

11. 牛胆嚢内胆汁から分離される大腸菌の病原性解析調査

○亀山 芳彦 （岐阜県保健環境研究所）

梶本 真希 （岐阜県中央食肉衛生検査所）

【研究目的】

牛胆嚢内胆汁（以下胆汁）には病原性細菌であるカンピロバクター属が高い菌量で存在することが報告¹⁾されている。大腸菌の分離については、カンピロバクターに比して検出率が低いもののいくつかの報告^{2) 3)}がなされている。また同一個体から検出された複数の大腸菌が同じ血清型であったとの報告⁴⁾があり、生体の胆嚢内で選択的に増殖している可能性が示唆されている。本研究では、胆汁から分離される大腸菌の危害を分離率、病原性を中心に解析し、と畜検査時の胆汁の取扱いに注意を促す目的で実施した。

【研究の必要性】

大腸菌には志賀毒素産生遺伝子（*stx*）の他、公衆衛生上問題とされるいくつかの病原遺伝子が知られている。しかし、多くのと畜場の衛生管理では、*stx* 以外の病原遺伝子を持つ大腸菌の危害は重要視されておらず、胆汁から検出された大腸菌について、*stx* 以外についてはほとんど検討がなされていない。

牛の胆汁は内容量が多いため、病原遺伝子を保有する大腸菌が存在すれば相当の菌量となり、と畜検査時に枝肉の他、肝臓・心臓（いわゆる赤物）を汚染する可能性がある。また、廃棄される胆嚢（胆汁）の危害について解析が不十分なため、適切な廃棄を行わず場内環境への汚染対策への対応がなされていないと畜場は少なくないと推察される。

本研究では、農家別の胆汁からの大腸菌分離率の検討に加え、血清型、病原遺伝子等の検索を実施し、その公衆衛生上のリスクを検討し、と畜の衛生管理への情報還元を試みた。

【研究計画】

1. 胆汁の採材

平成 30 年 11 月～翌年 5 月まで、県内と畜場 1 ヶ所に搬入された肉用牛（和種、交雑種）148 頭を対象に胆汁の採材を実施した。と畜検査で肝臓、胆嚢に明らかな病変が認められなかった個体の胆嚢表面をアルコール綿で消毒した後、滅菌済注射器で 15 mL 程度無菌的に採取した。採材後は 10℃以下の保冷状態で、速やかに検査に供した。

2. 大腸菌の分離

胆汁 5 mL を滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、 10^{-3} 希釈液を作製し、試料原液と

した。試料原液 100 μ L をクロモアガーオリエンタシオン培地（以下 CHO 培地、関東化学）に塗抹した。ピンク色を呈した大腸菌の典型的コロニーが確認された場合は、10 コロニーを釣菌し、トリプトソイ寒天培地（栄研化学）に画線塗抹した。菌量が多く単一コロニーが釣菌できない場合は、適宜希釈を追加し同様に処理した。純培養後、api20E（バイオメリュー）により大腸菌の同定を行った。

3. 大腸菌の解析

1) 血清型別

分離された大腸菌は、病原大腸菌免疫血清セット（デンカ生研）、Og・Hg-typing PCR プライマーセット（宮崎大学より有償分与）により、血清型の決定を行った。

2) 病原遺伝子の検出

純培養したコロニーからアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、病原遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法⁵⁾を実施した。プライマーセットは multi1(*stx1*, *stx2*, *eae*, *ipaH*)と multi2 (*lt*, *st*, *aggR*, *astA* 検出用) の組み合わせにより実施した。

3) ESBL(extended-spectrum β -lactamase、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ)の検索

検体希釈液を 4 μ g/mL セフトキシム加 CHO 培地に画線塗抹し、発育の有無を確認した。

4) 株の同一性の確認

同一検体から分離された大腸菌の同一性を確認するために、一部の血清型について 1 検体 5 株を PCR-based ORF typing 法（以下 POT 法、シカジーニアス分子疫学分析 POT キット；関東化学）で解析した。

4. 出荷農家別の大腸菌分離率および血清型の比較検討

農家別の大腸菌の分離率、分離された血清型については、平成 29～30 年に同じと畜場で当所が実施した調査⁶⁾（以下前回調査）と合わせて比較を行った。

【結果】

1. 分離された大腸菌の解析

148 検体中 13 検体 (8.8%) から大腸菌が分離された。同一検体から分離した 10 株は、すべての検体で血清型が一致した (型別不能株 OUT ; OgUT、HUT) を含む (表 1)。

