

令和元年度 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）
「畜産食品の生物学的ハザードとそのリスクを低減するための研究」

分担研究報告書

「鶏肉加工製品におけるサルモネラ等の汚染実態に関する研究」

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者 大屋賢司 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：サルモネラ属菌の汚染率は、鶏肉及び鶏肉ミンチなどの鶏肉関連製品で高いことが知られている。しかしながら、リスク評価を行う際に重要となる汚染菌数に関する定量的データは少ないのが現状である。本研究では、鶏肉加工製品（加工度の高い未加熱製品を含む）におけるサルモネラ定量検査法を確立し、市販の製品におけるサルモネラ定量汚染実態調査を行う。本年度の成果は以下の通りである。サルモネラ属菌標準試験法（NIHSJ-01:2019）を最確数（MPN）3 本法による定量検査に応用し、鶏肉由来サルモネラ属菌株の添加回収試験によって、概ね接種菌量を反映した値を得ることができた。更に本検査に使用する分離培地の選定も行った。以上により、鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法を確立することができた。次に、確立したプロトコルを用いて、加工度の高い鶏肉加工製品として鶏肉つみれ及び鶏肉だんごを対象とし、本年度は 13 検体（冷凍製品 2 及び冷蔵品 11）を購入し調査を開始した。これまでにサルモネラ陽性率 61.5%（冷凍製品では 0%及び冷蔵製品では 72.7%）、汚染菌量は最大で 23 MPN/25 g 検体（0.9 MPN/g）であり、最も高頻度に分離されるのは 04 群であるとの結果を得ることができた。次年度は、汚染調査の継続に加え、分離株の血清型別及び分子遺伝学的解析を開始する。鶏肉加工製品のサルモネラ汚染率、汚染菌量、分離株の血清型及び遺伝子型の関連を解析することによって、汚染実態を明らかにすることを目指す。

A. 研究目的

サルモネラ属菌の汚染率は、鶏肉及び鶏肉関連製品で高い。例えば、厚生労働省が実施した食品の食中毒菌汚染実態調査では、1998年から2008年における鶏肉ミンチのサルモネラ属菌陽性率は33.5%であった（Hara-Kudo Y. et al., Food Addit Contam Part A, 30: 1450-1458, 2013.）。肉用鶏、鶏肉及び鶏肉加工製品（鶏肉ミンチなど）におけるサルモネラ属菌汚染実態の把握は食品衛生学的に重要であり、国内外で多くの調査結果が報告されている。しかし、リスク評価を行う際に重要となる汚染菌数に

関する定量的なデータは殆ど無いのが現状である。また、これまでの鶏肉関連製品の調査に関しては、鶏肉及び鶏肉ミンチによる報告が主であり、鶏肉つみれ及び鶏肉だんご等の加工度の高い鶏肉製品に関する調査は少ない。そこで、本研究では、鶏肉加工製品（加工度の高い未加熱製品を含む）におけるサルモネラ定量試験法を確立し、市販の製品におけるサルモネラ定量汚染実態調査を行う。サルモネラの汚染率、汚染菌数、分離菌株の血清型及び遺伝子型の関連を解析し、最終的に鶏肉製品の衛生的な取り扱いの重要点の解析及び改善方法など

の対策の提案を行うことを目標とした。本年度は、サルモネラ属菌標準試験法 (NIHSJ-01:2019) を最確数 (MPN) 3本法による定量検査に応用し、確立したプロトコルを用いて、国内で流通する鶏肉加工製品のサルモネラ定量汚染データの作出を開始することを目的とした。

