

21. 大阪府内の河川水におけるカンピロバクター汚染状況

調査

○梅川 奈央 （地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所）

【研究目的】

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*)は我が国の主要な胃腸炎起因菌であるが、カンピロバクター腸炎の多くは感染源不明である。海外では本菌に汚染された河川水等がヒトへの感染に寄与することが示唆されているが、大阪府内では河川水等における本菌の定期的なモニタリングは行われていない。そこで本研究ではカンピロバクターの河川水を介したヒトへの健康危害リスクを評価することを目的とし、培養法とリアルタイムPCR法を用いて河川水における「感染能を持つ生きたカンピロバクター」の汚染状況を調査した。

【研究の必要性】

カンピロバクターは鳥類、牛、豚など動物の消化管に広く分布し、ヒトに感染すると発熱、腹痛、下痢を引き起こす。稀に敗血症や髄膜炎、難治性の神経疾患であるギラン・バレー症候群などの重篤な合併症を起こすこともある¹⁾。カンピロバクター腸炎は本菌が付着した加熱不十分な食肉の喫食が主な原因とされるが、多くは感染源不明であり、食品以外が感染源となっている可能性がある。

環境においても、家禽や家畜、さらには野生動物の糞便に由来すると考えられるカンピロバクターが国内の河川や湖水等から分離されている。過去には塩素消毒が不十分であった水道水が感染源となり集団感染が発生した²⁾。また海外ではレクリエーション水がヒトへの感染に寄与しているとも言及されている。しかしながら、日本では水道原水やレクリエーション水として利用される河川水の微生物モニタリングにおいて、カンピロバクターは対象となっていない。そこで、国内の河川水がヒトに健康危害を及ぼすリスクを有するかどうかを把握することの手始めとして、大阪府内河川水におけるカンピロバクターの汚染状況を調査することが必要であると考えた。

【研究計画】

1. サンプリング

大阪府内を流れる淀川の3地点（図1）において、河岸より表層水を採取した。2019年9月から2020年8月まで1か月に1回採水し、合計36試料を採取した。

2. リアルタイムPCR法によるカンピロバクター (*C. jejuni*/*C. coli*)の検出

河川水試料2Lを、孔径0.2 μmのメンブレンフィルター（ポリカーボネート）で吸引ろ過した後、メンブレンを滅菌生理食塩水2mlに懸濁して1000倍濃縮試料を作製した。濃縮試料の一部については、生菌由来のDNAのみが増幅されるように、選択的膜透過性色素（エチジウムモノアザイト：EMA）処理を行った。EMA処理および未処理サンプルについて、DNAを抽出し、リアルタイムPCR法により定量および定性的に*C. jejuni*/*C. coli*遺伝子を検出した。定量PCRはLiuらの方法³⁾に従い、定性PCRはCycleavePCR™ *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit（タカラバイオ）を使用した。

3. 培養法によるカンピロバクター属菌の検出

河川水試料1Lを、孔径0.2 μmのメンブレンフィルター（セルロース混合エステル）で吸引ろ過し、メンブレン上に細菌を捕集した。メンブレンをBolton培地で一次増菌後、培養液をPreston培地に接種し二次増菌を行った（2段階増菌培養⁴⁾）。増菌培養液をButzler培地およびSkirrow培地に塗抹し分離培養を行った後、平板上の濃厚発育部位をかき取りNHイムノクロマトカンピロバクター（日本ハム）を用いてカンピロバクターの検出を行った。カンピロバクターが検出された平板上からコロニーを分離し、MALDI Biotyper（Bruker）により分離株の菌種同定を行った。

4. 分離株の解析

4.1 MLST (Multi locus sequence typing)解析

分離株のDNAはアルカリ熱抽出法により抽出した。PCRプライマーおよび反応条件は、*Campylobacter*属のMLSTデータベース (<https://pubmlst.org/campylobacter/>)に記載の方法に従い、得られたPCR産物を精製後、サイクルシーケンス反応により7遺伝子 (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*)の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を上記データベースと照合してアレル番号を取得しST型を決定した。また、7遺伝子の塩基配列をもとに、MEGA Xを用いて過去の分離株（ヒトおよび食品）との近縁関係を解析した。

