

【原著】

弘前地区における下痢症患者由来 *Campylobacter* の分離状況

佐藤瑠海* 佐藤拓弥* 藤岡美幸*

(2017年9月28日受付, 2017年12月18日受理)

要旨: *Campylobacter* は世界中で流行している細菌性食中毒起因菌である。本研究では2016年4月から2017年3月の期間に、青森県弘前地区の医療検査機関で分離された腸炎由来 *Campylobacter* 230株について、検出状況と薬剤耐性を調査した。薬剤感受性試験ではオフロキサシン (OFLX), シプロフロキサシン (CPFX), エリスロマイシン (EM), ホスホマイシン (FOM), テトラサイクリン (TC)の5薬剤を用いた。種別の結果、230株中 *C. jejuni* が200株 (87.0%), *C. coli* が28株 (12.2%), *C. lari* が2株 (0.9%)検出された。1年を通じた月別の検出状況では、総数は6月から9月にかけて多く、菌種別では *C. jejuni* は7, 9月, *C. coli* は2月に最も多く検出された。薬剤耐性において、OFLX, CPFX, EM, TCにおいて *C. jejuni* より *C. coli* の耐性率が高いことが示された。FOMにおいては *C. jejuni* で耐性が200株中2株 (1.0%), *C. coli* では28株すべてが感受性であった。また1剤以上の耐性率は *C. jejuni* が200株中58株 (29.0%), *C. coli* が28株中15株 (53.6%)と *C. jejuni* と比較して *C. coli* の耐性率が高いことがわかった。

キーワード: 細菌性食中毒, *Campylobacter* 腸炎, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, 薬剤耐性

I. 背景

Campylobacter は先進国を中心に世界中で流行しているヒト腸炎を引き起こす食中毒起因菌の一つである¹⁾。厚生労働省が1982年に *C. jejuni* /*coli* を食中毒起因菌に指定して以降²⁾, 本菌が原因の食中毒事例は年間200件以上報告されており, 細菌性食中毒事件数第一位となっている³⁾。本菌は鶏肉を主として豚肉, 牛肉から検出され, 感染すると2日~7日間の潜伏期を経て発病し, 下痢, 腹痛, 発熱, 頭痛, 嘔吐などの症状を認める⁴⁾。さらに *C. jejuni* 感染症の後続症として, 感染数週間後に手足の麻痺や筋力低下などを引き起こす Guillain-Barré syndrome もある⁵⁾。*Campylobacter* 感染症の種別起因菌について国立感染症研究所の報告では *C. jejuni* が90%以上を占めており⁶⁾, 伊藤らは *C. jejuni* 96.5%, *C. coli* 3.5%⁷⁾, Kabirらは *C. jejuni* 96.6%, *C. coli* 3.4%⁸⁾としている。また農林水産省の報告によると *C. coli* は薬剤に対する耐性が *C. jejuni* より高く⁹⁾, 抗生物質による治療の難化が危惧される。そのため本研究では年間を通じての本菌の分離状況と薬剤耐性菌の出現状況を調査した。

II. 対象および方法

1. 対象菌株

対象は2016年4月から2017年3月までに弘前市医師会健診センターで分離された下痢症患者便由来 *Campylobacter* spp. 230株とした。

2. 菌の種別

1) 馬尿酸塩加水分解試験

藤岡ら¹⁰⁾の方法に準じ, 1%馬尿酸ナトリウム水溶液0.4 mLに被検菌を懸濁し, McFarland 2.0に調整後, 37±1°Cで2時間静置した。これにニンヒドリン試薬0.2 mLを加え, 37±1°Cで10分間静置した。判定は濃い青紫色を呈した場合を陽性 (*C. jejuni*), 無色から薄い紫色を呈した場合を陰性 (*C. coli* 等)とした。

