

平成21－23年度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

(総合) 分担研究報告書

8. 赤痢菌分離株の分子疫学的解析に関する研究

分担研究者 泉谷 秀昌
国立感染症研究所

分担研究課題： 赤痢菌分離株の分子疫学的解析に関する研究

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究要旨

細菌性赤痢は、赤痢菌 (*Shigella* spp.) によって生じる経口感染症であり、本菌に汚染された食品や水を介してヒトに感染する。細菌性赤痢は、感染症法において三類感染症に含まれ、確定例および無症状保菌者等の届出が義務付けられている。感染症発生動向調査によれば細菌性赤痢の発生数は年間100名前後を推移している。その推定感染地は海外が大半を占める一方で、近年の集団事例（2001年輸入カキ、2004年ハワイ便機内食、2008年輸入イカ）などでは輸入食品も感染源の重要な位置を占めることが示唆されている。また、細菌性赤痢の国内散发事例に関しては、原因究明にいたることはほとんどない。細菌性赤痢の発生状況を考えればその原因究明のためには、輸入例、国内例いずれに関しても現在の流行菌型を把握することは非常に重要であると考えられる。本研究では主として赤痢菌分離株に着目しこれらの特徴づけを行うべく、赤痢菌の分子疫学的解析を行った。

A. 研究目的

細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。

最近の我が国における細菌性赤痢患者の発生数は年間100名前後を推移している(表1)。その大半は海外輸入例である。また、近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散发もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどないのが現状である。そこで本研究では、国内例および輸入例の赤痢菌分離株を材料に分子疫学解析を行い、流行菌型を特徴づけ、そのデータベースの構築を行う。さらに、国内例のデータと比較し、当該解析結果と疫学情報のつきあわせを積み重ねることで、それが原因究明に対して有用であるか否かを検討する。

B. 研究方法

2011年までに国立感染症研究所細菌第一部に送付された赤痢菌分離株、とくに *Shigella sonnei*

を中心に供試菌株とした。

型別の方法としては、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)、もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA) を使用した。得られたデータを BioNumerics ソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。

PFGE は Pulsenet による国際標準法に順じて実施した (<http://www.pulsenetinternational.org/Pages/default.aspx>)。

MLVA は Liang ら (2007) および Izumiya ら (2009) の方法に基づいて行った。

C. 研究結果

Shigella sonnei について MLVA を実施した。結果を Genemapper ソフトにて解析し、各遺伝子座のリポート数を算出し、BioNumerics に入力した。BioNumerics 上では最小全域木 (minimal

spanning tree; MST) 等によるクラスター解析を行った。

2009年までの菌株のクラスター解析の結果をMST形式で図1に示す。左上部および中央左に多く集まる赤い丸はインドなど南アジアに渡航歴のある患者由来株であり、中央部に多く集まる青い丸はインドネシアなど東南アジアに渡航歴のある患者に由来する。1遺伝子座のみが異なる遺伝子型 (single locus variant; SLV) については丸を結ぶ線が太くしてある。

図1で番号 (MST-group#) の振ってある箇所は、主だった集団事例、並びに2007-2009年の株の中でMST上で集積の見られた株の場所を示す。

図1に示すように、関連の明らかな集団事例もしくは海外ツアーの事例においては、ほとんどが事例ごとに単一の遺伝子型か、もしくはそのSLVであることが明らかとなった。

2010年の*S. sonnei*分離株についてのクラスター解析の結果を図2に示す。上述の、海外ツアー参加者、家族内感染などの共通感染源からなる事例に関する2009年までの菌株の解析からSLVに関しては疫学上の関連が疑われることが示唆されている。このことから、図2においてSLVに収まる集積を網掛けで囲んだ。その結果、5つの集積が見られた。1つは渡航歴のない家族内事例であった。3つは渡航歴ありの輸入例と渡航歴のない国内例からなる集積であり、それぞれの発生場所 (県) も異なっていた。しかしながら、これらのいずれについても疫学的な共通性は見出せなかった。

残りの一つは、2010年10月にO市で発生した寿司店での食中毒事例1件を含む、10都県からの分離株からなる広域集積であった。これらはいずれも渡航歴のない国内例であり、発生時期も10月に集中していることから共通の食材が疑われたが、最終的な結論は出なかった。しかしながら、寿司店での食中毒事例を含んでいることから、2008年の輸入イカによる広域集団事例と同様、今回も何らかの魚介類が関連しているのではないかと疑われた。

2011年までの*S. sonnei*分離株についてのクラスター解析の結果をデンドログラム形式で図3に示す。2011年は8月に大手飲食チェーン店において食中毒が発生した。当部に送付された34株の当該事例関連株についてのMLVAの結果を表2に示す。34株中24株が同じタイプであり、残り10株のうち8株は当該タイプからSLVであり、2株は2遺伝子座の異なる (double locus variant; DLV) であった。こうしたバリエーションの分布はこれまでの海外ツアー、家族内感染事例の結果ともよく一致していた。当該関連株はデータベース上でもユニークなクラスターを形成した。一方で、海外輸入例において類似したMLVA型を示すものも観察されたが、疫学的な関連については不明である。

細菌性赤痢は3類感染症であり、全数報告の対象であるが、本研究でも示されたように食中毒の側面も持っている。2011年の大手飲食チェーン店の事例では、当該チェーン店が迅速に営業自粛を行った。しかしながら、感染源の最終的な結論には至っていない。患者情報の収集ならびに分離株の送付・解析もほぼリアルタイムに行われたが、食材の流通経路の調査ならびに残品の検査を含めた、より包括的かつ迅速な遡及調査が重要となってくるであろう。

D. 結論

近年発生する海外渡航歴のない細菌性赤痢の感染源はほとんど不明のままである。本研究から、赤痢菌、特に*S. sonnei*株についてMLVAを用いることで輸入例および国内散发例ならびに食中毒事例分離株のデータベースが構築され、関連株では集積を見つけることができた。本データベースを用いることで菌株の解析から疫学上の関連性が示唆されることが期待される。今後、これらの情報を活かしながら疫学調査を進めることで、原因究明の一助になることが期待される。

E. 研究発表

H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara,

なし

M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. J. Med. Microbiol. 58 (11), 1486-1491, 2009.

