

平成30年度調査研究

1. 平成30年度残留抗菌性物質検査結果	…	1
2. アンピシリンを中心としたペニシリン系抗生物質の LC/MS/MSによる分析法	…	5
3. 免疫組織化学的検索結果から確定診断した、 肉腫様変化を伴った牛の胆管細胞癌の1例	…	9
4. 仙台市ミートプラントに搬入されたブタのカンピロバクター保有状況	…	13

1. 平成30年度残留抗菌性物質検査結果

1. はじめに

食品中への抗菌性物質の残留は、耐性菌の出現や食品アレルギーの誘引になるとも言われており、食品衛生法（食品、添加物等の規格基準）により規制されている。本所においても、昭和59年より食肉中の残留抗菌性物質について検査を実施してきたところであり、以下に平成30年度の検査の概要を報告する。

2. 検査対象

仙台市ミートプラントに搬入された獣畜のうち、次に該当する獣畜を検査対象とした。

- (1) 病畜として搬入された獣畜。
- (2) 健康畜として搬入された1歳未満の牛（とく）。
- (3) 健康畜として搬入され、敗血症を疑わせる所見を認めた獣畜。
- (4) 健康畜として搬入され、抗菌性物質の使用を疑わせる所見を認めた獣畜。

3. 方法

本所独自法に従って検査を行った。

(1) プレミテストによる簡易法

平成20年4月から腎臓、筋肉について実施。

※プレミテストは製造元r-biopharm社、輸入元アヅマックス(株)の検査用培地で、厚生省通知(平成6年7月1日衛乳第107号)に基づく簡易法よりも迅速かつ高感度である。詳細は平成21年度事業概要の調査研究資料「プレミテストによる残留抗菌性物質の簡易検査法の検討」等を参照のこと。

(2) LC/MS/MSIによる残留抗菌性物質一斉分析法

簡易法により残留抗菌性物質陽性と判定された獣畜の筋肉についてLC/MS/MSIによる一斉分析を行った。当所では、妥当性評価試験により妥当性が得られた32成分を定量可能物質とし、残り12成分は定性可能物質として分析を行っており、表1に定量可能物質32成分を示した。

表1 平成30年度 LC/MS/MSIによる残留抗菌性物質一斉分析法の定量可能物質

対象成分名	
トリメプリム	スルファメキサゾール
スルファメラジン	スルファドキシム
マルボフロキサシン	フロルフェニコール
オキシテトラサイクリン	ドキシサイクリン
オルメプリム	オキシリン酸
チアンフェニコール	スルファジメトキシム
シプロフロキサシン	スルファキノキサリン
テトラサイクリン	タイロシン
ダノフロキサシン	ベンジルペニシリン
スルファジミジン	エリスロマイシン
エンロフロキサシン	デキサメタゾン
セファゾリン	オキサシリン
オルビフロキサシン	メンブトン
スルファモノメトキシム	クロキサシリン
スルファクロルピリダジン	ナフシリン
クロルテトラサイクリン	ジクロキサシリン

4. 結果および考察

簡易法の検査結果を表2に示した。簡易法により腎臓から抗菌性物質が検出されたものは、検査を行った牛、とく、及び豚の計224頭のうち牛9頭であった。

簡易法で腎臓陽性となった獣畜の筋肉を用いて、プレミテスト及びLC/MS/MSIによる残留抗菌性物質一斉分析(独自法)を行った結果、今年度は定量下限値を上回るものは確認されなかった。

平成21年度から平成30年度までの、簡易法による腎臓からの抗菌性物質の検出頭数(腎陽性率)を表4、図1に示した。平成27年度までは6%前後を推移していたが、平成28年度は1.5%と大きく減少した。しかし、平成29年度は再び5.1%と再び以前までに近い水準に戻った。本年度は4.0%となり例年よりやや低い水準であった。

簡易法で腎臓陽性となった9頭の個々の事例について、2頭は抗菌性物質の投薬歴がなかったが、そのうち1頭については後の検査でフルニキシムの使用が疑われたため、投与の確認を依頼した。その結果、1か月ほど前に当該成分を含む薬剤を投与していたことが分かり、投薬についてはすべて申請するよう荷受会社を通じて依頼を行った。また、消炎剤の投薬歴のあった1

頭の牛について、当薬歴にある薬剤では簡易法により腎臓陽性とはならないと推測されたため聞き取りを行った結果、1週間ほど前に抗菌性物質を投与していたことが判明した。こちらについても、出荷者から当薬歴の正確に申告をうけるよう、荷受会社へ口頭指導している。

今後も、荷受会社を通じ出荷者に対して投薬歴申告の徹底と薬剤の適切な使用を促すとともに、抗菌性物質を含めた動物用医薬品の検査を継続し、安全な食肉の供給に寄与していきたい。

