

食水系感染症病原体の検査法 - 7

サルモネラ

もり た ゆき お こ も だ え み こ
森 田 幸 雄 : 古 茂 田 恵 美 子
Yukio MORITA Emiko KOMODA

I. 病原体

1. 病原体

サルモネラは 1885 年、Salmon と Smith によって豚コレラ罹患豚（豚コレラの病原体は *Flavivirus Pestivirus*）から新しい種菌として分離され、*Bacillus choleraesuis* と命名された。その菌は後に Salmon の名に由来した *Salmonella* となった。現在 *Salmonella* は *S. enterica*, *S. bongori*, *S. subterranea*¹⁾ の 3 菌種で *S. enterica* は 6 亜種 (*subsp. enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) に分類されている。

サルモネラは O および H 抗原の組み合わせで、2000 種類以上の血清型が存在する。*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium は短縮して *S. Typhimurium* となる。学名はイタリック体で、血清型は通常の字体で書く。

感染症・食中毒として重要となるのは *S. enterica subsp. enterica* の多くの血清型である。*S. Typhi* および *S. Paratyphi A* は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」における三類感染症の腸チフスならびにパラチフスに各々該当する。家畜では鶏、あひる、七面鳥、うずらを対象動物とした *S. Gallinarum-Pullorum* 感染症は「家きんサルモネラ感染症」となり、家畜伝染病予防法の法定伝染病として、牛、水牛、しか、豚、いのしし、鶏、あひる、七面鳥、うずらを対象動物とした *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* 感染症は「サルモネラ症」となり、届出伝染病と定義されている。

2. 疫学

サルモネラは細菌性食中毒の原因菌の中で常に

上位であり、2009 年（平成 21 年）の食中毒統計では、細菌性食中毒のうちサルモネラ食中毒は 67 件（12.5%）、1,518 人（22.7%）で、件数では第 2 位、患者数は第 3 位である。

牛の保菌率は一般的に低値であり、成牛ではほとんど分離されることはない^{2,3)}。しかし子牛のサルモネラ症はまれに発生する。

豚の保菌率は約 4～7%であり^{3～5)}、多くの血清型が分離される。近年、*S. Choleraesuis* による全身感染例が散見され、これらからは H_2S 非産生株（バイオタイプ *Choleraesuis*）も分離される⁶⁾。

鶏の保菌率は高率で、53%（17/32）の鶏盲腸内容から本菌は分離される⁷⁾。ブロイラー処理場の 18～21%、成鶏処理場の 36～48%の食肉肉⁸⁾、12%（7/60）の市販鶏ひき肉からも検出される⁷⁾。1998 年（平成 10 年）、卵によるサルモネラ食中毒の発生防止に関するリスクアセスメントが食品衛生調査会で実施され、殻付き卵の 0.03%（6/24,000）から *S. Enteritidis* が検出されること（平成 4 年調査）。未殺菌液卵（全卵）の 4.0%（55/1,370）（平成 2 年調査）や、12.0%（18/150）（平成 2 年調査）から *S. Enteritidis* が検出されること等のデータの分析から、卵の消費期限の設定、液卵の衛生対策が講じられた。

爬虫類も保菌しており、米国では約 74,000 名が爬虫類に関連したサルモネラ症に罹患し、本症全体の 6%、特に子供では 11%が爬虫類関与である⁹⁾。2005 年、わが国でも厚生労働省は「ミドリガメ等のハ虫類を原因とするサルモネラ症発生事例に係る注意喚起について」（健感発第 1222002 号）を通知している。また、壁谷ら¹⁰⁾ はグリーンイグアナの 17%（17/98）の糞便からサルモネラを分離し、分離株の多くは *S. enterica subsp. houtenae*であることを報告している。

食水系感染症病原体の検査法-7

3. 臨床症状

サルモネラは感染型食中毒を引き起こし、臨床症状は多様であるが、主に急性胃腸炎を示す。潜伏期間は8～48時間であり、最近の *S. Enteritidis* 感染症では少量でも発症することから、潜伏期間が3～4日と長いこともある。症状は、悪心・嘔吐とともに高熱が起こり、腹痛・下痢となる。下痢は1日数回から十数回で3～4日持続するが、1週間以上に及ぶこともある。小児では意識障害、痙攣および菌血症、高齢者では急性脱水症および菌血症を起こすなど重症化しやすく、回復も遅れる。また、サルモネラは胆汁に耐性を示すことから、胆のう中に本菌が侵入した場合は、難治療性となり、長期間便中に排菌する健康保菌者となることもある。

II. 検査法

1. 培養法

サルモネラの培養法は多くの報告があるが、前増菌培地としてはBPWやEEMブイヨン、選択増菌培地としてはRV培地とTetrathionate (TT) 培地。選択培地としては日本ではH₂S産生(SS, DHL, MLCB等)、諸外国ではリシン脱炭酸性(dmLIA, BGA等)を確認する培地を用いることが多い。また、酵素基質培地(ESサルモネラ寒天培地、ESサルモネラ寒天培地II；栄研、CHROMagar™ *Salmonella*；CHROMagar社、X-SAL寒天培地；日水、*Salmonella* chromogenic agar；Oxoid等)も数多く市販されている。図1に米国農務省(USDA)食品安全検査局(FSIS)のサルモネラ分離法を示す。なお、著者らはH₂S非産生株も念頭におき、選択培地はdmLIA培地(脚注)と酵素基質培地を併用している。写真1に各種選択培地上のサルモネラ集落を示す。

国立医薬品食品衛生研究所・食品からの微生物標準試験法検討委員会の示したサルモネラ検査プロトコールは<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>から、AOAC検査法は<http://www.scribd.com/doc/17367740/Aoac-Official-Method-Salmone>

lla) から、WHOの推奨する検査法は<http://www.antimicrobialresistance.dk/232-169-215-protocols.htm#Salmonella>から入手できる。

2. 遺伝子検査法

通常のPCR法としては、上皮細胞侵入性関連遺伝子(*invA*)¹¹⁾、エンテロトキシン産生遺伝子(*stn*)¹²⁾、病原性プラスミド関連遺伝子(*SpvC*)¹³⁾、*S. Typhimurium*株についてはファージタイプDT104関連遺伝子¹³⁾等が報告されており、その用途に応じて検査が実施される。*invA*はほとんどすべてのサルモネラ属菌が保有しているため、本属の同定試験として用いられている。Real-Time PCR法も多くの報告があるが、サルモネラを含む食中毒菌発生時の迅速スクリーニングでは福島¹⁴⁾の方法が有効と思われる。LAMP法(Loopamp®サルモネラ検出試薬キット；栄研)、DNAプローブ法(核さんテストサルモネラ；ファスマック)等も市販されている。以下に、サルモネラ同定のための*invA*遺伝子検出の方法を記述する。

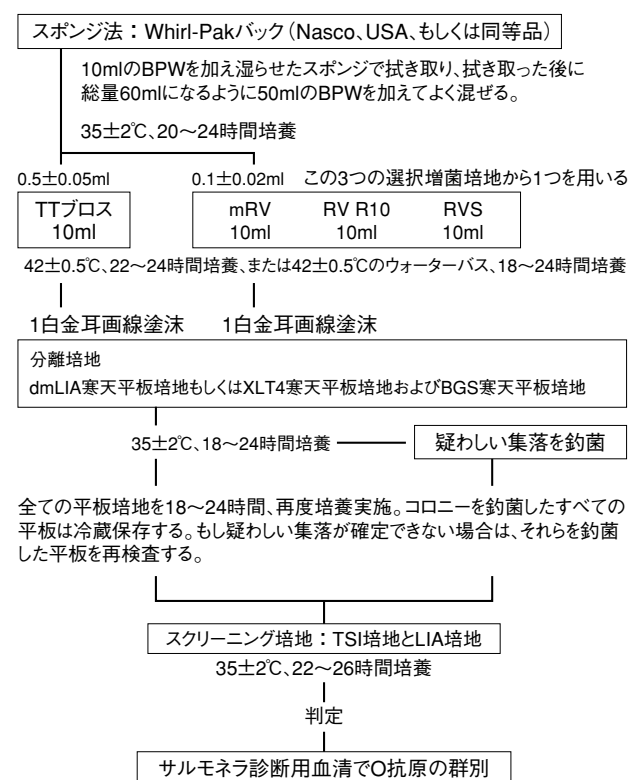


図1 USDA FSISの食品のふきとり検体からのサルモネラの検査法

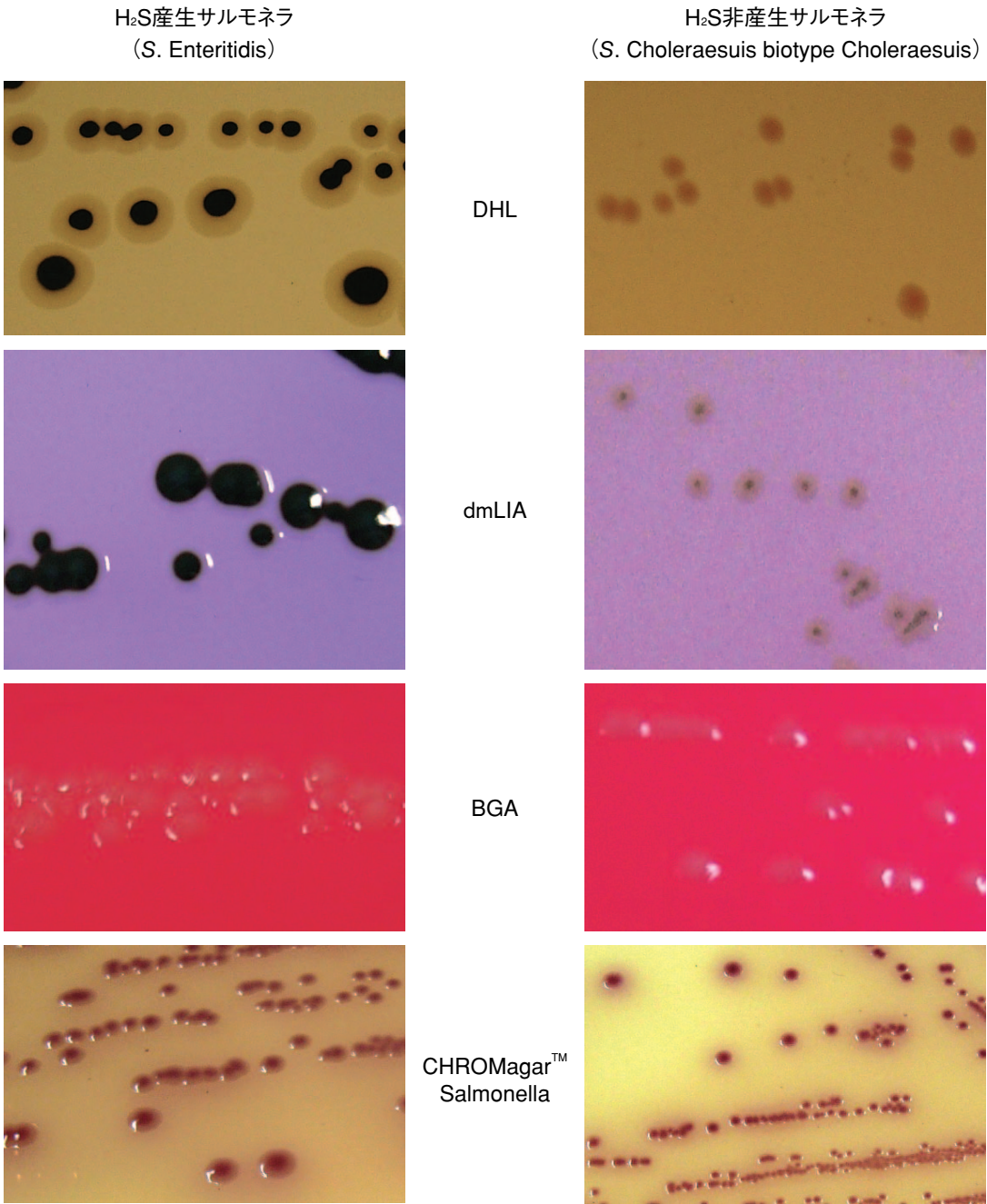


写真1 各種選択培地上のH₂S産生・非産生サルモネラ集落

Double Modified Lysin Iron Agar (dmLIA)