M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, S. Yamamoto, G.B. Nair, S. Matsushita, K. Yokoyama, A. Kai, K. Seto, H. Watanabe, and H. Izumiya: Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. J. Med. Microbiol. 59 (6), 708-712, 2010.

H. Izumiya, Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda, and H. Watanabe: New sytem for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. Microbiol. Immunol. 54, 569-577, 2010.

N. Sithivong, T. Morita-Ishihara, A. Vongdouangchanh, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, B. Khamphaphongphane, B. Sengkeopraseuth, P. Vongprachanh, O. Keosavanh, K. Southalack, J. Lee, R. Tsuyuoka, M. Ohnishi, and H. Izumiya: Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010. Emerg. Infect. Dis. 17 (11), 2060-2062, 2011.

泉谷秀昌、多田有希、伊藤健一郎、寺嶋淳、渡辺治雄：渡航者由来 *Shigella sonnei* の解析。第 84 回日本感染症学会総会、2010 年 4 月、京都府京都市。

F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案

なし

3 その他

表 1. 赤痢菌検出状況（地研、2000－2011年：病原微生物検出情報）

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. dysenteriae</i>	4	2	2	2	3	1	3	1	1	0	2	0
<i>S. flexneri</i>	45	40	66	21	40	33	34	18	36	15	17	12
<i>S. boydii</i>	4	2	3	8	2	3	1	1	11	0	1	2
<i>S. sonnei</i>	205	225	186	79	101	66	91	165	103	46	52	69
<i>Shigella</i> spp.	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
(輸入例)												
<i>S. dysenteriae</i>	4	1	2	2	2	1	3	1	1	0	1	0
<i>S. flexneri</i>	16	12	8	5	20	20	19	3	16	7	13	5
<i>S. boydii</i>	4	1	1	5	2	1	0	1	11	0	1	2
<i>S. sonnei</i>	77	55	47	43	72	38	48	59	40	26	27	19
<i>Shigella</i> spp.	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0

表 2. 2011年大手飲食チェーン店による *S. sonnei* 食中毒関連株の MLVA

n	SS1	SS3	SS6	SS9v	SS10v	SS11v	SS13v	SsV11-
24	10	27	11	8	2	4	4	30
3	10	27	12	8	2	4	4	33
1	10	26	11	8	2	4	4	31
1	11	27	11	8	2	4	4	36
1	14	27	11	8	2	4	4	34
1	16	27	11	8	2	4	4	35
1	12	27	11	8	2	4	4	79
1	10	25	12	8	2	4	4	40
1	10	28	12	8	2	4	4	49