表2 平成30年度 簡易法検査結果

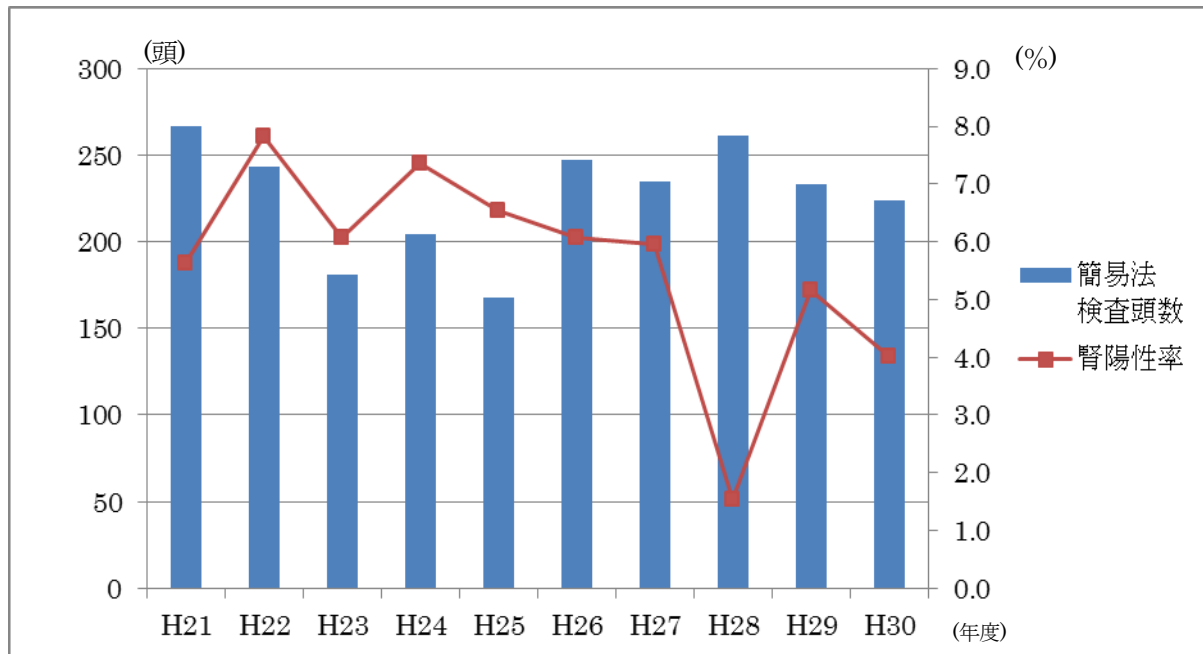
	牛		とく		豚		小計		総計
	健康畜	病畜	健康畜	病畜	健康畜	病畜	健康畜	病畜	
検査頭数	26	135	14	8	41	0	81	143	224
腎陽性頭数	0	8	1	0	0	0	0	8	9
腎陽性率(%)	0	5.9	7.1	0	0	0	1.2	5.6	4.0
腎筋陽性頭数	0	0	0	0	0	0	0	0	0
腎筋陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表4 過去10年間の簡易法による腎臓からの抗菌性物質検出頭数の推移

	牛	とく	豚	計
平成21年度	10(8)	2(1)	3(2)	15(11)
平成22年度	10(8)	4(0)	5(1)	19(9)
平成23年度	8(5)	0(0)	3(1)	11(6)
平成24年度	9(5)	2(0)	4(0)	15(5)
平成25年度	8(5)	1(0)	2(1)	11(6)
平成26年度	12(7)	1(0)	2(1)	15(8)
平成27年度	10(4)	3(0)	1(0)	14(4)
平成28年度	2(1)	2(0)	0(0)	4(1)
平成29年度	9(6)	2(1)	1(0)	12(7)
平成30年度	8(8)	1(0)	0(0)	9(8)

(())は病畜の頭数:再掲)

図1 過去10年間の簡易法による腎臓からの抗菌性物質検出頭数の推移



2. アンピシリンを中心としたペニシリン系抗生物質のLC/MS/MSによる 分析法

1. はじめに

ペニシリン系抗生物質であるアンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、ベンジルペニシリン (PGG)、クロキサシリン (CXC)、ジクロキサシリン (DCXC)、ナフシリン (NFPC)、メシリナム (MPC)、オキサシリン (OX) は、人のみならず家畜診療分野においても、動物用医薬品として幅広く使用されている。特に ABPC はグラム陽性菌からグラム陰性菌まで、広範にわたり優れた作用域と抗菌力を有する薬剤であり、当所においても病畜として搬入される獣畜の投薬履歴に申告があるものも多い。

ペニシリン系抗生物質について、当所では蛍光誘導体化法を用いた蛍光検出器による分析^{[1][2]}を行っていたが、手技がやや煩雑で、操作には熟練を要した。また LC/MS/MS を導入した際、一斉分析法 (独自法)^[3]を確立したが、ABPC を含め一部の薬剤については妥当性評価の目標値を満たすことはできなかった。そこで今回、LC/MS/MS による ABPC の定量を目的に分析法を検討し、併せて ABPC を含めたペニシリン系抗生物質 8 薬剤について妥当性評価を実施したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1 試料および試薬

所管と畜場に搬入された牛及び豚の筋肉を試料として用いた。固相抽出ミニカラムは、スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (InertSep PLS-2 6ml; GL sciences) を用いた。標準品 (富士フィルム和光純薬工業) は全て HPLC 用を用い、それぞれを水:アセトニトリル:メタノール (4:3:3; v/v) で 200ppm に溶解したものを標準原液とした。

2 試験溶液調整法

1 検体当たり 5g の細切した筋肉に水を加えホモジナイズし、0.17mol/l 硫酸と 5%タングステン酸ナトリウムを添加後に振とうすることで除タンパクを行った。その後、遠心分離を行い、上清をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過し、固相抽出ミニカラムに負荷した。溶出液を減圧乾固後、水:アセトニトリル (1:1; v/v) で再溶解し、試験溶液とした (図 1)。

