

# 食鳥処理施設から分離した *Campylobacter jejuni* の性状解析

中嶋 智子 星野 桃子\* 浅井 紀夫 杉浦 伸明 山本 京子\*  
足立 由佳里\*\* 岡本 裕行\*\* 柳瀬 杉夫

## Serological and Polymorphic Analysis of *Campylobacter jejuni* Isolates from Two Chicken Processing Plants

Satoko NAKAJIMA Momoko HOSHIMO\* Norio ASAI Nobuaki SUGIURA Kyoko YAMAMOTO\*  
Yukari ADACHI\*\* Hiroyuki OKAMOTO\*\* Sugio YANASE

### Abstract

We conducted a survey on *Campylobacter spp.* contamination at two chicken meat processing plants. *C. jejuni* were detected in 13 of 50 samples at 19 survey points. Seven isolates were obtained from 17 stool samples including cloacal swabs, and 6 isolates were obtained from 9 chicken meat products. These isolates were distinguished by three methods that were Penner heat stable (HS) serotyping, PFGE by digestion with *Sma* I and *Kpn* I, and PCR-RFLP analysis of the flagellin (*flaA*) gene by digestion with *Dde* I. By combining these genetic subtyping methods, 13 isolates clearly divided into distinguish 5 groups, and the results of analysis were revealed that *C. jejuni* contamination diffused through processings in the plant.

キーワード：*Campylobacter jejuni*、食鳥処理施設、パルスフィールドゲル電気泳動、フラゲリン (*flaA*) 遺伝子、制限酵素断片長多型、ペナー血清型別

key words：*Campylobacter jejuni*, Chicken processing plant, Pulsed-field gel electrophoresis, the *flaA* gene, Restriction fragment length polymorphism, Penner' serological typing

## はじめに

カンピロバクターによる食中毒は、2005年から2009年の厚生労働省食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>) によると、病因物質別事例数全体の40%、食中毒患者数の9%を占め、そのうち細菌性食中毒では事例数の60%、患者数の24%で、大規模な食中毒事例も生じるが、多くは散発事例として発生している。また、カンピロバクター感染によりギランバレー症候群を発症するリスクが高まるとされる<sup>1,2)</sup> こともあり、カンピロバクター食中毒予防の公衆衛生学上の意義は高く、必要性も大きい。

「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリについてリスク評価書」(2009年6月食品安全委員会)では、鶏肉の生食が10倍以上感染リスクを高めることが示され、また、鶏肉の感染リスクの低減には、生産農場での管理よりは食鳥処理場での汚染・非汚染鶏群の区分処理と塩素濃度管理の徹底が重要であることが示されている。

*Campylobacter jejuni* の菌株間比較には、Penner型27種類<sup>3)</sup>、Lior型14種類<sup>4)</sup>の血清型別や、パルスフィールド

(平成22年9月1日受理)

\* 京都府中丹西保健所

\*Kyoto Prefectural Chutan Nishi Public Health Center

\*\* 京都府山城北保健所

\*\*Kyoto Prefectural Yamashiro Kita Public Health Center

ドゲル電気泳動 (PFGE, Pulse-field gel electrophoresis) 法<sup>5)</sup>、特定の遺伝子のPCR産物を用いたRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型) 法<sup>6,8)</sup>などの遺伝子解析が行われているが、複数の手法を併用した報告はそれほど多くない。

今回、2009年9月と11月、2010年2月に実施した京都府内2箇所の食鳥処理施設計3回の立ち入り調査で採取したサンプルから*Campylobacter*属菌の分離を試み、分離した*C. jejuni* 13株で、Pennerの血清型別<sup>3)</sup>、PFGE法(制限酵素*Sma* Iと*Kpn* Iを使用)<sup>5)</sup>、*flaA*遺伝子のPCR増幅産物によるRFLP法<sup>7,10)</sup>を用いて比較した。その結果、複数の性状解析法を併用することにより、菌の由来や汚染状況とその広がりについてより詳細な検討を加えることができたので報告する。

## 材料と方法

### 1. 試料採取

*Campylobacter*属菌の分離に供した試料の一覧をTable 1に示した。京都府内2箇所の食鳥処理施設で延べ3回19箇所50検体の試料を採取した。

処理施設内で行った脱毛と体の総排泄口内や皮膚表面、トリガラ、まな板、水槽などのふき取りはシードスワブγ1号(栄研器材)を用い、前処理開始まで冷蔵保存した。

Table 1. Sampling sites and detections of *Campylobacter jejuni* at two chicken meat processing plants.

