

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

堀田 剛・深江弘恵・大浦裕子・河野喜美子・山本正悟

Study on contamination of *Campylobacter* and *Salmonella* in chickens, and relationship between contaminated chickens and food poisoning

Takeshi HORITA, Hiroe FUKAE, Yuko OURA, Kimiko KAWANO, Seigo YAMAMOTO

Abstract

Campylobacter and *Salmonella* are important pathogens of food poisoning. We surveyed the contamination by *Campylobacter* and *Salmonella* in raw chickens, sliced raw chickens and seared chickens collected from slaughterhouses, meat shop and restaurants. *Campylobacter* were detected from chickens in slaughterhouse, meat shop and restaurants at the rate of 100%(5/5), 45%(15/33), 28%(5/18), respectively, while those were detected from raw chickens, sliced raw chickens and seared chickens at the rate of 100%(9/9), 45%(7/33), 26%(9/25), respectively. *Salmonella* were detected from chickens in slaughterhouses, meat shops and restaurants at the rate of 0 % (0/5), 39% (13/33), 11% (2/18), respectively, while those were detected from raw chickens, sliced raw chickens and seared chickens at the rate of 0 % (0/9), 7.7% (4/13), 32% (11/34).

We performed serotyping and genetic analysis for *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated from patients, healthy carriers and chickens in Miyazaki prefecture during 2007-2009.

Most of *Campylobacter* isolates were not able to determine serotype. Two *Campylobacter* strains from two foods (chicken) showed the same genetic patterns by Pulse field Gel electrophoresis (PFGE).

On the other hand, the dominant serovar of *Salmonella* isolates were *Salmonella* (*S.*) Enteritidis (29 strains), *S. Corvalis* (24 strains), *S. Infantis* (16 strains), *S. Thompsons* (13 strains), and *S. Schwarzengrund* (10 strains). *S. Corvalis* strains from a healthy carrier and a chicken showed the same genetic patterns by PFGE. And, *S. Corvallis* strains from two healthy carriers also showed the same patterns by PFGE.

These results suggest that contamination by *Campylobacter* or *Salmonella* might spread to foods and people through distribution route.

Key word: *Campylobacter*, *Salmonella*, serovar, PFGE, chicken, carrier, healthy carrier

はじめに

平成 21 年の全国食中毒統計（厚生労働省）¹⁾ では、食中毒 1048 件中、カンピロバクター属菌が原因物質の約 32% (345 件)、サルモネラ属菌が約 6% (67 件) を占め、公衆衛生上大きな問題となっている (Fig.1) .そこで、宮崎県は、食肉による食中毒防止を図ることを目的とし、平成 20 年度から 3 年計画で、「みやざき県産食鳥肉」安全・安心衛生確保事業を立ち上げた。本事業は、①生食用食鳥肉の成分規格目標・加工基準目標の策定、②生食用食鳥肉の食中毒原因菌汚染実態調査の実施、③食鳥肉取扱業者等に対する衛生講習会等の実施、からなっており、当所および保健所検査部門では、②の項目を担当し、平成 20 年度、みやざき県産鶏肉製品のカンピロバクター属菌、サルモネラ属菌による汚染状況を調査した。

この調査において、カンピロバクター属菌、サルモネラ属菌による、鶏肉の汚染が認められたことから、我々は上記事業をさらに進め、これらの菌を原因とした食中毒と鶏肉製品との関連を明らかにする目的で、集団あるいは散発の下痢症や食中毒患者由来株、健康保菌者由来株および鶏肉製品由来株について、血清型別試験、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析を実施した。その検討結果についても併せて報告する。

材料と方法

1 材料

1) 供試食品

「みやざき県産食鳥肉」安全・安心衛生確保事業において、食肉処理施設から 5 検体、食肉販売業者から 32 検体、飲食店から 18 検体、合計 56 検体の鶏肉製品を収去し、これらを検体として用いた。これらの検体を製品別に分類すると、生肉が 9 検体、刺身が 13 検体、たたきが 34 検体であった。なお、鶏肉を「さしみ」と標記して販売するものを刺身、鶏肉の表面を炙る工程を加え、「たたき」と標記して販売するものをたたきと分類した。

