

平成 24 年度 厚労科研費「食品の安全・安心確保推進研究事業」
食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリー等の構築研究班
分担報告書

***Sarcocystis. fayeri* の輸入馬肉における汚染とその遺伝子型別**

研究分担者： 国立感染症研究所 寄生動物部部長 野崎智義
研究協力者： 国立感染症研究所 寄生動物部主任研究官 八木田健司

概要： カナダ以外の馬肉生産国からの輸入馬肉に関して *S. fayeri* 特異的定量 PCR 法を用いて、その汚染実態を調べた。生食用馬肉ではベルギー産、アルゼンチン産は残品以下のレベルであったが、メキシコ産において残品同等の食中毒リスクレベルの汚染が見られた。またペットフード用馬肉においてもメキシコ産で同様な汚染が認められ、食中毒レベルの汚染が国外に点在することが判明した。これらの *S. fayeri* が検出された試料に関して、これまでの国内と畜馬や輸入馬肉また国内事例残品の試料と合わせ、ITS-1 領域を PCR 増幅し、その制限酵素切断多型を調べた。その結果、制限酵素 Hpa2 により多型がみられたが、使用した酵素数からみて同領域内の変異は少ないことが想定された。しかしながら、*S. fayeri* において遺伝的に異なる性質を特定できることが明らかとなり、*S. fayeri* 食中毒において遺伝的要因がリスク要因となる可能性が示された。

1. 研究目的

近年明らかとなった馬刺し喫食による食中毒の原因が、これまでヒトへの健康被害の知られていないウマを中間宿主とする *S. fayeri* であり、これが新たにヒト健康被害をもたらしていることが明らかとなった。食中毒防止また食品衛生の面からも、国内で流通する生食用馬肉の *S. fayeri* 汚染実態を明らかにすることは、生食用馬肉の食中毒リスク対策を考案する上で重要な課題である。前年度、国内で生食用にと畜処理された馬肉およびカナダからの生食用輸入馬肉について、定量 PCR を用いて *S. fayeri* の汚染実態を明らかにした。現在、国内ではカナダ以外の馬肉生産国からの輸入馬肉が市販流通しているが、その汚染状況は不明である。一方、これまでの

喫食調査ならびに *S. fayeri* の汚染調査からは、食中毒のリスク要因として馬肉内の *S. fayeri* の量が毒性を決定することが推察されるが、株即ち国・地域によって *S. fayeri* には遺伝学的性質が異なり、馬への感染性を含めた病原性には差があり、これが結果的に馬肉の毒性に関与するのではないかという点についてはデータがない。本研究では、この点もリスク要因の一つになるのではないかと考え、輸入馬肉の *S. fayeri* の汚染実態解析とともに *S. fayeri* の遺伝子型別の可能性についても検討した。

2. 研究方法

2-1. 研究材料

市販流通するベルギー、メキシコ、アルゼンチ

ン、ブラジル産馬肉で、生食用あるいはペットフードとして販売されている製品を購入した。なおいずれも冷凍品であった。遺伝子型別試験用にはこれまでの研究で使用した国内事例残品、国内と畜馬肉(軽種馬)およびカナダ産輸入馬肉より抽出した DNA 試料も用いた。

2-2. 方法

2-2-1. 馬肉からの DNA 試料の調整と定量 PCR

前年度報告した調整方法に基づいて馬肉試料からの DNA 抽出ならびに精製を行った。なお前年度明らかになったように馬肉内の虫体(サルコシスト)分布には偏りがみられるので、本研究でも 50g 程度につき 1 つの DNA 試料を調製することとし、全体の汚染状況を検査するためランダムに選択した 5ヶ所より DNA を抽出、検査した。定量 PCR は前年度報告した方法に基づき、*S. fayeri* 特異的定量 PCR を行った。

2-2-2. ITS-1 領域の DNA 増幅と遺伝子型別

種内変異の検出に有用とされる ITS-1 (internal transcribed spacers 1) の DNA 増幅は、既報¹⁾ のプライマーを用いて行った。反応温度条件は 94°C5 分間の変性後は 94°C30 秒、58°C30 秒、72°C45 秒を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル繰り返し最後は 72°C5 分間の反応を行った。得られた PCR 産物は PCR プライマーによりシークエンスを行った。また制限酵素解析のために Ase1、Hae3、Hpa2、Mse1、Mps1、Rsa1 を用いて PCR 産物を消化し、3%アガロースゲルで電気泳動を行い切断パターンを調べた。

3. 研究結果

カナダ以外の生産国からの輸入馬肉における

S. fayeri 汚染

定量 PCR による *S. fayeri* DNA 量の測定結果を

表-1 に示した。生食用として販売されていた馬肉の中ではベルギー産馬肉およびアルゼンチン産馬肉は食中毒残品より低い DNA 量であった。これに対し、メキシコ産馬肉では残品以上の DNA 量が認められる場合があった。特にメキシコ産馬肉で検出された最大 9,250 コピー/ml の測定値は極めて高い数値で、カナダの高汚染馬肉とほぼ同等の結果であった。一方、ペットフード用として販売されている馬肉に関しては、ブラジル産馬肉は残品より低く、メキシコ産馬肉では残品同等の DNA 量が認められる場合があった。結果を全体的にみると、1 検体につき 5ヶ所の部分から DNA 試料を調整したが、これまでと同様に同一検体の DNA 試料間には測定値に大きな差があり、国によらずサルコシストの分布には偏りがあることが示された。

検出された *S. fayeri* の ITS-1 領域の DNA 増幅と遺伝子型別

前述の各輸入馬肉検体において、残品と同様の定量 PCR 測定値の試料あるいは残品以下の測定値では最高値を示した試料につき、馬肉検体毎に 1DNA 試料を用いて ITS-1 領域の DNA を増幅した。同様な条件で、国内事例残品、国内と畜馬肉(軽種馬)およびカナダ産輸入馬肉より抽出した DNA 試料についても ITS-1 の増幅を行ったところ、いずれの試料からもおよそ 760bp の DNA が増幅された。この PCR 産物に関してシークエンスを行ったところ、メキシコ産のペットフード用馬肉の DNA 試料のみ良好なシークエンスが得られた以外、他の試料では波形の重複が多く、解析は困難であった。設計し直したプライマーを用いても結果の改善は見られず、ITS-1 シークエンスによる型別は今後の課題とした。なおメキシコ産ペットフード用馬肉より得られたシークエンスの特徴であるが、その解析可能なシ

