

市内流通鶏肉のカンピロバクター汚染状況調査 における定量検査結果と分離菌株の性状

京塚 明美 池田 伸代 清水 裕美子 竹原 佑美
井澤 麻由*1 青田 達明 栗林 智早 千神 彩香
田内 敦子*2 坂本 綾 松室 信宏 石村 勝之

はじめに

カンピロバクター食中毒は、広島市においては発生件数が最も多く、全国的にもノロウイルス食中毒と1, 2位を争う発生件数の多い食中毒である。カンピロバクター食中毒における原因食品として特定又は推定される食品の多くが、鶏肉を使った料理であり、その主因として鶏肉のカンピロバクターの汚染率の高さ及び菌量と比較的少ない菌数を摂取することで感染が成立することにあると考えられる。本市では、市内に流通する鶏肉のカンピロバクター汚染率、汚染菌数を低減させることを目的に、保健所において平成26年度にカンピロバクター食中毒予防プロジェクトチーム¹⁾を編成し、その基礎調査の一環として加工所ごとのカンピロバクター(*Campylobacter jejuni/coli*)汚染状況の比較を行うため、加工所が明らかな国産鶏肉について、カンピロバクターの定性及び定量調査を実施した。その際に分離された菌株について血清型別試験、GBS関連糖鎖合成酵素遺伝子検出試験及び薬剤耐性試験を行った。

方 法

1 材料

平成27年度及び28年度の5月から3月に、市内の量販店等から収去された加工所が明らかな国産鶏肉147検体(平成27年73検体、平成28年74検体)を検査に供した。なお鶏肉は、冷蔵品で加工所から出荷後未開封品か開封直後に滅菌済の器具を使用して無菌的に採取されたものである。

2 カンピロバクター定性試験

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法(NIHSJ-02)に準拠して実施した。分離した菌株は、馬尿酸試験法及びPCR法により菌種の同定を行った。

3 カンピロバクター定量試験

MPN(3管)法により測定した(食品衛生検査指針

2004)。検体25gにプレストン培地(OXOID)225ml加えたものをストマッカー処理し試料液を作製した。この試料液を3本の空の試験管に各々10mlずつ分注し、更に試料液1ml及び0.1mlを各々プレストン培地が10ml入った試験管3本ずつに接種した。これらを42℃、24時間微好気培養後、各試験管の培養液の1白金耳をバツラー培地に塗抹して、カンピロバクターの分離・同定を行った。カンピロバクター陽性となった試験管数から最確数表よりMPN値を求め、更に得られた値を10倍して100g当たりのカンピロバクター汚染菌数を求めた。

4 血清型別試験

分離同定された*C. jejuni*についてPenner法による血清型別を行った。まず市販のカンピロバクター免疫血清(デンカ生研)で型別を行い、型別不能(UT)となった株については、PCR法²⁾による型別を実施した。

5 ギランバレー(GBS)関連糖鎖合成遺伝子の検出

分離同定された*C. jejuni*菌株について、*cstII*, *cgtA*, *cgtB*をPCR法³⁾によって検出した。

6 薬剤感受性試験

分離されたカンピロバクター菌株を用いて、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)、ナリジクス酸(NA)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)の6薬剤について、Sensi-Disc(BD)を用いた一濃度ディスク法により行った。

結 果

1 カンピロバクター汚染状況(定性・定量)

カンピロバクターの汚染状況を図、表1に示した。全体としては、147検体中118検体(80.3%)からカンピロバクターが検出された(1検体あたり定性試験から分離の1菌株のみ菌種同定、性状試験を実施した。ただし定性試験陰性で定量試験で菌分離できた検体が1検体あり、これについてはこの菌株を使用した。)。分離されたカンピロバクター118株のうち105株(89.0%)が*C. jejuni*で

*1: 現 健康福祉局保健部食肉衛生検査所

*2: 現 健康福祉局保健部食品指導課

13 株(11.0%)が *C. coli* であった。加工所別陽性率は、5 検体以上検査できた施設を見ると、63.6~100.0%と施設によりバラツキが見られた。

