

# ヒト下痢症由来および鶏肉由来 *Campylobacter* 属の疫学的研究

*Epidemiological study of Campylobacter species derived from human diarrhea and chicken meat*

福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二

麻布大学環境保健学研究科微生物学分野

Masafumi Fukuyama, Katunori Furuhata, Kenji Oonaka

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

**Abstract.** As part of a basic study on campylobacteriosis, we performed serotyping, molecular-epidemiological analysis using the RAPD method, and drug sensitivity tests of strains isolated from human diarrheal feces, chicken meat, and chicken feces between 2002 and 2006, and investigated gene mutations in quinolone-resistant strains.

1) On serotyping of 53 human clinical isolates and 102 chicken meat-derived isolates, a total of 155 isolates, 16 types were identified in 85 isolates (54.8 %), but the remaining 70 isolates (45.2 %) could not be typed. Of the 85 typed isolates, 20 isolates (12.9 %) were typed Group Y, which was the most frequent, followed by 18 isolates typed Group B (11.6 %), and 8 isolates typed Group D (5.2 %). Regarding the origin, Groups B and Y were most frequently identified in human clinical and chicken meat-derived isolates, respectively.

2) On molecular-epidemiological analysis by RAPD, 124 of the 155 isolates (80.0 %) were classified into Groups 1-30 at a similarity of  $89\% \leq$ , and 22 isolates were classified into Group 22 (14.8 %), which was the most frequent, followed by 10 isolates into Group 18 (6.7 %), and 8 isolates into Group 16 (5.4 %). Regarding the origin, isolates with the same origin tended to be classified into the same group, and only a few isolates were classified into groups consisting of isolates with a different origin.

3) MIC distribution in 53 human diarrhea-derived strains was compared among various drugs based on MIC<sub>90</sub>. The MIC<sub>90</sub> value of GM was 0.5 mg/ml, showing the highest sensitivity, followed by: SM and LM, 2 mg/ml; EM, 4 mg/ml; KM and CP, 8 mg/ml; RXM, 16 mg/ml; MINO and CPFEX, 32 mg/ml; NA and NFLX, 128 mg/ml; and ABPC, PIPC, CEX, and TC, 128 mg/ml <.

4) There were isolates resistant to 10 of the 15 drugs tested: 99.4 % of the isolates were resistant to CEX, 59.4 % to ABPC, 40.6 % to NA, 40.0 % to NFLX, 39.4 % each to TC and CPFEX, 38.1 % to PIPC, 30.3 % to MINO, 3.2 % to KM, and 2.6 % to SM.

5) Regarding the resistance patterns of the 155 isolates, 28 isolates showed single drug resistance (18.1 %), and 127 isolates showed multidrug resistance (81.9 %), revealing that many isolates were multidrug resistant. The most frequent multidrug resistance pattern was ABPC/PIPC/CEX, followed by ABPC/PIPC/CEX/TC/MINO/NA/NFLX/CPFEX.

6) GryA mutation (Thr86 → Ile) was detected in 43 (97.7 %) of 44 quinolone-resistant isolates, but no amino acid mutation was noted in the other regions.

## 序 文

食中毒や散発下痢症の原因となる *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) は家畜や家禽の腸管内に広く分布し、と畜場や食鳥処理場において、と体解体の過程で生肉を汚染することが報告されている<sup>1)</sup>。これら生肉から分離された菌株について、疫学的検討の手法として血清型による分類が広く用いられている<sup>2,3)</sup>。しかし、血清型別によっても型別できない株も多く存在している<sup>4)</sup>。最近、より詳細に分類する手法として、分子疫学的手法であるPCR-RFLP法、PFGE法およびRAPD法などが応用されつつある<sup>5)</sup>。その中でも、RAPD法は特定のプライマーを用い、DNAをランダムに増幅させ、その泳動パターンを用いて分類する手法で、簡易で迅速性に優れ、感染源や感染経路の検討には有用とされている<sup>6)</sup>。また、近年、*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) はキノロン系抗菌薬への耐性化が注目されている。キノロン系抗菌薬の耐性機序として、大腸菌などではDNA gyraseおよびtopoisomerase IVに変異が起これ、キノロン耐性決定領域(QRDR)にアミノ酸変異が集中していることが知られている<sup>7)</sup>。その中で、DNA gyraseのGyrAサブユニットおよびtopoisomerase IVのParCサブユニットの変異が重要とされている。そこで著者は上述のことを踏まえ、感染源や感染経路として重要な市販鶏肉や鶏糞便から*Campylobacter*の分離を試み、その分離株とヒト臨床由来株について血清型別、RAPD法による分子疫学的解析および各種薬剤に対する感受性試験を行うとともに、キノロン耐性株についてはgyrA遺伝子上のQRDRの変異について検討を行ったところ、以下の成績が得られた。