B. 研究方法

1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

鶏肉加工製品へのサルモネラ属菌の添加回収試験を行い、サルモネラ属菌標準試験法を基としたサルモネラ属菌定量試験法の確立を行った。

1.1 接種菌液の調製及び鶏肉加工製品への接種

鶏肉加工製品への添加回収試験には、鶏肉由来 *Salmonella* serovar Schwarzengrund SEC1011株を用いた。カジトン培地に保存したSEC1011株をTrypticase Soy Broth (TSB、OXOID) に接種し、37℃にて18時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて10倍階段希釈し、想定 10^3 もしくは 10^2 CFU/mlの希釈液500 μ lを鶏肉加工製品 (つみれ) に接種した。ストマッカー袋中の鶏肉加工製品 (25 g) に調製した菌液を接種し、十分に手もみ処理をしてなじませた。実際の接種菌数は、菌液の10倍階段希釈液をTrypticase soy agar (TSA、OXOID) に塗抹し、37℃にて18時間培養して形成された集落数を集計し計算した。

1.2 最確数法によるサルモネラ属菌の定量

サルモネラ属菌標準試験法を、最確数

(MPN) 3本法による定量検査に応用することを検討した。フロー図を図1に示す。

1.1にて菌液を接種した鶏肉加工製品(25 g) にペプトン加生理食塩水225 mlを加え1分間ストマッカー処理し乳剤とした。調製した乳剤を、2倍濃度の緩衝ペプトン水 (BPW) 10 ml入り試験管3本へ10 mlずつ接種した。また、10 mlのBPW入り試験管3本へ同乳剤を1 mlずつ、さらに10 mlのBPW入り試験管3本へ0.1 mlずつ接種した。計9本の試験管を37℃にて、 22 ± 2 時間前培養した。この前培養液を9本の試験管からそれぞれ、Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 (OXOID) へ1 ml及びTetrathionate (TT) 培地 (OXOID) へ0.1 ml接種し、42℃にて 22 ± 2 時間選択増菌培養した。

選択増菌培養液をよく攪拌し、1白金耳量を分離用培地へ画線塗末し、37℃にて 22 ± 2 時間培養した。分離用培地は、硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地3種類及び、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地4種類を用いた (表1)。

各培地に形成されたサルモネラ属菌の定型集落を3ヶずつTriple sugar iron (TSI) 寒天培地 (栄研化学) 及びLysine Indole Motility (LIM) 培地 (日水製薬) に接種し、37℃にて 22 ± 2 時間培養した。培養後、表2に示す定型的サルモネラ属菌の性状を示した菌株について、サルモネラ免疫血清 (サルモネラ免疫血清「生研」、デンカ生研) を用いてO抗原の血清凝集試験を行い、サルモネラ属菌であることの確定及びO血清群の決定を行った。サルモネラ属菌陽性を示した試験管の本数から、米国農務省 食品安全検査局 微生物検査ガイドブックMLG

Appendix 2.05に従いMPN値を求めた。

2. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量汚染調査

国内で流通する鶏肉加工製品について、サルモネラ属菌標準試験法によるサルモネラの定性試験を行い、陽性となった検体について1. で確立したサルモネラの定量汚染調査を行った。

2.1 供試検体

国内で流通する鶏肉加工製品（つみれ及び肉団子）13検体（表3）を購入し供試検体とした。

2.2 サルモネラの定性試験

サルモネラ属菌標準法に従って行った。フロー図を図2に示す。検体25 gにBPW 225 mlを加え、1分間ストマッカー処理し、37℃にて22±2時間前培養した。この前培養液をRV培地へ1 ml及びTT培地へ0.1 ml接種し、42℃にて22±2時間選択増菌培養した。選択増菌培養液をよく攪拌し、1白金耳量をMLCB培地、XLD培地及びCHS培地へ画線塗末し、37℃にて22±2時間培養した。以降は、上述と同様に、サルモネラ属菌の同定及び0群の決定を行った。

3. サルモネラの定量試験

サルモネラ属菌陽性となった検体について、1.2の方法で検体中のサルモネラ属菌の同定及び定量を行った。但し、分離培地はMLCB培地、XLD培地及びCHS培地を用いた。

