

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00941

研究課題名(和文)カンピロバクター食中毒の発生に寄与する二次汚染要因の探索

研究課題名(英文) Search for the cross contamination factor to contribute to foodborne campylobacteriosis

研究代表者

中村 寛海 (Nakamura, Hiromi)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹研究員

研究者番号：00332445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：実際にカンピロバクター食中毒の原因施設となった飲食店の調理環境からふきとり材料を採取し、カンピロバクター遺伝子の検出を試みた。その結果、複数の施設において調理台、冷蔵庫とっ手、まな板から本菌遺伝子が検出されたことから、これらは調理環境中でカンピロバクターに汚染される機会が多い場所と推察された。冷蔵庫とっ手には130 cfu相当のC. jejuni生菌の存在が示された。培養法では本検体からカンピロバクターが検出されなかったことから、生きているが培養不能な(VBNC)状態で存在した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンピロバクター食中毒の原因として、飲食店の調理環境中における二次汚染は重要であり、その対策は食中毒発生予防に繋がる。本研究は、環境材料から分離・同定しにくいカンピロバクターについて、実際に食中毒の原因施設となった飲食店のふきとり材料から本菌遺伝子の検出を行い、汚染を受けやすい箇所を特定した。さらに、検出された遺伝子が生菌由来であることを明らかにし、環境中でVBNC状態で存在することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Swab samples from the cooking environment in the retail restaurant where foodborne campylobacteriosis occurred were collected and tested for Campylobacter gene. As a result, the bacterial gene was detected in the kitchen counter, handle of the refrigerator, and cutting board samples from the plural facilities, implying that these parts of facility are easily contaminated by Campylobacter. Although 130 cfu equivalent viable C. jejuni germ was detected from a handle of the refrigerator sample, live Campylobacter was not detected by the culture method from the identical sample. This result suggested the possibility that they existed as Viable But Non Culturable (VBNC) forms.

研究分野：衛生微生物学、食品細菌学

キーワード：カンピロバクター 食中毒 二次汚染 遺伝子検出 ふきとり 調理環境 VBNC

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター食中毒は、2001年にそれまで細菌性食中毒の主要な原因菌であったサルモネラや腸炎ビブリオの事件数を抜いて以降、細菌性食中毒で最も事件数が多い食中毒であり、減少傾向はみられない。2009年6月の食品安全委員会の評価書によると、カンピロバクター食中毒の約60%は原因不明であり、残りの約40%は鶏肉が原因である。しかしながら、これらの多くは喫食状況等の疫学調査で特定されており、原因食品や原因施設のふきとり材料から本菌が分離されることは極めて稀である。その理由としては、発症までの潜伏時間が長いこと(1~7日程度)や、発症菌量が少ない(数100個程度)のために、調査時には原因食品(または施設内)の菌数が減少していることが原因であると推測される。また、*Campylobacter jejuni*(*C. jejuni*)は微好気性菌であり空気中では増殖できずに徐々に死滅することや、ストレス環境下ではVBNC(Viable But Non-Culturable)と呼ばれる「生きているが培養不能な状態」に変化することから、培養法による菌分離が難しく、これらのことがカンピロバクター食中毒の原因食品および感染経路の特定を困難にしていると予想される。カンピロバクター食中毒は、明らかに生あるいは加熱不十分な鶏肉の喫食がない学校給食¹⁾や調理実習^{2,3)}などでも発生する。これらは疫学調査およびその後の検証から二次汚染によるものと推察されている。

遺伝子検査法は培養法に比べて短時間で結果を得られること、また大量検体の処理に威力を発揮するが、PCR法では目的とする細菌由来DNAと死菌由来のDNAやサンプル中に混在するDNAが区別できずに増幅されるという問題点があった。近年、エチジウムモノアザイド(EMA)を利用して生菌由来のDNAを選択的に検出する方法が確立され、生菌由来DNAをリアルタイムPCR法で検出することにより培養せずに生菌数を定量することが可能となった(EMA-qPCR法)。

2. 研究の目的

本研究はカンピロバクター食中毒の発生に寄与する二次汚染要因を特定するため、調理施設のふきとり材料を対象とし、培養法および遺伝子検査法によってカンピロバクターの検出を試みること、また、EMA-qPCR法により、生菌あるいは死菌由来DNAを区別して定量的に検出することにより、飲食店の調理環境におけるカンピロバクター汚染実態を把握することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 飲食店の調理環境から採取したふきとり材料からのカンピロバクターの検出

