	a''''	h	
6 24 20	N		Lio4	45	42	45	26	47	0	b	a	l	E
7 5 0	N		Lio4	41	41	37	27	35	0	d	c	j	F
7 6 5	Y(焼肉)		Lio4	40	39	42	28	38	9	e	a	k	G
8 1 45	不明		Lio4	45	41	47	37	40	52				
8 28 10	N		Lio4	34	36	41	33	21	45	f	b	d	C
9 17 5	N		Lio4	0	0	0	0	38	0	b	a	l	H
10 6 28	Y(牛ノ刺)		Lio4	0	0	0	0	33	0				I
11 6 1	N		Lio4	0	0	0	10	34	0	b	a	m	J
11 6 7	N		Lio4	0	0	0	0	29	0	b	a	m	J
12 1 6	Y(鶏唐揚)		Lio4	0	0	0	0	28	0	b	a	m	J
12 4	不明		Lio4	37	40	40	34	36	12	b	a	b	B
12 28	N		Lio4	37	36	38	28	0	0	b	a''''		

a: Y, 喫食 ; N, 喫食せず

3 割，2001 年は約 4 割もの届出数を占める状況にある。その中で，カンピロバクターを原因とする食中毒の届出は，年間 280 件前後で推移していたが，2000 年には，それまで 1 位であったサルモネラが大幅に減少したことから，本市届出数の中で第 1 位を占めることとなり，本市における重要性が増す状況となった。しかし，その個々の事例はほとんどが聞き取り調査からは明確な関連性を認めることができない散発事例であった³⁾。一方，それらの事例の原因となった菌株がどのような疫学的特徴を有するのかを明らかにすることは，これら事例間の関連の可能性を推測し，その発生要因・感染経路を追究していく上で，有益な基礎資料・情報となると考えられる。広島市においては集団事例¹¹⁾については以前に疫学的な検討を行ったことはあるが，散発食中毒事例についての検討はないことから，今回調査研究事業において検討を行った。

血清型は，本市における過去 2 年間，Lio4 型，Lio7 型などが主要血清型であったが，全国の成績とも共通している⁹⁾。従って，これらの血清型菌はわが国に普遍的に存在する優勢血清型であることが認められる。一方，Lio1 型は 1999 年は 12 株で全国の分離株の 63% を占めたが，2000 年は 3 株で 10% のみに低下した。また，Lio27 型は

表 4 Lior 27 型菌の疫学的解析結果(2000年)

発症月日	年齢	肉類の喫食	血清型	薬剤感受性(mm)					PCR-RFLP		PFGE
				NFLX	OFLX	CPFEX	NA	EM	TC	DdeI	
7 7 39	Y(焼肉店)		Lio27	38	36	41	23	36	15	i	e
8 1 44	不明		Lio27	32	29	34	17	30	35	j	f
9 18 9	N		Lio27	47	40	40	36	45	47	i	e
9 20 27	Y(牛肉)		Lio27	44	41	44	38	43	47	i	e
10 1 31	N		Lio27	26	28	26	23	22	0		

