

牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と 分離菌株の性状

小 野 一 晃[†]

埼玉県衛生研究所 (〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1)

(2013年3月4日受付・2013年7月1日受理)

要 約

牛胆汁を検査したところ、105検体中57検体(54.3%)から*C. jejuni*が検出された。牛胆汁中のカンピロバクター菌数(cfu/ml)は、42.9%の検体が 10^3 cfu/ml以上であり、市販鶏肉の汚染菌数の1,000~10,000倍高い値であった。分離株の30%(12/40)は血清型別不能であったが、35%(14/40)がPenner D群、12.5%(5/40)がPenner B群であった。また、牛胆汁由来株は、PCR法により、供試した40株すべてが*flaA*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC*、*cmeA*、*cmeB*及び*cmeC*の7種類の病原遺伝子を保有していることが明らかとなった。さらに、パルスフィールド・ゲル電気泳動法では、牛胆汁由来株は食中毒患者由来株と高い類似性を示し、4種類の制限酵素を用いた場合でも、患者由来株と同一のDNA切断パターンを示した株も認められた。このことから、牛胆汁は食中毒の原因となりうる*C. jejuni*の重要な汚染源となる可能性が示された。

——キーワード：牛胆汁、カンピロバクター・ジェジュニ、パルスフィールド・ゲル電気泳動法、病原遺伝子。

----- 日獣会誌 66, 713~717 (2013)

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は人の下痢症の起原因菌で、近年、わが国でも欧米諸国と同様に [1]、本菌による食中毒事例が増加する傾向にある。本菌による食中毒の原因食品としては、生または加熱不足の鶏肉製品が多数報告されているが [2]、その他にも、牛レバーによる事例も報告されている (厚生労働省ホームページ: 全国食中毒統計)。

牛レバーのカンピロバクター汚染については、と体の解体工程における表面汚染の他に、著者らは、腸管内の菌が胆管を通じて胆嚢内に侵入・増殖後、上行性に肝臓実質内部を汚染することを報告している [3]。この肝臓実質の一次汚染は、表面の二次汚染とは異なり、予防が困難であることから、食品衛生上大きな問題である。

過去の研究において、牛胆嚢内の胆汁からカンピロバクターは分離されているが [3]、分離株の血清型や遺伝子性状については明らかにされていない。そこで、本研究では、牛胆汁に由来するカンピロバクターの食中毒に対するリスクを明らかにするために、牛胆汁中の本菌の汚染菌量を測定し、分離株の血清型や病原遺伝子の保有

状況について検討した。さらに、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (pulsed-field gel electro-phoresis : PFGE) 法により遺伝子系統解析を行い、食中毒患者由来株との関連性について検討した。

材料及び方法

供試材料：2007年6月~2012年7月にかけて、肥育牛の胆嚢105検体を購入し、検査を行った。

胆汁中のカンピロバクター定量培養法：牛胆嚢から胆汁約30mlを注射器(テルモ株, 東京)を用いて滅菌チューブ(テルモ株, 東京)に無菌的に採取した。次に、胆汁1mlを9mlの滅菌生理食塩水を用いて段階希釈後、各0.2mlをmCCDA培地(Oxoid, U.K.) [4]に塗抹し、微好気状態(O₂:5%, CO₂:10%, N₂:85%)で42℃, 48時間培養した。培地上に発育したカンピロバクター様のコロニー数を測定し、各平板上の3コロニーについて、①位相差顕微鏡による形態及び運動性の観察、②好気条件及び25℃における発育の有無、③オキシダーゼ試験、④カタラーゼ試験、⑤酢酸インドキシル

[†] 連絡責任者：小野一晃 (埼玉県衛生研究所)

〒338-0824 さいたま市桜区上大久保639-1

☎048-853-7196 FAX 048-853-5164

E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

牛胆嚢内胆汁のキャンピロバクター汚染状況と分離菌株の性状

表 牛胆嚢内胆汁中のキャンピロバクター菌数及び陽性検体数

菌数 (cfu/ml)	<10	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
陽性検体数 (%)	48 (45.7)	3 (2.9)	9 (8.6)	12 (11.4)	5 (4.8)	9 (8.6)	16 (15.2)	3 (2.9)

