

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（B）海外

研究期間：2009～2011

課題番号：21406013

研究課題名（和文） タイと中国でのカンピロバクター属菌の流行状況と薬剤耐性及び我が国のそれらとの比較

研究課題名（英文） Comparative analysis of prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacters* among Thailand, China and Japan

研究代表者

山崎 伸二（YAMASAKI SHINJI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70221653

研究成果の概要（和文）：

タイ、中国、我が国の食肉からカンピロバクター属菌を分離したところ。タイでの食肉の汚染率や下痢症患者からの分離率はあまり高くなかったが、中国と我が国での食肉の汚染率は高く、下痢症患者での陽性率も高かった。また、食中毒菌に指定されている *C. jejuni* や *C. coli* 以外のカンピロバクター属菌も食肉から分離され、アルコバクター属菌の食肉汚染率が予想以上に高かった。カンピロバクター属菌はニューキノロンに対して、アルコバクター属菌はセファロチンに対して高い耐性率を示した。

研究成果の概要（英文）：

When campylobacters were attempted to isolate from various meats and specimens of diarrheal patients in Thailand, R.P. China and Japan, few strains were isolated from meats and patients with diarrhea in Thailand. However, contamination rates of meats and isolation rate from patients in R.P. China and Japan were higher. Campylobacters other than *C. jejuni* and *C. coli*, which are food poisoning-causing bacteria were also isolated from meats. *Arcobacter* spp. were also isolated from various meats with unexpectedly high rate regardless of the isolation country. Furthermore, campylobacter and arcobacter are highly resistant to fluoroquinolone and cephalotin, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：医歯薬学 B

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：カンピロバクター、アルコバクター、食肉、タイ、中国

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター属細菌による食中毒が、我が国を始め世界的に増加傾向にある。その理由として、人々の健康志向の高まりから牛や豚等の赤身肉から鶏等の白身肉の消費の

増加、それに伴う鶏の大量飼育によるカンピロバクター属細菌の汚染の拡大が考えられる。また、鶏インフルエンザの流行でタイや中国からの生の鶏肉の輸入は停止されたものの鶏肉調整品の我が国への輸入量はこの

2国でほぼ100%を占めている。

2. 研究の目的

我が国のカンピロバクター属細菌による食中毒を制御する為には、我が国で流行しているカンピロバクター属細菌の流行状況を知るだけでなく、鶏肉調整品の我が国への最大の輸出国であるタイや中国の流行状況を把握することも重要である。そこで、本研究ではタイ、中国での食品や患者検体からアルコバクターを含むカンピロバクター属細菌を分離し、我が国での流行状況や分離菌の薬剤耐性について比較することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カンピロバクター属菌検出系の構築：
16S rRNA 遺伝子を標的としたカンピロバクター属菌を検出できるPCRプライマーを設計し、標準株を用いてPCR条件を検討した。

(2) 食肉検体からカンピロバクター属菌の分離：

オープンマーケットあるいはスーパーマーケットから牛肉、豚肉、鶏肉を購入し、ボルトン培地あるいはプレストン培地で増菌培養後、mCCDA、Skirrow培地あるいはフィルター法で、微好気条件下(N₂ 85%、O₂ 5%、CO₂ 10%)で培養した。フィルター法は、血液寒天培地上に孔径0.45 μm又は0.6 μmのフィルターを乗せ、増菌液を添加し30分間放置した後、フィルターを取り除き培養する方法である。

(3) 患者検体からのカンピロバクター属菌の分離：

下痢症患者便スワブを滅菌生理食水に懸濁し、懸濁液をmCCDA、Skirrow培地あるいはフィルター法で微好気条件下(N₂ 85%、O₂ 5%、CO₂ 10%あるいはN₂ 80%、O₂ 5%、CO₂ 7.5%、H₂ 7.5%)で培養した。

(4) 分離菌の菌種の同定：

菌種の同定は生化学的性状試験、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析及び *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRにて行った。

(5) 薬剤感受性試験：

薬剤感受性試験は、ディスク法にて行った。

(6) パルスフィールドゲル電気泳動

(PFGE)：

血液寒天培地で培養した菌を滅菌したトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、融解したアガロースと混和しプラークメーカーにてプラークを作製した。*Sma*Iで消化後、CEHF Mapperを用いて切断断片を解析した。

