

# 沖縄県における家畜（豚、山羊、採卵鶏、ブロイラー）のサルモネラ保菌状況及び薬剤耐性について

久高潤<sup>1)</sup>、岩井愛子<sup>2)</sup>、須佐たまき<sup>2)</sup>、芳垣純子<sup>2)</sup>、稲嶺美奈子<sup>2)</sup>  
平良勝也<sup>1)</sup>、糸数清正<sup>1)</sup>、中村正治<sup>1)</sup>、安里龍二<sup>1)</sup>

## Serovars and Drug Resistance of *Salmonella* Isolates from Domestic Animals in Okinawa.

Jun KUDAKA, Aiko IWAI, Tamaki SUSAKI, Junko YOSHIGAKI, Minako INAMINE,  
Katsuya TAIRA, Masaji NAKAMURA, Ryuji ASATO

1) 沖縄県衛生環境研究所、2) 沖縄県中央食肉衛生検査所

**Abstract :** Between Dec 2001 and Feb 2003, a total of 1187 domestic animals (cows, goats, laying hens, and broilers) swab specimens were collected from processing plants in Okinawa Prefecture and examined for the presence of *Salmonella* sp. and their drug resistance.

*Salmonella* was isolated from 57.1% (228/399) of the laying hens and 16.7% (98/588) of the broilers. From the broiler samples, 98% of isolates were serovar Infantis. On the other hand a total of 14 kinds of serovar such as Infantis, Albany (48.2%), Saintpaul (18.4%), Cerro (13.2%), were isolated from the laying hens. The isolated strains were tested for the susceptibility against twelve antimicrobial agents by the agar diffusion method. 16.2% of isolated *Salmonella* from the laying hens and 96.9% of that from broilers showed some drug resistance. The PFGE patterns of *S. Infantis* isolates collected from the “A” farm broiler in 2001 and 2003 were similar pattern. These results indicate the spread of a genetically identical clone of Infantis among the broilers in the farms in Okinawa.

**Key words :** *Salmonella*, Serovar, domestic animals, Drug resistance, Okinawa.

### はじめに

サルモネラは人の食中毒及び感染性胃腸炎の原因菌として長年にわたり発生頻度が高く、増加傾向にあり<sup>1,2)</sup>、その原因食品の一つとして食肉、鶏肉や鶏卵のサルモネラ汚染が重要視されている<sup>6)</sup>。サルモネラ食中毒の総合的な衛生対策を行うためには、家畜の保菌状況からと畜場におけると体の汚染状況、市販食肉や農産物等の汚染状況を把握し、対策を講ずる事が必要である。また、近年DT104と呼ばれる高度薬剤耐性サルモネラが欧米諸国を中心に発生<sup>10,11)</sup>し、本県への侵入も懸念される。そこで今回は、沖縄県内の豚、山羊、採卵鶏、ブロイラーのサルモネラ保菌状況と血清型及び薬剤耐性獲得状況について調査した。また、同一血清型間の相同性を比較、細分類するため、分子疫学的手法であるパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による解析を実施したので報告する。

### 材料及び方法

#### 1 材料

今回調査に用いた材料を表1に示す。調査期間は2001年10月から2003年2月までの期間で、と畜場または食鳥処理場に搬入された豚100頭（5農家）、山羊100頭（36農家）、採卵鶏399羽（1農家）、ブロイラー588羽（3農家）の計1187頭1287検体について調査した。豚の検体は生体検査場にて直腸スワブを、山羊は解体時に直腸スワブ及び盲腸スワブを、採卵鶏及びブロイラーは脱羽後中抜き前の直腸スワブを綿棒にて採取した。採取した検体は直ちに10mlのSelenite cystine培地に接種し、冷蔵にて輸送した。また、一部、と畜場（生体検査場）排水、食鳥処理場浄化槽水についても調査した（表1）。

#### 2 サルモネラの検出及び同定

検体をSelenite cystine培地（BBL）にて42℃、約

18時間増菌し、酵素基質培地Rambach (CHROMagar)にて分離後、TSI及びLIMによる生化学的試験及び血清学的試験により同定した。血清型別は市販の診断用抗血清を用いKauffman-Whiteの抗原構造表にて血清型を決定した。