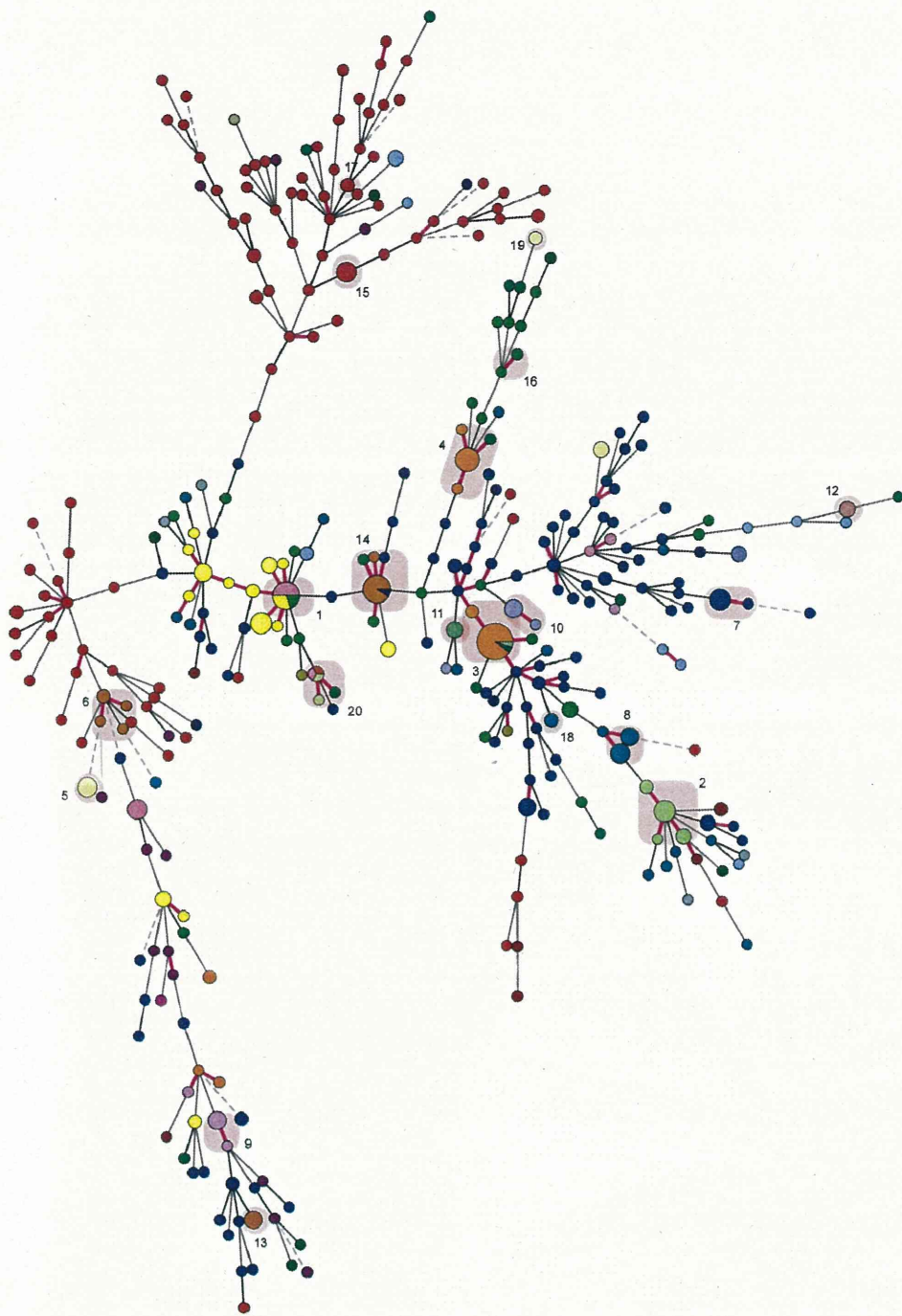


図1. *Shigella sonnei* 分離株 MLVA の結果に基づく最小全域木。MST-group(gr)#1-20 ; 1, 輸入カキ (2001) ; 2, 機内食 (2004) ; 3, 輸入イカ (2008) ; 4, 保育園+散発例 (2008) ; 5, 保育園 (2009) ; 6, 施設 (2007) ; 7, バリ島 (2009) ; 8, エジプト (2008) ; 9, 散発集積 (2007) ; 10, 国内集団 (2000) ; 11, 国内集団 (2003) ; 12, 国内集団 (2004) ; 13, 国内集団 (2007) ; 14, 国内集団 (2007) ; 15, ネパール (2008) ; 16, 中国 (2008) ; 17, インド (2009) ; 18, エジプト (2009) ; 19, 国内集団 (2009) ; 20, 散発集積 (2007, 2008)。

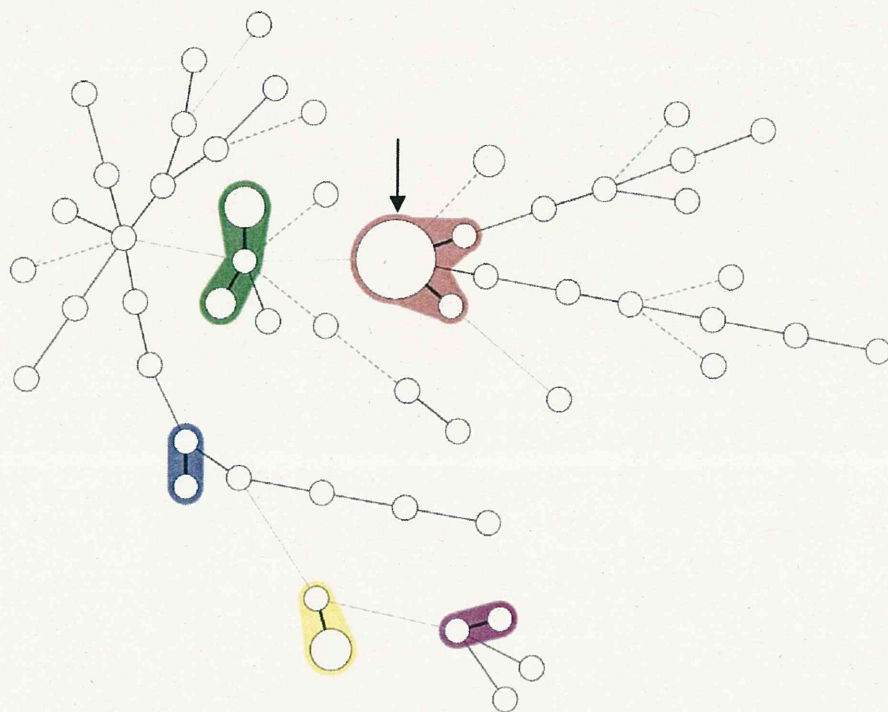


図 2. *Shigella sonnei* 2010 年分離株 MLVA の結果に基づく最小全域木。網がけは SLV に含まれる株を表す。矢印は 2010 年 10 月に発生した広域の集積を示す。

