

表2. 内臓肉処理工程実態まとめ

表2 内臓肉処理工程実態まとめ

検査所名	処理頭数 (牛)		平均処理 時間	従業者数			処理品目			備考
	最大	平均		汚染区域	非汚染区域	うち内臓処理	白物	赤物	大腸の処理形態	
早来	100	80		10	15	10	ミノ(生)、ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)、小腸(生)、大腸(生)、直腸(生)	心、ハツモト、横隔膜、肝臓、テール	オーバーフロー洗浄、消毒薬使用せず	赤物と白物はパーティションで仕切っている
岩手	124	82	45分	14	20	12	ミノ(マウンテン含む、生)、マウンテン(ムキ、生)、Bマウンテン(生)、ハチノス(生)、ハチノス(ポイル)、ヤン(ポイル)、センマイ(生)、白センマイ(生)、ギアラ(生)、ギアラ(ポイル)、小腸(生)、小腸(ポイル)、盲腸(生)、盲腸(ポイル)、大腸部(生)、直腸(生)、直腸(ポイル)	心、ハツモト、横隔膜、肝臓、テール、(肺・胸腺)	消毒薬は使用せず	赤物と白物の搬出行程を別々に実施。腸切れ時はその場で汚染部をトリミング。腸と胃も独立した処理室。
宮城		25	20分	7	8	5	ミノ(生)、上ミノ(生)、ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)、小腸(生)、盲腸(生)、大腸部(生)、直腸(生)	心、ハツモト、横隔膜、肝臓、テール、肺	オーバーフロー洗浄、消毒薬使用せず	赤物、白物で専従作業従事者を配置している
群馬	135	75	20分	14	22	14	ミノ(マウンテン含む、生)、マウンテン(生)、ハチノス(生)、センマイ(生)ギアラ(生)、小腸(生)、盲腸(生)、大腸部(生)、直腸(生)	テール、横隔膜、肝臓あり、心、ハツモト	オーバーフロー洗浄、消毒薬使用せず	赤物、白物は作業スペースの配置により相互汚染を防止
静岡西部	40	22	40分	7.5	2.5	2.5	ミノ(マウンテン含む、生)、マウンテン(生)、ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)、小腸(生)、盲腸(生)、大腸部(生)、直腸(生)	テール、心、肺、ハツモト、食道、肝臓	赤物は流水洗浄、白物は溜水洗浄、消毒薬使用せず	処理室を内臓移動用滑り台で区分し、赤物と白物専用の処理台を使用
兵庫	125	83		12	32	25	ミノ(マウンテン含む、生)、マウンテン(ムキ、生)、ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)、小腸(生)、盲腸(生)、大腸部(生)、直腸(生)	テール、横隔膜、肝臓あり、心、ハツモト、肺	シンク洗浄+流水洗浄、消毒薬使用せず	赤物、白物は独立した処理室で作業
鳥取	50	32	30分	12	15	8	ミノ・ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)、小腸(生)、大腸(生)、直腸(生)	テール、横隔膜、肝臓、心、ハツモト、(肺、気管、食道)	洗浄、消毒薬使用せず	赤物、白物でラインを分け、処理室はパーティションで分けられている
沖縄	30	10	12分	6	9	6	ミノ(生)、ハチノス(生)、センマイ(生)、ギアラ(生)小腸(生)、大腸(生)、直腸(生)	テール、横隔膜、肝臓、心、ハツモト、肺	洗浄機一手洗い、消毒薬使用せず	処理室はパーティションで仕切っている。まな板等は月2回程度次亜塩素酸で消毒

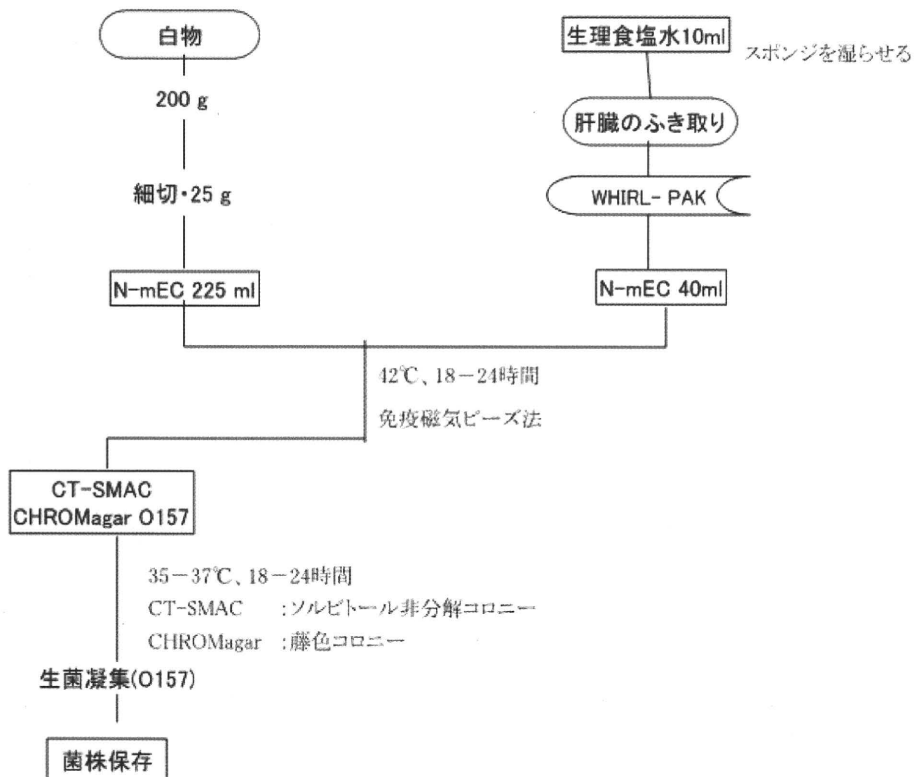
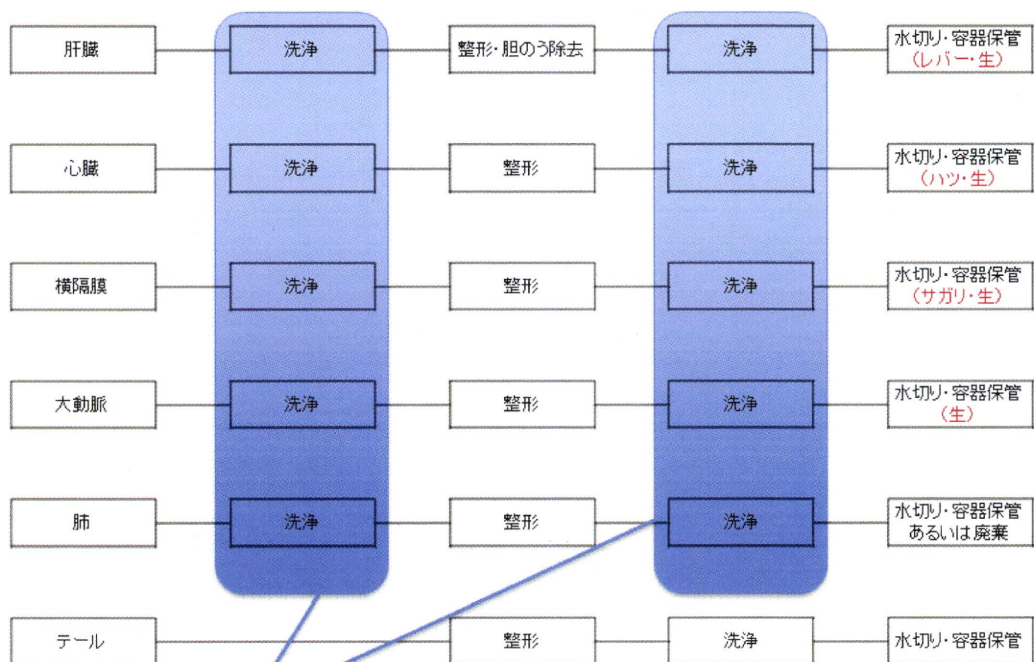


図1. 腸管出血性大腸菌O157分離・同定方法フロー



- ・ 整形前に洗浄する処理場、整形後に洗浄する処理場、および整形前後に洗浄する処理場がある
- ・ 肝臓の整形後、75%アルコールで消毒する行程を含めている処理場もある

