

【調査研究】

## 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

狩屋英明, 大畠律子, 中嶋 洋, 国富泰二\* (微生物科)

\*岡山赤十字病院小児科

### 要 旨

リステリアについて、動物の保菌状況と環境中及び調理用食肉の汚染状況を調査するとともに、人の便についても検査を行った。その結果、牛の保菌率(1.2%)及び鶏の保菌率(0%)に比較して食肉の汚染率(20.8%)が高く、食肉加工施設内での相互汚染の可能性が推測された。人糞由来株は、鶏肉由来の一部の菌株と PFGE 型別により酷似した DNA パターンを示した。

[ キーワード：リステリア, 食肉汚染, 保菌, PFGE ]

### 1. はじめに

*Listeria monocytogenes* (以下 *L. m* と略) は人の髄膜炎, 死産, 敗血症等の起因菌であり, 反芻獣にも脳炎, 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, 毎年国内で約2,500例の人感染例が発生し, そのうち約500人が死亡しているとそのホームページで報告している。通常は免疫抵抗力の未熟又は低下した人が感染し易い。日本におけるリステリア症は年間約80例と推定されており<sup>1)</sup>, 欧米に比較してその症例数は少ない。今回, 動物の保菌状況と環境中及び調理用食肉の汚染状況を調査するとともに, 人の便からも検出を試みた。

### 2. 材料及び方法

#### 2.1 材料

牛直腸内容物981検体, 犬糞便176検体, タヌキ回腸内容物38検体, タヌキ腸間膜リンパ節39検体, タヌキ脾臓39検体, 人糞便213検体, 鶏盲腸内容物150検体, サル糞便30検体, 河川水(沢水を含む)14検体, 海産魚5検体, 調理用食肉144検体について検査を行った。

#### 2.2 方法

腸内容物, 糞便は1/15M PBS (pH7.6) で乳剤とし, 4℃で3週間低温増菌を行い, さらに, UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO) で30℃, 48時間増菌後, PALCAM-*Listeria*-Selective agar (supplement 添加: MERCK) により30℃, 48時間分

離培養を行った。コロニーは, プレインハートインフュージョン寒天培地(BHI)で再分離した後, グラム陽性短桿菌, SIM 確認培地での25℃の傘状発育, VP 陽性, カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに, beutin 培地(自家製)での羊血液溶血活性, CHROMagar™ *Listeria* (CHROMagar Microbiology)でのハロ形成能, ラムノース, キシロース, マンニットの分解試験, 同定キット *api* *Listeria* (bioMérieux)を用いた生化学的性状試験, PCR 法による *hlyA* 遺伝子の確認を行い, 同定した。調理用食肉は10gを使ってUVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO)で10%乳剤を作成し, これを30℃, 48時間増菌して上記と同様に検査した。また, 汚染菌数はMPN 3本法により算出した。水は0.45µmのフィルターで濾過し, 濾紙を上記と同様に検査した。

#### 2.3 PCR 法による *hlyA* 遺伝子の確認

使用したプライマー<sup>2)</sup>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' - CACTCAGCATTGATTGCCA - 3'

BHIで増殖させた菌を, 5% Triton X-100 (t-Octyl phenoxypolyethoxyethanol: Sigma Ultra)に溶かし, 100℃, 10分間加熱後急冷した溶液をPCRに使用した。PCRはTakaRa PCR thermal cycler MP (TaKaRa Biomedicals)を使用して, 熱変性94℃, 1分間, アニール55℃, 1分間, 伸長反応72℃, 1分間を30

サイクルを行った。

## 2.4 PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動)

Gravesら<sup>3)</sup>の方法に準じて行ったが、プラグ作成には Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad) を使用し、Lysis buffer 処理は52 で3時間とし、処理後のプラグ洗浄は、4 mM Pefabloc SC (AEBSF) で行った。制限酵素処理は、Asc (New England Biolabs) では、1プラグあたり25unitsで37℃、一晩反応させ、Apa (TaKaRa) では、1プラグあたり160unitsで30℃、一晩反応させた。電気泳動は1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) ゲルで行った。使用機器はCHEF-DR を使った。泳動の終わったゲルは、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て、Molecular Analyst Fingerprinting Plus software (Bio-Rad) でバンドパターンを解析した。

## 3. 結果

### 3.1 動物、人、河川水 (沢水を含む) からの *L. m* の検出状況

表1に示すとおり、動物では牛直腸内容物981検体中12検体(1.2%)、犬糞便176検体中1検体(0.6%)、タヌキ回腸内容物38検体中4検体(10.5%)、タヌキ腸間膜リンパ節39検体中1検体(2.6%)から *L. m* を検出した。人糞便では213検体中2検体(0.9%)から *L. m* を検出したが、鶏盲腸内容物150検体、サル糞便30検体、タヌキ脾臓39検体、河川水 (沢水を含む) 14検体、海産魚5検体からは

*L. m* は検出されなかった。

### 3.2 動物、人、河川水 (沢水を含む) からのリステリア属菌の検出状況

表2に示すとおり、*L. m* 以外のリステリア属菌では、*L. innocua* が動物から最も多く検出された。動物では、複数の菌種が検出された検体はなかったが、河川水では同一検体から *L. seeligeri* と *L. welshimeri* が検出された。

### 3.3 調理用食肉からの *L. m* の検出状況

表3に示すとおり、調理用食肉 (牛肉、豚肉、鶏肉) 144検体中30検体 (20.8%) から *L. m* を検出した。分離された *L. m* の血清型は1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, UTで、1/2cが比較的多く検出され、複数の血清型の菌に汚染されている検体もあった。牛肉の陽性率は、豚肉、鶏肉に比較して低い傾向が伺われた。

### 3.4 調理用食肉からのリステリア属菌の検出状況

表4に示すとおり、*L. m*, *L. welshimeri*, *L. innocua* の単独陽性検体は144検体中42検体 (29.2%) であったが、*L. m* と *L. welshimeri*, *L. m* と *L. innocua* 及び *L. m* と *L. grayi* の複数の菌種に汚染されている食肉も8検体 (5.6%) あった。

### 3.5 分離された *L. m* の PFGE 型別

動物、人、調理用食肉から分離された *L. m* について、制限酵素 Asc, Apa を用い、PFGEを行ったところ、1/2a株はおよそ5パターン、1/2b株はおよそ3パターン、1/2c株はおよそ3パターン、4b株はおよそ4パターンに分類された。図1に示す

表1. 動物、人、河川水 (沢水を含む) からの *L. m* の検出状況

検体種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)	血清型 (検体数)
牛直腸内容物	981	12	1.2	1/2a(3), 1/2c(6), 4b(1), UT(2)
犬糞便	176	1	0.6	1/2a
タヌキ回腸内容物	38	4	10.5	1/2b(1)*, 4b(3)
タヌキ腸間膜リンパ節	39	1	2.6	1/2b*
タヌキ脾臓	39	0	0.0	
人糞便	213	2	0.9	4b(2)
鶏盲腸内容物	150	0	0.0	
サル糞便	30	0	0.0	
河川水 (沢水を含む)	14	0	0.0	
海産魚	5	0	0.0	

\* タヌキ回腸内容物及び腸間膜リンパ節由来の1/2b株は同一個体由来

とおり、人糞便由来の血清型 4b 株の 2 株は Asc で同一 DNA パターンを示し、さらに、鶏肉由来の一部の 4b 株と酷似した DNA パターンを示した。図には示していないが、Apa 処理でも酷似した遺伝子パターンを示した。

#### 4. 考 察

動物のうち食肉となる牛及び鶏の *L. m* 保菌率はそれぞれ 2% 及び 0% と低かったが、食肉の汚染率は 20.8% と高いことが分かった。また、同一食肉から複数の菌種及び複数の血清型の *L. m* が検出されるものもあり、食肉加工施設で食肉が相互に汚染されている可能性あるいは施設内での二次汚染の可能性が示唆された。食肉の *L. m* 汚染菌数は、ほとんどの検体で 3000

MPN/100g 未満であった。*L. m* の 13 種の血清型の内、人と動物のリステリア症の 90% 以上を占めるのは 1/2a, 1/2b, 4b で、4b は人のリステリア症の 50% 以上の症例から分離されるという報告がある<sup>4)</sup>。

1/2c は食品や食品施設環境からしばしば分離されるが、人の症例からはほとんど検出されていない<sup>5)</sup>。今回、分離された *L. m* の血清型は 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, UT で、1/2a, 1/2b, 4b 等人にリステリア症を引き起こす血清型が分離されており、食品衛生上注意を喚起する必要がある。また、今回比較的多く分離された 1/2c は、人の集団食中毒事例からは分離されていないが、その病原性については不明であり、継続した調査により明らかにすることが重要と考える。我が国のリステリア症は欧米に比較する

表 2. 動物, 人, 河川水 ( 沢水を含む ) からのリステリア属菌の検出状況

検体種類	検体数	陽性検体数				
		<i>L. m</i> *	<i>L. iva</i> *	<i>L. immo</i> *	<i>L. seel</i> *	<i>L. seel</i> * + <i>L. wel</i> *
牛直腸内容物	981	12	8	13	0	0
犬糞便	176	1	0	8	2	0
タヌキ回腸内容物	38	4	0	5	1	0
タヌキ腸間膜リンパ節	39	1	0	2	0	0
タヌキ脾臓	39	0	0	1	0	0
人糞便	213	2	0	0	0	0
鶏盲腸内容物	150	0	0	4	0	0
サル糞便	30	0	0	0	0	0
河川水 ( 沢水を含む )	14	0	0	0	0	1
海産魚	5	0	0	0	0	0

\* *L. m* : *L. monocytogenes* *L. iva* : *L. ivanovii* *L. immo* : *L. innocua* *L. seel* : *L. seeligeri* *L. wel* : *L. welshimeri*

