

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの
強化に関する研究」

分担研究報告書

カンピロバクター・レファレンス

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本章治	国立感染症研究所
研究協力者	今野貴之	秋田県健康環境センター
研究協力者	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山田和弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	坂田淳子	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	尾羽根紀子	山口県環境保健センター
研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所

研究要旨：カンピロバクターによる感染症の発生動向の探知に資するため、6 レファレンスセンターの協力を得て、1) 散発事例由来株を主な対象として、薬剤耐性プロファイル及び Penner 血清型別を調査した。2) また、Penner-PCR 法による型別試験を行い、Penner 血清型別との整合性を検討した。1) については、*C. jejuni* 計 122 株について薬剤感受性試験を実施し、シプロフロキサシンが 57% (N=69)、テトラサイクリンが 30% (N=37)、エリスロマイシンが 4% (N=5) の耐性頻度であることを確認した。Penner 血清型別試験では、型別判定された 142 株の内訳を調査し、D 群が 30 株 (21%)、O 群が 22 株 (15%) と多い状況にあった。2) については、前年度認められた Penner 血清型別法による低い型別率の向上に資するため、Penner 血清型が判明した 142 株を対象に Penner-PCR 法により同等性を評価したところ、136 株 (95.8%) で一致性が確認された。今後 Penner-PCR 法における陽性対照を確保し同法の普及を進めた上で、国際動向を踏まえた型別法の平準化を検討することも必要と思われる。

A. 研究目的

主として食品が媒介する細菌性感染症のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによるものは最も高頻度に発生している。本分担研究では、6 レファレンスセンターの協力の下、主として感染症病原体監視並びに健康危機対応の観点から、カンピロバクター感染症の発生動向、並びに原因物質の危害性とその検査法に関する問題点と改善措置について検討を行うこと目的として、検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 活動体制

本分担研究では、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所を含む、全国 6 地方衛生研究所により構成されるカンピロバクター・レファレンスセンターの活動成績をまとめ、報告することとした。

2. 薬剤感受性試験及び Penner 血清型別

1) 薬剤感受性試験

カンピロバクター・ジェジュニ散発事例由来株を対象として、平成30年度には、EU-CAST法に準拠したディスク拡散法を用いて統一的な試験方法とした。その概要は以下のとおりである。

試薬及び器具・器材等

- ①薬剤感受性用寒天平板：5%馬脱繊維血及び20 mg/mL β-NAD 加 MH-F 寒天培地
- ②菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ③薬剤ディスク：BD センシディスク エリスロマイシン (EM)， テトラサイクリン (TC)， シプロフロキサシン (CPFx)
- ④白金線， 白金耳
- ⑤滅菌済綿棒
- ⑥滅菌済ピンセット
- ⑦ふ卵器：通常のふ卵器の場合は、市販の微生物用ガスパック等を利用する。微生物環境を維持できるふ卵器も使用可能とする。

操作上の注意について

- ①菌株：前日に供試菌株を非選択分離培地に分離培養し、1種類の菌であることを確認した上で使用する。
- ②試薬は室温に戻してから使用すること。
- ③MH-F 平板は、接種菌の滑走を抑制するため、十分に乾燥させてから使用すること。20-25℃で一夜自然乾燥、または 35℃で蓋を開けた状態で 15 分乾燥を目安とする。

試薬等の調整方法

- ① β-NAD：滅菌蒸留水を用いて終濃度 20mg/mL に調整し、0.2µm 径フィルターを用いて濾過滅菌したものをストック溶液とする。長期保存は、-20℃で凍結するが、再凍結を繰り返さないこと。
- ②MH-F 平板：MH 寒天培地を指示書に従い、計量後、蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌する。約 42~45℃に冷却後、培地 1L に対し 50mL の馬脱繊維血と 1mL の β-NAD ストック溶液（上述）を加え、速やかに混和させる。シャ

ーレに厚さ 4±0.5 mmとなるよう（90 mm径の場合には約 25mL）、混合培地溶液を平らな場所で無菌的に注ぎ入れ、静置して固化させる。保存する場合には、冷蔵保存して差し支えない。なお、保存期間は各所が定める規則に準じること。

測定（操作）方法

①接種菌液の調整：MH 寒天平板に分離した菌株（37±1℃・24~48 時間または 42℃・24 時間培養）を滅菌生理食塩水または MH ブロスに懸濁し、McFarland 0.5 に調整する。