3 装置および分析条件

高速液体クロマトグラフ (HPLC) は Nexera (島津製作所) を、タンデム質量分析器 (MS/MS) は TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific) を用いた。分析カラムは Kinetex 1.7 μ m

C18 100×2.10mm(Phenomenex) を用いた。

4 LC/MS/MS 分析条件

LC 移動相は 0.1% ぎ酸水溶液(A 液)と 0.1% ぎ酸アセトニトリル溶液(B 液)を用いたリニアグラジエント方式(表 1)とし、表 2 の測定条件で分析を行った。MS/MS 測定条件は表 3 に示した。

5 妥当性評価

厚生労働省通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に基づき、選択性、真度及び精度について評価を行った。選択性は無添加試料の分析結果から妨害ピークについて評価し、真度及び精度は、各薬剤の基準値濃度に合わせた添加回収試験を行い、結果から算出した数値をガイドラインに定められている目標値と照らし合わせて評価した。枝分かれ条件は 1 日 2 検体 5 日間として評価を行った。

6 検量線の作成と定量

標準原液を水:アセトニトリル(1:1;v/v)で希釈し、基準値の1/2倍濃度、1倍濃度、2倍濃度を作成し、絶対検量線法により定量を行った。

時間(分)	A液濃度(%)	B液濃度(%)
Initial	90	10
8	25	75
8.01	10	90
10	10	90
10.01	90	10
13	90	10

表 1 グラジエント条件

[LC部]	
流速	0.3ml/min
カラム温度	40°C
[MS/MS部]	
イオン化法	ESI(+)
測定モード	MRM
スプレー電圧	2000V
キャピラリー温度	250°C
窒素ガス量	30arb

表 2 LC/MS/MS 測定条件

試験項目	プレカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	Tube lens (V)	Collision energy (eV)
ABPC	350.000	105.990	85	19
AMPC	366.111	349.200	124	5
POG	335.001	160.000	113	16
CXC	436.000	277.000	125	13
DCXC	469.999	160.000	143	13
NFPC	415.001	199.000	74	18
MPC	326.001	167.300	165	22
OX	402.100	160.000	125	10

表 3 対象動物用医薬品と測定条件

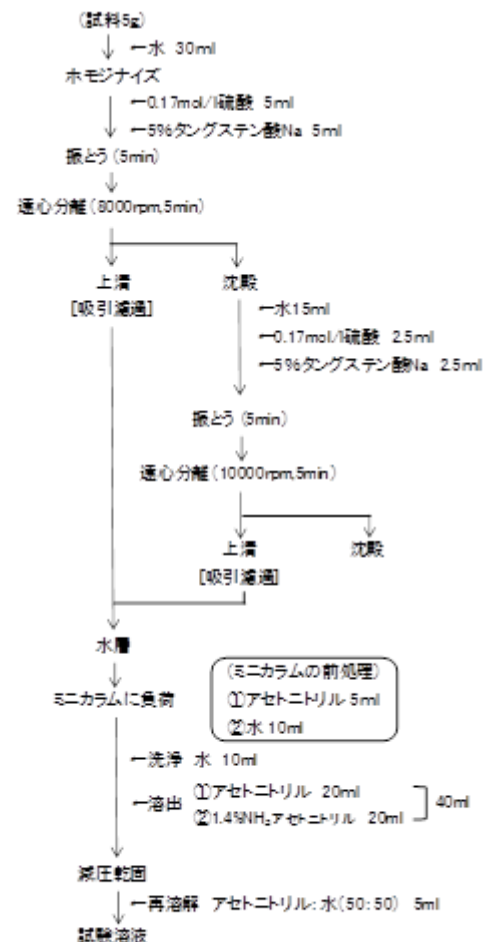


図 1 試験溶液の調整方法

3. 成績

1 検量線

8 薬剤についていずれも 0.0025~0.6ppm の間で良好な直線性 ($r^2 > 0.999$) を示した。

2 選択性

牛及び豚の筋肉について、無添加試料の MRM クロマトグラム上に分析対象化合物の検出を妨害するピークは確認されなかった。

3 真度及び精度

添加回収試験を実施した8薬剤のうち、牛、豚のいずれも、ABPC、PCG、DCXC、MPC、OX の5種類で、真度、併行精度、室内精度がガイドラインの目標値を満たした。(表4)

【牛・筋肉】

	ABPC	AMPC	PCG	CXC	DCXC	NFPC	MPC	OX
添加濃度($\mu\text{g/g}$)	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.005	0.005	0.3
真度(%)	79.36	-	84.51	81.31	79.03	49.00	96.41	94.35
併行精度(RSD%)	4.34	-	10.07	18.53	8.58	5.49	11.03	8.09
室内精度(RSD%)	4.91	-	11.78	29.89	12.66	27.98	12.24	14.23
判定	○	×	○	×	○	×	○	○

【豚・筋肉】

	ABPC	AMPC	PCG	CXC	DCXC	NFPC	MPC	OX
添加濃度($\mu\text{g/g}$)	0.06	0.04	0.05	0.3	0.3	0.01	0.05	0.3
真度(%)	74.96	-	95.16	65.00	83.89	45.27	108.96	85.46
併行精度(RSD%)	2.99	-	5.61	8.63	6.20	5.61	3.40	6.74
室内精度(RSD%)	3.49	-	17.76	15.38	9.92	37.40	4.92	12.81
判定	○	×	○	×	○	×	○	○

