

## 高知県下で分離された*Campylobacter jejuni*の分子疫学解析

藤戸 亜紀・鍋島 民・松本 一繁・松本 道明・今井 淳

### Molecular Epidemiologic Analysis of *Campylobacter jejuni* Isolated in KOCHI

Aki FUJITO, Tami NABESHIMA, Kazushige MATSUMOTO  
Michiaki MATSUMOTO, Atsushi IMAI

**【要旨】** カンピロバクターは急性胃腸炎や食中毒の主要な原因菌であり、近年日本における食中毒発生病数の一位を占めている<sup>1)</sup>。事例間の関連を調べるため、菌株の分子疫学解析は重要な役割をはたしてくる。今回、平成17、18年度に分離検出されたウシ由来およびヒト由来の保存菌株について、また平成20、21年に感染症発生動向調査および食中毒事例から分離検出されたヒト由来菌株についてそれぞれ血清型別を行った後、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による分子疫学解析を実施した。その結果、ウシ由来とヒト由来の菌株間で有意な関係性は見られなかったが、血清型の一致した食中毒事例では*Sma* 処理、*Kpn* 処理ともにそれぞれ切断パターンが一致した。これにより、カンピロバクター集団感染事例でのPFGEによる疫学解析の利用は可能であると思われた。しかし、未消化の大きなバンドや非特異バンドが出現することがあり、それらが解析結果に影響が出るのを防ぐため、菌液の濃度調整などさらなる検討が必要である。

Key words : カンピロバクター・ジェジュニ、パルスフィールドゲル電気泳動法  
*Campylobacter jejuni*, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

#### I はじめに

急性胃腸炎や食中毒の主要な原因菌であるカンピロバクターは、近年日本における食中毒発生病数の一位を占めており<sup>1)</sup>、高知県でもカンピロバクターによる集団食中毒事例が毎年のように報告されている。また、高知県感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の原因細菌検査では、検出された原因細菌の中で高率に、しかも季節を問わず年間を通じて検出されている (表1)。

当所では、平成7年よりウシ糞便の、平成13年からウシ胆汁の、平成17年度からウシ肝臓のカンピロバクターの汚染実態調査について報告しており<sup>2-4)</sup>、その動向を監視してきた。

今回、*Campylobacter jejuni*について、平成17、18年度に分離検出されたウシ由来菌株およびヒト由来菌株、また、平成20年1月から平成21年12月までに感染症発生動向調査および食中毒事例から分離検出された菌株を用い、それぞれ血清型別を実施した後、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により分子疫学解析を行ったので報告する。

表1 高知県感染症発生動向調査における感染性胃腸炎の原因細菌中のカンピロバクター検出率

	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	平成21年度
感染性胃腸炎原因菌検出数	77	75	64	57	13
カンピロバクター検出数	53	46	46	41	9
カンピロバクター検出率	68.80%	61.30%	71.90%	71.90%	69.20%

## II 材料と研究方法

### 1 材料

(1) 平成17、18年度に分離検出されたウシ由来の72菌株およびヒト由来の155菌株についてPenner型血清型別を行い、最も検体数の多かったB血清群（抗原因子2）のウシ由来7菌株、ヒト由来31菌株、D血清群（抗原因子4, 13, 16, 43, 50）のウシ由来26菌株、ヒト由来5菌株を検査材料として使用した。

(2) 平成20年1月から平成21年12月までに感染症発生動向調査で分離検出された48菌株および食中毒5事例から分離検出された16菌株、計64菌株についてPenner型血清型別後、型別不能（UT）菌株を含む全血清群を検査材料として使用した。

### 2 Penner型血清型別

5%馬脱繊維血加Trypticase Soy Agar（BD）平板を用い、微好氣的条件下42 1日培養した菌体を使用した。PHA法によるカンピロバクター血清型別用試薬（デンカ生研）で感作血球抗原を作製し、カンピロバクター免疫血清（デンカ生研）で判定した。

### 3 PFGE法

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中の近畿ブロックの「*Campylobacter* PFGE Protocole-Kinki ver.2(2008)」を参考に、制限酵素 *Sma*（Roche）は25、*Kpn*（Roche）は37 でそれぞれ一晩処理を行いPFGEを行った。マーカーには制限酵素 *Xba*（Roche）を用い、37 で一晩処理を行った *Salmonella* Braenderup H9812株を使用した。泳動条件は6.0V/cm、パルスタイム6.8-35.4sec、泳動時間19時間とした。泳動パターンの解析にはFingerprinting（Bio-Rad）を使用した。

