

9 サルモネラ検査の課題と取り組み

○林 朋弘 齋藤秀一

要 約

鶏舎環境ダスト（ダスト）を材料として「鶏卵のサルモネラ総合対策指針」に基づき実施している鶏舎環境のサルモネラ検査にて、1検査の6農場29検体のうち、2農場2検体からサルモネラと判断される菌が分離された。A農場の分離菌は *Salmonella* Typhimurium と判定されたが、B農場の分離菌（被験菌）は09群免疫血清のみの凝集でH型別での凝集が見られなかったことから、*Salmonella* serovar Gallinarum を疑った。そこで遺伝子検査および同定キット等による検査を追加実施した結果、最終的に *Citrobacter* 属と判定され、09群免疫血清に対する非特異反応と考えられた。生物学的性状および免疫血清による早急な血清型の判定は重要であるが、指針によっただけでは判定に疑問が生じる場合もあるため、判定に疑問を抱いた際の追加試験の実施等を含めた手順書を作成した。

当所では動物由来感染症監視体制整備事業の一環として、生産段階における汚染状況の把握と、生食する機会の多い鶏卵の安全性確保を目的とした養鶏農場のサルモネラ検査を定期的に行っている。

本事業の主要な検体であるダストは鶏舎内外の土埃、鶏の落屑物、乾燥風化した残餌および糞便、そこに発生した衛生害虫の死骸などが混入されている。

検査の方法は「鶏卵のサルモネラ総合対策指針」（指針）¹⁾に基づき、検査開始から最終的な血清型の判定まではH型別における菌の運動性によっても異なるが、概ね8~9日間を要している。

サルモネラ検査の概要

平成28年6月28日から30日にかけて、6農場の鶏舎床およびケージより採取した29検体のサルモネラ検査を実施したところ、選択培地であるXLT4寒天培地（XLT4）で13検体、クロモアガーサルモネラ培地（CHS）での8検体が陽性となった。TSI寒天培地（TSI）およびLIM半流動培地（LIM）

で確認検査を行ったところ、AおよびB農場の各1検体からサルモネラと判断される菌が分離された（表1）。

このうちA農場の分離菌の血清型は04群 *Salmonella* Typhimurium (ST) と判定された。一方でB農場の分離菌（被験菌）はサルモネラ免疫血清により09群と判定されたが、H型別で運動性が見られたものの凝集は認められなかったため、Kauffman-Whiteの抗原構造表から *Salmonella* serovar Gallinarum (SG) を疑った。

表1 各過程における所見

農場	XLT4 陽性数/検体数	CHS 陽性数/検体数	TSI・LIM 陽性数/検体数	判 定
A	1/2	1/2	1/1	S. Typhimurium (4:i:1,2)
B	6/12	5/12	1/6	09群凝集(+) H型別凝集(-)
C	3/8	0/8	0/3	サルモネラ陰性
D	0/2	1/2	0/1	
E	0/2	1/2	0/1	
F	3/3	0/3	0/1	
計	13/29	8/29	2/13	

表2 生化学的性状

	運動性	リジン	インドール	硫化水素	乳糖	クエン酸
被験菌	+	±	-	+	-	+
<i>S. Gallinarum</i>	-	+	-	d	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	d	d	+	-	d	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	d	-	-	d	+
<i>Citrobacter</i> spp.	+	-	d	d	d	+
<i>Proteus</i> spp.	+	-	d	d	-	d

SG は家畜伝染病である「家きんサルモネラ感染症」の原因菌であり、B農場では平成5年にもSGの biovar Pullorum が分離されているため、被験菌が SG であるか否かの早急な確認が必要となった。

SG 確認のための検査

0 群判定されたサルモネラの H 型別判定に際しては、クレーギー管を挿入した非選択性半流動高層培地に菌を穿刺して運動性を引き出すが、被験菌は H 型免疫血清で凝集しないにもかかわらず運動性が認められていた。また、別途作製したシモンズ・クエン酸寒天培地に被験菌を穿刺培養したところ、クエン酸の分解により培地が青変した。これを表2に当てはめたところ、性状が他の各種腸内細菌と重複するものの、SG は否定された。続いて実施した PCR では、検体として被験菌並びに本事例にて分離されたサルモネラ以外の菌（詳細な同定は未実施）より抽出した DNA、陽性コントロールとして A 農場で分離同定された ST より抽出した DNA を用いたところ、被験菌の DNA はサルモネラ遺伝子検出キットでは増幅されなかった（図1）。

更に細菌同定キット（アピ 20E）を用いて被験菌の性状を確認したところ表3のとおり、検索コード番号から 97.4% の確率で *Citrobacter youngae* という結果が出て、サルモネラは完全に否定された。*Citrobacter* 属は表在水や土壌中に

常在している菌で、リジン脱炭酸酵素の有無以外

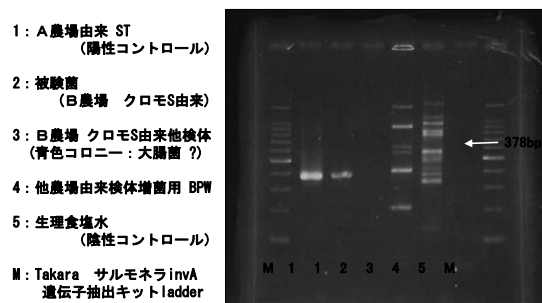


図1 PCR検査の結果

表3 アピ20Eにおける各陽性率と被験菌の状況

	ONPG	ADH	LDC	ODC	GIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
<i>S. Gallinarum</i>	0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100
<i>C. youngae</i>	100	50	0	1	80	80	1	0	1	0	0	100
被験菌	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+

	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>S. Gallinarum</i>	99	0	0	1	1	0	1	99	0
<i>C. youngae</i>	100	1	95	100	1	1	25	99	0
被験菌	+	-	+	+	-	-	+	+	-

api webより *Citrobacter youngae* 97.4%

ではサルモネラとよく似た生化学的性状を持っており、*Proteus* 属などを含めた他の腸内細菌とともに一部のサルモネラ免疫血清で凝集するとされている。また、公衆衛生分野でも日和見感染症としての報告に加え、調理従事者の検便においてサルモネラと誤同定された事例²⁾があること等から、本事例もサルモネラ免疫血清の非特異反応によるものであるという結論に至った。

考 察

通常サルモネラのコロニーはほぼ円形であり、菌の遊走等による不定形なコロニーの出現は少ないが、本事例では XLT4 において菌の遊走による不定形なコロニーが多く認められ、一部農場の検体では XLT4 および CHS にて、サルモネラ陽性と判定した菌の分離状況にも差があったことから、XLT4 上にサルモネラ以外の硫化水素産生腸内細菌の発

育が考えられた。また、指針では、選択培地の前段階で用いる増菌培地としてハーナ・テトラチオン酸塩培地を使用するが、この培地で増殖した被検菌をマニュアルどおり選択培地へ塗抹したがSG などチフス症状を呈するサルモネラが発育しにくいため、このことを熟知していれば早い段階で、具体的な検査を行わずともSGを否定することができる。また、検査担当者が初心者であったり、過去に検査を経験していても長期間のブランクがあるとマニュアル通りの検査となってしまうため、*Citrobacter* 等腸内細菌のサルモネラ免疫血清に対する非特異反応が疑われる際には、PCRや同定キットを用いた検査によりサルモネラを否定することが必要であると思われた。

手順書の作成

家畜および家きんでサルモネラ感染が疑われる大量死や下痢の集団発生に際して、免疫血清による早急なサルモネラの血清型判定は重要なことであるが、指針によっただけでは判定に迷う場合があるため、疑問を抱いた際の追加試験の実施等を含めた検査の手順書を簡便ながら「鶏卵のサルモネラ総合対策指針（平成17年1月26日付）」に準じて作成した（図2）。この手順書は、サルモネラ検査未経験の職員への技術伝達や学生実習にも活用している。

その後筆者自身がサルモネラ血清型の判定に迷う事態は無くなり、病性鑑定事例も含めた都内85農場、328検体のサルモネラを検査した結果、平成28年度は表4のとおり、6戸19検体より7血清型を分離・同定をし、農場の衛生指導を行っている。本事例では誤同定があったとはいえ、今後同様の事例に遭遇した際に行うべき検査の必要性が再認識されたものであり、手順書の改訂などによって担当者以外でも検査を可能にできる良い機会であったと考えられた。

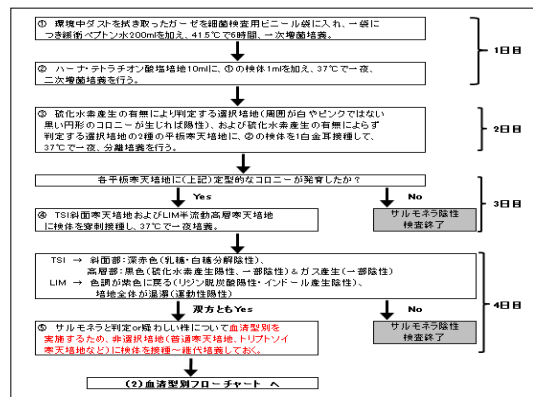


図2 作成したフローチャート形式の手順書（一部）

表4 H28年度 サルモネラ分離状況

農場	血清型	備考
ア	<i>S. Typhimurium</i> (04 : i : 1, 2)	
イ	<i>S. Typhimurium</i> (04 : i : 1, 2)	継続して分離
ウ	<i>S. Grumpensis</i> (013 : d : 1, 7) 04 : i : -	
エ	<i>S. Infantis</i> (07 : r : 1, 5) 08 : Z ₄ , Z ₂₃ : -	
オ	<i>S. Oranienburg</i> (07 : m, t : -) <i>S. Amager</i> (03, 10 : y : 1, 2)	
カ	<i>S. Grumpensis</i> (013 : d : 1, 7)	病性鑑定事例

引用文献

- 1) 鶏卵のサルモネラ総合対策指針（平成17年1月26日付第8441号農林水産省消費・安全局衛生管理課長通知）
- 2) 医療施設の無症状調理従事者から分離された *Citrobacter* 属菌がパラチフスA菌と誤同定された事例、国立感染症研究所病原微生物検出情報(IASR) Vol. 37 p. 112-113: 2016年6月号 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/typhi-m/typhi-iasrd/6528-436d01.html>