カンピロバクター食中毒の原因施設となった飲食店7施設および共同生活施設1施設について、2016年8月~2018年2月の間にこれらの調理環境からふきとり材料91検体を採取し、カンピロバクター検査に供した。ふきとり水はフィルターでろ過し、無菌的に4等分に切断して各1片をプレストンおよびボルトン培地で増菌培養した(培養法)。遺伝子検査として、フィルターの残り2片のうち1片をさらに細切し、NucleoSpin TissueキットによりDNAを抽出して*flaA*、*cadF*および*cdtB*遺伝子を標的とするコンベンショナルPCR法(cPCR)を行った。cPCRは3遺伝子のいずれか一つでも検出されれば陽性と判定した。3施設由来42検体については、cPCR法に加えて、フィルター1片を選択的膜透過性色素であるエチジウムモノアザイド(EMA)処理により生菌および死菌由来DNAを区別した上で、リアルタイム定量PCR法(qPCR)を実施した。

(2) ふきとり材料中DNAの菌叢解析

5施設由来23検体のふきとり材料から抽出したDNAについてIon PGMにより16SrRNA遺伝子を用いた菌叢解析を実施した⁴⁾。

4. 研究成果

(1) 飲食店の調理環境から採取したふきとり材料からのカンピロバクターの検出

培養法では91検体のうち鶏肉表面のふきとり2検体のみが陽性であった。これに対して、cPCRでは5施設由来16検体が陽性と判定された。さらにqPCRを実施した42検体では培養法、cPCRともにカンピロバクターは全て陰性であったが、qPCRでは3施設由来8検体が陽性と判定された。91検体のうちカンピロバクター遺伝子が検出された24検体の内容は、調理台が5検体(4施設)、冷蔵庫とつ手が4検体(4施設)、まな板が4検体(2施設)と多く、これらは調理環境中でカンピロバクターに汚染される機会が多い場所と推察された(表1)。EMA-qPCRの結果、カンピロバクター遺伝子陽性と判定された8検体(調理台3検体、まな板、排水口ネットゴミ、食器スポンジ、三角コーナー裏側、冷蔵庫とつ手各1検体)のうち、冷蔵庫とつ手以外の7検体から検出された遺伝子は全て死菌由来と考えられた。冷蔵庫とつ手には 1.3×10^2 cfu相当の*C. jejuni*生菌の存在が示された。本検体から培養法ではカンピロバクターが検出されなかったことから、生きているが培養不能な(VBNC)状態で存在した可能性が示唆された(表2)。

