

## 4. 高崎市における食中毒および食肉由来 カンピロバクタージェジュニの簡易分子疫学的解析

- 石岡 大成 (高崎市保健所)
- 高田 勇人 (群馬県食品・生活衛生課)
- 福本 憲嗣 (高崎市食肉衛生検査所)
- 亀井 厚志 (高崎市保健所)
- 遠藤 忠昭 (高崎市保健所)

### 【研究目的】

*Campylobacter jejuni* (以下、*C. jejuni*) が保有すると報告されている 13 種類の病原遺伝子の検索を行い、それら遺伝子の有無を検索することにより分離株のプロファイル化が可能となる。また、分離株の薬剤感受性を調査することにより、詳細な菌株間の関連性を確認することが可能であると考えられる。さらには、過去のデータと共有することにより経年的な変化を知ることができることから、保健所レベルにおいても簡易的に分子疫学的解析が可能であるか検討することを目的とする。

### 【研究の必要性】

厚生労働省の食中毒統計によると、平成 28 年の細菌性食中毒病因物質の第一位は、事件数および患者数とも圧倒的にカンピロバクター属菌 (*C. jejuni* および *coli*) となっており、同菌による食中毒事例は、過去 10 年以上細菌性食中毒の中で趨勢を占めている。また、感染性胃腸炎患者に関しても、2008 年の東京都の報告によると、過去 10 年間の都内登録衛生検査所で検出された下痢症起因菌の分離状況は、サルモネラや腸炎ビブリオについては年々減少しているのに対して、カンピロバクターは急増の一途である。したがって、本菌による食中毒予防および感染対策は急務であり、そのためには、市内に流通する食品から本菌を分離し、感染患者由来株との関連性、さらには、過去の分離菌株データとの比較により総合的に判断する必要がある。

### 【研究計画】

当保健所では、食品の微生物学的検査を実施しており、さらには、と畜場や食鳥処理場を管轄する食肉衛生検査所が併設されていることから、食肉等については市場流通前後での検体採取および細菌検査が可能である。そこで、食品についてはカンピロバクターの分離率が非常に高い市販鶏肉を対象とし、食肉処理場については、処理鶏の盲腸便を採取する。さらには、同時期に管内で発生した本菌による食中毒等の分離株を比較対象とする。

これらの分離株から遺伝子を抽出し、Talukder ら<sup>6)</sup>の方法に若干変更を加えて種々の病原遺伝子保有の有無を確認する。市販鶏肉から分離される *Campylobacter* の情報については、平成 19 年（2007 年）にも同様な調査を実施していることから、分離年による相違を比較することにより、現時点のみならず経年的な変化を知ることが可能となる。さらに今回は、分離菌株について薬剤感受性を検討することにより、より詳細に市内または県内に流行している本菌の疫学解析が可能となると考えられる。

### 【実施内容・結果】

調査期間を平成 28 年 8 月～平成 29 年 7 月までの 1 年間とし、市内流通食品として鶏肉（副生物を含む）を、1 ヶ月 10 サンプル程度市内大手スーパーから購入した。管内の食鳥処理場からのサンプルリングについては、解体処理中の内蔵を汚染の無いように採取し、3 羽を 1 ロットとして盲腸便を採取した。また、患者分離株については、食中毒事例については糞便を対象とし、感染性胃腸炎患者については協力が得られた医療機関から分離株を分与していただいた。

分離培養については以下のとおり行った。鶏肉については、Nutrient broth にて 10% 乳剤を作製し、その後プレストン選択増菌培地に培地の 10% 量を添加した。微好気条件下で 42℃、24 時間培養後、mCCDA に移植し、微好気条件下で 42℃、24～48 時間培養した。鶏盲腸便およびヒト糞便については、便を良く混合してからプレストン選択増菌培地に培地の 10% 量添加し、以降は鶏肉同様に実施した。

