

と畜場の牛枝肉からのベロ毒素産生性大腸菌分離

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	神田, 隆 佐々, 裕一郎 木村, 仁巳
巻/号	50巻11号
掲載ページ	p. 663-666
発行年月	1997年11月

と畜場の牛枝肉からのベロ毒素産生性大腸菌分離

神田 隆¹⁾ 佐々裕一郎¹⁾ 木村仁巳¹⁾ 仁科徳啓²⁾

1) 静岡県東部食肉衛生検査所 (〒411 三島市新谷 46-13)

2) 静岡県衛生環境センター (〒420 静岡市北安東 4-27-2)

(1996年9月12日受付・1997年6月19日受理)

要 約

1994年7月～1995年1月に、と畜場で処理された牛枝肉4,810検体中9検体からベロ毒素産生性大腸菌(VTEC)が分離され、血清型はO26:H11(1株), O128:H2(1株), O111:H8(4株), O157:H7(3株)であった。牛枝肉由来12株および牛糞便由来9株のVTEC計21株について、*eaeA* 遺伝子、*bfp* 遺伝子、60MDaプラスミドの検出を試みたところ、*eaeA* 遺伝子と60MDaプラスミドがO157:H7の8株、O26:H11の4株、O111:H8の4株に検出され、O26:H11の1株からは*eaeA* 遺伝子、O128:H2の1株からは60MDaプラスミドのみが検出された。

—キーワード：牛枝肉、*eaeA* 遺伝子、と畜場、ベロ毒素産生性大腸菌、60MDaプラスミド。

日獣会誌 50, 663～666 (1997)

人のベロ毒素産生性大腸菌(VTEC)感染症は欧米ではおもに牛に由来し、牛肉や生乳を介して人に感染する食品媒介性感染症として認識されている[12]。わが国でも、平成5年度の全国食肉衛生検査所協議会の調査[10]をはじめ多くの調査[6, 14, 15, 24]から、牛がVTECを保有していることが明らかとなった[19]。しかし、国内で流通している市販食肉等からの分離報告は少なく[9, 25]、人のVTEC感染症の多くが感染経路は不明である。そこで、今回この感染経路を明らかにする目的で、全国のと畜場で処理されている一般と畜(牛)枝肉を対象に、わが国の下痢症患者等から分離されているO血清群[8]のVTEC汚染の状況を調査した。

さらに、牛糞便由来のVTEC9株と今回の調査で分離された牛枝肉由来の9株および今回の調査で対象としたO血清群以外の牛枝肉由来VT産生株3株について、下痢原性大腸菌の人への病原因子(定着因子)と考えられている*eaeA* (*E. coli* attaching and effacing A) 遺伝子[1, 16]、*bfp* (*bundule forming pili*) 遺伝子[16]および60MDaプラスミド[1]の保有について検討した。

なお、最近、本菌の名称として志賀毒素産生性大腸菌(STEC)が用いられはじめている[22]。

材料および方法

牛枝肉からの分離調査：1994年7～8月(夏期)および12月～1995年1月(冬期)の各期間に全国のと畜場に一般と畜として搬入された牛の枝肉(夏期2,504検体/90施設、冬期2,306検体/87施設、合計4,810検体)を、最終洗浄後から冷蔵庫搬入前までの間に、頸部また

は肩の外側部分を約100cm²滅菌ガーゼタンポンで拭き取り供試した。また、検体を採取した各食肉センターのと畜処理の方法についても調査した。

菌分離は、全国の食肉衛生検査所において統一した方法で実施した。すなわち、検査材料をModified EC broth (mECブイヨン)[20]に接種して43℃、24時間増菌培養後、SIB寒天培地^{a)}で35℃、24時間分離培養した。そこに発育したソルビトール分解および非分解の集落を平板1枚当たり各5個以上釣菌した。分離された菌株は純培養した後、市販の病原大腸菌免疫血清^{b)}を用いてO26, O111, O128, O143, O157を対象に生菌(スクリーニング検査)および加熱抗原(確認検査)によるスライド凝集反応を行った。また、一部の検体については増菌培養としてECブイヨン^{c)}、分離培養としてSorbitol MacConkey寒天培地^{d)}、EMB培地^{e)}、Beutin培地[2]、毒素のスクリーニングにVero細胞接種法やPCR法を併用した。O血清群に凝集した菌株は、TSI培地^{e)}、LIM培地^{e)}、シモンズ・クエン酸ナトリウム培地^{e)}、VP半流動培地^{e)}およびβ-D-glucuronidase活性試験(MUG試験)により大腸菌の性状を確認した。H型別は市販の病原大腸菌免疫血清^{b)}を用い試験管内凝集反応により実施したが、一部のH血清型別不能菌株については東京都立衛生研究所に依頼した。

