

食肉および野菜における腸管出血性大腸菌汚染実態調査

【保健衛生室】

最首信和・石田 茂

1 はじめに

1990年代から腸管出血性大腸菌（以下EHEC）による集団発生が多数報告され、1996年には大阪府堺市において、腸管出血性大腸菌O157（以下EHEC O157）を原因とする、数千人規模の集団感染症が報告された¹⁾²⁾。

鳥取県内においても、EHEC O157、EHEC O26を中心に、毎年10数件の腸管出血性大腸菌感染症が見られ、平成16年度は15件53名の感染者が報告された。

EHECは、牛などの反芻動物が保菌していることが多数報告されているが³⁾⁴⁾、感染症が起こった際に、感染源の特定までたどり着くケースは非常に少なく、感染症発生の予防対策と共に、感染経路解明への取り組みが重要な問題となっている。現在では国立感染症研究所を中心とし、各地方衛生研究所においてパルスフィールドゲル電気泳動法（以下PFGE）を用いた遺伝子疫学解析とともに、パルスネットの構築が進められている。

本研究では、腸管出血性大腸菌感染症の感染源の解明及び予防を目的とし、市場に出回る食肉と野菜の調査を行った。また、平成16年度報告された腸管出血性大腸菌感染症との関連性についても調査を行った。

2 調査方法

1) 調査期間

平成16年7月～平成17年1月

2) 材 料

- (1) 食肉：鳥取県内における焼肉店2店、食肉販売店1店から食肉108検体を購入し検査を行った（表1）。
- (2) 野菜：鳥取県内における小売店2店から26検体を購入し検査を行った（表1）。

表1 食品（食肉、野菜）の生産地

	国内産		外国産	不明	合計
	県内産	県外産			
食肉	45	28	25	10	108
野菜	10	8	8	0	26

3) 方 法

(1) 食品からのEHEC検査方法

分離同定法：食品25gにEC培地225mlを加え、ストマッカーで攪拌し、37℃、24時間の増菌培養を行い、その増菌培養液を、選択分離培地（DHL、CT-SMAC、CHROMagarO157、CT-RMAC、RMAC、CT-SBMAC、SBMAC）に0.1ml塗抹し、37℃、24時間の培養を行った。疑わしいコロニーを1検体当たり200株釣菌し、常法を用いて、大腸菌の同定、血清型別試験を行った。

ベロ毒素確認試験：大腸菌と同定したものについて、分離株をテンプレートとしてPCR法によるベロ毒素の確認を行った。

増菌培養液からのPCR法：すべての検体の増菌培養液をテンプレートとしてPCR法によるベロ毒素の確認を行い、ベロ毒素陽性と判定された場合には、さらに重点的に分離同定を試みた。

(2) 遺伝子疫学解析（PFGE）

分離菌株をTSB培地で37℃、24時間培養後、増菌培養液を同量の1%低融点アガロースに包埋し、Lysozyme溶液で溶菌後、Proteinase Kでタンパク分解処理し、制限酵素XbaI、BlnIによりDNAを切断した。切断されたDNAを1%アガロースゲルにて電気泳動した。泳動条件は、電圧6.0V/cm、パルスタイム2.2～54.2秒、19時間、14℃で行い、UV照射下で検出を行った。解析については、下記のとおり行った。

食品内から分離された菌株についての解析。

食品と平成16年度にヒトから分離された菌株についての解析。

3 結 果

1) 食品からのEHEC検査

- (1) 食肉108検体の検査を行い、県内産の小腸から2株、センマイから4株の合計6株を分離した。血清型は、EHEC O123:H36、5株とEHEC OUT:H-, 1株であり、ベロ毒素型は6株すべてがVT1であった（図1）。

