

平成 30～令和 2 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。3年間の研究期間内に、アルコバクター属菌の検査法の作成、食肉、水耕栽培野菜、魚介類における汚染実態調査、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、*Arcobacter butzleri* の増殖挙動の解析を行った。汚染実態調査の結果から、鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌に汚染されていること、水耕栽培野菜や魚介類もアルコバクター属菌の感染源になりうることが明らかになった。増殖挙動の解析から、4℃や10℃のような低温でも生存できること、酸性域に耐性があること、高塩濃度でも増殖が可能であること、低水分活性条件では増殖できないこと、見かけ上、菌が死滅したように見えても、VBNC状態で生存している可能性があることが明らかになった。アルコバクター属菌に対する衛生管理を行う場合、これらの点に注意する必要がある。

#### 研究協力者

岩手県環境保健研究センター

上山昭、山中拓哉、太田美香子

高橋幸子、佐藤徳行

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、望月瑞葉
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、高良武俊

#### 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。海外では、アルコバクター属菌は胃腸炎患者便からしばしば分離されており、また、アルコバクター属菌が原因物質と疑われている事例が発生している。このため、アルコバクター属菌と食中毒との関連性が従来から指摘されている。しかし、我が国ではアルコバクター属菌に対する検査は日常の食中毒検査項目に含まれてい

ないため、万が一、アルコバクター属菌による食中毒が発生しても、見逃されている可能性がある。また、アルコバクター属菌はカンピロバクター属菌と非常によく似た性状を持っている。カンピロバクター属菌を分離する際には 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、他の生化学性状も非常に類似している。このため、アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤同定されている例が海外で報告されている。以上のことから、アルコバクター属菌と食中毒との関連性については未だに結論が出ていない。

この研究では、アルコバクター属菌と食中毒との関連性を明らか

にし、さらに、アルコバクター属菌の制御法を提案するために、以下の項目を検討した。

1) 食品におけるアルコバクター属菌の汚染実態調査

2) カンピロバクター患者便からのアルコバクター属菌の検出

3) アルコバクター属菌の増殖挙動の解析

## B. 研究方法

[1] アルコバクター属菌の検査法の確立

*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 Houf らの方法 (FEMS Microbiol. Letter, p.89-94, 2000) を改良して作製した。サンプルからの DNA 抽出はアルカリ熱抽出法で行った。

[2] アルコバクター属菌の最確数法の確立

アルコバクター属菌の最確数法を確立するために、アルコバクター属菌の発育に適した培地、および選択剤を検討した。

[3] アルコバクター属菌の汚染実態調査

確立したアルコバクター属菌の最確数法およびマルチプレックス PCR を用い、食肉 (鶏肉、豚肉、牛肉)、水耕栽培野菜、魚介類 (貝類、エビ類、イカ類) の汚染実態調査を

行った。食肉に関しては、カンピロバクター属菌に対する最確数法も同時に行い、汚染状況を比較した。

[4] *A. butzleri* の増殖挙動の解析

アルコバクター基本寒天培地で 25℃、48 時間培養した *A. butzleri* を、pH、塩濃度、水分活性などを調製したアルコバクター基本培地に約  $10^4$  cfu/ml になるように浮遊させ、特に指定のない場合、25℃で培養した。約 24 時間毎に、菌数を計数するとともに、生菌特異的 PCR を同時に行った。*A. butzleri* に対する生菌特異的 PCR には Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (Takara Bio 社製) を使用し作製した。

[5] 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℃、48 時間、好気培養を行った。また、フィルター法に

よる菌分離も行った。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。

### C. 研究結果

#### [1] アルコバクター属菌の検査法の確立

まず、他の研究に先立ち、アルコバクター属菌の検査方法を作製した。標準株から抽出した DNA をテンプレートとして使用し、今回作製したマルチプレックス PCR を行ったところ、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定することができた。次に本 PCR 法の感度を検討した。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 225 ml に *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* が存在しないことがあらかじめわかっている鶏肉 25 g を加え、ストマッカー処理し、乳剤を作製した。この乳剤に既知の菌数の *A. butzleri* もしくは *A. cryaerophilus* 菌液を加え攪拌後、この乳剤から DNA を抽出し、本マルチプレックス PCR を行った。その結果、乳剤中に 100 から 200 cfu/ml の *Arcobacter* 属菌が存在すれば検出することができた。また、*C.*

*jejuni* および *C. coli* から抽出した DNA をテンプレートとして本 PCR を行っても陽性にならなかつた。

#### [2] アルコバクター属菌の最確数法の確率

最確数法を確立するために、まず、アルコバクター属菌の発育に適した培地と選択剤の検討を行った。その結果、アルコバクター基本培地 (Oxoido 社製) が *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の発育に適していることが明らかになった。選択剤としては 5-フルオロウラシル (最終濃度 0.005%) および CAT サプリメント (Oxoido 社製) が適していることが、明らかになった。これらの結果をもとに、増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシル添加アルコバクター基本培地、分離培地として CAT サプリメント添加アルコバクター基本寒天培地を用いた最確数法を作製した。試験は三本法で行い、培養液からの菌の検出はアルコバクター属菌に対するマルチプレックス PCR を用いた。

