

14/Feb/2025 第5回肉用鶏の衛生水準の向上等に関する検討会

鶏糞と食肉からカンピロバクター属菌の迅速検出法



田 村 豊

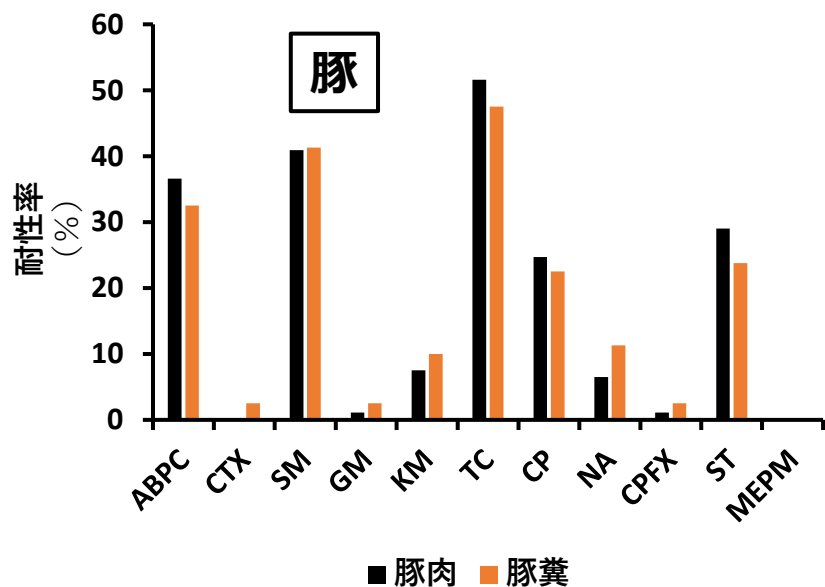
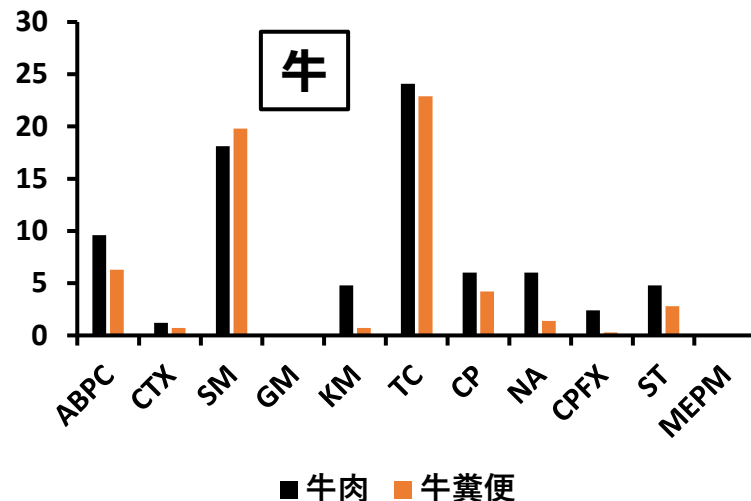
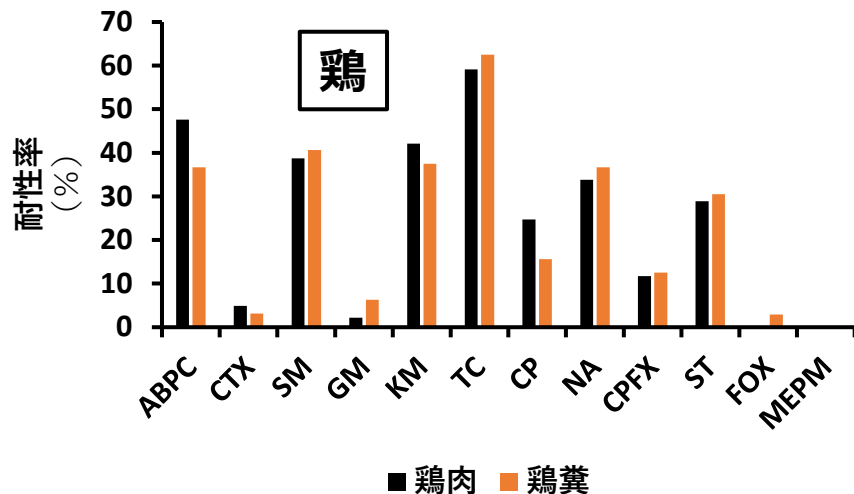
酪農学園大学名誉教授



