

短報

市販食肉及び食肉製品から分離された *Yersinia enterocolitica* の性状について

古川一郎, 寺西大, 長谷川幸江, 尾上洋一

Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from retailed meats and meat products

Ichiro FURUKAWA, Hiroshi TERANISHI,
Yukie HASEGAWA, Yoichi ONOUE

緒言

Yersinia enterocolitica は小児下痢症, 腸間膜リンパ節炎, 仮性虫垂炎などの原因菌として知られ, 我が国では1970年代から14件の集団感染事例が確認されており¹⁾, 1982年に食中毒起因菌として指定された. 本菌は自然環境中や水, 食品等に広く分布し, 食品では特に豚肉から高率に分離される^{2,3)}. さらに5℃以下でも増殖可能なことから, 食品の低温輸送が発達している今日において注目すべき病原菌の一つである. *Y. enterocolitica* の病原株による食中毒では原因食品が特定できない事例が多く¹⁾, 感染源や感染経路の解明に疫学的解析法の確立が待たれている.

今回著者らは, 食肉および食肉製品における *Y. enterocolitica* の汚染実態を把握し, さらに本菌の分子疫学的解析におけるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の有用性を検討する目的で, 市販豚肉を中心に *Y. enterocolitica* の分離を試み, 分離菌株を用いて PFGE を行ったので報告する.

材料と方法

検査対象: 1998年5月から1999年2月に神奈川県内で

市販された豚肉78検体, 生ハム12検体, 生ウィンナー7検体, および牛肉2検体の合計99検体の食肉および食肉製品を検査材料とした.

分離および同定: 増菌培養は検体25 g を 1 / 15M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.6) 225m L と混和後, 4℃で2週間から4週間行い, 0.4% KOH 加生理食塩水2mL と培養液1mL を30秒間混和処理した液の1白金耳量を CIN 寒天培地 (Difco) に塗抹した. 寒天平板上のマニニトール分解性の定型的集落を釣菌し, TSI 寒天, LIM 培地, シモンズのクエン酸ナトリウム培地, 尿素培地, 胆汁エスクリン寒天培地を用いた予備同定試験の後, Barsikow 培地によるラムノース, メリビオースおよびサリシンの糖分解試験により *Y. enterocolitica* のスクリーニングを行い, 菌種の同定には簡易同定キット API 20E (bio-Merieux) を使用した.

血清型別および生物型別: 血清型は市販診断用血清 (デンカ生研) を用いて決定した. 生物型別は Wauters の分類を元に, レシチナーゼ産生能, インドール反応, 硝酸塩還元, オルニチン加水分解, β -ガラクトシダーゼ活性, Barsikow 培地によるキシロースおよびトレハロースの糖分解について試験を行い, 全て陽性の場合を1型, レシチナーゼ産生陰性の場合を2型, レシチナーゼ産生およびインドール反応が陰性の場合を3型とした^{1,4)}.

病原性評価試験: 分離された *Y. enterocolitica* は, カルシウム依存性試験⁴⁾ および自己凝集性試験⁵⁾ から病原性の評価を行った.

染色体 DNA の制限酵素切断パターン: 分離菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行い, 菌株間における染色体 DNA の制限酵素切断パターンを比較検討した⁶⁾. 供試菌株の制限酵素処理には *Xba* I (Takara) を用い, 電気泳動装置は CHEF DR-II (Bio-Rad) を使用した. 200V 定電圧下, パルスタイムは4s から8s で10h, 8s から50s で8h の条件で泳動を行い, アガロースゲルは PFC Agarose (Bio-Rad) を使用した. 泳動終了後, エチジウムブロマイドでゲルを染色し, 紫外線照射下で切断パターンを観察した.

結果および考察

Y. enterocolitica は99検体中55検体で陽性となり, 食品別では, 豚肉は78検体中49検体, 生ウィンナーは7検体中5検体から分離され, 陽性率はそれぞれ62.8%, 71.4%であった. 生食用ハムからは12検体中1検体から分離され, 牛肉2検体からは分離されなかった (表1). 豚肉の陽性検体のうち4検体から異なる血清型あるいは生

表1 食品別の *Y. enterocolitica* 陽性率および分離菌株の型別

品名	検体数	陽性検体数(陽性率)	血清型:生物型(分離菌株数)
豚肉	78	49(62.8%)	○ 3:1(1), ○ 5:1(14), ○ 8:1(6), ○ 9:1(1), ○ UT*:1(27), ○ UT:2(4)
生ハム	12	1(8.3%)	○ UT:1(1)
生ウィンナー	7	5(71.4%)	○ 5:1(2), ○ UT:1(1), ○ UT:2(1), ○ UT:3(1)
牛肉	2	0	