表1 ふきとり材料からのカンピロバクター検出状況（施設A～E）

施設名	サンプルNo.	サンプル名	培養検査結果						遺伝子検査結果			検査結果	
			直接塗抹法		増菌培養法 (Preston)		増菌培養法 (Bolton)		PCR ^{*1}			培養法	PCR法
			mCCDA	Skirrow	mCCDA	Skirrow	mCCDA	Skirrow	flaA	cadF	cdtB		
A	カ1	調理台	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ2	シンク内部	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ3	まな板	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ4	冷蔵庫内（台下）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ5	台下冷蔵庫扉とっ手	-	-	-	-	-	+	-	-	陰性	陽性	
	カ6	食器洗浄機（天板）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ7	ネタケース内部	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ8	ネタケース扉とっ手	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ9	4枚扉冷凍冷蔵庫扉とっ手	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ10	4枚扉冷凍冷蔵庫内部	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
B	カ13	調理台（まな板（大））	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ12	シンク内部（鶏肉取扱い）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ11	まな板（鶏肉用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ14	冷蔵庫内	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ15	ふきん	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ16	包丁（鶏肉用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ17	排水口内側（流し）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ18	デシャップ台	-	-	-	-	-	++	-	-	陰性	陽性	
	カ19	冷蔵庫とっ手	-	-	-	-	-	++	-	++	陰性	陽性	
	カ20	スポンジ	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
C	カ21	調理台	-	-	-	-	-	++	++	++	陰性	陽性	
	カ22	調理用シンク内部	-	-	-	-	-	+	++	+	陰性	陽性	
	カ23	まな板（大）（鶏肉、野菜用）	-	-	-	-	-	-	++	+	陰性	陽性	
	カ24	鶏肉用冷蔵庫とっ手	-	-	-	-	-	+	++	+	陰性	陽性	
	カ25	鶏肉用冷蔵庫内	-	-	-	-	-	+	++	+	陰性	陽性	
	カ26	包丁（鶏肉用）	-	-	-	-	-	++	++	++	陰性	陽性	
	カ27	包丁（主として生食用）	-	-	-	-	-	++	-	-	陰性	陽性	
	カ28	まな板（中）（鶏肉用）	-	-	-	-	-	++	-	-	陰性	陽性	
	カ29	まな板（薄）（生食用）	-	-	-	-	-	++	++	-	陰性	陽性	
	カ30	鶏肉保管用バット	-	-	-	-	-	+	++	++	陰性	陽性	
D	カ31	調理台	-	-	-	-	-	++	++	++	陰性	陽性	
	カ32	シンク内部（野菜、下処理用シンク）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ33	まな板（生食用鶏肉用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ34	冷蔵庫内（仕込み前の鶏肉保管用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ35	2槽シンク右（食器洗い用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ36	仕込み後食肉保管用冷蔵庫	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ37	仕込み前の鶏肉保管用冷蔵庫内たまり水	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ38	仕込み後食肉保管用冷蔵庫とっ手	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ39	野菜、調味料保管冷蔵ショーケース外扉	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ40	2槽シンク右排水口	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
E	カ41	調理台	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ42	シンク内部	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ43	まな板（鶏肉用）	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ44	冷蔵庫とっ手	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ45	鶏肉表面（ムネ）	+	+	+	+	-	+	++	++	陽性	陽性	
	カ46	鶏肉表面（モモ）	-	-	-	+	-	+	+	-	陽性	陽性	
	カ47	包丁刃	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ48	製氷機内	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	
	カ49	冷蔵庫内	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性	陰性	

*1 食中毒患者、ウシおよびトリ由来 137 株について Datta ら（J Med Microbiol, 2003）の 11 の病原因子遺伝子について保有状況を調べ、最も検出率の高かったこれらの 3 遺伝子を選んだ。結果に*印が付いているものは、PCR プロダクトの塩基配列を解読し、相同性検索によりカンピロバクターの当該遺伝子であることを確認した。

*2 施設 C はカンピロバクターによる食中毒が発生してから約 1 週間後に、施設 A,B,D,E はカンピロバクターによる食中毒が発生してから約 1 年後にサンプリングを実施した

表2 リアルタイム PCR 陽性検体の Ct 値および推定カンピロバクター菌数

施設名	サンプルNo.	分類	サンプル名	リアルタイムPCR法 (Ct値)				リアルタイムPCR法 (cfu/filter)			
				EMA処理なし		EMA処理あり ^{*1}		EMA処理なし		EMA処理あり ^{*1}	
				<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
F	カ62	ふきとり水	調理台	35.99	-	35.57	-	ND	-	ND	-
	カ74	ふきとり水	排水口ネットゴミ	37.05	-	-	38.36	55	-	-	55
G	カ75	ふきとり水	食器スポンジ ¹	-	-	37.22	-	-	-	49	-
	カ83	ふきとり水	三角コーナー裏側	36.07	-	-	-	1.1 × 10 ²	-	-	-
	カ84	ふきとり水	冷蔵庫とっ手	34.98	-	35.75	-	2.2 × 10 ²	-	1.3 × 10 ²	-
H	カ85	ふきとり水	2F調理台(シンク横)	38.11	-	-	-	27	-	-	-
	カ87	ふきとり水	まな板(その他食品用)	-	37.49	-	-	-	99	-	-
	カ90	ふきとり水	調理台(シンクと調理台の間製氷機上部)	37.03	-	-	-	56	-	-	-

