

秋田市内で市販されていた輸入牛肉 からの腸管出血性大腸菌の分離

八柳 潤 齊藤志保子 遠藤 守保^{*1} 佐藤 宏康^{*2}
森田 盛大

要約：秋田県内における腸管出血性大腸菌（以下EHECと略）の感染源、感染ルートに関する知見を得る目的で秋田市内で市販されている輸入牛肉の腸管出血性大腸菌汚染実態調査を実施した。本調査を行うに先立ち、牛肉からのEHEC検出法を検討し、牛肉中のEHECを簡便確実に高感度で検出分離することが可能な、EC-PCR法を確立した。EC-PCR法により秋田市内で市販されていた米国産、及び豪州産牛肉計110件についてEHECの検出を試みたところ、豪州産牛肉1検体から血清型O157:H7のEHECが分離された。本菌はVT-2を産生し、ソルビトールを1日以内に分解した。以上の結果から、輸入牛肉がEHECに汚染されていることが秋田県内において初めて確認され、EHEC感染源の一つに輸入牛肉が関与する可能性が示された。

キーワード：腸管出血性大腸菌、輸入牛肉、Polymerase Chain Reaction、EC-PCR法

I はじめに

腸管出血性大腸菌（Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC）は、病原性大腸菌の中では比較的近年になってからその存在が確認された。EHECは培養 Vero 細胞を変性させる毒素（Vero 毒素, Vero cytotoxin, 以下 VT と略）を産生することが知られており¹⁾、この Vero 毒素が本菌の病原因子であると考えられている。EHECの血清型としてはO157:H7が代表的なものであるが、これ以外の血清型の大腸菌の中にも Vero 毒素を産生するものがあることから、これらは Vero 毒素産生性大腸菌（以下VTECと略）とも呼ばれている。²⁾

EHECに感染した場合、腹痛を伴う出血性大腸炎が惹起され、とくに小児では溶血性尿毒症症候群（以下HUSと略）が続発する場合があるなど³⁾感染病像は一般に重篤である。国内におけるEHECの感染例としては、1990年に埼玉県幼稚園で発生した大規模な集団例が著名であり⁴⁾、本事例を契機として国内においてEHECに対する関心が急速に高まった。秋田県内においても既報の如く、1991年に4名の散発的EHEC感染者が確認された⁵⁾。これらEHEC感染者の中にはHUSを続発したものも認められたが、予後は良好であり、全員健康を取り戻した。これらの感染者から分離されたEHECの疫学マーカーについて検討した結果、これらのEHECは、それぞれ異なる感染源から散発的に発生したことが示唆されたが、具体的な感染源は不明であった⁵⁾。

EHECの感染源として、外国の例ではハンバーガー、生牛乳などの畜産製品が関与していること⁶⁾、また、牛

がEHECのキャリアーとなっていることが報告されている⁷⁾。我が国においても、伊予保健所の田中たちが輸入牛肉からVTECを分離したことを報告していること⁸⁾からEHEC感染源として輸入牛肉が関与している可能性があるものと考えられる。以上のことから、秋田県内においても、市販の輸入牛肉がEHECにより汚染され、EHECの感染源になっている可能性が考えられたが、その実態についてはこれまで調査されたことがなく不明であった。このため、我々は秋田市内で市販されている輸入牛肉を対象として、EHECの汚染実態調査を実施した。また、牛肉からのEHEC検出方法についても検討したので、得られた結果を報告する。

II 材料と方法

1. 材 料

- (1) 輸入牛肉：秋田市内のスーパーマーケットF店、N店から購入した米国産牛肉計79件、S店、T店から購入した豪州産牛肉計31件、合計110件を調査対象とした。
- (2) 菌株：EHECの標準株には、東京都衛生研究所微生物部の工藤泰雄博士から分与された *E. coli* serotype O157:H7 EDL-931株を使用した。
- (3) 培地：EC培地は日水製薬製品、Sorbitol MacConkey No.3はOxoid 製品を使用した。4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) は Oxoid 製品を使用した。