ークエンスを図-1に示したが、GeneBank登録の *S. cruzi*、*S. felis*ならびに *S. canis*のITS-1シーケンスとは相同性が低いことが示された(図-2)。

シーケンス以外の方法で型別を行うためにITS-1PCR産物制限酵素解析を行った。その結果、4塩基認識酵素であるHpa2において多型が認められた。その特徴はメキシコ産のペットフード用馬肉以外の馬肉はすべて同一タイプを示すということであった(図-3 および 4)。6種類の酵素中1種類のみでしか多型が見られず、ITS-1内の変異は極めて少ないと想定されるものの、*S. fayeri*には遺伝的に多型が存在することが示された。

4. 考 察

馬肉は日本の他にヨーロッパ諸国のいくつかの国であるが、生食あるいはそれに近い形で食されてきた歴史がある。その中で馬肉に感染するザルコシスティスがヒトの健康被害を起こすという事例は、わが国の *S. fayeri*による食中毒発生が明らかになるまでひとつの報告もなかった。ゆえに *S. fayeri*による食中毒は極めてユニークな問題であると言えるものであり、発生原因の解明、そしてリスク要因の解明とリスク評価など今後の課題が多数残されている。本年度研究では、日本とカナダ以外の馬肉生産国より生産される馬肉中に *S. fayeri*を探索し、カナダ産馬肉の一部に見られる食中毒残品と同等の汚染が、メキシコ産馬肉でも見られることを明らかにした。ロットは全く別と考えられるが、生食用のみならず *S. fayeri*の固有(終)宿主であるイヌ用のペットフードにも高い汚染が認められたことは、ペットオーナーへの健康影響、また馬への *S. fayeri* 伝播の可能性という点で懸念される結果である。検査した馬肉製品は冷凍がなされていたが、生

食用と同様の凍結処理の周知が関係業界に求められる。

国外の複数国(現状ではカナダとメキシコ)で食中毒リスクのある *S. fayeri* 汚染が見られる現状は、各国間で生体馬体および馬肉が牛、豚とそれらの肉と同様、活発に輸出入される貿易状況がその背景にあり、*S. fayeri* 汚染もそれに伴って移動、拡散する可能性を示すものである。実際、日本が輸入するカナダ産肥育馬には高い汚染が認められ、また北米と南米の間では生体の貿易が盛んであり、これらの国からヨーロッパへの輸出も行われている。日本が経験したこれまでになかった馬肉食中毒が、馬や馬肉製品の消費と流通の変化により世界の馬肉消費国でも起こりうることは、現状で想定範囲内のことと考える必要があるであろう。馬肉の安全性確保の面からは *S. fayeri* 汚染の地域特定、拡散防止は将来的な問題になると思われる。

ITS-1領域は、リボゾームRNA遺伝子の配列内の18SrRNA遺伝子と5.8SrRNA遺伝子のスペースを形成する非コード領域であり、遺伝的変異が蓄積しやすいことから種内変異を検出できる分子マーカーの一つとして知られている。ザルコシスティスにおいては種間の変異は極めて高いことが本研究からも示されたが、種内変異に関しては *S. rileyi*において1,079bp内に2ヶ所の点変異が存在することが知られ¹⁾、また本研究でも種間変異ほどは高くないことが示された。*S. fayeri*に関してはITS-1に多型はみられるものの、変異の存在はシーケンスで確認する必要があり、その結果で有用性は判断される。分子マーカーとしては細胞内小器官であるアピコプラストのDNA、近縁のトキソプラズマで利用される表面抗原遺伝子など他にも候補はあるので、種内変異に関する研究は、それらの分子マーカーを適切に選択し、生息地域や馬への感染性、ヒ

トへの毒性などを遺伝的特性と関連付けていく方向で発展させることが重要である。遺伝的な型別がリスク要因としてリスク評価に有用な材料となるか、さらに諸外国で生産される馬肉について汚染調査を進めることが必要と考えられる。

5. 結論

国内で馬肉生食による食中毒の原因となった *S.fayer* は、*S.fayer* 特異的定量 PCR による解析の結果、世界の馬肉生産国において存在し、地域によっては食中毒リスクの汚染が見られることが判明した。さらに調査をすすめ汚染地域の特定、汚染量の分布を調べることは輸入馬肉に対する今後の対策の一環になると考えられる。

加えて *S.fayer* 型別が可能になれば、汚染馬また汚染馬肉の移動や拡散も把握可能となり、効果的な対策に結びつくものと考えられる。

F. 参考文献

1) Dubey JP et,al., J. Parasitol. 96:765-770, 2010

G. 研究発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1、カナダ以外の生産国からの輸入馬肉における *S. fayeri* の定量 PCR 測定結果

検査馬肉	定量 PCR 測定値(コピ―数/ml)				
	1	2	3	4	5
ベルギー産食用馬肉	2.5	2.6	55.2	136.0	179.4
メキシコ産食用馬肉	0.7	7.7	162.4	1394.5	9249.8
アルゼンチン産食用馬肉	UD	UD	1.0	2.0	26.9
メキシコ産ペット用馬肉	184.1	783.8	995.3	1851.7	2930.4
ブラジル産ペット用馬肉	0.6	1.7	58.0	102.6	352.0

