

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

Arcobacter butzleri の制御法の確立

研究分担者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究の目的はアルコバクター属菌による食中毒発生の可能性を検討することである。本年度はアルコバクター属菌の汚染実態調査およびカンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離を行った。アルコバクター属菌の汚染傾向を詳細に検討するために合わせてカンロバクター属菌の汚染状況も調査した。鶏肉、豚肉、牛肉それぞれ 20 検体からアルコバクター属菌の検出を行ったところ、鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90% の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が 10^2 MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。しかし、*A. butzleri* と *A. cryaerophilus* の汚染傾向が異なることから、感染源が異なる可能性が示唆された。また、カンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離を行ったところ 1 事例で *A. skirrowii* が検出された。本事例は国内の下痢症患者便からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

山中拓哉、太田美香子、高橋幸子、
佐藤德行

宇都宮市衛生環境試験所

床井由紀

さいたま市健康科学研究センター

土屋 彰彦

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子

東京都健康安全研究センター

小西典子

静岡県環境衛生科学研究所

長岡宏美

静岡市環境保健研究所

高橋直人

三重県保健環境研究所

赤地重宏

奈良県保健研究センター	佐伯美由紀
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
沖縄県衛生環境研究所	柿田徹也

A. 研究目的

アルコバクター属菌 (*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii*) はグラム陰性のラセン桿菌で鞭毛をもち運動性を有する。以前はカンピロバクター属菌に属していたが、その後、再分類され、現在ではアルコバクター属として独立している。アルコバクター属菌は食肉、魚介類、野菜など幅広い食品をはじめ、水などの環境中からもしばしば検出される。アルコバクター属菌は胃腸炎患者の便からしばしば分離されており、食中毒との関連性が示唆されている。これまでの報告では 2008 年に米国ウィスコンシン州での結婚式の際に参加した 280 人中少なくとも 51 人が下痢、腹痛、嘔吐などを発症した。調査の結果、原因食としてフライドチキンが強く示唆されたが、フライドチキンから、または患者便からもウイルスを含む既知の食中毒微生物は検出されなかった。しかし、その後の調査の結果、フライドチキンおよび患者便から *A. butzleri* が PCR で検

出された。残念ながら事例発生から日数が経過していたためか、菌分離は行ええず、最終的に *A. butzleri* を原因菌として同定出来なかった。また、1983 年にイタリア、フラッタ州の小学校で 10 名の学生が発症するという事例が発生している。この事例の患者便からはカンピロバクター様の菌が分離された。最終的にこの菌は *A. butzleri* と同定された。この事例でも食品からの菌分離は行われてはおらず、最終的な原因菌の同定はなされていない。また別の調査では、下痢症患者 6,744 名の便から菌分離を行ったところ、89 名 (1.3%) からアルコバクター属菌が分離されたという報告がある。さらにアメリカからメキシコ、グアテマラ、インドへの旅行者で下痢を発症した患者の 8%、また、タイの下痢症児童の便の 2.4% からそれぞれアルコバクター属菌が分離されている。この他にも多くの原因物質不明の事例で患者便からアルコバクター属菌が分離されている。

アルコバクター属菌の病原性に

関しては *A. butzleri* が詳しく調べられている。それらによると *A. butzleri* は Cytolethal distending toxin、Cytotoxic enterotoxin、Cytotoxic enterotoxin などの *C. jejuni* 様の毒素を産生することが明らかになっている。また、*ciaB*、*cadF*、*cj1349*、*hecA*、*hecB* などの細胞侵入因子、接着因子を発現しており、これらを利用して腸管上皮細胞へ接着、侵入し、タイトジャンクションのバリア機能を低下させることが報告されている。これらのことから *A. butzleri* も *C. jejuni* と同様に病原性を示すのではないかと考えられている。また、動物実験では新生仔豚やラットに下痢を惹起することが報告されている。

このようにアルコバクター属菌と食中毒発症との間に関連性が示唆されているが、アルコバクター属菌が食中毒の原因菌であるかどうかについては結論が出ていない。その原因の一つとしてアルコバクター属菌に対する検査は通常の検査項目に入っていないため、アルコバクター属菌が関与している事例が発生しても見逃される可能性が高いことが挙げられる。また、もう一つの理由として、アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌と非常に類似した性状を持っていること

