

# 宮城県内で鶏肉と散発下痢症患者から分離された サルモネラ菌の血清型，薬剤感受性試験および PFGE 解析

Serovars , Drug Susceptibility I and PFGE of *Salmonella*  
from Chicken and Sporadic diarrhea in Miyagi

渡邊 節 中居 真代 宮崎 麻由  
有田 富和 那須 務 沖村 容子

Setsu WATANABE, Masayo NAKAI, Mayu MIYAZAKI  
Tomikazu ARITA, Tsutomu NASU, Yoko OKIMURA

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ゲ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。血清型別は *Salmonella* *Infantis* (以下 SI) が 18株 (90%) を占めた。薬剤耐性試験の結果，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。2005年から2010年の6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) 268株を同定したところ，血清型別は 44種類に型別され，血清型では *S. Enteritidis* (以下 SE) 47株，*S. Typhimurium* (以下 ST) 34株，SI が 22株であった。鶏由来株，2008～2010年分離された散発下痢症由来株および 2009年食中毒由来の 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由来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 : *Salmonella* ; 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<sup>1)</sup>。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 10年間の患者数 500人以上の食中毒事例 27件のうち 5件がサルモネラによる事例である<sup>2)</sup>。また，統計上処理される食中毒による患者の他に，市中では散発的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耐性を調査してきた<sup>3)</sup>。2010年はこれに加えて，市販鶏肉および食鳥処理場への鶏搬入用ゲージのふきとりを実施し，散発下痢症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鶏肉 50件を対象としサルモネラ菌を分離した。また 2010年9月，食鳥処理場に搬入されるゲージのふきとりを 20検体実施した。

2005年から2010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 268株を分析した。また，PFGE は，2010年検出の鶏関連検出株 8株，2008～2010年の散発下痢症株 7株および 2009年発生した食中毒由来 1株の合計 16株の SI 株について実施した。

### 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°C±1°C, 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°C, 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 XSAL (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。

鶏搬入用ゲージ 20件はふきふきチェックⅢ (栄研器材) 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。

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

SI 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ヨンで 35°C で培養し McFarland 0.5 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 $\mu$ g)、フォスホマイシン(FOM:50 $\mu$ g)、ノロフロキサシン(NFX:10 $\mu$ g)、トスフロキサシン(TEX:5 $\mu$ g)、レボフロキサシン(LVX:5 $\mu$ g)、セファロチン(CET:30 $\mu$ g)、セフォタキシム(CTX:30 $\mu$ g)、セフトジジム(CAZ:30 $\mu$ g)、セフェピム(CFP:30 $\mu$ g)、セフォキシチン(CFX:30 $\mu$ g)、カナマイシン(KM:30 $\mu$ g)、テトラサイクリン(TC:30 $\mu$ g)、イミペネム(IPM:10 $\mu$ g)の13剤のディスクを各シャーレ4剤ずつ置き、35 $^{\circ}$ 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。

PFGEによる遺伝子解析はハートインヒュージョンブイオン培地(栄研化学)で一夜培養し、Ribotら<sup>4)</sup>の方法に準じてプラグを作成し、35UのXba IおよびBlu Iで37 $^{\circ}$ C一晚処理した。電気泳動条件は0.5 $\times$ TBEbuffer, 1%SeaKemGold アガロースゲル、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 Mapped (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 結果および考察

#### 3.1 サルモネラ汚染状況

2010年県内で購入した市販鶏肉15件(30.0%)から16株のサルモネラ菌が、鶏搬入用ゲージふきとり検体4検体(20.0%)から4株のサルモネラ菌が分離された。両者からの検出は19検体(27.1%)であった。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)。

#### 3.2 散発下痢症サルモネラ感染者の血清型

2005年から2010年の6年間に分与を受けた散発下痢症株は268株でそのうち血清型が判明した44菌種254株の中では、SEが最も多く47株(18.5%)、次いでST34株(13.4%)、SI22株(8.6%)でこの3菌種で全体の40.5%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年はST、2008年はSTとS.Bareilly、2009年はSI、2010年はS.RissenとSIが多かった(表2)。

