

流通鶏肉からのカンピロバクター属菌の分離と *flaA* 遺伝子の制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) を用いた型別について

中嶋 智子 小仲 兼次 武田 直樹 辻 昭博 藤本 直樹

Surveys and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) - Polymerase Chain Reaction-*flaA* Analysis of *Campylobacter* Isolates from Retail Chicken Meats

Satoko NAKAJIMA Kenji KONAKA Naoki TAKEDA Akihiro TSUJI Naoki FUJIMOTO

京都府食品衛生監視指導計画により2019年6月から12月の期間に当所で実施した京都府内流通の鶏肉29検体のうち22検体から *Campylobacter jejuni* が分離され、市場の鶏肉がカンピロバクター属菌に広く汚染されている実態が確認できた。これら菌株と2018、2019年度に依頼があった食中毒3事例6菌株計28株の *flaA* 遺伝子のPCR増幅産物で *DdeI*、*MboI*、*HindIII*、*RspRSII* (*MseI*) の4種類の制限酵素を用いて制限酵素断片長多型法 (RFLP法) を行い、13の遺伝子型に分けることができた。その結果、カンピロバクター属菌の性状確認には、*DdeI* に加え、*MboI*、あるいは *RspRSII* (*MseI*) を併用がコスト面からも妥当と考えられた。また、RFLP法による型別は、鶏肉のカンピロバクター汚染が起きた場所の推定に有効なツールとなると考えられた。

キーワード：鶏肉、カンピロバクター ジェジュニ、PCR-RFLP法、*flaA* 遺伝子

Keywords：Chicken meat, *Campylobacter jejuni*, PCR-RFLP analysis, *flaA*-gene

はじめに

我が国のカンピロバクターによる食中毒は、e-Stat (<https://www.e-stat.go.jp/>、2020.7.1アクセス) で公開されている食中毒統計調査第2表を集計すると、最近5年間(2015年から2019年)の食中毒事例5746件、患者数89734人中、病因物質別で事例数全体の28%、食中毒患者数の13%を占め、細菌性食中毒では事例数の72%、患者数の37%となり、その多くは散发事例として頻度高く発生している。京都府内でも2014年から2019年の6年間で合計28件(患者208人)の食中毒事例が起こっている。また、カンピロバクター感染症はギランバレー症候群の先行感染症の一つであるとされており^{1,2)}、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。「食品健康影響評価のためのリスクプロファイル」(2018年5月食品安全委員会)「微生物・ウイルス評価書 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、カンピロバクター属菌による食中毒発生事例の80%は鶏肉の生食に起因して発生し、鶏肉の生食で感染リスクを10倍以上高めると示されている。また、春日ら³⁾は、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の徹底が重要であると示している。

カンピロバクター・ジェジュニの性状比較には、Penner型27種類⁴⁾、Lior型14種類⁵⁾の血清型別や薬剤感受性試験、遺伝子解析では多座位配列タイピング (MLST, Multi locus sequence typing) 法⁶⁾、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE, Pulse-field

gel electrophoresis) 法⁷⁾、特定の遺伝子のPCR産物を用いた制限酵素断片長多型 (RFLP, Restriction fragment length polymorphism) 法⁸⁻¹⁰⁾などが用いられている。その中で、我々は *DdeI* を用いた *flaA* 遺伝子のPCR-RFLP法がPFGE法に比較して、簡易かつ短時間で同等の分解能で性状比較を行える良法であることを示した¹¹⁾。

今回、令和元年度京都府食品衛生監視指導計画に基づく取組検査のうち、2019年6月から12月の期間に当所で実施した鶏肉29検体のカンピロバクター属菌検査の結果から、その汚染状況をまとめた。加えて、2018年度と2019年度に依頼があった食中毒3事例の有症者から分離したカンピロバクター属菌も合わせ、分離株の *Campylobacter jejuni* の *flaA* 遺伝子のPCR増幅産物によるRFLP法^{9,10)}を用い、複数の制限酵素を用いてその型別を行い、若干の考察を行ったので報告する。

方法

1. カンピロバクター属菌の分離

1-1. 鶏肉からの分離

国立医薬品食品衛生研究所が設置した「食品からの微生物標準試験法検討委員会」が定めたカンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法(ステージ4:最終案)NIHSJ-02-ST4:2012 (http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-02-ST4_rev01.pdf、2020.7.1アクセス確認)に準拠して実施した。

細切した鶏肉25gに100mLのプレストン培地(プチットーカンピロ/225、(株)日研生物医学研究所)を加えストマッカーでホモジナイズ後、42°Cで微好気培養を行い、24時間後と48時間後にBD™ mCCDAクリアーHT 寒天培地(日本BD、252794)と自家製のmCCDA培地各2枚に5μLエーゼで画線

