

小児下痢症患者と動物からのカンピロバクター属菌の 分離状況とその疫学的解析

青木紀子 吉田紀美 田中 博 大瀬戸光明 井上博雄 中野省三*¹

A molecular epidemiology of the isolated *Campylobacter* spp. from pediatric patients with diarrhea and animals.

Noriko AOKI, Kimi YOSHIDA, Hiroshi TANAKA,
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE, Shozo NAKANO *¹

We have analyzed epidemiologically for isolated *Campylobacter* spp. from fecal samples of pediatric patients with diarrhea and rectum swabs of dogs, cats, and pigs. The isolates were identified by multiplex PCR and subtyped by using both Penner serotyping and method analyzed by pulsed-field gel electrophoreses (PFGE). The *Campylobacter* spp. were isolated from 26 (6.0%) out of 435 pediatric patients specimens, 11 (12.1%) out of 91 dog specimens, 2 out of 81 (2.5%) cat specimens and 29 (48.0%) out of 50 pig specimens. Twenty five of 26 isolates from pediatric patients were *C. jejuni*, in which 9 isolates were serotyped as group Y. Twenty four of 29 isolated from pigs were *C. coli*. By using multiplex PCR, the identification with high certainty became possible. Ten of *C. jejuni* Y group isolated from both pediatric patients and dogs were genotyped by PFGE using restriction enzymes *Sma* I, *Ksp* I and *Kpn* I. As a result, they were classified into four patterns, but the difference between the restriction enzymes was not seen.

Keywords : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Penner serotyping, pulsed-field gel electrophoreses (PFGE), *Sma* I, *Ksp* I and *Kpn* I

はじめに

カンピロバクター属菌は人に感染し胃腸炎を引き起こす原因菌であり、当所でも愛媛県感染症発生動向調査において小児下痢症患者から分離されている^{1),2)}。また、近年わが国におけるカンピロバクター属菌による食中毒は増加傾向にあり³⁾、愛媛県内でも平成13年度以降ほぼ毎年発生している⁴⁾。一方、イヌやネコ等動物における保菌調査の結果⁵⁾から愛玩動物が人への感染源となる可能性が懸念されている。

散発性、集団発生にかかわらず、原因病原菌の究明における菌株間の比較には分子疫学的な解析は重要な役割を果たしている。今回当所で分離されたカンピロバクター属菌を用いてPCR法による菌種の同定と血清型別

を行い、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)による解析について検討したので報告する。

対象と方法

1 検査材料

2006年1月から2007年7月までに愛媛県感染症発生動向調査事業のため松山市内の1小児科医院から当所へ搬入された小児下痢症患者の糞便435検体と、2006年11月から2007年7月までに愛媛県動物由来感染症予防体制整備事業のために採取されたイヌ71頭、ネコ67頭およびブタ50頭の直腸スワブを用いた。

2 分離同定

小児下痢症患者からの糞便はCCDA培地に直接塗抹し、37℃で48時間微好気培養した。イヌ等動物の直腸スワブはPreston培地で増菌後、CCDA培地にて37℃48時間微好気培養した。培養後、培地上に発育したコロ

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1石丸小児科

ニーのうち、カンピロバクター属菌が疑われるコロニーを釣菌し、常法⁶⁾に従って同定した。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、陰性および弱陽性の菌株は Wang らの方法⁷⁾により、*C. jejuni hipO*, *C. coli glyA*, *C. lari glyA*, *C. upsaliensis glyA*, *C. fetus sapB2*, *C. jejuni 23srRNA* の6種類の遺伝子に対するマルチプレックス PCR 法を行なった。*C. jejuni 23srRNA* (650bp) のみバンドが確認された菌株を *Campylobacter* spp. とした。

3 疫学的解析法

(1) 血清型別

C. jejuni と同定された株については、市販キットのカンピロバクター免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて Penner 血清型別を行なった。いずれの抗血清にも凝集しない場合を untypable (UT) とした。

(2) PFGE 解析

ヒトと犬から分離された *C. jejuni* Y 群11株のうち10株(小児下痢症患者由来8株, イヌ由来2株)を用い、八尋ら⁸⁾の方法に準じて PFGE を実施した(図1)。菌液の調整は、Preston 培地(37°C 48時間)で増菌後 CCDa 培地(37°C 48時間)に発育したコロニーをかきとり、MacFarland5程度になるように DDW に混濁した。3種類の制限酵素 *Sma* I, *Ksp* I, *Kpn* I を用いて DNA を切断し、PFGE パターンの比較を行った。標準マーカーは *Salmonella* Braenderup H9812株 を用いた。電気泳動は CHEF Mapper (Bio Rad) システムで0.5

× TBE buffer, 1%アガロースゲルを用い、泳動条件は6.0V/cm, 6.8~38.4sec 14°C 19hr に設定した。

結 果

1 分離状況と血清型別結果

小児下痢症患者および動物からの分離状況と血清型別結果を表1に示した。小児下痢症患者435検体中26検体(6.0%)が陽性で、*C. jejuni* が25株、*C. coli* が1株分離された。*C. jejuni* 25株の血清型別ではその1/3にあたる9株が Y 群で、I 群3株、D 群2株、R 群・J 群・C 群がそれぞれ1株であった。月別の分離株数を図2に示した。2006年には1月に6株分離されそのうち2株が Y 群であった。その後は特にピークは見られなかった。2007年は1月に2株、3・4・5月に3株ずつ分離されそのうち Y 群が6株を占めた。

また、動物の結果は、イヌでは91検体中11検体が陽性で、そのうち *C. jejuni* 9株が分離された(表1)。血清型別の結果、Y 群2株、Z7群1株、B 群2株で4株は型別不能であった。1検体からは *C. jejuni* と *Campylobacter* spp. の2種が分離された。ネコは81検体中2検体が陽性で *C. jejuni* 1株(N 群)と *Campylobacter* spp. の2種が分離された。一方ブタでは50検体中29検体が陽性であったが、*C. jejuni* は全く分離されず、*C. coli* が24株と *Campylobacter* spp. が5株分離された。

2 PFGE 解析結果

ヒトとイヌから分離された *C. jejuni* Y 群9株の PFGE

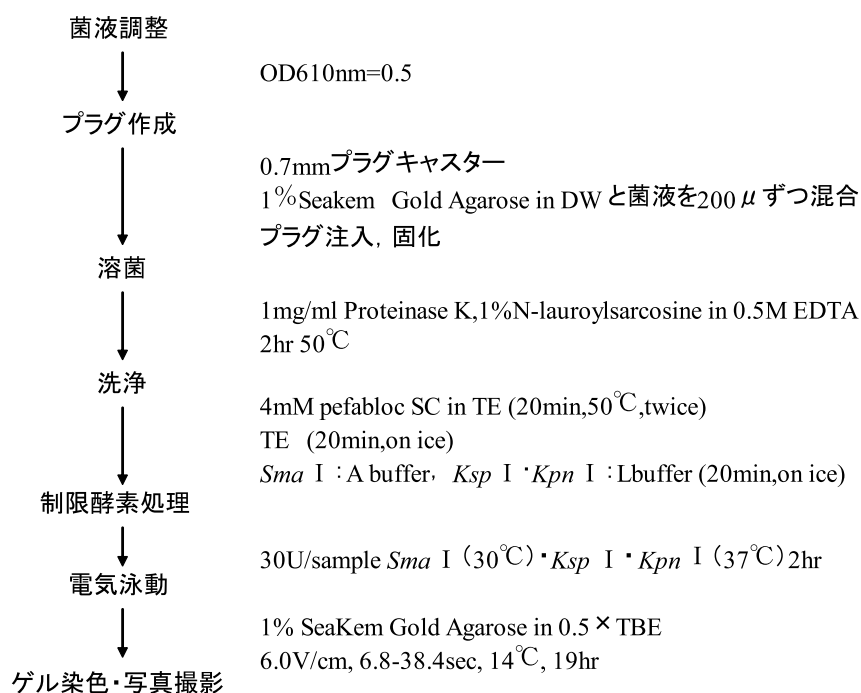


図1 PFGE 法のプロトコール

表1 カンピロバクター属菌の分離状況と血清型別結果

種別 (検体数)	陽性 検体数	<i>Campylobacter jejuni</i>											C.coli	C. spp.		
		Y	I	D	R	J	C	Z7	B	N	UT	NT			計	
小児下痢症患者 (435)	26 (6.0%)	9	3	2	1	1	1					6	2	25	1	
イヌ (91)	11* (12.1%)	2						1	2			4		9		3
ネコ (81)	2 (5.9%)										1			1		1
ブタ (50)	29 (58.0%)														24	5

*1検体から2種類分離

UT:型別不能 NT:型別未実施

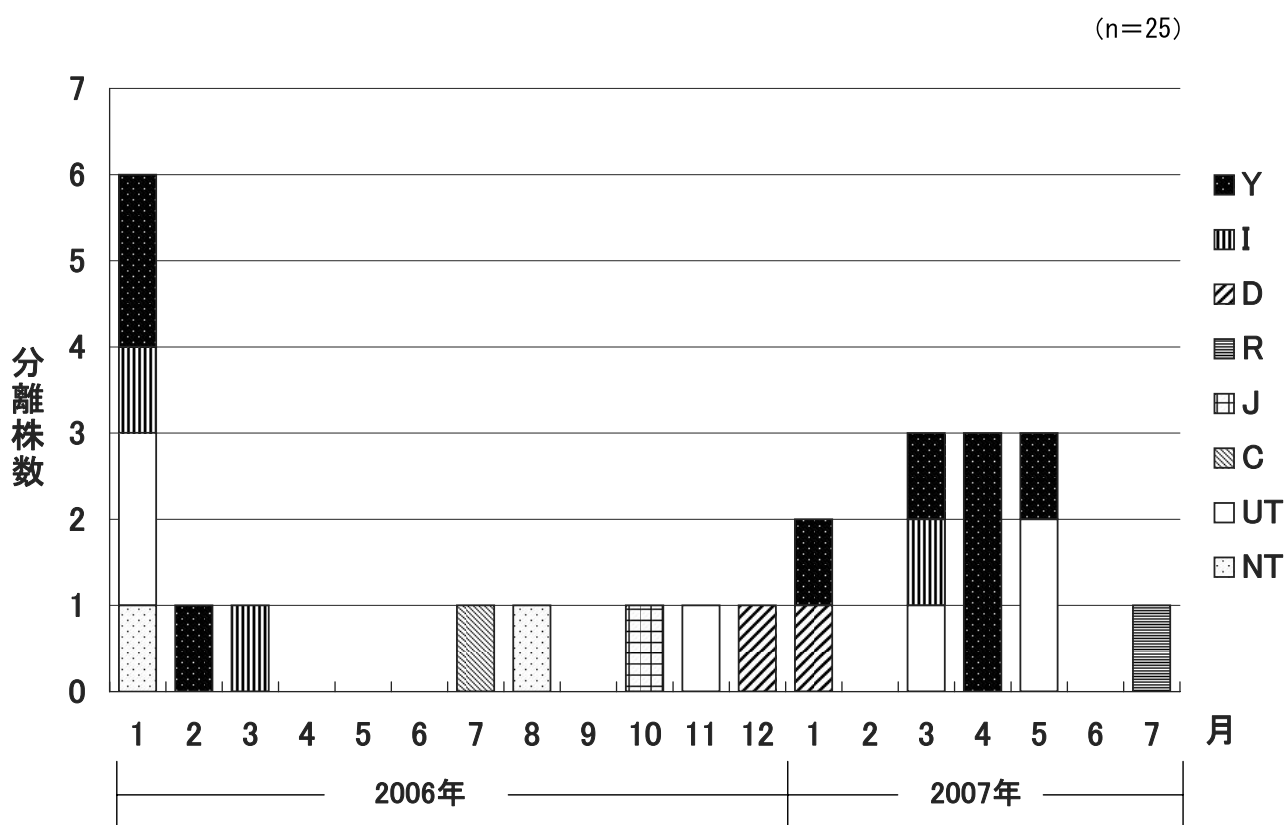


図2 小児下痢症患者由来 *C. jejuni* 分離状況

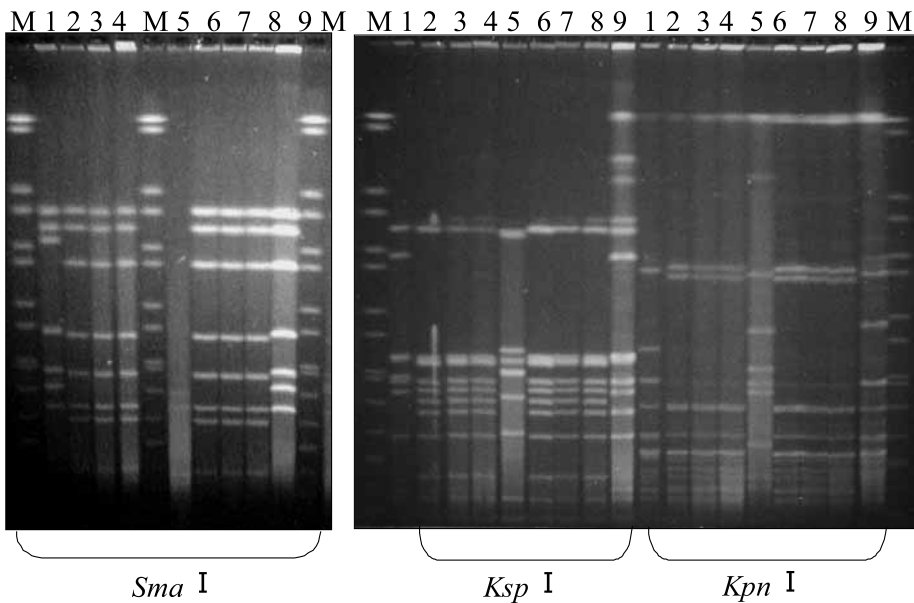


図3 *C. jejuni* Y群のPFGEパターン

表2 *C. jejuni* Y群のPFGE供試菌株情報

No.	由来	受付年月日	年齢	性別	発熱	症状	パターン		
							<i>Sma</i> I	<i>Ksp</i> I	<i>Kpn</i> I
1	小児散発	2006/1/6	5	M	39	下痢・腹痛・嘔吐・血便	A	A	A
2	小児散発	2006/1/6	10	M	36.6	下痢・腹痛	B	B	B
3	小児散発	2007/2/6	4	F		下痢・腹痛	B	B	B
4	犬62	2007/1/9					B	B	B
5	小児散発	2007/1/24	13	M		下痢・嘔吐	C	C	C
6	小児散発	2007/3/28	9	F	37.9	下痢・嘔吐	B	B	B
7	小児散発	2007/4/3	10	F		下痢	B	B	B
8	小児散発	2007/4/3	5	M	37.4	下痢・腹痛・血便	B	B	B
9	小児散発	2007/4/16	0	F	37.5	下痢・嘔吐	D	D	D
	犬60	2007/1/9					B	B	B

泳動像を図3に示す。*Sma* I切断によるPFGEパターンはA～Dの4型に分類された(表2)。さらに*Ksp* I・*Kpn* I切断を行ったところ*Sma* I切断パターンが同じ株は*Ksp* I・*Kpn* I切断パターンも同一であった。

