

【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 県内におけるサルモネラの疫学的解析（平成23年度）

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from the Internal Organs and Rectum Feces of Cattle and Epidemiological Study on *Salmonella* in Okayama Prefecture (FY2011)

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現代食文化学科

Manabu Ishii, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka*, Hiroshi Nakajima (Department of Bacteriology)

*The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

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、サルモネラによる食中毒は県下でも毎年多数発生している。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、県内の動物の保菌状況等を調査した。平成23年度に県内の2施設から採取した牛直腸便415検体、牛糞堆肥27検体、飼料7検体、市販の野菜60検体及び腸管感染症疑い患者便135検体についてリステリアとサルモネラの分離を試みたところ、リステリアは、牛直腸便32検体、牛糞堆肥3検体、飼料2検体及び患者便1検体から分離されたが、野菜からは検出されなかった。サルモネラは、患者便2検体から分離されたが、他の検体からは検出されなかった。血清型はリステリアでは1/2bが34検体で最も多く、サルモネラではS.Thompson, S.Weltevredenが各1検体であった。また、県内で分離された食品由来サルモネラ株11株を収集して血清型別を実施した結果、S.Infantisが7株で最も多かった。

[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 はじめに

Listeria monocytogenes (以下「*L.monocytogenes*」という。)は食中毒や、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起因菌であるほか反芻畜にも脳炎、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。五十君の報告¹⁾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、発生は稀であるが、欧米に比べて極端に少ないものではないとしている。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、当センターの調査では食肉の平均20%が汚染されていた³⁾。また、県内のリステリア症患者及び動物や食肉から分離された菌株の生化学的性状と病原性に関与する遺伝子の保有についても検討している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・感染経路の究明及び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 材料及び方法

2.1 材料

平成23年度に県内の2施設の牛から採取した直腸便415検体、牛糞堆肥27検体、飼料7検体及び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」という。)135検体についてリステリアとサルモネラの検査を行なった。さらに、市販の野菜60検体についてリステリアの検査を行った。

また、リステリアについては平成23年度に県内で分離された患者由来株1株を、サルモネラについては、患者由来株1株及び食品由来株11株(鶏肉由来10株、豚肉由来1株)を収集して血清型別を実施した。

2.2 方法

牛直腸便、牛糞堆肥、飼料及び患者便は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) (以下「UVM」という。) 10mLに接種して30℃, 48時間増菌した。野菜については、その25gをUVM225mLに接種して30℃, 48時間増菌した。いずれの検体もその後、PALCAM-Listeria-Selective agar (supplement添加: MERCK; 以下「PALCAM培地」という。) 及びCHROMagar™ Listeria寒天平板 (CHROMagar社: フランス; 以下「CHROMagar培地」という。) 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するとともに、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*と同定された菌株について、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*hlyA*遺伝子の保有を確認した。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⁵⁾は次のとおりである。

プライマー-*hlyA* 1

5' -ATTTTCCCTTCACTGATTGC-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」という。) 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, 飼料, 野菜及び患者便からの*L.monocytogenes*とサルモネラの検出状況

牛直腸便, 牛糞堆肥, 飼料, 野菜及び患者便からの*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415検体中32検体(7.7%), 牛糞堆肥27検体中3検体(11.1%), 飼料7検体中2検体(28.6%), 患者便135検体中1検体(0.7%)から検出され、すべての株が*hlyA*を保有していたが、野菜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28検体(87.5%), 4bが2検体(6.3%), 型別不能(UT)が2検体(6.3%), 牛糞堆肥及び飼料はすべての検体が1/2bであった。また、患者便からの分離株も1/2b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。

牛直腸便, 牛糞堆肥, 飼料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。

サルモネラは患者便135検体中2検体(1.5%)から検出され、分離株の血清型はS.Thompson, S.Weltevredenが各1検体であった。牛直腸便, 牛糞堆肥及び飼料については、サルモネラは検出されなかった。

3.2 収集したリステリア及びサルモネラ菌株の血清型

収集した患者及び食品由来のリステリアとサルモネラ菌株の血清型は、表3のとおりである。

リステリアの患者由来株の血清型は1/2aであり、今回検出した他のいずれの菌株とも異なっていた。サルモネラの患者由来株の血清型は、S.Thompsonであった。鶏肉由来サルモネラの10株は、S.Infantisが7株で最も多く、他の3株はS.Manhattan, S.Schwarzengrund, O8群H型別不能株であった。豚肉由来の1株はS.Derbyであった。

4 考察

今回、牛の直腸便から*L.monocytogenes*が7.7%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87.5%, 100%と高率に同じ血清型のリステリアが検出され、飼料からも同じ血清型のリステリアが検出された。調査の結果、この飼料は同施設で作った牛糞堆肥を肥料の一部に用いていたことが判明しており、飼料へのリステリア汚染の結果、この施設において牛が高率にリステリアを保菌する原因となった可能性が示唆された。

サルモネラの食品由来の血清型は、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ている。患者便からもリステリア及びサルモネラが検出されていることから、牛肉や鶏肉を介したリステリア感染症及びサルモネラ食中毒の予防対策としては、施設の衛生管理を徹底して実施することが重要であり、引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。

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

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

	牛直腸便	牛糞堆肥	飼料	野菜	患者便
検体数	415	27	7	60	135
検出数(率)	32(7.7%)	3(11.1%)	2(28.6%)	0(0.0%)	1(0.7%)
血清型	1/2b : 28(87.5%) 4b : 2(6.3%) UT : 2(6.3%)	1/2b : 3(100%)	1/2b : 2(100%)		1/2b : 1(100%)

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	飼料	患者便
検体数	415	27	7	135
検出数(率)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2(1.5%)
血清型				<i>S. Thompson</i> : 1(50.0%) <i>S. Weltevreden</i> : 1(50.0%)

表3 収集した患者及び食品由来のリステリアとサルモネラ菌株の血清型

菌種	リステリア				サルモネラ			
	リステリア		サルモネラ		サルモネラ		サルモネラ	
由来	患者由来	患者由来	鶏肉由来	豚肉由来	患者由来	鶏肉由来	豚肉由来	豚肉由来
検体数	1	1	10	1				
血清型	1/2a	<i>S. Thompson</i>	<i>S. Infantis</i> : 7株(70.0%) <i>S. Manhattan</i> : 1株(10.0%) <i>S. Schwarzengrund</i> : 1株(10.0%) 08群H型別不能株 : 1株(10.0%)	<i>S. Derby</i>				

- 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