

表3. マルチプレックスPCRにおける各病原遺伝子の検出感度

PCR	標的遺伝子	試験菌液濃度 (cfu/ml)	単独検査時の 陽性限界希釈倍率	混在検査時 陽性限界希釈倍率
テトラプレックス	<i>invE</i>	5.4×10^8	1000	125
	<i>stx</i>	5.5×10^8	100	125
	<i>est</i>	8.5×10^8	1000	125
	<i>elt</i>	4.0×10^8	100	25
デュプレックス1	<i>afa</i>	9.2×10^8	1000	25
	<i>astA</i>	1.7×10^9	10000	3125
デュプレックス2	<i>eae</i>	1.6×10^9	10000	125
	<i>aggR</i>	1.2×10^9	10000	625

表 4. 食材の増菌培養液で各病原遺伝子保有菌を希釈した際のマルチプレックス PCR の検出感度

PCR	標的遺伝子	試験菌液濃度 (cfu/ml)	陽性限界希釈倍率
テトラプレックス	<i>invE</i>	1.2×10^9	1000
	<i>stx</i>	9.3×10^8	100
	<i>est</i>	2.9×10^9	100
	<i>elt</i>	6.4×10^8	10
デュプレックス 1	<i>afa</i>	5.5×10^8	1000
	<i>astA</i>	1.3×10^9	1000
デュプレックス 2	<i>eae</i>	1.1×10^9	10000
	<i>aggR</i>	1.0×10^9	1000

表 5. 各増菌培養法における大腸菌群確定試験と PCR 試験の陽性および陰性検体数

	細菌集落が		PCR 試験	
	大腸菌群	PCR 試験	大腸菌群	PCR 試験
	生じた検体数*	確定試験**	陽性***	陰性***
FDA 二段培養法	84	48	22	3
STG-BPW 培養法	88	34	7	13

* 総検体数 115

** EMB 寒天培養後の大腸菌群集落の有無により判定

*** 複数の病原遺伝子について陽性となったものも 1 陽性検体として計数

表6. マルチプレックスPCRによる各病原遺伝子検出検体数*

	<i>invE</i>	<i>stx</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>afa</i>	<i>astA</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	陽性検体数
FDA 二段培養法	0	0	3	4	0	20	6	0	25
BPW-STG 培養法	0	2	0	4	5	10	1	0	20
(両培養法で検出)	—	—	—	(2)	—	(5)	(1)	—	(8)
計	0	2	3	6	5	25	6	0	37