RAKUNO GAKUEN UNIVERSITY

酪農学園大学

糞便と食肉由来大腸菌の薬剤感受性の比較



■ 糞便由来大腸菌 (JVARM)

- ・採材：2019年度
- ・検体：食鳥処理場やと畜場の家畜糞便から分離
- ・方法：微量液体希釈法

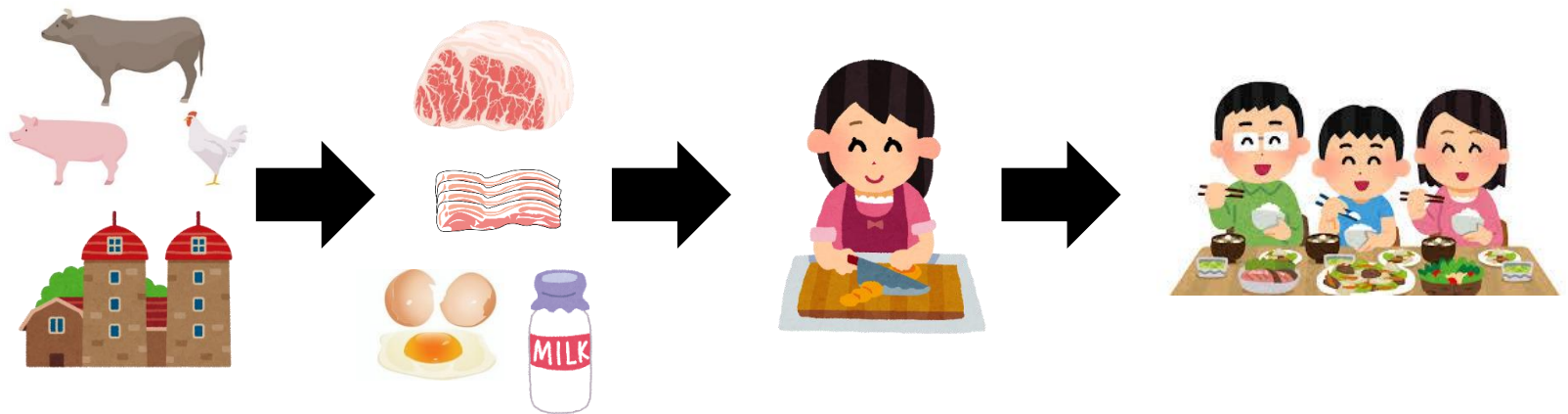
■ 食肉 (西野ほか, 食衛誌 60(3):45-51, 2019.)

- ・採材：2011～2012年, 2015～2017年
- ・検体：食肉処理業, 倉庫業, 小売店からの食肉
- ・方法：ディスク法 (センシディスク)

フードチェーンとは？

食品の原材料の生産から消費者に消費されるまでの食品供給の流れ

例：生産⇒加工⇒流通⇒保管⇒販売⇒消費者



フードチェーン・アプローチ：

フードチェーン全体を対象にして、食品の安全性を確保し、栄養を確保するもの

畜産食品における危害要因（ハザード）

■ 生物学的ハザード

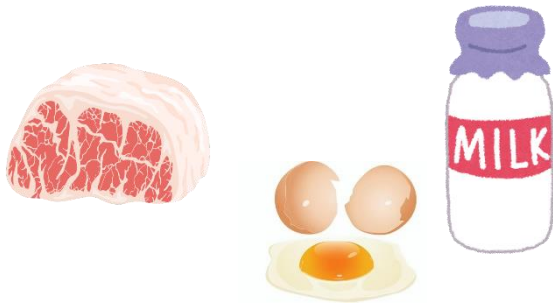
O-157、黄色ブドウ球菌、**カンピロバクター**、サルモネラ、ノロウイルス、アニサキス、薬剤耐性菌など