検出限界: 10 コピ―数/ml、UD: 不検出、事例残品検出量: 700 コピ―/ml 以上

ATCATTACACTACTACTGCCCCTTTTCGTATGGTGAGAGGGTAGTTCCTACATTCTCCTCCTACTACTACTGTGATAGTGTGATGTGGTG
GGTGGTGGCTATTGTTGCCATATACCCCTACCTCTTGTCTCCTTATCATATAAGTTAGTAAGGATGGAATGTTTGTGTTAACCACCCGAGTTG
AATCCCCACCGATAGTGATTTTCTATAATAGGAGTGGCTTATTACTACTACTACTACTGCGTTTTTGTGTATTGTATTAGTATTAGTA
ATTATAGATGGCACGTCGCGAACGATCTCTGGAGATTGATGATTGTGAAGACGTACGACATCATCAATGGTCCGGTGGTGGTTCGTTTTGGTT
TTTTCTTTTTTCCCACCTCTGGTTCTTATTTTATCTGTTTGTCTCACAGTGTGGAAGGAGTTCTGGGAGGAAAAATGATGATGGATCTCTATCAT
GTCATCTTGATCCTGGTATTTTTCTCGCCTTGAGAGAGACAGATCATTATTATGTTACAACCTATTATTATTGATTGGAGTGTGGGAGGAGGAG
GAGGAGTGGGATTTTATCTGCTCCTTATCATGCCTCGGACACACGCGGTATTTTTAT

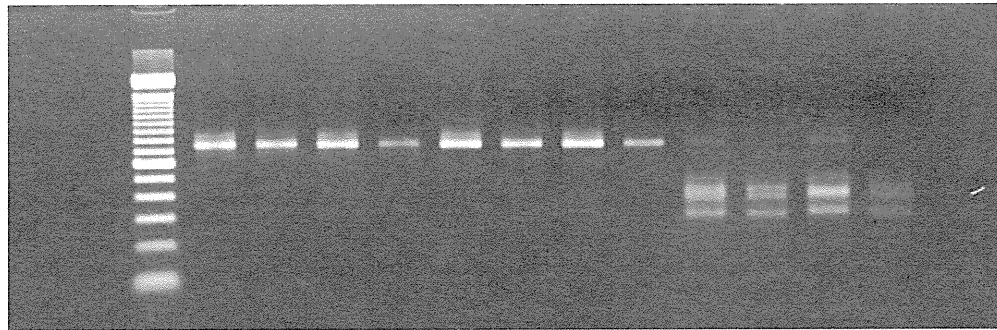
図-1、メキシコ産ペットフード用馬肉より得られた *S. fayeri* の ITS-1 領域シーケンス(7F1-R1, 634bp)

```

Sarcocystis_canis      TGAACCTGCGGAAGGATCATT--CACAC-----GTTTTGAAG----- 149
Sarcocystis_felis_7F1-R1  TGAACCTGCGGAAGGATCATT--CACAC-----GTTTTGAAAAA----- 49
Sarcocystis_cruzi_     TG-----GTGGCT--ATTGTTGCCATATACCCCTACCTCTTGTCTCCT----- 138
Sarcocystis_cruzi_     TGAACCTGCGGAAGGATCATT--CACACATCATCTCATCTCCTCGGAAGAAGAGAAGA 178
**      * **      ** **      ** *
Sarcocystis_canis      ---CGTTTGAAAGGATGATGGTATATCTTGTGCTTCTT--TTGCAAGCACAAATATATCA 205
Sarcocystis_felis_7F1-R1  ---CGTCTAAAAGGATGATGATATATCCTGTTGCTTCTT--TAGCAAGCACAGATATACCA 105
Sarcocystis_cruzi_     ---TATCATAATAGTTAGTAAGG--ATGGAAT--GTTTGTI-----TGTT-A-----A 178
Sarcocystis_cruzi_     GGATGTCAAAAAAGCAAGTGGTG--GTGCTGCAGTCTATTATTCTATGTATT--ATAGATTG 236
*      ** *      *      *      *      *      *
Sarcocystis_canis      TTGTCTCA-----TTTTAACCCATAA--TTTCAACAACCTGAATCCCCCGATATCAAAG 256
Sarcocystis_felis_7F1-R1  TCGTCTCA-----TTTTAACCCATAACTTTTCAACAACCTGAATCCCCCGATTTCACAG 158
Sarcocystis_cruzi_     CCACCGCAG-----TTGAATCCC-----CCACCGATAGGTGATT-----TT----- 214
Sarcocystis_cruzi_     CTGCTGCAACCACCTTTTTAACCCTTTTTCTACCTACAACCTGAATCCCCCCTATT----- 292
**      *      ** **      ** *      *      *
Sarcocystis_canis      CCAATGATAAATTGACTTTGCGCGCGTTGTTACGTTTCGTGAAGTGTATATCATTG----TG 312
Sarcocystis_felis_7F1-R1  GCAATGATAAATTGGCTTCATGTGCG--ATTACGTACCTGAAGTTATTATCGTTGAATGTG 216
Sarcocystis_cruzi_     -CTATAATAG--GAGT-----GCGT--CTAT-TACT-----TACTACTACTACTG 256
Sarcocystis_cruzi_     -CTGACGTGG--GACTTTAC-TACCT--CTGC-TATAAAGAATACTA-TACCACAGCAG 344
*      *      *      *      *      *      *
Sarcocystis_canis      CGTATATCATG-TATATATGATGATTGATATTTTCGTAGCGTTGAGRAGATATGTGGTT 371
Sarcocystis_felis_7F1-R1  TCGGTGTCATG-TAT-TGT-ATGTGTTTCATCTTTTGTATGGTTGGGAGATTTGTGATC 273
Sarcocystis_cruzi_     C---GT-----T-TTGCTGTAITG-TAITA-----GT-----ATTAGTAAT 289
Sarcocystis_cruzi_     CA---GTCGTGATGT-TGTGGTATATTC-TATTATAGCAGGGT-----AGTATTGTT 392
*      *      *      *      *      *      *
Sarcocystis_canis      GGGAAAAGTAGATTATATTACTTGCAGGACA---TCGCACTGCAAGTGGTGAACCTGCT 427
Sarcocystis_felis_7F1-R1  GGGAAAAGTAGGTATATAACTTGCAGGATAATATTACTGCAAGTGTAAAGTCT 333
Sarcocystis_cruzi_     A---TAGATGGCAGC--TCGC-GAACGAT-----CTCTGG-----AGATTGATG 327
Sarcocystis_cruzi_     T-----GACGTCTGATT--TTGC-GAGCGGT-----GTGTGGTCTGATGTT 435
*      *      *      *      *      *
Sarcocystis_canis      TTTCTTCTCCCTTTCTCCCCTCGG-CGCGAGGATGAACAATATATGTACATATATGCAT 486
Sarcocystis_felis_7F1-R1  TTTCTAC---CGTTTTTCCCCTCGGGCGCAAGATGAACGATGTATA-----ATACAT 383
Sarcocystis_cruzi_     ATTGTG-----AAGACGTACGACAT----- 347
Sarcocystis_cruzi_     ATTACAGT-----AGAATAATATGCACAACACATAC----- 466
**      *      *      *      *

