

# 1996年から2018年に福岡市で分離した *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の薬剤感受性及び食中毒事例等の PCR-RFLP 解析

古賀舞香・中野朝美・田上紗弥加・光安志織・松永典久

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Antimicrobial Susceptibility and PCR-RFLP Analysis of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated in Fukuoka City (1996–2018)

Maika KOGA, Asami NAKANO, Sayaka TANOUE, Shiori MITSUYASU  
and Norihisa MATSUNAGA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### Summary

We evaluated the antimicrobial susceptibility and PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Fukuoka City between 1996 and 2018. Antimicrobial susceptibility tests showed that most strains were resistant to the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>-generation cephalosporin agents but were sensitive to the 4<sup>th</sup>-generation agent. *C. coli* had significantly higher resistance to nine agents than did *C. jejuni*. The resistance of human-derived *C. coli* to selected quinolone agents was assessed to be 87.0–90.7%, which is higher than that of human-derived *C. jejuni*, animal-derived *C. jejuni*, and animal-derived *C. coli* (27.6–43.2%). In addition, from PCR-RFLP analysis of food poisoning cases, the relationship between isolated strains was inferred.

**Key Words** : カンピロバクタージェジュニ・コリ *Campylobacter jejuni/coli*, 薬剤感受性 antimicrobial susceptibility, 食中毒 food poisoning, PCR-RFLP Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism

### 1 はじめに

*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (*C. jejuni*) 及び *Campylobacter coli* (*C. coli*) は食中毒の病因物質の一つで、カンピロバクター症の有症者数は日本全国で年間150万人にもものぼると推定されており<sup>1)</sup>、その公衆衛生学的重要性は大きい。

カンピロバクター症は、JAID/JSC 感染症治療ガイドライン<sup>2)</sup>に示されるように一般的には補液などの対症療法のみで自然軽快することがほとんどであるが、重症例や免疫不全者の場合などには抗菌薬の投与が適応となるため、抗菌薬の投与は治療における選択肢の一つとなっている。一方、*C. jejuni/coli* はキノロン系薬剤への耐性化が世界的に進んでいる。このため、現在はマクロライド系薬が第一選択となっているが、近年マクロライド耐性の菌も出現してきており問題となっている。さらに、*C. jejuni/coli* は主に鶏が消化管内に保菌することから、動物用抗菌性物質の影響を受けているものと推察され、

薬剤耐性の実態を調査することは厚生労働省が提唱しているワンヘルス・アプローチの面からも重要である。こうした状況から、*C. jejuni/coli* の薬剤耐性の実態を把握する必要性が高まってきている。そこで、福岡市における *C. jejuni/coli* の薬剤耐性状況の把握を目的として、ヒトの便、市販鶏肉等から分離した菌株の薬剤感受性試験を行った。

また、食中毒事例及び食中毒疑い事例（以下、「食中毒事例等」とする。）の調査において、感染経路及び原因食品を推定するためには、事例内で分離された *C. jejuni/coli* が同一株であるか否かが重要となる。*C. jejuni/coli* の分子疫学的解析法には、Multilocus Sequence Typing (MLST) 法、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法等があるが、いずれも手技が煩雑でありコストも高く、本市では詳細な解析を行っていない。そこで、MLST 法や PFGE 法よりも操作が簡便でコストも低い Polymerase Chain Reaction based Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法による

遺伝子型別解析を行ったので、薬剤感受性試験結果と合わせて報告する。

## 2 方法

### 2.1 薬剤感受性試験

#### 2.1.1 供試菌株

1996年から2018年までの間に当所で分離し保存した1,158株のうち、復帰できた878株(*C. jejuni* 787株, *C. coli* 91株)を用いた。菌株の由来一覧をTable 1, 2に示す。食中毒事例等における有症者、従事者及び無症者の便から分離した株をヒト由来株とした。また、食中毒事例等、収去検査等における鶏肉、豚肉、牛肉、器具のふき取り等から分離した株を動物等由来株とした。分離方法は、糞便、食品、ふき取り液等を原則、プレストン培地(日研生物)又はボルトン培地(Oxoid)に接種して42°Cで24~48時間好気培養し、その培養液をバツラー培地(Oxoid)及びmodified charcoal cefoperazone desoxycholate agar (mCCDA)培地(Oxoid)に塗抹して42°Cで24~48時間好気培養した。いずれかの培地で*C. jejuni/coli*を疑う集落があった場合には、その集落を、原則、形態観察、生化学性状試験及び遺伝子検査法によりカンピロバクター属菌の同定を行った。分離株は試験に供するまで-80°Cで20%グリセリン(富士フィルム和光純薬)添加ミューラーヒントン液体培地(ベクトン・ディッキンソン)中に保存した。