VT産生性試験：大腸菌と確認された菌株(同一検体から複数の同一血清型菌株が分離された場合は、各検体1菌株)についてVero細胞を用いて既報[10]のVero

^{a)} 極東製薬, 東京。 ^{d)} デンカ生研, 東京。 ^{e)} 栄研化学, 東京。

^{b)} Oxoid, U.K. ^{c)} 日水製薬, 東京。

牛枝肉からのベロ毒素産生性大腸菌分離

表1 と畜処理方法別の牛枝肉からの対象血清群大腸菌および VTEC*1 の分離状況

処理方法	夏 期				冬 期			
	施設数	検体数	分離陽性数*2	VT 陽性数*3	施設数	検体数	分離陽性数*2	VT 陽性数*3
床方式	37	1,117	11	1	37	1,002	10	0
オンレール方式	49	1,273	8	2	46	1,199	11	4
台方式	4	114	2	2	4	105	0	0
合 計	90	2,504	21	5	87	2,306	21	4

*1: ベロ毒素産生性大腸菌

*2: 大腸菌 O 血清群 26, 111, 128, 143, 157 の分離陽性検体数

*3: VTEC 分離陽性検体数

細胞接種法により VT の産生性を調べた。VT (細胞変性) 陽性と判定された菌株は、逆受身ラテックス凝集反応による VT 検出キット^{b)}で毒素を確認した。また、遺伝子増幅法 (PCR) で VT 遺伝子を確認した。すなわち Karch ら [11] が報告した VT 遺伝子に特異的な塩基配列の一部を増幅するプライマーを用いて PCR により VT 遺伝子を確認した。

病原因子の検討: 1993 年 7~8 月および 1993 年 12 月~1994 年 1 月に国内のと畜場に搬入された健康牛 9 頭の糞便 (正常便) から分離された VTEC 9 株 [10] と今回の牛枝肉の拭き取り調査で分離された牛枝肉由来 9 株および今回の調査で分離された対象以外の O 血清群 (O6 および O 群血清型別不能の OUT) VT 産生株 3 株を病原因子の検討に供試した。

細菌の宿主動物腸管粘膜細胞への定着に関する *eaeA* 遺伝子および腸管病原性大腸菌 (EPEC) のマイクロコロニー形成に関する線毛の *bfp* 遺伝子は中澤ら [18] の報告したプライマーを用いた。すなわち、*eaeA* 遺伝子の一部を増幅するプライマー *eaek1* と *eaek4* および *bfp* 遺伝子の一部を増幅するプライマー *bfps* と *bfps* を使用して、報告の方法 [18] にしたがって PCR を行った。*eaeA* および *bfp* 遺伝子の陽性対照には国立予防衛生研究所の伊藤健一郎博士から分与された、秋田県の散発例から分離された EC-34 株の加熱菌液を用いた。

プラスミドの検出: Kado ら [7] の方法に準じてプラスミドを抽出した。すなわち、培養した菌液をアルカリ溶液で 56°C, 30 分間溶解処理した後、フェノール・クロロホルム処理によりプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは 0.7% アガロースゲルで電気泳動し、そのプロファイルを観察した。分子量マーカーには *E. coli* V517 株と NR1 株を用いてプラスミドの大きさを推測した。

成 績

牛枝肉 4,510 検体を検査した結果、42 検体 (0.9%) から対象血清群大腸菌が分離された。このうち、5 施設の 9 検体に由来する 9 株に VT の産生が認められ、血

表2 牛枝肉由来 VTEC*1 の血清型, VT 型および菌分離されたと畜場の概要

血清型	VT 型	分離 培地	分離 時期	施設	処理方法*2
O26: H11	VT1	SIB	夏期	A	オンレール方式
O128: H2	VT1, 2	SIB	夏期	B*3	台方式
O157: H7	VT2	SIB	夏期	B*3	台方式
O157: H7	VT2	SIB	夏期	C	床方式
O157: H7	VT1, 2	SIB	夏期	D	オンレール方式
O111: H8	VT1, 2	SIB	冬期	E*4	オンレール方式
O111: H8	VT1, 2	SIB	冬期	E*4	オンレール方式
O111: H8	VT1, 2	SIB	冬期	E*4	オンレール方式
O111: H8	VT1, 2	SIB	冬期	E*4	オンレール方式