なお、当所では血清型別不能であったため、国立感

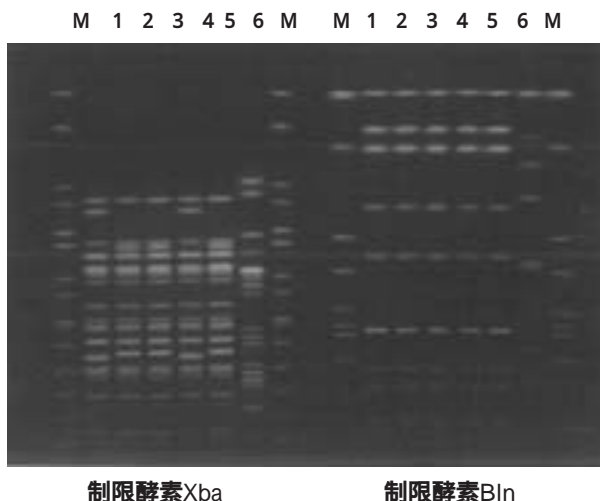


図1 食肉から分離された6菌株についてのPFGE電気泳動画像

感染症研究所に検査依頼を行い、血清型を特定した。

(2) 野菜26検体からEHECの分離はされなかった。

2) EHECの遺伝子疫学解析 (PFGE)

小腸から分離されたEHEC O123:H36, 2株については、Bln で一致していたが、Xba においては2パターン (パターンA, B) が確認された。センマイから分離されたEHEC O123:H36, 3株と、EHEC OUT:H-, 1株についても、EHEC O123:H36が2パターン (パターンA, B)、EHEC OUT:H- が1パターン (パターンC) の合計3パターンが確認された (図1)。小腸、センマイで確認されたパターンA、パターンBについては、それぞれに一致していた。

4 考察

EHEC O123は、過去に沖縄県で山羊から分離されていることが報告されているが⁵⁾、ウシやヒトからの分離については報告されていない。

今回、食肉2検体から分離されたことについては、採取日、生産地、および販売店が同一であったこと、さらにEHEC O123についてPFGEパターンが一致していたことから、汚染源の由来も同一である可能性が高いと推測される。なお本県においては、平成16年度にEHEC O123感染症の報告はなかった。

今回の調査では、食肉と野菜からEHEC O157は検出されなかった。国内産牛肉のEHEC O157分布状況は0.6~3.6%との報告がある⁴⁾。食肉からの検出が困難であるにも関わらず、毎年ヒトの感染症が多数報告されることについて、腸管出血性大腸菌感染症は他の細菌に比べ少量の菌量で発症することが要因と考えられる。

レーン番号	検出食品	血清型	毒素型	PFGEパターン		
				<100kb	100~200kb	>200kb
1	小腸	O123:H36	VT1	パターンA(ND)	ND	ND)
2	小腸	O123:H36	VT1	パターンB(ND)	ND	ND)
3	センマイ	O123:H36	VT1	パターンB(ND)	ND	ND)
4	センマイ	O123:H36	VT1	パターンA(ND)	ND	ND)
5	センマイ	O123:H36	VT1	パターンB(ND)	ND	ND)
6	センマイ	OUT:H-	VT1	パターンC(ND)	ND	ND)

M...Marker

PFGEパターン...制限酵素Xba での処理された泳動結果を、分子量<100kb、100~200kb、>200kbに分けて、パターンを表記する。さらに、既定のパターンに該当しないものについてはNDと表記する。

今後、さらに迅速かつ高感度の検査対応が求められ、リアルタイムPCR法やLAMP法の導入の検討も必要であると考えられる。

5 まとめ

- 1) 食肉108検体のうち、2検体からEHEC O123:H36 (VT1)、EHEC OUT:H- (VT1) を分離した。
- 2) PFGEの解析結果よりEHEC O123:H36, 2パターン、EHEC OUT:H-, 1パターンの合計3パターンを確認した。
- 3) 野菜26検体からは、EHECの分離はされなかった。
- 4) 平成16年度に、本県においてEHEC O123感染症の発生はなかった。

謝辞

この度の調査研究に関して、ご協力いただきました国立感染症研究所の寺嶋淳先生はじめ、担当者の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 堺市学童集団下痢症対策本部
堺市学童集団下痢症 (概要), 1-65 (1997)
- 2) 病原大腸菌O157対策本部
食品衛生研究, 46 (12), 7-28 (1996)
- 3) 中澤宗生, 甲斐明美: 日本のウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の性状. 感染症誌, 68: 1437-9 (2002)
- 4) 小川博美: 腸管出血性大腸菌の生態とその制御 動物における分布と食品・各種環境下でも消長. 広島県保健環境センター研究報告, No.11, 1-20 (2003)

- 5) 又吉正直, 中澤宗生: 沖縄県で分離された山羊由来
Vero毒素産生性大腸菌の細菌学的性状と薬剤感受性.
感染症誌, 76: 51~56 (2002)