

図3 保存温度と汚染細菌の増殖 (2000年1月実施)

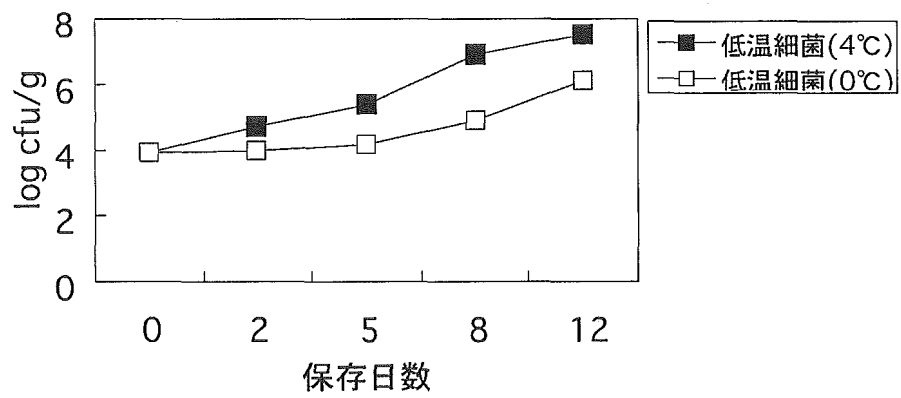


図4 保存温度と低温細菌の増殖 (2000年1月実施)

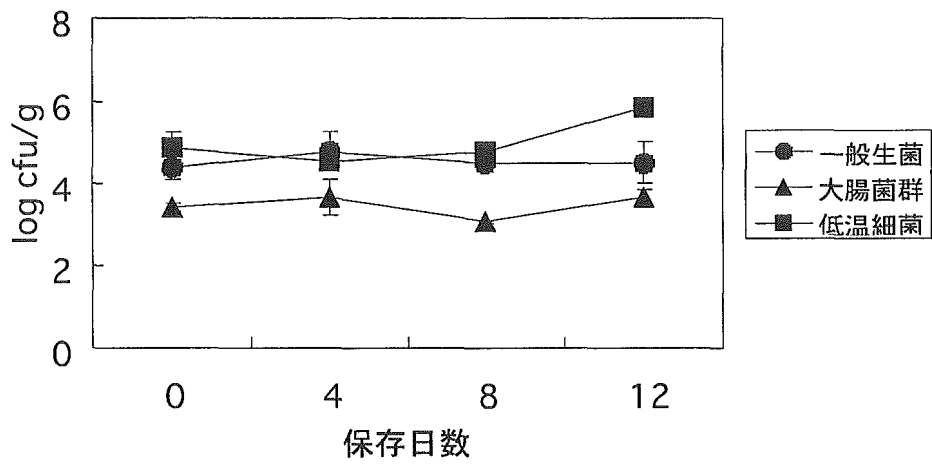


図5 0°C保存時の汚染細菌の増殖 (2000年7月午前実施)

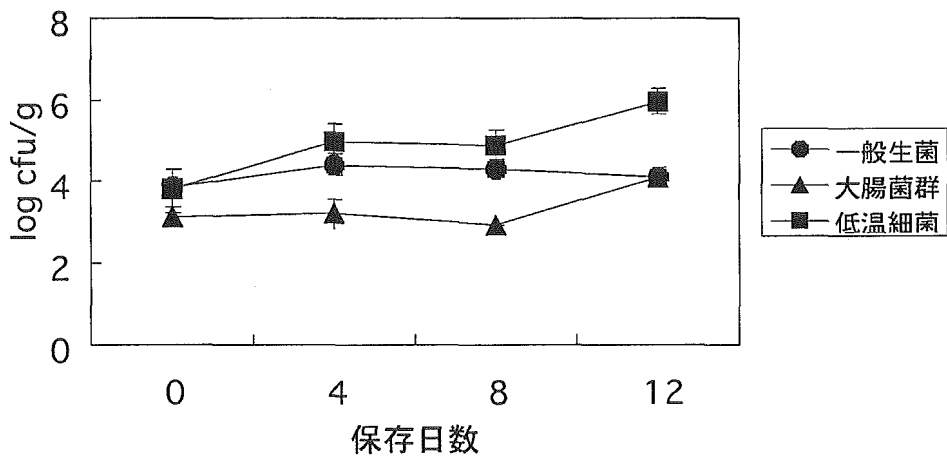


図6 0°C保存時の汚染細菌の増殖 (2000年7月午後実施)

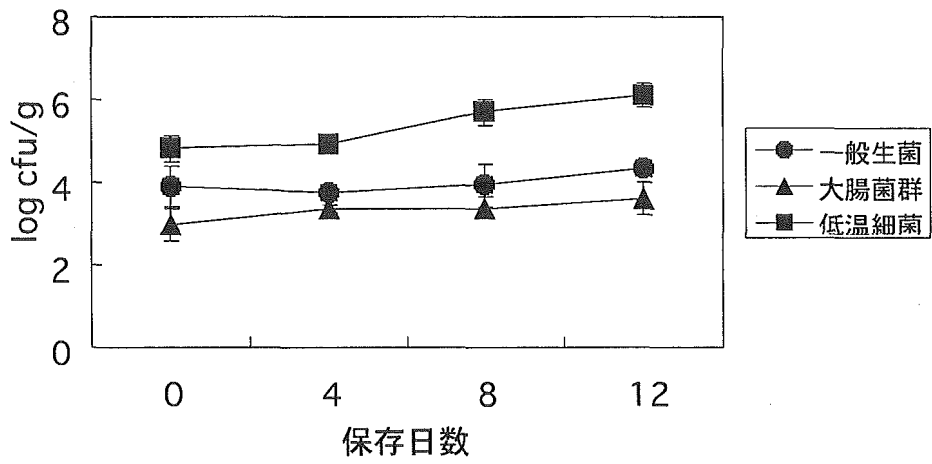


図7 0°C保存時の汚染細菌の増殖 (2001年1月午前実施)