表1 分離された大腸菌の血清型

検体No.	O血清群	Og-typing	H血清群	Hg-typing	病原遺伝子
9	OUT	Og174	H7	Hg7	NA*
15	08	Og8	H7	Hg7	NA
20	OUT	Og139	H19	Hg19	NA
27	OUT	Og40	H51	Hg51	NA
39	OUT	OgGp15	HUT	Hg37	astA
49	0148	Og148	HUT	Hg8	NA
56	029	Og29	H34	Hg34	NA
69	OUT	OgUT	HUT	Hg8	NA
74	OUT	Og8+OgGp15	H39	Hg39	NA
85	OUT	Og93	HUT	Hg29	NA
90	086a	Og86	H7	Hg7	NA
107	OUT	Og102	H7	Hg7	NA
134	OUT	Og79	H2	Hg2	NA

* 不検出

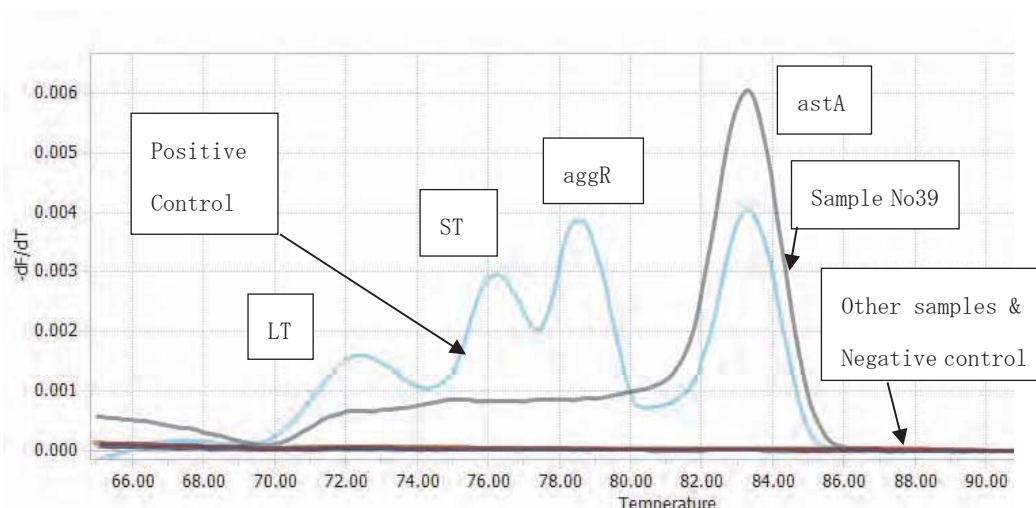


図1 病原遺伝子の検出（リアルタイムPCR）の結果（multi2）

病原遺伝子は1株から *astA* が検出された（図1、multi1は全株不検出のため省略）。

ESBL の検索では、すべての検体で大腸菌の発育は認められず検出されなかった。

同一検体より分離された大腸菌5株の POT 法の解析は、No. 39 OUT (OgGp15)、No. 69 OUT (OgUT)、No. 74 OUT (Og8+OgGp15) について行った（図2）。

Reaction mixture 1 の泳動パターンは同一検体に由来する5株は一致した。

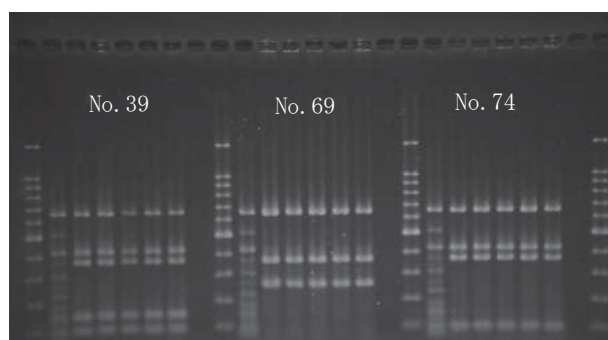


図2 POT 法による解析

（Reaction mixture 2はPCバンド；大腸菌判定領域以外のバンドが無いため省略）。

2. 大腸菌の分離率

1) 出荷農家別、品種別の分離率

計11農家から採材し、4農家の胆汁から大腸菌が分離された（表2）。

品種別では和種33検体中3検体（9.0%）、交雑種115検体中10検体（8.7%）で分離された。最も分離率の高かった農家では35検体中5検体（14.3%）であった。

表2 胆汁からの大腸菌分離状況 分離された検体数/供試検体数

農家名	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	計
和 種		0/1	0/1	0/1	0/3	2/18		1/8		0/1		3/33
交雑種	0/19						5/40	0/5	5/35		0/16	10/115
交雑種（前回調査）	4/15						1/21	1/5	2/41			8/82
計	4/34	0/1	0/1	0/1	0/3	2/18	6/61	2/18	7/76	0/1	0/16	21/230

前回調査分を合わせると交雑種では 197 検体中 19 検体（9.6%）となり、最も分離率の高い農家では 76 検体中 8 検体（10.5%）であった。全体では 230 検体中 22 検体（9.6%）であった。

2) 分離された大腸菌の血清型の農家別の比較

分離された大腸菌の O 血清群を、前回調査分と合わせ農家別にまとめた（表 3）。特定の農家に共通する血清型は無く、OUT (Og174) が 1 株ずつ、異なる農家で分離された他は、O 血清群に共通性はみられなかった。

