

2008 年度 大阪小児感染症研究会助成による研究成果報告書

堺市における市販食肉中の腸管出血性大腸菌等の検出状況について

代表研究者

田中智之（堺市衛生研究所 tanaka-tom@city.sakai.lg.jp）

共同研究者

下迫純子、横田正春、沼田富三、山内昌弘、大中隆史（堺市衛生研究所）

研究目的

平成 8 年に腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 感染による学童集団下痢症を経験した当市では、感染予防対策の資料として、平成 9 年より河川水等の環境から EHEC O157 及び O26 の分離を試み調査研究を行ってきた。また、集団感染事例以来、毎年約 30 名の EHEC 感染による散発事例が報告されている。その中の約半数は小児事例で、HUS の発症者は平成 16 年に 2 名、19 年 2 名、20 年 2 名あり原因菌はすべて O157:H7 であった。これらの散発事例の感染源は、喫食調査において生肉等の喫食(70~80%)があり、食肉との関連が疑われたが、殆どの事例において食肉等の残品が無く、原因食品の究明には至っていない。しかし、平成 13 年には、販売店から提供された生レバーと喫食した患者それぞれの EHEC 分離菌が、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析で DNA 型別の一一致した食中毒事例を経験している。

このような状況を踏まえて、今回、市販の牛由来食肉を検体として、EHEC の分離を試みた。さらに、食肉由来 EHEC 分離菌株については、平成 20 年度の EHEC 散発事例分離株及び市内河川水からの分離株との細菌遺伝子学的解析を PFGE により行い、その因果関係の可能性について検討した。また、食中毒原因菌であるカンピロバクターおよびサルモネラ属菌の分離も同時に行い検出状況を調査し、これらの結果を併せて感染予防対策の基礎資料に資することを目的とした。

材料および方法

1. 材料

市販の牛由来食肉 125 検体を材料とした。この中には、生レバー、ユッケなど好んで生食される材料の他にミンチ、カルビ、ハラミ、ツラミ、赤センマイ、シマ腸などを材料とした。

2. 方法

(1) EHEC の分離・同定

EHEC O157 及び O26 の分離には、食肉 25g をノボジオシン加 m E C ブイヨン 225ml で $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間の増菌培養を行い、免疫磁気ビーズ O157(Dynabeads)および O26(Dynabeads)による集菌、それらを CT-SMAC 寒天培地(O157)および CT-RMAC 寒天培地(O26)にて培養した。疑わしいコロニーをできる限り多く CLIG 培地(O157)/TSI 培地(O26)および LIM 培地、シモンズのクエン酸塩培地に釣菌した。これら菌株の生化学的性状および CLIG 培地上に発育した菌への紫外線 (365nm) 照射による蛍光の有無等から、O157 あるいは O26 を疑う菌株についてはさらに血清学的検査および PCR 法によるベロ毒素(VT1,VT2)遺伝子の検出を試みた。また、O157

および O26 以外の他血清型 EHEC の分離には、ノボビオシン加mECブイヨン増菌培養液を DHL 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地に塗抹・培養し、培地のコロニー密集部分を掻き取り、懸濁液をアルカリ熱抽出法で処理して、PCR 法によりベロ毒素(VT1,VT2)遺伝子の有無を検査した。VT 陽性の場合、DHL 寒天培地、CT-SMAC 寒天培地上の独立コロニーをできる限り多く釣菌し、標準寒天培地で培養後、PCR 法によりベロ毒素(VT1,VT2)遺伝子の有無を検査した。さらに、分離した VT 陽性菌株は、生化学的性状検査、血清型別を実施した。

1) ベロ毒素産生性の検査

ベロ毒素産生性は、CAYE 培地（メルク株式会社）にて 37℃、24 時間の振盪培養後、その培養上清について大腸菌ベロトキシン検出キット：デュオパス・ベロトキシン（メルク株式会社）にて検査を行った。