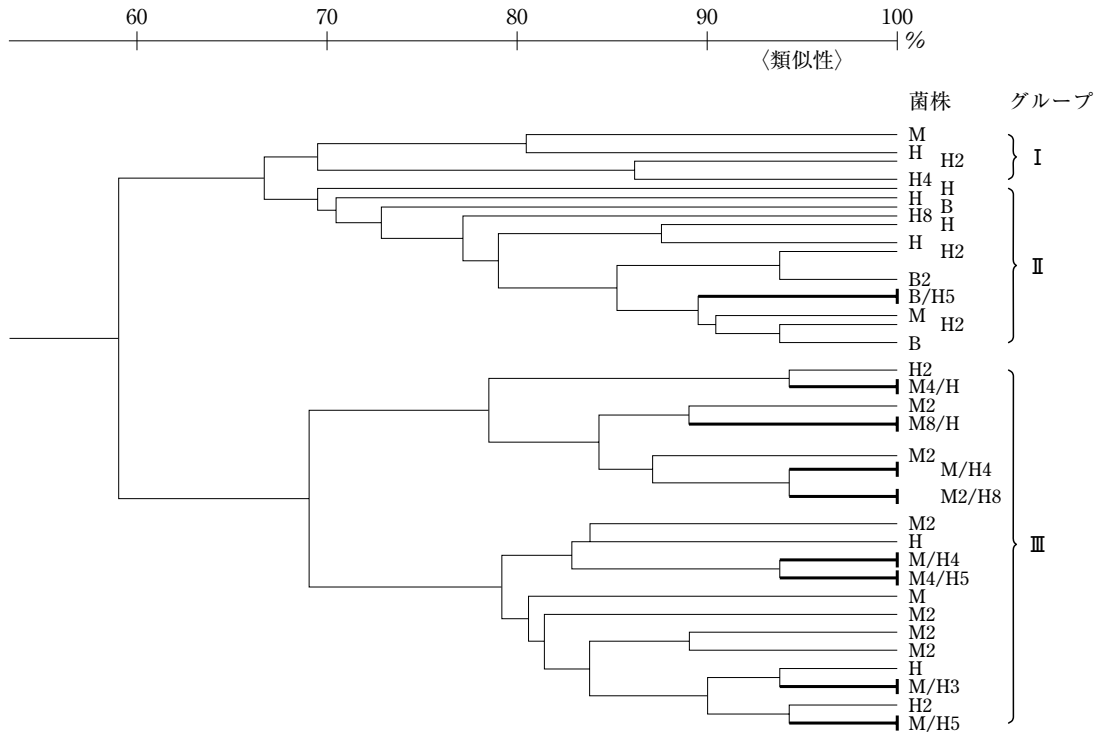


図1 食中毒患者・鶏肉・牛胆汁由来血清型Penner B群 *Campylobacter jejuni* の類似性

- I : 食中毒患者由来株が多く含まれるグループ
- II : 食中毒患者由来株と牛胆汁由来株が多く含まれるグループ
- III : 食中毒患者由来株と鶏肉由来株が多く含まれるグループ
- H : 食中毒患者由来株 (数字は株数)
- B : 牛胆汁由来株 (数字は株数)
- M : 鶏肉由来株 (数字は株数)
- B/H : 牛胆汁由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一のもの
- M/H : 鶏肉由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一のもの

加水分解試験, ⑥馬尿酸塩加水分解試験, ⑦ナリジクス酸 (30 µg) とセファロチン (30 µg) に対する感受性試験により菌種の同定を行った。

分離 *C. jejuni* の血清型別及び病原遺伝子検査法: 定量培養で胆汁から分離された *C. jejuni* 菌数の高かった計40株について, 市販のキャンピロバクター免疫血清 (デンカ生研株, 東京) を用いてPennerの血清型別 [5] を行った。

さらに, ミューラー・ヒントン培地 (Oxoid, U.K.) で培養した40株の新鮮培養菌を100 µlのTEバッファーに添加し, 95 °Cで1分間加熱してDNAを抽出した。次に, Dattaら [6] (*flaA*), Linら [7, 8] (*cmeA*, *cmeB*, *cmeC*), Picketら [9] (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) の報告に準じて, 遺伝子増幅装置 (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, U.S.A.) で病原遺伝

子の増幅を行った。次いで, 1%アガロースゲルでPCR産物を電気泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線下でバンドを観察した。

分離 *C. jejuni* の遺伝子型別及び解析法: 埼玉県衛生研究所において1998年~2012年にかけて分離した食中毒患者由来65株, 鶏肉由来37株, 牛胆汁由来5株, 計107株の *C. jejuni* (血清型Penner B群) 及び食中毒患者由来31株, 鶏肉由来28株, 牛胆汁由来13株, 計72株の *C. jejuni* (血清型Penner D群) を用いて, パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法による遺伝子型別を行った。-80 °Cで保存していた各株をミューラー・ヒントン培地で42 °C, 48時間微好気培養後, Ribotら [10] の報告に準じ, 試料を制限酵素 *Sma* I (タカラバイオ株, 東京) で処理後, 1% (w/v) アガロースにより, 電圧6V/cm, パルスタイム6.75秒~

