

鶏肉からの効率的なカンピロバクターの分離の検討と分離菌の性状

Effective Isolation of *Campylobacter* from Chicken meats and the Characteristics of Isolates

渡邊 節 菅原 直子 小林 妙子
山田 わか 齋藤 紀行 廣重 憲生

Setsu WATANABE, Naoko SUGAWARA, Taeko KOBAYASHI
Waka YAMADA, Noriyuki SAITO, Norio HIROSHIGE

市販鶏肉からカンピロバクター検出を従来法、リンス法およびドリップ法の3方法で試みた結果、リンス法は従来法に比べ有効であった。また、ドリップ法も菌検出が可能で、検体が入手できない場合でもドリップ液が検査に利用できることがわかった。培養にポルトン培地を用いると好気条件でも良好に菌が分離でき効率的な菌検出が可能であった。分離菌株の薬剤感受性試験の結果ニューキノロン系薬剤に加えテトラサイクリン系薬剤でも耐性菌の出現が認められた。分離菌株の病原遺伝子は毒素産生遺伝子*virB11*が食中毒患者由来菌株では高い保有率を示し、カンピロバクターの病原性との関連が示唆された。

キーワード：カンピロバクター；培養条件；薬剤感受性試験；*virB11*

Keywords : *Campylobacter* ; culture condition ; drug susceptibility test ; *virB11*

1 はじめに

カンピロバクター食中毒は近年増加傾向がみられ、原因食品として食肉、特に鶏肉が重要視されている。食中毒発生防止のために、市販食肉のカンピロバクター汚染の現状を把握することが重要と考え、2004年6月から12月に県内の市販鶏肉汚染実態調査を実施した結果、少量菌量ではあるが、鶏肉の55%、鶏レバーの91%、牛レバー25%から、また、同時に実施した牛胆汁では20%から*Campylobacter jejuni*が検出され、食中毒のリスクが大きいことが明らかになった¹⁾。一方、食中毒事件等で原因と推定された食品から菌が検出された例は少ない。この理由として汚染菌量が少量であること、食中毒の潜伏期間が長く対象食品が残っていないこと、食品中で菌が死滅、減少していることなどが考えられる。さらに本菌は微好気培養が必要なため食品検体からの菌検出はジャーやCO₂発生装置等を必要とする煩雑な検査手順となっている。そこで、検体の処理方法を検討するとともに、ピルビン酸等が含まれる培地を用いた好気増菌培養を検討した。また、分離菌の薬剤感受性、特異遺伝子保有状況を調査したので併せて報告する。

2 材料および方法

2.1 供試材料

2005年3月から4月に県内の小売店で購入した国産市

販鶏肉（モモ肉32検体、ムネ肉13検体、ササミ4検体、手羽肉1検体）合計50検体を用いた。

2.2 検体の調製と菌検出

各検体25gにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）100mlを加え、1分間ストマッカー処理し、5倍乳剤試料とした。また、各検体の25gをPBS10ml入ったシャーレ内で1分間振り洗いを行い、これをリンス液試料とした。食肉包装内の肉浸出液や浸出液の付着した敷紙も菌検出対象検体とし、これらをPBSで洗い、ドリップ液試料とした。

各試料をCCDA培地に100 μ lずつ塗抹し、さらにプレストン培地、ポルトン培地の増菌培地に接種して42 $^{\circ}$ C微好気培養した。培養20時間後、両増菌培地からCCDA培地へ塗抹し菌分離を行った。分離培地上の疑わしい集落は常法²⁾に従ってカンピロバクターの同定を行った。5倍乳剤試料を用いて行った菌検出を従来法、リンス液試料を用いて行った場合をリンス法、ドリップ液試料を用いた場合をドリップ法とした。

2.3 MPN法によるカンピロバクターの定量検査

各検体の5倍乳剤試料を10ml空試験管3本に分注し、さらに乳剤試料1ml、0.1mlをプレストン培地10ml入りの試験管3本にそれぞれ接種し、42 $^{\circ}$ C20時間微好気培養した。培養後、各々1白金耳をCCDA培地に塗抹し42 $^{\circ}$ C48時間微好気培養した。培地上の疑わしい集落について、常法に従ってカンピロバクターの同定を行い、各段階希