(令和3年1月26日受理)

塗抹を行った。平板は42℃で微好気培養し、48時間まで観察して、カンピロバクター属菌様コロニーを単離し、ミューラーヒントン培地（日水製薬(株)0553）で純培養後、グラム染色とCampylobacter (*cdt* gene) PCR Detection and Typing Kit（タカラRR134A）を用いたPCRでカンピロバクター属菌の種同定を行った。

1-2. ヒト糞便からの分離

鶏肉からの分離に用いた2種類の平板に糞便を綿棒で直接塗抹し、疑わしいコロニーを分離した。併せて、プレストン培地（プテット-カンピロ/10、(株)日研生物医学研究所）で約10%糞便液を調製し、以降、増菌液の平板への塗抹に菌液を十分に含ませた綿棒で行う操作以外は、鶏肉と同様の操作でカンピロバクター属の同定・確認を行った。

2. *fla A* 遺伝子のPCR-RFLP法

37℃、2日間ミューラーヒントン培地で微好気培養したカンピロバクター属菌のコロニーを1μLループエーゼで約1μL分500μL滅菌超純水に浮遊させ、ヒートブロック100℃、10分間加熱後、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。

fla A 遺伝子の増幅はChuma et al.⁹⁾Ishihara et al.¹⁰⁾に準拠し、Sigma-Aldrich社で作製したプライマーとTaKaRa Ex

Taq® Hot Start Version（タカラRR006A）で行った。PCR産物は2% NuSieve™ GTG™ アガロース（ロンザ(株)）を用いて電気泳動を行い、1728bpの増幅を確認した。

RFLPには4種類の制限酵素を用いた。*Dde*I（東洋紡DDE-101）と、先行例¹²⁾がある*Mbo*I（タカラ1069A）に加え、*fla A* 遺伝子の塩基配列¹³⁾から制限酵素認識配列検索ツールTaKaRa Cut-Site Navigator（http://www.takara-bio.co.jp/enzyme/enzyme_search.php、2020.7.1アクセス確認）を用いて、標的DNA 鋳型に切断部位を多く持つと予測された制限酵素*Hind*III（タカラ1060A）と*Rsp*RSII（*Mse*I）（タカラ1247A）を使用した。増幅産物10μLあたり1単位濃度で所定の条件で一晩酵素処理を行った。酵素処理液1~5μLを3% NuSieve™ GTG™ アガロース（ロンザ(株)）で、pH8.3、0.5xTBE（バイオラッド、#1610741）バッファー、分子量マーカーの100bpがゲルの先端近くに泳動されるまで、Mupid-2 Plus（アドバンス）を用い、室温、100Vで電気泳動を行った。得られた泳動像のバンド出現パターンから遺伝子型別を検討した。

なお、出現パターン比較には目視に加え、すべてのサンプルが一度に泳動できず、泳動ごとに分離特性が微妙に変化することから、分子量マーカーの100bpの位置を0とした分子量マーカーの各泳動距離から各出現バンドの分子量を求め、比較した。

表1. 京都府内業者からの収去鶏肉一覧とカンピロバクター属菌分離の結果

検体番号	検査開始日 (収去日)	鶏肉部位	収去重量(g)	収去保健所	収去場所	業務形態	飼養地 (都道府県別)	カンピロバクター属菌 検出結果(/25g)
1	2019/6/17	ムネ	166	A	a	販売	府内	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
2	2019/6/17	モモ	147	A	a	販売	府内	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
3	2019/6/17	ササミ	75	A	a	販売	府内	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
4	2019/6/17	ササミ(タタキ)	208	A	a	販売	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
5	2019/6/17	ササミ	74	B	b	飲食店	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
6	2019/6/17	ムネ	193	B	c	販売	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
7	2019/6/17	ササミ	90	B	c	販売	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
8	2019/6/17	ムネ	209	B	c	販売	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
9	2019/6/17	ササミ	215	B	c	販売	府外a	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
10	2019/7/22	ムネ	254	C	d	製造・販売	府内	陰性
11	2019/7/22	内臓	245	C	d	製造・販売	府内	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
12	2019/9/2	モモ	218	D	e	飲食店	—	陰性
13	2019/9/2	モモ	184	D	f	飲食店	—	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
14	2019/9/2	モモ	296	D	g	飲食店	—	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
15	2019/9/2	ササミ	220	D	h	製造・販売	府内	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
16	2019/9/2	モモ	208	D	i	飲食店	—	陰性
17	2019/9/2	モモ	215	D	j	飲食店	—	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
18	2019/9/2	ムネ	287	D	k	製造・販売	—	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
19	2019/10/1	モモ	51	B	c	販売	府外a	陰性
20	2019/10/1	モモ	62	B	c	販売	府外a	陰性
21	2019/11/25	—	124	C	d	製造・販売	府内	陰性
22	2019/11/25	—	214	C	d	製造・販売	府内	陰性
23	2019/11/25	モモ	212	C	l	販売	府外b	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
24	2019/11/25	モモ	404	C	m	販売	—(国産)	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
25	2019/11/25	ムネ	300	C	m	販売	—(国産)	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
26	2020/1/20	モモ	272	A	n	販売	府外c	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
27	2020/1/20	ムネ	361	A	n	販売	府外b	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
28	2020/1/20	ササミ	159	A	n	販売	府外d	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
29	2020/1/20	モモ	284	A	n	販売	府外c	陽性 (<i>C.jejuni</i>)

