

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590799

研究課題名(和文)カンピロバクター腸炎の実態解明(臨床情報・菌株情報の連結による調査研究)

研究課題名(英文)Epidemiological and molecular epidemiological study on Campylobacter enteritis.

## 研究代表者

藤本 秀士(Fujimoto, Shuji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30199369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：カンピロバクター腸炎の実態解明のため、福岡地域の分離菌株とそれに附帯する臨床情報を収集し、鞭毛遺伝子(fla A)によるPCR-RFLP解析、Multi Locus Sequence Typing(MLST)などを実施して、臨床情報と分離菌株情報とを連結した解析を行った。市内の飲食店で発生した事例では、分離されたC. jejuni10菌株はfla A PCR-RFLP、RAPD法および細胞致死性伸張化毒素の遺伝子解析において2群に分かれ、MLST解析で異なる2種類のSTタイプが検出された。互いに類縁関係がないことから、原因食材が由来の異なる2種類以上の菌株に汚染されていたことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Campylobacter is one of the most common causes of bacterial gastroenteritis in Japan. The public health center in Fukuoka city, conducted the inspections of the restaurant and identified an association between eating several dishes containing chicken. We investigated the cases those had been identified with culture positive for Campylobacter. PCR using species-specific primer sets for Campylobacter showed that 10 strains isolated from the cases were C. jejuni. Restriction Fragment Length Polymorphic (RFLP) Analysis using PCR amplified flagellin gene demonstrated that two distinct patterns were observed among the strains. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis also showed the same result. Cytotoxicity gene sequencing and Multilocus Sequence Typing analysis of the strains revealed that the two strains are not related each other. These data suggested that the outbreak might be caused by the food which was contaminated with the two distinct C. jejuni strains.

研究分野：医歯薬

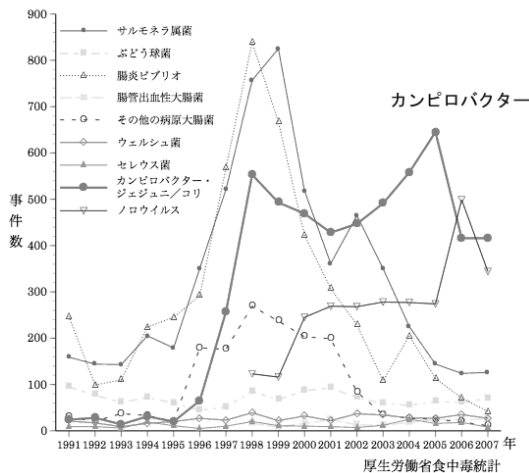
科研費の分科・細目：疫学・公衆衛生

キーワード：Campylobacter enteritis Food poisoning Molecular epidemiology カンピロバクター腸炎 食中毒  
分子疫学

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター *Campylobacter* 腸炎は、1972年に明らかとなった比較的新しい感染症で、カンピロバクター・ジェジュニ/カンピロバクター・コリ *C. jejuni*/*C. coli* が食品や水とともに経口的にヒトの体内に入り、下痢(水様性、血便)、発熱、腹痛等をおこす感染性腸炎である。日本では両菌種が1982年に食中毒起因菌に指定され、1999年以後、細菌性食中毒の発生件数に占める本菌事例数の割合は増加し、2001年以降の発生件数はサルモネラおよび腸炎ピブリオを上回り第一位となり、大きな問題となっている。(図1厚生労働省食中毒統計より)。

図1. 病因物質(主な細菌・ウイルス)別食中毒事件数, 1991~2007年



本腸炎は、ほとんどは後遺症無く回復するが、稀に反応性関節炎や末梢神経麻痺疾患であるギラン・バレー(Guillain-Barre)症候群(GBS)などが合併し、特に、本菌感染後のGBSでは、概して重症化しやすく、上肢や下肢の麻痺などのほか、呼吸筋の麻痺によって死亡の危険性もある。また、治療に際してキノロン系薬剤耐性菌の蔓延が世界的に問題となっている。