#### 3.3 薬剤感受性試験

鶏肉から分離された菌株および2005~2010年散発下痢症サルモネラ感染者株の薬剤耐性出現状況と各薬剤に対する薬剤耐性率を表3、表4に示した。鶏肉と鶏搬入用ゲ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。鶏肉

はTCやKMに耐性を示し、搬入用ゲージは加えてABPやCFX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12株、KM耐性が6株、ABP耐性とCET耐性は各5株、CFX耐性株は4株であった。鶏搬入用ゲージから分離した株はすべてABP, CET, CFX, TC4剤の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54株であった。1剤耐性株が39株、2剤耐性株が14株で、3剤耐性菌も1株あった。薬剤別にはTCに耐性をもつ株が40、ABP耐性が12、FOM耐性10、KM耐性が8であった。

#### 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)。検出された菌株は散発下痢症由来の1株を除き(レーン16:グループE)80%以上の相同性を示した。ふきとり検体由来2株(レーン1, 2)、2010年散発下痢症由来1株(レーン3)と鶏肉由来株(レーン4)がAグループに入り、鶏肉由来2株(レーン5, 6)と2008年(レーン7)および2010年散発下痢症株(レーン8)がBグループとなった。さらに、鶏肉3株(レーン9~11)がグループCに、2009年2月発生の食中毒由来株(レーン12)と2009年散発下痢症由来株(レーン13~15)がグループDになった。

### 4 まとめ

サルモネラ食中毒発生病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<sup>5)~8)</sup>と同様であった。

本県の過去6年間の散発下痢症由来株はSE, ST, SIで全体の38.4%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2007年から2010年の全国集計でSEは33.8%であるのに対し、本県は17.5%で、SEの全体に占める割合は少なかった。一方、STは全国の倍で12.7%、SIは全国とほぼ同じ8.2%であった。SEの検出率の低下に伴って、SE以外の血清型が分離されるようになっているが、多くのサルモネラが鶏を宿主としていることから、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。

薬剤耐性パターンは血清型によって特徴があった。散発下痢症由来SEは2.2%、STは32.4%、SIは40.9%で竹田ら<sup>9)</sup>の報告60.3%、100%、83.3%とは大きく異なった。鶏由来SI薬剤耐性株は72.2%であった。竹田らの報告ではブロイラー腸管内容物から分離SI株は100%耐性菌で、同様の結果が得られた。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

ABPC, FOM に耐性をもつものが、散発下痢症由来株 22 株、鶏由来 5 株あり、また、耐性薬剤数も散発下痢症由来株より鶏由来株が多かったのは、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, TEX, LVX に耐性の株はなかった。

PFGE による遺伝子解析の結果、制限酵素 Xba I では大きく 5 グループに分けられた。2010 年散発下痢症由来の 1 株 (レーン 16 : E) を除き 4 グループ (A~D) は 80 数%以上の相同性となった。A, B および C のグループ内には、鶏肉由来株と散発下痢症由来株が含まれ、D グループには 2009 年発生した食中毒由来株と散発下痢症株が入った。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汚染が示唆された。特定の菌株が広く環境を汚染し、食品を介した diffuse outbreak があると思われる。

SI が鶏肉を高濃度に汚染し、散発下痢症由来の株と遺伝子パターンが一致することは、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 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政策が必要で、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、他の食肉の SI 汚染状況も確認し、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。

## 5 参考文献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**30**，203 (2009)
- 2) 食品衛生研究：**60**，9，90 (2010)
- 3) 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)
- 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) 山崎史子，永田暁洋，石畝史，浅田恒夫：福井県衛生環境研究センター年報，**6**，137 (2008)
- 9) 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)
- 10) 山田万希子，原信行，白木豊，松川洋子，野田伸司：岐阜県保健環境研究所報，**14**，23-27 (2006)

表 1 市販鶏肉及び食鳥処理場搬入ゲージのサルモネラ汚染状況 (株数)

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)
搬入用ゲージ	20	4(20.0)	Infantis	4(100.0)
鶏肉全体	70	19(27.1)	Infantis	18(90.0)
			Typhimurium	1(5.0)
			Virchow	1(5.0)