2. 方 法

牛肉からのEHECの分離は、後述するEC-PCR

^{*1} 現 横手保健所

^{*2} 現 大館保健所

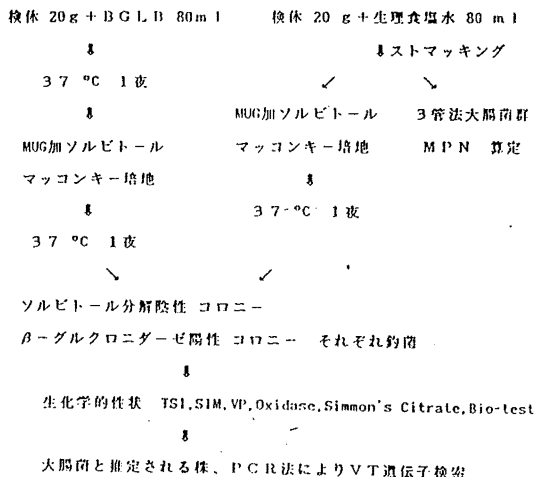
法によった。EHEC菌株の生化学的性状検査、血清型別、薬剤感受性、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法によるVeroto毒素産生遺伝子の検出及び型別は既報の方法に従って実施した⁵⁾。

Ⅲ 結果及び考察

1. 牛肉からのEHEC分離方法の検討

牛肉からのEHEC分離方法として、最初に図1に示

図1 初めに試みた牛肉からのEHEC分離法



す方法を試みた。血清型O157:H7のEHECはソルビトール分解陰性もしくは遅分解性、β-グルクロニダーゼ陽性もしくは陰性であることが、また、大腸菌は通常ソルビトール分解陽性、β-グルクロニダーゼ陽性であることが知られている。これらのことから、牛肉中に存在するEHEC血清型O157:H7及び大腸菌全般を分離する目的でMUG加 Sorbitol macConkey Agar (MUG-SM) を分離培地に使用して、生じたコロニーのうちソルビトール分解陰性を示す白色のもの、及び長波長紫外線照射下で青白色蛍光を発するβ-グルクロニダーゼ陽性のものを釣菌した。米国産牛肉8検体から表1に示す菌株が得られ、これらについて生化学的性状

表1 図1の方法により牛肉から分離した細菌

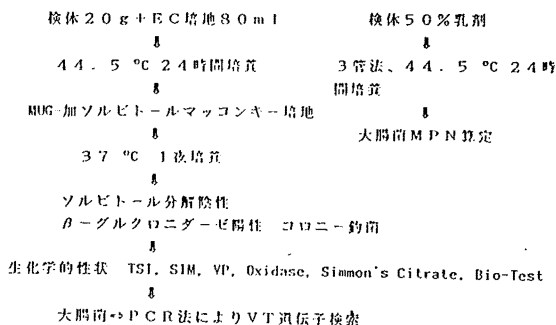
β-グルクロニダーゼ	ソルビトール	釣菌数	大腸菌数	VT遺伝子保有株	備考
陰性	陰性	8	0	—	Cedecea Spp
陰性	陽性	7	0	—	Serratia Spp
陽性	陽性	14	8	0	Enterobacter Spp

を検討した結果、EHEC O157:H7と推定されたβ-グルクロニダーゼ、ソルビトール分解陰性の菌株は大腸菌ではなくCedecea属の細菌であった。また、β-グルクロニダーゼ陰性、ソルビトール分解陽性の菌株はSerratia属の細菌であった。一方、大腸菌と思われる

β-グルクロニダーゼ、ソルビトール分解が共に陽性の菌株14株が分離されたが、これらのうち実際に大腸菌であったのは8株のみであり、他はEnterobacter属の細菌であった。なお、大腸菌と同定された菌株についてPCR法によりVT遺伝子を検索した結果、これら8株の中にVT遺伝子保有株は認められなかった。以上の結果から、牛肉中には各種の細菌が混入しており、図1の方法によっては、EHECを含めた大腸菌を選択的に分離することは困難であることが示された。従って、牛肉中のEHECを効率良く分離するためにはまず検体中の大腸菌を選択的に分離する方法を確立する必要があるものと考えた。食品中の大腸菌の存在を知るための方法として、衛生試験法注解に、食品をEC培地に接種後44.5℃で培養し、培地の混濁とガス産生の有無を見る方法が記載されているが、この培養方法により大腸菌が選択的に分離可能かどうか検討した。