2) 供試菌株

a) *Campylobacter* 属菌

上記の事業で収去した食品 56 検体中 25 検体か

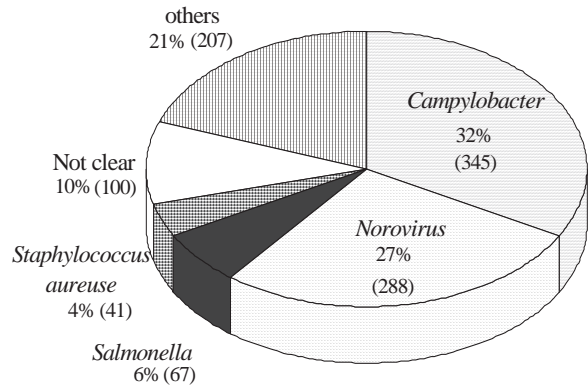


Fig. 1 The causative agent of 1048 food poisoning cases in Japan, 2009

ら分離された 28 株のうち、17 株と、平成 19~21 年度に宮崎県内で検出された患者由来株 8 株併せて合計 25 株を血清型別試験および PFGE に用いた。

b) *Salmonella* 属菌

血清型の集計には、上記事業で収去した食品 56 検体中 15 検体から分離されたサルモネラ属菌 15 株、および他の収去検査にて鶏ミンチや鶏タタキ、根切りもやしなどから検出された 18 株を含む、33 株を食品由来株として用いた。また、平成 20~21 年度に宮崎県内で検出された患者由来株 62 株、保菌者由来株 52 株、合計 147 株を用いた。なお、1 検体から同じ血清型の菌が複数分離された場合、その検体からの当該血清型の検出株数は 1 株とした。

また、PFGE には、上記事業でサルモネラが陽性となった食品 15 検体から分離された 23 株、上記事業以外の食品由来株 4 株、患者由来株 6 株、保菌者由来株 10 株、合計 43 株を用いた。

2 検査方法

1) 血清型別試験

a) *Campylobacter* 属菌

市販のカンピロバクター診断用免疫血清（デンカ生研）を使用し、マイクロプレート法で実施した。

b) *Salmonella* 属菌

市販のサルモネラ診断用免疫血清（デンカ生研）を使用し、菌体抗原 (O 抗原) についてはスライド凝集法、鞭毛抗原 (H 抗原) については試験管凝集法で実施した。

2) PFGE

a) *Campylobacter* 属菌

八尋らの方法²⁾に準じて実施した。すなわち、CCDA

培地（日水製薬）培養菌を超純水に懸濁（MacFarland5 程度の濃度）し、アガロースと混合・固化して、アガロースブロックとした。続いて、ブロックを、Proteinase K（1mg/ブロック、和光純薬）で50℃、1夜反応させたのち、Pefabloc SC（4mM, AEBSF）処理及びTEバッファーによる洗浄でProteinase Kを失活・除去した。その後、ブロックを、制限酵素 *Sma* I（30U/ブロック, TAKARA）及び *Kpn* I（30U/ブロック, TAKARA）で、37℃、1夜反応させ、泳動用アガロースゲルに充填し泳動した。泳動は、0.5×Tris-Borate-EDTA バッファー（0.5×TBE, 日本ジーン）を用い、6V/cm, パルス時間 6.8-34.8秒, 12-14℃の条件で、CHEF DR IIIにより、19時間行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色した画像を解析ソフト（Fingerprinting II, Bio-Rad）を用いて解析した。

b) *Salmonella* 属菌

米国 CDC 法に準じて国立感染症研究所が作成したプロトコールにより実施した³⁾。すなわち、トリプトソイブイオン（TSB, 日水製薬）で37℃1夜培養し SeaKem Gold Agarose, Cambrex）と混合・固化し、アガロースブロックとした。続いて、ブロックを、*Campylobacter* 属菌と同様の方法で、*Xba* I（30U/ブロック, Roche）及び *Bln* I（30U/ブロック, TAKARA）で、37℃、1夜反応させ、泳動用アガロースゲル（SeaKem Gold Agarose, Cambrex）に充填し、泳動を行った。泳動は、0.5×TBE を用い、6V/cm, パルス時間 2.2-63.8秒, 14℃の条件で、CHEF DR III（Bio-Rad）により、19時間行った。泳動後、*Campylobacter* 属菌と同様の方法で解析した。