C. 研究結果

1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

1.1 高濃度のサルモネラの添加回収試験

高濃度のサルモネラとして、想定500 CFU/500 µlに調製した菌液の実際の菌濃度は、480 CFU/500 µlであった（表4）。MPN 3本法において、7種類の分離用培地におけるサルモネラ陽性管の判定結果はすべて同じであった（表5）。10 ml及び1 mlの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 mlの乳剤を接種した試験管においては、3本中2本の陽性であった。サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は1,150 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は225-5,000であった（表4）。

1.2 低濃度のサルモネラの添加回収試験

低濃度のサルモネラとして、想定50 CFU/500 µlに調製した菌液を用いた添加回収試験を3回行った。実際に接種した菌濃度は、3回の試験でそれぞれ、93、53及び60 CFU/500 µlであった（表4）。MPN 3本法において、7種類の分離用培地におけるサルモネラ陽性管の判定結果はすべて同じであった（表6-8）。1回目の試験では、サルモネラは、10 ml及び1 mlの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。0.1 mlの乳剤を接種した試験管においては、3本中3本とも陰性であった（表6）。サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は600 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は105-2,500であった（表4）。2回目及び3回目の試験結果は同じであり、いずれの試験においても、サルモネラは、10 mlの乳剤を接種した試験管において3本とも陽性であった。1 mlの乳剤を接種した試験管においては、3本中1本が陽性であり、0.1 mlの乳剤を接種した試験管においては、

3本中3本とも陰性であった(表7及び8)。2回目及び3回目の試験において、サルモネラ陽性を示した管数から算出したMPN値は108 MPN/25 g検体であり、この試験で得られたMPN値の95%信頼区間は22.5-450であった(表4)。

2. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量汚染調査

2.1 定性試験

供試した鶏肉加工製品(鶏肉つみれ及び鶏肉だんご)13検体のうち、冷凍製品2検体はいずれも定性試験陰性であった。冷蔵製品11検体では8検体がサルモネラ陽性であり、陽性率は72.7%であった。全13検体での陽性率は61.5%であった(表9)。サルモネラ陽性を示した8検体から分離された菌株(検体あたり2-6菌株)の0血清群の内訳は、6検体から04群、1検体から07群及び2検体から08群であった(表10)。

2.2 定量試験

定性試験で陽性を示した検体におけるサルモネラ菌量をMPN 3本法で測定した。検体25 gあたりのMPN値は23 MPN (0.9 MPN/g)が2検体、9 MPN (0.4 MPN/g)が3検体及び、定量試験陰性[7.5 MPN (0.3 MPN/g)未滿]が3検体であった(図3)。

D. 考察

1. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法の確立

高濃度(500 cfu)のサルモネラ属菌株を接種した鶏肉つみれ中の菌数を、サルモネラ属菌標準法を基としたMPN 3本法で測定したところ、得られたMPN値は1,150 MPN/25 g検体(95%信頼区間: 225-5,000 MPN)であ

り、接種菌数を反映したMPN値が得られた。さらに低濃度(50 CFU)のサルモネラ属菌を接種した試験を3回実施した。1回目の試験で得られたMPN値は600 MPN/25 g検体(95%信頼区間: 105-2,500)であり、接種菌数を反映した値が得られなかったが、2及び3回目の試験で得られたMPN値はどちらも108 MPN/25 g(95%信頼区間: 22.5-450)と接種菌数を反映した値が得られた(表4)。以上により、高濃度及び低濃度のサルモネラの添加回収試験において、概ね接種した菌数を反映したMPN値が得られたことから、本試験法が鶏肉加工製品中のサルモネラ属菌の定量試験に有用であることが示された。また、サルモネラ属菌標準試験法では、サルモネラの分離培地として、硫化水素産生を指標とする培地3種類及び、硫化水素産生を指標としない培地4種類からそれぞれ1種類ずつ培地を選択して分離に用いることが指示されている。本研究では、7種類の培地すべてを用いて、MPN 3本法による判定結果を比較した。いずれの分離培地も、サルモネラ陽性管の判定結果は同じであった(表5-8)。そこで、形成された集落の判定し易さ及び培地の作製し易さを考慮し、硫化水素産生を指標とする培地としてMLCB培地及び、硫化水素産生を指標としない培地としてCHS培地を選択することとした。さらに、分離株によっては、MLCB培地では生育しない株が存在することから、硫化水素産生を指標とする培地としてXLD培地も選択することとした。すなわち、以降の調査では、サルモネラ属菌の分離培地として、MLCB、XLD及びCHS培地を用いることとした。