材料および方法

### 1. 供試試料および菌株

2002年10月から2006年3月にかけてヒト下痢症患者から分離した*C. jejuni* 53株と2005年5月から9月にかけて、市販鶏肉や養鶏場から採取した糞便から分離した*C. jejuni* 102株の計155株を用いた。

### 2. 血清型別試験

ヒト下痢症由来53株と市販鶏肉や鶏糞便由来102株の総計155株について免疫血清(デンカ生研)を用いてPennerの血清型別を行った。

### 3. RAPD法による分子疫学的解析

供試菌株を7%ウマ脱繊維血液加Heart infusion agar (Difco)に塗抹して37℃48時間微好気培養後、平板上のコロニーを白金耳でかき取り、TE溶液中に懸濁後、その試料に核酸抽出キット(EXTRAGEN II;東ソー)の各試薬を添付資料の操作フローに従って添加し、DNAを抽出した。PCRの条件は牧野ら<sup>6)</sup>に準拠し、Primer(5'-CAATCGCCGT-3')はFayosら<sup>7)</sup>が設定したものに準拠した。次に得られたPCR産物を2%アガロースゲルで100V、2時間電気泳動後、Ethidium Bromide(0.5 μg/mL)で30分間染色し、UV照射下で写真撮影した。得られた泳動パターンについて、解析ソフト(BioNumerics; Applied Maths)を用いてUPGMA法でデンドログラムを作成し、クラスター解析を行った。

### 4. 薬剤感受性試験

供試薬剤はβ-ラクタム系、アミノグリコシド系、マクロライド系およびキノロン系各3剤、テトラサイクリン系2剤、クロラムフェニコール系1剤の総計15薬剤を用いた。

最小発育阻止濃度(MIC)の測定はClinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)が制定した方法<sup>8)</sup>に準拠した。

### 5. gyrA-QRDRの塩基配列決定

キノロン系抗菌薬(NA, NFLX, CPMX)に感受性を示した*C. jejuni* 4株と耐性を示した*C. jejuni* 44株の計48株について、ダイレクトサイクルシーケンス法でgyrA遺伝子上にあるQRDRの塩基配列を決定した。

## 成 績

### 1. ヒト下痢症由来および鶏肉、鶏糞便由来株の血清型別状況

各由来別における血清型別状況をTable 1に示した。155株中85株(54.8%)が16菌型に型別されたが、残りの70株(45.2%)は型別不能であった。全体ではY群が20株(12.9%)と最も多く、次にB群が18株(11.6%)であった。

由来別では、ヒト下痢症由来は53株中35株(66.0%)が14菌型に型別され、B群が9株(17.0%)と最も多く、次にC群が5株(9.4%)などであった。市販鶏肉および鶏糞便由来は102株中52株(75.0%)

