



市販食肉、動物及びヒトにおける黄色ブドウ球菌調査と分離株の表現型・遺伝子型性状

北井, 智

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2005-09-25

(Date of Publication)

2009-05-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3463

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003463>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

市販食肉、動物及びヒトにおける黄色ブドウ球菌調査と
分離株の表現型・遺伝子型性状

平成17年9月

神戸大学大学院自然科学研究科
北井 智

目 次

序論	1
第 1 章 市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況	
目的	9
材料及び方法	10
成績	13
1. 豚肉、牛肉、鶏肉における検出状況	13
2. 購入地域による検出状況	14
考察	14
要約	18
第 2 章 市販食肉から分離された黄色ブドウ球菌の表現型・遺伝子型性状解析	
第 1 節 市販豚肉、牛肉、鶏肉由来株の生物型別	
目的	20
材料及び方法	21
成績	22
考察	24
要約	25
第 2 節 豚肉、牛肉、鶏肉由来株のエンテロトキシン産生能と型別	
目的	27
材料及び方法	27
成績	28
考察	31
要約	34
第 3 節 豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のコアグラーゼ型別	
目的	35
材料及び方法	35
成績	36

考察	39
要約	40
第4節 豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株の薬剤耐性	
目的	42
材料及び方法	42
成績	43
考察	46
要約	47
第5節 豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のファージ型別	
目的	48
材料及び方法	48
成績	49
考察	50
要約	51
第6節 鶏肉由来エンテロトキシン産生株の PFGE による疫学解析	
目的	53
材料及び方法	53
成績	55
考察	57
要約	60
第3章 豚肉、牛肉、鶏肉における MRSA 汚染状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析	
目的	62
材料及び方法	63
成績	68
1. 豚肉、牛肉における汚染状況	68
2. 鶏肉における汚染状況	68
考察	71
要約	75

第4章 ヒト・動物における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌及び MRSA の保菌状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析

第1節 ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔における保菌状況と分離株の性状

目的	77
材料及び方法	78
成績	79
1. 黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌状況と性状	79
2. MRSA の保菌状況と性状	80
考察	81
要約	86

第2節 ヒト由来エンテロトキシン産生株の生物型、コアグララーゼ型、ファージ型、薬剤耐性型

目的	88
材料及び方法	88
成績	89
考察	91
要約	93

総括	94
----	----

英文要約	101
------	-----

参考文献	109
------	-----

謝辞	117
----	-----

序 論

ブドウ球菌が1878年に Kochによって発見されてから1世紀以上が経過した。その間医学及び獣医細菌学の領域においてはヒト及び動物のブドウ球菌感染症の予防・治療法を確立するために、ブドウ球菌による感染発病機構と病原因子、付着・定着因子の解析、免疫機構及び薬剤耐性機構の解析、ヒトや動物におけるブドウ球菌の生態学的解析など、数多くの研究がなされ、大きな進展を遂げてきた。

一方、近年における分子生物学、近代遺伝学、生化学、その他関連分野の飛躍的な発展は、ブドウ球菌分類学の世界にも当然大きな影響を与えた。1957年の *Bergey's Manual* 第7版では、ブドウ球菌属 (Genus *Staphylococcus*) はコアグララーゼ陽性、マンニット分解性の黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) とコアグララーゼ陰性、マンニット非分解性の表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の2菌種に分類されていたが、その後新菌種の命名または命名変更が行われ、2005年現在、36菌種21亜種に分類されている。

ブドウ球菌はヒトや動物の皮膚、鼻腔、口腔、咽頭の粘膜、泌尿器や腸管内に常在し、生体外では空中、土壌、河川水などの自然環境に広く分布していることが知られている。またヒトや動物の生活環境に生息しているハエ【1】、さらに各種の食品類、食品類の製造・調理環境などからも検出される。

ブドウ球菌の中でヒト及び動物に病原性を示すのは数種類であり、特にコアグララーゼ陽性の黄色ブドウ球菌は古くから化膿性球菌とも呼ばれるように、各種の化膿性疾患を引き起こす。その他、近年、ヒトではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;

MRSA)に代表される病院内感染症をはじめ、毒素性ショック症候群(toxic shock syndorome,TSS)、幼児の熱傷様皮膚症候群(staphylococcal scalded skin syndorome,SSSS)や敗血症の起因菌としても注目されている。また黄色ブドウ球菌は食中毒起因菌として食品・公衆衛生学領域で重要な細菌でもある。

ブドウ球菌食中毒事例を最初に報告したのは、Barber【2】といわれ、1914年のことである。この事例は、フィリピンの農場で飼育されていた乳牛から搾乳したミルクを原因食とした食中毒で、ブドウ球菌自体の作用によるものでなく、本菌が産生した毒素によるものであることを示唆した。その後、この食中毒は一般に注目されなかった。しかしながら、1930年Dackら【3】は米国のシカゴでクリスマスケーキを原因食としたブドウ球菌食中毒を報告し、原因食から多数のブドウ球菌を認め、本食中毒はブドウ球菌自体の作用によるものでなく、菌の産生する毒素によって起こる毒素型食中毒であることを明らかにし、そしてその毒素は「エンテロトキシン(腸管毒、enterotoxin)」と命名された。この黄色ブドウ球菌とエンテロトキシンの研究は、その後多くの研究者の注目を集めるところとなった。それ以来世界各国でブドウ球菌食中毒が多数報告されるようになり、食品・公衆衛生上重要視されるようになった。

わが国で黄色ブドウ球菌による食中毒が注目されるようになったのは、第二次大戦後のことである。本食中毒は腸炎ビブリオ食中毒及びサルモネラ食中毒とともにわが国の3大食中毒の一つに挙げられてきた。厚生労働省の統計【4】(Table 1)によれば、1980年～2003年の過去24年間で、発生病数が2,850件、患者数が78,398人、死者数が4人である。1980年～1984年では年間205～254件、1985年～1990年では110～163件の発生であったが、食品業界の製造設備の改

善、低温流通の確立、衛生思想の向上などにより、また国や都道府県などの食品衛生行政指導の努力により、1991年以降は年間44～95件で、漸次減少傾向を示している。

Table 1. Number of staphylococcal food poisoning outbreaks and patients during 1980-2003 in Japan

Year	No. of outbreaks	No. of patients	No. of the dead
1980	209	5,665	0
1981	243	5,150	0
1982	218	4,804	0
1983	254	4,493	2
1984	205	4,813	0
1985	163	4,968	0
1986	155	3,885	0
1987	139	3,616	0
1988	117	3,168	0
1989	115	3,224	0
1990	110	4,104	0
1991	95	2,453	0
1992	77	1,541	0
1993	61	1,349	0
1994	72	1,836	0
1995	60	940	1
1996	44	698	0
1997	51	611	0
1998	85	1,924	0
1999	67	736	0
2000	87	14,722	1
2001	92	1,039	0
2002	72	1,221	0
2003	59	1,438	0
Total	2,850	78,398	4

近年の *Campylobacter jejuni/coli*、腸管出血性大腸菌 O157:H7 などの細菌、ノロウイルスに代表される小型球形ウイルスの台頭に伴い、食中毒の発生様相に変化が起こっており、病因物質として、2003 年ではカンピロバクター、サルモネラ、小型球形ウイルス、腸炎ビブリオ、植物性自然

毒に次いで、黄色ブドウ球菌は第6位となっている【4】。

しかし、2000年6月から7月にかけて、大阪府と近隣府県で、加工乳などの原料となる脱脂粉乳の製造過程において、黄色ブドウ球菌が大量に増殖し、脱脂粉乳中にエンテロトキシンA型毒素が濃厚に蓄積され、それを原料とした加工乳及び乳飲料が原因となった雪印乳業集団食中毒事件が発生して、有症者数は14,780人を数え、大きな社会問題となった【5】。

黄色ブドウ球菌は、前述したように自然界に広く存在するため、各種の食品を汚染する機会も多く、わが国では依然として食中毒の重要な原因菌であることに変わりがなく、黄色ブドウ球菌食中毒の予防・防止対策をなお一層強化すべきであると考えられる。

食中毒は、細菌性食中毒、ウイルス性食中毒、自然毒食中毒(動物性自然毒と植物性自然毒)、化学性食中毒の4つに分類され、細菌性食中毒は発病機序からさらに感染型と毒素型に分けられ、毒素型はさらに生体内毒素型と食品内毒素型に分けられ、黄色ブドウ球菌は、この食品内毒素型食中毒に当てはまる。食品内毒素型食中毒は、食品中で菌が増殖する際に作られる菌体外毒素(エンテロトキシン、enterotoxin)を含む食品を摂取し、毒素が腸管で吸収されることにより発病するもので、感染型と異なり細菌の有無は直接食中毒には関係なく、産生されたエンテロトキシンが問題になる。このエンテロトキシンを経口摂取すると、消化管から吸収され、脳の中樞神経系(嘔吐中枢)に作用して、ブドウ球菌食中毒に特有の吐き気、嘔吐などを起こすといわれている。

エンテロトキシンは分子量約26,000～28,500のタンパク毒素【6,7,8】で、その抗原性の違いによりA、B、C、D、E型の5種類があり、さらにC型は等電点の違いによってC₁、

C₂、C₃に細分される。また最近ではA～E型以外に、新しい型のG～R型が報告【8,9,10,11,12,13】されている。エンテロトキシンは食品中では耐熱性が強く、通常の加熱調理温度では破壊されない。しかし精製されたエンテロトキシンはA型で80℃、30分、B型で100℃、60分以上の加熱で失活する。

ブドウ球菌食中毒の原因食品は、国やその国の食文化の違いにより、かなりの違いが見られる。欧米諸国【14,15】では牛乳、クリーム、バターなどの乳製品や、ハム、ソーセージなどの肉類が主体であるが、わが国【16,17,18】では食生活習慣が異なることもあって、植物性食品、特にデンプン質を多く含む豆類、豆腐や握り飯、いなりずし、巻き寿司などの米飯類によるものが最も多い。しかしわが国でも、食生活の欧米化に伴って食肉及び食肉製品の消費が急激に増加し、1970年の国民一人当たりの年間食肉消費量は豚肉5.3kg、牛肉2.1kg、鶏肉3.7kgであったものが、1980年には豚肉9.6kg、牛肉3.5kg、鶏肉7.7kg、1990年には豚肉10.3kg、牛肉5.5kg、鶏肉9.4kg、2000年には豚肉10.6kg、牛肉7.1kg、鶏肉10.2kgと年々増加している【19】。このような背景から、今後ブドウ球菌食中毒の主要な原因食品も欧米と同じく食肉類に変化していくことも予想されるので、食肉類における黄色ブドウ球菌、特にエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の汚染状況を詳細に調査しておくことは、本食中毒の予防・防止対策を立てる上で極めて重要であり、かつ緊急の検討課題である。

わが国では、これまでも食肉類の黄色ブドウ球菌汚染状況についての調査【20,21,22,23,24,25,26,27,28】が行われてきたが、いずれも限られた地域での成績であり、全国レベルで調査した研究はなく、また最近の汚染実態についても不明である。さらに、分離株の詳細な性状に関する情

報も極めて不足している現状にある。

また現在、食肉類を含めた各種食品の黄色ブドウ球菌を検索するための検体採取及び試料の調製方法は、対象食品をアトランダムに数箇所を切り取ってサンプリングし、食品の10倍乳剤を調製する、定量検査【29】である。これは汚染状況を調査する手法としては、その食品全体を検査しているとはいい難く、また多数の検体を処理する方法として不適當である。食品全体を検査する方法として、欧米では滅菌されたバルクに食品を入れ、そこに液体培地を入れて培養する方法が一部取り入れられているが、この方法は培養するために、大型の培養設備とそれに伴う検査スペースが必要であり、特定の検査機関のみでしか採用できない方法である。実用的で、かつ食品全体を検査する方法の検討が望まれるところである。

1929年に、Flemingによりペニシリンが発見され、各種の抗生物質が次々と開発され、医療における各種細菌感染症の治療は著しく進歩し、抗生物質の果たす役割は多大であった。しかし一方で、ヒト及び動物に対する抗生物質の乱用により、多くの細菌で薬剤耐性菌の出現をもたらした。現在世界的レベルで「家畜・家禽における抗生物質使用と、薬剤耐性菌の出現状況との関連性」が重要な検討課題として取り上げられているが、畜産食品とMRSAを含めた薬剤耐性黄色ブドウ球菌及びヒトへの健康被害との関連性に関する研究データはほとんどない。

近年わが国でも、ほとんどの抗生物質が効かないバンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant enterococci ; VRE)が食肉類から分離され、食品衛生上の問題となっている。黄色ブドウ球菌も薬剤耐性化しやすい菌として古くから知られ、MRSAに代表されるように、抗生物質との戦いに勝って多くの薬剤に耐性を獲得しているものもある。し

かしながら、市販食肉類に分布している黄色ブドウ球菌の薬剤耐性及びMRSAについて研究された報告は少ない。公衆衛生及び食品衛生上、食肉類におけるMRSAを含めた薬剤耐性黄色ブドウ球菌の汚染を調査することは、食肉類への汚染拡散防止、ヒトへの健康危害防止の観点から、緊急に行われなければならない。

これまで黄色ブドウ球菌のヒト、動物、食品における生態及び本菌による各種感染症、食中毒を疫学解析する手段として、表現型による生物型別、コアグラゼ型別、フエーゼ型別などの方法が用いられ、多くの重要な生態学的、疫学的知見を我々に提供してきた。しかし一方で、これらの型別法は型別率、識別能力、再現性などの面で問題点が指摘されていた。

近年では、分子生物学的手法を導入して、細菌の遺伝情報の担い手である核酸そのものを解析することによって、より詳細な生態学的、疫学的研究を進めようとする、いわゆる分子生態・疫学が盛んに行われるようになった。

パルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis;PFGE)、ランダムプライムドPCR法(random amplified polymorphic DNA;RAPD)、リボタイピング法(ribotyping)などがあるが、特にPFGEによる染色体DNA解析は、型別能力、識別能力、再現性に優れており、各種のブドウ球菌感染症の疫学調査に応用され、より詳細な疫学情報を提供している。

最近になって、食品衛生学領域でも、PFGEがブドウ球菌食中毒事例に応用され、その有用性が確認されている【30,31】。しかしながら、このPFGEを市販食肉の黄色ブドウ球菌汚染調査に応用した研究【27】は極めて少ない。

食肉類における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌及びMRSAを含めた薬剤耐性黄色ブドウ球

菌の汚染実態調査と、分離株の表現型・遺伝子型による性状解析は、食肉類によるブドウ球菌食中毒防止の観点から、緊急に解明しなければならない重要な研究課題であり、得られる研究成果は国家的課題である「食肉類を含めた畜産食品の安全性確保」に大きく貢献するものと考えられる。

すでに述べたように、ブドウ球菌食中毒の原因菌である黄色ブドウ球菌はヒトや動物の鼻腔粘膜、皮膚及びこれらを取りまく自然環境に広く分布しており、食肉類を汚染する機会も多く、種々の食肉類から高率に検出されることが知られている。黄色ブドウ球菌の各種食肉における汚染実態を把握することは、食肉類によるブドウ球菌食中毒を未然に防止する上から極めて重要であると思われる。

本論文は序論、1～4章、総括より構成される。第1章では市販食肉の代表として、豚肉、牛肉、鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染実態調査について述べる。第2章では分離された黄色ブドウ球菌及びエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の表現型・遺伝子型性状について述べる。第3章では食肉類におけるMRSAの汚染実態調査と分離株の表現型・遺伝子型性状について述べる。第4章では食肉原材料となる家畜・家禽及びヒトの鼻腔における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌、MRSAの保菌実態調査と、分離株の性状について述べる。

第 1 章

市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況

目 的

ブドウ球菌食中毒の原因食品としては、欧米諸国【14,15】では肉類及びその加工品、乳製品によるものが多く、わが国【17,18】では握り飯、仕出し弁当などの穀類及びその加工品が多く、本食中毒の主要原因食品が国の食習慣と密接に関連していることが知られている。

近年、わが国でも食肉及び食肉製品の消費量【19】が年々増加しており、食肉類に起因する食中毒の発生も懸念されている。また生食用食肉類についても、その特性からヒトの手指で直接処理加工される場合が多いことから、ヒト及び環境などからの黄色ブドウ球菌汚染を受ける機会が多いと考えられる。しかし原因となるエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の食肉類における汚染実態調査研究については、これまでに数多く報告【20,21,22,23,24,25,26,27,28】されているが、地域が極めて限定されており、全国レベルで調査された報告はなく、また最近の汚染実態についても明らかにされていない。

現在、食肉類を含めた各種食品からの細菌検査のための検体採取方法は、公定法【29】では食品の一部をランダムに採取するいわゆる定量法が提唱されており、この方法は食品全体が検査できず、また検体を処理するのに多くの労力と時間を要し、特に多数の検体を調査する細菌検査に適さない。

本研究では、わが国の市販食肉における黄色ブドウ球菌汚染状況を把握するために、豚肉及び牛肉については大阪府と兵庫県を対象に、その汚染実態を、また鶏肉について

は全国 47 都道府県について汚染実態調査を実施した。

材料及び方法

1. 検査材料

豚肉及び牛肉については、2002年5月～2004年9月にかけて、兵庫県のスーパーマーケット40店舗と大阪府のスーパーマーケット40店舗、計80店舗について、1店舗当たり1検体購入し、豚肉及び牛肉それぞれ80検体を検査に供試した。

鶏肉については、2002年5月～2003年8月にかけて、全国47都道府県の145店舗のスーパーマーケットで市販されていた444検体(もも114、むね51、手羽148、肝臓94、筋胃31、心臓3、卵巣3)を供試した (Table 2)。

なお1パックまたは1トレイを1検体とした。

Table 2. Meat samples used in this study

Sample	No. of prefectures	No. of supermarkets	No. of samples
Pork	2	80	80
Beef	2	80	80
Chicken	47	145	
Thigh			114
Breast			51
Wing			148
Liver			94
Gizzard			31
Heart			3
Ovary			3
Subtotal			444

2. 分離培養方法

1) 直接培養法

検査材料の肉表面全体を滅菌綿棒で強くこすり、3%卵黄加マンニット食塩培地(日水製薬、東京)に直接塗抹して、37℃、48時間培養した。増殖した卵黄反応陽性及びマンニット分解コロニーを1平板当たり1~5個釣菌した。

2) 増菌培養法

直接培養法で使用した綿棒を7%食塩加ハートインフュージョン(HI)ブイヨン(日水製薬)5 mlに入れ、37℃、24時間増菌培養し、その培養菌液10 μ lを3%卵黄加マンニット食塩培地に接種後、コンラージ棒で全面にひろげ、37℃、48時間培養した。増殖してきた卵黄反応陽性及びマンニット分解コロニーを1平板当たり1個釣菌した(Fig.1)。

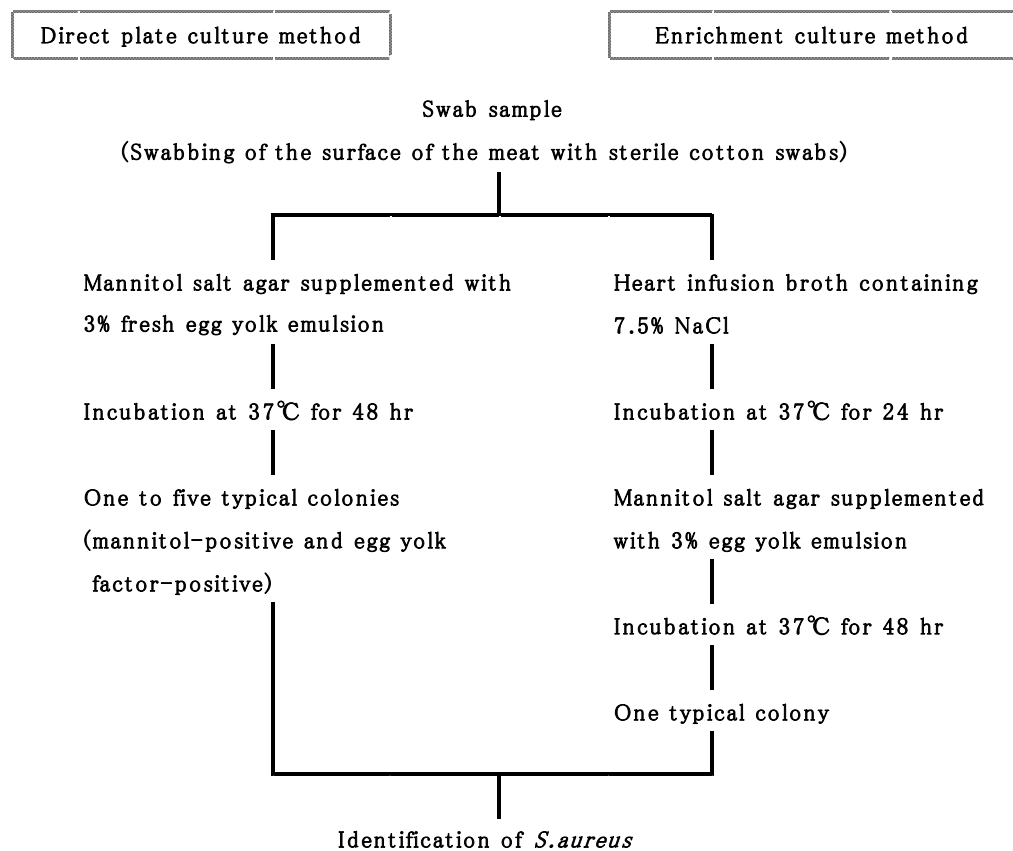


Fig.1. Flow chart of the detection of *S. aureus* from meat samples

3. 黄色ブドウ球菌の同定方法

卵黄反応陽性及びマンニット分解を示したコロニーについて、Devriese & Hájek【32】の記載に従い、同定を行った。生物学的性状の試験項目として、カタラーゼ産生能試験、グラム染色、コアグラーゼ産生能及びアセトイン産生能試験を、以下の方法で行った。

1) カタラーゼ産生能試験

被検菌苔に3%過酸化水素水を滴下し、気泡の生じたものを陽性とした。

2) グラム染色

Huckerの変法【33】で行った。

3) コアグラーゼ産生能試験

被検菌をHIブイヨン（日水製薬）0.5 mlで37℃、24時間培養後、これに等量のコアグラーゼ検査用ウサギプラズマ（7 mlの滅菌生理食塩水で溶解させたもの、栄研化学、東京）を加え、37℃の恒温水槽で培養し、24時間までに凝固したものを陽性とした。

4) アセトイン産生能試験

VP半流動培地（栄研化学）に被検菌を穿刺し、37℃、24時間培養後、 α -ナフトール・アルコール溶液3滴、クレアチン加40%水酸化カリウム2滴を加え、1時間静置後に液面が赤色を呈したものを陽性とした。

カタラーゼ陽性、ブドウ房状のグラム陽性球菌、クラスター形成、コアグラーゼ産生及びアセトイン産生したものを黄色ブドウ球菌と同定した。

成 績

1. 豚肉、牛肉、鶏肉における検出状況

Table 3に示すように、直接培養法では豚肉 7.5% (6/80)、牛肉 6.3% (5/80)、鶏肉 40.5% (180/444)であったが、増菌培養法では豚肉 30.0% (24/80)、牛肉 38.8% (31/80)、鶏肉 65.8% (292/444)となり、増菌培養法を併用することにより、検出率が著しく上昇した。

また鶏肉の検体種類別の検出率をみると、もも 72.8% (83/114)、むね 60.8% (31/51)、手羽 64.9% (96/148)、肝臓 63.8% (60/94)、筋胃 58.1% (18/31)、心臓、卵巣各 66.7% (2/3)で、検出率に大差がみられなかった。

Table 3. Incidence of *S. aureus* in raw pork, beef, and chicken meat

Sample	No. of samples	No. of positive samples	
		Direct plate culture ^{a)}	Enrichment culture ^{b)}
Pork	80	6 (7.5%)	24 (30.0%)
Beef	80	5 (6.3%)	31 (38.8%)
Chicken Thigh	114	47 (41.2%)	83 (72.8%)
Breast	51	19 (37.3%)	31 (60.8%)
Wing	148	59 (39.9%)	96 (64.9%)
Liver	94	45 (47.9%)	60 (63.8%)
Gizzard	31	7 (22.6%)	18 (58.1%)
Heart	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)
Ovary	3	2 (66.7%)	2 (66.7%)
Subtotal	444	180 (40.5%)	292 (65.8%)

a) Swab samples from meat were inoculated directly on mannitol salt agar medium containing 3% egg yolk.

b) Swab samples were cultured in heart infusion broth containing 7.5% NaCl. After overnight incubation, the broth cultures were subcultured onto mannitol salt medium containing 3% egg yolk.

2. 購入地域による検出状況

購入地域別で、豚肉、牛肉の黄色ブドウ球菌の検出率をみると、Table 4に示すように、豚肉では大阪府が35.0% (14/40)、兵庫県が25.0% (10/40)、牛肉では大阪府が47.5% (19/40)、兵庫県が30.0% (12/40)で、豚肉、牛肉ともに大阪府が兵庫県に比べて高い傾向を示した。

なお、1店舗当たり1検体を購入しているため、店舗別の陽性率についても同様の結果であった。

Table 4. Incidence of *S.aureus* in raw pork and beef

Sample	Prefecture	No. of <i>S.aureus</i> positive samples /No. of samples
Pork	Osaka	14/40 (35.0%)
	Hyogo	10/40 (25.0%)
Beef	Osaka	19/40 (47.5%)
	Hyogo	12/40 (30.0%)

鶏肉ではTable 5に示すように、全国47都道府県の全ての県の検体から、また145店舗中131店舗の検体から黄色ブドウ球菌が検出され、特定の地域・店舗で黄色ブドウ球菌が集中して検出されるということとはなかった。

考 察

わが国の市販食肉類からの黄色ブドウ球菌の検出状況については、これまでに多くの報告がみられ、調査された地

Table 5. Incidence of *S.aureus* in raw chicken meat

Prefecture	No. of <i>S.aureus</i> positive supermarkets /No. of supermarkets	No. of <i>S.aureus</i> positive samples /No. of samples
Hokkaido	6/6	14/18
Aomori	1/1	4/4
Akita	1/1	3/3
Miyagi	1/2	1/6
Yamagata	3/5	6/15
Iwate	2/2	3/6
Fukushima	3/3	6/9
Ibaraki	2/2	6/6
Chiba	2/3	4/9
Gunma	3/3	6/9
Tochigi	2/2	5/6
Saitama	3/3	8/9
Tokyo	3/3	4/8
Kanagawa	3/3	3/9
Niigata	2/2	5/6
Nagano	2/3	2/9
Yamanashi	3/3	5/7
Shizuoka	2/2	4/6
Toyama	3/3	7/9
Ishikawa	3/3	7/9
Fukui	4/4	11/16
Gifu	3/4	5/10
Aichi	2/2	5/6
Mie	3/3	6/7
Wakayama	3/3	8/9
Nara	3/3	8/9
Shiga	2/3	5/9
Kyoto	3/3	8/9
Osaka	6/7	10/19
Hyogo	14/15	44/64
Okayama	4/4	11/12
Hiroshima	2/2	5/6
Tottori	3/3	5/9
Shimane	3/3	7/9
Yamaguchi	2/2	5/6
Kagawa	2/2	2/6
Ehime	3/3	5/9
Tokushima	1/1	2/3
Kochi	2/2	6/6
Fukuoka	2/3	3/9
Saga	3/3	8/9
Nagasaki	2/2	4/6
Oita	3/3	6/9
Kumamoto	1/1	2/3
Miyazaki	1/3	1/3
Kagoshima	3/3	6/9
Okinawa	1/3	1/9
Total	131/145	292/444

域または検査法が異なっているが、1973年～1990年の調査成績をまとめると、豚肉4～76.3%【21,24,25,28】、牛肉27.9～40%【21,24,28】、鶏肉10～95%【21,23,24,25,26,28】の範囲で検出されている。また最近における市販食肉の黄色ブドウ球菌汚染調査によると、清水と堀江【27】が1998年に兵庫県で調査した結果では、豚肉36.3%、鶏肉70.0%が本菌に汚染されていたと報告している。海外でも蔣ら【34】が1995年～1998年に中国の市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査し、検出率は豚肉29.5%、牛肉25.0%、鶏肉73.6%であったと報告している。今回の調査結果でも、豚肉30.0%、牛肉38.8%、鶏肉65.8%で、過去の調査とほぼ同様の結果が得られ、汚染率は過去からあまり変動していないことが裏付けられ、また中国でも同様の汚染状況にあることが判明した。

わが国では食肉の処理法及び流通形態が年々変化し、衛生管理レベルは向上しているが、本研究で示したように、汚染率はこれまでとあまり変わらないことから、黄色ブドウ球菌の汚染対策は、食品衛生、公衆衛生上、依然として重要な検討課題であると考えられる。また中国とわが国を比べても同様の状況にあり、昨今中国を含めた諸外国から多くの食肉類が輸入されていることを考えると、わが国だけで汚染対策を講ずるのみならず、輸入元の国々と共同で汚染対策をとっていく必要があるものと思われる。

また鶏肉が豚肉、牛肉に比べて汚染率が高い原因として、食肉の処理方法の違いによることが推定された。鶏肉では、先ずその屠殺～整形処理方法が豚肉、牛肉と異なり、脱羽という工程がある。同じ機械で連続的に多数の個体が脱羽されるため、もし鼻腔や皮膚、腸管などに黄色ブドウ球菌を保菌している個体が存在すると、この脱羽工程の段階で他の個体を汚染する可能性が推察された。また豚肉、牛肉

が屠殺～整形までの加工工程がほぼ機械化され、ほとんど人の手を介さないのに対し、鶏肉は解体する工程が依然として人手によっている。この工程でのヒトや環境内からの二次汚染もあるものと推察される。おそらくはこれら処理方法の差が、検出率の差となったものと推定された。

購入地域別での汚染率については、豚肉、牛肉ともに大阪府が兵庫県に比べて高い傾向にあったが、この理由については不明である。また鶏肉は調査した145店舗中131店舗の検体から黄色ブドウ球菌が検出され、これらの店舗は全都道府県に分散していた。このように市販されている食肉類が広く本菌に汚染されていることが判明し、あらためて食肉類への黄色ブドウ球菌の汚染防止対策の重要性が指摘された。

鶏肉については、検体種類別に汚染率をみても、もも72.8%、むね60.8%、手羽64.9%、肝臓63.8%、筋胃58.1%、心臓及び卵巣各66.7%で、汚染率に大差はみられず、特定の部位が集中的に汚染されているのではないことがわかった。

わが国では、食肉を含む食品の黄色ブドウ球菌を検査する方法は、いわゆる公定法【29】に従い、無作為に検体の一部を数箇所切り取り、10倍乳剤を調製して、これをさらに希釈し、ブドウ球菌選択分離平板培地に塗抹する、定量法が提唱されている。この方法は検体中の菌数を測定し、定量的に評価する方法であるが、検体全体を検査するわけではないため、検体の採取の仕方、あるいは菌量が少ない場合は、陰性と判定される場合が考えられる。本研究では、滅菌綿棒で検体の表面全体を強く拭き取り、その綿棒について検査する方法を採用した。この方法は容易で、またホモジナイザー、ストマッカー、自動秤量分注装置などの特別な設備を必要とせず、また多数の検体を短時間で取り扱うことができ、さらに菌量が少ない検体を検査する方法と

しても有用であると考えられた。しかしながら、菌数測定ができない欠点を持っている。

腸炎ビブリオ、サルモネラなどの食中毒細菌の検出法には選択増菌培養法が実施されているが、黄色ブドウ球菌では直接選択分離平板培地に培養する直接培養法のみが採用されている。潮田【35】、野村ら【36】及び楠ら【37】は、黄色ブドウ球菌の検出法に増菌培養法を取り入れることによって、本菌の検出率が直接培養法に比べて、著しく上昇したことを報告している。本研究で、分離培養法として、直接培養法と増菌培養法を併用したが、検出率は増菌培養法で著しく上昇した。また、食肉類における黄色ブドウ球菌の汚染状況を検査する手法として、検体表面を拭き取って増菌する方法は今後応用されるべきであると考えられた。

以上のように、今回の調査で、特に全国の市販鶏肉が黄色ブドウ球菌に高率に汚染されている実態が明らかになった。著者の知る限り、全国の市販鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染実態調査を行ったのは本研究が初めてである。

要 約

わが国の市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況を把握するために、豚肉及び牛肉は大阪府と兵庫県で、鶏肉については全国47都道府県で購入した検体について、黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査した。

1. 菌検出率は、豚肉30.0%(24/80)、牛肉38.8%(31/80)、鶏肉65.8%(292/444)で、鶏肉が高率に黄色ブドウ球菌に汚染されていた。

2. 鶏肉については、もも、むね、手羽、肝臓、筋胃、心臓、卵巣について検査したが、検体種類別による検出率に差がみられなかった。

3. 購入地域別にみた黄色ブドウ球菌の検出率は、豚肉では大阪府の検体が35.0%、兵庫県の検体が25.0%、牛肉では大阪府が47.5%、兵庫県が30.0%で、豚肉、牛肉いずれも大阪府が兵庫県に比べて高い傾向にあった。

4. 鶏肉は調査した全国47都道府県のすべてから、また145店舗中131店舗(90.3%)の検体から黄色ブドウ球菌が検出され、全国レベルでの汚染が確認された。

5. 検体からの菌分離には、肉表面全体を綿棒で拭き取って直接塗抹する直接培養法と、同綿棒を選択増菌培地に入れ、増殖させる増菌培養法を併用したが、検出率は増菌培養法で著しく上昇した。

第2章

市販食肉から分離された黄色ブドウ球菌の表現型・遺伝子型性状解析

第1節

豚肉、牛肉、鶏肉由来株の生物型別

目 的

食肉類の中で、鶏肉が高率に黄色ブドウ球菌に汚染されていることは、世界各国で共通した所見である【34,38】。

第1章で、わが国で市販されている豚肉、牛肉、鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染調査を実施し、鶏肉(65.8%)が豚肉(30.0%)、牛肉(38.8%)に比べて、高率に本菌に汚染されていることを明らかにした。

これら食肉類を汚染した黄色ブドウ球菌がどこから由来したのかという、いわゆる汚染源を正確に把握することは、本菌の食肉類への汚染拡散防止対策を立てる上で、極めて重要である。

古くから黄色ブドウ球菌の生物学的性状が、由来動物種によって特徴のあることが報告されており、Hájek & Maršálek【39】は6つの性状(スタフィロキナーゼ産生能、色素産生能、ヒト及びウシ血漿凝固能、 α 及び β 溶血毒、クリスタルバイオレット加寒天平板上による増殖型、フェージ感受性)により、6生物型(A～F)に分類した。その後Devrieseら【40,41】及びIsigidiら【42】は、4種類の性状項目(スタフィロキナーゼ産生能、 β 溶血毒、ウシ血漿凝固能、クリスタルバイオレット加寒天平板上による増殖型)による、より簡便な生物型別法を提唱し、宿主特異的生態型としてHuman ecovar (ヒト)、Poultry ecovar (ニワトリ)、

Bovine ecovar (ウシ)、Ovine ecovar (ヒツジ、ヤギ)に分け、またウシ血漿凝固能陰性を条件として5つの宿主非特異的生物型を設定した。この生物型別法は菌株の由来を推定するのに、簡便で有用な方法であることが多くの研究者【43,44,45】によって支持されてきた。

本研究では、第1章で豚肉、牛肉、鶏肉から分離された黄色ブドウ球菌の汚染源を推定する目的で、Devrieseら【40,41】及びIsigidiら【42】の提唱した生物型別法を応用した。

材料及び方法

1. 供試菌株

第1章で豚肉(28株)、牛肉(37株)、鶏肉(714株)から分離された黄色ブドウ球菌を用いた。

2. 生物型試験

Devrieseら【40,41】及びIsigidiら【42】の提案した生物型別法を用い、4種類の性状試験は、以下の方法で行った。

1) スタフィロキナーゼ産生能 (staphylokinase;K)

HIブイヨン(日水製薬)に滅菌したウシフィブリノーゲンを最終濃度が0.05~0.1%になるように溶かしたものを55℃のHI寒天培地(日水製薬)に加え、55℃で10分間保温した。テスト用培地には最終濃度0.5%になるように正常イヌ血清を加え、コントロール用培地には無添加とした。HIブイヨンに培養した被検菌をそれぞれの培地にスポットし、37℃、24時間培養後、テスト用培地にのみスポットの周囲に明瞭な透明帯ができたものをスタフィロキナーゼ産生菌とした。

2) β 溶血毒 (β - hemolysin; β)

市販のヒツジ血液寒天培地(日水製薬)に被検菌を穿刺し、 37°C 、24時間培養後、 4°C で18時間放置し、hot-cold lysisのみられたものを陽性とした。

3) ウシ血漿凝固能(bovine plasma coagulation;BC)

被検菌をHIブイヨン0.5 mlで 37°C 、24時間培養後、市販のウシプラズマ(日本生物材料センター、東京)を0.5 ml加え、これを 37°C の恒温水槽で培養し、24時間までに凝固がみられたものを陽性とした。

4) クリスタルバイオレット加寒天平板上における増殖型
(type of growth on crystal violet agar;CV)

HI寒天培地(日水製薬)にクリスタルバイオレットを1/200,000の濃度になるように加えた培地に菌を大量塗抹し、 37°C 、24時間培養後、室温に2日間放置し、黄色に増殖したものをA型、白色に増殖したものをE型、紫色に増殖したものをC型とした。

5) 生物型

Devrieseら【40,41】及びIsigidiら【42】の生物型規準にもとづき、 $K+\beta \pm BC-CV:A/C/E$ を示したものをHuman型、 $K-\beta-BC-CV:A$ を示したものをPoultry型、 $K-\beta+BC+CV:A$ を示したものをBovine型、 $K-\beta+BC+CV:C$ を示したものをOvine型とした。

成 績

豚肉、牛肉由来株の生物型別の結果は、Table 6に示すよ

うに、豚肉由来28株中17株(60.7%)がHuman型で、次いで7株(25.0%)がK- β +CV:A型で、ヒトに広く分布するHuman型とウシ、ブタなどに多いK- β +CV:A型で全体の約86%を占めていた。

牛肉由来株でも37株中27株(72.9%)がHuman型、次いで4株(10.8%)がK- β +CV:A型で、この2つの生物型で全体の約84%を占めた。

Table 6. Biotypes of *S.aureus* isolates from raw pork and beef

Biotype ^{a)}	Pork isolates (n=28)	Beef isolates (n=37)
Human	17 (60.7%)	27 (72.9%)
Poultry	2 (7.2%)	2 (5.4%)
Ovine	1 (3.6%)	
K- β +CV:A	7 (25.0%)	4 (10.8%)
K- β +CV:C	1 (3.6%)	2 (5.4%)
K- β +CV:E		1 (2.7%)
K- β -CV:C		1 (2.7%)

a)Devriese,L.A.*et al.*[40,41] and Isigidi, B.K.*et al.*[42].

Biotyping pattern (K, staphylokinase; β , β -hemolysin; BC, bovine plasma coagulation; CV, growth on crystal violet agar type A,C or E). Human, K+ β ±BC-CV:A/C; Poultry, K- β -BC-CV:A; Ovine, K- β +BC+CV: C; K- β +CV:A, K- β +BC-CV:A; K- β +CV:C, K- β +BC-CV:C; K- β +CV:E, K- β +BC-CV:E; K- β -CV:C, K- β -BC-CV:C.

鶏肉由来株では、Table 7に示すように、292検体から分離した714株中408株(57.1%)がPoultry型に属し、次いでHuman型158株(22.1%)、K- β -CV:C型64株(9.0%)、K- β +CV:A型45株(6.3%)、K- β +CV:C型38株(5.3%)、Ovine型1株(0.1%)であった。

また検体種類別でみると、もも、むね、手羽、肝臓、筋肉由来株ではPoultry型が最も多かったが、心臓由来株は

10株のすべてが Human型で、また卵巣由来株は5株のすべてが K- β -CV:C型であった。

Table 7. Biotypes of *S. aureus* isolates from raw chicken meat

Meat type	No. of isolates	Biotype ^{a)}					
		Human	Poultry	Ovine	K- β +CV:A	K- β +CV:C	K- β -CV:C
Thigh	191	48	103	1	14	11	14
Breast	65	3	48	0	4	2	8
Wing	241	42	148	0	12	19	20
Liver	171	48	95	0	13	4	11
Gizzard	31	7	14	0	2	2	6
Heart	10	10	0	0	0	0	0
Ovary	5	0	0	0	0	0	5
Total	714	158 (22.1%)	408 (57.1%)	1 (0.1%)	45 (6.3%)	38 (5.3%)	64 (9.0%)

a)Devriese,L.A.*et al.* [40,41] and Isigidi,B.K.*et al.* [42].

See the footnotes on Table 6.

考 察

本研究で、食肉類を汚染していた黄色ブドウ球菌の由来を推定するのに有用な方法とされる、Devrieseら【40,41】及びIsigidiら【42】の生物型別法を応用した。

豚肉由来株の生物型は、ヒトに広く分布する Human型が約61%と最も多く、次にウシ、ブタなどに多い K- β +CV:A型が25.0%で、この両生物型で全体の約86%を占め、牛肉由来株でも Human型が約73%、K- β +CV:A型は約11%で、この両生物型で全体の約84%を占め、鶏肉由来株ではニワトリに多い Poultry型が約57%と最も多く、次いでヒトに多い Human型が約22%で、この両生物型で全体の約79%を占

めていた。豚肉、牛肉、鶏肉いずれもヒトからの二次汚染と、ブタ、ウシ、ニワトリ自体あるいはそれらの飼育環境からの一次汚染が考えられた。このように2つの汚染源が推定され、この結果より、ブタ、ウシ、ニワトリの飼育環境の衛生管理、と畜場や食鳥処理場内の環境衛生管理とと体の衛生管理、食肉販売施設の環境衛生管理、さらに作業従事者や食肉販売従事者の衛生管理と衛生教育の徹底が最重要課題であると考えられた。

外国でも Devrieseら【41】はベルギーで挽肉から分離した40株の35%がPoultry型、25%がHuman型、17.5%がBovine型、2.5%がOvine型、2.0%が非宿主特異的生物型に属し、ヒトと動物由来の菌株で汚染されていることを指摘し、また Mathieuら【46】はザイールで新鮮牛肉から分離した190株の87.4%がHuman型であったことから、作業従事者が牛肉への主要な汚染源である可能性を示唆した。

要 約

市販豚肉(28株)、牛肉(37株)、鶏肉(714株)から分離した黄色ブドウ球菌について、生物型別を行った。

1. 豚肉由来株はヒトに多いHuman型が60.7%(17/28)と最も多く、次いでウシ、ブタに多いK-β+CV:A型が25%(7/28)で、この両生物型で全体の85.7%を占めた。

2. 牛肉由来株でもHuman型が72.9%(27/37)と最も多く、次いでK-β+CV:A型が10.8%(4/37)で、この両生物型で全体の83.8%を占めた。

3. 鶏肉由来株は家禽に多いPoultry型が57.1%(408/714)と最も多く、次いでヒトに多いHuman型が22.1%(158/714)で、この両生物型で全体の79.1%を占めた。

4. 豚肉、牛肉、鶏肉への主要な汚染源として、ブタ、ウシ、ニワトリ自体からの一次汚染と、ヒトからの二次汚染が示唆された。

第2節

豚肉、牛肉、鶏肉由来株のエンテロトキシン産生能と型別

目 的

ブドウ球菌食中毒は食品内毒素型食中毒に分類され、黄色ブドウ球菌が食品中で増殖し、その過程で産生されたエンテロトキシンを食品とともに喫食することによって起こる。

現在ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるエンテロトキシンはA、B、C、D及びEの5型に、さらにC型は等電点の違いによりC₁、C₂及びC₃に分けられ、また1990年代に入ってから、新型のエンテロトキシンG、H、I、J型が、さらに2000年代に入ってから、K、L、M、N、O、P、Q及びR型が相次いで報告【8,9,10,11,12,13】されている。

これまでに日本【27,28】、中国【34】、フランス【45,47】、ベルギー【42】及びザイール【42,46】で、食肉由来の黄色ブドウ球菌について、そのエンテロトキシン産生能と型別を検討した成績はいくつか報告されているが、いずれも1988年～1998年の間に分離された菌株の成績であり、最近の分離株のエンテロトキシン産生率とそのエンテロトキシン型分布についての情報はない。

本研究では、第1節で用いた豚肉、牛肉、鶏肉由来株のエンテロトキシン産生能とその型別分布を調べた。また生物型とエンテロトキシン産生能の関連性についても検討した。

材料及び方法

1. 供試菌株

第1節で豚肉(26株)、牛肉(33株)、鶏肉(360株)から分離された黄色ブドウ球菌を用いた。

2. エンテロトキシン産生能試験

エンテロトキシン産生能及び型別は、逆受身ラテックス凝集反応によるブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット(SET-RPLA; A~D型、デンカ生研、東京)を用いた。被検菌株をブレインハートインヒュージョン(BHI)ブイヨン(Difco) 5 mlに接種し、37℃で18時間振盪培養(100回転/分)した。次に培養液を3,000 rpm、20分間遠心し、その上清を試験に用いた。

小試験管4本にそれぞれ0.9 mlの希釈液を入れ、その後培養上清検体液0.1 mlを第1管目の小試験管に入れ、よく混合し、その0.1 mlを第2管目に入れた。同様の操作を繰り返して、1:10、1:100、1:1,000、1:10,000、の検体希釈液を作製した。1検体につきマイクロプレート(V型)5穴に希釈液25 μ lずつ滴下し、同様に検体希釈液も滴下して、5系列の希釈系列を作った。次に、感作ラテックス抗A、抗B、抗C、抗D及び対照ラテックスを、それぞれの系列に25 μ lずつ滴下し、マイクロプレート用ミキサーでよく混合して、室温で18時間静置後、説明書に従って判定を行った。

成 績

Table 8に示すとおり、豚肉由来株は、26株中10株(38.5%)がエンテロトキシンを産生し、その型はB型が5株で最も多く、次いでA型が3株、C型及びA+D型がそれぞれ1株で、エンテロトキシン産生株のすべてがHuman生物型であった。

一方牛肉由来株では33株中9株(27.3%)がエンテロトキシンを産生し、A型3株、B型2株、C型2株、D型2株で、エンテロトキシン産生株の6株(66.7%)がHuman型で、2株がK- β +CV:A型、1株がK- β +CV:C型であった。

Table 8. Detection of enterotoxigenic *S.aureus* isolates from raw pork and beef

Sample	Biotype ^{a)}	No. of isolates	No. of enterotoxigenic isolates	Enterotoxin type (No. of isolates)
Pork	Poultry	2	0	
	Human	16	10 (62.5%)	A(3), B(5), C(1), A+D(1)
	K- β +CV:A	6	0	
	K- β +CV:C	1	0	
	Ovine	1	0	
	Total	26	10 (38.5%)	
Beef	Poultry	1	0	
	Human	23	6 (26.1%)	A(3), B(1), C(2)
	K- β +CV:A	4	2 (50.0%)	B(1), D(1)
	K- β +CV:C	2	1 (50.0%)	D(1)
	K- β -CV:C	2	0	
	K- β -CV:E	1	0	
	Total	33	9 (27.3%)	

a)Devriese,L.A.*et al.*[40,41] and Isigidi,K.B.*et al.*[42].