Facility	Date	Sampling situations			No. of tested samples	No. of <i>C. jejuni</i> detection
		Code	Points	Source		
A	29-Sep-09	Chicken-treatment room				
		1		Cloacal swab, whole chicken carcass removed feathers	10	3
		2		Swab from the chopping-board, in use	1	0
		3		Swab from the chicken carcass skin after the chiller	3	0
		4		Swab from chiller water	3	0
		Meat packing room				
		5		Swab from the chopping-board, in use	1	0
		Chicken meat:breast fillet, leg, breast				
		6	8:00 (1st lot in the day) *	3	0	
		7	9:55 *	3	3	
		8	10:10 *	3	3	
B	25-Nov-09	Chicken treatment room				
		9		Cloacal swab (three whole chicken carcasses removed feathers)	3	1
		10		Swab from the bone(three chicken carcasses)	3	0
		11		Swab from the water washing equipment	1	0
		Meat packing room				
		12		Swab from the chopping-board	1	0
		Display cages				
		13		Stool Nagoya **	1	0
		14		Stool Araucana **	1	1
		15		Stool Plymouth Rock hen **	1	1
Laying house						
16		Stool Broiler chicken	3	1		
A	25-Jan-10	Meat packing room				
		Chicken meat:breast fillet, leg, breast				
		17		8:00 (1st lot in the day) *	3	0
		18		9:55 *	3	0
		19	10:10 *	3	0	

\* : sampling time

\*\* : chicken breeds

A 施設では施設稼働時に試料採取を実施し、稼働開始直後と一度処理が中断される直前、再開直後の3回、ササミ、ムネ、モモの製品をそれぞれ収去した。B 施設では食鳥処理終了後洗浄を終えた状況で試料採取を行った。また、食鳥処理施設とは別棟にある養鶏場の糞便と直売場近くの展示鶏の糞便も併せて採取した。

## 2. 分離と同定

試料は冷蔵保存で実験室に持ち帰り、採取後4～12時間以内に、食肉製品はホモジナイズサンプル10%(w/v)を、ふき取りサンプルは綿棒を、糞便は表面の綿棒ぬぐい取りをそれぞれ、プレストン処方増菌培地(Oxoid)に接種して42℃、24時間微好気培養後カンピロバクター血液無添加寒天選択培地(CCCA、Oxoid)平板に塗抹して42℃、48時間微好気培養し、平板上の疑わしいコロニーを釣菌し、更にCCCA平板で純培養した。

分離した菌は、顕微鏡での形態確認、グラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、馬尿酸加水分解試験、ラテックス凝集(デンカ生研)で、*C. jejuni*と同定した。一部の菌では、Linton et al.の方法<sup>9)</sup>に従いhipo O 遺伝子(735bp)の増幅で同定を行った。

後述の型別には37℃、24～48時間培養したミューラーヒントン寒天培地(Oxoid)上のコロニーを用いた。

## 3. Penner 血清型別

生理食塩水に浮遊させた濃厚菌液で、RHA法によるカンピロバクター血清型別用試薬(デンカ生研)を用いて感作血球抗原を作製し、カンピロバクター免疫抗血清(デンカ生研)と反応させ、その血球凝集像から血清型別を判定した。どの抗血清にも凝集しないものをUT(untypable)とした。

## 4. パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

Ribot et al.の方法<sup>5)</sup>に従い実施した。0.85% NaCl添加0.01M PBSで610nmのO.D.約0.4に調整した菌の浮遊液を作製し、14,000rpm、1分間の洗浄遠心(TOMY MRX-150)を1回実施し、1% SeaKem® Gold Agarose(Lonza)等量と混合してゲルプラグを作製した。ゲルプラグはProteinase K(和光純薬)で2時間処理後、約4mm四方のゲルブロックに分割し、pefabloc SC(Roche)処理を行い、酵素処理開始まで4℃以下で冷蔵保存した。