図2. 代表的赤物処理工程フロー

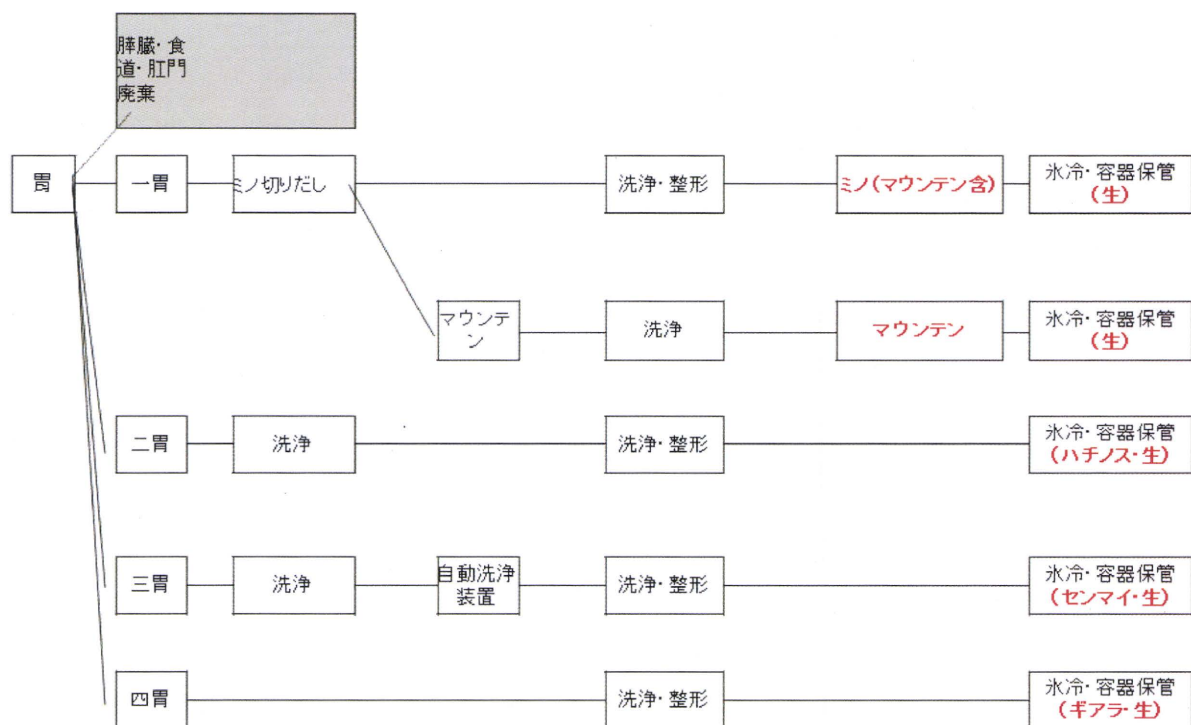


図3. 代表的な白物(胃)処理工程フロー

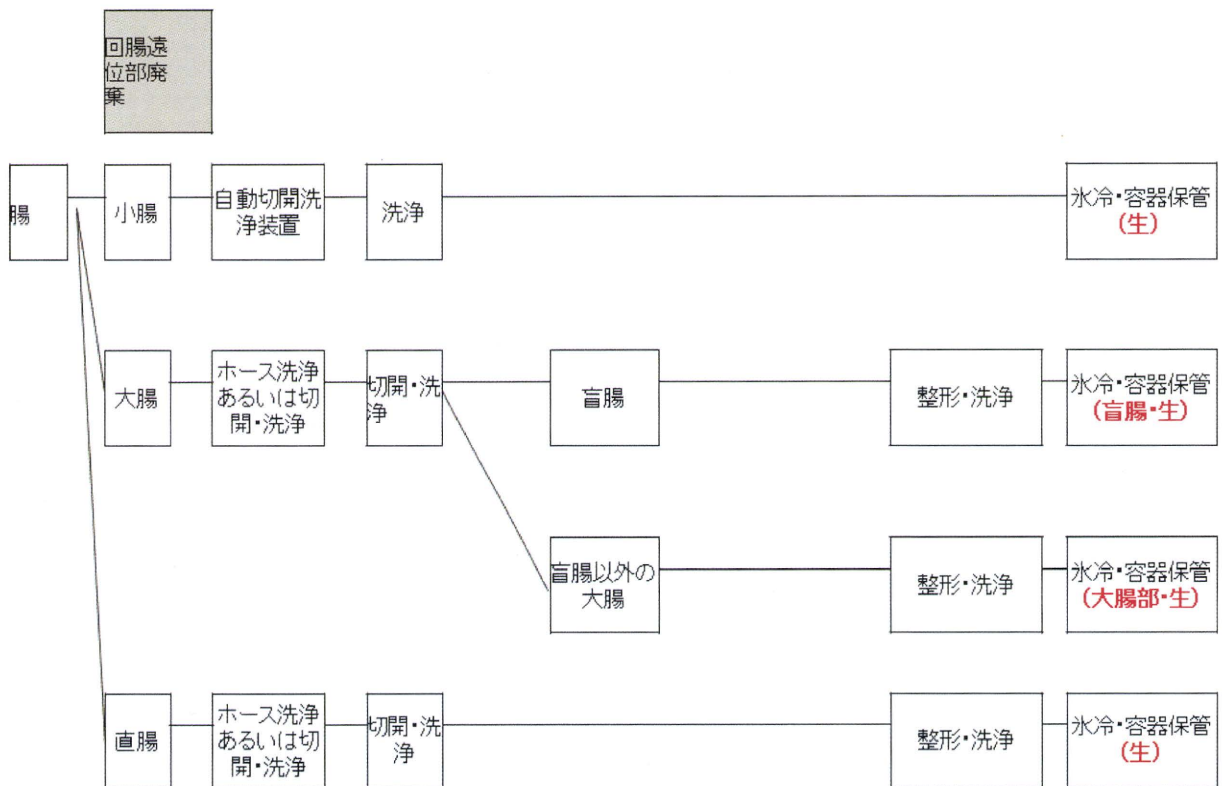


図4. 代表的な白物(腸)処理工程フロー

消毒薬の効果に関する研究、食鳥処理施設の衛生管理に関する研究

研究分担者 三澤尚明 宮崎大学・農学部

研究要旨

カンピロバクターは世界各国において人の主要な食水系感染症の起因菌として重要視されており、鶏肉とその関連調理食品が主な感染源になっている。国内の食鳥肉処理場における微生物制御には次亜塩素酸が使用されているが、鶏肉に付着した汚染微生物に対する殺菌効果は低いことが問題視されている。本研究課題では、と体表面に付着したカンピロバクターの殺菌効果を高めるため、と体への薬剤浸透効果を高める真空処理の導入、さらにはと体全体に超音波を照射できる共振超音波発生装置を用いるなどの組み合わせる処理法を検討した。さらに、次亜塩素酸以外の殺菌剤を用い、と体表面に付着したカンピロバクターに対する殺菌効果を比較した。その結果、ブロイラーと地鶏の殺菌効果には差が認められ、同一の殺菌処理において地鶏の方がブロイラーに比べ高い殺菌効果が得られることが分かった。最も高い殺菌効果が得られた処理法は、塩化セチルピリジニウムを用い、吸引処理と超音波照射処理の組合せを行った方法で、カンピロバクター菌数を処理前の10～100分の1程度に減少させることができた。

A. 研究目的

厚生労働省の食中毒統計によると、食肉およびその加工品を原因とする食中毒の発生が増加傾向にあり、食肉を「さしみ」や「たたき」などの生食あるいは不完全加熱調理品として食べる日本人の食習慣によるところが大きいと考えられている。したがって、食肉の品質劣化を引き起こす細菌群や食中毒の原因となる病原微生物を制御するための新しい技術開発が望まれている。

食肉の中でも食鳥肉は、牛肉や豚肉と比べると皮のついた状態で処理・販売されるため、皮膚表面の傷や羽毛の毛穴に入った微生物汚染を処理工程で制御することが難しく、消費期限は他の食肉と比べると短く設定されている。さらに国産の市販鶏肉の約7割が、カンピロバクター（国内での食中毒発生件数が第一位となっている食中毒菌）に汚染されている調査結果が出ており、その防除対策が急がれている。

カンピロバクターによる食中毒は近年増加傾向にあり、医療機関から届けられる年間患者数

3,000人程度であるが、厚生労働科学研究報告によると、実際の患者数は年間160万人以上であると推定されている。カンピロバクター菌は、鶏肉を原因食品とする事例が多く、養鶏場、食鳥肉処理場、さらには流通・販売に至る過程において本菌の防除対策を講じることが急務となっている。しかしながら、鶏肉の生食や不完全加熱調理のまま喫食する食習慣は日本の伝統的な食文化の背景もあることから、調理段階での原因菌の完全な除去は難しい。

食鳥肉処理場における微生物制御（殺菌処理）には現在主に次亜塩素酸が使用されているが、過去の研究結果から器具・器材に対する殺菌効果は認められるものの、鶏肉に付着した汚染微生物に対する殺菌効果は低いことが示されている。食鳥処理場での制御が困難な理由としては、生鳥の輸送コンテナ内で糞便による体表汚染が起こること、処理羽数が多いため、と体が接触して処理されること、腸管などの内蔵破損が起こりやすいこと、皮付きであること、処理工程全般にわたって大量の水を使用すること、と体に対する次亜塩素