4.2 薬剤感受性試験

CLSI法に準拠したディスク拡散法にて分離株の薬剤感受性試験を実施した（使用薬剤は表2の通り）。

5. 微生物汚染指標細菌の検査

河川の微生物汚染の指標として大腸菌群・大腸菌数を測定した。ピルビン酸添加XGal-MUG培地（ECブルー；日水製薬）を用い、最確数法（3本法）により実施した。

【実施内容・結果】

1. 河川水からのリアルタイムPCR法によるカンピロバクターの検出

河川水試料についてリアルタイム PCR 法により *C. jejuni* および *C. coli* の検出を行った結果を表 1 に示す。定性 PCR では、未処理サンプルについては 9 月、10 月、11 月、3 月、4 月の各 1 地点、1 月の 2 地点、12 月および 2 月の各 3 地点において *C. coli* が、10 月および 4 月の 1 地点において *C. jejuni* が陽性となった。EMA 処理サンプルについては 11 月、1 月、2 月、3 月の 1 地点において *C. coli* が陽性となった。定量 PCR では *C. jejuni*、*C. coli* ともにいずれの採取月においても定量下限値 (200 copies/L) 以下であった。

2. 河川水からの培養法によるカンピロバクターの検出と分離株の解析

2 段階増菌培養法により河川水試料から分離されたカンピロバクターの分離株数を表 1 に示す。分離培養の結果、11 月の 1 地点、12 月の 1 地点、1 月の 2 地点、3 月の 3 地点、4 月の 1 地点からカンピロバクターが検出された。各分離平板上の形態の異なるコロニーを鈎菌し、菌種同定を行った結果、いずれも *C. coli* と同定された。

分離株について MLST 解析を行った結果、13 タイプのアレルプロファイルが得られた。また、いずれもデータベースに登録されている既知の ST 型とは異なる塩基配列が得られたことから、新規の ST 型であることが判明した (表 2)。今回分離された河川由来株と、過去に大阪府内でヒトや食品 (鶏肉) から分離された *C. coli* 株を 7 遺伝子の塩基配列をもとに比較すると、河川由来株はヒトおよび食品由来株とは独立した 2 つのクラスターを形成した (図 3)。

薬剤感受性試験においては、13 株のうち 1 株が KM に耐性 (R)、1 株が FOM に中間 (I) を示したものの、他の株は自然耐性を示す CET を除き、いずれの抗菌薬に対しても感受性であった (表 2)。

3. 微生物汚染指標細菌の検出

天候等によりばらつきがみられたものの、水温の高い時期に菌数が多く、水温の低い時期に少なくなる傾向がみられた。カンピロバクター検出率との相関は認められなかった。

【考察と今後の課題】

本研究の結果、淀川の 3 地点において培養法および定性 PCR によりカンピロバクターが検出されたが、定量 PCR では、カンピロバクターは年間を通して定量下限値 (200 copies/L) 以下であった。この結果から、淀川における「感染能を持つ生きたカンピロバクター」の汚染量は高くないことが示唆された。したがって、カンピロバクターの感染菌量が数百個程度であることを考えると、淀川での水遊び程度ではカンピロバクターに感染する可能性は低いと考えられた。

試料採取時の水温および気温とカンピロバクター検出状況を比較すると、水温が 20°C を下回る冬季～春季にかけて検出頻度が増加した (図 2)。カンピロバクターは、低温の湿潤環境では長期間生存することが知られており、研究代表者が過去に実施した生残性試験においても、カンピロバクターの菌液を 25°C で保存した場合は数日のうちに培地上に発育しなくなったのに対し、10°C および 4°C で保存した場合は、3 週間～4 か月経過しても発育が

認められた。このことから、水温の高い時期には河川に流れ込んだカンピロバクターが短期間で死滅するため、検出率が低下したと考えられた。

今回淀川から分離されたカンピロバクターは、全て *C. coli* であった。しかしながら、ヒトや食肉（鶏、牛など）から分離されるカンピロバクターの9割以上は *C. jejuni* である。このことから、淀川から検出されたカンピロバクターは、下水等から流れ込んだものがそのまま反映されているとは考えにくい。カンピロバクターの汚染源としては、下水以外にも環境中に生息する野鳥や野生動物の糞便等が考えられる。そこで、過去に国内で分離された野鳥由来株 2 株⁵⁾を系統解析に加えたところ、そのうち 1 株と今回の分離株が同一のクラスターを形成し、淀川から分離された *C. coli* が、野鳥由来である可能性が示唆された。