制限酵素処理は1ゲルブロックあたり30単位で、Sma I(TOYOBO)は25℃、Kpn I(Roch)は37℃で、一晚行った。電気泳動はCHEFF-DRII(BioRad)で6V/cm、スイッチタイム6.8-38.4秒、44.5mM トリス-ホウ酸-1mM EDTAバッファー(0.5x TBE, 和光純薬)、水温13.5℃、泳動時間18.2時間で実施した。得られた泳動像

から、その違いを目視で判定し型別を行った。

5. *flaA* 遺伝子 PCR- 制限酵素断片長多型法 (RFLP)

1μL ループエーゼでコロニー 1μL 分を 500μL 滅菌超純水に浮遊させ、10 分間沸騰水中で煮沸し、4℃で 14,000rpm、10 分間遠心分離 (TOMY MRX-150) 後の上清を DNA テンプレートとし、PCR 実施まで -20℃以下で保存した。PCR は *flaA* 遺伝子を用いた Chuma et al. の方法<sup>7)</sup>を元に、PCR に TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ) を使用した Ishihara et al. の変法<sup>10)</sup>で、Sigma 社で作製したプライマーを用いた。PCR 産物は 1% アガロース I (同仁化学) で、1,728bp の増幅を確認した。RFLP には、20μL あたり 1 単位の制限酵素 *Dde* I (TOYOBO) で 37℃一晩処理をし、電気泳動は Mupid-2Plus (アドバンス) を用い、酵素処理液 10μL を 3% Nusieve GTG アガロース (Lonza) で、0.5x TBE、室温、100V で約 70 分間 (123bp の分子量マーカーがゲルの先端近くに泳動されるまで) 行った。得られた泳動像からバンドの出現パターンの違いを目視で判定し型別を行った。

結果

1. *C. jejuni* の検出

Table 1 に採取試料別の *Campylobacter* 属の分離結果を示した。50 試料から 13 株の *C. jejuni* が分離され、いずれの施設でも施設内の設備のふき取りなどからは *Campylobacter* 属は検出されなかった。2009 年 9 月に調査した A 施設では、総排泄口ふき取り 10 羽中 3 羽から 3 株、収去 2 回目と 3 回目の製品全てから 6 株が分離された。2009 年 11 月の B 施設では 3 羽ずつの総排泄口ふき取り 3 試料中 1 試料から 1 株、養鶏場鶏糞から 1 株、展示鶏のプリマスロックとアローカナの鶏糞から各 1 株、分離さ

れた。2010 年 2 月に A 施設で実施した製品のみの検査からは *Campylobacter* 属は検出されなかった。

2. 分離菌の血清型別と遺伝子型別の結果

分離された 13 株に菌番号 1-13 をつけ、Table 2 に血清型別、2 種の制限酵素切断による PFGE と RFLP の各泳動パターンの目視による型別結果を示し、PFGE と RFLP の泳動像を Fig. 1 に示した。

A 施設の 9 株は、血清型は G が 8 株 (1,2,4-9 以下、カッコ内の数字はことわりの無い限り菌番号を示す)、A が 1 株 (3) であった。*Sma* I 切断の PFGE パターンは血清型と同じく I と II の 2 種類に分かれ、*Kpn* I 切断では製品からの 6 株 (4-9) が同一の i、総排泄口由来 2 株 (1,2) が製品由来株 (4-9) と近似しているものの幾分異なるパターン i' を示し、血清型 A 株 (3) が i、i' と明確に異なる ii の 3 種類に分かれた。RFLP では、血清型 G の 8 株中 1 株 (9) がやや違うパターン a' を示し、a, a', b の 3 種類に分かれた。

B 施設の 4 株は、血清型は G が 1 株 (11)、UT が 3 株 (10,12,13) であった。PFGE と RFLP パターンは、血清型 UT の脱毛と体の総排泄口由来 (10) と養鶏場鶏糞由来 (13) は III、iii、c と同じで、他の 2 株とはそれぞれ異なる結果となり、B 施設の 4 株はいずれの遺伝子サブタイプピング手法でも 3 種類に分別された。

また、A、B 両施設から分離された血清型 G の株の PFGE と RFLP パターンは互いに大きく異なっていた。

考察

1. 食鳥処理施設の *Campylobacter* 属汚染状況

両施設とも設備のふき取りから *Campylobacter* 属検出は無く、良好な衛生状態で管理されていた。また、総排泄口内の

Table 2. Serological and polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* isoletes from two chicken meat processing plants.