—, 不明

表2. カンピロバクター属菌による食中毒事例での京都府内有症者一覧と分離結果

事例	検体番号	検査開始日 (採取日)	検査対象	管轄保健所	事例発生地	カンピロバクター属菌 検出結果
1	30	2018/11/29	糞便	A	大阪市	陰性
	31	2018/11/29	糞便	A		陽性 (<i>C.jejuni</i>)
	32	2018/11/29	糞便	A		陽性 (<i>C.jejuni</i>)
2	33	2019/10/4	糞便	A	京都市	陽性 (<i>C.jejuni</i>)
	34	2019/10/5	糞便	A		陽性 (<i>C.jejuni</i>)
3	35	2019/12/10	糞便	A	大阪市	陰性
	36	2019/12/10	糞便	A		陽性 (<i>C.jejuni</i>)
	37	2019/12/10	糞便	A		陽性 (<i>C.jejuni</i>)
	38	2019/12/10	糞便	A		陰性

結果

1. 流通鶏肉からのカンピロバクター属菌の分離

2019年6月から2020年1月の期間に6回実施した取去検査の概要と鶏肉からのカンピロバクター属菌分離結果を表1に示す。取去対象は店舗での冷蔵検体とし、4℃以下で実験室まで運搬し、取去当日に検査に供した。4保健所管内から鶏肉29検体を取去し、そのうち22検体76%からカンピロバクター属菌が分離され、すべて、*C. jejuni*であった。

内訳として6軒の飲食店から取去した6検体中4検体(67%)で、8軒の販売店の市販鶏肉23検体中18検体(78%)でカンピロバクター属菌陽性であった。販売店ごとの陽性率は、検体数が異なるものの販売店cの67%、販売店dの25%を除き、すべて100%であった。

鶏肉の部位別には、内臓1検体中1検体、ササミ7検体中7検体、ムネ肉7検体中6検体、モモ肉12検体中8検体でカンピロバクター属菌陽性であった。

2. 食中毒事例有症者からのカンピロバクター属菌の分離

2018年度、2019年度のカンピロバクター属に起因する食中毒事例で、当所で検査を実施した京都府内在住有症者の概要とカンピロバクター属菌分離結果を表2に示す。3事例9名の有症者便中6名からカンピロバクター属菌が分離され、すべて、*C. jejuni*であった。なお、本患者便では同時にノロウイルス、腸管出血性大腸菌、病原性大腸菌、サルモネラ属菌、ビブリオ属菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、ウェルシュ菌の検査を実施し、これらが病因という結果は得られていない。

