

1.と畜場搬入牛における農場別腸管出血性大腸菌 O157・O26・O111 保有状況調査と分離株の性状

豊橋市食肉衛生検査所 ○森本賢治 高木慎介 本多弥生 松本 圭
山口貴宏 山内俊平 細井美博

はじめに

わが国で 1998～2011 年に発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)による食中毒事例のなかで、原因食品が明らかな食品群のうち肉類及びその加工品の占める割合が最も高く、その多くが牛肉関連食品である。その理由として牛は EHEC の保菌動物となっていることがあげられる。そのためフードチェーンの上流でもあると畜場での解体時の食肉への汚染防止は重要な課題である。従前からと畜場搬入牛の EHEC 保有状況に関する報告は多く、このことは、と畜場における衛生管理強化への意識付けとはなるが、汚染源としての牛群そのもののリスク評価には結びつきにくい。当所では農場や時季別の EHEC 保菌状況を把握することが高リスク牛群を判断する上で重要と考え、2011 年 4 月～2012 年 3 月(一次調査)と 2012 年 6 月～10 月(二次調査)に EHEC の農場別保有状況を調査するとともに、分離株の性状等について若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

管内と畜場に搬入された肥育牛について、一次調査(2011 年 4 月～2012 年 3 月)ではと畜処理頭数実績上位 10 農場を、二次調査(2012 年 6 月～10 月)では同実績上位 20 農場を対象とし、毎月各農場 2～5 頭採材した。ただし、二次調査において 1 農場で 8、9 月の搬入がなかったため、採材できなかった。

1 EHEC の分離同定

- (1) 分離方法：一次調査では、直腸内容物 1g をノボビオン加 mEC 培地で 42℃24 時間増菌培養後、分離培地に画線塗抹し、37℃24 時間培養した。分離培地として、O157 は CT-SMAC、CHROMagar O157、O26 は CT-RMAC、CT-ViRX O26、O111 は CT-SBMAC、CHROMagar STEC を用いた。二次調査では直腸内容物を分離培地に滅菌ガラス棒を用いて直接塗抹し、37℃24 時間培養した。分離培地には O157 は CT-SMAC、O26 は CT-RMAC、O111 は CT-SBMAC を、各血清型に共通の培地とし

て、CHROMagar STEC を用いた。

- (2) 同定方法：EHEC を疑うコロニーについて病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型を確認し、TSI 培地、LIM 培地、CLIG 培地、シモンズ・クエン酸培地に接種し、37°C24 時間培養後、生化学性状を確認した。分離した O157、O26、O111 について、デュオパス・ベロトキシン (Merck) により VT の産生を確認したものを EHEC 陽性とした。
- 2 薬剤感受性試験:分離された EHEC について、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、アモキシシリン・クラブラン酸(AMPC/CVA)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ST 合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPLX)、ノルフロキサシン(NFLX)の 14 薬剤について、センシディスク(日本 BD)を用いた K-B 法で薬剤感受性試験を行った。方法はセンシディスクの付属説明書に従った。中間を示したものについては耐性に含めた。
- 3 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法：分離された EHEC について PFGE 法により遺伝子型別を確認した。制限酵素に *Xba* I を用い、泳動後 SYBR-Green で染色、紫外線撮影を行い、遺伝子解析ソフト(FP Quest)を用いてバンドパターンを比較した。

成績

1 次及び 2 次調査の結果、20 農場 1085 頭のうち、10 農場(50%)の 24 頭(2.2%)から EHEC 24 株 (いずれも血清型 O157) が分離され、農場毎の保有率は 1.2% (1 頭/85 頭) ~7.1% (6 頭/85 頭) であった(表 1、表 2)。

時季別では、6 月~10 月は 19 株/735 頭 (2.6%)、それ以外の月では 5 株/350 頭 (1.4%) であった。VT 型では VT1 のみが 4 株、VT2 のみが 11 株、両型を持つものが 9 株であった。薬剤感受性試験では、24 株中 15 株 (62.5%) が調査した全ての薬剤に感受性を示した。耐性を示した 9 株の内訳は、SM が 9 株、ABPC が 3 株、TC が 2 株、ST 及び CP が各々 1 株であった (表 3)。

