

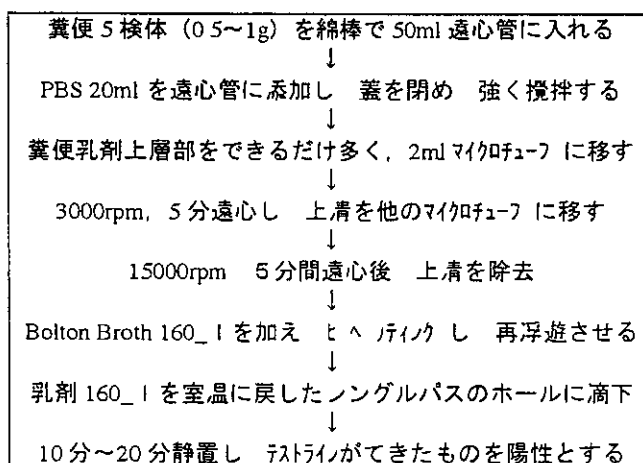
図2 遠心後の糞便乳剤上清中の菌数

表2 希釈液および加熱によるSCの判定結果の比較

希釈液の種類	100_15分	各糞便乳剤のSC判定結果	
		C. jejuni 陽性	C. jejuni 陰性
Bolton Broth	なし	+	-
Nutrient Broth No 2	なし	+	+
PBS	なし	ND*	+
Bolton Broth	あり	ND	+

\* 実施せず

図3 SC遠心法のプロトコール



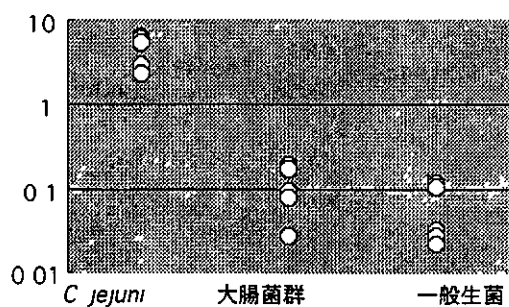


図4 遠心終了後の再浮遊乳剤の菌数変化  
(再浮遊乳剤の菌数/糞便乳剤原液の菌数)

表3 鶏糞便からのSC遠心法検出結果およびカンピロバクター検出状況

鶏群 No	SC遠心法	糞便乳剤中のカンピロバクター菌数 (/ml)	分離株の種類 (Penner 血清群)
8	+	$5.2 \times 10^6$	<i>C. jejuni</i> (UT)
9	-	$<10^2$	-
10	+	$1.3 \times 10^6$	<i>C. jejuni</i> (E, FUT)
11	+	$4.1 \times 10^6$	<i>C. jejuni</i> (UT)
12	-	$<10^2$	-
13	+	$3.1 \times 10^7$	<i>C. jejuni</i> (Z <sub>7</sub> )
14	+	$1.0 \times 10^6$	<i>C. jejuni</i> (B Y)
15	+	$6.7 \times 10^5$	<i>C. jejuni</i> (Z <sub>7</sub> )
16	+	$<10^2$	-
17	-	$<10^2$	-

厚生科学研究費補助金（生活研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

***Campylobacter jejuni*** ヒト及び市販鶏肉由来株の鶏腸管内における増殖性

1995～2001年にかけて秋田、埼玉、静岡で分離されたヒトおよび市販鶏肉由来株 91株（Penner B群）のうち、PFGE型別で異なるクラスターに分類された株を用いて、鶏の腸管内における増殖性の検討を行った。分離由来、供試鶏の日齢、接種菌量に関わらず、一旦鶏の体内に侵入すれば、容易に増殖し、14日間の観察期間中、安定した定着性が示された。また、菌の定着性は、鶏の個体差に影響されることが示唆された。

高木昌美 農林水産省動物医薬品検査所

小野一晃 埼玉県衛生研究所

三澤尚明 宮崎大学

齋藤志保子 秋田県衛生研究所

川森文彦 静岡県環境衛生化学研究所

重茂克彦 岩手大学

品川邦汎 岩手大学

A 目的

カンピロバクターは、近年、世界各国において腸管出血性大腸菌 O-157 やサルモネラと並んで注目される食中毒の原因菌であり、食中毒発生件数は増加傾向にある。

食中毒の原因食品としては汚染された食肉類が挙げられるが、菌分離率の高さから、「鶏」の汚染が重要視されている。プロイラ

一農場における菌分離検査で、約 **70%** から分離された報告や、導入時陰性ひなが、飼育開始 2 - 3 週間で陽性となる報告もあり、鶏における本菌の定着性の高さが指摘されている。

また、本菌の鶏腸管定着性は、高い定着性と持続性を示す株、定着はするが排除されやすい株、定着性を示さない株など、株により様々であることが報告されている。

今回、食中毒症ヒト由来及び鶏由来株の鶏腸管内における定着性を比較検討するために、分離株のうち **Penner B** 群に分類され、かつ **PFGE** 型別で異なるクラスターに分類された 2 株を用いて、鶏腸管内における定着性および増殖性を検討した。

## B. 検査方法

(1) 供試菌株 **1995** 年～**2001** 年、秋田埼玉・静岡の各県で分離した **Campylobacter jejuni** 食中毒症例由来株および市販鶏肉分離株 **Penner B** 群に型別された **91** 株について、

