

宮崎県内のカンピロバクターによる鶏肉汚染および

食中毒との関連についての検討

堀田 剛・深江弘恵・山田 亨・吉野修司・大浦裕子・河野喜美子・山本正悟^{*1}

Study of chicken meats contamination by *Campylobacter* and relation with *Campylobacter* food poisoning

Takeshi HORITA, Hiroe FUKAE, Toru YAMADA, Shuji YOSHINO, Yuko OURA, Kimiko KAWANO, Seigo YAMAMOTO

Abstract

Campylobacter is one of the main causative organisms of food poisoning. We examined the pollution rate of the chicken meats in Miyazaki prefecture. And we conducted the investigation for serotype and genetic types of *Campylobacter* strains isolated from chickens meats and patients in Miyazaki prefecture during 2007-2010. Of the total of 99 *Campylobacter jejuni* strains, 48 strains (48%) were classified into 17 different serotypes and 51 strains (52%) could not to be determined serotype. And *Campylobacter* strains from the chicken meats and the patients whose origins were different, did not show the same genetic patterns by PFGE.

An epidemic food poisoning case A by *Campylobacter* occurred in Miyazaki prefecture in 2010. We succeeded in isolation of *Campylobacter* from stored chicken meats by improvement of bacterial growth increase methods. We performed serotyping and PFGE analysis for *Campylobacter* strains isolated from the chickens and patients in this case. *Campylobacter* isolates from 7 chickens (7/7) and 8 patients (8/16) were classified into Y group, and *Campylobacter* isolates from 8 patients (8/16) could not to be determined. From a result of PFGE analysis, some PFGE patterns of *Campylobacter* strains from the chicken meats and patients in this case accorded.

These results suggest that chicken meats may be frequently polluted by plural *Campylobacter* strains and they must become causative organism of food poisoning.

Key word: *Campylobacter*, serotype, PFGE, chicken, food poisoning

はじめに

カンピロバクター腸炎は、ノロウイルス感染症について多い感染性腸炎であり、宮崎県内でも主要な細菌性下痢症の1つとなっている。また、日本におけるカンピロバクター腸炎の90～95%はカンピロバクター・ジェジュニを起因

菌とし、鶏肉が主な感染源であるといわれている。

そこで、宮崎県は食肉による食中毒防止を図ることを目的とし、平成20年度から3年計画で「みやざき県産食鳥肉安全安心衛生確保事業」を立ち上げた。当所は、本事業において、生食用食鳥肉のカンピロバクター属菌、サルモネラ

微生物部 *1 平成23年3月 退職

属菌，黄色ブドウ球菌，および糞便性大腸菌群の汚染実態調査を担当した。本調査では昨年度に引き続き，汚染実態調査で鶏肉，食中毒事例および散発下痢症事例から分離されたカンピロバクター株について血清型別試験とパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を実施し，鶏肉と食中毒との関連を検討した。また，本調査を実施していく中で，カンピロバクター属菌が原因と推定される集団食中毒事例Aが発生した。これまで，宮崎県で発生したカンピロバクターを原因とする食中毒事例では，原因食品から実際にカンピロバクター属菌が分離された事例は無かった。その理由としては，検査を行う際に原因食品が残っていない事や，残っていても微好気性菌であるため，食品中の生残カンピロバクター菌数が極めて少なくなり，分離が困難であったと考えられる。今回の事例では従来法に加えて，小野ら¹⁾の提唱する二段階増菌法に準じ，5%馬溶血液加 Bolton 培地と 5%馬溶血液加 Preston 培地を組み合わせた二段階増菌法を実施した結果，食品からのカンピロバクター属菌の分離に成功し，食品と食中毒との関連を検討することが出来たので併せて報告する。

材料と方法

1 供試菌株

2008年から2010年に収去鶏肉製品（生肉，刺身，タタキ）から分離された39株，宮崎県内で2001年から2010年に下痢症患者から分離された60株，合計99株を供試菌株として用いて，血清型別試験を実施した。さらに，2007年以降に分離された菌株のうち，鶏肉由来株18株，下痢症患者由来株20株の計38株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による遺伝子解析を実施した。

