

令和元—3年度厚生労働科学研究（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」

分担総合研究報告書

「鶏肉加工製品におけるサルモネラの汚染状況調査」

研究分担者	工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部
研究協力者	大屋賢司	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部
	林谷秀樹	東京農工大学

研究要旨： つみれや肉だんごなどの市販鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染を明らかにする目的で、市販鶏肉加工品からサルモネラを定量的に分離する方法を開発し、その手法を用いて市販鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染状況を検討した。その結果、開発した NIHSJ 法を基とする最確数 (MPN) 法により、つみれや肉団子などの鶏肉加工品は、高度(36.1%) にサルモネラに汚染されていたことが判明した。また、菌数は、7.5 CFU/25g 以下のものが多かった (63.5%) が、高い菌数(107.5 CFU/25g)のものも認められた。サルモネラは、4 血清型に型別され、*Salmonella* Schwarzengrund (60.6%) が最も多く、次いで *S. Infantis* (24.2%)、*S. Agona* (12.1%) ならびに *S. Manhattan* (3.0%) の順であった。分離頻度の最も高い *S. Schwarzengrund* 菌株は、Pulsed-field gel electrophoresis 及び multilocus sequence typing (MLST) のいずれの分子遺伝子型別でも由来が異なる菌株間で大きな遺伝的な相違は認められなかった。また、供試菌株の MLST 型は、国内の鶏肉などから高頻度に分離される *S. Schwarzengrund* の MLST 型と同一であった。これらの成績から、つみれなどの鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染は、原料となる鶏肉由来である可能性が高く、その予防には、鶏肉の生産や加工段階からの取り扱いに注意していくことが必要であることが明らかになった。

A. 研究目的

サルモネラは、腸内細菌科に属するグラム陰性通気嫌気性桿菌であり、感染型食中毒ならびに人獣共通感染症の原因菌として知られている。鶏は、サルモネラの保菌動物として知られ、鶏肉が人への感染源として最も重要視されている。鶏肉の加工品として、“つみれ”や“肉団子”などがあるが、これらの鶏肉加工品におけるサルモネラの汚染状況に関する報告は、ほとんどみられない。本研究では、まず、鶏肉加工品からサルモネラを定量的に検出する方法を確立し、次いで確立された手法で市販鶏肉加工品からサルモネラを分離・同定し、定量的に汚染状況

を検討した。最後に、鶏肉加工品から最も分離頻度の高かった *S. Schwarzengrund* について、分子遺伝子型別法を行い、菌株間の遺伝的関連性を解明するとともに、菌株の由来を推定し、サルモネラ汚染を予防する方策の確立を図った。

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の添加回収試験を行い、サルモネラ標準試験法を基としたサルモネラ定量試験法の確立を行った。

1.1. 製品への接種

鶏肉加工製品への添加回収試験には、鶏肉由来サルモネラ (*Salmonella* 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°C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 10³ もしくは 10² CFU/mL の希釈液 500 µL 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(25g)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°Cで18時間培養して形成された集落数を集計し計算した。

(1) 最確数法によるサルモネラの定量

サルモネラ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。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10mL 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°C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°C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°C

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。各培地に形成されたサルモネラの定型集落を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°Cで22±2時間培養した。培養後、定型的サルモネラ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汚染状況

2.1. 供試材料

2020年10月-2021年3月に東京都ならびに神奈川県のスーパーマーケットや小売店計39軒で購入した国産鶏肉を原材料とした鶏肉加工品95検体を供試検体とした。供試験体は購入後、冷蔵条件下で研究室に運搬し、ただちに実験に供した。

2.2. 定性試験

供試検体25gを緩衝ペプトン水(BPW、OXOID)225 mLに接種し、37°Cで22時間増菌培養を行った後、その1 mLをテトラチオネート液体培地(TT)(OXOID)に、0.1 mLをラパポート・バシリアディス液体培地(RV)(OXOID)に接種し、42°Cで22時間培養した。そして、それぞれの液体培地

から MLCB (日水)、XLD (OXOID) および CHROM agar Salmonella (CHROMagar) に接種し、37°Cで 22 時間培養した。選択培地に発育したコロニーからサルモネラが疑われるコロニーを各選択培地からそれぞれ 3 コロニーを釣菌し、純培養後、生化学試験を実施し、サルモネラを同定した。