積のカンピロバクター陽性試験管本数を最確数表にあてはめ、g当たりのMPN値を求めた。

2.4 培養条件と菌検出

カンピロバクターが検出された市販鶏肉のドリップ液11検体（モモ肉4検体、ムネ肉4検体、ササミ2検体、手羽肉1検体）を試料とし、次の①～⑤の各条件で菌分離を行った。①直接CCDA培地に100 μ l塗抹し42 $^{\circ}$ Cの微好気培養、②ボルトン培地に試料を接種し42 $^{\circ}$ Cで20時間微好気培養後、CCDA培地に1白金耳塗抹し、42 $^{\circ}$ C48時間微好気培養、③ボルトン培地に試料を接種し42 $^{\circ}$ Cで20時間好気培養後、CCDA培地に1白金耳塗抹し、42 $^{\circ}$ C48時間微好気培養、④ボルトン培地に試料を接種し37 $^{\circ}$ Cで20時間好気培養後、CCDA培地に1白金耳塗抹し42 $^{\circ}$ C48時間微好気培養、⑤ボルトン培地に試料を接種し37 $^{\circ}$ C4時間、42 $^{\circ}$ C20時間微好気培養後CCDA培地に1白金耳塗抹し42 $^{\circ}$ C48時間微好気培養する方法。

2.5 薬剤感受性試験

鶏由来34菌株（2004年～2005年度検出菌株）、牛由来13菌株（2004年度検出菌株）および食中毒患者由来18菌株（2002年～2005年検出菌株）合計65菌株をプレストン培地に接種し20時間微好気培養後、菌液を約1マクファーランド濃度に調整し25 μ lを12mlのミュラーヒントンブイヨンに添加し、ドライプレート（栄研化学）を用いた微量液体希釈法で17薬剤に対する感受性試験を行った。

2.6 特異遺伝子保有状況試験

鶏由来32菌株（2004～2005年度検出菌株）、牛由来7菌株（2004年度検出菌株）および食中毒患者由来28菌株（2002～2005年度検出菌株）合計67菌株のカンピロバクター特異遺伝子の保有についてPCR法を用いて確認した。対象遺伝子は鞭毛遺伝子*flaA*、侵入遺伝子*cadF*および毒

素産生遺伝子*virB11*とした。

3 結果

3.1 鶏肉から従来法によるカンピロバクター分離とリンス法、ドリップ法との比較

それぞれの種類の鶏肉50検体からのカンピロバクター分離を従来法、リンス法およびドリップ法で、直接培養、プレストン培地あるいはボルトン培地による増菌培養を行った。菌の検出件数と検出率の結果を表1に示した。いずれかの方法で菌が検出された鶏肉はムネ肉で13検体中5（38%）、モモ肉32検体中8（25%）、ササミ4検体中2（50%）、手羽肉1検体中1（100%）であったので、検出率は16検体に対する割合で現した。リンス法およびドリップ法と従来法とを比較すると、従来法の直接培養では菌が検出されなかったが、リンス法およびドリップ法の直接培養ではそれぞれ6%、19%の検出率であった。従来法のプレストン培地の増菌培養での菌検出率は25%であったがリンス法およびドリップ法でのプレストン培地による増菌培養ではそれぞれ56%、31%であった。従来法のボルトン培地培養による菌検出率は44%であったが、リンス法およびドリップ法での菌検出率はそれぞれ50%、44%であった。いずれの方法でも16検体全てから菌が検出できるものはなかった。

3.2 鶏肉中のカンピロバクターの菌数

カンピロバクターが検出された鶏肉16検体中12検体について菌数をMPN法で求めた。g当たり10オーダーが2検体、100のオーダーが2検体、1未満が8検体であった。

3.3 培養条件によるカンピロバクターの菌分離率

3.1に示したカンピロバクターが検出された市販鶏肉11検体から採取したドリップ液について、ボルトン培地

表1 検体の処理別増菌培地別検出結果

検体名	検体数	従来法			リンス法			ドリップ法			*いずれかの方法で陽性となった件数
		直接培養	Preston培養	Bolton培養	直接培養	Preston培養	Bolton培養	直接培養	Preston培養	Bolton培養	
ムネ肉	13	0	2 (40%)	2 (40%)	0	4 (80%)	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	3 (60%)	5
モモ肉	32	0	1 (13%)	4 (50%)	1 (13%)	3 (38%)	4 (50%)	1 (13%)	3 (38%)	3 (38%)	8
ササミ	4	0	1 (50%)	1 (50%)	0	1 (50%)	2 (100%)	0	0	1 (50%)	2
手羽肉	1	0	0	0	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	1
Total	50	0	4 (25%)	7 (44%)	1 (6%)	9 (56%)	8 (50%)	3 (19%)	5 (31%)	7 (44%)	16