* 総検体数 115

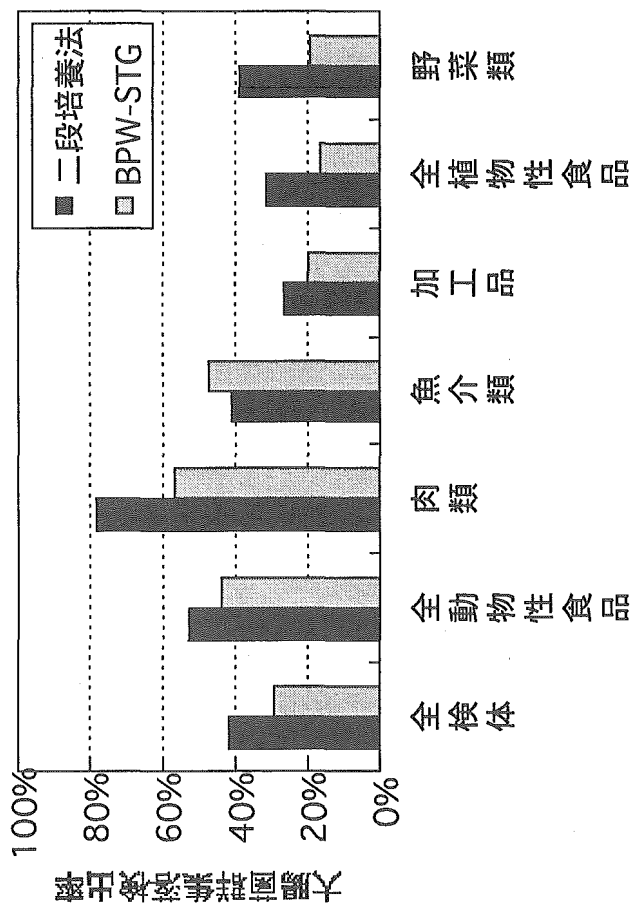


図1. 増菌培養法と検体の種類別に見た大腸菌群検出率
大腸菌群の確定はEMB寒天平板を用いて実施した。

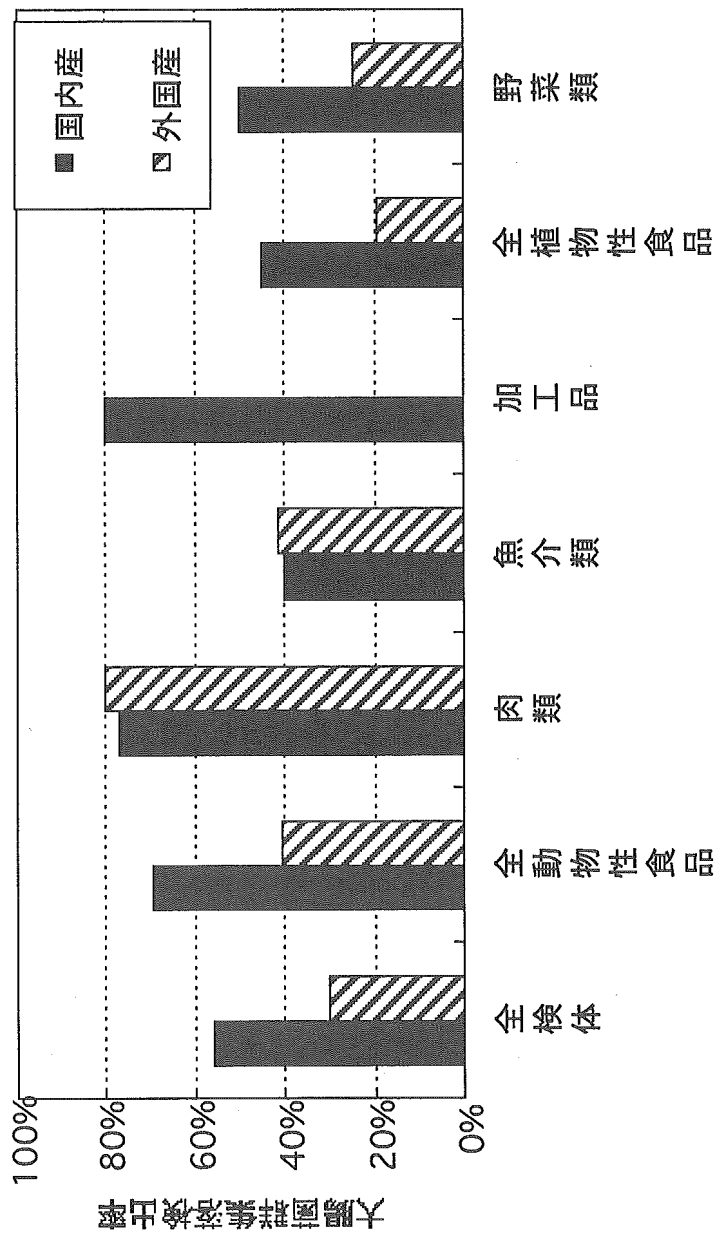


図 2. 国内産と外国産食品の種類別に見た大腸菌群検出率
 大腸菌群の確定は EMB 寒天平板を用いて実施し、FDA 二段培養法と BPW-STG 法の結果を集計した。

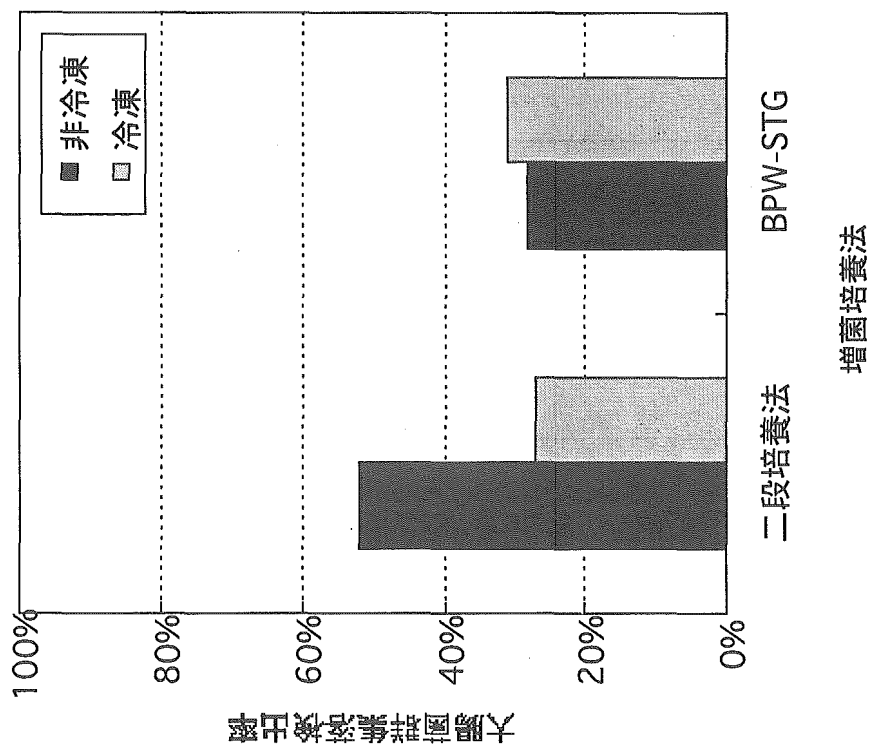


図3. 冷凍食品と非冷凍食品に対する各増菌培養法の大腸菌群検出率

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌

およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）

協力研究報告書

食品および人における *Salmonella* Senftenberg と *Salmonella* Weltevreden の分布と
細菌学的解析

要旨

Salmonella Enteritidis はサルモネラ食中毒の主要な血清型である。また、散発性下痢症者や健康保菌者から分離されるサルモネラも同血清型が主流を占めるが、半数以上は多様な種類の血清型株である。これまでに、SE 下痢症の重要な感染源が鶏卵等鶏関連材料であると指摘され、防止対策が行われてきたのに対し、他の血清型株にあっては汚染状況が明確でないこともあり、十分な措置がなされていない。そこで本研究では、香辛料をはじめ、国内に流通する食品のサルモネラ汚染実態調査を行い、分離した *Salmonella* Senftenberg と *Salmonella* Weltevreden を対象に、ヒト由来の同血清型株との関連性について検討した。食品とヒト由来株の一部は遺伝学的に近似することが示されたが、ヒトの感染源は不明であり、また両血清型は海外や沖縄での分離頻度が高いこと、日本は輸入食品への依存度が高いなどの理由から、サルモネラ下痢症の発生を低減させるため、引き続きヒトおよび市販食品のサルモネラ汚染状況を監視していく必要がある。