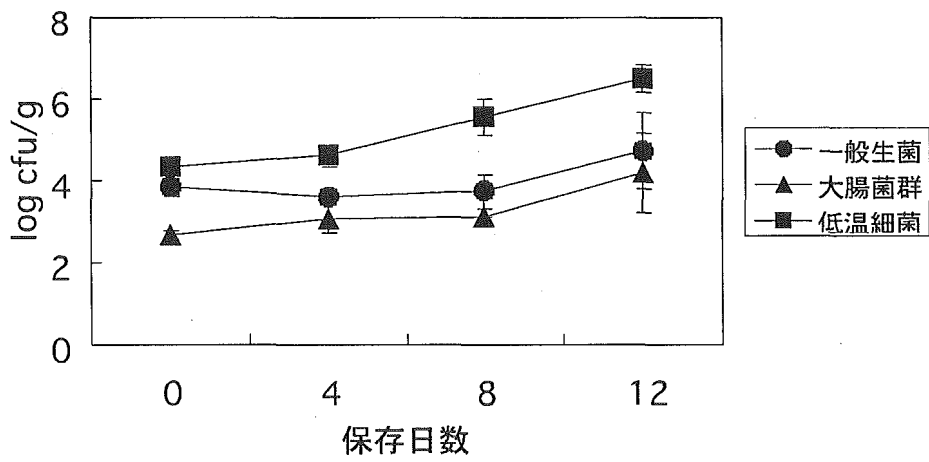


図8 0°C保存時の汚染細菌の増殖 (2001年1月午後実施)

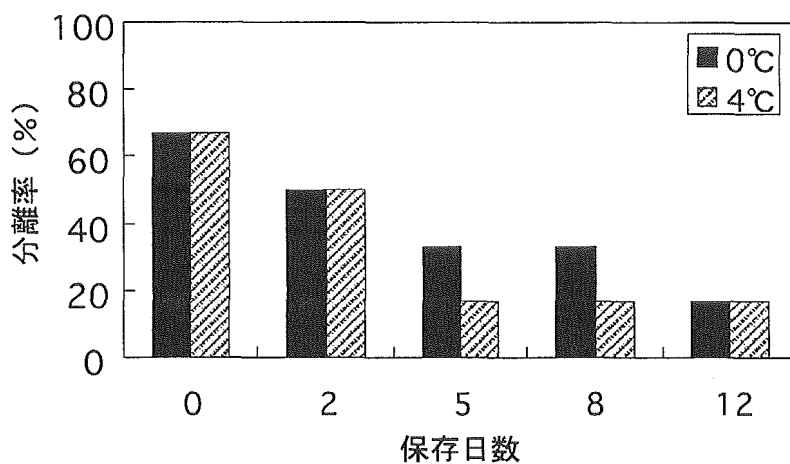


図9 保存温度とカンピロバクターの分離率 (1999年8, 11月実施)

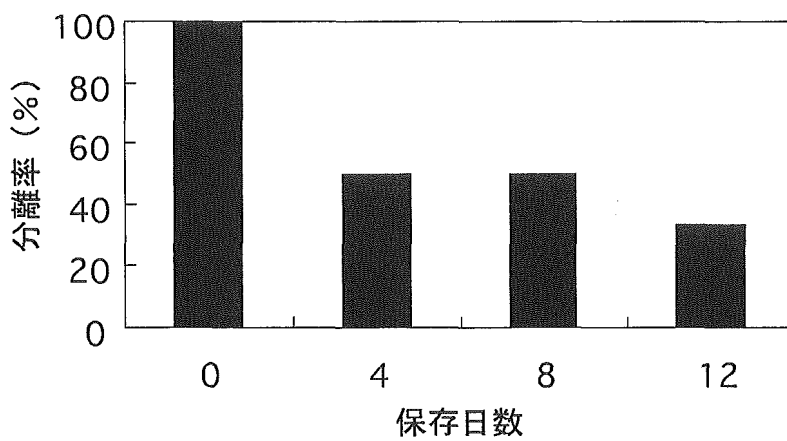


図10 0°C保存時のカンピロバクターの分離率 (2000年7月、午前・午後実施)

