

福井県の市販鶏肉から分離された サルモネラおよびカンピロバクター (2007~2010)

永田暁洋・山崎史子・石畝 史・望月典郎

Characterization of *Salmonella* and *Campylobacter* Isolated from
Commercial Chicken Meat in Fukui Prefecture (2007~2010)

Akihiro NAGATA, Fumiko YAMAZAKI, Fubito ISHIGURO, Michio MOCHIZUKI

1. はじめに

2010年、全国では細菌性食中毒だけで580件の発生があり、細菌性の原因物質としては、例年同様、カンピロバクター・ジェジュニ/コリが1位(361件)、サルモネラ属菌が2位(73件)となっており、この2菌種の重要度は高いと言える。福井県においても、カンピロバクターおよびサルモネラ属菌が原因の食中毒がそれぞれ1件発生している。

一方で、食中毒の原因食品は、自然毒(キノコおよびフグ)を除くと、肉類およびその加工品が挙げられ、生および加熱不足の鶏肉が主なものであると考えられている。このことから、鶏肉における食中毒菌の汚染状況を把握することは重要である。当センターでは2007年から市販鶏肉のサルモネラ属菌汚染状況調査を開始した。さらに、2009年からはカンピロバクターの汚染状況調査も追加し、分離株の血清型別および薬剤感受性等を実施した。

2. 材料および方法

2.1 サルモネラ属菌

2.1.1 材料および分離方法

2007年4月から2010年9月までの期間に、福井市内の量販店で購入した市販鶏肉158検体を用いた。検体25gを225mlの緩衝ペプトン水で37℃、22時間培養し、その培養液1mlおよび0.1mlをテトラチオネート培地およびラパポート・バシリアディス培地に接種し、42℃、18時間培養した。その後、サルモネラ属菌は、MLCB培地およびクロモアガーサルモネラを用いて分離し、生化学性状等から判定した。分離株は、サルモネラ診断用免疫血清「デンカ生研」を用いてO抗原およびH抗原を定法により調べ、血清型別を行った。

2.1.2 薬剤感受性試験

血清型別を実施した株の薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠するKB法により実施した。すなわち、マクファーランド0.5に調製した菌液を、ミューラーヒントンS寒天培地(栄研化学)に綿棒で3方向塗抹し、各薬剤ディスクを寒天平板上に置いて37℃、18時間培養後に阻止円直径を測定した。供試薬剤は、アンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、スルフィゾキサゾール(Su)、ST合剤(ST)、ナリジクス酸(NA)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)、シプロフロキ

サシン(CPFX)およびセフトキシム(CTX)の計12剤とした。

2.1.3 β-ラクタマーゼ遺伝子

薬剤感受性試験でCTXに耐性あるいは中間の感受性を示した株について、*bla* 遺伝子のうち *bla_{SHV}*¹⁾、*bla_{TEM}*²⁾ および *bla_{CMY}*³⁾ の保有状況をPCR法により調べた。また、*bla_{CTX-M}* 保有株については、Shibataらの方法⁴⁾に基づき、CTX-Mグループ型別のPCR法を実施し、いずれかが陽性となった株については、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、NCBIのBLASTによる相同性検索でCTX-M型を決定した。

2.1.4 パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)

PFGEは国立感染症研究所の方法⁵⁾に基づき実施した。すなわち、菌株を低融点アガロースブロックに包埋し、制限酵素 *Xba*I でDNAを切断処理後、CHEF Mapperを用いて電圧6.0V/cm、パルスタイム5~50秒、バッファー温度12℃、泳動時間19.7時間の条件で電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下で撮影した。画像は、画像解析ソフトFingerPrinting IIを用いてUPGMA(unweighted pair group method with averages)法により処理し、菌株間の相同性を比較解析した。