## III 結果

PFGEでは、未消化のサイズの大きいバンドや非特異バンドが見られ、判定が困難なものがあった。これは特に *Kpn* で顕著であった。*Sma* では明瞭なバンドが得られたものも多かったが、バンド数が少なく、解析能力に問題が見られた。また、*Kpn* では、173.9kb以下の小さいサイズのバンドが近接し不明瞭なため、バンドの認識が困難なものがあった。

(1) 平成17、18年度に分離検出された検査材料では、B血清群、D血清群ともにウシ由来菌株およびヒト由来菌株間での有意な関連性はみられなかった（図1～4）。しかし、ヒト由来検体の多かったB血清群ではヒト由来31菌株中14菌株が、*Kpn* および *Sma* の両方でそれぞれ切断パターンが一致した（図1、2）。

(2) 平成20、21年に分離検出されたヒト由来の64菌株の血清型別は多岐にわたった（表2）。平成21年5月から新型インフルエンザ（A/H1N1pdm）対応として感染症発生動向調査検体の受け入れ制限を行っていたため、平成21年6月から9月までは *C. jejuni* の検出はないが、それ以外はほぼ毎月分離検出された（図5）。

食中毒由来菌株のグループ別（G1～G5）のPFGE解析では、血清型がYとUTの2種類検出されたグループG3で、異なる血清型の菌株の切断パターンは *Sma*、*Kpn* いずれにおいてもそれぞれ明らかに異なった。G3以外の血清型が一致した4グループでは、*Sma*、*Kpn* ともにそれぞれ同じ切断パターンを示した（図6）。

血清型別の解析では、検体数の少ない血清群E、Fではどちらの酵素で処理をした場合でもそれぞれ切断パターンが一致した。検体数の比較的多いB血清群などでも、相同性の数値は異なるものの、*Sma* と *Kpn* でほぼ同様の系統樹となった（図7）。全64検体の系統樹は図8、9のとおり。

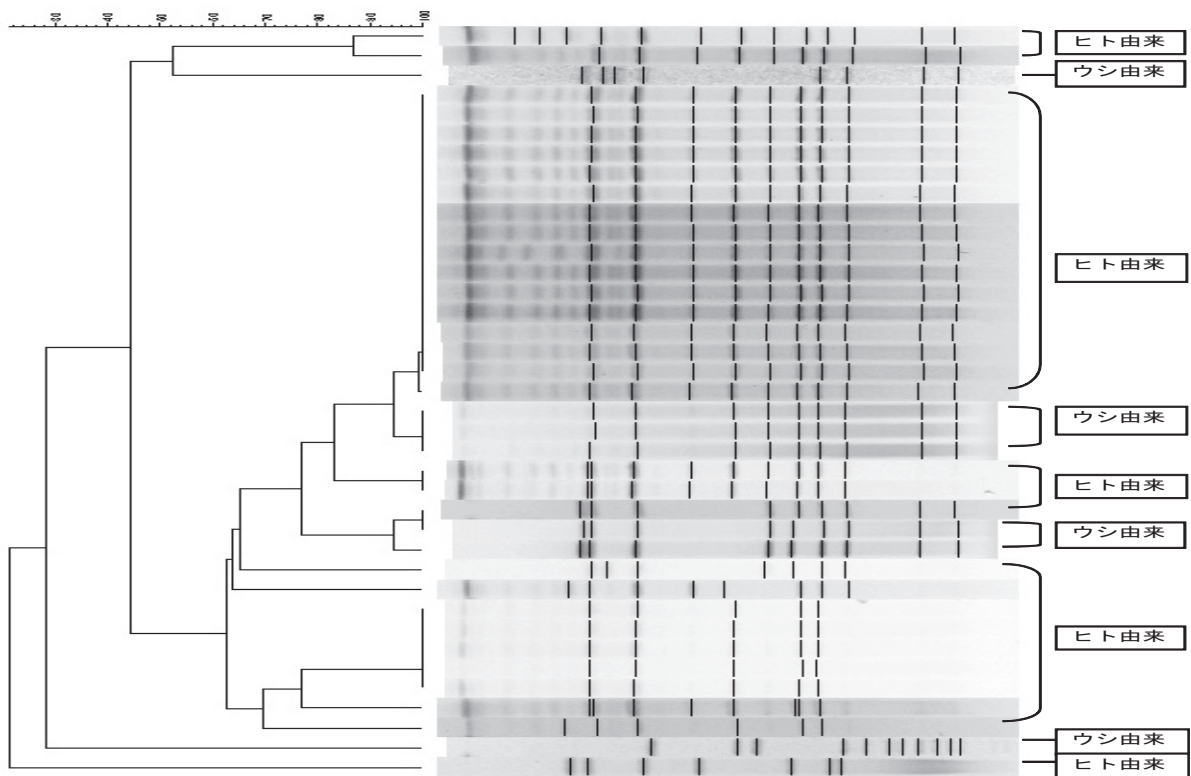


図1 平成17、18年度に分離検出された*C. jejuni* (B血清群) の系統樹 (*Sma* )