表 4 妥当性評価 結果一覧

4. 考察及びまとめ

ペニシリン系抗生物質のうち、特に ABPC は、臨床現場において古くから使用されており、当所においても、その残留性が疑われる事例もあったが、LC/MS/MS を用いた定量試験法は確立されていなかった。そこで今回、当試験法を検討するにあたっては、主に ABPC の定量を目的として各条件の検討を行った。

固相抽出カラムについては、PLS-2 以外のポリマー系カラムも検討したが、良いものでも 60%程度の真度であった。また、イオン交換系カラムについても検討したが、pH 調節が試料の影響を受けやすく、結果が安定しないことが多かった。溶出条件については、前実験で PLS-2 に負荷させた段階で、ほぼ 100%がカラムに保持されていることが確認されていたが、アセトニトリル、メタノール、また、各々酸性、塩基性に pH 調節したものを単一で用いた場合、ABPC については成績がよいものでも 70%弱の真度しか得られなかった。そこで、2 種の溶出溶媒を用いることを検討したところ、図 1 で示した方法が最も良い成績

となった。標準溶液については、溶媒標準溶液での定量と、ブランク試料から抽出した試験溶液で標準原液を希釈したマトリクス標準溶液を用いた定量を比較検討したが、ペニシリン系抗生物質については、真度に大きな差はみられなかった。

妥当性評価に関しては、ABPC を含むペニシリン系 5 薬剤で目標値を満たしており、残留抗生物質の検査において有効な手法の一つとなる可能性が示唆された。マトリクス標準液との比較検討から、試料由来成分の除去精度は十分であると推測され、溶媒標準溶液による絶対検量線法で定量が行える点、また、比較的手技が簡易な点から、実用性が高い試験法と考える。しかし溶出について、多量の溶媒を用いる必要があり、強溶出力の溶媒を用いるなどのさらなる検討が必要かもしれない。今回妥当性評価を満たすことができなかったペニシリン系薬剤に加え、同様に家畜診療分野での使用頻度が高い、同じβラクタム系抗生物質のセフェム系薬剤などについても、検査精度を高めつつ項目の拡充を検討していきたい。

- [1] 牛水徹, 佐藤俊夫, 齋藤忠夫, 他. : 日本畜産学会報, 72, 570-578 (2001)
- [2] 松本浩明, 牛水徹, 赤坂和昭, 他. : 日獣会誌, 59, 696-702 (2006)
- [3] 木村雅子, 狩野真由子, 佐々木弘郁, 他. : 平成 27 年度食肉衛生技術研修会・衛生発表会資料, 92-94 (2016)

3. 免疫組織化学的検索結果から確定診断した、

肉腫様変化を伴った牛の胆管細胞癌の1例

1. はじめに

仙台市ミートプラントでと畜検査したホルスタイン種の牛で、短紡錘形細胞が発育優位な肉腫様の1例を認めた。本例は迅速診断後に行った詳細な病理組織学的および免疫組織化学的検索により胆管細胞癌と病理診断したが、当検査所で過去に経験した牛胆管細胞癌の症例中、本例のみに見られた組織型であるため、その検索概要を報告する(全国食肉衛生検査所協議会病理部会第75回研修会に演題発表)。

2. 材料及び方法

(1) 材料

当該症例は仙台市ミートプラントに健康畜として搬入された牛、13歳4か月齢、ホルスタイン種、牝である。得られた肝臓実質の小型腫瘤形成部を主に、他には主要臓器、主要体表リンパ節および一部付属リンパ節を材料とした。

(2) 方法

まず、材料の一部腫瘤についてスタンプMey-Grunwald-Giemsa染色標本を作製した。同時に細胞診に用いた同様組織片からクリオスタット凍結切片を作製後、迅速HE標本と迅速免疫組織化学検査である抗Keratin/CytokeratinAE1/AE3(以下、抗Keratin/Cytokeratinは抗CKと略)、抗Vimentin標本を作製した。次に、病理検査材料は常法によりパラフィンブロックを作製し、HE染色および必要に応じてPAS染色、マッソントリクローム染色を行った。腫瘍組織の免疫組織化学検査については選定部位を用い、上皮系マーカーである抗CKについてはAE1/AE3、7、18、19、20を検索した。また、紡錘形腫瘍細胞が見られたため肉腫系マーカーとして抗Vimentin、抗S-100、抗 α -SMAを検索し、更に抗 α -Fetoprotein(以下抗AFP)、抗Chromogranin-A、抗WT-1についても検索した。尚、使用抗体は抗CK18、抗CK19がabcam、抗CK20がLSBio、他はニチレイの製品である。

3. 成績

(1) 肉眼所見

内臓摘出時、肝臓実質全域に散発性に灰白色結節形成を観察した。それらは大きさ5mm

～3cm の球状で、左葉先端では集簇していた。正常様肝臓組織と腫瘤は境界明瞭であり、腫瘤の諸所中心部に出血や壊死を認めた。尚、肝臓実質は腫大性で黄色調を呈し、左葉～方形葉の領域で慢性うっ血が見られた。この他、肝臓と同質の腫瘤(大きさ 5mm～2cm)が両側肺実質内に散発し、リンパ節中病変が最も重度であった肝門リンパ節の灰白色硬化腫大の他、同質性変状を腸間膜リンパ節と縦隔リンパ節の一部領域で認めた。

