

カンピロバクターふき取り検査と迅速診断に関する一考察

塩田豊¹，小野寺佳隆¹，伊藤英之¹，向井裕¹

Rapid diagnosis of *campylobacter* in the wiping inspection

Yutaka SHIOTA, Yositaka ONODERA, Hideyuki ITO, Hiroshi MUKAI

Abstract : Eating raw bovine liver cause food poisonings every year, in which *campylobacter* plays a role because this bacillus resides in the enteric canal and bile of the cattle. To detect *campylobacter* bacilli in our inspection of hepatic *campylobacter* pollution, we used the wiped off materials from the cattle, and found that a possible pollution route could be through the enteric canal or bile to the liver. Moreover, we found that quick diagnosis of *campylobacter* infection is possible by the PCR procedure using a restriction enzyme *Alu*.

Key words : カンピロバクター *Campyrobacter*, 胆汁 bile, 腸管 enteric canal, 制限酵素 restriction enzyme

はじめに

平成17年2月に厚生労働省が発表した資料によると、平成17年に発生したカンピロバクター食中毒は牛生レバーの喫食が疑われるものが10件認められている。そのような現状にもかかわらず、現在でも牛生レバー喫食の習慣が続いているため、食中毒事件が後を絶たない。その牛肝臓の汚染に関しては腸管、胆汁由来の汚染が指摘されている。そこで今回、京都市と畜場内でふき取り検査を行い、牛での汚染実態を調査した。また、カンピロバクターのPCRを用いた迅速診断に関して若干の知見を得たので、その概要を報告する。

材料及び方法

京都市と畜場で処理された58頭の牛の十二指腸内容物、胆汁及び肝臓表面を滅菌綿棒を用いて無菌的に拭き取ったものを検査材料とした。カンピロバクターの検出法は、拭き取った綿棒を10mlのプレストン培地に加えて42℃18~24時間微好気培養し、一白金耳をCCDA培地に塗布して42℃48時間微好気培養した。そして培地上の集落を形態学的に観察した後、さらに5%羊血液加寒天培地で純培養しオキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、馬尿酸加水分解試験を行った。またPCRによる迅速診断に関しては、ふき取り検査に供した検体のプレストン培養液2mlを煮沸処理しDNAを簡易抽出した後、FERMERらの方法に準じて¹⁾、カンピロバクター属菌特有の23SrRNA遺伝子(491bp)を標的にプライマーTHERM1、THERM4を用いてPCRを行った。

PCRは94℃5分を1サイクル、94℃1分、56℃1分、72℃1分を35サイクル、72℃5分を1サイクルの条件で行い、2%アガロースゲル電気泳動によってバンドを確認した。その後増幅した23SrRNA遺伝子を制限酵素*Alu*を用い37℃2時間の条件で消化した後電気泳動を行い遺伝子の消化パターンによって菌種の同定を行った。

成績

拭き取り検査では58頭中十二指腸で27頭(47%)から、胆汁では20頭(34%)から、肝臓表面では16頭(27%)からカンピロバクターが検出された。陽性検体中の菌種として、十二指腸では*C. jejuni*が23検体、*C. coli*が3検体から検出され、*C. jejuni*及び*C. coli*が同一検体から検出されたものが1検体あった。胆汁では*C. jejuni*が18検体、*C. coli*が2検体から検出された。肝臓表面では*C. jejuni*のみ検出された。拭き取り検査結果を表1に示す。

プレストン培養液のPCRの結果、カンピロバクター陽性検体は491bpのPCR産物が見られた(図1)。その後そのPCR産物を制限酵素*Alu*で切断すると*C. jejuni*は200, 160, 120bpで、*C. coli*は290, 200bpでバンドが確認された。また両菌種が混在するものは290, 200, 160, 120bpでバンドが確認された(図2)。

表1 ふき取り検査結果

部位	検体数	陽性	内訳	菌種
十二指腸	58	27	23	<i>C. jejuni</i>
			3	<i>C. coli</i>
			1	<i>C. jejuni</i> and <i>coli</i>
胆汁	58	20	18	<i>C. jejuni</i>
			1	<i>C. coli</i>
肝臓表面	58	16	16	<i>C. jejuni</i>

¹ 京都市衛生公害研究所 病理部門

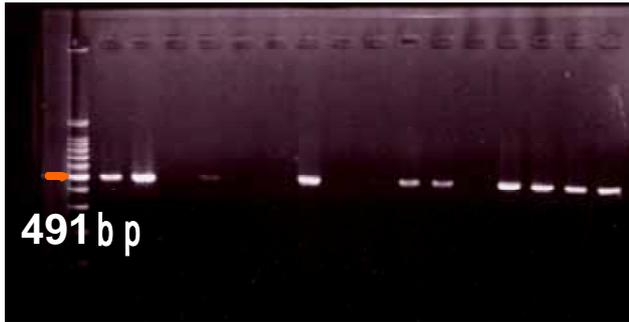


図1 プライマーTHERM1,4による電気泳動像



図2 制限酵素Alu で切断後の電気泳動像

考察

過去5年間の厚生労働省食中毒統計によると、カンピロバクター食中毒は各年450件前後発生しており、患者数は1,700~2,600人前後を推移している²⁾。この中には牛生レバーの喫食が原因と思われる事件も含まれてるが、世間一般では未だに、生レバー喫食の危険性は十分に認知されていないのが現状である。牛がどのようにしてカンピロバクターに汚染されるかは未だ定かではないが肝臓の汚染原因としては十二指腸由来の汚染が示唆されている。実際今回のふき取り調査から十二指腸、胆汁、肝臓表面の保菌率が47%、34%、27%であったことから肝臓の汚染は十二指腸から胆汁の経路で汚染していくと推察された。肝臓実質への汚染経路に関しては、十二指腸から総胆管を介して胆汁に定着したカンピロバクターが、と殺時の肝臓の圧迫や内圧の変化によって肝臓内に逆流するのではないかと疑われているが³⁾、今回の肝臓表面の拭き取り検査で肝臓表面から高確率でカンピロバクターが検出されたことで、と畜解体時に十二指腸や胆汁から汚染する可能性も示唆されたため、と畜解体時は十二指腸や胆嚢の取り扱いには十分に注

意することが重要であろう。しかし現在の食肉処理技術では100%カンピロバクターを除去するのは困難であるため、やはり最善の方法は生レバーや未加熱処理肉を食べないことしかないであろう。これまで行っていた標準的なカンピロバクターの同定法は増菌培養、純培養、同定試験の3工程が必要でありその労力は大きい。しかも純培養が難しく複数の菌種が混在していると、その結果、馬尿酸加水分解試験、API キットでは菌の同定まで明瞭な結果が出ないことがあった。今回行った PCR 検査では増菌培養から純培養を省略して同定試験が行うことができ検査時間の短縮になった。また制限酵素 *Alu* を用いることにより菌種の同定や混合感染の有無も確認できる利点があった。

参考文献

- 1) Christian Fermer and Era Olsson Engrall : J. Clin. Microbiol. Oct. 1999, p. 3370-3373
- 2) 厚生労働省：牛レバーによるカンピロバクター食中毒予防について（2005-2）
- 3) 杓木力晴，大阪市食肉衛生検査所：牛肝臓におけるカンピロバクターの危害評価に関する研究（2001）