酸などの殺菌効果が低いこと、カット工場内での器具や人を介した交差汚染が容易に起こること、などが挙げられる。したがって、牛・豚の食肉処理工程で行われている微生物学的危害防止策をそのまま実践できないことが大きな障壁となっている。研究分担者は、この問題を解決するため、殺菌剤のと体への浸透効果を高める処理技術の導入、さらにはと体全体に超音波を照射できる共振超音波発生装置を用いるなどの改良を加えることにより、と体に付着したカンピロバクターに対して高い殺菌効果を示す処理技術を開発した。本研究課題では、次亜塩素酸以外の様々な消毒薬を用いて、と体表面に付着したカンピロバクターに対する殺菌効果を調べた。

B. 研究方法

- 1) 食鳥と体：食鳥処理のどの工程でカンピロバクターの汚染が起こっているのかを調べるため、大規模食鳥処理場（ブロイラー）および小規模食鳥処理場（地鶏）において放血後、脱羽後、中抜き後のと体をそれぞれ供試した。種々の薬剤の殺菌効果を比較する試験には、大規模食鳥処理場のチラー処理後のブロイラー中抜きと体、及び小規模食鳥処理場で次亜塩素酸処理を行わずに処理された地鶏中抜きと体を用いた。
- 2) 殺菌処理方法：殺菌剤として、次亜塩素酸(100、200ppm)、塩化セチルピリジニウム（CPC；1000ppm）、オゾン(20ppm)、リン酸三ナトリウム(1%)、乳酸(5%)を用いた。殺菌剤を満たした真空容器内にブロイラーの「と体」を浸漬させ、0.002HPa（ヘクトパスカル）で10分間吸引後、常圧に戻す操作を3回行うことで脱気とともに薬液の浸透を促進させた。続いて殺菌剤を満たしたステンレス容器内に「と体」を移して浸漬させ、と体表面の付着細菌の遊離を促進させるため、共振型超音波発生装置（130KHz）により5～15分間超音波を照射した。最後に使用した殺菌剤の除去を目的として流水洗浄を行った。
- 3) カンピロバクター菌数の測定：一連の殺菌処理が終了後、殺菌剤を除去するため、と体を流水で10分間洗浄し、ムネ、背、モモ外、モモ内、手羽外、手羽内の6箇所からカンピロバクターの検出を試みると共に、処理前後の胸および背の皮をストマッカー処理し、最確数（MPN）法にて皮に付着しているカンピロバクター数

を定量的に測定・比較した。対照として未処理と体を水道水で処理、真空処理と共振超音波処理の対照として薬液に浸漬するだけの処理を行い、同様にカンピロバクター菌数を測定した。

増菌培地には、Preston培地を、分離培地にはmCCDA培地を使用した。増菌培養および分離培養は、微好気条件（10%CO₂、5%O₂、5%H₂、80%N₂）で37℃、48時間培養した。mCCDA培地上の疑わしい集落は、グラム染色による形態観察と、必要に応じてカンピロバクター属菌を特異的に検出するプライマーを用いたPCRによりカンピロバクターであるかどうかの判定を行い、皮10グラム当たりの最確数を測定した。

- 4) と体皮膚表面の走査型電子顕微鏡による観察：殺菌処理後の鶏皮の表面を走査型顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮）

実験動物を生体として使った実験等は含まれていないため、該当しない。

C. 研究結果

- 1) 月別カンピロバクター検出率の比較

ブロイラーは、2009年10月から2010年12月まで、地鶏は2010年9月から12月までカンピロバクターの検出を実施した。ブロイラーは調査した15ヶ月間で検出率に大きな季節的変動は認められず、158検体中143検体（90.5%）からカンピロバクターが検出された。地鳥では調査した4ヶ月間に14羽検査したが、全てのと体からカンピロバクターが検出された（表1）。

- 2) 処理工程におけると体のカンピロバクター汚染調査

食鳥処理のどの工程でカンピロバクターによると体の汚染が起こるのか調べるため、ブロイラーでは大規模食鳥処理場、地鶏では小規模認定食鳥処理場において、放血後、脱羽後、中抜き後の各と体6ヶ所の皮に付着するカンピロバクターを検出した。その結果、ブロイラー、地鶏に関わらず、放血後では胸からのみ検出されたのに対し、脱羽後および中抜き後では、検査した6箇所全ての部位からカンピロバクターが検出された。地鳥では、湯漬けの湯からは検出されなかったが、脱羽処理の排水からはカンピロバクターが検出された（図1，2）。ブロイラーでは、各と体のムネと背の皮に付着しているカンピロバクターを定量的に測定した

が、放血後の胸の皮からは検出されず、脱羽後、中抜き後に菌数の増加が認められた（図3）。

3) 殺菌処理方法の比較検討

と体を真空処理すると、毛包内にある空気が排出され、常圧に戻すことで薬液の浸透が亢進した（図4）。CPC、次亜塩素酸、水道水を使って吸引と共振処理の組み合わせ、共振処理のみでカンピロバクターに対する殺菌効果は無処理のと体と比較した。その結果、吸引と共振処理を組み合わせた方法が最も殺菌効果が高く、次亜塩素酸よりもCPCのほうがより高い殺菌効果を示した（図5、図6）。

さらに、吸引のみ、浸潤のみの処理によるカンピロバクターに対する殺菌効果を比較したところ、それぞれ単独で処理するよりも、吸引と共振システムを組み合わせたほうがより高い殺菌効果が得られることが分かった。さらに、用いた殺菌剤のカンピロバクターに対する殺菌効果は、ブロイラーよりも地鶏の方が殺菌効果は高い傾向を示し、次亜塩素酸よりもCPCを用いたほうがカンピロバクターの減少率は高かった（図7～10）。

CPCを用い、吸引処理と超音波照射処理の組合せを行った方法が最も殺菌効果が高く、カンピロバクターは未処理では6箇所されたのが、処理後は2箇所程度まで減り、菌数も処理前の10～100分の1程度に減少させることができた。次亜塩素酸でも吸引と超音波処理を組み合わせることによって、処理前の10分の1程度に減少させることができた。また、CPCを用いた共振型超音波発生装置による超音波照射処理のみの殺菌方法でも10分の1以下にカンピロバクターを減少させることができた。

4) 各種殺菌剤のと体に付着したカンピロバクターに対する殺菌効果の比較検討

殺菌処理法としては、殺菌液にと体を浸漬させて吸引3回を行った後に、同一薬剤を用いて共振型超音波処理を行うことで、最も強い殺菌所ル効果が得られることが分かった。この処理方法を用いて、次亜塩素酸（100ppm、pH8.7）、次亜塩素酸（100ppm、pH5.0）、次亜塩素酸（200ppm、pH5.0）、オゾン水（20ppm）、乳酸（5%）、リン酸三Na（5%）、CPC（1000ppm）を用いた際のブロイラーと体に付着したカンピロバクター

に対する殺菌効果を比較した。その結果、乳酸とリン酸三ナトリウムと乳酸が最も高い殺菌効果を示した。続いてCPCの殺菌効果が高かった（図11）。しかしながら、乳酸またはリン酸三ナトリウムを使用すると、皮の変色が起こり、商品価値の低下が認められた。

5) 走査型電子顕微鏡によると体皮膚の観察

走査型電子顕微鏡により、ブロイラーおよび地鶏の表面を観察したところ、チラー後においても皮膚表面には多くの狭雑物や細菌などがフィルム状に付着していた。これにCPCを用いた吸引・共振処理を行うと、表面のフィルム状物質が除去され、皮膚の形状が確認されるまで清浄化されていることが観察された（図12）。

D. 考察

食鳥処理場における食鳥と体のカンピロバクター汚染は、年間を通して認められた。月別の検査数にばらつきがあるため、定量的データは示していないが、個体間のばらつきが大きく、季節的な変動は認められない傾向を示した。

食鳥処理場では、と体表面のカンピロバクターの汚染は、脱羽処理後に起こっていることが分かった。これは、脱羽処理の工程で、内蔵を含んだと体が、脱羽機のフィンガーによる物理的な圧迫力により、腸内容物の漏出が起こり、カンピロバクター保菌鶏では容易にと体表面への汚染が起こるものと考えられた。

と体の殺菌処理効果を高める方法として、吸引による薬剤の浸透促進と、共振型超音波処理による付着細菌の遊離促進は効果が認められた。今回用いた殺菌剤の中で最も殺菌効果の高かった塩化セチルピリジニウム（CPC）は無味無臭の界面活性作用を有する殺菌剤で、毒性が低いことから、日本国内では医薬部外品として認可され、歯磨き、マウスウォッシュ、のど飴等に使用されている。一方、米国では、CPCが大腸菌、サルモネラ、リステリア・モノサイトゲネス、カンピロバクター、ブドウ球菌に殺菌効果を示すことから、食鳥処理での使用が認められている。しかしながらCPCの食品添加物としての使用は国内では認められておらず、食鳥処理場で使用できるようにするためには食品添加物としての承認が必要となる。

食鳥処理場において殺菌剤として最も普及している次亜塩素酸は、と体表面に付着したカンピロバ

クターに対する殺菌効果が低いことを改めて実証する結果が得られた。食品添加物として認可されている、乳酸とリン酸三ナトリウムを用いたが、今回の処理法では高い殺菌効果が認められたものの、皮の変色が認められ、商品としての価値が低下することが分かった。今後は溶液の pH などの条件を精査し、既存の殺菌料を用いながら高い殺菌効果を得られる条件を見出すことが必要である。