4. 研究成果

(1) カンピロバクター属菌検出系の構築：
データベースから得られた情報を基に、少なくとも人の胃腸炎の原因になる10菌種のカンピロバクター(*Campylobacter*)属細菌(*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. lanienae*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. concisus*)を16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR(Campy 16S rRNA PCR)で検出できる系を構築した。このCampy 16S rRNA PCRで当研究室に保有する少なくとも8菌種において特異的なPCR産物を得ること、その他の菌種では非特異的なPCR産物は得られないことを確認した。

(2) 食肉からのカンピロバクター属の分離：

タイ、中国及び我が国の牛肉、豚肉及び鶏肉からカンピロバクター属菌を分離した。タイでは、牛肉34検体中*C. jejuni*が4検体、*C. coli*が1検体、*C. hyointestinalis*が1検体、*A. butzleri*が25検体、*A. cryaerophilus*が1検体、*Arcobacter* spp.が5検体から分離された。豚肉では36検体中、*C. coli*が4検体、*C. jejuni*が1検体、*C. hyointestinalis*が1検体、*A. butzleri*が20検体、*A. cryaerophilus*が2検体、*Arcobacter* spp.が5検体から分離された。一方、鶏肉45検体中、*C. jejuni*が24検体、*C. coli*が6検体、*Campylobacter-like*が1検体、*A. butzleri*が36検体、*A. skirroi*が1検体、*Arcobacter* spp.が4検体から分離された。

中国では、牛肉3検体から*A. butzleri*が1検体、豚肉5検体から*C. coli*が2検体、鶏肉4検体から*C. coli*が4検体、*C. jejuni*が3検体、*A. butzleri*が4検体、鴨肉3検体から*C. jejuni*が2検体、*C. coli*が1検体、*A. butzleri*が3検体分離された。

一方、我が国の牛肉31検体から*C. jejuni*が2検体、*C. coli*が3検体、*C. fetus*が3検体、*A. butzleri*が9検体、*A. cryaerophilus*が4検体、豚肉26検体から、*C. jejuni*が1検体、*A. butzleri*が5検体、鶏肉36検体から、*C. jejuni*が18検体、*C. coli*が3検体、*A. butzleri*が24検体分離された。

(3) 患者検体からのカンピロバクター属菌の分離：

タイの下痢症患者164検体から2検体で*C. jejuni*が、1検体で*A. butzleri*が分離された。中国では下痢症患者5検体中1検体で*C. jejuni*と*C. coli*が分離された。一方、我が国の下痢症患者1816検体から、*C. jejuni*が113検体、*C. coli*が7検体、*C. curves*が1検体、*A. butzleri*が2検体から分離された。

(4) 分離菌の薬剤感受性と PFGE パターン:

A. butzleri は分離国に関わらずセファロチンに対して 90-100%と非常に高い耐性率を示し、次いでアンピシリンとクリンダマイシンで高い耐性率であった。タイ由来株ではアジスロマイシンに対して、我が国由来株ではクロラムフェニコールに対する耐性率が最も高かった。我が国で分離された *C. jejuni* はナリジクス酸やシプロフロキサシンに対する耐性率が 90%以上と高かったが、それ以外の薬剤に対しては比較的感受性であった。一方、タイ由来株では、この2剤に加えレボフロキサシンに対しても 60%と高い耐性率であった。

食肉及び患者から分離された *C. jejuni* の PFGE パターンはそれぞれユニークであったが、一部食肉由来株と患者由来株で類似の PFGE パターンを示したものが存在した。食肉由来と患者由来で類似の PFGE パターンを示したことから、食肉から人へ *C. jejuni* の感染が起こった可能性が示唆された。

(5) 総括と考察

我が国に鶏調整品を多く輸出しているタイの食肉の *Campylobacter* による汚染率は、以外に低いことがわかった。また、この汚染率の低さは、下痢症患者での陽性率の低さに繋がっていると考えられた。

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 5 件)

1. S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Nagita, A. Matsuhisa and S. Yamasaki. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. **J. Vet. Med. Sci.**, 査読有、74:857-862, 2012.
2. S. M. Lutful Kabir, K. Kikuchi, M. Asakura, S. Shiramaru, N. Tsuruoka, A. Goto, A. Hinenoya, and S. Yamasaki. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 査読有、64: 19-26, 2011.
3. 山崎伸二: ジェジュニ、コリ以外で無視できないカンピロバクター関連細菌、日本食品微生物学会雑誌、28:86-91, 2011.
4. 山崎伸二: カンピロバクターの簡便・迅速

検査法の開発研究、化学療法の領域、27: 118-127, 2011.

5. 山崎伸二: アルコバクターについて、感染と消毒 特別講座、18: 28-32, 2011.

