



【調査研究】

## 牛由来検体等からのリステリア及びサルモネラの検出状況と パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた*Listeria monocytogenes*の型別解析 について

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* from Rectum Contents of Bovine and Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

河合央博, 大畠律子, 仲 克巳\*, 檜原幸二\*\*, 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

\*\*岡山赤十字病院 第一小児科

Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka\*, Kouji Narahara\*\*, and Hiroshi Nakajima  
(Department of Bacteriology)

\*The Department of Contemporary Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

\*\*Department of Pediatrics, Okayama Red Cross General Hospital

### 要 旨

リステリア及びサルモネラ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, 岡山県内の動物等の保菌状況を調査した。平成24年度に, 県内の牛飼育施設10ヶ所から採取した牛直腸便50検体と, 県内の病院で採取された腸管感染症疑いの患者便235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。リステリアは牛直腸便2検体から*Listeria monocytogenes*が検出されたが, 患者便からは検出されなかった。血清型は2検体とも1/2bであった。一方, サルモネラは牛直腸便及び患者便ともに検出されなかった。また, *Listeria monocytogenes*について, 平成22年度から平成24年度の間に当センターで分離した126株と, 他所からの分与菌1株の127株についてパルスフィールドゲル電気泳動法を用い, 解析を試みた。得られたバンドパターンを解析した結果, 牛飼育施設におけるリステリアの相互感染, あるいは牛糞堆肥による牛飼料のリステリア汚染が示唆された。

[ キーワード : リステリア, サルモネラ, 牛, パルスフィールドゲル電気泳動, 疫学 ]

[ key words : *Listeria*, *Salmonella*, Cattle, Pulsed-field Gel Electrophoresis, Epidemiology ]

### 1 はじめに

*Listeria monocytogenes* (以下, *L.m.*) 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。欧米では食品による集団事例が多数報告されているが, 日本では平成13年にナチュラルチーズを原因とした北海道での集団事例1件以外, 確認されていないが, 日本におけるリステリア症発生数は, 年間83件と推定した報告がある<sup>1)</sup>。一方, *L.m.* は動物や土壌等の環境に広く常在しているため, 食肉や乳製品, 魚介類加工品など食品からの分離が多数報告されている<sup>1)</sup>。当センターの調査においても, 食肉の平均20%が汚染されていたことが判明しているが<sup>2)</sup>, 食品からしばしば*L.m.* が分離される事実と, リステリア症の発症の因果関係は不明である。これらを踏ま

え, *L.m.* について感染源・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, 食品の汚染状況や動物の保菌状況の調査を継続して行っている。また, サルモネラによる食中毒は一時期に比べ近年は減少したものの, 本菌はいまだ食中毒の主要な原因菌であるため, *L.m.* の調査と併せて動物等の保菌状況について調査を行うとともに, 分離株を収集し, 食品や動物から検出された菌株も併せて疫学解析を行い, 流行株の把握に努めている。

今回は, 牛の直腸便及び腸管感染症疑い患者便 (以下, 患者便) から*L.m.* 及びサルモネラの分離を試みた。また, 今までに当センターで分離した*L.m.* 菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下, PFGE) を実施し, DNAの制限酵素 (*Apa*, *Asc*) 切断パターンによる型別により, 菌株間の関連性等について疫学解析を行った。

## 2 材料

### 2.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

平成24年度に県内の牛飼育施設10ヶ所の牛から採取した直腸便50検体と、県内の病院で採取された患者便235検体について、*L.m.*及びサルモネラの検査を行った。

### 2.2 *L.m.*のPFGE解析

平成22年度から平成24年度の間に当センターで分離した*L.m.*126株と、県内の医療機関から分与を受けたりステリア症患者由来*L.m.*菌株1株の計127株を用いた。その内訳及び使用した菌株の血清型は、表1のとおりである。

牛等の由来株は、県内4か所の牛飼育施設等で採取した牛直腸便由来の100株と、施設Aで採取した牛糞堆肥由来株14株及び牛飼料由来株2株である。施設Aで採取した牛糞堆肥は同施設で作製したものであり、牛飼料はこの堆肥を肥料の一部に用いて栽培し加工したものであった。ヒト由来の2株は、当センター及び県内の医療機関が分離した株であるが、患者の症状、喫食状況等詳細については不明であった。牛肉由来株9株は、県内の異なる販売店で購入した牛肉から分離された菌株である。