図2に示すように、牛肉をEC培地に接種した後44.5℃で24時間培養し、その培養液の1白金耳量をMUG-SM培地に塗布し、37℃で一晩培養した。また、3管法

図2 EC—44.5℃培養法



による牛肉中の大腸菌MPN測定も並行して試みた。当該MUG-SM培地上にはβ-グルクロニダーゼ、ソルビトール分解共に陽性のコロニーが多数生じたが、β-グルクロニダーゼ陰性、ソルビトール分解陽性のコロニーも少数生じた。β-グルクロニダーゼ、ソルビトール分解共に陽性のコロニーを任意に釣菌して、それらの生化学的性状を検討したところ、試みた範囲の中で、これらは全て大腸菌であることが確認された。さらに、あらかじめE. coli O157:H7 EDL931株を接種しておいた牛肉を使用して検討したところ当該菌株も通常の大腸菌と同様に検出されることが確認された。以上の結果から、検体を接種したEC培地を44.5℃24時間培養することにより、検体中の大腸菌を選択的に分離することが可能であることが確認された。ところが、MUG-SM培地上に発育した大腸菌の全てを対象としてPCR法によりVT遺伝子の検索を実施することは極めて困難であり、実

際上は生じたコロニーの1部、例えば1平板あたり5個のコロニーについてのみVT遺伝子の検索を実施せざるを得ないために、VT遺伝子保有株を見逃すことが予測された。この問題点を回避、克服する方法として、多田たちはBGLB-PCR法を報告している⁹⁾。本法は、検体をBGLB培地に接種後37℃で培養し、発育した菌体を集菌して、これらの菌体を各種菌株の混合状態のま

まテンプレートとしてPCR法によりVT遺伝子のスクリーニングを行うという方法である。本法においては、スクリーニング陽性となった培養液のみを対象として菌分離を実施すれば良いことから、EHEC分離の簡便性、確実性がともに飛躍的に向上するとされている⁹⁾。しかしながら、先に我々が示したように牛肉中には大腸菌以外の各種の細菌が混在していることから、BGLB-PCR法の培養条件下においては、これらの細菌が大腸菌の発育を妨害する可能性が否定できないと考えられた。このため、我々は先に得られた知見を基に、BGLB培地の代わりにEC培地を使用して、培養を44.5℃で実施するEC-PCR法を考案した(図3)。図4に示すように100mlあたりEDL-931株を1CFU、7CFU、75CFU、710CFU、7500CFUをそれぞれ接種した米国産牛肉の50%乳剤を検体として、EC-PCR法のEHEC検出感度について検討したところ、全ての検体において、いずれかの発酵管に菌の発育及びガスの産生が認められ、これらの培養液から図4に示すようにVT遺伝子が検出されることが確認された。これらの結果からEC-PCR法のEHEC検出感度が高いことが示され、また、本法がBGLB-PCR法の特徴であるEHEC検出の簡便性、確実性を併せ持つことから、本法は牛肉中のEHEC検索法として有用であるものと考えられた。そこで、このEC-PCR法を利用して秋田市内で販売されていた輸入牛肉を対象としたEHECの汚染実態調査を実施した。