a: Y, 喫食 ; N, 喫食せず

逆の傾向を示した。これらのことから、全国的に広く分布する血清型と同時に地域的に分布が変動する血清型が存在することが考えられた。

薬剤耐性型をみると、本市では TC 単剤耐性が最も多く検出されたが、これも全国傾向と同様であった¹⁰⁾。一方、フルオロキノロン剤には 15% が耐性を示したが、この系統薬剤に対する多剤耐性化傾向は、世界的な問題として認識され¹⁾、耐性菌問題のひとつとして、今後ともその動向に注意が必要である。カンピロバクターの菌種同定においてキー性状とされる NA に関しては、最近では全国のヒト由来株の NA 耐性は 40% 近くに達するとの報告¹⁰⁾もあり、これに比較すると、今回の本市の散发性食中毒患者由来株の耐性率は低率であった。この理由としては、明らかではないが、地域により産地の異なる食品が流通していることやその流通量等の違いが、耐性率の違いに影響している可能性も考えられた。このように、*C. jejuni* の疫学的解析に用いられる疫学マーカーのうち、菌種、生物型、薬剤感受性試験、血清型別などの表現型によるものは、前述のように本菌のマクロな生態(疫学)を把握する上で有効である。一方、近年、より詳細な解析を行うことを目的とした構成蛋白質¹¹⁾、遺伝子 DNA のフラグメント多型解析(PFGE^{8), 12)}、random amplified polymorphic DNA(RAPD)¹³⁾、PCR-RFLP⁶⁾、amplified fragment length polymorphism(AFLP)¹⁴⁾ および遺伝子 DNA の塩基配列の比較解析⁷⁾などによる分子疫学的手法が報告されている。しかし、本邦では、これらの分子疫学的手法がどの程度カンピロバクター下痢症の疫学的追求手段として有効なのかを評価したものはあまりみられない。今回、Lio4 型と Lio27 型菌株について PFGE、*flaA* 遺伝子の PCR-RFLP、および *flaA* 遺伝子の塩基配列解析の 3 種類の方法で検討したところ、血清型や薬剤感受性試験では区別しがたい菌株が分子疫学的手法ではその多くが遺伝学的には異なる菌株であると判別された。この結果から、血清型別や薬剤感受性試験は、簡易で有効な疫学的解析手法であり、集団食中毒の場合はこれらの差異によって異同を判断してもさほど大きな誤りはないと考えられる¹¹⁾が、散发事例由来株の異同を検討する解析手法としては不十分で、菌株の異同に関してはさらに分子疫学的解析法による解析が必要であることが示された。

分子疫学的解析手法のなかでは、現在、識別能および基本試薬・操作の共通性などの点において PFGE 法が優れていることが報告されている。従って、本法は米国やわが国において発展途上にあるパルスネットシステム¹⁵⁾における中核技術の位置を占めている。しかし、解析に時間を要することや、異試験日間や試験機関間での解析結果の比較には解析画像の標準化など、さらに克服すべき課題が残されている。今回使用した方法は、従来の PFGE 法の所要時間を短縮した CDC の方法⁸⁾であるが、明瞭な泳動像が得にくかったものの、Lio4 型および Lio27 型菌株間の遺伝的差異を認めることができた。この PFGE 法については、株間あるいは他機関との比較を可能とするためにはさらに技術的検討を続ける必要がある。

一方、PCR を基本技術とする解析系として検討した鞭毛遺伝子 *flaA* の PCR-RFLP とそのシーケンス解析については、PCR-RFLP 分析によってもある程度の遺伝子型に型別されたが、同じ RFLP 像を示した菌株が他の 2 手法では異なる型に区別されたものもみられたことから、解析力の比較において他の 2 法に劣ると考えられた。しかし、本法は、迅速性において優れており、第一義的に用いる分子疫学的解析手法としては有用と考えられた。また、その PCR 産物を用いてダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定に結び付けられる利点がある。塩基配列のシーケンス比較は、生成された配列データの修正にかなりの時間を要するものの、菌株間の差異を PCR-RFLP よりも細かく識別できることが今回の結果から推測された。

今回、限られた菌株の結果ではあるが、これらの手法の適用により、市内での感染が多様な菌により起きている一端を明らかにすることができた。しかし、一方、検査手法の観点からみると、現実的に適応できる手法は簡便、迅速であることが望ましいが、今回の手法は *C. jejuni* 菌株の識別に複数の解析手法を必要とすることから、煩雑であり、複数検査の必要性から迅速性にも欠ける。受動的サーベイランスへの使用はもとより、事例間の関連性をさぐる(同一菌を探し出す)ことを目的とする能動的サーベイランスとしても、分離菌株の疫学的解析は困難な事態が予測される。

