

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ため、食中毒の重要な原因食品である市販の鶏肉について食中毒菌の汚染実態を調査した。本調査において、当所が黄色ブドウ球菌の集計担当であることから、黄色ブドウ球菌の汚染実態調査の結果について報告する。

## B. 研究方法

1. 検査材料 国産の非凍結市販鶏肉(モモ 49 検体、ムネ 36 検体、ササミ 12 検体、他 3 検体、計 100 検体)。地方衛生研究所 5 機関が 20 検体ずつ購入し、調査対象とした。

2. 検査期間 平成 24 年 7 月～11 月

3. 検査項目 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 4 項目とした。

### 4. 鶏肉の黄色ブドウ球菌検査方法

鶏肉 25 g をストマッカー袋に入れ、緩衝ペプトン水 (BPW) を 225mL 加えて、1 分間ストマッキング処理し 10 倍乳剤を作成した。

直接分離培養は 10 倍乳剤 0.1ml を選択分離培地 (卵黄加マンニット食塩寒天培地、卵黄加ベアード・パーカー培地、食塩卵黄寒天培地のうちいずれか) 2 枚に接種し、コンラージ棒で塗抹した。

増菌培養は 10 倍乳剤 10ml を選択増菌培地 (7.5%NaCl 加トリプトケースソイブロス) 100ml に接種し、35～37°C 24 時間培養後、1 白金耳を選択分離培地に塗布した。選択分離培地は 35～37°C で 48 時間培養した。

卵黄反応陽性の定型コロニーについて、

確認試験として、コアグララーゼ試験、クラumpingファクター試験、グラム染色を実施し、コアグララーゼ試験陽性、グラム染色陽性のブドウ状球菌を黄色ブドウ球菌と確定した。

黄色ブドウ球菌と確定された株について、ブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) 遺伝子の検出を PCR 法により実施した。標的遺伝子はブドウ球菌エンテロトキシン SEA～SEE の遺伝子、*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* とし、一部の検体については SEG, SEH, SEI の遺伝子、*seg*, *seh*, *sei* の PCR も実施した。

検査法は「食品衛生検査指針 2004 (微生物編) 厚生労働省監修」、「食品からの微生物標準試験法検討委員会 プロトコール No.NIHSJ-03 黄色ブドウ球菌試験法 最終案 091117」に準拠した。

## C. 研究結果

地方衛生研究所 5 機関において実施した鶏肉 100 検体の黄色ブドウ球菌調査結果は、表 1, 2 に示すとおり、鶏肉 100 検体中 47 検体から黄色ブドウ球菌が分離された。その陽性検体 47 検体中 34 検体 (72.3%) が増菌培養でのみ分離陽性であり、その汚染菌数は 1 以上 100 未満/g と考えられた。直接培養でも分離された検体は 13 検体であり、それらの検体の選択分離平板上の黄色ブドウ球菌コロニー数は 1 平板当たり 1～62 個であった。1 g 当たりの菌数にして  $10^2$  以上  $10^3$  未満の検体が 10 検体、 $10^3$  以上  $10^4$  未満の検体が 3 検体 ( $1.6 \times 10^3$ 、 $2.0 \times 10^3$ 、 $6.2 \times 10^3$  CFU/g) であった。表 1 に示すとおり、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。また、表 2 に示すとおり、生産地域別の分離率をみると、四国・九州地域産が 59.4%、次いで北海道・東北地域産が 43.8%、近畿地域産が 35.3%、そして生産地の記載が‘国産’であった鶏肉が 42.1%であった。生産地域別の分離率に有意差は認められなかった ( $P < 0.05$ )。

SEs 遺伝子の PCR 検査結果については表 3, 4 に示した。直接培養及び増菌培養において分離された黄色ブドウ球菌 162 株について SEs 遺伝子の保有を検索したところ 60 株 (37.0%) で SEs 遺伝子が確認された。表中の ET 型の “/” は同一株から複数の型の SEs 遺伝子が確認されたことを示し、例えば A/B は SEA (*sea*) と SEB (*seb*) の二つを同時に保有する株であったことを示す。単独の SEs 遺伝子を保有する株は 20 株であったが、2 種以上の複数の SEs 遺伝子を保有する株は 40 株と単独 SEs 遺伝子保有株の 2 倍認められた。

検体としては黄色ブドウ球菌分離陽性 47 検体中 SEs 遺伝子保有株が分離された検体は 19 検体 (40.4%) であった。同一検体において単独、複数を含め同じ型の SEs 遺伝子保有株が検出された場合が多かったが、異なる株、例えば A, G/I のように SEA (*sea*) 単独保有株と SEG (*seg*) と SEI (*sei*) 両保有株が同一検体から検出された例など、異なる種類の SEs 遺伝子を保有する株が同時に検出された検体が 3 検体認められた。

#### D. 考察

黄色ブドウ球菌の食中毒事例の原因としては人に定着しているブドウ球菌が重要とされているが、今回鶏肉においても黄色ブドウ球菌の汚染率が 47% と非常に高率であることが確認された。鶏肉部位別では汚染率に差がみられたが、食鳥処理行程における汚染を反映しているものと考えられた。汚染菌数は本調査では 1 g 当たりの汚染菌数が  $10^2$  個未満の検体が多く、最も高濃度の検体でも  $6.2 \times 10^3$  であった。しかし、鶏肉における高率な汚染は、不適切な取り扱いにより、食中毒の原因となる可能性を有することから、その取り扱いなどにさらなる注意喚起が必要と考えられた。また、人に定着している黄色ブドウ球菌の感染源が鶏肉等の食品である可能性も考えられる。