**PFGE** 型別を実施し、異なるクラスターに分類された食中毒症例由来 **S-4** 株と、市販鶏肉由来 **M-72** 株の 2 株を用いた。

(2) 供試鶏 日本生物科学研究所由来の **SPF** 鶏 (**L-M** 系) の、各試験毎に日齢の異なるものを用いた

(3) 供試株の培養及び盲腸内容物からの菌回収 経口投与に用いた菌は、供試菌株を **CCDA** 培地 (**Oxoid**) で **37°C**、**48** 時間の好気培養した後、ハート・インフューション (**HI**) 培地 (栄研) に接種、**37°C**、**24** 時間好気培養したものを用いた。盲腸内容物中の菌の定量的回収は、検体を **10** 倍量の **HI** 培地に再浮遊させ、さらに **HI** 培地で **10** 倍階段希釈した各希釈液を **CCDA** 培地に塗抹、**37°C**、**48** 時間の好気培養した後、コロニーを計測し、**1g** あたりの菌量を算出した。

(3) 定着試験 1 **SPF** 初生ヒナ (**36** 羽/群) を用い、**S-4** 株及び **M-72** 株の各培養菌液 (**10** ~ **10<sup>3</sup>** 個/mL) を、強制経口投与した。投与

前から投与後 14 日まで継日的に各群 3 羽を安楽死させ、盲腸内容物を取り出し、プールして内容物 1g 当たりの菌量の定量を実施した。

(4) 定着試験 2 7 日齢 SPF ヒナ (24 羽/群) に、2 段階の接種量 ( $10^2$ 、 $10^6$  個/mL) に調整した S-4 株の培養菌液を、強制経口投与した。投与後 14 日まで継日的に各群 3 羽を安楽死させ、盲腸内容物を取り出し、プールして内容物 1g 当たりの菌量の定量を実施した。

(5) 定着試験 3 35 日齢 SPF 鶏 (12 羽) を用い、S-4 株の培養菌液 ( $10^4$  個/mL) を強制経口投与した。投与後 14 日まで継日的に各群 3 羽を安楽死させ、個体別に盲腸内容物を取り出し、1g 当たりの菌量の定量を実施した。

## C 研究結果

腸内細菌叢が定着していない初生ひなへの定着性を検討したところ、症例由来及び市販

鶏肉由来と、由来の異なる両株とも、投与 1 日目から菌が回収され、14 日目でも  $10^{6-9}$  個/g の菌が検出され、高い増殖性と持続性が観察された (図 1)。

食中毒症例由来株を用いて、接種菌量を変えて定着試験を実施したところ、接種菌量に関係なく、1 日目から  $10^{5-6}$  個/g の菌が回収され、高い増殖性が示された。観察期間中、回収される菌量は、両接種群ともに高い値を示しており、定着性の高さか示唆された (図 2)。

35 日齢を用いた定着試験では、個体別に盲腸内容物からの菌の定量を行った。35 日齢においても、接種 1 日目から高い増殖性を示し、14 日目においても  $10^{6-8}$  個/g の菌が回収された。個体別にみたところ、7 日目の検体では、1g 当たり  $10^9$  個の菌が回収された個体と、 $10^2$  個/g 以下 (検出限界値以下) の個体があり、腸管内での増殖性に差があることか示唆された (図 3)。

## D 考察

Penner B群のうち、PFGE 型別で異なるクラスタに分類された、ヒトおよび市販鶏肉由来株は、鶏の日齢、接種菌量に関わらず、一旦鶏の体内に侵入すれば、容易に増殖し、長期間腸管内に定着していること、菌の定着性は、鶏の個体差に影響される事が示唆された。養鶏場における菌分離報告では、分離率は、ヒナの日齢により差があり、初生ヒナではほとんど検出されないが、導入後2週間目ころには、糞便中から菌が回収されるようになり、さらに週齢が加わる事により検出率が高くなるといわれている。また、菌株の持つ腸管内定着性にも差があることが言われているが、今回供試した菌株のように、鶏腸管内における増殖性や定着性が高い菌株に汚染された農場では、本菌に陰性のヒナが導入された場合、暴露される菌量に関係なく、短時間で定着し、汚染は拡大し、また長期間持続して排菌する

ことが想定された。

35 日齢を用いた定着試験では、排菌量に個体差があり、検出限界値以下で菌回収出来なかった個体もあった。本菌の検出陰性農場と陽性農場における鶏の腸内細菌叢の比較報告では、陽性農場において腸内細菌叢の中の乳酸菌の割合が多いことが示され、乳酸菌の関与が示唆されている。また、乳酸菌含有量や乳糖濃度の高い (pH 4) の生菌剤の本菌に対する制御試験では、直腸スワブにおける排菌量に明らかな減少が認められた報告もある。

今回の試験成績において、定着性の高い菌株でも、鶏の個体によってその定着性に影響を及ぼすことが示唆されたが、腸内細菌叢のポピュレーションの比較は実施していない。こうした個体間における定着性の違いと、腸内細菌叢との間にどのような関係があるのかは、今後検討していく必要があると思われ、農場における制御対策の一助になる可能性が