このような状況にありながら、日本におけるカンピロバクター腸炎の実態は、欧米諸国に比べてデータに乏しく、対策が大きく遅れている。その原因は、カンピロバクター腸炎の患者情報と分離菌株情報とを合わせて解析する調査が行われていないためである。

米国では CDC (米国疾病予防管理センター) が FoodNet (食品由来疾患の能動的サーベイランスネットワーク) によって、本感染症の散发事例を対象とした能動的なサーベイランスや疫学調査が行われている。

一方、日本では、厚生労働省による食中毒統計、地方衛生研究所・保健所(主に集団発生の食中毒患者を対象として実施した病原体検査結果)、都市立感染症指定医療機関(3都市16病院に入院した患者についての個票報告)の三つがあり、それぞれ独立に集計・調査されている。は食中毒として届出のあった例のみが対象であり、は散发症例・食中毒症例のうち、入院した重症例のみが対象である。また、では臨床情報が

切り離された分離菌株の解析のみが行われており、では患者情報はわかるものの分離菌株の詳しい解析が行われていない。このように、とも調査対象が本感染症のごく一部であり、その解析は臨床情報・分離菌株情報が解離して不十分であるのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、カンピロバクター腸炎症例について、その臨床情報と臨床分離株を収集し、臨床情報の疫学解析と分離菌株の分子生物学的解析情報を行い、その両方を連結させた解析を行って、日本でのカンピロバクター腸炎の病態解明のためのデータを提供し、本菌感染症の予防・治療に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 散发事例

福岡県内の病院・診療所から民間検査センターに送られてカンピロバクターが分離された検体を対象に、分離されたカンピロバクター菌株および検体に付随する臨床情報(患者年齢、性別、分離年月日・地域)を収集した。菌株は-80 で冷凍保存し、臨床情報は個人が特定されないよう匿名化した。

菌種の同定では、馬尿酸加水分解試験など生物学的性状および分子生物学的検査(馬尿酸加水分解酵素遺伝子の有無、既知の種鑑別プライマーによるPCR)により *C. jejuni*, *C. coli* を鑑別した。

分子生物学的型別では鞭毛遺伝子 (*flaA*) の可変部分をPCRで増幅し、制限酵素 *DdeI*, *MseI*, *AluI*, *MboI* の4種類をそれぞれ用いて切断して電気泳動パターンで型別した(*flaA* PCR-RFLP法)。MLST(Multi Locus Sequence Typing)法では、グルタミンやクエン酸の合成酵素 (*glxA*, *gltA*) など7つの遺伝子に対し、各遺伝子に対応したプライマー(表1)を用いてPCRを行い、得られた産物をもとにダイレクトシークエンス法によって塩基配列を決定した。得られた結果をMLSTデータベースと照合してST型を決定した。

表1 MLST に使用したプライマー一覧

Gene	Direction	Primer ID	Sequence	Direction	Primer ID	Sequence
aspA	F	A9	AGTACTAATGATGCTTATCC	S3	S3	CCAACTGCAAGATGCTGTACC
	R	A10	ATTTTCATCAATTTGTTCTTTGC	S6	S6	TTGATTTCCGGTAATACCATC
glnA	F	A1	TAGGAACCTGGCATCATATTACC	S3	S3	CATGCAATCAATGAAGAAAC
	R	A2	TTGGACGAGCTTCTACTGGC	S6	S6	TTCCATAAGCTCATATGAAAC
gltA	F	A1	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG	S3	S3	CTTATATTGATGGAGAAAATGG
	R	A2	CCAAATAAAGTTGCTTGGACGG	S6	S6	CCAAAGCGCACAATACTGTG
glyA	F	A1	GAGTTAGAGCGCTCAATGTGAAGG	S3	S3	AGCTAATCAAGGTTTATGCGG
	R	A2	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC	S4	S4	AGGTGATTATCCGTTCCATCCG
tkc	F	A3	GCAAACCTCAGGACACCCAGG	S5	S5	GGTTTTAGATGTGGCTCATG
	R	A6	AAAGCATTTGTAATGGCTGC	S2	S2	TCCAGAATAAGCAATAAGG
pgm	F	A7	TACTAATAATATCTAGTAGG	S5	S5	GCTTACGAGATATTTAAGTG
	R	A8	CACAACATTTTTCATTTCTTTTC	S6	S6	AAGCCTGCTTGTCTTTTGGC
uncA	F	A7	ATGGACTTAAGAATATTATGGC	S3	S3	AAAGTACAGTGGCACAAGTGG
	R	A8	ATAAATTCATCTTCAAAATTC	S4	S4	TGCCTCATCTAAATCACTAGC