Rosenquist らはデンマークにおける鶏肉に起因するカンピロバクター食中毒の発生率を減少させることを目的として、農場、処理場および家庭における各過程の危害因子を明らかにし、危害内容の明確化と暴露評価をそれぞれ調べ、**Monte Carlo Simulation** を用いた微生物学的リスクアセスメントを実施した。その結果、処理場での鶏と体表面の汚染を 1/100 に減らすことができればカンピロバクター感染症を 1/30 に減らせるとしている。

食品微生物の制御技術の開発は、鮮度保持や安全性の向上を実現するものであることから、食品の生産から消費に至る全ての過程に関わる人々にとってニーズの高いものとなる。さらに、本技術は食鳥処理場だけでなく、その他の畜産、水産食品の処理工程に応用できる可能性を含んでおり、広く普及することが見込まれる。従って、本研究の応用技術は、生産県にとって消費地に高品質、高付加価値の商品を市場に供給することができる大きなメリットがある。

共振型超音波発生装置はマイクロチップなどの洗浄を目的として作製されたもので、食品分野に応用した例はない。従って、本研究によって認められた食鳥肉のカンピロバクター制御技術は、食品分野において国内はもとより世界をリードすることが期待される。

E. 結論

殺菌剤に浸漬させた「と体」を吸引処理した後、共振型超音波発生装置による超音波照射処理を行うことで、従来の次亜塩素酸に浸漬させる方法に比べ、高い殺菌効果を得ることができた。今回供試した殺菌剤の中で、CPCはと体に付着したカンピロバクターに対し優れた殺菌効果を示した。

F. 健康危険情報

(総括報告書にまとめて記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 三澤尚明、副島潤一郎 超音波を使用したカンピロバクター撃退技術 超音波TECHNO, 22: 6-9, 2010

2. 学会発表

- 1) 新木泰輔、佐々木賢美、山崎 渉、三澤尚明、食鳥肉における新しいカンピロバクター制御技術の開発、日本食品微生物学会講演要旨集・2010年(滋賀)
- 2) 三澤尚明、佐々木賢美、吉山佳世、福井敬一、オゾン含有マイクロバブル水によるマンゴアの鮮度保持並びに殺菌効果、日本食品微生物学会講演要旨集・2010年(滋賀)
- 3) 三澤尚明、佐々木賢美、山崎 渉、鶏と体のカンピロバクター制御技術の開発、第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集・p258・2010年(帯広)
- 4) 吉本有貴、山崎 渉、三澤尚明、血清中に含まれる *Campylobacter jejuni* の自発凝集活性促進物質の検出、第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集・p252・2010年(帯広)
- 5) 三澤尚明、新しい概念に基づく食鳥と体のカンピロバクター制御法の開発、第3回日本カンピロバクター研究会要旨集・p66-68・2010年(宮崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

「真空および共振型超音波処理による食品材料における微生物の制御法及び制御装置」(特願2010-065744)

※2011年に国際特許を出願予定。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 カンピロバクターの月別検出率

	ブロイラー		地 鶏		
	サンプル数	陽性数(%)	サンプル数	陽性数(%)	
2009年	10月	17	17 (100)		
	11月	32	31 (96.8)		
	12月	26	23 (88.5)		
2010年	1月	2	0 (0)		
	2月	6	6 (100)		
	3月	10	7 (70.0)		
	4月	8	8 (100)		
	5月	9	8 (88.9)		
	6月	18	17 (94.4)		
	7月	8	6 (75.0)		
	8月	6	6 (100)		
	9月	1	1 (100)	2	2 (100)
	10月	8	8 (100)	8	8 (100)
	11月	3	2 (66.7)	3	3 (100)
	12月	4	3 (75.0)	1	1 (100)
合 計	158	143(90.5)	14	14(100)	

図3 ブロイラーの処理工程別カンピロバクター検出菌数

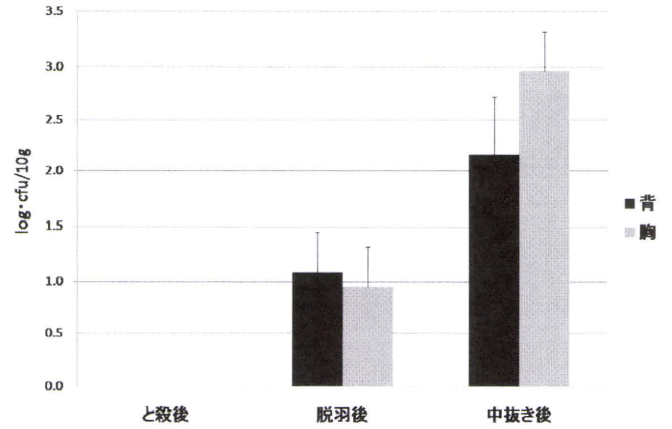


図1 地鶏の工程別カンピロバクターの検出

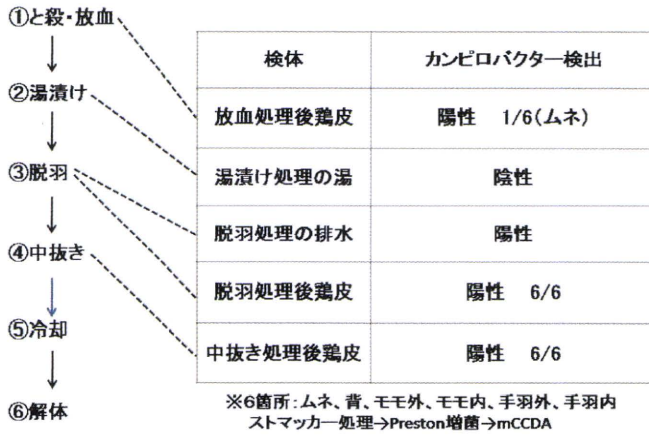


図4 真空処理で毛穴から脱気される空気

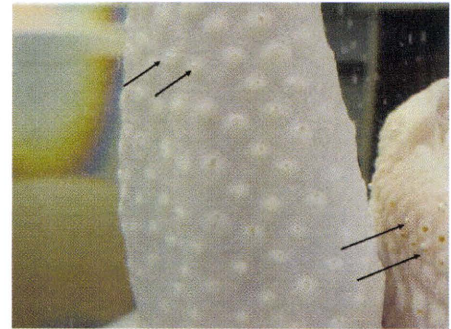


図2 ブロイラーの工程別カンピロバクターの検出

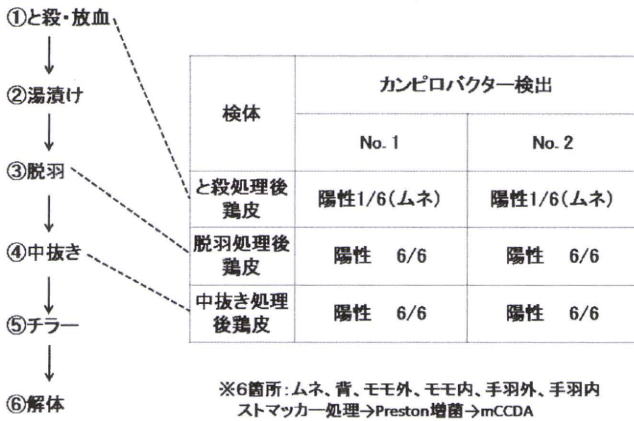


図5 カンピロバクターの殺菌効果に及ぼす殺菌処理方法及び使用殺菌剤の影響(定性試験)

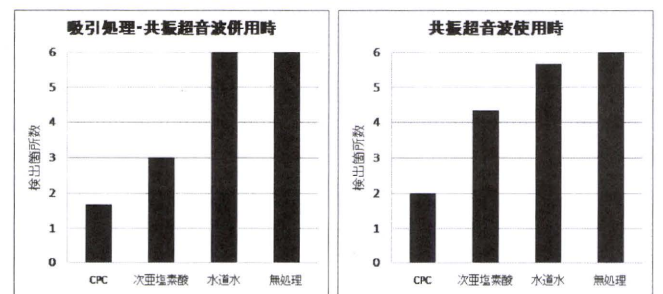


図6 カンピロバクターの殺菌効果に及ぼす殺菌処理方法及び使用殺菌剤の影響(定量試験)

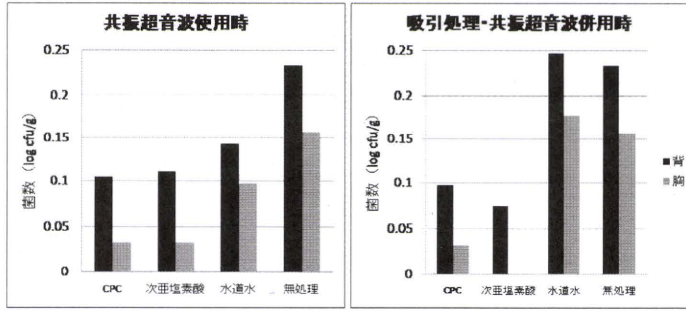


図9 CPC 処理別(地鶏)