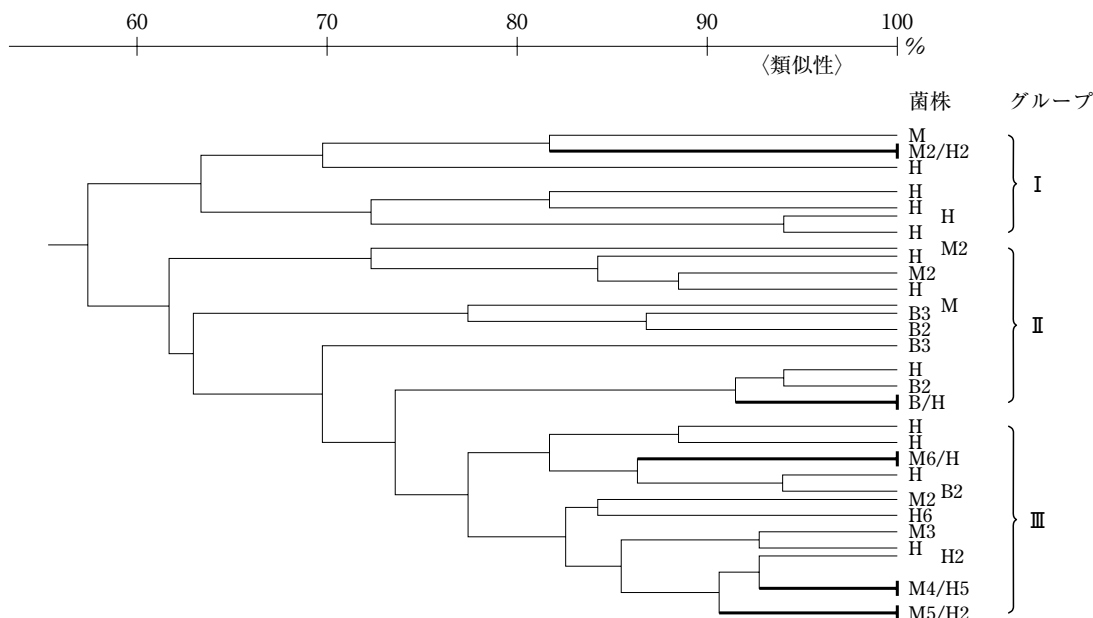


図2 食中毒患者・鶏肉・牛胆汁由来血清型Penner D群 *Campylobacter jejuni* の類似性

- I : 食中毒患者由来株が多く含まれるグループ
- II : 食中毒患者由来株と牛胆汁由来株が多く含まれるグループ
- III : 食中毒患者由来株と鶏肉由来株が多く含まれるグループ
- H : 食中毒患者由来株 (数字は株数)
- B : 牛胆汁由来株 (数字は株数)
- M : 鶏肉由来株 (数字は株数)
- B/H : 牛胆汁由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一のもの
- M/H : 鶏肉由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一のもの

38.35秒, バッファー温度 14℃, 泳動時間 18時間の条件で電気泳動 (CHEF-DR II, Bio-Rad, U.S.A.) を行った [11].

各菌株の PFGE 法による DNA 切断パターンを Diversity database (PDI社, U.S.A.) を用いてコンピュータ解析後, 制限酵素 DNA 切断パターンの違いから UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) 法によりクラスター解析を実施して, 人由来株や鶏由来株との関連性について調べた. なお, 制限酵素 (*Sma* I, タカラバイオ株, 東京) で同一の DNA 切断パターンを示した株については, 3種の制限酵素 (*Kpn* I, *Sal* I 及び *Sac* II, タカラバイオ株, 東京) を追加し, それぞれの泳動パターンを比較した.

成 績

牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況: 105 検体中 57 検体 (54.3%) から *C. jejuni* が検出された. 胆汁中のカンピロバクター菌数 (cfu/ml) は, 表に示すとおり, 10 未満が 48 検体 (45.7%), 10¹ 台が 3 検体 (2.9%), 10² 台が 9 検体 (8.6%), 10³ 台が 12 検体 (11.4%), 10⁴ 台が 5 検体 (4.8%), 10⁵ 台が 9 検体 (8.6%), 10⁶ 台が 16 検体 (15.2%), 10⁷ 台が 3 検体 (2.9%) であった.