Table 1 Source of samples and number of isolates strains

|       | Source of sample                        | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | total |
|-------|---|------------------|----------------|-------|
| human | Food poisoning cases                    | 421              | 54             | 475   |
|       | Food poisoning cases                    | 78               | 15             | 403   |
|       | Administrative surveillance inspections | 288              | 22             |       |

Table 2 Origin of samples and number of isolates strains

|         | Origin of sample    | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | total |
|---------|---------------------|------------------|----------------|-------|
| human   | patient             | 385              | 49             | 475   |
|         | employee            | 29               | 5              |       |
|         | asymptomatic person | 7                | 0              |       |
| animals | chicken             | 349              | 31             | 403   |
|         | pork                | 0                | 5              |       |
|         | beef                | 11               | 1              |       |
|         | instrument          | 6                | 0              |       |

#### 2.1.2 試験方法

米国臨床検査標準協会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)の提唱する微量液体希釈法<sup>3)</sup>に従い、Table 3に示す16薬剤(キノロン系のナリジクス酸(NA)、ニューキノロン系のシプロフロキサシン(CPFX)、ノルフロキサシン(NFLX)及びオフロキサシン(OFLX)、サルファ剤であるスルファメソキサゾールとトリメトプリムの合剤(ST)、ペニシリン系のアンピシリン(ABPC)、セファロスポリン系のセファレキシシン(CEX)、セフォキシチン(CFX)、セフトチブテン(CETB)及びセフェピム(CFPM)、ホスホマイシン系のホスホマイシン(FOM)、アミドグリコシド系のゲンタマイシン(GM)、テトラサイクリン系のテトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール系のクロラムフェニコール(CP)並びにマクロライド系のエリスロマイシン(EM)及びクラリスロマイシン(CAM))について、ドライプレート‘栄研’(栄研化学)を使用し、最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)を測定した。

各薬剤の薬剤濃度、精度管理限界値をTable 3に示した。精度管理は、*C. jejuni* ATCC 33560株を用いて実施した。耐性限界値(以下、「BP」とする。)はCLSI<sup>3)</sup>又はJVARM(Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)<sup>4)</sup>が規定したものについてはその値とし、その他の薬剤は、それぞれの抗菌剤に耐性を示した株をプロットし、2峰性以上の分布をした場合に、各ピーク値の中間値を耐性のBPとした。また、BP<MICである株は薬剤に耐性(R)、BP>MIC(1管)である株は薬剤に中間(I)、BP>MIC(2管以上)である株は薬剤に感性(S)であると判定した。

また、MICの結果から、50%の菌株の発育を阻止した濃度であるMIC<sub>50</sub>、90%の菌株の発育を阻止した濃度であるMIC<sub>90</sub>を求めた。

耐性率については、薬剤に耐性と判定した菌株数を全体の菌株数で除することにより求め、各薬剤に対する菌種別の耐性率の有意性については $\chi^2$ 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意水準として統計処理した。

### 2.2 PCR-RFLP

#### 2.2.1 供試菌株

1996年から2018年までの間に当所で検査を実施した食中毒事例等の253事例を情報解析し、一つの事例において患者由来菌株が複数復帰できた86事例・391株等を試験に供した。

Table 3 Antimicrobial agents used in this survey and quality control limit values

| Antimicrobial class | Antimicrobial agent               | Concentration (µg/mL) | Accuracy control                            |                |            |            |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|---|----------------|------------|------------|
|                     |                                   |                       | limit(µg/mL) ( <i>C. jejuni</i> ATCC 33560) | Break point    | Reference  |            |
| quinolone           | nalidixic acid (NA)               | 1-32                  | 8-32  | 32             | JVARM      |            |
|                     | ciprofloxacin(CPFX)               | 0.12-4                | 0.12-1                                      | 4              | CLSI       |            |
| new quinolone       | norfloxacin(NFLX)                 | 0.5-16                | Not determined                              | 4              | this study |            |
|                     | ofloxacin(OFLX)                   | 0.25-8                | Not determined                              | 4              | this study |            |
| sulfonamide         | sulfamethoxazole-trimethoprim(ST) | 4.75/0.25-76/4        | Not determined                              | 9.5            | this study |            |
| β-lactam            | penicillin                        | ampicillin(ABPC)      | 1-32  | Not determined | 32         | JVARM      |
|                     | first-generation cephalosporin    | cephalexin(CEX)       | 1-32  | Not determined | 2          | this study |
|                     | second-generation cephalosporin   | cefoxitin(CFX)        | 1-32  | Not determined | 2          | this study |
|                     | third-generation cephalosporin    | ceftibuten(CETB)      | 1-32  | Not determined | 2          | this study |
|                     | fourth-generation cephalosporin   | cefepime(CFPM)        | 1-32  | Not determined | 32         | this study |
| fosfomycin          | fosfomycin(FOM)                   | 4-128                 | Not determined                              | 128            | this study |            |
| aminoglycoside      | gentamicin(GM)                    | 0.5-16                | 0.5-4                                       |                | None       |            |
| tetracycline        | tetracycline(TC)                  | 0.5-16                | 1-4   | 16             | CLSI       |            |
| chloramphenicol     | chloramphenicol(CP)               | 1-32                  | 1-8   | 16             | JVARM      |            |
| macrolide           | erythromycin(EM)                  | 1-32                  | 1-8   | 32             | CLSI       |            |
|                     | clarithromycin(CAM)               | 1-32                  | Not determined                              | 32             | this study |            |