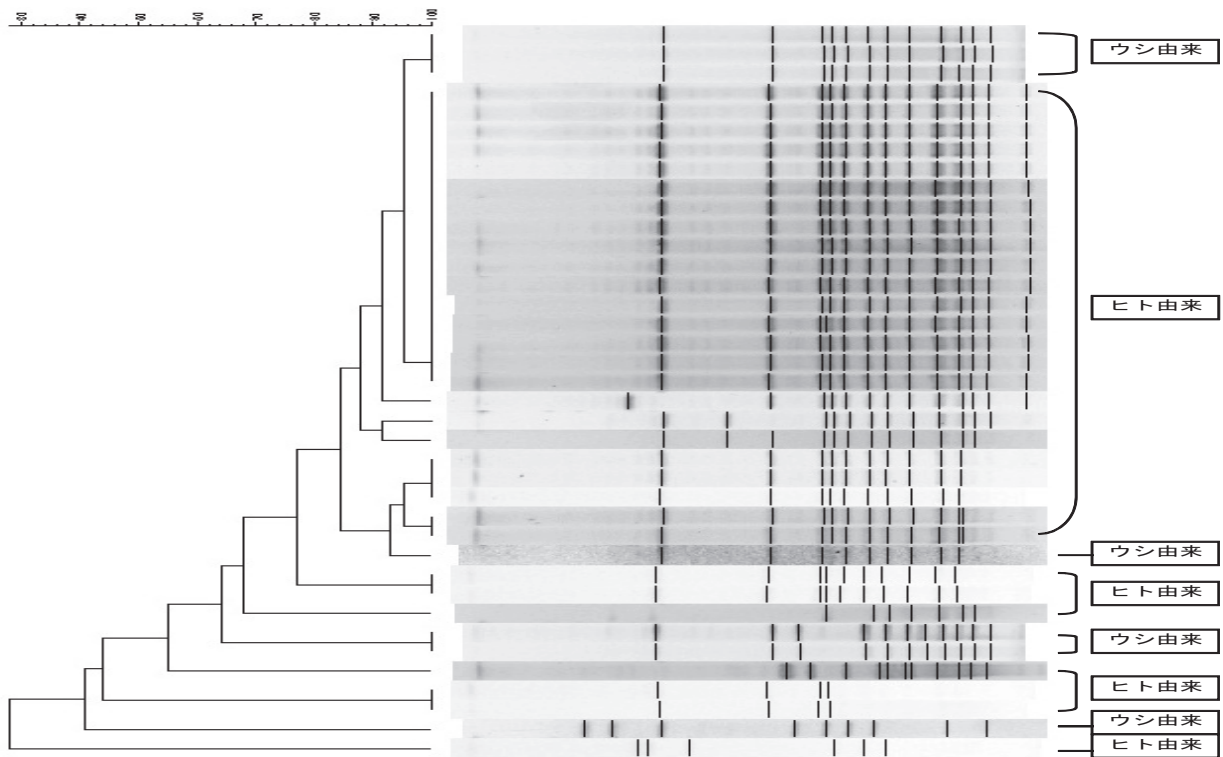


図2 平成17、8年度に分離検出された*C. jejuni* (B血清群) の系統樹 (*Kpn* )

