

2. 生食用鯨肉の微生物学的危害分析

一人の消化管感染症との関係に関する研究

○清水俊一（北海道立衛生研究所感染症部細菌グループ）

久保亜希子（北海道立衛生研究所感染症部細菌グループ）

1 目的

海棲哺乳類である鯨は、古来我が国では、食料や工芸品の原材料として沿岸の村落を潤してきた。近代になると南氷洋における商業捕鯨がはじまり、太平洋戦争後の食糧不足から、鯨肉が市場で販売され、学校給食にも使用される食材であった。1980年代の捕鯨モラトリアムにより、商業捕鯨は禁止され、現在、調査捕鯨が続けられている。

鯨肉は日本人の食習慣から魚介類として魚屋で取り扱われている¹⁾。小売店舗では、主として刺身などの生食用鯨肉が販売されている。遠洋捕鯨では、調査船の中で微生物汚染の検査が行われている²⁾が、市場に並ぶ鯨肉の衛生状態の評価は、近年行われていない³⁾。

平成22年9月21日、宮城県石巻市で鯨肉による食中毒が発生した。摂食者815名、患者数153名を記録したが、その原因は不明で終わった⁴⁾。北海道においては、昭和63年、漂流鯨を解体販売し、サルモネラ・エンテリティディス食中毒で479名の患者が発生したことが記録に残っている⁵⁾。そのほか、古いデータであるが、世界でも鯨を介した細菌感染が報告されている⁶⁻⁷⁾。

国内で流通する鯨肉は遠洋捕鯨由来と沿岸捕鯨由来の二種に大別されるが、北海道では、季節によるものの沿岸捕鯨ならびに遠洋捕鯨由来の鯨肉が販売されており、これらの鯨肉は高級食材として生食が好まれている。

店頭で市販される、遠洋捕鯨ならびに沿岸捕鯨の鯨肉について、複数の病原菌等を検査し鯨肉における病原細菌による危害の解析を試みた。バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)について北海道内において感染症として分離された菌株とパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)を用いて比較し由来を検討した。

2 材料および方法

【試料】平成23年10月～平成24年6月までの間、北海道内5箇所、13店舗の店頭で販売される鯨肉19検体(遠洋捕鯨7検体、沿岸捕鯨12検体)について調査を実施した。対象とした細菌は、志賀毒素産生性大腸菌(STEC)、大腸菌(EC)、サルモネラ属菌、リステリア属菌、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)とし、汚染指標として一般生菌数も測定した。また、沿岸捕鯨の12検体についてはカンピロバクター属菌も併せて検査した。

【菌の分離同定法】

志賀毒素産生性大腸菌: 試料25gにノボピオシン加mEC培地225mLを加え、ストマッキングしたあと42℃で24時間培養した。培養液100μLを10mLノボピオシン加mEC培地に添加し、さらに42℃で24時間培養した。二次培養液をCHROMagar O157TAM培地ならびにTricolor培地に画線塗抹し、37℃で24時間好気培養を行った。二次培養液100μLからDNAを抽出し、PCR法で*stx*, *stx2f*, *eae*, *astA* 遺伝子の検出を試みた⁸⁻¹⁰⁾。

大腸菌: 上記志賀毒素産生性大腸菌検査時のTricolor培地上に形成された、ECを疑うコロニーについて生化学性状を用いて同定、検出した。

サルモネラ属菌: 試料 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、ストマッキングしたあと 37°C で 24 時間培養した。培養液を DIASALM 培地に 100 μ L 移し、42°C で 24 時間培養した。疑わしい試料について、DIASALM 培地から CHROMagar Salmonella 培地に画線塗抹し、37°C で 24 時間好気培養した。

リステリア属菌: 試料 25g に Half strengthened FRASER 培地 225mL を加え、ストマッキングしたあと 30°C で 24 時間培養した。培養液 100 μ L を FRASER 培地 10mL に移し、30°C で 24 時間培養した。二次増菌液を CHROMagar Listeria 培地ならびに ALOA 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 24 時間培養した。疑わしいコロニーは、次の生化学性状を用いて同定した。すなわち、溶血性、25°C ならびに 37°C における発育、インドール試験、VP 試験、糖等からの酸産生(ラムノース、キシロース、マンニトール、 α -メチル-D-マンノシド)、CAMP 試験であった。