Table 1 Serotypes of *C. jejuni* isolated from human diarrhea and chicken

	Human diarrhea			Chicken(meat and feces)					
	Akita	Kanagawa	Tokushima	Tokyo	Kanagawa	Gunma	Tokushima		
A	1 ( 6.7)			1 ( 1.9)	3 ( 21.4)	2 ( 6.1)		5 ( 4.9)	6 ( 3.9)
B	1 ( 6.7)	4 ( 16.7)	4 ( 28.6)	9 ( 17.0)	2 ( 14.3)	7 ( 21.2)		9 ( 8.8)	18 ( 11.6)
C	2 ( 13.3)	3 ( 12.5)		5 ( 9.4)		1 ( 3.0)		1 ( 1.0)	6 ( 3.9)
D	2 ( 13.3)	1 ( 4.2)		3 ( 5.7)	1 ( 7.1)	2 ( 6.1)		2 ( 3.7)	5 ( 4.9)
E		1 ( 4.2)		1 ( 1.9)					1 ( 0.6)
F			1 ( 7.1)	1 ( 1.9)				2 ( 3.7)	2 ( 2.0)
G					2 ( 14.3)	3 ( 9.1)		5 ( 4.9)	5 ( 3.2)
I						1 ( 3.0)		1 ( 1.0)	1 ( 0.6)
K	1 ( 6.7)			1 ( 1.9)	1 ( 7.1)			1 ( 1.0)	2 ( 1.3)
L			2 ( 14.3)	2 ( 3.8)					2 ( 1.3)
O		3 ( 12.5)		3 ( 5.7)		3 ( 9.1)		3 ( 2.9)	6 ( 3.9)
R	1 ( 6.7)	1 ( 4.2)		2 ( 3.8)		1 ( 3.0)		1 ( 1.0)	3 ( 1.9)
S		1 ( 4.2)		1 ( 1.9)					1 ( 0.6)
Y		1 ( 4.2)	3 ( 21.4)	4 ( 7.5)	2 ( 14.3)	3 ( 9.1)	1 ( 100.0)	10 ( 18.5)	16 ( 15.7)
Z <sub>2</sub>		1 ( 4.2)		1 ( 1.9)				1 ( 1.9)	1 ( 1.0)
Z <sub>6</sub>			1 ( 7.1)	1 ( 1.9)					2 ( 1.3)
Z <sub>6</sub>									1 ( 0.6)
UT	7 ( 46.7)	8 ( 33.3)	3 ( 21.4)	18 ( 34.0)	3 ( 21.4)	10 ( 30.3)		39 ( 72.2)	52 ( 51.0)
Total	15 ( 100.0)	24 ( 100.0)	14 ( 100.0)	53 ( 100.0)	14 ( 100.0)	33 ( 100.0)	1 ( 100.0)	54 ( 100.0)	102 ( 100.0)

が12菌型に型別され、Y群が16株(15.7%)と最も多く、次にB群が9株(8.8%)などであった。以上のことから両由来に共通してB群が多く認められた。

地域別では、秋田県由来は15株中8株(53.3%)が6菌型に型別され、C群とD群が各2株(13.3%)などであった。東京都由来は14株中11株(78.6%)が6菌型に型別され、A群が3株(21.4%)と最も多く、次にB群、G群およびY群が各2株(14.3%)などであった。神奈川県由来は57株中39株(68.4%)が12菌型に型別され、B群が11株(19.3%)と最も多く、次にO群が6株(10.5%)などであった。群馬県由来はY群に1株のみであった。徳島県由来は68株中26株(38.2%)が7菌型に型別され、Y群が13株(19.1%)と最も多く、次にB群が4株(5.9%)などであった。

## 2. RAPD法による分子疫学的解析

ヒト下痢症由来53株と市販鶏肉、鶏糞便由来102株の計155株について、RAPD法を用い分子疫学的解析を行ったところ、供試した155株中149株(96.1%)が分子量100~10,000bpの間で約4~19本の泳動パターンが認められたが、残りの6株(3.9%)には泳動パターンが認められなかった。それらの泳動パターンが認められた149株について、解析ソフト(BioNumerics; Applied Maths)を用いてUPGMA法より系統樹を作製して、類似度89%≤で

分類を行ったところ、124株(83.2%)は1~30群に分類されたが、残り25株(16.8%)はいずれのグループにも分類されなかった。

## 3. 由来別における各種薬剤に対するMIC<sub>90</sub>の比較

ヒト下痢症由来53株、市販鶏肉由来40株および鶏糞便由来62株の計155株について各種薬剤に対するMIC分布をMIC<sub>90</sub>で比較検討したところ、ヒト下痢症由来株ではGMが0.5 μg/mlで最も感受性が高く、次にSM、EMおよびLMが各2 μg/ml、KM、RXMおよびCPが各8 μg/ml、CPF<sub>X</sub>が16 μg/ml、MINOが32 μg/ml、ABPCが64 μg/ml、TC、NAおよびNFLXが各128 μg/ml、PIP<sub>C</sub>とCEXが各128 > μg/mlの順であった。なお、TC、MINO、NA、NFLXおよびCPF<sub>X</sub>の5薬剤はMICの分布において二峰性が認められた(Table 2)。一方、市販鶏肉と鶏糞便由来株ではGMが0.5 μg/mlで最も感受性が高く、次にSMとLMが各2 μg/ml、EMが4 μg/ml、KMとCPが各8 μg/ml、RXMが16 μg/ml、MINOとCPF<sub>X</sub>が各32 μg/ml、NAとNFLXが各128 μg/ml、ABPC、PIP<sub>C</sub>、CEXおよびTCが各128 > μg/mlの順であった。なお、TC、MINO、NA、NFLXおよびCPF<sub>X</sub>の5薬剤はMIC分布において二峰性が認められた(Table 3)。