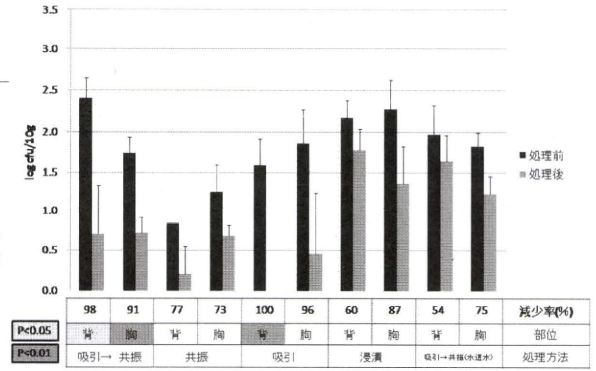


図7 CPC 処理別(ブロイラー)

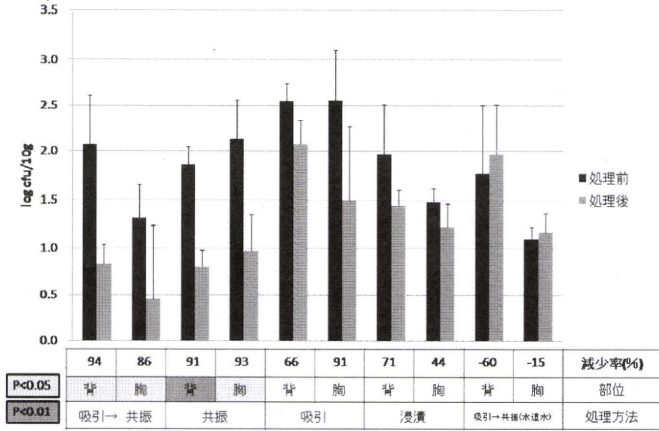


図10 次亜塩素酸 処理別(地鶏)

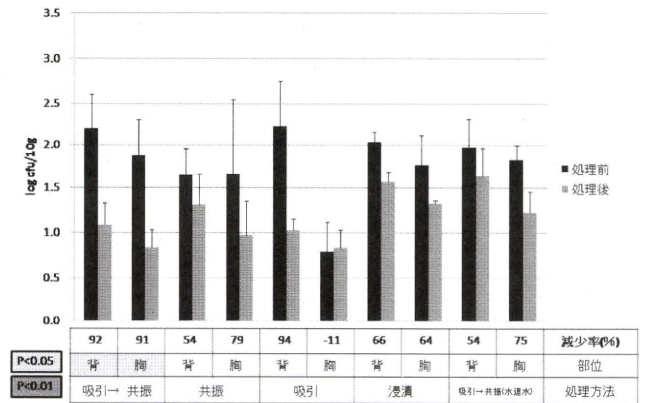


図8 次亜塩素酸 処理別(ブロイラー)

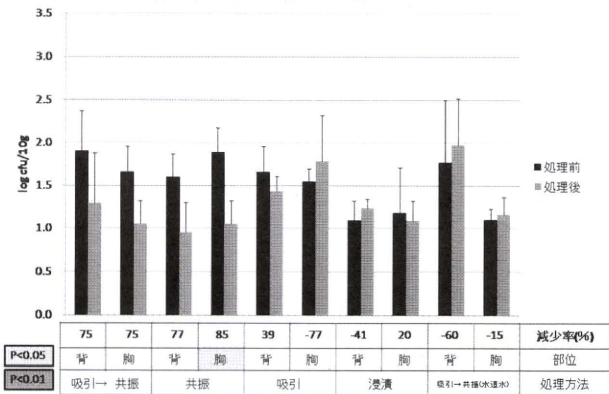


図11 薬剤別殺菌効果の比較(ブロイラー)

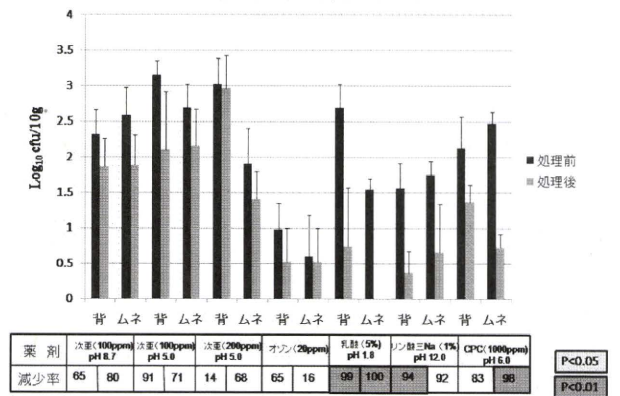
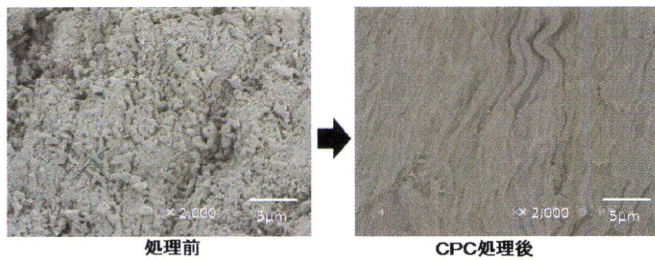


図12 殺菌処理後の鶏皮表面の変化



処理前

CPC処理後

地鶏(ムネ)

わが国で分離されたヒト臨床由来カンピロバクター・ジェジュニの 遺伝学的多様性と病原性に関する研究

研究分担者	朝倉宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	江川智哉	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨

2005-2006 年の間に国内ヒト臨床患者より分離された *Campylobacter jejuni* 計 100 株について、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 遺伝子型別を行い、PubMLST データベースを通じて国際比較を行った。諸外国と同様、国内分離株中には ST-21, ST-45 型が多く認められたが、ST-4526 型は日本でのみ認められた。本食中毒では、疫学情報より原因と目される食品から本菌が分離されることは非常に少なく、原因が特定されないことが多い。実際に国内分離株のうち、疫学情報から原因食品が特定された菌株は僅か 25%であった。上記データベース情報の活用により、約 73%の原因が推定された。このうち 63%はニワトリ、14%はウシ、23%はその他（ブタ、綿山羊等）によると推定され、国内カンピロバクター食中毒の原因食品として鶏肉が最も重要であるという現在の認識を遺伝学的に裏付けることができた。加えて、感染により生じる腸管上皮細胞の IL-8 産生量を評価したところ、3 株で感染初期に低値を認めたが、これらは運動性の減弱に因るものであり、ヒト臨床分離株の病原性には大きな差異がないと考えられた。今後は、本研究で試みた遺伝学的原因推定手法の有効性・精度を評価するため、動物由来株の収集と遺伝子解析を進め、国内情報の発信につとめたい。

A. 研究目的

Campylobacter 属菌は単極或いは両極に 1 本の鞭毛を有する微好気性・グラム陰性のらせん状菌である。本属菌は 1982 年に食中毒細菌に指定された比較的新しい腸管系病原菌であり、現在迄に 18 菌科種 6 亜種 3 生物型に分類されている。このうち、ヒトの下痢症と最も関連性が高いのは *C. jejuni* 及び *C. coli* である。

厚生労働省・食中毒統計によると、*C. jejuni*・*C. coli* による食中毒は、近年わが国で発生する細菌性食中毒の中で最も発生件数が多く（図 1A）、その約 9 割は、*C. jejuni*、残りの 1 割は *C. coli* により発生している。また、散发事例の割合が高いのも、本菌による食中毒の特徴の 1 つである（図 1AB）。*Campylobacter* 食中毒では、2-5 日とやや長い潜伏期間を経た後、下痢、腹痛、発熱、悪心、嘔吐、頭痛、倦怠感等の臨床症状を呈する。細菌性食中毒が発生した場合、患者及び原因推定食品より原因菌を捕捉すること

が、原因食品を特定する為の前提条件となる。しかしながら、本菌は大気中で生存できない、乾燥に弱い等の細菌学的形質を有するため、一般的な食品では保存中に生存性を喪失しやすい。本食中毒患者の病態は比較的長い潜伏期間を経て顕されるため、原因と疑われる食品から本菌を分離培養しようとする時点で、既に相当の保存期間を経ているため、原因食品が特定されることは非常に少ない（図 2A）。2006-2009 年の厚生労働省・食中毒統計によると、原因食品が特定された食中毒事例は、僅か 12%に留まっている（図 2A）。

Campylobacter 属菌は動物種により保菌している菌種に特徴がみられ、*C. jejuni* はニワトリ、野鳥等の家禽類、ウシをはじめとする反芻獣の腸管内に広く分布しており、*C. coli* はブタに高率で分布している。前述の通り、*C. jejuni* はヒト食中毒の主因であるが、多様な汚染分布を示すその生態は、本食中毒の感染経路を特定する

