

牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と分離株の性状

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	佐々木,貴正 岩田,剛敏 上間,匡 朝倉,宏
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	61巻4号
掲載ページ	p. 126-131
発行年月	2020年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と分離株の性状

佐々木貴正^{*,1,2} 岩田剛敏³ 上間 匡¹ 朝倉 宏^{1,2}Prevalence and Characterization of *Campylobacter* in Bile from Bovine GallbladdersYoshimasa SASAKI^{1,2*}, Taketoshi IWATA³, Masashi UEMA¹ and Hiroshi ASAKURA^{1,2}¹ Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences:
3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan;² Department of Applied Veterinary Science, the United Graduate School of Veterinary Science,
Gifu University: 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan;³ Division of Pathology and Pathophysiology, Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health,
National Agriculture and Food Research Organization: 4, Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-0045, Japan;

*Corresponding author

Campylobacter is one of the most important causes of food-borne infectious diseases. Antibiotics are rarely needed to treat campylobacteriosis, but occasionally used in severe or prolonged cases. Consumption of contaminated bovine liver is a source of campylobacteriosis. Bovine liver can be contaminated with *Campylobacter* on the surface and inside by the bile at slaughterhouses. Therefore, we investigated the current prevalence and characteristics of *Campylobacter* in bovine bile at a slaughterhouse. *Campylobacter* was isolated from 35.7% (55/154) of bile samples. *C. jejuni* and *C. fetus* were the two most frequent species. High antimicrobial resistant rates in *C. jejuni* were observed against tetracycline (63.0%) and ciprofloxacin (44.4%). Multi-locus sequence typing divided *C. jejuni* isolates (27 isolates) into 12 sequence types (STs) in which ST806 was the most frequent ST and accounted for 37.0%. All *C. fetus* were identified as *C. fetus* subsp. *fetus* which can cause systemic infections. High antimicrobial resistant rates in *C. fetus* were observed against ciprofloxacin (66.6%), streptomycin (58.3%) and tetracycline (33.3%). All the *C. fetus* isolates were divided into two STs, ST3 (16 isolates) and ST6 (8 isolates). Of the 16 ST3 isolates, 15 (93.8%) were resistant to both streptomycin and ciprofloxacin. Our data shows high prevalence of *Campylobacter* in bovine bile and their high rates of antimicrobial resistance. Preventing bile contamination of bovine liver at slaughterhouses is thus considered to be one of control measures to reduce the risk of *Campylobacter* infections.

(Received April 14, 2020 ; Accepted June 8, 2020)

Key words: カンピロバクター *Campylobacter*; 腸内細菌科菌群 *Enterobacteriaceae*; 牛胆汁 bovine bile

緒 言

カンピロバクター食中毒は、鶏肉（内臓を含む。）の生または軽度な加熱状態での喫食が原因となることが多いと考えられているが、牛肝臓の生または軽度な加熱状態での喫食が原因となることもある。厚生労働省の食中毒統計 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html) によれば、生食用牛肝臓の提供・販売が禁止された2012年には、牛レバ刺しの喫食が原因と推定されたカンピロバクター食中毒が12件、2013および2014年には報告がなかったもの

の、2015年以降は、炙りレバーや低温オイル煮など、軽度な加熱状態の牛肝臓料理の喫食が原因と推定されたカンピロバクター食中毒事件が報告されている。さらに、一般的な食中毒の症状（急性胃腸炎）ではないが、牛肝臓料理の喫食後に髄膜炎や心膜炎を発症した患者から *Campylobacter fetus* が分離された事例も報告されている^{1)~3)}。牛の肝臓内部や胆汁のカンピロバクター汚染については、Enokimoto⁴⁾らが2002年5~8月にと畜場で採取した肝臓内部の5.6% (6/108) および胆嚢内胆汁の45.4% (49/108) からカンピロバクターが分離され、胆汁中の菌濃度は3~7 log₁₀ CFU/mLであったこと、さらに、胆汁で *C. jejuni*, *C. coli* および *C. fetus* が増殖可能であったことを報告している。その後、Matsumotoら⁵⁾は、2004年6月~2006年12月の間に牛肝臓および胆嚢内胆汁を採取