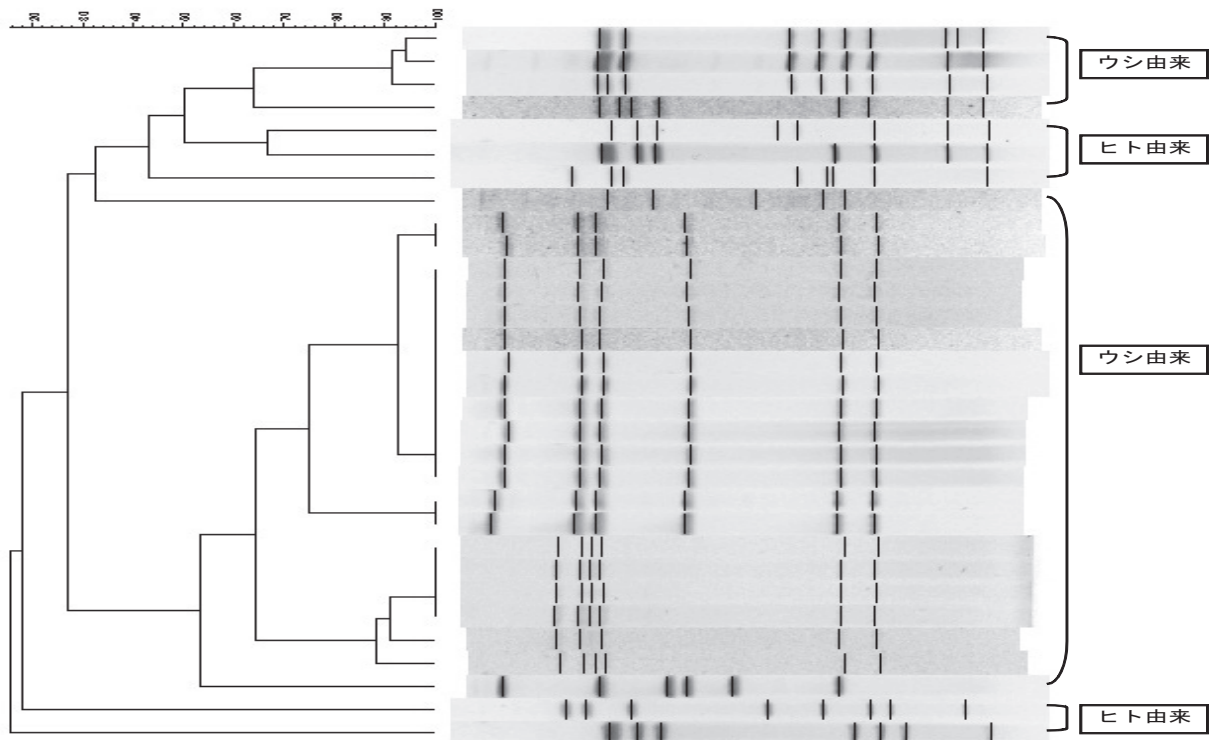


図3 平成17、18年度に分離検出された*C. jejuni* (D血清群) の系統樹 (*Sma* )

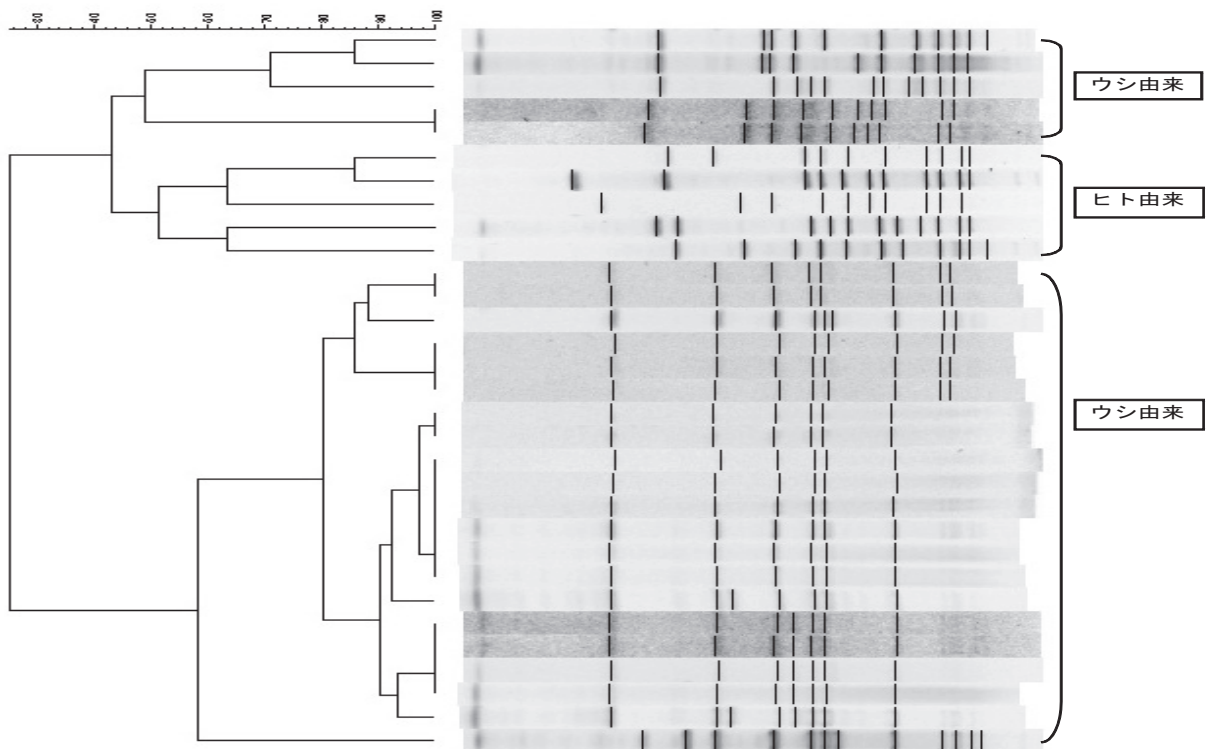


図4 平成17、18年度に分離検出された*C. jejuni* (D血清群) の系統樹 (*Kpn* )

表2 *C. jejuni*の血清型別内訳 (平成20、21年分離検出)

血清型		散発例 由来	食中毒事例 由来	計
血清群	抗原因子			
B	2	6	5	11
D	4, 13, 16, 43, 50	6		6
E	5	3		3
F	6, 7	2	2	4
G	8	3		3
O	19	2		2
Y	37	8	1	9
UT	-	18	8	26
計		48	16	64

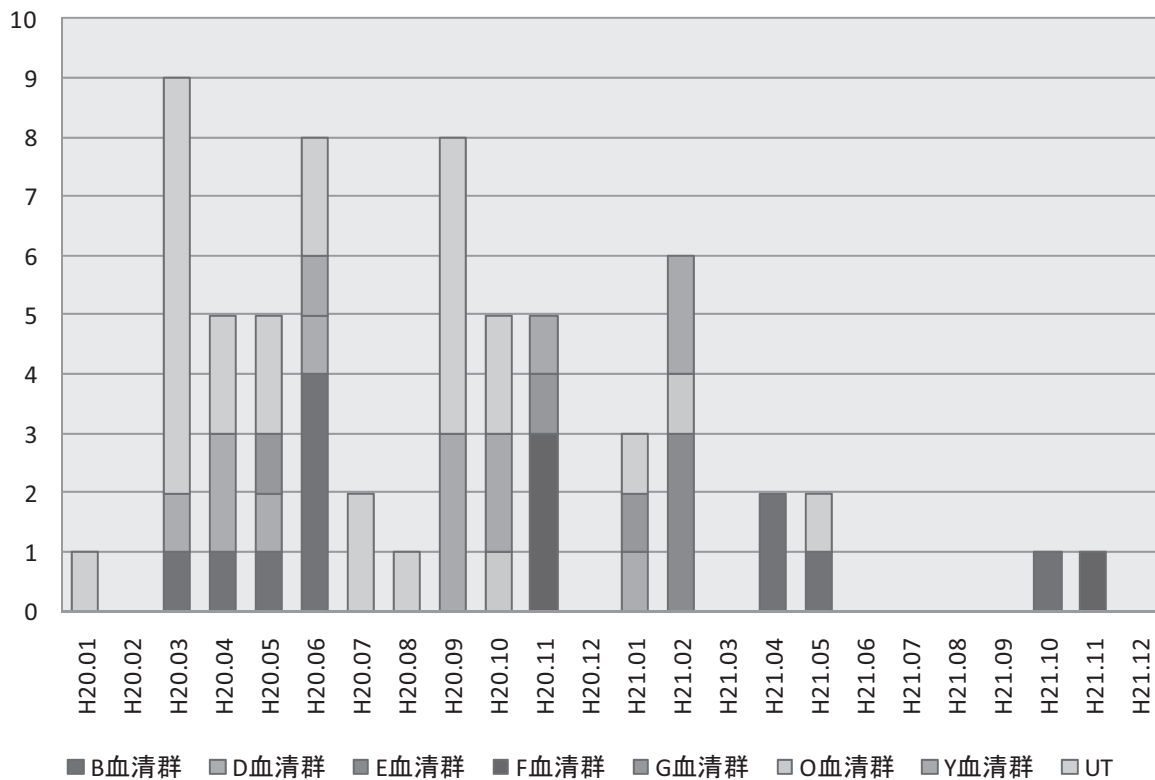


図5 食中毒由来を含む*C. jejuni*の月別分離検出件数および血清型別 (平成20、21年)

食中毒グループ	血清型	検出数	消化酵素	泳動像
G1	UT	5検体	<i>Sma</i> I	
			<i>Kpn</i> I	
G2	B	3検体	<i>Sma</i> I	
			<i>Kpn</i> I	
G3	UT	3検体	<i>Sma</i> I	
	Y	1検体	<i>Kpn</i> I	
G4	F	2検体	<i>Sma</i> I	
			<i>Kpn</i> I	
G5	B	2検体	<i>Sma</i> I	
			<i>Kpn</i> I	

図6 食中毒由来菌株の血清型と泳動像 (平成20、21年分離検出)