ある。また、サルモネラ制御にも用いられている生菌剤（プロバイオティクス）やこれらの菌の増殖を助けるプレバイオティクスなどの応用により、生産現場における本菌の制御を検討する必要があると思われた。

図1 初生ヒナを用いた定着試験

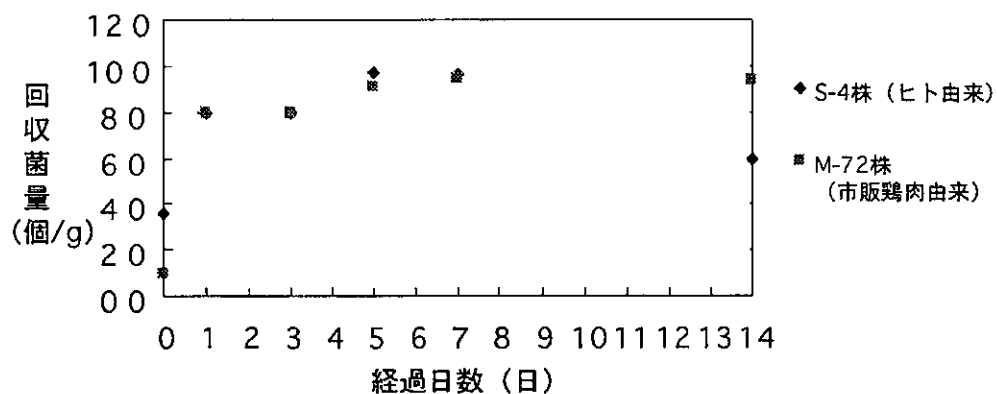


図2 接種菌量の違いによる定着性の比較

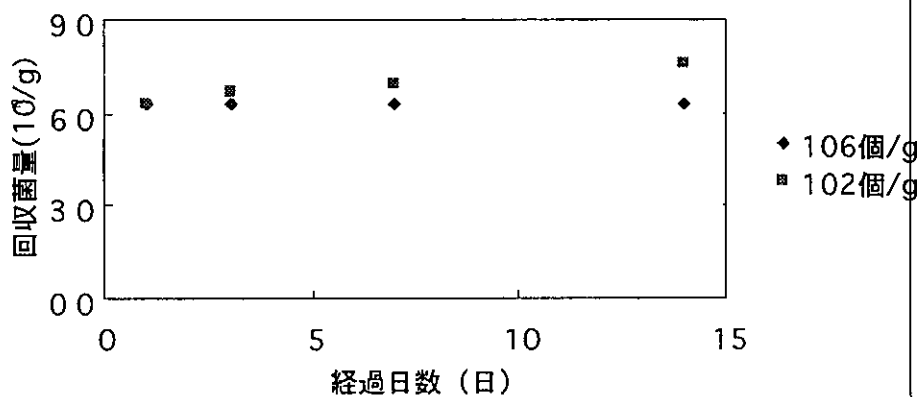
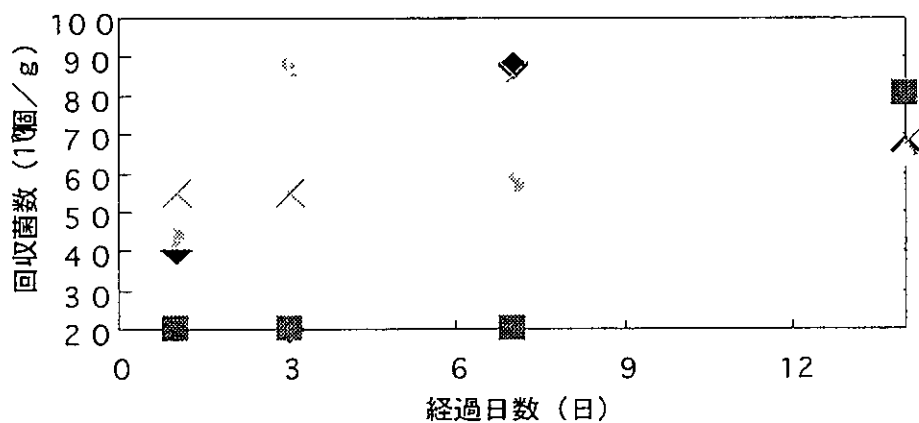


図3 鶏個体間における定着性の違い





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

*Campylobacter jejuni* のハイオフィウム形成能と市販鶏肉皮膚への付着性との関連性について

*Campylobacter jejuni* を液体培地中で培養すると、容器として用いたガラス等の表面に集合体として付着し、いわゆるハイオフィウムを形成する。バイオフィウムの形態学的ならびに生化学的性状検査から、鞭毛が集合体を形成するのに重要な役割を持つこと、さらに菌体同士、あるいはガラス面への接着剤の働きを持つ物質は多糖体を含んでいることを明らかにした。本研究では、これまでの観察結果を基に *C. jejuni* のゲノム情報から関連遺伝子を検索し、各遺伝子のノックアウトミュータントを作製し、ハイオフィウム形成能と市販鶏肉の皮への付着性との関連性を調べた。*C. jejuni* 81-176 株を用い、鞭毛関連遺伝子として *flaA*（鞭毛蛋白）と *pflA*（鞭毛の運動性）を、多糖合成遺伝子として *kpsM* 遺伝子をそれぞれ選択して変異株を作製した。それぞれのハイオフィウム形成能を定量的に調べた結果、鞭毛を欠いた  $\Delta flaA$  と鞭毛は発現するが運動性を欠いた  $\Delta pflA$  のフィルム形成能は培養後 72 時間まで有意に低かったが、 $\Delta kpsM$  は 48 時間以上培養した場合、野生株と有意差は認められなかった。次に、野生株とこれらの変異株を用いて、市販鶏モモ肉の皮膚への付着性を調べたところ、ハイオフィウム形成能のいかんに関わらず付着菌数は野生株と変わらなかった。以上の結果から、ハイオフィウム形成能と鶏肉皮膚への付着性との関連性は低いことが示唆された。