研究協力者

大塚佳代子 埼玉県衛生研究所

A. 研究目的

埼玉県では毎年数例のサルモネラ食中

毒が発生しており、その殆どが *Salmonella* Enteritidis (SE) によるものである。一方、散発性下痢症者や健康保菌者から分離されるサルモネラも同血清型が主流を占めるが、

半数以上は多様な種類の血清型株である。

これまでに、SE 下痢症の重要な感染源が鶏卵等鶏関連材料であると指摘され、防止対策が行われてきたのに対し、他の血清型株にあつては汚染状況が明確でないこともあり、十分な措置がなされていない。

そこで本研究では、香辛料をはじめ、国内に流通する食品のサルモネラ汚染実態調査を行い、分離されたサルモネラとヒト由来株との関連性について検討した。

B. 研究方法

1. 鶏肉および香辛料のサルモネラ検査

2004 年 7 月～2005 年 6 月、埼玉県内のスーパーおよび卸売市場で購入した輸入鶏肉 96 検体は、各々 25g を滅菌ストマッカー一袋に採材し、Buffered Pepton Water (BPW、OXOID) 225ml を加え、35℃、22～24 時間培養した。培養液 0.5ml を Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth (RV、OXOID) に接種し、42℃、22～24 時間培養した後、XLD 培地 (XLD、OXOID) および Brilliant Green Agar (MODIFIED) (BGM、OXOID) に画線塗抹し、35℃で 22 時間培養した。平板上のサルモネラと疑われるコロニーは TSI 寒天培地 (栄研化学) と LIM 培地 (栄研化学) に釣菌して生化学性状を確認後、サルモネラ免疫血清 (デンカ生研) で型別した。

2004 年 8 月～2005 年 3 月にかけて国内

各地の販売店から入手した香辛料 271 検体については、各々 25g に Tryptic Soy Broth (TSB、DIFCO) 225ml を加えて室温に 1 時間置き pH METER F-16 (HORIBA) で pH を測定し、pH が 6.0 以下の試料については 5 N NaOH で 6.8 に調整した。pH 調整後、35℃で 24 時間培養し、これら培養液は 0.1ml を RV 並びに 1ml を Tetrathionate Broth (TT、OXOID) に加えて、前者は 42℃、後者は 43℃で 20 時間培養した。菌の分離は RV および TT 培養液を XLD および CHROMager サルモネラ (CHROMager) に画線塗抹後、35℃で 22 時間培養し発育した定型的コロニーを TSI 寒天培地と LIM 培地に釣菌して生化学性状を確認した。

2. ヒト由来のサルモネラ検出状況

ヒト由来の菌株は、協力の得られた埼玉県内の病院を受診した下痢症者等から過去 10 年間に分離され、埼玉県衛生研究所に分与された株を集計した。

3. PFGE 法による遺伝子解析

食品から分離したサルモネラのうち、*Salmonella* Senftenberg (SS) および *Salmonella* Weltevreden (SW) 並びにヒト由来の同血清型株を対象に PFGE 法を用いて、その相同性を比較した。すわなち、泉谷らの方法に準じて DNA を抽出した後、プラグは *Bln* I (TAKARA) 30U を含む制限酵素液で 37℃、4 時間消化した。電気

泳動は CHEF-DR II (Bio-Rad) を用いて、パルスタイム 2.2~63.8 秒、6V/cm、14°C の条件で 20 時間行った。泳動像の解析には遺伝子解析用ソフト Diversity Database を用いて、UPGMA (Unweighted, pair-group method using arithmetic averages) 方式によりデンドログラムを作成して行った。

C. 研究結果および考察

1. 食品のサルモネラ汚染結果

検査した鶏肉 96 検体の産地は、ブラジル、中国、アメリカ、フィリピンで、分離したサルモネラの血清型は SE (11 検体)、SS (1 検体)、*S. Saintpaul* (2 検体)、*S. Heidelberg* (2 検体)、*S. Infantis* (1 検体)で、鶏肉のサルモネラ汚染率は 17.8% であった。

検査した香辛料 271 検体の種類は、チリ(レッド)ペッパー、ブラックペッパー、ホワイトペッパー、クミン、カレーパウダー等で、これらの原産国は主に東南アジアであった。サルモネラを分離した香辛料は、チリペッパー(タイ産) 58 検体中 1 検体(汚染率 1.7%)、ブラックペッパー(原産国不明) 42 検体中 1 検体(汚染率 2.4%)で、血清型は各々 SS、SW であった。

