

宮城県内のサルモネラ菌の浸淫状況調査

Prevalence of *Salmonella* in Miyagi

松島 桂子 中居 真代 宮崎 麻由*¹ 有田 富和*²
 那須 務*³ 小林 妙子 渡邊 節 佐藤 俊郎

Keiko MATSUSHIMA, Masayo NAKAI, Mayu MIYAZAKI, Tomikazu ARITA,
 Tsutomu NASU, Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE, Toshiro SATO

2010年、県内に流通している鶏肉および食鳥処理場への搬入用ケージのサルモネラ汚染を調査したところ20株のサルモネラ属菌が検出された。血清型は *Salmonella* *Infantis* (以下SI) が18株(90%)を占めた。薬剤感受性試験の結果、薬剤別ではテトラサイクリンに耐性を示した株の検出率が高かった。また2012年、宮城県産牛50頭、豚50頭の盲腸内容物のサルモネラ汚染を調査したところ検出されなかった。2005年から2012年の8年間に宮城県内で分離された散発下痢症由来サルモネラ感染者株(以下散発下痢症株)307株を同定したところ、血清型は47種類に型別され、*S. Enteritidis* (以下SE) 52株、*S. Typhimurium* (以下ST) 36株、SIが24株であった。鶏由来株、2008~2012年分離された散発下痢症株および2012年食中毒由来株(以下食中毒株)のSI株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析の結果、鶏由来株と散発下痢症株に同一パターンが認められた。

キーワード：サルモネラ；鶏肉；散発下痢症；薬剤感受性；PFGE

Key words : Chicken ; Sporadic Diarrhea ; Drug Susceptibility ; PFGE

1 はじめに

わが国におけるサルモネラ食中毒は1989年以降増加していたが、1999年の825件をピークにその後は減少傾向を示している。しかし、依然として食中毒原因細菌としてはカンピロバクターに次いで第2位を占める。近年の食品流通の広域化に伴ない食中毒事件は大規模化し、過去12年間の患者数500人以上の食中毒事例34件のうち10件がサルモネラ属菌による事例である¹⁾。さらに、統計上処理される食中毒による患者の他に、市中では散発下痢症患者としてサルモネラ感染者が存在している。また、検出される菌種も従来のパンデミック型であるSE以外に多くの血清型が分離され、薬剤耐性菌の増加も指摘されている。当所では食中毒やdiffuse outbreakを早期に探知する目的で2005年から散発下痢症株の分与を受け、菌の同定および薬剤感受性試験を行ってきた²⁾。本研究では、市販鶏肉、食鳥処理場への鶏搬入用ケージのふきとり³⁾、牛、豚の盲腸内容物の保菌調査および2012年に発生したサルモネラ食中毒株と比較したので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

2010年6月から11月まで宮城県内で購入した国産市販鶏肉50検体および鶏搬入用ケージのふきとり20検体のサルモネラ菌分離を実施した。

2012年、宮城県食肉衛生検査所で処理された県内産

の牛50、豚50の盲腸内容物100検体についてサルモネラ菌分離を試みた。

2005年から2012年までに宮城県医師会健康センターより分与された散発下痢症株307株を精査した。

2.2 方法

鶏肉はBPW培地(栄研化学)225mlに25gを無菌的に量り取り35±1℃、22±2時間前培養後、培養液0.1mlをRV培地(MERCK)10mlに接種し42±0.5℃、22±2時間培養し、MLCB寒天培地(日水製薬)、DHL寒天培地(栄研化学)およびX-SAL寒天培地(日水製薬)に塗抹した。疑わしい集落はTSI寒天培地(栄研化学)、LIM培地(栄研化学)、VP半流動培地(栄研化学)に接種して生化学性状を確認後、サルモネラ免疫血清(デンカ生研)を用いてスライド凝集法によりO抗原を試験管凝集法によりH抗原を決定した。

鶏搬入用ケージ20検体はふきふきチェックⅢ(栄研化学)でふきとり、付属のリン酸緩衝生理食塩水(以下PBS)10mlに希釈した。混和後BPWに1ml接種し、鶏肉同様に検査した。

盲腸内容物は、SS寒天培地(栄研化学)およびMLCB寒天培地に塗抹、RV培地10mlに接種、36±1℃、24±2時間培養後、さらにRV培地培養液をSS寒天培地およびMLCB寒天培地に塗抹した。