2) 菌株の薬剤感受性

各菌株は Kirby-Bauer 法（センシ・ディスク）によりアンピシリン（ABPC）、セフトキシム（CTX）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、ストレプトイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、シプロフロキサシン（CIP）、ナリジクス酸（NA）、ホスホマイシン（FOM）、ノルフロキサシン（NFLX）、ST 合剤（SXT）、クロラムフェニコール（CP）の 12 薬剤に対する感受性試験を実施した。

3) パルスフィールド・ゲル電気泳動法（PFGE）による DNA 解析

分離菌株について「PFGE New Protocol-Kinki」の方法¹⁾により PFGE を行った。泳動像については、Fingerprinting II（BIO-RAD）にて類似度の解析を行った。

(2)サルモネラ属菌の分離

食肉 25g を EEM 培地 225ml で 35±1℃、18±2 時間の前増菌培養をし、前増菌培養液 1ml をセレナイトシスチン培地 15ml に接種し、43±1℃、20±2 時間の選択増菌培養する。選択増菌培養液を SS 培地に塗抹し、35±1℃、22±2 時間の分離培養をする。定型的なコロニーを釣菌して、定法通りの分離同定を行った。

(3)カンピロバクターの分離

食肉 25g をプレストンブロス 100ml で 42±1℃、24±2 時間の微好気性増菌培養をする。増菌培養液をバツラー培地に塗抹し、42±1℃、48±3 時間の微好気性分離培養した。定型的なコロニーを釣菌して、血液寒天培地を用いて、42±1℃、48±3 時間の微好気性培養及び 35±1℃、48±3 時間の好気性培養を行い発育の有無を確認した。微好気性培養のみ発育した菌株について定法通りの確認試験を行った。

1) 確認試験

馬尿酸塩加水分解試験及びナリジクス酸（NA）・セファロシン（CF）感受性試験を行った。

2) 菌株の薬剤感受性

各菌株は Kirby-Bauer 法（センシ・ディスク）によりノルフロキサシン（NFLX）、オフロキサシン（OFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、テトラサイクリン（TC）、エリスロマイシン（EM）の 6 薬剤に対する感受性試験を実施した。

研究成果

1. 検体別の菌株分離状況

市販牛由来食肉 125 検体中 EHEC を 14 検体(11.2%)から 16 菌株分離し、カンピロバクターを 23 検体(18.4%)から 23 菌株分離した(表 1)。サルモネラ属菌は検出されなかった。部位別に見ると、赤センマイやシマ腸等の消化管系の検体で EHEC を 5 菌株、カンピロバクターを 10 菌株分離し、レバーで EHEC を 9 菌株、カンピロバクターを 9 菌株分離した。

2. EHEC の血清型別及び VT 型別

分離された EHEC16 菌株の血清型は、O157 が 4 菌株、O6、O119、O136 を 1 菌株ずつ、O UT が 9 菌株分離した(表 1)。ベロ毒素産生性試験にて判明したベロ毒素型は表 2 に示すように、VT1 または VT2 単独産生であり、VT1 と VT2 両方保有している菌株はなかった。O157:H7 の 3 菌株は VT2、1 菌株は VT1 であった。

3. EHEC の薬剤感受性

16 菌株中 12 薬剤すべてに感受性であったのは O157 の 2 菌株のみであり、他 14 菌株(87.5%)は薬剤耐性を示した(表 2)。薬剤耐性パターンは、8 パターンあり、ABPC のみ 1 剤耐性が 5 菌株、2 剤耐性が 3 菌株、3 剤耐性(中間(I)を含む)が 4 菌株、4 剤耐性が 2 菌株あった。4 剤耐性株は O136 と O UT であり、2 菌株共にレバーから分離されたものであった。さらに、シマ腸から分離された O UT の 1 菌株は、FOM 耐性株であった。

4. パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)による DNA 解析

平成 20 年度の O157 感染症患者から分離した 26 菌株の PFGE による DNA 解析の結果、家族内感染等を疑う同一事例株はそれぞれ相同性が高く、食肉から分離した 4 菌株および河川水から分離した 1 菌株の O157 は、患者分離株とは相同性は低いものであった(図 1、図 3)。

