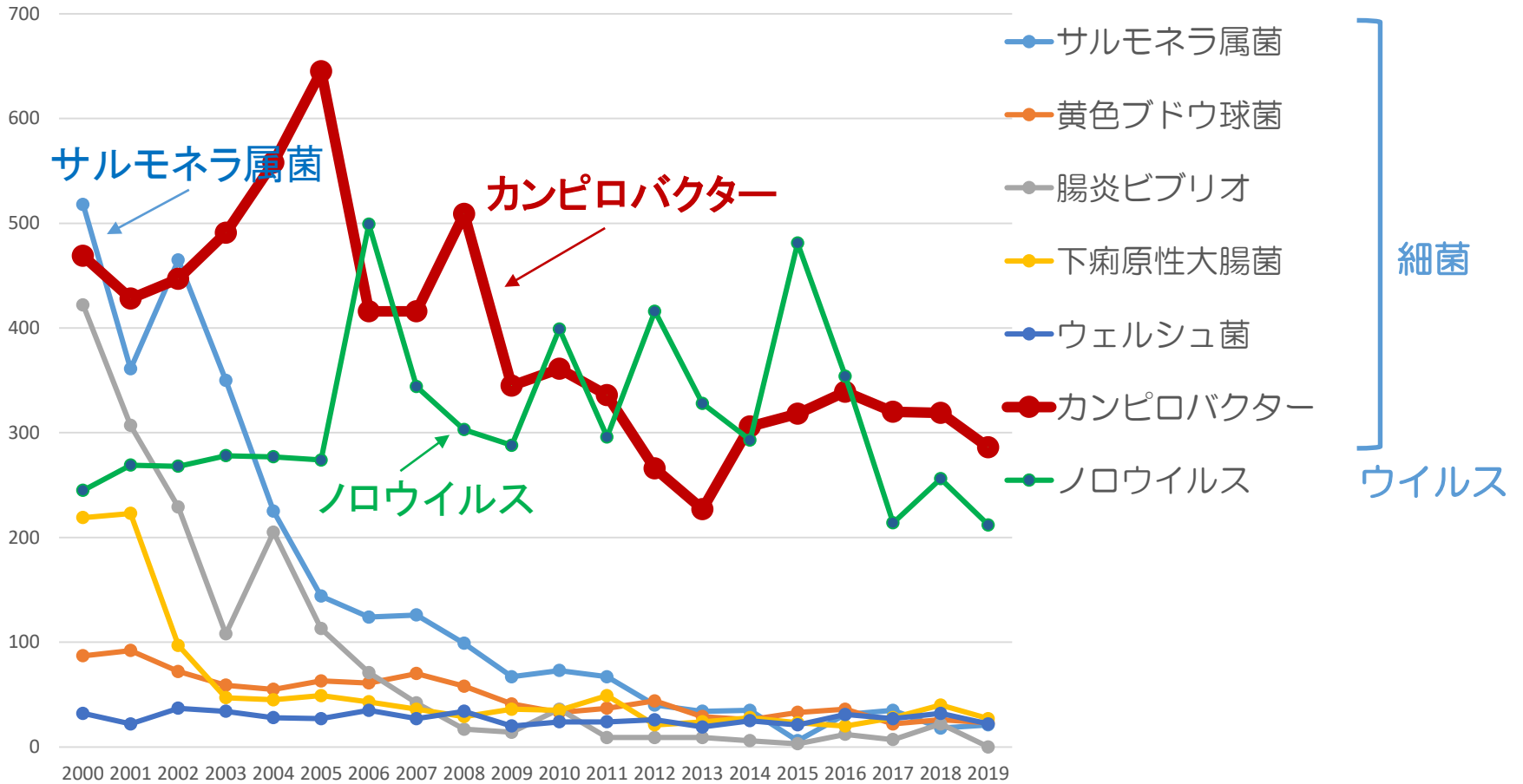


2018～2019年度食品健康影響評価技術研究
国内で多発するカンピロバクター食中毒
の定量的リスク分析に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所
朝倉 宏

背景

食中毒発生状況（病因物質別事件数、平成10年～令和元年）



出典：厚生労働省食中毒統計資料

カンピロバクター食中毒

<原因菌の主な特徴>

- 家畜、家禽類の腸管内に生息し、食肉、内臓肉や飲料水等を汚染する
- 乾燥に極めて弱い
- 大気中では増殖できない（微好気性）
- 本食中毒のおよそ9割は*C. jejuni*による
- 42℃で良好な発育を示す
- 最少発症菌数：500-800CFU（推定値）



<症状>

- 潜伏期は1～7日と比較的長い（海外では2時間の報告も有）
- 症状は発熱、倦怠感、頭痛、吐き気、腹痛、下痢、血便等
- ギラン・バレー症候群（GBS）の先行感染症

<現在の主な対策>

- 食肉・食鳥肉処理場での衛生管理、二次汚染防止を徹底する。
- 調理器具を熱湯消毒、よく乾燥させる。
- 食肉と他の食品との接触を防ぐ（交叉汚染防止）
- 食肉は調理段階において十分な加熱を行う。

現状の主な課題

1. 定量的な汚染実態の把握が不十分

- 本菌の特性上、コントロールが難しい
- フードチェーンに沿って、同一の検査法で継続的に調査された結果（ベースラインデータ）がない 等
→ 各段階での定量的汚染データの収集が必要

2. 食中毒が減らない

- ①加熱用として流通・販売されるべき鶏肉が、生食または加熱不十分な状態で喫食されている
- ②鶏肉中の菌数を効果的に下げることが困難
→ 健康被害実態等、更なる知見の収集が必要

- 鶏は感染しても症状を示さない
- 陰性鶏群を生産しても、経済的メリットがない
- 汚染鶏・鶏肉により容易に交差汚染が起こる 等

研究構成

国内の食鳥肉に係る汚染実態 → モニタリング計画の策定及び実施

Q1: 鶏腸管内で本菌はどのように経時変動するかは不明
(一般的に、3-4週齢で保菌し始め、出荷前の7-8週齢で急増することは周知)

➡ 鶏体内での本菌経時変動の検討

Q2: 国内の食鳥処理工程を通じた本菌の定量的汚染動態は不明

➡ 食鳥処理及び流通段階での本菌の汚染動態の検討

ヒトの健康被害実態 → 疫学情報の集積等

Q3: 日本国内で多発する食中毒患者の発症菌数は不明

➡ 食中毒事例における発症菌数の把握：方法論の構築と検証

Q4: 届け出のある食中毒事件は氷山の一角であるため本食中毒の被害実態及び食品寄与率は不明

➡ 食中毒被害実態及び食品寄与率の推定に関する検討

Q5: 本食中毒はギラン・バレー症候群（GBS）の先行感染となりうると想定されているが、原因菌の特性等は不明

➡ GBSに関連性の高い菌株のゲノム特性の解析

(1) 鶏の生育過程における動態解析

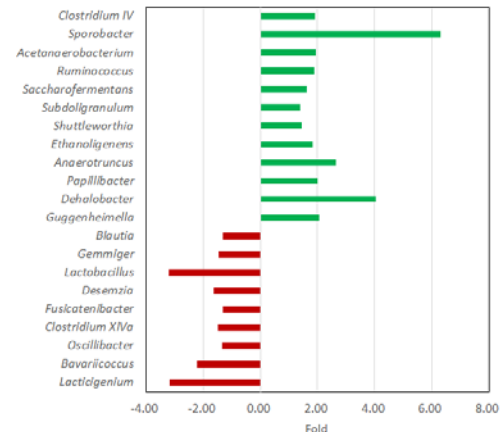
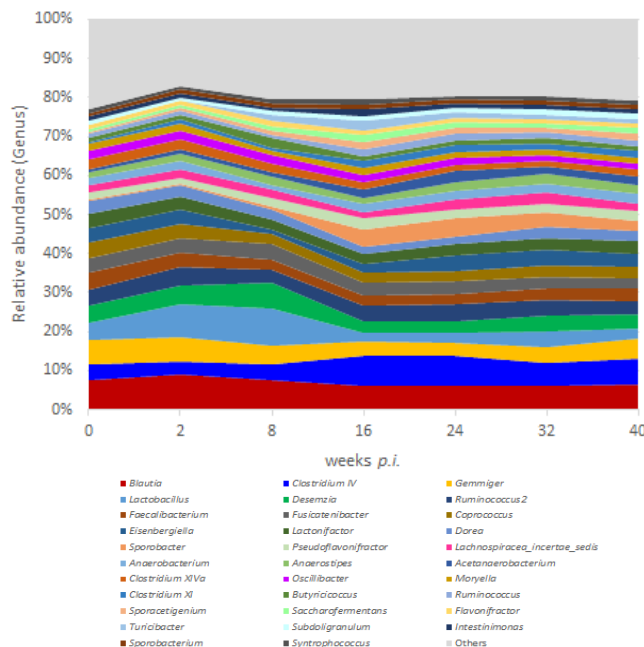
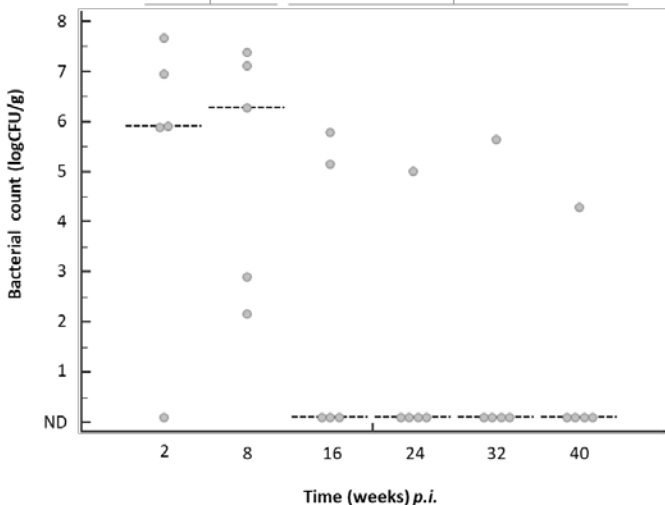
(研究分担者：国立医薬品食品衛生研究所 中山達哉)