## 2.2.2 試験方法

熱抽出法 (100°C, 10 分加熱処理. 13,000 × g, 1 分遠心.) により DNA を抽出した. PCR 条件を Table 4~6 に示す. PCR 産物 10 µL に対して, 2 種類の制限酵素 (DdeI 及び HinfI, TAKARA) それぞれ 3U を添加した反応バッファー25 µL を混ぜ, 37°C で 3 時間反応させた後, 2200 TapeStation (DNA/RNA 分析用全自動電気泳動システム, Agilent) を用いて泳動を行った. 事例別に菌株のバンドパターンでの分類を行い, DdeI については大文字, HinfI については小文字のアルファベットを A から順に付した.

Table 4 Primers

| Sequence (5'→3')                | Reference |
|---------------------------------|-----------|
| Forward ATGGGATTTTCGTATTAACAC   | 5)        |
| Reverse CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG |           |

Table 5 Reagent composition

|   |       |
|---|-------|
| 2x Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit) | 25 µL |
| DW  | 18 µL |
| Forward Primer (10 µM)                                      | 1 µL  |
| Reverse Primer (10 µM)                                      | 1 µL  |
| DNA template  | 5 µL  |

Table 6 PCR reaction conditions

|                    | Temperature (°C) | Time (min) |
|--------------------|------------------|------------|
| Denaturation       | 95               | 5          |
| Denaturation (×35) | 95               | 0.5        |
| Annealing (×35)    | 50               | 1.5        |
| Extension (×35)    | 72               | 1.5        |
| Final Ext          | 68               | 10         |
| Cool down          | 4                | hold       |

## 3 実験結果

### 3.1 薬剤感受性試験

878 株の各薬剤に対する MIC 分布と耐性率を Table 7 に示す. なお, GM は CLSI で BP が設定されておらず, また, MIC の分布も二峰性でないことから, BP を設定できなかったため, 耐性率等は算出しなかった.

*C. jejuni/coli* 両菌種併せての耐性率は ST, CEX, CFX, CETB, NFLX, CPFX, OFLX, NA, TC, ABPC, FOM, EM, CAM, CFPM, CP の順で高かった. 第一~三世代セファロsporin系の CEX, CFX 及び CETB はほとんどの株が耐性を示したが, 第四世代の CFPM は感受性を保っていた.

Table 7 MIC distribution and antimicrobial resistance of 878 *C. jejuni/coli* strains isolated from humans and animals

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | ≦1 ->32           | 4                         | >32                       | 34.6           |
| CPFEX               | ≦0.12 ->4         | 0.5                       | >4                        | 36.3           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | 1                         | >16                       | 37.2           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | 1                         | >8                        | 36.2           |
| ST                  | ≦4.75 - 76        | >76                       | >76                       | 99.0           |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 4                         | 32                        | 11.7           |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.9           |
| CFX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.9           |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.6           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.9            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 16                        | 64                        | 5.9            |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 34.2           |
| CP                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.7            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 3.1            |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 3.1            |

次に、菌種別の各薬剤に対する MIC 分布と耐性率を Table 8, 9 に示す。 *C. jejuni/coli* それぞれの耐性率について  $\chi^2$  検定を行った結果、 *C. coli* は *C. jejuni* に比べて NA (p<0.001), CPFEX (p<0.001), NFLX (p<0.001), OFLX (p<0.001), FOM (p=0.031), TC (p<0.001), CP (p=0.001), EM (p<0.001), CAM (p<0.001) において耐性率が有意に高値であった。特に、マクロライド系の EM 及び CAM について、 *C. jejuni* は耐性率 1.4%であったのに対して、 *C. coli* は耐性率 17.6%と 10 倍以上の差があったが、他の剤の耐性率の差は、大きいものでも 2 倍程度であった。なお、 ABPC は *C. jejuni* の方が *C. coli* より耐性率が高かったが有意差があるとは言えなかった。