2. 鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量

汚染調査

確立した定量試験法を用いて、鶏肉加工製品におけるサルモネラ属菌の定量汚染調査を開始した。定性試験の結果、冷蔵製品11検体における陽性率は72.7%及び、冷凍製品2検体では0%であった(表9)。陽性検体から分離されたサルモネラ属菌の0血清群は、04群、07群及び08群であった(表10)。国内の肉用鶏及び鶏肉製品から分離されるサルモネラ属菌では、血清型Infantisが最も多く分離される血清型であり、前述の1998年から2008年の調査において、Infantisは鶏肉ミンチから分離されるサルモネラ属菌の72.2%を占めていた(Hara-Kudo Y. et al., Food Addit Contam Part A, 30: 1450-1458, 2013.)。しかし、近年、肉用鶏では、Infantis以外のSchwarzengrund及びManhattanなどの血清型も増加傾向にある(Sasaki Y. et al., Epidemiol Infect, 140: 2074-2081, 2012)。最も高頻度に分離された04群には、国内で飼育される肉鶏から優勢に分離される血清型Schwarzengrundが含まれている(表11)。一方、Infantisが含まれる07群(表11)は、1検体からしか分離されなかった(表10)。次に、陽性検体中のサルモネラ菌数をMPN 3本法により測定した。最も高値を示した2検体で23 MPN/25 g検体(0.9 MPN/g)であり、定量試験陰性の検体も3検体あった(図3)。定量汚染調査は次年度も継続するが、本年度の段階では、高濃度のサルモネラに汚染された検体はなかった。

次年度は、調査の継続に加えて、分離株の血清型別及び分子遺伝学的解析を開始する。鶏肉加工製品中の汚染率及び汚染菌数並びに、分離株の血清型及び遺伝子型の関連を解析する事によって、汚染実態が明らかになることが期待される。

E. 結論

本年度は、サルモネラ属菌標準法を基にしたMPN法による定量検査について検討を行った。鶏肉由来サルモネラ属菌株の添加回収試験によって、概ね接種菌量を反映した値を得ることができ、更に分離培地の選定も行った。以上より、鶏肉加工製品におけるサルモネラ定量法を確立することができた。確立したプロトコールを用いて、加工度の高い鶏肉加工製品として鶏肉つみれ及び鶏肉だんごを対象とし、本年度は13検体を購入し調査を開始した。これまでにサルモネラ陽性率61.5%(冷蔵製品では0%及び冷蔵製品では72.7%)、汚染菌量は最大で23 MPN/25 g(0.9 MPN/g)検体であり、最も高頻度に分離されるのは04群であるとの結果を得ることができている。次年度は、汚染調査の継続に加え、分離株の血清型別及び分子遺伝学的解析を開始する。鶏肉加工製品のサルモネラ汚染率、汚染菌量、分離株の血清型及び遺伝子型の関連を解析することによって、汚染実態を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