ブドウ球菌食中毒の原因毒素である SEs については、SEA, SEB, SEC, SED, SEE がブドウ球菌食中毒原因の 95% とされているが、近年 SEA~SEE 以外の新しい型が報告されている。今回は検体・分離株の一部について新型の SEG (*seg*)、SEH (*seh*)、SEI (*sei*) について検索したが、その保有株が確認された。今後新しい型についてもその食中毒への関与も含めて分離株の保有状況を把握する必要があると考えられる。

#### E. 結論

今回の調査により鶏肉における黄色ブドウ球菌の高率な汚染実態を示すデータが得られ、また、鶏肉が SEs 遺伝子保有黄色ブドウ球菌により汚染されていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

なし

H. 知的財産権の出願。登録状況

G. 研究発表

なし

表1 部位別黄色ブドウ球菌分離成績

鶏肉部位名	検体数	黄色ブドウ球菌検査結果						SEs陽性検体数
		陰性 (<1/g) 検体数	陽性 (1 ≤ /g) 検体数, 陽性率	陽性検体内訳: CFU/g				
				増菌培養のみ陽性	直接・増菌培養陽性			
				1 ~ 10 <sup>2</sup> 未満	10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>3</sup> 未満	10 <sup>3</sup> ~ 10 <sup>4</sup> 未満		
モモ	49	26	23 46.9%	14	7	2	7	
ムネ	36	15	21 58.3%	17	3	1	10	
ササミ	12	10	2 16.7%	2	0	0	1	
その他	3	2	1 33.3%	1	0	0	1	
小計		53	47	34	10	3	19	
合計	100	100		47				

表2 生産地域別黄色ブドウ球菌分離成績

生産地域名	検体数	黄色ブドウ球菌検査結果						SEs陽性検体数
		陰性 (<1/g) 検体数	陽性 (1 ≤ /g) 検体数, 陽性率	陽性検体内訳: CFU/g				
				増菌培養のみ陽性	直接・増菌培養陽性			
				1 ~ 10 <sup>2</sup> 未満	10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>3</sup> 未満	10 <sup>3</sup> ~ 10 <sup>4</sup> 未満		
北海道・東北	32	18	14 43.8%	13	1	0	2	
近畿	17	11	6 35.3%	6	0	0	4	
四国・九州	32	13	19 59.4%	11	5	3	10	
国産	19	11	8 42.1%	4	4	0	3	
小計		53	47	34	10	3	19	
合計	100	100		47				

表3 分離株のSEs遺伝子保有試験結果

ET型	株数	計
A	11	20
B	1	
C	8	
D	0	
E	0	
A/B	15	40
A/C	6	
C/G/I	8	
G/I	11	
小計	60	60
未保有	102	
合計	162	

\* G,H,Iについては162株中、39株についてのみ検査実施。

表4 SEs遺伝子保有株陽性検体数

ET型	検体数	(%)
A	4	8.5
B	0	0.0
C	4	8.5
D	0	0.0
E	0	0.0
A/B	5	10.6
A/C	1	2.1
C/G/I	1	2.1
G/I	1	2.1
A, G/I	1	2.1
B, A/B	1	2.1
C, G/I	1	2.1
小計	19	40.4
未保有	28	59.6
計	47	100.0

\* G,H,Iについては分離陽性47検体中、8検体についてのみ検査実施。

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)

市販の国産鶏肉における *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の汚染状況に関する研究  
分担研究報告書

研究分担者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所

研究協力者 齋藤志保子 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  
堀川和美 福岡県保健環境研究所  
相川勝弘 神奈川県衛生研究所  
渡辺祐子 神奈川県衛生研究所  
古川一郎 神奈川県衛生研究所  
石原ともえ 神奈川県衛生研究所

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)において市販の国産非冷凍鶏肉における *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* の汚染状況を調査した。各地研でそれぞれ20検体ずつ、合わせて100検体の鶏肉から増菌培養とこれに続く選択寒天平板培地での培養により *Campylobacter* の分離を行った。*C. jejuni* は65検体(65%)、*C. coli* は13検体(13%)、合わせて71検体(71%)からいずれかの菌種が分離された。鶏肉の部位別及び産地別の汚染率はいずれも高く、有意差はなかった。

A. 研究目的

食品中の食中毒菌を調査・解析し、その汚染実態や分離菌の解析結果を有効活用するためのデータベースを作成することが、「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」に関する本研究の目的の一つである。そこで、その基礎的データを作成するために、鶏肉におけ

る食中毒菌の汚染実態調査を実施した。

*Salmonella* 属菌、*Campylobacter jejuni/coli*、ウェルシュ菌及び黄色ブドウ球菌を対象として参加地方衛生研究所が市販の鶏肉からの検出を試み、神奈川県衛生研究所は *Campylobacter jejuni/coli* の取りまとめを担当した。

## B.研究方法

### 1. 鶏肉

研究に参加している地方衛生研究所 5 機関が、平成 24 年 7 月 22 日から 10 月 29 日に各機関 20 検体ずつ購入した国産の非冷凍鶏肉（モモ、ムネおよびササミ等）、合わせて 100 検体を調査対象とした。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しなかった。