2) multiplex PCR

対象菌株をTE緩衝液 (pH8.0, 和光純薬工業) 1.0 mLに懸濁し, 100°Cで5分間加熱後10,000 rpm 5分間遠心した上清をテンプレートとした。標的遺伝子は *Campylobacter* 16S rRNA, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* の同定遺伝子とし, 使用プライマーを表1に示す。PCR反応量は1検体当たり滅菌蒸留水18.375 μL, 10×Ex Taq™ Buffer (TaKaRa) 2.5 μL, dNTP mixture (TaKaRa) 1.0 μL, 10×5 U Ex Taq™ polymerase (TaKaRa) 0.125 μL, テンプレート2.5 μL, 25 μMプライマー各0.25 μL加え, 全量を25 μLとした。PCRの条件は前熱変性94°C1分間とし, 熱変性94°C1分間, アニーリング55°C1分間, 伸長反応72°C1分間を25サイクル行い, さらに最終伸長反応72°C10分間1サイクル行った (i-cycler, Bio RAD)。PCR産物はエチジウムブロマイド含2.5%アガロースゲルにて100V 35分間, 電気泳動 (Mupid-21, コスモバイオ社) を行い, UV照射にて遺伝子の増幅を確認した (図1)。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験にはエリスロマイシン15 μg (EM), シプロフロキサシン5 μg (CPFX), オフロキサシン5 μg (OFLX), ホスホマイシン1 μg (FOM), テトラサイクリン30 μg (TC)の5薬剤 (以上, センシ・ディスク BD) のディスクを用いた。

*弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan

表 1 使用プライマー塩基配列

Species	Size (bp)	Target gene	Primer	Sequence (5' to 3')
<i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	GGATGACACTTTTCGGAGC
			C1228R	CATTGTAGCACGTGTGTC
<i>C. coli</i>	502	<i>askt</i>	CC18F	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG
			CC519R	ATAAAAGACTATCGTCGCGTG
<i>C. lari</i>	251	<i>glA</i>	CLF	TAGAGAGATAGCAAAGAGA
			CLR	TACACATAATAATCCACCC
<i>C. jejuni</i>	161	cj0414S	C-1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT
			C-3	CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT

5%ウマ血加 HI 寒天培地（栄研）で純培養した菌株を滅菌生理食塩水で McFarland 0.5 に調整後、5%ウマ血加 MH 寒天培地（Oxoid）に接種し、各薬剤のディスクを配置した。その後、微好気環境下（アネロパック、三菱ガス化学）で、 42 ± 1 °C、 48 ± 2 時間培養し、阻止円径を測定した。

であった。また *C. coli* が FOM 以外の薬剤に対して *C. jejuni* よりも高い耐性率となった（図 2）。

Ⅲ. 結果

1. 菌種の同定

同定対象 *Campylobacter* 230 株を種別した結果、*C. jejuni* 200 株 (87.0%)、*C. coli* 28 株 (12.2%)、*C. lari* 2 株 (0.9%) であった。月別検出状況では、6 月から 9 月にかけて検出数が増加し、特に 7 月に最も多く検出された（表 2）。

2. 薬剤感受性

薬剤感受性試験の結果、*C. jejuni* では EM、FOM に対して耐性を示す株がそれぞれ 1、2 株と少なく、*C. coli* では FOM に耐性を示す株が確認されなかった。*C. lari* では分離された 2 株いずれも OFLX に耐性であった（表 3）。1 薬剤以上に耐性であったのは *C. jejuni* が 200 株中 58 株 (29.0%)、*C. coli* が 28 株中 15 株 (53.6%)、*C. lari* が 2 株中 2 株 (100%)



図 1 PCR による遺伝子検索結果の一例
M : Marker (100-bp ladder), 1 : *C. jejuni* (161 bp)
2 : *C. coli* (502 bp), 3 : *C. lari* (251 bp)