汚染菌数(MPN/100g)は、全体では、<30 が 49 検体(33.4%)、 10^1 (30 以上)台が 19 検体(12.9%)、 10^2 台が 51 検体(34.7%)、 10^3 台が 19 検体(12.9%)、 10^4 以上が 9 検体(6.1%)であった(図 1)。

加工所別の汚染菌数をみると(表 1)、 10^4 台以上の 9 検体は全て加工所①の検体であり、加工所①では 80.0%(16/20 検体)が 10^3 台以上の高い汚染菌数であった。他に 10^3 台の汚染菌数が認められたのは加工所④で 31.6%(6/19 検体)、加工所②③⑤⑥⑩⑪で各 1 検体であり、その他の加工所では全ての検体が、 10^2 台以下の汚染菌数であった。加工所②③では、平成 27 年度に比して 28 年度は汚染菌数が少ない傾向にあった。

月別の汚染菌数(MPN/100g)では、12~3 月の冬季は、比較的少ない傾向であった。

2 分離菌株の性状

分離された *C. jejuni* の Penner 型別及び GBS 関連糖鎖合成遺伝子保有(3 遺伝子を揃って保有)状況を表 2 に示した(1 株 GBS 関連糖鎖合成遺伝子試験未実施)。全体としては PennerB 群が 26 株(24.8%)と最も多く検出された。加工所別では、加工所①において PennerB 群 8 株(42.1%)(全て平成 27 年度分離株)、UT7 株(36.8%)(内 6 株は 28 年度分離株)と検出 Penner 血清群に偏りが見られた。一方、他の加工所においては、検出血清型の偏り等一定の傾向は認められなかった。3 種の GBS 関連糖鎖合成遺伝子を揃って保有する株は、全体では 32 株(30.5%)みられた。加工所①では 16 株(84.2%)、加工所⑥では 5 株(71.4%)と保有株の

割合が高かった。なお、加工所①においては、27 年度分離 PennerB 群 8 株と 28 年度分離 UT6 株が、3 遺伝子を保有していた。

表 3 に定量試験による MPN/100g 値のオーダーと分離された *C. jejuni* 株の Penner 血清型及び GBS 関連糖鎖合成 3 遺伝子保有株数の分布を示した。Penner 型別では、B 群で半数以上の菌株が GBS 関連糖鎖合成遺伝子を保有した。汚染菌数別では、 10^4 以上で 9/9 検体、 10^3 台で 8/17 検体と汚染菌数が多い検体からの GBS 関連糖鎖合成遺伝子保有株の検出率が高い傾向がみられた。

分離されたカンピロバクターの薬剤耐性パターンの結果を表 4 に示した。*C. jejuni* の 53.3%、*C. coli* の 84.6%が 1 剤以上に耐性を示し、*C. jejuni* の 50.5%、*C. coli* の 69.3%がキノロン系 4 薬剤に耐性であった。*C. jejuni* 株が複数分離できた加工所では、加工所①が 89.5%、加工所⑨が 75.0%、加工所③が 64.3%と高い耐性率を示した。

なお、加工所①の前述の 27 年度分離 PennerB 群 8 株と 28 年度分離 UT6 株はいずれも同じ薬剤耐性パターン(EM のみ感受性)を示した(データ示さず)。

考 察

カンピロバクターの陽性率 80.3%(118/147 検体)は平成 16 年に本市で実施した調査結果⁴⁾とほぼ同程度であり、おおむね 10 年前とカンピロバクターの鶏肉汚染率は変化していないと考えられた。