結果

1 *Campylobacter* 属菌による汚染状況

「みやぎ県産食鳥肉」安全・安心衛生確保事業において収去された食品の *Campylobacter* 属菌による汚染率は、食肉処理施設で 100%（5/5）、食肉販売店で 45%（15/33）、飲食店で 28%（5/18）であった（Table 1）。また、製品別に見た汚染率は、生肉で 100%（9/9）、刺身で 54%（7/13）、たたきで 26%（9/34）であった（Table 2）。これらの汚染された 25 食品から 28 株の *Campylobacter*

属菌が分離され、21 株が *C. jejuni*、7 株が *C. coli* であった。

2 *Campylobacter* 属菌における血清型別試験と PFGE

上記食品由来株のうち 17 株（*C. jejuni* 16 株、*C. coli* 1 株）と患者由来株 8 株（*C. jejuni* 7 株、*C. coli* 1 株）について血清型別試験を行った結果、患者由来の 2 株が F 群-0 群の混合型に型別され、食品由来の 3 株がそれぞれ A 群、G 群、Y 群に 1 株ずつ型別された（Table 3）。それ以外の株は、血清型不明となった。

また、上記 25 株について PFGE を行った結果、制限酵素 *Sma* I で 22 種、*Kpn* I で 22 種にグループ分けされた。また、血清型不明であった食品由来株のうち、異なるロットの食品から分離された 2 株（No. 5 と No. 6）が同じ切断パターンを示した（Fig. 2）。

3 *Salmonella* 属菌による汚染状況

Salmonella 属菌による汚染率は、食肉処理施設で 0%（0/5）、食肉販売店で 39%（13/33）、飲食店で 11%（2/18）であった（Table 1）。また、製品別に見た汚染率は、生肉で 0%（0/9）、刺身で 31%（4/13）、たたきで 32%（11/34）であった（Table 2）。

4 *Salmonella* 属菌における血清型別試験と PFGE

血清型別試験を行った結果、患者からは、*Salmonella* (*S.*) *Enteritidis*（28 株）が最も多く、次いで *S. Thompson*（7 株）、*S. Stanley*（5 株）、*S. Typhimurium*（5 株）が検出された。また、保菌者からは、*S. Corvallis*（14 株）が最も多く、次いで *S. Infantis*（6 株）、*S. Thompson*（6 株）、*S. Schwarzengrund*（6 株）が多かった。一方、食品由来株では、*S. Corvallis*（9 株）が最も多く、次いで *S. Infantis*（6 株）、*S. Manhattan*（5 株）が多かった（Table 4）。なお、Table 4 には、検出数の多かった上位 10 血清型を示した。

これらの血清型のうち、食品と人の双方から分離された *S. Corvallis* と *S. Infantis* の菌株を中心に PFGE を行った。その結果、制限酵素 *Bln* I で 23 種、*Xba* I で 26 種にグループ分けされた。また、*S. Corvallis* において、平成 20 年 9 月に宮崎市の保菌者由来株（Fig. 3 の No. 38）と平成 20 年 7 月に綾町で収去された食品由来株（No. 17）、平成 20 年に分離された宮崎市（No. 37）と都城市の保菌者由来株（No. 39）で切断パターンが一致した。さらに、平成 20 年に高千穂町で収去された同一食品から分離さ

れた *S. Corvallis* 2 株 (No. 26 と No. 27) と、平成 20 年に清武町で収去された同一食品から分離

された *S. Infantis* 2 株 (No. 14 と No. 15) で、それぞれ切断パターンが一致した (Fig. 3).

Table 1 The number of detection of *Campylobacter* and *Salmonella* strains from chickens of slaughterhouse, meat shop and restaurant, respectively.

