

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金事業協力研究報告書

と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査

(と畜場に搬入された牛の O26、O157 保菌調査)

岩手県食肉衛生検査所

研究要旨

管内のと畜場に搬入された牛 130 頭について直腸内容物、口腔内唾液、一部剥皮後切皮部ふき取り（肛門周囲）、外皮ふき取り（肛門周囲）および枝肉ふき取り（胸部及＋肛門周囲）を材料として腸管出血性大腸菌（EHEC）O26、O157(以下 O26、O157 と略す)の分離を試みた結果、130 頭中 1 頭（0.9 %）の直腸内容物から O26 が分離され、130 頭中 13 頭（10.0%）の直腸内容物、50 頭中 7 頭の外皮（14.0%）、90 頭中 9 頭の一部剥皮後切皮部（10.0%）から O157 が分離された。

生産者別では 27 生産者のうち 11 生産者（40.7%）で O26 または O157 が分離された。また、同一生産者が同じ日に出荷した複数の牛から同一の PFGE パターンの O157 が分離された。一方、同一生産者が異なる日に出荷した牛からは PFGE パターンの異なる O157 が分離され、O157 に高度に汚染された農場の存在が確認された。

これらの結果から、と畜場に搬入される牛は EHEC 特に O157 の重要な汚染要因であることが再確認された。

さらに、同一個体の直腸内容物、一部剥皮後切皮部および外皮由来の O157 は PFGE パターンが同じであったことから、一部剥皮工程が汚染要因であることが示唆された。

今後、と畜場における高度衛生管理のためには生産段階からと畜場搬入、解体処理にわたる全ての過程で EHEC 特に O157 のコントロールが重要と考えられた。

A. 研究目的

と畜場における高度衛生管理（HACCP）確立のための基礎資料とするため平成 16 年度に実施した病原体汚染実態調査に継続して、牛が保有する重要な危害である O26、O157 を対象にと畜場搬入牛の保菌状況を調査した。

B. 検査方法

1. 検査材料

平成 17 年 4 月～18 年 4 月に管内の A 食肉センターに搬入された牛 130 頭の糞便

（130 検体）、口腔内唾液（60 検体）、外皮ふき取り（50 検体、肛門周囲）、一部剥皮後切皮部ふき取り（90 検体、肛門周囲）および枝肉ふき取り（130 検体、胸部＋肛門周囲）を検査材料とした。

糞便は内臓摘出後、汚染しないように直腸便を採取した。

唾液はと殺後、滅菌綿棒（メンテップ綿球径 2cm）で口腔内をぬぐって唾液を採取した。

外皮はと殺後、剥皮前に増菌培地（mEC）10mL を加えたふき取り検査用滅菌スポンジ（WHIRL PAK）で肛門周囲部 10×10cm<sup>2</sup> をふき取った。一部剥皮後

切皮部は肛門周囲の切皮部を中心に 10×10cm<sup>2</sup> をふき取った。枝肉は胸部 10×10cm<sup>2</sup> および肛門周囲部 10×10cm<sup>2</sup> をふき取り、併せて 1 検体とした。

## 2. 方法

### 1) O26、O157 分離

材料（糞便、唾液は各 1g、スポンジは 1 個）を novobiocin 添加 mEC (NmEC) に接種し 42°C で 18～24 時間培養後、O26 および O157 免疫磁気ビーズ (DYNAL) で集菌処理して各分離培地を用い 36°C で 18～24 時間分離培養を行った。O26 の分離培地は Cefixime-Tellurite 添加 Rhamnose MacConkey (CT-RMAC) を O157 は CT 添加 Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) およびクロモアガー-O157 (CHROM agar) を用いた。O26、O157 を疑うコロニーについて TSI、LIM、CLIG で生化学性状を確認し、O26、O157 診断用免疫血清 (デンカ生研) でスライド凝集反応を行った。

スライド凝集反応で陽性の菌株については市販の RPLA 法による毒素検出キット (デンカ生研) を用いてベロ毒素 (VT) 産生性試験を行った。

### 2) 分離菌株の血清型別、病原因子、パルスフィールドゲル電気泳動、薬剤感受性試験

山形県衛生研究所において O26、O157 について血清型別、PCR による病原因子 (VT、eae) の確認、PFGE (制限酵素: Xba I) および薬剤感受性試験 (ABPC、SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、NFLX、GM、NA、FOM) を実施した。

## C. 結果

### 1) EHEC (O26、O157) 分離成績

牛 130 頭について検査した結果、O26 は 7 月に 1 頭の直腸内容物から分離され、

O157 は 13 頭の糞便、2 頭の外皮、9 頭の一部剥皮後切皮部から分離された (表 1)。

牛の種類別では O26 が F1 (1 頭) から分離され、O157 は黒毛和種 (3 頭)、ホルスタイン (6 頭)、F1 (10 頭)、ジャージー種 (1 頭) から分離された。分離率はホルスタイン種が最も高く (20.7%)、次いで F1 (16.1%)、黒毛和種 (9.1%) の順であった。対象牛の月齢はジャージー種 (49 ヶ月齢) を除きすべてが 32 ヶ月以下の肉用牛であった (表 2)。