Facility	Strain Code	Sampling Code	Source	Penner' serotype	PFGE pattern		RFLP pattern	
					<i>Sma</i> I	<i>Kpn</i> I		
A	1	1	Cloacal swab	G	I	i'	a	
	2	1	Cloacal swab	G	I	i'	a	
	3	1	Cloacal swab	A	II	ii	b	
	4	7	Chicken meat	Breast fillet	G	I	i	a
	5	7	Chicken meat	Leg	G	I	i	a
	6	7	Chicken meat	Breast	G	I	i	a
	7	8	Chicken meat	Breast fillet	G	I	i	a
	8	8	Chicken meat	Leg	G	I	i	a
	9	8	Chicken meat	Breast	G	I	i	a'
B	10	9	Cloacal swab	UT	III	iii	c	
	11	14	Stool	Araucana *	G	IV	iv	d
	12	15	Stool	Plymouth Rock hen *	UT	V	v	e
	13	16	Stool	Broiler chicken *	UT	III	iii	c

Sampling code: as shown in Table. 1.

\* : chicken breeds

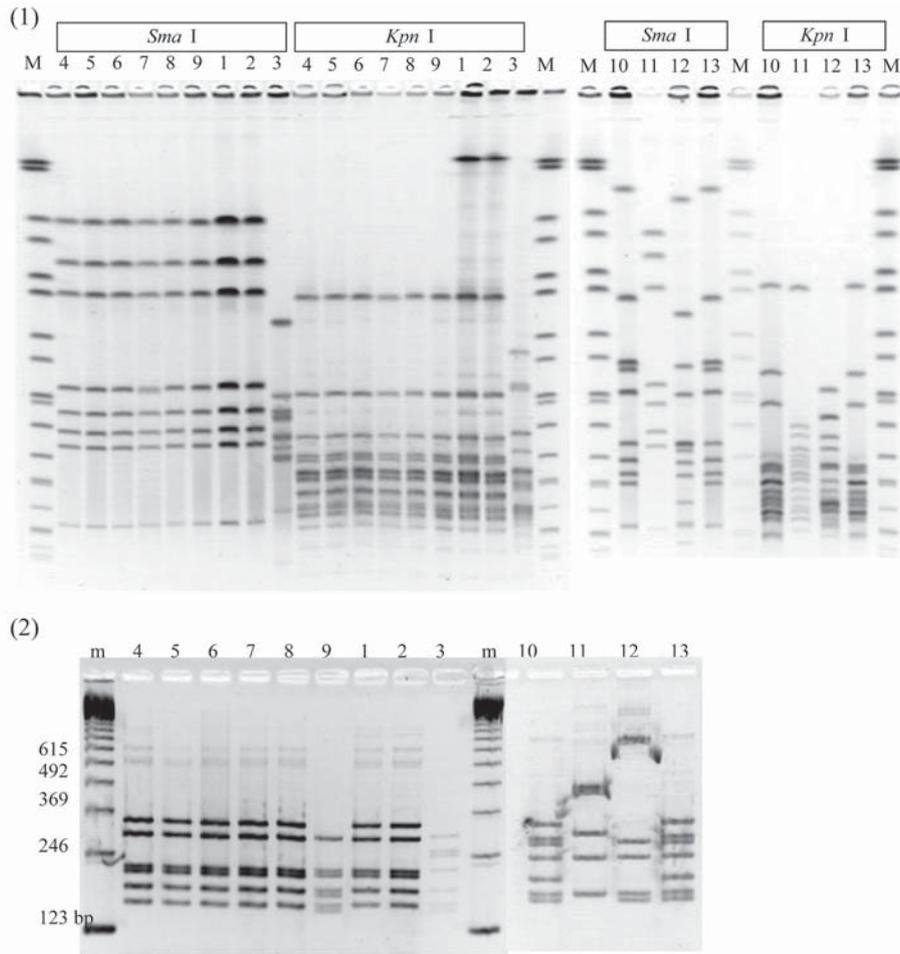


Fig. 1. Subtyping of *Campylobacter jejuni* Isolates from Chicken Meats and Stools. (1) PFGE profiles digested with *Sma* I and *Kpn* I, (2) *flaA* gene-RFLP profiles digested with *Dde* I, Lanes: Strain cord as shown in Table 2., Lane M: a molecular size marker, *Salmonella* Braenderup strain H9812 digested with *Xba* I., Lane m: a molecular size marker, 123 bp DNA Radder (Invitrogen)