(2) 病理組織及び免疫組織化学所見

凍結切片を用いた肝臓腫瘤組織迅速 HE 標本では、結合織の蜂巢状発育内における短紡錘形細胞(Short spindle cell:SSC)の集簇像が観察され、同迅速免疫組織化学染色の結果抗 CKAE1/AE3、抗 CK7 陽性、抗 Vimentin 陰性であった。パラフィン切片では上記 SSC 集簇に加え、正常様肝細胞と腫瘍組織の境界部領域で立方状細胞(Cuboidal cell:CC)による小集簇ないし腺腔様形成の混在を認めた。転移巣と考えられた肺実質の腫瘤および上記リンパ節では SSC のみの増殖像を認めた。また一部腫瘍組織内には多核巨細胞様細胞の出現を観察した。腫瘍細胞の特染性状としては SSC および CC 両者細胞質内に PAS 陽性物質の存在を極わずかに認めた。免疫組織化学的検査の結果、両者は抗 CKAE1/AE3、抗 CK7、抗 CK19、抗 CK20 陽性、抗 Chromogranin-A、抗 α -SMA、抗 WT-1 陰性、CC のみとしては抗 CK18 陽性の他、抗 Vimentin、抗 S-100、抗 AFP で陽性を示した。

4. 考察

本症例の病理診断の要点は、一見肉腫様を呈する短紡錘形細胞の病理組織学的扱いにあると考えられた。類似症例は牛[1]の他、各種動物でも犬や実験動物で僅かに報告があるが比較検討には至らなかった。過去の全国食肉衛生検査所協議会病理研修会では紡錘形細胞の出現を伴った肝細胞癌(No.463)が提出されているが、病理診断名は肝細胞癌(紡錘細胞型)とされ、免疫組織化学的検索情報は得られなかった。一方、医学領域では胆管細胞癌および肝細胞癌で肉腫様を呈する報告が多数見られ、過去には診断困難とされていたが近年では免疫組織化学検査の進歩により肉腫様変化を伴う両者の診断が容易になっている[2-7]。これに関連して解剖組織学的研究により上部胆管であるヘリング(Hering)管近縁に幹細胞(Stem cell)が存在し、本細胞が肝細胞および胆管細胞の両方に分化することが知られ[8]、従って両者の腫瘍細胞の免疫組織化学的性状が病理診断上重要になった経緯がある[5]。

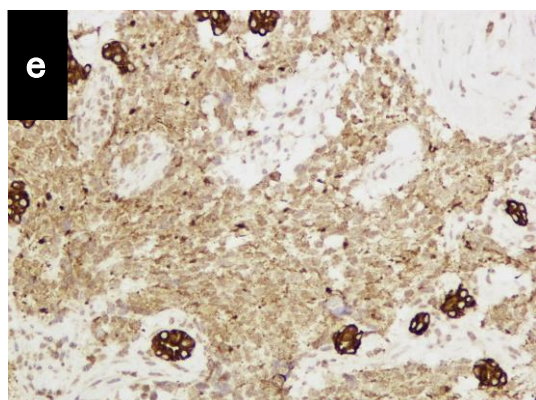
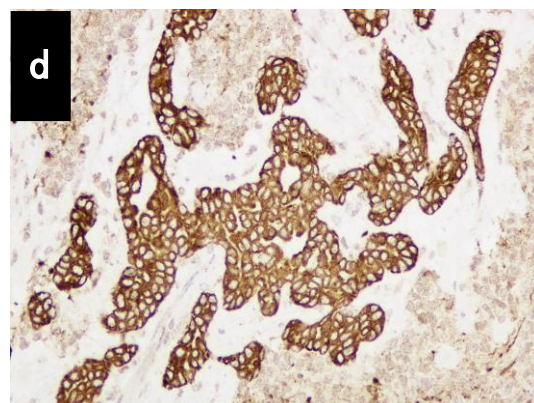
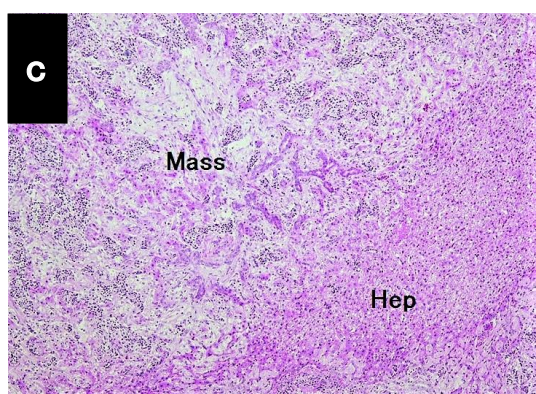
本症例は肉眼的には肝臓実質内に腫瘍性腫瘤が散見され胆管細胞癌の様相であった。人では胆管細胞癌が肉腫様を呈する場合、原発巣としてヘリング(Hering)管から胆細管の最上部で腫瘍化した際に見られるとのことである。また、免疫組織化学検査の抗CK結果がSSCおよびCCにおいてAE1/AE3、7、19、20が陽性で、特に抗CK7と抗CK19陽性所見は胆管細胞癌の性状であると考えられた。病理診断名に関しては転移巣での腫瘍細胞の発育状況はSSCのみが増殖し優位性が見られ、近年この様な組織型を呈する場合、人での分類では「肉腫様変化を伴う」と診断名に付するとしていることに即し、組織診断名を牛肝臓の肉腫様変化を伴った胆管細胞