* 連絡先 yasaki@nihs.go.jp
国立医薬品食品衛生研究所: 〒210-9501 川崎市川崎区殿町
3-25-26

し、牛肝臓内部の1.4% (2/148) および胆嚢内胆汁の23.4% (68/290) から *C. jejuni* が分離されたこと、また、胆嚢内胆汁の20.0% (58/290) から30 CFU/mL以上の大腸菌群が分離され、これら大腸菌群陽性検体の67.2% (39/58) ではその菌濃度が 10^6 CFU/mL以上であったことを報告している。さらに、佐々木ら⁶⁾ は、安楽殺直後に採取した牛の肝臓内部からカンピロバクターが分離され、それら個体の胆嚢内胆汁からも遺伝子型と薬剤耐性パターンが同じ株が分離されたことを報告している。カンピロバクター以外にも、低率であるが、牛胆嚢の0.54% (5/933) から大腸菌O157⁷⁾、牛胆汁の0.8% (28/3,500) からサルモネラが分離されたとの報告⁸⁾ もある。

これら報告は、と畜検査に合格した牛であっても、その胆嚢内胆汁にはカンピロバクターなどの病原細菌が存在し、腹腔からの肝臓摘出時や胆嚢切除時の胆汁漏出による肝臓や腹腔内の細菌汚染、さらに、胆管を通じた肝臓内部の細菌汚染の可能性を示唆している。

また、カンピロバクター腸炎患者に対する化学療法においては、エリスロマシンのようなマクロライド系抗菌薬が第一選択薬であるが、診断前にはフルオロキノロン系抗菌薬が使用されることもある⁹⁾。

以上のことから、現在の胆嚢内胆汁におけるカンピロバクターなどの細菌汚染およびカンピロバクター株の薬剤耐性に関するデータは、可食部位の胆汁汚染防止の重要性の再認識、さらに、牛肝臓料理の喫食を原因とするカンピロバクター食中毒のリスク管理を検討するうえで重要であると考えられる。

そこで、と畜検査に合格した肥育牛154頭の胆嚢内胆汁を採取し、カンピロバクターの定性試験および分離株の性状試験ならびに腸内細菌科菌群の定量試験を実施した。さらに、志賀毒素産生性大腸菌O157 (STEC O157) およびサルモネラの胆汁における増殖性を検討したので報告する。

実験方法

1. 材料

と畜場1施設において、2017年11月～2019年8月の間にと畜検査に合格し、さらに内臓検査により食用適とされた肝臓154検体(黒毛和種122頭および交雑種32頭に由来)の胆嚢内胆汁を調査対象とした。肝臓から胆嚢を切除し、胆嚢表面を消毒用アルコール(吉田製薬(株)製)で消毒後に注射器を用いて胆汁50 mLを採取した。その後、検体をクーラーボックスに入れて輸送し、採取後4時間以内に試験を開始した。

2. カンピロバクター定性試験および同定試験

胆汁0.1 mLをmodified charcoal cefoperazone deoxycholate Agar培地(mCCDA)(関東化学(株)製)に塗抹し、微好気条件下で 48 ± 2 時間(42°C)培養した(直接培養)。また、胆汁1 mLをプレストン液体増菌培地9 mL(関東化学(株)製)と混合し、微好気条件下で 24 ± 2 時間

(42°C)培養後にmCCDAに塗抹し、微好気条件下で 48 ± 2 時間(42°C)培養した(増菌培養)。さらに、*C. fetus*の分離を目的に、mCCDAとプレストン液体増菌培地にナリジクス酸(NA)の終濃度が5 mg/Lとなるように添加した培地を用い、培養温度30°Cで直接培養および増菌培養を実施した。mCCDA上に発育し、カンピロバクターと推定された集落については、1検体につき最大2個を釣菌し、Kameiら¹⁰⁾のPCR法を用いて菌種を同定した。さらに、本PCR法により*C. fetus*と同定された場合には、Abrilら¹¹⁾のPCR法を用いて亜種を鑑別した。同定後の菌株については、グリセリン20%溶液にけん濁し、-80°Cで凍結保存した。