Table 8 MIC distribution and antimicrobial resistance of 787 *C. jejuni* strains isolated from humans and animals

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | ≦1 ->32           | 4                         | >32                       | 31.3           |
| CPFEX               | ≦0.12 ->4         | 0.25                      | >4                        | 32.5           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 33.4           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | 0.5                       | >8                        | 32.3           |
| ST                  | ≦4.75 - 76        | >76                       | >76                       | 98.9           |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 4                         | 32                        | 12.3           |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.9           |
| CFX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.7           |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.6           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.9            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 8                         | 32                        | 5.3            |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 32.1           |
| CP                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.4            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 1.4            |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 1.4            |

Table 9 MIC distribution and antimicrobial resistance of 91 *C. coli* strains isolated from humans and animals

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | 2 ->32            | >32                       | >32                       | 63.7           |
| CPFEX               | ≦0.12 ->4         | >4                        | >4                        | 69.2           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | >16                       | >16                       | 70.3           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | >8                        | >8                        | 70.3           |
| ST                  | 19 - 76           | >76                       | >76                       | 100.0          |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 4                         | 16                        | 6.6            |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.9           |
| CFX                 | 11 ->32           | >32                       | >32                       | 100.0          |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.9           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 4                         | 1.1            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 8                         | 128                       | 11.0           |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | 16                        | >16                       | 51.6           |
| CP                  | ≦1 ->32           | 2                         | 4                         | 3.3            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 17.6           |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 17.6           |

さらに、由来別の各薬剤に対する MIC 分布と耐性率を菌種別に Table 10~13 に示す。キノロン系の NA 並びにニューキノロン系の CPFEX, NFLX 及び OFLX について、ヒト由来 *C. jejuni*、動物等由来 *C. jejuni* 及び動物等由来 *C. coli* の耐性率は 27.6~43.2%であるのに対して、ヒト由来 *C. coli* の耐性率は 87.0~90.7%であった。

Table 10 MIC distribution and antimicrobial resistance of 421 *C. jejuni* strains isolated from humans

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | ≦1 ->32           | 8                         | >32                       | 34.4           |
| CPFEX               | ≦0.12 ->4         | 0.25                      | >4                        | 36.1           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | 1                         | >16                       | 36.6           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | 1                         | >8                        | 35.9           |
| ST                  | ≦4.75 - 76        | >76                       | >76                       | 99.3           |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 4                         | 32                        | 13.3           |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 99.8           |
| CFX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 99.5           |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 99.5           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 1.0            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 16                        | 32                        | 3.6            |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 30.4           |
| CP                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.2            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 0.2            |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 0.2            |

Table 11 MIC distribution and antimicrobial resistance of 366 *C. jejuni* strains isolated from animals

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | ≦1 ->32           | 4                         | >32                       | 27.6           |
| CPFX                | ≦0.12 ->4         | ≦0.12                     | >4                        | 28.4           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 29.8           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | 0.5                       | >8                        | 28.1           |
| ST                  | ≦4.75 - 76        | >76                       | >76                       | 98.4           |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 4                         | 32                        | 11.2           |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 97.8           |
| CFX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 97.8           |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 97.5           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.8            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 8                         | 32                        | 7.4            |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | ≦0.5                      | >16                       | 34.2           |
| CP                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 0.5            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 2.7            |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 2.7            |

Table 12 MIC distribution and antimicrobial resistance of 54 *C. coli* strains isolated from humans

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | 2 ->32            | >32                       | >32                       | 87.0           |
| CPFX                | ≦0.12 ->4         | >4                        | >4                        | 88.9           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | >16                       | >16                       | 90.7           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | >8                        | >8                        | 88.9           |
| ST                  | 19 - 76           | >76                       | >76                       | 100.0          |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 8                         | 16                        | 9.3            |
| CEX                 | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 100.0          |
| CFX                 | 11 ->32           | >32                       | >32                       | 100.0          |
| CETB                | ≦1 ->32           | >32                       | >32                       | 98.1           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 4                         | 0.0            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | 16                        | 128                       | 16.7           |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | 16                        | >16                       | 53.7           |
| CP                  | ≦1 ->32           | 2                         | 4                         | 1.9            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 16.7           |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 16.7           |