今回の調査から、現状の淀川におけるカンピロバクター汚染量では、水遊び程度でヒトへ健康危害を与える可能性は高くないと考えられた。しかしながら、カンピロバクターの病原性については不明な点が多いことから、食中毒由来株とは系統的に異なることが示唆された今回の分離株についてはさらに詳細な解析を行い、その病原性について明らかにしていくことが必要と考える。

【参考文献】

- 1) 食品健康影響評価のためのリスクプロファイル 食品安全委員会 2018 年 5 月
- 2) 厚生労働省 HP 水質汚染事故等の発生状況
- 3) Liu KC *et al.* *Foodborne Pathog Dis.* 14(7): 371-378, 2017.
- 4) 小野一晃 他, 食品微生物学会雑誌, 24(3): 130-133, 2007.
- 5) Asakura H *et al.* *Microbes Environ.* 34(2): 146-154, 2019.

【経費使途明細】

使 途	金 額
試料採取用品	2,362 円
減圧濾過フィルター	29,626 円
培養関連試薬	64,218 円
DNA 抽出キット	67,067 円
リアルタイム PCR 関連試薬	116,259 円
その他消耗品	21,018 円
合 計	300,550 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

表 1. リアルタイム PCR および培養法によるカンピロバクター検出状況

Month	Sample	リアルタイム PCR (定性)				リアルタイム PCR (定量)				培養法 分離株数 (菌種)
		<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		
		未処理	EMA	未処理	EMA	未処理	EMA	未処理	EMA	
2019.09	A1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B1	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
2019.10	A2	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B2	+	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C2	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
2019.11	A3	UD	UD	+	+	UD	UD	UD	UD	1 (<i>C. coli</i>)
	B3	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C3	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-

表 1. つづき

2019.12	A4	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	1 (<i>C. coli</i>)
	B4	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-

	C4	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.01	A5	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B5	UD	UD	+	+	UD	UD	UD	UD	2 (<i>C. coli</i>)
	C5	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	2 (<i>C. coli</i>)
2020.02	A6	UD	UD	+	+	UD	UD	UD	UD	-
	B6	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C6	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.03	A7	UD	UD	+	+	UD	UD	UD	UD	1 (<i>C. coli</i>)
	B7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	2 (<i>C. coli</i>)
	C7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	2 (<i>C. coli</i>)
2020.04	A8	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	2 (<i>C. coli</i>)
	B8	UD	UD	+	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C8	+	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.05	A9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.06	A10	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B10	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C10	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.07	A11	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B11	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C11	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
2020.08	A12	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	B12	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-
	C12	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-

UD: Undetermined

表 2. *C. coli* 分離株の薬剤感受性と MLST 型

Strain	Source	Antimicrobial susceptibility											Allelic profile						ST	
		NFLX	OFLX	CPFX	NA	EM	TC	ABPC	GM	KM	FOM	CET	aspA	glnA	gltA	glyA	pgm	tkt		uncA
C19-129	A3 (2019.11)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	331	230	88	518	new allele	209	76	New1
C19-131	A4 (2019.12)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	147	215	500	new allele	new allele	241	583	New2
C20-025	B5 (2020.01)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	121	new allele	new allele	367	856	649	new allele	New3
C20-026	C5 (2020.01)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	121	238	185	217	635	new allele	336	New4
C20-030	B5 (2020.01)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	121	400	407	752	new allele	new allele	270	New5
C20-031	C5 (2020.01)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	86	86	86	308	327	129	76	New6
C20-036	A7 (2020.03)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	new allele	new allele	new allele	220	630	new allele	new allele	New7
C20-037	B7 (2020.03)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	new allele	new allele	new allele	830	208	574		New8
C20-038	B7 (2020.03)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	86	86	88	276	new allele	127	76	New9
C20-039	C7 (2020.03)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	121	593	506	218	new allele	new allele	173	New10
C20-040	C7 (2020.03)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	new allele	177	86	new allele	621	129	95	New11
C20-041	A8 (2020.04)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	204	230	191	308	661	316	230	New12
C20-042	A8 (2020.04)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	130	86	88	518	new allele	209	76	New13

S: sensitive, I: intermediate, R: resistant

