

牛由来検体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 22 年度）

石井 学, 大島律子, 仲 克己\*, 中嶋 洋（細菌科）

\*くらしき作陽大学現代食文化学科

【調査研究】

## 牛由来検体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22年度)

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from the Internal Organs and Rectum Fecess of Cattle and Epidemiological Study on *Salmonella* in Okayama Prefecture (2010)

石井 学, 大島律子, 仲 克己\*, 中嶋 洋(細菌科)

\*くらしき作陽大学現代食文化学科

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

### 要 旨

リステリア及びサルモネラは重篤な症状を起こす感染症の起原因菌であり、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及び食肉の汚染状況を調査した。平成22年度に岡山県内の2施設から採取した牛直腸便339検体、牛糞堆肥25検体と、市販の牛ホルモン57検体について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66検体、牛糞堆肥11検体及び牛ホルモン9検体からリステリアを分離した。サルモネラは牛直腸便15検体、牛糞堆肥1検体から分離された。リステリアの血清型は1/2bが69検体で最も多く、サルモネラの血清型は全てO4群のH型別不能株であった。また、腸管感染症疑い患者便89検体からもリステリア及びサルモネラの分離を試みたが、いずれも検出されなかった。平成22年度に岡山県内で分離された食品由来サルモネラ株15株を収集して血清型別を実施した結果、S. Infantisが最も多かった。

[キーワード：リステリア，サルモネラ，牛，疫学]

[key words : *Listeria*, *Salmonella*, Cattle, epidemiology]

### 1 目的

*Listeria monocytogenes* (以下*L.monocytogenes*と略)は食中毒や、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起原因菌である他、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原因菌である。米国のCDCは、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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。また、県内のリステリア症患者、動物及び食肉

から分離された菌株の生化学的性状と病原性に関する遺伝子の保有についても検討している<sup>4)</sup>。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。

### 2 方法

#### 2.1 材料

平成22年度に県内の2施設の牛から採取した直腸便339検体及び牛糞堆肥25検体及び市販の牛ホルモン57検体についてリステリア及びサルモネラの検査を行なった。

平成22年度に県内の病院で採取された腸管感染症疑い患者便(以下、患者便)についてもリステリア及びサ

ルモネラの検査を行なった。

また、平成 22 年度に県内で分離された食品由来株 15 株(鶏肉由来 13 株, 豚肉由来 1 株, 野菜由来 1 株)を収集し、サルモネラの血清型別を実施した。

## 2.2 方法

牛直腸便, 牛糞堆肥, 牛ホルモン及び患者便は 9 倍量の 1/15M PBS(pH7.6) に懸濁した。*L.monocytogenes* の検査は, その 1mL を 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 培地) 及び CHROMagar™ Listeria 寒天平板(CHROMagar 社: フランス; 以下, CHROMagar 培地) に塗抹して, 37℃, 48 時間分離培養を行った。PALCAM 培地上でのエスクリン分解能又は CHROMagar 培地上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 確認培地に接種して 25℃, 48 時間培養後の傘状発育と, カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに, Beutin 培地(自家製, 5%羊血液添加)による溶血性, ラムノース, マンニト, キシロースの分解試験を行い, 同定した。同定した株について, リステリア型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を実施した。

サルモネラの検査は前述の懸濁液 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サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて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 法で確認した。即ち, TSYEA 培地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 法に使用した。PCR 法は Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用して, 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<sup>5)</sup>は次のとおりである。

プライマー *hlyA*1

5'-ATTTTCCTTCACTGATTGC-3'

プライマー *hlyA*2

5'-CACTCAGCATTGATTTGCCA-3'

PCR 増幅産物 (276bp) の確認は, 増幅産物を滅菌ミリ Q 水で 5 倍希釈したのち, 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, 試薬キットとして DNA-1000 キットを用いた。