2.1.5 ファージ型別

多剤耐性を示した *S. Typhimurium* の2株はファージ型別を国立感染症研究所に依頼した。

2.2 カンピロバクター

2.2.1 材料および分離方法

サルモネラ属菌の分離を試みた市販鶏肉検体のうち、2009年4月から2010年9月までの期間に購入した66検体を供試した。カンピロバクターの分離は、検体の25gを225mlのPreston培地に入れ、微好気条件で42℃、24時間培養した後、CCDA培地で42℃、48時間分離培養を行った。その後、カンピロバクターと疑われる集落について、鏡検、生化学的性状およびPCR法を実施し、分離同定した。

3. 結果および考察

3. 1 サルモネラ属菌

3. 1. 1 検出状況

2007年から2010年までの検出状況を表1に示す。4年総計では158検体のうち98検体(62.0%)から126株が分離された。分離率は2007年が64.1%、2008年が71.4%、2009年が54.3%および2010年が60.0%で、広島市保健所の報告(27.1%)⁶⁾や福岡県の報告(40.7%)と比較しても4年とも高い分離率となった。

表1 サルモネラ属菌の検出状況(2007-2010)

年	検体数	陽性検体数	陽性率(%)	分離株数
2007	64	41	64.1	53株
2008	28	20	71.4	27株
2009	46	25	54.3	34株
2010	20	12	60.0	12株
計	158	98	62.0	126株

3. 1. 2 血清型別

4年間で多く分離された血清型は、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund* および *S. Manhattan* で、分離株数はそれぞれ67株、28株および19株であった。血清型別の分離率の経年変化を図1に示す。*S. Infantis* が4年間を通じて高い分離率を示したほか、*S. Manhattan* の分離が増加傾向にあるのが特徴的であった。複数株が分離された他の血清型としては、*S. Thompson* が2008年および2009年に1株ずつ、また *S. Typhimurium* が2008年に1株および2009年に2株分離された。



図1 分離サルモネラ属菌の主な血清型の経年変化

3. 1. 3 薬剤感受性

供試した126株のうち、120株が何らかの薬剤に耐性を示した。年別の平均耐性数は3.3~3.8剤で大きな違いは見られなかった。各薬剤別の耐性率をみると(図2)、高いものから順にTC(88.9%)、Su(84.1%)、SM(75.4%)、KM(39.7%)、ST(29.4%)と続いた。キノロン剤であるNAの耐性率は15.1%であったが、近年出現が増加し公衆衛生上問題となっている、フルオロキノロン剤のCPFXに耐性を示す株は分離されなかった。

一方、フルオロキノロン耐性ととも問題となっている第3世代セファロスピリンのCTXについて、耐性を示す株は分離されなかったが、CTX低感受性株が5株(*S. Infantis*2株および*S. Manhattan*3株)分離された。うち4株が2010年に分離された株であることから、CTX感受性の低下傾向が危惧されるとともに、今後の出現動向に注意が必要と思われる。

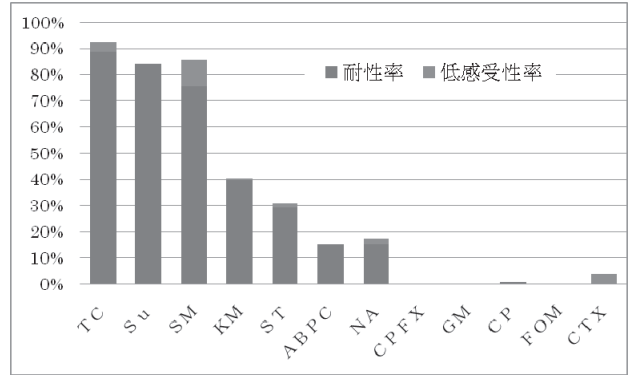


図2 薬剤別耐性率

3. 1. 4 β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

CTXに低感受性を示した5株(*S. Infantis*2株および*S. Manhattan*3株)について、PCR法による bla 遺伝子の検索の結果、*S. Manhattan*3株から bla_{TEM} が、*S. Infantis*1株からCTX-M-1グループの bla_{CTX-M} が検出された。*S. Infantis*の bla_{CTX-M} は、ダイレクトシークエンスおよびBLAST検索の結果、CTX-M-3と同定された(表2)。