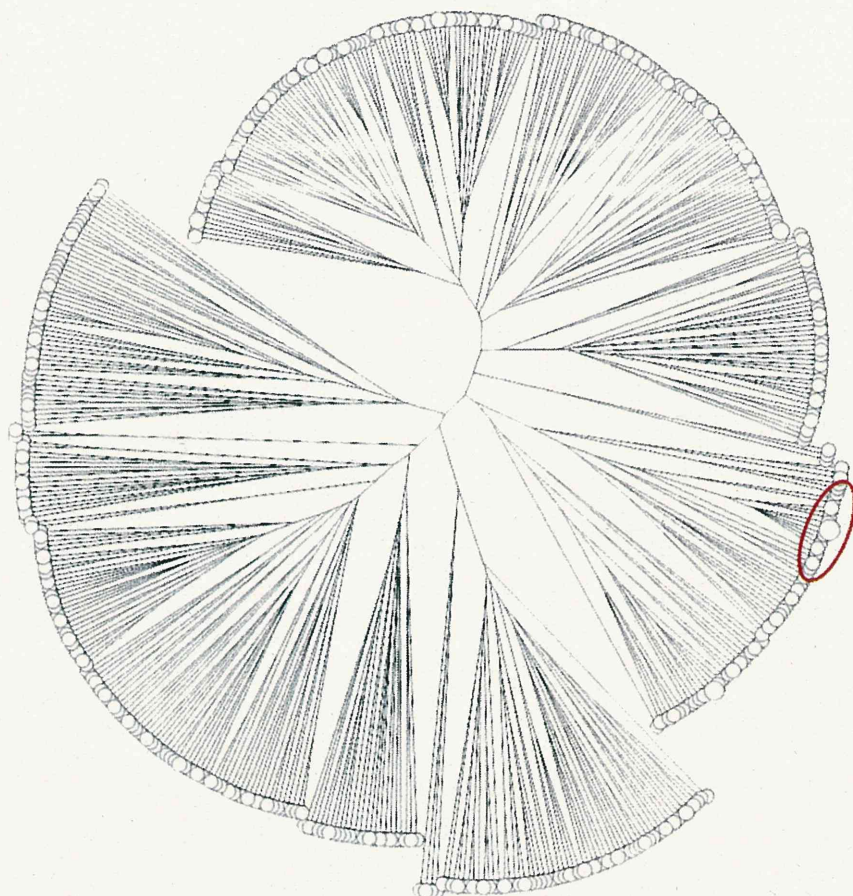


図 3. *Shigella sonnei* 分離株 MLVA の結果に基づくデンドログラム。楕円で囲った部分は 2011 年 8 月に発生した大手飲食チェーン店食中毒関連株の位置を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

III. 刊行物の一覧

論文発表

1. 鈴木穂高, 山本茂貴: 日本、および諸外国における鶏卵・液卵の *Salmonella* 汚染状況(文献調査) 国立医薬品食品衛生研究所報告, vol.127, p74-83, (2009)
2. H. Suzuki, S. Yamamoto: Prevalence of *Salmonella* Contamination in Eggs in the World: A Literature Survey
Scientific Proceedings, 16th FAVA Congress 2011 and 78th PVMA Annual Convention & Scientific Conference, p259, (2011)
3. 鈴木穂高, 山本茂貴: 日本とヨーロッパ各国の食品の食中毒菌汚染実態の比較-「食品の食中毒菌汚染実態調査」の結果の有効活用-国立医薬品食品衛生研究所報告, vol.129, p118-128, (2011)
4. Morita Y, Komoda E, Boonmar S, Markvichir K, Chaunchom S, Chanda C, Yingsakmongkon S, Padungtod P, Jha CV, Singh S, Yamamoto S, Kimura H, Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter coli* isolated from buffaloes in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. Nepalese Vet. J., 29: 42-45(2009)
5. Pulsrikarn C, Chaichana C, Pornruangwong S, Moria Y, Yamamoto S, Boonmar S. Serotype, Antimicrobial Susceptibility, and Genotype of *Salmonella* Isolates from Swine and Pork in Sa Kaew Province, Thailand, Thai Journal of Veterinary Medicine, 42(1), 印刷中
6. OKADA Y, OKUTANI A, SUZUKI H, ASAKURA H, MONDEN S, NAKAMA A, MARUYAMA T, IGIMI S. Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* Isolated in Japan J Vet Med Sci. 2011. 73(12), 1681-1684.
7. Okada Y, Monden S, Igimi S, Yamamoto S. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in imported ready-to-eat foods in Japan. J Vet Med Sci. 2012. 74(3), 373-375.
8. Narimatsu, H., K. Ogata, Y. Makino, and K. Ito. 2010. Distribution of non-locus of enterocyte effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying eae from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan. J. Clin. Microbiol. 48(11):4107-4114.
9. Yoshiki Etoh, K. Murakami, S. Ichihara, et al., (2009), Isolation of Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia coli* (O115:HNM) from an Adult Symptomatic Patient in Fukuoka Prefecture, Japan. Jap. J. Infect. Dis., 62:315-137.
10. 病原微生物検出情報月報 (IASR) Vol.31 No.10 (No. 368) : 301-302.
11. H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. J. Med. Microbiol. 58 (11), 1486-1491, 2009.
12. M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, S. Yamamoto, G.B. Nair, S. Matsushita, K.

- Yokoyama, A. Kai, K. Seto, H. Watanabe, and H. Izumiya: Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. *J. Med. Microbiol.* 59 (6), 708-712, 2010.
13. H. Izumiya, Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda, and H. Watanabe: New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54, 569-577, 2010.
14. N. Sithivong, T. Morita-Ishihara, A. Vongdouangchanh, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, B. Khamphaphongphane, B. Sengkeoprasedh, P. Vongprachanh, O. Keosavanh, K. Southalack, J. Lee, R. Tsuyuoka, M. Ohnishi, and H. Izumiya: Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (11), 2060-2062, 2011.
15. K. Takeshi, M. Kitagawa, M. Kadohira, S. Igimi, S. Makino. 2009. Hazard Analysis of *Listeria monocytogenes* Contaminations in Processing of Salted Roe from Walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71(1):1-3.
16. K. Takeshi, S. Itoh, H. Hosono, H. Kono, V. T. Tin, N. Q. Vinh, N. T. B. Thuy, K. Kawamoto, S. Makino. 2009. Detection of *Salmonella* spp. Isolates from Specimens due to Pork Production Chains in Hue City, Viet. *J. Vet. Med. Sci.*, 71(4):485-487.
17. 小熊恵二, 武士甲一, 門間千枝, 2009. ボツリヌス中毒. 梶 龍兒総監修, 坂本崇編集, ボツリヌス治療総論, 株診断と治療社, 東京, pp. 24-36.
18. Do Ngoc Thuy, Cu Huu Phu, Koichi Takeshi, Van Thi Huong, Le Thi Minh Hang, Nguyen Xuan Huyen, Au Xuan Tuan, Eiki Yamasaki, Sou-ichi Makino. 2009. Detection and Some Characteristics of *Salmonella* spp. Isolates from Raw Meat Retailed in Marketplaces in Hanoi, Vietnam. *VNese Veterinary Sciences and Techniques*, XVI(6): 25-32.
19. Nguyen Thi Bich Thuy, K. Takeshi, A. Kusumoto, S. Makino and K. Kawamoto. 2009. *Salmonella* Typhimurium Isolated from Healthy Pigs and Their Ability of Horizontal Transfer of Multidrug Resistance and Virulence Gene. *Bioscience Microflora*, 28 (4): 135-143.
20. A. Minami, W. Chaicumpa, M. Chongsa-Nguan, S. Samosornsuk, S. Monden, K. Takeshi, S. Makino, K. Kawamoto. 2009. Prevalence of foodborne pathogens in open market and supermarkets in Thailand. *Food Control*, 21(2010): 221-226.
21. 武士甲一, 2010. IV-B-3. ボツリヌス症, 青木洋介, 岩田 敏, 大西健児, 清田 浩, 草

地信也, 古西 満, 館田一博, 満田年宏監修, IV新興・再興感染症とバイオテロ, 感染症専門医テキスト (日本感染症学会編集), (株)南江堂, 東京, pp. 101-102.