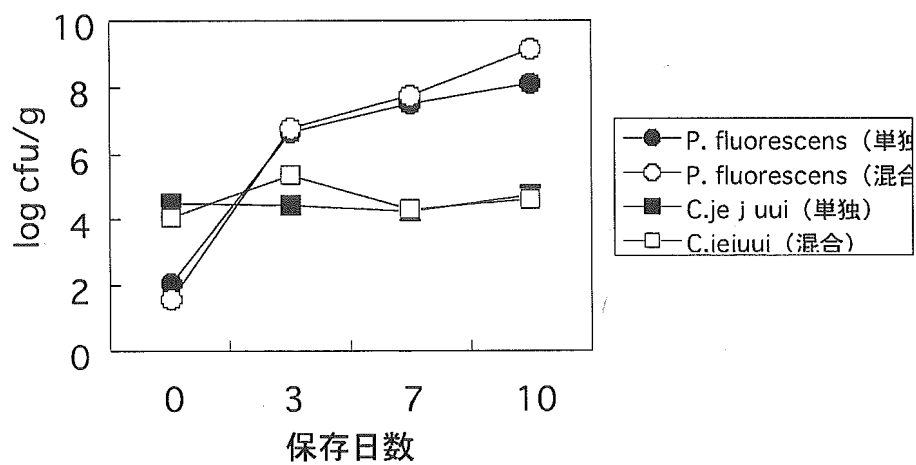


図 1 1 試験管内における 4°Cでの低温細菌とカンピロバクターの増殖性・生残性

表1 鶏肉の低温保存中に増殖した低温細菌の優勢菌種

保存 日数	検 体 No.	優勢に増殖した低温細菌の16S rRNA塩基配列に基づく菌種の同定		
		2000年7月午前	2000年7月午後	2001年1月午前
0	1	Maize root bacterium	Unidentified eubacterium	Soil bacterium
	2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Achromobacter ruhlandii</i>
	3	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	Unidentified bacterium
	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	5	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	6	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
4	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Uncultured proteobacterium	<i>Kineosporia rhamnosa</i>
	2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	4	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
	5	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
	6	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
8	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas veronii</i>
	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas veronii</i>
	3	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas veronii</i>
	4	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
	5	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
	6	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
12	1	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas mucidolens</i>
	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	3	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
	4	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
	5	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
	6	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas putida</i>

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

カンピロバクターの保菌と腸管破損によると体への影響に関する研究

食鳥肉製造工程において、脱羽後と体、中抜き後と体、冷却後と体、製品のカンピロバクター菌数の変動は明らかにされており、中抜き後で増加し、冷却後に低下、製品で若干増加する。製品での増加は高度汚染と体からの汚染拡散によると思われることから、まず腸管破損に起因する汚染が残存していると推定される冷却後と体を対象とし、腸管破損の影響を調べた。食鳥肉のカンピロバクター汚染に関して、腸管破損が与える影響を調べるために、消化管内容物による汚染が明らかと体（汚染と体）と、汚染がないと体（非汚染と体）のカンピロバクター菌数を比較した。併せて、と体汚染の程度と保菌濃度との関係を知るために、同一ロットの盲腸内容物について、カンピロバクターの定量分離を実施した。その結果、非汚染の検体からも一定量の菌量が検出されていること、また、過去の工程別検査では脱羽後からも検出されていることから、今後は脱羽直後の部位別定量検査を実施し、汚染度合いに差が認められるのか調査することで、脱羽機の衛生管理が処理場におけるカンピロバクター対策の重要ポイントになると考えられる。

研究協力者

福永真治 兵庫県淡路食肉衛生検査所
柴折浩幸 兵庫県但馬食肉衛生検査所
兼子めぐみ 兵庫県但馬食肉衛生検査所
佐藤 博 新潟県食肉衛生検査センター
川森文彦 静岡県環境衛生科学研究所

物についてカンピロバクター定量を平板法で実施した。

B 研究方法

1. 食鳥処理場の概要

処理状況は、ブロイラーを1日当たり約6000羽、脱羽はフィンガー式とドラム式、チラーは予備チラー4基、本チラー1基（次亜塩素酸 Na 使用無）、外剥ぎ方式による解体処理。

2. 材料

冷却後、解体中に糞便汚染した汚染と体、非汚染と体、同一ロットの盲腸内容物を材料とした。

1) と体

胸部、モモ肉部分の皮膚 25cm² を拭き取り枠等を使用して滅菌ハサミとピンセットで切り取り、サンプリングバックに入れた。

1ロットから各3羽分を目安に採取した。

2) 盲腸内容物

1ロットから3件採取した。サンプリングしたと体と異なるものでも可とした。

3. 検査方法

A 研究目的

平成12年度調査で脱羽後と体、中抜き後と体、冷却後と体、製品のカンピロバクター菌数変動は中抜き後で増加し、冷却後に低下、製品で若干増加することが明らかとなった。製品での増加は高度汚染と体からの汚染拡散によると思われることから、腸管破損に起因する汚染が原因と考えられたので、腸管破損が与える影響を調べるために消化管内容物における汚染が明らかと体（汚染と体）と、汚染がないと体（非汚染と体）の胸部皮膚と背部皮膚でカンピロバクター菌数を MPN 法と平板法で比較した。また、と体汚染量と保菌量との関係を知るために、同一ロットの盲腸内容

1) と体

皮膚を入れたサンプリングバックに滅菌生理食塩水 100ml を加え、60 秒間ストマックし試料原液とした。

2) 盲腸内容物

盲腸内容物の適量をサンプリングバックに入れ、これに 10 倍量の滅菌生理食塩水を加え、60 秒間ストマック処理したものを試料原液とした。さらに試料原液を滅菌生理食塩水 9 ml で 10^6 まで階段希釈した。