三澤尚明

宮崎大学

## A 研究目的

ハイオフィウムの形成は多くの細菌によって観察されており、環境中における生存性や宿主の感染防御機構からのエスケープ、さらには抗生物質や消毒剤に対する抵抗性等に重要な役割を演じていると考えられているが、*C. jejuni* のハイオフィウムの機能については明らかにされていない。本研究では、*C. jejuni* のハイ

オフィウム形成能と市販鶏肉の皮膚への付着性との関連性を調べるため、ハイオフィウム形成能を欠いた変異株を作製し、野生株と変異株の付着性を比較した。

## B 研究方法

### 1 変異株の作製

*C. jejuni* 81-176 株から変異株を作製するに当たり、鞭毛関連遺伝子として *flaA*（鞭毛蛋白）[4, 5, 17] と *pflA*（鞭毛の運動性）[21] を、

多糖合成遺伝子として *kpsM* [1, 6, 7]をそれぞれ選択した(表1)。PCRで増幅した当該遺伝子をヘクターにクローニングし、カナマイシン耐性遺伝子を挿入した後、野生株に形質転換して相同組み換えによる変異株を作製した。目的の遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることを、PCRとサザンハイブリダイゼーション法により確認した。得られた変異株の形質発現について、透過型電子顕微鏡による鞭毛の形態学的観察、ソフトアーカー法による運動性、ウェスタンブロット法による莢膜多糖体の確認をそれぞれ実施した。

## 2 ハイオフィーム形成能の定量的測定

ハイオフィーム形成能を定量的に測定するため、24 ウェルマイクロプレートの各ウェル内にカバースリップを置き、これにブルセラブロスで一定の濁度 ( $OD_{550}=0.1$ ) に調整した菌液 1ml をウェル内に接種して 37°C で一定時間培養後、カバースリップを新しいウェル内に移し、付着した菌を 1ml の PBS ではかして菌液の吸光度 ( $OD_{550}$ ) を測定した。

## 3 市販鶏肉の皮膚に対する付着性試験

### 1) 鶏もも肉

皮 骨付きももフレッシュ肉を食肉販売店より購入し、実験に供した。

### 2) 供試菌株

*C. jejuni* 81-176 株 (食中毒患者由来) とこれから作製した変異株を 3 株用いた (98-255 株,  $\Delta flaA$ , 03-368 株,  $\Delta pflA$ , 01-948 株,  $\Delta kpsM$ )。供試菌株は使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 3) 付着試験

$-80^{\circ}\text{C}$  で保存していた菌をプレストン寒天平板培地上に塗抹して 37°C 24 時間微好気的に培養した菌を平板上からかきとり、フルセラブロス中に浮遊させ 550nm の吸光度を 0.1 に調整し、1 菌株につき 2 枚の直径 35mm のプラスチックシャーレに各 2ml 入れ、37°C、48 時間微好気培養した。ハイオフィームの形成を肉眼で観察した後、培養菌液を均一にしてからフルセラブロスで希釈し、再度 550nm の吸光度を 0.1 に調整したものを 2ml を 198ml の PBS へ添加して総量 200ml の供試菌液を作製した。これを鶏もも肉 2 本とともにストマノカー袋へ入れてシーラーで密閉し、皮膚表面に菌液が馴染むように 30 秒間手でマッサージした。次にもも肉をストマノカー袋から取り出し、ペーパータオル上に置いて余分な液を拭き取った。もも肉 2 本中 1 本については、はさみを用いて剥皮し、 $100\text{ cm}^2$  の大きさの皮を 2 枚採取した。残りのもも肉 1 本については、新しいストマノカー袋内で水上で低温に保った 200ml の滅菌蒸留水中に 30 分間浸漬洗浄してからペーパー

ータオルで余分な水分をふき取った後、上記と同様に皮を2枚採取した。皮1枚につき100mlのプレストン液体培地を用意し、皮とともにストマノカー袋へ入れて30秒間ストマノキング処理を行い、細菌検査試料を作製した。試料乳剤の10倍段階希釈液列を作製し、各希釈液から100μずつプレストン平板培地に塗抹して37°C48時間好気培養後、発育集落数を計測し、皮100cm<sup>2</sup>当たりの付着菌数を算出した。

分離回収された菌が接種菌であるか確認するため、野生株についてはRAPD-PCRを、変異株ではPCRを実施した。平板培地から回収された菌のうち、希釈倍数の最も高い区画から3つのコロニーを分離し、DNAを抽出した。野生株を用いた試験では、ランダムプライマーを用いたRAPD-PCRのバンドパターンを接種菌と回収された菌とで比較した。変異株を用いた試験では、回収された菌からDNAを抽出し、カナマイシン耐性遺伝子の挿入された遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を認識するプライマーを用いたPCRを実施した。