22. 武士甲一, 山崎栄樹, 牧野壮一, 2010. ボツリヌス菌. 丸山総一, 重茂克彦, 上野俊治, 上田富貴子, 伊東直人, 加藤行男, 三澤尚明監修, 獣医公衆衛生学実習, 獣医公衆衛生教育研修協議会編, (株)学窓社, 東京, pp. 42-45.

23. 武士甲一, 山崎栄樹, 牧野壮一, 2010. ウェルシュ菌. 丸山総一, 重茂克彦, 上野俊治, 上田富貴子, 伊東直人, 加藤行男, 三澤尚明監修, 獣医公衆衛生学実習, 獣医公衆衛生教育研修協議会編, (株)学窓社, 東京, pp. 46-49.

24. Khuanwalai Maklon, Atsuka Minami, Akiko Kusumoto, Koichi Takeshi, Nguyen, Thi Bich Thuy, Sou-ichi Makino, Keiko Kawamoto. 2010. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). Int. J. Food Micro-biol., 139: 134-139.

25. 武士甲一, 小熊恵二, 2010. ボツリヌス食中毒. 渡邊治雄監修, 六訂版 家庭医学大全科, 東京, PP. 2555-2556.

26. 武士甲一, 2010. 21. ボツリヌス症. 内閣府食品安全委員会事務局編, 平成21年度食品安全確保総合調査, 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書, 社団法人畜産技術協会, 東京, pp. 350-356.

27. 武士甲一, 2010. IV-B-3. ボツリヌス症, 青木洋介, 岩田 敏, 大西健児, 清田 浩, 草地信也, 古西 満, 館田一博, 満田年宏監修, IV新興・再興感染症とバイオテロ, 感染症専門医テキスト (日本感染症学会編集), (株)南江堂, 東京, pp. 101-102.

28. 武士甲一, 山崎栄樹, 牧野壮一, 2010. ボツリヌス菌. 丸山総一, 重茂克彦, 上野俊治, 上田富貴子, 伊東直人, 加藤行男, 三澤尚明監修, 獣医公衆衛生学実習, 獣医公衆衛生教育研修協議会編, (株)学窓社, 東京, pp. 42-45.

29. 武士甲一, 山崎栄樹, 牧野壮一, 2010. ウェルシュ菌. 丸山総一, 重茂克彦, 上野俊治, 上田富貴子, 伊東直人, 加藤行男, 三澤尚明監修, 獣医公衆衛生学実習, 獣医公衆衛生教育研修協議会編, (株)学窓社, 東京, pp. 46-49.

30. Khuanwalai Maklon, Atsuka Minami, Akiko Kusumoto, Koichi Takeshi, Nguyen Thi Bich Thuy, Sou-ichi Makino, Keiko Kawamoto. 2010. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). Int. J. Food Micro-biol., 139: 134-139.

31. 武士甲一, 小熊恵二, 2010. ボツリヌス食中毒. 渡邊治雄監修, 六訂版 家庭医学大全科, 東京, PP. 2555-2556.

商業雑誌発表

1. 森田幸雄 (2009) 「衛生」を食肉処理場の経営戦略に生かす -衛生が「金」になる時代がやってきた-, 畜産コンサルタント, 537 (9)、28-32.(別添2)

2. 森田幸雄 (2010) アジア諸国の口蹄疫・高病原性鳥インフルエンザ発生状況と家畜の食中毒病原物質保有状況および市販食肉の微生物汚染実態、化学療法の領域、26(10)、114-120

研究成果の刊行物・別刷

別添1

Nepalese Vet. J. 29: 42-45
Nepal Veterinary Association

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLATED FROM BUFFALOES IN VIENTIANE, LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC

Y. Morita¹, E. Komoda¹, S. Boonmar², K. Markvichin³, S. Chaunchom³, C. Chanda⁴, S. Yingsakmongkon², P. Padungtod⁵, V. C. Jha⁶, S. Singh⁷, S. Yamamoto⁸, H. Kimura⁹

ABSTRACT

A study was conducted on the prevalence of *Campylobacter* spp. in buffaloes and antimicrobial susceptibility of isolates in Vientiane, Lao People's Democratic Republic (Lao PDR). *Campylobacter* was isolated from 3 (6%) of the 50 caecum samples and all the isolates were identified as *C. coli*. The resistance profile and MIC of the 3 *C. coli* strains; namely A, B, and C were CP (MIC; 128 mg/liter)-TC (32 mg/liter)-NA (256 mg/liter)-CPFX (128 mg/liter), ABPC (256 mg/liter)-CTR (64 mg/liter), and ABPC (128 mg/liter) respectively. A quinolone-resistant strain of *C. coli* has already been isolated in Lao PDR. This study results suggested that a survey on the prevalence of *Campylobacter* spp. in human, food animals, and different types of food products should be performed to determine important sources of *Campylobacter* infection.