また，集団食中毒事例Aで鶏タタキから分離された7株と8名の患者便から2株ずつ分離した16株の計23株についても同様に血清型別とPFGEを実施した。

2 *Campylobacter* 属菌の分離方法

1) 収去食品，食中毒患者，散発下痢症患者便からの分離

直接分離に加え，増菌培地として5%馬溶血液加 Preston 培地（Oxoid）を用い，42℃で24時間培養し，その培養液をCCDA培地（Oxoid）に塗抹して菌の分離を行った。

2) 集団食中毒事例Aの推定原因食品からの分離における方法の改善

2010年に合宿中の大学生58名中15名が下痢，腹痛，発熱などの症状を呈するという集団食中毒事例Aが発生した。本事例で食中毒患者に提供された鶏タタキの残品が，施設内の冷蔵庫に保存されていた。そこで，この鶏タタキについて5%馬溶血液加 Preston 培地を用いた増菌法と小野ら¹⁾が提唱している二段階増菌法を参考にした，5%馬溶血液加 Bolton 培地と5%馬溶血液加 Preston 培地を組み合わせた二段階増菌法を実施し，CCDA培地に塗抹して菌の分離を行った。

3 疫学解析方法

1) 血清型別試験

Penner の型別法に準拠した診断用免疫血清（デンカ生研）を使用し，マイクロプレート法で実施した。

2) PFGE

昨年度の報告²⁾と同様に八尋ら³⁾の方法に準じて，試料を制限酵素 *Sma* I 及び *Kpn* I で処理し，CHEF DR III（Bio-Rad）を用いて，0.5×Tris-Borate-EDTA バッファー（0.5×TBE，日本ジーン）2L，6V/cm，パルス時間 6.8-34.8秒，12-14℃の条件で19時間泳動した。泳動後，画像を解析ソフト（Fingerprinting II，Bio-Rad）を用いて解析した。

結果

1 *Campylobacter* 属菌における血清型別試験と PFGE

収去鶏肉製品から分離された39株と下痢症患者から分離された60株の計99株について，血清型別試験を実施した結果，血清型は血清型別不能(UT)を含め18種類に型別され，Y群が20株と最も多く，次いでO群に7株，L群に5株が型別された。また，99株のうち全体の半数以上を占める51株がUTであった。（Table 1）

さらに、2007年以降に分離された株のうち、鶏肉由来株18株と下痢症患者由来株20株についてPFGEを実施した。解析の結果は、Fig.1のとおりで、鶏肉間で1組(2鶏肉:No.11,12)、患者間で2組(2名:No.3,4, 4名:No.6,7,8,9)の計3組で、PFGEパターンが一致した。これらの一致した株は、それぞれ、同一飲食店から収去された鶏肉由来株2株、同一食中毒事例で2名の患者から分離された2株、および同一食中毒事例で4名の患者から分離された4株の計3組であった。由来や事例の異なる菌株間でPFGEパターンが一致するものは無かった。

2 集団食中毒事例Aにおける菌分離について
患者便については、5%馬溶血液加 Preston 培地を増菌培地として用いて、菌検索を実施した結果、9名中8名から *C.jejuni* が分離された。また、推定原因食品の鶏肉タタキについても同様の方法で菌検索を実施したが、*Campylobacter* を分離することは出来なかった。そこで、小野らの二段階増菌法を参考にして、5%馬溶血液加 Bolton 培地と5%馬血液加 Preston 培地を用いて二段階増菌し、菌の分離を行った結果、鶏肉タタキ残品1検体からも *C.jejuni* が分離された。

3 集団食中毒事例Aにおける患者由来株と食品由来株の疫学解析

集団食中毒事例Aで鶏タタキから分離された7株と8名の患者から分離された16株、計23株について血清型別試験及びPFGEを実施した。

血清型別試験の結果、鶏肉由来の7株全てと患者由来の8株(5名)がY群、患者由来の8株(5名)がUTであった。また、患者8名のうち2名から、Y群とUTの両方が分離された。(Table 2)

また、これらについてPFGEを実施した結果、Fig.2に示すように3つのグループに分類された。このうち、グループ2に分類された患者由来株(患者No.1,2,3,4,7)と鶏肉由来株(鶏肉A,B,C,D,E,F,G)はPFGEパターンが全株一致した。

Table 1 The number of *Campylobacter* serotype from chickens meats and patients.

Serotype	Chickens	Patients	total	(%)
A	1	0	1	1.0%
B	0	2	2	2.0%
C	0	1	1	1.0%
F	0	1	1	1.0%
G	1	0	1	1.0%
J	1	0	1	1.0%
K	1	0	1	1.0%
L	0	5	5	5.1%
O	0	7	7	7.1%
Y	10	10	20	20.2%
C,P	1	0	1	1.0%
D,Y	1	0	1	1.0%
F,O	0	2	2	2.0%
L,N	1	0	1	1.0%
L,O	0	1	1	1.0%
Y,Z4	0	1	1	1.0%
Y,Z6	0	1	1	1.0%
UT	22	29	51	51.5%
Total	39	60	99	(100.0)

Table 2 Serotype of *Campylobacter* isolates in epidemic food poisoning A from the chickens meats and patients.

sample	serotype	sample	serotype
patient 1	Y	patient 7	Y
"	UT	"	Y
patient 2	Y	patient 8	UT
"	Y	"	UT
patient 3	Y	chicken A	Y
"	Y	chicken B	Y
patient 4	Y	chicken C	Y
"	UT	chicken D	Y
patient 5	UT	chicken E	Y
"	UT	chicken F	Y
patient 6	UT	chicken G	Y
"	UT		

考察

宮崎県内で検出された *C.jejuni* のうち、鶏肉由来の39株と患者由来の60株の計99株について血清型別試験を実施した結果、鶏肉由来の22株(56%)、患者由来の29株(48%)の計51株(51%)が血清型不明であった。血清型が決定した株は、48株(48%)で、型は17種類と多岐に渡ったが、鶏肉、患者由来株ともにY型、O型、L型の3型で32%を占め、県内ではこれらの型が比較的多く分布していると推測された。また、食品由来株18株と下痢症患者由来株20株の計38株についてPFGEを実施した結果、由来や事例の異なる菌株間でPFGEパターン

が一致するものは無く、PFGE パターンが一致したのは、同一飲食店の鶏肉由来の菌株か、または同一食中毒由来の菌株であった。小野らも⁴⁾同様な調査を行い、1例の食中毒事例内での鶏肉と患者由来株でPFGEが一致した以外は、ヒト-鶏肉由来株間で明確な関係性は見いだせなかったと報告している。

集団食中毒事例Aの分離株は、血清型別試験で、Y群とUTの2血清型に型別されたが、そのうちY群の菌は、鶏肉由来株(7株)と患者由来株(5名8株)から検出され、鶏肉と食中毒の関連が強く疑われた。さらに、本事例で分離された菌株についてPFGEを実施した結果、3タイプのPFGEパターンが検出されたが、そのうちの1つのPFGEパターンが、鶏肉タタキと患者から検出された。血清型別試験およびPFGE結果から、鶏肉が原因食品であることが証明された。すなわち、本事例は、鶏肉と食中毒の関連を明確にできた事例であり、これにより、鶏肉はカンピロバクター食中毒の原因食品になりうる事が示唆された。