3) 培養

増菌培地にプレストン培地 42°C 、24 時間微好気培養、分離培地に CCDA 培地で 42°C 、48~72 時間微好気培養した。MPN 3 管法と平板法を併用しカンピロバクター菌数を求めた。MPN 法では試料接種量を 10ml、1ml、0.1ml の 3 段階とし、10ml の試料は倍濃度のプレストン培地に加え増菌培養した。平板法は 1 段階につき 2 枚ずつ試料 0.1ml を CCDA 培地に滴下しコンラージ棒で塗抹後、72 時間分離培養した。CCDA 培地使用時は、コロニーの拡散、遊走を防ぐため 30 分~1 時間孵卵器内で乾燥させた。コロニーの計測は原則として 200 以下のコロニーが発育する平板で行い、連続する希釈段階で出現した場合は、希釈段階の低い平板のコロニー数を採用した。

4) 確認試験

カンピロバクターであることの確認は次の性状試験により実施した。①グラム染色による染色性及び菌形、②オキシダーゼ、③カタラーゼ、④馬尿酸塩加水分解試験により *Campylobacter jejuni/coli* の区別を行う。平板法では疑わしいコロニーを数え推定カンピロバクター数とし、この内 10 個のコロニーを釣菌しグラム染色により菌形を確認する。異なったコロニーが含まれていた場合は、その比率から推定数を補正する。2 株について前述の性状検査を実施しカンピロバクターであることを確認する。

C 研究結果及び考察

3 農場 4 ロットについて検査した結果、汚染を受けたモモ肉部分の皮膚 6 検体は、MPN 法で $<0.12\sim>44\text{MPN}/\text{cm}^2$ 、平板法で $0\sim880\text{cfu}/\text{cm}^2$ 検出され、非汚染の皮膚 9 検体は、 $<12\sim0.44\text{MPN}/\text{cm}^2$ 、 $0\sim20\text{cfu}/\text{cm}^2$ 検出された。汚染胸は 2 検体、 $<0.12\sim44\text{MPN}/\text{cm}^2$ 、 $0\sim520\text{cfu}/\text{cm}^2$ 検出され、非汚染は 9 検体、 $<0.12\sim3.72\text{MPN}/\text{cm}^2$ 、 $0\sim100\text{cfu}/\text{cm}^2$ 検出された。分離されたカンピロバクターは、全て *C.jejuni* でその内の一部は Penner の血清群で R 群に型別された。MPN 法と平板法を比較すると、MPN 法で検出される検体が平板法では検出されず、両者に相関関係は認められなかった。しかし、平板法で検出された検体は 1cm^2 当たりの細菌数で比較すると MPN 法より 1 オーダー以上高く検出された (表 1)。盲腸内容物は 6 農場 10 ロットについて検査した結果、42 検体中 23 検体からカンピロバクターが分離され、 $1.7\times 10^6\sim2.7\times 10^8\text{cfu}/\text{g}$ 検出された (表 2)。分離されたカンピロバクターは、全て *C.jejuni* でその内の一部は Penner の血清群で R 群に型別された。

今回の皮膚検体では、D-b 8 ロットのみが盲腸内容物から $10^6\sim10^7\text{cfu}/\text{g}$ 検出され、皮膚からも高率に検出された。このことは、保菌したロットが処理されれば汚染・非汚染を問わずにカンピロバクターが検出され、さらに糞便汚染を受ければより高い菌量が検出される証明となった。しかし、保菌をしていないロットからも若干ではあるが検出されたことは、機械器具、手指等からの 2 次汚染が原因であると考えられた。外剥ぎ解体の処理場においては、糞便汚染を受ける割合は 1% 以下であるが、解体中糞便汚染を受ける原因は、と体の頸をシャックルにつり下げ、総排泄腔が下を向いた状態で手羽胸、モモと順次解体される

際、それぞれの部分肉が総排泄腔付近を通過させる時に汚染を受けることが明らかであることから、作業工程を見直す事で汚染対策が可能であると考えられた。

今回の結果では、非汚染の検体からも一定量の菌量が検出されていること、また、過去の工程別検査では脱羽後からも検出されていることから、今後は脱羽直後の部位別定量検査を実施し、汚染度合いに差が認められるのか調査することで、脱羽機の衛生管理が処理場におけるカンピロバクター対策の重要ポイントになると考えられる。

食鳥処理場におけるカンピロバクター対策には、保菌検査結果からも明らかなように農場での衛生対策が最も重要であるが、処理場においては常時、汚染農場を十分に把握するとともに汚染がない農場から処理し、汚染農場処理時は作業中の機械器具等の洗浄消毒を徹底する必要がある。

表1 カンピロバクター分離成績

採取月日	農場名	区分	モモ皮膚		胸部皮膚		盲腸便
			MPN/ cm ²	CFU/ cm ²	MPN/ cm ²	CFU/ cm ²	CFU/g
15.2.12	D-b 8	汚染	>44	400	44	520	4.4×10 ⁷
			3.0	0			1.7×10 ⁶
			>44	880			9.6×10 ⁶
		非汚染	0.44	0	3.72 <0.12 0.36	100 0 0	
H15.2.12	E	非汚染	<0.12	0	<0.12	0	0
			<0.12	0	<0.12	0	0
			<0.12	0	<0.12	0	0
H15.2.24	D-b 13	汚染	0.44	0	<0.12	0	0
			<0.12	0			0
			0.92	20			0
		非汚染	<0.12	0	<0.12	0	
		<0.12	0				
H15.2.24	F-9	非汚染	<0.12	0	<0.12	0	0
			0.28	0	<0.12	0	0

表2 盲腸内容物からのカンピロバクター分離成績

採取月日	農場名	CFU/g	採取月日	農場名	CFU/g
H14.9.19	A-1-3	2.8×10 ⁷ 1.8×10 ⁷ 7.4×10 ⁶ 1.7×10 ⁷ 2.6×10 ⁷	H14.9.30	B-c	1.5×10 ⁸ 1.7×10 ⁷ 5.1×10 ⁸ 4.4×10 ⁷ 8.9×10 ⁷
H14.10.3	D	9.5×10 ⁶ 1.7×10 ⁷ 2.9×10 ⁷ 4.4×10 ⁷ 1.5×10 ⁷	H14.10.3	B-d	2.7×10 ⁸ 1.1×10 ⁸ 9.6×10 ⁷ 2.5×10 ⁷ 1.6×10 ⁷
H14.12.23	B-a	0 0 0 0 0	H14.12.25	B-d	0 0 0 0 0
H15.2.12	D-b8	1.7×10 ⁶ 4.4×10 ⁷ 9.6×10 ⁶	H15.2.12	E	0 0 0
H15.2.24	D-b13	0 0 0	H15.2.24	F-9	0 0 0

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

パルスフィールド電気泳動(PFGE)法による Penner B 群
Campylobacter jejuni の遺伝子型別に関する研究

ヒトおよび動物（鶏・鳩・牛）由来 *Campylobacter jejuni* をパルスフィールド電気泳動法（Sma。処理）で型別したところ、同一の血清型（Penner B 群）を示した 81 株が 55 型に分けられた。このうち 5 つの型についてはヒト由来株と鶏肉（レバー）由来株が同一の遺伝子型を示し、また、その他にもヒト-鶏肉間で DNA 切断パターンが類似した菌株がいくつかみられたことから、カンピロバクター腸炎の原因食品として鶏肉（レバー）が重要であり、中でも Penner B 群の *Campylobacter jejuni* との関連が強いことが示唆された。

小野一晃	埼玉県衛生研究所
斎藤志保子	秋田県衛生科学研究所
川森文彦	静岡県環境衛生科学研究所
重茂克彦	岩手大学

が、カンピロバクターの病原性の研究には適切な実験動物モデルがなく、また遺伝学的解析もそれほど進んでいないため、腸炎の発病機序や病原因子については不明な点が多い。そこで過去に分離されたヒト臨床由来株と動物（鶏・鳩・牛）由来株の関連性を明らかにするため、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法により

A. 研究目的

カンピロバクターは家畜（牛・豚）や家禽（鶏）の腸管内に広く分布している

分離菌株の遺伝子レベルでの型別を行った。

わが国の腸炎患者から分離されるカンピロバクターの大部分（95%以上）は *Campylobacter jejuni* であり、また、分離菌株の血清型は Penner B 群が最も多いことが知られている。加えて、われわれが平成 12 年度の本研究で行った市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査においても、高率に菌が分離され、分離菌株の血清型も型別された中では Penner B 群が最も多かった。

そこで、ヒト・鶏・鳩・牛由来 *Campylobacter jejuni* 血清型 Penner B 群の菌株についてパルスフィールド電気泳動（PFGE）法により遺伝子型別を行い、さらに UPGMA(unweighted pair group method with averages)法により菌株間の相関関係を比較した。

B. 検査方法

1) 供試菌株

静岡県環境衛生科学研究所、埼玉県衛生研究所・秋田県衛生科学研究所の3ヶ所で分離したヒト臨床（集団発生4事例12株、散発例32株、海外旅行者由来3株）由来47株、鶏（鶏肉由来15株、鶏レバー由来11株）由来26株、鳩由来3株、牛盲腸便由来5株、計81株の *Campylobacter jejuni*（血清型 Penner B 群）を用いた。

2) パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法による *Campylobacter jejuni* の型別

C. jejuni 計81株についてPFGE法によるDNA切断パターンを基に遺伝子

型別を行った。凍結状態（-80℃）で保存してある *C. jejuni* をミューラーヒントン培地で微好気状態（O₂：5%，CO₂：10%，N₂：85%）で培養後、菌体を滅菌蒸留水200μlに懸濁し、等量の2% [W/V] 低融点アガロースと混ぜ、アガロースブロックを作成した。アガロースブロックはリゾチーム溶液（0.5M-EDTA [pH8.0], Lysozyme [1mg/ml]）に浮遊させ、37℃で4時間恒温水槽で静かに振盪した。その後アガロースブロックをプロテナーゼ K 溶液（0.5mM-EDTA [pH8.0], Proteinase K [1mg/ml], 0.5% [W/V] N-lauroyl-sarcosine）に入れ、恒温水槽で50℃に保温しながら一晩静かに振盪した。このアガロースブロックを洗浄液（10mM Tris-HCl [pH7.2], 1mM-EDTA [pH8.0], 4mM Pefabloc SC）に入れ50℃で30分恒温水槽で振盪し（2回繰り返す）、TE Buffer で洗浄後、制限酵素で一晩処理した。PFGE は CHEF-DR[®] (BIORAD) を用いて 1% [W/V] NA アガロースゲルにより、パルスタイム4秒から50秒、200V、14℃、22時間の条件でおこなった。電気泳動後、Et-Br で染色し、紫外線照射下で写真撮影した。なお、制限酵素については *Sma* I を用いた。

3) 各菌株間における相関関係の比較

各菌株の PFGE 法により得られた DNA 切断パターン（*Sma* I 処理）をコンピュータで解析した後、UPGMA 法により樹形図を作成し、ヒト・鶏・鳩・牛由来菌株間の相関関係を比較した。