Source from	total	<i>Campylobacter</i>		<i>Salmonella</i>	
		positive	negative	positive	negative
slaughterhouse	5	5	0	0	5
meat shop	33	15	18	13	20
restaurant	18	5	13	2	16
total	56	25	31	15	41

Table 2 The number of detection of *Campylobacter* and *salmonella* strains from raw chickens, sliced raw chickens, and seared chickens.

Sample from	total	<i>Campylobacter</i>		<i>Salmonella</i>	
		positive	negative	positive	negative
raw chicken	9	9	0	0	9
sliced raw chicken	13	7	6	4	9
seared chicken	34	9	25	11	23
total	56	25	31	15	41

Table 3 *Campylobacter* serotype from patients, healthy carriers and foods (chickens).

Stain No.	sample	serotype	Stain No.	sample	serotype
1	patient	UT	14	food	UT
2	patient	F ,O	15	food	UT
3	patient	F ,O	16	food	-
4	food	G	17	patient	UT
5	food	UT	18	patient	UT
6	food	UT	19	food	-
7	patient	UT	20	food	-
8	food	A	21	food	UT
9	food	UT	22	food	UT
10	food	UT	23	food	UT
11	food	UT	24	food	UT
12	patient	UT	25	patient	UT
13	food	Y			

UT : untyped - : untested

Table 4 *Salmonella* serovars from patients, healthy carriers and foods (chickens).

serovar	antigen	patient	carrier	food	total	
1	<i>S. Enteritidis</i>	09 : g, m : -	28	1	0	29
2	<i>S. Corvallis</i>	08 : z4, z23 : -	1	14	9	24
3	<i>S. Infantis</i>	07 : r : 1, 5	4	6	6	16
4	<i>S. Thompson</i>	07 : k : 1, 5	7	6	0	13
5	<i>S. Manhattan</i>	08 : 6 : d : 1, 5	1	4	5	10
6	<i>S. Schwarzengrund</i>	04 : d : 1, 7	1	6	2	9
7	<i>S. Agona</i>	04 : f, g, s : -	0	5	2	7
8	<i>S. Stanley</i>	04 : d : 1, 2	5	1	0	6
9	<i>S. Typhimurium</i>	04 : i : 1, 2	5	0	0	5
10	<i>S. Cerro</i>	018 : z4, z23 : -	1	1	2	4