また、鶏肉のカンピロバクター汚染率が高いこと及びカンピロバクターの汚染菌数が 53.7%(79/147 検体)が 10^2 (MPN/100g)台以上であったこ

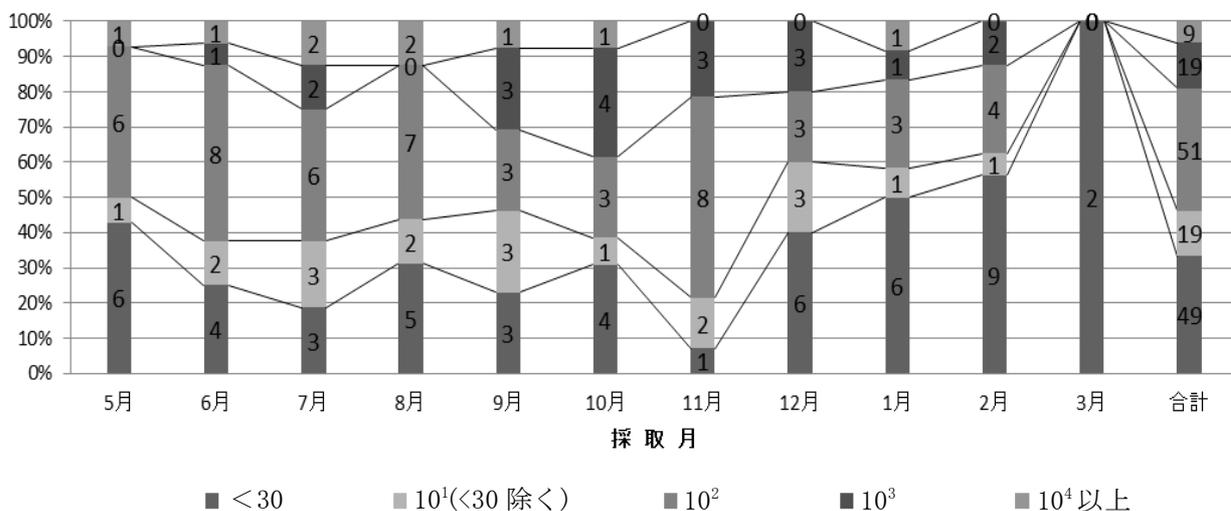


図 月別汚染菌数 (MPN/100g)

とは、カンピロバクターは数百個程度と比較的少ない菌量を摂取することで人への感染が成立することを考えると、鶏肉の生での提供、生肉の不適切な取り扱い、加熱不足の鶏肉の喫食は感染リスクが高いことが再認識された。

加工所①においては、平成 27 年度と 28 年度の各々で同じ性状を示す *C. jejuni* 株が継続的に検出されたことは、当加工所内や養鶏場での汚染が継続された可能性が考えられる。他の加工所では、検出された菌株の性状に顕著な偏りは認められず、同一由来による鶏肉の継続的な汚染傾向は見られなかった。加工所①は、他の加工所に比して汚染菌数もおおむね通年高値であり、加工所の衛生管理改善と養鶏場でのカンピロバクター対策をより強化することで、現在のカンピロバクター汚染状況の改善が図られるのではないかと考えられた。

今回の調査では汚染菌数分布や PennerB 群で GBS 関連糖鎖合成遺伝子 3 遺伝子を保有する *C. jejuni* の検出割合が多い傾向は、加工所①の結果が影響していると考えられるが、今後も平常汚染状況を把握する中で特異的な事象をとらえる体制が望まれる。GBS の発症と *C. jejuni* の菌体表面糖鎖抗原との因果関係において、量的・質的な詳細なメカニズムは解明されていない。そのため基礎データ取得のための多面的な調査は今後も必要と考えられる。

本市保健所では食鳥処理場を管轄する自治体に情報提供をしてきた^{5), 6)}。こうした取り組みにより、汚染菌数の低減化や業者の衛生管理の改善へと繋げ、一方でカンピロバクターに汚染された鶏