にあたっての更なる障害となっている。

本食中毒事例において原因が特定された食品の内訳について見ると、およそ 75-80%は鶏肉が占め、15%程度を牛肉が占めていることがわかる (図 2B)。多くの食品汚染実態調査を通じて、鶏肉は本菌に高率に汚染されていることが明らかとなっており、従って鶏肉はカンピロバクター食中毒の重要な原因食品と目されている。一方で、原因食品が特定される事例が極めて限定的であるため、わが国で多発している本食中毒事例全体の中で、鶏肉が原因として占める割合を把握する科学的根拠は得られていない。また、食品保存により生存性を著しく喪失した状態にある本菌を検出する技術は現在のところ開発されていない。

こうした背景から、本研究では 2005-2006 年の間に国内のヒト患者より分離された *C. jejuni* 株を収集し、MultiLocus Sequence Typing (MLST) 法による遺伝学的特徴付けを行うことで、(i) わが国の発生動向を海外情勢と比較すると共に、(ii) 国内における *Campylobacter jejuni* 食中毒の発生要因 (原因食品) の推定を試みた。更に、供試菌株の病原形質についても検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 菌株及び培地

2005-2006 年の間に東京都及び大阪府においてヒト臨床患者より分離された *C. jejuni*、計 100 株を供試菌株とした。培養には、Mueller-Hinton 寒天培地 (MHA) (BD Bioscience) 又は Mueller-Hinton broth (MHB) (BD Bioscience) を用い、微好気条件下で実施した。

2. DNA 抽出および PCR

MHA 上で一夜培養した供試菌株より、DNA easy Tissue kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。MLST 解析対象となる 7 遺伝子 (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glnA*, *pgm*, *tkk*, *uncA*) を表 1 に示すプライマーを用いて PCR 反応により増幅させた。増幅断片は脱塩・精製後、BigDye Terminator Ver.3.1 を用いた Cycle sequencing により、塩基配列を決定した。

3. MLST 解析

上記により得られた計 1400 の配列サンプルについて、比較対照配列を定法に従いアセンブルした。各遺伝子配列のアレル型は PubMLST homepage (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) に登録された配列情報を参照し、各菌株としての ST (Sequence Type)・CC (Clonal Complex) を

決定した。同データベースに未登録の配列については、新規登録を行った。

4. 分離株の由来推定法

PubMLST Isolate database (http://pubmlst.org/perl/bigddb/bigddb.pl?db=pubmlst_campylobacter_isolates) において、ST 型ごとに分離由来履歴を収集し、ニワトリ、ウシおよびその他 (ブタ・綿山羊・環境等) に分類してそれぞれの割合を集計した。これを各供試菌株にプロットすることで、供試菌株母集団における由来推定値を積算した (表 2)。

5. 統計・系統解析

供試菌株母集団の Complexity を検証するため、LIAN 3.5 を用いてアレル分布を、START ver. 2.2 を用いて dN/dS 比を算出した。Cluster 分類には BAPS アルゴリズムを用いた。系統樹の作成は PHYLOGENY Program を用いて最尤法により行った。

6. IL-8 ELISA・細胞付着性試験

各供試菌株を $MOI=100$ となるよう、Int407 細胞 (1.5×10^5 /Well, 24well-plate) に 2 時間感染させた。PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100 により細胞懸濁液を調整し、MHA 上に播種して 3 日培養後、CFU 値を測定した。また、同様の感染細胞系を用い、10 時間感染後の培養上清をサンプルとして IL-8 ELISA kit (BD Bioscience) により、感染により生じる IL-8 産生量を測定した。

7. 運動性試験、ウェスタンブロット

IL-8 産生及び細胞付着性の減弱が認められた菌株について、0.4% ソフトアガーを用いて運動性を検証した。また、総タンパクをサンプルとして 8% SDS-PAGE 中で泳動した後、ウェスタンブロット法により鞭毛抗原 FlaA を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト臨床情報を包含しておらず、またゲノム情報は分離微生物に関するもののみであるため、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

1. 獲得 MLST データの系統学的解析

ヒト臨床由来 *C. jejuni* 計 100 株は 43 の ST 型を含む 15 の CC に分離された (表 2)。これらは更に最尤法に基づく系統解析を通じて、4 群 (Cluster1-4) に分類された (図 3)。

Cluster1 には ST 型 14 種、CC6 種を含む計 38 株が分類された。CC 型による区分では、ST-48CC が最も多く (10%)、ST-22CC (9%)、ST-45CC (7%) が続いた (表 2)。ST 型としては ST-22(8%)、

ST-48(7%)、ST-45(6%)、ST-42(5%)が優勢であった(表2)。ST-2276とST-4612は共にCC未分類であったが、このうちST-4612については本研究で新たに発見されたものである。

Cluster2には、27のST型、11のCC型を含む計59株が分類された(図3、表2)。CC型による分類では、ST-21CCが最も多数を占め(27%)、ST-257CC(6%)、ST-443(5%)がこれに続いた(表2)。ST型による分類では、ST-50(9%)、ST-4526(7%)、ST-922(6%)が優勢であった(表2)。ST-922、ST-2328、ST-4390は、CC未分類であった。また、新規ST型としてST-4611、-4613、-4614、-4623、-4624を登録した。ST-48CCと-353CCはCluster1及び2の双方に分岐していた(表2)。

Cluster3及び4にはST-407(CC未分類)1株とST-61(61CC)1株が分類された(表2、図3)。

2. MLSTデータの統計学的解析

本供試菌株を母集団とした場合の各遺伝子のアレル数はn=9-17であり、米国(n=23-35)、英国(n=49-98)のそれに比べ低い値であった(表3B)。しかしながら、dN/dS比は0.0137-0.0635と米国データ(0.0102-0.0861)と同等であった(表3B)。LIANを用いた遺伝子分布解析により、東京・大阪分離株間には、有意差は認められなかった(表3C)。比較系統解析により、大阪分離株群は、東京分離株群に比べ、菌株間のClonarityが高い傾向を示した(I_{SA} 値=0.3908、表3D)。供試菌株全体としての I_{SA} 値は0.3293であった。

3. MLSTデータの国際間比較

過去に国内ヒト由来分離株としてデータベースに登録されたデータは16株であった(平成22年6月30日時点)。これに本研究の解析データ(n=100)を加えた、計116株を国内ヒト臨床由来*C.jejuni*菌株として、PubMLSTデータベース上に登録されていた米国、英国、カナダのヒト臨床分離株データと主要ST型(上位10型)の分布を比較した。結果を図4に示す。MLST登録数が最も多かったのは、英国で5,831株(全体の53%)であった(同上時点)。アジア(日本、韓国、中国、タイ、ベトナム、フィリピン、シンガポール)からの登録数は全体の約1.5%のみであった(データ未載)。

英国、米国、カナダ、日本各国より登録されたデータについて、ST型の比較を行ったところ、いずれの国においても、ST-21、ST-45型が高い頻度で分布していた(図2)。また、ST-50型については、米国を除く3カ国で多数認められた(図2)。ST-4526は日本分離株では複数(7株)

認められたものの、他国では認められなかった(図4)。同様に、日本分離株中で複数認められたST-922型を示す菌株は他国では少数であった(図4)。このように、多国間におけるST型分布の違いが明らかとなった。

4. MLSTデータに基づく原因食品の推定

疫学情報より原因食品が特定された分離菌株は僅か25株(25%)であった(図5A)。MLSTデータベース上の分離履歴情報に基づき、原因となる食品(動物)について試算したところ、全体の約73%が推定可能であった(表2)。このうち、ニワトリに由来するものは全体の約47%、ウシに由来するものは約10%、その他は約17%であり、依然として不明であったもの(データベース上にヒト以外から分離報告例がないもの)の割合は約27%と算定された(図5B)。

5. ヒト由来供試菌株の病原性評価

*C. jejuni*感染に対して、腸管上皮細胞はIL-8を産生し、感染部位への好中球や食細胞の遊走を促す。各供試菌株のIL-8産生誘導能についてELISA法により検証したところ、3株は感染初期(感染4時間後)に有意な低値を認めた(図6A)。これらの菌株は細胞付着性及び運動性を減弱させていた(図6BC)。ウエスタンブロットにより、運動性を低下させた菌株では鞭毛抗原FlaAの分子量が、他菌株に比べ低い値を示した(図6D)。これらのST型はST-4526(2株)およびST-50(1株)で何れもST-21CCに属していた。より長い時間(16時間)の経過に伴い、これらのIL-8産生能はその他の菌株と同等となった(図6A)。

D. 考察

高い汚染率を根拠として、鶏肉はわが国において多発するカンピロバクター食中毒の最も重要な原因食品と目されている。しかしながら、食中毒事例との直接的関連性を示す科学的データは限定的であり、国内で発生する本食中毒において鶏肉が原因として占める割合を正確に把握するには至っていない。本研究ではヒト臨床由来株について、遺伝情報を基軸とした原因食品の推定を試みると共に、国際間比較を通じて国内の発生動向について考察した。