## C 研究結果

### 1 変異株の性状

変異株作製において3種類の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を得ることができた。98-255株(*ΔflaA*)は鞭毛欠損株

であり、*flaA* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入され、*flaB* 遺伝子が自発的に欠失していた。03-368株(*Δpf1A*)は、鞭毛は野生株と同様に認められたが運動性が認められなかった。一方、01-948株(*ΔkpsM*)は莢膜多糖(O抗原)が欠失しており、鞭毛は野生株と同様に認められるものの運動性が弱かった(表2)。いずれの変異株も血液寒天平板上では野生株が示すムコイド状のコロニー性状は示さなかった。

### 2 バイオフィーム形成能

変異株のバイオフィーム形成能を野生株と比較したところ、*ΔflaA* 及び *Δpf1A* のバイオフィーム形成能は培養72時間後まで有意に低かった。一方、*ΔkpsM* の形成能は48時間以上培養した場合に野生株との有意差は認められなかった(図1)。

### 3 鶏肉皮膚への付着性

バイオフィーム形成能を持つ81-176株(野生株)と01-948株(*ΔkpsM*)、バイオフィーム形成能を失った98-255株(*ΔflaA*)と03-368株(*Δpf1A*)を用いて鶏もも肉の皮膚への付着能を比較した。付着菌数は鶏もも肉を菌液( $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml)に浸漬させた後、滅菌蒸留水で洗浄する前と後で比較した。その結果、蒸留水による洗浄前の付着菌数はいずれの供試株において $10^5$  cfu/100cm<sup>2</sup>で、バイオフィーム形成能に関わらず差は認められなかった。蒸留水による洗浄後の付着菌数は、洗浄前に比べると1/2~1/3に減少したが、野生株とバイオフィーム形成能を失った変異株の間に差は認められなかった(表3)。回収された

菌は、RAPD-PCR または PCR により接種菌と確認された。

#### D 考察

食中毒細菌の一種である *Campylobacter jejuni* は、家畜や野生動物等の消化管内に広く分布し、人の主要な食水系感染症の起因菌として重要視されている[9, 11]。我々は本菌を液体培地中で培養すると菌体からスライムあるいはクリコカリノクスと呼ばれる有機ポリマーが分泌され、容器として用いたガラス等の表面に集合体として付着し、いわゆるバイオフィルムを形成することを観察し、その形成過程を詳細に調べてきた[9, 12]。その結果、バイオフィルム形成には鞭毛が集合体を形成するのに重要な役割を持つこと、さらに菌体同士、あるいはガラス面への接着剤の働きを持つ物質は多糖体を含んでいることを明らかにした。そこで、これまでの観察結果を基に *C jejuni* のゲノム情報から関連遺伝子を検索し[11]、各遺伝子のノックアウトミュータントを作製して、バイオフィルム形成能と市販鶏肉の皮への付着性との関連性を調べた。*C jejuni* 81-176 株を用い、鞭毛関連遺伝子として *flaA* (鞭毛蛋白) と *pf1A* (鞭毛の運動性) を、多糖合成遺伝子として *kpsM* 遺伝子をそれぞれ選択して変異株を作製してバイオフィルム形成能を定量的に調べた結果、鞭毛を欠いた  $\Delta flaA$  及び鞭毛は発現するか運動性を欠いた  $\Delta pf1A$  のフィルム形成能は失われたか、 $\Delta kpsM$  は野生株と有意差は認められなかった。したがって、本菌

のバイオフィルム形成には鞭毛自身ではなく、鞭毛による運動性が重要であること、菌体表層に発現されている莢膜多糖体はバイオフィルム形成に関与していないことが示唆された。

細菌のバイオフィルム形成能は食品衛生分野において、パイプタクト内に菌の集合体を形成したり、容器 包装等へ接着して食品への汚染源となることが報告されている[3, 18]。しかしながら *C jejuni* のバイオフィルム形成能が、食品衛生分野においてどのような問題を生じるのかについては全く判っていない。*C jejuni* は 30℃以下の温度では増殖できず、微好気性細菌であるため[9]、食鳥処理場内の環境では菌自身が増殖してバイオフィルムを形成することはできない。したがって、本菌がスライムを産生してバイオフィルムを形成できるのは宿主消化管内であると考えられ[14]、腸管内容物に由来する本菌による鶏肉の汚染が食品衛生上深刻な問題となっており[15, 16]、食鳥処理場における処置工程において、菌の汚染拡大にバイオフィルムがどのような影響を持つのか調べることは重要である。今回、バイオフィルム形成能をもつ野外株からバイオフィルム形成能を失った変異株を作出し、鶏もも肉の皮膚への付着能を比較した。今回の実験ではモモ肉を菌液に浸漬した後、皮膚表面の余分な菌液をふき取り、さらに滅菌萃留水中で 30 分間静置した。しかしながらこの過程では、皮膚に付着した菌はバイオフィルム形成能に関わらず、ほとんど減少することはなかった。今回の実験は、食鳥肉の処理工程で消化管内容物に由来す

