市販食品からの志賀毒素産生大腸菌の検出

小田 隆弘・椿 本 亮・財津 修一・池田 嘉子
樋 脇 弘・金堂 正也

(福岡市保健環境研究所)

(受付 平成 9 年 9 月 17 日)

(受理 平成 9 年 11 月 5 日)

Detection of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* from Commercial Foods

Takahiro ODA, Makoto TSUBAKIMOTO, Shuichi ZAITSU,
Yoshiko IKEDA, Hiroshi HIWAKI and Masaya KANADOU

(Fukuoka City Institute for Hygiene and Environmental
Science, 2-1-34 Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka 810)

Key words: Shiga toxin producing *Escherichia coli*, Commercial foods, Colony sweeps
method

はじめに

腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157 と略) 集団感染事例が 1996 年に我が国の各地で発生し、社会的に大きな問題となった。これらの集団事例のうち、感染源が特定された事例は数例しかなく、大多数の事例では原因食品などの感染源は不明である。福岡市でも 1996 年 6 月中旬に、保育園で患者数 48 名の集団事例が発生し、原因として保育園給食が疑われたものの、感染源となった食品などを特定することはできなかった。また、その後発生した散発事例約 60 例 (1996 年 7 月から 1997 年 3 月までに発生した件数) においても、すべて感染源の特定はできなかった。

腸管出血性大腸菌感染症 (食中毒を含む) の原因菌は O157 によるものが最も多いが、O26, O111, O128 などほかの血清型による事例も報告¹⁾されている。腸管出血性大腸菌の主要な病原因子が、志賀毒素 (本論文では、従来、ベロ毒素と呼ばれてきた毒素を志賀毒素 [Shiga toxin; 略号は Stx] と記載した) 産生性である^{6, 13)}ことは分かっている。一方、牛などの家畜からは多種類の血清型の Stx 産生菌が分離されることも報告¹⁰⁾されている。Stx を産生する大腸菌が、すべてヒトに腸管出血性大腸炎を引き起こす病原菌であるかどうかは今のところ明確ではない。また、ヒトの腸管出血性大腸菌感染症の原因菌は、O157 によるものが圧倒的に多い理由も判明していない。したがって、今のところは Stx 産生大腸菌 (Shiga toxin producing *Escherichia coli*: 以下 STEC

と略) を腸管出血性大腸菌と見做して対策を立てるべきと考えられるが、O157 を含めた STEC についての食品汚染調査の報告は少なく、市販食品における分布状態は不明な点が多い。

著者らは、福岡市内で市販されていた食品 677 件について、1996 年 7 月から 1997 年 3 月までの期間に、O157 をはじめとする STEC の汚染調査を行ったので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 調査対象とした食品および細菌

1996 年 7 月から 1997 年 3 月の期間に福岡市内で販売されていた食品 677 件を対象に STEC の検査を行った。

2. 検査方法

STEC の検査法は、KARMALI ら⁷⁾の「コロニー掻き取り」(colony sweep) 法を参考にして、図 1 に示した方法により行った。

検査対象とした食品は、20~25 g に約 9 倍量のノボバイオシン加 mEC ブイヨンを加えてホモゲナイズ後、37 または 42℃ で 1 晩 (14~18 時間) 培養した。分離平板はソルビトールマッコニー寒天培地 (OXOID; 以下 SMAC と略) および亜テルル酸カリウムを 2.5 mg/L の濃度で加えた SMAC (TSMAC と略す) を併用し、培養液を白金耳で常法どおり塗抹した。1 晩 37℃ で培養した SMAC 平板および TSMAC 平板のコロニー密集部を 3~5 白金耳量集め (コロニーを掻き取り)、ポリミキシ

図1 食品からの STEC 検出法

ンB溶液 (5,000単位/mL) 1 mL に懸濁し、37℃ で1時間放置後、遠心 (15,000 rpm/min) 上清を採取した。上清中の Stx の有無を市販キット (ペロ毒素検出用 RPLA キット; デンカ生研) を用いた RPLA 法⁵⁾ で調べた。RPLA 法の代わりに、Stx 遺伝子を PCR 法で検出する方法⁸⁾ も用いた。PCR 法を用いる時の「コロニー掻き取り」法は、SMAC 平板のコロニー密集部を1~2白金耳量集め、1% Triton X100 1 mL に懸濁し、95℃ 5分で加熱溶菌後、遠心 (15,000 rpm/min) 上清を採取し、上清中の Stx 遺伝子の有無を市販の primer (「VT 遺伝子検出用プライマーセット」TaKaRa) を用いた PCR 法により調べた。この時の PCR 法の条件は primer 添付書の条件に従った。

コロニー混合物抽出液中に Stx または Stx 遺伝子が検出されなかった場合は、STEC 陰性とした。同抽出液中に Stx または Stx 遺伝子が検出された場合は、「コロニー掻き取り」に用いた SMAC 平板および TSMAC 平板上の独立コロニー約 100 個をそれぞれ滅菌爪楊枝で釣菌し、シャーレ裏に格子状に区画線を描いたシモンズクエン酸培地 (栄研) 平板およびフルオロカルト (メル

ク) 平板の同位置区画に塗布した。両平板を 37℃ で14時間以上培養し、シモンズクエン酸培地に生育せず、フルオロカルト平板に生育した菌を推定大腸菌として以下の検査を実施した。フルオロカルト平板上の推定大腸菌コロニーを10株ずつ釣菌混合したものを1群とし、再び上記の PCR (または RPLA) 法を用いて Stx 産生菌を検索した。Stx 産生菌の存在が認められた混合菌群を対象に、その群を構成する個々のコロニーについて再度 PCR (または RPLA) 法を行い、Stx 産生菌を特定した。特定された株について、通常の生化学性状検査を行い、大腸菌であることが確認された株を STEC とした。

3. 血清型別検査

STEC であることが確認された株は、市販血清 (デンカ生研) による血清型別検査 (O 型別および H 型別) を実施した。市販血清により型別できなかった株は国立感染症研究所細菌部外来性細菌室長 田村和満先生に型別を依頼した。

結 果

1. 市販食肉類からの STEC 検出

平成8年7月から平成9年3月までの9カ月間に、福岡市内で販売されていた食肉類（食肉および内臓類）157件について STEC の汚染状況を調べた結果を表1に示した。

STEC は、157件中11件(6.9%)から検出されたが、うち、O157が検出されたものは6件(3.8%)であった。検体数が1～2件と少なかったものを除いて STEC の陽性率を比較すると、最も高かったものは、牛の腸で16.1%の陽性率であった。牛肉では2.4%、牛レバーでは3.4%の STEC 陽性率であった。牛肉または牛肉内臓類以外では、豚の内臓（腸）および羊肉（ラム）からそれぞれ1件ずつ STEC が検出された。STEC が検出された時期を、夏期（7～9月）と秋冬期（10～3月）に分けて比較してみると、夏期では7.5%（120件中9件）、秋冬期では5.4%（37件中2件）と大きな差は認められなかった。O157の陽性率においても、夏期で3.3%（120件中4件）、秋冬期で5.4%（37件中2件）と明らかな差は認められなかった。

分離された STEC の血清型は、牛肉1件から O44 : H8 (Stx1+Stx2) が、牛レバー1件から O157 : H7 (Stx1+Stx2) が、牛せんまい1件から O157 : H7 (Stx2) および O161 : H- (Stx1) が、牛さがり肉1件から O113 : H4 (Stx1+Stx2) が、牛の腸の4件から O157 : H7 (Stx1+Stx2)、1件から O161 : H9 (Stx2) が、豚の腸1件から O161 : H9 (Stx2) が、羊肉（ラム；密封包装品）1件から O91 : H- (Stx1+Stx2) がそれぞれ検出された。分離

された STEC の血清型数と株数は、計6種12株であり、O157 : H7 が半数の6株を占めた。O157 : H7 以外の血清型では、O44 : H8、O113 : H4、O161 : H9（または H-）など、今までにヒトからも家畜からもほとんど分離されることがない^{1, 2, 9, 10)} STEC が検出された。

2. その他の食品からの STEC 検出

食肉類以外の市販食品520件についても、食肉類と同様な方法で STEC の検出を試みた結果を表2に示した。

刺身などの鮮魚類54件をはじめ、野菜・果物（カット品）43件ならびに多種類の加工食品すべてから STEC は1件も検出されなかった。

表2 食肉類以外の食品からの STEC 検出

食品名	供試検体数	STEC 陽性数
食肉製品（ハム等）	20	0
鮮魚介類（刺身等）	54	0
生カキ	18	0
魚介類加工品（辛子めんたい等）	59	0
野菜・果物（カット品）	43	0
原乳（生乳）	4	0
牛乳・乳製品	37	0
鶏卵・液卵	29	0
卵製品（卵焼き等）	22	0
生菓子（和洋）	23	0
弁当・調理パン	63	0
加熱・未加熱惣菜	94	0
生麺・ゆで麺	32	0
豆腐	4	0
冷凍食品（凍結前未加熱/加熱）	6	0
自販機の清涼飲料水	12	0
合 計	520	0

表1 市販食肉類からの STEC の検出

		STEC 陽性率（陽性数/検査数）			検出された STEC の血清型（毒素型）
		7～9月	10～3月	合計 (%)	
牛肉類	牛肉	1/29	0/13	1/42 (2.4)	O44 : H8 (Stx1+Stx2)
	レバー	1/27	0/2	1/29 (3.4)	O157 : H7 (Stx1+Stx2)
	せんまい	1/7	0/2	1/9 (11.1)	O157 : H7 (Stx2)+O161 : H- (Stx1)
	たん	0/2		0/2	
	さがり	1/1		1/1 (100)	O113 : H4 (Stx1+Stx2)
	腸	3/23	2/8	5/31 (16.1)	O157 : H7 (Stx1+Stx2); 4件 O161 : H9 (Stx2); 1件
豚肉類	豚肉	0/2	0/8	0/10	
	内臓(腸)	1/2		1/2 (50)	O161 : H9 (Stx2)
鶏肉類	鶏肉	0/11	0/3	0/14	
	レバー	0/11		0/11	
	砂ずり等	0/3	0/1	0/4	
他肉類	馬肉	0/1		0/1	
	羊肉(ラム)	1/1		1/1 (100)	O91 : H- (Stx1+Stx2)
計		9/120	2/37	11/157	
STEC 陽性率		(7.5)	(5.4)	(6.9)	
うち O157 陽性率		4/120	2/37	6/257	
		(3.3)	(5.4)	(3.8)	

O157 以外の血清型別は感染研で実施

考 察

ヒトの下痢症から分離される STEC の血清型は、圧倒的に O157:H7 (または H-) が多いが、その他の血清型の STEC による事例も多数報告されており、諸外国での分離例を調べた報告^{2, 15)}によれば、O 抗原の種類だけでも 30 種を超えている。我が国においても、O157:H7 (または H-) 以外に O26:H11 (または H-), O145:H-, O111:H-, O128:H2 などによるヒト感染事例が報告^{12, 13)}されている。

SMAC または SIB 平板上のソルビット非分解コロニーを釣菌する方法や、O157 抗体を利用して ELISA 法により検出する方法または磁気ビーズにより集菌する方法^{4, 11)}は、O157 の検査を目的に開発されたものであり、O157 だけではなく、他の血清型の STEC も対象に検査する場合には、これらの方法ではなはだ困難である。O157 に限って検査する場合においても、共存する類似菌 (STEC 以外の大腸菌) の量や類似菌と STEC の比率、また、分離平板から釣菌するコロニー数などによって検出率は大きく左右される。

著者らが今回行った「コロニー掻き取り法」では、多数 (少なくとも 1,000 以上) のコロニーを対象に Stx 産生菌を検索できるため、効率的に O157 以外の血清型も含めた STEC の検出が可能であった。表には示していないが、この方法では、分離平板上の STEC コロニーが類似の大腸菌様コロニーの 1% 以下程度でも検出が可能であり、今回の市販食品の調査成績でも、STEC が検出された 11 例のうちすべてで、SMAC および TSMAC 平板から釣菌した 100 コロニー中、STEC は 1~5 個程度の検出率であった。なお、STEC 検出における「コロニー掻き取り法」の有用性は、WELLS ら¹⁸⁾によっても報告されている。

また、用いる分離平板は、ZADIK ら¹⁹⁾によって報告された Cefixime-Tellulite SMAC (CT-SMAC) が O157 の選択性に優れていることは確認されている¹²⁾。一方、著者らは、Cefixime を加えない TSMAC が CT-SMAC に劣らない選択性を有していることを見いだしているが、すべての STEC が TSMAC に生育するのかどうかはまだ分かっていないため、現在のところは、TSMAC と SMAC を併用する方がよいと思われる。

我が国における市販食品の STEC 汚染率調査は、田中ら¹⁶⁾によって輸入食肉を対象に、伊藤ら²⁾によって市販食肉を対象に実施されており、それぞれ STEC 陽性率は、1.9%, 2.6% という値が報告されている。今回の私の調査でも、牛肉においては 2.4% であり、ほぼ同じであった。牛の内臓類では陽性率が 11.1% と高く、特に腸では 16.1% と高率な値であった。これらは、過去に我が国で調べられた家畜牛 (腸管、糞便または体表など) からの高い STEC 検出率^{1, 9)}を反映しているものと考えられる。STEC がすべてヒトに腸管出血性大腸炎

