

短報

市販鶏肉におけるカンピロバクター・ ジェジュニの汚染状況および 分離菌株の解析

古川一郎, 伊達佳美, 相川勝弘
浅井良夫, 尾上洋一

Prevalence of *Campylobacter jejuni* from retail chicken and epidemiological study of isolates

Ichiro FURUKAWA, Yoshimi DATE
Katsuhiro AIKAWA, Yoshio ASAI
and Yoichi ONOUE

緒言

近年, 国内外で *Campylobacter jejuni* による食中毒が多発して問題となっており^{1,2)}, *C. jejuni* は最も重要な食中毒原因物質の一つとなっている. 本菌は, 食肉のうち特に鶏肉において汚染率が高いことから³⁻⁵⁾, 鶏肉の生食や加熱不足または調理場等における二次汚染が食中毒の主な原因とされ, *C. jejuni* 汚染の低減に向けた対策が急務となっている. また患者由来の *C. jejuni* 分離株については, ニューキノロン系薬剤に対する耐性菌の増加が問題となっている^{1,6)}. 今回, 市販鶏肉における *C. jejuni* の汚染状況を把握することを目的とし, *C. jejuni* の分離を試みるとともに最確数 (MPN) を求め, 分離菌株について薬剤感受性試験を行った. さらに, 集団および散発下痢症患者に由来する *C. jejuni* は複数の血清型が報告されており⁷⁾, 主要な感染原因食品である鶏肉から分離される *C. jejuni* についてその多様性を遺伝子レベルで把握するため, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析を行ったので報告する.

材料と方法

1. 調査対象: 2005年6月から2006年5月に神奈川県内の8店舗 (A~H店) で市販されていた国産鶏肉35検体を調査対象とした.
2. 鶏肉からの *C. jejuni* の分離同定: 検体25gにプレストン増菌培地 (Oxoid) 100mlを加えてホモジナイズし,

5倍乳剤を作製して試料原液とした. 試料原液10mlを試験管に分注して42°Cで22~24時間微好気培養後, 増菌培養液をプレストン寒天培地 (Oxoid) およびCCDAサプリメント (Oxoid) 添加カンピロバクター血液無添加選択寒天培地 (Oxoid) に1白金耳ずつ接種し, 42°Cで44~48時間微好気培養した. 平板培地上の疑わしい集落を1検体あたり6~10株釣菌し, 5%羊脱せん血 (日本バイオテスト) 加Blood Agar Base No.2 (Oxoid) 平板培地で純培養後, 常法⁸⁾に従い *C. jejuni* を同定した. 分離同定した *C. jejuni* は, 市販のカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用いてPennerの血清型別試験を行った.

3. 鶏肉における *C. jejuni* の菌数測定: 菌数の測定はMPN3本法で行った. すなわち, 上記の試料原液10mlを3本の空の試験管に分注し, さらにプレストン培地9mlを3本ずつ分注した試験管に試料原液, 10倍希釈液および100倍希釈液をそれぞれ1mlずつ加えた. 培養条件は上記の分離同定の項と同様にして行い, 分離平板培地にはプレストン寒天培地を使用した.

4. 分離菌株の薬剤感受性試験: テトラサイクリン (TC), エリスロマイシン (EM), ゲンタマイシン (GM), クロラムフェニコール (CP), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), シプロフロキサシン (CPFX) の8薬剤について, センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いたKirby-Bauer法により分離菌株の感受性試験を行った. すなわち, 分離菌株をNutrient Broth No.2 (Oxoid) で微好気培養し, 培養液を0.5%NaCl加Mueller Hinton寒天 (Difco) に塗抹した後に各々のディスクを置き, 37°Cで48時間微好気培養して阻止円を計測した.

5. PFGEによる分子疫学的解析: 分離菌株を血液寒天培地で37°C, 48時間微好気培養後, Ribotら⁹⁾の方法に従って電気泳動用試料 (プラグ) を作製した. プラグは制限酵素 *Sma* I (Takara) で処理後, 1% Pulse Field Certified Agarose (BioRad) を電気泳動用アガロースとしてCHEF-DR III (BioRad) を用いて電気泳動を行った. 泳動条件は, 電圧6V/cm, パルスタイム6.8秒から38.4秒, バッファー温度14°C, 泳動時間19時間に設定した. 電気泳動後の泳動像はTIFFファイルとして保存し, FingerPrint II (BioRad) を用いてデータ解析を行った.

