

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02350

研究課題名(和文) 食中毒起因カンピロバクターの調理環境における二次汚染実態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cross-contamination in cooking environments causing 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：調理環境における二次汚染実態把握を目的として、ふきとり材料からのカンピロバクター(Camp)遺伝子の定量的検出を試みた。その結果、食中毒原因施設の飲食店16店舗由来156検体のうち11店舗由来23検体(14.7%)が遺伝子陽性と判定され、これらはすべてC. jejuniであった。リアルタイムPCR法(qPCR)で菌数を推定した結果、カランのハンドル部分が1ヶ所あたり69 cfu相当(Ct値34.4)と相対的に高値であったが、他検体ではすべて10 cfu未満(Ct値38.4～44.7)であった。qPCRによるCamp遺伝子の定量的な検出は、調理環境中での二次汚染推定手法として有用と考えられた。

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施設として最も多い飲食店の調理環境におけるカンピロバクターの二次汚染実態を把握することにより、飲食店における生鶏肉の取り扱いについての実態を知ることができ、食品衛生監視・指導業務に役立てられる。また、カンピロバクター遺伝子の定量的な検出法を確立することによって、これまで原因不明とされていた食中毒の原因究明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to quantitatively detect *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and *C. coli* genes and estimate the number of these bacterial cells. We collected swab samples among facilities from the cooking environment of 16 retail small restaurants. The 156 swab samples were collected and real-time PCR (qPCR) was used to detect *C. jejuni* and *C. coli*. Based on the results of qPCR, 23 samples (14.7%) from 11 facilities were positive of *C. jejuni* gene. The qPCR results showed that the estimated number of bacteria in the handle of the faucet was relatively high, equivalent to 69 cfu per site (Ct value 34.4), while all other samples were less than 10 cfu (Ct value between 38.4 and 44.7). Quantitative detection of *Campylobacter* genes by qPCR is considered to be a useful method for estimating cross-contamination in the cooking environment.

研究分野：衛生微生物学

キーワード：Campylobacter ふきとり 調理環境 リアルタイムPCR P-BIT Typing バイオフィルム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター食中毒は、*Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) あるいは *C. coli* によって引き起こされる。カンピロバクター食中毒事件数は、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ピブリオの事件数を 2001 年に上回って以降減少傾向は認められず(新型コロナウイルス感染症の影響で食中毒事件総数が大きく減少した 2020~2021 年を除く)、2022 年度に発生した細菌性食中毒の中で依然として事件数が最も多く、本菌による食中毒はいまだ制御できていない。カンピロバクター食中毒の主な原因は生あるいは加熱不十分な鶏肉の喫食であるが、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、70%以上が原因不明である¹⁾。原因の特定が困難な要因の一つとして、カンピロバクターが微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、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」に変化することが挙げられる。このため、本菌は培養法による菌分離が難しく、鶏肉以外の食品やふきとり材料から検出されることは稀である。また、学校給食などで明らかに生あるいは加熱不十分な鶏肉の喫食歴がなく調理環境中の鶏肉からの二次汚染による事例も報告されている²⁾。筆者らはこれまでの先行研究で、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のふきとり材料から培養法では本菌が検出できないものの、カンピロバクター遺伝子が検出できることを確認している。

2. 研究の目的

本研究は、食中毒原因施設である飲食店から採取したふきとり材料から *C. jejuni* / *coli* 遺伝子の定量的検出及び菌数の推定を試み、調理環境中におけるカンピロバクターの定量的な二次汚染実態を明らかにすること、また、近年流行している食中毒起因 *C. jejuni* / *coli* 菌株の遺伝学的特徴を知ることが目的とした。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR 法 (qPCR) によるふきとり材料からのカンピロバクター二次汚染実態の定量的把握

2019~20 年にカンピロバクター食中毒の原因施設となった飲食店 16 店舗について、食中毒発生翌年の監視時に調理施設環境から計 156 検体のふきとり材料を採取し、培養法と qPCR により *C. jejuni* / *coli* 遺伝子の検出を試みた。qPCR は Liu らの方法³⁾を改変して実施した。生菌数が既知の *C. jejuni* 及び *C. coli* 培養液から DNA を抽出して適宜希釈し、検量線を作成して菌数を推定した。