*1: ベロ毒素産生性大腸菌

*2: と畜の解体処理方法

*3: と畜処理 (検体採取) は異なる日に実施

*4: と畜処理 (検体採取) は同じ日に実施

清型は O26: H11 (1 株), O111: H8 (4 株), O128: H2 (1 株), O157: H7 (3 株) であった。また、これらの VT 型は VT1 (1 株), VT2 (2 株), VT1 & 2 (6 株) であった。

季節別の分離状況は夏期が 4 施設 (このうち 1 施設は異なる日に異なる血清型 VTEC を分離) で 5 検体由来の 5 株 (0.2%) に VT 産生が認められた。冬期は 1 施設で同じ日に処理された 4 検体由来の同一血清型の 4 株 (0.9%) に VT の産生が認められた。VTEC が分離されたと畜場のと畜処理方法はオンレール方式が 3 施設、床剥ぎ方式が 1 施設、台 (ベッド) 方式が 1 施設であった。

牛糞便および枝肉由来の VTEC 21 株について *eaeA* 遺伝子、*bfp* 遺伝子および 60MDa プラスミドの有無を検討した結果、調査の対象とした O 血清群 (O26, O111, O128, O157) 18 株では *eaeA* 遺伝子は枝肉由来の O128: H2 (1 株) 以外の供試したすべての株で検出された。また、60MDa プラスミドは糞便由来の O26: H11 (1 株) を除き供試したすべての株で検出された。しかし、*bfp* 遺伝子はいずれの株からも検出されなかった。

また、枝肉由来の調査対象以外の O 血清群 3 株には *eaeA* 遺伝子、*bfp* 遺伝子、60MDa プラスミドのいずれも検出されなかった。

表3 牛由来 VTEC*1分離株の病原因子

菌株 No.	血清型	検体名	病原因子			
			VT	<i>eaeA</i>	<i>bfp</i>	60MDa Plasmid
1	O26:H11	糞便	1	+	-	+
2	O26:H11	糞便	1	+	-	-
3	O26:H11	糞便	1	+	-	+
4	O26:H11	糞便	1	+	-	+
5	O157:H7	糞便	1 & 2	+	-	+
6	O157:H7	糞便	1 & 2	+	-	+
7	O157:H7	糞便	1 & 2	+	-	+
8	O157:H7	糞便	1 & 2	+	-	+
9	O157:H7	糞便	2	+	-	+
10	O26:H11	枝肉	1	+	-	+
11	O111:H8	枝肉	1 & 2	+	-	+
12	O111:H8	枝肉	1 & 2	+	-	+
13	O111:H8	枝肉	1 & 2	+	-	+
14	O111:H8	枝肉	1 & 2	+	-	+
15	O128:H2	枝肉	1 & 2	-	-	+
16	O157:H7	枝肉	2	+	-	+
17	O157:H7	枝肉	2	+	-	+
18	O157:H7	枝肉	1 & 2	+	-	+
19	O6:H+	枝肉	2	-	-	-
20	OUT:H+	枝肉	1 & 2	-	-	-
21	OUT:H-	枝肉	2	-	-	-

*1: ペロ毒素産生性大腸菌

考 察

人の VTEC 感染症の感染源を明らかにする目的で、と畜場搬入牛（和牛、ホルスタインおよび F1）の VTEC 保菌調査 [10] を実施し、わが国で飼育され、食用のためと畜場に搬入されている牛が VTEC を保菌している実態が明らかにされた。そこで今回は、全国のと畜場で処理された牛の枝肉について牛の保菌調査と同一の O 血清群大腸菌の汚染実態を調査した。その結果、牛枝肉 4,810 検体のうち 5 施設で処理された 9 検体 (0.2%) から対象血清群の VTEC が分離された。国内における食肉等の VTEC による汚染は、小長井ら [13] がと畜場で処理された牛枝肉の拭き取り材料 100 検体中 1 検体 (1.0%) から O157:H7 を分離している。今回の成績は小長井ら [13] の報告に比べ低い分離率ではあったが、国内の複数のと畜場において牛枝肉の VTEC 汚染の実態が確認された。

Chapman ら [4] は、英国のと畜場において牛（腸内容）と処理された枝肉から同一のフェージ型やプラスミドプロファイルを有する VTEC (O157) を分離し、と畜場の処理工程における VTEC の枝肉汚染の実態を明らかにしている。