分離株の血清型及び PCR 法による病原遺伝子の保有状況: 供試した 40 株の血清型は, Penner D 群が最も多く 14 株 (35.0%), 次に B 群 5 株 (12.5%), A 群 3 株 (7.5%), C 群 2 株 (5.0%), F 群 2 株 (5.0%), R 群 1 株 (2.5%), Z6 群 1 株 (2.5%) であった. 12 株 (30.0%) は血清型別不能であった.

また, PCR 法では, 供試したすべての株が *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cmeA*, *cmeB* 及び *cmeC* の病原遺伝子を保有していた.

PFGE による遺伝子型別: PFGE 法により血清型 Penner B 群由来株 107 株は 35 型に型別され, 患者由来株が多く含まれるグループ I, 患者由来株と牛胆汁由来株が多く含まれるグループ II, 患者由来株と鶏肉由来株が多く含まれるグループ III に大別された (図 1). 供試した牛胆汁由来 5 株のうち, 食中毒患者由来株と同一の遺伝子型を示したものが 1 株, 他の 4 株は 3 つのタイプに分類されたが, いずれも食中毒患者由来株と 70% 以上の類似性が認められた. 一方, グループ III の 8 タイプについては, 鶏肉由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一であった. また, 制限酵素 (*Sma* I, タカラバイオ株, 東京) で同一の DNA 切断パターンを示した株は, 他の制限酵素を用いた PFGE でも, それぞれ同一の泳動パターンを示した.

PFGE法により血清型Penner D群由来株72株は30型に型別され、血清型Penner B群と同様に、患者由来株が多く含まれるグループI、患者由来株と牛胆汁由来株が多く含まれるグループII、患者由来株と鶏肉由来株が多く含まれるグループIIIに大別された(図2)。供試した牛胆汁由来13株のうち、食中毒患者由来株と同一の遺伝子型を示したものは1株、他の12株については、5つのタイプに分類されたが、いずれも食中毒患者由来株と70%以上の類似性が認められた。一方、グループIの1タイプ及びグループIIIの3タイプについては、鶏肉由来株と食中毒患者由来株の遺伝子型が同一であった。なお、先の制限酵素で同一のDNA切断パターンを示した株は、他の3種の制限酵素を用いた場合でも、それぞれ同一の泳動パターンを示した。

考 察

牛胆嚢内胆汁の105検体中57検体(54.3%)から*C. jejuni*が検出された。胆汁1ml当たりの汚染菌数は、42.9%(45/105検体)が 10^3 cfu/ml以上であり、市販鶏肉の汚染菌数の1,000~10,000倍高い値であった[12]。

カンピロバクターの病原因子としては、鞭毛、腸管定着性、侵襲性、毒素産生性などが知られているが[13, 14]、近年、薬剤耐性ポンプである*cmeABC*が胆汁に対する抵抗性と腸管内への定着に重要であることが報告されている[7, 8]。牛胆汁から分離された40株は、鞭毛遺伝子であり腸管への定着に重要である*flaA*や、*cmeABC*、細胞膨化致死毒素をコードする*cdtABC*など7種類の病原遺伝子のすべてを保有していることが明らかとなった。さらに、分離株の血清型別は、食中毒患者由来株と同様に、Penner B群、D群が多く、また、PFGE法による解析でも患者由来株との類似性が高いことが示された。

PFGE法による遺伝子解析は、由来の異なる菌株間の関連性を明らかにするために広く応用されている[15, 16]。今回、血清型Penner B群の株は、牛胆汁由来株がグループII、鶏肉由来株がグループIIIとそれぞれ異なるクラスターに分類された。一方、血清型Penner D群の株では、牛胆汁由来株と鶏肉由来株の一部が同一のクラスターに分類された。カンピロバクターでは、サルモネラと異なり鶏体内の垂直感染が起こらない[17]。養鶏場に搬入直後の素ヒナは通常、カンピロバクター陰性であるが、育雛中の飼育環境から汚染を受けることが報告されており[18, 19]、この汚染源の一つに野鳥があげられている[20]。野鳥が汚染源であった場合、野鳥→鶏→人あるいは、野鳥→牛→人の感染ルートも考えられることから、Penner D群の牛由来株と鶏由来株の遺伝子型が一致したのではないかと考えられる。今後、供

試菌株を増やすことで、野鳥、牛、鶏及び人の食中毒との関係について、より詳細に検討する必要があると考えられる。

以上のように、食中毒の原因となりうる*C. jejuni*が牛胆汁中に多量に存在することが明らかとなったことから、解体作業中の胆嚢の取り外しには十分注意し、胆汁からの汚染を拡散させないための対策を講じることが必要であると思われた。

