

表5 外国産鶏肉由来サルモネラの血清型と薬剤耐性パターン

| 血清型(株数) | 薬剤耐性パターン | 菌株数 |
|-------------------------|--------------------|-----|
| <i>S. Infantis</i> (1) | SM・TC・NA | 1 |
| <i>S. Saintpaul</i> (2) | TC・ABPC・NA | 1 |
| | TC・ABPC・NA・(CPFX*) | 1 |

*: 低感受性

外国産鶏肉29検体 / 3検体(10.3%)サルモネラ陽性

表 6 腸管出血性大腸菌の血清型と毒素型(2004)

| 血清型 | 毒素型 | 検出数 | 血清型 | 毒素型 | 検出数 |
|---------|-------|-----|-----------|-------|-----|
| O157:H7 | VT1&2 | 36 | O26:H11 | VT1 | 10 |
| O157:H7 | VT2 | 21 | O26:H11 | VT2 | 1 |
| O157:H- | VT1&2 | 6 | O111: H- | VT1&2 | 1 |
| O157:H- | VT2 | 1 | O103: HUT | VT1 | 1 |
| O26:H11 | VT1&2 | 1 | 合計 | | 78 |

表 7 埼玉県内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン(2004)

| | O157:H7 | O157:H- | O26:H11 | O111:H- | O103:HUT | 計 |
|------------|---------|---------|---------|---------|----------|-------|
| 供試菌株数 | 57 | 7 | 12 | 1 | 1 | 78 |
| 耐性株数 | 9 | 3 | 6 | 0 | 0 | 18 |
| (%) | 15.8% | 42.9% | 50.0% | 0.0% | 0.0% | 23.1% |
| 薬剤耐性パターン | | | | | | |
| SM | 3 | | 1 | | | 4 |
| TC | 1 | | | | | 1 |
| SM・TC | 3 | | 4 | | | 7 |
| CP・SM・TC | | 3 | | | | 3 |
| SM・TC・ABPC | 1 | | | | | 1 |
| SM・TC・NA | 1 | | | | | 1 |
| SM・TC・FOM | | | 1 | | | 1 |
| 計 | 9 | 3 | 6 | 0 | 0 | 18 |

CP:クロラムフェニコール, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, KM:カナマイシン,
 ABPC:アミバンシルペニシリン, NA:ナリジクス酸, CTX:セフトキシム, CPFX:シプロフロキサシン,
 GM:ゲンタマイシン, FOM:ホスホマイシン, NFLX:ノルフロキサシン, SXT:ST合剤

厚生科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
平成16年度 分担研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター 微生物部
研究協力者 横山 敬子, 小西 典子, 矢野一好, 諸角 聖
東京都健康安全研究センター 微生物部

研究要旨：最近，食中毒の原因菌として最も重要であるサルモネラやカンピロバクターの薬剤耐性化，特にニューキノロン剤を含む多剤耐性化が世界的に問題になっている。そこで，食中毒患者や散発下痢症患者，あるいは食品から分離されたサルモネラやカンピロバクターを対象に，薬剤耐性菌の現状および動向について調べた。

市販鶏肉のサルモネラ汚染調査の結果，国産鶏肉からは血清型 Infantis が，輸入鶏肉からは Enteritidis が最も多く分離され，そのすべてが NA 耐性であった他，薬剤耐性出現率は非常に高いことが明らかとなった。また，サルモネラ血清型 Typhimurium DT104 による集団食中毒事例は，東京都内では 1997 年に初めて確認されて以降，9 事例の発生があった。その内，3 事例で牛レバ刺しが原因食品として推定された。

1999年～2003年に下痢症患者から分離された *C. jejuni* の薬剤別耐性菌出現率の年次変化をみると，EM（治療の第一選択薬）耐性率は2%以下であるが，TC, NA, CPMXに対する耐性率は20～40%で横ばいであった。また，*C. jejuni* のフルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は26～40%であるが，2001年をピークに減少傾向にあることが明らかとなった。

A. 研究目的

最近，食中毒の原因菌として最も重要であるサルモネラやカンピロバクターの薬剤耐性化，特にニューキノロン剤を含む多剤耐性化が世界的に問題になっている。そこで，食中毒患者や散発下痢症患者，あるいは食品から分離されたサルモネラやカンピロバクターを対象に，薬剤耐性菌の現状および動向について調べる。また，食中毒事例から耐性菌が分離された場合にはその耐性菌の由来についても

調査を行い，耐性菌出現の原因を究明するための資料を得る。

B. 研究方法

1. 供試菌株

1) ヒトから分離されたサルモネラ

血清型 Enteritidis：1994～2004年に集団および散発下痢症事例の患者および非発症者等から分離された血清型 Enteritidis の 464株を供試した。