系統学的解析により、Cluster1は、Cluster2に比べて系統深度が深く(図2)、相対的に長い時間をかけて進化を遂げた集団であると推察された。実際に、Cluster2に比べて、本Clusterの推定原因食品としてニワトリが占める割合は低く(表2)、様々な動物・環境を通過している

と推察される。

これに比して、Cluster2 は分岐度が高い傾向を示し（図 4）、特定の動物・環境に適応している割合が高いと考えられた。実際に、ST-46、ST-51、ST-354 型等の推定原因食品はニワトリのみであった（表 2）。ST-21 型は様々な動物・環境より分離されていたが（表 2）、本遺伝子型は分子遺伝学的に初期段階に発生したものと考えられている。ST-21CC についてみると、ST-50、ST-4526、ST-1360 はニワトリ、ST-21、ST-8、ST-4253 はウシやその他が感染食品と推定されている（表 2）。これらは、ST-21CC が Cluster2 の中で独自に適応進化を遂げていることを示唆している。この中に含まれる ST-4526 は日本国内でのみ分離報告があることから（表 2）、わが国において進化を遂げたものであると推察される。しかしながら、系統発生的に最も近縁である ST-4253 は、中国においてウシから分離されている（表 2）。両者間に宿主特異性の違いが存在するか、またそうであれば何により規定されているかといった点は、本菌の生態を知る上で大変興味深く、今後、ゲノム情報等を精査することで解明したい。

Cluster3 に分類された ST-407 は、系統樹より Cluster2 より派生した遺伝子型と推察された。また、Cluster4 に分類された ST-61 は、ウシに広く分布していた。本 ST 型は Cluster2 に属する ST-38 が最も近縁であり（図 4）、これらは共にウシに由来する割合が高かった（表 2）。

国内で発生するカンピロバクター食中毒では、「生、或いは加熱不足状態の肉の喫食」或いは「器具や手指を介した二次汚染」が、原因食品からの病原体伝播を助長する主な環境要因と考えられている。感染源の撲滅が根本的な食中毒予防に繋がることはいうまでもないが、本研究で最も重要な原因食品と推定されたニワトリに関しては、養鶏段階での効果的な本菌の制御法が確立されていないことから、現時点では流通・消費段階における加熱殺菌の徹底が唯一の実用可能な予防法と考えられる。しかしながら、日本には生食文化があり、生肉や加熱不十分の状態での喫食する機会が諸外国に比べて高いといえる。特に生食用食肉については「新鮮」であることで消費者が安心感を得る傾向が強い。本菌について言えば、新鮮であるほど、逆に生残しやすいという理解を、調理従事者・消費者へと発信していくことが、今後の公衆衛生上の必要かつ有効な社会啓蒙活動であろう。

本研究事業 1 年目では、ヒト臨床分離株に限定して MLST 解析を行った。来年度以降は、ニワトリ・ウシ由来菌株の情報を集積し、今回の成績に反映させることで、MLST 遺伝子解析に基づく原因食品推定手法の有効性・精度について検証したい。また、数少ない国内情報を海外へと発信するために MLST データベースへの登録を進めていく予定である。

E. 結論

わが国において分離されたヒト臨床由来 *C.jejuni* 株について、MLST 解析を行い、原因と推定される食品種を推定した。疫学情報から原因が特定されたものは 25% のみであったが、遺伝子情報によって全体の 73% の原因が推定された。このうち 63% はニワトリ、14% はウシ、23% はその他（ブタ、綿山羊等）に因ると推定され、国内カンピロバクター食中毒の原因食品として鶏肉が最も重要であるという現在の認識が遺伝学的に裏付けられた。また、同遺伝子情報を国際間で比較することで、わが国におけるカンピロバクター菌株の特徴を知ることができた。国内ヒト分離株の病原性に顕著な差異はなかったが、一部で運動性の減弱が認められた。

F. 健康危険情報

（総括報告書にまとめて記載）

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

・ Asakura H, Kawamoto K, Makino S. Response of foodborne microorganisms to osmotic stress. In a book of "Stress response of foodborne microorganisms". Wong HC ed. Nova Science Publishers. 印刷中.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

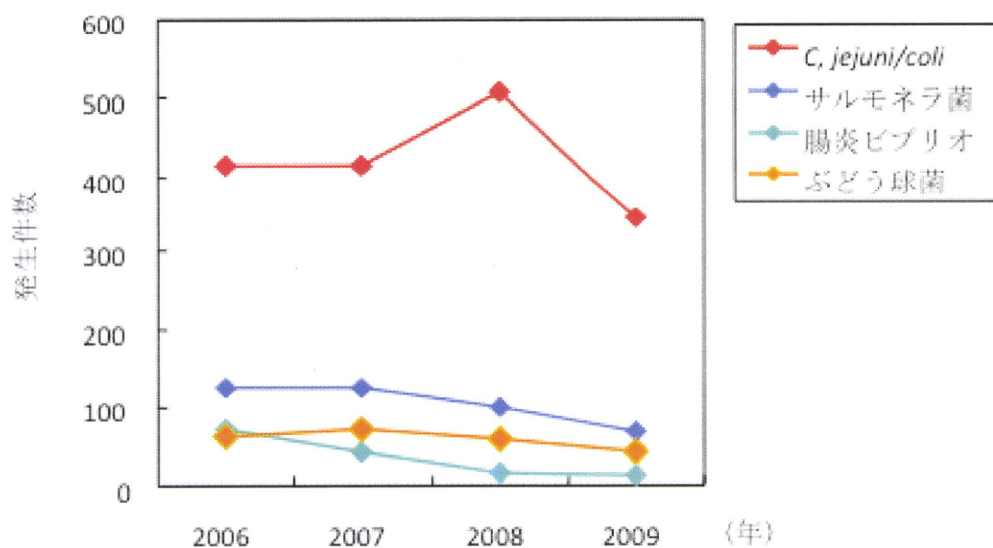
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

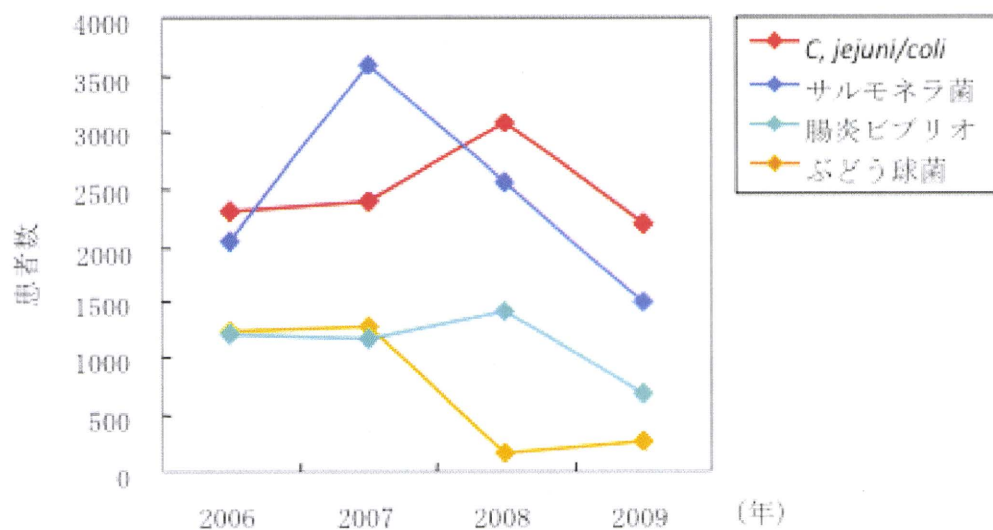
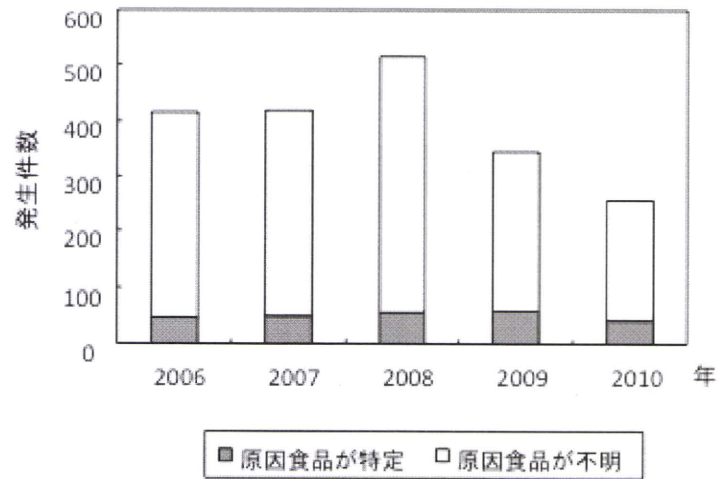


図1. 国内において2006-2009年の間に発生した代表的な細菌性食中毒の発生件数・患者数の推移（セクションA、Bはそれぞれ発生件数、患者数を示す）。（厚生労働省・食中毒統計による）

