

## 32. 市販食肉類の腸管出血性大腸菌、 食中毒起因菌の汚染状況調査

○杉本 光伸（堺市衛生研究所）

### 【目的】

堺市内では過去 10 年間に、散発性腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症が 153 例 (6 例の HUS 症例を含む) の報告があった。腸管出血性大腸菌感染症発生届に基づく保健所の調査では生食肉の喫食履歴が発症に起因する事例が多いが、しかし小児では肉を生食せずに感染する例が見受けられ、肉トレイ等に残存する肉汁 (ドリップ) による調理器具、サラダ等の非加熱食品への交差汚染が原因ではないかと考えられた。そこでこの原因を検証し、肉汁中の EHEC の汚染状況、あわせて食肉中に存在する食中毒起因菌の汚染状況について調査を行った。これらの成績を基に EHEC 感染症発生を防止する啓発資料とすることを目的にした。

### 【材料及び方法】

1. 期間 平成 22 年 5 月から平成 23 年 8 月に毎月 1 回、市内の食肉販売店で食肉を入手し、その食肉と肉汁、計 380 検体から菌の分離を試みた。
2. 材料 市販の牛由来食肉 190 検体を材料とした。内訳は食肉 53 検体、生食されるユッケ及びタタキ 12 検体、レバー 56 検体の他ミンチ 1 検体、消化管系のいわゆるホルモン部位であるアカセンマイ 15 検体、シマ腸 45 検体、ミノ 8 検体の計 190 検体及びこれらの入っていたトレイ等の容器 190 検体の合計 380 検体から菌の分離を試みた。
3. 方法

#### EHEC の分離

これまでの EHEC 分離手順に従った。即ち、食肉 25g をノボビオシン加 m E C ブイヨン 225ml で増菌培養を行い、免疫磁気ビーズ O157 および O26 で集菌後、CT-SMAC (O157)、CT-RMAC (O26) の分離培地にて培養した。疑わしいコロニーを CLIG 培地 (O157) / TSI 培地 (O26) 及び LIM 培地、シモンズのクエン酸培地 (O26) に釣菌し、生化学的性状検査で 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) 遺伝子の検出を行った。また、O157 および O26 以外の血清型 EHEC の分離には、ノボビオシン加 m E C 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、スクリーニング検査としてコロニー密集部分を掻き取り PCR 法によりベロ毒素 (VT1, VT2) 遺伝子の検出を行った。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、PCR 法により VT1, VT2 遺伝子の有無を検査、VT 陽性菌株を分離した。

VT 陽性株は大腸菌ベロトキシン検出キットを用いてその産生の確認を行った。

パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) による DNA 解析は PFGE New Protocol-Kinki の方法により食肉由来菌株、EHEC 散発事例分離株について実施し、泳動像は Fingerprinting II にて相同性の解析を行った。

分離した菌株の薬剤感受性は Kirby-Bauer 法によりアンピシリン (ABPC)、セフ

オタキシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、シプロフロキサチン (CPFX)、ナリジクス酸 (NA)、ノルフロキサシン (NFLX)、ホスホマイシン (FOM)、ST 合剤 (ST) の 12 薬剤に対して行った。

肉汁についても上記方法に準じて行った。

牛由来食肉から O157 が分離された場合には MPN 法で菌数を測定した。

#### サルモネラ属菌の分離

食肉 25g を EEM 培地 225ml で前増菌培養し、前増菌培養液 1ml をセレナイトシスチン培地 15ml に接種し、選択増菌培養した後、SS 寒天培地に塗抹し、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。

#### カンピロバクターの分離

食肉 25g をプレストンブロス 100ml で微好気性増菌培養し、増菌培養液をバツラー培地に塗抹し、微好気性分離培養した。定型的なコロニーは血液寒天培地を用いて、微好気性培養及び好気性培養を行い発育の有無を確認、微好気性培養のみ発育した菌株について馬尿酸加水分解試験及びナリジクス酸、セファロシン感受性試験を行った。

#### 【結果】

期間中に入手した 380 検体から EHEC 47 菌株、サルモネラ属菌 9 菌株、カンピロバクター 39 菌株を分離した。(表 1、表 2、表 3)

牛由来食肉からは 33 菌株、これらの入っていたトレイ等容器から 14 菌株、計 47 菌株の EHEC を分離した。VT 陽性菌株はシマ腸、アカセンマイ等の消化管系の部位から多く分離され、トレイ等容器に残存する肉汁からも同様に分離された。(表 1)

分離された O157 は MPN 法で菌数の測定を行ったが、いずれの検体も 3.0MPN/g 以下であった。

VT1 陽性の菌株は 13 株、VT2 陽性の菌株は 25 株、VT1,VT2 陽性の菌株は 9 株であった。

分離した O157 菌株 10 株の PFGE 解析では、平成 23 年 7 月入手のレバー 2 検体及びその容器から分離した O157 3 菌株と 23 年 8 月入手のミノ及びその容器から分離した菌株の PFGE パターンはそれぞれ一致したが、これら以外で高い相同性を示した菌株は見られなかった。(図 1) また、9 月のシマ腸分離菌株と 10 月下旬の無症状病原体保有者及びその家族からの分離株とパターンが一致したが保健所の疫学調査結果では両者の因果関係は認められなかった。他の散発 EHEC 感染症患者分離株と食肉分離株との間で高い相同性を示すものは見受けられなかった。(図 2)

複数株の EHEC を分離したのはレバー 2 検体、シマ腸 3 検体の計 5 検体であった。

薬剤感受性試験では 12 薬剤すべてに感受性であったのは 47 菌株中 28 菌株で他の 19 菌株は薬剤耐性を示した。薬剤耐性パターンは 6 パターンに分類され、その中で 4 剤耐性株は O103 で ABPC、KM、SM、ST に耐性を示した。FOM 耐性株は認められなかった。

サルモネラ属菌は 8 検体から 9 菌株を分離した。分離した血清型は表 2 に示す。分離部位はアカセンマイから 6 菌株、シマ腸から 3 菌株で、いずれも消化管からの分離であった。

カンピロバクターの分離は 39 検体であった。血清型はすべて *C.jejuni* であった。(表 3) 分離部位はレバー 4 菌株、アカセンマイ 13 菌株、シマ腸 19 菌株、小腸 1 菌株、ハラミ 2 菌株で、消化管からの分離が多かった。

アカセンマイ 5 検体、シマ腸 1 検体の計 6 検体からサルモネラ属菌及びカンピロバクターを同時に検出した。

EHEC とカンピロバクターの同時検出はアカセンマイ 3 検体、シマ腸 8 検体の計 11 検体であった。

また、1 検体のアカセンマイからは EHEC (O103)、サルモネラ属菌 (*S.Meleagridis*)、カンピロバクター (*C.jejuni*) の 3 菌種を同時に検出した。

#### 【考察】

市販の牛由来食肉の調査の結果 EHEC、サルモネラ属菌、カンピロバクターは食肉よりもレバーや消化管系の部位から多く分離された。また、トレイやそれに付着していたドリップからも EHEC が検出された。食品を介する EHEC を始めとした食中毒予防は生食肉の喫食を避けるということに主眼が置かれている。今回の我々の調査結果から食肉が EHEC 等の細菌に汚染されていた場合それが接触していたトレイ等の容器からも菌が検出されることが判明された。

食肉を生食せずに EHEC 感染症を発症する小児は保護者の使用した箸や食肉が接触していた野菜類を不十分な加熱状態で食べることにより感染する経路が報告されている。また、平成 23 年 9 月 12 日付けで厚生労働省は 10 月 1 日より牛由来牛肉について EHEC 感染症や食中毒防止のために生食用食肉の規格基準を定め、加熱殺菌後に飲食に供することを義務付けし、生食肉喫食による感染を防止するように通達した。

今回の成績はこれまでの EHEC 感染経路は食肉の取り扱いや食肉の入っていたトレイや容器類、ドリップから他の調理器具や食肉と接触している野菜等へ二次汚染する感染経路の存在を示した。消費者に対しては、食肉調理時の衛生的な取り扱いや調理器具の使い分け、とりわけ食肉から野菜類への二次汚染防止の注意喚起がさらに必要であると考えられた。

サルモネラ属菌とカンピロバクターが同時に検出された検体もあり消化管系の食肉の取り扱いについては EHEC のみならずこれらの菌にも十分な注意喚起が必要である。

共同研究者 横田 正春\*<sup>1</sup>、沼田 富三\*<sup>1</sup>、下迫 純子\*<sup>1</sup>、大中 隆史\*<sup>1</sup>、山内 昌弘\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>堺市衛生研究所 \*<sup>2</sup>堺市衛生研究所 退職

