

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

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	森 美総	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) 散发事例由来株を主な対象として、薬剤耐性状況を調査した。また、2) Penner-PCR 法による型別試験並びに Penner 血清型別法により、散发事例由来 *C. jejuni* 株を対象とした検討を行った。1) については、*C. jejuni* 188 株、*C. coli* 16 株を対象に薬剤感受性試験を実施し、*C. jejuni* 分離株のうちシプロフロキサシン耐性株は 37.2% (N=70)、テトラサイクリン耐性株は 20.7% (N=39)、エリスロマイシン耐性株は 11.7% (N=22) となったほか、*C. coli* 分離株ではシプロフロキサシン耐性株は 75.0% (N=12)、テトラサイクリン耐性株は 62.5% (N=10)、エリスロマイシン耐性株は 31.3% (N=5) の割合で検出された。2) については、*C. jejuni* 90 株を対象に Penner 血清型別法及び Penner-PCR 法を実施したところ、5 株は血清型別不能株であったほか、1 株(血清型:Z4 群、PCR 型:gB 群)のみ不一致の結果を示した。また、各センターで保存された *C. jejuni* 株のうち血清型別不能を示した計 180 株を PCR 型別法に供したところ、168 株(93.3%)は何れかの遺伝子型に型別され、同法の活用は *C. jejuni* 株の型別率向上に資すると考えられた。

行ったので報告する。

A. 研究目的

主として食品が媒介する細菌感染症のうち、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、並びに原因物質の有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を目的として、検討を

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纏め、報告することとした。

2. 薬剤感受性試験及び *C. jejuni* 型別試験

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、令和 2 年度は前年度に引き続き、主として EU-CAST 法に準拠したディスク拡散法により薬剤感受性試験を行った。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 β -NAD (20mg/mL) 加 MH-F 寒天培地
- ② 菌液調整用: 滅菌生理食塩水又は MH ブロス
- 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: 通常のみ卵器の場合は、市販の微好気用ガスパック等を利用する。微好気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。
- ③ MH-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°C で一夜自然乾燥、または 35°C 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、0.2 μ m 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°C で凍結するが、再凍結を繰り返さないこと。
- ② MH-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°C 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 \pm 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 \pm 1°C・24~48 時間または 42°C・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。

③ MH-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°C (24 時間) で微好気培養する。
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) (\geq mm)
EM	<i>C. jejuni</i> 20, <i>C. coli</i> 24	
CPFX	26	
TC	30	

2) *C. jejuni* 型別試験 (Penner 血清型別法及び Penner-PCR 型別法)

Penner 血清型別は、デンカ生研からキットを購入し、各レファレンスセンターに配布した後、製品説明書に従い使用した。Penner-PCR 型別法については、Polyらの報告 (PLoS One. 2015; 10(12): e0144349.) を基に改良した、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 (Penner-PCR 法) の実用性に関する検討を進めるため、陽性対照等を各レファレンスセンターに配布した。両法を *C. jejuni* 株計 90 株に適用し、型別試験を実施した。また、各レファレンスセンターで保存される *C. jejuni* 株のうち、血清型別不能と判定されたものを Penner-PCR 型別法に供した。

C. 結果

1. *C. jejuni* 株の薬剤感受性に関する動向

令和 2 年度に検出された *C. jejuni* 計 188 株及び *C. coli* 16 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、*C. jejuni* 分離株のうちシプロフロキサシン耐性株は 37.2% (N=70)、テトラサイクリン耐性株は 20.7% (N=39)、エリスロマイシン耐性株は 11.7% (N=22) の割合で認められた。3 剤に感受性を示した *C. jejuni* 株は 94 株 (50.0%) であった。

C. coli 株については 16 株のみが確保された。3 剤に対する感受性は、シプロフロキサシン耐性株が 75.0% (N=12)、テトラサイクリン耐性株が 62.5% (N=10)、エリスロマイシン耐性株が 31.3% (N=5) との割合でそれぞれ検出され、エリスロマイシン耐性が高率に認められる状況にあった (表 1)。

また、2 センターでは、CLSI 法についても並行的に検討を行い、2 株は 2 法間でテトラサイクリン感受性結果に差異を認めた。過去に分離された *C. jejuni* 株を含め計 4 株について E-test を用いて MIC 値を求めたところ、0.19-0.50 mg/L と判定

された (表 2)。

2. Penner-PCR 法による遺伝子型別

本年度は、主として散発事例由来の *C. jejuni* 計 90 株を対象に Penner-PCR 型別法及び Penner 血清型別を並行実施し、2 法間の相関性を評価した。結果として、90 株中 84 株は 2 法共に型別結果が得られたほか、5 株では血清型別不能となったものの、PCR 法による型別がなされた。また、残り 1 株については複数の遺伝子型で陽性反応が認められた (表 3)。

更に、保存株のうち、血清型別不能と判定された *C. jejuni* 計 180 株を対象に PCR 型別試験に供したところ、12 株を除く 168 株 (93.3%) は何れかの遺伝子群に型別された。