Table 13 MIC distribution and antimicrobial resistance of 37 *C. coli* strains isolated from animals

| Antimicrobial agent | MIC range (μg/mL) | MIC <sub>50</sub> (μg/mL) | MIC <sub>90</sub> (μg/mL) | Resistance (%) |
|---------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NA                  | 2 ->32            | 8                         | >32                       | 29.7           |
| CPFX                | ≦0.12 ->4         | 0.25                      | >4                        | 40.5           |
| NFLX                | ≦0.5 ->16         | 1                         | >16                       | 43.2           |
| OFLX                | ≦0.25 ->8         | 1                         | >8                        | 43.2           |
| ST                  | 38 - 76           | >76                       | >76                       | 100.0          |
| ABPC                | ≦1 ->32           | 2                         | 8                         | 2.7            |
| CEX                 | 32 ->32           | >32                       | >32                       | 94.6           |
| CFX                 | 32 ->32           | >32                       | >32                       | 100.0          |
| CETB                | 2 ->32            | >32                       | >32                       | 89.2           |
| CFPM                | ≦1 ->32           | ≦1                        | 2                         | 2.7            |
| GM                  | ≦0.5              | -                         | -                         | -              |
| FOM                 | ≦4 ->128          | ≦4                        | 64                        | 2.7            |
| TC                  | ≦0.5 ->16         | 4                         | >16                       | 48.6           |
| CP                  | ≦1 ->32           | 2                         | 2                         | 5.4            |
| EM                  | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 18.9           |
| CAM                 | ≦1 ->32           | ≦1                        | ≦1                        | 18.9           |

### 3.2 PCR-RFLP

復帰できた患者由来菌株が複数あった事例のうち、患者由来菌株のバンドパターンが全て一致した事例が約 4 割あり、また、一部一致した事例を含めると、全体の約 7 割において、バンドパターンが一致した。今回の解析において事例内で菌株間の関連性が認められた例をいくつか示す。

#### 3.2.1 修学旅行中の食中毒事例

2017 年、市内の中学校において修学旅行で大阪、京都及び奈良に行った生徒約 270 名のうち 167 名が下痢、腹痛、発熱等を発症した。患者 20 名、関連施設 A (福岡市) の従事者 6 名、ふき取り 8 検体及び検食 1 検体並びに関連施設 B (B 市) の従事者 16 名、ふき取り 24 検体及び検食 92 検体を、当所及び B 市にて検査し、患者 13 名及び関連施設 B の従事者 1 名から *C. jejuni* を検出した。保健所の調査の結果、原因施設及び食品は特定されなかったが、医師により複数の患者の食中毒患者等届出票が提出されたこと、潜伏期間及び症状がカンピロバクターによる食中毒と一致すること、並びに、医療機関による検便及び行政検便にて *C. jejuni* が検出されたことから病因物質は *C. jejuni* と断定された。さらに発症日時の流行曲線の形状が一峰性であることから、旅行中の飲食物が原因のカンピロバクター食中毒であると判断された。

患者由来 13 株について PCR-RFLP を行った結果、当所で分離した患者由来菌株のバンドパターンが全て一致した (Fig. 1, Table 14)。

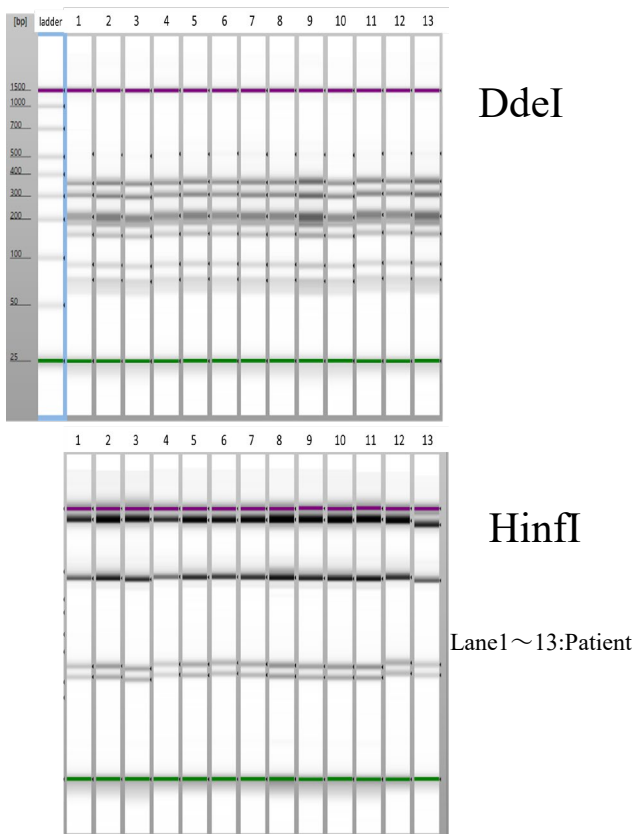


Fig. 1 PCR-RFLP pattern (Cases in a school excursion)

