

# 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性大腸菌の血清型について

松本 紀子・谷脇 妙・絹田 美苗\*・千屋 誠造

## Serotypes of *Campylobacter* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Bovine Bile and Liver

Noriko MATSUMOTO, Tae TANIWAKI, Minae KINUTA\* and Seizo CHIYA

**【要旨】** 平成16年6月～19年1月に高知県内の食肉処理場に搬入された牛の胆汁及び肝臓のカンピロバクター並びに志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の汚染実態について調査した。カンピロバクターについては、牛318頭中74頭（23.3%）の胆汁から、牛165頭中2頭の肝臓から検出され、すべて *Campylobacter jejuni* であった。うち1頭は胆汁及び肝臓の双方から検出された。血清型は、O:4, 13, 16, 43, 50（O:4-complex）が一番多く検出され、次にO:2であった。STECについては、牛318頭中1頭（0.3%）の胆汁から、牛165頭中7頭（4.2%）の肝臓から検出され、うち1頭は同一牛から同時に検出された。血清型はO抗原、H抗原ともにUntypeableのものが多く、同じ血清型の株は検出されなかった。

Key words：牛、志賀毒素産生性大腸菌、カンピロバクター、胆汁、肝臓  
Bovine, Shiga toxin-producing *E.coli*, *Campylobacter*, Bile, Liver

### I はじめに

カンピロバクターは急性胃腸炎や食中毒の主要な原因菌であり、近年日本における食中毒発生件数は *C. jejuni/coli* によるものが一位を占めている (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>)。牛、豚、鶏などの家畜を含む動物の腸管内に広く常在し<sup>1-3)</sup>、特に鶏肉や牛および鶏のレバー等が胃腸炎や食中毒の主な原因食品と考えられている<sup>3)</sup>。カンピロバクターはグラム陰性でらせん状の形状をした微好気性菌であり、熱や乾燥に非常に弱く十分に加熱すれば容易に死滅する<sup>4)</sup>。しかし、日本では昔より生食する習慣があり、特に牛レバーは生食されることが多いと言われている。このため、平成17年2月に厚生労働省より「牛レバーにおけるカンピロバクター食中毒Q&A」が示された。

志賀毒素産生性大腸菌（STEC）による食中毒は、1996年5月に岡山県の小学校で発生したのを発端とし、

その後大阪府堺市の小学校で大規模な食中毒発生を見るなど全国で多発し大きな社会問題となった。また、高知県においても1991年にSTEC O111が初めて検出されて以来、毎年のように患者が発生している。牛はSTECの保菌動物として特に重要視されており、その検出について、数多く報告されている<sup>5-7)</sup>。

当所では平成7年より牛糞便、平成13年から牛胆汁、平成17年度から牛肝臓におけるカンピロバクター並びにSTECの汚染実態調査を行い報告してきた<sup>8-10)</sup>。今回は平成16年からの調査について血清型別の結果を中心に報告する。

### II 材料と方法

#### 1 材料

##### (1) 胆汁

平成16年6月から平成19年1月まで高知県内の食肉

\* 高知県中央東福祉保健所

処理場に搬入された肥育牛318頭について、胆のうから胆汁を無菌的に約10ml採取し検査材料とした。

## (2) 肝 臓

平成17年5月から平成19年1月まで、上記で胆汁を採取した肥育牛の内165頭について肝臓尾状葉を採取し、これを実験室にて滅菌したメス等で表面を取り除き、無菌的に中心部を20g採取し、TSB180ml加え1分間ストマックしたものを各検査に供した。

## 2 方法

### (1) カンピロバクター

検体をバツラー寒天培地に接種し、42℃で48時間微好気培養した。42℃の発育性、形態（グラム染色による鏡検）、ナリジクス酸及びセファロシン感受性試験、オキシダーゼテスト、馬尿酸塩加水分解試験により同定した。分離株についてはPenner法により血清型別を行った。

また、平成18年12月から肝臓の24検体についてはプレストン培地にて増菌培養も行った。

### (2) STEC

検体をDHL寒天培地、クロモアガーO157およびソルビトールマッコンキー寒天培地（SMAC）に直接分離培養し、大腸菌と思われるコロニーを20個釣菌し、PCR法にてstx遺伝子の確認を行った。