今回は bla_{TEM} 型の決定を実施していないが、日本の鶏肉から分離されたサルモネラ属菌が保有している型としては、 bla_{TEM-20} 、 bla_{TEM-52} ⁷⁾などが報告されており、侵淫状況を把握するためにも型の決定をする必要があると考えられた。一方、 $bla_{CTX-M-3}$ 保有の*S. Infantis*については、田口らの報告⁸⁾があるのみであり、菌の遺伝子型比較および由来となった鶏肉の産地や流通経路などが判明すれば、汚染の広がりなどが明らかになるかもしれない。

表2 CTX低感受性株の bla 遺伝子保有状況

分離年	産地	血清型	bla 遺伝子
2007	A県	Infantis	-
2010	A県	Manhattan	bla_{TEM}
2010	B県	Infantis	$bla_{CTX-M-3}$
2010	A県	Manhattan	bla_{TEM}
2010	A県	Manhattan	bla_{TEM}

3. 1. 5 PFGE

血清型別のPFGE解析結果を示した(図3および図4)。*S. Infantis*は5株以外が約95%以上の相同性であり、多様性は見られなかった。A県由来株は、分離年および販売店舗が異なるにもかかわらず同一パターンを示すものが見られたほか、多様な遺伝子型も見られたことが特徴的であった。一方、C県由来株は16株中11株が97%以上の相同性を示してクラスターを形成したことから、同一クローン株による汚染の可能性が示唆された。

*S. Schwarzengrund*は2007年分離株とそれ以外とで2つのクラスターを形成したが、パターンとして大きな違いはなかった(89%の相同性)。2007年分離株のクラスターは、CおよびD産地由来株が78.6%を占めた一方、2008~2010年分離株のクラスターはBおよびD産地由来株が92.9%を占めており、産地での流行状況を反映しているものと思われた。また、*S. Manhattan*は1株を除いて95%以上の相同性を示した。