### 2. 培養

検体 25 g を滅菌したハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取した。ストマックカー袋に入れ、100 ml のプレストン増菌培地を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。ストマッキング処理後、微好気条件下（窒素 85%、二酸化炭素 10%、酸素 5%）で  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  で 48 時間増菌培養した。

微好気条件は下記のいずれかの方法で実施した。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。
- ② 市販の微好気ジャーシステム（ガスケットシステムなど）を利用する。
- ③ 通気性のない材質の容器または袋を使用し、これに増菌培養液を直接入れた後、密閉し通常のインキュベータで培養する。

増菌培養した培養液の 1 白金耳を mCCDA 培地およびバツラー培地に画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 48 時間微好気培養した。培養後、選択分離培地上に発育した *Campylobacter jejuni/coli* を疑う集落を 1 平板につき 2~5 個釣菌し、非選択性寒天平板培地に塗抹し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $22 \pm 2$  時間、微好気条件下で培養した。寒天平板培地の

培養に用いた微好気条件は増菌培養と同様にした。

### 3. *Campylobacter jejuni/coli* の鑑別同定

*C. jejuni/coli* を疑う集落について、グラム染色、カタラーゼ試験およびオキシダーゼ試験を実施し、らせん状または球状のグラム陰性桿菌、カタラーゼ陽性およびオキシダーゼ陽性の集落を選択した。菌種の決定には、以下の試験を実施した。

- ① 馬尿酸塩加水分解試験
- ② インドキシル酢酸塩加水分解試験
- ③ PCR 法による *C. jejuni* および *C. coli* の判別

PCR 法による *C. jejuni* および *C. coli* の判別は、5 機関の地方衛生研究所において通常利用している市販のキットあるいは既報のプライマーを用いた PCR システムにより行った。

菌種が決定した菌株については、追加試験を実施することになった場合等のために、非選択性培地で培養した菌を 10% スキムミルクに懸濁させ、 $-80 \sim -35^\circ\text{C}$  で保存した。

## C.研究結果

5 機関の地方衛生研究所において、それぞれ 20 検体の鶏肉計 100 検体を対象として *C. jejuni* あるいは *C. coli* の検出を試みたところ、分離された鶏肉は 71 検体であり、市販されている国産鶏肉の 71% が *C. jejuni* あるいは *C. coli* に汚染されていた。菌種別の分離率は、*C. jejuni* が 65%、*C. coli* が 13% となっており *C. jejuni* の汚染率が *C. coli* よりの高かった。同一検体から

*C. jejuni*および*C. coli*の両菌種が分離された検体は7検体(7%)であった。*C. lari*が1検体(モモ)から検出された。

鶏肉の部位別の*Campylobacter*の分離結果を表1に示した。鶏肉の部位別の*C. jejuni*あるいは*C. coli*が分離された割合は、ムネ80.6%、ササミ75.0%、モモ63.3%の順で分離率が高く、3部位以外では3検体中2検体で汚染が認められた。菌種別の分離率は、いずれの部位でも*C. jejuni*のほうが*C. coli*よりも分離率が高かった。モモおよびムネでは、同一検体から*C. jejuni*および*C. coli*の両菌種が分離された検体も確認されたが、ササミおよびその他の部位では、分離された菌種はすべて*C. jejuni*であった。

鶏肉の産地を北海道・東北、近畿、四国・九州および表示に産地の表示がなかった国産品に分けた場合の地域別の*Campylobacter*の分離結果を表2に示した。鶏肉の産地の地域別の*C. jejuni*あるいは*C. coli*が分離された割合は、62.5%から82.4%で、菌種別の分離率ではいずれの地域でも*C. jejuni*のほうが*C. coli*よりも分離率が高かった。

$\chi^2$ 検定により部位別及び産地の地域別の分離率を比較したところ、有意差は得られなかった。

#### D. 考察

5機関の地方衛生研究所において統一した分離方法を用い、市販の国産非冷凍鶏肉を対象にして*C. jejuni/coli*の汚染調査を行った。今回の調査では国産の市販鶏肉の71%が*C. jejuni*あるいは*C. coli*に汚染されていることが確認され、各機関ともに高い

汚染率が得られた。さらに鶏肉の部位別の汚染率は、ムネ、モモ、ササミおよび3部位以外のいずれにおいても60%以上を示した。菌種別に見ると、*C. jejuni*は部位別で53.1~77.8%となり、*C. coli*と比較して高い汚染率を示し、全体では65.0%であった。*C. coli*のモモおよびムネにおける汚染率は、それぞれ16.3%および13.9%であったが、ササミおよびその他の部位では分離されず、全検体における汚染率は13.0%であった。ササミおよびその他の部位については、調査した検体数はそれぞれ12検体および3検体と数が少なかったことから、これらの部位における正確な汚染率の把握にはより多くの検体を調査する必要がある。*C. coli*が分離された13検体については、半数以上の7検体から*C. jejuni*が分離されており、本研究では各検体から2~5菌株を分離したが、*C. coli*の分離率が低かったのは釣菌数が少なかったことが関連していることも推定されることから、菌種別の汚染率について詳細な解析を可能にするにはより多くの菌株を釣菌することが必要であると思われる。鶏肉の産地を北海道・東北、近畿、四国・九州および国産に区分した解析でも、地域別の汚染率に有意差はなく、国内に流通する国産鶏肉については、産地あるいは部位別にかかわらずその50%以上が*Campylobacter*に汚染されており、特に*C. jejuni*の汚染率が高いことが確認された。