## 3 方法

### 3.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

*L.m.*及びサルモネラの分離培養、生化学的性状試験、血清型別試験及びPCR法を用いた*L.m.*のhlyA遺伝子の検出は、既報<sup>3)</sup>のとおり行った。

### 3.2 *L.m.*のPFGE解析

PFGEは、アメリカのPulseNetが示した*L.m.*のPFGEプロトコル(CDC 2009 Section5.3)、並びに平成15年に国立感染症研究所が示した腸管出血性大腸菌O157のPFGEプロトコルを参考にして実施した。制限酵素は*Apa* (TaKaRa)及び*Asc* (New England Biolabs)を用いた。電気泳動はCHEF-DR (BioRad)を使用し、泳動条件は以下のとおりとした。

(泳動条件)

緩衝液：×0.5TBE

アガロース：SeaKemGold Agarose 1%

Voltage：6V

Included Angle：120°

Switch time：4.0sec ~ 40.0sec

Run time：19h

泳動後、ゲルを0.2~0.5µg/mlのEthidium bromide水溶液で染色し、脱色を行い紫外線下で写真撮影した。PFGEバンドパターンは、目視並びに解析ソフトBioNumerics ver6.5 (APPLIED MATHS)を用いて解析した。

## 4 結果及び考察

### 4.1 *L.m.*及びサルモネラの保菌状況調査

牛直腸便及び患者便からの*L.m.*及びサルモネラの検出状況は、表2のとおりであった。*L.m.*は、牛直腸便50検体中2検体(4%)から検出されたが、患者便からは検出されなかった。検出された2検体ともhlyAを保有していた。また、血清型は2検体とも1/2bであった。

表1 *L.monocytogenes*のPFGE解析に用いた菌株一覧

内容	菌株数	内訳等	血清型
牛直腸便由来株	100	施設A由来 97株	1/2b 96株、4e 1株
		施設B由来 1株	4b 1株
		施設C由来 1株	1/2b 1株
		施設D由来 1株	1/2b 1株
牛糞堆肥由来株	14	施設A由来 14株	1/2b 14株
牛飼料由来株	2	施設A由来 2株	1/2b 2株
ヒト由来株	2	腸管感染症疑い患者便由来 1株	1/2b 1株
		リステリア症患者由来(分与菌株) 1株	1/2a 1株
牛肉由来株	9	異なる販売店で購入した牛肉由来 9株	1/2a 5株、1/2b 3株、1/2c 1株
計	127		

表2 牛直腸便及び患者便からの*L.monocytogenes*及びサルモネラの検出状況

検体名	<i>L.monocytogenes</i>		サルモネラ	
	牛直腸便	患者便	牛直腸便	患者便
検体数	50	235	50	235
検出数(率)	2(4.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
血清型	1/2b:2(100%)	-	-	-

一方、サルモネラは牛直腸便及び患者便とも検出されなかった。

#### 4.2 *L.m.*のPFGE解析

##### 4.2.1 PFGEバンドパターンの分類と系統樹の作成

*L.m.*全127株のPFGEバンドパターンを目視により比較したところ、*Apa* による切断では22種類に、*Asc* では20種類に分類された。これらのバンドパターンをBioNumerics ver6.5により解析を行い、*Apa*、*Asc* の各制限酵素処理によるバンドパターンについて、系統樹を作成した(図1)。*Apa* による系統樹(以下、*Apa* 系統樹)で類似度が80%以上を同一タイプとして分類すると、9種類のタイプに分類された。これらのタイプをP1~P9とし、さらに、そのタイプに含まれるサブタイプをa, b,

c, d...と区別し、P3a, P3b...と表現した。*Asc* による系統樹(以下、*Asc* 系統樹)についても類似度80%以上で分類を行うと、8種類(S1~S8)のタイプに分類された。また、サブタイプは同様にS1a, S1b...と表現した。

さらに、*Apa* と*Asc* のバンドパターンを組み合わせで分類すると、26通りに分類された(表3)。これらの組み合わせによる類似度を表した系統樹(以下、*Apa* + *Asc* 系統樹)を作成するため、BioNumerics ver6.5で再度解析を行った(図2)。*Apa* + *Asc* 系統樹には、構成する*Apa* 及び*Asc* のバンドパターンタイプ、血清型、菌株の種類及び菌株数を併記した。