D. 考察

C. jejuni の薬剤感受性は、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、テトラサイクリン耐性率も高い割合で維持されていた。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関連モニタリング結果を継続的に収集できる本研究班の活動は貴重な体制であり、引き続きその実施にあたる必要がある。 *C. jejuni* のテトラサイクリン耐性判定基準については、E-test を用いた検証を行ったが、E-test では Agar dilution 法に比べ MIC 値が低く見積られることも報告されており、その原因究明には寒天平板希釈法による MIC 値の算出や *tet* 遺伝子の検出も今後検討すべき事項の一つとして想定された。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、議論することが可能となると思われる。

加えて、*C. jejuni* 株の型別にこれ迄汎用されてきた Penner 血清型別法と本分担研究において検討を進めてきた Penner-PCR 法の相関性を確認するため、両法間での一致性を確認すると共に、

血清型別不能株を対象に型別率を求め、概ね良好な結果を得た。今後、*C. jejuni* 株については、Penner-PCR 法の活用を通じて改善すべき点を抽出していくことが必要と思われる。また、*C. coli* については現時点で同等となる型別法が存在しないことから、新たな検討に向けた協議も必要であろう。

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い状態が維持されており、その動向を引き続きモニタリングする必要がある。また、テトラサイクリン感受性の判定基準については今後更に検討すべき課題として抽出された。また、*C. jejuni* 株の遺伝子型別法である Penner-PCR 法の検証を行い、型別率が高い手法であることが示された。今後、*C. jejuni* を対象とした更なる検証を蓄積することで、改善すべき点を抽出することが期待される。また、*C. coli* に対す

る型別法の設定も検討すべき課題であろう。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし(投稿中)
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 令和 2 年度の *C. jejuni* 分離株における薬剤耐性状況

菌種	供試菌株数	EM	TC	CPFX
<i>C. jejuni</i>	188	22	39	70
		(11.7%)	(20.7%)	(37.2%)
<i>C. coli</i>	16	5	10	12
		(31.3%)	(62.5%)	(75.0%)

表 2. CLSI と EU-CAST で TC 耐性に差異を認めた *C. jejuni* 菌株の判定結果概要.

菌株	CLSI			EU-CAST		
	阻止円径 (mm)	判定	E-test (mg/L)	阻止円径 (mm)	判定	E-test (mg/L)
I	32	S	0.5	20	R	0.75
II	19	S	0.25	19	R	-
III	>30	S	0.38	25	R	-
IV	25	S	0.19	29	R	-

表 3. *C. jejuni* 90 株における Penner-PCR 型別法・Penner 血清型別法成績の一致性.

血清型	供試菌株							一致性	
	A	B	C	D	E	F	合計	一致	不一致
A群			1		3		4	4	0
B群	1						1	1	0
E群			1	3			4	4	0
G群	2	5	1		1		9	9	0
I群		2	2	1	1		6	6	0
J群	2	1	6				9	8	1
K群	1	1	1	1			4	4	0
L群	1	2	1	1	2		7	7	0
N群	2	1	2	1			6	6	0
O群						1	1	1	0
P群	3	1					4	4	0
S群				1			1	1	0
U群		1	1			1	3	3	0
Y群	1	1	1	1	7		11	11	0
Z群	1		1	1	1		4	0	4
Z 2群	2						2	2	0
Z 4群			2				2	1	1
Z 6群	1		1	2	1		5	5	0
Z 7群	3		1	3			7	7	0
計	20	15	22	15	16	2	90	84	6

表 4. 血清型別不能を示した *C. jejuni* 180 株における PCR 型別結果.

PCR型別	レファレンスセンター						計	割合%
	A	B	C	D	E	F		
gA群 (HS1)	5	1	3	1	4	1	15	8.33
gA群 (HS44)							0	0.00
gB群(HS2)	8	13	7	6	18	12	64	35.56
gC群(HS3)	1	1				1	3	1.67
gD群 (HS4 complex)	10	8	3		4		25	13.89
gE群 (HS5)							0	0.00
gF群 (HS6/HS7)							0	0.00
gG群 (HS8/HS17)	2	3	9	1	2	2	19	10.56
gI群 (HS10)		1					1	0.56
gJ群 (HS11)							0	0.00
gK群 (HS12)						1	1	0.56
gL群 (HS15) /HS58						2	2	1.11
gN群 (HS18)						1	1	0.56
gO群(HS19)	1	2	1		11	2	17	9.44
gP群 (HS21)	1			1			2	1.11
gR群(HS23/HS36)	2		4			1	7	3.89
gR群(HS53)		1		2	2	2	7	3.89
gS群 (HS27)							0	0.00
gU群 (HS31)				1		2	3	1.67
gV群 (HS32)							0	0.00
gY群 (HS37)							0	0.00
gZ群 (HS38)							0	0.00
gZ2群 (HS41)							0	0.00
gZ4群 (HS45) /HS60				1			1	0.56
gZ5群 (HS52)							0	0.00
gZ6群 (HS55)							0	0.00
gZ7群 (HS57)							0	0.00
遺伝子型別不能			3	2	3	4	12	6.67
計	30	30	30	15	44	31	180	100