考 察

小児下痢症患者からのカンピロバクター属菌の検出率は6.0%であり、愛媛県での過去10年間の報告とほぼ同様の傾向を示した^{1), 2)}。Pennerの血清型別では26株中

Y群が最も多く9株で36%を占めた。2005年に分離された*C. jejuni*は28株であったが、そのうちO群が7株(25%)と最も多く分離された²⁾。Y群は3株(10.7%)であり、年によって主流株が違うことが示唆された。検出される時期も例年春先から夏場にかけて増加していたが、2006年は1月に6株分離された後は特に集積性がみられなかった。2007年は3・4・5月に3株ずつ分離され、その半数以上がY群であった。この期間中の小児カンピロバクター感染症の原因として、Y群が優位であったこ

とが示唆された。

イヌのカンピロバクター属菌陽性率は12.1%で、そのうち *C. jejuni* は9.9%であった。ネコのカンピロバクター属菌陽性率は2.5%であった。*C. jejuni* に関しては、既報^{5,9,10}による検出率(1.3～2.9%)よりも高率であった。三澤ら⁵⁾によるイヌの保菌調査では *C. upsaliensis* が高率に検出されているが、今回我々は *C. jejuni*, *C. coli* の分離を目的に CCDA 培地を使用したためセフォペラゾンに感受性とされる *C. upsaliensis* を検出することはできなかった。