##### 4.2.2 *Apa* I + *Asc* I 系統樹を用いた疫学解析

##### *Apa* + *Asc* 系統樹について

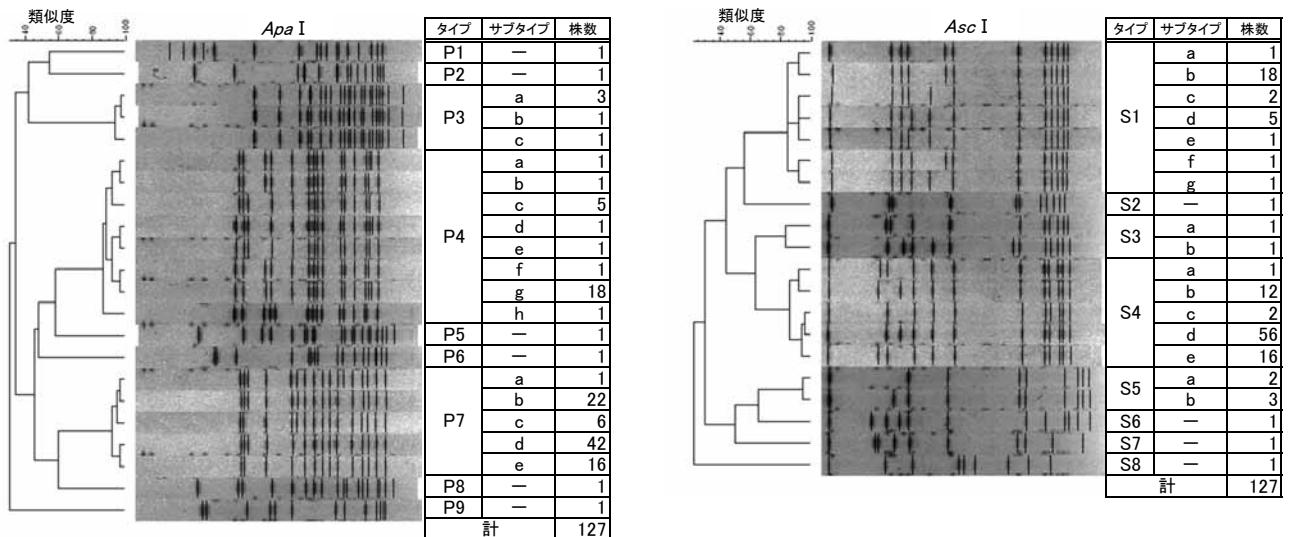


図1 *L.monocytogenes*のPFGEバンドパターンと系統樹1  
(左) *Apa* I 系統樹 (右) *Asc* I 系統樹

表3 *Apa* I バンドパターンと*Asc* I バンドパターンの組み合わせによる株数の分布

	<i>Asc</i> I																				株数計		
	S1							S2	S3		S4					S5		S6	S7	S8			
	a	b	c	d	e	f	g		a	b	a	b	c	d	e	a	b						
P1																				1	1		
P2																					1	1	
P3	a																			2	3		
	b																			1	1		
	c																			1	1		
P4	a																				1	1	
	b																				1	1	
	c																				5	5	
	d	1																			1	1	
	e																				1	1	
	f																					1	1
	g																				18	18	
	h																				1	1	
P5																					1	1	
P6																					1	1	
P7	a																				1	1	
	b																				7	22	
	c																				5	6	
	d																				2	42	
	e																				16	16	
P8																					1	1	
P9																						1	1
株数計	1	18	2	5	1	1	1	1	1	1	1	1	12	2	56	16	2	3	1	1	1	127	

*Apa* + *Asc* 系統樹では、組み合わせNo.1 ~ 8, No.12 ~ 19及びNo.20 ~ 23の3つのグループの類似度が高く、それぞれをグループ、グループ、及びグループとした。グループ内の類似度は85%程度であり、グループ内では85%程度、そして、グループ内では95%程度と非常に高かった。また、グループは*Apa* 系統樹のタイプP4と*Asc* 系統樹のタイプS1のみで構成され、同様にグループはP7とS4、そしてグループはP3とS5で構成されていた。さらに、同一グループ内の菌株の血清型はすべて一致していた。これらのことから、同一グループ内の菌株には関連性が考えられた。