(2) mP-BIT に基づく食中毒患者由来カンピロバクター菌株の型別

mP-BIT (Multiplex PCR Binary Typing) 法は、カンピロバクターが保有する病原因子や薬剤耐性にかかわる 19 遺伝子の保有の有無に基づく型別法である⁴⁾。2011~20 年に 195 事例から分離された 655 株の患者由来 *C. jejuni* および *C. coli* を mP-BIT に供した。mP-BIT の結果は対象とする 19 遺伝子の保有の有無に基づき任意にタイプ番号を付与した。

(3) *C. jejuni* のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) および全ゲノム解読 (WGS) とバイオフィーム (BF) 形成試験

同じ mP-BIT タイプ (J-27) に分類された *C. jejuni* の一部の菌株については、制限酵素 *Kpn* I による PFGE を実施した。また、2016 年 4~10 月に発生した J-27 タイプの *C. jejuni* を原因とする食中毒事例 6 事例 (16-40 号、16-53 号、16-55 号、16-56 号、16-74 号および 16-80 号) については、各事例から 1~6 株の計 18 株を選び、Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて WGS を実施し、SNP 解析を行った。*C. jejuni* では宿主適応域の広い菌株は病原性が高く、また BF 形成性が高いことが報告されている⁶⁾。そこで、食中毒起因カンピロバクターの主要なタイプと考えられた J-27 10 株、J-357 株、J-727 株およびこれら以外のタイプ 20 株計 44 株を用いて Reuter, et al.⁵⁾ に従って BF 形成試験を実施した。染色されたクリスタルバイオレット量を SpectraMax iD3 (Molecular Devices 社) により OD₅₇₀ 値として測定し、これを形成された BF 量として定量した。また、これらのうち 41 株について MiSeq (illumina 社) による WGS 解析を実施し、MLST に基づく Sequence Type (ST) を決定した。

4. 研究成果

(1) qPCR によるふきとり材料からのカンピロバクター二次汚染実態の定量的把握

食中毒発生翌年の監視の際に採取した 16 店舗由来 156 検体では、qPCR により 11 店舗由来 23 検体 (14.7%) が遺伝子陽性と判定され、これらは全て *C. jejuni* であった。qPCR の成績より、カランのハンドル部分の推定菌数は 1 か所あたり 69 cfu 相当 (Ct 値 34.4) と相対的に高値であったが、他検体では全て 10 cfu 未満 (Ct 値 38.4~44.7) であった (表 1)。培養法では全てのふきとり材料から *C. jejuni* および *C. coli* は検出されなかった。qPCR によるカンピロバクター遺

伝子の定量的な検出は、調理環境中での二次汚染推定の手法として有用と考えられた。相対的に高い推定 *C. jejuni* 菌数を認めたカランのハンドル部分は調理作業者が頻繁に接触する部位であり、作業中に *C. jejuni* の二次汚染を拡大させる要因になっていると推定され、当該施設では手指洗浄の更なる徹底が必要と考えられた。

店舗名	サンプル名	qPCR法 (Ct値)		推定カンピロバクター菌数 (cfu/ filter)		
		1回目	2回目	1回目	2回目	平均値
A	まな板 (鶏肉用)	-	41.35	-	0.58	0.58
A	まな板 (野菜用)	39.39	41.26	1.96	0.62	1.29
A	皿 (3枚)	41.15	-	0.60	-	0.6
B	2層シンクカラン (ハンドル部)	40.48	-	0.94	-	0.94
D	冷蔵庫内 (左)	-	43.30	-	1.1	1.1
D	冷蔵庫内 (右)	42.09	-	0.32	-	0.32
I	包丁の柄 (鶏肉用)	-	40.13	-	2.55	2.55
I	冷蔵庫内	-	40.51	-	2.01	2.01
I	2層シンクカラン (ハンドル部分)	38.35	38.35	3.73	7.67	5.7
I	包丁の柄 (野菜、その他)	-	41.09	-	1.4	1.4
I	まな板 (野菜、その他)	41.44	41.09	0.58	0.68	0.63
J	調理台 (野菜用)	41.80	-	0.45	-	0.45
J	カラン (ハンドル部分)	33.74	35.02	65.05	72.67	68.86
K	冷蔵庫内	39.39	39.93	5.12	14.34	9.73
L	調理台	44.25	41.90	0.25	0.41	0.33
L	冷蔵庫取っ手 (鶏肉用)	39.75	44.74	1.54	0.07	0.805
L	鶏肉以外まな板	39.05	-	2.46	-	2.46
M	まな板 (鶏肉用)	-	41.98	1.06	-	1.06
N	冷蔵庫内	40.83	-	1.77	-	1.77
N	冷蔵庫取っ手	-	41.98	-	1.22	1.22
O	冷蔵庫取っ手	-	41.04	-	2.20	2.20
P	包丁の柄 (鶏肉用)	-	41.96	-	0.84	0.84
P	まな板 (鶏刺身用)	41.97	-	1.01	-	1.01