Table 2 MIC distribution of human diarrhea derived *C. jejuni* strains

Drug	Break points* ( $\mu\text{g/mL}$ )		No. of Resistant (%) n=53	MIC range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	S	R				
ABPC	8	32	19 ( 35.8)	8 ~ 128 <	16	64
PIPC	16	128	26 ( 49.1)	64 ~ 128 <	64	128 <
CEX	8	32	53 (100.0)	32 ~ 128 <	128	128 <
SM		16	3 ( 5.7)	1 ~ 128 <	1	2
KM	16	64	1 ( 1.9)	1 ~ 128 <	4	8
GM	4	16	0	0.25 ~ 1	0.5	0.5
EM	0.5	16	0	0.5 ~ 4	1	2
LM		16	0	0.25 ~ 2	1	2
RXM	0.05	64	0	2 ~ 16	4	8
CP	8	16	0	2 ~ 16	2	8
TC	4	16	22 ( 41.5)	0.125 ~ 128 <	0.5	128
MINO	4	16	18 ( 34.0)	$\leq 0.06$ ~ 32	0.125	32
NA	16	32	17 ( 32.1)	2 ~ 128 <	4	128
NFLX	4	16	17 ( 32.1)	0.25 ~ 128	0.5	128
CPFEX	1	4	17 ( 32.1)	$\leq 0.06$ ~ 32	0.125	16

\* S=Susceptible, R=Resistant

Table 3 MIC distribution of chicken derived *C. jejuni* strains

Drug	Break points* ( $\mu\text{g/mL}$ )		No. of Resistant (%) n=102	MIC range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	S	R				
ABPC	8	32	73 ( 71.6)	4 ~ 128 <	32	128 <
PIPC	16	128	83 ( 81.4)	1 ~ 128 <	128	128 <
CEX	8	32	101 ( 99.0)	8 ~ 128 <	128 <	128 <
SM		16	1 ( 1.0)	0.5 ~ 128 <	1	2
KM	16	64	4 ( 3.9)	2 ~ 128 <	4	8
GM	4	16	0	0.25 ~ 2	0.5	0.5
EM	0.5	16	0	0.125 ~ 4	1	4
LM		16	0	0.25 ~ 4	0.5	2
RXM	0.05	64	0	0.25 ~ 32	4	16
CP	8	16	0	2 ~ 8	4	8
TC	4	16	39 ( 38.2)	0.125 ~ 128 <	1	128 <
MINO	4	16	29 ( 28.4)	$\leq 0.06$ ~ 64	0.25	32
NA	16	32	46 ( 45.1)	2 ~ 128 <	8	128
NFLX	4	16	45 ( 44.1)	0.25 ~ 128 <	1	128
CPFEX	1	4	44 ( 43.1)	$\leq 0.06$ ~ 32	0.5	32

\* S=Susceptible, R=Resistant

## 4. 由来別における薬剤耐性株の出現率と耐性パターン

供試した *C. jejuni* 155 株のすべてに耐性株が認められた。各種薬剤に対する耐性株の出現率は ABPC 59.4%, PIPC 38.1%, CEX 99.4%, SM 2.6%, KM 3.2%, TC 39.4%, MINO 30.3%, NA 40.6%, NFLX 40.0% および CPFEX 39.4% であった。

耐性株の耐性パターンでは Table 4 に示すとおり、由来別においてヒト下痢症由来ではすべての株が耐性を示し、CEX 単剤耐性が 12 株 (22.6%), ABPC/CEX, CEX/TC/MINO, CEX/TC/MINO/NA/NFLX/CPFEX および CEX/NA/NFLX/CPFEX 耐性が各 5 株 (9.4%), ABPC/PIPC/CEX および ABPC/PIPC/CEX/TC/MINO 耐性が各 4 株 (7.5%) な