A



B

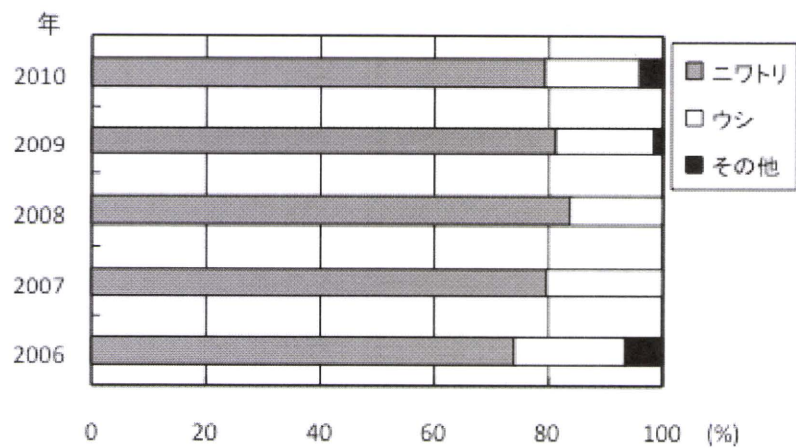


図2. 国内における*C. jejuni*食中毒の発生状況. 2006-2010年に厚生労働省・食中毒統計に集計された*C. jejuni*による食中毒の発生件数をセクションA.に示した(2011年1月11日集計記録)。原因食品が特定された事例と原因が不明である事例について別個に表記した。セクションBには、セクションAにある「原因食品が特定」された事例を取り上げ、原因となった食品についてニワトリ(鶏肉)・ウシ(牛肉)・その他(豚肉・井戸水等)として分類したときの割合をパーセント表示した。

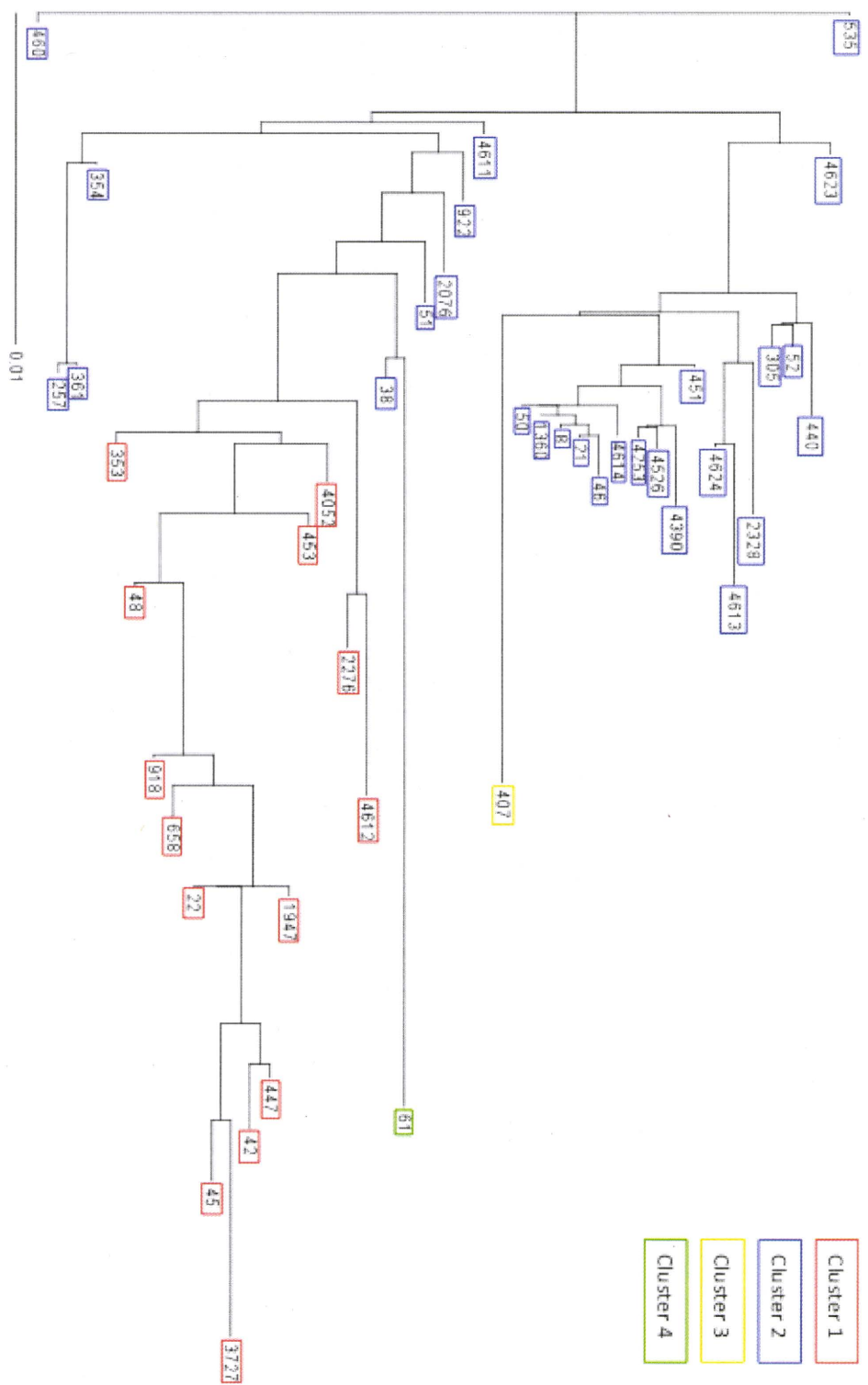


図3. MLSTデータに基づく国内分離*C. jejuni*株の系統解析
国内ヒト臨床分離株のMLST配列データより、最尤法を用いて系統樹を作成した。各数字はST型を示している。

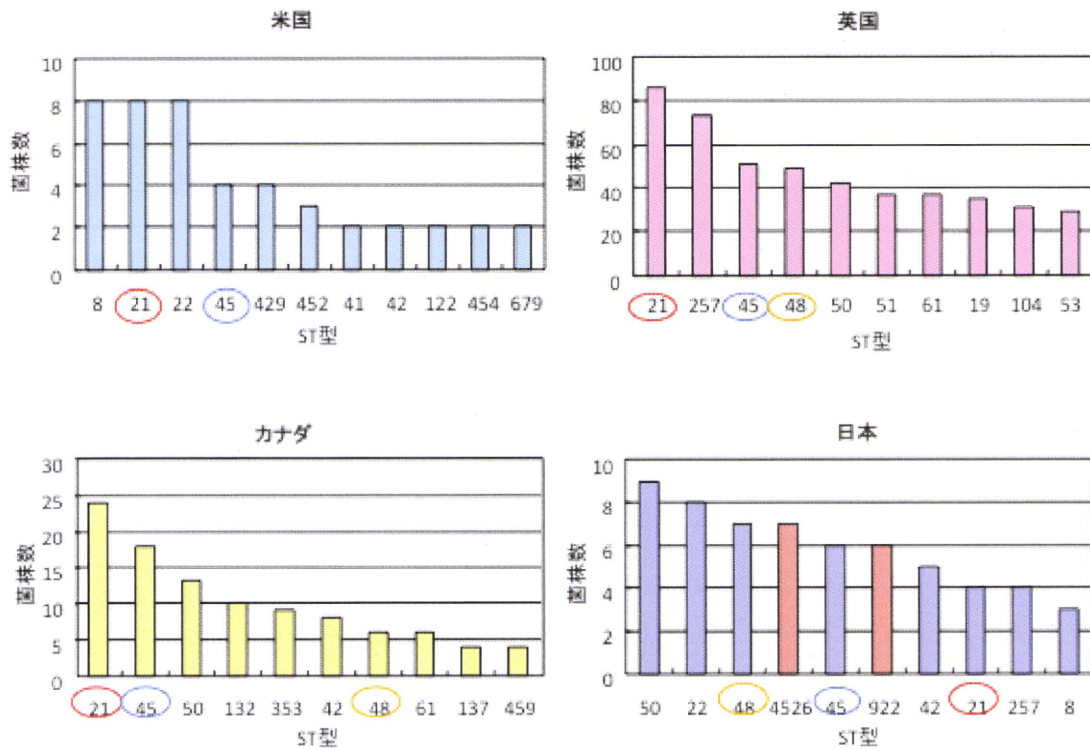


図4. ヒト臨床由来*C.jejuni*株におけるST型別の国別分布

米国、英国、カナダにおいて分離されたヒト臨床由来*C.jejuni*株の主要ST型（上位10型）について、PubMLSTデータベース上に登録されたデータを集計して表示した（2010年6月30日時点）。日本における同データは、上記データベースに既登録のものに、本研究で新たに解析した100株のデータを追加して集計した（計116株）。ST-21型とST-45型は何れの国でも高頻度に検出され、ST-48株は米国を除く各国で同様に高頻度に検出された。また、国内分離菌株のうち、7株はその他の国での報告例のないST-4526型であり、6株は他国では主要なST型ではないST-922型であった。