3. カンピロバクター株の薬剤感受性試験

各検体から分離されたカンピロバクター1菌種1株について、米国Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の提唱する微量液体希釈法¹²⁾(ドライプレート‘栄研’(RU1Cプレート):栄研化学(株)製)を用いて最少発育阻止濃度(MIC)を決定した。使用薬剤は、アンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、ゲンタマイシン(GM)、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、NA、シプロフロキサシン(CPFX)およびエリスロマイシン(EM)の8剤とした。精度管理に*C. jejuni* ATCC33560を使用し、ブレイクポイントはCLSIの基準¹³⁾とCLSIに基準のない薬剤は過去の報告^{14), 15)}に準じて判定した。

4. Multilocus Sequence Typing (MLST)

*C. jejuni*および*C. fetus*については、Campylobacter MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>)のガイドラインに従い遺伝子型を決定した。

5. 腸内細菌科菌群の定量試験

PBSを用いて10倍希釈段階($10^1 \sim 10^6$ 倍希釈)を作成し、その各2.0 mLを2枚の腸内細菌科菌群数測定用プレート(EBプレート:スリーエムジャパン(株)製)に各々1.0 mL分注し、好気条件下で 24 ± 2 時間培養後(37°C)、集落数を計測し、プレート上の集落数が15~150個であった希釈液の2枚の平均値を菌数として算出した。

6. 胆汁中における志賀毒素産生性大腸菌O157 (STEC O157) およびサルモネラの増殖性試験

ヒト由来STEC O157株(2株:O157-1株およびO157-2株)およびヒト由来サルモネラ株(*Salmonella* Enteritidis 2株(E9-2およびE9-3)および*S. Typhimurium* 2株(T4-3およびT4-34))を供試した。ミューラーヒントン液体培地に各供試菌株を接種し、好気条件下で15時間培養後(37°C)にPBSで $10^4 \sim 10^5$ CFU/mLとなるように希釈した。上述の腸内細菌科菌群定量試験で陰性であった胆汁5検体を混合した胆汁液各12.0 mLに希釈菌液各0.1 mLを添加し、好気条件下で5時間培養(38°C)した。なお、PBS 0.1 mLを陰性対照として同様に試験した。培養開始時および培養後に各2.0 mLを採取し、上述の腸内細菌科菌群定量試験を実施した。計数した集落が添

加した菌株であることを確認するため、計数算出に採用したEBプレート内の集落5個を採取し、STEC O157の増殖性試験については、Valadezら¹⁶⁾のPCR法、サルモネラについてはMakinoら¹⁷⁾のPCR法を用いて菌種を同定した。なお、当該試験は1株につき1回実施した。

結 果

1. カンピロバクターおよび腸内細菌科菌群の分離状況

肥育牛は15自治体から出荷され、と殺時の平均月齢は30か月（最少23か月，最高37か月）であった。カンピロバクターは55検体（35.7%）から分離され、分離率は26～28か月齢の41.5%が最も高かったものの、他の月齢グループとの間に関連性は認められなかった（フィッシャーの正確確率検定： $p > 0.05$, Table 1）。性別、品種（黒毛和種および交雑種）、検体採取時期についても、カンピロバクター分離との間に関連性は認められなかった。カンピロバクターは*C. jejuni* (29株)、*C. fetus* (24株) および*C. coli* (7株) の3菌種に分類され、5検体からは2菌種が分離された (Table 2)。*C. fetus* はすべて*C. fetus* subsp. *fetus* と同定された。*C. fetus* は、1検体を除き*C. fetus* の分離を目的とした培養法でのみ分離された。腸内細菌科菌群は17検体（11.0%）から分離されたが、カンピロバク