が挙げられる (表 1)。カンピロバクター属菌を分離するときには 42℃での発育や微好気条件下での発育が大きな指標となるが、*A. butzleri* は 20℃～42℃で発育でき、好気条件下、微好気条件下の何れでも発育できる。また、他の生化学性状もカンピロバクター属菌と類似しており、特に *C. coli* とは生化学性状的には区別することができない。形態学的にもカンピロバクター属菌と同じグラム陰性のラセン桿菌である。また、アルコバクター属菌は灰白色～クリーム色で表面に光沢のある隆起した微小集落を形成する。また培地の表面が湿っていた場合、その運動性のため扁平なコロニーを形成する。これらの特徴はカンピロバクター属菌と類似しており、集落の色調、形態でも区別することが難しい (図 1、2)。さらにアルコバクター属菌はカンピロバクター属菌を分離するとき用いられる多くの選択培地上で発育できることが報告されている。このようなことからアルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤同定され、カンピロバクターの事例として処理されている可能性が示唆されている。これまでの調査ではカンピロバクター属菌による事例の分離株 2855 株を再調査したとこ

る、1%が *A. butzleri* がカンピロバクター属菌として誤同定されたものであったとの報告がある。また、アルコバクター属菌にも病原性があり、カンピロバクター属菌が単独ではなくアルコバクター属菌とともに発症に関与していたとしても、前述のとおりアルコバクター属菌に対する検査は通常行われていないため、表面上はカンピロバクター属菌単独の事例となってしまう可能性が示唆されている。例えば南アフリカの調査では患者便 322 検体のうち 35 検体からアルコバクター属菌を検出したが、そのうち 27 検体から *C. jejuni/coli* も同時に検出され、最終的に *C. jejuni/coli* の事例として処理されている。以上のような要因から、アルコバクター属菌の食中毒への関与は明らかになっていない。

本研究ではアルコバクター属菌の食中毒への関与について検討する。そのために、1) 肉類、野菜、魚介類など様々な食品における汚染実態を調査する、2) 地方衛生研究所に協力をお願いし、カンピロバクター食中毒発生時に患者便からアルコバクター属菌の検出を試みる、3) アルコバクター属菌の制御法の検討、以上の三点について研究を行う。本年度は食肉における汚染

実態調査とカンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出を行った。

B. 研究方法

[1] 標準菌株

American Type Culture Collection (ATCC) より *A. butzleri* (ATCC49618)、*A. cryaerophilus* (ATCC43158)、*A. skirrowii* (ATCC51400) を購入し標準株として使用した。

[2] 試薬・培地

アルコバクター基本培地、CATサプリメントは Oxoid 社より購入した。5-フルオロウラシルは(株)ナカライテスクより購入した。アルコバクター基本培地には 1.5%の寒天を加え寒天培地としても使用した。寒天培地は、121℃、15分間、オートクレーブ処理後、滅菌シャーレに 15~20 ml ずつ分注し、使用した。選択剤もしくは馬脱繊維血を添加する場合は、オートクレーブ後の培地を 55℃まで冷却した後、無菌的に添加した。

[3] 検体

鶏肉、豚肉、牛肉は神奈川県内のスーパーマーケットより購入した。購入後、検体は 4℃で保管し、24時間以内に試験に供した。

[4] 最確数法 (アルコバクター属

菌)

最確数法によるアルコバクター属菌の計数は昨年度確立した方法で行った。増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地を用い、分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用いた。増菌培地 225 ml に検体 25 g を加え、2 分間ストマッキング処理を行った。これを 10 倍乳剤とする。10 倍乳剤を増菌培地でさらに希釈し、100 倍乳剤を作製した。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 ml、100 倍乳剤 1 ml および 0.1 ml に増菌培地を加えて最終 10 ml にした。各濃度につき試験管 3 本ずつ用意した。30℃、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製した。作成したテンプレートを用いてマルチプレックス PCR を行い、アルコバクター属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* それぞれの最確数を算出した。さらに、マルチプレックス PCR で陽性になった試験管の培養液を CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地に塗抹し、