## (2) 集団食中毒事例

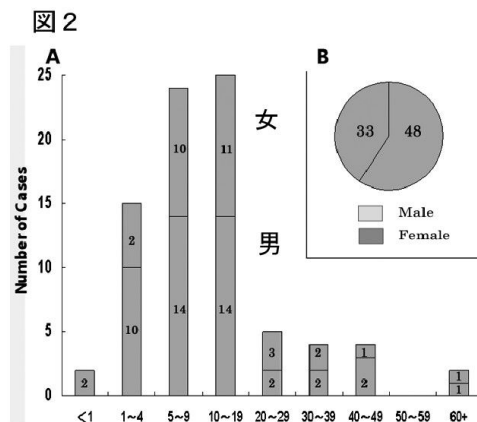
福岡市内の飲食店で発生したカンピロバクター腸炎の集団発生事例について、アンケート調査によって臨床情報を収集し、各患者からの分離菌株について菌種を同定し、分子生物学的解析 (*flaA* PCR-RFLP, MLST) を行った (方法は上記 (1) と同様)。

## 4. 研究成果

### (1) 散発事例

福岡地域の患者年齢分布は、30歳未満の割合が全体の9割近くを占め、特に5~9歳の発生数が最も多く、次いで10~19歳であった (図2A)。一方、1歳未満の発生率が非常に少なく、欧米と大きく異なっていた。一方、男女比では女性がやや多く、欧米の報告とほぼ同様であった (図2B)。

分子生物学的な菌種同定では、分離菌株の8割以上が *C. jejuni* で、*C. coli* は1割程度であった。鞭毛遺伝子 (*flaA*) による PCR-RFLP 法では、多くの菌株でパターンが異なっていた。しかし、一部に4つの制限酵素 (*DdeI*, *MseI*, *AluI*, *MboI*) それぞれで全く同一パターンを示す菌株グループが見られ、散発的集団発生 (diffuse outbreak) の可能性が疑われた。



MLST は、塩基配列に基づいた分子疫学的解析手法で、細菌などの亜種決定や菌株解析に利用される。菌株由来のハウスキーピング遺伝子を数種類設定し、シーケンス解析をすることで、遺伝子セットとしてその塩基配列をパターン化する。これをデータベースとして解析することで、アリルプロファイルすなわち Sequence Type を同定・分類することができ、系統分析、分子疫学、母集団構造調査などに応用されている。今回の分離株の MLST 解析では、これまでの諸外国での報告と同様の傾向が見られた。しかし、世界的に流行している ST タイプ群に混じってデータベースに未登録の ST タイプが見られ、わが国独自のものである可能性が示唆された。

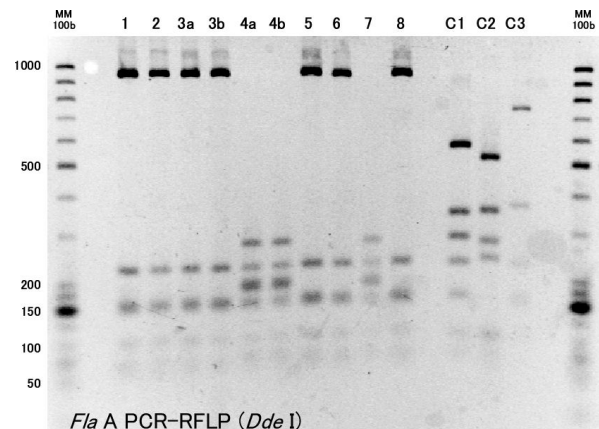
## (2) 集団食中毒事例

福岡市内の飲食店で発生したカンピロバクターによる食中毒 (集団発生例) について調査を行った。調べた 11 名グループ中 8 名が症状を訴え、便培養で 8 名全員からカンピロバクターが検出された。