組 成 (1000mL)	
リシン鉄寒天培地 (OXOID)	34.0g
Bile salt No.3 (OXOID)	1.5g
乳糖	10.0g
白糖	10.0g
チオ硫酸ナトリウム	6.76g
クエン酸鉄アンモニウム	0.3g
ノボビオシナトリウム	0.015g

- 作製方法
- ノボビオシナトリウム以外のすべての成分を蒸留水 1000mL で混合し、約 30 分間煮沸して完全に溶解させる(禁オートクレーブ)。
 - ウォーターバスなどで 50℃ に冷却し、ノボビオシナトリウム[0.0075g(力価)/1mL(DDW)：濾過滅菌済み]*を加えてよく混合する。
 - 滅菌シャーレに分注する(20mL 程度)
 - 冷蔵で 3 週間保存可能。
- *：ノボビオシナトリウムについては、1 本(1mL)/500mL(培地)となるように前もって調整して-80℃ 保存し、それを解凍して使用。

食水系感染症病原体の検査法－7

1) DNA 抽出

増菌培養液や培地上の集落をかきとった菌浮遊水溶液に 95～100℃、5 分間熱処理を実施する。または市販 DNA 抽出キット (InstaGene™ Matrix : BIO RAD 等) を用いる。

2) PCR 増幅

Chiu CH and Ou JT¹¹⁾ が報告している *invA* を増幅する Primer を用いて、PCR を実施する。なお、試薬や検査時間を考慮して、反応液の組成、反応時間等に変更して実施している。

① Primer

INVA-1 : 5'-ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT-3'

INVA-2 : 5'-AGACGACTGGTACTGATCGATAAT-3'

② 反応液

試薬は GoTaq® Green Master Mix (Promega) を用い、反応組成は次のとおりとしている。

Green Master Mix、2X	12.5μl
Primer INVA-1 (10pmol)	1.0μl
Primer INVA-2 (10pmol)	1.0μl
Nuclease-Free Water	9.5μl
DNA Template	1.0μl
Total	25.0μl

③ PCR 条件

Initial denaturation	95℃	2分間	} 30 cycles
Denaturation	95℃	30秒間	
Annealing	56℃	30秒間	
Extension	72℃	1分間	
Final extension	72℃	5分間	

3) 電気泳動

2～3%アガロースを用いて電気泳動し、244bp の増幅産物を確認する。

3. その他の簡易・迅速診断法等

サルモネラは微生物学的危害として重要視されているため各種簡易・迅速診断法が市販されている。ラテックス凝集法 (サルモネラ LA : デンカ生研、Salmonella Latex test : Oxoid, 等)、イムノクロマト法 (VIP for Salmonella : BioControl Systems, Reveal Salmonella : Neogen, Singlepath salmonella : Merck, 等)、EIA (酵素抗体) 法 (バイダス アッセイキット サルモネラ : シスメックス・ビオメリュー)、免疫拡散法 (salmonella 1-2test : BioControl Systems) 等がある。また、少数菌を効率的に検出するための免疫磁気ビーズ法も市販されている。

文 献

- 1) Shelobolina ES, et al. Appl Environ Microbiol, **70** : 2959-2965, 2004.
- 2) 小林光士ら. 日食微誌, **25** : 153-158, 2008.
- 3) 森田幸雄ら. 日獣会誌, **57** : 393-397, 2004.
- 4) Asai T. et al. J Vet Med Sci, **68** : 881-884, 2006.
- 5) 高田勇人ら. 日獣会誌, **61** : 65-69, 2008.
- 6) Asai T. et al. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, **33** : 109-119, 2010.
- 7) 森田幸雄ら. 日獣会誌, **56** : 401-405, 2003.
- 8) 清水泰美ら. 日獣会誌, **51** : 608-612, 1998.
- 9) Mermin J. et al. Clin Infect Dis, 38 Suppl 3, S253-S261, 2004.
- 10) 壁谷英則ら. 日獣会誌, **61** : 70-74, 2008.
- 11) Chiu CH and Ou JT. J Clin Microbiol, **34** : 2619-2622, 1996.
- 12) Makino S. et al. J Vet Med Sci, **61** : 1245-1247, 1999.
- 13) Pritchett LC. et al. J Clin Microbiol, **38** : 3484-3488, 2000.
- 14) 福島 博, 角森ヨシエ. 感染症誌, **79** : 644-655, 2005.