3. 分離菌株のPCR-RFLPによる性状解析

分離株の各酵素による切断パターンの一例を図1に示す。

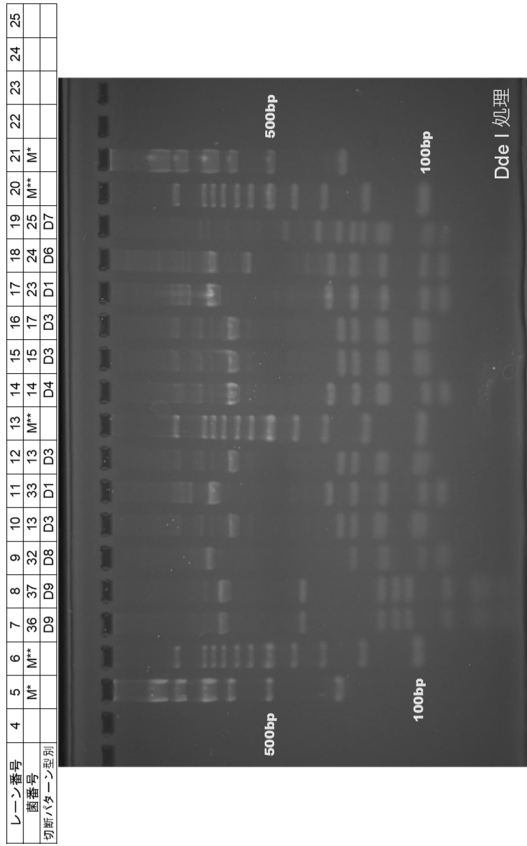
分離株28株は、*Dde*Iで9型、*Mbo*Iで6型、*Hind*IIIで3型に判別した。*RspRS*II (*Mse*I)では、多くの切断部位があることが判明したため、目視での読み取りやすさを考慮し、1728bspをおおまかに切断できると想定できる300-400bsp間の切断部位から4型に判別した。各酵素の組み合わせにより得られた遺伝子型別結果を表3に示す。2組の制限酵素の組

表3. 流通鶏肉と食中毒事例ヒト糞便から分離された*C. jejuni*株の4種類の制限酵素による*flaA*遺伝子のRFLP法型別結果

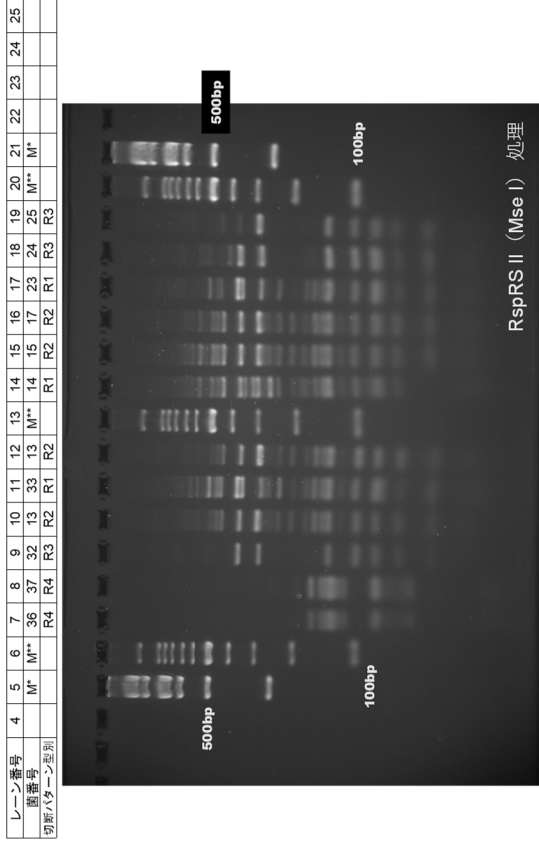
由来	取去場所 事例	検体 番号	制限酵素による切断パターン型別				2種類の制限酵素による遺伝子型別*					3種類の制限酵素による遺伝子型別*			4種類の* 制限酵素による 遺伝子型別		
			<i>Dde</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Hind</i> III	<i>RspRS</i> II (<i>Mse</i> I)	D+M	D+H	D+R	M+H	M+R	H+R	D+M+H	D+H+R		M+H+R	
鶏肉	a	1	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1	
		2	D1	M1	H1	R2	DM1	DH1	DR2	MH1	MR2	HR2	DHM1	DHR2	MHR2	DMHR2	
		3	D1	M1	H1	R2	DM1	DH1	DR2	MH1	MR2	HR2	DHM1	DHR2	MHR2	DMHR2	
		4	D1	M1	H1	R2	DM1	DH1	DR2	MH1	MR2	HR2	DHM1	DHR2	MHR2	DMHR2	
	b	5	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1	
		6	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1	
	c	7	D2	M2	H1	R1	DM2	DH2	DR3	MH2	MR3	HR1	DHM2	DHR3	MHR3	DMHR3	
		8	D1	M1	H1	R2	DM1	DH1	DR2	MH1	MR2	HR2	DHM1	DHR2	MHR2	DMHR2	
		9	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1	
	d	11	D1	M1	H1	R3	DM1	DH1	DR4	MH1	MR4	HR3	DHM1	DHR4	MHR4	DMHR4	
	f	13	D3	M1	H2	R2	DM3	DH3	DR5	MH3	MR4	HR4	DHM3	DHR5	MHR5	DMHR5	
	g	14	D4	M1	H2	R1	DM4	DH4	DR6	MH3	MR1	HR5	DHM4	DHR6	MHR6	DMHR6	
	h	15	D3	M1	H2	R2	DM3	DH3	DR5	MH3	MR2	HR4	DHM3	DHR5	MHR5	DMHR5	
	j	17	D3	M1	H2	R2	DM3	DH3	DR5	MH3	MR2	HR4	DHM3	DHR5	MHR5	DMHR5	
	k	18	D5	M3	H1	R3	DM5	DH5	DR7	MH4	MR5	HR3	DHM5	DHR7	MHR7	DMHR7	
	l	23	D1	M2	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH2	MR3	HR1	DHM2	DHR1	MHR3	DMHR8	
	m	24	D6	M4	H1	R2	DM6	DH6	DR8	MH5	MR6	HR2	DHM6	DHR8	MHR8	DMHR9	
		25	D7	M5	H3	R2	DM7	DH7	DR9	MH6	MR7	HR6	DHM7	DHR9	MHR9	DMHR10	
	n	26	D8	M1	H1	R3	DM8	DH8	DR10	MH1	MR4	HR3	DHM8	DHR10	MHR4	DMHR11	
		27	D8	M1	H1	R3	DM8	DH8	DR10	MH1	MR4	HR3	DHM8	DHR10	MHR4	DMHR11	
		28	D8	M1	H1	R3	DM8	DH8	DR10	MH1	MR4	HR3	DHM8	DHR10	MHR4	DMHR11	
		28	D8	M1	H1	R3	DM8	DH8	DR10	MH1	MR4	HR3	DHM8	DHR10	MHR4	DMHR11	
		29	D8	M1	H1	R3	DM8	DH8	DR10	MH1	MR4	HR3	DHM8	DHR10	MHR4	DMHR11	
	ヒト 糞便	事例1	31	D8	M3	H1	R3	DM9	DH8	DR10	MH4	MR5	HR3	DHM9	DHR10	MHR7	DMHR12
			32	D8	M3	H1	R3	DM9	DH8	DR10	MH4	MR5	HR3	DHM9	DHR10	MHR7	DMHR12
		事例2	33	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1
			34	D1	M1	H1	R1	DM1	DH1	DR1	MH1	MR1	HR1	DHM1	DHR1	MHR1	DMHR1
		事例3	36	D9	M6	H3	R4	DM10	DH9	DR11	MH7	MR8	HR7	DHM10	DHR12	MHR10	DMHR13
			37	D9	M6	H3	R4	DM10	DH9	DR11	MH7	MR8	HR7	DHM10	DHR12	MHR10	DMHR13
型別数		9	6	3	4	10	9	11	7	8	7	10	12	10	13		

* D, *Dde* I; M, *Mbo* I; H, *Hind* III; R, *RspRS* II

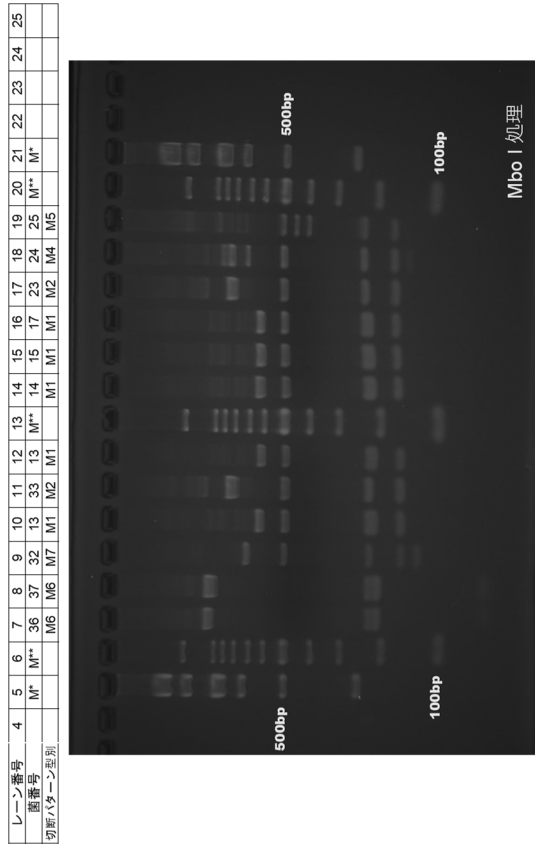
(1)



(2)



(3)



(4)

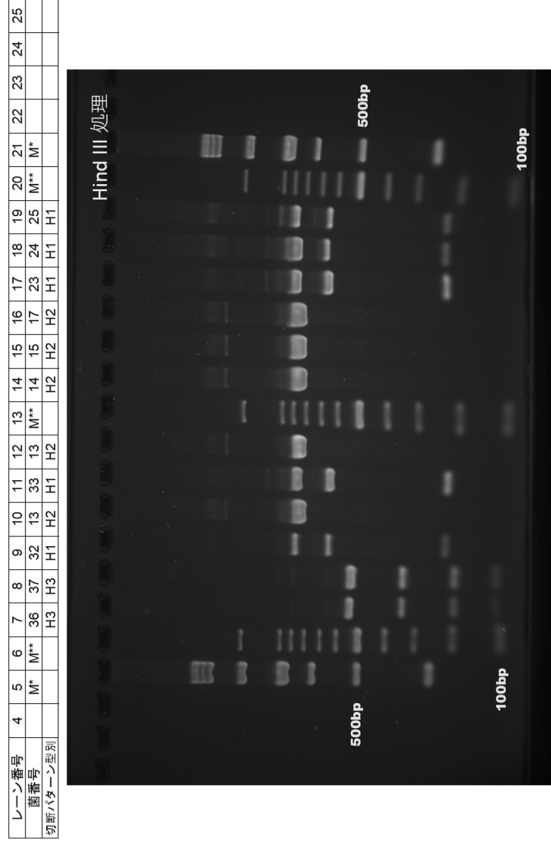


図1. 京都府で分離された *Campylobacter jejuni* の *flaA* 遺伝子増幅産物の制限酵素による切断パターン例。(1) *Dde* I 処理 (2) *RspRS* II (*Mse* I) 処理 (3) *Mbo* I 処理 (4) *Hind* III 処理。M*, 250bp 分子量マーカー；M**, 100bp 分子量マーカー。レーン番号10のみ5μLアプライ、他は3μLアプライ。

み合わせでは *DdeI* と *RspRSII (MseI)* の組み合わせが最も多く11型に、3組の制限酵素の組み合わせでは *DdeI*、*HindIII* と *RspRSII (MseI)* の組み合わせが12型と多かった。4種類すべての制限酵素型別では、28株は13の遺伝子型に分けることができた。

考察

1. 流通鶏肉のカンピロバクター属菌汚染

国内の鶏肉のカンピロバクター属菌の汚染実態調査は多くの報告があり¹⁴⁻²¹⁾、その汚染率は調査条件等により6~77%とさまざまである。「食品健康影響評価のためのリスクプロファイル」では、小売店で採材された国産鶏肉の汚染率は最低値32%、最高値96%、中央値75%（平均値65.8%）と報告されている。今回実施した京都府内の流通鶏肉ではカンピロバクター属菌が76%と国産鶏肉の汚染率の中央値に近く、改めて本属菌の鶏肉での高い汚染率が確認できた。

鶏肉の部位別にみると、ムネ肉やササミがモモ肉に比べ、汚染率がやや高い傾向にあり、他の報告^{19,20)}とは異なる傾向がみられた。一方、輸入鶏肉では、モモ肉の汚染率が他の部位に比べ非常に高いとの報告¹⁸⁾があることから、食肉の保存期間や部位ごとの栄養成分等の違いによりカンピロバクター属菌の残存率が異なることも予想され、取去直後に菌分離を開始した我々の調査では、ムネ肉やササミの本属菌の分離率が向上した可能性も考えられた。また、今回「タタキ」として市販されていた製品からもカンピロバクター属菌が検出され、カンピロバクター食中毒防止に向け、生食への注意喚起だけでなく、調理法等についても啓発していくことの重要性が再認された。

カンピロバクター属菌汚染率を取去時期別に4半期ごとに見ると、順に100%、67%、43%、0%と高温期に汚染率が高いことが明確となり、カンピロバクター食中毒事例の多発時期と一致する傾向をみせた。

2. 複数の制限酵素を用いたカンピロバクター属菌の性状比較

今回、*DdeI*によるRFLPで9型と最も多い遺伝子型に分けることができた。以前我々は食鳥処理施設から分離した13株の *C. jejuni* を6型に判別している¹¹⁾が、その際に示した菌株eのみが今回のD3型と一致していたことから、*DdeI*によるRFLPで合計31株から14の遺伝子型が得られたことになる。Yadav et al.²²⁾は、*DdeI*によるPCR-RFLP法で43株の *C. jejuni* から15型に、Yano et al.²³⁾は4か所の養鶏場のニワトリ糞から分離した206株を15型に判別したと報告している。我々の結果もほぼ同じ分解能が得られ、*C. jejuni* の *flaA* 遺伝子のRFLPでは *DdeI* は有用な制限酵素と考えられた。また、Tsai et al.¹²⁾は702bpの *flaA* 遺伝子の増幅産物を用いた *MboI* によるRFLPで220株の *C. jejuni* を7型の遺伝子型に分けている。今回、28株から6型が得られことから、1728bpの *flaA* 遺伝子の増幅産物^{9,10)}を用いた我々の手法は、同等以上の分解能を持つ可能性がみられた。*HindIII*による型別は3と最も少