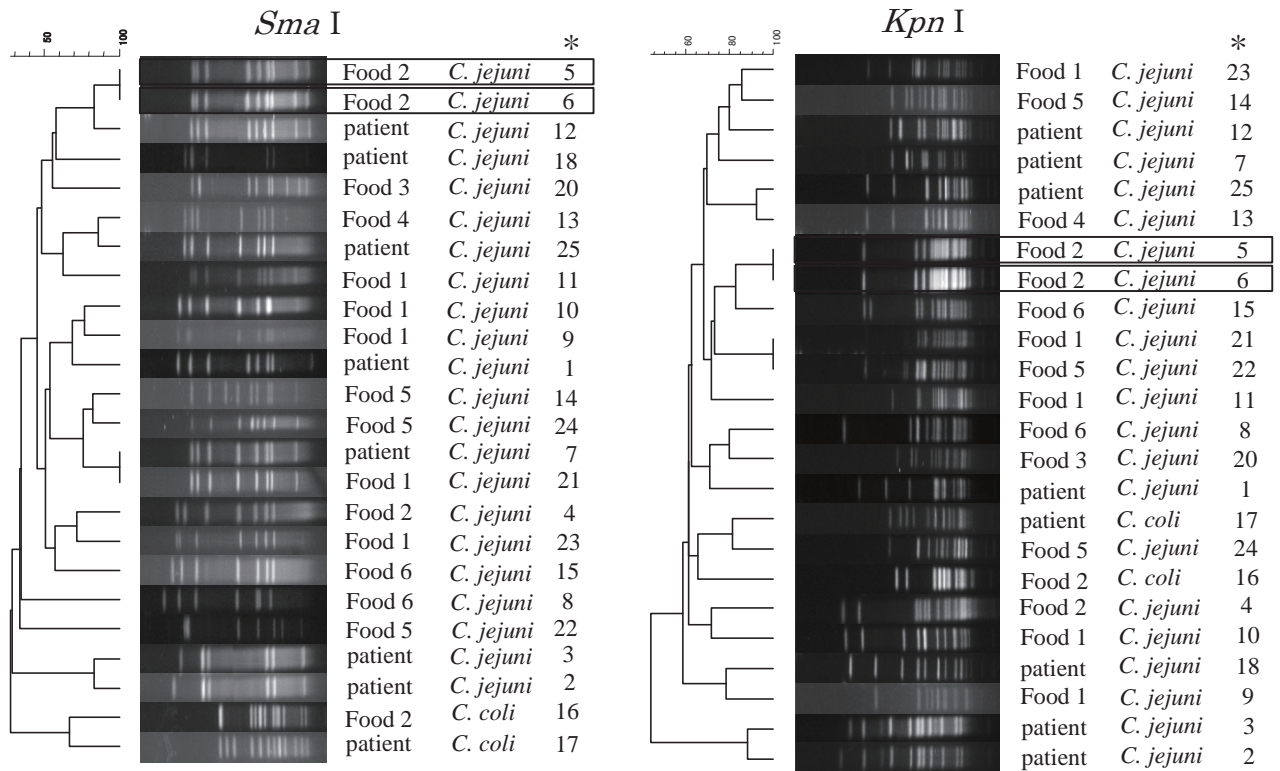


Fig.2 Result of gene analysis by PFGE of *Campylobacter*

Food 1 is seared chicken, Food 2 is sliced raw chicken, Food 3 is chicken liver, Food 4 is chicken breast, Food 5 is chicken tenderloin, Food 6 is chicken thigh. *The number indicated is same to the strain No. in table 3.