引用文献

- [1] Olson CK, Ethelberg S, Wilfrid van Pelt, Tauxe RV : Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. *Campylobacter*, Nachamkin I, et al eds, 3rd ed, 163-189, ASM press, Washington DC (2008)
- [2] Jacob-Reitsma W, Lyhs U, Wagenaar J : *Campylobacter* in the Food Safety, Nachamkin I, et al eds, *Campylobacter*, 627-644, 3rd ed, Washington DC, ASM press (2008)
- [3] 小野一見 : 牛レバーや鶏レバーのカンピロバクター汚染状況, 食品衛生研究, 56, 17-24 (2006)
- [4] Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D : Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces, *J Clin Microbiol*, 19, 169-171 (1984)
- [5] Penner JL, Hennessy JN : Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens, *J Clin Microbiol*, 12, 732-737 (1980)
- [6] Datta S, Niwa H, Itoh K : Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces, *J Medical Microbiol*, 52, 345-348 (2003)
- [7] Lin J, Michel LO, Zhang Q : CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2124-2131 (2002)
- [8] Lin J, Sahin O, Michel LO, Zhang Q : Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*, *Infect Immun*, 71, 4250-4259 (2003)
- [9] Pickett CL, Pesc EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H : Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene, *Infect Immun*, 64, 2070-2078 (1996)
- [10] Ribot EM, Fitzgergald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett T : Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*, *J Clin Microbiol*, 39, 1889-1894 (2001)
- [11] Ono K, Kurazono T, Niwa H, Itoh K : Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, *Current Microbiol*, 47, 364-371 (2003)
- [12] 小野一見, 齊藤志保子, 川森文彦, 後藤公吉, 重茂克彦, 品川邦汎 : 市販鶏肉におけるカンピロバクターの定量検査と分離菌株の血清型, 日獣会誌, 57, 595-598 (2004)

- [13] Deun KV, Haesebrouck F, Heyndrickx M, Favoree, H, Dewulf J, Ceelen L, Demez L, Messns W, Leleu S, Immerseel FV, Ducatelle R, Pasma, F : Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin, *J Medical Biol*, 56, 1284–1289 (2007)
- [14] Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P : *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review, *Front Microbiol*, 2 article 200, 1–12 (2011)
- [15] Nielsen EM, Fussing V : Most *Campylobacter* subtypes from sporadic infections can be found in retail poultry products and food animals, *Epidemiol Infect*, 134, 758–767 (2006)
- [16] Ragimbeau C, Schneider F, Losch S, Even J, Mossong J : Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and *fla* short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg, *Appl Environ Microbiol*, 74, 7715–7722 (2008)
- [17] Shaker S : *Campylobacter jejuni* in broilers: the role of vertical transmission, *J Hyg Camb*, 96, 153–159 (1986)
- [18] Annan-Prah A, Janc M : The mode of spread of *Campylobacter jejuni/coli* to broiler flocks, *J Vet Med*, B35, 11–18 (1988)
- [19] Berndson E, Danielson T, Engvall ML : *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process, *Int J Food Microbiol*, 32, 35–47 (1996)
- [20] Smitherman RE, Genigeorgis CA, Farver TB : Preliminary observations on the occurrence of *Campylobacter jejuni* at four California chicken ranches, *J Food Prot*, 47, 293–298 (1984)

Contamination of Bile in Gallbladder of Beef Cattle with *Campylobacter jejuni* and Characteristics of Isolates

Kazuaki ONO[†]

* *Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan*

SUMMARY

Of 105 bile samples of cattle tested, 57 (54.3%) were found positive for *C. jejuni*. In 42.9% (45/105) of the samples, the measurement of *C. jejuni* in the bile exceeded 10^3 cfu/ml. The contamination level of *C. jejuni* in the bile of beef cattle was 1,000–10,000 times higher than that found in fresh chicken meat. Although 30% (12/40) of isolates were untypable, 35% (14/40) and 12.5% (5/40) of the isolates were serotyped as the Penner D and Penner B group, respectively. Forty bile isolates examined possessed seven virulence genes: *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cmeA*, *cmeB* and *cmeC*. Pulsed-field gel electrophoresis was also performed to determine the genotypic relatedness of isolates. All isolates from cattle bile showed high similarity to those from human patients and some showed identical band patterns to those from humans, using four different restriction enzymes. These data indicate that bile of beef cattle could be an important source of *C. jejuni* food poisoning for humans.

—Key words : bile of beef cattle, *Campylobacter jejuni*, pulsed-field gel electrophoresis, virulence gene.

[†] Correspondence to : Kazuaki ONO (*Saitama Institute of Public Health*)

639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-0824, Japan

TEL 048-853-7196 FAX 048-853-5164 E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 66, 713 ~ 717 (2013)