分与された散発下痢症株は、SS寒天培地で再分離し生化学性状を確認後、鶏肉と同様にO抗原とH抗原を決定し、菌を同定した。

*1 現 石巻保健所 *2 現 環境政策課 *3 現 仙南保健所

分離株の薬剤感受性試験は、NCCLS 法規格に準拠した一濃度ディスク拡散法 (KB ディスク「栄研」：栄研化学) を用いた。すなわち、菌株をトリプトソイブイオン (栄研化学) で 35°C で培養し McFarland0.5 になるよう滅菌生理食塩水で調整したものを被検菌液とし、厚さ 4mm に作成したミュラーヒントン寒天培地 (OXOID) に滅菌綿棒で塗抹した。アンピシリン (ABP:10 μ g)、ホスホマイシン (FOM:50 μ g)、ノルフロキサシン (NFX:10 μ g)、トスフロキサシン (TFX:5 μ g)、レボフロキサシン (LVX:5 μ g)、セファロチン (CET:30 μ g)、セフォタキシム (CTX:30 μ g)、セフトジジム (CAZ:30 μ g)、セフェピム (CFP:30 μ g)、セフォキシチン (CFX:30 μ g)、カナマイシン (KM:30 μ g)、テトラサイクリン (TC:30 μ g)、イミペネム (IPM:10 μ g) の 13 剤のディスクを 35°C で 16~18 時間培養し、添付文書記載の基準に従って判定を行った。

市中サルモネラ感染者由来株、鶏関連株および 2012 年に分離された食中毒株の SI 株について、PFGE 法による遺伝子解析を行った。分離 SI 株は、ハートインヒュージョンブイオン培地 (栄研化学) で 37°C 一夜振盪培養し、Ribot ら⁴⁾の方法に準じてプラグを作成し、35U の Xba I で 37°C 一晚処理した。泳動条件は電圧 6.0V/cm、パルスタイム 2.2~63.8sec、泳動時間 19h で、CHFF Mapper (BIO RAD 社) を用いて行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを比較した。系統樹解析は Finger-Printing II, Dice 係数によった。

3 結果

3.1 サルモネラ汚染状況

国産市販鶏肉 15 検体 (30.0%) から 16 株のサルモネラ菌が、鶏搬入用ケージふきとり 4 検体 (20.0%) から 4 株のサルモネラ菌が分離された。分離株の血清型は SI が 18 株 (90.0%)、ST と *S.Virchow* が各 1 株 (5.0%) であった (表 1)。

牛および豚の盲腸内容物 100 検体から、サルモネラ菌は検出されなかった (表 2)。

3.2 散発下痢症株の血清型

分与を受けた散発下痢症株 307 株のうち血清型が判

明した 288 株は、47 菌種に型別された。SE が最も多く 52 株 (18.1%)、次いで ST36 株 (12.5%)、SI24 株 (8.3%) でこの 3 菌種で全体の 38.9% を占めた。SE は概ね毎年高頻度に検出されたが、他は年によって検出された血清型に特徴があり、2007 年、2008 年は ST、2010 年は *S.Rissen* が多かった (表 3)。

3.3 薬剤感受性試験

鶏肉および鶏搬入用ケージから分離された菌株ならびに 2005~2012 年散発下痢症株の薬剤耐性出現状況を表 4、表 5 に示した。鶏肉および鶏搬入用ケージのふきとりから検出された 20 株のサルモネラ分離株のうち薬剤感受性菌は 14 株 (70%) で ABP、CET、CFX、KM、TC いずれかの薬剤に耐性を示した。鶏関連株で 1 剤耐性株は 5 株、2 剤耐性株は 4 株、4 剤耐性株は 5 株であった。薬剤別にみると TC に耐性がある株は 13 株、KM 耐性が 6 株、ABP 耐性と CET 耐性は各 5 株、CFX 耐性は 4 株であった。鶏搬入用ケージから分離した株はすべて ABP、CET、CFX、TC の 4 剤に耐性があった。散発下痢症株はいずれかの薬剤に耐性をもつものは 65 株であった。1 剤耐性が 43 株、2 剤耐性が 20 株、3 剤耐性および 4 剤耐性も 1 株あった。薬剤別には TC 耐性が 50 株、ABP 耐性が 19 株、FOM 耐性が 10 株、KM 耐性が 9 株であった。

表 1 市販鶏肉および鶏搬入ケージのサルモネラ汚染状況

検体	検体数		検出株数	
	検体数	検出数 (%)	血清型	検出数 (%)
市販鶏肉	50	15(30.0)	Infantis	14(87.4)
			Typhimurium	1(6.3)
			Virchow	1(6.3)
搬入用ケージ	20	4(20.0)	Infantis	4(100.0)
鶏肉合計	70	19(27.1)	Infantis	18(90.0)
			Typhimurium	1(5.0)
			Virchow	1(5.0)