2. ヒト由来サルモネラの血清型別検出状況

埼玉県内の医療機関で、下痢症者等から過去 10 年間に分離し、埼玉県衛生研究

所に菌株が分与されたサルモネラ 1,931 株の血清型は、SE が 748 株(38.7%)と最も多く、次いで Typhimurium 115 株(6.0%)の順で、食品の汚染実態調査において検出された SS は 18 株(0.9%)、SW は 17 株(0.9%)と少なかった(表 1)。

食品およびヒト由来 SS 7 株と SW 8 株の PFGE パターンを比較し、両者の相同性を検討したところ、食品由来の SS 2 株はヒト由来株と同一の PFGE パターンではなかった。しかしながら、鶏肉由来の SS 1 株のパターンはヒト由来の 2 株と近似し、香辛料の SW 1 株はヒト由来の 2 株と近似していた(図 1)。

3. PFGE 法による遺伝子解析

SE による食中毒事例や下痢症者が多発したことを受け、厚生労働省は食品衛生法施行規則等を改正し「卵選別包装施設の衛生管理要領」、「家庭における卵の衛生的取扱いについて」を策定して、生産から消費に至るまでの卵の取扱いに関する総合的な衛生対策を 1999 年以降進めてきた。

加えて、農林水産省は 2005 年、種鶏場等における鶏卵のサルモネラ総合対策指針を示し、サルモネラの制御にさらなる拍車をかけている。

また、家畜伝染病予防法やと畜場法では、家畜や家禽を対象に、4 種の特定なサルモネラを監視し、感染頻度の把握と感染の排除を行っている。

近年、人々が摂取する食品は多様化し、鶏卵と SE のごとく、リスク食品と特定のサルモネラを関連づけるまでには至っていない。従って、食品個々の汚染状況に応じた対策が講じられるためには、国内に流通する食品のサルモネラ汚染状況を把握することが基本となる。そこで本研究では、調味料あるいは薬味として使用される香辛料および汚染リスクの高い鶏肉について、実態調査を行った。

今回サルモネラが分離されたチリペッパーやブラックペッパーは、ポテトチップスなどのスナック菓子に嗜好風味として加えられ、またラーメン、加熱工程のないサラダや調理済み料理を食す際に辛み効果を期待して添加される頻度の高い食材である。

今回サルモネラ汚染調査をしたチリペッパーやブラックペッパーの細菌数は平均 4.00~4.23 log cfu/g で、ブラックペッパーの中には 7.68 log cfu/g といった高い数値を示す検体も確認された。香辛料野菜の多くは選別、水洗した後乾燥されるが、天日乾燥や通風乾燥の段階で内部に侵入した微生物は殆ど取り除けない。香辛料の利用形態は様々であるが、生のまま食酢等に浸漬されたもの、あるいは粉末香辛料にあってはサルモネラをはじめ微生物汚染はそのまま移行するばかりでなく、場合によると粉碎工程でさらに相互汚染の危険性もある。海外では、輸入パプリカでフレーバーされ

たポテトチップスや輸入ブラックペッパーによる食中毒事例報告があり、汚染香辛料で調味した食材の温度管理が不適切で、喫食までの間に菌の増殖をもたらしたり、他の食品を 2 次汚染する可能性もあり、調理時の取扱いに注意を要する。

欧米諸国をはじめ 24 カ国の野菜からの病原菌検出状況報告によると、チリ（原産国：スリナム）、フェネル（イタリア）、オランダガラシ（イギリス）、コショウ（スウェーデン）からサルモネラが検出されている。また、厚生労働省の 2004 年輸入食品監視統計によると、野菜加工品および香辛料は 42,202 トン輸入されており、今回サルモネラが検出されたペッパー類は 8,481 トン、とうがらし 8,815 トンで、その輸入国上位 5 位は前者がマレーシア、インドネシア、シンガポール、インド、アメリカ、後者が中国、大韓民国、アメリカ、タイ、インドで東南アジアが殆どを占める。香辛料およびその調整品の輸入食品監視モニタリング検査の結果、食品衛生法違反等で輸入が拒否された理由の多くは、アフラトキシン陽性や指定外添加物使用などで、過去 5 年間のデータをみても、病原細菌汚染によるものはない。一方、海外の同様な検査結果をみると、FDA のモニタリング検査において病原細菌汚染が確認され、リコールされた輸入香辛料は 1969 年から 2003 年の間において 20 件で、その種類は

バジル、ブラックペッパー、ケラシン、クミン、オレガノ、パプリカ、レッドペッパー、セージ、セサミ、タイムであった。そのうち輸入国が判明した 12 件の内訳はインド、スペイン、トルコ、エジプト、ジャマイカ、メキシコ、台湾で、これらは日本の香辛料等輸入国とは異なる。

本研究で実態調査を行った鶏肉は、加工食品、飲食店など外食産業、家庭において、焼き鳥、親子丼など様々な料理の原材料として利用されることが多く、汚染された鶏肉の加熱不足や不適切な生食による摂取および取扱いの不備等による 2 次汚染を考慮して用途に応じた適切な取扱いが望まれる。