どであった。市販鶏肉や鶏糞便由来でもすべての株が耐性を示し、ABPC/PIPC/CEX 耐性が 24 株 (23.5%) と最も多く、次に ABPC/PIPC/CEX/TC/MINO/NA/NFLX/CPFEX 耐性が 19 株 (18.6%), ABPC/CEX/NA/NFLX/CPFEX および CEX 単剤耐性が各 16 株 (15.7%) などであった。

5. *gyrA-QRDR* の変異

供試した 48 株 (ヒト下痢症由来 38 株, 市販鶏肉と鶏糞便由来 10 株) の MIC 値と遺伝子変異状況を Table 5 に示した。48 株中 47 株 (97.9%) において *gyrA-QRDR* で 6 箇所のうちいずれかのコドンの置換が確認された。その内訳では感受性株と耐性株に共通する変異が CAC → CTC (His-81), AGT → ACT

Table 4 Drug-resistance patterns of *C. jejuni* isolated from human diarrhea and chicken

Origin	Drug resistance pattern						No. of resistant (%)	
human diarrhea	ABPC	CEX					12( 22.6)	
		CEX					5( 9.4)	
		CEX	TC	MINO			5( 9.4)	
		CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX		5( 9.4)	
		CEX			NA	NFLX CPIX	5( 9.4)	
		ABPC PIPC	CEX				4( 7.5)	
		ABPC PIPC	CEX	TC	MINO		4( 7.5)	
			CEX	TC			3( 5.7)	
		ABPC	CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX	2( 3.8)	
		ABPC PIPC	CEX			NA	NFLX CPIX	2( 3.8)
			CEX	SM				2( 3.8)
		ABPC	CEX			NA	NFLX CPIX	1( 1.9)
		ABPC PIPC	CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX		1( 1.9)
			CEX	SM	KM	TC	MINO	1( 1.9)
			CEX			TC	NA	NFLX CPIX
<b>Subtotal</b>							<b>53(100.0)</b>	
chicken	ABPC PIPC	CEX					24( 23.5)	
	ABPC PIPC	CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX		19( 18.6)	
	ABPC	CEX			NA	NFLX CPIX	16( 15.7)	
		CEX					16( 15.7)	
		CEX	TC				7( 6.9)	
	ABPC	CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX		3( 2.9)	
		CEX	KM	TC	MINO		3( 2.9)	
	ABPC	CEX					2( 2.0)	
	ABPC	CEX	TC				2( 2.0)	
		CEX	TC	MINCNA	NFLX CPIX		2( 2.0)	
	ABPC PIPC	CEX	SM	TC	NA	NFLX CPIX	1( 1.0)	
	ABPC PIPC	CEX	KM	TC	MINO		1( 1.0)	
	ABPC PIPC	CEX			NA		1( 1.0)	
	ABPC PIPC	CEX			NA	NFLX CPIX	1( 1.0)	
		PIPC	CEX			NA	NFLX CPIX	1( 1.0)
		CEX	TC	MINO			1( 1.0)	
		CEX			NA	NFLX CPIX	1( 1.0)	
					NA	NFLX	1( 1.0)	
<b>Subtotal</b>							<b>102(100.0)</b>	
<b>Total</b>							<b>155</b>	

Table 5 Mutations in *C. jejuni gyrA* genes and quinolone resistance properties

Type strain(NCTC11168)	No. of strains(%)	MIC range( $\mu$ g/mL)			Nucleic acid codons and corresponding amino acid changes in QRDR of <i>gyrA</i> from <i>C. jejuni</i>											
		NA	NFLX	CPFX	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid		
					G G T	Gly-78	C A C	His-81	A C A	Thr-86	G G C	Gly-110	A G T	Ser-119	G C C	Ala-120
Sensitive group*	3( 75.0)	2 ~ 8	0.5 ~ 1	0.125 ~ 0.25	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	-
	1( 25.0)	2	0.5	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>4( 100.0)</b>															
Resistance group**	13( 29.5)	32 ~ 128	64 ~ 128 <	8 ~ 32	-	-	-	-	T	Ile-86	-	-	-	-	-	-
	12( 27.3)	128 ~ 128 <	64 ~ 128	16 ~ 32	-	C	-	-	-	T	Ile-86	-	-	C	-	-
	11( 25.0)	128 ~ 128 <	64 ~ 128 <	8 ~ 32	-	-	-	T	-	T	Ile-86	-	-	C	-	T
	7( 15.9)	128	128	32	-	-	-	T	-	T	Ile-86	-	T	-	C	-
<b>Total</b>	<b>1( 2.3)</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C	-	T