牛飼育施設等から分離された菌株について

施設Aの牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛飼料由来株は、組み合わせNo.1 ~ 7, 12 ~ 19及び26の16種類に分類された(図2)。血清型で見ると、No.26の4eである1株を除いたすべてが1/2bであり、施設Aにおける*L.m.*汚染は1/2bが主と考えられた。これらの菌株はグループに含まれるNo.1 ~ 7とグループに含まれるNo.12 ~ 19の2グループに分別され、2種類の遺伝子型及びその類似型の*L.m.*による汚染が主であることが示唆された。このことから、施設Aでは外部からの*L.m.*混入の可能性よりも、これらの菌が施設内部で長期間継続して汚染している可能性が高いと考えられた。

一方、施設Aの牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛飼料由来株で同一バンドパターンを示す組み合わせが確認された。No.14には牛直腸便由来株と牛飼料由来株が分類され、No.18では牛直腸便由来株、牛糞堆肥由来株及び牛

飼料由来株が分類された。これらの菌株のバンドパターンの一例を図3に示す。

牛直腸便由来株 - 牛飼料由来株間、並びに牛直腸便由来株 - 牛糞堆肥由来株 - 牛飼料由来株間で同一バンドパターンが確認されたことにより、牛飼料が施設内の牛の便または牛糞堆肥から*L.m.*に汚染され、牛が感染する経路の存在が疑われた。さらに、同施設で作製した牛糞堆肥を肥料の一部に使用して牛飼料を栽培し加工していたことから、*L.m.*の汚染は牛糞堆肥 → 牛飼料 → 牛への感染の可能性が高いと考えられた。

施設Bから採取した牛直腸便由来菌株はNo.9に分類されたが、唯一の血清型4bの菌株であり、また、バンドパターンも他の菌株とは異なったため、他の菌株との関連性は認められなかった(図2)。

施設C及びDから採取した牛直腸便由来株はそれぞれNo.13, No.18に分類された(図2)。共にグループに含まれる菌株で施設Aから分離された菌株と同じバンドパターンが確認された。しかし、施設Aと施設C及びDの関連性は不明であり、同じバンドパターンの菌株が分離された原因は不明であった。

牛肉由来株について

牛肉由来株9株は、血清型1/2aの5株がNo.20,21,23及び25の4種類に、血清型1/2bの3株はNo.8, 10, 11の3種類、そして血清型1/2cの1株はNo.24に分類された(図2)。このうち、No.20, 21, 23の血清型1/2aの4株はグループに属しており、関連性を示した。これらの牛肉は、全て異なる販売店で購入した物であったが、販売以前