また、検体0.5mlを5mlのTSBに接種し培養後、さらにTSB培地5mlに増菌液0.5mlを接種し二次増菌培養した。これらの増菌液についてPCR法にてstx遺伝子の確認を行った。PCR法にて陽性の検体はその増菌液をDHL培地に接種し、stx遺伝子陽性の大腸菌を検索した。さらに、TSB増菌液をバイダスICEでO157のみ特異的に濃縮し、クロモアガーO157及びSMACに接種し分離培養した。

stx遺伝子陽性株については常法により生化学的性状で大腸菌と同定し、血清型別については病原大腸菌免疫血清により行った。

## Ⅲ 結 果

### 1 カンピロバクター

牛318頭の胆汁のうち74頭（23.3%）からカンピロバクターが検出され、すべて *C. jejuni* であった。また、肝臓からは165頭中2頭（1.2%）から *C. jejuni* が検出された。

胆汁から分離された *C. jejuni* 分離株は、8つの血清型に分けられた（表1）。O:4, 13, 16, 43, 50（O:4-complex）が30検体（40%）と一番多く検出され、次にO:2が13検体（17.3%）、O:23, 26, 53が4検体（5.3%）の順であった。また、15検体（20%）がUntypeable（UT）であった。

肝臓からの分離株は2検体ともO:2であった。うち1頭は胆汁からも同時に同じ血清型の *C. jejuni* が検出された。

表1 胆汁並びに肝臓における *C. jejuni* 分離数（%）及び血清型

	胆 汁	肝 臓
検査頭数	318	165
陽性数（%）	74(23.3)	2(1.2)
血清型		
1, 44	2( 2.7)	
2	13(17.3)	2(100)
3	4( 5.3)	
4, 13, 16, 43, 50 (O:4-complex)	30(40.0)	
5	1( 1.3)	
19	1( 1.3)	
23, 36, 53	4( 5.3)	
27	3( 4.0)	
Untypeable	15(20.0)	
Not Tested	1	

表2 胆汁及び肝臓から分離されたSTEC血清型

採取年月	胆 汁			肝 臓		
	血清型	stx型	eae	血清型	stx型	eae
H17. 5				O UT: H11	2	—
H17.10				O157: H21	1, 2	—
H17.11				O UT: H UT	1, 2	—
H18. 1				O UT: H21	2	—
H18. 5				O28: H UT	2	—
H18. 9	O91: H UT	1, 2	—	O91: H UT	1, 2	—
H18. 9				O UT: H UT	1, 2	—

UT : Untypeable

## 2 STEC

STECについては、胆汁から1頭(0.3%)、肝臓から7頭(4.2%)から検出された(表2)。うち1頭は胆汁及び肝臓から同時に検出され、その血清型はO91:HUTであった。検出されたSTECはすべて血清型が異なり、eae因子も陰性であった。

また、同じ胆汁及び肝臓からSTECと*C. jejuni*と同時に検出された検体はなかった。

## IV 考 察

牛318頭の胆汁中74頭(23.3%)からカンピロバクターが検出され、すべて*C. jejuni*であった。また肝臓からは165頭中2頭(4.2%)から*C. jejuni*が検出された。Saitoら<sup>2)</sup>は牛の胆汁から21.8%の*C. jejuni*を、Açikら<sup>11)</sup>は胆嚢から30.3%検出しており、今回の結果はこれらとほぼ同様の検出率であった。

これらの血清型をPenner法にて調べたところ8タイプに分かれ、O:4-complexが30検体(40.0%)と一番多く、次がO:2(13検体、17.3%)、O:23,36,53(4検体、5.3%)の順であった。また、UT株が15頭(20.0%)から検出された。Saitoら<sup>2)</sup>が行った調査では、牛の糞便と胆汁からの合算であるが、O:2(23.8%)が一番多く分離され、次にO:4-complex(16.7%)、O:23,36,53(14.3%)の順であった。また、Ishiharaら<sup>12)</sup>の調査では牛由来株において、O:2とO:4-complexが各21.1%と一番多く、次がO:23,36,53(10.5%)という結果であり、今回の調査での結果もこれらと同様の傾向であった。さらに、Saitoら<sup>2)</sup>は人の下痢症患者及び鶏由来の*C. jejuni*血清型についても調査しているが、牛由来株と同じくO:2とO:4-complexが多数検出されていることから、人の*C. jejuni*感染症と牛及び鶏の関連が示唆された。