■ 化学的ハザード

動物用医薬品、飼料添加物、農薬など

■ 物理的ハザード

金属、ガラス、プラスチックなど



*Campylobacter jejuni*の伝顕像

2. 調査結果（盲腸内容物）

- 食鳥処理場搬入時の肉用鶏群において盲腸内容物を検査した結果、陽性率※は**55%**、陰性率は**45%**。（図1）

※ 定量検査の結果、1鶏群5羽中1羽以上カンピロバクター属菌が分離された鶏群を陽性鶏群と判定

- 陽性鶏群のうち、群内陽性率※が80%以上の鶏群は**96%**。（表1）

※ 検査した5羽中、検査陽性であった羽数の割合

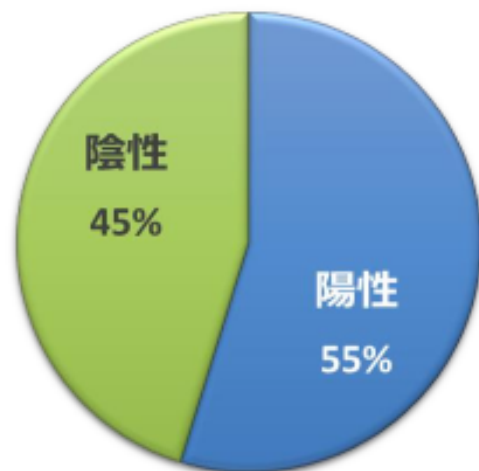


図1 調査対象鶏群の
カンピロバクター陽性割合

表1 陽性鶏群の群内陽性率の分布

	全体	群内陽性率				
		100% (5/5)	80% (4/5)	60% (3/5)	40% (2/5)	20% (1/5)
鶏群数	75	68	4	1	0	2
割合	100%	91%	5%	1%	0%	3%

96 %

鶏群の中には陰性の鶏群も一定数存在

第2回肉用鶏の衛生水準の向上等に関する検討会資料から

https://www.maff.go.jp/j/study/nikuyoukei_kentoukai/2nd_time.html

鶏肉のカンピロバクター汚染状況

鶏群	鶏肉	供試数	陽性数 (%)
カンピロバクター陽性鶏群 (22鶏群)	ムネ肉	110	76(69) ^a
	肝臓	110	97(88) ^a
	合計	220	173(79)
カンピロバクター陰性鶏群 (56鶏群)	ムネ肉	280	2(0.5)
	肝臓	280	1(0.7)
	合計	560	3(0.5)

^a $p < 0.01$ (ムネ肉は肝臓より陽性率が低い)

カンピロバクター陽性鶏群から汚染鶏肉が生産される！

農林水産省HPより

https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/kekka/keiniku_cam_12.html

カンピロバクター食中毒への対応

■カンピロバクター食中毒

- ・日本で細菌性食中毒の患者数が最も多い
- ・原因食品は主に鶏肉

■ヒトのカンピロバクター症の治療に、マクロライド(ML)系、フルオロキノロン(FQ)系薬剤が使用

- ・鶏肉由来カンピロバクターにおいてFQ耐性菌が増加傾向

■薬剤耐性カンピロバクターの出現、増加に対抗するため

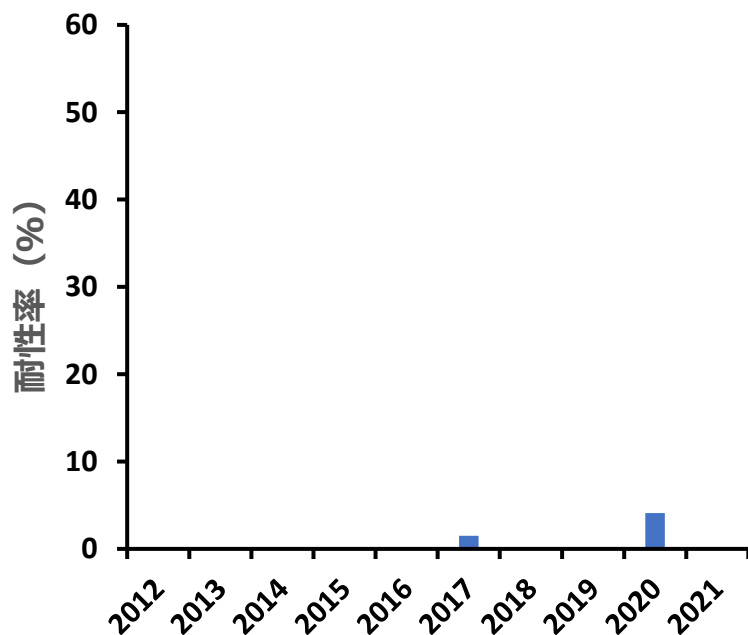
- ・鶏糞便を調べることによる農場レベルでの検出率の把握
- ・市販鶏肉を調べることによる販売レベルでの検出率の把握
- ・医療での診断と治療に貢献