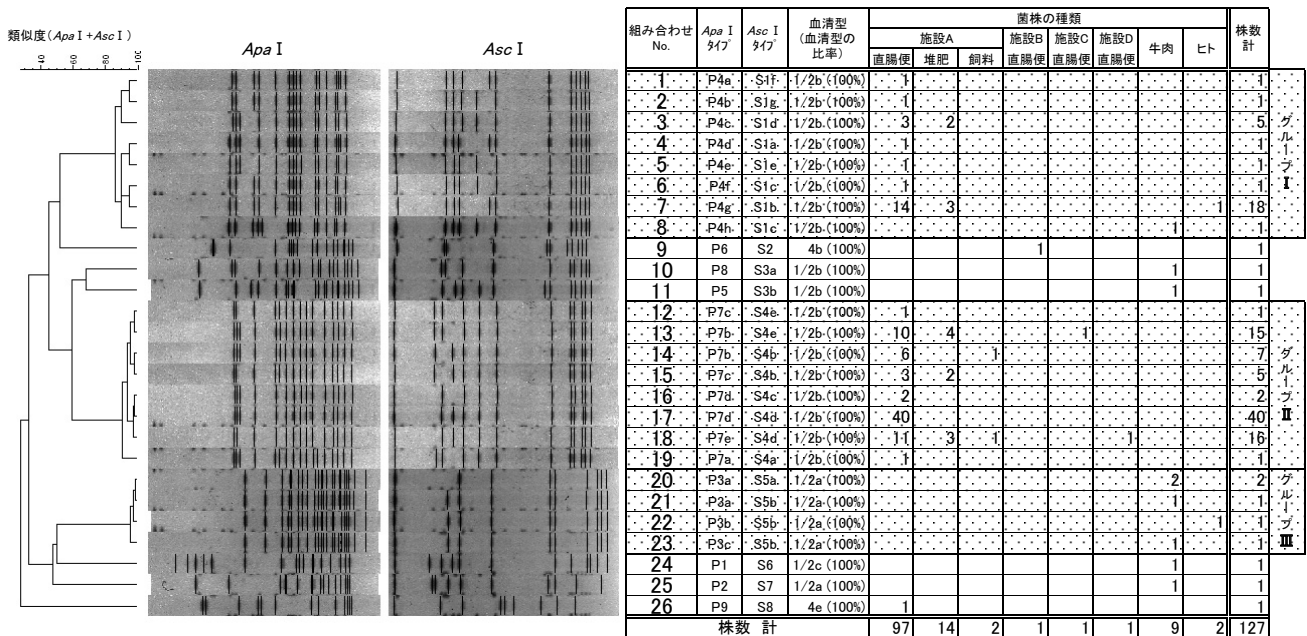


図2 *L.monocytogenes*のPFGEバンドパターンと系統樹2  
*Apa* I + *Asc* I 系統樹

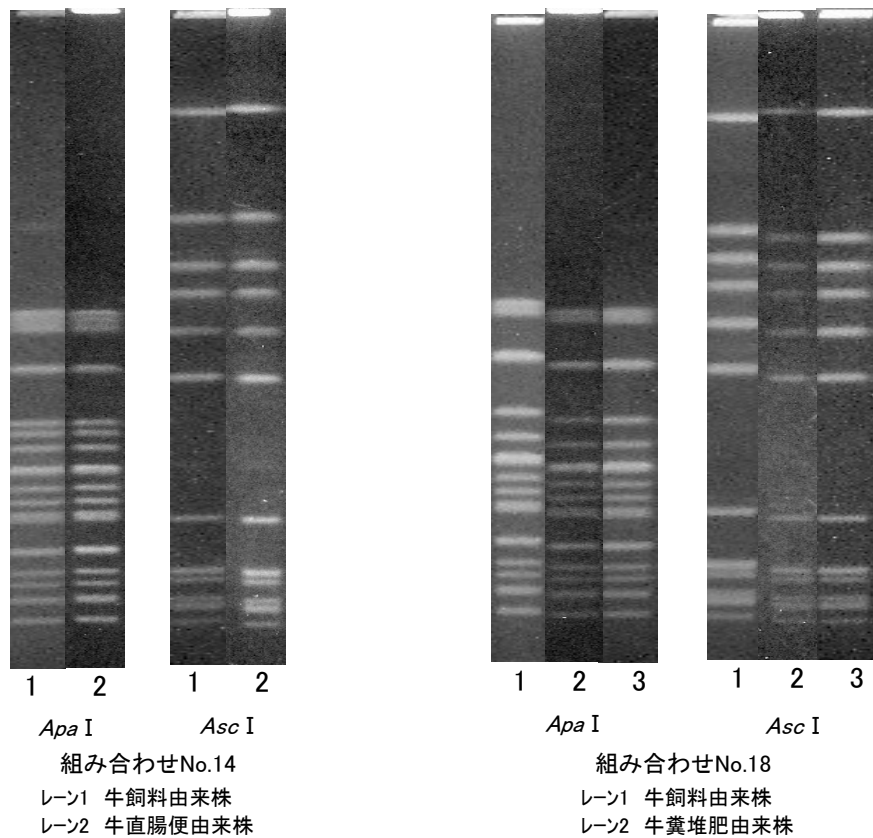


図3 牛飼料由来株と同一バンドパターンを示した菌株

の流通経路等詳細については不明であった。数種類の食肉が同一もしくは酷似したバンドパターンを示したことから、飼育段階で牛が同一遺伝子型あるいはその類似型の *L.m.* に感染していたこと、あるいは、牛肉の加工施設等流通経路で汚染された可能性が考えられた。一方、No. 8 に分類された血清型1/2bの牛肉由来株は、グループ に含まれていたが、その原因は不明であった。

ヒト由来株について

ヒト由来株 2 株は、No. 7 及びNo.22に分類された(図2)。No. 7 の血清型1/2bの患者便由来株は、牛直腸便由来株等と同一バンドパターンが見られた。このバンドパターンの一例を図4に示す。また、No.22の血清型1/2aのリストeria症患者便由来株は、グループ に属しており、No.20, 21, 23に分類された牛肉由来株と酷似したバンドパターンを示した。このバンドパターンの一例を図5に示す。