Table 1. Isolation of *Campylobacter* and *Enterobacteriaceae* from bile samples

Months of age	No. of samples	No. of positive samples (%)	
		<i>Campylobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
23-25	7	2 (28.6)	0 (0.0)
26-28	41	17 (41.5)	5 (12.2)
29-31	64	22 (34.4)	7 (10.9)
32-34	34	13 (38.2)	3 (8.8)
35-37	8	1 (12.5)	2 (25.0)
Total	154	55 (35.7)	17 (11.0)

Table 2. *Campylobacter* species isolated from bile

Species	No. of samples
<i>C. jejuni</i>	24
<i>C. jejuni</i> + <i>C. fetus</i>	4
<i>C. jejuni</i> + <i>C. coli</i>	1
<i>C. fetus</i>	20
<i>C. coli</i>	6

Table 3. Antimicrobial resistance in *C. jejuni*, *C. fetus* and *C. coli*

Species	No. of isolates	No. of resistant isolates (%)							
		ABPC (32) *	SM (32)	GM (2)	CP (16)	TC (16)	NA (32)	CPFX (4)	EM (32)
<i>C. jejuni</i>	27	7 (25.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (63.0)	12 (44.4)	12 (44.4)	1 (3.8)
<i>C. fetus</i>	24	0 (0.0)	14 (58.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (33.3)	24 (100.0)	16 (66.7)	0 (0.0)
<i>C. coli</i>	5	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (60.0)	3 (60.0)	3 (60.0)	1 (20.0)
Total	56	7 (12.5)	15 (26.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (50.0)	39 (69.6)	31 (55.4)	2 (3.6)

Abbreviation; ABPC: ampicillin, SM: streptomycin, GM: gentamicin, CP: chloramphenicol, TC: tetracycline, NA: nalidixic acid, CPFX: ciprofloxacin, EM: erythromycin.

* Values in parentheses are the minimum inhibitory concentration (mg/L) of the breakpoint.

ターと同様に月齢、性別および品種との間に関連性は見られなかった。腸内細菌科菌群陰性147検体中51検体からカンピロバクターが分離されたが、カンピロバクター分離との間に関連性は認められなかった。腸内細菌科菌群数は、1検体（菌濃度10 CFU/mL）を除き、すべて6.04 log₁₀ CFU/mL以上（最大値7.8 log₁₀ CFU/mL）であった。

2. カンピロバクター株の薬剤耐性

保存菌株の培養後に増殖が認められた56株について薬剤感受性試験を実施した (Table 3)。耐性率については、*C. fetus* が自然耐性であるNAを除くと、CPFX (55.4%) が最も高く、次いでTC (50.0%), SM (26.8%), ABPC (12.5%), EM (3.6%) の順であった。GMとCPに対しては全株が感受性であった。ABPC耐性率は、*C. jejuni* が*C. fetus* よりも有意 ($p < 0.05$) に高い一方で、SM耐性率は、*C. fetus* が*C. jejuni* よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。

3. *C. jejuni* および *C. fetus* の遺伝子型と薬剤耐性の関連性

C. jejuni 27株は、MLST解析によって8のClonal complexes (CCs) に属する12のSequence types (STs) に分類された (Table 4)。最も多かったのはCC21に属するST806で、全体の37.0% (10/27) を占め、すべてがTC耐性、半数がCPFX耐性であった。ST806が分離された牛は8自治体に所在する9農場から出荷されていた。一方、*C. fetus* は、ST3 (16株) とST6 (8株) の2型に分類された。ST3が分離された牛は4自治体に所在する5農場から出荷され、1株を除きSMとCPFXの両方に耐性であった。ST6が分離された牛は5自治体に所在する5農場から出荷され、2株がCPFX耐性であったが、残りの6株が供試した8剤すべてに感受性であった。

4. 胆汁中におけるSTEC O157およびサルモネラの増殖性

供試菌株のすべてが、胆汁中で増殖できることが確認された。最も増殖性が高かったのはO157-1株で、培養5時間で3.80 log₁₀の増加が認められた (Table 5)。最も増殖性が低かったT4-34株でも3.19 log₁₀の増加が認められた。なお、陰性対照検体からは、培養開始時および5時間培養後も集落は観察されなかった。

Table 4. Sequence types and antimicrobial resistant profiles of *C. jejuni* and *C. fetus*.