()内は、いずれかの方法で陽性となった件数のうちの各条件の検出率

表2 ドリップ検体の培養条件別検出状況

検体名	直接培養	増菌培養(Bolton培地)			
		42 $^{\circ}$ C微好気	42 $^{\circ}$ C好気	37 $^{\circ}$ C好気	37 $^{\circ}$ C4hrs+42 $^{\circ}$ C24hrs微好気
ムネ肉	2	3	3	2	2
モモ肉	1	3	2	1	2
ササミ	0	1	1	1	2
手羽肉	0	0	0	0	0
Total	3	7	6	4	6

表3 C.jejuni分離株の薬剤感受性試験結果

薬剤	MIC(μ g/ml)								MIC* ブレイクポイント	耐性菌株数 (%)
	≤ 0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64		
ABPC	0	0	9	19	15	9	13	0	32	13(20)
PIPC	0	0	0	0	0	2	21	42	64	42(64)
CEZ	0	0	0	0	0	1	64	0	32	64(99)
CAZ	0	0	2	0	38	19	6	0	32	6(9)
AZT	0	0	0	0	0	2	63	0	32	63(97)
IPM	54	10	0	0	1	0	0	0	16	0
GM	52	10	2	0	1	0	0	0	16	0
AMK	7	2	51	1	2	2	0	0	32	0
MINO	30	6	7	4	3	15	0	0	16	15(23)
LIFX	42	8	2	2	11	0	0	0	8	11(17)

* : 栄研化学ドライプレートの腸内細菌の感受性カテゴリー

で増菌する培養条件を好気、微好気あるいは37℃、42℃に設定して菌分離を行い、菌を検出した検体数の結果を表2に示した。通常実施される培養条件②(42℃微好気培養)では7検体からカンピロバクターが検出されたが、③の条件では6検体、④条件では4検体が検出された。⑤の培養温度をシフトアップする条件では6検体が検出された。

3.4 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の最小発育阻止濃度(μ g/ml)のブレイクポイントは栄研化学ドライプレートの腸内細菌の感受性カテゴリーに拠り、ニューキノロン系LIFXは8 μ g/ml以上、MINOは16 μ g/ml以上とした。カンピロバクターは β -ラクタム系薬剤に抵抗性を示すが、これ以外にキノロン系薬剤およびテトラサイクリン系薬剤に耐性を示す菌がみられた。供試菌65菌株中LIFXに耐性を示したのは鶏由来35菌株中8株(24%)、牛由来13菌株中1株(8%)、食中毒由来18菌株中2株(11%)で、全体では17%の株が耐性を示した。一方、MINOは鶏由来株15株(44%)全体で25%が耐性であった。食中毒由来株、牛由来株に耐性を示すものはなかった。

3.5 特異遺伝子保有状況

分離菌株の由来別に*Campylobacter jejuni*の特異遺伝子*flaA*、*cadF*および*virBII*の保有状況を比較した結果を表4に示した。鞭毛遺伝子*flaA*は鶏由来株、牛由来株の100%が保有し、食中毒由来株では93%の保有率であった。侵入遺伝子*cadF*は由来に関係なくすべての菌株が保有していた。毒素産生遺伝子の*virBII*は鶏由来株の13%、牛由来株の29%が保有していたが、食中毒由来株では54%と高い保有率であった。

表4 分離菌株の特異遺伝子保有状況

由来	菌株数	特異遺伝子保有数		
		<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>virBII</i>
鶏	32	32	32	4
(%)		(100)	(100)	(13)
牛	7	7	7	2
(%)		(100)	(100)	(29)
食中毒患者	28	26	28	15
(%)		(93)	(100)	(54)
計	67	65	67	21
(%)		(97)	(100)	(31)

4 考察

カンピロバクター食中毒事件において、食品からの菌検出は困難である。その理由として潜伏時間が長いこと、対象食品が残されていないこと、食品が残っていても汚染菌量は比較的少ないことが考えられる。食品からの菌検出は食中毒の原因究明のために重要で食中毒防止対策につながる。そこで、食品からの菌検出率を高めるために検体の処理方法の工夫と処理検体の培養条件について最良の方法について検討した。

はじめに、検体の処理方法の工夫として、鶏肉検体をストマッカー処理し5倍乳剤を作製する方法、鶏肉検体をPBSでリンスする方法および鶏肉検体の包装内液等を採取するドリップ法で鶏肉50検体について検討した。その結果、鶏肉50検体のうち、いずれかの方法で菌が検出された陽性件数は16件であったが、一つの方法で16件がカバーできるものはなかった。菌が検出された16検体のうち12検体についてMPN法で菌数を求めた。結果は示していないが、10のオーダーが2検体、10⁰オーダーのものが2検体、1未満が8検体と、検査対象とした検体中の菌数は極めて少量であったため、一つの方法で16検体全てから菌が検出されなかったと考える。すなわち3方法のうちいずれかの方法で菌検出を比較すると、5倍乳剤を用いる従来の方法に比べて、同じ試料量を10mlのPBSの入ったシャーレ内で振り洗いするリンス法は、10倍量が処理できるので10倍濃縮試料となり、また、ストマッキングによる試料の肉油脂成分による混濁もなく検出率が高くなる方法であると思われた。また、ドリップ法でも菌検出が可能で、食肉検体が入手できない場合でもドリップ液を利用できることがわかった。