血清型 Typhimurium：1997～2002年に

都内で発生した集団下痢症9事例の患者および非発症者等から分離された血清型Typhimuriumの21株を供試した。ファージ型別は、国立感染症研究所細菌部に依頼した。

2) 鶏肉から分離されたサルモネラ

2003年11月～12月に輸入鶏肉47検体を対象にサルモネラの分離を行った結果、8検体(61.5%)から血清型Enteritidisが分離された。これら8株を供試した。

3) カンピロバクター

1999年～2003年に都内で散発下痢症患者から分離された*C. jejuni* 886株を供試した。

2. 薬剤感受性試験

1) サルモネラ

供試薬剤は、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、アンピシリン(ABPC)、S T合剤(ST)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)、ノルフロキサシン(NFLX)の9剤である。感受性試験は、NCCLS法に従い、センシディスク(BBL)を用いたKB法によって行った。また、フルオロキノロン系薬剤に対する最小発育阻止濃度(MIC)の測定には、E-test(AB BIODISK, Sweden)を用いた。用いた薬剤は、ナリジクス酸(NA)、シプロキサシン(CPFX)、ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、レボフロキサシン(LVFX)の5剤である。

2) カンピロバクター

供試薬剤は、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)、ナリジクス酸(NA)、ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロキサシン(CPFX)

の6剤で、NCCLS法に従い、センシディスク(BBL)を用いたKB法によって行った。

3. ナリジクス酸耐性菌の遺伝子変異の確認

NA耐性株の遺伝子変異については、*gyrA*遺伝子上の点変異について、Giraudら(J. Antimicrob. Chemother. 43, 2131, 1999)に従いPCR法で調べた。

C. 研究結果

1. サルモネラ血清型 Enteritidis 分離株の薬剤耐性

1) ヒト由来株分離の薬剤感受性

集団および散発下痢症患者から分離された血清型Enteritidis(SE)の薬剤耐性菌出現状況を図1にまとめた。SEは、SM耐性菌が多いことが従来から知られている。1994年分離株ではその80%がSM耐性であったが、耐性率は年々減少しており、2004年分離株では20%にまで減少していた。一方、NA耐性菌が2001年以降増加しており2004年分離株では30%に達していた。

2) 食品由来株の薬剤感受性

SEによる食中毒関連食品からのSE分離状況を表1に示した。検出された食品19件中、12件が鶏卵およびその加工品(山かけ、かまぼこ:卵白を加えた装飾用かまぼこの加熱不足が食中毒の原因であることが判明している)、鶏肉3件、その他4件であった。耐性菌は、鶏卵由来の3株がSM耐性、鶏肉由来の2株がNA耐性、他の14株は感受性であった。NA耐性のSMが鶏肉から検出されたことから、鶏肉のSE汚染状況を調べた。

表2に国産品、輸入品別にサルモネラ分離状況をまとめた。国産鶏肉から分離されたサルモネラの血清型は、Infantisが全体の64.2%をしめ、SEは検出されなかったのに対して、輸入鶏肉ではSEが61.5%と最も高頻度に分離された。これら分離されたSEの薬剤耐性率を図2に示した。供試した8株全株がNA耐性であった。この他、SM(50%)、ABPC(25%)、TC(25%)、ST(12.5%)、CP(25.5%)と輸入鶏肉由来株の薬剤耐性出現率は非常に高いことが明らかとなった。

3) ナリジクス酸耐性株

NA耐性SE株のフルオロキノロン系薬剤に対するMICを表3に示した。ヒト由来16株、食品由来の10株(鶏肉由来8株、その他2株)のすべてが、フルオロキノロン系薬剤に対して、0.1～1.0 µg/mLであり、低感受性と判定された。

NA耐性株の遺伝子変異について調べた結果を表4および表5に示した。下痢症患者由来株では*gyrA*遺伝子に点変異が認められ、83位のセリン(Ser)がフェニルアラニン(Phe)またはチロシン(Tyr)に、87位のアスパラギン酸(Asp)がグリシン(Gly)、アスパラギン(Asn)またはチロシン(Tyr)に変異していた。同じ現象が鶏肉由来株でも認められ、下痢症患者由来株と同様、83位のセリン(Ser)がフェニルアラニン(Phe)に、87位のアスパラギン酸(Asp)がアスパラギン(Asn)、チロシン(Tyr)またはグリシン(Gly)に変異していた。

2. サルモネラ血清型 Typhimurium 分離株の薬剤耐性

東京都内で発生したサルモネラ血清

型Typhimuriumによる集団食中毒事例の内、フェージ型DT104による事例は、1997年以來9事例確認されている(表6)。その耐性パターンは、CP・TC・SM・ABPCの4剤耐性菌によるものが6事例、CP・TC・SM・ABPC・NAの5剤耐性菌によるものが1事例、CP・TC・SM・ABPC・ST・NAの6剤耐性菌による事例が2例であった。その中で、原因食品が推定されたものには、牛レバー刺しが3事例あった。