30℃、48 時間、培養した。単離した集落から DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行った。PCR が陽性の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11000 MPN/100 g である。

[5]最確数法(カンピロバクター属菌)

最確数法によるカンピロバクター属菌の計数は以下の手順で行った(図 3)。増菌培地として 5% 馬血液を加えたプレストン培地(以下 増菌培地)を用いた。増菌培地 225 ml に検体 25 g を加え、2 分間ストマッキング処理を行った。これを 10 倍乳剤とする。10 倍乳剤を増菌培地でさらに希釈し、100 倍乳剤を作製した。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 ml、100 倍乳剤 1 ml および 0.1 ml に増菌培地を加えて最終 10 ml にした。各濃度につき試験管 3 本ずつ用意した。37℃、48 時間、微好気培養後、各試験官から培養液 0.1 ml を取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製した。作成したテンプレートを用いてマルチプレックス PCR を行い、

カンピロバクター属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* それぞれの最確数を算出した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11000 MPN/100 g である。

[6] マルチプレックス PCR

A. butzleri、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR は昨年確立した方法を用いた (図 4)。*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* を同時に検出できるマルチプレックス PCR は Asakura et al. の PCR プライマーを参考にし構築した (FEMS Immunol. Med. Micro Biol., 260-266, 2008)。PCR 条件を図 5 に示す。このマルチプレックス PCR 法の検出限界は増菌培養液 1ml あたり 10^2 cfu であった (図 6)。サンプルからの DNA 抽出はアルカリ熱抽出法で行った。具体的には増菌培養液 100 μ l を滅菌微量遠心チューブに移し、12,000 rpm、10 分間の遠心処理後、上清を捨て、50 mM NaOH を 85 μ l 加えた。100°C、10 分間加熱後、1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ l 加え、12,000 rpm、10 分間の遠心処理後、上清をテンプレートとして使用した。

[7] カンピロバクター食中毒患者

便からのアルコバクター属菌の分離

カンピロバクター食中毒もしくはカンピロバクターが原因菌として疑われる事例が発生した場合、研究協力機関において患者便からアルコバクター属菌の分離を行っていただいた。分離手順は以下のとおりである (図 7)。分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用い、これに患者便を塗抹後、30°C、48 時間、好気培養を行った。培養後、カンピロバクター様コロニーを 10 個選択し、アルカリ熱抽出法もしくは熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行った。陽性の菌株は国立医薬品食品衛生研究所において性状を解析した。

研究協力機関の東京都健康安全研究センターではさらに糞便から直接 DNA を抽出しアルコバクター属菌を検出していただくとともにフィルター法による菌分離を行っていただいた。糞便からの DNA 抽出は以下の手順で行った (図 9)。糞便 200 μ l をサンプリングし滅菌生食 800 μ l 加え懸濁した後、12,000rpm 10 分間遠心分離、上清を取り除いた。沈査に滅菌生食 1ml 加え懸濁後、再度遠心分離し上清を除いた。25mM NaOH を 50 μ l 加

え 100°C 10 分間加熱後、1/25mM Tris-HCl を 50 μ l 加え中和した。遠心上清をテンプレートとして用い、マルチプレックス PCR でアルコバクター属菌を検出した。フィルター法によって糞便からアルコバクター属菌を分離する場合は以下の手順で行った。まず、平板にフィルター (0.45 μ m、0.22 μ m、0.65 μ m) をのせ、糞便 50 μ l を滴下した。さらに 50 μ l の滅菌生理食塩水をフィルターにのせ 30 分間~1 時間、室温に放置した。その後フィルターを取り除き培養を行った。

C. 研究結果

[1] 食肉における汚染実態調査概要

今回の汚染実態調査では鶏肉、豚肉、牛肉を対象にそれぞれ 20 検体ずつ調査を行った。検体の内訳を表 3~表 5 に示す。鶏肉はもも肉 10、胸肉 7、手羽先 1、ささみ 1、不明 1 ですべて国産であった。冷凍処理の有無は不明であった。豚肉はもも肉 3、ロース肉 11、不明 6 で、産地は国産 13、海外産は 7 であった。冷凍処理の有無は不明であった。牛肉検体はもも肉 4、肩ロース 3、サーロイン 1、不明 12 であった。産地は国産が 11、海