① 接種・培養

調整菌液に滅菌綿棒を浸し、余液を試験管壁で取り除く。ただし、本菌は乾燥に弱いため、固く絞り過ぎないこと。

③MH-F 平板に塗抹する。平板を約 60° ずつ回転させた位置から、3 回塗抹する。綿棒に菌液をつけるのは最初に行った 1 回でよい。

④滅菌ピンセットを用いてディスクを置く。寒天培地に密着させるため、ピンセットでディスクを適度に押さえる。42℃（24 時間）で微生物培養する。

注意：①から③の操作は、出来るだけ迅速に行う。特に、菌を塗抹した寒天平板培地を長時間大気中に置かないようにする。

判定

培養後、シャーレの蓋を取り、約 30 cm離れた位置から目視観察し、ディスク周囲に形成された阻止円直径を測定・記録する。耐性・感受性の判定基準は以下のとおりである。

薬剤	EUCAST	
	耐性 (R) (< mm)	感受性 (S) (≥ mm)
EM	C. jejuni 20, C. coli 24	
CPFx	26	
TC	30	

2) Penner 血清型別

上記の分離株を対象として、カンピロバクターLA「生研」及びカンピロバクター免疫血清を指示書に従って用い、Penner 血清型別を行った。

3. Penner-PCR 法

Poly らの報告 (PLoS One. 2015; 10(12): e0144349.) に従い、多糖莢膜 (CPS) 遺伝子領域を標的とするマルチプレックス PCR 法により、血清型別が決定された計 142 株を対象として PCR 型別法の成績を創出し、血清型別成績との一致性を評価することとした。なお、同法の陽性対照 DNA については全てを調整可能な状況にはないため、限定的な配布とした。

C. 結果

1. *C. jejuni* 株の薬剤感受性に関する動向

平成 30 年度に検出された *C. jejuni* 計 122 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、シプロフロキサシン耐性は 69 株 (56.6%)、テトラサイクリン耐性は 37 株 (30.3%) と高い頻度で認められた (表 1)。エリスロマイシン耐性は 5 株 (4.1%) であった (表 1)。

なお、*C. coli* 株については 10 株のみが確保され、エリスロマイシン耐性が 4 株 (40%)、テトラサイクリン耐性またはシプロフロキサシン耐性がそれぞれ 5 株 (50%) 認められた。3 剤に対して感受性を示す株は 3 株認められた (表 1)。

2. Penner 血清型別

平成 30 年度に収集され、Penner 血清型が同定された *C. jejuni* 計 142 株の内訳を図 1 に示した。群別の構成としては、D 群が 30 株 (21.1%) と最も多く、O 群が 22 株 (15.5%) とこれに続いた。B 群・C 群・F 群はそれぞれ 13 株、14 株、12 株であった (図 1)。

3. Penner-PCR 法による遺伝子型別

Penner 血清型別が可能であった計 142 株を対象に同遺伝子型別法を実施し、結果の整合性を評価したところ、136 株が同一の型別結果を示し、一致率は 95.8% であった (表 2)。二法間で不一致となった菌株の血清型は、A 群、D 群、F 群、I 群であった (表 2)。

D. 考察

C. jejuni の薬剤感受性については、これまでの動向とほぼ同様にフルオロキノロン系薬剤であるシプロフロキサシンの耐性率が高いほか、近年ではテトラサイクリン耐性率が増加傾向にあることが確認された。国際的に AMR 対策が求められる状況の中、本病原体の薬剤耐性に係る情報収集を継続的に実施することができる本研究班の活動は貴重な体制であり、引き続きこれを継続的に実施することが必要であると思われる。また、*C. coli* の薬剤感受性については、菌株数が相対的に少なく、調査対象とするためには菌株の確保体制を確立した上で検討の在り方を議論すべきと考えられる。

薬剤感受性試験法の統一化は、国際的な AMR 情報の集約化を行う上で必要不可欠な課題である。本年度の分担研究では、ディスク拡散法の判定基準として阻止円直径が明示される EU-CAST 法を試行的に採用し、その評価と課題等についてレファレンスセンターに意見を求めた。また、このうち 2 機関では CLSI 法を平行して実施し、結果の評価を行ったところ、阻止円直径には有意差が認められず、同等性が高いものと考えられた。EU-CAST 法の利点は判定基準が明確であることが複数のセンターから挙げられたが、 β -NAD の添加が労力・費用面から欠点として挙げられた。

血清型別の動向としては、型別不能株がおよ

そ7割を占め、現行の体制を大きく変えないという前提の下では同法の改善が急務の課題であった。本分担研究では、Penner 血清型別の代替法としての遺伝子検査法の有用性が示され、将来的には同法の選択肢の一つとして普及できる可能性が示唆された。喫緊の課題としては陽性対照株の確保が挙げられ、次年度以降これに関する体制整備が求められる状況にあるといえる。