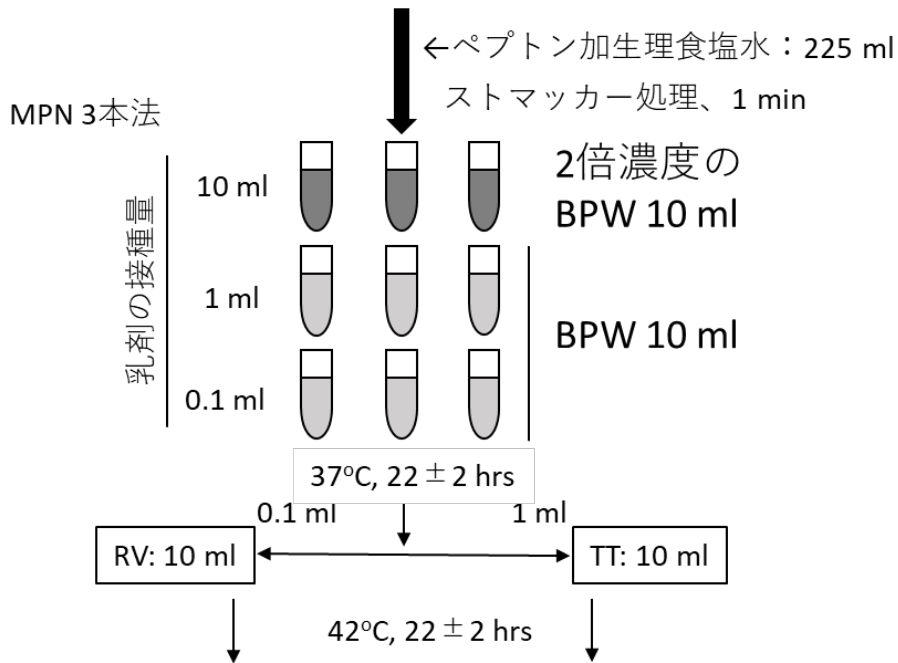
(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

鶏肉加工製品（加工度の高いつみれなど）：25 g
サルモネラ属菌（鶏肉由来株）：500 CFU, 50 CFU



分離用培地の選定

- ・ 硫化水素産生を指標とする培地 (DHL, MLCB, XLD)
- ・ 硫化水素産生を指標としない培地 (BGS, CHS, ESII, SM2)