C. 研究結果

1) 集団発生例由来菌株の型別

供試したヒト由来 *C. jejuni* 47 株の PFGE 型を表 1 に示す。集団例 (1) では T1, T5 のグループ(P5 型)と T3(P25 型)の 2 つの遺伝子型に分けられた。このうち P5 型については、この食中毒事例において、食品残品の鶏肉から分離された菌株 (No. T103) と同一の遺伝子型であった。

次に集団例 (2) では患者由来 4 株が同一 (P20 型) の遺伝子型に、集団例 (3) についても 4 株が同一 (P48 型) の遺伝子型であった。

2) 散発例由来菌株の型別

海外旅行者分離株も含め、散発例ではほとんどの菌株が異なる遺伝子型に分けられたが、秋田、静岡でそれぞれ分離された計 4 株 (菌株 No. AK2923, AK3235, SH21, SH24) は P55 型で同一の遺伝子型であった (表 1)。

3) 動物由来菌株の型別

供試した動物由来 *C. jejuni* 34 株の PFGE 型を表 2 に示す。多くの菌株が異なる遺伝子型に分けられたが、秋田と埼玉で鶏肉から分離された 2 株 (菌株 No. M28, M320) は P55 型で同一の遺伝子型であった。また、秋田の鶏肉および埼玉の鶏レバーから分離された 5 株 (菌株 No. M330, L10, L58, L72, L73)、埼玉の鶏レバーから分離された 7 株 (菌株 No. L1, L2, L5, L6, L17, L18, L38) はそれぞれ、P47 型、P52 型で同一の遺伝子型であった。

また、鳩、牛由来株はすべて異なる遺伝子型であった。

4) UPGMA 法による菌株間の相関関係の比較

C. jejuni 計 81 株の UPGMA 法による樹形図を図 1 に示す。供試した菌株は PFGE 法により 55 型に型別された。P46、52、55 型についてはヒト由来株と鶏肉 (レバー) 由来株が同一の遺伝子型であった。また、AK2911 と SH23 (0.94), AK2901 と AK3297 (0.94), M336 と AK2923, AK3235 (0.94) のようにヒト-鶏肉間で 0.9 以上の高い相関関係を示した菌株もあった。

D. 考察

ヒト由来株については、集団発生例 (2), (3) では患者由来 4 株がそれぞれ P20 型、P48 型の同一の型を示したが、カンピロバクター食中毒においては同一事例の患者から複数の血清 (遺伝子) 型菌が分離された例がいくつか報告されている。集団発生例 (1) においても分離された菌株は同じ Penner B 群であったが、PFGE 法による遺伝子型別では P5 型と P25 型の 2 種類に分けられた。この事例では患者から分離された菌株と食品残品の鶏肉から分離された菌株の DNA 切断パターンが一致し (P5 型)、原因食品が特定できた事例であった。

カンピロバクター腸炎は潜伏時間が長く、調査開始時すでに原因食品が保存されていないために、原因を特定できない場合が多い。しかし、過去の集団発生事例から原因食品としては生または調理不

十分な鶏肉を介したものがいくつか報告されている。今回 PFGE 法により Penner B 群の菌株について遺伝子型別を行いヒト-動物間の相関関係を比較したところ、ヒト-鶏肉間 (P46 型) およびヒト-鶏レバー間 (P52 型) で同一の遺伝子型を示すものがあることが判明し、また、DNA 切断パターンが完全に一致しないまでも P45 型と P46 型, P49 型と P50 型, P54 と P55 型のように 0.9 以上の高い相関を示した菌株もみられたことから、カンピロバクター腸炎の原因食品として鶏肉 (レバー) の関与が強く示唆された。

一方、動物由来株については P52 型のように同一店舗で購入した鶏レバーから分離された菌株 (菌株 No. L1, 2, 5, 6 および L17, 18) が同一の遺伝子型であったのに対し、同一店舗で購入日が異なっても同一の遺伝子型を示したもの (P47, P52 型)、また、分離年月・場所が異なっても同一の遺伝子型であったもの (P55 型) もみられた。この P55 型については秋田県内での散発例 (菌株 No. AK2923 および AK3235) や静岡県内での散発例 (菌株 No. SH21 および SH24) といった複数事例のヒト由来株と遺伝子型が一致することが判明した。カンピロバクター (*C. jejuni / coli*) の病原因子についてはまだ不明な部分が多いことから、P55 型のように、ヒト腸炎との関連性の強いタイプを明らかにし、これらの菌の食品への付着や食品中での増殖を防ぐための対策を取ることが必要であると考えられる。

牛由来株については供試した菌株数が

5 株と少なかったことから、すべて異なる遺伝子型を示した。今後菌株数を増やしヒト-牛間の相関についても鶏同様に調査する必要があることが考えられた。

今回、検出頻度が高いことから、Penner B 群の菌株を対象として PFGE 法により遺伝子型別を行ったが、他の血清群についても同様に調査することにより、カンピロバクター腸炎の原因 (食品) を明らかにし、その制御方法について検討する必要があることが考えられる。

