

## 小児キャンピロバクター下痢症における 迅速遺伝子診断の有用性に関する研究

Trinh Duy Quang<sup>1)\*</sup>, Ngan Thi Kim Pham<sup>1)\*</sup>, Pattara Khamrin<sup>2)</sup>, Niwat Maneekarn<sup>2)</sup>,  
相澤(小峯)志保子<sup>1)</sup>, 沖津祥子<sup>1)</sup>, 牛島廣治<sup>1)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>

### Study on the rapid molecular diagnosis on pediatric *Campylobacter colitis*

Trinh Duy Quang<sup>1)\*</sup>, Ngan Thi Kim Pham<sup>1)\*</sup>, Pattara Khamrin<sup>2)</sup>, Niwat Maneekarn<sup>2)</sup>,  
Shihoko AIZAWA<sup>1)</sup>, Shoko OKITSU<sup>1)</sup>, Hiroshi USHIJIMA<sup>1)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>

#### 要旨

キャンピロバクターは細菌性下痢症の原因菌として一般的なもののひとつである。しかし、他の細菌性下痢症やウイルス性下痢症との鑑別は容易ではない。培養による同定には一定の時間と施設を要し、PCR法も一定の設備が必要なため、迅速診断は困難である。我々は、キャンピロバクターの中でも代表的な *Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* を特殊な器械を要しないLAMP法で検出する方法を確立し、151例の小児下痢症の患者でPCRあるいは培養法と比較してその有用性を検討した。その結果、タイでは小児下痢症の8.6%がキャンピロバクターによるものであり、LAMP法の検出感度・特異性はPCRにほぼ匹敵すること、二種類の菌種を容易に鑑別できることを明らかにした。さらに、キャンピロバクターと下痢症ウイルスの混合感染が半数にみられ、両者を念頭に置いた治療戦略の重要性が示唆された<sup>1)</sup>。

#### 1. はじめに

キャンピロバクター属は螺旋状のグラム陰性桿菌で現在18種が知られている。多くの動物の消化管に常在するが、獣医学領域では流産の原因菌として知られていたが、ヒトでも1980年代以降下痢症の原因菌として注目されるに至った。その大部分は *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* (以下 *C. jejuni*) であるが、一部は *Campylobacter coli* (以下 *C. coli*) である。一方、敗血症や髄膜炎、膿瘍などの検査材料から分離されるキャンピロバクターは *C. fetus subsp. fetus* であることが多く、生物学的性状を異にする。菌の同定には培養法が一般的であるが、数日の期間と培養設備のある細菌検査室が必要である<sup>2)</sup>。特に中央検査室のない一般診療所や検査施設へのアクセスが難しい途上国ではベッドサイドで迅速に確定診断を得る必要がある。本研究で我々はタイ王国の小児糞便検体を用い、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による迅速診断の応用を試みた。

#### 2. 対象と方法

タイ王国 Chiang Mai にある Nakornping 病院において、2012年に1月から10月に同病院の倫理委員会と患者・保護者の同意を得て採取した151例の小児下痢症糞便検体を対象とした。対象は全て5歳以下で急性下痢症で同病院に入院した他に大きな合併症や既往歴のない患者である。検体は同病院において不活化しDNAの簡易抽出を行った。LAMP法による検出はLoopamp DNA Amplification Kit (栄研科学・栃木) を用い、添付文書に従って増幅した。*C. jejuni* 及び *C. coli* についてはPCRによる確認を行った。*C. jejuni* の hippurate (hipO) 遺伝子に由来する344bpフラグメント、*C. coli* に特異的な aspartate kinase (ask) に由来する502bpフラグメントを増幅する primer を作成し、<sup>3,4)</sup> さらに検出困難例では nested PCRにより我々の独自のプライマーによる確認を行った<sup>5)</sup>。PCRの後ダイレクトシーケンスで目的としたフラグメントの増幅を確認した。ウイルスの

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Trinh Duy Quang : trinh.duyquang@nihon-u.ac.jp

\*第一著者と第二著者は同等の貢献をしている

混合感染を検討するため、我々の開発した MultiplexPCR法によって group A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, enterovirus, bocavirus, and human parechovirus の検出を行った<sup>6)</sup>。尚、本研究は日本大学医学部の倫理委員会承認を受けている (Nos. 22-15 and 25-13-0)。

### 3. 結果

小児下痢症患者151例の糞便検体で13例 (8.6%) がカンピロバクター陽性であった。この結果は我々の日本人における結果とほぼ一致するが、下痢

症の18%がカンピロバクターだったというタイプにおける過去の報告<sup>7)</sup>の1/3であり、地域差や年代の相違が影響している可能性がある。LAMP法による検出結果は、PCR・ダイレクトシーケンス法に一致し、本法が十分な感度と特異性を有することが示唆された。13例中10例 (77%) は1月と2月に集中しており、雨季に多い可能性がある。患児の平均月齢数は13ヶ月 (5ヶ月から34ヶ月) 半数は12-14月齢であった。これは、過去の報告に一致する (10)。興味深いことに13例中7例 (54%) で下痢症ウイルスが陽性であった。すなわち、3例は group A rotavirus, norovirus GII, enteric adenovirus 各2例である。