今回、枝肉に VTEC の汚染を認めた施設のと畜処理方法は特定の方式ではなく、オンレール方式、床方式、台方式のいずれの方式の施設でも認められた。さらに、同じ日に連続して処理された複数の枝肉表面から同じ血

清型の VTEC が分離された例がみられており、Chapman ら [4] の報告のように、牛の腸内容物に由来する菌 (VTEC) がと畜処理の工程を介して枝肉を汚染したものと推測された。

また、季節的には夏期に汚染のみられた施設が多かったが、牛の保菌調査 [10] では夏冬いずれの時期にも O157:H7 や O26:H11 が分離されており、VTEC 保菌牛などが存在すれば、季節に関わりなく作業工程における二次汚染の可能性があると考えられた。

今回分離された VTEC のうち O26:H11, O157:H7 はいずれも国内外の牛や下痢症患者から分離されている血清型 [8, 12, 18] であった。また、O128:H2 は国内外の下痢症患者 [8, 12] や外国では健康な羊 [3] から、O111:H8 は外国で出血性大腸炎の子牛 [5] や患者 [12] から分離されている血清型であった。

さらに、今回牛糞便および枝肉由来の菌株について、VTEC の病原因子として示唆されている *eaeA* 遺伝子 [1, 16]、60MDa プラスミド [1] および腸管病原性大腸菌の病原因子と考えられている *bfp* 遺伝子 [16] の保有の有無を調査した結果、一部の株を除き *eaeA* 遺伝子と 60MDa プラスミドの保有が確認された。国内の患者から分離された O157:H7, O26:NM, O111:H-, O128:H2 などの VTEC は 60MDa プラスミドを保有していることが報告 [21, 27] されている。また、60MDa プラスミドと *eaeA* 遺伝子をともに保有する患者由来の O157:H7 や O26:H- も報告 [28] されている。

いっぽう、中澤ら [18] は兔感染モデル実験により、牛由来 VTEC と *eaeA* 遺伝子の下痢原性を明らかにし、牛由来 VTEC のうち、O26:H11 や O157:H7 など人症例から分離報告の多い血清型と同一の血清型に属する菌株が人の下痢原性大腸菌となる可能性を示唆している。これらのことから今回病原因子を検討した牛糞便および牛枝肉由来の分離株のうち O 血清群 O26, O111, O157 などは人に対して病原性を有するものと推測された。

また、牛枝肉由来の VTEC 3 株 (O6:H+, OUT:H+, OUT:H-) には VT 以外の病原因子は検出されなかったことから、これら分離株の人に対する病原性については不明である。家畜からは O26:H11 や O157:H7 など人の臨床例から多く分離されている血清型以外にも多くの種類の血清型の VTEC が分離されており [14, 15, 17, 24]、これらの VTEC の人への病原性については、今後明らかにする必要があると考えられた。

また、今回供試した分離株には *bfp* 遺伝子は検出されなかった。塚本 [26] は局在性付着を示す腸管病原性大腸菌のすべてに *bfp* 遺伝子が検出されるが、VTEC を含むその他の大腸菌には認められないと報告している。今回の成績はこれを裏付けるものと思われ、VTEC においてはその感染因子としての *bfp* 遺伝子の関与は低いも

のと考えられた。

以上のことから、わが国でもと畜場において、処理工程における二次汚染と推測される牛に由来した人に病原性を有すると考えられる VTEC の枝肉への汚染実態が確認された。したがって、と畜場においては、生体洗浄などによる牛体表の糞便汚染の除去、直腸結紮等の汚染源の排除を目的としたと畜処理工程の改善や、と畜作業従事者の衛生教育を十分行うなど、各と畜場において HACCP 方式等を取り入れた微生物制御[23]の実施が早急かつ重要な課題である。

さらに、今後は国内の牧場など生産段階における牛の VTEC 保菌の実態を詳細に明らかにするとともに、VTEC などの病原菌の排除を目指した衛生的な家畜生産、飼養管理の研究が望まれる。

最後に、本調査に対してご助言ならびに分離株の H 血清型別をしていただいた東京都立衛生研究所の甲斐明美博士ならびに病原因子の検討に関してご助言等をいただいた国立予防衛生研究所の伊藤健一郎博士に深謝するとともに、今回の枝肉汚染実態調査は全国食肉衛生検査所協議会微生物部会の平成 6 年度の調査研究事業として実施されたものであり、本調査に参加された全国の食肉衛生検査所各位に深謝する。