図3 EC-PCR法

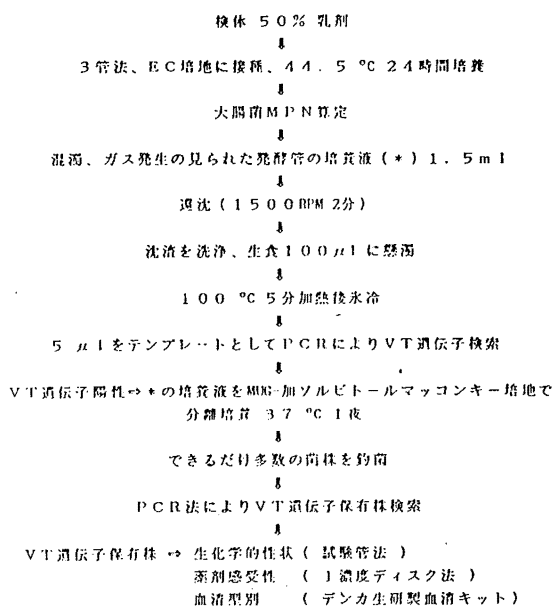
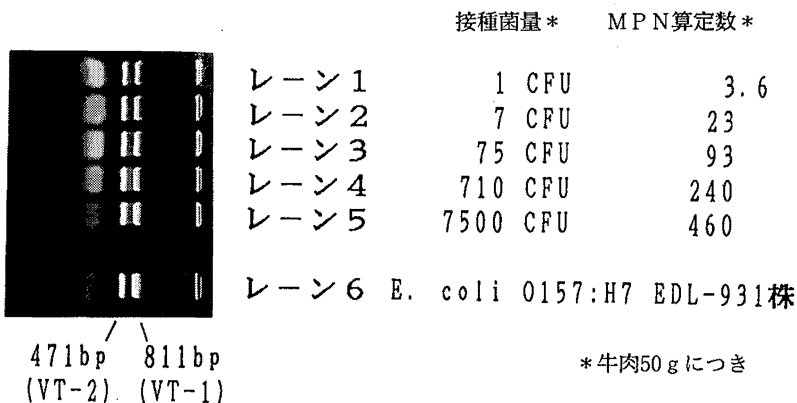


図4 EC-PCR法のEHEC検出感度



2. 秋田市内で購入した輸入牛肉のEHEC汚染実態調査

表2に秋田市内のスーパーから購入した輸入牛肉合計110件についての大腸菌、及びEHEC検出状況を示す。輸入牛肉としては豪州産、及び米国産の2種類が入手可

能であった。これらの輸入牛肉110件中57件から大腸菌が検出された。大腸菌検出率を店舗別にみると、F店の米国産牛肉は16.7%、S店の豪州産牛肉は50.0%、N店の米国産牛肉は54.1%、T店の豪州産牛肉は100%であり、大腸菌検出率が店舗により相当異なることが認めら

表2 市販輸入牛肉からの大腸菌,
及びEHEC検出状況

販売店名	原産国	調査数	大腸菌検出率	EHEC検出数
F店	米国	42	16.7%	0
N店	米国	37	54.1%	0
S店	豪州	8	50.0%	0
T店	豪州	23	100.0%	1
合計		110	57.0%	1

れ、T店の豪州産牛肉の大腸菌汚染は特に顕著であった。

図5にEC-PCR法によるこれらの牛肉を対象としたEHEC検索結果の一部を示す。レーン7の検体5(T店の豪州産牛肉)にVT-2遺伝子の増幅断片が認められたため、当該培養液からの大腸菌分離を実施して18菌株を得た。これらの菌株についてPCR法によりVT-2遺伝子の検索をしたところ、図6に示すようにレーン5, 6, 7, 18の株がVT-2遺伝子を保有していた。