散発性下痢症者や健康保菌者等、医療機関を受診したヒトに由来するサルモネラの感染源は殆ど明らかでなく、これを究明する一端となるべく、食品およびヒト由来サルモネラ株について、遺伝子学的相同性を比較した。食品由来株に近似するサルモネラが分離されたヒトの食生活習慣情報は不明であるが、海外渡航歴がないことから当該菌に汚染された食品を国内で摂取した可能性は否定できない。また、2002 年の食料需給表（農林水産省調査）によると、供給熱量ベースで 60%を海外からの輸入に依存しており、輸入食品無くして国民の食生活は成り立たないものとなっている。WHO National *Salmonella* and *Shigella*

Center の 2001 年報告書によると、タイでは人、食品、動物などから検出したサルモネラの内 SW が 10%、SS が 2%を占める。一方、1989 年～1999 年に沖縄県で発生したサルモネラ食中毒事例報告によると、SW を起 因 菌 と する 事 例 が SE と *S. Typhimurium* によるものに次いで 13%を占め、患者数にあつては SE についで多い。

今回の調査でサルモネラ汚染が明らかとなった香辛料の原産国であるタイは、沖縄とも地理的に近く、気候的条件も類似しており、地域性や食習慣等との関連性に今後注目を払うとともに、サルモネラ下痢症の発生を低減させるため、引き続きヒトおよび市販食品のサルモネラ汚染状況を監視していく必要がある。

D. 結論

香辛料をはじめ、国内に流通する食品のサルモネラ汚染実態調査を行い、分離した *Salmonella* Senftenberg と *Salmonella* Weltevreden を対象にヒト由来の同血清型株との関連性について検討した。食品とヒト由来株の一部は遺伝学的に近似することが示されたが、ヒトの感染源は不明であり、また両血清型は海外や沖縄での分離頻度が高いこと、日本は輸入食品への依存度が高いことから、サルモネラ下痢症の発生を低減させるため、引き続きヒトおよび市販食品のサルモネラ汚染状況を監視してい

く必要がある。

E. 研究発表

学会発表

第 26 回日本食品微生物学会学術総
会・2005 年

表1 埼玉県におけるヒト由来サルモネラの血型別検出状況

血清型	1 0 年		菌株数/年									
	合計 (%)		1955	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Enteritidis	748	38.7	47	81	73	91	77	170	61	38	63	47
Typhimurium	115	6.0	4	15	17	14	7	13	8	5	13	19
Oranienburg	68	3.5	2	2	1	2	49	2	4	3	2	1
Infantis	64	3.3	4	7	4	6	4	6	9	9	13	2
Saintpaul	62	3.2	0	1	1	3	2	12	14	5	11	13
Hadar	56	2.9	17	11	6	6	2	1	5	4	4	0
Thompson	46	2.4	7	10	6	3	6	2	2	3	2	5
Anatum	45	2.3	12	10	10	3	-	2	2	2	1	3
Agona	45	2.3	8	4	3	5	4	5	-	4	5	7
Senftenberg	18	0.9	3	4	0	4	2	1	1	1	2	1
Weltevreden	17	0.9	2	3	1	2	-	2	3	0	2	1
その他	537	27.8	100	79	76	45	34	35	25	44	43	49
計	1,931	100	223	246	215	198	203	256	140	125	173	152

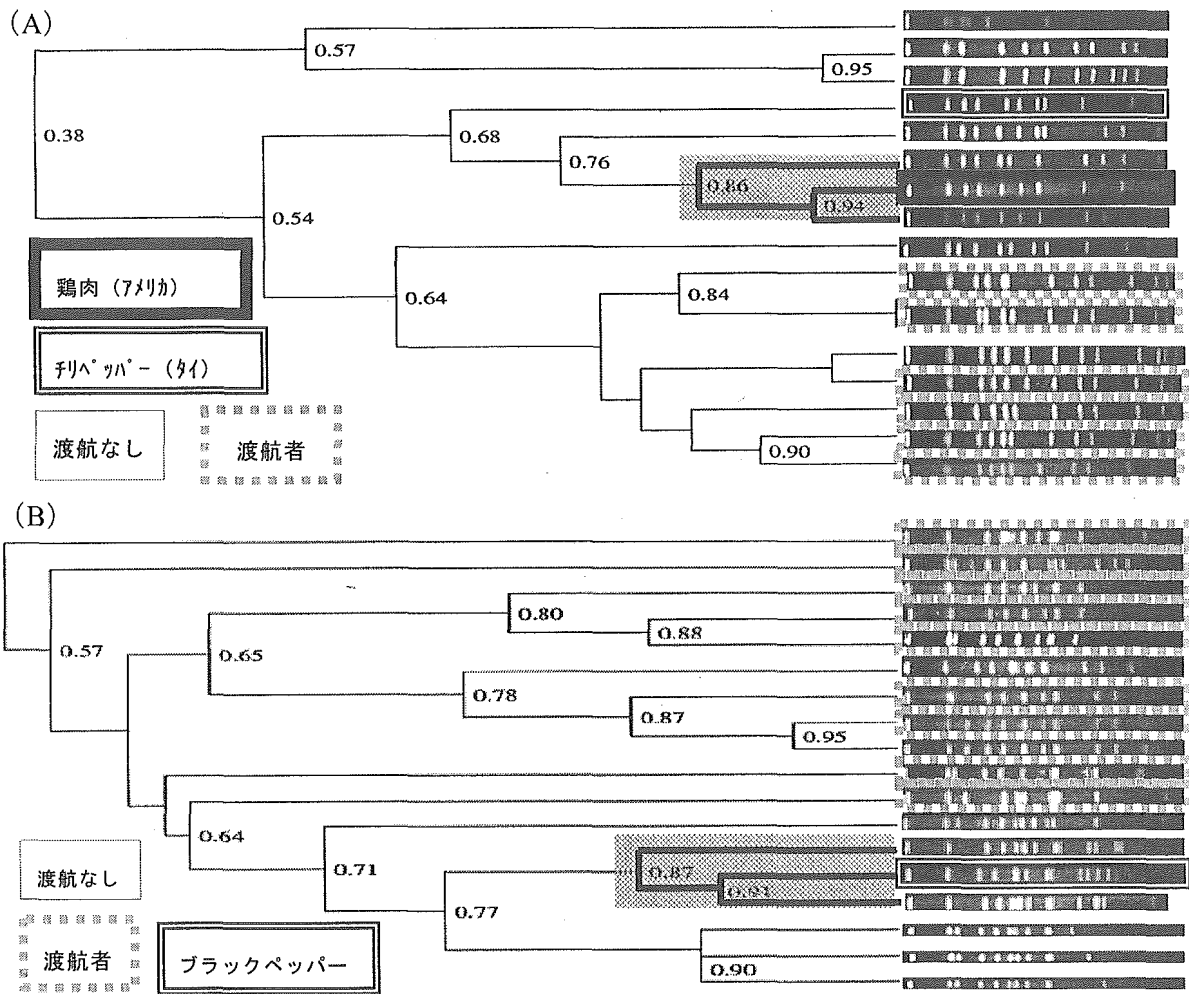


図1 PFGE (*Bln I*) 解析による食品由来とヒト由来の *S. Senftenberg*(A)および *S. Weltevreden* (B) の相同性

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

要旨

サルモネラの輸入魚介類における汚染実態を調査した結果、魚介類全体からのサルモネラ検出率は、*Salmonella invA* 遺伝子のみを検出した 3 検体を含め 5 件 1.4% (5/353)であった。すべてエビ由来で、エビからの検出率としては 2.4% (5/212)であった。そのうちサルモネラを検出したのはブラックタイガーのみ 2 検体 4.3% (2/47)で、そのサルモネラ汚染菌数はインドネシア産が 40 CFU/100g、一般生菌数は 7.48 log CFU/g、ベトナム産が 30 CFU 未満/100g、一般生菌数は 5.18 log CFU/g であった。検出菌の血清型はいずれも *Salmonella Weltevreden* であった。

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所
森田 幸雄 群馬県衛生環境研究所
大塚佳代子 埼玉県衛生研究所
金子 誠二 東京都健康安全研究センター
浅井 良夫 神奈川県衛生研究所
古川 一郎 神奈川県衛生研究所
金子 通治 山梨県衛生公害研究所
野田 裕之 山梨県衛生公害研究所

介類におけるサルモネラ汚染実態を調査した。

B. 研究方法

1. 調査試料

主に夏場の輸入魚介類を対象とし、甲殻類、貝類の小さなものは殻付きのまま検体とし、魚は対象から除外することとした。調査期間は 2005 年 8 月～11 月頃を主体に一部機関で 2006 年 1 月まで各機関 70 検体を目途に、5 機関で計 353 検体について調査を行った。

2. サルモネラ定性試験（図 1）

A. 研究目的

日本の主要な細菌性食中毒の一つであるサルモネラ食中毒の制御を目的に、魚

検体 25g をストマフィルター (オルガノ) にとり、BPW (OXOID) を 225ml 加えて 2 分間混和した。室温に 1 時間静置後、pH6.0 以下の試料については、5N NaOH で pH6.8 に調整し、35℃ 24 時間培養した。BPW 培養液を Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth (RV, OXOID) 10ml に 0.1ml、Tetrathionate Broth (TT, OXOID) 10ml に 1ml をそれぞれに接種し、ウォーターバスで 42℃ 24 時間培養した。RV、TT 培養液をボルテックス後、XLD (OXOID) およびクロモアガーサルモネラ (CHROM Agar) に画線し、35℃ 24 時間培養した。プレート上の典型コロニーを釣菌し、TSI および LIM で性状を確認後、さらに Salmonella LATEX TEST (OXOID) で凝集を確認して確定試験を行った。

3. サルモネラ定量試験 (図 2)

定性試験で陽性となった検体の -30℃ 冷凍保存残検体について、MPN3 本法でサルモネラ生菌数を測定した。

検体 25g をストマフィルターにとり、BPW を 225ml 加えて 2 分間混和した。室温に 1 時間静置後、pH6.0 以下の試料について 5N NaOH で pH6.8 に調整した。この溶液を滅菌中試 3 本に 10ml ずつ分取し、さらに 10ml の BPW にそれぞれ 1ml および 0.1ml ずつ 3 本に接種して 35℃ 24 時間培養した。この BPW 培養液について、定性試験と同様の手順で分離、確認試験を行った。

4. PCR 試験

MagExtractor Genome (TOYOBO) を用いて DNA 抽出を行った。1.5ml 容マイクロチューブ (Treff) に BPW 培養液 1ml をとり、4℃ 15,000g、5 分間遠心し上清を除去後、溶解・吸着液を 850 μ l、磁性ビーズ 40 μ l を添加して 10 分間攪拌した。その後、4℃ 10,000g、1 分間遠心後、上清を除去し、さらに洗浄液を 900 μ l 添加、5 分間攪拌し、4℃ 10,000g、1 分間遠心する洗浄操作を 2 度繰り返した。さらに 70% エタノールを 900 μ l 添加し、ミキサーで 5 分間攪拌し 4℃ 10,000g、1 分間遠心後、上清を除去した。滅菌水を 100 μ l 添加しシェイカーで 10 分間攪拌後、4℃ 10,000g、1 分間遠心した上清をテンプレート DNA とした。

PCR 組成は 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ l、dNTPs 4 μ l、Primer invA139 (40pmol/ μ l) 0.5 μ l、Primer invA141 (40pmol/ μ l) 0.5 μ l、Ex Taq 0.25 μ l、滅菌水 34.75 μ l、テンプレート DNA 5 μ l で、Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) を用いて 95℃ 1 分の後、95℃ 30 秒、64℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 35 サイクル、72℃ 4 分で行った。PCR 反応物は 3% NuSieve 3:1 Agarose、1 \times TBE で電気泳動を行い、284bp の増幅産物を確認した。

5. 一般生菌数測定 (図 3)

検体 10g をストマフィルターにとり、リン酸緩衝希釈水 90ml を加えて混和後 2ml を分取し、このうち 1ml を 9ml の希釈水で 10⁻⁴ まで 10 段階希釈した。検体液および段階希釈検体液 1ml を 20ml の

標準寒天培地 (栄研器材)で混釈し、重層して 35°C 48 時間培養後、カウントした。

6. PFGE 法による遺伝子解析
分離した *Salmonella* Weltevreden について Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析を行った。CHEF Genomic DNA Plug Kits (Bio-Rad) を用いてプラグを調製し、*Bln* I (Takara) 30 U/plug で 37°C 一晩制限酵素処理を行った。電気泳動は CHEF-DR III (Bio-Rad) を用いて、パルスタイム 5~50 秒、6 V/cm、14°C で 20 時間行った。マーカーとして Lambda ladder (Bio-Rad) を用いた。

C. 結果

1. 調査試料

夏場の魚を除く輸入魚介類を、各機関の近隣のスーパー等から主に 2005 年 8 月から 11 月にかけて、エビ 212 件、イカ 63 件、貝 61 件、タコ 10 件、カニ 6 件、ウニ 1 件の計 353 件 (表 1) を試買し調査を実施した。原産国は 32 カ国の多岐にわたっていたが、中国、インド、インドネシア、ベトナム、タイの 5 カ国で検体の 68.8% (243/353) を占めていた (表 2)。エビの主な原産国はインドネシア、インド、ベトナムで 64.2% (136/212)、イカは中国、タイ、ペルーで 60.3% (38/63)、貝では中国が 75.4% (46/61) を占めた (表 3)。

これらを検体種類別にみると、むきエ

ビではインド、インドネシアで 61.1% (33/54)、ホワイトエビではインド、サウジアラビアで 66.7% (32/48)、ブラックタイガーではインドネシア、インド、ベトナムで 91.5% (43/47)、殻付きエビではインドネシア、インドで 58.6% (17/29)、甘エビではグリーンランド、ロシアで 66.7% (14/21) を占めていた。アカイカではペルー、中国で 85.2% (23/27)、甲イカではモロッコ、タイで 53.8% (7/13)、ヤリイカ、アオリイカではタイがそれぞれ 33.3% (3/9)、75.0% (6/8) であった。はまぐり、イタヤ貝・小柱はすべて中国が原産国であった (表 4)。

2. サルモネラ定性試験

エビ 212 件、イカ 63 件、貝 61 件、タコ 10 件、カニ 6 件、ウニ 1 件の計 353 件の魚介類からサルモネラを検索した結果、エビ 212 検体のうちインドネシア産およびベトナム産のブラックタイガー各 1 検体の計 2 検体 0.9% (2/212) からサルモネラを検出した。インドネシア産ブラックタイガーからは H₂S 産生性および遅産生性の 2 種類の株を分離した。

ブラックタイガーからの検出率としては 4.3% (2/47) で、その血清型はいずれも *Salmonella* Weltevreden であった。両検体とも 10 月に試買したブラックタイガーであった。エビを除いたイカ、貝、タコ等 141 件からはサルモネラを検出しなかった。

3. サルモネラ定量試験

定性試験でサルモネラを検出したブラックタイガーについて、MPN3 本法でサルモネラ生菌数を測定した結果、インドネシア産は 40 CFU/100g、一般生菌数は 7.48 log CFU/g、ベトナム産は 30 CFU 未満/100g、一般生菌数は 5.18 log CFU/g であった。