【研究背景】過去に行われた厚生労働科学研究では、主として成鶏を原料肉として製造加工される生食用食鳥肉のカンピロバクター汚染菌数は加熱用のものに比べて低い成績が報告されている。一方、**成鶏**のように**長期飼育**を経て出荷される食鳥の生育過程を通じた本菌の定量的動態については国内外を含め報告がない。

【達成目標】動物実験計画に沿って、鶏への感染実験を行い、適切に飼育・採材すると共に、定量解析及び菌叢解析を実施する。

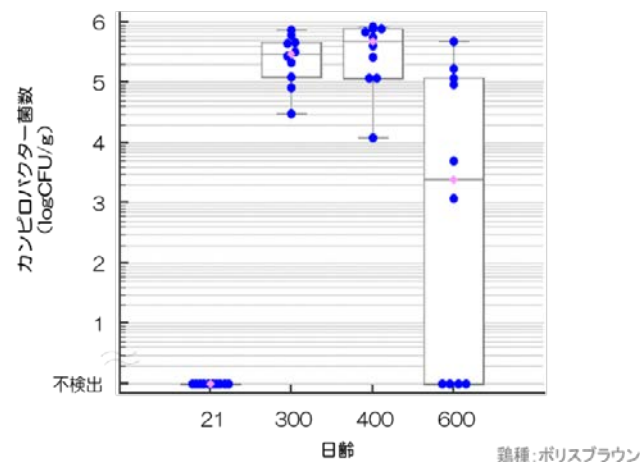
【材料及び方法】鶏への長期感染実験を行うため、所属機関規則に従って動物実験計画を申請し承認を得た。その後、Line-M系のSPF鶏2週齢メスを導入し、実験を開始した。同鶏生体に 2.0×10^7 CFUの*C. jejuni* 81-176株を単回経口投与し、感染0週間後、2週間後、2か月後、4か月後、6か月後、8か月後、10か月後に盲腸内容中の被験菌数をISO10272:2017-2に準じた方法により求めた。また、各採材時点より3検体を無作為抽出し、16S rRNA菌叢解析に供した。

p=0.0002



(MS in prep)

- 感染2週後には鶏盲腸内容1gあたり $6.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^7$ CFUの接種菌が検出
- 感染16週後以降は陰性個体が増加し、菌数も低減傾向
- 日数経過に伴い菌叢も変動を認めた (*Clostridium* IV, *Sporobacter* spp.等の増加, *Lactobacillus* spp.の減少等)
- 感染0-8週後と16-40週後間で菌叢構成成分に差異を認めた
- ある採卵鶏農場で異なる日齢の採卵鶏盲腸便を採材し、本菌の定量検出試験を行ったところ、300-400日齢個体に比べ、600日齢個体では有意に低値を示した



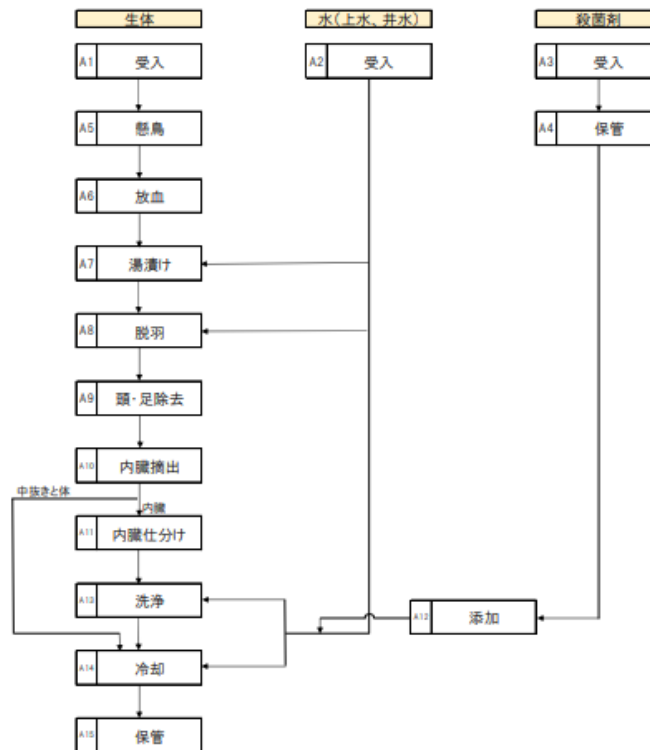
単回投与後の長期飼育を通じ、採卵鶏盲腸内のカンピロバクター菌数は減少し、菌叢も相関性をもちつつ変動することが確認された

今後の課題：複数回投与を行った際の動態、肉用鶏での動態

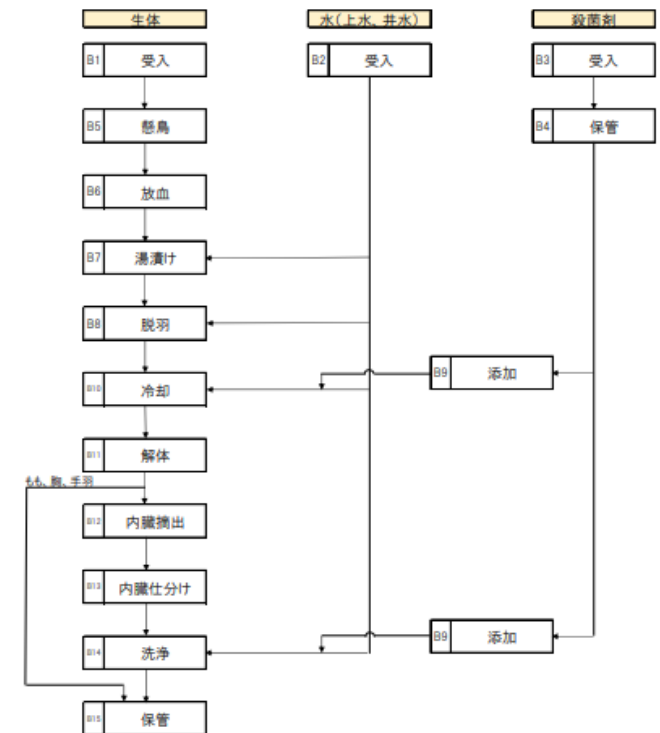
食鳥処理工程

- 食鳥処理方式は、中抜き方式と外剥ぎ方式に大別される。

<中抜き方式>



<外剥ぎ方式>



認定小規模食鳥処理場のための
HACCP の考え方を取り入れた
衛生管理の手引書



一般社団法人日本食鳥協会

食鳥処理場の構成（厚生労働省調査，令和元年度実績）

・処理羽数（規模）別

規模別	施設数	処理羽数
大規模食鳥処理場	143 (8.0%)	811,142,444 (97.6%)
認定小規模食鳥処理場	1,636 (92.0%)	20,168,114 (2.4%)
計	1,779 (100.0%)	831,310,558 (100.0%)

・処理方式別

処理方式	施設数*	処理羽数
中抜き	354 (19.9%)	766,329,740 (92.2%)
外剥ぎ	622 (35.0%)	59,473,845 (7.2%)
両方(認定小規模のみ)	125 (7.0%)	3,245,222 (0.4%)
その他(丸とたいを出荷)	96 (5.4%)	2,261,751 (0.3%)
休止中または実績無	551 (31.0%)	-
計		831,310,558 (100.0%)

出典：厚生労働省 と畜・食鳥検査等に関する実態調査の結果について
 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000689979.pdf>)

食鳥処理場で処理される家禽種別と処理羽数（厚労省調査、令和元年度実績）

- 大規模食鳥処理場

処理方式	家禽種別	処理羽数
中抜き	ブロイラー	707,952,957 (87.3%)
	成鶏	53,767,304 (6.6%)
	その他	439,213 (0.1%)
外剥ぎ	ブロイラー	14,085,659 (1.7%)
	成鶏	34,447,517 (4.2%)
	その他	51 (<0.1%)

- 認定小規模食鳥処理場

処理方式	家禽種別	処理羽数
中抜き	ブロイラー	1,638,757 (8.1%)
	成鶏	2,370,326 (11.8%)
	その他	161,183 (0.8%)
外剥ぎ	ブロイラー	3,746,896 (18.6%)
	成鶏	5,790,427 (28.7%)
	その他	1,403,295 (7.0%)