表1 ヒト由来Penner B群*Campylobacter jejuni* のPFGE法による型別結果

菌株No.	由来	分離年月日	分離場所	PFGE型	
T1	集団例(1)	2002.5.4	埼玉	P5	
T3		2002.5.4	埼玉	P25	
T5		2002.5.4	埼玉	P5	
B1	集団例(2)	1999.5.22	埼玉	P20	
B2		1999.5.22	埼玉	P20	
B3		1999.5.22	埼玉	P20	
B4		1999.5.22	埼玉	P20	
S4	集団例(3)	1999.8.3	埼玉	P48	
S5		1999.8.3	埼玉	P48	
S6		1999.8.3	埼玉	P48	
S7		1999.8.3	埼玉	P48	
AK3283	集団例(4)	2002.10.23	秋田	P46	
Ab30	海外旅行	1995.10.21	イノ初(埼玉)	P9	
Ab35		1995.8.19	タイ(埼玉)	P15	
Ab43		1996.9.20	イノ初(埼玉)	P2	
AK1	散発例	2001.1	秋田	P16	
AK6		2001.1	秋田	P11	
AK21		2001.7	秋田	P12	
AK13		2001.7	秋田	P33	
AK33		2001.7	秋田	P32	
AK37		2001.7	秋田	P28	
AK44		2001.9	秋田	P8	
AK49		2001.9	秋田	P44	
AK54		2001.11	秋田	P34	
AK2897		散発例	2000.7.3	秋田	P27
AK2898			2000.7.3	秋田	P13
AK2901			2000.7.8	秋田	P49
AK2911			2000.7.27	秋田	P45
AK2923			2000.8.16	秋田	P55
AK3056	2001.6.12		秋田	P31	
AK3096	2001.8.9		秋田	P17	
AK3230	2002.8.6		秋田	P50	
AK3235	2002.8.12		秋田	P55	
AK3240	2002.8.23		秋田	P40	
AK3280	2002.10.21		秋田	P14	
AK2934	2000.10.11		秋田	P51	
SH5	散発例		1998.6.24	静岡	P10
SH6			1998.7.2	静岡	P35
SH10		1999.7.19	静岡	P52	
SH11		1999.11.8	静岡	P39	
SH18		2001.5.9	静岡	P24	
SH19		2001.5.31	静岡	P26	
SH20		2002.8.15	静岡	P6	
SH21		2002.8.23	静岡	P55	
SH24		2002.10.7	静岡	P55	
SH26		2002.11.7	静岡	P6	
SH27		2002.11.10	静岡	P38	

表2 動物由来Penner B群*Campylobacter jejuni* のPFGE法による型別結果

菌株No.	由来	分離年月日	分離場所	PFGE型
T103	鶏肉	2002.5.4	埼玉	P5
M3		2000.7.10	埼玉	P43
M4		2000.7.10	埼玉	P42
M28		2000.9.11	埼玉	P55
M312		2000.8.7	秋田	P53
M320		2000.9.8	秋田	P55
M330		2000.10.17	秋田	P47
M336		2000.10.17	秋田	P54
AK3297		2002.11.25	秋田	P50
AK3299		2002.11.25	秋田	P37
AK3303		2002.11.25	秋田	P21
SH13		2002.1.8	静岡	P41
SH15		2002.1.15	静岡	P4
SH23		2002.10.22	静岡	P46
SH25		2002.10.28	静岡	P3
L1	鶏レバー	2001.10.22	埼玉	P52
L2		2001.10.22	埼玉	P52
L5		2001.10.22	埼玉	P52
L6		2001.10.22	埼玉	P52
L10		2001.10.28	埼玉	P47
L17		2001.11.5	埼玉	P52
L18		2001.11.5	埼玉	P52
L38		2001.11.26	埼玉	P52
L58		2001.12.10	埼玉	P47
L72		2001.12.16	埼玉	P47
L73		2001.12.16	埼玉	P47
SH30	鳩	2001.9.5	静岡	P29
SH36		2001.10.4	静岡	P1
SH39		2001.11.9	静岡	P30
C131	牛	1998.11.24	鹿児島	P36
C178		1999.12.6	福岡	P23
C183		2000.7.11	福岡	P19
C185		2000.7.11	福岡	P22
C188		1999.6.17	鹿児島	P18

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

Campylobacter jejuni Penner B 群 分離株のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による遺伝子型の解析

Penner B 群に属する *Campylobacter jejuni* 40 株（散発患者糞便由来 20 株，鶏肉由来 9 株，牛レバー由来 1 株，ドバト糞便由来 10 株）についてパルスフィールドゲル電気泳動法により，遺伝子型を解析した。泳動パターンを基に系統樹を作成したところ，ヒト由来株と鶏肉由来株の含まれる 3 系統とドバト由来株のみで形成される 1 系統の合計 4 群に分類された。患者由来株の多かった I 群に関しては，鶏肉由来株と牛レバー由来株の両方が含まれており，さらなる解析が必要であると思われる。ドバト由来株と泳動パターンが類似する患者由来株は認められなかったことから，ドバト糞便からヒトへの感染は少ないことが示唆された。

研究協力者

川森文彦，秋山真人

静岡県環境衛生科学研究所

柴折浩幸

兵庫県但馬食肉衛生検査所

福永真治

兵庫県淡路食肉衛生検査所

重茂克彦

岩手大学農学部

るが，生食する機会もある牛レバーからも本菌が分離され問題となっている。また，ペットや野生動物を感染源とする人獣共通感染症の側面ももち合わせている。*C. jejuni* の血清学的なタイピングの方法は，耐熱性抗原を用いる方法（Penner）と易熱性抗原を用いる方法（Lior）があるが，国内では，市販の抗血清がある Penner による血清群別が広く用いられている。今回は，腸炎患者や鶏肉などから頻繁に分離される Penner B 群の *C. jejuni* 分離株に絞り，パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による遺伝子型の解析を実施した。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni は，細菌性腸炎の主要な病原菌であり，本菌を保有している哺乳類や鳥類の種類も数多くある。ヒトへの感染源としては鶏肉が最も重要であ