O157 以外の血清型についても、河川水から分離した 3 菌株と患者から分離した 1 菌株の O26 は、相同性は低いものであった。なお、食肉同一検体から分離した O UT の 2 菌株(S13,S15)は PFGE では 100%の相同性を示したが薬剤耐性パターンは異なった。さらに、同日同店にて入手した 2 種類の食肉から分離した O UT の 2 菌株(S16,S17)が 100%の相同性を示した(図 2、図 4)。

5. カンピロバクターの分離状況

分離されたカンピロバクター23 菌株はすべて *C. jejuni* であった。

6. カンピロバクターの薬剤感受性

6 薬剤すべて感受性は 23 菌株中 13 菌株、TC のみ耐性は 8 菌株(34.8%)、キノロン系薬剤である NFLX、OFLX、CPFX、NA の 4 剤耐性株は赤せんまいとカルビから 1 菌株ずつ分離され 2 菌株(8.7%)あった(表 3)。

将来の展望と感想

牛の EHEC 保菌率については、1996 年、厚生科学研究の「食肉の汚染実態に関する研究班」により、汚染調査が実施されている。それによると、と畜場に搬入された牛の直腸便からの EHEC 分離率は、39.4%~78.9%(月齢差及び季節変動あり)、O157 の分離は 1.4%、保菌牛は全国的に分布していること、また、処理施設での牛枝肉から O157 が 0.3%検出されたことが報告されている。2006~2007 年の愛媛県における牛の保菌調査では、57.3%の牛から EHEC が分離され、一頭か

ら 1～6 種類の EHEC が検出されている。また、検出された EHEC は 9 種類の血清型と O UT であり、分離菌株 137 株中 O157 は 5 菌株(3.6%)、O26 は 11 菌株(8.0%)、O UT は 105 菌株(76.6%)と報告されている。

今回、堺市内の市販牛由来食肉 125 検体の検査の結果、EHEC が 14 検体(11.2%)から 16 菌株が分離された。その血清型は O157 が 4 菌株、他 O6、O119、O136 を 1 菌株ずつ分離し、O UT は 9 菌株であった。部位別に見ると、赤センマイやシマ腸等で 17 検体中 3 検体から 5 菌株分離し、特にシマ腸 1 検体からは O157 を 1 株、O UT2 株（異なった薬剤耐性）の 3 種類の EHEC を分離した。また、レバー46 検体中から EHEC 9 菌株を分離した。さらに、ツラミ肉 3 検体中 2 検体から EHEC 2 菌株(O157、O UT 各 1 菌株)が分離され、また、図 4 に示す様に、PFGE による DNA 解析の結果、同日同店にて入手した 2 種類の食肉から分離した O UT の 2 菌株(S16,S17)が 100%の相同性を示し、解体処理等での相互汚染の可能性が考えられた。なお、これらの食肉から分離した 4 菌株および河川水から分離した 1 菌株の O157 は、平成 20 年度の O157 患者分離株 26 菌株との相同性は低いものであった。

家畜由来細菌の薬剤耐性については 2006 年に静岡県との報告がある。それによると鶏・豚・牛畜種別の抗菌剤使用量が薬剤耐性状況に反映している傾向があり、大腸菌の薬剤耐性株は鶏・豚で出現率が高く、さらに 5 剤耐性株や ESBL 産生株も報告されている。また、FOM の耐性株は、牛が 7.3%と他畜に比べ高い出現率を示しており、EHEC O157 の主な保菌動物である牛の治療に FOM が使用されることによるものであると推測され、FOM 耐性の EHEC 増加が懸念されている。

今回、食肉から分離した菌株の薬剤感受性試験では、16 菌株中 12 薬剤すべてに感受性であったのは O157 の 2 菌株のみであり、他 14 菌株（87.5%）は薬剤耐性を示した。薬剤耐性パターンには、8 パターンあり、共にレバーから分離された O136 と O UT の 2 菌株は ABPC、KM、SM、TC の 4 剤耐性株であった。さらに、シマ腸から分離された O UT の 1 菌株は、EHEC 感染症の治療薬である FOM の耐性株であった。一方、堺市の感染者から分離された EHEC 菌株の薬剤耐性出現率は、2007 年度は 35.1%、2008 年度は 33.3%で、これらと比べて食肉からの分離菌株が強い薬剤耐性を示すことは、今後の EHEC 感染症において非常に危惧される問題であると言える。