(2) 生食用食鳥肉の生産から流通に至る本菌汚染動態に関する検討

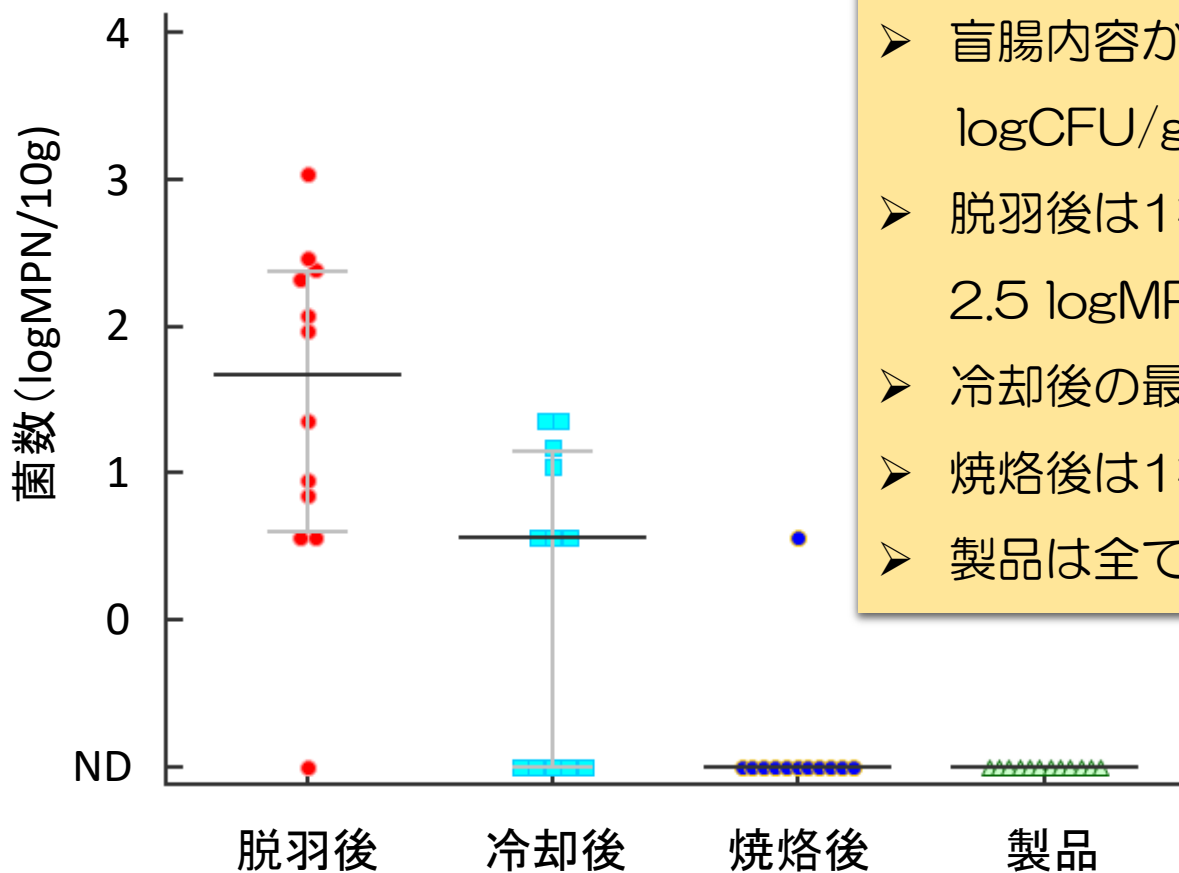
(研究分担者：鹿児島大学 中馬猛久)

【背景・目的】鹿児島県内では生食用食鳥肉が製造・流通されるが、消費量の大きさにも関わらず、同地域での本食中毒発生は相対的に少ない。本研究では、生食用食鳥肉を取り扱う認定小規模食鳥処理場（外剥ぎ方式）で当該食品の製造加工工程を通じたカンピロバクター汚染菌数の推移を求めることを目的とした。

【達成目標】外剥ぎ方式で生食用食鳥肉を製造加工する施設にて、処理工程を通じた、カンピロバクター定量動態を評価する。

【材料及び方法】鹿児島県が定めた「生食用食鳥肉の衛生基準」に基づき、生食用食鳥肉を取扱う、鹿児島県内の認定小規模食鳥処理場の協力を要請し協力の承諾を得た。予め搬入鶏群（成鶏）の盲腸内容物におけるカンピロバクター汚染状況を把握した上で、製造加工工程では本菌陽性を示す食鳥とたいより鶏皮を、製品からは皮を含む検体を採材し、定量試験により動態を解析した。

- 生食用食鳥肉の原料として供された計48羽の盲腸内容菌数、及び同一個体の各処理過程におけるカンピロバクター菌数動態を評価



- 盲腸内容からの検出菌数は平均値が3.6 logCFU/g、最大値が7.7 logCFU/g
- 脱羽後は1検体を除き検出され、最大値は2.5 logMPN/10g
- 冷却後の最大値は1.4 logMPN/10g
- 焼烙後は1検体を除き陰性
- 製品は全て陰性

- 外剥ぎ方式の施設では内臓摘出時の腸管内容物がとたいに付着する可能性は低く実際に脱羽後工程での汚染菌数も1検体を除き、低値であった。
- 製造工程管理上、焼烙～カット（部位分け）工程は特に重点的に管理すべきと考えられた。

(3) 肉用鶏の生産から流通に至る本菌汚染動態に関する検討①

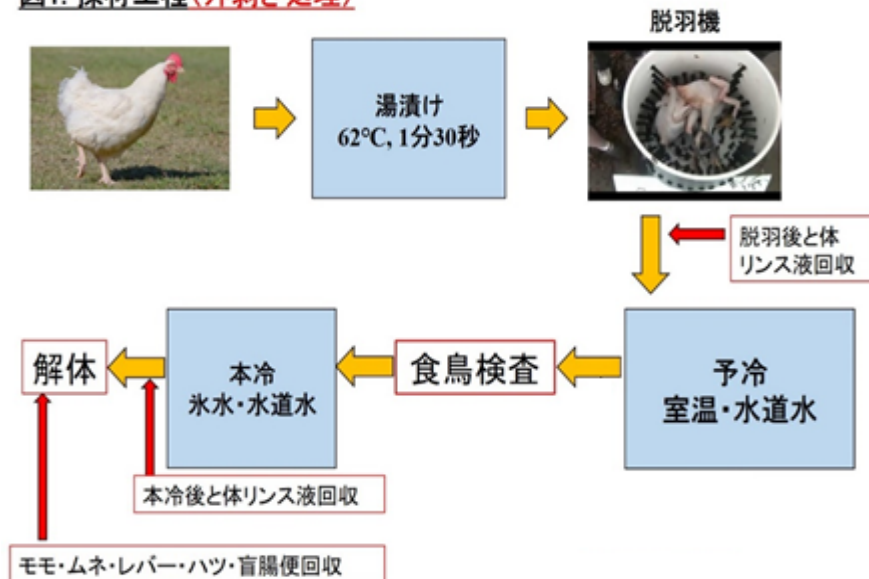
(研究分担者：大阪府立大学 山崎伸二)

【背景・目的】食鳥処理工程でのカンピロバクター汚染状況を定量的に把握することを目的として、**小規模食鳥処理場（処理羽数約1,400羽/日、外剥ぎ方式）**で工程を通じた本菌定量解析を行った。

【達成目標】肉用鶏の小規模食鳥処理場における汚染菌数の動態解析を開始する。

【材料及び方法】西日本の認定小規模食鳥処理場の協力を得た上で、同施設で外剥ぎ処理により解体された食鳥とたいより検体（1. 脱羽後、2. 冷却後、3. モモ、4. ムネ、5. レバー、6. ハツ、7. 盲腸便）を対象に、ISO 10272-2:2017に基づく定量培養法及びリアルタイムPCR法による定量解析を行った。

図1. 採材工程(外剥ぎ処理)



Campylobacterによる汚染状況(5羽、同一個体由来)

検体	菌数 (log CFU/g)
	(means \pm SD)
盲腸便	6.44 \pm 0.26
脱羽後とたい	1.88 \pm 0.42
冷却後とたい	1.16 \pm 0.46
可食部位	
モモ	2.53 \pm 0.53
ムネ	2.63 \pm 0.22
ハツ	1.53 \pm 1.01
レバー	2.42 \pm 0.60

- 平均6.44logCFU/gのカンピロバクターを盲腸便中に保菌する肉用鶏5羽は食鳥処理（外剥ぎ）を通じて、脱羽後には1.88logCFU/g、冷却後には1.16logCFU/gの菌数動態を示した。
- 鶏内臓肉（ハツ、レバー）は約1.53logCFU/gまたは2.42logCFU/gの本菌汚染を認め、外剥ぎ方式であっても、内臓肉の生食はリスクを伴うことが示された。
- 中抜き方式施設でも同様の検討を行ったが全て陰性鶏群であった。
- 生産農場出荷時の迅速判定試験の確立が今後の課題と想定された。