表 3. 調理用食肉からの *L. m* の検出状況

食肉種類	検体数	陽性数	陽性率 (%)	血清型 ( 検体数 )
牛肉スライス	36	4	11.1	1/2C(3), UT(2)
牛肉ミンチ	13	2	15.4	1/2C(2), UT(2)
豚肉スライス	34	8	23.5	1/2a(4), 1/2C(3), 4b(1)
豚肉ミンチ	8	3	37.5	1/2a(1), 1/2C(2), UT(1)
鶏肉	38	8	21.1	1/2a(3), 1/2b(2), 4b(3), UT(1)
鶏肉ミンチ	12	4	33.3	1/2b(2), 1/2C(1), 4b(2)
鶏・豚肉ミンチ	1	1	100.0	1/2C(1)
牛・豚肉ミンチ	1	0	0.0	
鶏キモ	1	0	0.0	
合計	144	30	20.8	

と少なく、また、食品媒介リステリア症は証明されていないが<sup>6)</sup>、国内で市販されている調理用食肉の *L. m* 汚染率は10~40%であり、欧米とほぼ同程度と考察されている<sup>1)</sup>。本研究でも調理用食肉の20.8%が *L. m* に汚染されており、汚染菌数は少ないものの実際に高率に汚染されていることが判った。五十君は<sup>1)</sup>食品媒介リステリア症の発生がすでに起こっている可能性を指摘しており、その発生実態を把握するには人のリステリア症の診断法の確立が重要であると報告している。

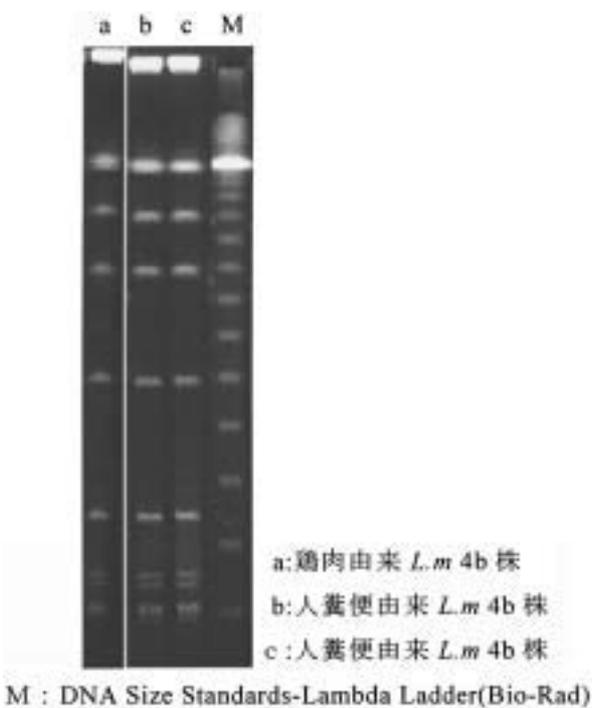


図1. 鶏肉及び人由来株の PFGE 型別 (制限酵素 *Asc* 使用)

今回の調査結果からも、PFGE 型別により、人から分離された *L. m* (血清型 4b) と鶏肉から分離された *L. m* (血清型 4b) が酷似した DNA パターンを示しており、鶏肉由来株が人への感染源となる可能性が伺われた。

## 謝 辞

各種検体採取にご協力をいただいた岡山県内関係保健所及び岡山県食肉衛生検査所の関係者各位に深謝いたします。

## 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，食品衛生研究，53(4)，19 - 23，2003
- 2) Cooray, K. J., Nishibori, T., Xiong, H., Matsuyama, T., Fujita, M., Mitsuyama, M. : Detection of Multiple Virulence - Associated Genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in Artificially Contaminated Milk Samples, Appl. Environ. Microbiol., 60 (8), 3023-3026, 1994
- 3) Graves, L. M., Swaminathan, B. : PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis, Int. J. Food. Microbiol., 65, 55-62, 2001
- 4) Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W.,

表4 調理用食肉からのリステリア属菌の検出状況

食肉種類	検体数	陽性検体数					
		<i>L. m</i>	<i>L. wel</i>	<i>L. inno</i>	<i>L. m + L. wel</i>	<i>L. m + L. inno</i>	<i>L. m + L. gra</i> *
牛肉スライス	36	3	0	1	1	0	0
牛肉ミンチ	13	1	1	1	0	0	1
豚肉スライス	34	6	0	4	0	2	0
豚肉ミンチ	8	2	1	2	1	0	0
鶏肉	38	5	0	5	1	2	0
鶏肉ミンチ	12	4	0	4	0	0	0
鶏・豚肉ミンチ	1	1	0	0	0	0	0
牛・豚肉ミンチ	1	0	0	1	0	0	0
鶏キモ	1	0	0	0	0	0	0
合計	144	22	2	18	3	4	1

\* *L. gra* : *L. grayi*

- González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. : *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, Clin. Microbiol. Rev., 14 (3), 584–640, 2001
- 5 ) Kathariou, S. : *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective, J. Food. Prot., 65 (11), 1811–1829, 2002
- 6 ) 仲真晶子 : 海外での食品媒介リステリア症とリステリア汚染防止対策の現状, 食衛誌, 41(4), J - 271 - J - 276 , 2000