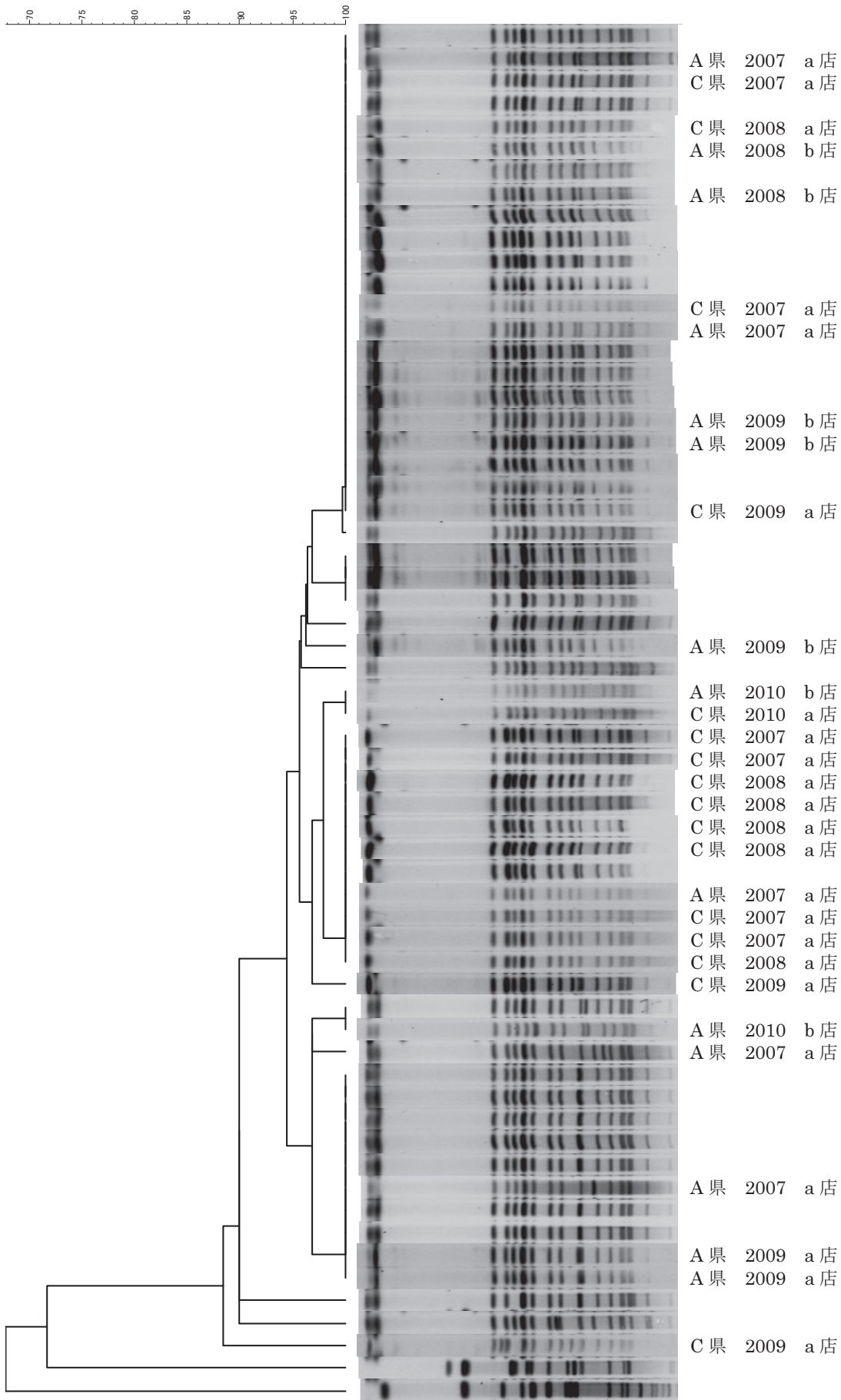


図3 *S. infantis* の PFGE 解析結果

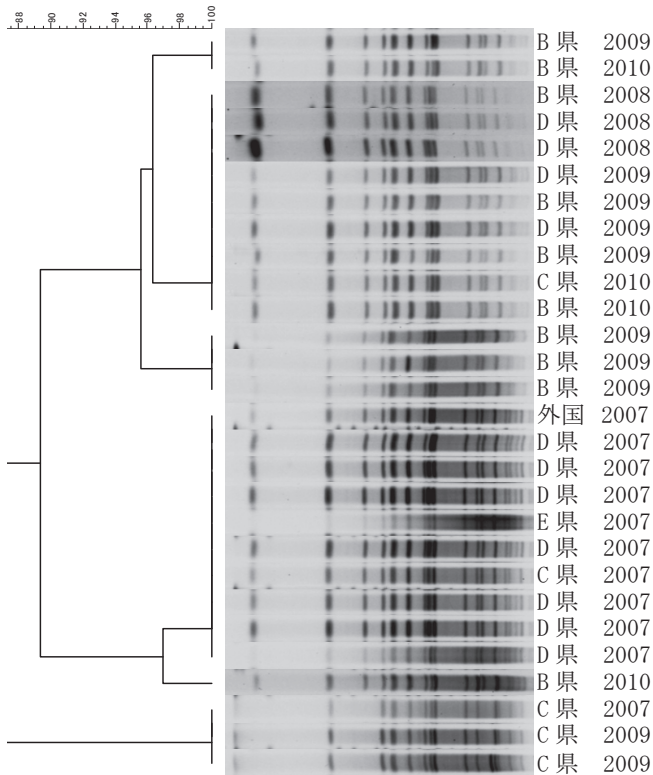


図4 *S. Schwarzengrund* の PFGE 解析結果

3. 1. 6 ファージ型別

2009年に分離された5剤耐性(ABPC、TC、SM、Su、KM)および2010年に分離された6剤耐性(ABPC、TC、SM、Su、ST、NA)の*S. Typhimurium* 2株のファージ型別結果は、UT(Untypable)およびDT194であった。多剤耐性サルモネラ属菌の代表格である*S. Typhimurium* ファージ型 definitive type 104(DT104)とは耐性パターンも異なっているが、1株がNA耐性であるなど引き続き注意を要すると思われた。

3. 2 カンピロバクター

カンピロバクターは66検体のうち37検体(56.1%)から検出され、いずれも*Campylobacter jejuni*であった。年別では、2009年が46検体のうち22検体(47.8%)から22株が分離された。季節別の検出率をみると(図5)、夏季(7~9月)が73.5%で最も高いが、次に冬季(1~2月)で62.5%となり、冬季であっても鶏肉の調理の仕方によってはカンピロバクター食中毒のリスクが高いことが示唆された。

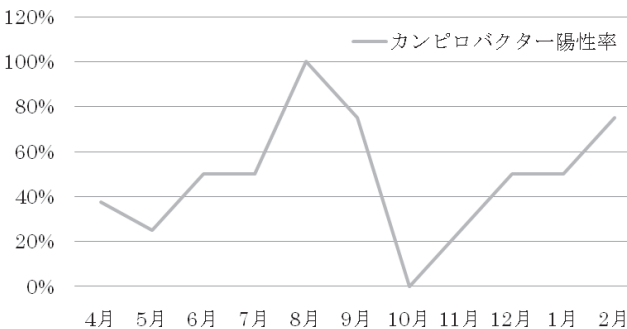


図5 2009年の月別カンピロバクター検出率

4. まとめ

2007年から2010年に市販鶏肉について、サルモネラ属菌(158検体)およびカンピロバクター(66検体)の検出を試みた。サルモネラ属菌の検出率は4年を通して高く(54.3%~71.4%)、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund* および *S. Manhattan* が多く分離された。薬剤耐性率はTC(88.9%)、Su(84.1%)およびSM(75.4%)が高かった一方、フルオロキノロン系薬剤耐性は見られなかったが、CTX 低感受性株が散見された。また、CTX 低感受性株の1株は、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla_{CTX-M-3}* を保有する *S. Infantis* であった。血清型別のPFGEによる分子疫学解析では、産地および年ごとにクラスターを形成する傾向が見られた。

謝辞