(4) 肉用鶏の生産から流通に至る本菌汚染動態に関する検討②

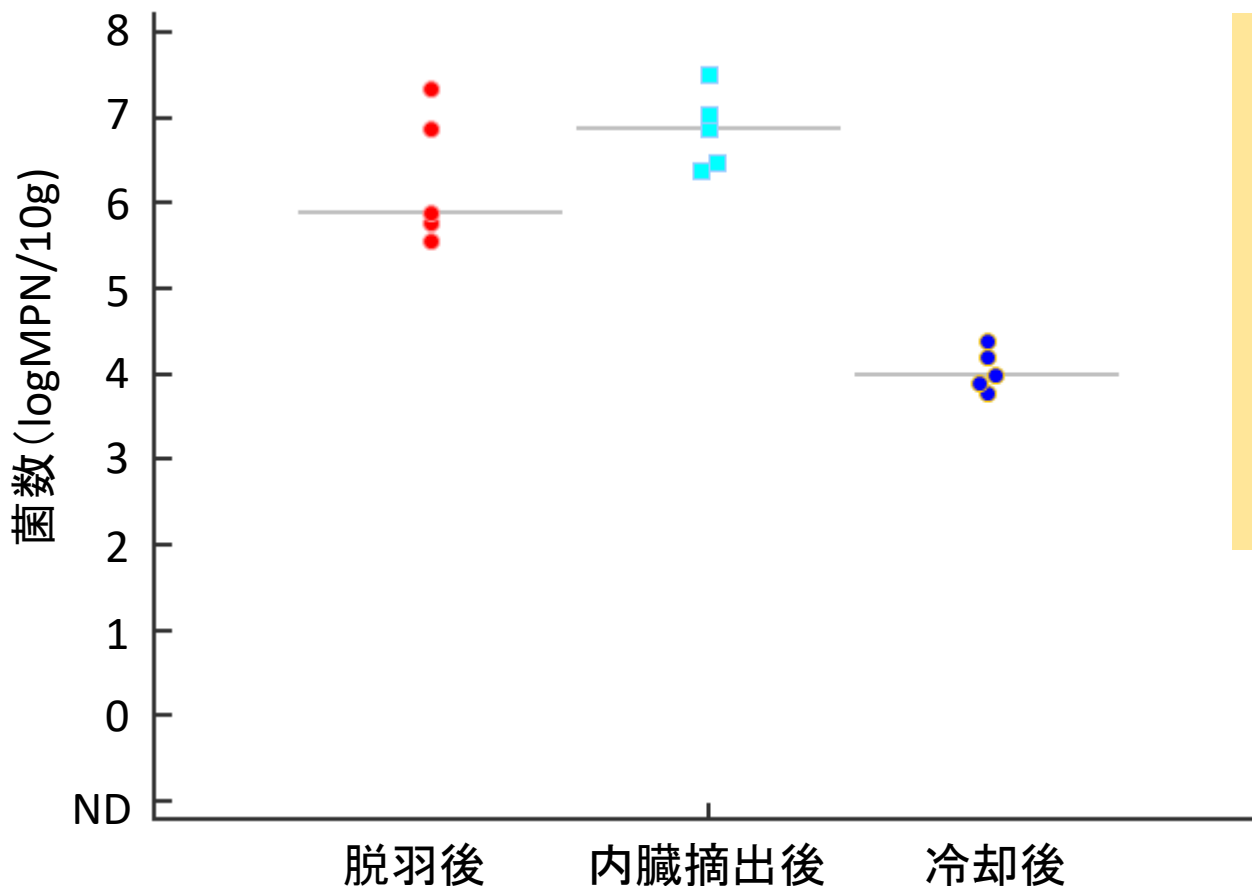
(研究分担者：国立医薬品食品衛生研究所 佐々木貴正)

【背景・目的】 **大規模食鳥処理場**（処理羽数約7.6万羽/日）で**中抜き**処理される鶏群について、食鳥処理工程を通じたカンピロバクター汚染動態を定量的に評価することを目的とした。

【達成目標】 大規模食鳥処理場において、肉用若鳥（とたい）の汚染菌数の定量評価を開始する。

【材料及び方法】 定量試験はISO 10272-2:2017に従い、盲腸内容は1 g、胸肉・肝臓は25gを計量し、9倍量の0.1%チオ硫酸ナトリウム加BPW液を加え、ストマッキング処理後、PBSにて階段希釈し、各希釈液100 μ LをmCCDA寒天培地に植菌し、42 $^{\circ}$ Cで48時間微好気培養した。培養後は定型発育集落数を計数し、確認試験を行い、検体1 gあたりの菌数を求めた。

〈ある同一ロットでのデータ〉



- 盲腸内容の平均値は 6.5logCFU/g
- 脱羽後の平均値は 6.3logCFU/と体
- 内臓摘出後の平均値は 6.8 logCFU/と体
- 冷却後の平均値は 4.0logCFU/と体
- 鶏肉中の菌数は1.5-2.8logCFU/g

- 対象処理場（肉用若鳥を中抜き方式で処理する大規模食鳥処理場）では初発菌数・陽性率共に高く、最終製品（鶏肉）も1.5-2.8logCFU/gと高い汚染を示した。
- 処理工程では冷却工程前後で明確な菌数低減が図られる状況を確認でき、本工程を重要管理点とする意義を裏付ける結果と捉えられた。
- 今後検討すべき課題としては、高濃度汚染鶏群の搬入制御、脱羽工程での汚染低減策の構築 内臓摘出時の腸管内容物による交叉汚染の制御等が考えられた

(5) 食鳥処理工程を通じた本菌汚染動態に関する定量的リスク分析

(研究担当者名：山口大学 豊福肇)

JEMRAが報告する「Risk Management Tool for the Control of *Campylobacter* and *Salmonella* spp. in Chicken Meat」を定量的リスク分析に用いることが国際整合の観点からも有用と考えられたため、同ツールを本研究班の個別課題（2）及び（4）データに採用して検討。

A：個別課題（2）のデータ

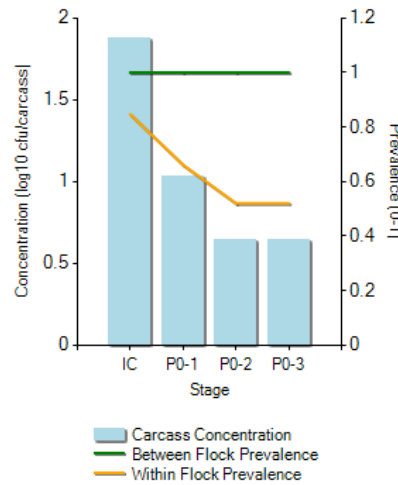
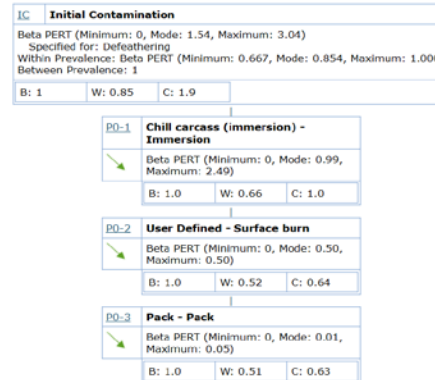
B：個別課題（4）のデータ

（右図の，“Mode”は最も妥当と考えられる数値（但し今回は限定的な検体数のため平均値を採用），+と↘は前工程の検出菌数に対する増減を各々意味する。X軸上の文字はICが共に，“脱羽後とたい”，セクションAのPO-1～-3は，“冷却後”，“焼烙後とたい”，“最終製品”（生食用食鳥肉製品），セクションBのPO-1～2は，“内臓摘出後”，“冷却後とたい”をそれぞれ指す。また，水図の淡青色バー，黄色線，緑色線は，“工程毎の菌数”，“鶏群内での陽性率”，“鶏群内陽性率”を示す）

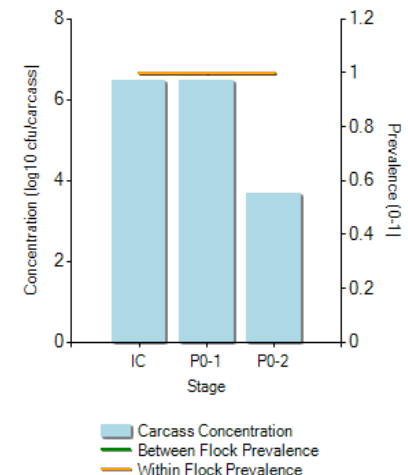
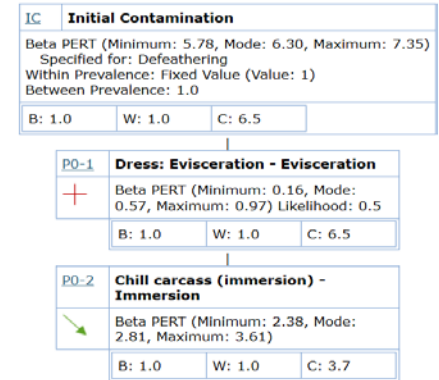


A：冷却後，焼烙後とたいは，標的菌はほぼ不検出であり特段の介入研究は不要と思われた（但しサルモネラ属菌による汚染は不明）
 B：脱羽後に比べ，内臓摘出後とたいは菌数増加を示し，交叉汚染の発生が推察されたほか，冷却工程では明確な菌数減少を認め，同工程がリスク低減に機能している実態が数的に示された。

A



B



食鳥処理工程段階における定量的データの更なる集積は，本菌による健康被害低減に向けたリスク管理策の効果の評価する上で必要且つ有用と考えられた。

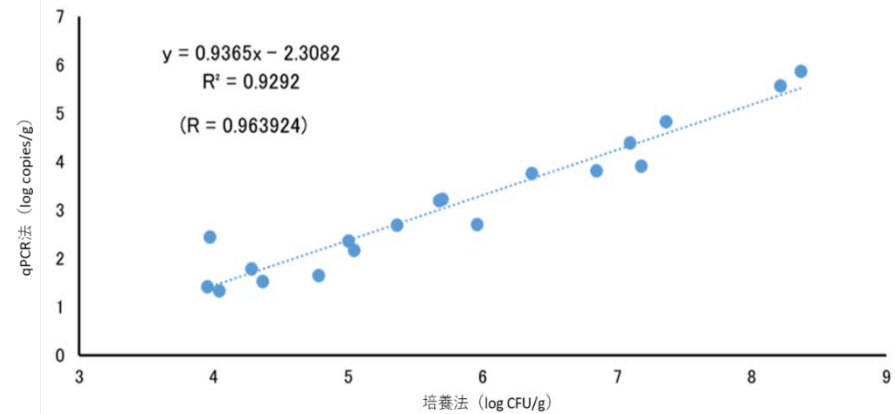
(6) 食中毒発症患者における菌数把握に関する検討

(研究分担者：大阪健康安全基盤研究所 坂田淳子、
国立医薬品食品衛生研究所 朝倉宏)