PFGE では、No.5 と No.13 の 2 株、No.6 と No.7 の 2 株、No.22~24 の 3 株で各々のバンドパターンが一致した。なお、No.5、No.13 及び No.22~24 は D 農場、No.6 と No.7 は E 農場からそれぞれ分離されたものであった。

表1 農場及び月別の EHEC (O157) 分離状況 (1次調査)

農場	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	計
A	1					1						2
B	1	1										2
C			1				1					2
D					1	1	1					3
E					2							2
F					1	1	1	1				4
G										1		1
計	2	1	1	0	4	3	3	1	0	1	0	16

表2 農場及び月別の EHEC (O157) 分離状況 (2次調査)

農場	6月	7月	8月	9月	10月	計
C				1		1
D				3		3
H		1		1		2
I		1				1
J			1			1
計	0	2	1	5	0	8

表3 分離菌株の性状

菌株No.	採材月	農場	VT	耐性パターン
1	H23.4	A	1,2	ABPC-SM-ST
2	H23.4	B	2	-
3	H23.5	B	2	-
4	H23.6	C	2	-
5	H23.8	D	1,2	-
6	H23.8	E	2	ABPC-SM
7	H23.8	E	2	-
8	H23.8	F	2	ABPC-SM-TC
9	H23.9	A	1,2	SM-TC-CP
10	H23.9	D	1,2	-
11	H23.9	F	1,2	-
12	H23.10	C	2	-
13	H23.10	D	1,2	-
14	H23.10	F	1,2	SM (I※)
15	H23.11	F	1,2	SM (I)
16	H24.1	G	2	SM (I)
17	H24.7	H	2	-
18	H24.7	I	1,2	SM (I)
19	H24.8	J	1	-
20	H24.9	C	2	-
21	H24.9	H	2	SM (I)
22	H24.9	D	1	-
23	H24.9	D	1	-
24	H24.9	D	1	-

※Iは中間

考察

EHEC の分離率は夏季に高いとされている¹⁾。今回の調査でも 6 月～10 月に高い保菌率を認めたことから、EHEC の保有調査を夏季に集約して実施する意義は高いと考えられた。

一方、農場別では、調査した 20 農場中 10 農場からは EHEC が検出されず、EHEC が検出された残り 10 農場についても農場毎に保菌率に差がみられ、フィールドにおいて特に保菌率の高い特定農場が存在することが示唆された。今後、例数や血清型を増やす等の継続調査が必要となる。また、EHEC 汚染率の高い農場については、と畜処理の区別化等衛生管理を徹底していきたい。

保菌率の最も高かった D 農場由来株の PFGE では、No.5 と No.13 でパターンが一致したが、この 2 株は分離月が異なる（2011 年 8 月と 10 月）ことから、飼養環境が継続的に汚染されている可能性が示唆された。また、前述した 2 株とはパターンが異なったが、同日に分離された No.22～24 の 3 株も同一パターンを示し、牛群内で同一の EHEC 株が伝播しやすい飼養環境にあった可能性も示唆された。

今回分離された 24 株のうち、20 株(83.3%)が VT2 産生株だった。VT2 は VT1 と比較してヒトに対して強毒であると言われており²⁾、公衆衛生上留意すべきものと考えられた。また、薬剤感受性試験を行った 24 株のうち、9 株が SM、ABPC、ST、TC 及び CP のいずれかに耐性を示したが、ヒトの治療に用いられることがある KM、FOM、ニューキノロン系薬剤³⁾に耐性を示す株は見られなかった。今後もこれらの薬剤に耐性を示す株が現れないか、引き続き調査を継続したい。

EHEC は食中毒の原因となるだけでなく、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で規定される三類感染症の原因菌であり、食品衛生法で生食用牛肉の規格基準が定められ、牛肝臓の生食用としての販売・提供が禁止された現在でも、公衆衛生上の重要度は大きい。特に、食肉流通の起点となると畜場での対処が大切であり、調査結果をいかに効果的な行政施策につなげていくかが課題である。今後も、公衆衛生上の各種見地から広く EHEC 関連調査を継続するとともに、「と畜場における衛生管理」に活かせるよう努めていきたい。

引用文献

- 1) 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル 18-21(2010)
- 2) 藤井潤：ベロ毒素に関する新たな知見、化学療法の領域,25 39-48(2009)
- 3) 厚生省：一次、二次医療機関のための腸管出血性大腸菌(O157 等)感染症治療の手引き(改訂版)