*C. jejuni/coli*は細菌性食中毒の中ではもっとも事例数が多く、厚生労働省の統計では平成19~23年の5年間の発生件数は年間336~509件であり、患者数も年間2,092~3,071名となっている。原因食品としてもっとも重要である鶏肉については、

*Campylobacter*に関する数多くの調査が報告されており、国産鶏肉は高い汚染率であることが知られている。今回の調査でも、市販鶏肉が高率に汚染されているという結果が得られた。さらに、患者および鶏肉からの分離菌株については、薬剤耐性菌の割合が高いことが指摘されていることから、鶏肉の汚染率ならびに分離菌株の解析を今後も定期的実施する必要がある。

今回の鶏肉における食中毒原因菌の汚染実態調査では、*C. jejuni/coli*に高率に汚染されている実態が改めて明らかになった。市販の国産鶏肉における*C. jejuni/coli*による汚染に関する多くの調査がこれまでに実施されており、2000～2011年に報告された調査においても高い汚染率が報告されている。表3に国内で実施された鶏肉類の*C. jejuni/coli*の汚染実態調査の結果をまとめた。*C. jejuni/coli*として調査した事例では、汚染率は10.0～100%と幅があり、鶏肉類の種類別では肝や砂肝の汚染率がやや高い傾向がみられる。また、生食用として提供される鶏肉でも10.3～53.8%に汚染がみられたことは注目される。*C. jejuni*と*C. coli*を鑑別して実施した調査では、*C. jejuni*の汚染率は20～85.4%に対して、*C. coli*は0～33.3%であり、*C. jejuni*の汚染率が高いことが示されている。今回の調査でも、*C. jejuni*が65検体(65%)、*C. coli*が13検体(13%)から検出され、同様の傾向が示された。

今回実施した調査では、鶏肉の部位別あるいは産地別の汚染率には有意差がみられなかった。鶏肉における*C. jejuni/coli*の汚染調査においては検出法により検出率が異なることが知られている。表3に挙げた調

査結果では、培養法においては使用された培地が異なり、さらに一部の調査では*Campylobacter jejuni/coli*の検出に遺伝学的手法が用いられていた。今回の調査では、参加した5機関が統一した方法で調査を実施したことで、部位別や産地別の汚染率に差がみられず、いずれの部位あるいは産地の鶏肉であっても高い汚染率であることが示された。

表4には、鶏肉類における*C. jejuni/coli*の汚染菌量の報告事例を挙げた。市販の鶏肉類では汚染率が高いことに加えて、汚染菌量は10MPN/100g以下の鶏肉類があるものの、 $10^3$ MPN/100gを示した鶏肉も多く、さらに $10^3$ MPN/100gを超える菌に汚染されている鶏肉類も決して少なくないことが示されている。*C. jejuni/coli*の感染菌量は100個程度とされており、比較的少数の菌により感染が成立する可能性があり、鶏肉を介して*C. jejuni/coli*に感染するリスクが高いことが推測される。

今年度の研究においては、鶏肉における食中毒原因菌の汚染状況調査を実施し、ライブラリーシステム構築のための基礎的データの蓄積を行った。今後は、このような調査において得られた菌株を対象にして型別などの詳細な解析を行い、そのデータを公表して食中毒や感染症の解明や予防に役立てることが重要である。その場合、鶏肉などの食品から食中毒原因菌が分離されたときに、食中毒の原因食品や感染経路の解明、患者分離株の解析といった疫学的解析にデータを利用するには、有用性の高い型別法から得られる結果が公表されることが求められる。*Campylobacter*の型別法としては、血清型別(Lior法及びPenner法)



や薬剤耐性パターンによる型別 (antimicrobial resistotyping) があり、遺伝学的手法を用いた型別法として Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)法、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、リボタイピング、Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)法、Multilocus sequence typing (MLST)法、*fla* typing 法、Single Nucleotide Polymorphism (SNP : 一塩基多型)解析法がある。

血清型別法のうち、Lior 法は *Campylobacter* の易熱性抗原を対象にして型別する方法である。Penner 法は、耐熱性抗原を対象にし、血球凝集法により型別する。血清型別法は簡単な操作で型別を実施できる方法であるが、*Campylobacter* の場合、型別不能となる株が比較的多いことが課題となっている。薬剤耐性パターンによる型別は、薬剤感受性を測定し、得られた耐性パターンにより型別する方法である。

*Campylobacter* での利用も報告されている。

遺伝子型別法は、菌が持つ遺伝子を対象にした遺伝学的手法を応用して型別する方法である。このうち、PFGE 法、RFLP 法及びリボタイピングは制限酵素により切断した断片の解析に基づいている。AFLP 法と RAPD 法は、ターゲット遺伝子の PCR 法による増幅を利用している。MLST 法、*fla* typing 及び SNP 法は塩基配列の多様性に注目し、これにより型別を行う方法である。