Species	Clonal complex	Sequence type	Antimicrobial resistant profile	No. of isolates
<i>C. jejuni</i>	CC21	ST21	TC+NA+CPFX	27
			Susceptible	3
		ST806	ABPC+TC+NA+CPFX	1
			TC+NA+CPFX	3
			TC	2
		ST982	ABPC+TC+NA+CPFX	5
	ABPC+TC		1	
	ST9111	EM+TC	1	
	CC22	ST22	NA+CPFX	1
	CC42	ST42	Susceptible	2
			TC+NA+CPFX	1
	CC48	ST918	Susceptible	1
	CC61	ST61	TC+NA+CPFX	1
	CC48	ST1244	ABPC+TC	1
			Susceptible	1
	CC464	ST4389	ABPC	1
CC508	ST132	NA+CPFX	1	
<i>C. fetus</i>	Unassigned	ST3	SM+TC+CPFX	24
			SM+CPFX	8
		ST6	Susceptible	7
			CPFX	1
			Susceptible	2

Table 5. The bacterial growth in bile spiked with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157) or *Salmonella* strains

Strain	Concentration (log ₁₀ CFU/mL)		Increase (log ₁₀)
	0 hr	5 hr	
STEC O157			
O157-1	2.58	6.38	3.80
O157-2	2.36	6.04	3.68
<i>Salmonella</i>			
T4-3	3.13	6.40	3.27
T4-34	2.99	6.18	3.19
E9-2	3.30	6.60	3.30
E9-3	2.81	6.11	3.30

考 察

今回の調査では、と畜検査に合格した肥育牛の35.7% (55/154) の胆嚢内胆汁からカンピロバクターが分離され、大部分が *C. jejuni* と *C. fetus* subsp. *fetus* であった。Enokimotoら⁴⁾ が2002年5~8月の間に実施した調査では、45.4% (49/108) の胆嚢内胆汁からカンピロバクターが分離され、その大部分が *C. jejuni* および *C. fetus* (亜種鑑別は未実施) であった。本調査と使用培地、培養条件など試験方法が異なるため数値を単純比較することはできないが、食用適となった肝臓の約4割の胆嚢内胆汁中にカンピロバクターが存在している可能性がある。特に、本研究で *C. fetus* のすべてが *C. fetus* subsp. *fetus* と鑑別された事実は注目に値する。*C. fetus* subsp. *fetus* は、急性腸炎以外にも、心膜炎、髄膜炎、腹部大動脈瘤などの感染性疾

患を引き起こすことが知られている^{2), 3), 18)-21)}。感染経路については、牛や羊の生レバーの喫食や動物との接触などが報告されているものの、症例の多くは感染経路が不明である³⁾。また、患者の多くは高齢者、低栄養状態、糖尿病などの低免疫状態または基礎疾患を有する人であるが、母親が妊娠後期に生レバーを喫食した場合に、新生児が髄膜炎と脳膿瘍を発症したとの国内報告もある²⁰⁾。腸内細菌科菌群汚染については、カンピロバクターと比べ分離率は低いものの、陽性検体の94.1% (16/17) ではその菌濃度が6.04 log₁₀ CFU/mL以上であり、Matsumotoら⁵⁾ の大腸菌群定量試験の結果と同様に胆嚢内胆汁には細菌が高濃度に存在する可能性がある。胆嚢内胆汁のカンピロバクターおよび腸内細菌科菌群の存在が高濃度である理由については、Emonokimotoら⁴⁾ のカンピロバクター定量試験成績 (3~7 log₁₀ CFU/mL)、*C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の増殖性に関する成績に加え、今回の志賀毒素産生性大腸菌 O157株とサルモネラ株の増殖性試験の成績から、これら細菌が少量でも胆嚢内に到達すれば、胆汁を栄養源として増殖できるためと考えられる。ただし、今回、好気条件下で培養を実施しているため、実際の胆嚢内における増殖性と異なる可能性がある。また、胆汁組成は、飼料、牛個体等によって異なる可能性があることにも留意すべきである。

C. jejuni および *C. coli* の薬剤耐性率は、農林水産省の薬剤耐性モニタリング (JVARM) (https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3.html) の2014~2015年の間の調査結果¹⁴⁾ と比べ、ABPC耐性率が約3倍であった以外は大きな違いは認められなかった。ABPC耐性に関しては、耐性であった *C. jejuni* の7株のうち3株がST806であった。ST806は分離株全体の37% (10/27) を占め、8自治体に所在する9農場から出荷された牛に由来する株であった。Asakuraら²²⁾ は、2005~2006年の間に8自治体から得られた牛由来株のMLST解析を実施し、今回の調査と同様にCC21に属する株が最も多く (27.5%)、ST806は全体の15.7%を占め2番目に多かったことを報告しており、国内牛から分離されるST型の1つであると考えられる。佐々木ら⁶⁾ は2014~2016年の間に8頭の肉用牛、2016年²³⁾ にも6頭の肉用牛からST806を分離したが、いずれもABPC感受性であったと報告している。農林水産省動物医薬品検査所の動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器製造販売高年報 (<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/index.html>) では、ペニシリン系抗生物質の販売高に基づく原末換算量において、2015~2018年の間に大きな変化は認められていないが、2016年以降にST806の一部がABPC耐性を獲得した可能性がある。今回分離されたST806の50.0% (5/10) はCPFX耐性であり、2017年には人の国内臨床事例からもST806が分離²⁴⁾ されていることから、牛および人の臨床事例に由来する *C. jejuni* 株のフルオロキノロン耐性率とST型の動向に留意すべきである。

C. fetus subsp. *fetus* の薬剤耐性に関しては、我々の知

る限り、国内外の家畜由来株に関する報告は近年なされていない。人由来株の薬剤耐性に関しても、国内報告はほとんどなく、例えば、1995年に発生した国内蜂巣炎事例3件¹⁾で分離された株は、いずれもABPC、ミノサイクリン(MINO)、EMおよびレボフロキサシン(LVFX)に感受性で、セファゾリン、アズトレオナムおよびNAに耐性、また、2016年に報告された腹部大動脈瘤事例¹⁹⁾の分離株のMICは、ABPC: 1 µg/mL、セフトリアキソン: 2 µg/mL、イミペネム(IPM): ≤ 0.25 µg/mL、MINO: ≤ 0.25 µg/mLおよびCPFX: 0.5 µg/mL、2017年に報告された心膜炎事例²⁾の分離株のMICは、ABPC: 1 µg/mL、セフトキサシム(CTX): 1 µg/mL、IPM: ≤ 0.25 µg/mL、EM: 1 µg/mLおよびCPFX: 0.5 µg/mLと報告されているなど情報が限定されているものの、ABPCとフルオロキノロンに対する耐性化は認められていない。上述の臨床事例を含め、ヒトの*C. fetus* subsp. *fetus* 感染症事例では、ABPC、CTX、IPM、メロペネム、バンコマイシン、MINOなどが使用されているが、LVFXやCPFXが使用されることもある^{1)-3), 17), 18), 20)}。今回、ABPC耐性は認められなかったが、CPFX耐性率が66.7%と高率であり、その多くがST3であった。国内の肉用牛農場へST3が拡散している可能性があり、今後、ヒトからフルオロキノロン耐性*C. fetus* subsp. *fetus* 株が分離される可能性がある。