* 現行の培養法では、薬剤感受性の判定まで5日以上かかる

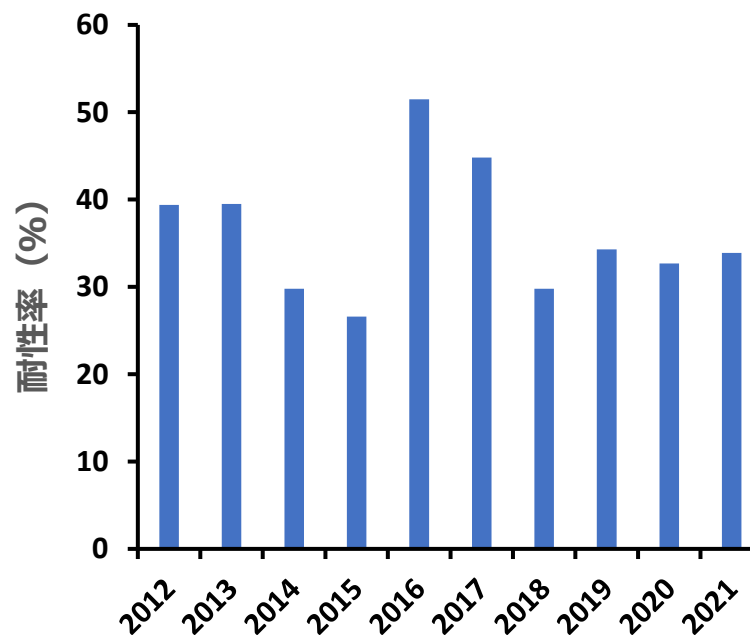
迅速なカンピロバクターの検出法が必要

肉用鶏糞便から分離されたカンピロバクターの 薬剤感受性

Erythromycin



Ciprofloxacin



■材料：健康な肉用鶏の盲腸便

■菌種：*Campylobacter jejuni*

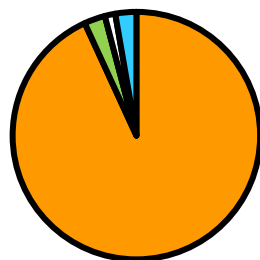
■方法：微量液体希釈法

■出典：JVARM (https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_AMR_2.html)

カンピロバクターの薬剤耐性に係る遺伝子変異調査結果

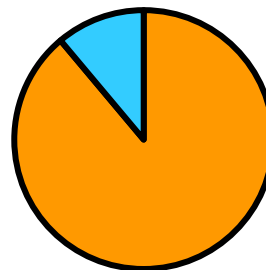
国内で家畜から分離された薬剤耐性カンピロバクター 139株を供試

gyrA 遺伝子 (FQ耐性株)



C257T
93%

rrl 遺伝子 (ML耐性株)



A2075G
89%

FQ, ML耐性カンピロバクターをスクリーニングするには
gyrA C257T, *rrl* A2075G 変異の検出でほとんどの耐性株を検出

FQ耐性、ML耐性に関わる点突然変異を検出するDNAマイクロアレイ法

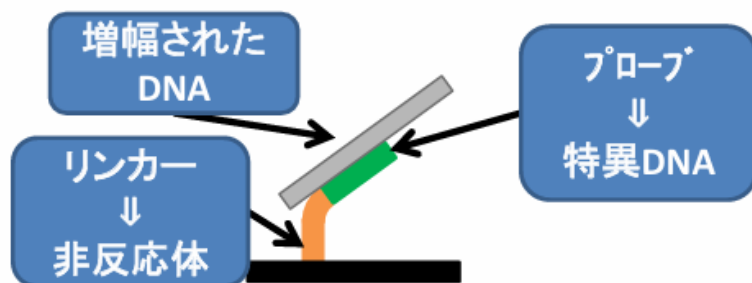
CAMpylobacter **E**xpress **R**esistance **D**etection
Array (CAMERA法)