表 1 qPCR 陽性検体の Ct 値および推定カンピロバクター菌数 (店舗 A~P)

(2) mP-BIT に基づく食中毒患者由来カンピロバクター菌株の特徴

mP-BIT の結果、655 株中 549 株の *C. jejuni* は 101 タイプ(J-01~J-101)、106 株の *C. coli* は 14 タイプ(C-01~C-14)に分類された。*C. jejuni* で最も多く検出されたタイプは J-27 で 44 事例由来 146 株(26.6%)、次いで J-35 が 18 事例由来 35 株、J-72 が 9 事例由来 34 株であった(表 2 および図 1)。また、WGS による MLST の結果、J-27 は ST-22、J-35 は ST-4526、J-72 は ST-52 に型別され、mP-BIT は MLST と高い相関性が確認された。J-27 は mP-BIT の対象としている 19 遺伝子のうち *hipO* 遺伝子以外に *panB* および *cgtA* 遺伝子しか保有していなかったことから、一部の菌株について PFGE を実施した。その結果、これらの PFGE パターンは類似度が高く、クローナリティの高いグループと考えられた。2016 年 4~10 月に発生した J-27 タイプの *C. jejuni* を原因とする 6 事例の食中毒は全て鶏肉の刺身あるいはタタキを原因食品とする事例であった。各事例から 1~6 株の計 18 株を選び、WGS を実施し、MLST および SNP 解析を行った結果、これらは全て ST22 であり、SNP 解析の結果、ゲノム配列はほぼ同一であることがわかった。原因となった鶏肉に同一の汚染源の可能性が考えられたことから、鶏肉の遡り調査を実施したが、鶏肉の仕入れ先、処理場に共通点はなく、汚染源については不明であった。

事例数	菌株数	標的遺伝子																			
		CjE 1500	CjE 1733	<i>virB8</i>	Cj 1135	Cj 1136	<i>cfrA</i>	Cj 0265	<i>mafS</i>	Cj 0008	<i>cgtA</i>	<i>tetO</i>	<i>flgE</i>	<i>gmhA2</i>	Cj 1321	<i>wlaN</i>	<i>panB</i>	Cj 0423	Cj 0122	<i>hipO</i>	
J-27	44	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J-35	18	35	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
J-72	9	34	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1

表 2 主要な mP-BIT タイプの菌株数と遺伝子保有状況

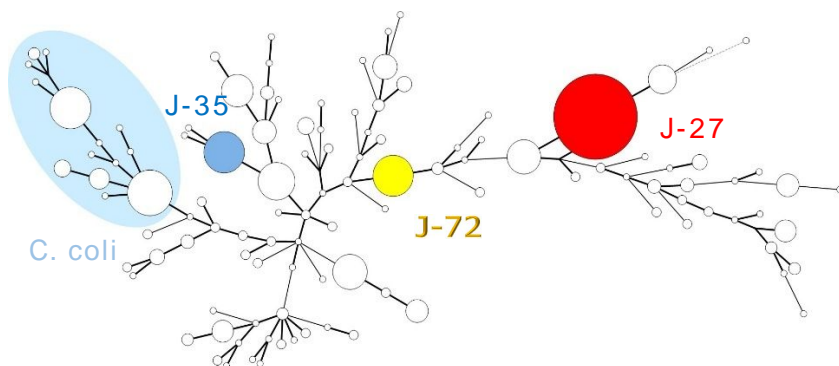


図 1 *C. jejuni/coli* の mP-BIT による Minimum Spanning Tree (n=655)