ふき取りを含む糞便由来試料からは7株 (37%) 分離され、ニワトリ体内には *C. jejuni* が常在していることが伺えた。

A 施設で分離された *C. jejuni* の血清型 G の 8 株は、一部の株で PFGE や RFLP で 1 バンド程度の違いはみられたものの、分離株は互いに大きな変異がないと考えられ、同一の汚染源由来であったと推定できた。処理されたニワトリ個々が元々汚染していた可能性もあるが、試料採取時間から処理時間の経過とともに製品汚染が出現したことやチラー水洗浄直後のと体ふき取りでは *C. jejuni* が分離されなかったことも考え合わせると、高濃度に汚染された鶏肉が一度製品化工程を通過すると、その後施設内でカンピロバクター汚染が順次拡散していく可能性が高いと考えられた。また、市販の鶏肉のカンピロバクター汚染は 60-70% とされ<sup>11-15)</sup>、検査法により検出率が変わるとい報告も多い<sup>13,14)</sup>。総排泄口内のふき取りを含む糞便由来試料の分離率 (37%) が製品の分離率 (67%) に比べて低かったことを考えると、市販鶏肉にみられる高い汚染率は、食鳥処理場も含めたニワトリのと体や鶏肉の処理・加工工程で汚染が拡散していることが示唆された。

B 施設では、血清型が UT となった 3 株のうち、併設の産卵鶏飼育をしている養鶏場の鶏糞由来株と食鳥処理

施設のと体総排泄口内由来株は PFGE と RFLP の結果から同一と考えられ、一方、展示鶏舎から分離した 2 株はこれらと全く別系統の *C. jejuni* であった。養鶏場、展示鶏舎、食鳥処理施設は、B 施設敷地内の互いに離れた場所に所在し、ヒトや車など互いを行き来する場合は汚染物質を相互に持ち込まないような構造となっていることから、処理する家禽を通じて処理施設に *C. jejuni* が入ってくる場合が多いと予想された。

A、B 両施設の結果を併せると、養鶏場に常在している *C. jejuni* がと体にも残存し、汚染が重篤な個体の存在などで処理工程に汚染が生じると、製品である鶏肉に *C. jejuni* が移行していく様相が確認できたと考える。食鳥処理は処理数が多い上、鶏のサイズが小さいためと体同士の接触が避けられないこと、製品に皮を含むことなどから、カンピロバクター汚染を制御するには多くの問題点があると指摘されている<sup>12,14,16)</sup>。今回の調査では血清型別に加え、PFGE、RFLP を用い遺伝子型別を実施したことで、菌株の同一性あるいは不同一性をより明確に示すことが可能となり、処理工程で汚染が拡散していくというこれら食鳥処理の問題点が再確認できたと考えた。

## 2. *Campylobacter jejuni* の型別分類について

今回分離した *C. jejuni* 13 株の判別では PFGE と RFLP 解析では明確に 5 種類に分別できたのに対し、Penner 血清型は 3 種類で、型別不能の UT 株が存在した。Penner 血清型による *C. jejuni* の分類は UT となることが多いといわれ<sup>8)</sup>、その上、今回、両施設から分離された同じ血清型 G を示した株は PFGE や RFLP などの遺伝子型別でそのパターンが大きく異なり、互いに関連性が薄いと判断できた。これらのことから、Penner 血清型別は *C. jejuni* だけにしか利用できない上、本血清型のみでカンピロバクターの同一性の判断に用いるのは困難と考えられた。

今回、血清型 G、PFGE パターン I, i の A 施設の製品由来株 (49) で、株番号 9 が RFLP のみが 1 バンド欠如の a' を示した。RFLP 型別は PFGE に比べ、制限酵素切断対象が特定遺伝子の PCR 産物であり比較的小さな分子量タンパクであるため、出現バンドも少なく、出現パターンの種類も限られる可能性が高い。そのため、パターン分けには出現バンドの正確な分子量サイズの同定が必要となるが、今回のように PFGE、RFLP 両者を併用すると、*flaA* 遺伝子に変異がみられた場合でも分離株の同一性の有無やその差を確認することが目視だけで検討することが可能で、より容易となることが判明した。