肝臓については165頭中2頭(1.2%)から*C. jejuni*が検出され、その血清型はどちらもO:2であった。2頭のうち1頭は同一牛の胆汁からもO:2の*C. jejuni*が検出され、また残りの1頭も同日に検体採取した同一農場で生産された牛の胆汁からO:2の*C. jejuni*が検出された。このことから、胆汁を汚染している*C. jejuni*が上行性に肝臓の実質も汚染すると考えられる。

STECについては、1頭(0.3%)の胆汁、7頭(4.2%)の肝臓から検出され、うち1頭は同一牛の胆汁及び肝臓から同じ血清型(O91:HUT)の株が検出された。STECについても胆汁から肝臓実質へ上

行性に汚染していくことが示唆された。

胆汁及び肝臓から分離したSTEC血清型はUTが多く、同じ血清型の株は検出されなかった。中嶋ら<sup>7)</sup>が平成17年度に牛の糞便から分離されたSTECの血清型を調査したところ、OUTもしくはHUT株が多数を占めておりこれと同じ傾向であった。また、検出されたSTECはすべてeae因子が陰性であり、人から多く検出される株とは異なっていた。しかし、牛糞便からはSTEC O157:H7など人のSTEC感染症患者から分離される株も検出されており<sup>6-9)</sup>、牛肝臓もこれらの株に汚染される可能性がある。

同一牛の胆汁並びに肝臓からSTECと*C. jejuni*が同時に検出された例はなかった。しかしSTECの分離数が少なく、この両菌がお互いを抑制しあうかどうかは不明である。

最後に、今回同じ牛の胆汁及び肝臓から同じ血清型の*C. jejuni*及びSTECが同時に検出された牛が各々1頭づつ発見され、胆汁から肝臓への菌の移行が確認された。これは胆管などを通じたものと考えられ、処理段階で衛生的な取り扱いをしても汚染をさけることは不可能と考える。従って、生レバーからほかの食品への二次汚染を防ぐよう食品の取り扱いに注意する、生食をなるべく避けるなど、食肉取り扱い業者、飲食店、消費者への一層の啓発が重要であると考えられる。

## V 参考文献

- 1) Kazuaki Ono and Katsuhiko Yamamoto: Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 211-219, 1999.
- 2) Shioko Saito, et al.: *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile, and human diarrheal samples in Japan: Comparison of serotypes and genotypes., *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45, 311-319, 2005.
- 3) Keiko Yokoyama: Occurrence of *Campylobacter* Food Poisoning., *Jpn. J. Food Microbiol.*, 23(3), 109-113, 2006.
- 4) Simon F. Park: The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens., *International Journal of Food Microbiology*, 74, 177-188, 2002.

- 5) 田中博ら：家畜および愛玩動物からのVero毒素産生性大腸菌の分離. 感染症誌, 66, 445-448, 1992.
- 6) 多田博ら：PCR法を用いた肥育牛からのVero毒素産生性大腸菌の検出. 感染症誌, 66, 1383-1389, 1992.
- 7) 中嶋洋ら：岡山県における感染症胃腸炎起因菌の流行疫学調査（平成17年度），岡山県環境保健センター年報, 30, 85-88, 2006.
- 8) 安岡富久ら：高知県内産の肥育牛におけるペロ毒素産生性大腸菌の検出. 高知衛研報, 42, 31-34, 1996.
- 9) 安岡富久ら：病原微生物環境汚染サーベイランス. 高知衛研報, 47, 31-39, 2001.
- 10) 松本紀子ら：牛胆汁中における病原微生物汚染状況について. 高知衛研報, 51, 33-36, 2005.
- 11) M.N. Aık and B. etinkaya: The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle., Letters in Applied Microbiology, 41, 397-403, 2005
- 12) Ishihara K, et al.: Comparison of *Campylobacter* isolated from human and food-producing animals in Japan., Journal of Applied Microbiology, 100, 153-160, 2006.