INTRODUCTION

Thermophilic *Campylobacter*, such as *C. jejuni* and *C. coli* is a major foodborne bacterium that affects children in many parts of the world, especially in developing countries. Foods of animal origin or other cross-contaminated foods and drinking water are considered as the main sources of this infection in humans (Coker *et al.*, 2002 and Oberhelman and Taylor, 2000). Previous reports have suggested

¹ Faculty of Nutritional Science, Tokyo Kasei University, 1-18-1, Kaga, Itabashi, Tokyo 173-8602, Japan

² Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

³ Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Nakornpathom 73140, Thailand

⁴ Faculty of Agriculture, National University of Laos, Vientiane, Lao PDR

⁵ Faculty of Veterinary Medicine, ChangMai University, ChangMai, 50100, Thailand

⁶ National FMD and TADs Laboratory, Chapali, Budhanilkantha, Kathmandu, Nepal

⁷ Institute of Agriculture and Animal Science, Rampur, Chitwan, Nepal

⁸ National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

⁹ National Institute of Infectious Diseases, Infectious Diseases Surveillance Center, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

that the prevalence of both *C. jejuni* and/or *C. coli* in children in Lao People's Democratic Republic (Lao PDR) varies from 2.9% to 4.4% (Phetsouvanh *et al.*, 1999 and Yamashiro *et al.*, 1998). Boonmar *et al.*, 2007 reported that 1.6% (3/184) of caecum samples and 1.0% (1/100) of bile samples from buffaloes harbored *Campylobacters*, while no *Campylobacters* were isolated from any of the 82 cattle caecum samples. In the adjacent country, Thailand, many quinolone-resistant *Campylobacter* strains have been found in patients, animals and food (Padungtod *et al.*, 2006 and Boonmar *et al.*, 2007). However, there is no report so far on antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates in Lao PDR. Thus, this study was conducted to investigate the prevalence of *Campylobacter* in buffaloes in Lao PDR and to determine the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates.

MATERIALS AND METHODS

A total of 50 caecum swab samples were collected from buffaloes approximately 3–10 years of age group slaughtered on February 7, 2007 at the Dorn Du slaughterhouse in Vientiane, Lao PDR. We could not confirm the number of farms where the buffaloes were raised. The caecum samples were collected using commercial swab sets containing Stuart transport media (BD BBL Culture Swab Plus, BD, NJ, USA) for swabbing the caecal content after evisceration. The samples were stored at 4°C, and immediately transported to the laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. The stored samples were analyzed within 30 h of collection. Isolation and identification methods used were same as those in the previous report (Boonmar *et al.*, 2007). Antimicrobial susceptibility of the *C. coli* isolates were tested using the broth dilution technique, in accordance with the guidelines of the clinical laboratory standard institute (CLSI), formerly called National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). The antimicrobial agents tested included ampicillin (ABPC), Chloramphenicol (CP), Erythromycin (EM), Tetracycline (TC), Nalidixic Acid (NA), Ceftriaxone (CTRX), and Ciprofloxacin (CPFX). Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that completely inhibited visible growth of the organism on the growth plates. The breakpoints of the drugs were obtained from Human Isolates Final Report, 2004, the U.S. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS), CDC (<http://www.cdc.gov/narms/reports.htm>) and were used to categorize *Campylobacter* into resistant groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Three *C. coli* strains could be isolated from the 50 buffalo samples. All the 3 *C. coli* isolates showed resistance to the antimicrobial agents used in this study. Resistance to CP, TC, NA, CPFX, and CTRX were found in one isolate each, whereas that to ABPC was observed in two isolates.

The resistance profile and MIC of strain A, B, and C were CP(MIC;128 mg/ liter)-TC(32 mg/ liter)-NA(256 mg/ liter)-CPFX(128 mg/ liter), ABPC(256 mg/ liter)-CTR(64 mg/ liter), and ABPC(128 mg/ liter) only, respectively (table1).

Table 1. Minimum inhibitory concentration(MIC) of *C. coli* isolated from buffaloes

Strain Number	Antimicrobial agents(a)						
	ABPC	CP	EM	TC	NA	CTR	CPFX
A	<0.125b)	128	<0.125	32	256	<0.125	128
B	256	16	8	0.5	16	64	2
C	128	8	4	0.2	8	32	0.5

a) ABPC:ampicillin. CP: chloramphenicol. EM: erythromycin. TC: tetracycline. NA: nalidixic acid. CTR: ceftriaxone. CPFX: ciprofloxacin.

b) mg/liter

To the best of our knowledge, there is no report available on the prevalence of *C. coli* from buffaloes in Asia. According to one report (Padungtod *et al.*, 2006) on the proportion of *Campylobacter* isolates demonstrating antimicrobial resistance in dairy cattle in Thailand (69% were *C. jejuni*), the resistance of ABPC, CP, EM, TC, NA, and CPFX were 17.7%, 5.9%, 5.9%, 11.8%, 11.8%, and 29.4%, respectively. A quinolone-resistant strain of *C. coli* has already been isolated in La PDR. A survey on the prevalence *Campylobacter* spp. in human, food animals, and different types of food should be performed to determine important sources of *Campylobacter* infection. Moreover, antimicrobial susceptibility analysis of isolates is needed for proper surveillance and monitoring of *Campylobacter* infections in the medical and veterinary fields.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was partially supported by Research on Food Safety, Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japanese government.

REFERENCES

- Boonmar, S., Morita, Y., Fujita, M., Sangsuk, L., Suthivarakom, K., Padungtod, P., Maruyama, S., Kabeya, H., Kozawa, K. and Kimura, H. (2007). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyr A* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. *Microbiology and Immunology*, 51: 531-537.
- Coker, A.O., Isokpehi, R.D., Thomas, B.N., Amisu, K.O. and Obi, C.L. (2002).

