

令和3年度厚生労働科学研究費（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の定量汚染の調査」

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 林谷秀樹 東京農工大学

研究要旨：本年度は、昨年度に鶏肉加工品から分離したサルモネラのうち、最も検出頻度の高かった *Salmonella* Schwarzengrund について、分離株の分子遺伝子型別を実施し、菌株間の遺伝的関連性を明らかにするとともに、その汚染源を推定した。その結果、つみれや肉団子などの鶏肉加工品から分離された *S. Schwarzengrund* 20 菌株は、pulsed-field gel electrophoresis および multilocus sequence typing のいずれの分子遺伝子型別法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、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。今年度は、昨年度、これら鶏肉加工製品から分離されたサルモネラのうち、最も分離頻度の高かった *Salmonella* Schwarzengrund について、分子遺伝子型別を行い、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. 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。また、鶏肉加工品の汚染源を推定するため、2021 年に国産鶏肉から分離された *S. Schwarzengrund* 10 株（北海道産及び東北産）も供試した（MLST のみ）。

2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

アガロースプラグの作成は、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 10 mL 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 μ g/mLになるよう添加した。培養菌液1 mLを15,000rpm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2 mL 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) 1 mL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、1 mM 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×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

Bio-tech ltd., Cambridge, England) のウェルに、作成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. Multilocus sequence typing (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* および *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. 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)。

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)。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。また、国産鶏肉 (北海道産及び東北産) 由来の 10 株についても、MLST タイプは ST241 であった。

D. 考察

本研究により、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、2000 年頃から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。さらに、今回、北海道産及び東北産の鶏肉製品から分離された *S. Schwarzengrund* 10 株の MLST タイプも ST241 であったことから、当該 MLST タイプの *S. Schwarzengrund* が北海道

にまで到達していると示唆された。

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

つみれや肉団子などの市販鶏肉加工品から高頻度で分離された *S. Schwarzengrund* について、分子遺伝子型別を行った。その結果、供試菌株 20 菌株は、PFGE および 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、その MLST 型はいずれも ST241 のタイプを示したが、これは、国内の鶏肉から高頻度で分離される *S. Schwarzengrund* の MLST 型と同一であった。これらのことから、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、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. 健康被害情報

なし

G. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

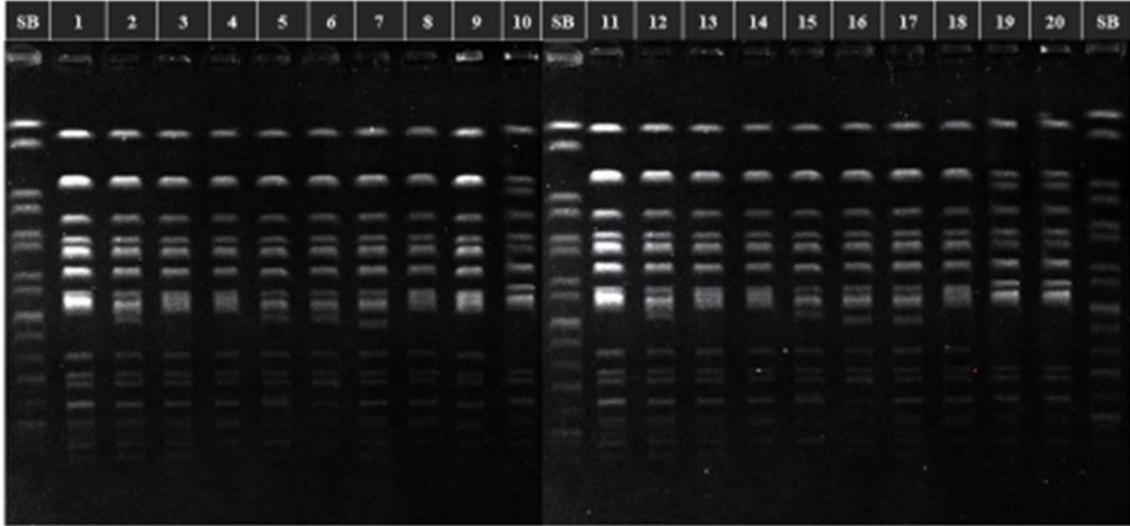


図1. 鶏肉加工品から分離された*S. Swarzenrund*のPFGEパターン

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