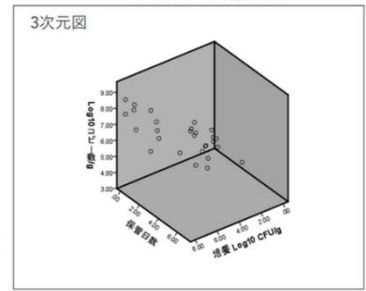
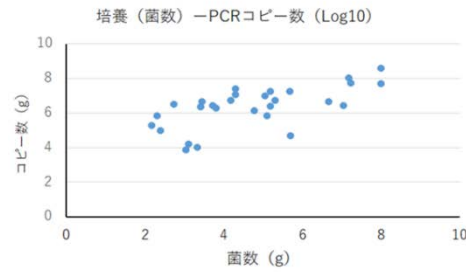
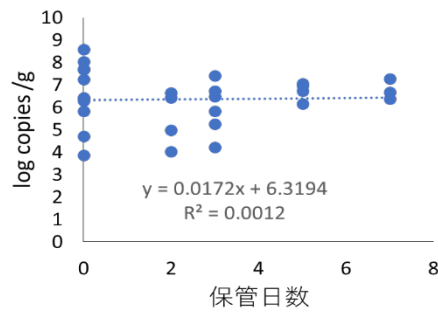
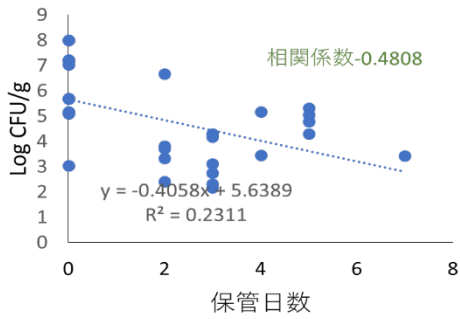
【背景・目的】日本国内で多発するカンピロバクター食中毒患者の発症菌数は不明であることから、食中毒事例患者由来検体における当該菌数を定量的に求めることを目的とした。

【達成目標】定量リアルタイムPCR法及び培養法を用いて、カンピロバクター食中毒事例由来検体中の原因菌定量解析を行う。

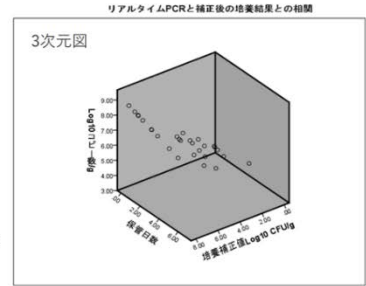
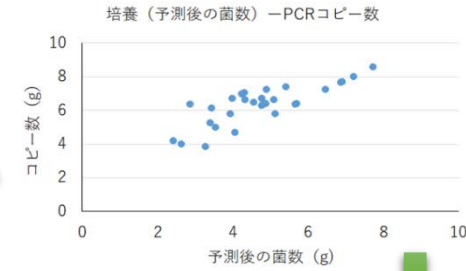
【材料及び方法】大阪健康安全基盤研究所，島根県保健環境科学研究所，東京都健康安全研究センターで食中毒患者由来検体からの定量検出を培養法及び（または）定量リアルタイムPCR法により行った。更に、坂田らのデータについては疫学情報を加味した統計解析を行い、菌数分布と関連性を示す因子の探索を行った。



添加回収試験を通じたqPCR法の評価
：培養法（定量法）成績の相関性評価



➤ 検体保管日数により培養菌数が低減 (qPCR値は変動なし)



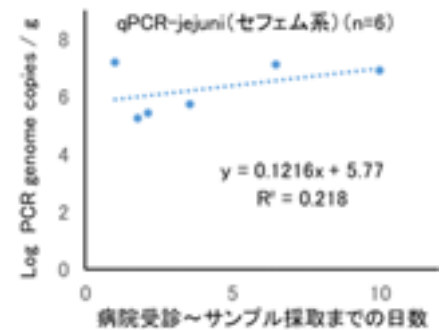
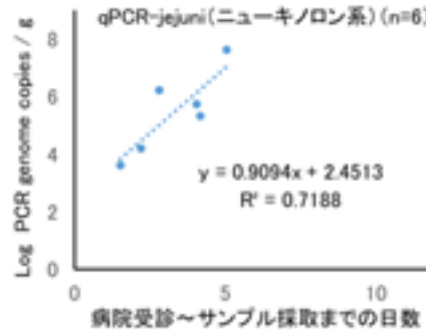
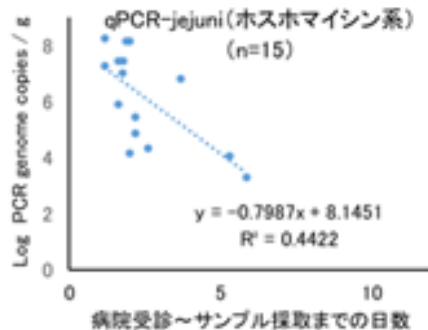
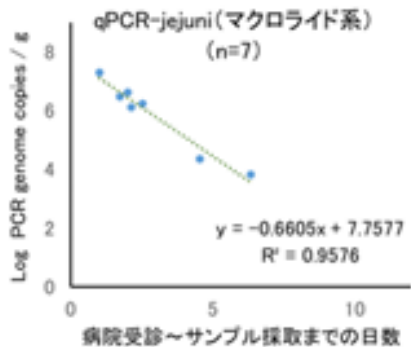
重回帰分析により補正式を作成し、qPCR法成績から検体中の菌数を予測する手法を作成

最少菌数は約 10^3 CFUと算出

- 冷凍或いは長期保管された食品検体でも菌数予測を行える手法としての応用が期待
- 疫学情報を踏まえた解析を通じ、抗菌剤服用患者検体からの検出手法の適切な選択が原因究明向上に資することが明らかとなった

投薬の有効性が明確＝服用期間によっては培養法で検出困難

投薬の有効性が不明＝培養法でも検出可能



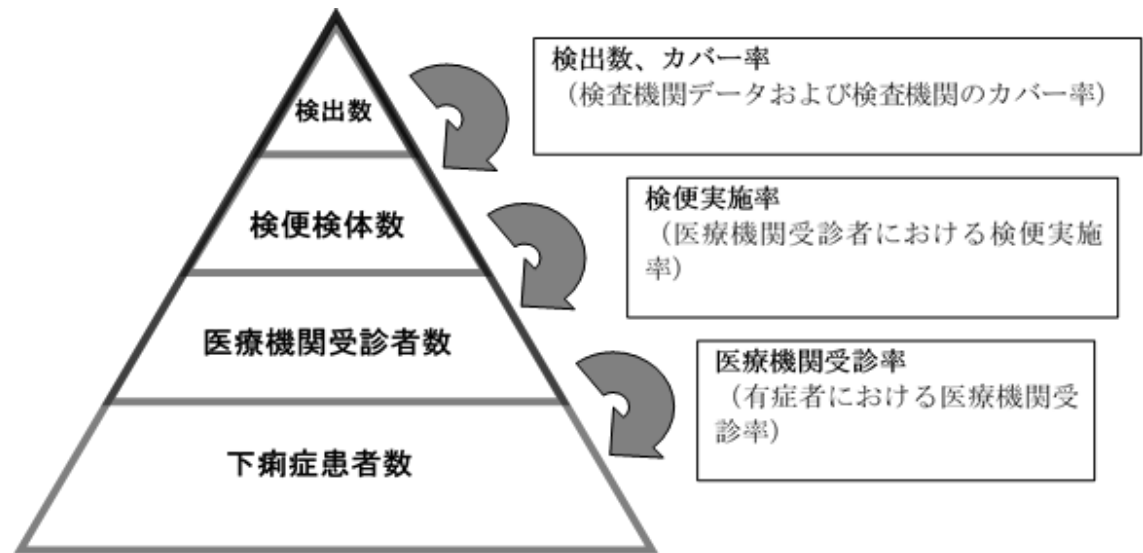
(7) 食中毒被害実態推定に関する検討

(研究分担者：国立医薬品食品衛生研究所 窪田邦宏)

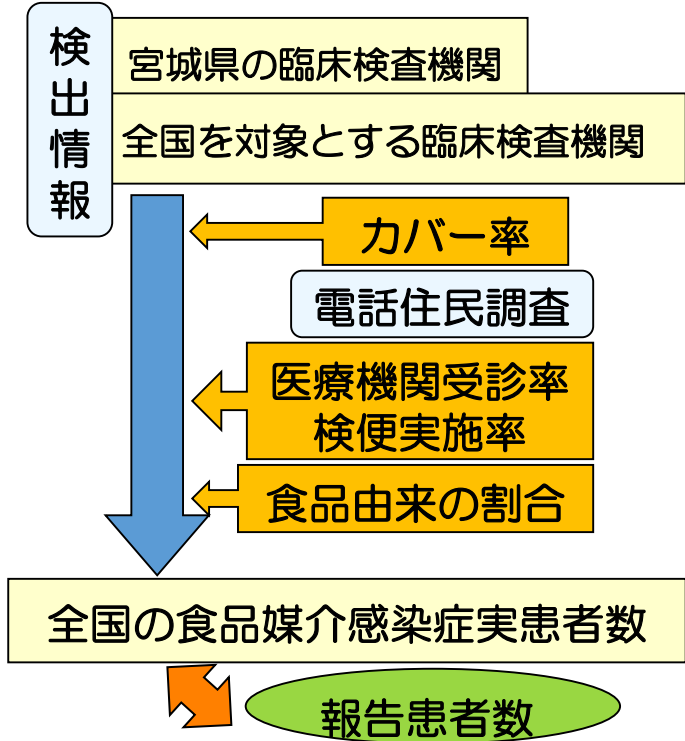
【背景・目的】食中毒のより正確な被害実態を継続した把握を行い、長期にわたる発生傾向の把握を通じ、科学的根拠に基づく食品衛生行政における施策決定や各種評価へ活用可能な被害実態推定データを集積することを目的とする。