カンピロバクター属菌: 試料 25g に Preston 培地 225mL を加えストマッキングしたあと、嫌気ジャーを用いて 42°C で 24 時間微好気培養した。培養液を mCCDA 培地に画線塗抹し、嫌気ジャーを用いて 42°C で 24 時間微好気培養した。

バンコマイシン耐性腸球菌: 試料 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、ストマッキングしたあと 37°C で 24 時間培養した。500 μ L の培養液を 4 μ g/mL 濃度にバンコマイシン(VCM)を添加した Enterococcosel broth に加え、37°C で 24 時間培養した。培養液を CHROMCULT enterococci 培地ならびに 6 μ g/mL 濃度に VCM を添加した Bile Esculin 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 24 時間好気培養した。培養液 100 μ L から DNA を抽出し、PCR 法で *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2,3* 遺伝子の検出を試みた¹¹⁾。疑わしいコロニーについて、培養液からの PCR で検出した VCM 耐性遺伝子について colony PCR を実施し、VRE を特定した。菌同定は、次の生化学性状に依った。すなわち、10°C ならびに 45°C 発育、溶血性、40%胆汁酸抵抗性、塩分耐性、アルギニンジヒドメレーション試験、ピルビン酸利用、有機化合物からの酸産生(マンニトール、ソルビトール、ソルボース、イヌリン、可溶性デンプン)であった。

一般生菌数: 試料 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、ストマッキングした試料溶液を元に、maximum recovery solution で 10 倍段階希釈を行い、その 1mL を Total Plate Count agar で混釈固化し、37°C で 48 時間培養した。プレートの菌数を測定し、もっとも適切な希釈の菌数に希釈倍率を掛けて、試料 1g 当たりの生菌数(cfu/g)を換算した。

【増菌菌液からの DNA 抽出】 アルカリ抽出法を用いた。すなわち、増菌菌液 100 μ L を採取し、12000rpm で 2 分間遠心し、上清をマイクロピペットで除いた。アルカリ液 100 μ L (2N NaOH 2.5 μ L+滅菌精製水 97.5 μ L)を加えて vortex し、100°C で 10 分間インキュベートした。50 μ L を別のチューブに採り、8 μ L の 1M Tris (pH7.0)を加え vortex した。その後、12000rpm で 2 分間遠心し、上清を DNA 鋳型とした。

【PFGE】 VRE の PFGE に用いるプラグは Turabelidze *et al*¹²⁾に従い作成した。制限酵素は *Apa* I および *Sma* I を用いた。泳動は 1%GTG Gold アガロースゲルを担体とし、0.5 \times TBE (Tris-Borate-EDTA)緩衝液下にて、電圧 6V/cm、液温 14°C で行った。スイッチタイム FIRST 3.5-35 秒 12 時間で、SECOND 1-5 秒 8 時間とした。泳動後、ゲルを臭化エチジウム(1 μ g/mL)で染色した。UV 照射下で泳動像を PHOTODYNE にて観察した。

3 結 果

市販鯨肉 19 検体から、志賀毒素産生性大腸菌ならびにサルモネラ属菌は検出されなかった。沿岸捕鯨由来 12 検体からカンピロバクター属菌は検出されなかった。大腸菌は 19 検体中 1 検体

(沿岸捕鯨分)から検出された。人に病原性を示す *Listeria monocytogenes* は検出されなかったが、*L. innocua* は 13 検体から検出された。VRE は 13 検体から検出されたが、*vanA* ならびに *vanB* 遺伝子保有 VRE は検出されず、すべて *vanC2,3* 遺伝子保有 VRE であった。また、1 検体は *vanC2,3* 遺伝子保有 VRE に加えて *vanC1* 遺伝子陽性 VRE が検出された(沿岸捕鯨分)。一般生菌数は 8.7×10^2 cfu/g - 8.4×10^6 cfu/g の範囲にあった。なお、中央値は 3.9×10^3 cfu/g であった(表 1)。*vanC1* gene 陽性の VRE 1 株について、北海道内で患者から確認された菌株 2 株と比較した。*Apa I* 消化後の PFGE では、3 株は固有の泳動像を示し、由来が同一と考えられるものはなかった(図 1)。