しかし、一方で例数は少ないが、差異が確認できない菌株も認められた。この結果は、市内における同一菌に汚染された食品による diffuse

outbreak の一端を捉えたものである可能性と遺伝的な同一系統の菌(clonal lines)に汚染された異なる食品による感染(食中毒)事例である可能性を示している。聞き取り調査では、これらの多くが食肉の喫食を否定しており、食肉の関与を特定できなかったが、区別できない菌が分離された患者は市内の同一区に住む例が3事例みられた。今後、このようなケースがどのように解釈できるのか、聞き取り方法、聞き取り内容なども検討していくことが必要と考えられる。

以上の結果を総合すると、これら解析手法の菌株識別能力の評価をさらに続ける必要があるが、現在の鶏肉等の食肉における広範なカンピロバクター汚染の実態を勘案すると、菌株疫学解析による監視的機能は、今後、国内外で進行中である鶏肉のカンピロバクターリスクアセスメント¹⁶⁾や他の研究成果を科学的根拠としたリスクマネージメントおよびリスクコミュニケーションなどのマクロな衛生管理政策が立案・実施され、効果をあげ得た段階において、その有効性が発揮されるものと考えられた。

謝 辞

血清型別用抗血清を調製・分与していただきました東京都立衛生研究所横山敬子先生並びに菌種鑑別 PCR 法についてご教示いただいた高橋正樹先生に深謝いたします。

文 献

- 1) FDA : Draft risk assessment on the human health impact of fluoroquinolone resistant *Campylobacter* associated with the consumption of chicken. (2000).
- 2) Kapperud G et al: Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection :results of a case-control study in southeastern Norway, J Clin Microbiol , 30 , 3117 ~ 3121(1992).
- 3) 蔵田和正 他 : 広島市の散発性カンピロバクター食中毒の発生動向, 平成 13 年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録 (2000)
- 4) 高橋正樹 他 : PCR 法による *Campylobacter jejuni* 並びに *C.coli* 同定のための各種プライマーの評価について, 感染症学雑誌, 73 , 171 (1999)
- 5) 斎藤香彦 他 : *Campylobacter jejuni/coli* の

血清型別に関する研究 : Lior の血清型別システムの導入, 感染症学雑誌, 66, 340 ~ 347(1992)

- 6) Bour P et al: Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, J Clin Microbiol 38(5), 1940 ~ 1946(2000)
- 7) Meinersmann RJ et al: Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by gene sequencing, J Clin Microbiol 35, 2810 ~ 2814(1997)
- 8) Ribot EM et al: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni* , J Clin Microbiol , 39(5), 1889 ~ 1894(2001)
- 9) 感染症情報センター : わが国における腸炎由来 *Campylobacter jejuni* 血清型の検出動向および散発下痢症由来 *C.jejuni* のキノロン剤に対する耐性菌の出現-カンピロバクター・レファレンスセンター, 病原微生物検出情報月報, 20(5), 3 ~ 4(1999)
- 10) 感染症情報センター : カンピロバクター腸炎 1995-1998, 病原微生物検出情報月報, 20(5), 1 ~ 2(1999)
- 11) 石村勝之 他 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の食中毒菌迅速同定への応用 : *Campylobacter jejuni* 集団発生事例の疫学的解析, 日食微誌, 7(3), 167 ~ 172(1991)
- 12) 松根 涉 他 : 食鳥および食中毒由来 *Campylobacter jejuni* のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学解析, 日食微誌, 17(4), 245 ~ 248(2000)
- 13) 小野一晃 他 : RAPD 法による *Campylobacter jejuni* の分類と血清型との比較, 日細学誌, 53(3), 519 ~ 529(1998)
- 14) Lindstedt BA et al: Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified fragment length polymorphism genotyping, J Clin Microbiol , 38(9), 3379 ~ 3387(2000)
- 15) Centers for disease control and prevention: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbnd/pulsenet/pulsenet.html>
- 16) FAO and WHO: Joint FAO/WHO activities on risk assessment of microbiological hazards

in foods: -preliminary reports- hazard
identification , hazard characterization and

exposure assessment of *Campylobacter* spp.
in broiler chickens (2001)