排水、浄化槽水は、検体1Lに対し2倍濃度のSelenite cystine培地を等量加える方法にて増菌培養を行った。

### 3 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき感受性ディスク (BD) を用いて実施した。供試薬剤はアンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、シプロフロキサシン (CPF)、カナマイシン (KM)、セフトキシム (CTX)、クロラムフェニコール (CP)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST)、トリメトプリム (TMP)、ゲンタマイシン (GM)、ナリジクス酸 (NA)、ホスホマイシン (FOM) の12薬剤を用いた。

### 4 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による分類

プロイラーA農家及びB農家から分離されたInfantisをそれぞれ薬剤耐性パターン別に8株、また、同時期に市販鶏肉より分離された2株を加え、計10株について試験した。方法はRibotらの報告した迅速法<sup>3)</sup>に従い細胞を処理後、制限酵素Xba-IにてDNAを切断し、電圧6.0V/cm、パルスタイム4~50秒、泳動時間22時間、Buffer温度14の泳動条件にてPFGEを実施した。PFGEパターンの判定は目視にて行い、Tenovarら報告した基準<sup>5)</sup>に従った。

## 結 果

### 1 サルモネラの保菌率及び血清型

採卵鶏の保菌率が57.1% (228/399) で最も高く、ついでプロイラー16.7% (98/588) であった。豚及び山羊100頭からサルモネラは検出されなかった (表2)。また、プロイラーについて、採材した時期あるいは農家別には、2001年10月にA農家の42日令を調査した結果、分離率は16.3% (47/288) であった。2003年1月に同じA農家を調査した結果は、41日令が34% (34/100)、57日令が16% (16/100)、また、2003年1月にB農家の54日令を調査した結果、1% (1/100) がサルモネラ陽性であった (表3)。

採卵鶏、プロイラー及び食鳥処理場浄化槽水から検出されたサルモネラと沖縄県の散発下痢症患者から検出さ

れた主なサルモネラの血清型の比較を表4に示す。プロイラーから分離されるサルモネラは、ほぼ単一の血清型で占められInfantis 95株 (96.9%)、Enteritidis 1株 (1.0%)、型別不能2株 (2.0%) であった。一方、採卵鶏からはAlbany 110株 (48.2%)、Saintpaul 42株 (18.4%)、Cerro 30株 (13.2%) と多様な血清型が分離され、以下Bareilly 14株 (6.1%)、Oranienburg 4株 (1.8%) 他、合わせて14種類の血清型が検出された。食鳥処理場の排水の検査では、浄化槽水1Lを増菌したのち、分離培地から15株を釣菌し検査した結果、Infantis 13株、Newport 1株、Weltevreden 1株が検出された。これらの血清型は沖縄県の散発下痢症患者から比較的高頻度に分離されるサルモネラの血清型とほぼ一致していた。

豚の生体検査場の排水からサルモネラは検出されなかった。

### 2 薬剤感受性試験

12薬剤についていずれかの薬剤に耐性を示した株は、採卵鶏では16.2%、プロイラーでは98.8%であった (表5)。また、プロイラー農家及び日令別には、2001年10月にA農家の42日令から分離された31株のうち30株 (96.8%) が耐性株で、2003年1月に同じくA農家の41日令及び57日令から分離された16株はすべて薬剤耐性株であった。

耐性を示した薬剤の種類については、採卵鶏の場合SMに14.9%、TCに0.9%、ABPC、ST及びTMPに0.4%が耐性であり、プロイラーの場合、特にInfantisはSM及びTCに100%、STに66.7%、KMに65.4%、TMPに64.2%が耐性であった。Enteritidisの1株は12薬剤すべてに感受性であった。(表6)

薬剤耐性パターンは、採卵鶏の場合、耐性株37株のうち34株 (91.9%) がSM単独耐性でSM、TC、KM、ST、TMPの5剤耐性は1株 (2.7%) であったのに対し、プロイラーの場合、耐性株81株のうち単独耐性はなくSM、TCの2剤耐性が27株 (33.3%)、SM、TC、ST、TMPの4剤耐性が1株 (1.2%)、SM、TC、KM、ST、TMPの5剤耐性が53株 (65.4%) であった。

また、プロイラーA農家で・42日令の分離株30株 (100%) 及び41日令の22株 (64.7%) がSM、TC、KM、ST、TMPの5剤耐性であったのに対し、57日令では5剤耐性を示した株は1株 (6.3%) で、16株 (93.8%) がSM、TCの2剤耐性であった (表7)。