PFGE 法は、制限酵素で菌の全遺伝子を対象にして切断し、その断片を分離したパターンにより型別を行う。DNA の切断パ

ターンを菌株の識別に用いる。PFGE 法はこのパターンを比較する方法であるため、その再現性には手法の標準化が必要である。RFLP 法は、ゲノム染色体を制限酵素で消化し、電気泳動後にハイブリダイゼーションを行い、得られたバンドパターンにより型別を行う。リボタイピングはリボゾーム RNA の塩基配列の相違に基づいて型別を行う。自動化されたシステムもあるが、型別のための多様性が小さい一方で、実施には経費がかかるため、あまり利用されていない。AFLP 法は、ゲノム染色体を制限酵素で消化し、得られたすべての断片にアダプター配列を結合させ、アダプターに相補的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、得られたバンドパターンを比較する。高い識別能があるとされている。RAPD 法は、菌のゲノム染色体に対してプライマーセット (ランダムな配列の短めのプライマーの組み合わせ) を用いて PCR 法により増幅を行い、産物の泳動パターンにより型別を行う。実施は比較的容易であるが、再現性に課題がある。MLST 法は、菌が持つ 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*aspA*、*glnA*、*gltA*、*glyA*、*pgm*、*tkt*、*uncA*) の点変異に基づいて型別する。MLST 法は再現性に優れ、標準化された解析法、データベース及び命名法はインターネット上で公開されている。解析結果を専用サイトに入力すると一致する ST 番号が即座に示される。MLST 法は系統解析に適しているが、菌株の識別能力に限界があるとされている。*fla* typing 法は、*Campylobacter* の flagellin をコードしている *fla* 遺伝子の多型を利用している。PCR-RFLP 法を用いた解析や塩基配列解析により型別が行われる。再現性は良いが、

識別能が課題とされている。SNPはゲノム塩基の配列中にある1塩基の変異による多型のことで、特定の遺伝子座にある1塩基の変異による多様性が型別に利用される。

いずれの型別法を用いた結果をデータベース化するかの検討においては、型別法の再現性、識別能、操作性、経済性といった項目が挙げられる。このうち、情報の共有化においては再現性が非常に重要となる。遺伝子型別法では、フラグメント解析であるPFGE法は識別能力は優れているものの解析結果の再現性、さらにデータの互換性に課題がある。これは遺伝子解析法のなかでもフラグメント解析法の持つ共通した問題点である。この問題の解決には、手法を標準化することで研究室・実験室間で型別結果を比較することが可能となる。これに対して、MLST法などの塩基配列解析は、データの比較や情報の共有化が容易である。実際に、MLST法による型別のデータはネット上でデータベース化され、広く利用されている。今後、十分な検討が必要であるが、*Campylobacter*に関する型別データのデータベースの構築とその公開には、再現性やデータ互換性に優れた塩基配列解析法を主体としたシステムが適していると考えられる。

#### E. 結論

市販の国産鶏肉 100 検体を対象に、*C. jejuni/coli* の汚染状況を調べたところ、71 検体 (71.0%) から検出され、菌種の内訳は *C. jejuni* が 65 検体 (65%)、*C. coli* が 13 検体 (13%) であった。鶏肉の部位別あるいは産地別の汚染率には有意差はみられ

なかった。これまでに、鶏肉は高率に *Campylobacter* に汚染されていることが報告されているが、今回の調査でも、市販の国産鶏肉は *C. jejuni/coli* に高い割合で汚染されていることを改めて示すことができた。

#### F. 参考文献

1. 安藤陽子、小野一晃、小林留美子ほか：市販鶏肉の細菌汚染調査、埼玉県衛生研究所報、36, 80-82, 2003.
2. 伊達佳美、浅井良夫、古川一郎ほか：凍結鶏肉からのカンピロバクター検出のための選択培地に関する検討、神奈川県衛生研究所研究報告、39, 4-7, 2009.
3. Fukushima H., Katsube K., Hata Y., et al.: Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1, 92-100, 2007.
4. 古川一郎、伊達佳美、相川勝弘ほか：市販鶏肉におけるカンピロバクター・ジェジュニの汚染状況および分離菌株の解析、神奈川県衛生研究所研究報告、37, 24-27, 2007.
5. 古田宗宜、小田隆弘、樋脇弘ほか：市販鶏肉類における *Campylobacter jejuni/coli*、*Salmonella* ならびに糞便系大腸菌群の汚染状況の関係、日本食品微生物学会雑誌、27, 200-205, 2010.
6. 古畑勝則、柿本将平、百田隆祥ほか：LAMP 法および培養法による市販鶏肉からのカンピロバクターの検出比較、

- 日本食品微生物学会雑誌、23, 4, 237-241, 2006.
7. 堀田剛、深江弘恵、大浦裕子ほか：鶏肉における *Campylobacter*、*Salmonella* の汚染状況および汚染鶏肉と食中毒との関連について、宮崎県衛生環境研究所年報、21, 64-70, 2010.
  8. 石村勝之、吉野谷進、下村佳ほか：鶏肉からのカンピロバクターの定量および定性検査法の有効性評価、広島市衛生研年報、25, 44-46, 2006.
  9. 川森文彦、有田世乃、西尾智裕ほか：カンピロバクターの生態および検出方法に関する研究、静岡県環境衛生科学研究所報告、45, 5-11, 2002.
  10. 川森文彦、柏木美智子、佐野世乃ほか：カンピロバクターの菌数測定法の検討および食品におけるカンピロバクター汚染実態調査-リアルタイム PCR法による *Campylobacter jejuni* の菌数測定、静岡県環境衛生科学研究所報告、46, 1-6, 2003.
  11. 国井悦子、下村佳、古田喜美ほか：鶏肉のカンピロバクター培養検査法の検討 - 鶏肉の検査方法別検出感度および検出率の比較 -、広島市衛生研究所年報、24, 49-54, 2005.
  12. 杉岡由美子、丸住美都里、森田美加ほか：鶏肉のカンピロバクター汚染状況と加熱(湯引きなど)による菌数の変化について、熊本市環境総合研究所報、13, 37-39, 2006.
  13. 森田幸雄、壁谷英則、丸山総一ほか：市販鶏ひき肉における *Arcobacter*、*Campylobacter* および *Salmonella* の汚染状況、日本獣医師会誌、56, 401-405, 2003.
  14. 永田暁洋、山崎史子、石畝 史ほか：福井県の市販鶏肉から分離されたサルモネラおよびカンピロバクター (2007~2010)、福井県衛生環境研究センター年報、9, 89-92, 2010.
  15. 小野一晃、安藤陽子、尾関由姫恵ほか：試験管培養法による鶏肉からのカンピロバクター分離法の検討-微好気条件の有無による菌分離率の比較-、日本食品微生物学会雑誌、22, 116-119, 2005.
  16. 小野一晃、安藤陽子、川森文彦ほか：冷凍保存鶏肉における *Campylobacter jejuni* の生存性とパルスフィールド・ゲル電気泳動法による分離菌株の遺伝子解析、日本食品微生物学会雑誌、22, 59-65, 2005.
  17. 小野一晃、安藤陽子、重茂克彦、品川邦汎. MPN 法及び直接平板塗抹法による市販鶏レバーのカンピロバクターの定量検査. 日本獣医師会誌. 55, 447-449, 2002.
  18. 小野一晃、斎藤章暢、土井りえほか：市販鶏肉のカンピロバクターの定量検査と RAPD 法による遺伝子型別、埼玉県衛生研究所報、35, 59-62, 2001.
  19. 小野一晃、斎藤志保子、川森文彦ほか：市販鶏肉におけるカンピロバクターの定量検査と分離菌株の血清型、日本獣医師会誌、57, 595-598, 2004.
  20. 小野一晃、辻りえ、安藤陽子ほか：国産および輸入鶏肉におけるカンピロバクターの汚染状況、日本獣医師会誌、56, 103-105, 2003.
  21. 齊藤志保子、八柳潤、佐藤晴美ほか：

- 薬剤耐性菌の浸淫実態解明に関する調査研究(平成 12 年度～平成 14 年度)、秋田県衛生科学研究所報、47, 24-29, 2003.
22. Saito, S., Yatsuyanagi, J., Harata, S., et al.: *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile, and human diarrheal samples in Japan: comparison of serotypes and genotypes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 45, 311-319, 2005.
23. 坂本裕敬、井原光紀、藤本美香ほか：鶏肉におけるカンピロバクター及びサルモネラの感染状況、広島県獣医学会雑誌、21, 61-63, 2006.
24. 佐野達哉、小嶋由香、荻本直輝ほか：鶏肉からのカンピロバクター検出における増菌培養法の検討、川崎市衛生研究所報、45, 49-50, 2009.
25. 清水美和子、磯部順子、木全恵子ほか：富山県におけるカンピロバクター分離状況(2005 年)、富山県衛生研究所年報、29, 174-177, 2006.
26. 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、129, 118-128, 2011.
27. 多田芽生、砂原千寿子、多田千鶴子ほか：鶏肉における *Campylobacter* および *Salmonella* の汚染状況、香川県環境保健研究センター所報、3, 187-190, 2004.
28. 辻澤恵都子、金澤祐子、岩崎恵子ほか：市販鶏肉のサルモネラ、カンピロバクター、腸球菌による汚染状況調査、和歌山市衛生研究所報、12, 108-114, 2000.
29. 渡邊節、川野みち、小林妙子ほか：市販食肉等からのカンピロバクター検出と低温保存での菌消長、宮城県保健環境センター年報、23, 98-101, 2005.
30. 渡邊節、菅原直子、小林妙子ほか：鶏肉からの効率的なカンピロバクターの分離の検討と分離菌の性状、宮城県保健環境センター年報、24, 117-120, 2006.
31. 横山敬子：カンピロバクター食中毒の発生状況、日本食品微生物学会雑誌、23, 109-113, 2006.
- G.健康危険情報  
なし
- H.研究発表  
なし
- I.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
なし

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  
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  
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  
研究報告書

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
研究協力者 白石理奈 さいたま市健康科学研究センター  
加藤直樹 さいたま市健康科学研究センター  
小田切正昭 さいたま市健康科学研究センター  
小林昭彦 さいたま市健康科学研究センター

「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、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター、ウェルシュ菌並びにサルモネラの汚染実態について調査した。本稿では、当所の調査結果について報告する。

鶏肉 20 検体中 17 検体（85.0%）から食中毒菌が検出された。項目別汚染率は、黄色ブドウ球菌が最も高く、65.0%（黄色ブドウ球菌エンテロトキシン（以下、SEs）遺伝子陽性は、35.0%）。次いで、カンピロバクターが 50.0%。ウェルシュ菌が 35.0%（エンテロトキシン（以下、ET）遺伝子は、全て陰性）、サルモネラが 30.0%であった。

今後は、このような調査において得られた菌株を対象にして詳細な解析を行い、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、食品中の有害微生物の科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関と地方衛生研究所の間で効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することが重要である。