3. カンピロバクター分離株の薬剤耐性

1999年～2003年に都内で散発下痢症患者から分離された*C. jejuni* 886株について薬剤感受性試験を行なった成績を表7、および図3に示した。耐性菌は、460株(51.9%)に認められ、毎年50%前後で推移している。このうち、フルオロキノロン系薬剤耐性率は、2001年の39.4%をピークに、2002年28.9%、2003年は26.5%と徐々に減少している傾向にある。1999年以來多く認められている耐性パターンは、NFLX・OFLX・CPFY・NA、あるいはNFLX・OFLX・CPFY・NA・TCで、それぞれ、供試した886株中144株(16.3%)、122株(113.8%)に認められた。一方、治療の第一選択剤であるEMに対する耐性率は、毎年1～2%程度で推移しており、大きな変動はなかった。

D. 考察

依然としてヒト下痢症から分離されるサルモネラの血清型は、SEが第一位である。そしてSEによる食中毒の原因食品は、鶏卵とその加工品が最も多い。また、わが国でSEが分離される食品も鶏卵とその加工品がほとんどである。

一方、輸入鶏肉からは高率にSEが分離されたSE がいずれの株もNA耐性であることは、サルモネラ食中毒の原因食品として最も問題視されている鶏卵由来のSE株の多くがSM単独、または SM・TCであるのと比べると大きな差がある。これらの事実は、耐性菌出現の原因について検証するために非常に重要な結果である。しかし、現在のところまだ、事例が少ないのでさらに検討する必要がある。

ヒト由来サルモネラ血清型Typhimuriumの耐性率は47.2%であったが、ファージ型DT104のような多剤耐性株も検出されており、今後の監視が必要である。中でもDT104が検出された食中毒事例の推定原因食品が牛レバーであることから、牛由来のTyphimuriumについて調べてみる必要がある。

*C. jejuni*の耐性菌は1999年以降、毎年50%前後の高値で推移している。このうち、フルオロキノロン系薬剤耐性率は、2001年の39.4%をピークに、2002年28.9%、2003年は26.5%と徐々に減少している傾向にある。しかし、これらのフルオロキノロン系薬剤耐性は、サルモネラの低感受性とは異なり、高度耐性であるので、適切な対策が必要である。

ヒト下痢症由来*C. jejuni*のニューキノロン系薬剤に対する耐性菌の出現は、カンピロバクター食中毒の主な原因食品である鶏肉に由来していることが推定される。そこで市販されている鶏肉の*jejuni*の汚染実態を含め、食品由来株の動向を調査し、耐性菌出現の要因を精査する必要がある。

E. 結論

1. 市販鶏肉のサルモネラ汚染調査の結果、国産鶏肉からは血清型 Infantis が、輸入鶏肉からは Enteritidis が最も多く分離された。輸入鶏肉由来株は、8株全株がNA耐性であった他、全体的に薬剤耐性出現率は非常に高いことが明らかとなった。

2. サルモネラ血清型Typhimurium DT104による集団食中毒事例は、東京都内では1997年に初めて確認されて以降、9事例の発生があった。その内、3例で牛レバー刺しが原因食品として推定された。

3. 1999年～2003年に下痢症患者から分離された*C. jejuni*の薬剤別耐性菌出現率の年次変化をみると、EM（治療の第一選択薬）耐性率は2%以下であるが、フルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は26～40%であり、2001年をピークに減少傾向にある。

F. 研究発表

〈学会発表〉

小西典子，秋場哲哉，下島優香子，尾畑浩魅，柴田幹良，門間千枝，横山敬子，河村真保，高橋正樹，矢野一好，甲斐明美，諸角 聖，泉谷秀昌：ナリジクス酸耐性 *Salmonella* Enteritidis の出現状況—ヒトおよび食品由来株の解析—，日本食品微生物学会，2004年．東京．

横山敬子，高橋正樹，河村真保，三井一子，関根整治，石崎直人，金子誠二，甲斐明美，矢野一好，諸角 聖，：鶏肉におけるカンピロバクター検査法の検討ならびに汚染状況について，日本食品微生物学会，2004年．東京．

Noriko Konishi, Akemi Kai, Yukako Shimojima, Hiromi Obata, Mikiyoshi Shibata, Chie Monma, Hiroshi Fujikawa, Keiko Yokoyama, Maho Kawamura, Masaki Takahashi, Kazuyoshi Yano, Shigeru Matsushita, Satoshi Morozumi, Hidemasa Izumiya, Haruo Watanabe and Yasuo Kudoh : Antibiotic resistance of *Salmonella* recently isolated from human and foods in Tokyo, The 39th Joint Conference of US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, 2004. Kyoto.