薬剤感受性については、Kirby-Bauer 法による拡散法に基づいた 1 濃度ディスク法により実施した。すなわち、分離株を McFarland no. 0.5 濁度になるように Mueller-Hinton broth に懸濁し、綿棒を用いて懸濁菌液を 5% 綿羊血液加 Mueller-Hinton 寒天培地に 3 方向から均等に塗抹した。培地表面が乾いてからセンチディスク（BD）を静置し、微好気条件下で 37℃、48 時間培養した。培養後、各ディスク周囲に生じた阻止円をノギスを用いて測定し各薬剤に対する感受性について検討した。検討した薬剤は、アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CET）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、オフロキサシン（OFLX）、ノルフロキサシン（NFLX）、クロラムフェニコール（CP）、セフトジジム（CAZ）、セフポドキシム（CPDX）、レボフロキサシン（LVFX）、ホスホマイシン（FOM）、ST 合剤（ST）の 13 薬剤とした。

遺伝子検査については、純培養した分離菌株から QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出し、これを PCR 反応における Template とした。その後、*flaA*、*cadF*、*racR*、*dnaJ*、*virB11*、*ciaB*、*pldA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC*、*wlaN*、*cfrA* および *ceuE* の 13 病原遺伝子の保有状況について、コンベンショナル PCR にて確認した。PCR master mix は GoTaq Green Master Mix Hot Start（Promega）を用いた。プライマー配列や PCR 条件については表 1 に示した。増幅後は常法に従い 2% アガロースで泳動後、エチジウムブロマイドで染色し特異的バンドの有無を確認した。

表1 病原遺伝子検出用プライマー

Target gene	Primer	DNA sequence (5' - 3')	Product size (bp)	Pathogenic gene	Reference
<i>flaA</i>	flaA664	AATAAAAAATGCTGATAAAAACAGGTG	855		(1)
	flaA1494	TACCGAACCAATGCTGCTGATT			
<i>cadF</i>	cadF-F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	400	細胞吸着および増殖関連	(2)
	cadF-R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC			
<i>racR</i>	racR-25	GATGATCCTGACTTTG	584		(1)
	racR-593	TCCTCATTTTTACCC			
<i>dnaJ</i>	dnaJ-299	AAGGCTTTGGCTCATC	720		(1)
	dnaJ-1003	CTTTTTGTCATCGTT			
<i>virB11</i>	virB-232	TCTTGTGAGTTGCTTACCCCTTTT	494		(1)
	virB-701	CCTGCGTGCCTGTGTTATTTACCC			
<i>ciaB</i>	ciaB-403	TTTTTATCAGTCCTTA	986	細胞侵襲性関連	(1)
	ciaB-1373	TTTCGGTATCATTAGC			
<i>pldA</i>	pldA-84	AAGCTTATGCGTTTTT	913		(1)
	Plid-981	TATAAGGCTTTTCCA			
<i>cdtA</i>	DS-18	CCTTGTGATGCAAGCAATC	370		(3)
	DS-15	ACACTCCATTGCTTTCTG			
<i>cdtB</i>	cdtB-113	CAGAAAGCAAAATGGAGTGT	620	細胞毒素産生性関連	(1)
	cdtB-713	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT			
<i>cdtC</i>	cdtC-192	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	182		(1)
	cdtC-351	TTGGCATTATAGAAAAATACAGTT			
<i>wlaN</i>	wlaN-DL39	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG	672	Guillain-Barre syndrome関連	(4)
	wlaN-DL41	CCATTGAATTGATATTTTTG			
<i>cfrA</i>	CfrA-F	GAGATGTTGCAGAGGCTATCG	527	エンテロバクテレン第二鉄受容器および輸送システムリボ蛋白関連	(5)
	CfrA-R	TGCTTTGTAGGACTTTGAGC			
<i>ceuE</i>	JEJ1	CCTGCTACGGTGAAGTTTTGC	793		(6)
	JEJ2	GATCTTTTTGTTTGTGCTGC			