2.3. 定量試験

定性試験でサルモネラ陽性になった供試検体について、最確数法 (Most probable number method: MPN 法、3 本法)を用いて定量を行った。定性培養時、低温下で保存しておいた供試検体 25 g をペプトン加生理食塩水 225 mL に加え、ストマッカーで良く混和後、その 10 ml を 2 倍量の BPW10 mL に、1 mL を BPW10 mL に、0.1 mL を BPW10 mL に、それぞれ 3 本ずつに加え、37°Cで 22 時間培養した。その後、同様に、分離・同定を行い、サルモネラを分離した。

2.4. 血清型別

分離されたサルモネラ菌株は、市販抗血清(デンカ生研)を用いて、O 抗原と H 抗原を決定し、血清型を同定した。

3. *S. Schwarzengrund* の分子遺伝子型別

3.1. 供試材料

2021 年度に、国産鶏肉を原材料とした鶏肉加工品 95 検体から分離した *S. Schwarzengrund*20 株を供試菌株とした。

3.2. 供試菌株の分子遺伝子型別

アガロースプラグの作製は、プラグ作成キット (Bio-Rad) を用いて、以下の方法で行った。供試菌株を TSA 平板培地に塗抹し、37°Cで 24 時間培養を行った。培地上に発育したコロニーを LB 液体培地 10mL に接種し、25°Cで 1 晩培養後、培養液にクロラム

フェニコールを 180 g/mL になるよう添加した。培養菌液 1 mL を 15,000 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、Cell Suspension Buffer (Bio-Rad) 50 μ L に懸濁し、50°Cで保持した。これに 50°Cに保持した 2%クリーンカットアガロース (Bio-Rad) 50 μ L を混合し、型に移して固形化させた。固まったプラグは型から取り出し、Lysozyme solution (Bio-Rad) 250 μ L とともに 2mL マイクロチューブに入れて、37°Cで 2 時間反応させた後、Lysozyme solution を取り除き、滅菌蒸留水でプラグを洗浄後、Proteinase K reaction buffer (Bio-Rad) 500 μ L を加え、50°Cで 1 晩反応させた。反応後、Proteinase K reaction buffer を除去し、Wash buffer (Bio-Rad) 1mL を加え、室温で 1 時間軽く振盪させながらプラグを洗浄した。その後、Proteinase K の不活性化のため、1mM phenyl methane sulfonyl fluoride (SIGMA-ALDRICH Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) を添加した Wash buffer で 2 度洗浄後、Wash buffer による洗浄を再度行った。最後に、0.1 \times Wash buffer で洗浄を行った。作成したアガロースプラグは、染色体 DNA 1 μ g に対し制限酵素 *Not I* (タカラバイオ) を 1.5 μ L 含むように調整した反応液の中に入れ、37°Cで 1 晩反応させた。その後、Loading buffer (タカラバイオ) 3 μ L を添加して酵素反応を止め、反応液を除去後、Wash buffer でプラグを 1 時間洗浄した。電気泳動は、1.2% Agarose NA (Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, England) のウェルに、作製したプラグを挿入後、0.5%クリーンカットアガロースで封入した。パルスフィールドゲル電気泳動は、泳動装置に CHEF-DR® II Pulsed Field ElectroPhoresis

Systems (Bio-Rad) を使用し、14°C、200V、パルスタイム 2.2–63.8 秒、泳動時間 19 時間電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色し、UV を照射して撮影後、得られたバンドパターンの解析を行った。なお、PFGE パターンの解析にあたり、Tenover らの提言に従い、検出されたバンドが 1 つまたは 2 つしか違わないものは同じ PFGE パターンと判断した。

3.3. MLST

供試菌株を TSB 培地で、37°C で 24 時間培養後、アルカリ熱抽出法を用いて、DNA 抽出を行った。そして、サルモネラの House Keeping 遺伝子である *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA* 及び *thrA* の 7 つ遺伝子を標的とし、これらの遺伝子を各々の PCR 条件で標的遺伝子の増幅を行った。増幅産物については、塩基配列を決定し、供試菌株の MLST タイプを決定した。

C. 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 μ L に調製した菌液の実際の菌濃度は、480 CFU/500 μ L であった。MPN3 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全て同じであった。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。

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 0 CFU/500 μ L 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 μ L であった。MPN3 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全て同じであった。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。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。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。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。