[学会発表] (計 21 件)

1. 四良丸 幸、西川明芳、井上春名、朝倉昌博、日根野谷 淳、山崎伸二: Evaluation of selective enrichment broths for *Campylobacter* by a real-time PCR and culture method. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 29 日、長崎
2. 朝倉昌博、西川明芳、四良丸 幸、日根野谷 淳、名木田 章、山崎伸二: Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from meats and feces of diarrheal patients in Japan. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27 日、長崎
3. 西川明芳、四良丸 幸、奥野健太郎、日根野谷淳、名木田 章、朝倉昌博、山崎伸二: 下痢症患者便からのアルコバクター属菌の分離と性状解析、第 8 回小児消化管感染症研究会、2012 年 2 月 11 日、東京
4. 四良丸 幸、西川明芳、井上春名、朝倉昌博、山崎伸二: ストップザカンピロバクター感染症 一培養に頼らない細菌検査は食の安全に貢献できるか? -、第 4 回日本カンピロバクター研究会 2011 年 12 月 3 日、麻布大学、相模原
5. 西川明芳、四良丸 幸、日根野谷 淳、名木田 章、朝倉昌博、山崎伸二: 日本の食肉及び消化器症状患者からのアルコバクター属細菌の分離、第 32 回日本食品微生物学会学術集会、2011 年 10 月 7 日、東京
6. M. Asakura, H. Inoue, S. Shiramaru, S. Nishikawa, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. *Campylobacter* isolation method using polycarbonate membrane filter. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. September 6-10, 2011, Sapporo, Japan.
7. S. Nishikawa, S. Shiramaru, A. Hinenoya, M. Asakura, and S. Yamasaki. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and feces of diarrheal patients in Japan. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* & related Organisms (CHRO2011). August 28-September 1, Vancouver, Canada.
8. M. Asakura, H. Inoue, S. Shiramaru, S. Nishikawa, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. An improved isolation method for *Campylobacters* and *Arcobacter* spp. using a polycarbonate membrane filter.

- 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* & related Organisms (CHRO2011). August 28–September 1, Vancouver, Canada.
9. S. Shiramaru, S. Nishikawa, H. Inoue, M. Asakura, A. Hinenoya, and S. Yamasaki. Comparative evaluation of PCR-based methods and conventional culture for detection of campylobacters in clinical samples. 16th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* & related Organisms (CHRO2011). August 28–September 1, Vancouver, Canada
 10. S. Shiramaru, H. Inoue, S. Nishikawa, M. Asakura, S. Samosornsuk, W. Samosornsuk, S. Yamasaki. Isolation of *Campylobacter* and *Arcobacter* strains from meat in Thailand and Japan. 45th Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections panel. December 6–8, 2010, Kyoto, Japan.
 11. S. M. L. Kabir, M. Asakura, K. Kikuchi, A. Hinenoya, S. Yamasaki. Antimicrobial resistance profiles and genotypic characterization of fluoroquinolones resistance in *C. jejuni* and *C. coli* strains isolated from diarrheal patients in Japan. 45th Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections panel. December 6–8, 2010, Kyoto, Japan.
 12. 山崎伸二:PCR法によるカンピロバクタージェジュニ・コリの迅速鑑別検査、第3回日本カンピロバクター研究会 シンポジウム I「カンピロバクター検査・診断最前線」2010年12月4日、宮崎
 13. 朝倉昌博、井上春奈、西川明芳、松久明生、山崎伸二:新規メンブランフィルター法を用いたカンピロバクター分離培養法の開発、第3回日本カンピロバクター研究会 2010年12月4日、宮崎
 14. 四良丸 幸、朝倉昌博、西川明芳、井上春奈、松久明生、Worada Samosornsuk、山崎伸二:タイと日本における食肉からのカンピロバクター、アルコバクターの分離、第3回日本カンピロバクター研究会 2010年12月4日、宮崎
 15. 四良丸 幸、井上春奈、西川明芳、朝倉昌博、松久明生、山崎伸二:Cycleave PCR® *Campylobacter (coli/jejuni)* Typing Kitを用いたカンピロバクター属細菌の迅速検査 第31回日本食品微生物学会 11月11日–12日、大津、2010
 16. 山崎伸二、四良丸 幸、井上春奈、日根野谷 淳、名木田 章、松久明生、朝倉昌博: *Campylobacter jejuni* と *C. coli* 検出用の細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子を標的とした Real-time PCR 法の開発とその応用 第150回日本獣医学会学術集会 9月16日–18日、帯広、2010
 17. S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Hinenoya, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in food sample by a *cdt*-gene based duplex real-time PCR assay. FoodMicro 2010, 30 August – 3 September, 2010. Copenhagen, Denmark
 18. 朝倉昌博、四良丸 幸、井上春奈、日根野谷 淳、名木田 章、松久明生、山崎伸二:細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子に基づくサイクリングプローブ法を用いた Real-time PCR による *Campylobacter jejuni* と *C. coli* の検出 第62回日本細菌学会関西支部総会 2009年11月、大阪
 19. S. Shiramaru, M. Asakura, H. Inoue, A. Hinenoya, A. Matsuhisa, S. Yamasaki. Development of a duplex real-time PCR assay for the detection of the cytolethal distending toxin (*cdt*) genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter*, and Related Organisms (CHRO2009), Niigata Japan, September 2–5, 2009.
 20. 井上春奈、四良丸 幸、名木田 章、朝倉昌博、松久明生、山崎伸二:カンピロバクター検査に用いる分離選択培地の詳細な検討 第2回日本カンピロバクター研究会 2009年9月2日、新潟
 21. 朝倉昌博、四良丸 幸、井上春奈、日根野谷 淳、名木田 章、松久明生、山崎伸二:細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子に基づく duplex real-time PCR 法による下痢症患者検体からの *Campylobacter jejuni* と *C. coli* の検出 第2回日本カンピロバクター研究会 2009年9月2日、新潟
- [図書] (計1件)
1. S. Yamasaki, M. Asakura, S. Shiramaru, S. B. Neogi, A. Hinenoya, W. Samosornsuk, L. Shi and T. Ramamurthy: Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Campylobacter* isolated in Asian countries. Current Topics of Infectious Diseases in Japan and Asia. Edited by K. Tanaka, Y. Niki and A. Kokaze, (Springer, Tokyo), 25–43, 2010.
- [その他]
- 講演
1. 山崎伸二: 第4回日本カンピロバクター研究会 教育講演 「選択培地の落とし穴-故きを温ね新しきを知る」2011年12月3