#### 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、黄色ブドウ球菌、カンピロバク

ター、ウェルシュ菌並びにサルモネラである。本稿では、当市における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 9 月 10 日～10 月 29 日の間に、国産の凍結されていない市販鶏肉を 20 検体（ムネ肉 11 検体、モモ肉 9 検体）を購入し調査対象とした。なお、購入店舗数は複数とし、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. 検査方法

### (1) 黄色ブドウ球菌

食品衛生検査指針 2004 (微生物編) 厚生労働省監修、標準試験法 NIHSJ-03 最終案 091117 に準拠して行った。以下、具体的に示す。

検体 25 g をストマッカー袋に入れ、BPW を 225mL 加えて、1 分間ストマッキング処理し、10 倍乳剤を作製した。

直接分離培養は 10 倍乳剤 0.1ml を卵黄加マンニット食塩寒天培地 (以下、MN 培地) 2 枚に接種し、コンラージ棒で塗抹した。

増菌培養は 10 倍乳剤 10ml を選択増菌培地 (7.5%NaCl 加トリプトケースソイブロス) 100ml に接種し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養後、1 白金耳を MN 培地に塗抹した。MN 培地は  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。

各分離平板培地より定型的集落を 1~3 個ずつ釣菌し、確認試験を実施した。コアグララーゼ試験陽性、クランピングファクター試験陽性、並びにグラム染色陽性のブドウ状球菌を黄色ブドウ球菌と同定した。

黄色ブドウ球菌と同定された菌株について、SEs 遺伝子の検出を PCR 法により実施した。標的遺伝子はブドウ球菌エンテロトキシン SEA~SEE の遺伝子、*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* とした。

### (2) カンピロバクター

標準試験法 NIHSJ-02-ST4:2012 (Draft 120731) に準拠して行った。以下、具体的に示す。

検体 25 g をストマッカー袋に入れ、100 ml のプレストン増菌培地を加え、1 分間ストマッキング処理した後、微好気条件下で  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 48 時間増菌培養した。培養液の 1 白金耳を mCCDA 培地及びバツラー培

地に画線塗抹し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 48 時間微好気培養した。培養後、各分離平板培地より定型的集落を 1~5 個ずつ釣菌し、血液寒天培地及びミューラー・ヒントン培地に塗抹し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 48 時間微好気培養した。

培養後、鑑別同定を実施し、らせん状または球状のグラム陰性桿菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性並びにラテックス凝集反応陽性をカンピロバクターと同定した。菌種の決定には、馬尿酸塩加水分解試験、インドキシル酢酸塩加水分解試験、PCR 法を実施した。

### (3) ウェルシュ菌

食品衛生検査指針 2004 (微生物編) に準拠して行った。以下、具体的に示す。

検体 25 g をストマッカー袋に入れ、BPW を 225mL 加えて、1 分間ストマッキング処理し、10 倍乳剤を作製した。また、更に BPW 90ml で 10 倍段階希釈した。

直接分離培養は、各希釈段階について 2 枚の PT パウチ中に、それぞれ 10ml ずつ入れ、ハンドフォード改良培地を 15ml 加えた。その後密封し、 $46\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 22~26 時間培養した。培養後、定型的集落を 1 検体につき 1~5 個釣菌して、カナマイシン含有 CW 寒天培地 (以下、KCW 培地) に塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間嫌気培養した。

増菌培養は 10 倍乳剤 1ml をクックドミート培地 10ml に接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間嫌気培養後、1 白金耳を KCW 培地に塗抹した。KCW 培地は  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間嫌気培養した。

分離平板培地より定型的集落を 1~3 個釣菌し、確認試験を実施した。グラム陽性、好気培養試験陰性、乳糖分解試験陽性、

ゼラチン分解試験陽性、運動性試験陰性並びに硝酸塩還元試験陽性をウェルシュ菌と同定した。

ウェルシュ菌と同定された菌株について、ET 遺伝子の検出を PCR 法により実施した。

#### (4) サルモネラ

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°C 対応) に準拠して行った。以下、具体的に示す。

検体 25g をストマッカー袋に入れ、緩衝ペプトン水 (以下、BPW) 225ml を加え、1 分間ストマッキング処理した後、35±1°C で 22±2 時間、前増菌した。その前培養液 1.0ml をテトラチオネート培地 10ml に、培養液 0.1ml をラパポートバシリアデイス培地 10ml に接種し、42±0.5°C で 22±2 時間培養した。

1 白金耳量を 2 種類の分離平板培地 DHL 寒天培地及び ES サルモネラ II 寒天培地に画線塗抹し、35±1°C で 22±2 時間培養した。培養後、各分離平板培地より定型的集落を 1~3 個ずつ釣菌し、生化学的性状試験を行い、TSI 培地で高層部黄変・黒変・ガス産生および斜面部赤変、かつ、LIM 培地でリジン陽性、インドール陰性、運動性陽性を定型的なサルモネラと同定した。また、非定型的な性状を示すサルモネラが疑われる場合には、更に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。

#### C. 研究結果

鶏肉の食中毒菌汚染実態調査結果は表に示すとおり、20 検体中 17 検体 (85.0%) からいずれかの食中毒菌が分離された。

黄色ブドウ球菌は、13 検体 (65.0%) から検出した。そのうち 7 検体 (35.0%) が、SEs 遺伝子陽性であった。SEs 遺伝子型の内訳は、SEA 単独保有が 1 検体、SEA 及び SEB の 2 種類保有が 6 検体であった。