今回、胆嚢内胆汁の35.7%からカンピロバクターが分離され、その菌種が*C. jejuni*、*C. coli*に加え、心膜炎、髄膜炎、腹部大動脈瘤などの感染性疾患を引き起こす*C. fetus* subsp. *fetus*であったこと、*C. fetus* subsp. *fetus*の66.7%がフルオロキノロン系抗菌薬に耐性であったこと、さらにSTEC O157およびサルモネラは胆汁を栄養源として増殖可能であったことを明らかにした。と畜場では、可食部位の胆汁汚染が起きないように胆嚢切除を実施しており、本研究成果は、その重要性を再認識するものである。また、本研究では、*C. fetus*分離に際し、mCCDAとプレストン液体増菌培地にNAの終濃度が5 mg/Lとなるように添加した培地を用い、培養温度30°Cで培養を実施しており、この培養条件が*C. fetus*分離率向上に貢献したと考えられる。牛や牛肉等のカンピロバクター汚染実態調査で用いられる培養温度は42°Cであることが多く、*C. fetus*汚染状況を過小評価している可能性がある。ヒトの*C. fetus*感染症発生動向を注視し、必要に応じ培養条件を検討すべきと考えられる。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業(H28-食品-一般-005)により実施しました。胆汁採取にご協力いただいた皆様に深謝いたします。

文 献

1) Ichiyama, S., Hirai, S., Minami, T., Nishiyama, Y., Shimizu, S., Shimokata, K., Ohta, M. *Campylobacter fetus*

- subspecies *fetus* cellulitis associated with bacteremia in debilitated hosts. *Clin. Infect. Dis.*, **27**, 252-255 (1998).
- 2) Kiyasu, Y., Akiyama, D., Kurihara, Y., Koganemaru, H., Hitomi, S. Pericarditis caused by *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* associated with ingestion of raw beef liver. *J. Infect. Chemother.*, **23**, 833-836 (2017).
- 3) Ishihara, A., Hashimoto, F., Ishioka, H., Kobayashi, H., Gomi, H. *Campylobacter fetus* meningitis with eating habits of raw meat and raw liver in a healthy patient: a case report and literature review. *IDCases*, **11**, 97-100 (2018).
- 4) Enokimoto, M., Kubo, M., Bozono, Y., Mieno, Y., Misawa N. Enumeration and identification of *Campylobacter* species in the liver and bile of slaughtered cattle. *Int. J. Food Microbiol.*, **118**, 259-263 (2007).
- 5) Matsumoto, N., Taniwaki, T., Kinuta, M., Murase, T. Isolation of *Campylobacter jejuni* and coliform bacilli from bile and liver obtained from slaughter cattle in western Japan. *J. Food Prot.*, **71**, 1228-1231 (2008).
- 6) 佐々木貴正, 関口秀人, 永井英貴. 牛および豚の消化器におけるカンピロバクター分布. 獣畜新報, **70**, 445-450 (2017).
- 7) Reinstein, JT., Shi, FX., Nagaraja, TG. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gallbladders of beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1002-1004 (2007).
- 8) 坂崎利一, 山田千昌, 田島嘉雄. 牛胆汁の *Salmonella* について. 日本細菌学会誌, **10**, 59-62 (1955).
- 9) Engberg, J., Aarestrup, FM., Taylor, DE., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 24-34 (2001).
- 10) Kamei, K., Kawabata, H., Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Nakagawa, S., Yamasaki, S. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for *Campylobacter jejuni*, *C. fetus*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, and *C. lari*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **69**, 256-258 (2016).
- 11) Abril, C., Vilei, EM., Brodard, I., Burnens, A., Frey J., Miserez, R. Discovery of insertion element *ISCfe1*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, 993-1000 (2007).
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—4th ed. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2013).
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, 3rd ed. CLSI guideline M45. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2016).
- 14) National Veterinary Assay Laboratory. Report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2014-2015. Available at https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/JVARM_Report_2014-2015.pdf. (2018).