癌、疾病診断名を牛の胆管細胞癌とした。

尚、本症例では若干の参考知見を得た。一点目は腫瘍組織内に多核巨細胞様細胞の出現を観察したことである。これは紡錘形細胞が出現する肉腫様未分化癌腫に見られる所見の様である。未分化な腫瘍性紡錘形細胞は細胞接着因子が骨系芽細胞と同一な点で骨芽細胞の側面を有することから、多核巨細胞様細胞の出現が見られるとの報告があり[9]同様所見と思われた。二点目は、本症例のCCのみで抗AFPに陽性反応が見られたことである。当所の経験上、牛の胆管細胞癌初めての結果であり、同様な動物報告例の文献検索では見当たらなかった。本例のAFP産生機序は明らかではなかったが、人の症例では稀に未分化胆管細胞癌で見られ、腫瘍細胞の逆分化によるものとの記述があった[10]。三点目は、腫瘍細胞のCCにおいて免疫組織化学的に抗Vimentinと抗S-100に陽性を示し肉腫様の性状を認めたことである。本件については人および動物でも報告されている、癌腫細胞が転移と組織浸潤の為に、可逆的に非運動性の上皮系癌細胞から運動性の間葉系細胞に分化転換する現象である上皮間葉移行(EMT)の一所見として興味深いものであった。

- [1]Ohfuji,S:Osseous Metaplasia in the Mesenteric Lymph Node with metastatic Cholangiocarcinoma in a Cow,American journal of Canser Sience,1,1-6(2012)
- [2]石上俊一:免疫組織学的に細胆管細胞癌と考えられた1例,日消外会誌,428(6), 657-662(2009)
- [3]高野将人:肉腫様肝内胆管癌と肉腫様肝細胞癌の2例,日消外会誌誌,428(6),657-662 (2009)
- [4]徳丸勝悟:肉腫様変化を伴った胆管細胞癌の1例,日消外会誌38(5),521-526(2005)
- [5]中正恵二:肉腫様成分を伴った肝細胞癌・胆管細胞癌の混合型の1例, 肝臓,93-3,206 -211(1996)
- [6]半田 寛:細胆管細胞癌の1例,日臨外会誌,72(2),461-465(2011)
- [7]前田敦行:多彩な組織像を呈した肝内胆管癌の1例,胆道,17巻4,5号434-440(2003)
- [8]西川裕司:肝細胞と胆管上皮の相互可塑性,生化学,第84巻第8号,649-657(2012)
- [9]村上哲平:上皮性腫瘍の肉腫様変化は骨芽細胞分化の側面を有する:骨分化マーカーを用いた検討と解析,近畿大医誌、40(1),2,39-46(2015)
- [10]大森順子:肝細胞癌との鑑別が困難であったAFP産生胆管細胞癌の1例,日消誌,101、 1106-1111(2004)

5. 写真



- a 肝臓腫瘍：肝臓実質全域における灰白色腫瘍の散発と付属リンパ節の灰白色腫大を認めた。
b 肝門リンパ節：転移巣として、肝門リンパ節の硬化腫大を認めた。
c 肝臓腫瘍部 HE染色 (40倍)：正常様肝組織(Hep)から腫瘍組織(Mass)への移行部像。
d 肝臓腫瘍部 免疫組織化学染色 抗CK19(200倍)：腫瘍細胞CCの抗CK19陽性像。
e 肝臓腫瘍部 免疫組織化学染色 抗CK19(200倍)：腫瘍細胞SSCの抗CK19陽性像。

4. 仙台市ミートプラントに搬入されたブタのカンピロバクター保有状況

1. はじめに

ヒトに下痢, 腹痛, 発熱などの感染型食中毒を起こすカンピロバクターは, 古くから家畜に流産などを起こす人獣共通感染症の病原菌としても知られている。ニワトリ, ウシ, ブタなどの家畜やイヌ, ネコ等のペットが腸管内に保菌しており, 本菌が原因とされる食中毒患者数は 2010 年以降毎年 200~400 件, 患者数 1500~3000 名で推移している。その一部は数週間後に, 手足の麻痺や顔面神経麻痺, 呼吸困難などを起こす「ギラン・バレー症候群」や外眼筋麻痺や運動失調, 腱反射消失を主徴とする「フィッシャー症候群」を発症する場合があることも指摘されている。[1,2,3]

平成 27 年 6 月 12 日から, 食品衛生法に基づきブタの肉や内臓(肝臓)を生食用として販売・提供することは禁止されている[4]が, 肉や内臓の不十分な加熱や調理器具, 取扱い者の手指を介した二次汚染による感染の危険性もある。

また近年ではカンピロバクター腸炎の第一選択治療薬であるマクロライド系薬剤のエリスロマイシンや、キノロン系薬剤(ナリジスク酸, シプロフロキサシン), テトラサイクリン系薬剤への耐性株が出現しているという報告がある。[3,6,10,11]

そこで仙台市ミートプラントに搬入されるブタの肝臓, 胆汁, 直腸便からカンピロバクターの分離を試み, 得られた菌株について薬剤感受性試験を行ったので報告する。

2. カンピロバクターとは

カンピロバクター属は 24 の菌種及び亜種が含まれ, さらに 11 の新たな菌種が提案されている(2012 年時点)[5]が, そのうちカンピロバクター・ジェジュニ(以下 C.j.)とカンピロバクター・コリ(以下 C.c.)は動物が保菌し, 食中毒患者から分離される菌種の多くを占める。