カンピロバクターは、10 検体 (50.0%) から検出し、菌種の内訳は、*C. jejuni* 9 検体、*C. jejuni* 及び *C. coli* 1 検体であった。部位別検出数は、ムネ肉が 8 検体 (73.0%)、モモ肉が 2 検体 (22.0%) であった。

ウェルシュ菌は、7 検体 (35.0%) から検出した。ウェルシュ菌では、ET 遺伝子陽性株は、分離されなかった。

サルモネラは、7 検体 (30.0%) から検出し、血清型の内訳は、Manhattan (O8 群) 3 検体、Infantis (O7 群) 2 検体、Schwarzengrund (O4 群) 1 検体、不明 1 検体であった。肉の部位別検出数は、ムネ肉が 3 検体 (27.0%)、モモ肉が 4 検体 (44.0%) であった。

#### D. 考察

今回調査した 4 項目による食中毒は、鶏肉が関係している原因食品が多い。今回の調査結果からも、市販鶏肉が食中毒菌に高率に汚染されているという結果が得られた。

また、カンピロバクター及びサルモネラについては、部位による検出率の差が認められたが、今回の検体数は 20 検体と少ないため、今後正確な汚染率の把握にはより多くの検体を調査する必要があると考えられた。

鶏肉における高率な食中毒菌汚染は、不適切な取り扱いにより、食中毒の原因となる可能性を有することから、その取り扱いに更なる注意喚起が必要と考えられた。

今後は、このような調査において得られた菌株を対象にして詳細な解析を行い、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、食品中の有害微生物の科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関と地方衛生研究所の間で効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することが重要である。

#### E. 結論

今回の調査により、鶏肉における食中毒菌の高率な汚染実態を示す資料が得られた。

今後、今回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。

H. 知的財産権の出願。登録状況  
なし

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
なし

表 検査結果

番号	部位	サルモネラ		カンピロバクター		ウェルシュ菌				黄色ブドウ球菌					
		成績	血清型	成績	菌種	直接		増菌		直接		増菌			
						推定菌数	成績	ET遺伝子	成績	ET遺伝子	推定菌数	成績	SEs遺伝子	成績	SEs遺伝子
1	ムネ	-		+	C.jejuni	1/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	+	A,B
2	モモ	-		-		2/g	-	-	-	-	150/g	+	A,B	+	A,B
3	ムネ	-		+	C.jejuni	1/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
4	モモ	-		+	C.jejuni	2/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	+	-
5	ムネ	-		+	C.jejuni,C.coli	5/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	+	-
6	モモ	+	Manhattan	-		1未満/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
7	ムネ	+	Infantis	+	C.jejuni	2/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
8	モモ	+	Infantis	-		10/g	+	-	+	-	100未満/g	-	-	-	-
9	モモ	-		-		1/g	-	-	-	-	6.2 × 10 <sup>3</sup> /g	+	-	+	-
10	ムネ	-		-		1未満/g	-	-	-	-	1.6 × 10 <sup>3</sup> /g	+	-	+	-
11	ムネ	-		-		1/g	-	-	-	-	1.0 × 10 <sup>2</sup> /g	+	-	+	A,B
12	モモ	-		-		1/g	-	-	-	-	2.0 × 10 <sup>3</sup> /g	+	A,B	+	A,B
13	ムネ	+	Manhattan	+	C.jejuni	2/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	+	-
14	ムネ	-		+	C.jejuni	4/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
15	モモ	-		+	C.jejuni	1/g	+	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
16	ムネ	+	Manhattan	+	C.jejuni	1未満/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	+	A,B
17	モモ	+	Schwarzengrund	-		1未満/g	-	-	-	-	7.0 × 10 <sup>2</sup> /g	+	A,B	+	A,B
18	ムネ	-		-		19/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	-	-
19	モモ	+	O:UT,H:r,1	-		1未満/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	+	A
20	ムネ	-		+	C.jejuni	4/g	-	-	-	-	100未満/g	-	-	+	-
検出率(%)		30		50		35(ET遺伝子陽性 0)		5(ET遺伝子陽性 0)		30(SEs陽性 15)		65(SEs陽性 35)			



### 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	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lee, K., French, N. P., Jones, G., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S.	Variation in stress-resistance patterns among stx genotypes and genetic lineages in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O157.	Appl. Environ. Microbiol	78	3361-3368	2012
Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S.	Characteristics of a sharp decrease in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> infections and seafood contamination in Japan.	Int. J. Food Microbiol	157	95-101	2012
H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe, A. Kai, T. Kurazono, M. Taguchi, T. Asai, M. Akiba, Y. Matsumoto, and Y. Tamura	Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg. Infect. Dis	in press		
M. Watanabe, T. Yonezawa, Y. Sugita-Konishi and Y. Kamata.	Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing <i>Fusarium</i> species for predicting their mycotoxin producing potential.	Food additives and contaminants.	in press		
八木田 健司	ザルコシステイス総論	病原微生物検出情	33(6)	11-12	2012

		報			
八木田健司	食品による寄生動物感染③原虫感染症(1) ザルコシステイス・クドア	防菌防黴	40	705-714	2012
八木田健司	寄生虫、知って防ごう食中毒	食と健康	665	10-18	2012
山崎 浩、森嶋康之、八木田健司	食肉・野生動物の生食と寄生虫症	公衆衛生	76	30-36	2012

