

牛直腸内容物からのリステリア及びサルモネラの検出状況と
岡山県におけるサルモネラの疫学的解析（平成21年度）

石井 学, 大島律子, 仲 克己*, 中嶋 洋（細菌科）

*くらしき作陽大学食文化学部栄養学科

【調査研究】

牛直腸内容物からのリステリア及びサルモネラの検出状況と 岡山県におけるサルモネラの疫学的解析（平成21年度）

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from Rectum Contents of Cattle and
Epidemiological Study on *Salmonella* in Okayama Prefecture (2009)

石井 学, 大島律子, 仲 克己*, 中嶋 洋 (細菌科)

*くらしき作陽大学食文化学部栄養学科

Manabu Ishii, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka *, Hiroshi Nakajima

要 旨

リステリアは重篤な症状を起こす感染症の起因菌であり、サルモネラは岡山県下でも毎年多数の食中毒が発生している。このため、両菌の感染予防や発生時の原因究明、感染拡大防止に役立てるため、岡山県内の動物の保菌状況を調査した。平成21年度に岡山県内の3施設から牛直腸便566検体、牛糞堆肥33検体を採取し、リステリア及びサルモネラの分離を試みたところ、牛直腸便19検体、牛糞堆肥3検体からリステリアを分離したが、サルモネラは検出しなかった。リステリアの病原遺伝子の検査にマイクロチップ電気泳動装置を用いたところ、従来のゲル電気泳動法よりも迅速かつ簡便に結果が得られた。また、サルモネラについては、平成21年度に岡山県内で分離されたヒト由来株11株及び食品由来株6株を収集して血清型別を実施した結果、ヒト由来株ではS.Enteritidisが最も多く、食品由来株はS.Infantisが最も多かった。

[キーワード：リステリア，サルモネラ，動物，マイクロチップ電気泳動，疫学]

[Key words : *Listeria*, *Salmonella*, Animals, Microchip Electrophoresis, epidemiology]

1 目的

Listeria monocytogenes(以下*L.monocytogenes*と略)は食中毒や、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起因菌である他、主として反芻畜にも脳炎、死産等を引き起こす人畜共通感染症起因菌である。米国のCDCは、米国内で毎年約2,500例の重症感染例が発生し、そのうち約500人が死亡していると報告している。五十君によると、日本における重症化したリステリア症は年間83人と推計され¹⁾、発生はまれであるが、欧米に比べても極端に少ないものではないと報告されている。平成13年に北海道で発生した我が国で初めての食品媒介リステリア症の集団発生は、リステリアに汚染されたナチュラルチーズが感染源であることが判明した²⁾。国内でリステリア症の発生が少ない理由は不明であるが、食肉の平均20%が汚染されていることが当センターの研究で判っている³⁾。また、県内のリステリア症患者及び動物、食肉から分離された菌株の生化学的、及び分子生物学的性状についても

比較している⁴⁾。サルモネラについては、岡山県下では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生しており、感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立てることを目的として分離株を収集し、食品や動物から検出された菌株とともに疫学解析を行い、流行株の把握に努めている。今回は牛の直腸内容物及び牛糞堆肥から、*L.monocytogenes*及びサルモネラの検出を行なった。また、*L.monocytogenes*ではPCRによる病原遺伝子の検出において、従来はゲル電気泳動を行なっていたが、今年度は当センターに導入されたマイクロチップ電気泳動装置を使用して、その有用性を検討した。サルモネラの疫学解析ではヒト由来株及び食品由来株を収集して血清型別を実施した。

2 方法

2.1 材料

平成21年度に県内の3施設の牛から採取した直腸内容

物566検体及び牛糞堆肥33検体について検査を行なった。

サルモネラについては、平成21年度に県内で分離されたヒト由来株11株(集団発生事例2株, 散発事例9株)及び食品由来株6株(とり検体5株, 豚肉検体1株)を収集した。

2.2 方法

直腸内容物及び牛糞堆肥検体は9倍量の1/15M PBS (pH7.6)に懸濁し, その1mlを*L.monocytogenes*についてはUVM Modified Listeria Enrichment Broth (DIFCO)10mlに接種して30℃, 48時間増菌後, PALCAM-Listeria-Selective agar (supplement添加: MERCK; 以下, PALCAM)及びCHROMagar™ Listeria寒天平板(CHROMagar社: フランス; 以下, CHROMagar)に塗抹して, 37℃, 48時間分離培養を行った。PALCAMでのエスクリン分解能又はCHROMagarでのハロー形成能が見られたコロニーをTSYEA培地で再分離した後, SIM確認培地での25℃の傘状発育, カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに, butin培地(自家製, 5%羊血液添加)による溶血性, ラムノース, マンニット, キシロースの分解試験を行い同定した。サルモネラについては前述の懸濁液1mlをセレナイト培地10mlに接種し, 37℃, 18-24時間増菌後, 白糖加SS寒天培地(日水)で37℃, 18-24時間培養した。疑わしいコロニーをTSI及びSIM確認培地で性状を確認し, 腸内細菌同定用キットEB-20(日水)で同定した。収集した菌株についてはO, H抗原の血清型別を実施した。

2.3 PCR法によるhlyA遺伝子の確認

生化学的性状試験で*L.monocytogenes*陽性と判定された菌株について, *hlyA* 遺伝子の保有をPCRで確認した。即ち, TSYEAで増殖させた菌を滅菌ミリQ水に浮遊させ, 100℃, 10分間加熱後急冷し, 8,000rpm, 10分間遠心した上清をPCRに使用した。PCRはGene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を使用した。反応条件は, 94℃ 3分間熱変性し, 94℃, 1分間, 55℃, 1分間, 72℃, 1分間を30サイクル行い, さらに72℃ 7分間伸長反応を行った。

使用したプライマー⁵⁾は次のとおりである。

プライマー *hlyA1*

5'-ATTTTCCCTTCACTGATTGC-3'

プライマー *hlyA2*

5'-CACTCAGCATTGATTTGCCA-3'

PCR増幅産物(276bp)の確認は, マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNA(島津製作所; 以下, MultiNA)を用い, 試薬キットDNA-1000キットを用いた。

3 結果

3.1 直腸内容物及び牛糞堆肥からの*L.monocytogenes*及びサルモネラの検出状況

*L.monocytogenes*は, 牛の直腸内容物566検体中19検体(3.4%), 牛糞堆肥33検体中3検体(9.1%)から検出された。サルモネラについては何れの検体からも検出されなかった。

3.2 収集したサルモネラの血清型

収集したサルモネラ菌株のうち, ヒト由来株は食中毒事例の2株がS.Mbandakaであった。これ以外の散発事例由来株は, S.Enteritidis3株, S.Heidelberg2株, S.Newport, S.Saintpaul, S.Schleissheim, S.Thompsonがそれぞれ1株であった。

食品由来株はとり検体5検体中4検体がS.Infantisで最も多く, 他の1検体はS.Enteritidisであった。豚肉由来株はS.Derbyであった。

3.3 マイクロチップ電気泳動装置による*hlyA*遺伝子の確認

PCRにより増幅した*hlyA* 遺伝子の確認に用いたMultiNAでは, 本来の増幅産物である276bpに対し, 261から275bpの範囲で増幅産物が確認された。(図1)

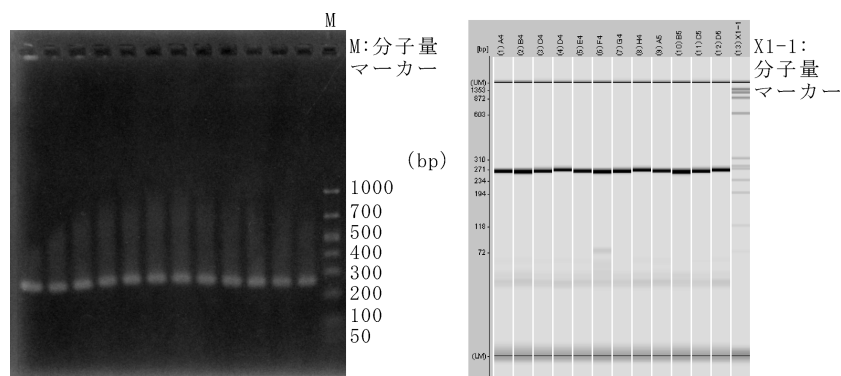


図1 *hlyA* PCR後の電気泳動像の比較
(左)アガロースゲル電気泳動法 (右)マイクロチップ電気泳動法

4 考察

今回、牛の直腸内容物から *L.monocytogenes* が 3.4% 検出されたが、施設間で検出率に差が見られた。今年度調査を実施した施設は、これまでの調査対象施設を一部変更したため、単純な比較はできなかった。しかし、同一施設でも検出率に変動が見られており、今後も継続した調査を実施して、保菌実態を明らかにする必要があると考える。一方、サルモネラは何れの牛検体からも検出されなかったが、県内では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生しているため、引続き調査を行う必要がある。

サルモネラの血清型は、ヒト由来株では食中毒事例において S.Mbandaka が検出されたが、感染源の究明は出来なかった。食品由来株ではとり検体から S.Infantis が最も多く検出され、過去の調査からも、食鳥の本菌汚染が恒常化していることが示されたことから、とり肉を介したヒトへの感染が懸念される。そのほか、豚肉検体からも S.Derby が検出されており、食鳥・食肉処理場をはじめ、食肉あるいはその加工品の衛生管理の重要性が示された。

マイクロチップ電気泳動装置による PCR 増幅産物の検出は、従来のゲル電気泳動法と比べて、多くの検体を少ない手順・時間で高感度に検出でき、染色には変異原性が指摘されているエチジウムブロマイドではなく、比較的毒性の低い SYBR Gold を用いるため、より安全な方法である。ただ、今回検査を行なった結果、DNA 濃度が高くなると増幅バンドが低分子量側にシフトする傾向が見

られた。この点については、単一遺伝子の増幅産物を検出する場合は特に不都合は感じられなかったが、マルチプレックス PCR では複数の増幅バンドの分子量が接近している場合はバンドのシフトにより MultiNA による検出・鑑別が困難になるという事例を経験しており、マルチプレックス PCR と組合せて使用する場合は条件を吟味する必要があると思われる。

文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリステリア菌による健康被害，食品衛研究，53(4)，19-23，2003
- 2) 五十君 静信：リステリア症の概況と対策，月刊 フードケミカル，21(5)，32-37，2005
- 3) 狩屋英明，大島律子，中嶋 洋，国富泰二：動物を含めた環境中及び調理用食肉のリステリア汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28，73-77，2004
- 4) 狩屋英明，大島律子，中嶋 洋：食肉及び牛直腸内容物から検出されたリステリアの生化学的性状と病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析，岡山県環境保健センター年報，31，99-102，2007
- 5) Ermolaeva,S., KarpovavT., Novella,S., Wagner, M., Scottti,M., Tartakovskii,I., Vazquez-Boland, J.A.：A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal, Int.J.Food Microbiol., 82, 87-94, 2003