CAMERA法における菌種同定と薬剤耐性の検出

CAMpylobacter Express Resistance detection Array

① Multiplex PCRによる標的DNAの増幅

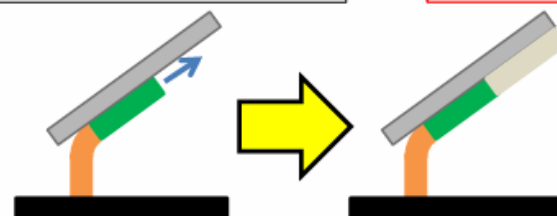
② プローブとのハイブリダイゼーション



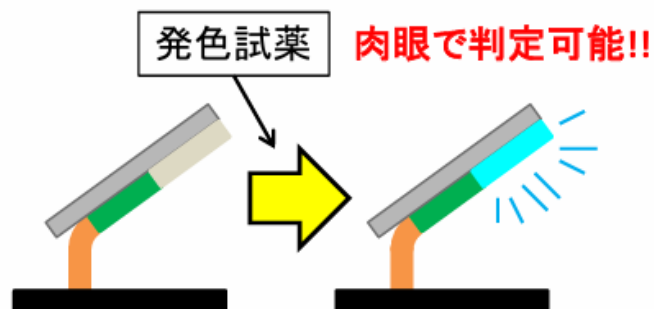
③ Primer Extension

プローブと特異DNAが結合した場合のみ伸長

非特異反応を減少!!



④ 発色



アレイシート模式図

発色する箇所により判定

	野生型	変異型	
M	1	2	M
	3	4	
M	5	6	M

Campylobacter spp.マクロライド系

C.jejuni

ニューキノロン系

C.coli

※Mは指標マーカー

《特長》・*gyrA*遺伝子により*C.jejuni*と*C.coli*を鑑別 ・少量のサンプルでも実施可能
・*gyrA*遺伝子と*rrf*遺伝子における点変異の中で約80%を占める変異型を検出

CAMpylobacter Express Resistance Detection Array (CAMERA法)

ML耐性、カンピロバクター属菌の確認 (23SリボゾームRNA遺伝子)

左: WT (感受性? *Campylobacter*)、右: A2075G (ML耐性)

FQ耐性、カンピロバクター種の確認
(*gyrA* 遺伝子)

上段: *C. jejuni*

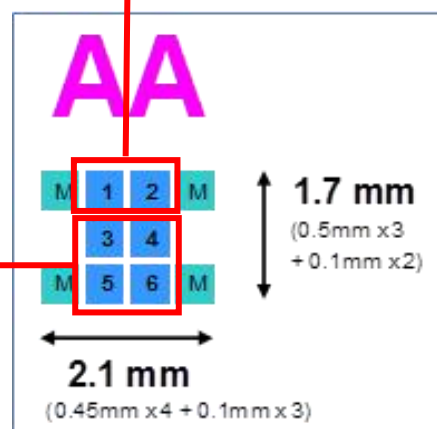
左: WT (感受性?)

右: C257T (耐性)

下段: *C. coli*

左: WT (感受性?)

右: C257T (耐性)