カンピロバクターは鶏に頻度高く保有されていることが報告されており、今回、宮崎県内に分布するカンピロバクターの遺伝子型は非常に多様であることが判明した。これらのことから、ランダムに抽出した鶏肉食品と食中毒事例を関連づけるためには、相当に多くの食品検体を調査する必要があると推測された。従って、今後も鶏肉食品および患者における*Campylobacter* 属菌の疫学的動向を把握していく必要があるが、一方で、個々の食中毒事例について、食品からのカンピロバクターの検出を確実にし患者との関連を明らかにしていくことが、鶏肉と食中毒との関連を明らかにするための、より有効な方法であると考えられた。

しかし、これまで宮崎県内で発生したカンピロバクター属菌を原因とする食中毒事例では、原因食品が残っていないこと、残っていても菌が損傷していたり、菌数が極めて少なかったことなどから、菌の分離が難しく、実際に推定原因食品から*Campylobacter* 属菌を分離できた事例はなかった。今回発生した集団食中毒事例Aでは、提供食が残っていたこと、および二段階増菌法を用いたことによって推定原因食品の

鶏タタキからも菌を分離することが出来た。今後、食中毒事例における鶏肉の検査方法として、この方法の応用を検討していきたい。さらに、その結果により、鶏肉とカンピロバクターの関連性について明らかにしていきたい。

まとめ

Campylobacter 属菌による食中毒事例は、宮崎県内においても多発し、問題となっている。そこで、県内の食中毒の防止を目的として、県内に流通している鶏肉の汚染実態調査を実施した。本研究では、鶏肉由来株と食中毒との関連について明らかにすることを目的として、収去検査で検出された鶏肉由来株と下痢症患者由来株について、血清型別試験およびPFGEを実施し、比較検討を行った。その結果、県内には様々な血清型のカンピロバクターが分布していることが明らかとなった。また、PFGEの結果、由来が同一の食品や同一事例内の株間ではPFGEパターンが一致したが、由来が異なる鶏肉と下痢症患者由来株で遺伝子の型が一致する株はなかった。

本研究を実施していく中で、2010年に*Campylobacter* 属菌を原因菌とする、集団食中毒事例Aが発生した。この事例では、二段階増菌法を用いることで、今まで困難であった保存された原因食品からの*Campylobacter jejuni* の分離に成功した。本事例で鶏タタキと患者から分離された菌株について、血清型別試験とPFGEを実施した。結果、鶏肉(7株)と患者(5名8株)から同じ血清型(Y群)の*C. jejuni* が検出され、他に、患者(5名8株)から血清型UTの菌が検出された。また遺伝子解析の結果、分離菌のPFGEパターンは3つのグループに分かれ、そのうち1つのグループでは、鶏肉由来株と患者由来株のPFGEパターンが一致した。このことから、鶏肉が食中毒の原因になりうるということが、証明された。また、同一事例であっても、異なる複数の菌株が検出されたことから、*Campylobacter* 属菌による食中毒事例では、由来の異なる複数の菌株による汚染が起こりうるということが明らかとなった。

参考文献

- 1) 小野一晃, 安藤洋子, 柳川敬子, 中川俊夫 : 二段階増菌法による輸入鶏肉からのカンピロバクター分離法の検討, 日本食品微生物学会雑誌, 24(3), 130-133, 2007
- 2) 堀田剛, 深江弘恵, 大浦裕子, 河野喜美子, 山本正悟 : 鶏肉における *Campylobacter*, *Salmonella* の汚染状況および汚染鶏肉と食中毒との関連について, 宮崎県衛生環境研究所年

報, 第 21 号, 64-70, (2009)

- 3) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美 : 「*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討」, 厚生労働省科学研究補助金 (新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書
- 4) 小野一晃, 斎藤志保子, 川森文彦, 重茂克彦, 品川邦汎 : ヒト, 鶏および牛由来血清型 Penner B 群, D 群 *Campylobacter jejuni* の PFGE 法による遺伝子解析, 日本食品微生物学会雑誌, 22(2), 66-71, 2005