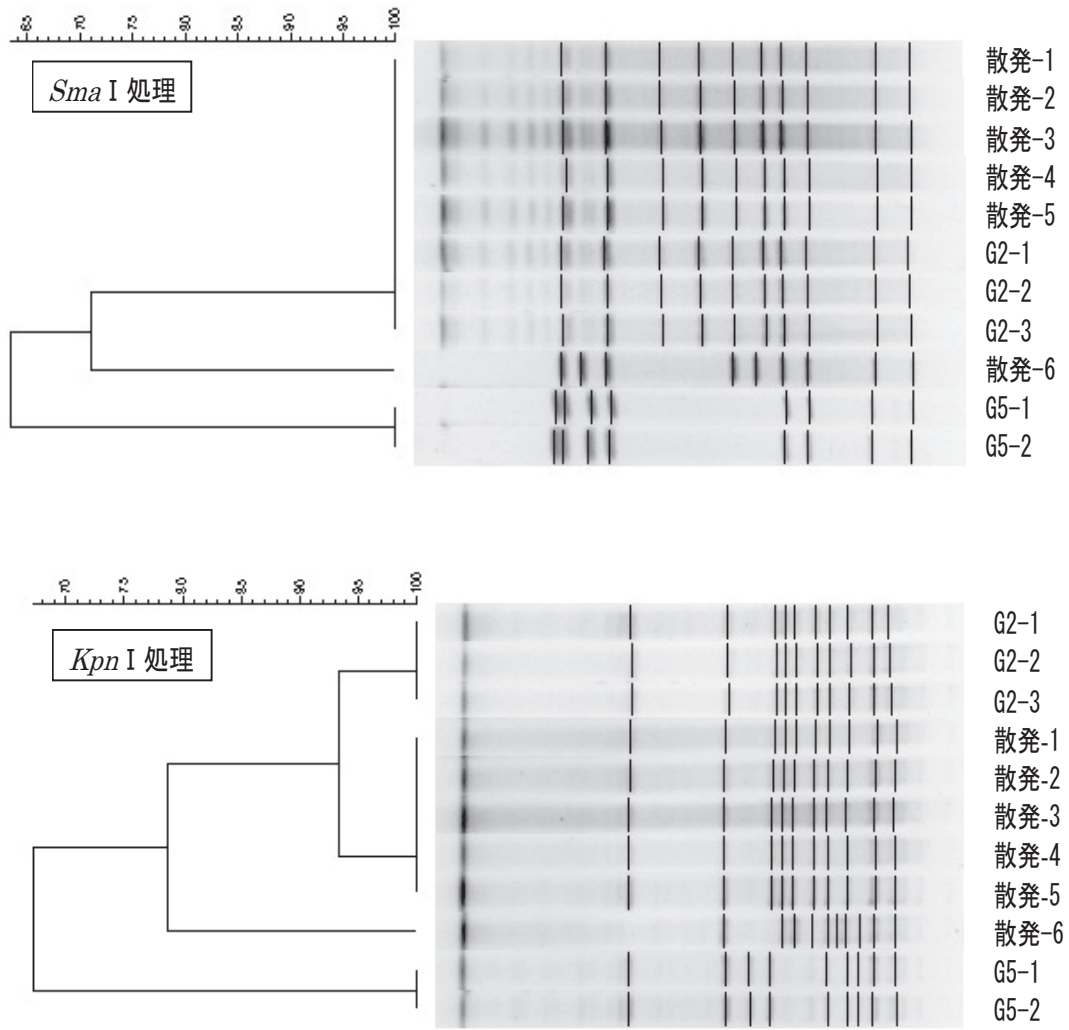


図7 *C. jejuni* (B血清群) の系統樹 (平成20、21年分離検出)