```

図-2、*S. cruzi*、*S. felis*、*S. canis* および *S. fayeri* の ITS-1 シーケンスアライメント(部分)

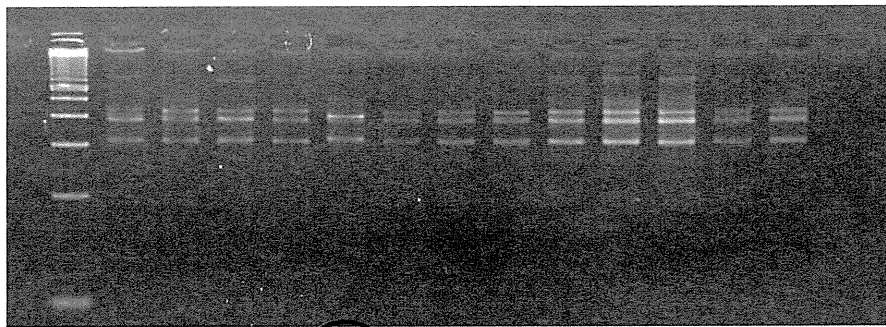


Hae 3 digest
Hha 1 digest
Hpa 2 digest

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

図-3、各種 *S. fayeri* の ITS-1 領域における 4 塩基認識制限酵素解析結果例

- | | |
|--------|--------------|
| 1,5,9 | 国内軽種馬 |
| 2,6,10 | ベルギー(生食) |
| 3,7,11 | メキシコ(ペットフード) |
| 4,8,12 | ブラジル(ドッグフード) |



M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

図-4、Hpa2 を用いた ITS-1 領域の制限酵素解析結

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1. 国内軽種馬1 | 7 国内事例残品1 |
| 2. ベルギー(馬刺) | 8. 国内事例残品2 |
| 3. メキシコ(馬刺) | 9. 国内事例残品3 |
| 4. アルゼンチン(馬刺) | 10. 国内事例残品4 |
| 5. メキシコ(ペットフード) | 11. 国内事例残品5 |
| 6. ブラジル(ドッグフード) | 12. 国内事例残品6 |
| | 13. 国内事例残品7 |

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)

平成 24 年度分担研究報告書

地方衛生研究所のネットワーク構築班：市販鶏肉の食中毒菌汚染に関する研究
市販の国産鶏肉におけるサルモネラの汚染状況
分担研究報告書

研究分担者	林 賢一	滋賀県衛生科学センター
研究協力者	齊藤志保子	秋田県健康環境センター
	小林昭彦	さいたま市健康科学研究センター
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	堀川和美	福岡県保健環境研究所
	福島敬介	滋賀県衛生科学センター
	向井晃一	滋賀県衛生科学センター
	青木佳代	滋賀県衛生科学センター
	梅原成子	滋賀県衛生科学センター
	河野智美	滋賀県衛生科学センター
	石川和彦	滋賀県衛生科学センター

要旨

「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」に参加する地方衛生研究所 5 機関において、市販の国産鶏肉（非冷凍）各機関 20 検体ずつ合計 100 検体を対象に、サルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌およびウェルシュ菌の汚染実態について調査した。本稿では、当所が担当したサルモネラについて報告する。

鶏肉 100 検体中 54 検体 (54.0%) からサルモネラが検出された。鶏肉の部位別汚染率としては、モモ肉が最も高く (61.2%)、次いでムネ肉 (52.8%) で、ササミは最も低かった (25.0%)。北海道・東北、近畿および四国・九州の生産地域別に集計したところ地域ごとの検出率は 35.3%～59.4%であり、地域別に大きな差異は認められなかった。9 種の血清型が検出され、血清型別集計 (n=60) の検出頻度は、Infantis (O7 群) の検出頻度が最も高く (53.3%)、次いで Schwarzengrund (O4 群) 20.0%、Manhattan (O8 群) 15.0%で、Agona (O4 群)、Cerro (O18 群)、Corvalis (O8 群)、Duesseldorf (O8 群)、Typhimurium (O4 群) および Virginia (O8 群) はそれぞれ 1.7% (1 検体) から検出された。6 検体の鶏肉からは 2 種の血清型のサルモネラが検出された。これらの成績は、厚生労働省事業の食品の食中毒菌汚染実態調査 (平成 21～23 年度) 由来のサルモネラの検出状況 (ミンチ鶏肉：48.6～55.3%) と同様の傾向であった。

A. 研究目的

流通食品における食中毒菌の汚染状況等の情報は、食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等の衛生対策に非常に有用であるが、現在、これらの情報を容易に入手できる状況にはなっていない。このことから、食品の食中毒菌汚染状況の全国的なデータベースの構築等について検討するための実際のデータを得ることを目的として、食中毒対策上重要な原因食品である市販鶏肉の食中毒菌汚染実態について調査した。調査対象とした食中毒菌は、サルモネラ、カンピロバクター、ウェルシュ菌および黄色ブドウ球菌で、本稿ではサルモネラの汚染実態調査の結果について報告する。

B. 研究方法

1. 調査材料

平成24年7月22日～10月29日の間に、本研究に参加している地方衛生研究所5機関が、国産の凍結されていない市販鶏肉を20検体ずつ、計100検体（モモ肉49検体、ムネ肉36検体、ササミ12検体およびその他3検体）を購入し調査対象とした。なお、購入店舗数は量販店を含めて複数とし、同一日に同一店舗で同一部位の購入は避けることにした。