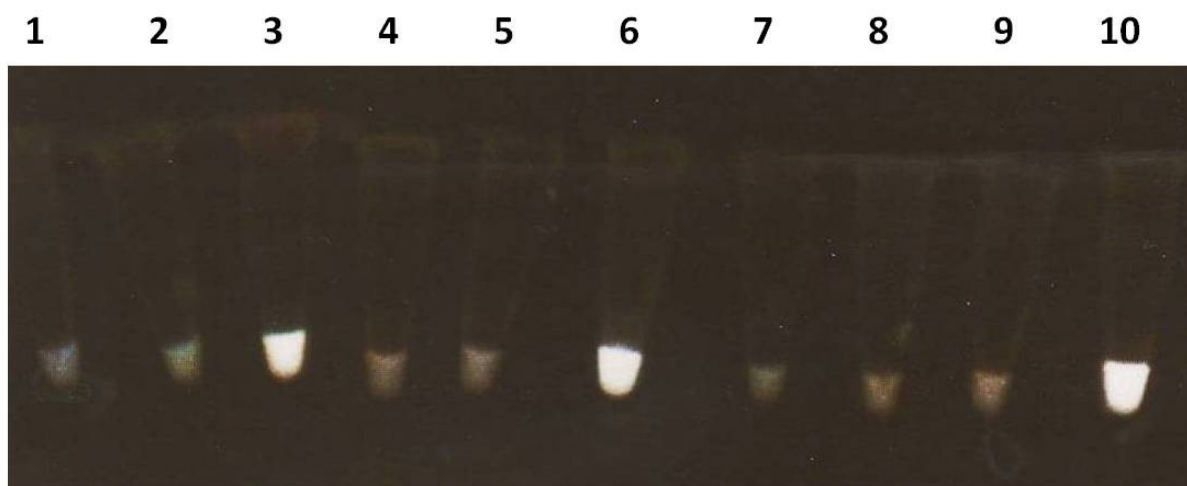


図1 LAMP results (lane 9: negative control, lane 10: positive control)

表1 Summary of LAMP and PCR positive samples

Case No.	Sample No.	Month of specimen collection	Age (month)	LAMP	PCR	Co-infection
1	CMHN 1/12	Jan	13	+	<i>C. jejuni</i>	
2	CMHN 2/12	Jan	13	+	<i>C. coli</i> <sup>1)</sup>	
3	CMHN 5/12	Jan	12	+	<i>C. jejuni</i>	Adenovirus
4	CMHN15/12	Jan	8	+	<i>C. jejuni</i>	
5	CMHN21/12	Jan	5	+	<i>C. jejuni</i>	
6	CMHN31/12	Jan	11	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
7	CMHN53/12	Feb	34	+	<i>C. coli</i>	
8	CMHN54/12	Feb	13	+	<i>C. jejuni</i>	
9	CMHN64/12	Feb	14	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
10	CMHN69/12	Feb	9	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
11	CMHN124/12	Aug	14	+	<i>C. jejuni</i>	Norovirus GII
12	CMHN127/12	Aug	12	+	<i>C. coli</i>	Norovirus GII
13	CMHN152/12	Sep	12	+	<i>C. jejuni</i>	Adenovirus

#### 4. 考 察

*C. jejuni* は *C. coli* と共に1982年、食中毒起因菌に指定されているが、本邦においてサルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌に次ぐ発生頻度を示し、近年増加傾向にある<sup>8)</sup>。東南アジアでは旅行者下痢症の代表的なものであり、成人においては基本的に予後良好であるが、小児では稀に敗血症を来すことや脱水から生命に関わることもある。培養によるキャンピロバクターの細菌学的同定は3-5日を要し、迅速診断は臨床的に極めて価値が高い。重篤な症状や敗血症などを呈した患者では、対症療法と共に適切な化学療法が必要である。我が国の外来でもっとも多く処方されるセフェム系抗菌薬に対しては自然耐性を示すため、第一選択薬剤としてマクロライド系抗菌薬が推奨される。ニューキノロン系に対しては近年耐性菌が増加しており、世界的な問題となっている。我々の研究で特に注目すべき点はキャンピロバクター陽性例の半数に下痢症ウイルスが検出されたことである。

キャンピロバクターは哺乳類腸管の常在菌であり、ヒトでも無症候性キャリアが偶々ウイルス腸炎に罹患して受診した可能性は否定出来ない。一方、ウイルス腸炎も無症候性に経過することは少なくないが、キャンピロバクターの混合感染でより重篤化する可能性もある。本研究は外国施設で過去に採取された糞便DNAを元にした研究であるため、十分な臨床情報が得られず、これ以上の解析は不可能であった。腸管における粘膜免疫と防御機構の解明のため、さらなる研究が必要である。

#### 5. 結 語

糞便を用いたLAMP法によってキャンピロバクターによる小児下痢症の迅速診断が可能である。タ

イ王国の検体ではキャンピロバクターと下痢症ウイルスの混合感染が高頻度にみられ、ウイルスと細菌が相互に増悪因子となっている可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Yamazaki W, Komine-Aizawa S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Application of the LAMP method for the detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Thai children with diarrhea. *Jpn J Infect Dis.* 2015 Sep 18; **68** (5): 432-3.
- 2) Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009; **75**: 1597-603.
- 3) Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Methods Mol Biol.* 2013; **943**: 267-77.
- 4) Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol.* 2005; **54**: 1043-7.
- 5) Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, et al. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter* species from stools of diarrheal children in Japan by LAMP method. *Jpn J Infect Dis.* 2014; **67**: 374-8.
- 6) Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. *Arch Virol.* 2014 Dec; **159**(12):3371-5. doi: 10.1007/s00705-014-2191-3. Epub 2014 Jul 31.
- 7) Padungtod, P, Kaneene JB. *Campylobacter* in food animals and humans in northern Thailand. *J Food Prot.* 2005; **68**: 2519-26.
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター キャンピロバクター [http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k05/k05\\_19/k05\\_19.html](http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k05/k05_19/k05_19.html)