肉の生食、加熱不足、不適切な取り扱いの危険性を業者や消費者へ啓発していくことがカンピロバクター食中毒の低減に向けて必要である。

謝 辞

カンピロバクター汚染菌量調査を実施された本市保健所関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 高場雄貴 他:カンピロバクター食中毒予防プロジェクトの推進について、平成 26 年度生活衛生関係業績発表会演題集, 6-1~6-3
- 2) 青田達明 他:マルチプレックス PCR 法による *Campylobacter jejuni* の血清型別の検討, 広島市衛生研究所年報, 35, 87~88(2016)
- 3) 国井悦子 他:下痢症患者由来カンピロバクター分離株のギランバレー症候群(GBS) 関与遺伝子の保有状況, 広島市衛生研究所年報, 29, 58~60(2010)
- 4) 坂本裕敬 他:鶏肉におけるカンピロバクター及びサルモネラの感染状況, 広島県獣医学会雑誌, 21, 61~63(2006)
- 5) 田内敦子 他:本市に流通する鶏肉のカンピロバクター汚染状況と分離菌株についての検討, 平成 28 年度食品衛生監視員等業績発表会演題集, 5-8
- 6) 京塚明美 他:広島市の食中毒事例から分離された Penner0 群 *Campylobacter jejuni* 菌株の分子疫学検討, 広島市衛生研究所年報, 35, 89~92(2016)

表 1 鶏肉のカンピロバクター汚染状況

加工所	カンピロバクター検出数				菌数(MPN/100g)											
	検体数	C. j	C. c	陽性数	陽性率	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
						月	月	月	月	月	月	月	月	月	月	月
①	20	19	0	19	95.0	<30	<30	>11000	>11000	>11000	2400	2400	4600	2400	2400	
						>11000	11000	11000	>11000	<30	>11000	4600	2400	11000	430	
②	20	14	2	16	80.0	<30	230	930	230	92	74	230	930	<30	<30	
						<30	<30	<30	<30	4600	230	36	<30	36	<30	
③	20	14	1	15	75.0		36	930	930	230	930	430	92	930	2400	
						<30	230	230	<30	<30	<30	430	<30	<30, <30	150	
④	19	15	2	17	89.5	430		930	930	2400	2400	430	36	<30	36	
						930	750	1500	930	2400	2100	4600	<30	430	930	
⑤	18	14	0	14	77.8	930	<30	92	36	92	430	74	<30	<30	230	
							<30	36	430	430		230	4600		<30, <30	
⑥	11	7	0	7	63.6	<30	2400	230	<30	36	<30	430	<30	230	<30	
											<30					
⑦	6	4	0	4	66.7		930		380						<30	
						430			36					<30		
⑧	5	4	0	4	80.0		74	92	<30			160				
									<30							
⑨	5	4	1	5	100.0	230		<30								
						<30, 230										<30
⑩	5	2	2	4	80.0		230		230		2400		<30, 30			
⑪	3	1	1	2	66.7			4600		430		<30				
⑫	3	3	0	3	100.0		150								<30	
							200								<30	
⑬	2	1	0	1	50.0										<30	
															<30	
⑭	2	0	1	1	50.0		930									<30
⑮	2	1	1	2	100.0			930, <30								
⑯	1	0	1	1	100.0							930				
⑰	1	0	0	0	0.0						<30					
⑱	1	0	1	1	100.0								930			
⑲	1	0	0	0	0.0						<30					
⑳	1	1	0	1	100.0								430			
㉑	1	1	0	1	100.0	36										
合計	147	105	13	118	80.3											