結果

各検査実施日における汚染率およびMPN法により算出した汚染菌数の結果を表1に示した. 7回に分けて実施

した調査すべてで *C. jejuni* が分離され、市販鶏肉35検体のうち、17検体 (48.6%) が *C. jejuni* 陽性であった。さらに汚染菌数をMPN法により算出した結果、1検体は $1.5 \cdot 10^1/100g$ 、9検体は $10^1 \cdot 10^2/100g$ 、4検体は $10^2 \cdot 10^3/100g$ 、3検体は $>10^3/100g$ となり、平均値は $3.6 \times 10^2/100g$ であった、菌数の範囲は $7.0 \cdot 2.3 \times 10^3/100g$ であった。

各検体から分離された *C. jejuni* の血清型別試験、薬剤感受性試験およびPFGE型別結果を表2に示した。血清型別試験を分離代表株について行ったところ、型別不能 (UT) が最も多く、以下B群、F群、Y群、C群等の順であった。薬剤感受性試験は、市販鶏肉17検体から分離された *C. jejuni* 150菌株について行い、14検体から分離した71菌株 (47.3%) が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。35菌株 (23.3%) がTC単独、24菌株 (16.0%) がTC、NA、NFLX、OFLXおよびCPFXの5剤、12菌株 (8.0%) がNA、NFLX、OFLXおよびCPFXの4剤に耐性を示し、NFLX、OFLXおよびCPFXのニューキノロン系薬剤に対し36菌株 (24.0%) が耐性であった。

市販鶏肉17検体から分離された *C. jejuni* 150菌株について、Sma I 処理によるPFGEの結果をFingerPrint II により解析したところ、分離菌株は合計42のPFGE型に識別された。*C. jejuni* 陽性17検体のうち12検体から複数パターンの *C. jejuni* の分離が確認され、1検体あたりのPFGE型の数は平均2.9であった。分離菌株におけるPFGE型と血清型別試験の比較では、B群はPFGE型が10種、C群およびY群はそれぞれ5種、F群、G群およびK群はそれぞれ3種に分けられた。PFGE型と薬剤感受性試験の比較では、分離菌株間で薬剤耐性パターンが異なる

場合はPFGE型も異なり、TC単剤耐性株は10種、5剤および4剤耐性株はそれぞれ5種に分けられ、ニューキノロン系薬剤に耐性を示した分離菌株は10種であった。店舗別に解析した結果、店舗A由来の3菌株は、店舗B由来の1菌株または店舗E由来の2菌株のいずれかと同一のPFGE型を示した。

考 察

市販鶏肉35検体中17検体 (48.6%) から *C. jejuni* が分離され、鶏肉における *C. jejuni* の汚染が改めて確認された。MPN法により求めた *C. jejuni* の汚染菌数は、平均で $3.6 \times 10^2/100g$ を示し、 $10^3/100g$ 以上が3検体確認された。これまでに、鶏肉の *C. jejuni* 汚染実態については多くの報告があり³⁻⁵⁾、報告者により異なるものの、国産鶏肉における *C. jejuni* の汚染率は40~60%あるいはそれ以上とされ、今回も同様の結果が得られた。*C. jejuni* による食中毒は温暖な時期に増加する傾向を示すが冬季においても発生しており¹⁾、今回も調査実施日すべてで *C. jejuni* が分離され、鶏肉については年間を通して衛生対策が必要であることが改めて示された。さらにBlackらは、ヒトにおける *C. jejuni* の発症菌量が $10^2 \sim 10^3$ 個以上であることを報告しており¹⁰⁾、今回の汚染菌数の調査結果では $10^2/100g$ 以上の菌数が35検体中7検体で確認され、生肉の不適切な取扱いや加熱不足による発症の可能性が考えられることから、消費者を含めた生肉の取扱者に対し *C. jejuni* 食中毒防止に向けたさらなる啓発が必要と思われた。

薬剤感受性試験の結果、今回調査を行った35検体中9検体 (25.7%) からニューキノロン系薬剤およびナリジクス酸耐性株が分離された。国内においては、散發事例

表1 市販鶏肉における *C. jejuni* 陽性率および菌数の分布

検査実施日	陽性検体数 ／検査検体数	菌数 (MPN /100g)				
		<1.5 *	$1.5 \cdot 10^1$	$10^1 \cdot 10^2$	$10^2 \cdot 10^3$	$>10^3$
2005.6.13	2/5	3		2		
6.27	2/5	3	1	1		
8.8	2/5	3		2		
9.27	5/5			1	1	3
11.21	4/5	1		2	2	
2006.3.13	1/5	4		1		
5.22	1/5	4			1	
計	17/35 (48.6%)	18	1	9	4	3