【達成目標】臨床検査機関からのデータ収集に関する承諾を得た上で、データ収集及び解析を進められるよう調整を行う。

【材料及び方法】国内主要臨床検査機関3社及び宮城県等からのデータ提供依頼を行い、了承を得た。2017年及び2018年のデータを収集し、同データを活用して被害実態を推定した。



アクティブサーベイランスデータに基づく食品由来下痢症疾患の実患者数推定と食中毒患者報告数 (2006~18年)



食中毒菌	年	検出数	推定食品由来患者数 (全国)	食中毒患者報告数 (全国)
カンピロバクター	2006	10,144	10,463,071	2,297
	2007	10,962	13,543,466	2,396
	2008	12,934	11,339,146	3,071
	2009	14,057	8,559,932	2,206
	2010	15,401	8,549,830	2,092
	2011	14,950	8,342,000	2,341
	2012	12,794	5,498,827	1,834
	2013	13,947	5,828,531	1,551
	2014	16,762	7,039,646	1,893
	2015	18,164	8,080,859	2,089
	2016	18,547	8,512,871	3,272
	2017	19,844	6,721,577	2,315
	2018	19,565	7,212,407	1,995
サルモネラ	2006	1,888	2,312,520	2,053
	2007	1,886	2,767,039	3,603
	2008	1,894	1,971,792	2,551
	2009	2,059	1,488,907	1,518
	2010	2,434	1,604,585	2,476
	2011	2,705	1,792,379	3,068
	2012	2,258	1,152,448	670
	2013	2,324	1,153,315	861
	2014	2,726	1,359,516	440
	2015	2,728	1,441,199	1,918
	2016	2,689	1,465,638	704
	2017	3,090	1,242,894	1,183
	2018	3,103	1,358,363	640
腸炎ビブリオ	2006	523	438,304	1,236
	2007	421	422,616	1,278
	2008	216	153,860	168
	2009	227	112,312	280
	2010	563	253,945	579
	2011	351	159,133	87
	2012	312	108,954	124
	2013	287	97,450	164
	2014	209	71,317	47
	2015	138	49,883	224
	2016	232	86,519	240
	2017	208	57,244	97
	2018	188	55,710	222

・カンピロバクター食中毒患者数は最大で721万人と推計(2018年)。(既存サーベイランスシステムによる食中毒患者報告数の約3600倍の患者数が推定)

・患者報告数と推定患者数との間で経年変動は必ずしも一致していない。

継続したアクティブサーベイランスシステムは既存のサーベイランスシステムの補完に有用

(8) カンピロバクター食中毒の原因食品寄与率推定に関する検討

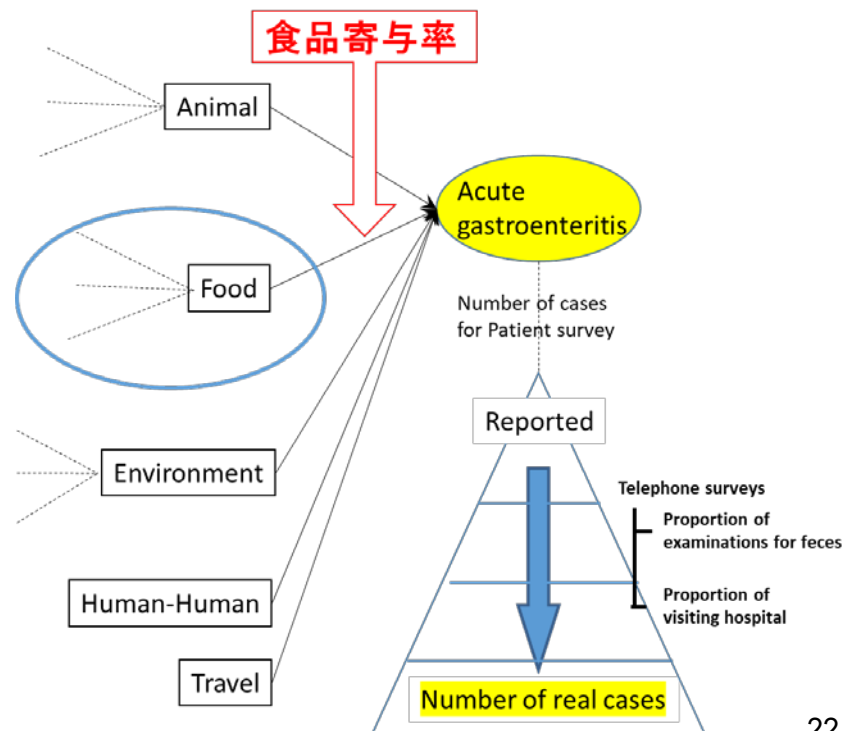
(研究分担者：和洋女子大学 熊谷優子)

【背景・目的】カンピロバクター感染に係る食品寄与率は各国の食習慣等による影響を受けると想定される。国内では近年鶏肉が本食中毒の原因食品として占める割合が増加傾向にあると推察されるため、これを裏付ける知見の創出を目的として検討を進めた。

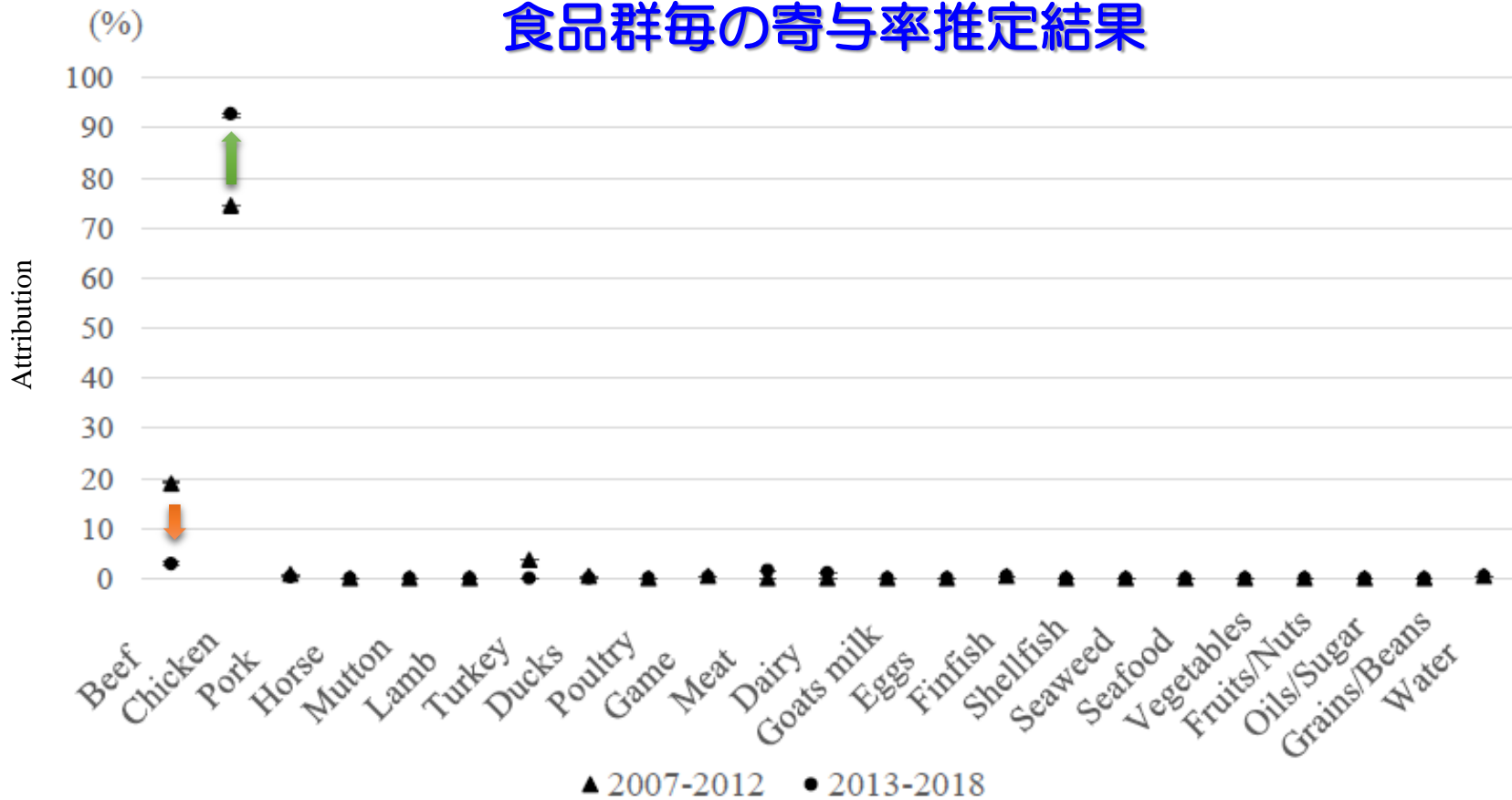
【達成目標】食中毒調査結果や専門家の意見に基づく食品寄与率推計作業を進行させると共に、関連文献収集等を進める。