外産が 9 で、冷凍処理の有無は不明であった。

鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出された(表 2、3)。*A. cryaerophilus* は 12 検体 (60%) から検出された (表 2、3)。*C. jejuni* は 20 検体中 11 検体から検出された (55%) が、*A. skirrowii*、*C. coli*、*C. fetus* は検出されなかった (表 2、3)。100 g あたりの MPN が 10^2 以上の検体は、*A. butzleri* が 18 検体 (90%)、*A. cryaerophilus* が 3 検体 (15%)、*C. jejuni* が 6 検体 (30%) であった (表 3、6)。

豚肉では *A. butzleri* は 20 検体中 11 検体から検出された (55%) (表 2、4)。*A. cryaerophilus* は 12 検体 (60%) から検出された (表 2、4)。*A. skirrowii* およびカンピロバクター属菌は検出されなかった (表 2、4)。100g あたりの MPN が 10^2 以上の検体は、*A. butzleri* は 0 検体、*A. cryaerophilus* が 3 検体 (15%) であった (表 4)。

牛肉では 2 検体から *A. cryaerophilus* が検出されたが、他の菌は検出されなかった(表 2、5)。

以上のように鶏肉においては *A. butzleri* の菌数が非常に多い傾向が見られた (表 3、6)。鶏肉にお

ける *A. cryaerophilus* と *C. jejuni* はほぼ同じような菌数の分布となった (表 3、6)。豚肉においては *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* では大きな差は見られなかったが、*A. cryaerophilus* の方に菌数の高い検体が 8 検体存在していた (表 4)。部位や産地によって菌の分布に差は見られなかった (表 3、4、5)。

[2] 鶏肉における汚染状況

鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の最確数を比較したところ (図 9)、*C. jejuni* が検出限界未満であるにもかかわらず *A. butzreli* の菌数が 10^3 MPN/100 g を超えている検体が 6 検体あった。しかしそれ以外の検体に関しては *A. butzreli* も *C. jejuni* も高い菌数を示しており、*A. butzreli* の菌数が上昇するにつれて *C. jejuni* の菌数も増加する傾向が認められた。(図 9)。*A. butzreli*、*C. jejuni* とともに最も菌数の多い検体では検出上限値 11000 MPN/100g を超えていた。*A. butzreli* が検出限界未満で、*C. jejuni* だけが検出された検体はなかった。

A. cryaerophilus と *C. jejuni* の菌数の比較を行った (図 10)。*A. cryaerophilus*、*C. jejuni* と

ともに検出された検体は 8 検体あった。5 検体で *A. cryaerophilus*、*C. jejuni* とともに検出されなかった。*A. cryaerophilus* だけが検出され *C. jejuni* が検出されなかったのは 4 検体あった。また、*C. jejuni* だけ検出され *A. cryaerophilus* が検出されなかったのは 3 検体あった。*A. cryaerophilus* で最も菌数が多かった検体は 360 MPN/100g であった。*C. jejuni* で菌数が最も多かった検体では検出上限値 11000 MPN/100g を超えていた。*A. cryaerophilus* が検出された検体では菌数は 10^2 MPN/100g 前後に集中しており、*C. jejuni* の菌数とは相関が見られなかった。

A. butzreli と *A. cryaerophilus* の菌数を比較した (図 11)。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* がともに検出された検体は 12 検体存在した。*A. butzreli* だけが検出され *A. cryaerophilus* が検出されなかった検体は 8 検体あった。一方で、*A. cryaerophilus* だけが検出され *A. butzreli* が検出されなかった検体、また *A. butzreli*、*A. cryaerophilus* とともに検出されなかった検体はなかった。*A. butzreli* の菌数で最も高かったの

は検出上限値の 11000 MPN/100g を超えていた。*A. cryaerophilus* で菌数が最も高かったのは 360 MPN/100g であった。*A. cryaerophilus* が検出された検体では菌数が 30-360 MPN/100g に集中しており、*A. butzreli* の菌数との相関は見られなかった。