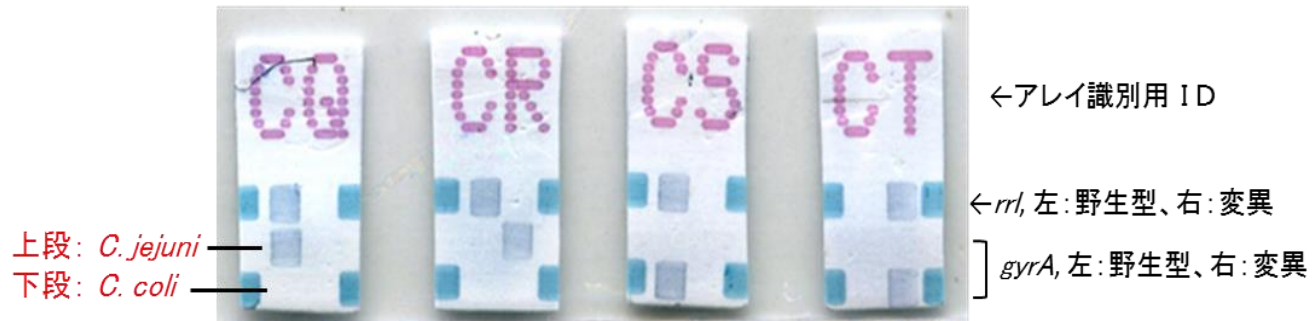


エッペンドルフチューブ1.5ml

菌種と薬剤(FQ, ML)耐性が同時に判定可能

サイズの縮小により、迅速、高精度、低コストの系が実現

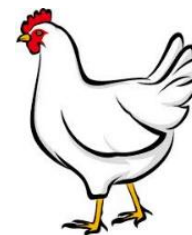
CAMERA法による薬剤耐性カンピロバクター検出の実際



<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
ML 感受性	ML 感受性	ML 感受性	ML 耐性
FQ 感受性	FQ 耐性	FQ 感受性	FQ 耐性



鶏盲腸便での培養法との比較



培養法

分離菌の性質	鶏舎(n)
<i>C. jejuni</i> FQ-S	19
<i>C. jejuni</i> FQ-R	1
<i>C. coli</i> FQ-R	2
<i>C. jejuni</i> FQ-S FQ-R	1
<i>C. jejuni</i> FQ-S <i>C. coli</i> FQ-R	1
Not isolated	18
Total	42

CAMERA法

一致(n)	一致せず(n)
18	1
1	0
2	0
1	0
0	1
18	0
40	2

培養法と40/42（95%）一致
一致しなかった2鶏舎についても主要構成菌を検出

市販鶏肉での培養法との比較



培養法

分離菌の性質	鶏肉(n)
<i>C. jejuni</i> FQS-MCS	5
<i>C. jejuni</i> FQR-MCS	11
<i>C. coli</i> FQR-MCR	1
Not isolated	83
Total	100

CAMERA法

一致(n)	一致せず(n)
5	0
10	1
1	0
83	0
99	1

培養法と99%一致
スクリーニング試験に十分な感度と特異度

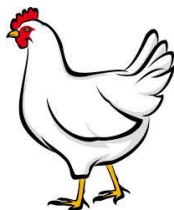
CAMERA法の特徴

鶏肉



- ・DNA抽出までのプレストン培地での前培養は24時間が適当
- ・検査時間は24時間培養+6時間=30時間
- ・検出限界は <10 CFU/g
 - ・鶏肉中カンピロバクター汚染濃度は約 10^2 CFU/g(第2回検討会資料)

鶏糞便

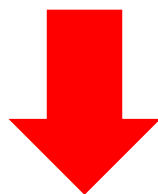


- ・前処理も含め検査時間は約6時間
- ・検出限界は $10^4 \sim 10^5$ CFU/g
 - ・鶏糞便中カンピロバクター汚染濃度は $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(Norman J, 2005)