37°C, 22 ± 2 hrs

- ・ 定型的な集落について性状試験
- ・ 血清凝集試験

MPN値を算出

接種菌量を反映した値が得られるか確認

図1：サルモネラ定量法確立のフロー図

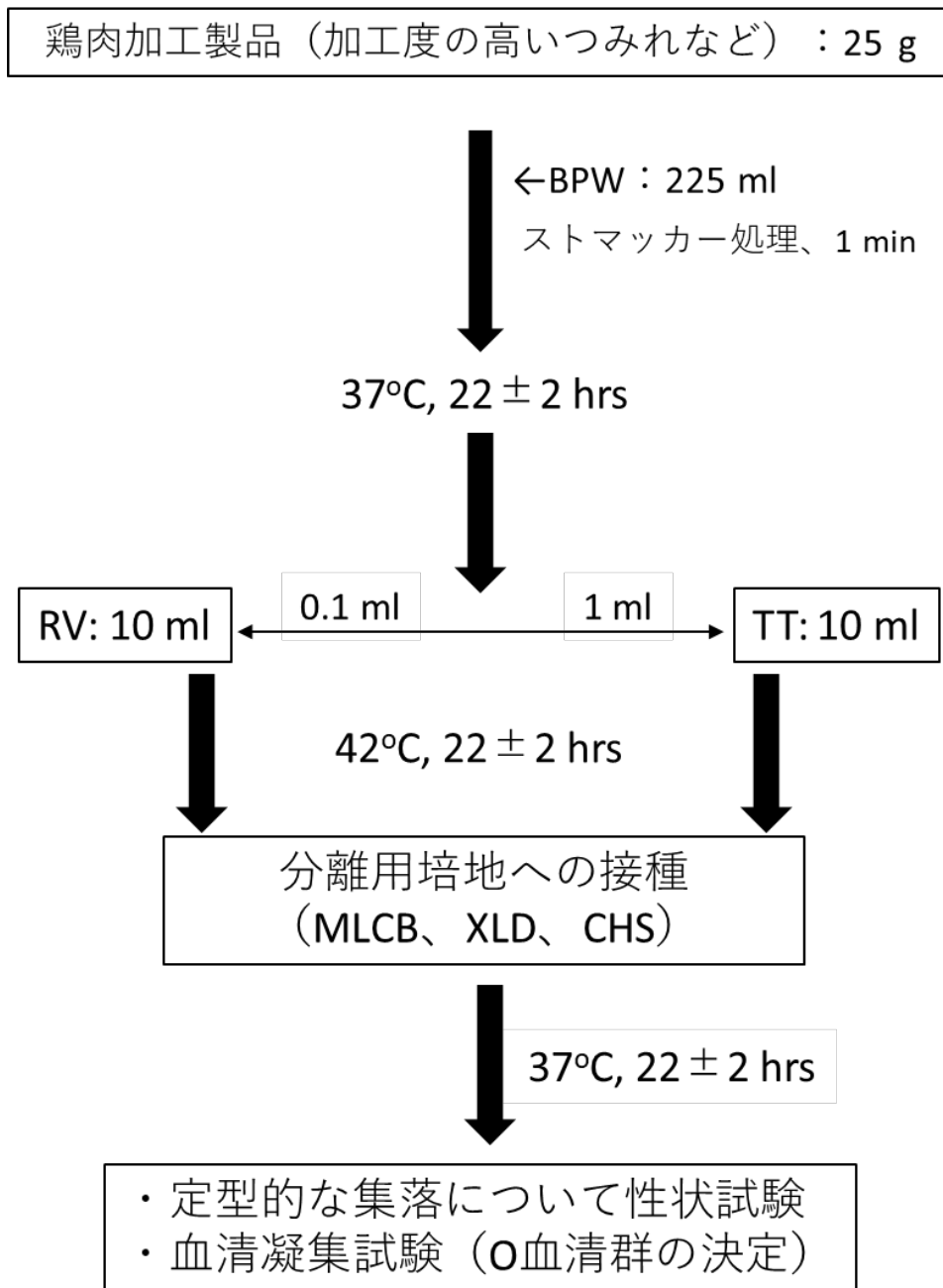


図2：サルモネラ定性試験のフロー図

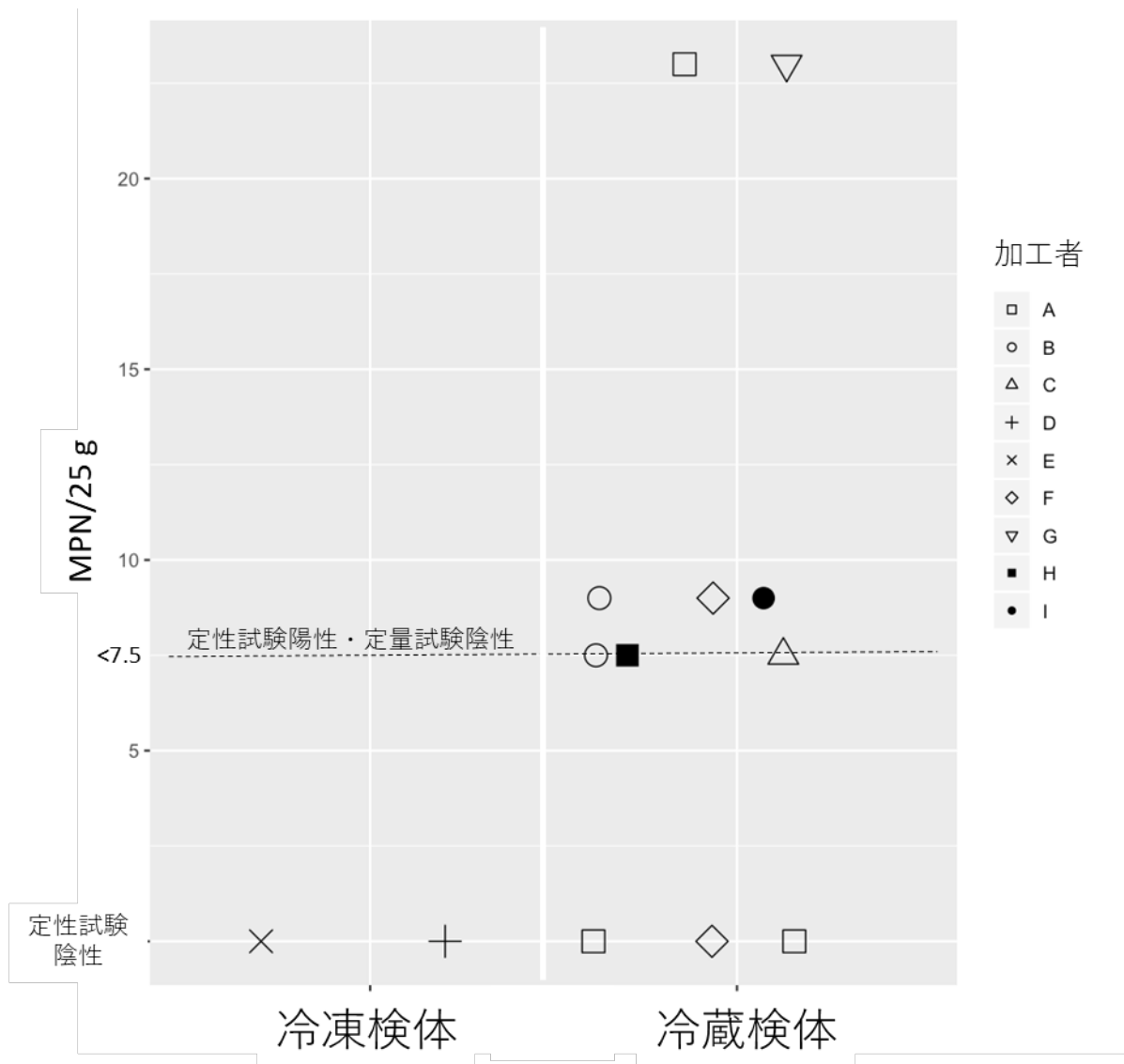


図3：鶏肉加工製品中のサルモネラ属菌数

表1：本研究で用いたサルモネラ属菌の分離用培地

培地の分類	培地名	製造者	備考
硫化水素の産生を 指標とする 分離培地	Deoxycholate-hydrogen sulfide -lactose (DHL) 寒天培地	日水製薬	黒色集落を形成
	Mannitol lysine crystal violet brilliant green (MLCB) 寒天培地	日水製薬	黒色集落を形成
	Xylose lysine deoxycholate (XLD) 寒天培地	OXOID	黒色集落を形成
硫化水素の産生を 指標にしない 分離培地	Brilliant Green containing Sulfadiazine (BGS) 寒天培地	OXOID	BG寒天培地にスルファピリジン 溶液を加えて作製する。 無色透明な集落を形成し培地は赤変
	CHROMagar Salmonella (CHS) 培地	CHROMagar	サルモネラ属菌は 藤色集落を形成する。
	ES サルモネラ寒天培地 II (ES11)	栄研化学	ピンク色集落を形成する。
	chromID Salmonella agar (SM2) 培地	バイオメリュウ	ピンク色集落を形成する。

表2：サルモネラ属菌の基本性状*

鑑別培地	判定項目	サルモネラ属菌の性状
TSI 寒天培地	斜面部	赤
	高層部	黄
	硫化水素	産生（黒）
	ガス	産生（黒）
LIM培地	リジン	陽性（紫）
	インドール	陰性
	運動性	陽性