表 2 牛・豚盲腸内容物のサルモネラ菌汚染状況

検体	検体数	
	検体数	検出数 (%)
牛盲腸内容物	50	0(0.0)
豚盲腸内容物	50	0(0.0)

表 3 市中サルモネラ感染者由来血清型別

合計	2005年		2006年		2007年		2008年		2009年		2010年		2011年		2012年		
Enteritidis	52	Enteritidis	12	Enteritidis	9	Typhimurium	8	Typhimurium	13	Enteritidis	14	Rissen	15	Rissen	3	Litchfield	3
Typhimurium	36	Istanbul	12	Typhimurium	5	Istanbul	7	Bareilly	7	Infantis	3	Enteritidis	8	Nagoya	3	Enteritidis	2
Infantis	24	Typhimurium	6	Infantis	4	Infantis	5	Braenderup	6	Typhimurium	2	Infantis	5	Enteritidis	3	その他	12
Istanbul	19	Saintpaul	5	Agona	3	Saintpaul	4	Infantis	4	Saintpaul	2	Nagoya	3	Typhimurium	2		
Rissen	19	London	3	Saintpaul	2	Hader	4	Virchow	2	その他	6	Agona	2	Thompson	2		
Saintpaul	16	Agona	3	Stanly	2	Bareilly	3	Carvallis	2		Thompson	2	その他	9			
Bareilly	11	Braenderup	3	Virchow	2	Montevideo	2	Kottbus	2		その他	10					
Nagoya	10	Montevideo	3	その他	14	Thompson	2	Nagoya	2								
Braenderup	13	その他	16		Enteritidis	2	Enteritidis	2									
Agona	9				その他	9	その他	6									
Thompson	9																
Virchow	7																
その他	82																
計	307		63		41		46		46		27		45		22		17

3.4 PFGEによる遺伝子解析

制限酵素 Xba I で処理し、Dice 係数で解析した結果を示す(図1)。検出された菌株は、80%以上で散発下痢症株の1株(lane32:グループE)を除き相同性を示した。90%以上では5グループに分けられ、鶏搬入用ケージ由来4株(lane1・2・6・7)、2008年散発下痢症株2株(lane8・16)、2010年散発下痢症株3株(lane3・4・17)、2012年散発下痢症株2株(lane9・10)と鶏肉由来9株(lane5・11・12・13・14・15・18・19・20)がAグループに入り、鶏肉由来4株(lane21・22・23・24)がBグループになった。2012年8月発生の食中毒株(lane25・26)がCグループ、2009年散発下痢症株4株(lane27・28・29・30)と2010年散発下痢症株1株(lane31)がDグループになった。

表4 鶏由来株の薬剤耐性出現状況

血清型	耐性株 (%)	耐性パターン			耐性株数
		1剤	2剤	4剤	
Infantis	4(22.2)	TC			4
	1(5.5)	KM			1
	4(22.2)		KM,TC		4
	4(22.2)			ABP,CET,CFX,TC	4
Typhimurium	1(100.0)			ABP,CET,KM,TC	1
		5	4	5	14

表5 散発下痢症株の薬剤耐性出現状況(2005~2012年)

血清型	耐性株 (%)	耐性パターン				耐性株数
		1剤	2剤	3剤	4剤	
Enteritidis	1(1.9)	ABP				1
Typhimurium	6(16.7)	TC				6
	4(11.1)		ABP,TC			4
	1(2.8)		FOM,TC			1
	1(2.8)			ABP,KM,TC		1
Infantis	6(25.0)	TC				6
	1(4.2)	KM				1
	4(16.7)		KM,TC			4
	2(22.2)	FOM				2
Bareilly	7(63.6)	FOM				7
Baaenderup	1(7.7)	ABP				1
Hader	4(100.0)	TC				4
Heidelberg	1(50.0)		ABP,TC			1
Istanbul	7(36.8)	TC				7
Isangi	1(100.0)		KM,TC			1
Kottbus	1(50.0)	ABP				1
Neumuenster	1(100.0)	TC				1
Panama	1(100.0)		ABP,TC			1
Saintpaul	3(18.8)	TC				3
Schwarzengrund	1(33.3)	TC				1
	1(33.3)		KM,TC			1
Yovokome	1(100.0)	TC				1
O4:	1(100.0)				ABP,CET,TC,NA	1
O4:i,-	1(6.7)	ABP				1
	1(6.7)		ABP,KM			1
	6(40.0)		ABP,TC			6
		43	20	1	1	65