る本菌によってと体皮膚表面が汚染されたことを想定し、チラー水処理後の付着菌数に変化が見られるかを評価しようとするものであった。今回の結果から、ハイオフィウム形成能と鶏肉皮膚への菌の付着との関連性は低いものと考えられるか、結果に影響を与えるいくつかの要因についても考慮する必要がある。加えて、菌の皮膚への付着には、菌体側と皮膚側の要因に分けて考えなければならない。*C. jejuni* の付着因子としては、鞭毛、菌体外膜蛋白などが報告されており[4]、培養細胞への付着や菌体同士が凝集する自発凝集活性として観察され[10]、これらは菌体表層の疎水結合能によって付着する機序であると考えられている[10]。さらに、リポ多糖のような親水性の付着因子[8, 13]もあり、バイオフィウムも親水性の付着因子であると考えられる。鞭毛欠損株ではバイオフィウム形成能が失われるだけでなく、培養細胞への付着能が低下し、自発凝集活性や疎水結合能も野生株と比べて著しく低下する[10, 19]。しかしながら鞭毛欠損株の鶏肉皮膚への付着菌数は野生株と変わらなかったことから、菌体が鶏肉皮膚表層へ付着するのは単純なメカニズムによるものではないことが推察された。次に、皮膚側の要因として、非特異的に菌を付着させるとこのできる皮膚の物理的構造や、接着物質の存在などが考えられる。蛍光マーカーで標識した *C. jejuni* の菌液に鶏のと体を浸漬して菌の存在する部位を調べると、皮膚表面の微小な凹凸のくぼみや毛包内に菌が観察されている[2]。このように菌体側の複数の付着因子と皮膚側の様々

な要因との相互作用の結果として付着作用が起こると考えられ[20]、ハイオフィウムの鶏肉皮膚への付着能を単純に評価するのは困難であると思われた。さらに、今回の実験実施方法では洗浄が不十分であったことも考えられ、洗浄回数や洗浄方法をさらに検討することが必要と思われた。

## E 結論

- 1 ハイオフィウム形成には鞭毛による運動性が必要条件であり、フィルムの構成成分であるスライムの菌体外への放出と密接に関連していると考えられた。
- 2 鶏肉の皮膚への菌の付着性はハイオフィウム形成能とは関連性が低い。

## F. 参考文献

- 1) Bacon, D J, Szymanski, C M, Burr, D H, Silver, R P, Alm, R A, and Guerry, P A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176 Mol Microbiol, **40**, 769-77 (2001)
- 2) Chantarapanont, W, Berrang, M, and Frank, J F Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin J Food Prot, **66**, 2222-30 (2003)
- 3) Frank, J F Microbial attachment to food and food contact surfaces Adv Food Nutr Res, **43**, 319-70 (2001)
- 4) Grant, C C, Konkel, M E, Cieplak, W,

- Jr , and Tompkins, L S Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures Infect Immun, **61**, 1764-71 (1993)
- 5) Guerry, P , Logan, S M , Thornton, S , and Trust, T J Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes J Bacteriol, **172**, 1853-60 (1990)
- 6) Karlyshev, A V , Linton, D , Gregson, N A , Lastovica, A J , and Wren, B W Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity Mol Microbiol, **35**, 529-41 (2000)
- 7) Karlyshev, A V , McCrossan, M V , and Wren, B W Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy Infect Immun, **69**, 5921-4 (2001)
- 8) McSweegan, E , and Walker, R I Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates Infect Immun, **53**, 141-8 (1986)
- 9) Misawa, N New aspects of human campylobacteriosis Jpn J Food Microbiol , **20**, 91-97 (2003)
- 10) Misawa, N , and Blaser, M J Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni* Infect Immun, **68**, 6168-75 (2000)
- 11) Misawa, N , and Ito, K *Campylobacter (jejuni/coli)* Nippon Rinsho, **61 Suppl 3**, 727-31 (2003)
- 12) Misawa, N , Kiyoyama, H , Goto, Y , Shinjo, T , Itoh, K , and Takahashi, E Formation of a biofilm on smooth surface by slime producing strains of *Campylobacter jejuni* World Veterinary Congress (abstract), 214 (1995)
- 13) Moran, A P , Prendergast, M M , and Appelmeik, B J Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease FEMS Immunol Med Microbiol, **16**, 105-15 (1996)
- 14) Probert, H M , and Gibson, G R Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract Curr Issues Intest Microbiol, **3**, 23-7 (2002)
- 15) Shane, S M *Campylobacter* infection of commercial poultry Rev Sci Tech, **19**, 376-95 (2000)
- 16) Solow, B T , Cloak, O M , and Fratamico, P M Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin J Food Prot, **66**, 2023-31 (2003)
- 17) Wassenaar, T M , Bleumink-Pluym, N M , Newell, D G , Nuijten, P J , and