サルモネラ属菌のファージ型別を実施していただきました国立感染症研究所の泉谷秀昌先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Sutcliffe JG : Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR 322. Proc Natl Acad Sci USA ,75 3737-3741(1978)
- 2) Coudron PE, et al. : Occurrence and detection of extended-spectrum β-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a veterans medical center: seek and you may find. J Clin Microbiol, 35 2593-2597(1997)
- 3) Zhao S, et al. : Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport isolated from humans and food animals. J Clin Microbiol, 41 5366-5371(2003)
- 4) Shibata N, et al. : PCR Classification of CTX-M-Type β-Lactamase Genes Identified in Clinically Isolated Gram-Negative Bacilli in Japan. Antimicrob Agents Chemother ,50 791-795(2006)
- 5) 国立感染症研究所細菌部：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修マニュアル, 17-27(1997)
- 6) 坂本裕敬他：鶏肉におけるカンピロバクター及びサルモネラの感染状況 広島県獣医学会雑誌, 21 61-63(2006)
- 7) 松本裕子他：横浜市内の小売店より収去した国産鶏肉から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Infantis* における薬剤感受性の状況および基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の検出状況について 日食微誌, 27(1) 27-33(2010)
- 8) 田口 真澄：サルモネラの薬剤耐性動向 公衛研ニュース, 37 3-4(2008)