なく、今回の菌株では単独での使用は有用でない上、複数の制限酵素の組み合わせによる分解能向上もみられなかった。*RspRSII (MseI)* では前述したように限局した分子量範囲での結果から型別を行ったところ、単独での型別数は4と少なかったが、他の制限酵素との組み合わせ型別で分解能向上への寄与がみられた。これらの結果から、複数の制限酵素を組み合わせることで遺伝子型別の分解能が向上することが明らかとなり、*DdeI*単独の型別では9型であったのに対し、4種類の制限酵素を用いることで13の遺伝子型に分類することが可能となった。PCR-RFLP法は血清型別やPFGE法に比べ、簡易かつ短時間でカンピロバクター属菌の型別を行える良法であるが、使用する制限酵素数が増えると操作が増え、簡易法とはなりがたい可能性がある。今回の結果からは、*DdeI*に加え、*MboI*、あるいは *RspRSII (MseI)* を併用して、2種類の酵素で型別検討を実施するのがコスト面からも妥当であろうと考えられた。

3. RFLP法による性状比較を用いたカンピロバクター属菌汚染の実態解明

同一販売店から複数の鶏肉を取去したa、c、m、nの4店舗の遺伝子型をみると、n店は4検体すべて一致のDMHR11であった。カンピロバクター属菌は、元来、鳥類の腸管内の常在細菌であるため、鳥類の個体あるいは個体群、生産農場ごとに遺伝的に多様なカンピロバクター属菌を保持している²³⁾。そのため、これら鶏肉の生産地がすべて異なる今回の事例は、店内での二次汚染が強く疑われた。まな板やバット・秤などの調理器具類のカンピロバクター属菌汚染率は10%以上という報告¹⁴⁾もあり、本結果は、二次汚染防止の処置を講じる衛生管理の必要性を強く示した。a店は4検体中3検体が同一(DMHR2)、残り1検体も *RspRSII (MseI)* による切断パターンが若干異なるのみのよく似た遺伝子型(DMHR1)を持っていた。c店は4検体中2検体が同一(DMHR1)、1検体はDMHR1と似たDMHR2、そしてDMHR3の3つの遺伝子型で、m店の2検体は異なる遺伝子型であった。販売店は異なるが、同時期の取去でDMHR1もしくはDMHR2が多くみられたことから、この時期に出荷された汚染鶏群、もしくは同一の食鳥処理での交差汚染の存在の可能性も考えられた。また、DMHR1は同年秋の食中毒患者便からも検出されていることから、ヒトへの病原性を持つ遺伝子型であり、本遺伝子型の *C. jejuni* により、広く府内流通鶏の汚染があった可能性も考えられた。また、飲食店も含め、季節ごとによく似た遺伝子型をもつカンピロバクター属菌が出現する傾向がみられたことから、本手法は、カンピロバクター属菌汚染が起きた場所や処理工程等の特定が可能となることを示唆した。したがって、本手法を利用し、フードチェーンの各段階(生産、食鳥処理、流通、調理、提供)の継続的なモニタリングを行えば、本属菌汚染の実態やリスクポイントがより明確にできると考えられた。

また、食中毒事例では、事例数・分離株とも数は少ないが、同一事例の患者株は4種類の制限酵素すべてでRFLPによる型が同じで、同一の汚染源によるものと考えられた。カンピ