- van der Zeijst, B A Differential flagellin expression in a *flaA flaB*<sup>+</sup> mutant of *Campylobacter jejuni* Infect Immun, 62, 3901-6 (1994)
- 18) Wong, A C Biofilms in food processing environments J Dairy Sci, 81, 2765-70 (1998)
- 19) Yanagawa, Y, Takahashi, M, and Itoh, T The role of flagella of *Campylobacter jejuni* in colonization in the intestinal tract in mice and the cultured-cell infectivity Nippon Saikingaku Zasshi, 49, 395-403 (1994)
- 20) Yang, H, Li, Y, and Johnson, M G Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling J Food Prot, 64, 770-6 (2001)
- 21) Yao, R, Burr, D H, Doig, P, Trust, T J, Niu, H, and Guerry, P Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni* the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells Mol Microbiol, 14, 883-93 (1994)

表 1 変異株作製リスト

遺伝子	遺伝子機能	文献
<i>flaA</i>	鞭毛蛋白	5
<i>pflA</i>	鞭毛の運動	21
<i>kpsM</i>	多糖の輸送系	7

表 2 変異株の性状

菌株	鞭毛	運動性	ムコイドコロニー
81-176(wild type)	+	+	+
98-255( $\Delta$ <i>flaA</i> )	-	-	-
03-368( $\Delta$ <i>pflA</i> )	+	-	-
01-948( $\Delta$ <i>kpsM</i> )	+	+	-

表 3 鶏もも肉皮膚への付着菌数

菌株	接種菌数	付着菌数 (cfu/100cm <sup>2</sup> )	
	(cfu/ml)	洗浄前	洗浄後
81-176(wild type)	$5.4 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$
98-255( $\Delta$ <i>flaA</i> )	$1.8 \times 10^6$	$9.9 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$
03-368( $\Delta$ <i>pflA</i> )	$1.6 \times 10^6$	$5.7 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$
01-948( $\Delta$ <i>kpsM</i> )	$1.9 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$5.8 \times 10^4$



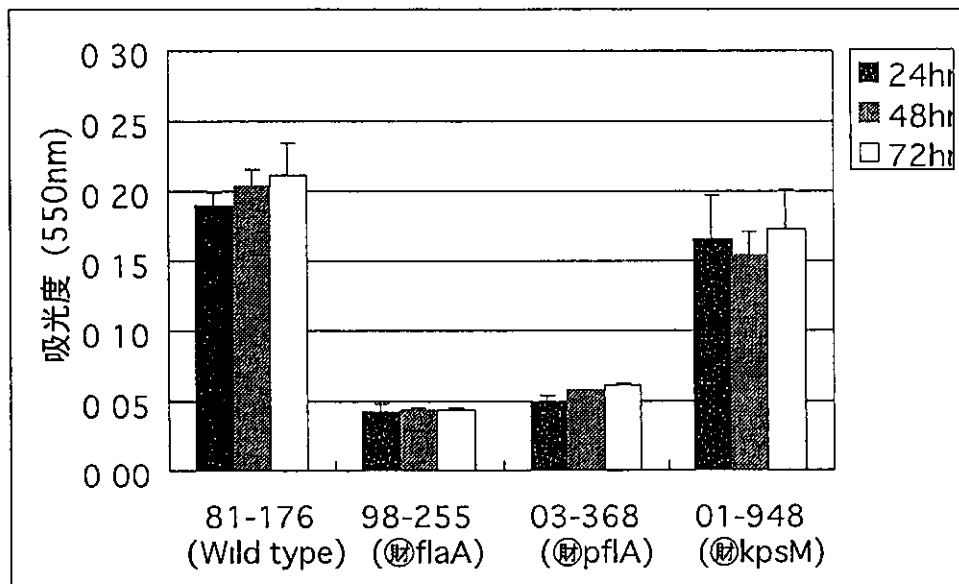


図1 *C. jejuni* 81-176 株と変異株のハイオフィルム形成能の定量的測定

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

## カンピロバクターによる食中毒事件発生時の 検査法に関する研究

食中毒事件発生の際にカンピロバクターの検査を効果的に行うために患者便と食品の検査方法について検討した。1回の検査で、同一事例の患者から複数の型（血清型・PFGE型）の菌が分離されたことから5℃保存の患者便について検査を複数回くり返したところ、複数の型の菌が分離された。さらに食品においては、直接平板塗抹法とMPN法で分離菌株の型に違いがみられた。

原因食品が複数の型の菌に汚染されている場合にはそれを摂取したヒト（患者）の糞便からも同様に複数の型の菌が分離されることが推測されることから、事件究明のためには食品については直接法とMPN法の2法を併用し、また、患者便についてはできるだけ多くの菌株を、場合によっては複数回分離することが必要であることが示唆された。

小野一晃	埼玉県衛生研究所
重茂克彦	岩手大学

## A 研究目的

カンピロバクター (*C. jejuni/coli*) はヒトの下痢症の起因菌とされ、近年、わが国でも欧米諸国同様、本菌による食中毒事例が増加する傾向にある。食肉の中でも鶏肉は牛肉や豚肉に比べカンピロバクターの汚染率が高く、さらに鶏肉の生または不十分な加熱調理による食中毒事例がいくつか報告されており、カンピロバクター腸炎(食中毒)の原因食品として特に注意されている。しかし実際の食中毒事件の際に、食品中のカンピロバクターの汚染菌数は不明なところが多く、また検査法も十分には確立されていない。