Morita, Komoda, Boonmar, Markvichit, Chaunchom, Chanda,
Yingsakmongkon, Padungtod, Jha, Singh, Yamamoto and Kimura

- Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 237-243.
- Oberhelman, R. and Taylor, D. (2000). Campylobacter infections in developing countries, pp 139-153. In Nachamkin, L., and Blaser M. (eds), *Campylobacter*, Vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
- Padungtod, P., Kaneene, J.B., Hanson, R., Morita, Y. and Boonmar, S. (2006). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. *FEMS immunology and medical microbiology*, 47: 217-225.
- Phetsouvanh, R., Midorikawa, Y. and Nakamura, S. (1999). The seasonal variation in the microbial agents implicated in the etiology of diarrheal diseases among children in Lao People's Democratic Republic. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 30: 319-323.
- Public Health Laboratory Service. (1999). *In: Detection of Campylobacter species*. Public Health Laboratory Service. London, pp 33
- Yamashiro, T., Nakasone, N., Higa, N., Iwanaga, M., Insisiengmay, S., Phounane, T., Munnalath, K., Sithivong, N., Sisavath, L., Phanthauamath, B., Chomlasak, K., Sisulath, P. and Vongsanith, P. (1998). Etiological study of diarrheal patients in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2195-2199.

「衛生」を食肉処理場の経営戦略に生かす

—衛生が「金」になる時代がやってきた—

東京家政大学 森田 幸雄

日本の食品業界への HACCP システムの導入は平成7年(1995年)から食品衛生法の「総合衛生管理製造過程」として段階的に行われてきた。平成8年(1996年)には日本中で腸管出血性大腸菌(特に血清型 O157)感染症が発生し、この発生対策として、「総合衛生管理製造過程」や「HACCP システムの考え方に沿った衛生管理手法」の導入が加速した。

特に平成8年以降のわが国の「食肉衛生に対する取り組み」は大変革を迎え、「農場から食卓まで」の各工程でさまざまな衛生的な取り組みが強力的に実施された。これらの取り組みによって、(消費者が知らない間に)日本の食肉衛生は格段に向上した。今、この良好な衛生を基盤とした経営戦略を練る時代と思われるので、その根拠となる取り組みや成績などを紹介する。

「衛生」に対する食肉処理場等の取り組み

家畜の消化管内容には、正常細菌叢としての大腸菌ばかりでなく、カンピロバクター、サルモネラ、腸管出血性大腸菌などの病原細菌が存在していることがある⁽¹⁾。これらの家畜を衛生的に処理し、病原細菌の汚染もなく、さらに、品質に影響を与える腐敗細菌・一般細菌等の汚染も少ない食肉を製造する「と畜場」における衛生管理は最も重要である。

と畜場の設置・運営は「と畜場法」「と畜場法施行令」「と畜場施行規則」などに

従って行われている。これらの基本法令に加え、「より高い食の安全」という付加価値をつけて食肉を生産すると畜場がいくつが現れた。

「対米輸出食肉を取り扱うと畜場等の認定要綱(「対米要綱」と略)」に沿った衛生管理実施施設(鹿児島、群馬県、宮崎県の4つの対米食肉輸出認定食肉処理場)、ISO22000取得施設(JA飛騨ミート、(株)佐賀県畜産公社、(株)千葉県食肉公社、サンキョーミート(株)霧島ミート工場、(株)神奈川食肉センター)などで、これらで生産される食肉の衛生レベルは高い⁽²⁾⁽³⁾。

と畜場に求められる衛生管理は、ほかのどの食品製造業と比較しても最も厳しく、しかも、その管理を実施するうえで高度な技術を要する。特に、食肉処理は全自動化が難しく、衛生標準作業書(SSOP)に従って作業を行うためには、衛生的な処理を理解し、かつ、確実な手技を備えた人材が必要となる。すなわち、「匠(たくみ)の技が備わった衛生技能者集団」のみ、衛生的な作業が可能となる。

しかしながら、と畜作業やカット作業従事者がほかのと畜場を訪問し、作業状況を見学、技術交流することは極めてまれである。(財)日本食肉生産技術開発センター(<http://jamti.lin.gr.jp/>)が昨年より実施している「食肉処理施設作業管理者研修会」(第1回:JA飛騨ミート、第2回:(株)神奈川食肉センターにて開催)は、食肉処理の衛生対策など高品質な食肉の生産に関する

技術的な課題を、ISO22000取得施設などで現地研修を実施し解決するものである。このような作業従事者の技術交流が恒常的に実施され、多くのと畜場で、より衛生的な食肉処理技術が習得・伝承されることが期待される。

細菌学的検査結果を踏まえた
今日の状況

「対米要綱」では、食肉処理場が実施する内部検証として大腸菌検査、食肉検査所が実施する外部検証としてサルモネラ検査を義務付けている。そこで、外部検証で用いられるサルモネラを用いて、HACCPシステム等衛生対策導入前（1953～1985年調査）と導入後の検査結果を比較した（表1）。検査方法、サンプリング方法は異なるものの、可能な限り比較できるものを抽出した。

牛腸内容のサルモネラ保菌率は、導入前（1983年以前）2～10%であったものが導入後は0%である。また、豚腸内容のそれは1～25%であったが、導入後は4～7%

である。逆に、鶏腸内容は5%であったものが導入後53%と上昇している。豚枝肉のサルモネラ汚染率は導入前8%であったものが、導入後の2008年の調査ではサルモネラは検出されていない。牛枝肉調査においても導入後はサルモネラ未検出であるが、腸内容物の保菌率が0%であるので客観的な評価はできない。