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1. 食中毒関連食品から分離されたS.Enteritidisの薬剤耐性パターン

| 分離年 | 由来 | 供試菌株数 | 薬剤耐性パターン |
|-------|--------|-------|----------|
| 2000年 | 卵の殻 | 2 | — |
| | ブロッコリー | 1 | — |
| | たらこ | 1 | — |
| 2001年 | 寮の食事 | 1 | — |
| | 山かけ | 1 | SM |
| | 焼き鳥用鶏肉 | 1 | — |
| 2002年 | 鶏卵の殻 | 1 | — |
| | 液卵(残品) | 1 | — |
| | かまぼこ | 2 | — |
| | 台所の生ゴミ | 1 | — |
| 2003年 | 卵の殻 | 3 | — |
| | 未殺菌液卵 | 1 | SM |
| | 生卵白 | 1 | SM |
| | 鶏肉 | 1 | NA |
| | 鶏軟骨 | 1 | NA |

表2. 国産および輸入鶏肉からのS. Enteritidis の分離

| 血清型 | 国産品 | | 輸入品 | |
|-------------|------------|-------------|----------|-------------|
| | 菌株数 (%) | 血清型 | 菌株数 (%) | 血清型 |
| Infantis | 111 (64.2) | Enteritidis | 8 (61.5) | Enteritidis |
| Haifa | 11 (6.4) | Virchow | 1 (7.7) | Virchow |
| Manhattan | 7 (4.0) | Mbandaka | 1 | Mbandaka |
| Yovokome | 4 (2.3) | Braenderup | 1 | Braenderup |
| Hadar | 3 (1.7) | Hadar | 1 | Hadar |
| Typhimurium | 2 (1.2) | Newport | 1 | Newport |
| Bredeney | 1 (0.6) | | | |
| Agona | 1 (0.6) | | | |
| OUT | 33 (19.1) | | | |
| 計 | 173 | 計 | 13 | |

国産: 調査期間 2002年4月～2003年2月

市販鶏肉210検体中134検体(63.8%)から173菌株分離

輸入: 調査期間 2003年11月～12月

輸入国 ブラジル, タイ, 中華人民共和国, アメリカ

輸入鶏肉47検体中11検体(23.4%)から13株分離

表3. NA耐性S.Enteritidisのフルオロキノロン系薬剤に対するMIC

| 薬剤 | ヒト由来 (n=16) | 食品由来 (n=2) | 鶏肉由来 (n=8) |
|------|----------------|---------------|---------------|
| NA | >256 | >256 | 128~>256 |
| CPFX | 0.1 ~0.25 | 0.125~0.5 | 0.25~0.5 |
| NFLX | 0.5 ~2.0 | 0.5 ~1.0 | 0.5 ~1.0 |
| OFLX | 0.5 ~1.0 | 0.5 ~1.0 | 0.5 ~1.0 |
| LVFX | 0.25 ~0.5 | 0.5 | 0.25 ~0.5 |

MIC μ g/mL

CPFX 耐性: ≥ 2.0 , 低感受性: 0.1~1.0, 感受性: <0.1

表4. 下痢症患者由来ナリジクス酸耐性S.Enteritidis株の
gyrA遺伝子変異

| 年 | 菌株数 | 変異点 | |
|------|-----|----------|----------|
| | | 83 (Ser) | 87 (Asp) |
| 1995 | 3 | Phe | — |
| 1999 | 1 | — | Gly |
| 2001 | 1 | Tyr | — |
| | 2 | — | Asn |
| 2002 | 1 | — | Asn |
| 2003 | 1 | Tyr | — |
| | 1 | — | Asn |
| | 3 | — | Tyr |
| 2004 | 1 | — | Asn |
| | 2 | — | Tyr |

表5. 鶏肉由来ナリジクス酸耐性S.Enteritidis株のgyrA遺伝子変異

| 由来 | 菌株数 | 変異点 | |
|-------------|-----|---------|---------|
| | | 83(Ser) | 87(Asp) |
| 食中毒関連食品(鶏肉) | 2 | — | Asn |
| 輸入鶏肉 | 4 | Phe | — |
| | 2 | — | Asn |
| | 1 | — | Tyr |
| | 1 | — | Gly |

2003～2004年分離株

表6. 東京都内で発生したサルモネラ血清型Typhimurium DT104による
集団食中毒事例

| No. | 発生年月 | 発生場所 | 喫食者数 | 患者数 | 原因食品 | 薬剤耐性パターン |
|-----|----------|------|------|-----|-------|--------------------------|
| 1 | 1997. 10 | 保育園 | 21 | 11 | 保育園給食 | CP, TC, SM, ABPC |
| 2 | 1998. 4 | 保育園 | 不明 | 5 | 不明 | CP, TC, SM, ABPC |
| 3 | 1998. 5 | 飲食店 | 7 | 6 | 牛レバ刺し | CP, TC, SM, ABPC, ST, NA |
| 4 | 1998. 5 | 飲食店 | 不明 | 4 | 牛レバ刺し | CP, TC, SM, ABPC, ST, NA |
| 5 | 1999. 5 | 不明 | 4 | 4 | 不明 | CP, TC, SM, ABPC |
| 6 | 1999. 5 | 不明 | 6 | 4 | 不明 | CP, TC, SM, ABPC, NA |
| 7 | 2001. 10 | 不明 | 2 | 2 | レバ刺し | CP, TC, SM, ABPC |
| 8 | 2001. 12 | 飲食店? | 44 | 3 | 不明 | CP, TC, SM, ABPC |
| 9 | 2002. 10 | 飲食店 | 28 | 9 | 仕出し弁当 | CP, TC, SM, ABPC |