### 3 パルスフィールドゲル電気泳動法によるInfantisの分類

制限酵素 Xba-I により 50kb ~ 700kb の間で 14 ~ 15本のフラグメントに切断され、10株の *Infantis* は3つの PFGE パターンに分類された。A 農家のブロイラーから分離された 5 剤耐性株はすべて同一のパターンを示した (X-1a)。また、A 農家の 2 剤耐性の 2 株は同一パターンで 5 剤耐性株とは 190kb 付近のバンドの位置が 1 本の異なっていた (X-1b)。2 剤耐性の市販鶏肉 A は、A 農家の 2 剤耐性株と同一であり、市販鶏肉 B の 2 剤耐性株は 5 剤耐性のパターンとバンド 1 本の違いで 100 kb 付近のバンドが脱落していた (X-1c) (図 1)。

## 考 察

サルモネラ症の感染経路の一つとして、家畜や家禽が保菌し、食肉処理過程において肉に付着、あるいは鶏卵を介してヒトに感染することが重要視されている。昨年著者らは、沖縄県におけるサルモネラの菌疫学的特徴に基づく動向調査 (1) として、食中毒及びヒトの散発下痢症から分離されるサルモネラの血清型と原因食品について報告した<sup>7)</sup>。調査 2 年目に当たる本年は、家畜について、県内の食肉処理場及び食鳥処理場に搬入された豚、山羊、採卵鶏、ブロイラー 1187 頭 (1287 検体) を対象にサルモネラの保菌状況と薬剤感受性調査を行った。

豚、山羊のそれぞれ 100 頭からはサルモネラは検出されず、サルモネラの保菌は低いことが伺えた。一方、採卵鶏及びブロイラーの陽性率は高く、それぞれ 57.1%、16.7% と高率にサルモネラを保菌していた。ブロイラーについては農家別に 34% ~ 1% と保菌率が異なり、また、同一農家であっても、41、42 日令で体重 1kg 前後の若齢ブロイラーの方が、57、58 日令で体重 2kg 前後のものに比べ保菌率が高い結果であった。Morris らは、ブロイラー種鶏群におけるサルモネラの感染率の推移を調べ、若齢の雛ほどサルモネラに対する感染率が高く、その後 40 日令を過ぎる頃から急速に低下するが、産卵開始前後の 160 日令頃から再びには感染率が高くなると報告している<sup>6)</sup>。

血清型については、採卵鶏から 14 種もの多種多様な血清型が分離されたのに対し、ブロイラーからは分離されるサルモネラ殆どは *Infantis* であった。ブロイラーから *Infantis* が優位に分離される傾向は他府県でも同様であり、また、1994 年に本県で実施された仲嶺らの調査においても、*Infantis* が優位に検出されている<sup>8)</sup>。今回、採卵鶏やブロイラーから、鶏卵・卵製品を主な食中毒の原因食品とする *Enteritidis* や本県において食中毒あるいは散発下痢症から多く分離される血清型の *Weltebreden*

は分離されなかったものの、採卵鶏から分離された *Bareilly*、*Saintpaul*、*Oranienberg* や、ブロイラーから分離された *Infantis*、*Enteritidis* は、人の下痢症から比較的高頻度に分離されている血清型と一致していた。採卵鶏から最も高率に分離された *Albany* は人の下痢症から分離された報告はほとんど無いため、人に対する病原性は低いことが示唆される。1998 年、座喜味らの行った採卵鶏の調査においても *Albany*、*Bareilly* など今回の調査と共通する血清型が認められ、また、*Weltevreden* も 7 農家のうち 5 農家の環境またはクロアカスワブから検出されている<sup>9)</sup>。

ブロイラーに比べ採卵鶏の保菌率が高かった要因や、採卵鶏は多様な血清型が分離されたのに対しブロイラーは単一の血清型であった理由の一つとして、飼育形態や飼育環境の違いが考えられる。すなわち、ブロイラーはオールイン、オールアウトにて 50 日程度で一斉に入れ替わり、その間清掃もしやすいのに対し、採卵鶏は飼育期間が長いことや、開放、ウィンドレス鶏舎での飼育、えさ切り、ワクチン接種によるストレスなどが関連することも考えられる。

薬剤耐性については、採卵鶏では比較的低く (16.2%)、多剤耐性を示す割合も低 (2.7%) だったのに対し、ブロイラーでは殆ど (98.8%) が薬剤耐性株であり、分離株のすべてが 2 剤 ~ 5 剤の多剤耐性であった。また、同一ブロイラー農家でも体重 1kg 前後の若齢 (41、42 日令) のものの方が、2kg 前後の 57 日令と比較し、5 剤耐性割合が高かった。これは、鶏の飼料、抗生物質の使用の種類、頻度、及び飼育環境の違いによるものと考えられた。薬剤パターンは SM、TC、ST、KM、TMP に耐性を示す株が多く、他府県と同様の傾向を示した。

パルスフィールドゲル電気泳動法による A 農家から分離された *Infantis* は、2001 年分離株と 2003 年分離株は同一のパターンを示したことより、同一のサルモネラが、繰り返しブロイラーに感染している事が推察された。今回の調査にて、と畜場に搬入される豚や山羊のサルモネラ保菌率は低かったものの、食鳥処理場に搬入される採卵鶏やブロイラーは、比較的高い保菌率を示したことから、食肉処理の段階においてと体に菌が付着する可能性は十分高い事が予想され、調理従事者は鶏肉に対する取扱には注意を払い、十分加熱調理を行い、生肉からの二時汚染を防止する必要がある。

今回調査した、採卵鶏やブロイラーは、調査した農家が少ないため、県内すべての農家の採卵鶏やブロイラーが高率にサルモネラを保菌しているのか、あるいは採卵

鶏とブロイラーのサルモネラ保菌率に優位な差があるのか、ブロイラーの場合、日令により保菌率、薬剤耐性が異なるのか、飼育形態で開放鶏舎とウインドレス鶏舎でサルモネラ保菌率に差があるのかなど、不明確な点が多かった。今後、さらに農家数を増やし調査することや、豚、山羊、その他の家畜についても引き続き調査していく必要がある。また、実際の市販食肉や農産物におけるサルモネラの汚染実態調査を実施し、本県におけるサルモネラの生態的特徴やその動向を把握することにより、調理従事者に対する衛生的意識の向上と食中毒予防に役立てていきたい。また、食肉、鶏肉、鶏卵に対する衛生的で安全な食のために、生産農家、家畜保健衛生所、食肉検査所および保健所の各機関の情報交換や連携を強め、生産現場から食卓までそれぞれのサルモネラ汚染対策をなお一層推進していく必要がある。

### まとめ

- 1) 豚、山羊、採卵鶏、ブロイラーについてサルモネラ保菌状況及び薬剤感受性調査を実施した。
- 2) 豚、山羊のサルモネラ保菌率は低いのに対し採卵鶏は57.1%、ブロイラーは16.7%で高率に保菌していた。
- 3) ブロイラーの保菌率は農家別(1~34%)あるいは同一農家でも日令別に異なり若齢のもので分離率が高かった。
- 4) 家禽から分離されるサルモネラの血清型は採卵鶏では14種で多様な血清型がみられたのに対し、ブロイラーでは少なくとも2種類で殆ど(96.9%)がInfantisであった。
- 5) 薬剤に対する耐性は、採卵鶏では低く(16.2%)単剤耐性が多いのに対し、ブロイラーでは殆ど(98.8%)が2剤~5剤に対して耐性であった。
- 6) 分離時期、薬剤耐性が異なる同一ブロイラー農家のInfantisは、PFGEパターンほぼ同じであり、継続した同一菌による汚染、再感染が示唆された。
- 7) 今後、食肉、鶏肉、鶏卵について、より衛生的で安全な食のために生産者、と畜場、食鳥処理場が共同で対応していくことが必要であり、そのために食肉衛生検査所、家畜保健衛生所、保健所、衛研など関係機関が協力して情報交換や連携を強め、また、一般県民に情報を公開し、生産現場から食卓までそれぞれの分野においてサルモネラ汚染対策を尚一層推進していく必要がある。

### 参考文献

- 1) 工藤泰雄：最近のわが国における細菌性食中毒の動向．モダンメディア 1991；37：265-227．
- 2) 工藤泰雄：最近のわが国における細菌性食中毒の動向．モダンメディア 1994；40：115-125．
- 3) Efrain, M, Robit et al：Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejunii*；J. Clin. Microbiol.；39：1889-1894．2001．
- 4) 工藤泰雄：最近のわが国における細菌性食中毒の動向．モダンメディア；40：115-125．1994．
- 5) Tenovar, F., et al.：Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis; Criteria for Bacterial Strain Typing．J. Clin. Microbiol.；33：2233-2239．1995．
- 6) 小沼博隆、品川邦汎、熊谷進：サルモネラ食中毒と鶏卵．モダンメディア；41：230-244．1995．
- 7) 秋庭正人ら、：家畜由来サルモネラの血清型．家畜衛試研究報告；102・103号：43-48．1996．
- 6) Morris, G.K et al.: A study of the dissemination of salmonellosis in commercial broiler chicken operation. Am. J. Vet. Res.；30,；1413-1421．1968．
- 7) 久高ら：沖縄県における散発下痢症及び食中毒由来サルモネラの血清型、平成13年度 新興・再興感染症調査研究報告書；沖縄県衛生環境研究所：1-7．2002．
- 8) 仲嶺マチ子ら：ブロイラー鶏及び採卵鶏からのサルモネラの分離と農場内の疫学調査．鶏病研報；30：18-22．1994．
- 9) 座喜味聡ら：採卵鶏農家におけるSalmonellaの感染疫学．平成12年度 第27回家畜保健衛生業績発表会 抄録43-45 沖縄県 1998．
- 10) Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype Typhimurium-United States, 1996．MMWR；46(14)：308-310．1997．
- 11) Threlfall EJ, et al. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium．Lancet；347：1053-1054.1996．

表1．サルモネラ保菌状況調査材料

畜種	採取年月日	年齢	採取部位	検体数	採材農家数	飼育形態
豚	2002年1月	6ヶ月令	直腸スワブ	100	5	
山羊	2002年8月から10月	1~4歳	直腸スワブ 盲腸スワブ	100 100	36	
採卵鶏 (レヤ-種)	2001年10月、12月	700日令	直腸スワブ	399	1	ウインドレス
ブロイラー (ファン-種)	2001年10月、12月	42日令	直腸スワブ	288	1(A農家)	開放
	2003年1月	41日令	直腸スワブ	100	1(A農家)	開放
		57日令	直腸スワブ	100	1(A農家)	開放
	2003年2月	180日令	直腸スワブ	100	1(B農家)	開放
処理場排水						
食鳥処理場	2001年10月	-	浄化槽水	1	1	
と畜場	2002年1月	-	豚生体検査場	1	1施設	
合計				1287	48	

\*食肉処理過程の脱羽後に検体採取

表2．豚、山羊、採卵鶏及びブロイラーのサルモネラ保菌状況

畜種	年齢	検査数	陽性数	(%)
豚	6ヶ月	100	0	(0)
山羊	1-4歳	100	0	(0)
採卵鶏	700日令	399	228	(57.1)
ブロイラー	41-58日令	588	98	(16.7)

表3．ブロイラーのサルモネラ保菌状況

農家名	検体採取年	日令	検査数	陽性数	(%)
A農家	2001年10月	42日	288	47	(16.3)
A農家	2003年1月	41日	100	34	(34.0)
A農家	2003年1月	57日	100	16	(16.0)
B農家	2003年2月	58日	100	1	(1.0)
ブロイラー合計			588	98	(16.7)

表4 . 採卵鶏、ブロイラー及び食鳥処理場浄化槽水から検出されたサルモネラと沖縄県の散発下痢症患者から検出された主なサルモネラ血清型の比較

採卵鶏	株 ( % ) 数	ブロイラー	株 ( % ) 数	食鳥処理場 浄化槽水	株 ( % ) 数*	ヒトの散発 下痢症 <sup>7)</sup>	順位 ( % )
Albany	110 (48.2)	<u>Infantis</u>	95 (96.9)	<u>Infantis</u>	13 (100)	Enteritidis	1 (49.8)
<u>Saintpaul</u>	42 (18.4)	<u>Enteritidis</u>	1 (1.0)	<u>Weltevreden</u>	1 (100)	Weltevreden	2 (6.7)
<u>Cerro</u>	30 (13.2)	型別不能	2 (2.0)	<u>Newport</u>	1 (100)	Bareilly	3 (5.1)
<u>Bareilly</u>	14 (6.1)					Typhimurium	4 (4.9)
<u>Oranienburg</u>	4 (1.8)					Infantis	5 (3.1)
Larochella	2 (0.9)					Newport	5 (3.1)
<u>Infantis</u>	1 (0.4)					Agona	5 (3.1)
<u>Agona</u>	1 (0.4)					:	
<u>Newport</u>	1 (0.4)					:	
Banana	1 (0.4)					:	
Menden	1 (0.4)					Oranienburg	16 (0.6)
Tananarive	1 (0.4)					Cerro	21 (0.4)
型別不能	18 (7.9)					Saintpaul	29 (0.2)
合計	228 (100)		98		3	42 血清型	