円の大きさは菌株数を表しており、円と円との距離は変異の度合いを反映している。主要な mP-BIT タイプを色付きで示した (タイプ番号は任意)。

(3) *C. jejuni* の BF 形成性

BF 形成試験の結果、J-27 は J-35 および J-72 に比べて BF 形成量が低く、環境適応性が低い可能性が示唆された。WGS による MLST の結果から、J-27 は ST-22 と相関しているが、ST-22 は運動性が弱いことが報告されているため⁷⁾、今後、これらの運動性について確認する必要がある。

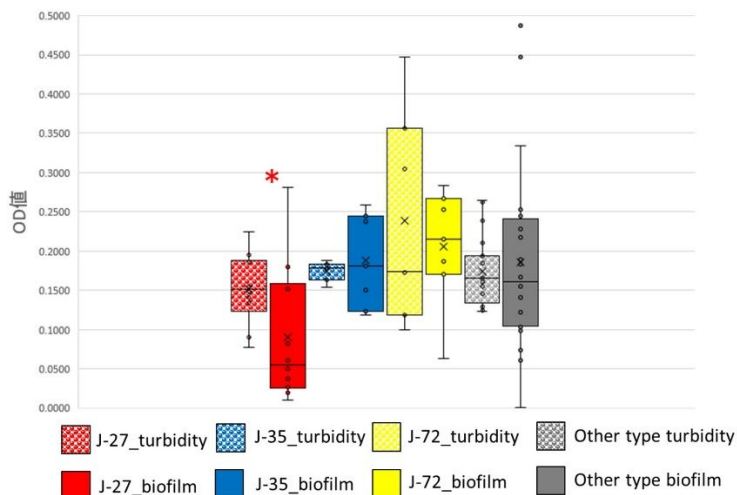


図 2 主要 3 タイプの *C. jejuni* の増殖と形成されたバイオフィルム量の比較

* : J-27 の biofilm 形成が他の 3 グループに比べて有意に低かった (マンホイットニ検定)

< 引用文献 >

- 1) Vetchapitak, T. and Misawa, N. Food Safety. 7(3): 61-73 (2019)
- 2) 久米田裕子、田口真澄ら . 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)
- 3) Liu, KC., et al., Foodborne Pathog. Dis., 14(7) 2017
- 4) Yamada, K., Ibata, A., et al. J. Infect. Chemother. 21(1): 50-54 (2015)
- 5) Reuer, M., et al., App. Environ. Microbiol., 76: 2122-2128 (2010)
- 6) Culotti, A., et al., FEMS Microbiol Ecol, 91: 1-8 (2015)
- 7) Revez, J., Rossi, M., et al., PloS ONE. 6, e26880 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2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 37
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 132-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5803/jsfm.37.132	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 -

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 薫, 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 オープンアクセスではない, 又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村寛海, 秋吉充子, 山本香織, 梅田 薫, 小笠原 準, 平井佑治, 野本竜平, 朝倉 宏, 阿部仁一郎
2. 発表標題 mP-BITに基づく食中毒患者由来カンピロバクター菌株の特徴とバイオフィルム形成性
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村寛海, 山元誠司, 朝倉 宏, 阿部仁一郎
2. 発表標題 食中毒原因施設の調理環境におけるカンピロバクター二次汚染実態把握の試み
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村寛海、秋吉充子、山本香織、梅田 薫、平井佑治、朝倉 宏、阿部仁一郎
2. 発表標題 mP-BIT法による食中毒起因カンピロバクターの流行動態解析
3. 学会等名 第14回カンピロバクター研究会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村寛海、山元誠司、朝倉 宏、阿部仁一郎
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の定量的汚染評価の試み
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村寛海、秋吉充子、後藤 薫、柴川紗恵子、朝倉 宏、小笠原準
2. 発表標題 輸入食肉からのカンピロバクター、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の検出とこれら进行评估するための衛生指標菌について
3. 学会等名 第13回日本カンピロバクター研究会総会
4. 発表年 2020年

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Campylobacter jejuni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

〔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	野本 竜平 (NOMOTO Ryohei) (60642238)	神戸市健康科学研究所・その他部局等・副部長 (84505)	

	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
研究協力者	朝倉 宏 (ASAKURA Hiroshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------