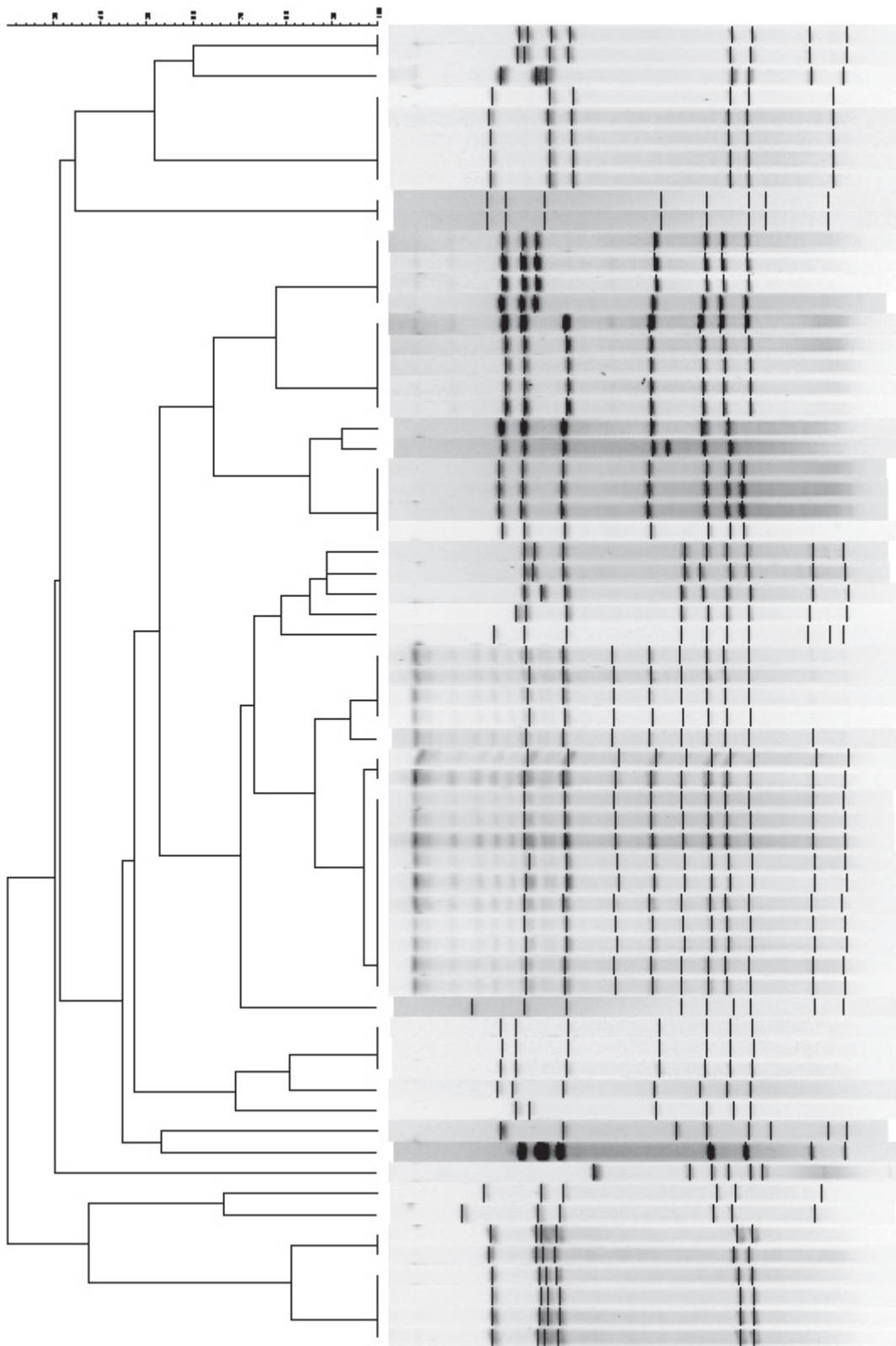


図8 平成20、21年に分離検出した菌株の系統樹 (Sma 処理)