*株によっては、硫化水素陰性、リジン陰性、
運動性陰性などの非定型的な性状を示す場合もある。

表3：供試した13検体の概要

	内訳*
保管形式	冷凍 (2) 冷蔵 (11)
製品名	鶏肉つみれ (10) 鶏肉だんご (3)
鶏産地	岩手県 (1) 宮崎県 (2) 鹿児島県 (2) 九州 (3) その他国産 (5)
加工者所在地	青森県 [加工者C] (1) 千葉県 [加工者H] (1) 埼玉県 [加工者F、G] (3) 東京都 [加工者I] (1) 神奈川県 [加工者A、B] (5) 佐賀県 [加工者D] (1) 鹿児島県 [加工者E] (1)

* ()内の数値は検体数

表4：添加回収試験における接種菌量及び回収された菌量

	想定接種菌量 (CFU/25 g検体)	接種菌量 (CFU/25g検体)	回収された菌量 (MPN/25 g検体)	回収された菌量の 95%信頼区間
高濃度				
	500	480	1,150	225-5,000
低濃度				
	50	93	600	105-2,500
	50	53	108	22.5-450
	50	60	108	22.5-450

表5：高濃度（想定500 CFU）のサルモネラ添加回収試験における各分離培地でのMPN 3本法の判定結果

乳剤の量 (ml)		硫化水素の産生を指標にする分離培地			硫化水素の産生を指標にしない分離培地			
		DHL	MLCB	XLD	BGS	CHS	ES11	SM2
10	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
1	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
0.1	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-

+: サルモネラが検出された管

-: サルモネラが検出されなかった管

表6：低濃度（想定50 CFU）のサルモネラ添加回収試験における各分離培地でのMPN 3本法の判定結果（1回目の試験）

乳剤の量 (ml)		硫化水素の産生を指標にする分離培地			硫化水素の産生を指標にしない分離培地			
		DHL	MLCB	XLD	BGS	CHS	ES11	SM2
10	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
1	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
0.1	管1	-	-	-	-	-	-	-
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-

+: サルモネラが検出された管

-: サルモネラが検出されなかった管

表7：低濃度（想定50 CFU）のサルモネラ添加回収試験における各分離培地でのMPN 3本法の判定結果（2回目の試験）

乳剤の量 (ml)		硫化水素の産生を指標にする分離培地			硫化水素の産生を指標にしない分離培地			
		DHL	MLCB	XLD	BGS	CHS	ES11	SM2
10	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
1	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-
0.1	管1	-	-	-	-	-	-	-
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-

+: サルモネラが検出された管

-: サルモネラが検出されなかった管

表8：低濃度（想定50 CFU）のサルモネラ添加回収試験における各分離培地でのMPN 3本法の判定結果（3回目の試験）

乳剤の量 (ml)		硫化水素の産生を指標にする分離培地			硫化水素の産生を指標にしない分離培地			
		DHL	MLCB	XLD	BGS	CHS	ESI I	SM2
10	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	+	+	+	+	+	+	+
	管3	+	+	+	+	+	+	+
1	管1	+	+	+	+	+	+	+
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-
0.1	管1	-	-	-	-	-	-	-
	管2	-	-	-	-	-	-	-
	管3	-	-	-	-	-	-	-

+: サルモネラが検出された管

-: サルモネラが検出されなかった管

表9：鶏肉加工製品のサルモネラ定性試験の結果

検体の保管形式	検体数	陽性検体数	陽性率(%)
冷凍	2	0	0
冷蔵	11	8	72.7
合計	13	8	61.5

表10：分離されたサルモネラ属菌のO血清群

O血清群	検体数	加工者
04	6	A (神奈川県) B (神奈川県) F (埼玉県) G (埼玉県) H (千葉県) I (東京都)
07	1	C (青森県)
08	2	B (神奈川県) *
合計	9	

*購入時期の異なる2検体から分離

表11：鶏肉加工製品から分離されたO血清群の主な血清型

O血清群	分離検体数	主な血清型
04群	6	Legon, Stanley, Eppendorf, Schwarzengrund, Saintpaul, Agona, Typhimurium
07群	1	Livingstone, Braenderup, Montevideo, Oranienburg, Thompson, Infantis
08群	2	Yovokome, Manhattan, Newport