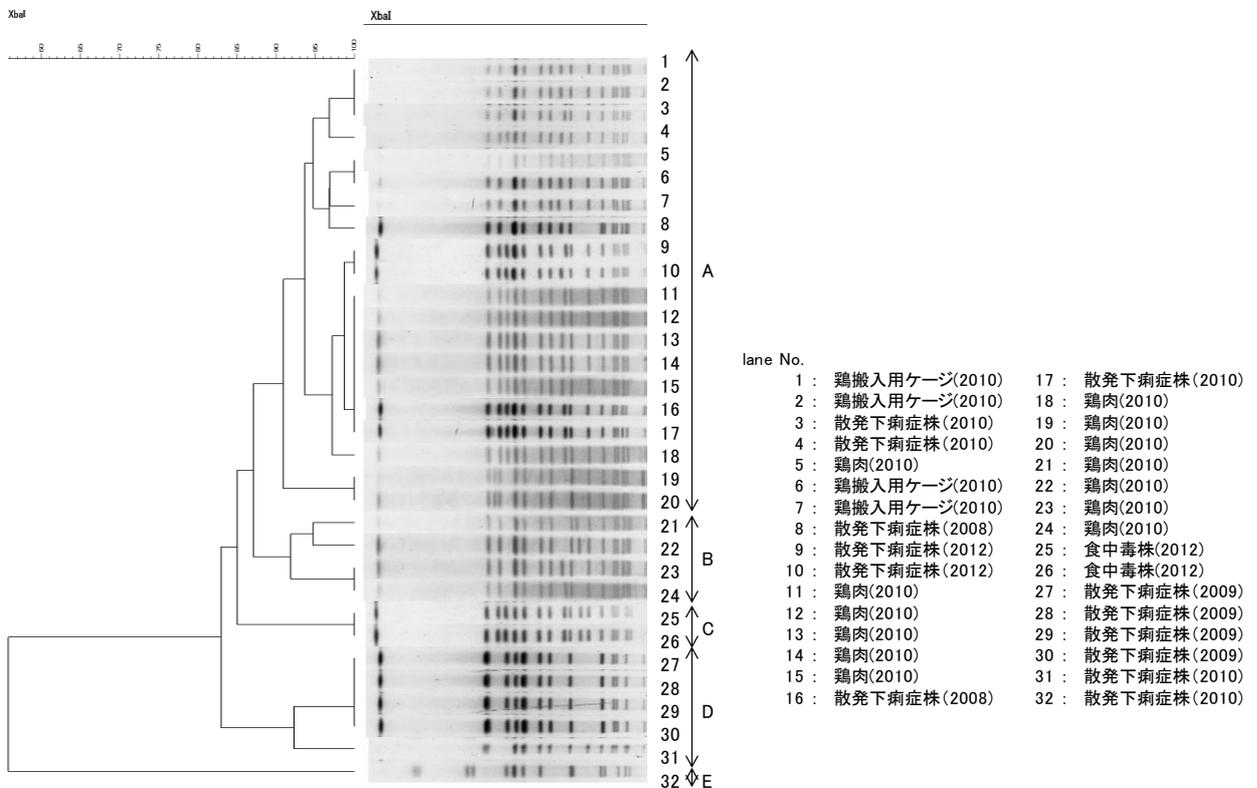


図1 Salmonella Infantis の PFGE パターン (Xba I 処理)

4 考 察

サルモネラ食中毒発生件数は減少傾向にはあるが、7～9月の夏季を中心に多発しており、本県のサルモネラ食中毒事例や散発下痢症感染者発生も同時期に集中している。今回県内で購入した国産鶏肉からは30%の高率でサルモネラが分離され、検出された菌種はほとんどがSIであった。これは他の各報告^{5)~8)}と同様であった。

牛および豚の盲腸内容物100検体から今回サルモネラが検出されなかったことは、他の報告^{9)~12)}と同様であった。

本県の過去8年間の散発下痢症株はSE, ST, SIで全体の36.5%を占めている。その内訳は、国立感染症研究所感染症情報センターの2005年から2012年までの全国集計(速報を含む)。では、SEは34.0%であるのに対し、本県は16.8%で、SEの全体に占める割合は少なかった。一方、STは全国のほぼ倍で11.7%、SIは全国とほぼ同じ7.8%であった。全国的なSEの検出率の低下に伴ってSE以外の血清型の分離率が高くなっている。本県でも、多くのサルモネラが鶏に関連すると推察されることから農場でのサルモネラ排除が重要な食品衛生対策となると思われる。