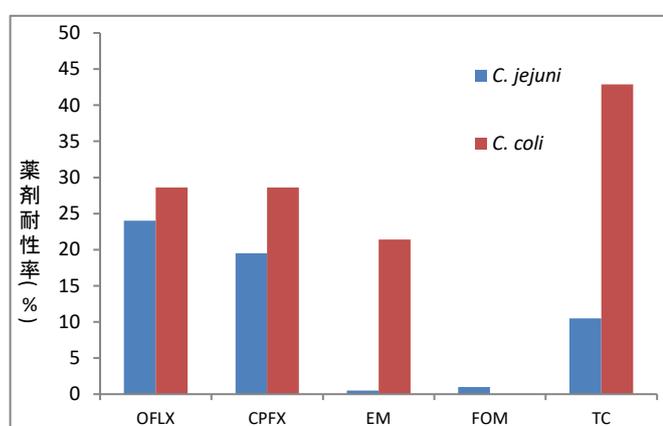
表 2 下痢症患者由来 *Campylobacter* の分離結果

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
<i>C. jejuni</i>	12	12	22	27	22	27	16	12	14	11	15	10	200
<i>C. coli</i>	1	0	2	4	3	0	2	3	1	4	5	3	28
<i>C. lari</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
合計	13	13	24	31	26	27	18	15	15	15	20	13	230

表3 5薬剤における薬剤感受性試験結果

	<i>C. jejuni</i> (n=200)		<i>C. coli</i> (n=28)		<i>C. lari</i> (n=2)	
	S・I	R	S・I	R	S・I	R
OFLX	152	48	20	8	0	2
CPFX	161	39	20	8	2	0
EM	199	1	22	6	2	0
FOM	198	2	28	0	2	0
TC	179	21	16	12	2	0

(S:感受性、I:中間、R:耐性)

図2 *C. jejuni* および *C. coli* における薬剤別耐性率

IV. 考察

近年、細菌性食中毒は全体として減少傾向にあるが *Campylobacter* 食中毒は発生数、患者数ともに増加傾向にあると報告されている⁴⁾。今回の調査では年間230検体、月当たり13~31検体検出され、特に6月から9月にかけて検体数が増加傾向にあることを確認した。*Campylobacter* の培養法は定められた方法が国内外で確立されていないが、一般的に湿潤環境での培養が良いとされている¹¹⁾。これは *Campylobacter* が乾燥に弱く^{4,11)}、そのため湿度が上昇する梅雨~夏期に多く検出されると考えられる。また、*Campylobacter* 腸炎では *C. coli* は数%程度であるとの報告⁶⁻⁸⁾が多いが、本調査では年間12.2%と高い割合であった。*C. coli* は *C. jejuni* よりも環境中の抵抗力が弱いとされているが⁴⁾、その *C. coli* が高率に分離された原因の一つとして、豚の腸管内から検出される *Campylobacter* はほとんどが *C. coli* であることから⁴⁾、豚肉類の喫食等が関係している可能性が考えられる。

マクロライド系薬剤である EM は *Campylobacter* 感染症で第一選択剤とされ¹²⁾、今回、*C. jejuni* では200株中1株(0.5%)、*C. coli* では28株中6株(21.4%)が耐性であった。

国内、国外問わず EM に対する耐性菌の報告もあり¹³⁻¹⁶⁾、本調査においても耐性菌が確認された。

FOM は主に細菌性胃腸炎において起因菌が不明な場合に選択剤として用いられる¹⁷⁾。竹田らの報告では *C. jejuni* 524株中106株(19.2%)が耐性を示しているが¹⁸⁾、本調査において、*C. jejuni* では200株中2株(1%)が耐性であり、*C. coli* では耐性株は認められなかった。この原因について、家畜やヒトの腸炎へ FOM を投与することにより耐性化した可能性が考えられ、今後詳細な検討が必要である。