表2 本調査および2007年調査でサンプルから検出された *Campylobacter jejuni* の遺伝子プロファイル

<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>virB11</i>	<i>ciaB</i>	<i>pldA</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	<i>wlaN</i>	<i>cfrA</i>	<i>ceuE</i>	pattern
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	2
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	3
+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	4
+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	5
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	6
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	7
+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	8
+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	9
+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	10
-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	11
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	12
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	13
+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	14
-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	15
+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	NT	16
+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	NT	17
+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	NT	18
+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	NT	19
-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	NT	20
-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	NT	21
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	NT	22
+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	NT	23
+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	NT	24
+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	NT	25

表3-1 本調査で鶏肉類から分離された *Campylobacter jejuni* の病原遺伝子プロファイル(販売店別)

購入店	産地	部位	pattern
FLS	IW	ガラ	3
FLS	IW	レバー	3
FLS	GM	ムネ	3
FLS	IW	モモ	7
FLS	GM	モモ	10
FLS	IW	モモ	1
TRS	QS	レバー	9
TRS	QS	レバー	3
TRS	K	カワ	4
TRS	QS	レバー	5
TRS	K	ナンコツ	3
TRS	QS	レバー	3
TRS	QS	ヤキトリ	3
TRS	QS	レバー	11
TRS	QS	レバー	3
TRS	QS	ムネ	1
TRS	QS	レバー	5
AIZ	QS	モモ	8
AIZ	K	レバー	3
FJS	K	ムネ	5
FJS	K	ムネ	5
FJN	K	ムネ	5
FJN	K	モツ	2
RYI	K	ムネ	3
RYI	K	ササミ	3
RYI	K	モモ	12
RYI	K	ナンコツ	3
RYN	K	カワ	1
MCH	K	カワ	3
BRK	GM	ムネ	6
MCH	TS	ムネ	5

今回の調査により、市販鶏肉由来サンプル 152 検体から 41 株の *Campylobacter* 属菌が分離

され、うち *C. jejuni* は 34 株分離された。また、同様に鶏盲腸便からは、90 検体中 35 株から *Campylobacter* 属菌が分離され、うち *C. jejuni* は 31 株分離された。食中毒事例を含む胃腸炎患者から *C. jejuni* は 4 株分離された。これらの *C. jejuni* のうち、市販鶏肉由来は 31 株、鶏盲腸便由来は 11 株、胃腸炎患者由来は 4 株（うち 1 株は遺伝子検索のみ実施）をそれぞれの代表菌株として以降の検査に供した。

これらの分離菌株は、病原遺伝子検索の結果 15 パターンに型別された（表 2 上段）。また、2007 年の調査において、今回の遺伝子プロファイルに該当しない病原遺伝子の組み合わせは 10 パターン存在した（表 2 下段）。

表3-2 本調査で鶏盲腸便から分離された*Campylobacter jejuni*の病原遺伝子プロファイル

ロットNo.	pattern
Cb-A	13
Cb-B	3
Cb-C	1
Cb-D	3
Cb-E	5
Cb-F	8
Cb-G	5
Cb-H	8
Cb-O	15
Cb-S	14
Cb-U	10

表3-3 本調査で胃腸炎患者から分離された*Campylobacter jejuni*の病原遺伝子プロファイル

患者No.	pattern
Fp-1	5
Fp-2	5
Fp-3	3
Fp-4	3

表 3-1 に、今回鶏肉等から検出された *C. jejuni* の販売店別病原遺伝子プロファイルを示した。店舗によっては *virB11* および *wlaN* を保有していないパターン 3、*virB11*、*wlaN* および *ciaB* を保有していないパターン 5 を示す分離株が多いことが認められた。また、管内の食鳥処理場に搬入された鶏の盲腸便については、A~H(すべて系列農場)については、農場によりパターン 3、5 および 8 の蔓延が推察されたが、他の農場は優勢的な病原遺伝子パターンは認められなかった。一方、調査期間中に発生した食中毒事例や感染性胃腸炎患者由来株では、鶏肉類同様パターン 3 および 5 が優性であった。表 4 には今回の分離株の 13 薬剤に対する感受性に関するプロファイルを示した。鶏肉類のサンプルに関しては販売店別に示した。個別薬剤でみると、CET、CPDX