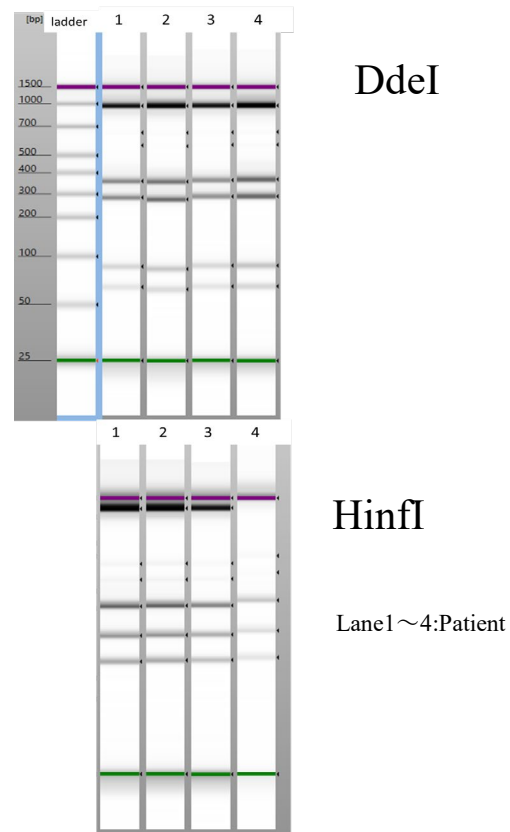


Fig. 2 PCR-RFLP pattern (Cases in meals with relatives)

Table 14 Grouping of PCR-RFLP pattern  
(Cases in a school excursion)

|                  | Lane | DdeI | HinfI |
|------------------|------|------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | 1~13 | A    | a     |

Table 15 Grouping of PCR-RFLP pattern  
(Cases in meals with relatives)

|                  | Lane | DdeI | HinfI |
|------------------|------|------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | 1~4  | A    | a     |

### 3.2.2 親族グループにおける食中毒事例

2009年, 市内飲食店で1グループ27名が鶏ささみ刺, 鶏肝のたれ煮, 手羽先の唐揚げ, 鶏の水炊き, 雑炊等を喫食し, 8名が腹痛, 下痢, 発熱等を発症した. 保健所による調査の結果, 患者の共通食は当該飲食店で提供された食品のみであった. 患者8名, 飲食店従事者3名及び施設のふき取り4検体を検査し, 患者4名から *C. jejuni* を検出した.

患者由来 *C. jejuni* 4株について PCR-RFLP を行った結果, バンドパターンが全て一致した (Fig. 2, Table 15) .

### 3.2.3 患者, 従事者及び参考品からカンピロバクター属菌を検出した食中毒事例

2009年の初夏, 市内飲食店で8名が鶏レバーの刺身を含む鶏料理を喫食し, うち6名が下痢, 腹痛, 発熱等を発症した. 患者4名, 飲食店従事者3名及び参考品 (鶏レバー) 1検体を検査し, 患者2名, 飲食店従事者3名及び参考品1検体から *C. jejuni* を検出した.

患者1名, 飲食店従事者3名, 参考品 (鶏レバー) 由来の計5株について PCR-RFLP を行った結果, 患者, 飲食店従事者2名及び参考品 (鶏レバー) の4株のバンドパターンが一致した (Fig. 3, Table 16) .

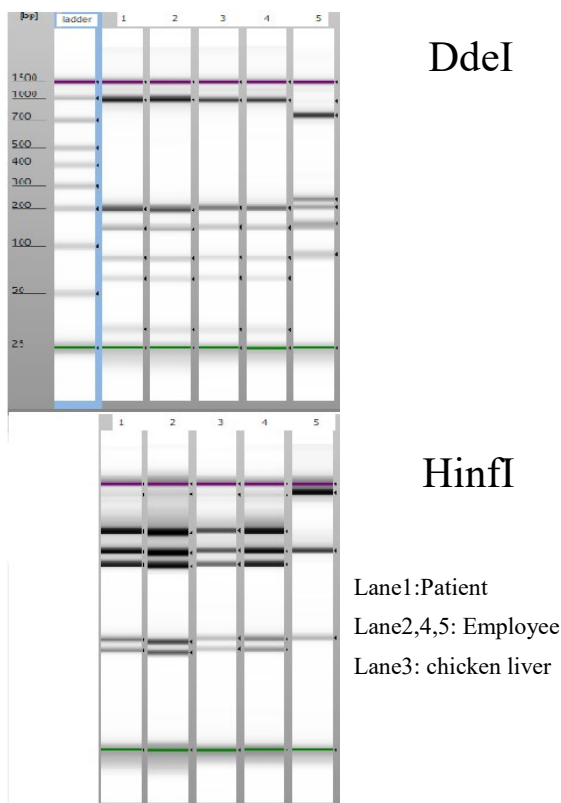


Fig. 3 PCR-RFLP pattern (Cases in which *Campylobacter* was detected in patient, employees and chicken liver)