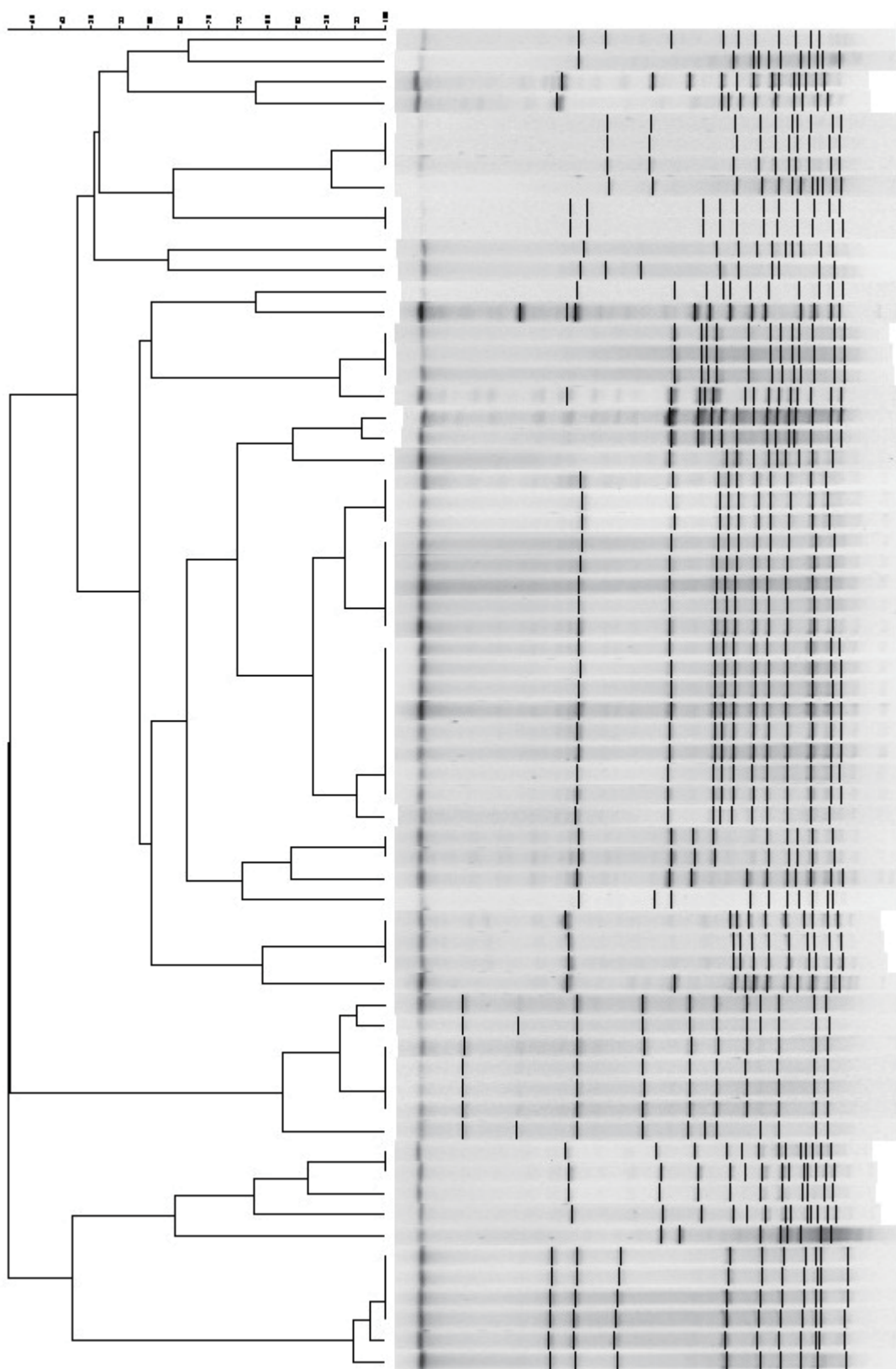


図9 平成20、21年に分離検出した菌株の系統樹 (*Kpn* 処理)

## IV 考 察

PFGEでは、未消化のサイズの大きいバンドや非特異バンドが見られた。これは、菌量の多少に関係することが考えられる。現在は、目視で菌液の濃度調整を行っているため、菌液調整の方法と菌液濃度のさらなる検討が必要である。

*Sma* での切断パターンではバンド数が少なく、解析能力に問題が見られた。しかし、同一血清群の検体群で比較すると、*Sma* と *Kpn* それぞれのデンドログラムは、相同性の数値はやや異なるものの形はほぼ一致しており、異なる消化酵素を併用することで十分な解析を得られると思われる。

カンピロバクター食中毒の主な推定原因食品又は感染源として、鶏肉、牛生レバーなどの食肉が強く示唆されている<sup>1)</sup>。今回の調査ではウシ由来とヒト由来の菌株間で有意な関係性は見られなかった。しかし、ウシ由来、ヒト由来ともに検体数が少ないため、食肉と食中毒との関連については、鶏肉由来菌株を含めるなど検体数を増やしてさらなる調査が必要である。

カンピロバクターは同一事例で多種類の血清型の株が分離されることがあり問題となる。今回の結果でも

食中毒事例5グループ中、1グループで血清型が一致せず、PFGE泳動像も完全に異なっていた。しかし、血清型がそれぞれ同じであった他の4グループ（うち2グループで血清型別不能株を含む）では *Sma*、*Kpn* いずれの制限酵素で処理した場合でもPFGE泳動像は一致した。これらのことから、食中毒事例ではPFGEによる分子疫学解析は疫学調査を補強するために有用であると考えられる。

## V 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/>
- 2) 松本のり子ら：牛胆汁中における病原微生物汚染状況について．高知衛研報，51，33-35，2005
- 3) 松本のり子ら：食由来病原微生物の環境モニタリング．高知衛研報，52，25-33，2006
- 4) 松本のり子ら：牛の胆汁及び肝臓中から分離されたカンピロバクター並びに志賀毒素産生性大腸菌の血清型について．高知衛研報，53，37-40，2007