以上の結果から、*A. butzreli* と *C. jejuni* は菌数に共通の傾向がみられたが、*A. butzreli* と *A. cryaerophilus*、*A. cryaerophilus* と *C. jejuni* との間には相関は認められなかった。

[3] 豚肉における汚染状況

豚肉からはカンピロバクター属菌は検出されなかった。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* の菌数を比較したところ、*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* がともに検出された検体は 3 検体存在した (図 12)。*A. butzreli* だけ検出され、*A. cryaerophilus* が検出限界値未満の検体は 7 検体存在した。一方、*A. cryaerophilus* が検出されたのにもかかわらず *A. butzreli* が検出限界値未満の検体は 8 検体存在した。以上のように豚肉では 15 検体で *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* いずれかの単独汚染であった。*A. butzreli* で最も菌数が高かった検体は 93

MPN/100g で、*A. cryaerophilus* で最も菌数が高かった検体は 11000 MPN/100g を超えていた。豚肉における *A. butzreli* の菌数は鶏肉のそれよりかなり低かった。*A. cryaerophilus* の菌数は 11000 MPN/100g を超えている 1 検体を除くと 30~426 MPN/100g の範囲で鶏における菌数と大きな差は見られなかった。産地や部位の違いによる菌数の分布に差は見られなかった。

[3] 牛肉における汚染状況

牛肉では *A. butzreli*、*A. skirrowii*、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* は検出されなかった。*A. cryaerophilus* も 2 検体でのみ検出され、その菌数は 92、4600 MPN/100g であった (表 5)。

[4] カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出

カンピロバクター食中毒 (疑いも含む) 発生時に研究協力機関にて便からコロニーを分離していただき、マルチプレックス PCR でアルコバクター属菌の検出を行なった。今回は 2018 年から 2019 年の間に発生した 129 事例に関して検出を行なった。その結果、患者便からアルコバクター属菌は検出できなかった。アルコバクター属菌

の集落は特徴が無いと、判別が難しかったのと、今回使用した選択剤の選択性が低いため多くの菌が発育しことが原因として考えられた。しかし、2019年5月から8月にかけて搬入された75検体に関して、東京都健康安全研究センターで便からDNAを直接抽出しPCRによって検出を行なったところ1検体から*A. skirrowii*が検出された。そこでフィルター法を用いて*A. skirrowii*の分離を行なったが、便から菌は分離できなかった。*A. skirrowii*が検出された事例は6名で鶏料理を喫食後、6名が発症した事例で、*A. skirrowii*が検出された患者からは他に*C. jejuni*、腸管出血性大腸菌0157が検出されており、また、同じグループの人からサルモネラ04群が検出され、原因食品不明の有症事例となっている。しかし、本事例は下痢症患者からアルコバクター属菌が分離された国内では大変貴重な事例である。

D. 考察

[1]食肉における汚染実態調査

これまでに食肉でアルコバクター属菌の汚染実態は調査されてきたが、具体的な菌数を調査したものは少ない。そこで国内での食肉

の汚染状況を最確数法を用いて調査した。今回はアルコバクター汚染の特徴を把握するためにカンピロバクターの汚染状況も併せて調査を行い比較した。今回調査の対象としたのは鶏肉、豚肉、牛肉である。鶏肉はこれまでの多くの研究でアルコバクター属菌が分離されており、アルコバクター属菌の保菌動物の一つではないかと考えられている。鶏肉の調査の結果、これまでの報告と同様にアルコバクター属菌が検出された。特に*A. butzreli*はすべての検体から検出された。今回の調査では*C. jejuni*より検出率が高かった。菌数も大変高く、*C. jejuni*よりも高かった。このように*A. butzreli*は鶏肉において汚染率、菌数ともに*C. jejuni*より高かった。現在の食中毒の発生状況、これまでに報告されている菌の検出状況を考えあわせると、カンピロバクター食中毒に関与していたとしても*C. jejuni*より病原性が弱い可能性が示唆された。

*A. cryaerophilus*も60%の検体から検出されており、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染の広がりを見ることができた。しかし、菌数は*A. butzreli*に比べると低く、*C. jejuni*と近い値となった。一