および ST にはほとんどすべての分離株が耐性を示し、最近の傾向として、ニューキノロン系薬剤に対する耐性を示す株が今回の調査でも多く認められた。薬剤プロファイルについては、パターン C を示す分離株が 6 株認められたが、特に明瞭な傾向は認められなかった。

【考察と今後の課題】 今回の調査により、市内に流通する鶏肉類には、生産地域よりはそれら进行处理する販売店舗における加工中のコンタミネーションによる汚染の影響が大きいことが推察された。したがって、表 3-3 に示した患者の分離株プロファイルから、汚染した食材を購入した一般消費者や飲食店業者による食材の不適切な取り扱いにより、胃腸炎や食中毒等が発生する可能性が示唆された。2007 年のデータによると、鶏肉由来 *C. jejuni* の遺伝子パターンは、パターン 5 および 17 が主流であったが、今回の調査ではパターン 3 および 5 に流行が変化していた(表 3 および表 5)。また、データとして示してはいないが、同一飼育地域由来鶏肉の新旧の分離株を比較したところ、遺伝子パターンに共通性が認められないこと、今回の調査における分離株のほとんどが *ciaB* を保有して

表4 本調査で分離された*Campylobacter jejuni*の薬剤感受性プロファイル

販売店	pattern
FLS	A
FLS	B
FLS	C
FLS	C
FLS	D
TRS	E
TRS	F
TRS	G
TRS	C
TRS	H
TRS	I
TRS	I
TRS	J
TRS	K
TRS	L
AIZ	M
AIZ	N
FJS	O
FJS	P
FJN	Q
FJN	B
RYI	H
RYI	J
RYI	D
RYI	C
RYN	R
MCH	S
BRK	C
MCH	T
	U
	S
	R
	T
盲腸便	S
	V
	W
	R
	X
	R
	Y
	C
患者	T
	Z

表5 2007年調査時における鶏肉等および胃腸炎患者由来*Campylobacter jejuni*の病原遺伝子プロファイル

Pattern	1	3	5	8	9	10	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
鶏肉由来株数		2	12	3	3	2	2	1	1	13	2	1	1	1	1			
患者由来株数	3		2	1						2							1	1

いたことから、市内のみならず群馬県内に流行している *C. jejuni* については、経年的に遺伝学的変化が生じていることが示唆された。*ciaB* は *Campylobacter* 属菌では細胞侵襲性に関与する遺伝子であることから、近年、本菌による感染事例が減少しないこととの関連性が推測された。

今回の結果から、市内流行株である病原遺伝子プロファイルにおけるパターン 3 や 5 については、病原遺伝子プロファイルのみでは感染源追求のための疫学解析は難しいと考えられるが、薬剤感受性のプロファイルにバリエーションが広く認められたことから、より詳細に疫学解析を実施するためには、遺伝子パターンのみならず薬剤感受性パターンを併用することが必要であることが考えられた。今後は、対象遺伝子のパネルを増やすこと、感受性を確認する薬剤を精査することにより、地域保健所の検査室レベルにおいても解像度の高い疫学解析が可能となる手法を検討したい。

#### 【参考文献】

- 1) Datta S, et al. J Med Microbiol. 2003 Apr;52(Pt 4):345-8.
- 2) Konkel ME, et al. J Clin Microbiol. 1999 Mar;37(3):510-7.
- 3) Hickey TE, et al. Infect Immun. 2000 Dec;68(12):6535-41.
- 4) Linton D, et al. Mol Microbiol. 2000 Aug;37(3):501-14.
- 5) Zeng X, et al. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5437-48. doi: 10.1128/IAI.00666-09. Epub 2009 Sep 8.
- 6) Talukder KA, et al. J Clin Microbiol. 2008 Apr;46(4):1485-8. doi: 10.1128/JCM.01912-07. Epub 2008 Feb 20.

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品（食材含む）および実験器材	
遺伝子抽出キット	54,000 円
プライマーセット	77,760 円
電気泳動装置およびゲル作製キット一式	59,100 円
マイクロチューブおよび PCR チューブ	73,872 円
カンピロバクター用培地およびサプリメント類	69,640 円
鶏肉および副生物	27,648 円
合 計	362,020 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円