#### [3] アルコバクター属菌の汚染実態調査

鶏肉、豚肉、牛肉、各 20 検体ずつ調査し、アルコバクター属菌の汚染菌量を最確数法を用いて定量し

た。その結果、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。また、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染は汚染率、汚染菌量ともにカンピロバクター属菌を上回っていた。

水耕栽培野菜におけるアルコバクター属菌の汚染状況を調査した。カイワレ 3 検体、レタス類 5 検体、ブロッコリスプラウト 7 検体、その他のスプラウト 5 検体、計 20 検体を供試した。20 検体中、10 検体から *A. butzleri* が検出された（陽性率 50%）。*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* は検出されなかった。*A. butzleri* が検出された 10 検体のうち 5 検体で 100 g あたりの MPN が 11,000 を超えていた。また、ブロッコリスプラウトの陽性率が高く、7 検体中 5 検体から *A. butzleri* が検出された（陽性率 71%）。陽性のブロッコリスプラウト 5 検体中、4 検体で *A. butzleri* が 11,000 MPN/100 g を超えていた。

魚介類におけるアルコバクター属菌の汚染状況を調査した。調査に

はエビ類 6 検体、貝類 7 検体、イカ類 4 検体を供試した。*A. butzleri* はエビ類 3 検体、イカ類 1 検体から検出された。*A. cryaerophilus* はエビ類 1 検体から検出された。*A. skirrowii* は貝類 1 検体から検出された。

[4] *A. butzleri* の増殖挙動の解析

*A. butzleri* は 4℃ や 10℃ のような低温でも生存できることが明らかになった。pH による影響では、アルカリ性域には耐性はないが、酸性域では長期間生残できることを明らかにした。また、海水の塩濃度に匹敵する高塩濃度下でも増殖が可能であることが明らかになった。水分活性に関しては、低水分活性条件では増殖できななかった。しかし、見かけ上、菌が死滅したように見えても、VBNC 状態で生存している可能性があるため、注意が必要であることが明らかになった。

[5] 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

204 検体の患者便の内、1 検体から *A. skirrowii* が検出された。

#### D. 考察

[1] 食中毒細菌としての可能性

アルコバクター属菌は食中毒細

菌としての可能性が指摘されている。その可能性を検証するために食品における汚染実態調査を行った。鶏肉における調査結果では *A. butzleri* の鶏肉における汚染率は100%、一方、*C. jejuni* は55%であった。汚染菌数も *A. butzleri* のほうが高かった。つまり、アルコバクター属菌は、食中毒細菌として確立されている *C. jejuni* よりも重度に鶏肉を汚染していることになる。もし、*A. butzleri* が *C. jejuni* に匹敵するような病原性を持っているとするならば、*A. butzleri* の検査が日常的に行われていないことを考慮しても、もう少し *A. butzleri* の事例が報告されても良いと思われる。また、水耕栽培野菜を調査した結果では、20検体中10検体が *A. butzleri* 陽性であり、うち5検体で11,000 MPN/100 gを超えていた。水耕栽培野菜は基本的に生食されることを考えると、これだけ *A. butzleri* に汚染されているにもかかわらず、水耕栽培野菜で原因物質不明の食中毒が発生しているという情報もない。これらのことから、アルコバクター属菌は、病原性を持っていたとしても、非常に弱いものではないかと思われた。しかしながら、海外ではアルコバクター属菌が関与していると考えられる

事例が発生していることから、条件が整えば病原性を発揮する、いわゆる日和見菌のような存在ではないかと考えられた。

[2]アルコバクター属菌に対する衛生管理における注意点

本研究結果から、*A. butzleri* は4℃、低pH、高塩濃度条件下でも増殖もしくは生残できることが明らかになった。*A. butzleri* はカンピロバクター属菌と近縁であるため、VBNC状態で長期間生残できることが、本研究結果から示唆された。以上のことからアルコバクター属菌は環境適応能力の高い細菌であると言える。また、アルコバクター属菌が汚染している食品として、鶏肉や水耕栽培野菜、イカ類、貝類、エビ類などの魚介類が挙げられる。特に水耕栽培野菜や魚介類は生食される頻度が高いため注意が必要であると思われる。

## E. 結論

本研究ではアルコバクター属菌による食中毒の可能性を検討した。結論として、アルコバクター属菌は病原性の弱い日和見菌的な存在ではないかと考えられた。しかし、アルコバクター属菌は他の細菌では死滅してしまうような環境でも、長期間生残できることから、衛生管理

には細心の注意を払う必要性が認められた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

Takahiro Ohnishi, Yukiko Hara-Kudo:  
Presence and quantification of pathogenic  
*Arcobacter* and *Campylobacter* species in  
retail meats available in Japan. Letters in  
Applied Microbiology (in press)

2．学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし