

と畜場に搬入された家畜のサルモネラ属菌保有調査及び分離菌株の分子疫学的解析

北海道八雲食肉衛生検査所 ○一戸佳奈 竹下日出夫 瀬戸萌未 矢幅達也
北海道立衛生研究所 池田徹也

1 はじめに

サルモネラ属菌による食中毒は、平成 27 年の全国統計によると細菌性食中毒の中ではカンピロバクター属菌に次いで患者数が多く¹⁾、近年においても患者数 1,000 人規模の集団食中毒事例も多数報告されており²⁾³⁾公衆衛生上重要な菌である。また、家畜衛生分野においては血清型 Typhimurium を含む一部の血清型が家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されており、北海道内では毎年牛豚で多数発生が報告されている⁴⁾。

当所では平成 12 年からと畜場の衛生管理の検証としてサルモネラ属菌の枝肉衛生検査を実施しているが、平成 27 年 3 月血清型 Typhimurium の変異型と考えられている O4:i:-を牛枝肉 2 検体から分離した。O4:i:-は本国において以前はほとんど報告を認めない血清型であったが、近年では人や家畜からの検出が多数報告されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。当所での菌分離後、過去の枝肉のサルモネラ属菌検査結果をまとめ、さらに事後搬入された牛、豚の直腸便におけるサルモネラ属菌保有状況を調べた。また、分離菌株について血清型の同定や遺伝子解析、薬剤感受性試験を実施、薬剤耐性の傾向や過去の食中毒事例等の分離菌株との近縁性を検討した。

2 材料および方法

(1) 枝肉衛生検査

牛は平成 12 年 4 月から平成 27 年 3 月、豚は平成 16 年 4 月から平成 27 年 3 月までの期間中に所管と畜場で行った枝肉衛生検査におけるサルモネラ属菌分離状況をまとめた。分離方法は、枝肉の胸部と肛門周囲部をそれぞれ滅菌プースを用いて 100cm² 拭き取り、BPW 培地で前増菌後、TT 培地と RV 培地で選択増菌を行い、MLCB 培地とクロモアガー・サルモネラ培地を用いて選択分離を行った。選択分離培地にて疑わしいコロニーを形成したのものについては VP 培地、TSI 培地、LIM 培地、Cit 培地を用いて生化学性状の確認を行い、血清型別試験を実施し判定した。

(2) 糞便検査

平成 27 年 4 月から平成 28 年 3 月の期間中に所管と畜場に搬入された牛 317 頭、豚 49 頭の直腸便を検体としてサルモネラ属菌の保菌状況を調査した。菌の分離は滅菌綿棒を用いて直腸便を無菌的に採取し BPW 培地にて前増菌培養、ラポポート・バシリディウス半流動培地による選択分離培養を行った後、遊走性を示したものを DHL 培地とクロモアガー・サルモネラ培地に接種した。その後サルモネラ属菌が疑われるコロニーについては菌種同定のため、(1)と同様の生化学性状試験と血清型別試験に加え、api20E とリアルタイム PCR⁷⁾による菌種同定を行った。

(3) 分離菌株の解析

分離された菌株の内、血清型 O4:i:-の株について MLST 法、PFGE 法による遺伝子解析と薬剤感受

性試験を実施した。供試菌株は平成 27 年 3 月に牛枝肉から分離した株 2 株（牛枝肉 1、牛枝肉 2）、平成 28 年 3 月に豚糞便から分離した株 2 株（豚糞便 1、豚糞便 2）の計 4 株に加え、MLST 法、PFGE 法による遺伝子解析では比較対照として過去に道内で分離された豚由来株 1 株（道内豚分離株）を用いた。この株は遺伝子解析結果が道内で近年数多く分離されている血清型 O4:i:- のタイプと一致している。MLST 法は aroC、dnaN、hemD、hisD、purE、sucA、thrA の 7 種類の遺伝子を解析、PFGE 法の制限酵素には BlnI を用いた。薬剤感受性試験はストレプトマイシン、ST 合剤、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、セフトキシム、アンピシリン、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、ノルフロキサシンの 10 薬剤について感受性パターンを比較した。

3 結果

(1) 枝肉衛生検査

牛枝肉 1,146 検体中 2 検体からサルモネラ属菌が分離され（0.17%）、2 株とも血清型は O4:i:- であった。また、これら 2 検体は同日同地域から同一業者により搬入された牛であったが、生産者は異なっていた。豚枝肉 1,054 検体からはサルモネラ属菌は検出されなかった（第 1 表）。

第1表 牛、豚の枝肉検査結果と分離サルモネラ属菌の血清型

検体の種類	検体数	サルモネラ属菌陽性検体数(%)	分離菌株名	血清型	生産者	生産地域
牛枝肉	1,146	2(0.17)	牛枝肉1	O4:i:-	A	道東
			牛枝肉2	O4:i:-	B	道東
豚枝肉	1,054	0(0)				

(2) 糞便検査

牛糞便からサルモネラ属菌は分離されなかった。一方、豚糞便では 4 検体からサルモネラ属菌が分離された（8.16%）。陽性検体の血清型と由来は、O4:i:-（2 検体）がそれぞれ異なる生産者からの分離であり、Brandenburg（2 検体）が同一生産者からの分離であったが、生産地域はすべて同一であった（第 2 表）。

第2表 牛、豚の糞便検査結果と分離サルモネラ属菌の血清型

検体の種類	検体数	サルモネラ属菌陽性検体数(%)	分離菌株名	血清型	生産者	生産地域
牛糞便	317	0(0)				
豚糞便	49	4(8.16)	豚糞便1	O4:i:-	C	道南
			豚糞便2	O4:i:-	D	道南
			豚糞便3	Brandenburg	E	道南
			豚糞便4	Brandenburg	E	道南

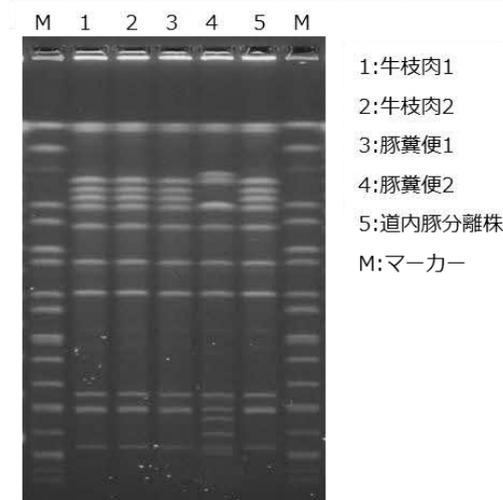
(3) 分離菌株の解析

牛枝肉・豚糞便から分離された供試菌株 4 株の MLST タイプは全て ST34 であった。PFGE タイプは豚糞便由来株の内 1 株のみが異なるパターンを示した。供試菌株を道内豚分離株（MLST タイプが ST34、PFGE タイプが b に分類されている）と比較すると当所分離株中 3 株は道内豚分離株と同じ遺伝子解析パターン（ST34-b）であり、豚糞便の 1 株のみ異なるパターン（ST34-c）であった（第 3 表、第 1 図）。

第3表 当所分離血清型O4:i-のMLST法、PFGE法解析結果

分離菌株名	MLSTタイプ-PFGEタイプ
牛枝肉1	ST34-b
牛枝肉2	ST34-b
豚糞便1	ST34-b
豚糞便2	ST34-c
道内豚分離株	ST34-b

薬剤感受性試験では、遺伝子解析パターンが ST34-b である 3 株が同一の耐性パターンを示し 3 剤に耐性があった。一方、ST34-c は 1 剤に耐性を示した (第 4 表)。



第1図 当所分離O4:i-のPFGE法解析結果

4 考察

調査期間内における牛糞便のサルモネラ属菌保菌率が 0%であったことや牛枝肉衛生検査での分離率が低い (0.17%) ことより、現在の衛生管理を維持すれば牛枝肉からサルモネラ属菌が分離される可能性は今後も低いと考えられる。一方で、血清型 O4:i- の MLST 法と PFGE 法による解析の結果、牛枝肉分離株が道内豚分離株と同じ遺伝子解析パターン (ST34-b) であることや豚のサルモネラ属菌保菌率が牛に比べ高い (8.16%) ことから、同種家畜間での伝播に加え、豚から牛への交差汚染にも留意が必要であると思われる。

また、当所分離血清型 O4:i- 株と道内分離 O4:i- 株を MLST 法と PFGE 法による解析を基に比較したところ、当所分離株中 3 株は道内の家畜や患者で現在流行している株のパターンと一致していた (ST34-b) が、残り 1 株はこれまで道内で分離例のない株のパターン (ST34-c) であった (第 5 表)。

道内で分離される O4:i- の ST は ST19 から ST34 に移り変わっており、本研究のような MLST 法と PFGE 法を用いたタイプ分けによって ST34 の中でも特定のタイプが流行していることがわかる (第 5 表)。さらに、本研究にお

第4表 当所分離血清型O4:i-の薬剤感受性試験結果

由来	牛枝肉1	牛枝肉2	豚糞便1	豚糞便2
MLST-PFGEパターン	ST34-b			ST34-c
ストレプトマイシン	R	R	R	I
ST合剤	S	S	S	S
カナマイシン	I	I	I	I
テトラサイクリン	R	R	R	R
ナリジクス酸	S	S	S	S
セフトキシム	I	I	I	I
アンピシリン	R	R	R	S
クロラムフェニコール	S	S	S	S
ホスホマイシン	S	S	S	S
ノルフロキサシン	S	S	S	S

R:抵抗性 S:感受性 I:中間

第5表 道内分離O4:i-のMLST法、PFGE法解析結果

分離年	由来	MLST-PFGE
S63	患者	ST19-d
H20	鶏	
H20	鶏	
H20	患者	ST19-e
H20	鶏	
H21	鶏	
H25	患者 (食中毒)	ST34-a
H26	豚*	
H27	患者	
H27	患者	
	牛枝肉1**	ST34-b
	牛枝肉2**	
H27	豚糞便1**	
	豚糞便2**	ST34-c

*本研究で比較対照に用いた株 (道内豚分離株)

**本研究における当所分離株

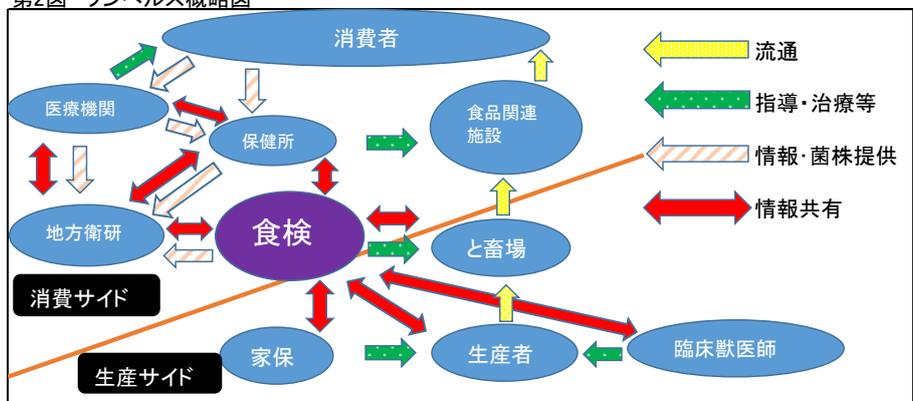
る血清型 O4:i- の薬剤感受性試験の結果より、遺伝子解析パターンによって薬剤耐性パターンにも差異があることが示唆された。このように、血清型の特定のみならず分子疫学的解析も併せて行うことで、より正確な流行株の推察と菌株間の近縁性を検討することができ、菌の薬剤耐性状況の把握や家畜のサルモネラ症発生原因の究明など様々なことに応用できると考えられる。

道内で流行しているサルモネラ属菌は移り変わっている。平成 16 年に当所で行った所管と畜場施設調査⁸⁾では Derby、Mbandaka、Infantis の 3 種の血清型が消化管処理シンクや排水溝から分離されていたが、今回の調査ではこれらの血清型は分離されなかった。このことから菌の移り変わりが裏付けられる。

家畜で流行している菌種は、家畜、食肉、食品等を媒介してヒトにも感染を起こしうること、家畜とヒト間、または異なる畜種間で共通の菌株が分離されていることを意識し、引き続きと畜現場での衛生管理とモニタリングを徹底

するとともに、分子疫学的解析を含む分離菌株の情報を他機関と共有することは、サルモネラ食中毒予防のみならず、ワンヘルスの観点(第 2 図)からも極めて重要であると考えられる。

第2図 ワンヘルス概略図



5 参考文献

1) 厚生労働省ホームページ:

http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2

2) 北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課ホームページ

<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/hf/kse/syokuhin-index.htm#shiryo>

3) 厚生労働省「平成 27 年食中毒発生状況概要版」

<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000116573.html>

4) 北海道農政部生産振興局畜産振興課編：平成 23～27 年度版北海道家畜保健衛生所事業成績書

5) 国立感染症研究所ホームページ, Infectious Agents Surveillance Report

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/1524-iasrgb.html>

6) 東北食中毒研究会 八柳 潤 他：東北地方で 2006 (平成 18) 年度に分離されたサルモネラの血清型と薬剤耐性, Infectious Agents Surveillance Report, Vol. 29, 164-166(2008)

<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/340/kj3401.html>

7) A.T. Csordas, J.D. Barak and M.J. Delwiche : Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR, Letters in Applied Microbiology, 39, 187-193, (2004)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2004.01559.x/pdf>

8) 小藤 昭雄 他：とちく場搬入豚および小動物処理レーンにおける *Salmonella* 汚染状況, THE JOURNAL OF THE HOKKAIDO VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 第 48 巻第 8 号(2004)