2007 年の病原微生物検出情報によると、EHEC 患者の血清型別頻度では O157 は 76.2%を占め、O26 は 11.0%、O111 は 6.0%、O121 は 1.6%、O165 は 0.8%、その他の血清型である VT 陽性株は 4.1%あった。2000～2007 年のその他 VT 陽性株は 4.6%であり、その内 O UT によるものは 1.9%あった。堺市の 2007 年度 EHEC 感染症発生は 27 事例あり、O157 が 29 菌株、O26、O91、O119 が各 1 菌株、O121、O165 が各 2 菌株、O UT が 1 菌株分離されている。2008 年度は 17 事例あり、O157 が 25 菌株、O26、O121 が各 1 菌株分離されている。

今回検出された EHEC のうち O157 以外の O119、O6、O136 では、国内で散発事例の報告があるが、堺市内において患者発生はなく、今回の調査成績との関連性は不明である。

近年、我が国の細菌性食中毒は、全体として減少傾向にあるものの、カンピロバクターによる食中毒事例の減少はみられず、多くの散発下痢事例が報告されている。2007 年の厚生労働省食中毒統計によると、416 事例、2,396 人(細菌性食中毒総数は 732 事例、12,964 人)の発生があった。原因として鶏肉によるものが多いが、レファレンスセンター報告による 2006 年度の集団発生事

例では牛生レバー喫食が明らかであるものが 78 事例中 8 事例(10.2%)ある。また、全国 121 カ所の食肉衛生検査所で行われた牛のカンピロバクター保菌の調査では、胆汁 35%、肝臓 12%の検出率である。また、滋賀県食肉衛生検査所は、2008 年の調査では 42.6%の牛の胆汁または肝臓からカンピロバクターを検出したと報告している。カンピロバクターは、経口的に牛に取り込まれるが、EHEC 異なり、十二指腸から胆嚢内に蓄積、増殖し消化管内に排泄される一方、肝臓実質内にも移行するといわれている。

2005～2008 年の堺市のカンピロバクター食中毒事例では、鶏肉が原因食品と推定される事例のみであった。市販の牛由来食肉 125 検体の汚染状況検査の結果では、赤センマイやシマ腸等の消化管系の 17 検体中 10 検体からカンピロバクター 10 菌株(58.8%)を分離した。またレバーからも 46 検体中 9 検体から 9 菌株(19.6%)分離され、いずれも高い検出率であった。加えて、カルビやハラミからも 4 菌株が分離されており、解体処理等での二次汚染の可能性が考えられた。

カンピロバクターの薬剤耐性株の出現率は、2007 年のレファレンスセンターの報告によると全国から分離された散発下痢症由来性 *C. jejuni* の約 55%が薬剤耐性株であり、そのうち約 35%がキノロン系薬剤である NFLX、OFLX、CPFX、NA の 4 剤に耐性であり、TC 耐性は約 38%、治療の第一選択薬であるエリスロマイシン(EM)の耐性は約 2%出現している。今回の食肉検査で分離した菌株はすべて *C. jejuni* であり、薬剤感受性試験では、10 菌株(43.5%)は薬剤耐性を示し、キノロン系の 4 剤耐性は 2 菌株(8.7%)、TC のみ耐性は 8 菌株(34.8%)あった。散発下痢症由来株と同様の薬剤耐性があったが、キノロン系薬剤耐性の出現率は低かった。

今回の市販牛由来食肉の調査の結果、赤センマイやシマ腸等の消化管系の食肉やレバー等で EHEC 及びカンピロバクターが多く検出された。さらに、カルビ等からも菌が分離された。以上のことにより、消費者に対しては、肉調理時の衛生的な取り扱いやレバー生食の危険性について、一層の啓発を行うことが食肉由来感染症の予防に極めて重要であると考ええる。