2. サルモネラの検査方法

サルモネラの検査法は、国立医薬品食品衛生研究所「食品からの微生物標準試験法検討委員会」が定めたサルモネラ属菌標準試験法 NIHSJ-01-ST4（090218、090623 一部修正、091014 一部修正 37℃対応）に準拠し、O群型別に加えてH型別も行い、血清型名を調べた。以下、具体

的に示す。

検体 25g をストマッカー袋に入れて緩衝ペプトン水（BPW）225ml を加え、ストマッカーであるいは揉み洗い処理し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間、前増菌した。その前培養液 1.0ml を TT（Tetrathionate）培地（10ml）に、培養液 0.1ml を RV（Rappaport-Vassiliadis）培地（10ml）に接種し、 $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した培養液を試料とした。

試料をよく混和後、1白金耳量を2種類の分離平板培地（硫化水素産生により判定する培地；DHL培地（日水）および硫化水素非産生性であってもサルモネラと判定できる培地；ESサルモネラII培地（栄研））に画線塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した。各々の分離平板培地に発育増殖した定型的な、あるいは疑わしい集落を3個ずつ釣菌して、TSI培地とLIM培地等に接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養した。サルモネラを否定できない性状であった場合、その他のサルモネラの生化学的性状を調べて同定した。

サルモネラの血清型は、市販のサルモネラ診断用 OH 型別血清（デンカ生研）を用いて型別を行い、血清型を決定した。

3. 厚生労働省事業「食品の食中毒菌汚染実態調査」由来のサルモネラの血清型

平成21～23年度に行われた厚生労働省事業の「食品の食中毒菌汚染実態調査」資料からサルモネラの検出状況について調査した。

C. 研究結果

地方衛生研究所5機関において行った鶏肉からのサルモネラの調査結果は表1

および表 2 に示すとおり、鶏肉 100 検体中 54 検体 (54.0%) からサルモネラが分離された。部位別の検出状況は表 1 に示すとおり、モモ肉 (61.2%)、ムネ肉 (52.8%)、ササミ (25.0%) の順で高かった。また、生産地域別の検出状況は表 2 に示すとおり、四国・九州地方 (59.4%)、北海道・東北地方 (50.0%)、近畿地方 (35.3%) の順で高かった。

検出されたサルモネラの血清型を表 3 および表 4 に示すとおり、54 検体のうち 6 検体からは 2 種の血清型のサルモネラが検出された。また、検出されたサルモネラ血清型は、型別不明を除き 9 種に分別された。血清型別集計 (n=60) による検出頻度では、Infantis (O7 群) の検出頻度が最も高く (53.3%)、次いで、Schwarzengrund (O4 群) 20.0%、Manhattan (O8 群) 15.0% で、Agona (O4 群)、Cerro (O18 群)、Corvalis (O8 群)、Duesseldorf (O8 群)、Typhimurium (O4 群) および Virginia (O8 群) はそれぞれ 1 検体 (1.7%) から検出された。これらの血清型別の検出状況では、鶏肉の部位別でも生産地域別でも大きな偏りは認められなかった。

平成 21~23 年度に厚生労働省事業として行われた「食品の食中毒菌汚染実態調査」由来のサルモネラの検出状況に、今回の調査成績を加えて、表 5 (サルモネラの血清型情報：食品汚染調査由来) にまとめて示す。厚生労働省事業由来 (鶏肉ミンチ肉) のサルモネラの血清型は、Infantis (O7 群) が最も多く、次いで Schwarzengrund (O4 群)、Manhattan (O8 群)、Typhimurium (O4 群) の順であった。今回の調査成績と比べると、Infantis (O7 群) が

最も多く、次いで Schwarzengrund (O4 群) の検出頻度が高かったことは同様であったが、その他の血清型の検出傾向はやや異なっていた。

D. 考察

サルモネラは食中毒の原因菌として重要な位置にある。鶏肉におけるサルモネラ汚染は以前から指摘されており、厚生労働省事業の「食品の食中毒菌汚染実態調査」の成績¹⁾でも、鶏肉 (ミンチ肉) からは平成 21 年度成績で 48.6%、22 年度成績で 53.5%、23 年度成績で 55.3% と高率に汚染されていることが示されている。今回、5 機関の地方衛生研究所で実施した成績では 100 検体中 54 検体 (54.0%) の鶏肉からサルモネラが検出され、先の厚生労働省事業における調査成績とほぼ同様の傾向であることが窺えた。調査部位別の成績では、モモ肉、ムネ肉ササミの順で検出率が高く、それぞれの処理工程における汚染の機会を反映している可能性があると考えている。また、生産地域別に集計したところ、四国・九州地域、北海道・東北地域、近畿地域の順で検出率が高かったが、大きな差異は認められず、鶏肉への汚染は全国的であることが再確認された。

一方、検出されたサルモネラの血清型は、富山県²⁾、島根県³⁾ および福岡県⁴⁾ でも示されているように、Infantis (O7 群) (53.3%) の検出率が最も高く、全国的な傾向と考えられた。

今回得られたサルモネラの血清型情報を、平成 21~23 年度に行われた全国調査由来のサルモネラ血清型の成績に加えた

集計表を、食品中のサルモネラ汚染に関するデータベースとして提案したい。

E. 結論

今回の調査により、鶏肉におけるサルモネラの高率な汚染実態を示す資料が得られた。部位別のサルモネラ汚染率は、モモ肉、ムネ肉、ササミの順で高かった。また、鶏肉から検出されたサルモネラの血清型は、生産地域を問わず *Infantis* (O7 群) が広く汚染していることが判明した。

今後、今回の鶏肉におけるサルモネラの調査結果を有効に活用するために、厚生労働省事業「食品の食中毒菌汚染実態調査」から得られた食中毒菌情報とあわせて、ライブラリーとしてのデータベースとしての活用が期待できる。

F. 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課鳥通知:平成 23 年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果について. 平成 24 年 3 月 27 日付け食安監発 0327 第 1 号
- 2) 嶋 智子ら:富山県における市販鶏肉のカンピロバクターおよびサルモネラ属菌汚染実態調査 (2010). 富山衛研年報、

34、149-153 (2011)

- 3) 熱田純子ら:島根県における食肉のカンピロバクターとサルモネラの汚染状況及びヒト由来株との関連性について. 島根保環研所報、51、52-56 (2009)
- 4) 江藤良樹ら:平成 22 年度収去食品中の食中毒細菌及び貝毒検査. 福岡県保環研年報、38、81-84 (2011)

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

福島敬介、河野智美、梅原成子、青木佳代、坂口初美、向井晃一、石川和彦、林賢一:滋賀県内で処理された食鳥肉の食中毒菌汚染の実態について. 第 43 回滋賀県公衆衛生学会、2013 年 2 月 14 日、大津市

I. 知的財産権の出願。登録状況

なし

表1 部位別サルモネラ検出状況

部位	検体数	陽性数	%
モモ	49	30	61.2
ムネ	36	19	52.8
ササミ	12	3	25.0
その他	3	2	66.7
計	100	54	54.0

表2 生産地域別サルモネラの検出状況

生産地域	検体数	陽性数	%
北海道・東北	32	16	50.0
近畿	17	6	35.3
四国・九州	32	19	59.4
国産*	19	13	68.4
計	100	54	54.0

* 生産地域不明

表3 市販鶏肉の部位別および血清型別サルモネラの検出状況

血清型 (O 群)	陽性検体数*	% (n=60)	モモ	ムネ	ササミ	その他
Infantis (O7)	32	53.3	16	12	2	2
Schwarzengrund (O4)	12	20.0	7	3	1	1
Manhattan (O8)	9	15.0	5	4		
Agona (O4)	1	1.7	1			
Cerro (O18)	1	1.7	1			
Corvallis (O8)	1	1.7	1			
Duesseldorf (O8)	1	1.7	1			
Typhimurium (O4)	1	1.7	1			
Virginia (O8)	1	1.7	1			
型別不明 (O:UT,H:r.1)	1	1.7	1			
計	60		35	19	3	3

*:サルモネラ陽性 54 件のうち 6 検体からは 2 種の血清型が検出 (Infantis + Schwarzengrund 2 検体、Infantis + Manhattan 1 検体、Infantis + Typhimurium 1 検体、Agona + Corvallis 1 検体、Cerro + Dusseldorf 1 検体)

表4 市販鶏肉の産地別および血清型別サルモネラの検出状況

血清型 (O群)	陽性 検体数*	% (n=60)	北海道・ 東北	近畿	四国・九 州	国産
Infantis (O7)	32	53.3	14	3	6	9
Schwarzengrund (O4)	12	20.0		2	7	3
Manhattan (O8)	9	15.0	1		6	2
Agona (O4)	1	1.7			1	
Cerro (O18)	1	1.7			1	
Corvallis (O8)	1	1.7			1	
Duesseldorf (O8)	1	1.7			1	
Typhimurium (O4)	1	1.7	1			
Virginia (O8)	1	1.7		1		
型別不明 (O:UT,H:r.1)	1	1.7	1			
計	60		17	6	23	14

*:サルモネラ陽性 54 件のうち 6 検体からは 2 種の血清型が検出 (Infantis + Schwarzengrund 2 検体、Infantis + Manhattan 1 検体、Infantis + Typhimurium 1 検体、Agona + Corvallis 1 検体、Cerro + Dusseldorf 1 検体)

厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保推進研究事業)

地方衛生研究所のネットワーク構築に関する研究
市販の国産鶏肉におけるウェルシュ菌の汚染状況に関する調査
分担研究報告書

分担研究者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	齊藤志保子	秋田県健康環境センター
	小林昭彦	さいたま市健康科学研究センター
	林 賢一	滋賀県衛生科学センター
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	村上光一	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	大石 明	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所

要旨

「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」に参加する5地方衛生研究所（地研）により市販されている冷凍を経っていない国産鶏肉におけるウェルシュ菌の汚染状況を調査した。各地研で20検体を購入した計100検体の鶏肉について、パウチ法による推定ウェルシュ菌の計測およびウェルシュ菌の同定、並びに、増菌培養法による本菌の検出を行った。鶏肉の推定ウェルシュ菌数は、100検体中52検体から1-190 CFU/g 検出され、残り48検体は1 CFU 未満/g であった。ウェルシュ菌は37検体から検出されたが、いずれもエンテロトキシン産生遺伝子は保有していなかった。また、鶏肉の部位による汚染率の違いは認められなかった。

A. 研究目的

「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」のため、鶏肉における食中毒菌の汚染実態調査を実施した。今回は主な食中毒原因細菌

である *Salmonella* 属菌、*Campylobacter jejuni/coli*、ウェルシュ菌および黄色ブドウ球菌を対象として参加地方衛生研究所（地研）が市販の鶏肉からの検出を行った。福岡県保健環境研究所はウェルシ

ユ菌についてとりまとめを担当したので、その概要を報告する。

B. 研究方法

1. 検査材料

国内で生産され冷凍を経ていない鶏肉のモモ 49 検体、ムネ 36 検体、ササミ 12 検体および他 3 検体、計 100 検体を用いた。これら鶏肉は、平成 24 年 7 月 22 日から 10 月 29 日までの間に、5 地研が 20 検体ずつ購入した。同一系列会社の店舗での重複購入はせず、同一処理業者からの購入とならないよう配慮した。

購入した鶏肉を滅菌した器具により無菌的に細切し、ストマッカー袋に 25 g 採取した。これに緩衝ペプトン水 (BPW) 225ml を加え、約 1 分間ストマッキング処理を行い、試料原液 (10 倍) とした。

2. 検査方法

推定ウェルシュ菌数はパウチ法、ウェルシュ菌の検出はパウチ法および増菌培養法により実施した。検査方法は食品衛生検査指針¹⁾に準拠した。

2-1 パウチ法

ストマッカー処理した 10 倍希釈液をさらに BPW で 10 倍段階希釈し、100 倍希釈液を作製した。各希釈段階について 2 枚のパウチに 10ml ずつ入れ、あらかじめ溶解後 50°C に保温したハンドフォード改良培地 (栄研化学) を 15mL 加え混和し、気泡が封入されないように注意してパウチの首部分をヒートシールした。寒天が固化した後、46±1°C で 22-26 時間培養した。直径約 1-3mm の黒色集落数を計測し、推定ウェルシュ菌数を算定した。パウチの表面を

アルコール綿で消毒した後、1 検体あたり 5 から 10 コロニーをカナマイシン加 CW 寒天培地 (日水製薬) に釣菌し、35±1°C で 18-24 時間嫌気培養した。レンチナーゼ反応が認められたコロニーについて、同定検査を実施した。確認試験として、運動性-硝酸塩還元 (MN) 培地、乳糖-ゼラチン (LG) 培地、好気培養試験および Gram 染色を行い、非運動性、硝酸塩還元試験陽性、乳糖分解およびゼラチン液化試験陽性で好気培養非発育の Gram 陽性桿菌をウェルシュ菌と同定した。

2-2 増菌培養法

10 倍希釈液 1ml をクックドミート培地 (BD) 10ml に接種し、35±1°C で 18-24 時間嫌気培養した。この増菌培養液をカナマイシン加 CW 寒天培地に塗抹し、35±1°C で 18-24 時間嫌気培養した。レンチナーゼ反応が認められた集落を純培養し、パウチ法と同様にウェルシュ菌の確認試験を行った。

2-3 エンテロトキシン産生遺伝子の確認

ウェルシュ菌と同定された菌株について、ウェルシュ菌毒素産生遺伝子検出用プライマー (TaKaRa) を用い、PCR によりエンテロトキシン産生遺伝子の有無を確認した。

C. 研究結果

地研 5 機関においてパウチ法にて実施した鶏肉 100 検体の推定ウェルシュ菌数は、48 検体が 1 CFU/g 未満であった。40 検体は 1-5 CFU/g で、うち 25 検体 (62.5%) はウェルシュ菌が確認された (図 1)。推定ウェルシュ菌数の最大値は 190 CFU/g で、近畿地域で生産された鶏のムネ肉から

検出された。各部位別の推定ウェルシュ菌数は表 1 に示した。

各部位のパウチ法および増菌培養法によるウェルシュ菌の検出率は、モモ 36.7%、ムネ 41.7%およびササミ 33.3%で、部位による有意差は認められなかった(表 2)。また、検査法別にみるとパウチ法では 32 検体からウェルシュ菌が検出されたが、増菌培養法では 12 検体で、パウチ法は増菌培養法での検出率の 2.7 倍であった。参考までに生産地別のウェルシュ菌検出率を表 3 に示した。今回の調査では、四国・九州地域で生産された鶏肉のウェルシュ菌汚染率は約 25%であり、他の地域に比べ低い傾向が見られた。

パウチ法により分離されたウェルシュ菌 68 株および増菌培養法により分離された 23 株について、PCR 法によりエンテロトキシン産生遺伝子保有の確認を行ったが、91 株すべて陰性であった。

D. 考察

国内におけるウェルシュ菌食中毒は、厚生労働省の食中毒統計によると、その年により変動はあるものの年間約 20-40 件で平均約 30 件に留まり、全事例数の数%である。しかし、本菌による食中毒は 1 事例あたりの患者数が多く、患者数で見ると 10%を超え(表 4)、重大な事件となった事例が多い。この要因として、煮込み料理など大量に調理された食品が原因食品であることが挙げられる。特に食肉が関係した原因食品が多い²⁾。食肉製品は還元物質を多く含み、これらを使用した大量食品中では酸化還元電位が下がり易く、ウェルシュ菌の増殖に適した条件となるためである。

食中毒事例の原因物質の原材料に鶏肉が多く含まれている²⁾。

本菌は健康なヒトや動物の腸管内、土壌、下水などの自然界に広く常在している。食肉、特に鶏肉の本菌汚染は、食肉の生産工程における鶏の腸内容物や調理・加工中の環境からの経路が考えられる。今回 100 検体ではあるが、部位別のウェルシュ菌の検出率に大差がないことから、食肉の生産工程での汚染であると推察された。一方で、ウェルシュ菌による食中毒は、ウェルシュ菌が芽胞を形成する際に産生・放出されたエンテロトキシンにより下痢を伴った食中毒症状が引き起こされる。今回調査では、エンテロトキシン産生遺伝子を保有するウェルシュ菌は分離されなかった。しかし、パウチ法に比べ増菌培養法では検出率が低かったことなどから、使用培地や検査法について十分な検討が必要であると考えられた。

E. 結論

今回の調査では、市販の冷凍を経ない国産鶏肉 100 検体中 37 検体からウェルシュ菌が検出された。しかし、エンテロトキシン産生遺伝子を保有したウェルシュ菌は、検出されなかった。

今回使用した増菌培養法では、パウチ法に比べ検出率が低く、検査法の検討も今後の課題であると考えられた。

F. 文献

- 1) 食品衛生検査指針 微生物編 2004. 厚生労働省監修、p297-305、社団法人日本食品衛生協会、(2004).
- 2) 門間千枝、伊藤武: 食品由来感染症と食

品微生物. 仲西寿男、丸山務監修、
p380-400、中央法規出版、(2009).