Table 16 Grouping of PCR-RFLP pattern (Cases in which *Campylobacter* was detected in patient, employees and chicken liver)

|                  | Lane | DdeI | HinfI |
|------------------|------|------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | 1~4  | A    | a     |
|                  | 5    | B    | b     |

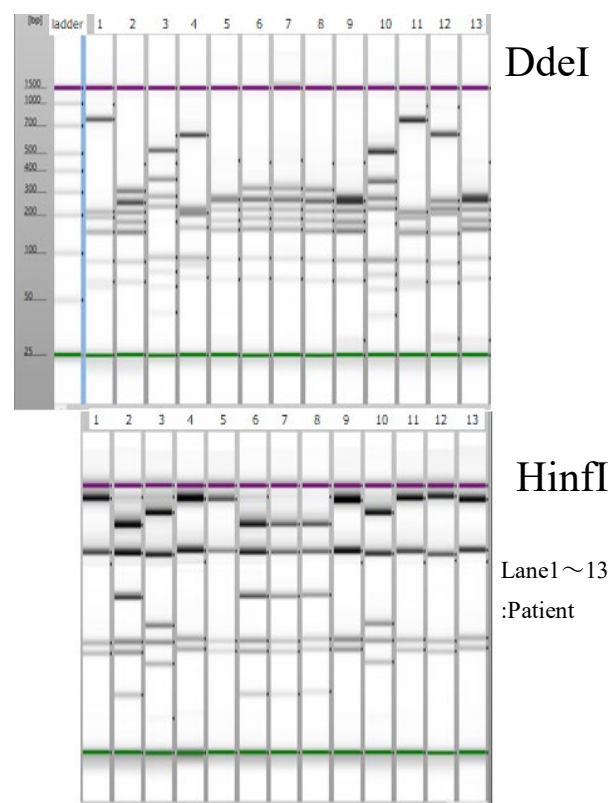


Fig. 4 PCR-RFLP pattern (Cases in an overseas school excursion)

Table 17 Grouping of PCR-RFLP pattern (Cases in an overseas school excursion)

|                  | Lane       | DdeI | HinfI |
|------------------|------------|------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | 1, 11      | A    | a     |
|                  | 4          | D    |       |
|                  | 12         | F    |       |
| <i>C. coli</i>   | 2, 6, 7, 8 | B    | b     |
|                  | 3, 10      | C    | c     |
|                  | 5          | E    | d     |
|                  | 9, 13      | E    | a     |

### 3. 2. 4 海外への修学旅行中の食中毒事例

2017年の冬に市内高校の海外修学旅行に参加した225名のうち118名の生徒・引率者が体調不良となった(全てが食中毒によるものであったかは不明)。当所に検査依頼のあった患者23名のうち13名から、*C. jejuni* 5株、*C. coli* 9株を検出した(1名は*C. jejuni/coli*検出)。原因食品は特定されなかったが、調査においてチキンライスの鶏肉が半生であったという多数の証言が得られた。

患者由来の13株についてPCR-RFLPを行った結果、*C. jejuni* 3種類及び*C. coli* 4種類のバンドパターンが得られ、一部一致していた(Fig. 4, Table 17)。

## 4 考察

一般的に、MIC<sub>90</sub>が低い場合は大部分の株が感受性であり、MIC<sub>50</sub>が高い場合には大部分が耐性化していると判断でき、MIC<sub>90</sub>とMIC<sub>50</sub>の幅が広い場合には耐性株が増加、あるいは、耐性化傾向にあると考えることができる<sup>6)</sup>。薬剤感受性試験の結果、CFPM、CP、EM及びCAMは、MIC<sub>50</sub>とMIC<sub>90</sub>の差がない、又は1管差であり、かつ、MIC<sub>90</sub>が低かったことから、感受性が保たれており、ST、CEX、CFX及びCETBはMIC<sub>50</sub>が高く、大部分が耐

性であった。また、NA, CPF, NFLX, OFLX, ABPC, FOM 及び TC は、MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> の差が 2 管以上あったことから、耐性化傾向にあることが推察された。