## 3 結果

### 3.1 牛直腸便, 牛糞堆肥, 牛ホルモン及び患者便から

#### の *L.monocytogenes* 及びサルモネラの検出状況

牛直腸便, 牛糞堆肥, 牛ホルモン及び患者便からの *L.monocytogenes* の検出状況は表 1 のとおりであった。

*L.monocytogenes* は, 牛の直腸便 339 検体中 66 検体 (19.5%), 牛糞堆肥 25 検体中 11 検体 (44.0%), 牛ホルモン 57 検体中 9 検体 (15.8%) から検出され, すべての株が *hlyA* を保有していたが, 患者便からは検出されなかった。分離株の血清型は, 直腸便では 1/2b が 56 検体 (84.8%), UT が 6 検体 (9.1%), 4b が 3 検体 (4.5%), 3b が 1 検体 (1.5%), 牛糞堆肥では 1/2b が 10 検体 (90.9%), UT が 1 検体 (9.1%), 牛ホルモンでは 1/2a が 5 検体 (55.6%), 1/2b が 3 検体 (33.3%), 1/2c が 1 検体 (11.1%) であった。リステリアが検出された牛糞堆肥はそのほとんどが発酵初期のものであり, 十分に発酵が進んだ牛糞堆肥からはリステリアは検出されなかった。

表 1 牛由来検体及び患者便からの *L.monocytogenes* の検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	牛ホルモン	患者便
検体数	339	25	57	89
検出数(率)	66(19.5%)	11(44.0%)	9(15.8%)	0(0.0%)
血清型	1/2b : 56(84.8%) UT : 6(9.1%) 4b : 3(4.5%) 3b : 1(1.5%)	1/2b : 10(90.9%) UT : 1(9.1%)	1/2a : 5(55.6%) 1/2b : 3(33.3%) 1/2c : 1(11.1%)	

表2 牛由来検体及び患者便からのサルモネラの検出状況

	牛直腸便	牛糞堆肥	牛ホルモン	患者便
検体数	339	25	57	89
検出数(率)	15(4.4%)	1(4.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
血清型	いずれも O4 群 H 型別不能株			

表3 収集した食品由来のサルモネラ菌株の血清型

	鶏肉由来	豚肉由来	野菜由来
検体数	13	1	1
血清型	<i>S. Infantis</i> : 10 株 (76.9%) <i>S. Braenderup</i> : 1 株 (7.7%) <i>S. Schwarzengrund</i> : 1 株 (7.7%) <i>S. Eppendorf</i> : 1 株 (7.7%)	<i>S. Infantis</i>	O7 群 H 型別不能株

牛直腸便、牛糞堆肥、牛ホルモン及び患者便からのサルモネラの検出状況は表2のとおりであった。

サルモネラは牛の直腸便 339 検体中 15 検体 (4.4%)、牛糞堆肥 25 検体中 1 検体 (4.0%) から検出され、分離株の血清型はいずれも O4 群 H 型別不能株であった。牛ホルモン及び患者便からはサルモネラは検出されなかった。

### 3.2 収集したサルモネラ菌株の血清型

収集した食品由来のサルモネラ菌株の血清型は表3のとおりであった。

鶏肉由来の 13 株では 10 株が *S. Infantis* で最も多く、他の 3 株は *S. Braenderup*, *S. Schwarzengrund*, *S. Eppendorf* であった。豚肉由来の 1 株は *S. Infantis*, 野菜由来の 1 株は O7 群 H 型別不能株であった。

## 4 考察

今回、牛の直腸便から *L. monocytogenes* が 19.5% 検出されたが、同一施設において直腸便及び牛糞堆肥からそれぞれ 84.8%, 90.9% と比較的高率に同じ血清型のリステリアが検出された。また、サルモネラも牛の直腸便から O4 群 H 型別不能株が 4.4% 検出され、飼料のリステリア及びサルモネラによる汚染あるいは施設内での相互感染の可能性が考えられた。県内では毎年多数のサルモネラ食中毒が発生していることから、サルモネラによる食中毒発生予防対策あるいはリステリアによる感染症予防対策として施設の衛生管理を十分に実施することが重要であり、引き続き調査を行って汚染実態を把握していく

必要があると思われる。

食品由来のサルモネラの血清型は、鶏肉検体では *S. Infantis* が最も多く、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、鶏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. Infantis* 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。

## 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., Karpova, T., Novella, S., Wagner, M., Scortti, 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