\* 1 検体からの分離数

アンダーラインは昨年の調査<sup>7)</sup>で人からも分離された血清型

表5 . 採卵鶏及びブロイラーの12薬剤に対する耐性

畜種	試験株数	薬剤耐性株数	耐性率
採卵鶏	228	37	16.2%
ブロイラー	82	81	98.8%

表6 . 採卵鶏及びブロイラー由来サルモネラの耐性薬剤

由来 畜種	検査 数	耐性 (%)	耐性薬剤 (%)												
			ABPC	SM	TC	CPEX	KM	CTX	CP	ST	TMP	GM	NA	FOM	
採卵鶏	228	37 (16.2)	1 (0.4)	34 (14.9)	2 (0.9)	0	0	0	0	0	1 (0.4)	1 (0.4)	0	0	0
ブロイラー	82	81 (98.9)	0	81 (98.9)	81 (98.9)	0	53 (64.6)	0	0	0	54 (65.9)	52 (63.4)	0	0	0
Infantis	81	81	0	81 (100)	81 (100)	0	53 (65.4)	0	0	0	54 (66.7)	52 (64.2)	0	0	0
Enteritidis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表7．採卵鶏及びブロイラー由来サルモネラの薬剤耐性パターン

畜種	農家	日令	耐性数	薬剤耐性パターン				
				SM	TC	SM, TC	SM, TC, ST, TMP, KM	SM, TC, ST, TMP, KM
採卵鶏		700	37	34 (91.9)	2 (5.4)	0	0	1 (2.7)
ブロイラー	A 農家	42	30					30 (100)
	A 農家	41	34			12 (35.3)		22 (64.7)
	A 農家	57	16			15 (93.8)		1 (6.3)
	B 農家	58	1				1 (100)	
	合計			81	0	0	27 (33.3)	1 (1.2)

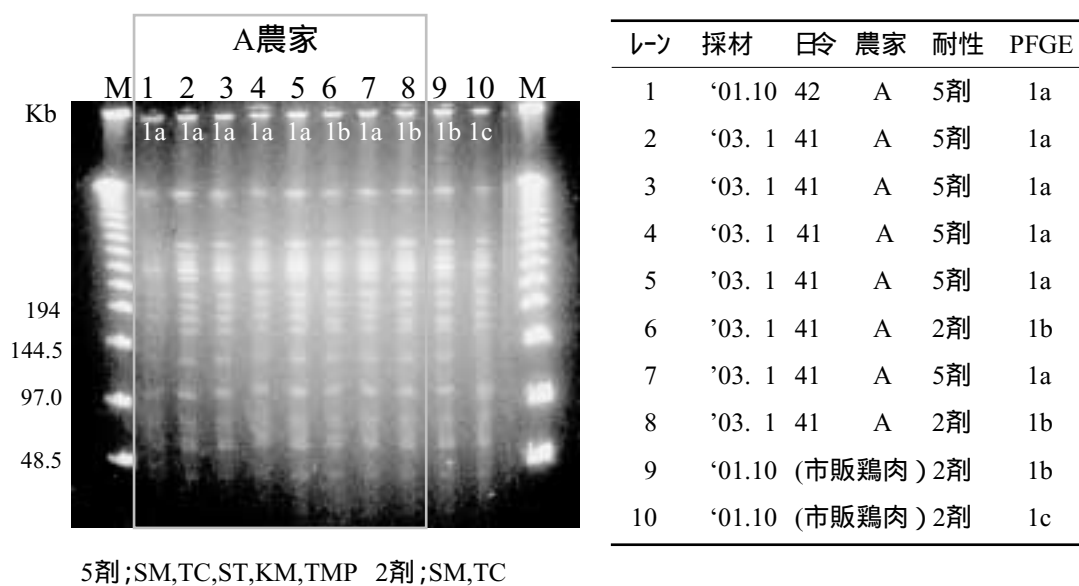


図1．A 農家における S. Infantis の PFGE パターン