キノロン系薬剤の NA 及びニューキノロン系薬剤の CPF については、由来及び菌種別の耐性率において、大石らの報告<sup>7)</sup>、すなわちヒト由来 *C. coli* は、食肉由来 *C. jejuni*、ヒト由来 *C. jejuni* 及び食肉由来 *C. coli* と比較して耐性率が高かったという報告と一致していた。また、菌種別の耐性率において、衛生微生物技術協議会研究会におけるレファレンス委員会活動報告<sup>8)</sup> による 2005～2008 年の下痢散発事例で収集された *C. jejuni/coli* の耐性率と比較し、*C. jejuni* においては大きな差はみられなかったが、*C. coli* ではやや高い傾向を示した。本市で分離された *C. coli* がニューキノロン系薬剤に対してやや高い耐性率を示した理由は不明であるが、今後も薬剤耐性状況に注視していく必要がある。

今回、PCR-RFLP 法を用いた食中毒事例等における保存菌株の分子疫学的解析の結果、復帰できた患者由来菌株が複数あった 86 事例のうち、患者由来菌株のバンドパターンが全て一致した事例は約 4 割に当たる 35 事例であった。菌株のバンドパターンが一致した場合は、患者は単一の *C. jejuni/coli* に汚染された同一食品を喫食したと推察される。また、患者由来菌株のバンドパターンが全て一致した事例のうち、残品から *C. jejuni/coli* を分離した事例は無かったが、参考品から分離した事例が 7 事例あり、うち 2 事例は患者由来菌株のバンドパターンと一致した。原因食品と参考品の関連性の強弱はさまざまであるが、食材の仕入れ先が継続して同一の *C. jejuni/coli* に汚染されていたことも考えられる。さらに、患者由来菌株のバンドパターンが全て一致した 35 事例の中で、原因施設の従事者から *C. jejuni/coli* を分離した事例が 4 事例あり、うち 2 事例は患者由来菌株のバンドパターンと一致した。この 2 事例は、客に提供された原因食と従事者のまかない食の原材料が共通していたこと、器具の洗浄不足などにより同一の菌に汚染されていたこと等も考えられる。また、患者由来菌株のバンドパターンが複数のグループに分かれた事例もあり、この場合は、原因食品が複数種類の *C. jejuni/coli* に汚染されていた可能性が考えられた。このようにいくつかの事例においては、PCR-RFLP 解析を行うことにより、事例内の菌株間の関連性を推察することができた。

本研究において、患者由来菌株の PCR-RFLP の結果、同一のバンドパターンが得られなかった事例が全体の 3

割弱であった。その理由の一つとして、試験に供した菌株が保存菌株に限られていたことが考えられる。本市ではこれまで、1 検体 1 菌種につき 1 株の保存を行ってきたため、原因食品が複数の株に汚染されていた場合、保存菌株は全ての株を保存できていないことになる。実際の食中毒発生時に分子疫学的解析を行う際には、患者等から分離した複数の株を解析することにより、事例のより詳細な解析が可能となると予想された。今後、行政側に有益な情報を還元し、全市的にカンピロバクター食中毒の発生低減へ役立てるため、実用化にむけてさらなる検討を行っていきたい。

## 文献

- 1) 窪田邦宏, 他: 食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究, 分担研究報告書, 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業, 2010
- 2) 一般社団法人日本感染症学会, 公益社団法人日本化学療法学会, JAID/JSC 感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会腸管感染症ワーキンググループ: JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015—腸管感染症一, 2016
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria M45, 3rd ed., 2015
- 4) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Report on the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System 2016-2017, 2020
- 5) TRUDY M. WASSENAAR, et al: Genotyping of *Campylobacter* spp., APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1~9, 2000
- 6) 農林水産省動物医薬品検査所検査第二部抗生物質製剤検査室: 薬剤耐性菌についての Q&A, 第二版, 2010
- 7) 大石明, 他: 食肉およびヒトの便から分離した *Campylobacter jejuni/coli* の薬剤感受性試験並びに耐性遺伝子変異の検討, 感染症学雑誌, 89(2), 244~253, 2015
- 8) 食品安全委員会通知府食第 368 号別添: 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル～鶏肉等における *Campylobacter jejuni/coli* ～ (改訂版), 令和 3 年 6 月 22 日



### 要約

1996～2018年に福岡市で分離した *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* について、薬剤感受性試験及び PCR-RFLP 解析を行った。薬剤感受性試験の結果、第1～3世代セファロsporin系薬剤はほとんどの株が耐性を示したが、第4世代の薬剤は感受性を保っていた。9種の薬剤において *C. coli* は *C. jejuni* に比べて耐性率が有意に高値であった。また、キノロン系1種及びニューキノロン系3種について、ヒト由来 *C. coli* の耐性率は87.0～90.7%であり、ヒト由来 *C. jejuni*、動物等由来 *C. jejuni* 及び動物等由来 *C. coli* (27.6～43.2%) に対して高い傾向であった。さらに、食中毒事例等の PCR-RFLP 解析により、分離された菌株間の関係性を推察できると考えられた。