B. 研究方法

1. 材料

1998~2003 年の間に静岡県, 神奈川県および兵庫県で分離された Penner B 群に属する *C. jejuni* 40 株を検査に供した。分離株の内訳は, 散発患者糞便由来 20 株, 鶏肉由来 9 株, 牛レバー由来 1 株およびドバト糞便由来 10 株である (表 1)。なお, 血清群別は, 感作血球調整試薬 (デンカ生研) およびカンピロバクター免疫血清 (デンカ生研) を用い, マニュアルに従って行った。

2. PFGE 用試料の作製

C. jejuni 分離株をブルセラ寒天培地 (DIFCO) を用いて 42°C で 24 時間微好気培養した菌体を掻き取り, PBS 100 μ l で懸濁した。等量の加熱融解させたアガロース (Seakem Gold agarose:BMA) 1% 水溶液を菌液と混合し, プラグモールド (BIO RAD) の 2 ウェルに 50 μ l ずつ挿入した。アガロースが凝固した後, プラグモールド内の試料 2 個を Lysozyme 溶液 (0.5M EDTA(pH8.0), Lysozyme 1mg/ml) 1 ml が入ったチューブに入れ, 37°C で 4 時間, 振盪した。Lysozyme 溶液を抜き取り, Proteinase K 溶液 (0.5M EDTA(pH8.0), 1% N-Lauroyl Sarcosin, Proteinase K

1mg/ml) 1 ml を入れ, 50°C で一晩, 振盪した。Proteinase K 溶液を抜き取り, Pefabloc SC 溶液 (TE, 4mM PefablocSC) 1 ml を入れ, 50°C で 30 分振盪後, 新しい Pefabloc SC 溶液に換え, 50°C で 30 分, 振盪した。Pefabloc SC 溶液を抜き取り, TE 溶液 1 ml を加え, 氷中で 30 分, 振盪した後, 1/2 にカットした試料を制限酵素用 Buffer 200 μ l (Takara) を入れたチューブに入れ氷中で 30 分振盪した。

制限酵素用 Buffer を抜き取り, *Sma* I (40U/チューブ: Takara) を含む Buffer 200 μ l を加え, 25°C で 3 時間反応させた。

3. PFGE および泳動パターンの解析

0.5XTBE 100ml で加熱溶解した PFGE centrifuged agarose (BIO RAD) 1% 溶液をゲルホルダーに流し込み, 凝固させたゲルのウェルに作製した PFGE 用試料を挿入した後, ゲルを CHEF-DR III (BIO RAD) の泳動槽 (0.5XTBE 2000ml: 14°C) にセットし, 2 段階の泳動条件 (6V/cm, 4-8s, 9hr \rightarrow 6V/cm, 8-50s, 13hr) で泳動を行った。泳動後のゲルを 0.5 μ g/ml の Ethidium bromide 水溶液で 30 分間染色後, 蒸留水で 30 分間脱色し, 紫外線照射下で観察した。泳動画像をレーンマルチスクリーナー (アトー) を用いて, 泳動パターンを解

析し、系統樹(遺伝距離, 誤差 6.6%, UPGMA 法)を作成した。

C. 結果

すべての検体において良好な泳動像が得られたので、泳動パターンを解析し、系統樹を図2のごとく作成し、類似パターン毎にIからIVの4群に分類した。I群に分類された患者由来株15株のうち8株および3株はそれぞれ同一パターンであることが確認された。患者由来株と鶏肉由来株はI, IIおよびIII群に分類され、I群とII群では患者由来株と鶏肉由来株が同一パターンとなるケースが認められ患者由来株の比率が高かったが、III群では患者由来株は6株中1株だけであった。また、ドバト由来株はすべてIV群であり、この群には他の由来株はみられなかった。なお、牛レバー由来の1株はI群に分類された。

D. 考察

今回は制限酵素として、カンピロバクターの解析用として最も頻繁に用いられる *Sma*I を用いたが、切断されたDNA断片は5本から10本であり多くはなかった。特にドバト由来株のDNA断片はすべて5または6本しかなく、パターンも他の由来株

のものとは類似性が乏しかったので、誤差範囲5%ではすべての株を網羅した系統樹を作成することができず、誤差範囲を6.6%まで大きくせざるを得なかった。また、今回解析に用いた患者由来株はすべて散发事例のものであったが、I群では多数の株が同一パターンとなった。これらのことから、DNA断片数が多くなる酵素を併用するなどして、さらに詳細に遺伝子解析を行うことが必要であると思われる。

患者由来株と鶏肉由来株は3つの群に属していたが、比率は様々で、患者由来株の3/4はI群に、また鶏肉由来株の半分以上はIII群に分類された。患者由来株が多かったI群では、患者由来株以外に鶏肉由来株が2株と牛レバー由来株が1株含まれており、感染源を検討する上でこれらの食材由来株をさらに多く収集し、解析していく必要があるものと思われる。

ドバト由来の10株は他の由来株と遺伝子型が大きく異なっており、ドバト由来株のみでクラスターを形成していたので、公園などでドバトの糞便から *C. jejuni* が感染する危険性は、Penner B群に関しては少ないことが示唆された。

今回は、患者由来株や鶏肉由来株で最も多くみられる Penner B群に絞り PFGE によ