No.3およびNo.4: 牛レバ刺し残品から患者と同一菌を検出

No.8: 喫食者44名中13名からカンピロバクター, 3名からサルモネラを検出

表7. 散発事例由来 *C.jejuni* の薬剤耐性菌出現状況(東京都)

| 耐性パターン | 1999年 | 2000年 | 2001年 | 2002年 | 2003年 |
|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| TC | 28 | 46 | 40 | 39 | 34 |
| EM | | | | 2 | |
| EM TC | | | 1 | | |
| NFLX OFLX CPFX NA | 18 | 30 | 34 | 26 | 36 |
| NFLX OFLX CPFX NA TC | 18 | 22 | 33 | 33 | 16 |
| NFLX OFLX CPFX NA EM TC | 1 | 2 | | | 1 |
| 耐性(小計) | 65(50.4%) | 100(54.6%) | 108(63.5%) | 100(49.0%) | 87(43.5%) |
| 感受性 | 64(49.6%) | 83(45.4%) | 62(36.5%) | 104(51.0%) | 113(56.5%) |
| 計 | 129 | 183 | 170 | 204 | 200 |
| キノロン剤に対する耐性率 | 28.7% | 29.5% | 39.4% | 28.9% | 26.5% |

キノロン剤:NFLX, OFLX, CPFX, NA

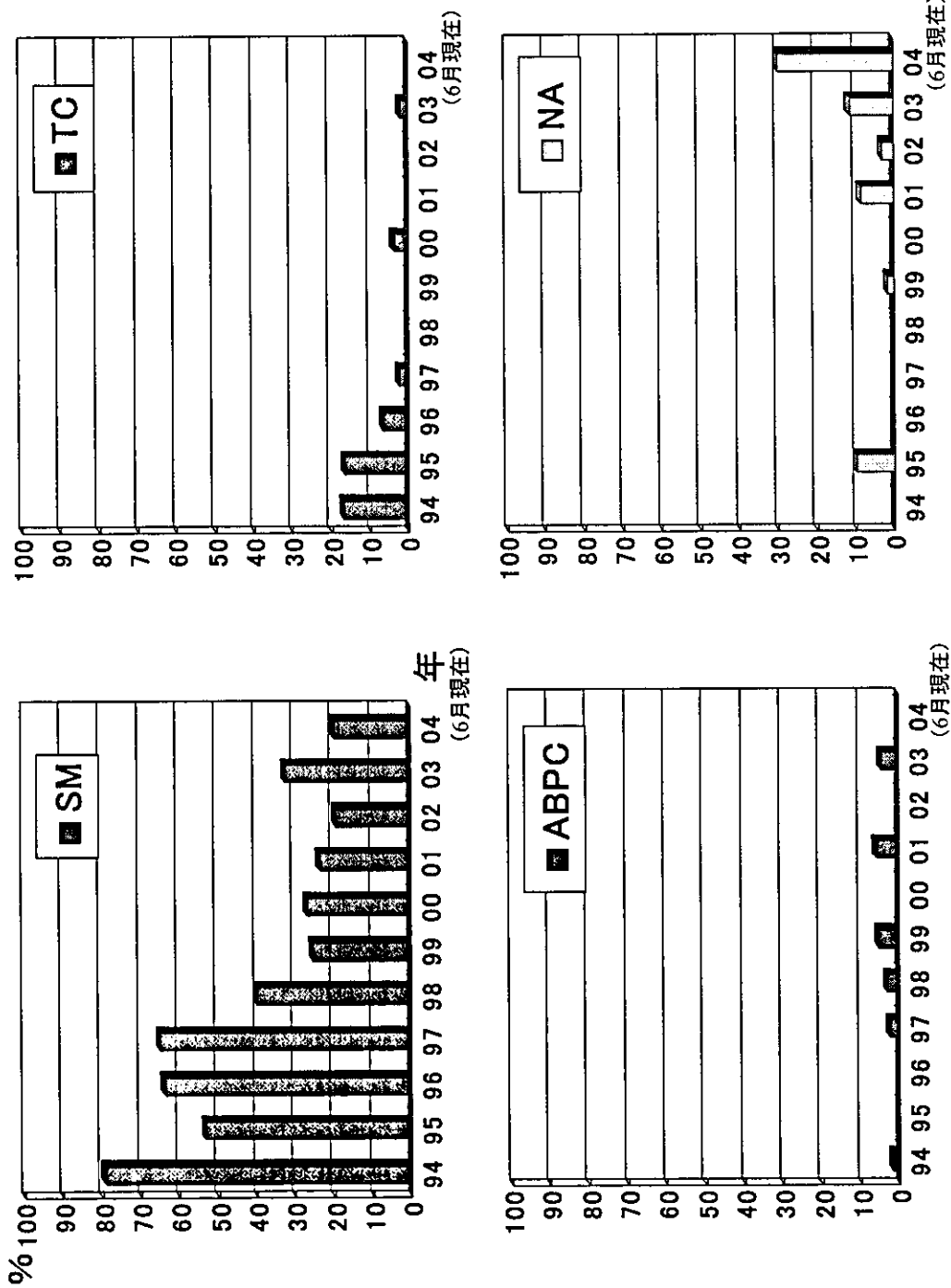


図1. 集団および散発事例由来S. Enteritidis 耐性株の年次別出現頻度

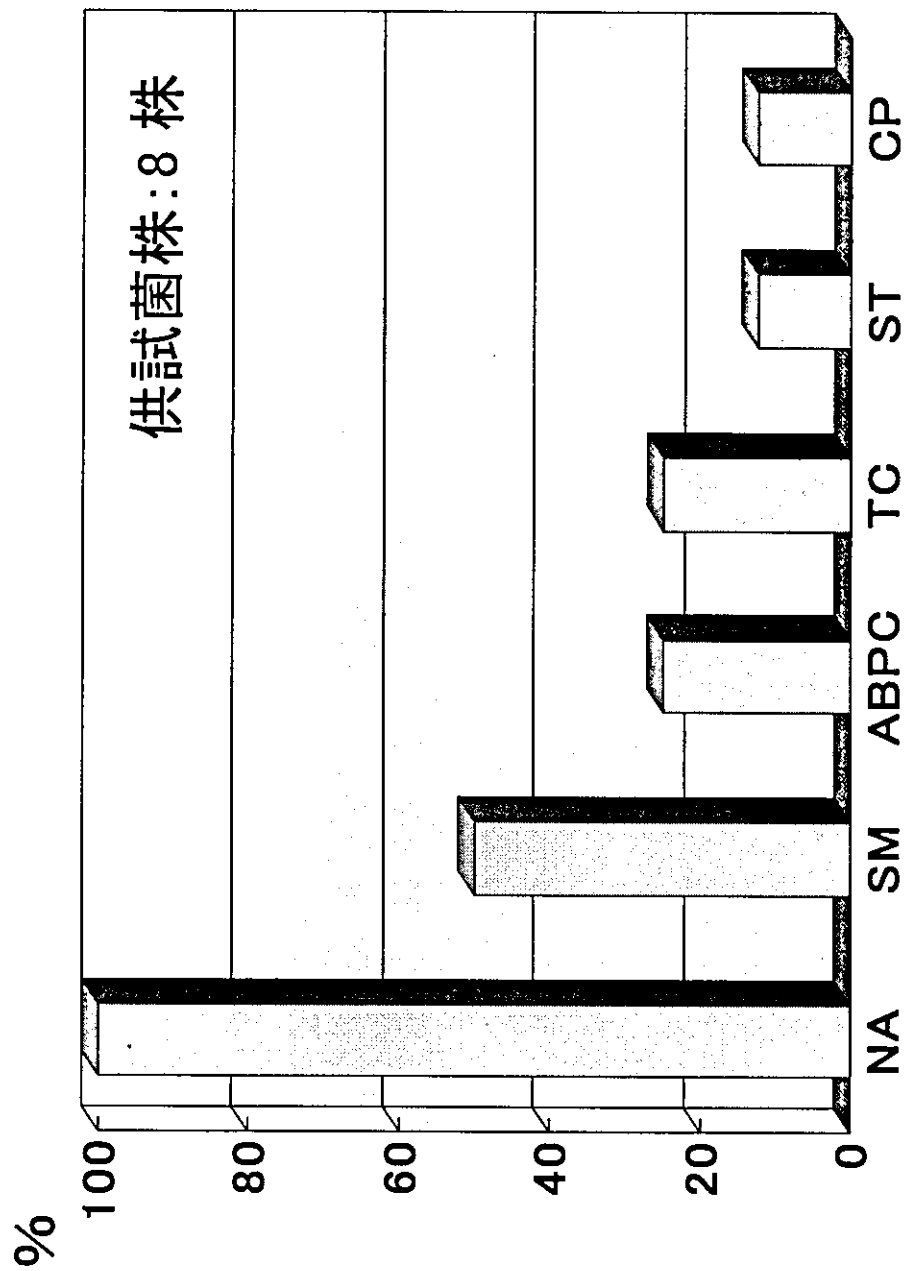


図2. 輸入鶏肉から分離されたS.Enteritidis の薬剤耐性率

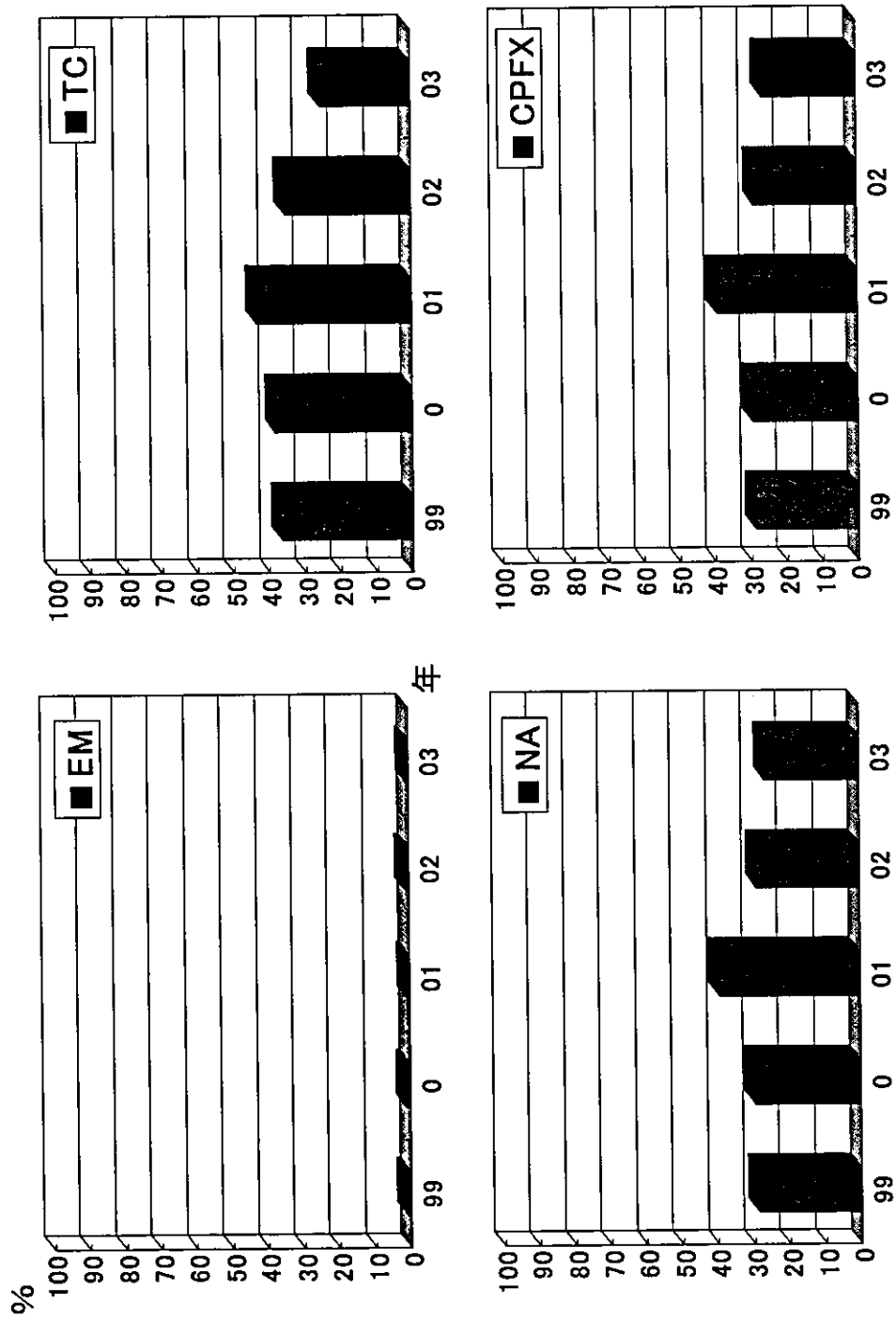


図3. 下痢症患者由来 *Campylobacter jejuni* における薬剤別耐性率の年次変化

分担課題名：食品由来の食中毒菌による耐性獲得リスクマネジメント手法に関する研究

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長

協力研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 部長

協力研究者 山崎 学 国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員

研究要旨

わが国において、カンピロバクターやサルモネラは、食中毒発生事例が多く、代表的な食中毒起因菌であるが、抗生物質耐性菌が増加傾向にあり、問題となっている。一方、スウェーデン王立研究所の研究により、鶏に用いられたアボパルシンと、バンコマイシン耐性腸球菌の出現に因果関係が示され、耐性菌の出現に食肉動物の飼料に用いられた抗菌物質が関与していることが示唆されている。本分担研究では、食品分離株における耐性に関わる検討を行うと共に、研究班全体より得られた生産段階、食品、臨床といったそれぞれの分離株に関する耐性に関する情報を基に、耐性菌出現防止に関わるリスクマネジメント手法を検討する。本年は、食品からのカンピロバクター分離手法の研究班内での標準化を検討し、プロトコール上の個々の問題点につき比較を行いながら、食品からのカンピロバクター分離を試み、研究チームとしての試案を作成した。検討した検査法により得られた食品由来株を用いて、次年度の耐性獲得の基礎データとして、食品分離のカンピロバクターの菌株につき、ニューキノロン剤について、耐性を調べた。