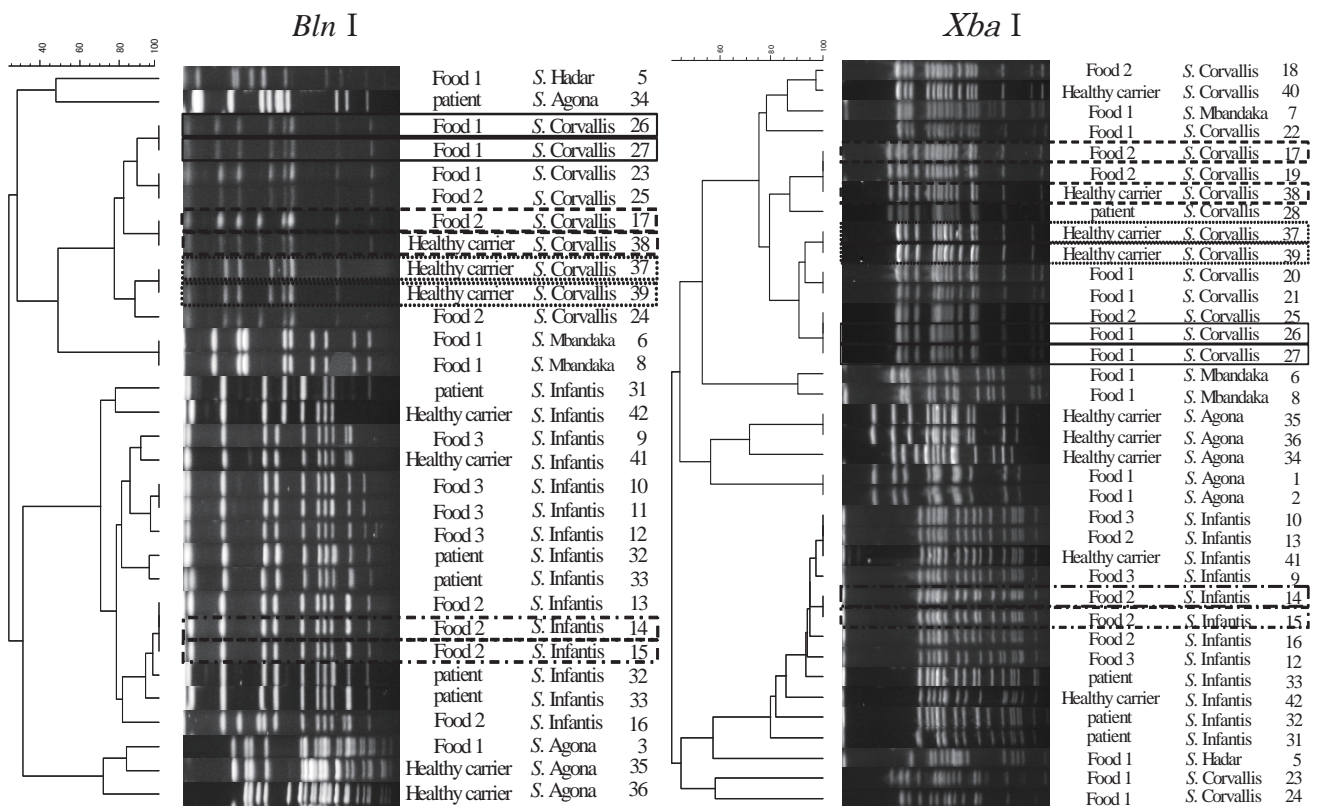


Fig.3 Result of gene analysis by PFGE of *Salmonella*

Food 1 is seared chicken, Food 2 is sliced raw chicken, Food 3 is minced chicken.

考察

「みやぎ県産食鳥肉」安全・安心衛生確保事業で収去された鶏肉製品における *Campylobacter* 属菌による汚染率は、食肉処理場由来鶏肉で 100%と最も高く、食肉販売店由来で 45%、飲食店由来で 28%であった。このことから、*Campylobacter* 属菌による汚染率は食品の流通による日数の経過に従って減少する傾向があると推測された。これは、①*Campylobacter* 属菌は微好気性菌であり大気中では不安定で死にやすいこと、②*Campylobacter* 属菌は 25℃以下では増殖しないこと、③生食用鶏肉製品は冷蔵状態で流通されること等から、鶏肉製品中の *Campylobacter* 属菌は、鶏肉製品中で増殖せず、時間とともに減少していくからであろうと推測された。また、表面を炙るたたきという工程を加えることによって、さらに減少することが考えられた。

また、平成 20～21 年度に宮崎県内で検出された *Campylobacter* 属菌について血清型別試験を実施した結果、多くの菌株が血清型不明であった。これは、全ての血清型に対応する免疫血清が市販されていないためと考えられる。

PFGE は、菌を制限酵素で切断し、その切断パターンを比較することによって、菌の系統の近似性を推測する方法であるが、*Campylobacter* 属菌の PFGE の結果、2 つの食品由来株が同一の切断パターンを示した。今回の調査では、2 つの制限酵素を使用して、精度を上げているが、疫学的背景の情報が不十分であるため、解析結果に限界があることは否めない。しかし、この PFGE の結果から、由来の共通した *Campylobacter* 株による汚染が食品間で広がっている可能性も推測された。

一方、収去食品における *Salmonella* 属菌の汚染率は、食肉処理施設由来鶏肉では 0%であったのに対し、食肉販売店由来、飲食店由来では、それぞれ、39%、11%であった。鶏肉のサルモネラ属菌汚染については多くの報告があり、楠ら⁴⁾は、食鳥処理場由来の食鳥肉の検出率は 22.9%であったのに対し、食肉販売店由来の食鳥肉での検出率は 38%であったと報告している。また、山田ら⁵⁾も食鳥処理場由来の若鶏での検出率は 26.2%だったのに対し、市販若鶏肉での検出率は 43.2%であっ

たと報告している。これらの成績では、いずれも食鳥処理場での検出率よりも販売店での検出率が高く、その理由を食肉処理後の加工工程や販売店での取扱による汚染増幅によるものであろうと推測している。今回の調査では、食肉処理施設でサルモネラ属菌が検出されなかったが、それは検体数が 5 検体と少なかったためと思われる。また販売店でのサルモネラ属菌汚染率は 38%と上記報告と同程度であり、食肉処理後の加工工程や販売店での取扱による汚染の増幅があると推定される。同様に、生肉で 0%、刺身で 31%、たたきで 32%という結果についても、販売店や飲食店で加工処理することで、汚染が増幅されたと推定される。