2. 鶏肉加工品のサルモネラ汚染状況

2.1. 鶏肉加工品からのサルモネラ検出状況

サルモネラは、供試検体 95 検体中 30 検体(31.6%)から分離された。また、サルモネ

ラは、冷蔵品から分離されたが、冷凍品からは分離されなかった。冷蔵のつみれからの分離率が高かった。

2.2. 汚染サルモネラ菌量の定量

鶏肉加工品を汚染するサルモネラの菌量を MPN 法(3 本法)で測定した結果、サルモネラの汚染菌量は、 $<7.5-107.5$ CFU/25 g であった。MPN 法では検出されない菌量 (<7.5 CFU/25g) のもの (63.3%) が最も多かった。

2.3. 分離されたサルモネラの血清型

サルモネラ陽性検体 30 検体から 33 菌株が分離された。分離されたサルモネラ 33 菌株は、4 血清型に型別され、*S. Schwarzengrund* (60.6%) が最も多く、次いで *S. Infantis* (24.2%)、*S. Agona* (12.1%) ならび、*S. Manhattan* (3.0%) の順であった。

3. 供試菌株の分子遺伝子型別

3.1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

供試菌株 20 菌株は、*NotI* を用いた PFGE で、バンドパターンが 1-2 違う菌株も見られたが、結果としていずれも同じ PFGE パターンであると判断された (図 1)。

3.2. MLST

供試菌株 20 株のうち、19 菌株は 7 遺伝子すべてが同じ塩基配列を示した。1 株は *hisD* で増幅は認められなかったものの、残りの 6 遺伝子は他の 19 菌株と同じ塩基配列を示したので、19 菌株と同じ塩基配列である可能性が高いと判断された。供試菌株の MLST タイプは、ST241 であった (表 1)。また、図 2 に最小スパニングツリーによる *S. Schwarzengrund* の遺伝的関連性を示した (図 2)。

D. 考察

本研究により、開発した NIHSJ 法を基とする MPN 法により、つみれや肉団子といった市販の鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染状況を定量的に調査したところ、これらの加工品は高度にサルモネラに汚染されていることが判明した。またそのサルモネラ汚染菌量は、検体によりばらつきがあり、多くは MPN 法で検出できない菌量であったが、最も菌量が多いものでは 107.5 CFU/25 g のものもあった。これらの鶏肉加工品は、主に冬期に鍋などの具材として食用に供されることが多く、スーパーマーケットや小売精肉店などでは、冬期に生の状態で冷蔵品として販売されることが多い。鶏肉がサルモネラに汚染されていることは、広く知られているが、鶏肉を加工した製品も同様に高度に汚染されていることから、つみれや肉団子といった鶏肉加工品の取り扱いには注意が必要である。

鶏肉加工品を汚染するサルモネラの汚染源は、原材料の鶏肉である可能性が高いが、つみれは鶏肉に野菜やきのこなどの材料を加えている作ってあるものが多く、これらからの汚染を受けている可能性がある。そこで分離したサルモネラの血清型を同定した。その結果、鶏肉加工品から分離されたサルモネラの血清型は、*S. Schwarzengrund* (60.6%) が最も多く、次いで *S. Infantis* (24.2%)、*S. Agona* (12.1%) 及び *S. Manhattan* (3.0%) の順であった。これらの血清型は、東京都で販売されていた市販鶏肉から分離されたサルモネラ の血清型とその割合が近似していた(下島ら、食衛誌

61:211-217, 2020)。そこでさらに、つみれや肉団子などの市販鶏肉加工品から高頻度に分離された *S. Schwarzengrund* 20 菌株について、分子遺伝子型別を行った。つみれや肉団子といった鶏肉加工品から最も高い頻度で分離された *S. Schwarzengrund* は、検体の由来は異なるにも関わらず、遺伝子タイプは PFGE および MLST による分子遺伝子型別においてのいずれも同じタイプを示した。また、MLST タイプは ST241 であった。ST241 は、近年、九州地方でブロイラー鶏から分離され、その後、これら鶏の国内移動に伴い、東北地方にまで分布が拡大していることが確認されている MLST タイプである。今回、鶏肉加工品から分離された *S. Schwarzengrund*20 菌株の MLST タイプが、日本のブロイラー鶏から特異的に分離される本菌の MLST タイプと同じであったことから、つみれや肉団子などの市販鶏肉加工品を汚染するサルモネラは、原料となる鶏肉由来であることが示された。