* 検出限界以下

表2 店舗, 検体別菌数と分離代表株の血清型および *C.jejuni* 分離株における薬剤耐性パターンと PFGE 型

店舗	検体		Penner 血清型 (分離代表株)	分離菌株の性状	
	No.	MPN/100g		薬剤耐性パターン(株数)	PFGE 型
A	2	7.5x10 ¹	F 群,D 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	27*
				TC (3)	26
				感受性 (2)	16*,24
	3	7.5x10 ¹	C 群,F 群,UT	NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	9,25
感受性 (4)				12	
18	2.3x10 ³	C 群,Y 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	27*	
			NA,NFLX,OFLX,CPFX (1)	39	
			TC (6)	4,29*,42	
			感受性 (1)	31	
19	4.7x10 ²	B 群,C 群,Y 群, UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	27*	
			NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	38	
			TC (2)	29*	
			感受性 (3)	5,31	
B	7	7.0x10 ¹	B 群,F 群	TC (3)	8
				感受性 (5)	6,7
	8	1.8x10 ²	F 群	TC (6)	8
17	1.2x10 ³	B 群,Y 群,UT	TC (5)	29*,33,37	
			感受性 (5)	35,36,40	
C	11	5.5x10 ¹	A 群,P 群,Y 群	TC (2)	22,
				感受性 (8)	30,41
33	1.2x10 ²	B 群,G 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	10,	
			感受性 (8)	13,14,15	
D	14	4.6x10 ¹	K 群	感受性 (9)	1,2
	20	1.2x10 ³	B 群	感受性 (10)	34
E	16	7.5x10 ¹	B 群,K 群,UT	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (2)	27*
				感受性 (4)	16*,23
F	21	1.8x10 ¹	UT	NA,NFLX,OFLX,CPFX (7)	20
	23	1.8x10 ¹	A 群,B 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (3)	28
				感受性 (7)	19
G	24	1.5x10 ²	Y 群,Z6 群	TC,NA,NFLX,OFLX,CPFX (9)	17,18
				TC (1)	3
	25	2.2x10 ²	R 群,UT	TC (7)	32
感受性 (3)				21	
30	4.6x10 ²	UT	感受性 (10)	11	

* 異なる店舗間で同一の PFGE 型

患者由来 *C. jejuni* のニューキノロン系薬剤耐性株の分離率が、30～40%程度を推移し増加傾向にあることから¹⁾、今後も継続したモニタリングが必要である。耐性菌の増加については、ニューキノロン系薬剤の家畜への使用が主な原因とされ⁶⁾、患者由来菌株と同様、市販の鶏肉を中心とした食品からの *C. jejuni* 分離菌株について解析する必要性は高いものと思われる。現在、*C. jejuni* による下痢症の治療にはエリスロマイシンが第一選択薬剤として使用されるが、今回分離された *C. jejuni* については、エリスロマイシン耐性株は確認されなかった。米国では、小売りの鶏肉からエリスロマイシン耐性 *C. jejuni* が分離されており⁶⁾、ニューキノロン系薬剤も含め、耐性株の動向について監視することが必要と思われた。

C. jejuni による食中毒事例では、患者および原因施設で処理された鶏肉から複数の血清型およびPFGE型が分離されることが報告され¹¹⁾、市販鶏肉の *Campylobacter* 汚染については、食鳥処理場における相互汚染が主な原因であることが指摘されている⁴⁾。今回も血清型別試験およびPFGEによる解析において、*C. jejuni* 陽性の17検体中12検体から複数パターンの *C. jejuni* が分離され、市販鶏肉における菌株の多様性が確認されたことから、鶏肉から *C. jejuni* を分離するには複数のPFGEパターンが検出されることを常に考慮すべきものと思われた。今回、異なる店舗で販売された鶏肉から、同一のPFGEパターンを示す *C. jejuni* が確認され、食鳥処理場あるいは仕入れ先等における複合汚染が示唆された。*C. jejuni* の遺伝子型別法においてはPFGEの識別能は高く¹²⁾、事例発生時の汚染源追求に有効であるが、事例発生時の感染源および感染経路を解明するためには、可能な限り多くの菌株を分離することが必要と思われた。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) カンピロバクター腸炎：病原微生物検出情報, **27** (2006)
- 2) Altekruuse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I. and Swerdlow, D.L. : *Campylobacter jejuni* -an emerging foodborne pathogen, *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 28-35 (1999)
- 3) 滝沢金次郎, 浅井良夫：食品におけるカンピロバクターの汚染状況, *獣畜新報*, **790**, 310-315 (1987)
- 4) 伊藤武, 高橋正樹, 斉藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 大橋誠：市販食肉および食肉店舗や食鳥処理場の環境における *Campylobacter* の汚染状況ならびに分離菌株の血清型別に関する研究, *感染症誌*, **62**, 17-25(1988)
- 5) Ono, K. and Yamamoto, K. :Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama Japan, *Int. J. Food. Microbiol.*, **47**, 211-219 (1999)
- 6) Gupta, A., Nelson, J.M., Barrett, T.J., Tauxe, R.V., Rossiter, S.P. and Friedman, C.R. et al.: Antimicrobiol resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001, *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 1102-1109 (2004)
- 7) カンピロバクター腸炎：病原微生物検出情報, **20** (1999)
- 8) 伊藤武：新訂食水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, 中央法規出版, pp.336-362, 東京 (2000)
- 9) Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. : Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 1889-1894 (2001)
- 10) Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Highes, T.P. and Blaser, M.J. : Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, *J. Infect. Dis.*, **157**, 472-479 (1988)
- 11) 小野一晃, 土井りえ, 安藤陽子, 大塚佳代子, 柴田穰, 尾関由姫恵ほか：カンピロバクター食中毒における患者便および食品からの分離菌株の型別, *日食微誌*, **21**, 151-155(2004)
- 12) Wassenaar, T.M. and Newell, D.G. :Genotyping of *Campylobacter* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1-9 (2000)