\* Sensitive to NA, NFLX and CPFX  
 \*\* Resistant to NA, NFLX and CPFX

(Ser-119), GCC→GTC (Ala-120) の3箇所, 耐性株のみの変異がGGT→GGC (Gly-78), ACA→ATA (Thr-86→Ile-86), GGC→GGT (Gly-110) の3箇所であった。アミノ酸レベルでの変異では耐性株44株中43株(97.7%)がACA→ATAの置換による86位スレオニン(Thr)のイソロイシン(Ile)の

変異のみが認められた。

考 察

著者らはヒト下痢便および鶏肉, 鶏糞便から分離した菌株を用い, 感染源や感染経路を解明する疫学的手段として, 血清型別, RAPD法による分子疫学

的解析、薬剤感受性試験およびキノロン系薬剤に対する耐性株の遺伝子変異について検討を行った。その結果、血清型別においてヒト下痢症由来と鶏肉および鶏糞便由来ではB群、D群およびY群に型別されるものが多く認められた。由来別において、ヒト下痢症由来では安岡ら<sup>9)</sup>やIshiharaら<sup>10)</sup>はB群やD群を、谷ら<sup>11)</sup>はB群やL群を、鶏肉由来では安岡らはD群やG群を、IshiharaらはA群、B群およびD群を、糞便由来では安岡らはA群やB群を多く認めている。これらの成績と著者らの成績を比較すると、ほぼ一致する成績であった。また、今回調査した同一地域におけるヒト下痢症由来および鶏肉、鶏糞便由来の両由来間の型別状況において、神奈川県由来の12菌型中6菌型(50.0%)と徳島県由来の7菌型中2菌型(28.6%)が共通していた。このことからヒト下痢症由来と鶏肉や鶏糞便由来との間で密接な関わりのあることが考えられた。さらに、Guillain-Barré症候群の原因血清型であるO群<sup>12)</sup>が神奈川県由来株から高率に分離されたことは注目すべきであろう。

分子疫学的検討の手段としてRAPD法を用いて地域、由来および血清型における分離株間での相関性を検討するために、解析ソフトを用い、類似度 $89\% \leq$ <sup>13)</sup>で分類を行った。その結果、供試した96.1%に分子量100~10,000 bpの間で約4~19本の泳動パターンが認められ、そのうちの83.2%が1~30群に分類されたが、残りの16.8%はいずれのグループにも分類されなかった。しかし、ヒト下痢症由来および鶏由来のうち、少数ではあるが同一群に分類されるものが認められ、鶏からヒトへの感染が示唆された。また、同一地域における農場別の検討において、4農場から分離された*Campylobacter*は9タイプに分類された。Miwaら<sup>14)</sup>は同一農場から分離した株についてRAPD法を用い、複数の泳動パターンを認め、同一農場で複数回の汚染があったことを推察している。著者らも調査した3農場において、共通する泳動パターンが認められたことから、Miwaらと同様に同一タイプの菌が地域全体を広く汚染していることが考えられた。さらに、Mazurierら<sup>15)</sup>は鶏糞便由来株について血清型別とRAPD法による分類を行い、供試したすべての株が一致したと報告している。この点については今回著者らが供試した菌

株では両由来株の採取地区が異なっていたことから、一致する株は少数しか認められず異なっていた。しかし、今回供試した株において、血清型別では54.8%が型別されたのに比べRAPD法を行うことにより80%が分類されたことから、疫学的手法としてRAPD法が有用であることが考えられた。

薬剤感受性試験については最小発育阻止濃度(MIC)を測定するとともに供試薬剤のうちキノロン耐性を示した菌株について遺伝子変異を検討した。その結果、 $\beta$ -ラクタム系、テトラサイクリン系およびキノロン系抗菌薬の8薬剤(ABPC, PIPC, CEX, TC, MINO, NA, NFLX, CPFX)に対して30.3%~99.4%と高率に耐性が認められた。薬剤別においてEMでは谷ら<sup>11)</sup>、川森ら<sup>16)</sup>および横山ら<sup>17)</sup>が2.5~5.4%に耐性株を認めているが、著者らはIshiharaら<sup>10)</sup>や高山ら<sup>18)</sup>と同様に耐性株を認めなかった。キノロン系抗菌薬では、ヒト下痢症由来で32.1%、鶏肉や鶏糞便由来で43.1~45.1%にそれぞれ耐性を認め、鶏由来株はヒト下痢症由来株に比べ若干耐性率が高い傾向を示した。しかし、川森ら<sup>16)</sup>はヒト下痢症由来株で44.6~46.2%、鶏由来株で26.4~27.8%とヒト下痢症由来株に耐性率が高い傾向を示し、著者と異なっていた。この原因として地域的な要因などが関わっているものと考えられた。その他の薬剤に対する耐性株の出現状況において、川森ら<sup>16)</sup>はABPC, GM, CPおよびTCに各耐性を、谷ら<sup>11)</sup>はABPC, KMおよびTCに各耐性を示す株をそれぞれ分離している。しかし、今回著者らの成績においてGMやCPに耐性を示す株は認められず、川森らや谷らの報告とは異なっていた。薬剤耐性を示したヒトおよび鶏由来株について耐性パターンを比較したが、両由来間に顕著な差は認められず同様のパターンであった。多田ら<sup>23)</sup>の報告でも著者らの成績と同様に、ヒト由来株と鶏由来株において薬剤耐性パターンの顕著な違いは認めていない。

*C. jejuni*におけるキノロン系抗菌薬の耐性機序は、キノロン排出ポンプの存在が報告され、2種の外膜タンパク質が確認されている<sup>20)</sup>。また、*gyrA*遺伝子の変異によるThr-86→Ileのアミノ酸置換が関与していることも報告されている<sup>21-23)</sup>。著者らが供試した株のうち、CPF<sub>X</sub>のMIC値が $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ を示す株は秦らの成績<sup>25)</sup>と同様に、アミノ酸置換が認められ、

一致していた。しかし、それ以外の部位において Wang ら<sup>22)</sup> は Ala-70 → Thr, Asp-90 → Asn, Hakanen ら<sup>23)</sup> は Pro-104 → Ser などのアミノ酸置換がキノロン耐性に関与することを報告しているが、著者らの成績では変異は認められず異なっていた。これらのことから、今回供試したキノロン系抗菌薬に耐性を示した *C. jejuni* 株は *gyrA* 遺伝子上にアミノ酸の二重変異は認められず、1 アミノ酸変異で高い耐性を示していることが推察された。

### 要 旨

*Campylobacter* 感染症に関する基礎的研究の一環として、2002～2006年にかけてヒト下痢便および鶏肉、鶏糞便から分離した株を用いて、血清型別、RAPD法による分子疫学的解析、薬剤感受性試験およびキノロン系薬剤に対する耐性株の遺伝子変異について検討を行ったところ、以下の成績が得られた。

- 1) ヒト臨床由来 53 株と鶏由来 102 株の計 155 株を用いて血清型別を行ったところ、85 株 (54.8%) が 16 菌型に型別されたが、残りの 70 株 (45.2%) は型別不能であった。型別された 85 株の内訳は Y 群に 20 株 (12.9%) と最も多く、次に B 群 18 株 (11.6%)、D 群 8 株 (5.2%) であった。由来別において、ヒト臨床由来では B 群に、鶏由来では Y 群にそれぞれ多く型別された。
- 2) RAPD 法による分子疫学的検討を行ったところ、供試した 155 株中 124 株 (80.0%) が類似度 89% 以下において 1～30 群に分類され、22 群に 22 株 (14.8%) と最も多く、次に 18 群 10 株 (6.7%)、16 群 8 株 (5.4%) などであった。由来別においては同一由来別に分類される傾向が強く認められ、由来の異なる株が共通した群へ分類される株は少数であった。
- 3) ヒト下痢症由来 53 株の各種薬剤に対する MIC の分布状況を MIC<sub>90</sub> で比較したところ、GM が 0.5 μg/ml で最も感受性が高く、次に SM と LM が各 2 μg/ml、EM が 4 μg/ml、KM と CP が各 8 μg/ml、RXM が 16 μg/ml、MINO と CPFEX が各 32 μg/ml、NA と NFLX が各 128 μg/ml、ABPC、PIPC、CEX および TC が各 128 < μg/ml の順であった。
- 4) 供試した 15 薬剤のうち 10 薬剤に対していずれかの株に耐性が認められた。その内訳は CEX99.4%、