A. 研究目的

カンピロバクター等の食中毒菌の抗菌剤耐性に関するリスクアセスメントを行い、耐性菌出現防止に関わるリスクマネジメント手法を検討し、耐性菌の出現の防止に有効な対策に関する情報を提供する。

B. 研究方法

食中毒菌の抗生物質耐性、食中毒発生状況、食品汚染状況をもとにリスクプロファイルを作成し、米国 FDA により行われたリスクアセス

メントの情報を参考に、カンピロバクターを中心に日本国内における情報およびデータの収集を行うとともに、耐性獲得リスクマネジメントに関する検討を開始する。本年は昨年作成した、“食品からのカンピロバクター分離法”の試案につき、プロトコール上の個々の問題点の検討のため、市販の鶏肉を購入し、検出頻度の比較をおこない、検査法を改良した。食中毒菌に関する耐性株の基礎データは、食品より分離されたカンピロバクターにつき、ニューキノロン剤の耐性獲得状況を調べた。

(1) 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化：海外の主要なプロトコールを、調べPHLS法、FDA-CFSAN (BAM) 法、ISO法を比較検討し、文献等の情報から、標準的なプロトコール原案を作成した。この案につき、日常的に検査を行っている衛生研究所に意見をもとめ、個々の問題点を明らかにすると共に、プロトコールを完成させる上で、実験によるデータの確認が必要と思われる部分を議論し明らかにした。これらの重要な部分については、カンピロバクター分離に実績のある以下の地方衛生研究所9機関と共同で、手法の検討を行った(別表1)。

検討を行った機関は、以下の10機関である。

国立医薬品食品衛生研究所
東京都健康安全研究センター
埼玉県衛生研究所
秋田県衛生科学研究所
群馬県衛生環境研究所
愛知県衛生研究所
大阪府立公衆衛生研究所
広島市衛生研究所
山口県環境保健研究センター
熊本県保健環境科学研究所

(2) 市販生鶏肉からのカンピロバクターの検出：市販の生鶏肉(皮付きモモ肉)30検体について微好気条件①酸素透過性のない袋による密封培養および②ガスパックによる微好気培養を用いてカンピロバクターの検出を行った(図1)。また、定量試験も並行して行った(微好気条件は①のみ)。生鶏肉25gを非通気性のストマックバッグに採取し(条件②では通気性素材のストマックバッグを使用)、プレストン培地225mlを加えて1分間ストマッキング

を行い、①および②の微好気条件にて増菌培養(42℃, 24および48hr)後、一白金耳をmCCDAに画線塗抹し、BBLジャー(CampyPak)で微好気培養(42℃, 48hr)を行った。mCCDA上に生育した疑わしいコロニーは、S字状あるいはらせん状桿菌の形状を検鏡にて確認し、オキシダーゼ試験が陽性であった場合、1検体あたり5コロニー以上を釣菌して5%羊血加コロンビア寒天培地に純培養(42℃, 48hr)を行い、生化学的性状試験(37℃好気性発育、25℃微好気発育、カタラーゼ、馬尿酸塩加水分解、酢酸インドキシル)にて鑑別同定を行った。各陽性検体から単離したコロニーが全て同一性状であった場合は1株、複数の性状であればその株数だけ-80℃にて冷凍保存した。

(3) 食中毒菌の耐性獲得状況の基礎データとしては、本年はカンピロバクターを対象とした。検査法が統一されないと、検出率が大きく異なるため、全国的な食品分離と耐性状況の本調査は来年度となるが、今年度は、ほぼ確定した検査法により、市販鶏肉から分離された20株につき試験的に、ニューキノロン剤耐性につき、ディスク法で調べた。対象とした薬剤は、EM、TC、NFLX、OFLX、CPFx、NA、CFの7剤である。

C. 研究結果

(1) 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化：食品からのカンピロバクター分離の標準法を3種(PHLS法、BAM法、ISO法)の特徴とそれを基に検討したプロトコール原案をたたき台として、食品や臨床材料からのカンピロバクター分離実績のある衛生研究所の研究者の意見を合わせ、検査法の問題点及び検討が必要な重要項目を整理したのが、別表1である。