薬剤耐性の状況は、血清型によって特徴があった。散発下痢症株SEは1.9%、STは33.3%、SIは45.8%であった。これは竹田ら¹³⁾の報告60.3%、100%、83.3%とは大きく異なった。一方、鶏由来SI薬剤耐性株は72.2%であり、プロイラー腸管内容物からの分離SI株は100%耐性菌であったという竹田らの報告と同様の結果が得られた。特に本県の状況では、サルモネラの治療薬として臨床的に有効性があると認められているABP, FOMに耐性をもつものが、散発下痢症株29株、鶏由来株5株あり、農場での飼育中に疾病予防や発育促進の目的で投与された抗生剤の使用歴がそのまま反映されたものと考えた。今後の動向を注視することが必要である。ニューキノロン系薬剤NFX, TFX, LVXに耐性の株はなかった。

PFGEによる遺伝子解析の結果、2010年散発下痢症株の1株を除き制限酵素Xba Iで80%以上の相同性となった。90%以上では、大きくAからDの5グループに分けられた。Aグループ内には、鶏由来株と散発下痢症株が含まれた。AグループとDグループの散発下痢症株は年度が異なる検体が含まれた。分離の由来、散発下痢症の場合は採材された地域、時期が異なるにもかかわらず、類似のパターンを示す株による感染が確認された。以上のことから特定の菌株が広く環境を汚染し、食品を介したdiffuse outbreakがあると示唆された。

SIが鶏肉から高濃度に分離され、散発下痢症株とPFGEパターンが一致したことは、鶏肉の不適正な取扱

いによって下痢症や食中毒が発生していることを示唆した。SE対策では鶏卵、鶏卵加工品の取扱いや製品の規格基準、表示などを策定し、様々な分野で汚染の減少化に力を注いだことが食中毒防止に有効に働いている。SIやSTについても同様の鶏に特化した施策が必要で、農場の清浄化から流通、販売、家庭での取扱いを含めた対策が必要であろう。また、今回牛および豚のサルモネラ汚染は確認できなかったが、総合的な体系で衛生行政を推進していくことが重要と考える。

謝 辞

菌株を分与していただいた宮城県医師会健康センターならびに牛・豚の盲腸便を採取提供いただいた宮城県食肉衛生検査所の関係各位に感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省 HP (食中毒統計資料)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2) 小林妙子, 高橋恵美, 谷津壽郎, 齋藤紀行: 宮城県保健環境センター年報, **26**, 44-47 (2008)
- 3) 渡邊節, 中居真代, 宮崎麻由, 有田富和, 那須務, 沖村容子: 宮城県保健環境センター年報, **29**, 46-49 (2011)
- 4) Original Article: N Engl J Med, **341**, 1420-1425 (1999)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 “平成 22 年度食品の食中毒菌汚染実態調査について” 平成 23 年 3 月 30 日, 食安監発 0330 第 1 号 (2011)
- 6) 久高潤, 近藤海和, 嘉数浩, 中村正治, 平良勝也, 糸数清正, 安里龍二: 沖縄県衛生環境研究所年報, **40**, 65-70 (2006)
- 7) 中嶋洋, 狩屋英明, 大島律子, 国富泰二: 岡山県環境保健センター年報, **28**, 63-67 (2004)
- 8) 永田暁洋, 山崎史子, 石畠史, 大村勝彦: 福井県衛生環境研究センター年報, **10**, 128 (2011)
- 9) 大饗英章, 岡田和子, 芝美和, 田中博: 愛媛県食肉衛生検査センター平成調査研究報告(2002), 平成 14 年度日本獣医公衆衛生学会講演要旨集
- 10) 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 阪脇廣美, 長井章, 鈴木宣夫他: 日本獣医師会雑誌 **57**, 393-397(2004)
- 11) 仁和岳史, 高馬洋之, 岡田峰幸, 武田憲生, 朝原幸穂, 小野寺功, 西阪めぐみ, 岡野肇: 千葉県東総食肉衛生検査所調査研究報告(2010)
- 12) 小野聡美, 吉岡幸信, 小野寺瑞穂, 齋藤直: 宮城県食肉衛生検査所調査研究報告(2008)
- 13) 竹田義弘, 東久保靖, 小川博美: 広島県保健環境センター研究報告, **10**, 19-27 (2002)