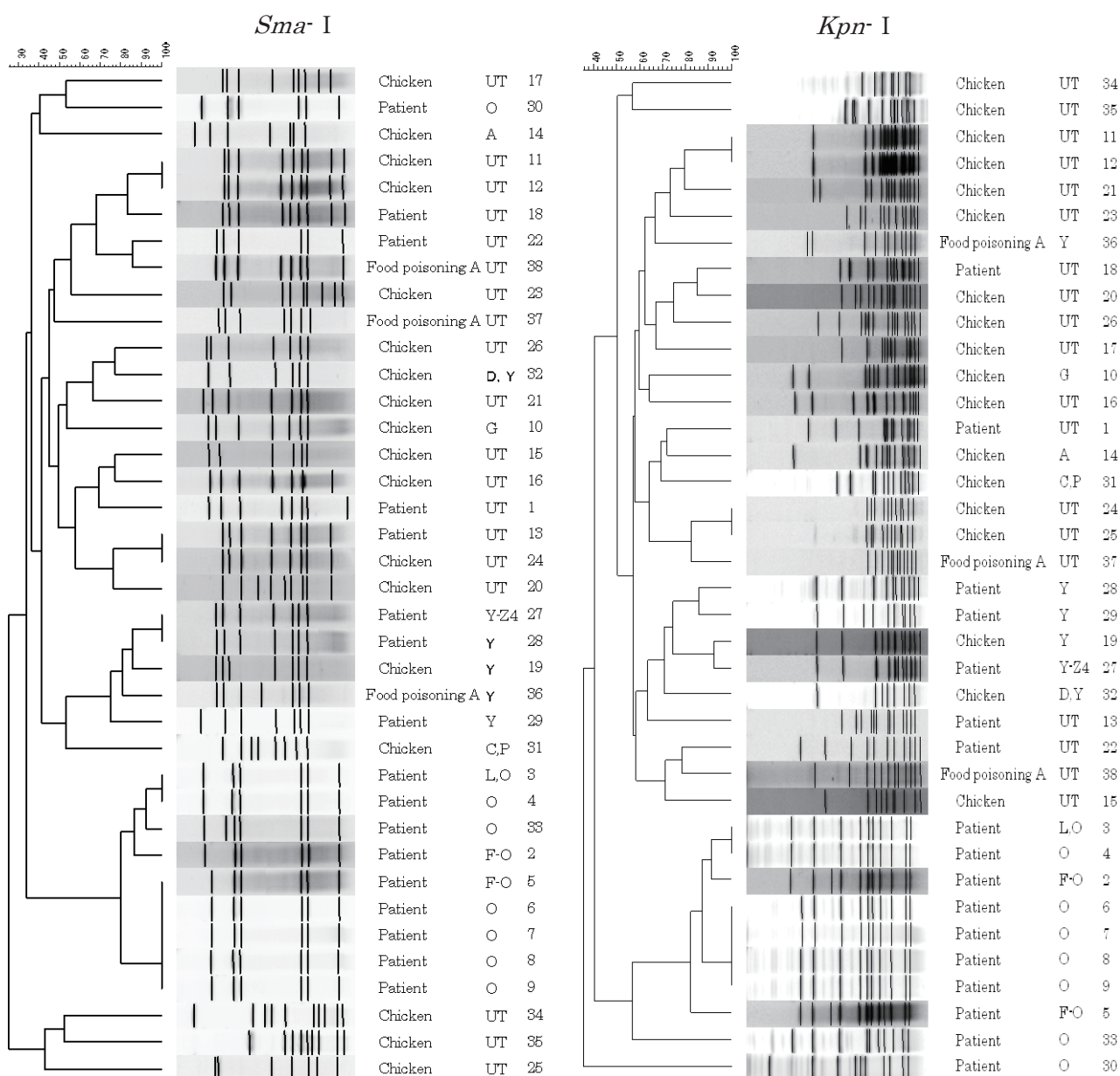


Fig.1 Result of gene analysis by PFGE of Campylobacter.