近年環境水からのカンピロバクター検出にピルビン酸やメタ重亜硫酸ナトリウムを含む培地であれば好気条件で増菌培養が可能との報告³⁾がある。そこで従来から用いていたプレストン培地を指標に、ピルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウムがプレストン培地より4倍含有されるボルトン培地の2培地を用い、食肉検体から好気増菌培養での検出状況を微好気培養法の場合と比較した。その結果、好気増菌培養は従来の微好気増菌培養や37℃4時間後42℃24時間微好気培養する欧米方式の培養方法と比較して遜色なく菌検出ができた。微好気条件を設定しな

くても、ボルトン培地に接種して検体を搬入すればカンピロバクターが効率的に培養でき、食品からの検出率が向上する可能性を示した。

また、カンピロバクターのニューキノロン系薬剤に対する耐性菌の増加が世界的な問題となっている。伊藤らの調査によると1989年ころより薬剤耐性菌が出現し、現在では約30%が本薬剤に対して耐性となっている⁴⁾。今回の調査でも牛や食中毒患者由来菌の耐性菌出現は10%前後と低いが、鶏由来菌の耐性が24%と高かった。また、テトラサイクリン系薬剤MINOにも鶏由来株の44%が耐性を示し、横山ら⁵⁾のテトラサイクリン耐性試験と同等の結果を示した。テトラサイクリン系薬剤は鶏用飼料に添加が認められており⁶⁾ニューキノロン系薬剤とともに今後も継続した調査を行い動向をみる必要があるものと考えられる。

一方、*C.jejuni*の病原性について腸内病原細菌と同様、細胞侵入性、毒素産生性などの遺伝子について報告がされているが、病原性との関連については不明である^{7)~9)}。今回、特異遺伝子を調査した結果、鞭毛遺伝子*flaA*や侵入遺伝子*cadF*は鶏、牛、食中毒患者の由来による区別なく、各菌株で保有が認められた。むしろカンピロバクターであることを証明する鑑別用に利用できる遺伝子になりえると思われた。しかし毒素産生遺伝子*virB11*は食中毒患者由来菌株では54%となり、鶏由来が13%、牛由来が29%と比較的高い保有率を示し、病原性との関連が強く示唆された。今後、検査データの蓄積が病原性発現の解明につながっていくと思われる。

参考文献

1) 渡邊節, 川野みち, 小林妙子, 山田わか, 齋藤紀行, 川向和雄: 宮城県保健環境センター年報, 23, 98 (2005)

2) 坂崎利一: 食水系感染症と細菌性食中毒, 中央法規出版 (2000) p 351

3) A.D.Sails, F.J.Bolton, A.J.Fox, D.R.A.Wareing, and D.L.A.Greenway : Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environment Water by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 5 2002, p1319-1324

4) 伊藤武, 甲斐明美: モダンメディア, 50, 6 (2004)

5) 横山敬子, 柳川義勢, 齊藤香彦, 新垣正夫, 甲斐明美, 鎌田有希, 五十嵐英夫, 伊藤武: 鶏および鶏肉由来*Campylobacter*属菌のニューキノロン剤に対する薬剤感受性. 東京衛研年報, 48, 3 (1997)

6) 農林水産省消費・安全局衛生管理課 (2003) “畜産用飼料の使用について—畜産農家の皆様へ—” 平成15年12月

7) David J.Bacon, Richard A.Alm, Don H.Burr, Lan Hu, Dennis J.Kopecko, Cheryl P.Ewing, Trevor J.Trust, and Patricia Guerry : Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176, American Society for Microbiology. 8, 4384 (2000)

8) Suvamoy Datta, Hidekazu Niwa and Kikuji Itoh : Prevalence of 11 Pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. Journal of Medical Microbiology, 52, 345 (2003)

9) Dang Duong Bang, Birgitte Borck, Eva Moller Nielsen, Flemming Scheutz, Karl Pedersen and Mogens Madsen : Detection of Seven Virulence and Toxin Genes of *Campylobacter jejuni* Isoletes from Danish Turkeys by PCR and Cytolethal Toxin Production of the Isolates, Journal of Food Protection, 67, 2171 (2004)