最後に今回の調査を実施するにあたり助成を頂いた財団法人大同生命厚生事業団、堺市衛生研究所所長 田中 智之に厚くお礼申し上げます。

#### 【経費使途明細】

|               |         |
|---------------|---------|
| 食肉購入費         | 98,996  |
| EHEC 検査用試薬、培地 | 75,080  |
| サルモネラ検査用培地    | 20,720  |
| カンピロバクター検査用培地 | 39,000  |
| VT スクリーニング用試薬 | 60,000  |
| PFGE 用試薬      | 35,500  |
| 計             | 329,296 |

表 1

| 部位<br>血清型 | レバー<br>56 検<br>体 | レバー<br>容器<br>56 検体 | 消化管<br>68 検体 | 消化管<br>容器<br>68 検体 | 肉<br>54 検体 | 肉<br>容器<br>54 検体 | ユッケ<br>及び<br>タタキ<br>12 検体 | ユッケ<br>及び<br>タタキ<br>容器<br>12 検体 | 計  |
|-----------|------------------|--------------------|--------------|--------------------|------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|----|
| O157      | 2                | 1                  | 5            | 1                  | 1          |                  |                           |                                 | 10 |
| O26       |                  |                    | 1            | 1                  |            |                  |                           |                                 | 2  |
| O1        | 1                | 1                  |              |                    |            |                  |                           |                                 | 2  |
| O8        | 1                |                    |              |                    |            |                  |                           |                                 | 1  |
| O55       |                  |                    | 1            |                    |            |                  |                           |                                 | 1  |
| O74       |                  |                    | 1            |                    |            |                  |                           |                                 | 1  |
| O103      |                  |                    | 1            |                    |            |                  |                           |                                 | 1  |
| O119      | 1                |                    | 1            |                    |            |                  |                           |                                 | 2  |
| O152      |                  |                    | 1            |                    |            |                  |                           |                                 | 1  |
| UT        | 5                | 3                  | 9            | 7                  | 2          |                  |                           |                                 | 26 |
| 計         | 10               | 5                  | 20           | 9                  | 3          | 0                |                           |                                 | 47 |

表 2

|         | 血清型                   | 消化管 |
|---------|-----------------------|-----|
| O3,10 群 | <i>S. Meleagridis</i> | 2   |
|         | <i>S. Muenster</i>    | 1   |
| O4 群    | <i>S. Reading</i>     | 2   |
| O7 群    | <i>S. Montevideo</i>  | 1   |
| O8 群    | <i>S. Kentucky</i>    | 1   |
| O9 群    | 型別不能                  | 1   |
| O18 群   | <i>S. Cerro</i>       | 1   |
| 計       |                       | 9   |

表 3

|                 | レバー | 消化管 | 肉 | 計  |
|-----------------|-----|-----|---|----|
| <i>C.jejuni</i> | 4   | 33  | 2 | 39 |

図 1

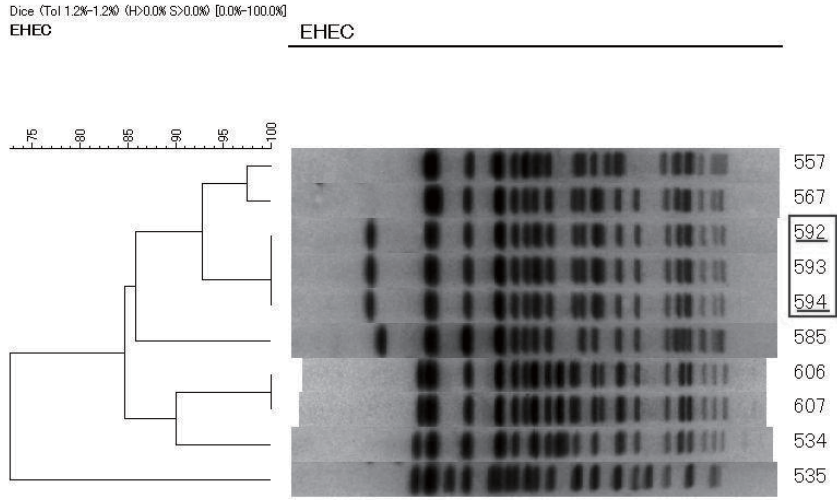


図 2