引用文献

- [1] Barrett TJ, Kaper JB, Jerse AE, et al : J Infect Dis, 165, 979-980 (1990)
- [2] Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, et al : J Clin Microbiol, 27, 2559-2564 (1989)
- [3] Beutin L, Geier D, Steinruck H, et al : J Clin Microbiol, 31, 2483-2488 (1993)
- [4] Chapman PA, Siddons CA, Wright DT, et al : Epidemiol Infect, 111, 439-447 (1993)
- [5] Clarke RC, Wilson JB, Read SC, et al : Recent Advance in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infections, 17-24 (1994)
- [6] 藤田雅弘, 塩野雅孝, 森田幸雄, 他 : 日獣会誌, 47, 875-878 (1994)
- [7] Kado CI, Liu ST : J Bacteriol, 145, 1365-1375 (1981)
- [8] 甲斐明美 : 東京都予防医学協会年報, 24, 198-202 (1994)
- [9] 甲斐明美, 尾畑浩魅, 昌山 薫, 他 : 第 17 回日本食品微生物学会講演要旨集, 78 (1996)
- [10] 神田 隆, 仁科徳啓, 岩田正明 : 日獣会誌, 48, 978-980 (1995)
- [11] Karch H, Meyer T : J Clin Microbiol, 27, 2751-2757 (1989)
- [12] Karmali MA : Clin Microbiol Rev, 2, 15-38 (1989)
- [13] 小長井春夫, 仁科徳啓, 雨宮十四, 他 : モダンメディア, 39, 338-343 (1993)
- [14] 宮尾陽子, 吉原雅子, 鈴木輝康, 他 : 日獣会誌, 47, 288-292 (1994)
- [15] 宮尾陽子, 宗村佳子, 鈴木輝康, 他 : 日獣会誌, 49, 46-51 (1996)
- [16] 永山憲市, 本田武司 : 細菌感染の分子医学, 渡辺治雄編, 24-30 羊土社, 東京 (1995)
- [17] 中澤宗生, 甲斐明美 : 感染症誌, 68, 1437-1439 (1994)
- [18] 中澤宗生, 伊藤健一郎 : 感染症誌, 69, 772-776 (1995)
- [19] 仁科徳啓 : 食衛誌, 35, 429-431 (1994)
- [20] Okrend AJG, Rose BE, Matner R : J Food Prot, 53, 936-940 (1990)
- [21] 坂口早苗, 坂口武洋, 中村磐男, 他 : 感染症誌, 67, 127-136 (1993)
- [22] 坂崎利一, 田村和満 : 日本臨床微生物学雑誌, 6(3), 89-98 (1996)
- [23] 品川邦汎 : 獣医畜産新報, 47, 587-591 (1994)
- [24] 多田 博, 伊丹幸子, 山本保男, 他 : 感染症誌, 66, 1383-1389 (1992)
- [25] 田中 博, 西内 力, 近藤玲子, 他 : 感染症誌, 65, 175-180 (1991)
- [26] 塚本定三 : 感染症誌, 70, 569-573 (1996)
- [27] 山田文也, 倉園貴至, 山口正則, 他 : 感染症誌, 68, 1451-1458 (1994)
- [28] 八柳 潤, 齊藤志保子, 森田盛大 : 感染症誌, 69, 1286-1293 (1995)

Isolation of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* from Carcasses of Cattle at Slaughter Houses

Takashi KANDA, Yuichiro SASA, Hitomi KIMURA and Tokuhiko NISHINA

Tobu Meat Inspection Center of Shizuoka Prefecture, 46-13 Araya, Mishima 411, Japan

SUMMARY

Of 4,810 bovine carcasses examined at slaughter houses, 9 (0.2%) were positive for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). The isolates were of serotypes O26:H11 (1 strain), O111:H8 (4 strains), O128:H2 (1 strain) and O157:H7 (3 strains). A total of 21 VTEC isolates, 9 fecal and 12 carcass strains, were examined for *eaeA* and *bfp* genes and 60MDa plasmid, revealing *eaeA* gene and 60MDa plasmid in 8 strains with O157:H7 and 4 strains each with O26:H11 and O111:H8. One strain each with O26:H11 and O128:H2 had only *eaeA* and 60MDa plasmid, respectively. No *bfp* gene was detectable, and VTEC with O6:H+, O128:H+ or O157:H- had no pathogenic factors.

—Key words : carcass, *eaeA* gene, slaughter house, VTEC, 60MDa plasmid.

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 50, 663-666 (1997)