表3 分離された大腸菌の O 血清群（農家別）

農家名	分離された大腸菌の O 血清群	（前回調査）
A	—	OUT (OgUT)、OUT (Og116)、OUT (OgGp2)、OUT (OgUT)
F	OUT (Og174)、08 (Og8)	調査対象外
G	OUT (Og139)、OUT (Og40)、OUT (OgUT)、OUT (Og9+OgGp15)	015 (Og15)
I	OUT (Og29)、OUT (Og93)、OUT (Og86)、OUT (Og79)	OUT (OgUT)、OgUT (Og174)、OUT (OgUT)

【考察と今後の課題】

牛の胆汁は、腸内容物と同様に従来から枝肉の汚染物質の一つとして取り扱われてきた。平成 23 年度に実施された肝臓の生食規制に係る調査では、肝臓外部および内部の腸管出血性大腸菌（EHEC）の汚染源の一つとして注目された経緯がある。この際、カンピロバクター属菌と同様に、大腸菌が胆汁内で増殖する可能性が示唆された²⁾。

と畜検査では、検査を受けた胃腸（いわゆる白物）は通常、別フロア（階下）の内臓処理室に送られ、以降の処理工程は他の部位と明確に区分される。一方、胆嚢は専用の排出経路を設けている施設を除き、肝臓、心臓（いわゆる赤物）の検査場所と同じレベルで専用容器などに廃棄され一定時間保管される。このため他の部位への汚染源となる可能性は高くなる。また、液体であるため容器からの漏出等により、場内および周辺的环境を汚染する可能性は否定できない。本調査で分離された大腸菌は、*astA* 保有が 1 株、前回調査⁶⁾では *astA* 保有 2 株、*st* 保有 1 株が分離されている。これらが直接、枝肉などを汚染する可能性がある他、排水溝など環境中に定着した場合、病原遺伝子の保有源として、他の細菌への影響も危惧される。

また、胆汁中に増殖している大腸菌は選択的に増殖しており、菌量も $>10^6$ CFU/ml と十分にあることが確認された。このことから前回調査で確認された事例（同一検体から 2 血清型が分離、菌量 2.0×10^2 CFU/ml、非提示）は、と殺後の生体内での混入または採材時の汚染と推定された。胆汁の総量を考慮すると、大量の「大腸菌の増菌培養液」を取り扱っていることと等しく、その取り扱いには慎重さが求められる。

大腸菌の分離率は肉用牛（和種、交雑種）で 10 %前後となり、農家別の分離率、分離

される血清型、遺伝子型に一定の傾向はみられなかった。このため分離される菌は特定の飼育環境、血清型や病原遺伝子によらないことが示唆された。大腸菌が偶発的に胆汁に迷入し増殖するとすれば、EHEC の検出率の高い農家では、胆汁中から分離される可能性も高くなると推察される。今後の課題として EHEC 検出率の高い出荷農家の経時的な調査が必要となる。また、短期間に肥育するため飼養条件が異なる乳用牛の去勢等についても積極的に調査を行い、危害の詳細な分析を継続したい。引き続き、と畜の現場での胆汁の衛生的な取扱いの必要性について、明確な根拠を提示していきたい。

【参考文献】

- 1) 小野一晃；牛胆嚢内胆汁のカンピロバクター汚染状況と分離株菌の性状、日獣会誌、66、713－717
- 2) 平成 24 年 2 月 24 日薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産物食品部会資料 2、3
- 3) 松本紀子ら；牛の胆汁及び肝臓中から分離されたカンピロバクター並びに志賀毒素産生大腸菌の血清型について、高知衛研報、53、37－40、2007
- 4) 加藤和子ら；. 浜松市と畜場に搬入された牛の胆嚢内胆汁の細菌汚染状況、浜松市食肉衛生検査所平成 28 年度事業概要
- 5) 池田徹也ら；第 36 回日本食品微生物学会学術総会 P-12、2015
- 6) Food Pathogen Enrichment 培地を用いたと畜場での stx 遺伝子の迅速検査法と牛胆汁中の大腸菌病原遺伝子の検索、岐阜県保健環境研究所報第 26 号、2018

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費（大腸菌 O 血清群判別用マルチプレックス PCR セット）	48,600 円
消耗品費（大腸菌 H 血清群判別用マルチプレックス PCR セット）	32,400 円
消耗品費（注射筒、注射針、アルコール綿、消毒用アルコール）	12,549 円
消耗品費（クロモアガーオリエンタシオン培地、POT 法キット）	50,598 円
消耗品費（api20E）	40,824 円
消耗品費（マイクロバンク、遠沈管、滅菌綿棒）	96,033 円
消耗品費（アイソレーションガウン、滅菌バック）	18,996 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円