See the footnotes on Table 6.

鶏肉由来株ではTable 9に示したように、供試した360株中78株(21.7%)がエンテロトキシンを産生した。検体種類別ではもも20.0%(20/100)、むね25.0%(9/36)、手羽16.3%(20/123)、肝臓25.3%(29/101)、筋胃36.4%(8/22)、心臓・卵巣各50.0%(1/2)で、産生率にはほとんど差がみられなかった。

エンテロトキシン産生78株中50株(64.1%)がB型で最も多く、この型はもも、むね、手羽、肝臓から高率に検出された。次いでA型が14株(17.9%)、C型が8株(10.3%)、D型、A+B型、A+C型がそれぞれ2株(2.6%)であった。

また、エンテロトキシン産生78株は31都道府県の53店舗のスーパーマーケットで購入した鶏肉から検出され、A型株は12県13店舗、B型株は18県33店舗、C型株は8県8店舗、D型株は2県2店舗、A+B型株は1県1店舗、A+C型株は1県1店舗から検出された。

Table 9. Detection of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat

Meat type	No. of isolates	No. of enterotoxigenic isolates	Enterotoxin type					
			A	B	C	D	A+B	A+C
Thigh	100	20 (20.0%)	3	12	2		1	2
Breast	36	9 (25.0%)	2	7				
Wing	123	20 (16.3%)	3	15	1		1	
Liver	75	19 (25.3%)	4	13	2			
Gizzard	22	8 (36.4%)	2	2	3	1		
Heart	2	1 (50.0%)		1				
Ovary	2	1 (50.0%)				1		
Total	360	78 (21.7%)	14 (17.9%)	50 (64.1%)	8 (10.3%)	2 (2.6%)	2 (2.6%)	2 (2.6%)

生物型からみたエンテロトキシン産生能とそのエンテロトキシン型をTable 10に示した。エンテロトキシン産生率が最も高かった生物型はHuman型37.8%、次いでK-β+C V:C型16.7%、Poultry型16.3%、K-β-CV:C型14.3%、K

－ β +CV:A型 12.5%であった。Ovine型からはエンテロトキシン産生株は検出されなかった。エンテロトキシンB型はOvine型を除く、すべての生物型に属する菌株から検出され、特にHuman型とPoultry型で多くみられた。またエンテロトキシンA型はHuman型とPoultry型に属する菌株からのみ検出された。

Table 10. Detection of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat

Biotype ^{a)}	No. of isolates	No. of enterotoxigenic isolates	Enterotoxin type					
			A	B	C	D	A+B	A+C
Human	98	37 (37.8%)	9	24	2		2	
Poultry	178	29 (16.3%)	5	19	2	2		1
Ovine	1	0						
K- β +CV:A	24	3 (12.5%)		2				1
K- β +CV:C	24	4 (16.7%)		2	2			
K- β -CV:C	35	5 (14.3%)		3	2			
Total	360	78 (21.7%)	14 (17.9%)	50 (64.1%)	8 (10.3%)	2 (2.6%)	2 (2.6%)	2 (2.6%)

a) Devriese, L.A. *et al.* [40,41] and Isigidi, B.K. *et al.* [42].

See the footnotes on Table 6.

考 察

1981年から1995年までの15年間で、わが国のブドウ球菌食中毒事例のうち、最も発生件数の多かったエンテロトキシン型はA型(62.4%)であり、A+B型(16.7%)、A+C型(2.9%)、A+D型(3.9%)、A+B+C型(1.5%)、A+B+D型(0.8%)、A+C+D型(0.2%)を合わせると、エンテロトキシンA型産生が全体の88.1%を占めていた【17】。1986年から1995年の10年間

に東京都内で発生した食中毒99事例でも同様の傾向を示し、A型が50例(50.5%)、A+B型が23例(23.2%)、A+D型が7例(7.0%)、B型4例(4.0%)、D型3例(3.0%)、A+C型1例(1.0%)、B+C型1例(1.0%)、不明10例(10.1%)で、A型単独産生と他の型との複合産生を加えると、エンテロトキシンA型が全体の81.8%を占めていた【18】。

最近、新型のエンテロトキシンとしてG型からR型が報告【8,9,10,11,12,13】されているが、現在のところ、わが国ではこれらによる食中毒事例は報告されていない。しかし、小田ら【48】はA～E型以外のエンテロトキシンによる食中毒と推定される2事例を報告している。

今回、豚肉由来株のエンテロトキシン産生率は38.5%で、清水ら【28】の38.5%、中国の蔣ら【34】の30.8%とほぼ同様の成績であった。またエンテロトキシン型はB型が最も多く、次いでA型で、清水ら【28】及び清水と堀江【27】の報告とほぼ同様の成績であった。これに対し、中国の蔣ら【34】の成績ではA型とC型が最も多く、エンテロトキシン型分布に若干の違いが認められた。

一方牛肉由来株では27.3%がエンテロトキシンを産生し、この産生率は清水ら【28】の40%、蔣ら【34】の28.6%に比べると、若干低い値であった。またエンテロトキシン型はA型3株、B型2株、C型2株、D型2株で、型分布に偏りはみられず、清水ら【28】、蔣ら【34】の成績でも同様の型分布を示していた。これに対しザイルの成績【46】では、供試した52株の25%がエンテロトキシンを産生し、その約70%がA型であった。

鶏肉由来株のエンテロトキシン産生率は21.7%で、清水ら【28】の28.4%、蔣ら【34】の31.3%に比べると若干低い値であった。エンテロトキシン型はB型(64.1%)が最も多く、次いでA型(17.9%)とC型(10.3%)であり、清水ら【28】

の報告とほぼ同様の成績であった。このようにわが国の市販鶏肉がB型菌によって高率に汚染されていることが判明し、何故にこのB型菌で汚染されていたのかについては、今後さらに検討する必要があるが、食品取扱者を含めた健康人の鼻前庭、手指から比較的高率にエンテロトキシンB型が検出されている【49,50,51,52】。

生物型とエンテロトキシン産生能との関係については、Human型に属する菌株が他の生物型に属する菌株に比べてエンテロトキシンを産生するものが多いことが報告【42,45,46,49】されている。今回の研究でもこのような傾向が認められたことから、このHuman型の菌株は最も危険な生物型として、食品衛生上十分な注意を払う必要があると思われる。

わが国のブドウ球菌食中毒の原因菌の80%以上がエンテロトキシンA型産生株であり、米国【9】でもエンテロトキシンA型が約78%を占め、何故A型産生株による事例が圧倒的に多いかについては不明確であるが、A型が他の型よりも菌増殖の比較的初期に産生されることや、食品中で早期に蓄積されやすい性質があるからだと考えられている【17】。今回の調査で、豚肉、牛肉、鶏肉のいずれからも検出率は低いが、食中毒事例から高率に検出されるA型毒素が認められたことは、食品衛生上十分な注意を払う必要があると思われる。

本研究では、新型のエンテロトキシンの検出は行っていないが、Rosec & Gigaud【47】は豚肉からG、H、I、J型のいずれかの遺伝子を保有している菌株を分離しており、今後これらの新しいエンテロトキシン型についても検討する必要があると思われる。

要 約

豚肉(26株)、牛肉(33株)、鶏肉(360株)から分離した黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能とその型を調べた。また生物型とエンテロトキシン産生能との関連性についても検討した。

1. 豚肉由来株のエンテロトキシン産生率は38.5%(10/26)で、エンテロトキシン型はB型5株、A型3株、C型1株、A+D型1株であった。またエンテロトキシン産生株はすべてHuman型に属した。
2. 牛肉由来株のエンテロトキシン産生率は27.3%(9/33)で、A型3株、B型2株、C型2株、D型2株であった。エンテロトキシン産生株の生物型はHuman型6株、K- β +CV:A型2株、K- β +CV:C型1株であった。
3. 鶏肉由来株のエンテロトキシン産生率は21.7%(78/360)で、B型50株、A型14株、C型8株、D型2株、A+B型2株、A+C型2株であった。エンテロトキシン産生株の生物型は、Human型37株、Poultry型29株、K- β -CV:C型5株、K- β +CV:C型4株、K- β +CV:A型3株であった。
4. エンテロトキシン産生率は、Human生物型に属する菌株が他の生物型に属する菌株に比べて高い傾向を示した。

第3節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のコアグラ ーゼ型別

目 的

黄色ブドウ球菌の産生するコアグラーゼは抗原性を有し、産生する菌株によって異なることが知られ、その抗原特異性を利用した黄色ブドウ球菌を型別する方法が開発され、これがコアグラーゼ型別法であり、わが国ではファージ型別とともに、実用的な型別法として、ブドウ球菌食中毒や各種のブドウ球菌感染症の感染源、感染経路を調べるための疫学調査に広く応用されている。現在黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型はⅠ～Ⅷ型に分けられている。

これまで、わが国で発生したブドウ球菌食中毒原因菌のコアグラーゼ型はほぼⅡ、Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ型【17】に限られており、また近年ではⅦ型菌による事例が増加していることが報告【8,17】されている。このように、食中毒事例の原因菌のコアグラーゼ型については十分なデータが蓄積されている。一方食肉類から分離される黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型に関する情報【27,28】は極めて不足している。

本研究では、豚肉、牛肉、鶏肉から分離されたエンテロトキシン産生株について、コアグラーゼ型別を行った。

材料及び方法

1. 供試菌株

本章第2節で豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)から分離したエンテロトキシン産生株を使用した。

2. コアグララーゼ型別試験

コアグララーゼ型別はブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清(デンカ生研)を用いた。まず、被検菌株をBHIブイヨン培地(Difco)5 mlに接種し、好氣的条件下で、37℃一夜、振盪培養(100回転/分)した。培養液を3,000 rpm、20分間遠心し、上清を採取し、これを試験用抗原液として用いた。

最初に9本の小試験管に被検菌株の抗原液0.1 mlずつ分注した。この試験管列の第1管から第8管まで、I～Ⅷ型の抗血清をそれぞれ0.1 ml加えてよく混合し、37℃の恒温槽中で1時間反応させた。次に、それぞれの小試験管に5倍希釈正常ウサギ血漿を0.2 mlずつ加え、37℃の恒温槽で反応させ、1時間後に判定を行い、血漿凝固を阻止している試験管の抗血清型をもって、被検菌株のコアグララーゼ型とした。なお、型別が確定しない場合は、さらに反応時間を2時間、4時間、24時間、48時間と延長して判定を行った。

成 績

Table 11に示すように、豚肉由来株では10株すべてが型別され、その内訳はⅦ型が4株(40.0%)、Ⅳ型が3株(30.0%)、Ⅷ型が2株(20.0%)、Ⅲ型が1株(10.0%)であった。またエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、B型：Ⅶ型の組合せが4株と最も多く、次いでA型：Ⅳ型が3株、B型：Ⅷ型、C型：Ⅷ型、A+D型：Ⅲ型がそれぞれ1株であった。

牛肉由来株では9株中8株(88.9%)が型別され、その内訳はⅡ型、Ⅲ型、Ⅳ型がそれぞれ2株(25.0%)、Ⅵ型、Ⅷ型がそれぞれ1株(12.5%)であった。またエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せは、A型：Ⅳ型の組合せが2株、A

型：Ⅲ型、B型：Ⅱ型、B型：Ⅵ型、C型：Ⅷ型、C型：UT、
D型：Ⅱ型、D型：Ⅲ型がそれぞれ1株と、多彩な組合せを示した。

Table 11. Coagulase types of enterotoxigenic *S.aureus* isolates from raw pork and beef

Sample (No. of isolates)	Enterotoxin type	Coagulase type								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	UT ^{a)}
Pork (n=10)	A				3					
	B							4	1	
	C								1	
	A+D			1						
Beef (n=9)	A			1	2					
	B		1				1			
	C								1	1
	D		1	1						

a) Untypable.

鶏肉由来株は、Table 12に示すように、78株中70株(89.7%)が型別され、その内訳はⅦ型が37株(52.9%)で最も多く、次いでⅧ型が15株(21.4%)、Ⅳ型が11株(15.7%)、Ⅴ型が3株(4.3%)、Ⅲ型とⅥ型がそれぞれ2株(2.9%)であった。検体種類別でみると、Ⅶ型はもも、むね、手羽、肝臓、筋胃、心臓、卵巣のすべての材料から高率に検出され、Ⅴ型とⅥ型はもも、むね、手羽からのみ、またⅢ型は肝臓と筋胃からのみ検出された。

また、エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、Table 13に示すように、B型：Ⅶ型が27株と最も多く、次いでB型：Ⅷ型が14株、A型：Ⅳ型が10株、B型：UTが5株、A型：Ⅶ型が4株、B型：Ⅴ型が2株、B型：Ⅵ型が2株、C型：Ⅲ型が2株、C型：UTが2株、A+C型：Ⅶ型が2株、C型：Ⅶ型が2株、C

Table 12. Coagulase types of enterotoxigenic *S.aureus* isolates from raw chicken meat

Meat type	No. of isolates	No. of typable isolates	Coagulase type								
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	UT ^{a)}
Thigh	20	17 (85.0%)				4		1	8	4	3
Breast	9	9 (100%)				1	1		4	3	
Wing	20	19 (95.0%)				2	2	1	8	6	1
Liver	19	18 (94.7%)			1	3			12	2	1
Gizzard	8	5 (62.5%)			1	1			3		3
Heart	1	1 (100%)							1		
Ovary	1	1 (100%)							1		
Total	78	70 (89.7%)	0	0	2 (2.9%)	11 (15.7%)	3 (4.3%)	2 (2.9%)	37 (52.9%)	15 (21.4%)	8 (11.4%)

a) Untypable.

型：V 型 が 1 株、C 型：VIII 型 が 1 株、D 型：VII 型 が 1 株、D 型：UT が 1 株、A+B 型：IV 型 が 1 株、A+B 型：VII 型 が 1 株と多彩な組合せを示した。A 型：IV 型，B 型：VII 型，B 型：VIII 型の組合せが全体の 65.4% を占めていた。

Table 13. Enterotoxin types and coagulase types of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat

Enterotoxin type	No. of isolates	No. of typable isolates	Coagulase type								
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	UT ^{a)}
A	14	14 (100%)				10			4		
B	50	45 (90%)					2	2	27	14	5
C	8	6 (75%)			2		1		2	1	2
D	2	1 (50%)							1		1
A+B	2	2 (100%)				1			1		
A+C	2	2 (100%)							2		
Total	78	70 (89.7%)	0	0	2 (2.9%)	11 (15.7%)	3 (4.3%)	2 (2.9%)	37 (52.9%)	15 (19.2%)	8 (11.4%)

a) Untypable.

考 察

わが国で1981年～1995年までの15年間に発生したブドウ球菌食中毒事例の原因菌のコアグララーゼ型をみると、Ⅶ型が圧倒的に多く、約70%を占めており、次いでⅢ型(約12%)、Ⅱ型(約11%)、Ⅵ型(約3%)で、これらで全体の約92%を占めている【17】。1986年～1995年の10年間に東京都内で発生した食中毒事例でも同様の傾向を示し、Ⅶ型が65例、Ⅲ型が14例、Ⅱ型が10例、Ⅳ型が5例、Ⅵ型が4例、不明が1例であった【8,18,53】。このようにコアグララーゼⅦ型菌による食中毒が突出して多い理由は明確ではないが、自然環境や食品材料における分布率が高いことが反映しているのではないかと考えられる。今回の調査で、豚肉由来株の70%がコアグララーゼⅦ型(40.0%)とⅣ型(30.0%)に属し、清水ら【28】の成績でもⅦ型(70%)が最も多く検出されている。

牛肉由来株では、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅵ、Ⅷ型に分散し、特徴を見出せなかった。この傾向は清水ら【28】の成績でも報告されている。

鶏肉由来株ではⅦ型が52.9%と約半数を占め、次いでⅧ型(21.4%)とⅣ型(15.7%)で、これらで全体の約90%を占めていた。清水ら【28】の成績でも約50%がこれらの型であった。

このように豚肉と鶏肉に食中毒の主要菌型であるⅦ型が多く検出されたことは注目する必要がある。

潮田ら【20】はブタとウシ枝肉分離株のコアグララーゼ型を調べたところ、Ⅷ型菌がブタ株の56.4%、ウシ株の58.8%に認め、ブタ、ウシ枝肉株の特性ではないかと報告している。今回の調査で、市販の豚肉、牛肉、鶏肉に検出頻度は低いが、Ⅷ型菌が広く分布していたことから、このⅧ型と食肉の関連性については今後検討する必要がある。

寺山ら【54】は、ヒト及び食品由来株のエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の間には特に相関性は認められなかったと報告しているが、本研究で鶏肉から検出された黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン型とコアグララーゼ型との間には、エンテロトキシンA型の71.4%がコアグララーゼIV型に、エンテロトキシンB型の82%がコアグララーゼVII型(54%)とVIII型(28%)に属し、また豚肉由来株でもA型の100%がIV型、B型の80%がVII型に属しており、エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の間に相関性が認められた。鶏肉由来株では、エンテロトキシンA型：コアグララーゼIV型、B型：VII型、B型：VIII型の組合せが全体の65.4%を占め、これらの組合せの菌株が豚肉と牛肉からも検出されている。また前2者の組合せは健康人【50】からも高率に検出されている。わが国ではこれまでにA型：IV型【55,56】あるいはB型：VIII型【57】による食中毒事例は極めて少ないが、豚肉、牛肉、鶏肉からこれらの菌型が比較的高率に検出されたことは食品衛生上注目する必要があると考えられた。

また、わが国の食中毒事例でよくみられるA型：VII型が低率ながら鶏肉から検出されている。

要 約

豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)由来エンテロトキシン産生株のコアグララーゼ型を調べた。

1. 豚肉由来株では10株すべてが型別され、その内訳はVII型4株、IV型3株、VIII型2株、III型1株であった。エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、B型：VII型(4株)とA型：IV型(3株)の組合せが多かった。

2. 牛肉由来株では9株中8株(88.9%)が型別され、その内訳はⅡ型2株、Ⅲ型2株、Ⅳ型2株、Ⅵ型1株、Ⅷ型1株であった。エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、8種の組合せがみられ、多彩であった。

3. 鶏肉由来株では78株中70株(89.7%)が型別され、その内訳はⅦ型が37株(52.9%)と最も多く、次いでⅧ型15株、Ⅳ型11株、Ⅴ型3株、Ⅲ型2株、Ⅵ型2株であった。エンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、B型:Ⅶ型(27株)の組合せが最も多く、次いでB型:Ⅷ型(14株)、A型:Ⅳ型(10株)で、これらの組合せが全体の65.4%を占めていた。その他14種類の組合せがみられ、多彩であった。

4. 鶏肉の検体種類別でみると、Ⅶ型はもも、むね、手羽、内臓から高率に検出され、Ⅴ型とⅥ型はもも、むね、手羽からのみ、またⅢ型は肝臓と筋胃からのみ検出された。

第4節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株の薬剤耐性

目 的

1941年にペニシリンGが医療に応用されて以来、数多くの抗生物質が次々に実用化され、各種細菌感染症の治療に多大な貢献をもたらした。しかし一方で、世界的に各種細菌の薬剤耐性化が深刻な社会問題となっている。

1980年代後半になって、バンコマイシンに耐性を示す腸球菌が発見され、その後このVREは世界各国に広がり、院内感染が問題となっている。このVREは外国では豚肉、牛肉、鶏肉から検出され、わが国でも輸入鶏肉から検出されており、食品衛生上注目されている。

黄色ブドウ球菌についても、古くから薬剤耐性化しやすい菌として知られており、近年MRSAに代表される多剤耐性を示す黄色ブドウ球菌が多く検出され、問題となっている。医学・獣医学領域では、各種臨床材料から検出された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する報告は多数みられるが、食品衛生領域における本菌の薬剤耐性に関する動向についてはほとんど明らかにされていない【28,58】。

本研究では豚肉、牛肉、鶏肉から分離されたエンテロトキシン産生株の薬剤耐性について検討した。

材料及び方法

1. 供試菌株

本章第2節で豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)から分離したエンテロトキシン産生株を使用した。

2. 薬剤感受性試験

1濃度ディスク法(昭和薬品化工業、東京)で行った。ペニシリンG(PCG)、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフメタゾール(CMZ)、イミペネム10(IPM)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、エリスロマイシン30(EM)、リンコマイシン(LCM)、テトラサイクリン30(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ノルフロキサシン10(NFLX)、の計12種類の薬剤について試験した。ディスク周辺に形成された阻止円直径を計測し、判定表より、被検菌の感受性を判定した。

3. β -ラクタマーゼ産生能試験

セフィナーゼディスク法(BBL)で行った。被検菌苔を大量、検査用ディスクに塗抹し、1時間以内に赤色を呈したものを β -ラクタマーゼ陽性とした。

成 績

Table 14に示すように、豚肉由来株では10株中8株(80%)が薬剤耐性を示し、耐性型でみると、PCG/ABPC型が4株、PCG/ABPC/EM型、PCG/ABPC/SM/NFLX型、TC/EM/SM/LCM型、NFLX型がそれぞれ1株で、7株が β -ラクタマーゼ陽性であった。なお、薬剤耐性8株はすべてHuman生物型であった。

一方牛肉由来株では9株中4株(44.4%)が薬剤耐性を示し、PCG/ABPC型とPCG/ABPC/DSM型がそれぞれ4株で、すべて β -ラクタマーゼ陽性であった。また4株中2株がHuman生物型であった。

Table 14. Antimicrobial resistance patterns of enterotoxigenic *S.aureus* isolates
from raw pork and beef

Sample	No. of isolates	No. of antimicrobial resistant isolates	Antimicrobial resistance pattern (No. of isolates)	β -lactamase
Pork	10	8 ^{a)} (80.0%)	PCG/ABPC ^{b)} (4)	+
			PCG/ABPC/EM (1)	+
			PCG/ABPC/SM/NFLX (1)	+
			TC/EM/SM/LCM (1)	-
			NFLX (1)	+
Beef	9	4 ^{c)} (44.4%)	PCG/ABPC (2)	+
			PCG/ABPC/SM (2)	+
Total	19	12 (63.2%)		

a) All the isolates were classified as human biotype [40,41,42].

b) Abbreviations are shown in Materials and Methods.

c) Two of 4 isolates were classified as human biotype.

鶏肉由来株はTable 15に示したように、78株中34株(43.6%)が供試したいずれかの薬剤に耐性を示した。検体種類別の薬剤耐性率では、ももが35.0% (7/20)、むねが66.7% (6/9)、手羽が45.0% (9/20)、肝臓が42.1% (8/19)、筋胃が50.0% (4/8)で、むねがやや高い耐性率を示した。

薬剤別ではPCG耐性が20株と最も多く、全体の58.8%を占めていた。次いでABPCが13株(38.2%)、TCが11株(32.4%)、EMが7株(20.6%)、KMが4株(11.8%)、SMが3株(8.8%)、NFLXが2株(5.9%)、CEZ、CMZ、LCMがそれぞれ1株(2.9%)であった。また、薬剤耐性型でみると、単剤耐性型が15株、2剤耐性型が12株、3剤耐性型が4株、4剤耐性型が3株であった。

また薬剤耐性34株中29株(85.3%)が β -ラクタマーゼを産生した。

なお、データは示していないが、生物型からみた薬剤耐性については、薬剤耐性株34株中30株(88.2%)がHuman型(17株、50.0%)とPoultry型(13株、38.2%)に属していた。

Table 15. Antimicrobial resistance patterns of enterotoxigenic *S.aureus* isolates from raw chicken meat

Antimicrobial resistance pattern	Meat type							Total
	Thigh	Breast	Wing	Liver	Gizzard	Heart	Ovary	
PCG ^{a)}	1	1	3	1	1			7
PCG/ABPC	1		2	2	1			6
PCG/ABPC/EM	1		1					2
PCG/ABPC/CEZ				1				1
PCG/CMZ/EM	1							1
PCG/EM/KM/NFLX				1				1
PCG/TC	1							1
PCG/TC/SM/LCM		1						1
ABPC/EM/TC/NFLX	1							1
ABPC/TC		1	1	1				3
EM/TC				1				1
EM/KM		1						1
TC	1	1		1	1			4
KM		1	1					2
SM			1		1			2
No. of antimicrobial resistant isolates / No. of isolates tested	7/20 (35.0%)	6/9 (66.7%)	9/20 (45.0%)	8/19 (42.1%)	4/8 (50.0%)	0/1	0/1	34 ^{b)} /78 (43.6%)

a) Abbreviations are shown in Materials and Methods.

b) Twenty-nine of 34 antimicrobial resistant isolates were β -lactamase producers.

考 察

各種細菌の薬剤耐性菌が、食肉を含む食品を介してヒトへ伝播し、それによる健康危害が世界的に問題となっている。黄色ブドウ球菌は薬剤耐性化しやすい菌であるが、食肉における薬剤耐性黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査した報告はほとんどない。したがって、食肉を介しての薬剤耐性黄色ブドウ球菌とヒトへの健康危害との関連性に関するデータは極めて不足している。

清水ら【28】は市販食肉由来黄色ブドウ球菌の薬剤耐性を調べ、その薬剤耐性率は豚肉由来株で38.5%、牛肉由来株で30%、鶏肉由来株で30.4%であり、鶏肉ではPCG、EM、LCM耐性株が多くみられ、全体の約81%を占めていたと報告している。

今回の調査では、エンテロトキシン産生株についてのみ薬剤耐性を調べたが、豚肉由来株の80.0%、牛肉由来株の44.4%、鶏肉由来株の43.6%が薬剤耐性で、この薬剤耐性率は前述の清水ら【28】の報告に比べてかなり高率であった。またこれら薬剤耐性株の多くがHuman生物型であったことも、疫学的に興味深い所見である。

薬剤別では、いずれの由来株でもPCGとABPC耐性株が高率に検出され、また鶏肉由来株ではTC(32.4%)とEM(20.6%)に耐性を示す株が多くみられている。清水ら【28】の報告でもPCG耐性株が豚肉、牛肉、鶏肉から高率に検出されており、また鶏肉からEM耐性株も高率に検出されており、同様の成績が得られている。また今回の研究で、特に注目されたことは、豚肉由来耐性株の87.5%、牛肉由来株の100%、鶏肉由来株の55.9%が、2～4剤に示す多剤耐性株であり、多剤耐性化の傾向を示していたことであった。このように、市販の豚肉、牛肉、鶏肉が薬剤耐性黄色ブドウ球菌によっ

て、かなり汚染されているという事実は公衆衛生上十分な注意を払う必要があると思われる。

要 約

豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)由来エンテロトキシン産生株の薬剤耐性について検討した。

1. 豚肉由来株では80%(8/10)が薬剤耐性を示し、うち7株がPCGとABPC耐性であった。薬剤耐性株の生物型はすべてHuman型であった。
2. 牛肉由来株では44.4%(4/9)が耐性で、すべてがPCGとABPCに耐性であった。生物型では4株中3株がHuman型であった。
3. 鶏肉由来株では43.6%(34/78)が耐性で、その58.8%(20株)がPCG、38.4%(13株)がABPC耐性であった。またTC(11株,32.4%)とEM(7株,20.6%)耐性株も多くみられた。生物型では34株中30株(88.2%)がHuman型(17株、50.0%)とPoultry型(13株、38.2%)であった。
4. 豚肉、牛肉、鶏肉から分離された耐性株のそれぞれ87.5%、100%、55.9%が2～4剤の多剤耐性を示した。
5. 豚肉、牛肉、鶏肉由来の薬剤耐性46株中40株(86.9%)がβ-ラクタマーゼを産生した。

第5節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のファージ型別

目 的

黄色ブドウ球菌のヒト及び動物における生態並びに本菌による感染症、食中毒の疫学を解析する手段として、これまでに生物型別【39,40,41,42】、コアグララーゼ型別【59】、ファージ型別など、種々の型別方法が開発され、応用されてきた。

ファージ型別は黄色ブドウ球菌の菌型細分法として、世界各国で最も広く応用されている。現在ヒト【60】、ウシ【61】、ニワトリ【62,63】由来株を型別するための、それぞれ独自の型別用ファージセットがある。

本研究では、食肉類に分布する黄色ブドウ球菌の特性を調べるために、ヒト系のファージセットを用いて、豚肉、牛肉、鶏肉由来株のファージ型別を行った。

材料及び方法

1. 供試菌株

本章第2節で豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)から分離したエンテロトキシン産生株を使用した。

2. ファージ型別試験

国際ブドウ球菌ファージ型別委員会によるヒト系ファージセットを用いて型別試験を行った。本ファージセットは23種(I群－29、52、52A、79、80；II群－3A、3C、55、

71 ; Ⅲ 群 - 6、42E、47、53、54、75、77、83A、84、85 ;
V 群 - 94、96 ; 雑 群 - 81、95) の ファージ より 構 成 さ れ る 。
ファージ型別は Shimizu ら 【 63 】 及 び Blair & Williams 【 60 】
の 記 載 し た 方 法 に 準 じ て 行 っ た 。 型 別 に は 100 × routine test
dilution の ファージ濃度を用いた。50個以上のプラークか
ら完全溶菌を示したものを型別可能株と判定した。

成 績

Table 16 に 示 し た よ う に 、 豚 肉 由 来 株 で は 10 株 中 4 株 (40.0%) が 型 別 さ れ 、 そ の 内 訳 は Ⅲ 群 が 1 株 (25.0%)、混 合 群 が 3 株 (75.0%) で 、 4 株 す べ て が Ⅲ 群 ファージのいずれかに溶菌した。エンテロトキシン型とファージ型の組合せでは A 型 : 混 合 群 が 2 株、B 型 : 混 合 群 及 び A+D 型 : Ⅲ 群 が そ れ ぞ れ 1 株 で あ っ た 。

牛 肉 由 来 株 で は 9 株 中 6 株 (62.6%) が 型 別 さ れ 、 そ の 内 訳 は Ⅲ 群 及 び V 群 が そ れ ぞ れ 1 株 (16.7%)、混 合 群 が 4 株 (66.7%) で 、 6 株 中 5 株 が Ⅲ 群 ファージのいずれかに溶菌した。エンテロトキシン型とファージ型の組合せでは A 型 : 混 合 群 及 び D 型 : 混 合 群 が そ れ ぞ れ 2 株、B 型 : V 群 及 び C 型 : Ⅲ 群 が そ れ ぞ れ 1 株 で あ っ た 。

鶏 肉 由 来 株 で は 78 株 中 51 株 (65.4%) が 型 別 さ れ 、 そ の 内 訳 は Ⅲ 群 が 22 株 (43.1%)、混 合 群 が 21 株 (41.2%)、Ⅱ 群 が 6 株 (11.8%)、Ⅰ 群 及 び 雑 群 が そ れ ぞ れ 1 株 (2.0%) で あ っ た 。 混 合 群 で は 1 株 を 除 く 20 株 が Ⅲ 群 ファージのいずれかに溶菌した。エンテロトキシン型とファージ型の組合せでは、B 型 : Ⅲ 群 の 組 合 せ が 18 株 と 最 も 多 く 、 次 い で B 型 : 混 合 群 が 10 株、A 型 : 混 合 群、B 型 : Ⅱ 群 が そ れ ぞ れ 6 株、A 型 : Ⅲ 群、C 型 : 混 合 群、A+B 型 : 混 合 群 が そ れ ぞ れ 2 株、

A型：Ⅰ群、A型：混合群、C型：Ⅲ群、D型：Ⅲ群、D型：混合群がそれぞれ1株であった。

Table 16. Phage groups of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw pork, beef, and chicken meat

Sample (No. of isolates)	Phage group	Enterotoxin type							Total
		A	B	C	D	A+B	A+C	A+D	
Pork (n=10)	Ⅲ							1	1 (25.0%)
	Mixed ^{a)}	2	1						3 (75.0%)
	Untypable	1	4	1					6 (60.0%)
Beef (n=9)	Ⅲ			1					1 (16.7%)
	V		1						1 (16.7%)
	Mixed ^{a)}	2			2				4 (66.7%)
	Untypable	1	1	1					3 (37.4%)
Chicken (n=78)	I	1							1 (2.0%)
	Ⅱ		6						6 (11.8%)
	Ⅲ	2	18	1	1				22 (43.1%)
	Miscellaneous	1							1 (2.0%)
	Mixed ^{a)}	6	10	2	1	2			21 (41.2%)
	Untypable	4	16	5			2		27 (34.6%)

a) Mixed groups (No. of isolates):

Pork- I / Ⅲ (1), I / Ⅲ/Miscellaneous (1), Ⅲ/Miscellaneous (1) ;

Beef- I / Ⅲ/Miscellaneous (4); Chicken- I / Ⅱ (1), I / Ⅲ (6),

Ⅱ / Ⅲ (2), Ⅲ / V (2), Ⅲ/Miscellaneous (1), I / Ⅱ / Ⅲ (1), I / Ⅲ / V (3),

I / Ⅲ/Miscellaneous (1), I / Ⅲ / V/Miscellaneous (2),

Ⅱ / Ⅲ / V/Miscellaneous (1), I / Ⅱ / Ⅲ / V/Miscellaneous (1).

考 察

ファージ型別は、世界各国でブドウ球菌食中毒の疫学調査の「ゴールドスタンダード」と考えられてきた。

わが国及び諸外国で、ブドウ球菌食中毒事例の原因食品から分離された菌株の大多数はヒト系ファージセットで型別され、そのほとんどの菌株がヒト系のⅠ群またはⅢ群ファージのいずれかに感受性を示している【15,31,64,65】。

本研究で、市販食肉から分離されたエンテロトキシン産生株のファージ型別では、豚肉由来株では40.0%、牛肉由来株では62.6%、鶏肉由来株では65.4%が型別され、型別率は由来によって若干違いがみられ、またあまり高くなかったが、いずれの由来株も、前述したブドウ球菌食中毒に関与した原因菌株で多くみられる、Ⅲ群ファージに感受性を示し、興味深い所見が得られた。

清水ら【28】が1988年～1989年に調査した成績でも、市販豚肉、牛肉、鶏肉由来株の大多数がⅢ群とⅠ/Ⅲ群に属していた。またMathieuら【46】がザイールの牛肉由来株について行った成績でも、大多数の菌株がⅢ群ファージに感受性を示したと述べている。

なお、ヒト系セットを用いたファージ型別では、豚肉、牛肉、鶏肉由来株の特性を見出すことができなかった。

要 約

豚肉(10株)、牛肉(9株)、鶏肉(78株)由来エンテロトキシン産生株のヒト系ファージセットによる型別を行った。

1. 豚肉由来株では40.0%(4/10)が型別され、その内訳はⅢ群が1株(25.0%)、混合群が3株(75.0%)で、4株すべてがⅢ群ファージのいずれかに溶菌した。

2. 牛肉由来株では62.6%(6/9)が型別され、その内訳はⅢ群

及び V 群がそれぞれ 1 株 (16.7%)、混合群が 4 株 (66.7%) で、6 株中 5 株が III 群ファージのいずれかに溶菌した。

3. 鶏肉由来株では 65.4% (51/78) が型別され、その内訳は III 群が 22 株 (43.1%)、混合群が 21 株 (41.2%)、II 群が 6 株 (11.8%)、I 群及び雑群がそれぞれ 1 株 (2.0%) であった。51 株中 42 株 (82.4%) が III 群ファージのいずれかに溶菌した。

第6節

鶏肉由来エンテロトキシン産生株のPFGEによる疫学解析

目 的

分子遺伝学的方法(ゲノタイピング法)として、パルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gelelectrophoresis, PFGE)による染色体DNA解析、リボゾームRNA遺伝子を標的としたサザンハイブリダイゼーション解析によるリボタイピング法、ランダムプライムドPCR法などが開発され、特にPFGEは型別能力、識別能力、再現性に優れており、MRSA感染症【66,67】や各種のブドウ球菌感染症の疫学研究に応用され、感染源や感染経路の追跡に有用であることが示されている。またPFGEによって近縁なブドウ球菌菌種間【68】において、そのPFGEパターンが異なることが明らかにされ、菌種同定への可能性が示唆されている。このほか動物に由来する黄色ブドウ球菌【69,70】の生態、疫学的研究にもPFGEが応用されている。

食品衛生学領域でも、PFGEがブドウ球菌食中毒例に応用され、その有用性が確認されている【30,31】。しかしながら、市販食肉類における黄色ブドウ球菌の汚染実態調査にPFGEを応用し、その有用性を検討した報告は極めて少ない【27】。

本研究では、わが国の広範囲な地域の鶏肉から分離されたエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の疫学的関連性を知るために、PFGE解析を行った。

材料及び方法

1. 供試菌株

本章第2節で示した、31都道府県の53店舗の78検体から分離したエンテロトキシン産生78株を用いた。

2. PFGE解析

被検菌株の染色体DNA調整法、制限酵素処理法及び電気泳動法は、George & Kloos【68】の方法にほぼ準じ、また他の論文【66,67,70,71】も参考にした。

1) 染色体DNAの調整とplugの作製

被検菌を5 mlのBHIブイヨンで37℃、一夜振盪培養し、その培養液700 μ lをポリプロピレン製マイクロチューブ(1.5 ml)に移し、8,000 rpm、10分間遠心し菌体を回収した。菌体にTEN buffer(100 mM Tris、150 mM NaCl、100 mM EDTA・2Na、pH 7.5)1 mlを加えて懸濁後、前述の同条件にて遠心洗浄した。その後、洗浄菌体に EC buffer(6 mM Tris-HCl、1M NaCl、100 mM EDTA・2Na、0.5% Brij58、0.2% sodium deoxycholate、0.5% Sarkosyl、pH7.5)300 μ lを加えて懸濁した。この菌体液に25 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)を用いて100 μ g/ ml(180 units/ml)に調整したリゾスタフィン(Sigma)液10 μ lを加え、ミキサーにて混合し、直ちに55℃に保温しておいたEC bufferに溶解した2%低融点アガロース(SEAPLAQUE agarose,FMC)液を300 μ l加えてミキサーにて混合後、専用のアクリル製mold(鋳型)に入れ、室温で10分間置いて固化させた。固化して得られたplugを、EC buffer 3 mlを入れたポリプロピレン製サンプル管(内径16 mm)に移し、37℃、1時間静置して溶菌させた。次にEC bufferを捨て、TE buffer(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA・2Na、pH7.6)3 mlを加えて、55℃、1時間インキュベートした。その後、新鮮なTE buffer 3 mlに置換

して、使用時まで4℃に保存した。

2) 制限酵素 *Sma* I 処理

マイクロチューブに20 unitsの *Sma* I 液(New England BioLabs(NEB), Beverly, Mass., 精製水 110.5 μ l、10% $\times$ NE buffer 12.5 μ l、*Sma* I 2 μ l、計 125 μ l)を入れ、これに前述の plug をカミソリを用いて 3 $\times$ 6 $\times$ 1.5 mm に切り取って移し、25℃で2時間反応させて(130 rpm、回転半径 1.8 cm)染色体 DNA の切断消化を行った。その後 plug を取り出し、泳動ゲル試料溝の陽極側の壁に密着させて埋めた。

3) PFGE

電気泳動用ゲルは 0.5 $\times$ TBE buffer (89 mM Tris-base、89 mM boric acid、2mM EDTA $\cdot$ 2Na、pH 8.0)を用いて、1%アガロース(SeaKem GTG、FMC)100 mlでスラブゲル(12.5 $\times$ 14 cm)を作製し、試料溝の数は15とした。Plugを埋めた試料溝は 0.5 $\times$ TBE bufferを用いて0.8%に調整、溶解した低融点アガロース液でシールし、室温で10分間静置した。PFGE泳動槽に、十分に脱気した 0.5 $\times$ TBE bufferを 2.5 L 入れ、14℃に保持してから泳動ゲルを泳動槽に移して電気泳動(CHEF-DR II システム、Bio-Rad Laboratories, Inc, Richmond, Calif.)を開始した。泳動条件は、パルスタイム 5–40秒、電圧 6V/cm、泳動時間 22時間とした。サイズマーカーには、Lamda Ladder PFG Marker (NEB)を用いた。

泳動ゲルは ethidium bromide(2 μ g/ml)で25分間染色し、精製水を用いて2時間水洗後、UVトランスイルミネーター(302 nm)を用いて観察し、写真撮影した。

成 績

PFGEを用いて、鶏肉から分離したエンテロトキシン産生78株の疫学的関連性について検討した。

供試した78株は44のPFGEパターンに分類され、エンテロトキシンA型が11パターン、B型が22パターン、C型が6パターン、D型が2パターン、A+B型が2パターン、A+C型が1パターンであった。主要な9つのPFGEパターンをFig.2及びTable 17に示す。これらのPFGEパターンの解析結果から、次のような疫学的知見が得られた。

1. パターン8の菌株(エンテロトキシンA型、Human生物型、コアグラゼⅦ型)は群馬県の同一店舗のももと肝臓の検体から分離された。

2. パターン7の菌株(エンテロトキシンB型、Poultry生物型、コアグラゼⅧ型)は愛媛県の異なる2スーパーマーケットの検体から、またパターン9の菌株(エンテロトキシンB型、Human生物型、コアグラゼⅦ型)は北海道の異なる2スーパーマーケットから分離された。

3. 同一パターン(パターン1～6)を示す菌株が、地理的に離れたいくつかの異なる県(2～6県)で分離され、例えばパターン4の15株(エンテロトキシンB型、Human生物型、コアグラゼⅤ、Ⅶ、UT型)は北海道、埼玉県、大阪府、兵庫県、岡山県、鹿児島県の6府県から分離された。

4. エンテロトキシンB型50株のうち、27株(54.0%)はFig.2に示すように、フラグメントのわずかな違いがみられるだけで、類似したPFGEパターン(パターン4～6)を示し、遺伝学的に近縁関係にあった。これら3つのパターンは地理的に遠く離れた11道府県の17店舗のスーパーマーケットで購

入した検体から分離された。またこれら27株のうち22株が Human生物型(16株)と Poultry生物型(6株)に属した。

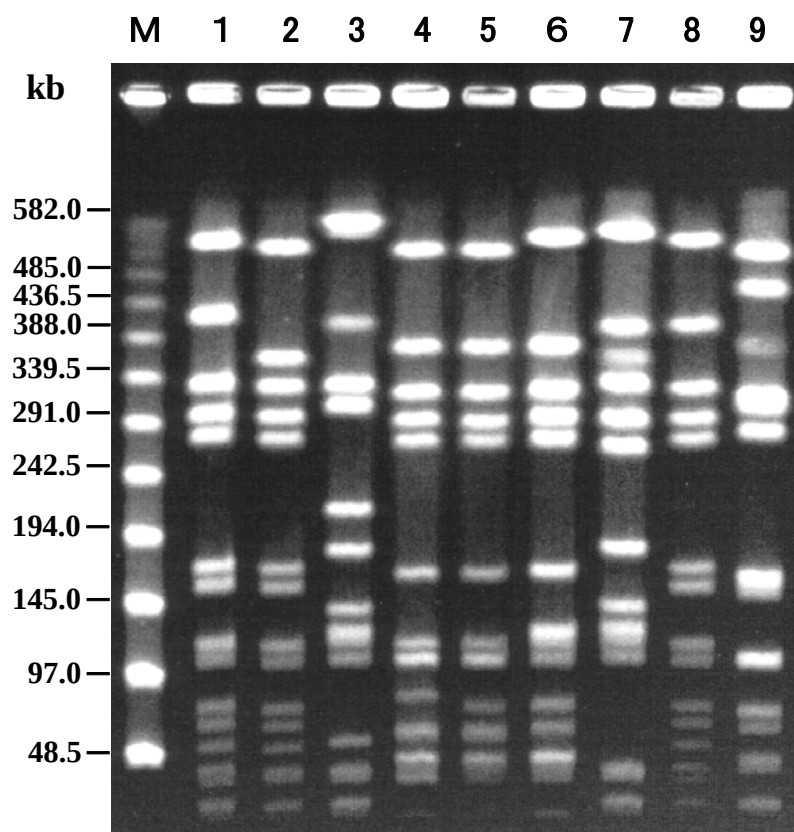


Fig. 2. PFGE of *Sma* I -digested genomic fragments of representative enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat. Lane No.at top corresponds to those of PFGE pattern No. in Table 17. M indicates the lambda ladder DNA concatemers used as molecular size markers (kb).

考 察

黄色ブドウ球菌の生態並びに本菌による各種感染症の疫学を解析する手段として、これまで生物型別、ファージ型別、コアグララーゼ型別などの表現型に基づく方法が用いられ、多くの重要な生態学・疫学的知見を我々に提供してき

Table 17. PFGE patterns, biotypes and coagulase types of representative enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat

PFGE pattern ^{a)}	No. of isolates	Enterotoxin type	Biotype	Coagulase type	Prefecture (No. of supermarkets)
1 ^{b)}	2	A	Poultry	IV	Yamanashi (1), Mie (1)
2 ^{b)}	2	A	Human	IV	Fukushima (1), Oita (1) ^{b)}
3 ^{b)}	3	B	Poultry	VIII	Hyogo (2), Hiroshima (1) ^{b)}
4 ^{b)}	12	B	Human	VII	Hokkaido (1), Saitama (1), Hyogo (1), Okayama(3), Kagoshima (2)
	2	B	Human	V	Osaka (1)
	1	B	Human	UT	Okayama (1)
5 ^{b)}	1	B	Human	VII	Kagoshima (1)
	3	B	Poultry	VII	Hiroshima (1), Shimane (2)
	1	B	K-β+CV:C	VII	Aomori (1),
	2	B	K-β-CV:C	VII	Okayama (1), Kagoshima (1)
6 ^{b)}	3	B	Poultry	VIII	Kyoto (1), Hyogo (1)
	1	B	K-β+CV:A	VII	Tochigi (1)
	1	B	K-β+CV:C	VII	Aomori (1)
7 ^{c)}	3	B	Poultry	VIII	Ehime (2)
8 ^{d)}	2	A	Human	IV	Gunma (1)
9 ^{c)}	2	B	Human	VII	Hokkaido (2)

a) PFGE pattern No. correspond to those of Lane No. in Fig. 1.

b) Isolates of the same PFGE patterns were isolated from samples in different prefectures.

c) Isolates of the same PFGE patterns were isolated from samples in different supermarkets in the same prefectures.

d) Isolates of the same PFGE pattern were isolated from both thigh and liver in the same supermarket.

た。しかし一方で、これらの方法は、型別率、識別能力、再現性、安定性などの面で問題点が指摘されていた。そこで近年では、分子生物学的手法を用いたプラスミド解析、PFGE、リボタイピング法、ランダムプライムドPCRなどの遺伝学的解析に基づく方法が逐次開発されてきた。これらのゲノタイピング法は、直接菌の持っている染色体DNAの多型性を解析する方法なので、プラスミド解析を除いて、同定不能がなく、十分な識別能力があり、安定性(再現性)

がある。特に、本研究で用いたPFGEは、医学領域で問題となっているMRSA感染症【66,67】やウマのMRSA感染症【72】の疫学的研究に応用され、感染源・感染経路の追跡に有用であることが証明されている。

最近になって、食品衛生学領域でもPFGEの有用性が検討されるようになり、Suzukiら【30】は愛知県で発生したブドウ球菌食中毒事例に応用し、同一コアグラマーゼ型の菌株を識別するのに有用であったと述べている。Shimizuら【31】も東京都内で発生した食中毒事例の中で、最も多かったコアグラマーゼⅦ型菌に応用し、コアグラマーゼ型別とPFGEを組合せることによって、より詳細な疫学情報が得られることを報告した。また清水と堀江【27】は、同一店舗内における市販食肉の黄色ブドウ球菌の汚染調査にも、PFGEが有用な方法であることを報告している。

本研究では市販鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況とその分離菌株の性状について、前述した表現型による方法と分子遺伝学的方法の一つであるPFGEを用いて検討した。

今回、鶏肉から分離されたエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌のPFGE解析では、疫学的に興味深い所見として、特にA型とB型産生株で、分離された県、店舗あるいは検体の種類が異なっているにもかかわらず、同一のPFGEパターンを示したものが認められた。例をあげると、同一店舗内で、検体の種類が異なっているにもかかわらず、同一のPFGEパターンを示した例では、同一の加工処理施設あるいは販売店舗内での交叉汚染の可能性が示唆された。同一地域の異なった店舗の検体から同一のPFGEパターンを示した例では、同一の処理施設で加工され、そこで汚染された可能性が考えられた。異なる地域で同一のPFGEパターンを示した例では地理的(北海道、埼玉県、大阪府、兵庫県、

岡山県、鹿児島県)にも遠く離れており、同一の食鳥処理場あるいは加工処理施設で加工が行われたとは考えにくく、生物型の成績から判断すると、ヒトが保菌している菌で汚染されたと考えるのが妥当である。

またエンテロトキシンB産生株の54.0%が3つの類似したPFGEパターンを示し、遺伝学的に極めて近い関係にあることがわかり、これらのパターンを示した菌株が11県・17店舗の検体から分離されたことから、この菌型がわが国の鶏肉の間に広く分布していることが示唆された。

以上のように、PFGE型別を実施することにより、より詳細な疫学情報が得られた。

要 約

鶏肉由来エンテロトキシン産生78株について、PFGEによる疫学解析を試みた。

1. 供試した78株は44のPFGEパターンに分類され、エンテロトキシンA型が11パターン、B型が22パターン、C型が6パターン、D型が2パターン、A+B型が2パターン、A+C型が1パターンであった。
2. 同一エンテロトキシン型、生物型、コアグララーゼ型、PFGEパターンを示す菌株が、同一店舗の異なった種類の検体から、同一県の異なった店舗の検体から、また複数の県(2～6)の検体から分離され、疫学的に興味深い所見が得られた。
3. エンテロトキシンB型産生株の54.0% (27/50)が、3つの

類似した PFGE パターンを示し、遺伝学的に近縁関係にあった。これらのパターンを示す菌株が地理的に遠く離れた 11 道府県の 17 店舗のスーパーマーケットで購入した検体から分離され、わが国の鶏肉の間に広く分布していることが示唆された。

第3章

豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSA汚染状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析

目 的

黄色ブドウ球菌は薬剤耐性化しやすい菌として知られ、MRSAに代表されるように、抗生物質との戦いに勝って多くの薬剤に耐性を獲得し、薬剤耐性菌感染症の治療という新たな問題が投げかけられてきた。

メチシリンという抗生物質は1960年に英国で開発され、ペニシリンGを化学修飾することによって、ペニシリン分解酵素（ペニシリナーゼ）に分解されないようにした半合成ペニシリンである。しかし、臨床応用された翌年の1961年には英国でメチシリンが効かないMRSAが分離され、その後ヨーロッパを中心に広がり、現在では世界中で院内感染を引き起こしている。

黄色ブドウ球菌には分子量の異なる1～4の4種類の細胞壁合成酵素（ペニシリン系の薬剤と結合する性質をもっているため、ペニシリン結合蛋白penicillin-binding protein; PBPと呼ばれている）が細胞質膜上に存在している。 β -ラクタム剤（ペニシリン系とセフェム系の総称）がPBPに結合すると、細胞壁の合成を阻害して、菌を死に至らしめる。ところがMRSAにはさらにもう一つのPBPが存在しており、PBP-2'と呼ばれている。このPBP-2'は β -ラクタム剤との結合親和性が極めて低く、他のPBPの代替酵素として機能することで、 β -ラクタム剤が存在しても細胞壁合成を遂行でき、分裂増殖し続けることができる。

PBP-2'産生を支配する構造遺伝子は*mecA*遺伝子と呼ば

れ、この遺伝子を持った黄色ブドウ球菌をMRSAと定義している。MRSAは β -ラクタム剤のみならず、医学領域で広く用いられている多くの抗菌薬にも耐性を示し、有効な治療薬が少ないため、治療上の大きな問題となっている。

MRSAによる感染症としては、菌血症、敗血症、感染性菌心内膜炎、呼吸器感染症(肺炎、肺膿瘍、膿胸)、皮膚軟部組織感染症(熱傷、褥瘡、皮下膿瘍)、感染性腸炎(下痢症)などがある。治療薬には、バンコマイシン、アルベカシン、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST合剤)、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、ニューキノロンなどの抗菌剤が単独あるいは併用で使用されているが、最近これらの薬剤の耐性化が問題となっている。また最近、特効薬であるバンコマイシンに耐性を獲得したMRSAが臨床例から検出されており、その拡散が懸念されている。

獣医学領域では、1990年代に入ってから、ウシの乳房炎乳汁【73】、ウマの子宮炎【74】と創傷感染症【75,76】、イヌ【75,77,78,79】とネコ【75】の創傷感染症からのMRSAの分離報告が行なわれるようになり、動物における実態も少しずつ明らかにされている。

一方、食品衛生学領域では諸外国を含めて、食肉を含む各種食品におけるMRSAの汚染状況についてはまだ十分な調査【58】が行われておらず、また食品に由来するMRSAの詳細な性状についての知見も極めて少なく、これらMRSAが食品を介してヒトに危害を及ぼすかどうか、論議がなされていないのが現状である。

本研究では、豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSAの汚染状況を調査し、また分離株の性状解析を行った。

材料及び方法

1. 供試菌株

第1章にて、市販豚肉(28株)、牛肉(37株)、鶏肉(714株)から分離した黄色ブドウ球菌を用いた。

2. MRSAの検出法

1) オキサシリン培地によるMRSA候補株の選択

被検菌株を滅菌生理食塩水3 ml中にMacFarland No.0.5になるように懸濁したものを、オキサシリン培地[4%食塩加感性ディスク用培地—N(ニッスイ)にオキサシリンを最終濃度が $6\mu\text{g/ml}$ になるように加えたもの]に約 $20\mu\text{l}$ 塗抹した。 35°C 、18時間培養後、増殖の有無を観察した(Fig.3)。

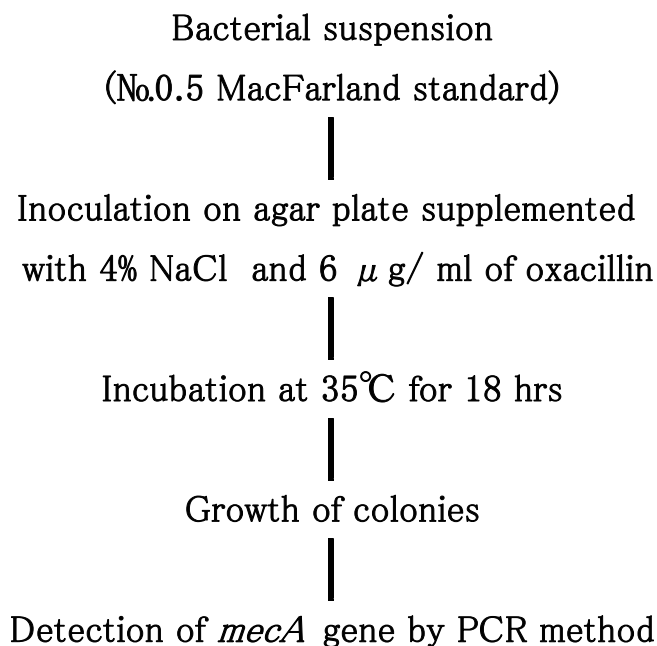


Fig.3. Flow chart for the detection of MRSA

同培地に増殖した菌株をMRSA候補株として、以下の方法で*mecA*遺伝子の検出【80】を試みた。

2) *mecA*遺伝子の検出法

(1) DNAの抽出

前述の方法で選択したMRSA候補株を、BHIブイヨンで37℃、24時間培養後、8,000 rpm、10分間遠心し、沈渣にTris-EDTA(20 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、5 mM EDTA・2Na、pH 8.0)を加えて懸濁し、再び8,000 rpm、10分間遠心した。さらに沈渣をTris-EDTA 200 mlで懸濁し、リゾスタフィン(2.5 mg/ml)2 μ lを加え、37℃に10分間放置した。5分間氷冷後、氷冷した滅菌蒸留水 400 μ lを加え、10分間氷冷した。次に65℃の恒温槽に試料を移し、5分間加熱し、等量の100 mM Tris-HCl(pH 8.0)飽和フェノールを加え、混和後12,000 rpmで10分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し等量のクロロホルム液(クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1)を加え、混和後12,000 rpmで10分間遠心し、上清を新しいチューブに移し、1/10倍量の3 M sodium acetate 溶液(pH 8.0)を加え、さらに2.5倍量のエタノールを加えて-80℃に60分間放置した。その後、12,000 rpmで10分間遠心し、上清を捨て、沈殿したDNAを70%エタノールでリンスした後、減圧乾燥させた。このDNAを100 μ lの滅菌蒸留水に溶解し、このDNA溶液をPCR反応の templateとして用いた。

(2) Polymerase chain reaction(PCR)法

PCR反応には TaKaRa Taq(宝酒造)及び反応槽としてDNA Thermal Cyclor PJ2000(Perkin-Elmer Cetus Instrument)を用いた。TemplateのDNA溶液 2 μ lを、反応液(200 μ M buffer、800 μ M dNTP、2.5 unit/100 μ l Taq Polymerase、0.1 μ M Primer #1、0.1 μ M Primer #2) 18 μ lに加え、ミネラルオイル(Sigma) 20 μ lで反応液を覆い、DNA Thermal Cyclorにセットした。反応は、①熱変

性：94℃ 1分間、②アニーリング：55℃ 2分間、③プライマーの伸長：72℃ 3分間として、25サイクル繰り返した後、さらに72℃で7分間インキュベートした。プライマーは、5'-AGATTGGGATCATAGCGTCA-3'(Primer #1)、相補鎖のプライマーとして 5'-GAAGGTATCATCTTGTACCC-3'(Primer #2)を用いた。これらのプライマーは、*mecA*遺伝子の塩基配列の374-632番目の258塩基対を増幅するものである。

(3) 電気泳動

PCR反応終了後、PCR産物 10 μ lを2.0%アガロースゲル(SeaKem ME,FMC)で100V、20分間電気泳動した。泳動bufferとしてTAE buffer(400 mM Tris、400 mM 氷酢酸、EDTA 1 mM)を用いた。泳動ゲルは、2 mg/ml ethidium bromide液で20分間染色し、精製水を用いて水洗後、UVトランスイルミネーターを用いて増幅されたDNA断片を確認した。

3. メチシリン耐性関連遺伝子群(staphylococcal cassette chromosome *mec* ; SCC *mec*)の解析

Hiramatsuら【81,82,83】の記載した方法で行った。*ccr* gene complexと*mec* gene complexの各遺伝子検出はTable 18に示したプライマーを用いて行った。PCRの条件は①熱変性：94℃、5分間、94℃、1分間、②アニーリング：55℃、2分間、③プライマーの伸長：72℃、3分間として、25サイクル繰り返した後、さらに72℃で10分間インキュベートした。

4. 生物型別試験

第2章第1節に記載した方法で行った。

Table 18. Primer sets used for identifying *SOCmec*

Primer (for detection of)	Nucleotide sequence	Nucleotide position (EMBL#)	Size of PCR product	Reference
<i>acr</i> gene complex				
β	5'-ATTGCCCTTGATAATAGCCTTCT-3'			79
$\alpha 2$	5'-AACCTATATCATCAATGAGTACGT-3'			79
$\alpha 3$	5'-TAAAGGCATCATGCACAAACACT-3'			79
$\alpha 4$	5'-AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT-3'			79
Class A <i>mec</i> gene complex				
<i>mec 2</i>	5'-GAAGGATCATCTTGTACCC-3'	613-632 (#Y00688)	2784bp	81
<i>mec I</i>	5'-ACAAGTGAATTGAAACCGCC-3'	2258-2277 (#X63598)		This study
Class B <i>mec</i> gene complex				
<i>mec RI-1</i>	5'-TTAGTGCTCGTCTCCACGTT-3'	31167-31148 (#AB033763)	2527bp	This study
IS1272-4	5'-CCGAATGATGTGGCTATCAC-3'	28641-28660 (#AB033763)		This study

PCR condition: 94°C 5 min, 94°C 1 min-55°C 2 min-72°C 3 min-25 cycles, and 72°C 10 min.

5. コアグラマーゼ型別試験

第2章第3節に記載した方法で行った。

6. ファージ型別試験

第2章第5節に記載した方法で行った。

7. エンテロトキシン産生能試験と型別

第2章第2節に記載した方法で行った。

8. TSST-1産生能試験

逆受身ラテックス凝集反応によるブドウ球菌 TSST-1 検出用キット(デンカ生研)を用いて行った。TSST-1 産生には BHI ブイヨンを用いた。

9. 薬剤感受性試験

第2章第4節に記載した方法で行った。

10. PFGE解析

第2章第6節に記載した方法で行った。

成 績

1. 豚肉、牛肉における汚染状況

豚肉(28株)、牛肉(37株)からは、MRSAは検出されなかった。

2. 鶏肉における汚染状況

1) オキサシリン培地によるMRSAのスクリーニング試験

292検体(精肉114検体、手羽96検体、内臓82検体)から分離した黄色ブドウ球菌714株(精肉256株、手羽241株、内臓217株)について、オキサシリン培地を用いてスクリーニングテストを実施した。その結果、同培地に2株が発育増殖した。

2) *mecA*遺伝子の検出

前述の2株について、PCR法を用いて*mecA*遺伝子の有無を調べたところ、2株(C17とF14株と命名)とも*mecA*遺伝子を保有していた(Fig.4.)。C17株は兵庫県で市販されていたもも由来、F14株は福岡県で市販されていた肝臓由来のものであった。

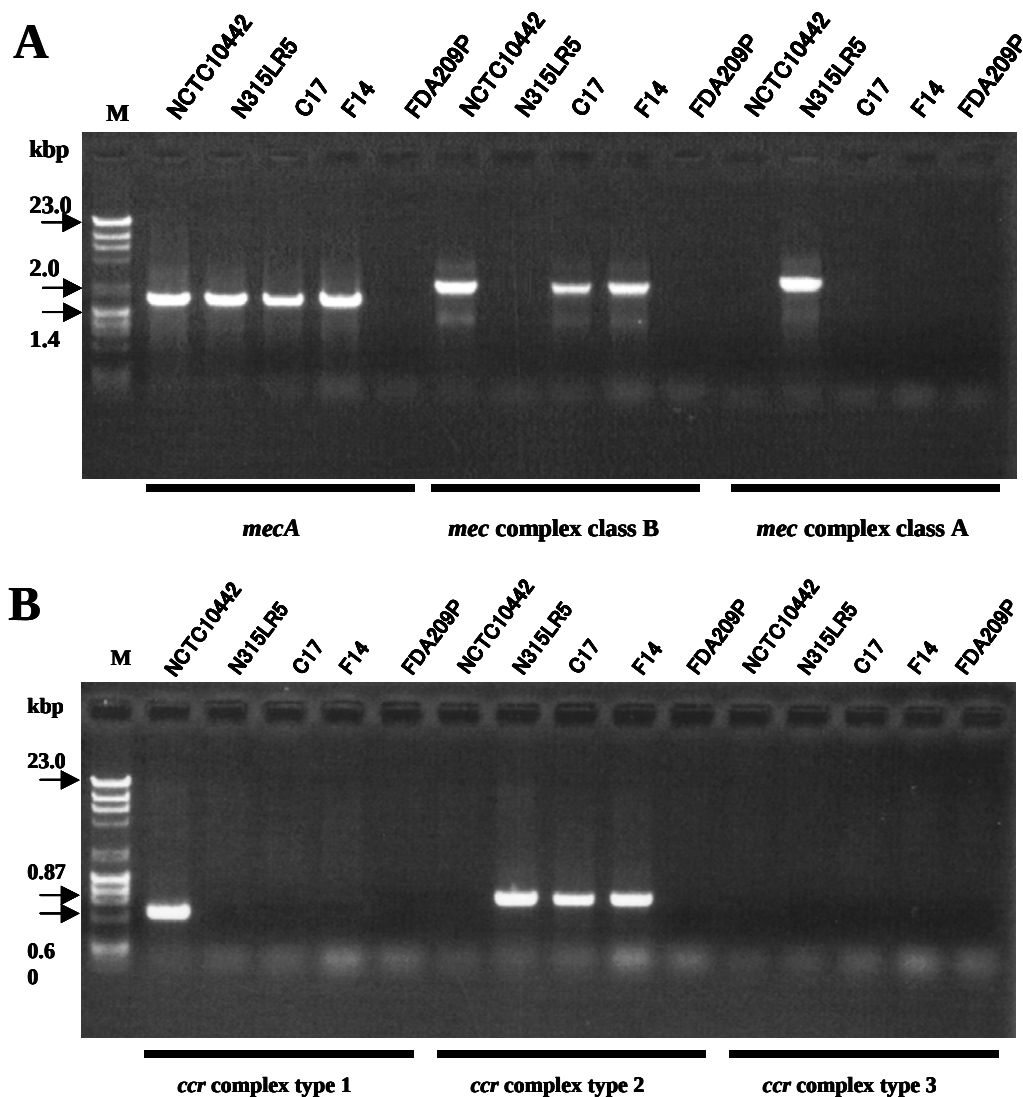


Fig.4. Detection of *mecA* gene (A) and PCR typing of *mec* gene complex (A) and *ccr* gene complex (B) of MRSA isolates C17 and F14. MRSA strains of NCTC 10442(SCC *mec* type I), N315 LR5(SCC*mec* type II), and FDA 209P(methicillin-susceptible *S. aureus*) were also used for references. M indicates size markers(λ /HindIII digest).

3) 表現型・遺伝子型性状解析

分離された2株の表現型性状はTable 19に示したように、C17株はHuman生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅠ・Ⅲ群、エンテロトキシン非産生、TSST-1非産生、PCG/ABPC/EM/GM/KMの5剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。これに対し、F14株はHuman生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅢ群、エンテロトキシンC型、TSST-1産生、PCG/ABPC/CEZの3剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。

次に、C17とF14株について、メチシリン耐性をコードするカセット染色体、SCC *mec*のタイプを調べたところ、両株ともtype-2 *ccr* gene complexとclass B *mec* gene complexを持ち、SCC *mec* type IVであり、いわゆる市中獲得型のMRSAであった(Fig. 4、Table 19)。

Table 19. Characteristics of MRSA isolates from raw chicken meat

Strain name	C17	F14
District・Source	Hyogo prefecture・thigh	Fukuoka prefecture・liver
<i>mecA</i> gene	+	+
Biotype ^{a)}	Human	Human
Coagulase type	Ⅲ	Ⅲ
Phage pattern	29/52A/79/47/53/75+	6/47/53/54/75/83A/85+
Enterotoxin type	—	C
TSST-1 production	—	+
Antibiogram ^{b)}	PCG/ABPC/EM/GM/KM	PCG/ABPC/CEZ
β -lactamase production	+	+
SCC <i>mec</i> type	typeIV	typeIV
	Community-acquired type	Community-acquired type

a) Devriese, L. A. *et al.* [40,41] and Isigidi, B. K. *et al.* [42]. See the footnotes on Table 6.

b) Abbreviations are shown in Materials and Methods of fourth paragraph in chapter II.

PFGE解析ではFig. 5に示すように、C17株とF14株は、互いに異なるPFGEパターンを示した。

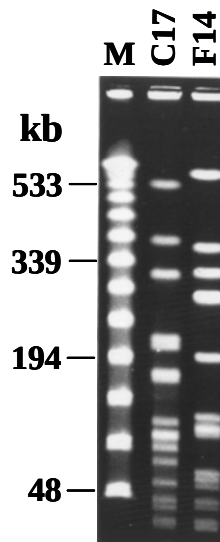


Fig.5. PFGE of *SmaI*-digested genomic fragments of MRSA isolates C17 and F14. M indicates lambda ladder PFGE size markers. See Table 20 for origin and characteristics of isolates.

考 察

薬剤耐性菌の出現歴史は、人類が抗生物質を発見し、使用され始めた時から始まった。1940年代に最初の抗生物質であるペニシリンが使用され始めてほどなく、1950年代にはペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が出現した。以来、これに対応するため各種の抗生物質が開発され、医療領域で使われるようになり、各種の薬剤耐性菌が次々と出現し広がってきた。

一方、薬剤耐性菌を増加させたもう一つの原因とされているのが、家畜・家禽の疾病予防と成長促進の目的で飼料

に添加されたことにより、家畜・家禽の体内で生まれた耐性菌が畜産食品に付着・汚染し、これを食した人あるいは取り扱った人が感染したり、あるいは人の間で広がったといわれている。ヨーロッパでは、特に養鶏においてバンコマイシンと同じグリコペプチド系のアボパルシンが成長促進の目的で使用され、鶏腸管内のVREを増加させ、それが一般の健康なヒト・環境に広がったといわれている。わが国でもタイ産鶏肉からのVREはヒトから分離されたVREとその遺伝子構造が同じであったことから、社会問題となっている。

黄色ブドウ球菌では、特にMRSAが院内感染や術後の菌交代性腸炎などを引き起こし、医療上の難題となっている。このMRSAが問題となっている大きな理由はβ-ラクタム剤のみならず、アミノ配糖体系、マクロライド系、テトラサイクリン系薬などにも耐性を示し、多剤耐性になっていることである。今回、鶏肉から分離された2株のMRSAも、1株がβ-ラクタム剤、マクロライド系、アミノ配糖体系に、1株がβ-ラクタム剤に耐性を示していた。

医療分野では、入院・外来患者、医療従事者のMRSA保菌状況及び医療環境における汚染状況、また分離株の性状についてはかなり明らかにされ、獣医学領域でも動物におけるMRSAの生態に関する研究が少しずつ行われるようになり、動物でのMRSA検出率はヒトに比べると低いですが、動物にも徐々にMRSA汚染が広がってきており、その生態が少しずつ明らかにされている。

一方食品衛生学領域では、食肉を含む各種食品のMRSAの分布状況についてはほとんど明らかにされていない。村上ら【58】は、1997年～2000年までの4年間で広島県内の食品製造施設及び調理施設などから県環境保健協会生活科学センターに搬入された計9,844検体（市販食肉は含まれて

いない)についてMRSAの汚染状況を調査し、そのうち1,115検体(11.3%)で黄色ブドウ球菌が検出され、この陽性検体のうち19検体からMRSAが検出され、食肉(276検体)及び食肉加工品(132検体)では、食肉加工品1検体からMRSAが分離されたと報告している。また、分離されたMRSA42株中32株(76.2%)がコアグララーゼⅢ型に属し、34株(80.9%)がエンテロトキシン非産生で、病院内環境で分離されるMRSAとは性状が異なっていることを指摘している。Lee【85】は韓国のと畜場で鶏肉の化膿巣部と鶏の関節病巣部から計3株のMRSAを分離しているが、豚肉、牛肉材料からは分離されなかったと報告している。また清水ら【86】が1987年～1999年に市販鶏肉(137株)、牛肉(33株)、豚肉(17株)から分離した黄色ブドウ球菌のMRSAを調査したが、MRSAは検出されていない。

本研究では、市販豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSAの汚染状況を調査した結果、大阪府及び兵庫県で購入した豚肉及び牛肉それぞれ80検体からはMRSAは検出されなかった。

しかし鶏肉では全国47都道府県の145店舗より購入した444検体のうち、兵庫県(もも)と福岡県(肝臓)の2検体(0.5%)からMRSAが検出された。鶏肉由来MRSA2株(C17とF14)の性状解析を行ったところ、2株とも*mecA*遺伝子を保有し、コアグララーゼ型は前述した村上ら【58】の報告と同様に、Ⅲ型であった。このコアグララーゼⅢ型のMRSAが何故食肉を含めた食品材料、食品及び調理施設環境に広く分布・汚染しているかについては、今後さらに検討する必要があると思われる。

他の性状解析では、C17株はⅠ群ファージ感受性、エンテロトキシンとTSST-1非産生、EM/GM/KM耐性で、一方F14株はⅠ群ファージ非感受性、エンテロトキシンCとTSST-1産生、EM/GM/KM感受性で、両株間で違いが認められ

た。

今回鶏肉から検出されたMRSA2株の汚染源であるが、その生物型から判断すると、両菌株はヒトに広く分布するHuman型であったことから、食鳥処理場の作業従事者あるいは販売店舗の鶏肉を取り扱った人などからの二次汚染を受けた可能性が考えられた。また今回の調査で、市販食肉からのMRSA検出率は、医療分野と比較すると極めて低率であったが、鶏肉からMRSAが検出されたことは食品衛生上注目に値し、今後さらなる食肉類のMRSA汚染調査を実施し、その実態を解明していく必要があると思われる。

今回の成績から、MRSAがヒトから食肉へ、汚染した食肉からヒトに広がる、ヒト→食肉→ヒトの伝播経路があるのではないかと推測された。MRSAが食肉を介して健康なヒトへのリスク評価に関しては、今後の検討課題と思われる。

Hiramatsuら【81,82,83】は*mecA*遺伝子の伝達単位であるSCC *mec*の存在を明らかにし、4種類が同定されている。Type I SCC *mec*はclassB *mec* gene complexとtype-1 *ccr* gene complexを持ち、コアグラマーゼⅢ型・Ⅳ型の主にヨーロッパのMRSAにみられるタイプであり、NCTC10442株に代表され、英国で最初に分離されたMRSAはこのタイプである。Type II SCC *mec*はclassA *mec* gene complexとtype-2 *ccr* gene complexを持ち、コアグラマーゼⅡ型・Ⅳ型の主に日米のMRSAにみられ、N315株に代表される。日本で分離されるMRSAのほとんどがこれに属する。Type III SCC *mec*はclassA *mec* gene complexとtype-3 *ccr* gene complexを持ち、コアグラマーゼⅣ型のオセアニアやヨーロッパのMRSAにみられ、85/2082株に代表される。Type IV SCC *mec*はclassB *mec* gene complexとtype-2 *ccr* gene complexを持ち、市中獲得型MRSAにみられる。1990年頃から、アメリ

カ【87,88,89】ヨーロッパ【90,91,92】、オーストラリア【93,94】で、病院外でMRSAに感染する例が増加しはじめ、このMRSAは市中で発生したことから市中獲得型MRSA(community-acquired MRSA;C-MRSA)と呼ばれ、病院のMRSA(health-care-associated MRSA;H-MRSA)とは異なるSCC *mec*を持っていることが明らかにされ、その代表的なものがTypeIV *mec*【95】である。わが国でも、幼稚園・保育園児のMRSA保菌調査によると、病院型と異なるSCC *mec*を持つMRSAが増加していることが明らかにされつつある。最近になって、さらに新しいTypeVの存在が報告【96】されている。今回の研究で、もも肉から分離されたC17株と肝臓から分離されたF14株は、ともにTypeIV SCC *mec*であり、病院をはじめとする医療分野で蔓延しているSCC *mec*タイプとは異なっていた。

著者の知る限り、わが国で市販鶏肉からMRSAを検出したのは、本報告が初めてと思われる。

要 約

豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSAの汚染状況と、分離株の表現型・遺伝子型性状について検討した。

1. 豚肉(28株)及び牛肉(37株)から分離した菌株には、MRSAは存在しなかった。
2. 鶏肉292検体から分離した712株のうち、2株(兵庫県、もも肉由来のC17株と福岡県、肝臓由来のF14株)がMRSAであった。

3. C17株は Human生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅠ・Ⅲ群、エンテロトキシン・TSST-1非産生、PCG/ABPC/EM/GM/KMの5剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。F14株は Human生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅢ群、エンテロトキシンC型、TSST-1産生、PCG/ABPC/CEZの3剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。

4. 両株はエンテロトキシンとTSST-1産生性、ファージ感受性、薬剤感受性、PFGEパターンに違いが見られた。

5. 両株はともにその生物型から、ヒト由来の性状を示した。

6. 両株はともにtype-2 *ccr* gene complexとclass B *mec* gene complexを持ち、SCC *mec* typeⅣであり、市中獲得型MRSAであった。

第4章

ヒト・動物における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌及びMRSAの保菌状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析

第1節

ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔における保菌状況と分離株の性状

目 的

ブドウ球菌食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌は、健康なヒトの鼻前庭、咽頭の粘膜面、手指、頭髮などの皮膚消化管内に常在菌として定着しており【51,52,97】、また我々の生活環境にも広く分布しているので、食品への汚染は避けられない。またブタ【98,99】、ウシ【99】、ニワトリ【43,99,100,101,102,103】などの家畜、家禽も鼻腔、皮膚に保菌しており、食肉などの原材料が一次汚染される機会が非常に多い。また屠畜場や食鳥処理場内の環境、機械器具【102】などからも分離されているので、食肉製品に処理・加工される工程で、施設内環境からの二次汚染を受けることもある。

汚染源となりうるヒト、動物の鼻腔・皮膚における黄色ブドウ球菌、特にエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌状況を十分に把握しておくことは、食肉による黄色ブドウ球菌食中毒を未然に防止するための基礎的資料を得る上で極めて重要な課題であると考えられる。しかしながらヒトと動物の鼻腔や皮膚に常在している黄色ブドウ球菌の保菌状況と分離株の性状に関する研究は国内及び海外を問わず、極めて少ない。

本研究は、ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔における黄色ブドウ球菌とエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌状況を把握するとともに、汚染源を推定するために、分離株の生物型別を行った。また本研究ではヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔におけるMRSAの保菌状況と分離株の性状についても併せて検討した。

材料及び方法

1. 検査材料

2003年から2005年の間に、ヒト89検体(学生29検体、食品取扱者60検体)、ブタ66検体、ウシ101検体、ニワトリ42検体、計298検体を検査した。検体の採取方法は、滅菌綿棒で鼻腔内を拭き取り、その綿棒について培養を行った。

2. 分離培養方法

第1章第1節の方法に準じた。

3. 黄色ブドウ球菌の同定方法

第1章第1節の方法に準じた。

4. エンテロトキシン産生能及び型別試験

第2章第2節の方法に準じた。

5. 生物型別試験

第2章第1節の方法に準じた。

6. MRSAの検出と性状試験

第3章の方法に準じた。

成 績

1. 黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌状況と性状

黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率は、Table 20に示すように、ヒト42.7%(38/89)、ブタ86.4%(57/66)、ウシ19.8%(20/101)、ニワトリ9.5%(4/42)であった。ヒトの保菌率は食品取扱者(45.0%)が学生(34.5%)に比べて高かった。

またエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率は、学生で27.6%(8/29)、食品取扱者で25.0%(15/60)であり、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔からは検出されなかった。

Table 20. Incidence of *S.aureus*, enterotoxigenic *S.aureus* and MRSA in the nares of humans and animals

Host	No. of samples	No. of <i>S.aureus</i> positive	No. of enterotoxigenic <i>S.aureus</i> positive	No. of MRSA positive
Human				
Students	29	11 (37.9%)	8 (27.6%)	0
Food handlers	60	27 (45.0%)	15 (25.0%)	5 (8.3%)
Subtotal	89	38 (42.7%)	23 (25.9%)	5 (5.6%)
Pig	66	57 (86.4%)	0	0
Cow	101	20 (19.8%)	0	0
Chicken	42	4 (9.5%)	0	0

ヒト由来株のエンテロトキシン型はTable 21に示すように、学生由来株でA型1株、B型6株、A+D型1株で、食品取扱者由来株ではA型7株、B型3株、C型5株であった。

Table 21. Enterotoxin types of enterotoxigenic *S. aureus* isolates
from the nares of humans

Enterotoxin type	Student (n=8)	Food handler (n=15)	Total (n=23)
A	1 (12.5%)	7 (46.7%)	8 (34.8%)
B	6 (75.0%)	3 (20.0%)	9 (39.1%)
C		5 (33.7%)	5 (21.7%)
A+D	1 (12.5%)		1 (4.3%)

また分離された黄色ブドウ球菌の生物型別は、Table 22に示したように、ヒト由来株では38株中33株(86.8%)がHuman型、5株(13.2%)がPoultry型であった。またニワトリ由来株では4株すべてがPoultry型であった。ブタ由来株では57株中30株(52.6%)がK-β+CV:A型、22株(38.6%)がK-β-CV:C型、3株(5.3%)がPoultry型、2株(3.5%)がHuman型であった。ウシ由来株では20株中10株(50.0%)がK-β+CV:A型、4株(20.0%)がHuman型、3株(15.0%)がK-β-CV:C型、2株(10.0%)がPoultry型、1株(0.5%)がK-β-CV:E型であった。

2. MRSAの保菌状況と性状

MRSAの鼻腔保菌率は、Table 20に示したように、黄色ブドウ球菌を保菌していた学生11人、食品取扱者27人、ブタ57頭、ウシ20頭、ニワトリ4羽のうち、食品取扱者5人のみからMRSAが検出された。

分離された5株(Nos.1～5と命名)の各種性状をTable 23に

Table 22. Biotypes of *S.aureus* isolates from the nares of humans and animals

Biotype ^{a)}	Host			
	Human (n=38)	Pig (n=57)	Cow (n=20)	Chicken (n=4)
Human	33 (86.8%)	2 (3.5%)	4 (20.0%)	
Poultry	5 (13.2%)	3 (5.3%)	2 (10.0%)	4 (100%)
K- β +CV:A		30 (52.6%)	10 (50.0%)	
K- β +CV:C		22 (38.6%)		
K- β -CV:C			3 (15.0%)	
K- β -CV:E			1 (0.5%)	

a) Devriese, L.A. *et al.* [40,41] and Isigidi, B. K. *et al.* [42].

See the footnotes on Table 6.

示す。5株のうち、4株(No.2~5)はHuman生物型、コアグラゼⅢ群で、同一性状を示した。1株(No.1)はHuman生物型であったが、コアグラゼがⅣ型、ファージ型がⅢ/M群で異なっていた。

毒素産生性については、4株(No.1, No.2, No.3, No.5)がエンテロトキシンC型、TSST-1を産生し、1株(No.4)は両毒素を産生しなかった。薬剤耐性では、3株(No.2, No.3, No.4)がPCG/ABPC/CEZ/CMZ/KM/EM型で、2株(No.1, No.5)がPCG/ABPC/CEZ/CMZ/KM型であった。また5株のすべてが β -ラクタマーゼを産生した。

考 察

関口ら【50】は1996年から1997年に東京都内の専門学校

Table 23. Characteristics of MRSA isolates from food handlers

Strain	1	2	3	4	5
Prefecture・Facilities	Hyogo・A	Hyogo・A	Hyogo・A	Hyogo・B	Fukuoka・A
<i>mecA</i> gene	+	+	+	+	+
Biotype ^{a)}	Human	Human	Human	Human	Human
Coagulase type	IV	III	III	III	III
Phage group	III+ M ^{b)}	III	III	III	III
Enterotoxin type	C	C	C	—	C
TSST-1 production	+	+	+	—	+
Antibiogram ^{c)}	PCG/ABPC/ CEZ/CMZ/ KM	PCG/ABPC/ CEZ/CMZ/ KM/EM	PCG/ABPC/ CEZ/CMZ/ KM/EM	PCG/ABPC/ CEZ/CMZ/ KM/EM	PCG/ABPC/ CEZ/CMZ/ KM
β -lactamase production	+	+	+	+	+

a) Devriese, L. A. *et al.* [40,41] and Isigidi, B. K. *et al.* [42].

See footnotes on Table 6.

b) Miscellaneous

c) Abbreviations are shown in Materials and Methods of fourth paragraph in chapter II.

生739人の鼻前庭における黄色ブドウ球菌の保菌状況を調査し、保菌率は12.6%であったと報告している。森ら【51】は神奈川県内の駅弁当製造会社の従業員100人について、年4回にわたって、鼻前庭からの菌分離を行い、延べ400人中65人(16.3%)から黄色ブドウ球菌を検出した。入倉ら【52】は東京都内の学校給食施設従事者325人、弁当惣菜調理人103人、寿司調理人197人、食肉販売業者269人、生鮮魚介類販売業者136人、和菓子製造業者156人、洋生菓子製造業者124人、豆腐製造業者104人の計1,414人の鼻前庭について調査し、検出率は10.9～33.0%の範囲にあり、平

均 21.1%(300/1,414)であった。新井ら【102】は食鳥処理場の解体作業従事者の手指の保菌状況を、2回にわたって調査し、延べ144人中56人(38.9%)から黄色ブドウ球菌を分離している。

今回の調査では学生が37.9%、食品取扱者が45.0%と高い値を示した。前述の報告【50,51,52,102】では綿棒を直接培地に塗抹する方法を用いているが、一方本研究では増菌培養法を用いているため、単純な比較は困難であると思われるが、過去の調査成績に比べて保菌率が高くなっていることは、公衆衛生上注意すべきであると考えられた。また食品取扱者が学生に比べて高い保菌率を示した理由については不明であるが、食品材料と接触する機会が多いことが反映しているのではないかと考えられた。食品取扱者の約半数が鼻前庭に黄色ブドウ球菌を保菌していたことは食品への汚染源となりうる可能性を示唆しており、食品取扱者への衛生教育を徹底させる必要がある。

動物の保菌状況に関して、わが国で行われた調査研究をみると、ブタからの検出率は鼻腔で85.3%【98】、皮膚で41.7~100%【99,100,104】、ウシでは皮膚で23.3~59.5%【99,100】、ニワトリでは鼻腔で10~63.9%【43,101,102】、皮膚で2.5~75.4%【43,99,100,101,102】の範囲にあり、研究者により、また分離部位によりかなりの差が認められている。

今回の調査では、鼻腔保菌率はブタが86.4%と非常に高率で、森ら【98】の報告とほぼ同様の成績であった。一方ウシでは19.8%、ニワトリでは9.5%で、ニワトリの鼻腔保菌率は前述の報告【43,101,102】に比べると低い値を示した。

森ら【51】の報告によると、食品取扱者の鼻前庭におけるエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌率は7.8%で、

そのエンテロトキシン型はD型(41.9%)が最も多く、次いでC型(29.0%)、B型(9.7%)、B+D型(9.7%)、A+B型(6.5%)、A+C+D型(3.2%)であり、入倉ら【52】の報告では食品取扱者の鼻前庭におけるエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌率は13.8%で、エンテロトキシン型はA型(41.0%)が最も多く、次いでA+B型(21.0%)、B型(14.9%)、C型(10.8%)、A+C型(8.2%)、A+B+C型(3.1%)、A+D型(1.0%)で、A型単独産生と他の型との複合産生を加えると、全体の約74%を占めていた。食鳥処理場従事者の手指保菌率は5.6%で、エンテロトキシン型はA型37.5%、A+B型25%、C型25%、B型12.5%であった【101】。一方日常あまり食品を扱わない学生のエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率については不明であるが、鼻腔分離株のエンテロトキシン型はB型(53.3%)が最も多く、次いでA型20.0%、C型10.0%、D型6.7%、A+B型、A+C型、B+D型がそれぞれ3.3%であったとの報告がある【50】。

今回の調査では、食品取扱者及び学生の鼻腔におけるエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の保菌率はそれぞれ25.0%、27.6%でほとんど差がみられず、また前述の報告【50,51,52】に比べて高かった。エンテロトキシン型は食品取扱者ではA型46.7%、C型33.3%、B型20.0%であり、入倉ら【52】の報告とほぼ同様の型別分布を示し、また学生ではB型75.0%、A型、A+D型それぞれ12.5%であり、関口ら【50】の成績でも同様の型別分布を示している。

生物型別では、ヒト由来株では38株中33株(86.8%)がヒトに多いHuman型を示し、ニワトリ由来株では4株すべてが家禽に多いPoultry型で、またブタ、ウシ由来株では多くがブタ、ウシに広く分布しているK- β +CV:A型、K- β +CV:C型であり、ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリに特有の生物型菌を保有していることがわかった。

Isigidiら【105】はベルギーの食肉処理場従事者、獣医学生の鼻腔に存在する黄色ブドウ球菌の生物型を調べたところ、いずれからも大多数の人がHuman型の菌を保菌していたと述べている。

学生及び食品取扱者の鼻腔、手指におけるMRSAの保菌状況を調査した研究は極めて少なく、関口ら【50】は東京都内の専門学校生及びその家族の鼻前庭、手指などから分離した180株について調べたが、MRSAは検出されなかった。食鳥処理場の従事者の手指由来56株の調査【102】でも、MRSAは検出されなかった。

今回の調査で、健康な学生、食品取扱者、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔からMRSAの検出を試みたところ、食品取扱者60人のうち、3加工施設の5人(8.3%)がMRSA保菌者であることが判明した。5人中3人は兵庫県のA加工施設の従事者であり、これら3人の2人から分離された菌株の生物型、コアグララーゼ型、ファージ型は全く同一であり、この施設内でヒトの間で水平伝播が起こっていた可能性が示唆された。また、福岡県・A食肉加工施設の従事者と同じ生物型、コアグララーゼ型、ファージ型、エンテロトキシン型の菌株が市販鶏肉から分離されており、今後ヒトと鶏肉を含めた食肉の間でMRSAの伝播について検討して行きたいと考えている。

疫学マーカーであるコアグララーゼ型でみた場合、全国の国立大学病院由来MRSAの大多数がコアグララーゼⅡ型で、Ⅲ型は極めて少ない【8】。今回の健康な食品取扱者のMRSA 5株の4株がⅢ型で、医療分野における型分布と少し異なっていた。エンテロトキシン型とTSST-1産生性に関しては、5株中4株が医療分野の成績と同様に、C型+TSST-1であった。薬剤耐性では、5株すべてがPCG、ABPCのペニシリン系、CEZ、CMZのセフェム系、KMのアミノ配糖体系抗生

物質に耐性を示し、多剤耐性のMRSAであった。

健康人及び各種食品におけるMRSAの実態については不明なところが多く、今後さらにこれらの調査を実施し、病院内と病院外のMRSAの性状比較を行いたいと考えている。

要 約

ヒト(学生29人、食品取扱者60人)、ブタ(66頭)、ウシ(101頭)、ニワトリ(42羽)の鼻腔における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌、MRSAの保菌状況を調査するとともに、分離株の性状についても検討した。

1. 黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率は、ヒト42.7%(38/89)、ブタ86.4%(57/66)、ウシ19.8%(20/101)、ニワトリ9.5%(4/42)であった。ヒトでは学生の保菌率が37.9%(11/29)、食品取扱者が45.0%(27/60)であった。

2. エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率はヒト25.9%(23/89)で、学生が27.6%(8/29)、食品取扱者が25.0%(15/60)であり、ブタ、ウシ、ニワトリからはエンテロトキシン産生株は検出されなかった。

3. エンテロトキシン型では、学生由来株はA型1株、B型6株、A+D型1株で、食品取扱者由来株ではA型7株、B型3株、C型5株であった。

4. 生物型別では、ヒト由来38株中33株(86.8%)がHuman型に、ブタ由来57株中52株(91.2%)がK-β+CV:A型(30株)とK-β-CV:C型(22株)に、ウシ由来20株中10株(50.0%)がK

－ β +CV:A型に、ニワトリ由来4株のすべてが Poultry型に属し、ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリはそれぞれに特有の生物型菌を保菌していた。

5. MRSAの鼻腔保菌率は、食品取扱者5人からのみ検出され、学生、ブタ、ウシ、ニワトリからは検出されなかった。

6.分離されたMRSA5株中4株が Human型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅢ群で、1株は Human型、コアグララーゼⅣ型、ファージⅢ+M群であった。4株がエンテロトキシンC型でTSST－1を産生した。薬剤耐性では5株のすべてがPCG/ABPC/CEZ/CMZ/KMに耐性を示した。

第 2 節

ヒト由来エンテロトキシン産生株の生物型、コアグラージェ型、ファージ型、薬剤耐性型

目 的

前節で、ヒト及び動物の鼻腔における黄色ブドウ球菌の保菌状況とそれらのエンテロトキシン産生性について検討し、調査した健康人の42.7%が鼻腔内に黄色ブドウ球菌を保菌し、ブタでは86.4%、ウシでは19.8%、ニワトリでは9.5%であった。またエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率はヒトで25.9%であったが、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔からは検出されなかった。

わが国で、ヒト【50,51,52,102】及び動物【101,102,103,106】におけるエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の分布状況とそのエンテロトキシン型についてはいくつか報告されているが、エンテロトキシン産生株の詳細な特性についてはほとんど検討されていない。

本研究では前節で、健康人の鼻腔から分離したエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の特性を明らかにするために、その生物型、コアグラージェ型、ファージ型、薬剤耐性型を調べた。

材料及び方法

1. 供試菌株

本章第1節で、ヒトの鼻腔から分離したエンテロトキシン産生23株を使用した。

2. 生物型別

第2章第1節の方法に準じた。

3. コアグララーゼ型別試験

第2章第3節の方法に準じた。

4. ファージ型別試験

第2章第5節の方法に準じた。

5. 薬剤感受性試験

第2章第4節の方法に準じた。

6. β -ラクタマーゼ産生能試験

第2章第4節の方法に準じた。

成 績

Table 24に示すように、供試した23株の生物型はすべてHuman型であった。

コアグララーゼ型別では23株中22株(95.7%)が型別され、その内訳はIV型が9株(40.9%)で最も多く、次いでVII型5株(22.7%)、II型4株(18.2%)、III型3株(13.6%)、VIII型1株(4.5%)であった。またエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せは、A型：IV型の組合せが8株と最も多く、次いでB型：VII型が4株、B型：II型及びC型：III型がそれぞれ3株、B型：VIII型、C型：IV型、C型：VII型、A+D型：II型及びB型：UTがそれぞれ1株であった。

ファージ型別では23株中13株(56.5%)が型別され、その内訳はIII群が6株、混合群が4株、V群が3株であった。ま

たエンテロトキシン型とファージ型の組合せは9種類みられ、多彩な組合せを示した。

Table 24. Biotypes, coagulase types and phage groups of human enterotoxigenic *S. aureus* isolates

Characterisitic category		Enterotoxin type				
		A (n=8)	B (n=9)	C (n=5)	A+D (n=1)	Total (n=23)
Biotype ^{a)}	Human	8	9	5	1	23 (100%)
Coagulase type	I					0
	II		3		1	4 (18.2%)
	III			3		3 (13.6%)
	IV	8		1		9 (40.9%)
	V					0
	VI					0
	VII		4	1		5 (22.7%)
	VIII		1			1 (4.5%)
	Untypable		1			1 (4.3%)
Phage group	I					0
	II					0
	III	2	1	3		6 (26.1%)
	V		3			3 (13.0%)
	Miscellaneous					0
	Mixed group ^{b)}	1		2	1	4 (17.4%)
	Untypable	5	5			10 (43.5%)

b) Devriese, L. A. *et al.*[40,41] and Isigidi, B. K. *et al.*[42].