臨床症状では、下痢が有症者全員にみられ、期間は 3~10 日間であった。発熱は一部に見られた。

分離された 10 菌株は、生化学的性状検査および分子生物学的検査で全て *C. jejuni* と同定された。これらの菌株は鞭毛遺伝子の解析 (*flaA* PCR-RFLP) で 2 群に分けられた (図 3)。RAPD 法および細胞致死性伸張化毒素 cytolethal distending toxin の遺伝子解析においても異なる 2 菌株であることがわかった。さらに、MLST 解析でも異なる 2 種類の ST タイプが検出され、互いに類縁関係がないことから、原因食材が由来の異なる 2 種類以上の *C. jejuni* に汚染されていたことが明らかとなった。

図 3 *flaA* PCR-RFLP (*DdeI*)



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

藤本秀土, カンピロバクター感染症, 化学療法の領域, Vol.28 (No.6) p1268~1275, 2012.

藤本秀土, カンピロバクター感染症, 日本臨床, 新領域別症候群シリーズ、感染症症候群, p190~193, 2013.

[学会発表](計 7件)

藤本秀土, 小島夫美子, 東田正二, 福岡地域のカンピロバクター臨床分離株における分子疫学解析, 第22回日本臨床微生物学会総会, 2011.01.09. 岡山.

Shuji Fujimoto, Fumiko Kojima, Yukiko Harada, Shoji Higashida, Mika Shigematsu. Molecular epidemiological analysis of *Campylobacter* infection in Fukuoka, Japan, IUMS 2011 (International Union of Microbiological Societies), 2011.09.09. Sapporo.

藤本秀土, 小島夫美子, 福岡地市内の飲食店で発生したカンピロバクター食中毒の1事例: アンケート調査と菌株解析, 第23回日本臨床微生物学会総会, 2012.01.21. 横浜.

藤本秀土, 小島夫美子, 重松美加, Molecular biological analysis on *Campylobacter* isolates associated with food poisoning., 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.11. 福岡.

藤本秀土, 重松美加, Molecular epidemiological analysis on *Campylobacter* isolates associated with food poisoning., 第85回日本細菌学会総会, 2013.03.27. 長崎.

Shuji Fujimoto, Fumiko Kojima, Mika Shigematsu, Molecular epidemiological analysis on *Campylobacter* isolates associated with food poisoning., 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013.06.07. Yokohama.

藤本秀土, 小島夫美子, 重松美加, カンピロバクター食中毒原因菌株の分子生物学的解析. 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会 合同学会, 2013.06.05. 横浜.

[図書](計 4件)

藤本秀土, 病原菌の今日的意味 改訂4版 第25章 カンピロバクター (genus *Campylobacter*), 医薬ジャーナル社, 2011.11.

藤本秀土, レビンソン微生物学・免疫学 [原書11版], 臨床細菌学 18. 腸管関連のグラム陰性桿菌丸善出版, 2012.08.

藤本秀土, 戸田新細菌学 第34版, 細菌学各論(第9章)カンピロバクター属、ヘリコバクター属とその他の類縁細菌. 南山堂, 2013.08.

藤本秀土, 内科学書 改訂第8版, 内科学総論: 病因・病態: 中毒, 4. 食中毒. 中山書店, 2013.10.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 秀土 (FUJIMOTO Shuji)  
九州大学大学院・医学研究院・教授  
研究者番号: 30199369

### (2) 研究分担者

小島夫美子 (KOJIMA Fumiko)  
九州大学大学院・医学研究院・講師  
研究者番号: 80136564

### (3) 連携研究者

重松 美加 (SHIGEMAYSU Mika)  
国立感染症研究所・感染症疫学センター・主任研究官  
研究者番号: 20299598