しかし、「対米食肉輸出認定食肉処理場」や「ISO22000取得食肉処理場」の一般生菌数や大腸菌群数の成績をも考慮に入れると、豚、牛ともにと畜場法の改正以降、格段に衛生は向上しているものと思われる⁽²⁾⁽³⁾。市販の牛ひき肉、豚ひき肉は、導入前はそれぞれ13%、18%あったものが、導入後は未検出となっている⁽¹⁾。鶏については処理工程で消化管の破損が起こる場合があり、これらの汚染が最終と体にも残ってしまうことが多いことから、現在においてもいまだ問題となっている⁽⁴⁾。導入前は加工・販売店での鶏・豚・牛ひき肉間のサルモネラ交差汚染が問題視されてい

(表1) サルモネラ検査結果

調査対象・部位等	1953年～1985年調査 ¹⁾					衛生対策が実施された後の調査結果				
	調査頭数	陽性頭数(%)	調査地域	調査年	報告者	調査頭数	陽性頭数(%)	調査地域等	調査年	[文献]
牛 腸内容	60	4(7)	東京	1965	善養寺ら	75	0(0)	群馬	2002	[1]
	100	8(8)	三重	1967	角谷ら	120	0(0)	岐阜	2006	[3]
	20	2(10)	東京	1966-1969	深沢					
	124	2(2)	神奈川	1983	森田					
	228	17(7)	全国調査	1984	2)	204 ²⁾	0(0)	群馬	1999	[2]
処理場内の枝肉拭き取り										
市販ひき肉	120	16(13)	神奈川	1983	黒田	50	0(0)	群馬	2001	[1]
豚 腸内容	1082	14(1)	東京	1953-1954	有森ら	105	4(4)	群馬	2002	[1]
	40	10(25)	神奈川	1969	勝部ら	110	8(7)	群馬	2005	[6]
	110	14(13)	神奈川	1983	斎藤					
	405	31(8)	全国調査	1984	2)	70	0(0)	日本7か所	2008	未発表
	120	21(18)	神奈川	1983	佐藤	50	0(0)	群馬	2001	[1]
処理場内の枝肉拭き取り										
市販ひき肉										
鶏 腸内容	300	15(5)	神奈川	1985	鹿島	32	17(53)	群馬	2002	[1]
	85	24(28)	埼玉	1983	渡辺ら	82 ⁴⁾	15(16)	全国調査 ⁵⁾	1996	[4]
						31 ⁵⁾	15(48)	全国調査 ⁶⁾	1996	[4]
	30	8(27)	神奈川	1982	弥富	60	7(12)	群馬	2000-2001	[5]
処理場内の鶏と体表拭き取り										
市販ひき肉										

1) 藤部素次(1989)サルモネラ環境汚染、乳技協資料、39、89-105より抜粋
 3) 対米国輸出牛肉認定食肉処理場のHACCP導入以後の調査
 5) 成築

2) 全国食肉衛生検査所協議会調査報告
 4) プロイラー
 6) 平成4年に導入された食肉検査実施後の全国食肉衛生検査所協議会全国調査

た。しかし、今日は、食肉処理場から加工・販売に至る工程での衛生向上のため、最終製品のひき肉間の交差汚染は少ないと思われる。

「当たり前」の変化と国際基準への対応

と畜場法の改正前とは畜処理工程で「家畜は汚いのが当たり前」「軍手を使用することは当たり前」「ふん便が枝肉に付着したら水で洗い流すことは当たり前」など、現在では考えられない「当たり前」が数多く存在していた。しかし、今では「作業中の床はドライフローアが当たり前」「1頭ごとのナイフの消毒は当たり前」「枝肉が汚染されたらトリミングするのは当たり前」「と畜場は食品製造施設であるので、清潔なのは当たり前」の世の中になった。ISO22000を取得したJA飛騨ミート、(株)神奈川食肉センターなどは、国際基準の衛生度を保っており、外観においても「と畜場である」と確認することすら難しい。このように、高度衛生処理を実施すると畜場が出現する動きは、社会ニーズに呼応したものと考えられる。また、衛生的な食肉が現実的に生産されている今こそ、消費者に正確な情報を含めた安全性を的確に伝え、その情報のもとに自分で考え、購入・消費する消費者を育てる時代が到来したと思われる。

消費者の食肉に対する意識

首都圏にある東京家政大学栄養学科に在籍する学生92人(19~21歳、女性)の協力得て表2のアンケート結果を得た。現在、肉をスーパーマーケットで購入する人は88%と圧倒的に多い(Q1)。ほとんどの人(96%)は「市販されている肉に食中毒

菌が汚染している可能性がある」ことは知らず(Q2)、もしもサルモネラやカンピロバクター汚染があるか否かの情報が同じ値段の肉であれば99%の人は「汚染がないひき肉」を購入する(Q6)。また、「清潔な肉を提供するために努力している店舗があることを実感している人」は42%、「実感していない人」は58%であり(Q3)、88%の人は「多少値段が高くて、きれいで安全な安心できる食品が求められている時代」(Q4)と思いつつも、今の経済状態では値段が高い「きれいで安全・安心の食品」より、品質はほどほどなら安いものを購入する人が75%存在している(Q7)。衛生、不衛生な商品を見分けるものとしては「商品をじっくりみて決める」が最も多く65%、次いで「お店や加工室の衛生度(雰囲気)で決める」が54%、「今まで購入した経験(以前購入した品が長期保存をしてもいたまなかつた等)」が26%である。

一方、スーパーマーケットの名前で選ぶ人は8%(7人)しかいない。あらかじめ情報として「食中毒汚染が確認されているひき肉」が100円で売られているとすると、「それらの汚染がないひき肉」は平均値209円(中央値190円、最頻値150円:n=75)でも購入したいと感じていることが判明した(Q8)。

「首都圏の栄養学科に所属する女子大学生」という母集団の偏りがあると思われるが、そもそも消費者は販売されている肉が食中毒汚染の可能性はあることは考えていない。正確な情報を消費者が入手した場合、経済状況にも左右されるが、消費者は衛生的な肉を付加価値の高い肉と認識するであろう。

写真はフィリピン・マニラ市内の朝市(写