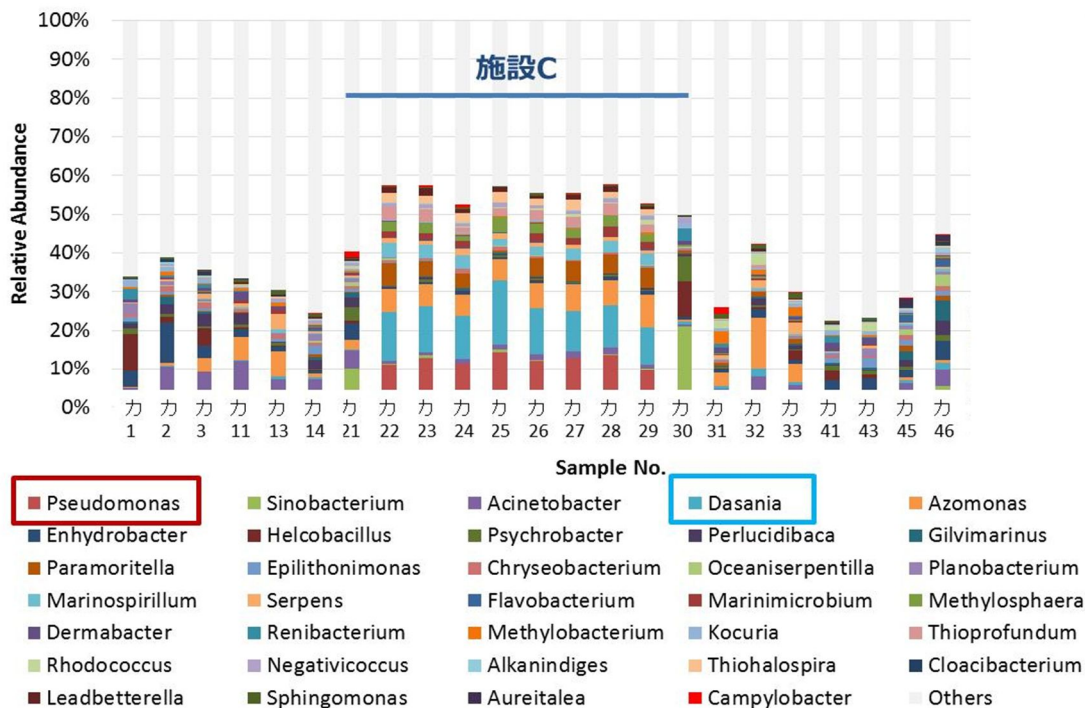
*1 施設 F のサンプルと施設 G および H のサンプルの EMA 処理条件は異なる。

*2 ND: Not Done

(2) ふきとり材料中 DNA の菌叢解析

10 検体全てが陽性と判定された施設 C において、*Pseudomonas* 目の細菌が優位に存在していた (図 1)。

図 1 ふきとり材料から抽出した DNA の菌叢解析



(3) 考察

カンピロバクター食中毒の原因施設である飲食店の調理環境から採取したふきとり材料からカンピロバクター遺伝子を検出することができた。培養法では鶏肉以外のふきとり材料から本菌の検出・分離ができなかったことから、本菌遺伝子の検出は、調理環境中における衛生管理の評価を可能とする新たな指標となる可能性がある。また、EMA-qPCR の結果、冷蔵庫と手には 1.3×10^2 cfu 相当の *C. jejuni* が、生きているが培養不能な (VBNC) 状態で存在した可能性が示唆された。実際の調理環境でカンピロバクターが VBNC 状態で存在している可能性があることを示したデータは少なく、今後、実験室内でさらに検討したい。