方、これまでに鶏肉からしばしば分離されてきた *A. skirrowii* は今回検出できなかった。*A. skirrowii* もアルコバクター属菌による食中毒や胃腸炎などの健康被害に関与していると考えられている。今回は 20 検体しか調査を行っていないため、今後さらに調査を進め *A. skirrowii* の汚染率をあきらかにしていきたい。

豚肉における汚染状況を見てみるとこれまでの報告にあったようにアルコバクター属菌の汚染が確認された。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* の汚染率は 50% を超えており、豚肉においてもアルコバクター属菌の汚染率が高いことが明らかになった。*A. butzreli* は鶏肉においては汚染率は 100% で、且つとても高い菌数で汚染していたが、豚肉における汚染率は 50% で菌数も低く *A. cryaerophilus* に近い値となっていた。一方、牛肉におけるアルコバクター属菌の汚染は低く、*A. cryaerophilus* が 2 検体で陽性となっただけである。これらの結果から、アルコバクター属菌の汚染状況は鶏肉、豚肉、牛肉の順で深刻で、食中毒対策を考える上で特に鶏肉と豚肉に対して注目する必要があると思われた。また、鶏肉

における *A. butzreli* の菌数は *C. jejuni* のそれを超えていたことから、*A. butzreli* の鶏の腸管および鶏肉に汚染後の増殖性、生存性が *C. jejuni* よりも強い可能性がある。今後さらに検討が必要であると思われる。

今回調査した菌種間で菌数の比較を行った。鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の菌数を比較すると、*C. jejuni* が検出限界値以下であるのにも関わらず、*A. butzreli* の菌数が 10^3 MPN/100g 以上の高い値を示した検体が 6 検体認められた。しかし、それ以外の検体に関しては *A. butzreli*、*C. jejuni* ともに高い菌数を示しており、*A. butzreli* の菌数が上昇するにつれて *C. jejuni* の菌数も増加する傾向が認められた。カンピロバクター属菌は鶏の腸管に生息しており、食鳥処理時に鶏肉を汚染すると考えられている。*A. butzreli* も鶏の糞便から分離される報告があることから、おそらく鶏の腸管に生息していると思われる。今回の結果から *C. jejuni* の菌数と *A. butzreli* の菌数には同様の傾向が認められることから、*A. butzreli* も鶏の腸管に生息しており、*C. jejuni* 同様、鶏の解体時に処理場内で汚染が発生して

いるのではないかと考えられた。しかし、*A. butzreli* に対して *A. cryaerophilus* は *A. butzreli* と *C. jejuni* とともに菌数の傾向が一致しない。*A. butzreli* や *C. jejuni* の菌数にかかわらず 10～430 MPN/100g の範囲に *A. cryaerophilus* の菌数が集中している。今回のデータだけで確定的なことは言えないが、鶏肉における *A. cryaerophilus* の汚染は *A. butzreli* や *C. jejuni* と異なる汚染源、例えば環境や別の保菌動物からの二次汚染の可能性も考えられた。一方、豚肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の菌数を比較したところ、両方が検出されたのが 3 検体、両方とも検出されなかったのが 2 検体であった。残りの 15 検体は *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* のいずれかしか検出されなかった。このような現象が見られた原因として 1) *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* のいずれかしか保菌していない豚が多い、2) *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の両方、もしくはいずれかが豚以外に汚染源を持っている可能性が考えられた。鶏肉における汚染状況からも示唆されるように *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* は

汚染源が異なる可能性がある。アルコバクター属菌はこれまでの報告で食肉だけでなく環境や水などから広く検出されている。このような環境からの汚染に関しても今後検討していく必要があると思われる。

今回は PCR による検出だけでなく、PCR で陽性になった試験管から菌液を取り選択培地に塗抹し菌分離を試みたが、分離できい検体が多くあった。培地に添加した CAT supplement はアルコバクター属菌の分離に用いられているが、今回の鶏肉からの分離では他の菌の発育が見られた。また、アルコバクター属菌の集落は特徴が少ないため判別が難しかったのも原因の一つとして考えられた。今後は選択培地の改良を行なっていく必要があると思われる。