RFLP の判別能は出現バンド数が少ないことなどから PFGE に比べやや劣る可能性はあるが、検査手法が簡易な上、結果判定までの時間も PFGE に比べ 1 日以上短縮できるという利点もあった。また、RFLP では PCR の対象とする遺伝子、あるいはその増幅部位の選定には多くのバリエーションがあり、それによって血清型や PFGE とは全く違う観点でカンピロバクターの型別を実施できる可能性をもつ。A 施設で同時に分離した血清型 G の 8 株にみられた RFLP、PFGE の菌株ごとの微妙な差異はそれを示唆するものと考えられ、由来が同一であっても *C. jejuni* 遺伝子が次第に変異していく過程を捉えることができる可能性もある。今後、*flaA* 遺伝子のみでなく複数の遺伝子での RFLP についても検討し、カンピロバクターの生態についてより詳細な考察をしていきたいと考えている。

## 謝辞

調査にあたり、試料を提供していただいた食鳥処理施設の皆様に深謝します。また、本稿をまとめるにあたり、多くの助言をいただいた中丹家畜保健衛生所、矢野小夜子氏に深謝します。

## 引用文献

- 1) Rees R.H., Soudain S. E., Gregson N.A., Hughes R.A.C. 1995. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre Syndrome. N.Engl.J.Med.,23, 1374-1379.
- 2) 古賀道明, 結城伸泰. *Campylobacter jejuni* 腸炎とギラン・バレー症候群. 2003. 感染症誌, 77, 418-422
- 3) Penner J.L., Hennessy J.N. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. J.Clin.Microbiol.,12, 732-737.
- 4) Lior H., Woodward D.L., Edgar J.A. Laroche L.J., Gill P.A. 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J.Clin.Microbiol.,15, 761-768.
- 5) Ribot E.M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., Barrett T.J. 2001. Rapid Pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J.Clin.Microbiol., 39, 1889-1894.
- 6) Wassenaar T.M., Newell D.G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl.Environ.Microbiol.,66, 1-9.
- 7) Chuma T., Makino K., Okamoto K., Yugi H. 1997. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of *Flagellin* gene. J.Vet.Med.Sci.,59, 1011-1015.
- 8) 三澤尚明. 2005. カンピロバクター感染症. モダンメディア, 51, 45-52.
- 9) Linton D., Lawson A.J., Owen R.J., Stanley J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrhetic samples. J. Clin.Microbiol.,35, 2568-2572.
- 10) Ishihara K., Yamamoto T., S. Satake S., Takayama S., Kubota S., Negishi H., Kojima A., Asai T. 2006. Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J. Appl. Microbiol.,100,153-160.
- 11) Workman S.N., Mathison G.E., Lavoie M.C. 2005. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. J.Clin.Microbiol.,43, 2642-2650.
- 12) 品川邦汎, 2006. 食鳥肉のカンピロバクター汚染とその防止. 食品衛生研究, 56 (8), 25-31.
- 13) 古川一郎, 伊達佳美, 相川勝弘, 浅井良夫, 尾上洋一, 2007. 市販鶏肉におけるカンピロバクター・ジェジュニの汚染状況および分離菌株の解析. 神奈川県衛生研究所研究報告, 37,24-27.
- 14) 小岩井健司, 三瓶憲一, 矢崎広久, 1987. 食鳥処理場における細菌汚染実態調査. 千葉衛研報告, 11,61-69.
- 15) 坂本裕敬, 井原光紀, 藤本美香, 久保盛恵, 佐々木敏之, 北原明生, 舟越敦司, 古田喜美, 下村佳, 国井悦子, 2006. 鶏肉におけるカンピロバクター及びサルモネラの感染状況, 広島県獣医師会雑誌, 21,61-63.
- 16) 平松礼司, 青木日出美, 下岸協, 遠山明人, 皆川洋子, 2010. 食品からのカンピロバクター検出. 愛知県衛生研究所報告, 60,9-14.