図5 EC-PCR法によるEHEC陽性検体検索例

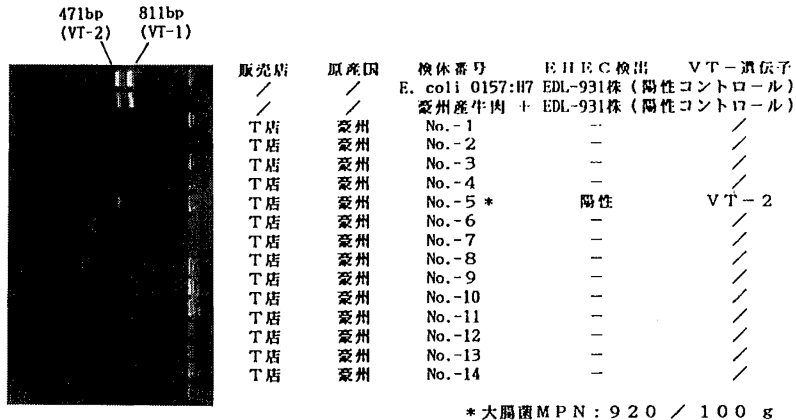
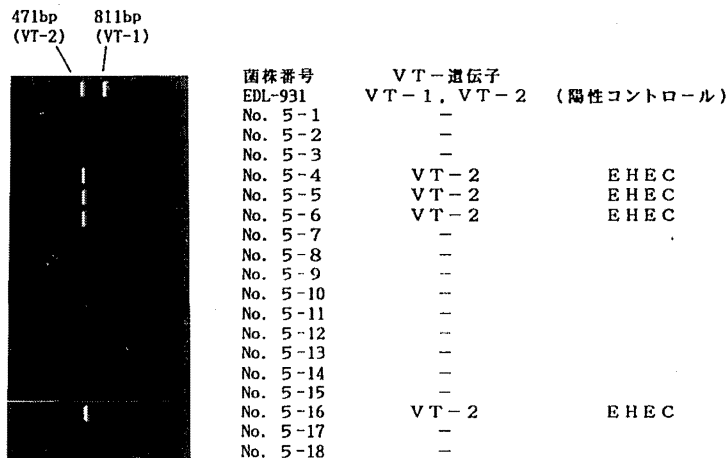


図6 PCR法による分離菌株のVT遺伝子検索結果



3. 分離したVT-2遺伝子保有株の性状

豪州産牛肉から分離したVT-2遺伝子保有株4株の生化学的性状、薬剤感受性を表3、表4にそれぞれ示す。これらの4株は、全て定型的大腸菌の生化学的性状を示したことから、これらをEHECと同定した。これら

4株とも血清型がOUT:H2であり、薬剤感受性においても共通の性状が認められたことから、これらの4株は1株のVT-2遺伝子を保有するEHECから派生したものと考えた。なお、今回分離したEHECは、E. coli O157:H7とは異なり、ソルビトールを1日以内

表3 分離VT-2遺伝子保有株の生化学的性状、血清型

Tests	5-4	5-5	5-6	5-16	Tests	5-4	5-5	5-6	5-16
TSI(H ₂ S)	A/A(-)	A/A(-)	A/A(-)	A/A(-)	Mos	11	11	11	11
Motility	+	+	+	+	Catalase	11	11	+	11
Oxidase	+	+	+	+	Glucose				
VP	+	+	+	+	Gas	11	11	11	11
MR	+	+	+	+	Acid	11	11	11	11
Citrate					Mucate	12	12	12	12
Christensen	+	+	+	+	Lactose	11	11	11	11
Simon's	-	-	-	-	Mannitol	11	11	11	11
Acetate	11	11	11	11	Sucrose	11	11	11	11
Malonate	-2	-2	-2	-2	Silicene	17	15	14	16
Indole	11	11	11	11	Dulcitol	11	11	11	11
Urease	-4	-4	-4	-4	Inositol	-14	-14	-14	-14
IPA	-1	-1	-1	-1	Adonitol	-14	-14	-14	-14
IPA	-1	-1	-1	-1	Raffinose	11	11	11	11
Moller					Sorbitol	11	11	11	11
Lysine	+	+	+	+	Arabinose	11	11	11	11
Arginine	-4	-4	-4	-4	Rhamnose	11	11	11	11
Ornithine	11	11	11	11	Xylose	11	11	11	11
ONPG	+	+	+	+	Trehalose	11	11	11	11
Tartrate	11	11	11	11	Cellobiose	-14	-14	-14	-14
O/F glucose	F	F	F	F	Maltose	11	11	11	11
Sero type	OUT-102	OUT-102	OUT-102	OUT-102					

注) 1. -に続く数値は読取期間

表4 分離VT-2遺伝子保有株の薬剤感受性

薬剤名	5-4	5-5	5-6	5-16
Gentamicin	S	S	S	S
Streptomycin	S	S	S	S
Tetracycline	S	S	S	S
Ampicillin	S	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S	S
Kanamycin	S	S	S	S
Cephalexin	S	S	S	S
Nalidixic acid	S	S	S	S
Sulphamethoxazole	S	S	S	S
Trimethoprim	S	S	S	S