表 2 市中サルモネラ感染者由来血清型別

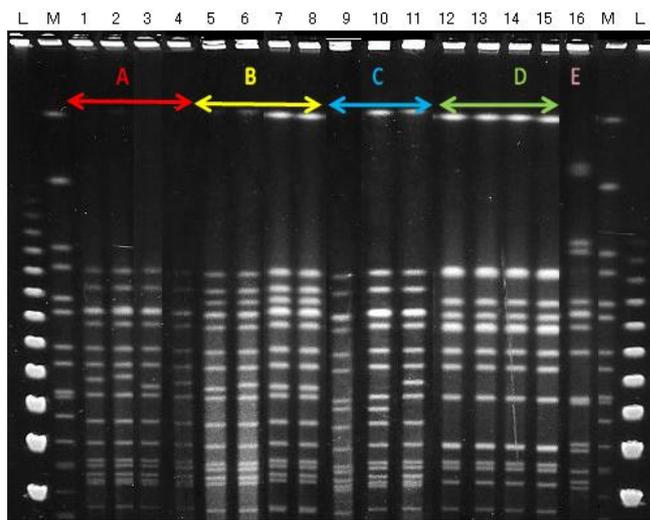
合計	2005年		2006年		2007年		2008年		2009年		2010年	
Enteritidis 47	Enteritidis 12	Enteritidis 9	Typhimurium 8	Typhimurium 13	Enteritidis 14	Rissen 15						
Typhimurium 34	Istanbul 12	Typhimurium 5	Istanbul 7	Bareilly 7	Infantis 3	Enteritidis 8						
Infantis 22	Typhimurium 6	Infantis 4	Infantis 5	Braenderup 6	Typhimurium 2	Infantis 5						
Istanbul 19	Saintpaul 5	Agona 3	Saintpaul 4	Infantis 4	Saintpaul 2	Nagoya 3						
Rissen 15	London 3	Saintpaul 2	Hader 4	Virchow 2	その他 6	Agona 2						
Saintpaul 14	Agona 3	Stanly 2	Bareilly 3	Carvallis 2		Thompson 2						
Bareilly 11	Braenderup 3	Virchow 2	Montevideo 2	Kottbus 2		その他 10						
Braenderup 11	Montevideo 3	その他 14	Thompson 2	Nagoya 2								
Agona 8	その他 16		Enteritidis 2	Enteritidis 2								
Virchow 7			その他 9	その他 6								
その他 80												
計 268	63	41	46	46	27	45						

表3 鶏肉由来株の薬剤耐性パターン

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4 散発下痢症由来株の薬剤耐性パターン (2005~2010年)

血清型	耐性株 (%)	耐性パターン			耐性株数
		1剤	2剤	3剤	
Enteritidis	1(2.2)	ABP			1
Typhimurium	6(17.6)	TC			6
	3(8.8)		ABP,TC		3
	1(2.9)		FOM,TC		1
Infantis	1(2.9)			ABP,KM,TC	1
	5(22.7)	TC			5
	1(4.5)	KM			1
	3(13.6)		KM,TC		3
Agona	2(25.0)	FOM			2
Bareilly	7(63.6)	FOM			7
Braenderup	1(9.1)	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
Saintpaul	3(21.4)	TC			3
Schwarzengrun	1(50.0)		KM,TC		1
Yovokome	1(100.0)	TC			1
04:i-	1(10.0)		ABP,KM		1
	3(30.0)		ABP,TC		3
		40	14	1	55



L: Lambda Ladder  
M: S. Braenderup  
レ-1: 鶏糞入用サ-ツ(A農場)      レ-9: 鶏肉(2010年/6月)  
レ-2: 鶏糞入用サ-ツ(B農場)      レ-10~11: 鶏肉(2010年/11月)  
レ-3: 散発下痢症由来株(2010/大崎)      レ-12: 食中毒(2009年2月/気仙沼)  
レ-4: 鶏肉(2010/6)      レ-13: 散発下痢症由来株(2009/仙南)  
レ-5~6: 鶏肉(2010/3)      レ-14: 散発下痢症由来株(2009/加美)  
レ-7: 散発下痢症由来株(2008/岩沼)      レ-15: 散発下痢症由来株(2009/蔵王)  
レ-8: 散発下痢症由来株(2010/蔵王)      レ-16: 散発下痢症由来株(2010/青葉区)

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