菌数：上段-平成 27 年度，下段-平成 28 年度

C. j: *C. jejuni* C. c: *C. coli*

表2 *C. jejuni* 菌株の Penner 型別及び GBS 関連糖鎖合成遺伝子の保有状況

加工所	株数	Penner 群																		GBS 関連3 遺伝子		
		A	B	C	D	E	F	G	I	K	L	O	R	Y	Z	Z6	G/HS17	L/U	D, F	UT	保有株数	保有率 (%)
①	19	1	8				2					1								7	16	84.2
②	14		1		2				2				1	1		1	4			2	2	14.3
③	14	3	4	1								1		3						2	5	35.7
④	15	1	3	1		1	1			1			3*			1		1		2	0	0.0
⑤	14		2		3			2					1		1	3				2	1	7.1
⑥	7		2		1									2						2	5	71.4
⑦	4				1				1				1				1				2	50.0
⑧	4		1					1								1				1	1	25.0
⑨	4	2			1						1										0	0.0
⑩	2		1		1																0	0.0
⑪	1															1					0	0.0
⑫	3		1											1					1		0	0.0
⑬	1																	1			0	0.0
⑭	0																					
⑮	1		1																		0	0.0
⑯	0																					
⑰	0																					
⑱	0																					
⑳	1		1																		0	0.0
㉑	1		1																		0	0.0
合計	105	7	26	2	9	1	3	3	3	1	1	2	6	7	1	1	11	2	1	18	32	30.5

* : 1 株 GBS 関連糖鎖合成遺伝子検査未実施

表3 汚染菌数と検出 *C. jejuni* の Penner 型別及び GBS 関連糖鎖合成遺伝子の保有状況

Penner 群	汚染菌数 (MPN/100g) 別検体数						計	GBS 関連3 遺伝子保有数
	<30	10 ¹ (<30 除く)	10 ²	10 ³	10 ⁴ 以上	計		
A	1	1	4	1(1)		7	(1)	
B	3(2)	3(1)	11(4)	6(5)	3(3)	26	(15)	
C			1	1		2		
D	3	2	3	1(1)		9	(1)	
E				1		1		
F	1		2			3		
G		1	2			3		
I		2(2)	1(1)			3	(3)	
K			1			1		
L			1			1		
O			1(1)		1(1)	2	(2)	
R		1(1)	4(1)	1*		6	(2)	
Y		2	4	1		7		
Z		1				1		
Z6	1					1		
G/HS17	4	1	4	2		11		
L/U	1			1		2		
D, F	1					1		
UT	2	3	6(2)	2(1)	5(5)	18	(8)	
計	17	17	45	17	9	105		
(計:GBS 関連3 遺伝子保有数)	(2)	(4)	(9)	(8)	(9)	(32)	(32)	

() : GBS 関連糖鎖合成 3 遺伝子保有 *C. jejuni* を検出した検体数(株数)

* : GBS 関連糖鎖合成遺伝子検査未実施

表 4 薬剤耐性パターン

加工所	<i>C. jejuni</i>							<i>C. coli</i>							
	NFLX OFLX CPFX NA EM, TC	NFLX OFLX CPFX NA TC	NFLX OFLX CPFX NA	TC	感受性	計	耐性率 (%)	NFLX OFLX CPFX NA EM, TC	NFLX OFLX CPFX NA TC	NFLX OFLX CPFX NA EM	NFLX OFLX CPFX NA	TC	感受性	計	耐性率 (%)
①		16		1	2	19	89.5								
②		5			9	14	35.7			1			1	2	50.0
③		5	2	2	5	14	64.3					1		1	100.0
④		5	2		8	15	46.7		2					2	100.0
⑤	1	3	2		8	14	42.9								
⑥		2	2		3	7	57.1								
⑦		2			2	4	50.0								
⑧		1			3	4	25.0								
⑨		2	1		1	4	75.0		1					1	100.0
⑩		1			1	2	50.0	1			1			2	100.0
⑪					1	1	0.0						1	1	0.0
⑫					3	3	0.0								
⑬					1	1	0.0								
⑭									1					1	100.0
⑮					1	1	0.0		1					1	100.0
⑯								1						1	100.0
⑰															
⑱												1		1	100.0
⑲															
⑳			1			1	100.0								
㉑					1	1	0.0								
合計	1	42	10	3	49	105	53.3	2	5	1	1	2	2	13	84.6
(%)	1.0	40.0	9.5	2.9	46.7			15.4	38.5	7.7	7.7	15.4	15.4		