カンピロバクターは, らせん(S 字)状に湾曲した, グラム陰性桿菌で, 一端または両端に一本の鞭毛(細菌の運動器官)を有し, スクリュー様の運動をする。長時間の培養や環境変化によって, らせん状から球形に形態変化し, 長期間生存する場合も見られる。発育温度域は 30~46°C(最も発育良好な至適発育温度は 42°C付近)で, 30°C以下では発育できず, pH 5.0 以下・pH 9.0 以上では発育できない, 大気中(酸素存在下)および乾燥状態, 65°C30 秒の加熱で死滅し, 低温 10°C以下では長期間生存するが, 凍結保存の場合, 凍結や解凍時に損傷を受けて死滅しやすいという特徴がある。

カンピロバクターはヒトや動物の腸管内でしか増殖しないが, 数百個程度と比較的少ない菌量を摂取することにより, ヒトへの感染が成立することが知られている。[1,2,3]

3. 材料と方法

(1)材料

2017 年から 2018 年に仙台市ミートプラントに搬入されたブタ 100 頭の肝臓, 胆汁, 直腸便を用いた.

(2)カンピロバクターの分離

炎症, 退色, 癒着等で廃棄になった肝臓の外側右葉と外側左葉から約 5cm × 5cm × 2cm を採取した. 表面をアルコール綿で消毒した後, 内側から 2 部位合わせて 1g を切り出し, 細切してプチッとカンピロ/10(プレストン培地)(日研生物医学研究所)に接種した.

同一個体の胆汁 1ml, 直腸便 1g も同様に接種した.

42°C24±2 時間培養後, 培養液を mCCDA 培地(日本 BD)に画線塗沫し, 42°C24~48 時間微好気条件で培養した. 培地上に発育した疑わしいコロニーをカンピロバクターLA「生研」(デンカ生研株式会社)でスクリーニングし, 陽性になったものをミューラーヒントン 5%羊血液寒天培地(日本 BD)で分離・純培養し, 各種試験に用いた.

(3)検出および性状試験

ミューラーヒントン 5%羊血液寒天培地に発育したコロニーについて, カンピロバクターLA, グラム染色, 運動性確認, カタラーゼ試験, オキシターゼ試験を行った.

(4)PCRによる同定

ミューラーヒントン 5%羊血液寒天培地からコロニーを釣菌し, TE バッファー500 μl に懸濁後, 95°C10 分間加熱し, 15,000rpm10 分間遠心分離した. 上清を DNA サンプルとして使用した. 同定には Campylobacter(cdt gene) PCR Detection and Typing Kit(タカラバイオ)を用いた.

(5)薬剤感受性試験

1 濃度ディスク(センシディスク, 日本 BD)を用い, Kirby-Bauer 法に準じて実施した. [7,8] ミューラーヒントン 5%羊血液寒天培地 2 枚に, 滅菌生理食塩水に懸濁した試験菌を塗沫し, アンピシリン(ABPC/ペニシリン系), ストレプトマイシン(SM/アミノグリコシド系), ゲンタマイシン(GM/アミノグリコシド系), テトラサイクリン(TC/テトラサイクリン系), クロラムフェニコール(CP/フェニコール系), エリスロマイシン(EM/マクロライド系), ナリジクス酸(NA/キノロン系), シプロフロキサシン(CPFX/キノロン系)の 8 薬剤を配置して, 37°Cで 48 時間微好気培養した. 培養後, 阻止円により耐性の有無を判定した.

4. 結果

(1)カンピロバクター検出状況

100 頭中 61 頭から 72 株のカンピロバクターが分離された。検出率は 61.0%であった。

肝臓から 11 株, 胆汁から 3 株, 直腸便から 58 株が分離され(表 1), 分離された 72 株はすべて, グラム陰性のらせん状桿菌, 運動性陽性, カタラーゼ陽性, オキシターゼ陽性であった。

PCRによる同定の結果, C.j.が 2 株, C.c.が 70 株であった(表 2)。2 個体から, C.j.と C.c.が両方分離された。

表 1 分離部位と分離パターン

肝臓	胆汁	直腸便	頭 (検出率)
+	+	+	2 (2.0%)
+	+	-	1 (1.0%)
+	-	+	6 (6.0%)
+	-	-	2 (2.0%)
-	-	+	51 (51.0%)
-	-	-	39 (39.0%)

表 2 分離部位と菌種

	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	計(株)
肝臓	2	9	11
胆汁	0	3	3
直腸便	0	58	58
合計	2	70	72

(2)薬剤感受性試験

供試した 8 薬剤のうち 7 薬剤に耐性株が認められ, 耐性率は CP の 9.7%から SM の 62.5%であった。(表 3)

表 3 薬剤感受性試験結果

	ABPC	SM	GM	TC	CP	EM	NA	CPFX
感受性株数	53	27	72	38	65	46	43	61
耐性株数	19	45	0	34	7	26	29	11
耐性率(%)	26.4	62.5	0	47.2	9.7	36.0	40.3	15.3

また、薬剤耐性パターンは 1 剤耐性の 4 パターンから 6 薬剤耐性の 1 パターンまでの 29 パターンに分類され、6 薬剤耐性が 2 株、5 薬剤耐性株が 6 株、4 薬剤耐性が 8 株、3 薬剤耐性が 13 株、2 薬剤耐性が 22 株、1 薬剤耐性が 14 株であった。(表 4)

多剤耐性率は 72 株中 51 株で、70.8%であった。

表 4 耐性薬剤の組み合わせ ※特記のないものは C.a.