※ UT: ○ 1,2,○ 3,○ 5,○ 8,○ 9の各抗血清に凝集せず

表2 *Y. enterocolitica* 分離菌株の主な性状

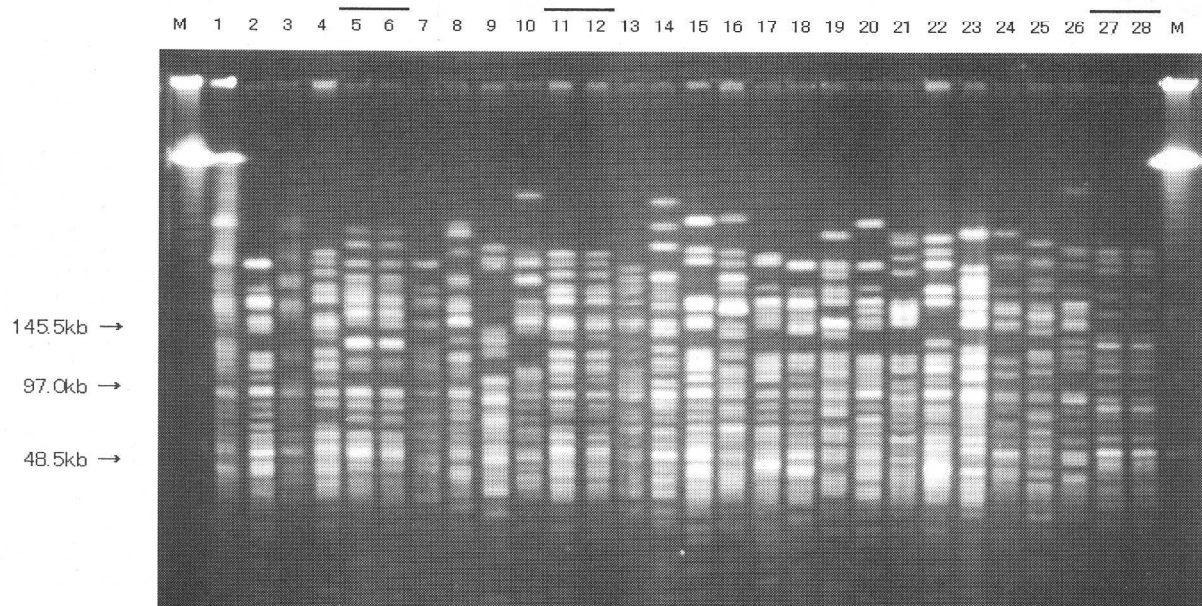
	血清型	○3	○5	○8	○9	OUT*	OUT	OUT
	生物型	1	1	1	1	1	2	3
Ca依存性増殖 (37℃)		—	—	—	—	—	—	—
自己凝集性		—	—	—	—	—	—	—
エスクリン加水分解		+	+	+	+	+	+	—
サリシン		+	+	+	+	+	+	—
レシチナーゼ		+	+	+	+	+	—	—
インドール		+	+	+	+	+	+	—
菌株数		1	16	6	1	29	5	1

※ UT: ○ 1,2,○ 3,○ 5,○ 8,○ 9の各抗血清に凝集せず

物型の菌株が重複して分離された。

市販血清に凝集を示した分離菌株の生物型は全て1型となり、非凝集を示した菌株からは生物型2および3が分離された。国内の集団事例における原因菌と同一の血清型および生物型の組み合わせ¹⁾は確認されなかつ

た。病原株の指標となる性状は、37℃におけるカルシウム依存性増殖および自己凝集性陽性であるが、分離菌株はカルシウム依存性増殖試験が全て陰性であり、また自己凝集性試験も陰性を示したため非病原株に該当した(表2)。

図1 制限酵素 *Xba*I 処理による分離菌株染色体DNAのPFGEパターンM: 分子量マーカー, 1~28: *Y. enterocolitica* 分離菌株,

——: 同一パターンを示すレーンの組

今回病原株は分離されなかったが、福島は非病原株の増殖力が病原株より高いため、病原株が分離平板上で検出困難になることを指摘している⁷⁾。さらに市販豚肉からの *Y. enterocolitica* 病原株の分離率は⁸⁾、ブタからの分離率⁹⁾より低い値を示していることから、食品中における病原株の挙動や、高感度な病原株検出法が今後の検討課題であろう。

分離された *Y. enterocolitica* 59菌株のうち、市販血清に凝集を示した菌株を中心に合計28菌株について PFGE を行ったところ、25種類の制限酵素切断パターンが認められた。22菌株は菌株ごとに切断パターンが異なっていたが、切断パターンの一致したものが3例確認された(図1)。この3例は、各々同一施設でサンプリングされた豚肉からの分離菌株であり、同一汚染源に由来している菌株であると推測された。

PFGE の結果から、同じ血清型あるいは生物型においても多くの切断パターンに分けられた。PFGE を用いた制限酵素切断パターンの解析により、共通の食品汚染源の存在が推測されたことから、今後病原株について検討する必要はあるが、*Y. enterocolitica* の食中毒事例における疫学的解析に PFGE が有効であることが示唆された。

(平成14年7月24日受理)

文 献

- 1) 杉山寛治: *Yersinia enterocolitica*, 防菌防黴, **26**, 161-166(1998)
- 2) Doyle, M. P. and Hugdahl, M. B.: Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 127-135(1983)
- 3) Fukushima, H.: Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 710-712(1985)
- 4) Wauters, G., Kandolo, K. and Janssens, M.: Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*, *Contr. Microbiol. Immunol.*, **9**, 14-21(1987)
- 5) Gemski, p., Lazere, J. R. and Casey, T.: Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*, *Infect. Immun.*, **27**, 682-685(1980)
- 6) Laird, W. J. and Cavanaugh, D. C.: Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae, *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 430-432(1980)
- 7) Buchrieser, C., Buchrieser, O., Kristl, A. and Kasper, C. W.: Clamped homogeneous electric fields(CHEF) gel-electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* spp., *Zbl. Bakt.*, **281**, 457-470(1994)
- 8) 福島博: エルシニア・エンテロコリチカ, 防菌防黴, **29**, 797-806(2001)
- 9) 金子誠二, 丸山努, 小久保彌太郎, 神保勝彦, 松本昌雄: 市販豚肉における *Yersinia enterocolitica* およびその他の *Yersinia* 属菌の分布, 東京衛研年報, **37**, 136-140(1986)
- 10) Christensen, S. G.: *Yersinia enterocolitica* in Danish pigs, *J. Appl. Microbiol.*, **48**, 377-382(1980)