[2] カンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離

アルコバクター属菌とカンピロバクター属菌は性状が非常に似ているため、アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤判定された事例が海外で報告されている。また、カンピロバクター属菌に対する検査はルーチンの検査項目に入っているが、アルコバク

ター属菌に対する検査は通常行われないため、アルコバクター属菌が食中毒に関与していたとしても、カンピロバクター食中毒として処理されてしまっている可能性が報告されている。そこで本研究では日本国内におけるこれらの可能性を検討するために研究協力機関である地方衛生研究所で、カンピロバクター食中毒発生時に患者便からアルコバクター属菌の分離を行なっていた。その結果、患者便からアルコバクター属菌は分離できなかった。原因として CAT supplement の選択性が弱く他の菌が発育してしまうため分離が困難になることが挙げられた。一方で、海外の研究では糞便からのアルコバクター属菌の検出はしばしば PCR によって行われている。PCR による検出は菌の状態に関わらず検出を行えるため、生菌の分離よりも検出感度が上昇する可能性がある。そこで、2019 年 5 月から 8 月の間に搬入された 75 の患者便から直接 DNA を抽出し、PCR でアルコバクター属菌の検出を東京都健康安全研究センターで行なったところ、1 事例から *A. skirrowii* が検出された。この事例では *A. skirrowii* 以外に *C. jejuni* やサルモネラ、腸管出血性大腸菌 0157

が検出されているため、*A. skirrowii* が原因菌であるかどうかは判定できず、最終的に有症事例扱いとなっている。しかしながら、本事例は日本国内で下痢症患者からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。ベルギーの報告では胃腸炎患者の 1% からアルコバクター属菌が分離されている。今回の検出率はそれに近いものである。もちろん我が国におけるアルコバクター属菌の食中毒への関与を結論づけるためには今回の検体数、検出頻度は不足していると思われる。さらに選択性の高いアルコバクター属菌の選択培地を検討するとともに、PCR による検出も併せて行う必要があると思われる。今後、さらに例数を増やし、アルコバクター属菌の食中毒への関与を検討していく必要があると思われた。また、今回はカンピロバクター食中毒に限定し、調査を行なったが、海外の報告ではカンピロバクター食中毒以外の下痢症患者便からも分離されている。今後はカンピロバクター食中毒以外、例えば原因物質不明の有症事例の患者便からもアルコバクター属菌の分離を行うことによって、我が国におけるアルコバクター属菌における健康被害の実態が

明らかになるものと思われる。

E. 結論

本年度は昨年度確立した検査法を用いて食肉におけるアルコバクター属菌の汚染実態調査およびカンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出を行った。その結果、鶏肉や豚肉でアルコバクター属菌の重度の汚染が認められた。特に鶏における *A. butzreli* の汚染率、汚染菌数は *C. jejuni* のそれを超えていた。このことから現在の食中毒の発生状況、これまでに報告されている菌の検出状況を考えあわせると、*A. butzreli* がカンピロバクター食中毒に関与していたとしても、*C. jejuni* より病原性が弱い可能性が示唆された。一方で、*A. butzreli* の菌数が *C. jejuni* のそれよりも高いため、鶏肉に汚染後の増殖性、生存性が *C. jejuni* に比べて強い可能性が示唆された。アルコバクター属菌の増殖性、生存性の検討を行い、アルコバクター属菌の増殖、生存を抑えられるような条件を見つけ出すことが食中毒予防に重要であると考えられる。次年度はアルコバクター属菌の増殖性、生存性試験を行う予定である。

汚染菌数の比較の結果から *A.*

butzreli と *A. cryaerophilus* とでは汚染源が異なる可能性が示唆された。汚染源を明らかにし、食品への汚染を防ぐことは食中毒発生を予防する上で基礎的なことである。今後さらに研究を進め、汚染源を明らかにしていく必要があると思われる。

今回、カンピロバクター食中毒の患者便から *A. skirrowii* を検出した。これは我が国で下痢症患者便からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。もちろんこの事例だけでアルコバクター属菌の食中毒への関与を結論づけることはできない。今後継続的な調査を行い、事例数を増やすことによって、我が国におけるアルコバクター属菌と食中毒の関係が明らかになると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし