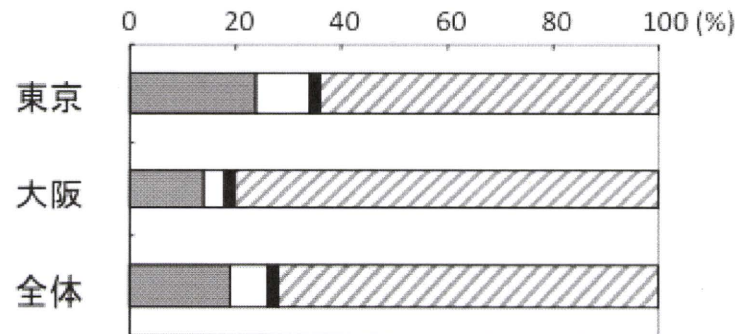


A



B

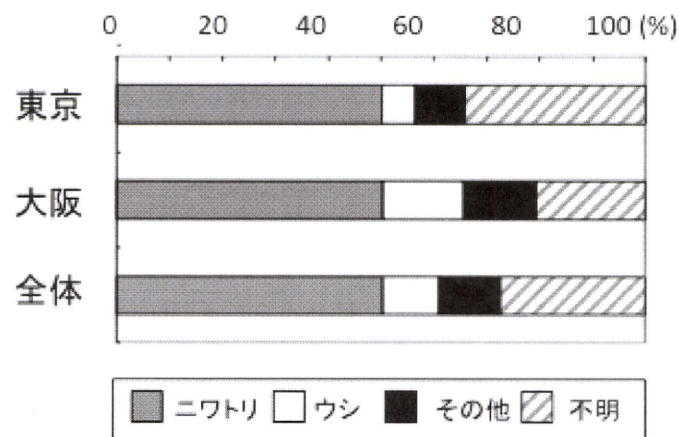


図5. ヒト臨床分離株の由来推定. セクションAでは、疫学情報から得られた原因食品の割合、セクションBではMLSTデータベース情報の参照により推定された原因食品について、ニワトリ・ウシ・その他・およびその他に分類し、パーセント表示した。

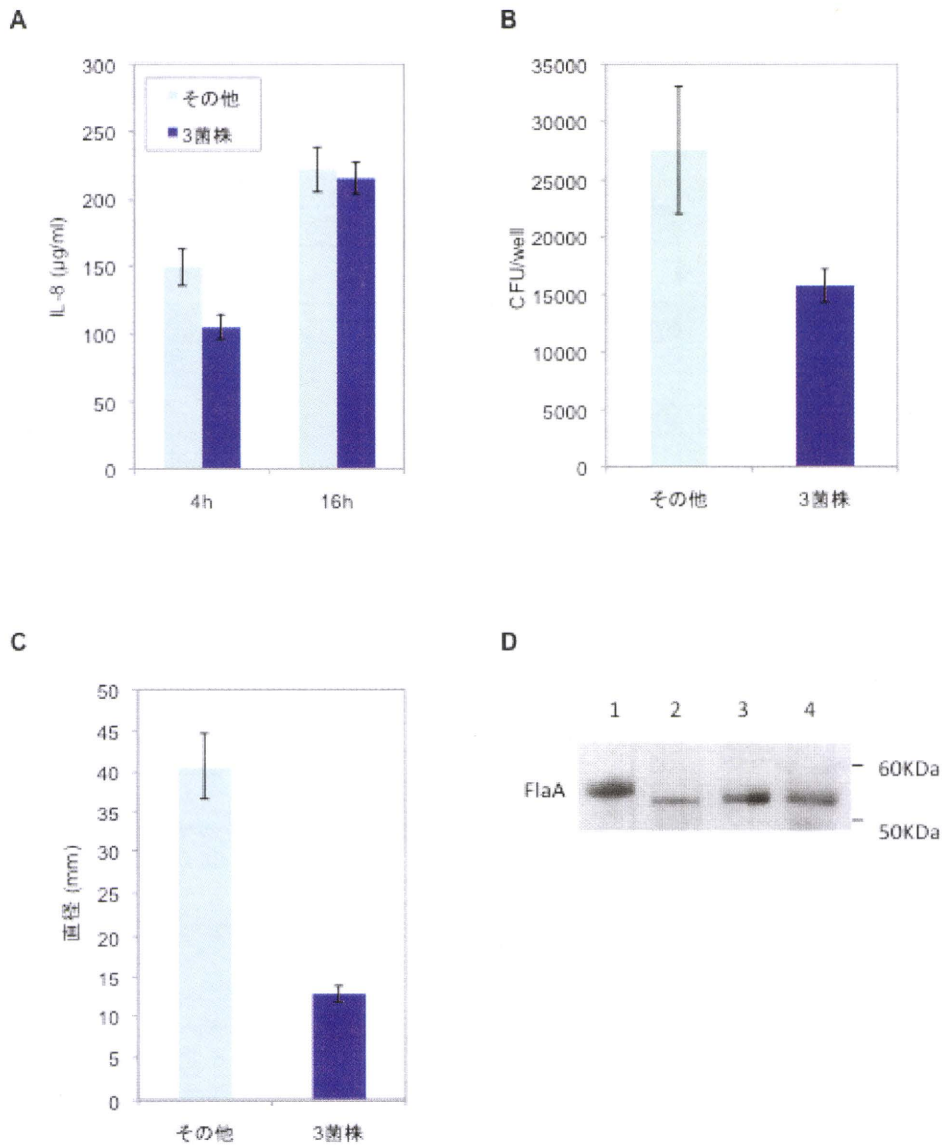


図6. ヒト臨床由来*C. jejuni* 菌株の病原性に関する評価

(A) *C. jejuni*感染によりInt407細胞が産生するIL-8量をELISAにより測定した。IL-8産生誘導能の低い3菌株について、細胞付着性(セクションB、ウェルあたりのCFUで表示)およびソフトアガー上での運動性(セクションC、直径をmmで表示)を測定した。(セクションD) 当該3菌株のFlaAタンパクをウエスタンブロットにより検出した(レーン2-4)。レーン1には、81-176株をコントロールとして用いた。右Y軸には分子量を表示した。

表1. 本研究で用いたPCRプライマー

遺伝子		名称	Sequence (5' to 3')
<i>aspA</i>	Forward	A1	AAAGCTGCAGCTATGGC
		A3	ATGAGGTTTATTATGGAGTGC
		A9	AGTACTAATGATGCTTATCC
	Reverse	A2	AAGCGCAATATCAGCCACTC
		A4	CCTCTTTGGCTATAGAAGCTG
		A10	ATTCATCAATTTGTTCTTTGC
<i>glnA</i>	Forward	A1	TAGGAACTTGGCATCATATTACC
	Reverse	A2	TTGGACGAGCTTCTACTGGC
<i>gltA</i>	Forward	A1	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG
	Reverse	A2	CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG
<i>glyA</i>	Forward	A1	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG
	Reverse	A2	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC
<i>tkt</i>	Forward	A1	TTAAGTGCTGATATGGTGC
		A3	GCAAACCTCAGGACACCCAGG
		A4	CATAGCGTGTCTCTGATAACC
	Reverse	A6	AAAGCATTGTTAATGGCTGC
		A1	TTGGAACTGATGGAGTTCG
		A3	TCAGGGCTTACTTCTATAGG
<i>pgm</i>	Forward	A7	TACTAATAATATCTTAGTAGG
		A2	AAGAGCTTAATATCTCTGGCTTCTAG
		A4	AGCTTAATATCTCTGGCTTC
	Reverse	A8	CACAACATTTTTCATTCTTTTTC
		A3	AAAGCTGATGAGATCACTTC
		A7	ATGGACTTAAGAATATTATGGC
<i>uncA</i>	Forward	A2	GCTAAGCGGAGAATAAGGTGG
		A4	ATTCTTTGTCCACGTTCAAG
	Reverse	A8	ATAAATCCATCTTCAAATCC

表2. 本研究において用いたヒト臨床由来*C.jejuni*株のMLST型別と推定原因食品

Cluster ¹	Clonal Complex (CC)	%	ST	%	ヒト ²	推定原因食品の割合(%) ³			
						ヒト ²	ニワトリ	ウシ	その他
Cluster1	ST-48 complex	10	ST-48	7	106(142)	67	19	11	
			ST-918	2	5(7)	50	0	50	
			ST-453	1	0(0)	0	0	0	
	ST-22 complex	9	ST-22	8	68(87)	47	26	21	
			ST-1947	1	1(1)	0	0	0	
	ST-45 complex	7	ST-45	6	125(328)	72	6	20	
			ST-3727	1	1(1)	0	0	0	
	ST-42 complex	6	ST-42	5	38(89)	27	27	41	
			ST-447	1	8(15)	71	14	14	
	ST-353 complex	3	ST-4052	2	0(1)	100	0	0	
ST-353			1	31(45)	93	0	7		
ST-658 complex	1	ST-658	1	20(20)	0	0	0		
unassigned	2	ST-2276	1	1(3)	100	0	0		
			ST-4612	1	1(1)	0	0	0	
	total	38	14			19.76	5.32	5.91	
Cluster2	ST-21 complex	27	ST-50	9	133(195)	82	0	10	
			ST-4526	7	0(1)	100	0	0	
			ST-21	4	185(327)	34	50	15	
			ST-8	3	11(20)	11	22	67	
			ST-451	1	2(2)	0	0	0	
			ST-1360	1	0(1)	100	0	0	
			ST-4253	1	0(1)	0	100	0	
				ST-4614	1	1(1)	0	0	0
	ST-257 complex	6	ST-257	4	98(215)	83	2	5	
			ST-361	2	2(2)	0	0	0	
	ST-443 complex	5	ST-440	3	1(1)	0	0	0	
			ST-51	2	63(96)	100	0	0	
	ST-49 complex	3	ST-4613	2	1(1)	0	0	0	
			ST-4624	1	1(1)	0	0	0	
	ST-354 complex	3	ST-354	1	31(47)	88	0	6	
			ST-4611	1	1(1)	0	0	0	
			ST-4623	1	1(1)	0	0	0	
	ST-460 complex	2	ST-460	1	5(5)	0	0	0	
			ST-535	1	3(3)	0	0	0	
ST-48 complex	1	ST-38	1	11(26)	0	53	20		
ST-52 complex	1	ST-52	1	14(25)	45	0	45		
ST-206 complex	1	ST-46	1	11(24)	100	0	0		
ST-353 complex	1	ST-2076	1	1(1)	0	0	0		
ST-574 complex	1	ST-305	1	3(4)	100	0	0		
unassigned	8	ST-922	6	1(2)	0	0	100		
		ST-2328	1	1(1)	0	0	0		
			ST-4390	1	0(1)	100	0	0	
	total	59	27			26.6	4.19	10.41	
Cluster3	unassigned	2	ST-407	2	2(2)	0	0	0	
	total	2	ST-407	2		0	0	0	
Cluster4	ST-61 complex	1	ST-61	1	55(123)	10	56	32	
	total	1	ST-61	1		0.1	0.56	0.32	
total		18	100	43	100	46.5	10.1	16.6	

¹PHYLIPSによる系統解析の結果、得られたクラスター毎にMLSTデータを表記した。²MLSTデータベース上に登録されている分離株について、それぞれのST型で分離由来情報を集計し、ヒト以外の由来について%表示した。³ヒト由来株の数を記した（括弧内には同一のST型を示す全ての菌株数を示した）。本研究において新たに登録したST型については太字で表示した。

表3. MLSTデータの統計学的解析

A 東京・大阪において分離されたヒト臨床分離株のMLSTアレル数とdN/dS比

Locus	No. of alleles in		dN/dS	
	Osaka	Tokyo	Osaka	Tokyo
<i>aspA</i>	8	9	0.0401	0.0449
<i>glnA</i>	10	12	0.0964	0.0726
<i>gltA</i>	8	8	0.0631	0.0600
<i>glyA</i>	7	8	0.0487	0.0489
<i>pgm</i>	11	15	0.0370	0.0329
<i>tkr</i>	7	8	0.0099	0.0265
<i>uncA</i>	7	7	0.0502	0.0111

B 日本、英国、米国におけるヒト臨床分離株のMLSTアレル数・dN/dS比の比較

Locus	No. of alleles in			dN/dS		
	Japan (n=116)	UK (n=1693)	USA (n=118)	Japan	UK	USA
<i>aspA</i>	15	62	23	0.0436	0.0432	0.0392
<i>glnA</i>	17	78	28	0.0369	0.0298	0.0236
<i>gltA</i>	11	61	27	0.0438	0.0378	0.0385
<i>glyA</i>	10	86	28	0.0360	0.0411	0.0348
<i>pgm</i>	20	98	35	0.0441	0.0459	0.0480
<i>tkr</i>	13	86	34	0.0635	0.0722	0.0861
<i>uncA</i>	9	49	25	0.0137	0.0115	0.0102

C 東京・大阪において分離されたヒト臨床分離株のアレル分布解析

	Tokyo	Osaka
total	0.8262 +/- 0.0226	0.7665 +/- 0.0267
<i>aspA</i>	0.8416	0.6841
<i>glnA</i>	0.8694	0.849
<i>gltA</i>	0.8253	0.8147
<i>glyA</i>	0.8269	0.7616
<i>pgm</i>	0.8988	0.8033
<i>tkr</i>	0.8131	0.658
<i>uncA</i>	0.7086	0.7951

D 東京・大阪において分離されたヒト臨床分離株のClonality解析

Source	V_n	V_e	λ_{xx}	Mean trial variance	Max trial variance	LMC
Tokyo	2.5782	0.9836	0.2702	0.9843	1.2154	1.0618
Osaka	4.0378	1.2073	0.3908	1.2159	1.5639	1.3188
Total	3.2149	1.0803	0.3293	1.0829	1.2424	1.1369

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

食鳥処理場の改善策

研究分担者 藤村 達也 日本ハム(株)中央研究所札幌サテライト

研究要旨 道内の大規模食鳥処理工場を対象として、食鳥処理検査を行った。検査は、10月～1月で3度、それぞれ異なる農場由来の検体について実施した。モモ肉および盲腸便5検体ずつを対象に、大腸菌 O-157、サルモネラ属、リステリアモノサイトゲネス、カンピロバクター属について検出を試みた。大腸菌 O-157 およびカンピロバクター属は全て陰性であった。一方、サルモネラ属は10月および11月の検査では全て陽性、また1月の検査では全て陰性であった。リステリアモノサイトゲネスは、盲腸便検体は全て陰性であったが、肉検体からは、10月検査で4/5が陽性、11月、1月検査ともに5/5が陽性という結果であった。

A. 研究目的

道内の大規模食鳥処理工場を対象として、食鳥処理検査を行った。検査は10~1月の間で3回、それぞれ異なる農場由来の鶏を対象として実施した。農場での感染状態を検査するために盲腸便を、工場内でのクロスコンタミを検査するためにモモ肉をそれぞれ検体として使用した。

B. 研究方法

1. 検体採取

盲腸便は、衛生検査後の盲腸部分を含む内臓全体を切り取り、検体ごとにビニール袋に入れた。採取は午後に5検体を一定の間隔をおいて行った。

モモ肉は、と畜～解体が終了し、製品として袋詰めする直前のものを検体として採取した。盲腸便と同様に採取は午後に5検体を一定の間隔をおいて行った。

採取した検体は冷蔵保存し、当日の夕方にクール便で輸送（北海道～茨城県）した。

2. 検査

内臓から盲腸を分離し、その重量の10倍量の生理食塩水を加えてストマッキングすることにより盲腸内容物の懸濁液を調製した。そのうち10mlを増菌液90mlに加えて前培養液とした。

また、モモ肉は25gをストマッキングし、225mlの増菌液を加えて前培養液とした。

カンピロバクター検査：

増菌液にプレストンブイヨンを用い、42℃で48時間微好気培養後、mCCDA培地に一白金耳量を植菌した。42℃で48時間微好気培養後、成育したコロニーについてイムノクロマト法にてカンピロバクターであることを確認した。

サルモネラ検査：

増菌液には緩衝ペプトン水を用い、35℃で24時間培養後、0.1mlを採取し、10mlのRV培地に加えた。42℃で18時間培養後、DHL寒天培地に一白金耳量を植菌し、35℃で24時間培養した。生育したサルモネラ様コロニーについて公定法に基づいた性状確認試験によってサルモネラであることを確認した。また、サルモネラと確定した菌株についてはスライド凝集法による血清型別試験を行った。

O157検査：

食安監発第1102006号に基づいて検査を行った。すなわち増菌液にはノボピオシン添加mEC培地を用い、42℃で18時間培養後、1ml分を採取し、

0.02ml の O157 磁気ビーズ溶液に混和した。その後、CT-SMAC 培地およびクロモアガー O157 培地に白金耳量を植菌した。35°C で 18 時間培養した後、O157 の有無を判定した。

リステリアモノサイトゲネス検査：

増菌液には Half Frazer 培地を用い、30°C で 24 時間培養した後、0.1ml を採取して 10ml の Frazer 培地に加えた。35°C で 18 時間培養後、培地が黒変したものについて白金耳量をパルカム寒天培地、およびクロモアガーリステリア寒天培地に植菌した。35°C で一晩培養した後、リステリアモノサイトゲネスの有無を判定した。

マルチプレックス PCR：

単離した菌株をトリプチックソイブロスで 37°C、一晩培養した後、培養液から菌体を回収した。菌体は細胞溶解液(PrepMan Ultra Reagent、Applied Biosystems) 200 μ l に懸濁し、沸騰水中で 10 分間加熱した。加熱後の懸濁液を 15,000g で 2 分間遠心分離し、上清を回収した。上清からフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿により DNA を回収し、TE 緩衝液 400 μ l で溶解したものを PCR に供した。

PCR は「多重 PCR によるサルモネラ属血清型の迅速簡易判別法およびそのプライマーセット (特願 2011-034184)」に記載された方法に従って行った。すなわち Takara 社製 Multiplex PCR Assay Kit を用い、鋳型 DNA 溶液 1 μ l を含む 20 μ l の反応液を調製した。PCR 反応条件は、94°C にて 1 分間の熱変性反応を行った後、94°C で 30 秒間、58°C で 90 秒間、72°C で 90 秒間の 3 ステップからなるサイクリング反応を 30 回繰り返す、サイクリング反応の終了後に 72°C で 10 分間の伸長反応を行った。

PCR による増幅産物の検出は 2%アガロースを使用したゲル電気泳動により行った。電気泳動後のゲルに UV ランプを照射し、増幅産物の検出ならびに DNA 断片長の確認を行った。

3. パルスフィールド電気泳動：

単離したリステリアモノサイトゲネス株をトリプチックソイブロスで 37°C、一晩培養した。集菌した後、EET buffer (100mM EDTA, 10mM

EGTA, 10mM Tris-HCl, pH8.0) に懸濁し、ローメルトアガロース (終濃度 1%) に混合してアガロースプラグ (Bio-Rad) に流し込み固化させた。固めたアガロースプラグをリゾチーム (終濃度 4mg/ml) とアクロモペプチダーゼ (終濃度 1000U/ml) の混合液で 37°C、一晩処理し、続いてアガロースプラグをプロテイナーゼ K (終濃度 1mg/ml) で 50°C、一晩処理した。処理後のアガロースプラグは制限酵素 SmaI (終濃度 40U/ml) で 25°C、一晩処理し、パルスフィールド電気泳動用 1%アガロースゲル (Bio-Rad) に包埋した後パルスフィールド電気泳動を行った。パルスフィールド電気泳動は Bio-Rad の CHEF DR-III を使用した。電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下で DNA 断片のパターンを解析した。

4. イムノクロマト法：

盲腸内容物に 10 倍量の PBS を添加し、ストマッカーで処理して 10x 懸濁液とした。さらに PBS で 2 倍、および 10 倍希釈し、それぞれ 20x および 100x 懸濁液を作製した。

懸濁液をそれぞれサルモネラ、カンピロバクター、リステリアモノサイトゲネス (以上 MERCK)、および O-157 (DuPont) のイムノクロマトキットに滴下し、ラインの識別を行った。

C. 研究結果

1. もも肉及び盲腸便の食中毒菌検査。3 回の検査を表 1 にまとめた。大腸菌 O-157 およびカンピロバクター属は全ての検査で陰性であった。

リステリアモノサイトゲネスは、盲腸便検体は全て陰性であったが、肉検体からは、10 月の検査で 4/5 が陽性 (80%)、11 月および 1 月の検査はともに 5/5 が陽性 (100%) であった。

一方、サルモネラ属は 10 月および 11 月の検査では全て陽性であったが、1 月の検査では全て陰性であった。血清型の判別試験では、陽性検体全てが O7 群と判定された。マルチプレックス PCR 法による菌種判定の結果、70% (7/10) が Infantis で、30% (3/10) がその他の血清型であった。

2. リステリアモノサイトゲネスの型別判定

リステリアモノサイトゲネスは、盲腸便からは検

出されなかったが、ほぼすべての肉検体（14/15）からは検出された。このことから、検出された菌が、農場由来ではなく工場内に常在しているものである可能性が考えられた。常在菌であれば、検査実施日が異なっても同一の遺伝子型を持っている可能性が高いため、それぞれの検査で検出されたリステリアモノサイトゲネスの遺伝子型をパルスフィールドゲル電気泳動によって解析した（図1）。各検体から分離されたリステリアモノサイトゲネスは、1種類で、かつ同一の遺伝子型を保有していた。

3. イムノクロマト法による迅速検査の検討

食鳥処理場でのクロスコンタミネーションを避けるためには、搬入される鶏が汚染農場由来なのか、非汚染農場由来なのかを予め知っておき、それを元に処理の順序を決めるなどの配慮が必要になると考えられる。そこで、便検体から直接測定する方法として、イムノクロマトの有効性について検証した。

1月に実施した検査検体を材料に用いたが、培養法では全検体が陰性結果となったので、今回の試験ではどのくらいの希釈を行えば偽陽性が見えなくなるかを検討した。

10x 希釈液を検体として使用した場合は、クロマトライン上を希釈液が流れにくくなった。20x 希釈液を検体として使用すると、偽陽性ラインが多く見られた。100x 希釈液を検体として用いた場合は、O-157 やリステリアモノサイトゲネスキットでは偽陽性ラインは見られなくなったが、カンピロバクターやサルモネラキットでは偽陽性が見られた（データは示さず）。

D. 考察

道内の大規模処理工場を対象として、検査を実施した。

今回の検査では、大腸菌 O-157 およびカンピロバクター属は検出されなかった。盲腸便からも検出されなかったことから、農場での肥育の段階ですでにこれらの菌は存在していないと考えられる。

一方、リステリアモノサイトゲネスに関しては、盲腸便からは検出されなかったが、モモ肉からは検出された。さらに、検出された菌がすべて

同一の遺伝子型を持っていることから、モモ肉に付着していたリステリアモノサイトゲネスは、工場内のどこかで常在菌として存在している可能性が示唆された。

サルモネラ属に関しては、10,11月の検査では全て陽性であったが、1月の検査ではモモ肉も盲腸便も共に陰性であった。この3回の検査は、全て異なる農場由来の鶏を対象としている。盲腸便も陰性であったことから、1月検査の対象となった農場にはサルモネラが存在していなかったと考えられる。農場ごとに清浄度が異なる原因を調査すれば、汚染の原因も特定できる可能性が高いと考えられる。

便希釈液を用いた迅速評価法の一つとして、イムノクロマト法を用いた検出を試みたが、100x 希釈しても偽陽性が見られた。食品検査用として販売されているキットを便の検査用に使用するには、希釈液を工夫するなどの操作が必要だと思われる。

E. 結論

今回の検査では、盲腸便からサルモネラが検出されない場合は、肉からも検出されなかった。工場内の清浄度は維持されていると考えられ、同時に、農場からの持ち込みを無くせば、清浄化が可能であると予想される。リステリアに関しては、工場内での対策を講じれば清浄化は可能であると考えられる。また今回の検査からは、カンピロバクターおよびO-157の汚染は認められなかった。

F. 健康危険情報

（総括報告書にまとめて記載）

G. 研究発表

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし
2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

(陽性検体数:もも肉)

検査日	カンピロバクター	リステリア	サルモネラ	O157
10/16	0/5	4/5	5/5	0/5
11/26	0/5	5/5	5/5	0/5
1/29	0/5	5/5	0/5	0/5

(陽性検体数:盲腸便)

検査日	カンピロバクター	リステリア	サルモネラ	O157
10/16	0/5	0/5	5/5	0/5
11/26	0/5	0/5	5/5	0/5
1/29	0/5	0/5	0/5	0/5

表 1. 食肉処理工場由来検体検査の結果

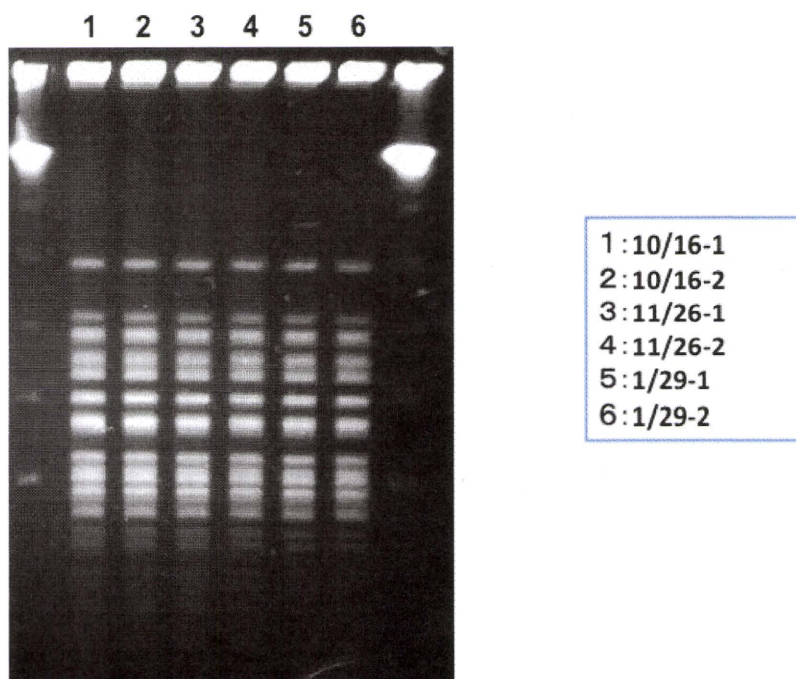


図1. パルスフィールド電気泳動法によるリステリア菌の由来分析

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maklon K, Minami A, Kusumoto A, Takeshi K, Thuy NTB, Makino S, Kawamoto K.	Isolation and characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> from commercial asazuke (Japaneses light pickles).	Int J Food Microbiol.	139(3)	134-9	2010
門田修子、楠本晃子、牧野壮一、川本恵子	食品における赤痢菌検出法の感度の向上	日本獣医公衆衛生学雑誌日獣会誌	63	297-300	2010
三澤尚明、副島潤一郎	超音波を使用したカンピロバクター撃退技術	超音波TECHNO	22	6-9	2010

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年
Asakura H, Kawamoto K, Makino S.	Response of foodborne microorganisms to osmotic stress.	Wong HC	Stress response of foodborne microorganisms.	Nova Science Publishers	in press