ヒト由来株と牛直腸便由来株並びに牛肉由来株で関連性が考えられたことから、牛肉等牛由来食品を介した人への感染に注意が必要と思われる。

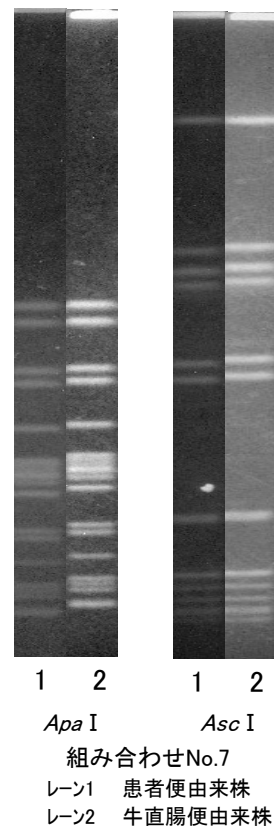
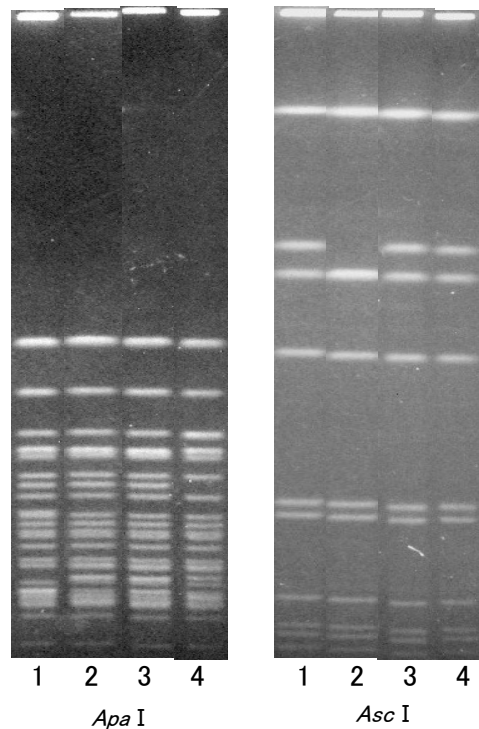


図4 患者便由来株と牛直腸便由来株のPFGEバンドパターン



レーン1 リステリア症患者由来株(組み合わせNo.22)  
 レーン2 牛肉由来株(組み合わせNo.20)  
 レーン3 牛肉由来株(組み合わせNo.21)  
 レーン4 牛肉由来株(組み合わせNo.23)

図5 リステリア症患者由来株と牛肉由来株のPFGEバンドパターン

## 5 まとめ

*L.m.*の保菌状況調査では、牛直腸便から*L.m.*が4%検出された。当センターの過去の調査では、牛直腸便から分離した*L.m.*の血清型1/2b検出率は87.5%と高かったが<sup>3)</sup>、今回も検出された*L.m.*はすべて1/2bであり、同様の結果となった。一方、サルモネラは今回の調査では検出されなかったため、より広く汚染実態を把握するためにも検査対象を拡大するなど工夫が必要であると思われた。

*L.m.*のPFGE解析では、同一牛飼育施設において同じ遺伝子型の*L.m.*及びその類似型の継続した汚染が示唆された。また、牛肉由来株間では同じ遺伝子型の*L.m.*及びその類似型の汚染が確認され、ヒト由来株 - 牛直腸便由来株間や患者便由来株 - 牛肉由来株間では関連性が考えられた。これらのことから、人のリステリア感染症の予防対策として、牛飼育施設での牛の*L.m.*感染防止や牛肉等加工施設における食品の汚染防止等の衛生管理の徹底が重要であり、特に牛飼育施設における牛の*L.m.*感染防止対策の一つとして、牛糞堆肥の完熟化による菌の殺菌と飼料への汚染防止が、重要と考える。

## 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に関する研究，厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 平成14年度 総括・分担研究報告書，2005
- 2) 狩屋英明，大畠律子，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
- 3) 石井 学，大畠律子，仲 克巳，中嶋 洋：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，岡山県環境保健センター年報，36, 79-81, 2012