日 相模原

2. 山崎伸二：第 34 回日本食品微生物学会学術セミナー（神戸）「微生物検査の将来展望—遺伝子診断の応用—」2011 年 2 月 25 日、神戸
3. 山崎伸二：第 4 回日本カンピロバクター研究会 シンポジウム「PCR 法によるカンピロバクター ジェジュニ・コリの迅速鑑別検査」、2010 年 12 月 4 日、宮崎
4. 山崎伸二：e-食安全研究会 第 27 回セミナー「食品媒介病原体 “カンピロバクター関連細菌” の最新情報」～食中毒原因物質の細菌の中で最も多いカンピロバクター・ジェジュニ、・コリ以外の無視できない関連細菌の解説と検査法について～ 2010 年 11 月 24 日、大阪
5. 山崎伸二：第 31 回日本食品微生物学会 シンポジウム II 「今、注目すべき食品媒介病原体」 「ジェジュニ、コリ以外の無視できないカンピロバクター関連細菌」2010 年 11 月 12 日、大津
6. 山崎伸二：第 31 回日本食品微生物学会 ランチョンセミナー「食品媒介性病原微生物の遺伝子検査技術」タカラバイオ主宰、2010 年 11 月 12 日、大津
7. 山崎伸二：第 26 回大阪小児栄養消化器病懇話会 特別講演「小児下痢症患者便からのカンピロバクターの迅速検査」2010 年 11 月 6 日、大阪
8. 山崎伸二：神戸食品微生物研究会研修会「最近の食中毒発生状況と検査法について—大腸菌、カンピロバクター検査法の最新情報について—」、2009 年 9 月 29 日、神戸
9. S. Yamasaki. The 6th Annual Meeting Showa International Symposium for Life Sciences, Current Topics of Infectious Diseases in Japan and Asia 「Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Campylobacters* isolated in Asian countries」September 19th 2009, Showa University, Tokyo.
10. 山崎伸二：第 32 回日本食品微生物学会学術セミナー：今、あらためて問う、食品の品質感知体制のありかた「カンピロバクター食中毒と迅速検査法」、2009 年 7 月 31 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 伸二 (YAMASAKI SHINJI)
大阪府立大学生命環境科学研究科 教授
研究者番号：7 0 2 2 1 6 5 3

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

塚本 定三 (TSUKAMOTO TEIZO)
大阪府立大学 生命環境科学研究科
客員研究員
研究者番号：8 0 2 5 0 3 1 4

朝倉 昌博 (ASAKURA MASAHIRO)
大阪府立大学 生命環境科学研究科
客員研究員
研究者番号：1 0 5 2 9 1 4 2