- 培養法に比べて検出時間を大幅に短縮し検出感度も十分
- 薬剤感受性も同時に検出

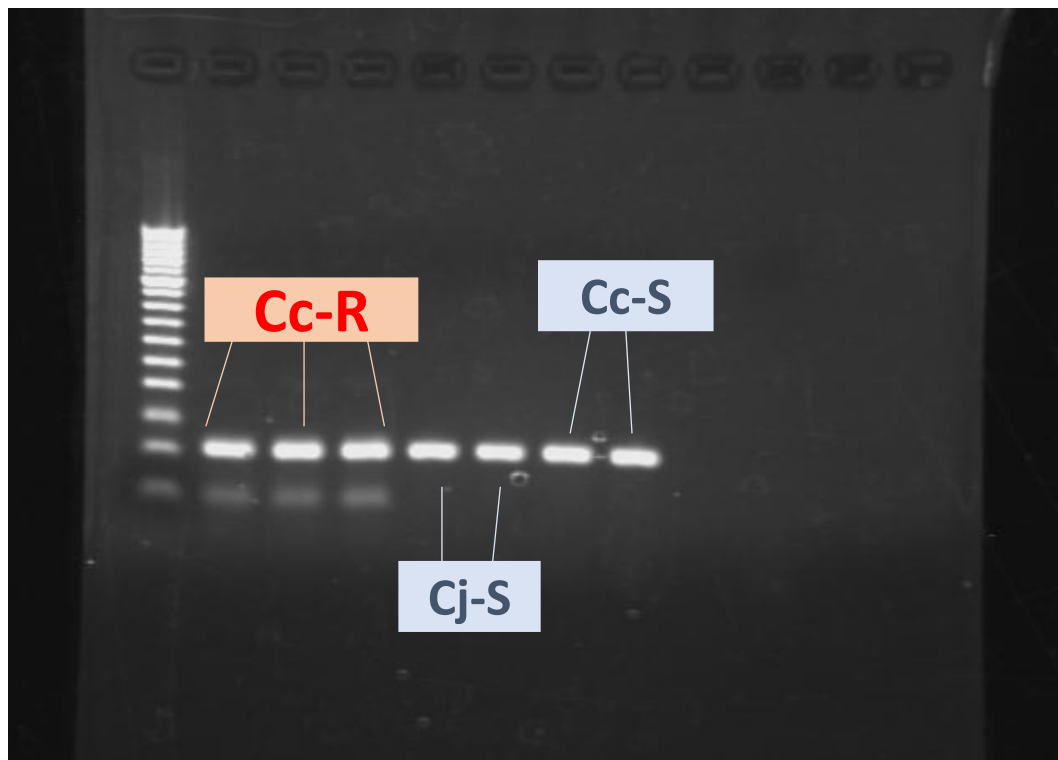
ところが

CAMERA法で使用する高性能の膜が突如販売中止



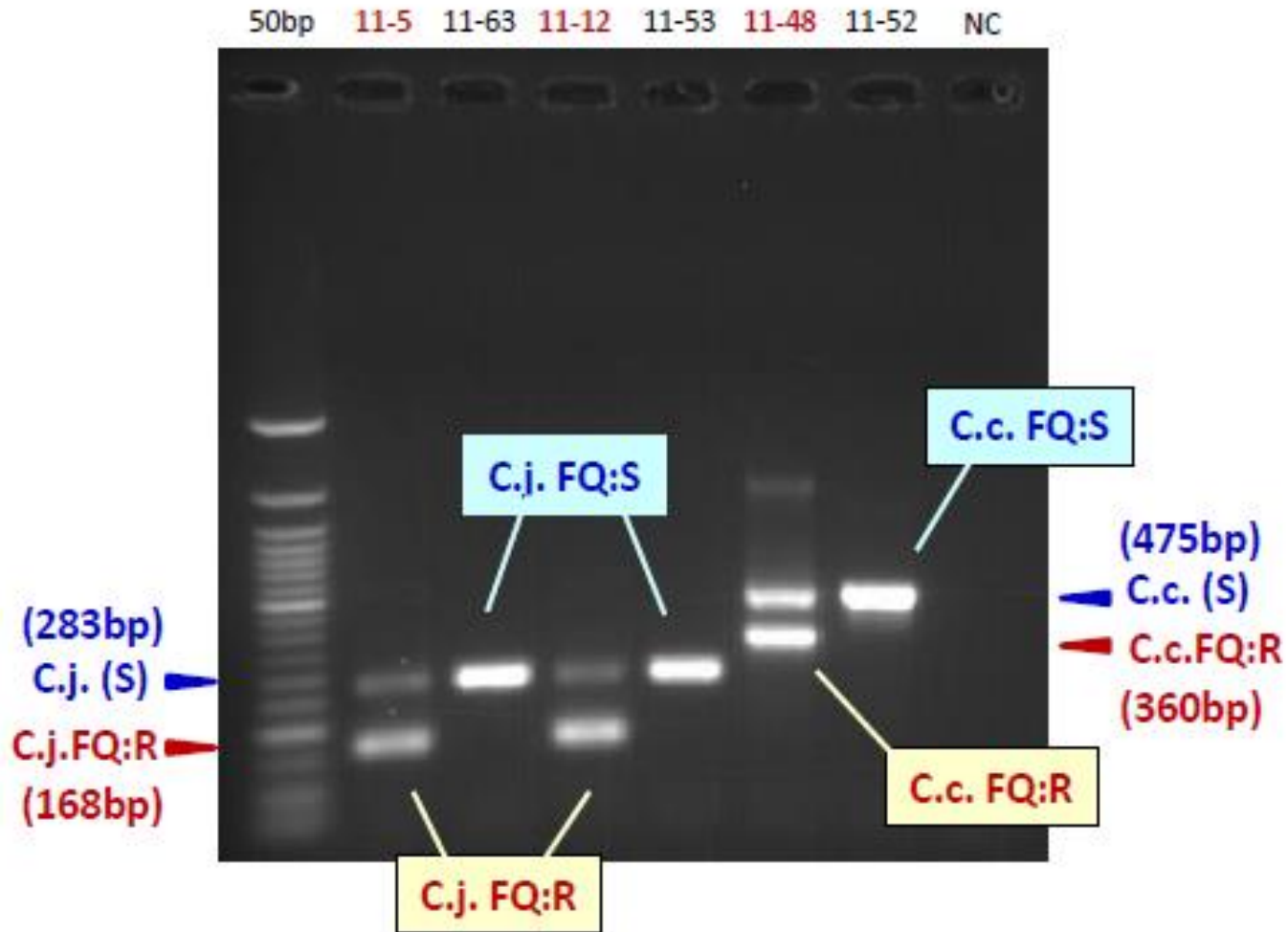
Multiplex-PCR法の開発に着手

開発したMultiplex-PCR法の電気泳動像 (マクロライド耐性検出系)



- カンピロバクター属菌の確認
- マクロライド耐性の検出

開発したMultiplex-PCR法の電気泳動像 (フルオロキノロン (FQ) 耐性検出系)



- *C.jejuni*と*C.coli*の識別
- FQ耐性と感受性の識別

市販鶏肉を用いた培養法とMultiplex-PCR法によるカンピロバクター属菌の検出と識別

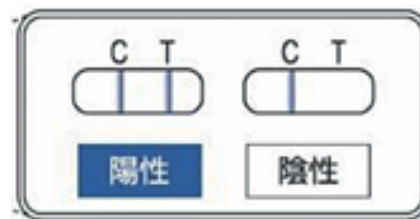
合計(n=277)	培養法	multiplex PCR
カンピロバクター属菌	52(18.8%)	59 (21.3%)
<i>C. jejuni</i>	48 (17.3%)	50 (18.1%)
<i>C. coli</i>	5 (1.8%)	6 (2.2%)

**C. jejuni/coli*の両方が存在：1検体（培養法）

培養法と同程度にカンピロバクター属菌を検出

糞便中のカンピロバクター抗原の検出キット

- 体外診断用医薬品
- 使用目的：糞便中のカンピロバクター抗原の検出
(カンピロバクター感染の診断の補助)
- 原理：イムノクロマト法
- 反応時間：15分間
- 検出感度：
Campylobacter jejuni 7.8×10^4 CFU/ml