カンピロバクター属菌の同定検査の一つに馬尿酸加水分解試験があるが、陰性および弱陽性の菌株は同定できない場合がある。今回マルチプレックス PCR を用いることにより迅速かつ正確に同定することが可能となった。

次に、患者間の関連性と、患者由来株とイヌ由来株の関連性を見るため PFGE を実施した。カンピロバクターの PFGE には通常 *Sma*I が多く用いられている¹¹⁾。今回も *Sma*I を用いることによって、明瞭なバンドパターンを得ることができた。しかしそのバンド数は7-8本と少なく10株のうち7株が同じパターンを示したことから、*Sma*I のみでは菌株間の比較に不十分であると考えられた。そこで *Sma*I との併用が報告されている *Ksp*I・*Kpn*I を用いて PFGE を行なった^{12,13)}。その結果、*Sma*I で同じパターンを示した7株は *Ksp*I・*Kpn*I でも同じパターンを示し、3種類の制限酵素によるグルーピングに差異は認められなかった。桜庭ら¹⁴⁾は散発の下痢症患者由来株では同じ血清型であっても PFGE パターンが一致することはまれであったと報告している。また、*Sma*I で同一パターンを示した場合でも *Ksp*I・*Kpn*I では異なるパターンを示す事例^{12,13)}も報告されている。今回小児下痢症患者由来の5株は PFGE パターンが同一であったことから、これらの株は同一である可能性がきわめて高く、共通の感染源経路が存在するものと推察された。

さらに同時期にイヌから分離された株も同一 PFGE パターンを示し、また今回画像には示していないがイヌから分離された Y 群の残りの1株も同一 PFGE を示していたことから、イヌがヒト由来株と同一の菌を保菌していたことが推察された。

今回ブタ50検体中24検体(48%)から *C. coli* が高率に分離された。*C. coli* は食中毒菌に指定され、*C. jejuni* に比べると例数は少ないが食中毒事例も発生している³⁾。今回、小児下痢症患者からも1株分離されており、今後 *C. coli* についても PFGE 等を用いて、動物由来株

と患者由来株との関連性について検討が必要であると思われる。

まとめ

- 1 小児下痢症患者(435人)、イヌ(71頭)、ネコ(67頭)およびブタ(50頭)の糞便あるいは直腸スワブからカンピロバクター属菌68株(小児下痢症患者26株、イヌ11株、ネコ2株、ブタ29株)が分離された。
- 2 マルチプレックス PCR 法を用いることにより確実に種の同定が可能であった。
- 3 小児下痢症患者から分離された26株は25株が *C. jejuni* であり、血清型別では Y 群が9株であった。
- 4 3種類の制限酵素を用いた PFGE 法を行い *C. jejuni* Y 群10株は4つのパターンに分類されたが制限酵素間の相違は見られなかった。

文 献

- 1) 青木紀子ほか：愛媛衛環研年報，4：1-5（2001）
- 2) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書2004・2005・2006
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，27：167-169
- 4) 愛媛県食品衛生の概況：平成13年～平成18年
- 5) 三澤尚明ほか：日獣会誌，54：707-711（2001）
- 6) 善養寺浩ほか：腸管系病原菌の検査法，第4版。医学書院，東京，（1985）
- 7) Wang G et al.：J Clin Microbiol., 40：4744-4747（2002）
- 8) 八尋俊輔ほか：厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「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」18年度総括・分担研究報告書，219-230（2007）
- 9) 川森文彦ほか：日獣会誌，57：455-459（2004）
- 10) http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/eisei/d_oshira/h18/zoono13-16.html
- 11) Ribot E et al.：J Clin Microbiol., 39：1889-1894（2001）
- 12) Gilpin B et al.：J Clin Microbiol., 44：406-412（2006）
- 13) 依田清江ほか：感染症学雑誌，80：694-700（2006）
- 14) 桜庭恵ほか：青森県環境保健センター研究報告，17：33-37（2006）