< 引用文献 >

- 1) 久米田裕子、田口眞澄ら．学校給食によるカンピロバクター集団食中毒事例 - 大阪府．病原微生物検出情報 27: 172-173 (2006)
- 2) 久米田裕子、河合高生ら．高等学校の調理実習で発生したカンピロバクターによる集団食中毒事例 - 大阪府．病原微生物検出情報 20 (1999)
- 3) 依田清江、内村眞佐子．学校の調理実習で発生した *Campylobacter jejuni* による集団食中毒の原因解析 - 千葉県．病原微生物検出情報 27: 171-172 (2006)
- 4) Asakura, H., Tachibana, M., et al., Seasonal and growth dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. J Food Safety 36: 392-401 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 中村寛海, 山本香織, 藤原淳史, 平山照雄, 秋吉充子, 梅田 薫, 小笠原準	4. 巻 3
2. 論文標題 食中毒患者、ニワトリおよびウシ由来カンピロバクターのmultiplex PCR binary typing法による型別	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中村寛海	4. 巻 35
2. 論文標題 食品製造施設への定着要因としてのバイオフィルム形成	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 122-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5803/jsfm.35.122	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中村寛海、後藤 薫、梅田 薫、山本香織、平井佑治、福田 昭、阿部仁一郎、久保英幸、改田 厚、山元誠司、馬場 孝、平井有紀、江川和孝、長谷 篤、秋吉充子、柴川紗恵子、山崎一夫、小笠原 準	4. 巻 3
2. 論文標題 2018年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 大阪健康安全基盤研究所研究年報	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中村寛海、後藤 薫、梅田 薫、山本香織、入谷展弘、阿部仁一郎、久保英幸、改田 厚、山元誠司、馬場 孝、平井有紀、長谷 篤、平山照雄、秋吉充子、山崎一夫、小笠原 準	4. 巻 2
2. 論文標題 2017年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 大阪健康安全基盤研究所研究年報	6. 最初と最後の頁 44-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中村寛海、後藤 薫、梅田 薫、山本香織、入谷展弘、阿部仁一郎、久保英幸、改田 厚、上林大起、山元誠司、平山照雄、平井有紀、山崎一夫、長谷 篤、小笠原 準	4. 巻 79
2. 論文標題 2016年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 大阪市立環境科学研究所報告	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中村寛海、後藤 薫、山本香織、入谷展弘、阿部仁一郎、久保英幸、改田 厚、上林大起、山元誠司、平山照雄、平井有紀、山崎一夫、長谷 篤、西尾孝之、小笠原 準	4. 巻 78
2. 論文標題 2015年に大阪市内の食中毒原因調査で検出された下痢原性微生物	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 大阪市立環境科学研究所報告	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Asakura, Junko Sakata, Hiromi Nakamura, Shiori Yamamoto, and Satoshi Murakami	4. 巻 34
2. 論文標題 Phylogenetic diversity and antimicrobial resistance of <i>Campylobacter coli</i> from humans and animals in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 146-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村寛海、野本竜平、山本香織、朝倉 宏、梅田 薫、小笠原 準
2. 発表標題 大阪市内の食中毒患者から分離された <i>Campylobacter jejuni</i> の分子疫学解析
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝倉 宏、山本詩織、中山達哉、佐々木貴正、中村寛海
2. 発表標題 鶏の生産・食鳥処理・消費段階におけるCampylobacter spp.の動態解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村寛海、山元誠司、朝倉 宏、梅田 薫、山本香織、小笠原準
2. 発表標題 調理環境から採取したふきとり材料からのカンピロバクター遺伝子の検出
3. 学会等名 第11回カンピロバクター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村寛海、朝倉 宏、梅田 薫、山本香織、小笠原 準
2. 発表標題 生菌由来カンピロバクターDNAのふきとり材料からの定量的検出
3. 学会等名 第39回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本香織、中村寛海、平山照雄、秋吉充子、梅田 薫、小笠原準
2. 発表標題 食中毒原因究明調査で分離された患者由来カンピロバクターのmP-BIT法による型別
3. 学会等名 第11回カンピロバクター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 朝倉 宏、森田幸雄、中馬猛久、中村寛海
2. 発表標題 鳥肉におけるカンピロバクター汚染制御と汚染探知への次世代シーケンサーの応用
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村寛海、朝倉 宏、山本香織、梅田 薫、小笠原 準
2. 発表標題 飲食店の調理環境におけるカンピロバクター汚染状況
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村寛海、朝倉 宏、山本香織、梅田 薫、小笠原 準
2. 発表標題 飲食店のふきとり材料からのカンピロバクター検出状況
3. 学会等名 第10回日本カンピロバクター研究会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村寛海、山本香織、梅田 薫、原田哲也、坂田淳子、長谷 篤、後藤 薫、平山照雄、秋吉充子、平井有紀、小笠原 準
2. 発表標題 食中毒事例から分離された同定困難なカンピロバクターについて
3. 学会等名 平成29年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村寛海
2. 発表標題 食品製造施設への定着要因としてのバイオフィルム形成
3. 学会等名 第38回日本食品微生物学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井口 純 (Iguchi Atsushi) (00437948)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	
連携研究者	朝倉 宏 (Asakura Hiroshi) (40370936)	国立医薬品食品衛生研究所・その他部局等・部長 (82601)	
連携研究者	山本 香織 (Yamamoto Kaori) (70649011)	大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員 (84407)	