注) S: 感受性

に分解するという性状を示した。また、市販のO型別用血清キットを使用しては型別が不能であった。

以上述べたように、我々は牛肉中のEHECを検索する方法としてEC-PCR法を考案し、本法のEHEC検出感度が高いこと、操作が簡便且つEHECの分離が確実であることを示した。なお、我々は病院から依頼されるEHEC感染が疑われる患者の直腸スワブの検査を本法に切り替え、ルーチン化した。加えて、下痢症患者の直腸スワブに対する病原性大腸菌全般のルーチン検査も本法の原理を踏襲した方法に切り替え、実際にEPEC(AEEC)の検出、分離に成功した。今回分離したEHECは、市販の血清キットによってはO型別が不能であり、且つ、定型的大腸菌の生化学的性状を保有しているため、ソルビトールマッコンキー培地又は、血清型を指標とした従来のEHEC検索法では検出することが不可能と考えられた。我々が過去に病院から検査を依頼されたEHEC感染疑い患者の検査のなかには、血便性下痢を起こし、EHEC感染が強く疑われながらも、ソルビトールマッコンキー培地を使用した検査でEHECが検出されなかった例がいくつかあった。それらの患

者は今回分離したEHECのような性状のEHECに感染していた可能性も推察される。

一方、我々は輸入牛肉がEHECにより汚染されている事実を秋田県内において初めて確認した。伊予保健所の田中たちも松山市内、伊予市内で市販されていた輸入牛肉がVTECにより汚染されていたことを明らかにしている⁷⁾。これらのことは、EHECが我々の周辺に侵淫していることを示しており、EHEC感染の発生は予断を許さぬ状況にあるものと考えられる。県民が喫食する牛肉としては、輸入品のみならず、国産、並びに県内産牛肉もその対象になると考えられる。近年、国内で飼育されている、牛を含めた家畜からVTECが検出されたという報告が散見されるようになってきた⁹⁾。しかしながら、秋田県内においては牛などの家畜、及びそれらから生産された食肉についてのEHEC汚染実態は調査されたことがなく、その実態は不明である。EHEC感染者の発生予防対策を構築する上において、EHECの感染ルートに関する知見を集積することが極めて重要と考えられるので今後、国産、県内産牛肉のEHEC汚染実態を調査すると共に、県内で飼育されている牛などを対象としたEHEC保菌調査なども併せて実施して行く必要があると考えられた。

IV 文 献

- 1) A. D. O'Brien et. al., Escherichia coli O157 : H 7 Strains Associated with hemorrhagic Colitis in the United States Produce a Shigella Dysenteriae (shiga) like Cytotoxin., Lancet 1983 ; i : 702
- 2) 伊藤武, 他. 新しく認識された Verocytotoxin 産生大腸菌による感染と本菌の病原性に関する研究の現況. モダンメディア, 1988 ; 34 : 12-23
- 3) M. A. Karmali et. al., Sporadic Cases of Haemolytic-Uremic-Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing Escherichia coli in stools., Lancet 1983 ; i : 619-620
- 4) 城宏輔, 埼玉県某幼稚園で流行した E. coli O157 : H 7 による出血性大腸炎, 臨床と微生物, 1991 ; 18 : 457-46
- 5) 八柳潤, 他. 平成3年度に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47
- 6) M. A. Karmali, Infection by Verocytotoxin-producing Escherichia coli., Clin. Microbiol. Rev. 1989 ; 2 : 15-47
- 7) M. A. Montenegro et. al., Detection and Char-

acterization of Fecal Verotoxin-producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle., *J. Clin. Microbiol.* 1990 ; 28 : 1427-1421

8) 田中博, 他. Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の輸入食肉からの分離, *感染症学雑誌*, 1991 ; 65 : 175-180

9) 多田博, 他. PCR法を用いた肥育牛からの Vero 毒素産生性大腸菌の検出, *感染症学雑誌*, 1992 ; 66 : 1383-1389