ABPC59.4%、NA40.6%、NFLX40.0%、TC と CPFEX 各 39.4%、PIPC38.1%、MINO30.3%、KM3.2% および SM2.6% であった。

- 5) 薬剤耐性が認められた 155 株の耐性パターンの内訳は単剤耐性が 28 株 (18.1%) と多剤耐性が 127 株 (81.9%) であり、多剤耐性株が多いことを明らかにした。また、多剤耐性を示した耐性パターンでは ABPC/PIPC/CEX が最も多く、次に ABPC/PIPC/CEX/TC/MINO/NA/NFLX/CPFEX であった。
- 6) キノロン系抗菌薬に対して耐性を示した 44 株のうち、43 株 (97.7%) が *GyrA* の変異 (Thr-86 → Ile) が認められたが、他の部位ではアミノ酸レベルでの変異は認められなかった。

### 文 献

- 1) 伊藤 武, 高橋正樹, 斉藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 大橋 誠: 感染症誌 1988; 62: 17-25.
- 2) Penner JL, Hennessy JN: J Clin Microbiol 1980; 12: 732-737.
- 3) Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P: J Clin Microbiol 1982; 15: 761-768.
- 4) 佐々木実己子, 小川博美: 広島県保健環境センター研究報告 2001; 9: 39-42.
- 5) 東久保靖, 井上佳織, 竹田義弘, 小川博美: 広島県保健環境センター研究報告 2001; 9: 9-12.
- 6) 牧野壮一: モダンメディア 1995; 41: 186-194.
- 7) 吉田博明: 日細誌 1996; 51: 973-992.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. 2006; 26: M100-S16.
- 9) 安岡富久, 高橋富世, 出口祐男: 高知衛研報 1995; 41: 37-41.
- 10) Ishihara K, Yamamoto T, Satake S, Takayama S, Kubota S, Negishi H, et al.: J Appl Microbiol 2006; 100: 153-160.
- 11) 谷 好史, 笹川知位子, 立石ひとみ: 徳島県保健環境センター年報 2004; 22: 1-4.
- 12) 結城伸泰: 日細誌 1995; 50: 991-1003.
- 13) 山田三紀子, 武藤哲典, 北爪晴恵, 鈴木正弘: 感染症誌 1999; 73: 923-929.
- 14) Miwa N, Takegahara Y, Terai K, Kato H, Takeuchi T: 日食微誌 2003; 20: 211-215.
- 15) Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K: Lett Appl Microbiol 1992; 14: 260-262.
- 16) 川森文彦, 久島昇平, 有田世乃, 増田高志, 秋山

- 真人, 重松克彦, 他: 日食微誌 2004; 21: 131-137.
- 17) 横山敬子, 柳川義勢, 齊藤香彦, 新垣正夫, 甲斐明美, 鎌田有希, 他: 東京衛研年報 1997; 48: 3-8.
- 18) 高山貞男, 佐竹幸子, 石原加奈子: 感染症誌 2005; 79: 169-175.
- 19) 多田芽生, 砂原千寿子, 多田千鶴子, 山西重機: 香川県環境保健研究センター所報 2004; 3: 187-190.
- 20) Charvalos E, Tselentis Y, Hamzehpour MM, Köhler T, Pechere J-C: Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2019-2022.
- 21) 秦 眞美, 平松礼司, 鈴木匡弘, 松本昌門, 高橋正夫, 榮 賢司: 愛知県衛生研究所報 2005; 55: 9-15.
- 22) Wang Y, Huang WM, Taylor DE: Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 457-463.
- 23) Hakanen A, Jalava J, Kotilainen P, Jousimies-Somer H, Siitonen A, Huovinen P: Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2644-2647.