【材料及び方法】カンピロバクター研究会参加者を対象に調査を行い、回収成績を基に解析を進めた。また、国内分離株のMLST解析情報の収集にあたった。

1. 疫学的手法
食中毒のアウトブレイク調査情報
散発例の症例対照研究
2. 微生物学的手法
病原体の微生物学的サブタイピング
微生物学的リスクアセスメント
3. 介入研究による解析手法
4. 専門家の意見による解析手法
(expert elicitation)

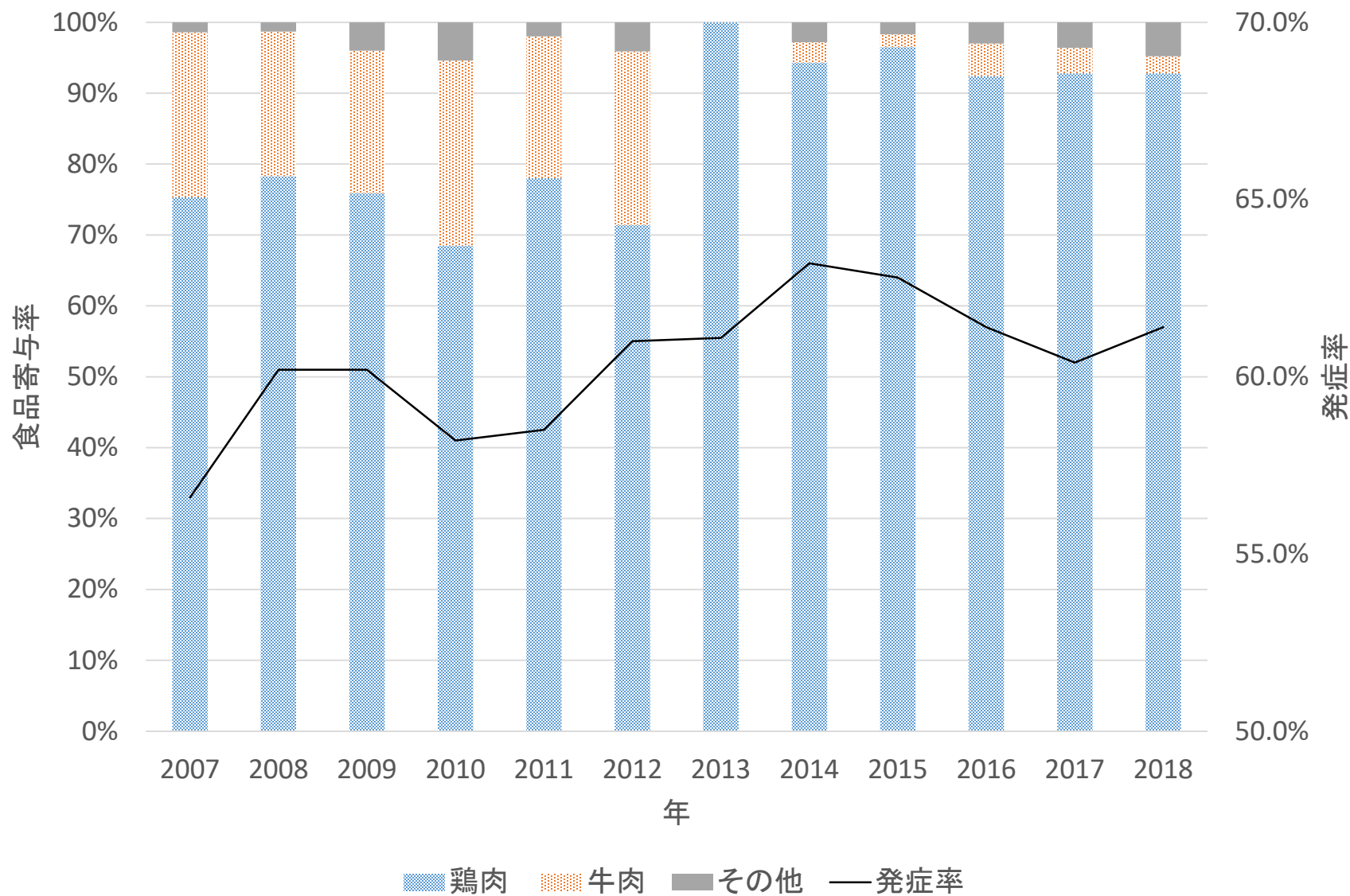


食品群毎の寄与率推定結果



- 生食用食肉等の規制措置後の2013年以降では、カンピロバクター食中毒の90%以上が鶏肉由来と推計された。
- 本食中毒の発生状況として、2013年は一過性の減少を示したが、2014年には規制前の発生状況に戻り、更に平均発症率は60%以上を維持していた。
- 欧米で汎用される遺伝学的推計手法へ展開するために、MLSTデータに関する情報を収集・整理した。
- これらの状況から、鶏肉のカンピロバクター汚染低減対策は、本食中毒の発生低減を図る上で、今後更に積極的に進める必要がある。

カンピロバクター食中毒の食品寄与率推定 ～食中毒届出データに基づく～



(9) ギラン・バレー症候群（GBS）に関連性の高い菌株の特性解析

（研究分担者：大阪健康安全基盤研究所 坂田淳子、
国立医薬品食品衛生研究所 朝倉宏）

【研究背景】 GBS発症と疫学的関連性が示唆される代表的な血清型としては、HS:19やHS:41型が報告されている。本血清型は鶏肉等の食品からもしばしば分離されるが、その特性の多くは不明である。海外のGBS患者由来株ではHS:23、LOS class B型株の比率が高いことも報告されている（PLoS One. 2009. 4:e7257.）。

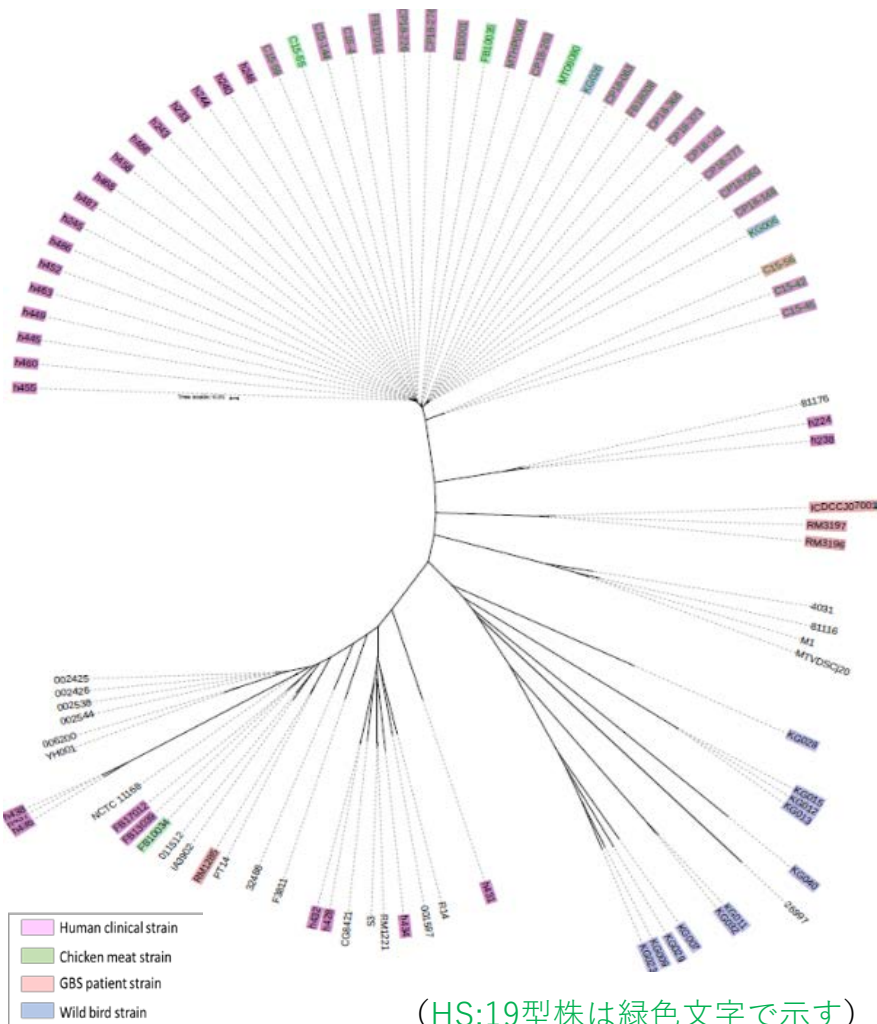
【達成目標】 HS:19型株を2年間で10株程度収集しゲノム特性に関する解析を実施する。

【材料及び方法】 HS:19型株の収集は大阪健康安全基盤研究所坂田淳子氏のほか、東京都健康安全研究センター赤瀬悟氏、島根県保健環境科学研究所川瀬遵氏の協力を得て行った。収集菌株と共に、ST-22以外の遺伝子型の食中毒由来株を含め、Ion Torrent GeneStudio S5を用いてWGS解析を行った。得られたゲノムデータは、NCBIデータベース上に登録される参照ゲノム配列と共に concatenated SNPsを基盤とする系統解析に供した。また、病原遺伝子群の保有状況等を検討した。