4 考 察

食品衛生法第 11 条に基づく食品の規格基準¹⁾では、鯨肉は微生物の基準が示されていない。生食用冷凍鯨肉は生食用冷凍鮮魚介類の規格を適用するため微生物の基準がある。市販される刺身用鯨肉は、特に遠洋捕鯨のものは冷凍されているものの、店頭ではすでに解凍されているため、鯨肉の規格基準適応となる。今回の結果を、仮に生食用冷凍鯨肉に適用して検討すると、大腸菌群については検査していないが、大腸菌が 1 検体検出されている(W967)ことから、少なくとも 1 検体以上は大腸菌群が陽性である可能性がある。また、生菌数で 1g 当たり 10 万以上の 3 検体(W970, W976, W984)は規格基準から逸脱していることになる。これらのことから、市販鯨肉一部には、生食用として望ましくないものがあるという認識を持つことが肝要である。

今回、志賀毒素産生性大腸菌、サルモネラ及び沿岸捕鯨検体からカンピロバクターは検出されなかった。斃死鯨を食用に回したとはいえ、過去には鯨肉によるサルモネラ食中毒事例が発生している⁵⁾ことから、病原菌の混入には充分注意して、消費までの経路で食品衛生の一層の向上を図る必要がある。

欧米では食品由来感染症として取り扱われる *Listeria monocytogenes*(Lm)¹³⁾は、今回検出されなかった。一方、人に病原性を示さない *L. innocua* が 13 検体(68.4%)検出されており、Lm の混入があれば容易に増殖し、人に影響を及ぼす可能性にあることを示している。今回の対象ではないが、鯨肉から Lm が検出されたことがあり、刺身など生食をすると感染する虞があるため、一層の衛生対策が必要である。

VRE は、院内感染対策上重要な菌種である。VanA, VanB-type の VRE が注目され、また入院患者から VanA, VanB-type の VRE が検出されている。しかし、VanC-type の VRE も菌血症を発症させることが確認され¹⁴⁾、併せて制御の対象とする必要性がある。

今回、沿岸捕鯨の 1 検体から *vanC1* 遺伝子保有 VRE が検出され、これと近年北海道において検出された *vanC1* 遺伝子保有 VRE 株と PFGE 解析を行った。全く異なるバンドパターンを示したことから、異なる起源であることが推測されるが、今後も調査を続けて、人と食品や環境との間で微生物の動態を解明することが重要と考えられる。一方、*vanC2,3* 遺伝子保有 VRE は 13 検体から検出され、これらも PFGE 像の観察を行った。複数の菌株が同一の泳動像を示し、これらは由来が同様と考えられた(データは示さない)。しかし、検体の購入先が数キロ以上離れているため、同一の PFGE 像を示す *vanC2,3* 遺伝子保有 VRE が検出された鯨肉は、販売店の店頭に並ぶ以前に汚染を受けていたものと考えられた。

5 文 献

- 1) 食品衛生法, 昭和 22 年 12 月 24 日, 法律第 233 号
- 2) 共同船舶株式会社: <http://www.whaling.jp/press/pr20110513.pdf>

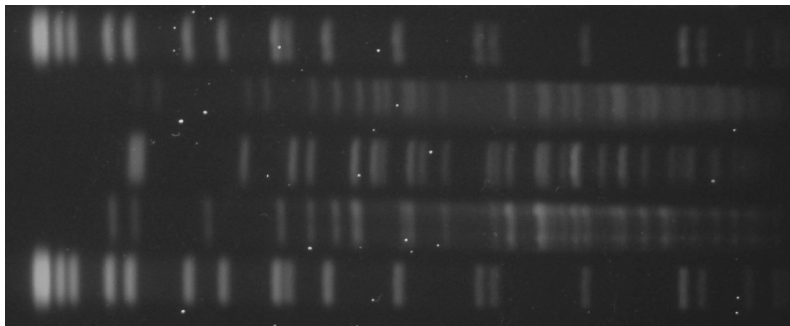
- 3) Robinson RHM, Pugh AM, Selbie FR: J. Hyg., 47(3), 236-243 (1949)
- 4) 宮城県, <http://www.pref.miyagi.jp/shoku-k/syokuhin/chuudoku/SOKUHOU2/TEMP02.HTM>
- 5) 相川孝史:病原微生物検出情報, 9(8), 102 (1988)
- 6) Bender TR, Jones TS, DeWitt WE, Kaplan GJ, Saslow AR, Nevius SE, Clark PS, Gangarosa EJ: Am. J. Epidemiol., 96(2), 153-160 (1972)
- 7) McLaughlin JB, Sobel J, Lynn T, Funk E, Middaugh JP: Emerg. Infect. Dis., 10(9), 1685-1687 (2004)
- 8) Yamasaki S, Lin Z, Shirai H, Terai A, Oku Y, Ito H, Ohmura M, Karasawa T, Tsukamoto T, Kurazono H, Takeda Y: Microbiol. Immuno., 40(5), 345-352 (1996)
- 9) Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H: Applied Environ. Microbiol., 66(3), 1205-1208 (2000)
- 10) 小林一寛 瀬戸和子, 八柳 潤, 齋藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎 貢, 林 賢一, 松根 渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田 亨, 伊藤健一郎: 感染症学雑誌, 76(11), 911-920 (2002)
- 11) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P : J. Clinical Microbiol., **33**(1), 24-27 (1995)
- 12) Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris Jr. JG, Sulakvelidze A: J. Clinical Microbiol., **38**(11), 4242-4245 (2000)
- 13) Farber JM, Peterkin PI: Microbiol. Reviews, SEPT, 476-551 (1991)
- 14) Koganemaru H, Hitomi S: J. Infect. Chemother., 14(6), 413-417 (2008)

経費使途明細

	項目	金額(円)
収入の部	大同生命厚生事業団から	300,000
支出の部	需用費	300,000
	シャーレ	(16,000)
	培地	(25,000)
	試薬	(26,000)
	試薬キット	(175,000)
	薬剤感受性試験	(58,000)
	役務費	0
	通信費	0
	旅費	0
	事務費	0
	雑費	0
	計	300,000

図1 vanC1 遺伝子保有バンコムマイシン耐性腸球菌の PFGE 像

M 1 2 3 M



M: サイズマーカークー
 1 北海道内病院人分離例 1
 2 北海道内病院人分離例 2
 3 W332 ミクダグジラ

表1 鯨肉の細菌検査結果

番号	栽培	種類	大腸菌	STEC	サルモネラ	Listeria		VRE	Campy	TPC cfu/g	
						Lm	sp				
W967	沿岸	ミンク	+	-	-	-	innocua	-	-	3.4 × 10 ³	1
W968	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	-	-	2.7 × 10 ³	2
W969	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	3.9 × 10 ³	3
W970	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	1.7 × 10 ⁵	4
W971	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	1.1 × 10 ⁴	5
W972	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	1.4 × 10 ⁴	6
W975	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	1.9 × 10 ³	7
W976	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C1, C2,3	-	4.8 × 10 ⁵	8
W977	沿岸	ミンク	-	-	-	-	-	C2,3	-	1.6 × 10 ⁴	9
W978	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	1.1 × 10 ³	10
W979	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	9.4 × 10 ⁴	11
W980	沿岸	ミンク	-	-	-	-	innocua	C2,3	-	3.5 × 10 ³	12
W966	遠洋	不明	-	-	-	-	-	-	NT	3.6 × 10 ³	1
W973	遠洋	不明	-	-	-	-	-	C2,3	NT	7.9 × 10 ³	2
W974	遠洋	不明	-	-	-	-	-	-	NT	1.7 × 10 ³	3
W982	遠洋	イワシ	-	-	-	-	-	-	NT	3.0 × 10 ³	4
W983	遠洋	不明	-	-	-	-	-	C2,3	NT	4.0 × 10 ³	5
W984	遠洋	イワシ	-	-	-	-	-	-	NT	8.4 × 10 ⁶	6
W998	遠洋	イワシ	-	-	-	-	innocua	C2,3	NT	1.0 × 10 ³	7

STEC: 志賀毒素産生性大腸菌 Lm: *Listeria monocytogenes* sp: Lm 以外のリステリア属菌

innocua: *Listeria innocua* を検出 VRE: バンコムマイシン耐性腸球菌 C1: vanC1 遺伝子陽性 VRE 検出

C2,3: vanC2,3 遺伝子陽性 VRE 検出 Campy: カンピロバクター属菌 NT: 検査を実施せず TPC: 生菌数