Campylobacter coli 6.3×10^5 CFU/ml



糞便中のカンピロバクター抗原検出キットの 鶏糞便への応用

■ 方法：

- (1) 培養した*C. jejuni* 10^8 CFU/mlを10倍階段希釈し、PCR法で確認したカンピロバクター陰性の鶏糞便に添加
- (2) カンピロバクター抗原検出キットの添付文書に従って試験を実施

■ 結果：

鶏糞便での検出限界 4.8×10^4 CFU/ml



鶏糞便でもヒト糞便と同等の検出感度で使用可能

まとめ



- カンピロバクター食中毒の低減化にはフードチェーンアプローチで対応することが重要
- カンピロバクター属菌が検出されない農場が存在
- カンピロバクター陽性農場から汚染鶏肉が生産
- 肉用鶏農場での対策が重要
- 鶏糞由来*Campylobacter jejuni*のほとんどがML感受性
- ただし、FQ耐性が増加傾向
- カンピロバクター属菌と薬剤感受性を同時に検出するCAMERA法を開発（ただし、使用する膜の供給が中止となり実用化を断念）
- カンピロバクター属菌と薬剤感受性を同時に検出するMultiplex-PCR法を開発中
- ヒト糞使用のカンピロバクター抗原検出キットを鶏糞便に応用可能



肉用鶏農場でのカンピロバクター検査法の導入が重要

提 案

- 肉用鶏農場でのカンピロバクター属菌の定期的なモニタリング検査を実施
- モニタリング検査の結果で対策を構築
- モニタリング検査法の確立が課題
 - ・農場段階での検査にはイムノクロマト法の応用が可能
 - ・検査室段階ではMultiplex-PCR法の応用が可能
- 検査会社の利用も考慮

モニタリング検査を導入して
カンピロバクター陰性の肉用鶏農場をめざしましょう！