Salmonella 属菌 147 株の血清型別試験を行った結果、*S. Enteritidis* が最も多く、次いで *S. Corvallis*、*S. Infantis*、*S. Thompson* が多く検出された。このうち、*S. Corvallis* と *S. Infantis* は、患者や保菌者だけでなく、鶏肉からも高率に検出され、鶏肉は人への感染源となっていると考えられた。また、株数は少ないが、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan*、*S. Agona*、*S. Cerro* についても、患者、保菌者、鶏肉製品で検出され、鶏肉が人への感染源となる可能性が考えられた。一方、*S. Enteritidis* と *S. Thompson* は患者や保菌者から検出されたが、鶏肉からは検出されなかった。このことから、*S. Enteritidis* や *S. Thompson* については、主要な感染源が、鶏肉以外の食品である可能性も考えられる。実際、*S. Enteritidis* においては、鶏卵が主な感染源であり、鶏卵を原因食品とした食中毒が高頻度に発生している。しかし、*S. Thompson* については、ウエディングケーキ、スッポン、調理パン、ローストビーフを原因食品とした食中毒の報告がある^{6～9)}が、主要な感染源が何であるかは不明である。

また、患者・保菌者での検出状況から、血清型により、人への病原性が異なることが推測された。*S. Enteritidis* や *S. Typhimurium* は、主として患者から検出され、保菌者からはまれにしか検出されないことから、人への病原性が強いと思われる。逆に、*S. Corvallis* は、保菌者からの検出がほとんどで、患者からは少ないことから、病原性が弱いと考えられる。*S. Infantis* や *S. Thompson* はその中間であると考えられる。

PFGE の結果、*Salmonella* 属菌では、*S. Corvallis*

の株の中に、保菌者と食品、及び2人の保菌者で一致する切断パターンを示す株が認められた。このことから、汚染食品が流通・販売・喫食される過程で、他の食品や人の間に汚染を広げている可能性があると考えられた。特に、食品と保菌者由来株の切断パターンが一致した *S. Corvallis* は、県内で *S. Enteritidis* について多く分離される血清型であることから、県内の人や食品中に汚染が広がり、これらの人や食品が新たな人への感染源となっている可能性が考えられる。

今後は特に、実際の食中毒事例で、食品からの検出を積極的に行い、感染源を明らかにする努力をしていきたい。

謝辞

本研究にご協力いただいた中央保健所、延岡保健所、都城保健所の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料 平成 21 (2009 年) 食中毒発生状況
- 2) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美：「*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討」, 厚生労働省科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書
- 3) 厚生労働科学研究 新興・再興感染症 研究事業 平成 15-17 年度総合研究報告書 (分担報告)：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究
- 4) 楠くみ子, 神真知子, 岩谷美枝, 石上武, 森本敬子, 斉藤香彦, 山田澄夫：東京都多摩地区の国産食鳥肉のサルモネラ汚染状況と分離株の血清型別および薬剤耐性 (1992~1999) . 日本食品微生物学会雑誌, 17, 207-212 (2000)
- 5) 山田亨, 河野喜美子, 八木利喬：宮崎における家畜, 食肉・食鳥処理場の汚水, 鶏肉および河川水の *Salmonella* *Corvallis* 汚染実態調査
- 6) 宮城県保健環境センター：ウエディングケーキが原因食品となった *Salmonella* *Thompson* 食中毒事例-宮城県
- 7) 群馬県衛生環境研究所：スッポンが原因と推定された *Salmonella* *Thompson* 食中毒事例-群馬県
- 8) 伊藤武夫, 村田四郎, 片山淳：調理パンによる *Salmonella* *Thompson* 集団食中毒第 I 報 主として疫学調査について：山口獣医学雑誌, 第 9 号, 7~10 頁
- 9) ProMed-mail 国際感染症学会メーリングリスト：2005 年 6 月 10 日 (2)