- 15) Ishihara, K., Yamamoto, T., Satake, S., Takayama, S., Kubota, S., Negishi, H., Kojima, A., Asai, T., Sawada, T., Takahashi, T., Tamura, Y. Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and foods-producing animals in Japan. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 153–160 (2004).
- 16) Valadez, AM., Debroy, C., Dudley, E., Cutter, CN. Multiplex PCR Detection of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O157, O103, O91, O113, O145, O111, and O26 experimentally inoculated in beef carcass swabs, beef trim, and ground beef. *J. Food Protect.*, **74**, 228–239 (2011).
- 17) Makino, S., Kurazono, H., Chongsanguam M., Hayashi, H., Cheun H., Suzuki, S., Shirahata, T. Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1245–1247 (1999).
- 18) 戸田宏文, 佐藤かおり, 古田 格. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*による慢性髄膜炎の一例. *日本臨床微生物学雑誌*, **16**, 173–178 (2006).
- 19) 木下 愛, 清水 馨, 有田奈弥恵, 末廣伸子, 森本政憲, 浅井 徹, 宮平良満, 九嶋亮治. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*による感染性腹部大動脈瘤の1症例. *医学検査*, **65**, 459–465 (2016).
- 20) 中村幸嗣, 宮地悠輔, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 五島敏郎, 大楠清文, 加藤達夫. 遺伝子解析によって診断された *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*による髄膜炎・脳膿瘍の1新生児例. *小児感染免疫*, **22**, 357–361 (2010).
- 21) Wagenaar, JA., van Bergen, MAP., Blaser, MJ., Tauxe, RV., Newell, DG., van Putten, JPM. *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease. *Clin. Infect. Dis.*, **58**, 1579–1586 (2014).
- 22) Asakura, H., Brüggemann, H., Sheppard, SK., Ekawa, T., Meyer, TF., Yamamoto, S., Igimi, S. Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLOS ONE*, **7**, E48394 (2012).
- 23) 佐々木貴正, 関口秀人, 小佐々隆志, 永井英貴. 牛の移動に伴うフルオロキノロン耐性カンピロバクターの伝播の可能性. *獣畜新報*, **70**, 601–604 (2017).
- 24) Yamada, K., Saito, R., Muto, S., Sasaki, M., Murakami, H., Aoki, K., Ishii, Y., Tateda, K. Long-term observation of antimicrobial susceptibility and molecular characterisation of *Campylobacter jejuni* isolated from in a Japanese general hospital 2000–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, **18**, 59–63 (2019).

牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と分離株の性状 (報文)

佐々木貴正*, 岩田剛敏, 上間 匡, 朝倉 宏
食衛誌 61(4), 126~131(2020)

カンピロバクターは、食品媒介性感染症における最も重要な原因菌の1つである。カンピロバクター感染症の際に抗菌薬が使用されることは稀であるが、症状が重度である場合や長期間持続する場合には使用されることがある。カンピロバクター感染症の原因の1つは、カンピロバクターに汚染された牛肝臓の喫食である。牛肝臓は、と畜場において胆汁により表面と内部が汚染される可能性がある。以上のことから、われわれは、と畜場において、胆汁のカンピロバクター汚染状況およびその分離株の性状を調査した。カンピロバクターは35.7% (55/154) から分離され、*C. jejuni* と *C. fetus* が上位2菌種であった。*C. jejuni* では、テトラサイクリン (63.0%) とシプロフロキサシン (44.4%) に高率な耐性が認められた。Multi-locus sequence typingにより、*C. jejuni* は12型に分類され、ST806が最も多く、37.0%を占めていた。すべての*C. fetus* は全身性疾患の原因となることがある*C. fetus* subsp. *fetus* と同定された。*C. fetus* では、シプロフロキサシン (66.6%)、ストレプトマイシン (58.3%) およびテトラサイクリン (33.3%) に高率な耐性が認められた。すべての*C. fetus* は、ST3 (16株) およびST6 (8株) に分類された。16株のST3のうち、15株 (93.8%) はストレプトマイシンとシプロフロキサシンの両方に耐性であった。本調査結果は、牛胆汁の高率なカンピロバクター汚染とその分離株の高率な薬剤耐性を示している。と畜場における牛肝臓の胆汁汚染防止は、カンピロバクター感染のリスク低減策の1つである。

* 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部