Penner 血清型及び同 PCR 法における標的分子（遺伝子）は菌体表層のギランバレー症候群やミラーフィッシャー症候群の誘発分子と目される多糖構造体であり、同分子の型別法は別途開発評価されている。後者の手法（LOS 型別法）との整合性についても今後の検討課題といえよう。一方でこれらを確立した上では、国際整合性を踏まえた型別法の在り方を検討することが求められる。すなわち、カンピロバクター菌株の分類には詳細な型別化が有効とされ、そもそも血清型別は *C. jejuni/C.coli* の同一性判定やモニタリング・サーベイランスには適さないとする国際的認識も踏まえる必要があると思われる。

このほか、*C. coli* については、Penner-PCR 法による型別は直ぐに応用できる状況にはないため、他の型別手法を用いた評価検討を進めることも必要と思われる。

E. 結論

C. jejuni はシプロフロキサシン、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高く、これらの動向を引き続きモニタリングする必要がある。分離菌株の型別・分類法として、以前より国内で汎用される Penner 血清型別法を補完する手法として Penner-PCR 法の有用性を示すことができた。一方で分離株の型別・分類法については国際動向を踏まえた形で徐々に検討を

進め、使用目的に応じた体制整備を進めることが情報共有の観点から重要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 平成 30 年度の *C. jejuni*, *C. coli* 分離株における薬剤耐性状況

薬剤	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
	耐性株数	耐性率%	耐性株数	耐性率%
シプロフロキサシン	69	56.6	4	40.0
テトラサイクリン	37	30.3	5	50.0
エリスロマイシン	5	4.1	5	50.0
感受性	48	39.3	3	30.0
供試株数	122	-	10	-

図 1. 平成 30 年度の *C. jejuni* 分離株における Penner 血清型別

血清型	菌株数
A群	7
B群	13
C群	14
D群	30
E群	1
F群	12
G群	5
I群	4
J群	2
K群	6
L群	4
N群	4
O群	22
P群	2
R群	6
S群	0
U群	1
V群	0
Y群	7
Z群	0
Z 2群	0
Z 4群	0
Z 5群	0
Z 6群	2
Z 7群	0
計	142

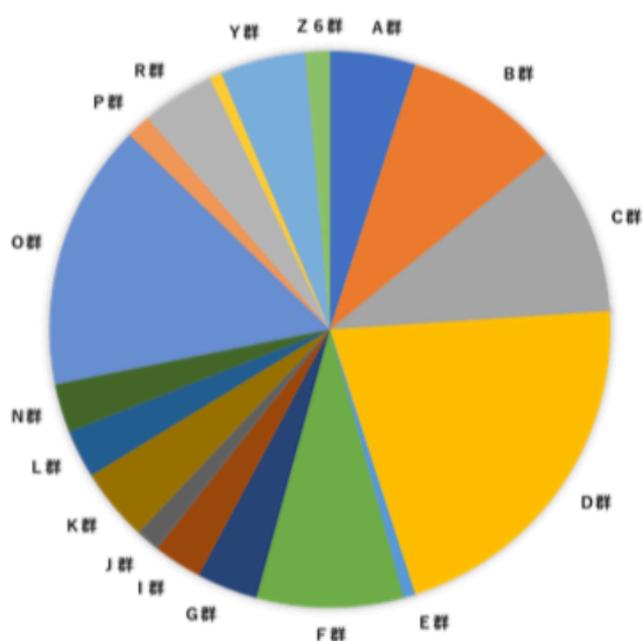


表 2. Penner-PCR 法の Penner 血清型別との一致性に関する評価結果

血清型	菌株数	Penner-PCR法		
		一致株数	不一致株数	一致率 (%)
A群	7	6	1	85.7
B群	13	13	0	100
C群	14	14	0	100
D群	30	28	2	93.3
E群	1	1	0	100
F群	12	11	1	91.7
G群	5	5	0	100
I群	4	2	2	50
J群	2	2	0	100
K群	6	6	0	100
L群	4	4	0	100
N群	4	4	0	100
O群	22	22	0	100
P群	2	2	0	100
R群	6	6	0	100
S群	0	0	0	-
U群	1	1	0	100
V群	0	0	0	-
Y群	7	7	0	100
Z群	0	0	0	-
Z 2群	0	0	0	-
Z 4群	0	0	0	-
Z 5群	0	0	0	-
Z 6群	2	2	0	100
Z 7群	0	0	0	-
計	142	136	6	95.8