CPFX, OFLX 等のニューキノロン系薬剤は、主にグラム陰性菌を原因とした感染症に対する治療薬として EM と共に第一選択剤として推奨されていた¹²⁾が、近年同薬剤に対する耐性菌が増加している^{19,20)}との報告もある。カンピロバクター・レファレンスセンターによると、ニューキノロン系薬剤に対する耐性率は、2014年に *C. jejuni* が57.1%、*C. coli* が82.4%となっており増加傾向を示している²¹⁾。今回 CPFX, OFLX いずれかに耐性を持つ株が *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* で複数見られ、*Campylobacter* 感染症に対するニューキノロン系の治療効果の低下が確認された。

TC はテトラサイクリン系薬剤の1種であり *C. jejuni* では200株中21株(10.5%)、*C. coli* では28株中12株(42.9%)が耐性であった。現在テトラサイクリン系薬剤は疾病の治療を目的とした動物用抗菌剤や食用動物における「発育促進」、「飼料効率の改善」を目的に鶏用飼料への添加が認められ²²⁾、家畜由来 *Campylobacter* の薬剤感受性試験において *C. jejuni/coli* が TC に対する耐性率が高いとの報告がある^{23,24)}。このことから、家畜用飼料などによって家畜体内で耐性を獲得していた菌種に感染し、耐性菌として検出されている可能性が考えられる。

C. jejuni/coli の薬剤耐性について、農林水産省の報告⁹⁾では ABPC, SM, EM, TC, NA, CPFX において *C. coli* と *C. jejuni* と比べると耐性率が高く、本研究でも EM, TC, CPFX において同様の傾向がみられた。しかしながら *C. coli* は散発性下痢症患者からの分離報告が少ないことや Guillain-Barré syndrome など後続症の発症事例もない⁴⁾ことから研究が活発に行われておらず、原因は明らかとなっていない現状である。また本研究では、弘前地区において *C. coli* の分離割合が有意に高く、今後弘前地区における喫食食品等をはじめとした保有調査等が急務である。

Campylobacter 食中毒は現在も増加傾向にあることから、出現状況や同菌の薬剤耐性についてモニタリングの継続が必要である。加えて、感染を未然に防ぐために食品を取り扱う施設における徹底した衛生管理や各家庭での調理時の衛生的な取り扱いについて、一層の注意が重要になると考える。