一方、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型菌が分離されたことが報告されているが、その原因は明らかにされていない。今年3月に埼玉県内で発生した食中毒事例では、当初の検査で患者4名からすべて異なる血清型菌が分離されたことから、冷蔵(5℃)保存してある患者便について複数回カンピロバクターの分離を行い、糞便中の菌量および分離菌株の血清型・遺伝子型の変化について調べた。

加えて、原因施設に残されていた食品について直接平板塗抹法とMPN法を併用してカンピロバクターの汚染菌数を測定すると共に2法による分離菌株の血清型・遺伝子型の違いについても検討した。

## B 検査方法

### 1) 事件概要

2003年3月13日に県内保健所から「3月8日(21時頃)に市内の焼き鳥屋で喫食した友人4人のグループ全員が11日夕方(16時頃)から12日朝(8時頃)にかけて、下痢・腹痛・発熱等の食中毒様症状を呈した」との連絡があった。保健所の調査により、4人はこの焼き鳥屋以外で共通の食事はなく、表1に示すとおり、当該施設で「さしみ刺身」や「焼き鳥」等を食していたことが判明した。また、患者の主な症状は表2に示すとおり、水様性下痢15~20回、下腹部の痛み、発熱38.0~39.0℃、嘔気などの症状を示しており、発症までの潜伏時間は67~78時間であった。

### 2) 細菌学的検査

常法に基づき患者便3検体について赤痢・サルモネラ・腸炎ビブリオ・病原大腸菌・黄色ブドウ球菌・カンピロバクター・ウエルシュ菌を対象に常法により菌の分離同定を行った。なお、5℃保存の便について5、18、24、30日後に直接平板塗抹法でカンピロバクターの菌数を測定した。

また参考品として搬入された鶏ささみ、鶏心臓、ねぎ間、鶏レバー、鶏皮、シャカパリサラタ、つくねについては直接法とMPN(増菌)法を併用してカンピロバクターの分離し、菌数の測定を行った。

### 3) 分離菌株の型別

分離されたカンピロバクターについては血清型別とPFGE法による遺伝子型別の2法によるタイプニングを行った。

血清型別については市販(テンカ生研)のカンピロバクター免疫血清を用い

て Penner 法による型別を行った。

さらに PFGE 法では、菌株をミューラーヒントン培地で好気状態 (O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 85%) で培養後、アガロースブロックを作成し、制限酵素 (*Sma* I) で処理した。電気泳動は CHEF-DR II (BIORAD) を用いて 1% [W/V] NA アガロースゲルにより、6V/cm、パルスタイム 4 秒から 50 秒、14°C、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。

#### 4) 生理食塩液中での生存試験

滅菌生理食塩液中に *C jejuni* (血清型 Penner D 群および F 群) および *C coli* (PFGE2 型、3 型) を接種し、5°C で保存し、7 日間ごとにカンピロバクターの菌数の測定を行った。

### C 研究成果

表 3 に患者 4 名から分離されたカンピロバクターの血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果を示す。

1 回目の検査において、4 名の患者便から *C jejuni* (2 名) および *C coli* (2 名) が分離され、分離菌株の血清型・PFGE 型は 4 人ともすべて異なっていた。また、薬剤感受性試験では *C jejuni* は供試した 6 薬剤すべてに感受性であったのに対し、*C coli* は NA, NFLX, OFLX, CPFX 4 剤に対して耐性を示した。

表 4 に 5°C 保存 5 日後の患者便中のカンピロバクターの菌数と分離菌株の血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果を示す。2 回目の検査では、*C jejuni* (2 名) および *C coli* (1 名) が分離さ

れ、患者 No 1 は 1 回目と異なる血清型 PFGE 型の *C jejuni* が分離され、患者 No 3 は 1 回目 (*C coli*) と異なり、患者 No 1 と同じ型の *C jejuni* が分離された。糞便中のカンピロバクターの菌数は 3 名いずれも 10<sup>7</sup> 台 (cfu/g) であった。薬剤感受性試験では 1 回目の分離結果と同様、*C jejuni* が供試した 6 薬剤すべてに感受性であったのに対し、*C coli* が NA, NFLX, OFLX, CPFX 4 剤に耐性を示した。

表 5 に 5°C 保存 18 日後の患者便中のカンピロバクターの菌数と分離菌株の血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果を示す。3 名中 1 名 (患者 No 2) の便は量か少なかったために検査できず、また 1 名 (患者 No 1) の便からはカンピロバクターは分離されなかった。残りの 1 名 (患者 No 3) の便からは 10<sup>5</sup> 台 (cfu/g) の菌が分離され、分離菌株の血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果は 2 回目 (保存 5 日後) のものと同様であった。

表 6 に 5°C 保存 24 日後の患者便中のカンピロバクターの菌数と分離菌株の血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果を示す。患者 No 3 の便からは 10<sup>2</sup> 台 (cfu/g) の菌が分離され、分離菌株の血清型・PFGE 型は 3 回目 (保存 18 日後) と異なり、Penner F 群 (PFGE 1 型) の *C jejuni* や *C coli* (PFGE 3 型) など 3 タイプが分離された。また、薬剤感受性試験では *C jejuni* は供試した 6 薬剤すべてに感受性であったのに対し、*C coli* は NA, NFLX, OFLX, CPFX 4 剤に対して耐性を示した。

5°C 保存便から分離されたカンピロバ