ロバクター食中毒事例では、食材の食肉からの遺伝子型は多様な場合もあるが、患者からは同じ遺伝子型の菌が検出される傾向にある²⁴⁾ことが改めて確認された。今回の事例では起因食品の検査を伴わなかったもののPCR-RFLP法はカンピロバクター食中毒事例での原因探索の有効なツールとして機能した。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、検体の取去や運搬等にご協力いただいた京都府の食品衛生担当の皆様にお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 伊藤武. 1999. カンピロバクター感染症とギラン・バレー症候群. IASR, 20, 5.
- 2) 古賀道明, 結城伸泰. 2003. *Campylobacter jejuni* 腸炎とギラン・バレー症候群. 感染症学雑誌, 77(6), 418-422.
- 3) 春日文子, 花岡頼子, 長谷川専, 松下知己, 山本昭夫, 岩堀淳一郎, 筒井俊之, 早山陽子, 山本健久, 澤田美樹子, 本山恵子. 2010. 鶏肉によるカンピロバクター感染のリスク評価. IASR, 31, 5-7.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Maiden M.C., Bygraves J.A., Feril E.J., Morelli G., Russeli J.E., Urawin R., Zhang Q., Zhou J., Zurith K., Caugant D.A., Feavers M., Achtman M., Spratt B. G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3140-3145.
- 7) 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.
- 8) Nishimura M, Nukina M, Yuan J M. 1996. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. FEMS Microbiology Letters, 142, 133-138.
- 9) Chuma T., Makino K., Okamoto K., Yugi H. 1997. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in roilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. J. Vet. Med. Sci., 59, 1011-1015.
- 10) Ishihara K., Yamamoto T., Satake S., Takayama S., Kubota S., Negishi H., Kojima A., Asai T., Sawada T., Takahashi T., Tamura Y. 2006. Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J. Appl. Microbiol., 100, 153-160.
- 11) 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. 2010. 食鳥処理施設から分離した *Campylobacter jejuni* の性状解析. 京都府保健環境研究所年報, 55, 25-29.
- 12) Tsai HJ., Huang HC., Tsai HL, Chang CC. 2006. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens and dogs in northern Taiwan. J. Vet. Med. Sci., 68, 815-819.
- 13) Nuijten PJ., van Asten FJ., Gaastra W., van der Zeijst BA. 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. J Biol. Chem., 15, 17798-17804.
- 14) 伊藤武, 高橋正樹, 斎藤香彦, 柳川義勢, 甲斐明美, 大橋誠. 1988. 市販食肉及び食肉店舗や食鳥処理場の環境における *Campylobacter* の汚染状況ならびに分離菌株の血清型別に関する研究. 感染症誌, 62, 17-24.
- 15) 賀澤優, 菅野奈美, 寺島祐司, 金成篤子. 2018. 食肉の食中毒菌汚染状況 (第2報). 福島県衛生研究所年報, 36, 31-35.
- 16) 吉原純子, 野本さとみ, 篠田亮子, 佐々木彩華, 石橋恵美子, 横井一, 山本一. 2019. 食鳥肉におけるカンピロバクターとサルモネラの検出状況と分離菌株の薬剤感受性. 千葉市環境保健研究所年報, 26, 70-75.
- 17) 佐藤拓弥, 藤岡美幸. 2018. 青森県内における市販食肉の *Campylobacter* 汚染状況および分離菌株の薬剤感受性. 日本食品微生物学会誌, 35, 36-40.
- 18) 小野一. 2014. 市販鶏肉のカンピロバクター及びサルモネラ汚染状況と分離株の薬剤感受性. 日獣会誌, 67, 442-444.
- 19) 嶋智子, 磯部順子, 嶋一世, 金谷潤一, 木全恵子, 綿引正則, 佐多徹太郎, 出村尚子. 2011. 富山県における市販鶏肉のカンピロバクターおよびサルモネラ属菌汚染実態調査 (2011年). 富山県衛生研究所年報, 35, 121-123.
- 20) 清水美和子, 嶋智子, 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 佐多徹太郎, 綿引正則, 出村尚子. 2012. 富山県における市販鶏肉のカンピロバクター, サルモネラ属菌および基質特異性 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産性大腸菌汚染実態調査 (2012年). 富山県衛生研究所年報, 36, 120-110.
- 21) 清水美和子, 増田千恵子, 磯部順子, 金谷潤一, 木全恵子, 佐多徹太郎, 綿引正. 2013. 富山県における市販鶏肉

- のカンピロバクターおよびサルモネラ属菌汚染実態調査(2013年). 富山県衛生研究所年報, 37, 108-110.
- 22) Yadav R., Yadav J., Maherchandani S., Kashyap SK. 2018. Typing of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry on the basis of *flaA*-RFLP by various restriction enzymes. *Veterinary and Animal Science*, 6, 1-5.
- 23) Yano S., Kira T., Morishita Y., Ishihara K., Asai T., Iwata T., Akiba M., Murase T. 2013. Colonization of chicken flocks by *Campylobacter jejuni* in multiple farms in Japan. *Poultry Sci.*, 92, 375-381.
- 24) 中嶋智子, 浅井紀夫, 柳瀬杉夫, 飯田貴久, 足立有佳里, 大石剛史, 三谷亜里子, 岡本裕行, 谷尾桂子, 和田行雄, 三影博司. 2010. *Campylobacter jejuni* による食中毒事例と「生食」用合鴨肉の疫学的考察—京都府. *IASR*, 51, 11-13.