利益相反 本論文に関して、申告すべき利益相反はありません。

謝辞 本研究を行うにあたり、貴重な菌株の提供をしてくださいました弘前市医師会健診センターの皆様へ深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Skirrow MB: *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *Br. Med. J.*, 2 (6078):9-11, 1977.
- 2) 厚生省環境衛生食品衛生課長通知：ナグビブリオ、カンピロバクター等の食品衛生上の取り扱いについて。環食第 59 号, 1982.
- 3) 厚生労働省：「食中毒一覧速報」
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushoku/syokuchu/04.html(2017-09-06)
- 4) 坂崎利一、浅尾努：食水系感染症と細菌性食中毒。pp336-362, 東京中央法規出版, 東京, 1991.
- 5) 高橋恵美, 佐々木美江, 他：食中毒検査から分離されたカンピロバクター菌株の解析結果。宮城県保健環境センター年報, 27:44-47, 2005.
- 6) 国立感染症研究所：カンピロバクター腸炎(2006~2009)。病原微生物検出情報, 31:1-3, 2010.
- 7) 伊藤武：カンピロバクター腸炎の発生状況。医学のあゆみ, 135(12-13):1072-1073, 1985.
- 8) Kabir SM, Kikuchi K, et al: Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64:19-27, 2011.
- 9) 農林水産省：平成 25 年度と畜場及び食鳥処理場における家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング結果
http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/index.html(2017-09-06)
- 10) 藤岡美幸, 大友良光, 他: *Campylobacter jejuni* と *C. coli* を同定する馬尿酸塩加水分解試験に用いる至適菌濃度。医学検査, 63:168-172, 2013.
- 11) 厚生労働省：食品衛生検査指針微生物編 2004。pp225-235, 日本食品衛生協会, 東京, 2004.
- 12) Skirrow MB, Blaser MJ: Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In *Campylobacter*, 2nd Edition, Nachamkin, I. and Blaser, MJ(ed). ASM Press, Washington, D.C.:69-88, 2000.
- 13) Vanhoof R, Vanderlinden MP, et al: Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty-nine antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 14:553-556, 1978.
- 14) Anders BJ, Lauer BA, et al: Double-blind placebo controlled trial of erythromycin for treatment of *Campylobacter* enteritis. *Lancet*, 1:131-132, 1982.
- 15) 川森文彦, 久島昇平, 他：ヒト, 家畜および食肉から分離されたカンピロバクターの薬剤感受性。日本食品微生物学会雑誌, 21(2):131-137, 2004.
- 16) Harada K, Asai T, et al: Characterization of macrolide-resistant *Campylobacter coli* isolates from food-producing animals on farms across Japan during 2004. *J. vet. Med. Sci.* 68(10):1109-1111, 2006.
- 17) 岩田敏：特集 1 感染性下痢症。診断と治療。医薬ジャーナル, 35:87-91, 1999.
- 18) 竹田義弘, 桑山勝, 他: 広島県内で分離された腸炎由来カンピロバクターの薬剤耐性。広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, 16:5-9, 2008.
- 19) 衛生微生物技術協議会カンピロバクター・レファレンスグループ: わが国における腸炎由来 *Campylobacter jejuni* の血清型別検出動向およびキノロン剤に対する耐性菌の出現状況。カンピロバクター・レファレンスセンター, 31:15-17, 2010.
- 20) 小花光夫, 松岡康夫, 他: *Campylobacter* 腸炎患者の治療における問題点 - 特にニューキノロン系薬, 使用後の耐性発現例に関する検討。感染症誌, 1, 66:923-929, 1992.
- 21) 衛生微生物技術協議会第 36 回研究会: カンピロバクター・レファレンスセンター報告, 2015.
- 22) 農林水産省：飼料の適正使用について, 畜産農家の皆様へ。
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/siryoo/>(2017-09-06)
- 23) 農林水産省, 動物医薬品検査所検査, 第二部抗生物質製剤検査室: 薬剤耐性菌についての Q&A. 2:1-3, 2010.
- 24) 高橋敏雄, 浅井鉄夫, 他: 家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応。感染症学雑誌, 80, 3:192-193, 2006.

【Original article】

**The study of *Campylobacter* isolated from diarrheal patients
in Hirosaki area**

RYUNA SATO* TAKUYA SATO* MIYUKI FUJIOKA*

(Received September 28, 2017 ; Accepted December 18, 2017)

Abstract: *Campylobacter* species cause foodborne diarrheal disease worldwide. During the period between April 2016 and March 2017, we collected *Campylobacter* spp. isolated from patients with enteritis at a medical laboratory in the Hirosaki area of Aomori Prefecture. In this study, the isolates were identified as *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* using the hippurate hydrolysis test and multiplex polymerase chain reaction. In addition, antimicrobial susceptibility tests using the Kirby Bauer method were performed with ofloxacin (OFLX), ciprofloxacin (CPFX), erythromycin (EM), fosfomycin (FOM) and tetracycline (TC). We obtained 230 isolates of *Campylobacter* spp. (200 *C. jejuni*, 28 *C. coli*, and 2 *C. lari*). The prevalence of *Campylobacter* spp. peaked during the summer (June-September). *C. jejuni* was most prevalent in July and September and *C. coli* was most prevalent in February. In the antimicrobial susceptibility tests, higher resistance to OFLX, CPFX, EM and TC was observed for *C. coli* than *C. jejuni*. Among *C. jejuni* isolates, 1.0% (2/200) were resistant to FOM, but none of the *C. coli* isolates was resistant to the antibiotic. A total of 29.0% (58/200) of *C. jejuni* isolates and 53.6% (15/28) of *C. coli* isolates were resistant to at least one of the antibiotics.

Keywords: Food borne pathogen, *Campylobacter* infections, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Antimicrobial resistance