4. PCR 試験

Salmonella invA 遺伝子の検索を、サルモネラ定性試験と併行して行った。サルモネラ検出および invA 遺伝子を検出した結果を表 5 に示した。定性試験においてサルモネラを検出した 2 検体を含むブラックタイガー3 件（インドネシア、ベトナム、タイ産）、ホワイトエビ2 件（インド、インドネシア産）の計 5 検体 2.4% (5/212) から invA 遺伝子を検出した。エビ以外の検体から invA 遺伝子は検出されなかった。

5. 一般生菌数測定

検体種類別にみた一般生菌数を表 6 に示した。エビで一般生菌数の平均値が最も高かったのは、ブラックタイガー (5.04 log CFU/g)、最も低かったのは甘エビ (3.27 log CFU/g) であった。同様に、イカで最も高かったのは、甲イカ (4.53 log CFU/g)、最も低かったのはアオリイカ (2.94 log CFU/g) であった。貝で最も高かったのは、赤貝 (5.47 log CFU/g)、最も低かったのはホッキ貝 (3.18 log CFU/g) であった。

次に検体種類別に主要原産国からみた一般生菌数を表 7 に示した。主な検体種

の検体数が多い原産国の順にその平均値をみると、むきエビではインド (4.78 log CFU/g)、インドネシア (5.09 log CFU/g)、ホワイトエビではインド (5.16 log CFU/g)、サウジアラビア (4.28 log CFU/g)、ブラックタイガーではインドネシア (5.32 log CFU/g)、インド (5.15 log CFU/g)、ベトナム (4.60 log CFU/g)、殻付きエビではインドネシア (4.56 log CFU/g) であった。アカイカではペルー (4.39 log CFU/g)、中国 (3.89 log CFU/g)、はまぐりでは中国 (4.05 log CFU/g) であった。

6. PFGE 法による遺伝子解析

インドネシア産ブラックタイガー2 株 (H₂S 産生性および遅産生性)、ベトナム産ブラックタイガー1 株の Bln I による PFGE パターンを図 4 に示す。インドネシア産、ベトナム産では異なるバンドパターンが得られた。また、インドネシア産の H₂S 産生性と遅産生性においても異なるバンドパターンが得られた。

D. 考察

本調査で試買された輸入魚介類はそのほとんどが東南アジア地域を原産としていた。サルモネラはエビからのみ検出され、Salmonella invA 遺伝子を 5 検体、2.4% (5/212) から検出した。このうちサルモネラを検出したのはブラックタイガーの 2 検体、4.3% (2/47) であり、ブラックタイガー47 検体の一般生菌数平均値は 5.04 log CFU/g で、エビの中で最も高い

値を示した。サルモネラを検出したインドネシア産ブラックタイガーの一般生菌数は 7.48 log CFU/g、ベトナム産が 5.18 log CFU/g で、両検体ともブラックタイガーの一般生菌数平均値より高く、なかでもインドネシア産では、ブラックタイガーの平均値 5.04 log CFU/g を 2 オーダー上回る高い細菌汚染が認められた。また、この検体からは H₂S 産生性および遅産生性の 2 種類の株を分離し、PFGE 解析において異なるバンドパターンが得られたことから潜在的な病原菌が混在して汚染している可能性が疑われた。今後、食中毒患者から分離した *Salmonella* Weltevreden の PFGE パターンと比較することにより汚染源の特定の可能性が示唆された。また、魚介類以外の輸入食品および食中毒患者から分離したサルモネラの PFGE 解析が有用であると示唆された。ブラックタイガー等はほとんど東南アジア地域で養殖され、冷凍で我国に輸入されている。ブラックタイガーを非加熱で喫食することはほとんどないと考えられるが、他の食品を始め周囲環境への汚染の拡大が危惧される。今回調査の検出割合および検出菌数から類推すると、エビがサルモネラを保菌しているというよりも、飼育、加工、輸送等の段階で汚染を受けたと考える方が妥当と思われる。養殖から冷凍までの段階のどこで汚染を受けるかの追究も含め、汚染に関与する様々な因子の除去や環境、意識等の改善に努め、総合的な衛生管理を実施する必

要があるのではないかと考える。

Salmonella Weltevreden による集団発生事例は、1989 年に沖縄県、1994 年に栃木県、1999 年に沖縄県で報告がみられている。沖縄県の事例は山羊肉の刺身を原因食品とする沖縄県地方の食習慣によると考えられるもので、本邦では集団、散発事例とも検出報告が少ない稀な血清型である。しかし沖縄県では高頻度に検出される血清型で、又吉らの報告によると、1992 から 2005 年の動物、環境からの検出サルモネラ血清型では 2 位にランクされている。久高らによれば散発下痢症、食中毒事例由来の検出血清型の上位 3 血清型に位置しているという。また、*Salmonella* Weltevreden がベトナムのメコンデルタ地帯の家畜、食肉、エビから高頻度に検出されたという報告や、昨年度の当該研究事業の香辛料におけるサルモネラ調査においても、ブラックペッパー (原産国不明) から検出されている。このように当該血清型は東南アジア地域において検出報告の多い血清型で、それらの地域では汚染が常在しているものと考えられる。今回の調査でインドネシア、ベトナム産のブラックタイガーから当該血清型菌が検出されたことは、それを裏付ける結果であった。海外からの渡航者や、輸入汚染食品等の増大に伴う食中毒菌の持込み監視の重要性と徹底が望まれる。

E. 結論