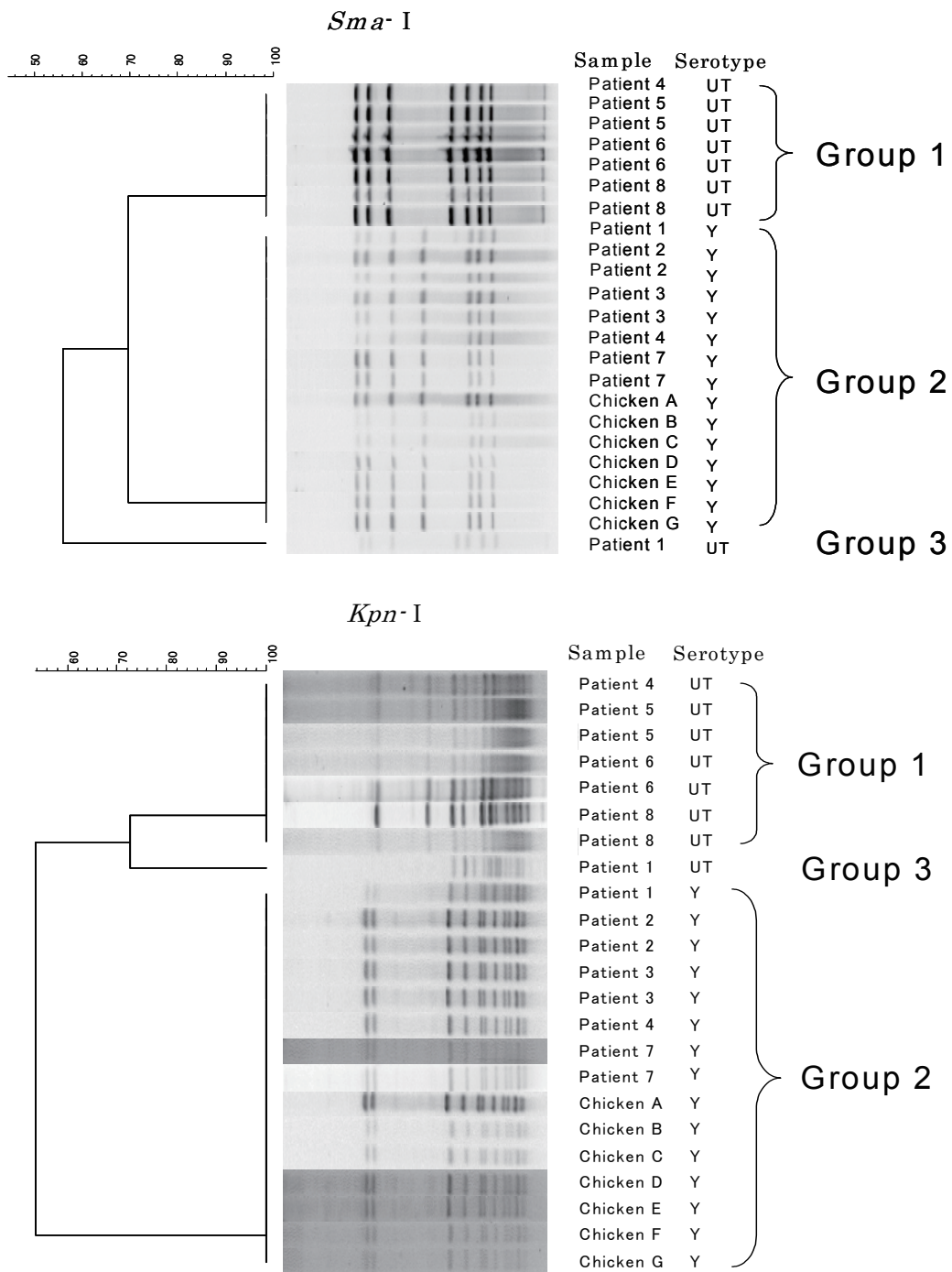


Fig. 2 Result of gene analysis by PFGE of *Campylobacter jejuni* of the epidemic food poisoning A.