以上のように、鶏肉加工品のサルモネラ汚染は、その原料となる鶏肉由来である可能性が高く、したがって、鶏肉加工品のサルモネラ汚染を予防するためには、鶏肉の生産や加工段階から、その取り扱いに注意を払う必要が示された。

E. 結論

つみれなどの鶏肉加工品におけるサルモネラ汚染は、原料となる鶏肉由来である可能性が高く、鶏肉加工品のサルモネラ汚染を予防するためには、鶏肉の生産や加工段階から、その取り扱いに注意を払う必要が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2.1. 池内隼佑ら. 鶏肉加工品におけるサルモネラの定量汚染調査. 第 117 回日本食品衛生学会学術講演会 (2021 年 10 月) (WEB 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

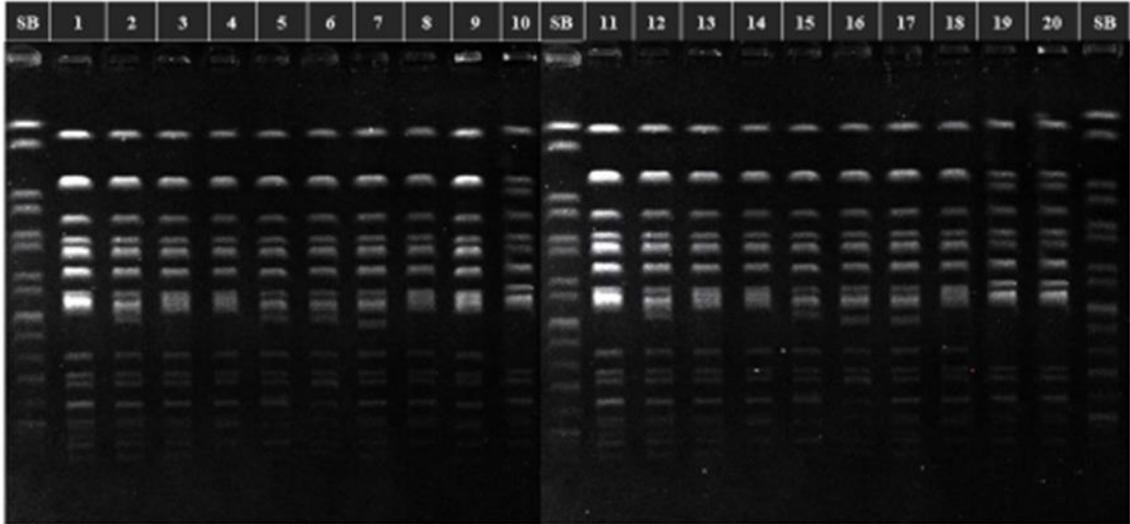


図1. 鶏肉加工品から分離された *S. Swarzenrund* のPFGEパターン

Lanes: 1-20: 鶏肉加工品から分離された *S. Swarzenrund*,
 SB; Marker (*S. enterica* serovar Braenderup)

表 1. 分離した *S. schwarzengrand* の MLST 解析結果

分離菌株	遺伝子							ST タイプ
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	
ss01	43	47	49	16	41	15	3	241
ss02	43	47	49	16	41	15	3	241
ss03	43	47	49	16	41	15	3	241
ss04	43	47	49	16	41	15	3	241
ss05	43	47	49	16	41	15	3	241
ss06	43	47	49	16	41	15	3	241
ss07	43	47	49	16	41	15	3	241
ss08	43	47	49	16	41	15	3	241
ss09	43	47	49	16	41	15	3	241
ss10	43	47	49	NT*	41	15	3	(241)
ss11	43	47	49	16	41	15	3	241
ss12	43	47	49	16	41	15	3	241
ss13	43	47	49	16	41	15	3	241
ss14	43	47	49	16	41	15	3	241
ss15	43	47	49	16	41	15	3	241
ss16	43	47	49	16	41	15	3	241
ss17	43	47	49	16	41	15	3	241
ss18	43	47	49	16	41	15	3	241
ss19	43	47	49	16	41	15	3	241
ss20	43	47	49	16	41	15	3	241

*遺伝子産物確認できず

図2.S. Schwarzengrundの最小スパニングツリーによる遺伝的関連性