HS:19型株のゲノム特性概要

Strain	Source	MLST	LOS	Antimicrobial resistance gene				Antimicrobial susceptibility (Phenotype) ^{†1}					Virulence gene							
				Acquired gene		Point mutation		CPFX	NA	TC	ABPC	GM	KM	Adherence & colonization			Invasion		Cytotoxin production	
				<i>bla</i> _{OXA-61}	<i>tetO</i>	<i>gyrA</i>	<i>cmeR</i>							<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>racR</i>	<i>virB11</i>	<i>iam</i>		<i>ciaB</i>
MTHP0006	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	+	-	-	E84K	S	S	R	S	S	S	+	+	+	+	+	+
FB10001	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	-	-	E84K	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
FB17014	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	+	T86I	-	E84K	R	R	R	S	S	S	+	+	+	-	+	+
FB18008	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
C15-4	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	-	+
C15-42	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
C15-45	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	-	+
C15-59	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
C15-144	Human	9723	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-060	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-063	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-142	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-226	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-148	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	-	-	E84K	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-263	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-276	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-277	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I/D90N	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-366	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
CP18-373	Human	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
C15-56	GBS patient	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
MT08080	Chicken meat	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	-	-	E84K	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
FB10035	Chicken meat	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	+	-	-	E84K	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+	+	+
C15-55	Chicken meat	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
KG0006	Wild bird	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I/D90N	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+
KG0026	Wild bird	22	A	<i>bla</i> _{OXA-61}	-	T86I	-	E84K	R	R	S	S	S	S	+	+	+	-	+	+

- HS:19型株（計25株）は由来に拠らず特定のクラスターに座位した。
- 同株はST-22またはST-9723の遺伝子型、LOS型はA型であった。
- HS:19型株は細胞付着関連遺伝子を保有したが侵入・細胞膨化壊死関連遺伝子の一部を保有しない特性を把握した。



(HS:19型株は緑色文字で示す)

HS:19型株を含む *C. jejuni* 代表株のゲノム系統樹

GBS原因株の早期検知に向けては、HS:19型株の迅速・正確な検出同定法の開発が必要であり、MLST/LOS型別は一次スクリーニング手法として有用と考えられた。

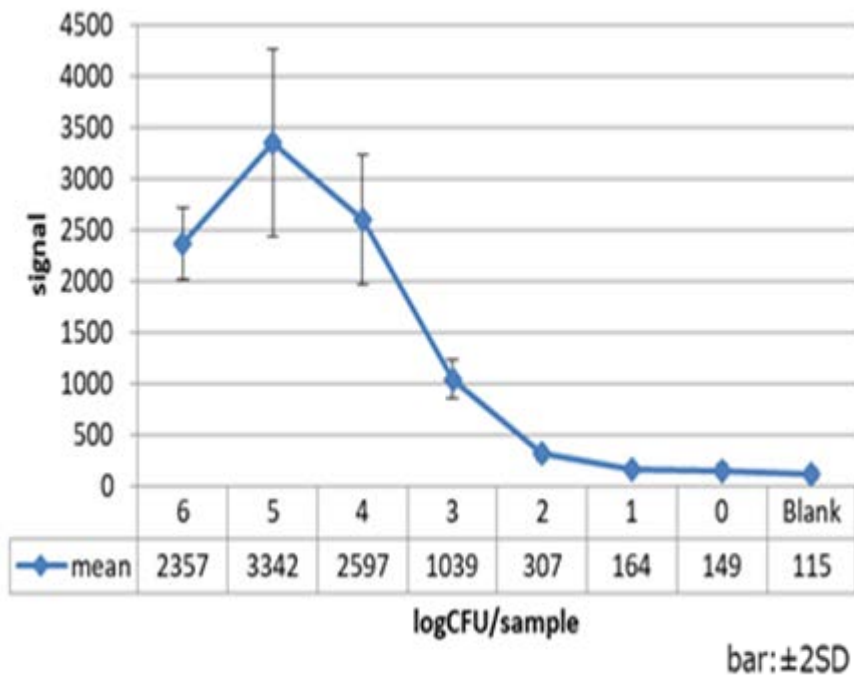
(10) 定量分析法に関する検討

(研究分担者：大阪健康安全基盤研究所 坂田淳子、
国立医薬品食品衛生研究所 中山達哉、朝倉宏)

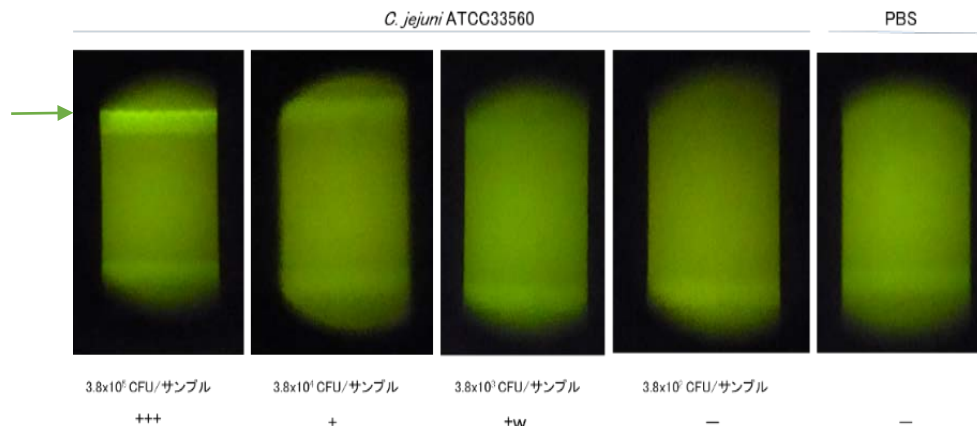
【研究背景・目的】食鳥処理工程において、食鳥と体のカンピロバクター陽性・陰性判定を迅速簡便に判断し得ることが期待される蛍光イムノクロマト法について、検出感度・精度を検証し、食鳥処理等への適用性を考察することを目的とした。

【達成目標】蛍光イムノクロマト法について、検出感度・精度を検証し、食鳥処理等への適用性を考察する。

【材料及び方法】大阪健康安全基盤研究所で作出した4B4単クローン抗体を用いてカンピロバクターに対する蛍光イムノクロマトを作成した。その後、異なる菌数の*C. jejuni* 81-176株懸濁液を調整し、同法による検出感度試験を実施した（各群5検体）。加えて、*C. jejuni* 12株、*C. coli* 7株、その他の菌種10株を対象として、反応特異性を検討した。



- *C. jejuni* 81-176株の検出限界は約 3.1×10^2 CFU (機器分析評価, 左図参照)
- *C. jejuni* ATCC 33560株の検出限界は約 3.8×10^3 CFU (目視評価, 下図参照)



菌種	陽性数/供試株数	検出限界
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	10/10	$9.6 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^4$ CFU/サンプル
<i>C. coli</i>	7/7	$1.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^4$ CFU/サンプル
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	1/1	NT
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	0/1	NT
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	0/2	NT
<i>C. upsaliensis</i>	1/1	NT
<i>C. lari</i>	2/2	NT
<i>C. hyointestinalis</i>	0/2	NT
<i>A. butzleri</i>	0/1	NT

- 陽性反応はカンピロバクター属でのみ確認。
- *C. jejuni* の検出限界は約 10^3 CFU, *C. coli* のそれは約 10^4 CFUであった。

本法は食鳥処理工程において特に高度汚染ロットの迅速スクリーニング等への活用が期待される。但し、その適用を考える上では、実地での検証が不可欠と思われる。

総括

- 1) 採卵鶏は長期飼育を通じ、カンピロバクター保菌数の経時的減少と菌叢変動を示した。
- 2) 食鳥処理工程での菌数動態からは、①生食用食鳥肉の製造加工にあっては適切な衛生管理を前提とすれば一定の安全性確保を行いうるが、更なる衛生高度化を求める必要があること、②外剥ぎ方式では中抜き方式に比べ、高濃度汚染が生じにくい傾向にあること、③中抜き方式の大規模食鳥処理場では特に冷却工程での汚染低減効果が大きいこと等が確認され、動態解析の実施には統一的な手法を用いることが必要と考えられた。
- 3) 食中毒患者便検体1g中の菌数は約 10^3 オーダーが下限値であった。原因食品が確保される本食中毒事例は稀であるが、qPCR法は冷凍・長期保管検体にも適用可能であり、同法及び補正式の活用により、原因食品特定や原因菌定量検出を行える可能性が示唆された。また、ある種の抗菌剤投与を受けた患者便検体の多くは培養法で検出困難となる実態が確認され、本食中毒対応にあたって疫学情報を考慮する意義が示されたと考えられる。

4) 健康被害実態と食品寄与率の推定に関する検討では、継続的に統一されたアクティブサーベイランス手法の活用を通じ、本食中毒による健康被害実態を推定できた。また本食中毒の原因食品として食鳥肉が占める割合は以前に比べ上昇している状況が確認された。

5) GBSとの関連性が高いとされるHS:19型株は由来や分離地域・年度等に関わらず、ゲノム安定性に富むことが確認された。今後、本研究で確認された形質を標的として本血清型株に特異的な検出・同定法の開発評価を進める意義が示唆された。

6) 定量分析法に関する検討では、蛍光イムノクロマト法が高い検出感度と特異性を有していることを確認できた。今後、同法は高濃度汚染ロットの早期探知等への活用が期待される。