耐性 薬剤数	耐性 株数	薬剤耐性パターン ●=耐性							
		ABPC	SM	GM	TC	CP	EM	NA	CPFX
6	2	●	●		●		●	●	●
5	4		●		●		●	●	●
	1				●	●	●	●	●
	1	●	●		●			●	●
4	2				●	●	●	●	
	2	●	●		●			●	
	1		●				●	●	●
	1	●	●			●	●		
	1		●		●	●	●		
	1		●		●		●	●	
3	4		●				●	●	
	2		●		●		●		
	2				●	●	●		
	2				●		●	●	
	2	●	●		●				
	1		●		●			●	
2	2							●	●
	(C _j)								
	6		●		●				
	4	●	●						
	3	●			●				
	2		●					●	
	2	●			●				
	1				●			●	
	1						●	●	
	1		●				●		

1	10	●
	2	●
	1	●
	1	●
耐性なし	7	
合計	72	

5. 考察

近年、トリ、ウシ、ブタの肉や内臓の生食またはたたき、湯引き等の不完全な加熱による摂取、あるいは調理器具の殺菌不足による二次汚染により、カンピロバクターによる食中毒件数、患者数が増加している。[1,2,3]

以前からトリ肉やトリの肝臓、ウシの肝臓がカンピロバクター感染症の原因食品と知られており、ウシの肝臓、胆汁、腸管内容物からカンピロバクターが高率に分離された報告もある[12]。

今回ブタの肝臓や胆汁、直腸便からもカンピロバクターが分離されたことで、ブタ内臓肉や調理器具の取扱い、取扱い者の手指の衛生にも注意が必要であることが再認識された。

また、分離された菌株は、アミノグリコシド系やテトラサイクリン系、キノロン系薬剤に高率に耐性を示した。カンピロバクター腸炎の第一選択薬剤であるマクロライド系薬剤のエリスロマイシンにも4割近い耐性株が検出され、同様にキノロン系薬剤のナリジスク酸やシプロフロキサシンにも高率に耐性株が検出された。テトラサイクリン系薬剤は飼料添加剤として認められているためか、薬剤耐性株も高率に出現した。

アンピシリン耐性株は、石原らの報告[13]ではブタ由来の C.c.ではほとんど認められないとのことだったが、近年では耐性を獲得していることが分かってきており[11]、今回の調査で当所でも26.4%の耐性株が存在していることが判明した。

多剤耐性菌とその薬剤耐性のパターンも種類が多く、投薬の際には薬剤感受性試験を行ってからの使用が必須と思われた。

カンピロバクターは熱、凍結、酸素に弱いのが、菌量は少なくとも感染が成立するという特性をわかりやすく説明・指導し、感染の予防を啓蒙する必要があると考えられ、2016年には「薬剤耐性(AMR=Antimicrobial resistance)対策アクションプラン 2016-2020」が策定されて、薬剤耐性菌の蔓延は世界的にも注目を集めており、家畜におけるカンピロバクターの保有状況を把握しておくことは、今後公衆衛生上重要であると思われる。[14]

6. 参考文献

- [1] 内閣府 食品安全委員会 HP(2016)
http://www.fsc.go.jp/factsheets/index.data/factsheets_campylobacter.pdf
- [2] 農林水産省 HP(2018)
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/180302_campylo.pdf
- [3] 三澤尚明 モダンメディア 51 巻 3 号(2005)
- [4] 厚生労働省 HP 食安発 0602 第 2 号 平成 27 年 6 月 2 日付
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000087847.pdf>
- [5] 国際保健機関(WHO): THE GLOBAL VIEW OF CAMPYLOBACTERIOSIS. Report of expert consultation. Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012. (2013)
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf
- [6] 浅井鉄夫 小澤真名緒 農林水産省動物医薬品検査所(2010)
<https://idsc.niid.go.jp/iasr/31/359/dj359a.html>
- [7] Bauer,A.W.,Kirby,W.M.M.,Sherris,J.C.andTruck,M.:Antimicrobial susceptibility testing by a standard-ized single disk method. See comment in PubMed Commons below AM.J.Clin.Pathol.,45,493-496(1966)
- [8] ディスク拡散法 農林水産省動物医薬品検査所
http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/koenshiryo/pdf/h29kenshu_1.pdf
- [9] 渡邊節 菅原直子 小林妙子 山田わか 齋藤紀行 廣重憲生 宮城県保健環境センター一年報 第 24 号(2006)
<https://www.pref.miyagi.jp/uploaded/attachment/209931.pdf>
- [10] 井上奈奈 宮城県(2018)
<http://www.pref.miyagi.jp/uploaded/attachment/350741.pdf>
- [11] 森 哲也, 市川 希美, 岸野 かなえ, 和田 真太郎, 鄒 碧珍, 難波 豊彦, 伊藤 武
日本食品微生物学会雑誌 32 巻 4 号(2015)
- [12] 農林水産省 HP 肉用ウシの消化管内・肝臓・胆汁の菌分布状況調査(2011)
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/kekka/gyuniku/cam/03.html#23221>
- [13] Ishihara K,et al. , J Appl Microb 100(2006)
- [14] 厚生労働省 HP 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン
http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kokusai_kansen/pdf/yakuzai_honbun.pdf