See the footnotes on Table 6.

c) Mixed groups (No. of isolates): I / III (1), I / III/Miscellaneous (1), III/Miscellaneous (2).

薬剤耐性試験では、Table 25に示すように、23株中15株(65.2%)が供試したいずれかの薬剤に耐性を示し、すべてが多剤耐性株で β -ラクタマーゼを産生した。薬剤別では15株のすべてがPCGとABPC、6株がKM、4株がCEZとCMZ、

3株がEMに耐性を示した。

Table 25. Antimicrobial resistance patterns of human enterotoxigenic *S. aureus* isolates

Resistance pattern	Enterotoxin type				Total (n=23)
	A (n=8)	B (n=9)	C (n=5)	A+D (n=1)	
PCG/ABPC ^{a)}	4	3	1		8 (53.3%)
PCG/ABPC/KM	1	1			2 (13.3%)
PCG/ABPC/EM	1				1 (6.7%)
PCG/ABPC/CEZ/CMZ/KM			2		2 (13.3%)
PCG/ABPC/CEZ/CMZ/KM/EM			2		2 (13.3%)
Susceptible	2	5		1	8 (34.8%)

a) Abbreviations are shown in Materials and Methods of fourth paragraph in Chapter II.

考 察

健康人の鼻腔や皮膚には、ヒトに特有な Human 生物型の黄色ブドウ球菌が、優勢にかつ広く分布していることが知られている【40】。

本研究でも、健康人の鼻腔から分離された菌株は例外なくすべて Human 型であった。

わが国で発生したブドウ球菌食中毒の原因菌のコアグラーゼ型はほぼⅡ、Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ型に限られており、この中でⅦ型菌による事例が最も多い。また近年Ⅳ型及びⅧ型による食中毒事例も少数ながら報告【55,56,57】されている。今回、ヒト由来エンテロトキシン産生株のコアグラーゼ型別でも、食中毒事例にみられるⅡ、Ⅲ、Ⅶ型が13.6～22.7%の割合で検出されたことから、ヒトが食品への汚染源とな

りうる可能性を示唆しており、食品衛生上注意すべきであると考えられる。

近年わが国ではエンテロトキシンA型：コアグラゼⅣ型【55,56】あるいはB型：Ⅷ型【57】による事例が散見されるようになり、今回これらの菌型がヒトから検出されており、また第2章で述べたように食肉にもこれらの菌型が検出されていることから、ヒト→食肉→食中毒の感染経路の可能性が考えられたが、これらについてはさらに検討する必要がある。

ファージ型別についても、型別された13株のうち10株(76.9%)が諸外国【15,63,64】及び日本【31】でブドウ球菌食中毒の原因となった菌株から頻繁に分離されるⅢ群ファージに感受性を示し、ヒトから食品への二次汚染防止が、食中毒事故防止対策として重要であることが再認識された。

わが国のブドウ球菌食中毒の多くがエンテロトキシンA型によることが報告されており、今回、特に食品取扱者からA型が比較的高率に検出されたことから、これらの保菌者による食品汚染を極力防止する上からも、食品取扱者への衛生教育を徹底させ、食品取扱者自身が汚染源となる可能性の高いことを認識させる必要があると考える。

動物由来株のエンテロトキシン産生能を調べた研究は極めて少なく、一般にヒト由来株に比べて動物由来株ではエンテロトキシン産生率は低いといわれている。ブタ由来株【104】では30%、ニワトリ由来株【43,102,105】では0～4.0%である。本研究で、ブタ、ウシ、ニワトリ分離株のすべてがエンテロトキシンを産生しなかった。

薬剤耐性試験では、耐性を示した15株のすべてがPCGとABPC耐性であり、第2章で述べた食肉由来株にもこの2剤に耐性を示す菌株が多かったことを合せ考えると、ヒトと食肉の間で薬剤耐性菌の伝播が行われている可能性が考え

られた。いずれにしても食品取扱者がこれら多剤耐性黄色ブドウ球菌を保菌していることは、公衆衛生上十分な注意を払い、二次汚染防止に務めるべきであると思われる。

要 約

学生及び食品取扱者の鼻腔から分離したエンテロトキシン産生23株の生物型、コアグララーゼ型、ファージ型、薬剤耐性を調べた。

1. 生物型別では、23株すべてがヒトに広く分布している Human型であった。
2. コアグララーゼ型別では、23株中22株(95.6%)が型別され、その内訳はIV型9株(40.9%)、VII型5株(22.7%)、II型4株(18.2%)、III型3株(13.6%)、VIII型1株(4.5%)であった。またエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せでは、A型：IV型が8株と最も多く、その他8種類の組合せがみられ、多彩であった。
3. ファージ型別では、23株中13株(56.5%)が型別され、うち10株がIII群ファージのいずれかに溶菌した。
4. 薬剤耐性試験では、23株中15株(65.2%)が多剤耐性株で、特に全株がPCGとABPCに耐性を示し、またβ-ラクタマーゼ産生性であった。

総 括

本論文では、食肉類によるブドウ球菌食中毒の防止対策を立てるための基礎的資料を得る目的で、食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌について、まず市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染実態調査を実施し、また分離された黄色ブドウ球菌及びエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の表現型・遺伝子型性状を調べた。次に、薬剤耐性菌の食肉類への汚染拡散防止及びヒトへの健康危害防止の観点から、食肉類におけるMRSAの汚染実態と分離株の表現型・遺伝子型性状について検討した。さらに黄色ブドウ球菌の生態学的研究の一環として、家畜・家禽及びヒトの鼻腔における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌、MRSAの保菌実態調査と、分離株の諸性状についても検討した。得られた成果について以下に記載する。

第1章

市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況

わが国で最も一般的に消費される食肉である、豚肉、牛肉、鶏肉について調査した。豚肉、牛肉は2002年5月～2004年9月にかけて兵庫県と大阪府で、鶏肉は2002年5月～2003年8月にかけて全国47都道府県で購入した検体について、黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査した。菌検出率は豚肉30.0%(24/80)、牛肉38.8%(31/80)、鶏肉65.8%(292/444)で、鶏肉が高率に本菌に汚染されていた。また鶏肉についてはもも、むね、手羽、肝臓、筋胃、心臓、卵巣について検査したが、検体種類別による検出率に差はみられなかった。購入地域による検出率は、豚肉と牛肉ではいずれも大阪府の検体が兵庫県の検体に比べて高い傾向を示した。鶏肉については全国47都道府県すべてから、また145店舗中131

店舗(90.3%)から本菌が検出され、全国レベルでの汚染が確認された。また今回検体から菌を分離する方法として、肉表面を綿棒で拭き取って培地に塗抹する直接培養法と、同綿棒を選択増菌培地に入れ増殖させる増菌培養法を併用したが、検出率は増菌培養法で著しく上昇し、増菌培養法の有用性が確認された。

第2章

市販食肉から分離された黄色ブドウ球菌の表現型・遺伝性状解析

第1節

豚肉、牛肉、鶏肉由来株の生物型別

第1章で豚肉、牛肉、鶏肉から分離された黄色ブドウ球菌(豚肉28株、牛肉37株、鶏肉714株)の汚染源を推定する目的で、生物型別法を応用した。豚肉由来株ではヒトに多いHuman型が60.7%(17/28)と最も多く、次いでウシ、ブタに多いK-β+CV:A型が25.0%(7/28)で、この両生物型で全体の85.7%を占め、牛肉由来株でもHuman型が72.9%(27/37)、K-β+CV:A型が10.8%(4/37)で、この両生物型で全体の83.8%を占めた。鶏肉由来株では、家禽に多いPoultry型が57.1%(408/714)と最も多く、次いでHuman型が22.1%(158/714)で、この両生物型で全体の79.1%を占めた。以上の結果から、豚肉、牛肉、鶏肉への主要な汚染源として、ブタ、ウシ、ニワトリ自体からの一次汚染と、ヒトからの二次汚染が示唆された。

第2節

豚肉、牛肉、鶏肉由来株のエンテロトキシン産生能と型別

第1節で分離した菌株(豚肉26株、牛肉33株、鶏肉360株)についてエンテロトキシン産生能とその型を調べた。エン

テロトキシン産生率は、豚肉由来株では38.5%(10/26)で、その型はB型5株、A型3株、C型、A+D型それぞれ1株であった。牛肉由来株では27.3%(9/33)で、A型3株、B型、C型、D型それぞれ2株であった。鶏肉由来株では21.7%(78/360)で、B型50株、A型14株、C型8株、D型、A+B型、A+C型それぞれ2株であった。またエンテロトキシン産生能と生物型との関連でみると、エンテロトキシン産生率は、豚肉、牛肉、鶏肉由来株いずれもHuman型に属する菌株が他の生物型に属する菌株に比べて高い傾向を示していた。

第3節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のコアグラマーゼ型別

第2節で分離されたエンテロトキシン産生株(豚肉10株、牛肉9株、鶏肉78株)のコアグラマーゼ型を調べた。豚肉由来株では10株すべてが型別され、Ⅶ型4株、Ⅳ型3株、Ⅷ型2株、Ⅲ型1株で、エンテロトキシン型とコアグラマーゼ型の組合せではB型：Ⅶ型(4株)とA型：Ⅳ型(3株)の組合せが多かった。牛肉由来株では9株中8株(88.9%)が型別され、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型それぞれ2株、Ⅵ型とⅧ型それぞれ1株で、エンテロトキシン型とコアグラマーゼ型の組合せでは8株すべてが異なる組合せであった。鶏肉由来株では78株中70株(89.7%)が型別され、Ⅶ型37株、Ⅷ型15株、Ⅳ型11株、Ⅴ型3株、Ⅲ型とⅥ型それぞれ2株で、エンテロトキシン型とコアグラマーゼ型の組合せではB型：Ⅶ型(27株)、B型：Ⅷ型(14株)、A型：Ⅳ型(10株)の組合せが全体の65.4%を占めた。また鶏肉の検体種類別でみると、Ⅶ型はもも、むね、手羽、内臓から高率に検出され、Ⅴ型とⅥ型はもも、むね、手羽からのみ、Ⅲ型は肝臓と筋胃からのみ検出された。

第4節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株の薬剤耐性

第2節で分離されたエンテロトキシン産生株(豚肉10株、牛肉9株、鶏肉78株)の薬剤耐性について検討した。豚肉由来株では80.0%(8/10)が薬剤耐性を示し、うち7株がPCGとABPC耐性で、また耐性株の生物型はすべてHuman型であった。牛肉由来株では44.4%(4/9)が耐性で、すべてがPCGとABPC耐性で、また耐性株の生物型は4株中3株がHuman型であった。鶏肉由来株では43.6%(34/78)が耐性で、うち58.8%(20株)がPCG、38.4%(13株)がABPC耐性であり、またTC(11株,32.4%)、EM(7株,20.6%)耐性株も多くみられた。生物型では34株中30株(88.2%)がHuman型(17株)とPoultry型(13株)であった。豚肉、牛肉、鶏肉由来耐性株のそれぞれ87.5%、100%、55.9%が2~4剤の多剤耐性を示し、また計46株中40株(86.9%)がβ-ラクタマーゼを産生した。

第5節

豚肉、牛肉、鶏肉由来エンテロトキシン産生株のファージ型別

第2節で分離されたエンテロトキシン産生株(豚肉10株、牛肉9株、鶏肉78株)のヒト系ファージセットによる型別を行った。豚肉由来株では40.0%(4/10)が型別され、Ⅲ群1株、混合群3株で、4株すべてがⅢ群ファージのいずれかに溶菌した。牛肉由来株では62.6%(6/9)が型別され、Ⅲ群1株、Ⅴ群1株、混合群4株で、6株中5株がⅢ群ファージのいずれかに溶菌した。鶏肉由来株では65.4%(51/78)が型別され、Ⅲ群22株、混合群21株、Ⅱ群6株、Ⅰ群1株、雑群1株で、51株中42株(82.4%)がⅢ群ファージのいずれかに溶菌した。

第6節

鶏肉由来エンテロトキシン産生株のPFGEによる疫学解析

鶏肉由来エンテロトキシン産生78株について、PFGEによる疫学解析を試みた。78株は44のPFGEパターンに分類され、エンテロトキシンA型が11パターン、B型が22パターン、C型が6パターン、D型及びA+B型が2パターン、A+C型が1パターンであった。

疫学的に興味深い所見として、同一のエンテロトキシン型、生物型、コアグララーゼ型、PFGEパターンを示す菌株が、同一店舗の異なった種類の検体から、同一県の異なった店舗の検体から、また複数の県(2~6)の検体から分離された。またエンテロトキシンB型産生株の54.0% (27/50)が、3つの類似したPFGEパターンを示し、遺伝学的に近縁関係にあった。これらのパターンを示す菌株が地理的に遠く離れた11道府県の17店舗のスーパーマーケットで購入した検体から分離され、わが国の鶏肉の間に広く分布していることが示唆された。

第3章

豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSA汚染状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析

豚肉、牛肉、鶏肉におけるMRSAの汚染状況を調査し、また分離株の表現型・遺伝子型性状について検討した。豚肉(28株)及び牛肉(37株)から分離した菌株にはMRSAは存在しなかったが、鶏肉292検体から分離した712株のうち、2株(兵庫県、もも肉由来のC17株と福岡県、肝臓由来F14株)がMRSAであった。C17株はHuman生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅠ・Ⅲ群、エンテロトキシン・TSST-1非産生、PCG/ABPC/EM/GM/KMの5剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。F14株はHuman生物

型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅢ群、エンテロトキシンC型、TSST-1産生、PCG/ABPC/CEZの3剤耐性、 β -ラクタマーゼ産生性であった。両株はエンテロトキシンとTSST-1産生性、ファージ感受性、薬剤感受性、PFGEパターンに違いが見られた。両株はともにその生物型から、ヒト由来の性状を示した。また両株はともにtype-2 *ccr* gene complexとclass B *mec* gene complexを持ち、SCC *mec* typeⅣであり、市中獲得型MRSAであった。

第4章

ヒト・動物における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌及びMRSAの保菌状況と分離株の表現型・遺伝子型性状解析

第1節

ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔における保菌状況と分離株の性状

ヒト(学生29人、食品取扱者60人)、ブタ(66頭)、ウシ(101頭)、ニワトリ(42羽)の鼻腔における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌、MRSAの保菌状況を調査するとともに、分離株の性状についても検討した。

黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率は、ヒト42.7%(38/89)、ブタ86.4%(57/66)、ウシ19.8%(20/101)、ニワトリ9.5%(4/42)であった。ヒトでは学生の保菌率が37.9%(11/29)、食品取扱者が45.0%(27/60)であった。

エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の鼻腔保菌率はヒト25.9%(23/89)で、学生が27.6%(8/29)、食品取扱者が25.0%(15/60)であり、ブタ、ウシ、ニワトリからはエンテロトキシン産生株は検出されなかった。エンテロトキシン型では、学生由来株はA型1株、B型6株、A+D型1株で、食品取扱者由来株ではA型7株、B型3株、C型5株であった。

生物型別では、ヒト由来38株中33株(86.8%)がHuman型に、ブタ由来57株中52株(91.2%)がK- β +CV:A型(30株)とK- β -CV:C型(22株)に、ウシ由来20株中10株(50.0%)がK- β +CV:A型に、ニワトリ由来4株中すべてがPoultry型に属し、ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリの鼻腔にはそれぞれに特有の生物型菌を保菌していることが明らかにされた。

MRSAの鼻腔保菌率は、食品取扱者5人からのみ検出され、学生、ブタ、ウシ、ニワトリからは検出されなかった。分離された5株中4株がHuman生物型、コアグララーゼⅢ型、ファージⅢ群で、1株はHuman生物型、コアグララーゼⅣ型、ファージⅢ+M群であった。4株がエンテロトキシンC型でTSST-1を産生した。薬剤耐性では5株のすべてがPCG/ABPC/CEZ/CMZ/KMに耐性を示した。

第2節

ヒト由来エンテロトキシン産生株のコアグララーゼ型、ファージ型、薬剤耐性型

学生及び食品取扱者の鼻腔から分離したエンテロトキシン産生23株の生物型、コアグララーゼ型、ファージ型、薬剤耐性を調べた。生物型別では、23株すべてがHuman型であった。コアグララーゼ型別では、23株中22株(95.6%)が型別され、Ⅳ型9株、Ⅶ型5株、Ⅱ型4株、Ⅲ型3株、Ⅷ型1株であった。またエンテロトキシン型とコアグララーゼ型の組合せは、A型：Ⅳ型(8株)の組合せが多かった。ファージ型別では、23株中13株(56.5%)が型別され、10株がⅢ群ファージのいずれかに溶菌した。薬剤耐性試験では、23株中15株(65.2%)が多剤耐性株で、特に全株がPCGとABPCに耐性を示し、また β -ラクタマーゼ産生性であった。

Summary

Staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* is a prevalent food-borne disease throughout the world. In many countries, the foods that most frequently involved in this type of food poisoning are raw milk, milk products, meat and meat products. In Japan, raw meat and meat products have only infrequently been involved in staphylococcal food poisoning, but the consumption of raw meat and meat products has been on the increase yearly in Japan. To prevent food poisoning caused by meat, it is important to determine how much actual contamination with enterotoxigenic *S. aureus* in retail raw meat occurs. However, little information is available on the incidence of enterotoxigenic *S. aureus* in meat. The author thus attempted to detect *S. aureus* and enterotoxigenic *S. aureus* in retail raw pork, beef, and chicken meat in Japan (CHAPTER I).

Enterotoxigenic *S. aureus* have been isolated from retail raw meat, dressed carcasses, hindquarters and the environment in meat-processing plants. However, there is insufficient information on the detailed characteristics of the isolates. The author investigated the phenotypic and genotypic characterization of the enterotoxigenic *S. aureus* isolates from retail raw pork, beef and chicken meat (CHAPTER II).

In human medicine, nosocomial infections caused by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are common throughout the world. Information regarding the isolation and characteristics of MRSA from foodstuffs and foods is insufficient, although several studies have been reported. The author attempted to detect MRSA strains from retail raw meat samples in order to

examine how MRSA contamination prevails in the food hygiene field. In addition, the present study aimed to characterize MRSA isolates by phenotypic and genotypic methods (CHAPTER III).

S. aureus are present in the nasal vestibulum, intestinal tract, and on the skin surface of healthy humans and other mammals or birds. However, the prevalence of *S. aureus* inhabiting the anterior nares of humans and animals has not yet been sufficiently studied. The author investigated the distribution of *S. aureus*, enterotoxigenic *S. aureus*, and MRSA in the anterior nares of healthy humans, pigs, cattle and chickens. In addition, the present study aimed to characterize the isolates by phenotypic and genotypic methods (CHAPTER IV).

These studies and results are described below.

I. Prevalence of *S. aureus* in retail raw pork, beef, and chicken meat

From May 2002 through September 2004, a total of 604 samples comprising 80 pork, 80 beef and 444 chicken meat (thighs, breasts, wings, livers, gizzards, hearts and ovaries) were examined for the contamination with *S. aureus*. The organism was isolated from 24 (30.0%) of the 80 pork, 31 (38.8%) of the 80 beef, and 292 (65.8%) of the 444 chicken meat samples. The *S. aureus* contamination rate in chicken meat was surprisingly high compared with pork and beef. There was no significant differences in the detection rate of *S. aureus* according to the type of chicken meat examined. With respect to chicken meat, samples positive for *S. aureus* were detected in all the 47 prefectures in Japan and in 131 of 145 supermarkets investigated. By introducing the enrichment culture method for *S. aureus*, the detection ratio remarkably increased.

II. Phenotypic and genotypic characterization of *S. aureus* isolates from retail raw pork, beef, and chicken meat

1. Biotyping of *S. aureus* isolates

S. aureus isolates from pork (n=28), beef (n=37), and chicken meat (n=714) were subjected to the biotyping. Twenty-four (85.7%) of the 28 pork isolates belonged to the human (n=17) and K- β +CV:A (n=7) biotypes. Thirty-one (83.8%) of the 37 beef isolates belonged to the human (n=27) and K- β +CV:A (n=4) biotypes. Five hundred and sixty-six (79.1%) of the 714 chicken meat isolates belonged to the poultry (n=408) and the human (n=158) biotypes. The pork, beef and chicken meat examined in the present study was frequently contaminated by *S. aureus* belonging to the K- β +CV:A or poultry biotypes, suggesting that the isolates originated from live pigs, cattle, and chickens. In addition, the human biotype, which is characteristic of strains of human origin, has frequently been isolated from pork, beef and chicken meat, suggesting that the isolates might incidentally be contaminated by workers handling the raw meat during processing.

2. Enterotoxin production of *S. aureus* isolates

S. aureus isolates from pork (n=26), beef (n=33), and chicken meat (n=360) were examined for enterotoxigenicity. Ten (38.5%) of the 26 pork isolates produced enterotoxins B (n=5), A (n=3), C (n=1) and A+D (n=1). Nine (27.3%) of the 33 beef isolates produced enterotoxins A (n=3), B (n=2), C (n=2), and D (n=2). Seventy-eight (21.7%) of the 360 chicken meat isolates produced enterotoxins B (n=50), A (n=14), C (n=8), D (n=2), A+B (n=2), and A+C (n=2). All enterotoxigenic isolates from pork and the majority

of beef and chicken meat isolates were classified as belonging to the human biotype. The production rate of enterotoxins in the isolates of the human biotype was significantly higher than that in isolates of other biotypes.

3. Coagulase types of enterotoxigenic *S. aureus* isolates

Enterotoxigenic isolates from pork (n=10), beef (n=9), and chicken meat (n=78) were subjected to the coagulase typing. All of the 10 pork isolates were typable, and 4 of these belonged to coagulase type VII, 3 to IV, 2 to VIII, and 1 to III. Eight (88.9%) of the 9 beef isolates were typable, and 2 of these belonged to type II, 2 to III, 2 to IV, 1 to VI, and 1 to VIII. Seventy (89.7%) of the 78 chicken meat isolates were typable, and 37 of these belonged to type VII, 15 to VIII, 11 to IV, 3 to V, 2 to III and 2 to VI. Interestingly, most of the beef and chicken meat isolates were type VII, which is the most frequently found in staphylococcal food poisoning outbreaks in Japan.

4. Antimicrobial resistance of enterotoxigenic *S. aureus* isolates

Enterotoxigenic isolates from pork (n=10), beef (n=9), and chicken meat (n=78) were examined for antimicrobial susceptibility. Antimicrobial resistance was found in 8 (80.0%) of the 10 pork isolates, 4 (44.4%) of the 9 beef isolates, and 34 (43.6%) of the 78 chicken meat isolates. The incidence of multiple antimicrobial resistant types was 87.5%, 100% and 55.9% in the resistant isolates from pork, beef and chicken meat, respectively. Overall, resistance to PCG and ABPC, irrespective of source, was the most frequent. Forty (87.5%) of the 46 resistant isolates were β -lactamase producers. From the standpoint of food hygiene, it is noteworthy that antimicrobial resistant isolates

were frequently found in retail raw meat.

5. Phage types of enterotoxigenic *S. aureus* isolates

Enterotoxigenic isolates from pork (n=10), beef (n=9), and chicken meat (n=78) were tested with the 23 phages of the international human typing set. Four (40.0%) of the 10 pork isolates were typable, and 1 of these belonged to group III, and 3 to mixed groups. Six (62.6%) of the 9 beef isolates were typable, and 1 of these belonged to group III, 1 to group V, and 4 to mixed groups. Fifty-one (65.4%) of the 78 chicken meat isolates were typable, and 43 (84.3%) of these belonged to group III (n=22) and the mixed groups (n=21). Overall, most of the pork, beef and chicken meat isolates were lysed by the phages of group III, which are the most commonly found in staphylococcal food poisoning outbreaks.

6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from raw chicken meat and epidemiology

The 78 enterotoxigenic *S. aureus* isolates were further analyzed for their epidemiological relationships by using PFGE. A total of 44 PFGE patterns were identified. The enterotoxin types A, B, C, D, A+B, and A+C isolates yielded 11, 22, 6, 2, 2, and 1 pattern, respectively. Identical enterotoxin types, biotypes, coagulase types and PFGE patterns were shown in isolates from different types of chicken meat at the same supermarkets and from samples taken from different supermarkets in the same prefectures or in isolates from samples obtained from several different prefectures. Among the 50 enterotoxin type B isolates, 27 (54.0%) yielded three similar PFGE patterns that differed by only a few fragments, suggesting that they were closely related

genetically. The three patterns were found in isolates of samples that retailed at 17 supermarkets in 11 prefectures, indicating that they may be disseminated among raw chicken meat in Japan.

III. Prevalence and characterization of MRSA in retail raw pork, beef, and chicken meat

A total of 777 isolates from pork (n=28), beef (n=37), and chicken meat (n=712) were tested for methicillin resistance by screening on oxacillin agar and identification by PCR. Only two *mecA*-positive MRSA (designated C17 and F14) were isolated from raw chicken meat retailing at two supermarkets in two prefectures. The isolate C17 showed the human biotype, coagulase type III, phage group I • III, the lack of production of enterotoxins and TSST-1, resistance to PCG/ABPC/EM/GM/KM, and β -lactamase production. The isolate F14 showed the human biotype, coagulase type III, phage group III, the production of enterotoxin C and TSST-1, resistance to PCG/ABPC/CEZ, and β -lactamase production. The PFGE patterns of the two isolates differed from each other. The two isolates were found to belong to the human biotype, which is characteristic of strains of human origin, suggesting that the two MRSA isolates were transmitted incidentally by workers handling raw chicken meat during the process. The two MRSA isolates harbored SCC*mec* type IV, which has been commonly found in so-called community-acquired MRSA isolates.

IV. Prevalence and characterization of *S. aureus*, enterotoxigenic *S. aureus*, and MRSA in healthy humans and animals

1. Isolation and characterization of *S. aureus*, enterotoxigenic *S. aureus* and MRSA from the anterior nares of humans, pigs,

cattle, and chickens

From May 2003 to December 2005, a survey was conducted of the distribution of *S. aureus*, enterotoxigenic *S. aureus* and MRSA in the anterior nares of 3 kinds of animals and humans. *S. aureus* were isolated from 11 (37.9%) of 29 students, 27 (45.0%) of 60 food handlers, 57 (86.4%) of 66 pigs, 20 (19.8%) of 101 cattle, and 4 (9.5%) of 42 chickens. Thirty-three (86.8%) of the 38 human isolates belonged to the human biotype, 52 (91.2%) of the 57 pig isolates to K- β +CV:A (n=30) and K- β -CV:C (n=22), and 10 (50.0%) of the 20 cattle isolates to K- β +CV:A. All of the 4 chicken isolates were classified as the poultry biotype. The anterior nares of humans, pigs, cattle, and chickens harbored host-specific biotypes, which are characteristic of strains of each host. Enterotoxigenic strains were isolated only from humans, comprising 8 students and 15 food handlers. The enterotoxigenic 23 isolates produced enterotoxins A (n=8), B (n=9), C (n=5), and A+D (n=1). Nasal carriers may be considered the main source of contamination of foods with enterotoxigenic strains. Five *mecA*-positive MRSA strains were isolated only from the 5 food handlers at 3 food-processing facilities in 2 different prefectures. Interestingly, the identical enterotoxin type, biotype, coagulase type, phage group, antimicrobial resistance type were shown in isolates from 2 food handlers at the same facility. This suggests that the spread of MRSA from one food handler to another was uncommonly in this facility.

2. Biotypes, coagulase types, phage types, and antimicrobial resistance types of enterotoxigenic *S. aureus* isolates from humans

The 23 enterotoxigenic *S. aureus* isolates from the anterior

nares of students and food handlers were characterized. All of the 23 isolates belonged to the human biotype. The most predominant coagulase type was IV (n=9), followed by VII (n=5), II (n=4), III (n=3) and VIII (n=1). One strain was untypable. Thirteen (56.5%) of the 23 isolates were phage typed, and 10 of these were associated with lysis by phages of group III. Fifteen (65.2%) of the 23 isolates were resistant to two or more of the 12 antimicrobial agents such as PCG (n=15), ABPC (n=15), KM (n=6), EM (n=4), CEZ (n=4), and CMZ (n=4). All of the resistant isolates were β -lactamase producers.

参考文献

- 1) Hájek, V. and Balusek, J. (1985) : The Staphylococci.
(Jeljaszewicz, J. ed.), pp.129-133, Gustav Fischer Verlag,
Stuttgart, New York.
- 2) Barber, M. A. (1914) : *Philippine J. Sci.*, 9, 515-519.
- 3) Dack, G. M., Cary, W. E., Woolper, O. and Wiggers, H. J. (1930) :
J. Prevent. Med., 4, 167-175.
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課：昭和55年～平成15年の食
中毒発生状況統計資料.
- 5) 厚生省・大阪市原因究明合同専門家会議(2001)：食品衛生研究, 51,
17-91.
- 6) 上田成子(1998) : *Medical Technology*, 26, 757-763.
- 7) 永宗喜三郎, 本田武司(1996) : 日食微誌, 13, 55-61.
- 8) 五十嵐 英夫(2003) : 日食微誌, 20, 51-62.
- 9) Balaban, N. and Rasooly, A. (2000) : *Int. J. Food Microbiol.*, 61,
1-10.
- 10) Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.-L., Ueda, S. and
Shinagawa, K. (2002) : *J. Clin. Microbiol.*, 40, 857-862.
- 11) Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.-L., Kato, H., Takahashi-Omoe,
H., Nakane, A., Uchiyama, T. and Shinagawa, K. (2004) : *Infect.*
Immun., 72, 3664-3667.
- 12) Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi,
A., Pepe, O. and Villani, F. (2004) : *J. A. Microbiol.*, 97, 719
-730.
- 13) Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V.,
Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lövenich, S., Greve, T.,

- Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G. and Bröker, B. M. (2004) : *Infect. Immun.*, 72, 4061-4071.
- 14) Genigeorgis, C. A. (1989) : *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 327-360.
- 15) Wieneke, A. A. ,Roberts, D. and Gilbert, R. J. (1993) : *Epidemiol. Infect.*, 110, 519-531.
- 16) 寺山 武(1991) : 食水系感染症と細菌性食中毒(坂崎利一編集), pp. 336-359, 中央法規出版, 東京.
- 17) 小田隆弘(1998) : 食衛誌, 39, J179-J185.
- 18) 五十嵐英夫(1997) : 防菌防黴, 25, 549-557.
- 19) 農林水産省(2000) : 国民需給表:219.
- 20) 潮田 弘, 藤川 浩, 五十嵐英夫, 丸山 務, 工藤泰雄 (1989) : 東京衛研年報, 40, 1-5.
- 21) 小沼博隆, 品川邦汎(1985) : 肉の科学, 26, 103-114.
- 22) 板屋民子, 徳丸雅一, 砂川 誠, 正木宏幸, 青木敦子, 岩崎久夫(1987) : 日獣会誌, 40, 191-196.
- 23) 徳丸雅一(1988) : 食品と微生物, 5, 59-65.
- 24) 梅木富士郎, 小久保彌太郎, 春田三佐夫, 四宮 栄(1973) : 日獣会誌, 26, 20-23.
- 25) 山崎亨毅(1988) : 昭和62年度日本獣医公衆衛生学年次総会講演要旨集, pp. 286-287.
- 26) 岩上泰雄, 山田米重, 星川博文, 石田謙子, 吉野正克, 大中隆史, 山野井茂樹(1990) : 食品衛生研究, 40, 101-108.
- 27) 清水 晃, 堀江理香(1999) : 日食微誌, 16, 257-261.
- 28) 清水 晃, 尾崎潤一郎, 河野潤一, 木村 重(1991) : 食品と微生物, 8, 135-141.
- 29) 品川邦汎(2004) : 食品衛生検査指針, 微生物編(厚生労働省監修), pp. 236-248, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京.

- 30) Suzuki, Y., Saito, M. and Ishikawa, N. (1999) : *Int.J.Food Microbiol.*, 46, 271-274.
- 31) Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A. and Kawano, J. (2000) : *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3746-3749.
- 32) Devriese, L. A. and Hájek, V. (1980) : *J. Appl. Bacteriol.*, 49, 1-11.
- 33) 成瀬 順(1999) : Medical Technology, 別冊, pp. 332-334, 医歯薬出版株式会社, 東京.
- 34) 蔣 長苗, 劉 佩紅, 丁 建平, 劉 旭光, 胡 東良, 品川邦汎(2001) : 日食微誌, 18, 43-47.
- 35) 潮田 弘(2000) : 食衛誌, 41, J335.
- 36) 野村秀一, 原賀壮勇, 花木秀明, 永山在明(2002) : 日食微誌, 19, 17-20.
- 37) 楠 くみ子, 潮田 弘, 神 真知子, 新井輝美, 岩谷美枝, 石上 武, 山田澄夫(1998) : 日食微誌, 15, 161-165.
- 38) Waldroup, A. L. (1996) : *World's Poult. Sci. J.*, 52, 7-25.
- 39) Hájek, V. and Maršálek E. (1971). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A217, 176-182.
- 40) Devriese, L. A. (1984) : *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 215-220.
- 41) Devriese, L. A., Yde, M., Godard, C. and Isigidi, B. K. (1985) : *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 365-369.
- 42) Isigidi, B. K., Mathieu, A.-M., Devriese, L. A., Godard, C. and Van Hoof, J. (1992) : *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 16-20.
- 43) 斎藤吉広, 清水 晃, 八木 実, 足立崇博, 河野潤一, 氷上雄三, 合田光明, 鋤柄恵子(1994) : 神大農研報, 21, 1-9.
- 44) Nagase, N., Shimizu, A., Kawano, J., Yamashita, K., Yoshimura,

- H., Ishimaru, M. and Kojima, A.(2002) : *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 1169-1172.
- 45) Rosec, J. P., Guiraud, J. P., Dalet, C. and Richard, N. (1997) : *Int. J. Food Microbiol.*, 35, 213-221.
- 46) Mathieu, A.-M., Isigidi, B.K., Devriese, L. A. Godard, C. and Van Hoof, R.(1991) : *Int. J. Food Microbiol.*, 14, 119-126.
- 47) Rosec, J. P. and Gigaud, O.(2002) : *Int. J. Food Microbiol.*, 77, 61-70.
- 48) 小田隆弘, 樋脇 弘, 椿本 亮, 久保倉宏一(1996) : 日食微誌, 13, 133-136.
- 49) Hájek, V. and Maršálek, E. (1973) : *Zbl. Bakt. Hyg., Abt. Orig.* A223, 63-68.
- 50) 関口幸枝, 浅香清美, 川端 彰, 斉藤 勝, 加藤硯雄, 加納堯子(1997) : 食衛誌, 38, 418-424.
- 51) 森 實, 加藤英一, 浜田輔一 (1977) : 日細菌誌, 501-508.
- 52) 入倉義久, 池島伸至, 平田一郎, 新井輝義, 楠 くみ子, 神 真知子, 大田建爾 (1987) : 東京衛研年報, 38, 145-149.
- 53) 五十嵐英夫(1993) : 食品衛生研究, 43, 31-45.
- 54) 寺山 武, 五十嵐 英夫, 潮田 弘, 善養寺浩(1972) : 食衛誌, 13, 549-554.
- 55) 松崎静枝, 冨田正章, 片山 淳, 遠藤隆二, 宮村惠宣(1994) : 日食微誌, 11, 137-139.
- 56) 柴田幹良, 柳川義勢, 新井輝義, 甲斐朋美, 諸角 聖(2001) : 東京衛研年報, 52, 3-6.
- 57) 松崎静枝, 片山 淳, 岩崎 明, 宮村惠宣, 和田隆至, 正田聖事, 石戸泰則(1996) : 日食微誌, 13, 89-91.
- 58) 村上和保, 石橋 弥, 和田貴臣(2002) : 日食微誌, 19, 127-131.

- 59) 潮田 弘, 寺山 武(1979) : 臨床検査, 23, 779-784.
- 60) Blair, J. E. and Williams, R. E.O. (1961) : *Bull. WHO.*, 24, 771-784.
- 61) Davidson, I. (1972) : *Bull. WHO.*, 46, 81-98.
- 62) Gibbs, P. A., and Patterson, J. T. and Thompson, J. K. (1978) : *J. Appl. Bacteriol.*, 44, 387-400.
- 63) Shimizu, A.(1977) : *Am. J. Vet. Res.*, 38, 1601-1605.
- 64) Niskanen, A. and Koiranen, L. (1977) : *J. Food Protect.*, 40, 543-548.
- 65) Melconian, A. K., Brun, Y. and Fleurette, J. (1983) : *J. Hyg.* (Cambridge)., 91, 235-242.
- 66) Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N. and Takeuchi, J. (1991) : *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2690-2695.
- 67) 満田年宏, 荒井一二, 川本 進, 横田俊平(1995) : 日細菌誌, 50, 1077-1086.
- 68) George, C. G. and Kloos, W. E. (1994) : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 404-409.
- 69) McCullagh, J. J., McNamee, P. T., Smyth, J. A. and Ball, H. J. (1998) : *Vet. Microbiol.*, 63, 275-281.
- 70) Shimizu, A., Kawano, J., Yamamoto, C., Kakutani, O. and Fujita, M. (1997) : *Am. J. Vet. Res.*, 58, 1412-1416.
- 71) Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C. and Miller, J. M. (1995) : *J. Clin. Microbiol.*, 33, 551-555.
- 72) Shimizu, A., Kawano, J., Yamamoto, C., Kakutani, O., Anzai, S. and Kamada, M. (1997) : *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 935-937.
- 73) Devriese, L. A., & Hommeez, J. (1975) : *Res. Vet. Sci.*, 19, 23-27.
- 74) Anzai, T., Kamada, M., Kanemura, T. Sugita, S., Shimizu, A.,

- and Higuchi, T., (1996) : *J. Equine Sci.*, 7, 7-11.
- 75) Rich, M. and Roberts, L. (2004) : *Vet. Rec.*, 154, 310.
- 76) Seguin, J. C., Walker, R. D., Caron, J. P., Kloos, W. E., George, C. G., Hollis, R. J., Jones, R. N. and Pfaller, M. A. (1999): *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1459-1463.
- 77) Gortel, K., Cambell, K. L., Kakoma, I., Whittem, T., Schaeffer, D. J. and Weisiger, R. M. (1999) : *Am. J. Vet. Res.*, 60, 1526-1530.
- 78) Pak, S-I., Han, H-R. and Shimizu, A.(1999): *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 1013-1018.
- 79) Tomlin. J., Pead, M. J., Lloyd, D. H., Howell, S., Hartmann, F., Jackson, H. A. and Muir, P. (1999) : *Vet. Rec.*, 144, 60-64.
- 80) Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saitoh, T. and Okamoto, R. (1996) : *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2072-2077.
- 81) Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. (2001) : *Trends in Microbiol.*, 9, 486-493.
- 82) Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. and Hiramatsu, K. (2001) : *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1323-1336.
- 83) Katayama, Y., Ito, T. and Hiramatsu, K. (2000) : *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1549-1555.
- 84) Warsa, U. C., Okubo, T. and Okamoto, R. (1996) : *J. Infect. Chemother.*, 2, 29-33.
- 85) Lee, J. H. (2003) : *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6489-6494.
- 86) 清水 晃 (2002) : 畜産の研究, 56, 611-616.
- 87) Bagget, H. C., Hennessy, T. W., Rudolph, K., Bruden, D., Reasonover, A., Parkinson, A., Sparks, R., Donlan, R. M., Martinez, P., Mongkolrattanothai, K. and Butler, J. C. (2004) : *J. Infect. Dis.*,

- 189, 1565-1573.
- 88) Frank, A. L., Marcinam, J. F., Mangat, P. D. and Schreckenberger, P. C. (1999) : *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 18, 993-1000.
 - 89) Groom, A. V., Wolsey, D. H., Naimi, T. S., Smith, K., Johnson, S., Boxrud, D., Moore, K. A. and Cheek, J. E. (2001) : *J. Am. Med. Assoc.*, 286, 1201-1205.
 - 90) Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandensch, F., Floret, D., Etienne, J. and Richet, H. (2002) : *Clin. Infect. Dis.*, 35, 819-824.
 - 91) Salmenlinna, S., Lyytikäinen, O. and Vuopio-Varkila, J. (2002) : *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 602-607.
 - 92) Witte, W., Cuny, C., Strommenger, B., Bräulke, C. and Heuck, D. (2004) : *Euro. Surveill.*, 9, 16-18.
 - 93) Collins, N., Gosbell, I. and Wilson, S. F. (2002) : *Med. J. Aust.*, 177, 55-56.
 - 94) O'Brien, F. G., Pearman, J. W., Gracey, M., Piley, T. V. and Grubb, W. E. (1999) : *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2858-2862.
 - 95) Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J. D., Crubb, W. E., Bell, J. M., O'Brien, F. G., Coombs, G. W., Pearman, J. W., Tenover, F. C., Kapi, M., Tiensasitron, C., Ito, T. and Hiramatsu, K. (2002) : *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4289-4294.
 - 96) Ito, T., Ma, X. X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. and Hiramatsu, K. (2004) : *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 2637-2651.
 - 97) Noble, W. C. (1997) : The Staphylococci in human diseases. (Crossley, K. B. and Archer, G. L. eds.), pp. 401-412, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne,

San Francisco,Tokyo.

- 98) 森 實, 高橋 勉, 増田二郎, 山井志朗, 武原文三郎 (1970) : 日細菌誌, 25, 1-9.
- 99) Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y. Kitai, S. and Kawano, J. (2002) : *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 245-250.
- 100) Shimizu, A., Ozaki, J., Kawano, J., Saitoh, Y. and Kimura, S.(1992) : *J. Vet. Med. Sci.* 54, 355-375.
- 101) 清水 晃, 山本千景, 河野潤一, 犬伏秀樹, 角谷 修, 氷上雄三, (1997) : 鶏病研報, 33, 24-29.
- 102) 新井孝典, 岡田秀平, 清水 晃 (2004) : 日獣会誌, 57, 460-464.
- 103) Gibbs, P. A., Patterson, J. T. and Harvey, J. (1978) : *J. Appl. Bacteriol.*, 44, 57-74.
- 104) 中内 潔, 五島三千雄, 曾根純一 (1989) : 日獣会誌, 42, 112-115.
- 105) Isigidi, B. K., Devriese, L. A., Godard, C. and Van Hoof, J. (1990) : *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 145-147.
- 106) Shiozawa, K., Kato, E. and Shimizu, A. (1980) : *J. food Protect.*, 43, 683-685.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました神戸大学農学部清水晃教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、ご校閲を賜りました神戸大学自然科学研究科北川浩教授、神戸大学農学部岡山高秀教授、神戸大学農学部河野潤一助教授に深甚の謝意を表します。

研究遂行上、終始熱心なご指導、ご教示を賜りました神戸大学農学部清水晃教授、北川浩教授、河野潤一助教授に厚く御礼を申し上げます。

最後に、実験遂行にご協力いただきました神戸大学農学部応用動物学科感染症制御学研究室（旧感染免疫学研究室）の学生各位、特に佐藤絵理、中野千紗、松村浩介、藤尾公輔さんに深く感謝申し上げます。