H. 研究発表
なし

G. 健康危険情報
なし

I. 知的財産権の出願、登録状況
なし

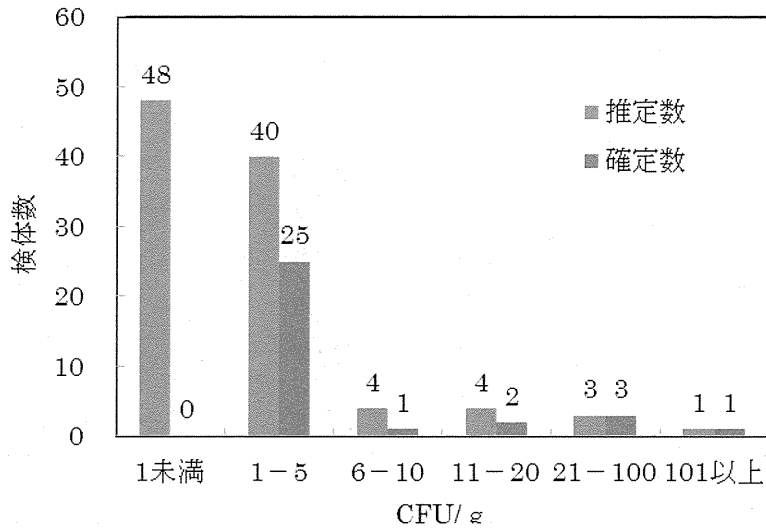


図 1. 推定ウェルシユ菌数とその確定検体数

表 1. 部位別の推定ウェルシユ菌数

部位	検査数	検体数					
		推定ウェルシユ菌数、CFU/g					
		1未満	1-5	6-10	11-20	21-100	101以上
モモ	49	25	17	4	1	1	1
ムネ	36	14	17	0	3	2	0
ササミ	12	7	5	0	0	0	0
その他	3	2	1	0	0	0	0
計	100	48	40	4	4	3	1

表 2. 部位別と検査法のウェルシユ菌陽性検体数

部位	総検体数	陽性検体数 (%)	ウェルシユ菌検出内訳			
			方法		検出内訳	
			パウチ法	増菌培養	-	+
モモ	49	18 (36.7%)	31	11	3	4
ムネ	36	15 (41.7%)	21	10	2	3
ササミ	12	4 (33.3%)	8	4	0	0
その他	3	0 (0.0%)	3	0	0	0
計	100	37	63	25	5	7

表 3. 生産地域別のウェルシュ菌検出率

生産地域	検査数	陽性検体数 (%)	方法			
			ウェルシュ菌検出内訳			
			パウチ法	—	+	—
北海道・東北	32	17 (53.1%)	15	11	3	3
近畿	17	8 (47.1%)	9	6	0	2
四国・九州	32	8 (25.0%)	24	5	1	2
産地不明国産	19	4 (21.1%)	15	3	1	0
計	100	37	63	25	5	7

表 4. 日本における平成 18 年—23 年の食中毒事例数と平成 23 年の食中毒患者数*

原因物質	事例数						患者数		
	18年	19年	20年	21年	22年	23年	23年	23年	
総数	1,491	1,289	1,369	1,048	1,254	1,062	(%)	21,616	(%)
細菌	774	732	778	536	580	543	(51.1)	10,948	(50.6)
サルモネラ	124	126	99	67	73	67	(6.3)	3,068	(14.2)
黄色ブドウ球菌	61	70	58	41	33	37	(3.5)	792	(3.7)
ウェルシュ菌	35	27	34	20	24	24	(2.3)	2,784	(12.9)
カンピロバクター	416	416	509	345	361	336	(31.6)	2,341	(10.8)
ウイルス	504	348	304	290	403	302	(28.4)	8,737	(40.4)
化学物	15	10	27	13	9	12	(1.1)	222	(1.0)
自然毒	138	113	152	92	139	69	(6.5)	171	(0.8)
その他	7	8	17	17	28	68	(6.4)	522	(2.4)
不明	53	78	91	100	95	68	(6.4)	1,016	(4.7)

*厚生労働省による食中毒統計

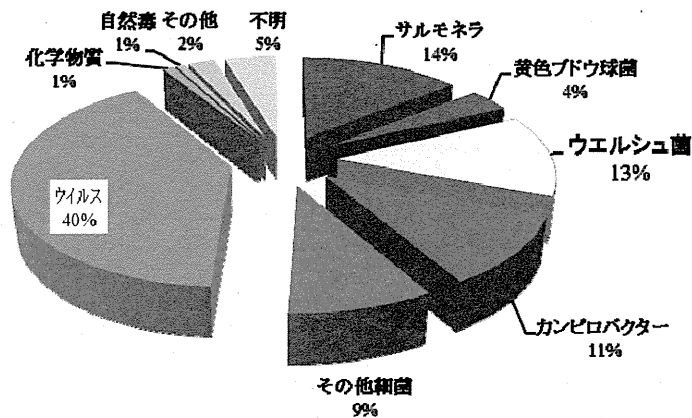


図 2. 平成 23 年に日本で発生した食中毒の原因物質別患者数

厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保推進研究事業)

地方衛生研究所のネットワーク構築班：市販鶏肉の食中毒菌汚染に関する研究
市販の国産鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況

分担研究報告書

研究分担者	齊藤志保子	秋田県健康環境センター
研究協力者	小林昭彦	さいたま市健康科学研究センター
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	林 賢一	滋賀県衛生科学センター
	堀川和美	福岡県保健環境研究所
	千葉真知子	秋田県健康環境センター
	和田恵理子	秋田県健康環境センター
	八柳 潤	秋田県健康環境センター
	熊谷優子	秋田県健康環境センター
	高橋志保	秋田県健康環境センター
	今野貴之	秋田県健康環境センター

要旨

「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」に参加する地方衛生研究所5機関において、市販の国産鶏肉を対象に各機関20検体ずつ計100検体について、サルモネラ、カンピロバクター、ウエルシュ菌、黄色ブドウ球菌の汚染実態を調査した。本報では当所が集計担当である黄色ブドウ球菌について報告する。

鶏肉100検体中47検体から黄色ブドウ球菌が分離された。肉の部位別汚染率は、ムネ肉が最も高く58.3%、次いでモモ肉46.9%、ササミは最も低く16.7%であった。生産地域による黄色ブドウ球菌の分離率に有意差はみられなかった。また、ブドウ球菌エンテロトキシン(SEs: Staphylococcal enterotoxins)については、SEs遺伝子をPCR法で検査したところ、19検体において各種SEs遺伝子保有株が検出された。

A. 研究目的

一般に流通している食品における各種食中毒菌の汚染状況等の情報は食中毒発生時の原因究明あるいは食品衛生指導等

に非常に有用と考えられる。しかし、現在、地方衛生研究所が食品の汚染実態の各種データを容易に入手できる状況にはない。このことから、食品の食中毒菌汚