を引き起こす病原菌かどうかは今のところ明確ではない。したがって、今回得られた STEC 陽性率が、そのままヒトの腸管出血性大腸炎発生の危険性を示すものとはいえないが、O157 の陽性率の高さから見ても、牛の内臓類が嚴重な注意を要する食品であると考えられた。内臓類のうち、レバーの STEC 陽性率は 3.4% (検出された株はいずれも O157) であったが、レバーは好んで生食される食品であることから、特に嚴重な注意が必要であろう。現に、神奈川県では生レバーの喫食が原因であることが証明された O157 感染事例が起こっており、福岡市においても、生レバーの喫食が原因と推定される STEC 感染散発事例が 10 数例発生している。このようなことから、生食用レバーについては衛生基準および加工基準等を早急に制定する必要があると考える。

食肉および内臓類以外の食品 520 件からは、今回、STEC は検出されなかった。しかし、我が国の最近の STEC 集団感染事例では野菜類またはその加工品からも STEC が分離されており、食肉および内臓類以外の食品の STEC 汚染率については今後、もっと多数の検体についての調査が必要と思われる。

今回の調査から、ヒトの STEC 感染 (食中毒) を防止する上で、現在最も緊急な課題は、食肉および内臓類からの感染防止と、それらから他の食品への二次汚染の防止であることが明らかとなった。

謝 辞

分離された O157 以外の STEC の血清型別を行って頂いた厚生省感染症研究所細菌部外来性細菌室長 田村和満先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 早矢仕裕子, 宗村佳子, 柴田和彦, 吉原雅子, 与那原美恵子, 草野友子, 丸山啓二, 佐竹浩之, 宮尾陽子, 鈴木輝康, 堀内亮三, 白石義明, 尾崎正美, 木下正彦, 中尾厚義, 甲斐明美, 金子誠二, 尾畑浩魅, 伊藤 武: 肥育牛における Vero 毒素産生性大腸菌の保菌実態調査. 食品衛生研究, **43**(5), 73-79 (1993).
- 2) 伊藤 武: ペロ毒素産生性大腸菌と食品衛生. モダンメディア, **39**, 307-322 (1993).
- 3) 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況. 医学のあゆみ, **178**, 909-914 (1996).
- 4) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 貫名正文, 黒木 学, 仲西寿男: 食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出法. 日食微誌, **13**, 205-219 (1997).
- 5) 甲斐明美, 山田澄夫, 伊藤 武, 工藤泰雄, 大橋 誠: 大腸菌が産生する Verocytotoxin の逆受身ラテックス凝集反応法による検出法の検討とその応用. 日細菌誌, **43**, 307-310 (1988).
- 6) Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. and Lior, H.: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., **151**, 775-782 (1985).

- 7) Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Cheung, R. and Arbus, G. S.: Sensitive method for detection low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, **22**, 614-619 (1985).
- 8) 小林一寛: 腸管出血性大腸菌の同定法 2, PCR 法. 臨床検査, **36**, 1334-1338 (1992).
- 9) 中澤宗生, 甲斐明美: 日本のウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の性状. 感染症誌, **68**, 1437-1439 (1994).
- 10) 仁科徳啓, 神田 隆: 動物及び食肉における腸管出血性大腸菌分布. 日食微誌, **13**, 199-204 (1997).
- 11) Okrend, A. J. G., Rose, B. and Lattuada, C. P.: Isolation of *Escherichia coli* O157 specific antibody coated magnetic beads. *J. Food Prot.*, **55**, 214-217 (1992).
- 12) 尾上洋一, 古川一郎, 寺西 大, 長谷川幸江, 森 實, 小沼博隆: 挽き肉からの *Escherichia coli* O157:H7 の検出法の検討. 食衛誌, **38**, 185-189 (1997).
- 13) 坂崎利一: 志賀毒産生性 (腸管出血性) 大腸菌—細菌学的性状, 病原性および発症機序—. 日食微誌, **13**, 187-193 (1997).
- 14) 竹田美文: 大腸菌による出血性大腸炎. 微生物, **3**, 137-142 (1987).
- 15) 竹田美文: 病原大腸菌に関する最近の動向について. 食品衛生研究, **41**(7), 7-16 (1991).
- 16) 田中 博, 西内 力, 近藤玲子, 木村真理, 目見田 清, 菊池正健, 塚本定三, 奥 裕一, 山崎伸二, 竹田美文: Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の輸入食肉からの分離. 感染症誌, **65**, 175-180 (1991).
- 17) 渡邊治雄: 腸管出血性大腸菌 O157:H7 による食中毒とその予防. 食品衛生研究, **46**(8), 7-16 (1996).
- 18) Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Martin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Potter, M. E., Tauxe, R. V. and Wachsmuth, I. K.: Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 985-989 (1991).
- 19) Zadic, P. M., Chapman, P. A. and Siddons, C. A.: Use of tellulite for the selection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 155-158 (1993).