検査月別では 6 月から 9 月にかけて分離率が高かったが、11、12 月においても O157 が分離された (表 3)。

生産者別では、年間 1 回の検査 (1 農場あたりの平均検査頭数 2.6 頭) で陽性であった農場は 7 戸で、全体の 25.9% (陽性農場の 64%) であった。年間 2 回以上の検査 (1 農場あたりの平均検査頭数 3.8～4.8 頭) で陽性であった農場は 4 戸で、全体の 14.8% (陽性農場の 33%) であった。このうち 4 回検査された 2 農場についてはいずれも 2 頭以上の陽性牛が認められた。一方、5 回検査された 1 農場からは一度も分離されなかった (表 4)。

検体の組み合わせ別では、直腸内容物・外皮・切皮部を検査した 30 頭のうち 3 頭から O157 が分離された。直腸内容物だけが陽性である個体が最も多かったが、一方で、外皮・切皮部が陽性であるにもかかわらず、直腸内容物から O157 が分離されない個体が 7 頭認められた。また切皮部陽性個体の多くは直腸内容物や外皮においても陽性であった。(表 5、6)。

### 2) 分離菌株の病原因子、PFGE パターン、薬剤感受性

分離株株中のうち eae の検査と PFGE を実施した 21 頭由来の菌株はすべて EHEC の病原因子の一つである eae を保有していた。また、PFGE パターンは同じ日に同じ生産者が出荷した複数頭由来の O157 で一

致していた。また、同一個体の直腸内容物・外皮・切皮部から分離された菌の PFGE パターンが同じであった。この他にも同一個体の複数箇所から分離された O157 の PFGE 型は同一であるか類似のパターンを示した。

薬剤感受性は O26 では 1 株 (1 頭由来) が ABPC、SM、TC、ST 耐性を示した。O157 で SM、TC に耐性を示す株が 7 頭由来 13 株、SM 耐性株 1 頭由来 1 株で、その他は耐性と感受性の中間性を示した (表 7)。

#### D. 考察

今回の調査では、検査した牛直腸内容物の 0.8% から O26 が分離され、10.0% から O157 が分離されたことからと畜場搬入牛は腸管出血性大腸菌の重要な汚染要因であることが再確認された。

O157 については全国的に調査が行われ、乳用牛に比べ和牛や F1 などの肥育牛で高い保菌の傾向があることが知られている。また、牛からは季節的には夏季に高率に分離されること、生産者によって分離率に差があることなどが報告されている。

今回調査では牛の種類別 EHEC 保有率については、黒毛和種が低く、ホルスタインが高い傾向が認められたものの、菌の保有率が高いことは肉用牛としての飼養管理であることや、牛群の保菌状況の影響が大きいと思われた。

検査月別では、O26 は 7 月に 1 回分離されたが、O157 は 6、8、9、11、12、1 月に分離された。このことから夏季における保菌率は最も高いが、春～夏においても保菌率が高いことが推測された。一方で、冬季においても菌が分離されたことから年間を通して注意が必要と思われた。

生産者別 (農場別) では菌の検出にいくつかの特徴が見られた。1 年に 1 回検査される出荷頻度の農場のうち、陽性農場は

25.9% (陽性農場全体に占める割合は 64%) であり、全陽性頭数の 38% を占めていた。一方、1 年に 4 回検査された農場は 2 農場であったが、O157 が 2 回または 3 回にわたって複数頭検出され、この 2 農場の陽性数が陽性頭数全体の 52% を占めていた。このように牛群に菌が蔓延し定着していることが窺われる農場は最も重要な汚染源であると思われた。

また、同一生産者由来の複数の牛で同じ PFGE パターンの O157 が分離されたことから同一牛舎内で牛の間に同じクローンの O157 が維持されている高度に汚染された生産者の存在が確認された。一方、複数回の調査で同じ生産者由来の牛から異なる PFGE パターンの O157 が分離されたことから、O157 は遺伝子変異をしながら牛群内で維持されていることや、人や物の移動に伴って新しい遺伝子型の O157 が牛群に入っている可能性が考えられた。

同一個体の直腸内容物、外皮、切皮部から分離された O157 の PFGE パターンが一致したことから、飼育舎における腸管内保有が体表付着につながり、一部剥皮工程において枝肉の二次汚染が引き起こされる汚染経路が証明された。今回の調査では枝肉からは O157 は検出されなかったが、一時的にでも枝肉に付着したことが判明したことから、一部剥皮工程は衛生管理のうえで最も重要であると思われた。

次に、今回分離株の薬剤感受性を調査した結果、O26 で 1 株が ABPC、SM、TC、ST に耐性を示し、O157 で 13 株が SM、TC に、1 株が SM に対して耐性を示した。また、ほとんどの株で、複数の薬剤に対して耐性と感受性の中間の反応を示したことから、生産段階で新たな薬剤耐性菌を作らないための対策と薬剤耐性菌に汚染された食肉を介した人へ感染防止対策の重要性が確認された。

以上、今回の調査から EHEC 特に O157

は牛が保有する重要な微生物学的危害であり、と畜場の衛生を確保していくためには生産段階からと畜場搬入、解体処理の全て過程で O157 のコントロールが重要と考えられた。

表 1. 検査材料別による EHEC O157,O26 検出結果

材 料	検体数	O157 陽性数(%)		O26 陽性数(%)	
直腸内容物	130	13	(10.0)	1	(0.8)
口腔内唾液	60	0		0	
外皮	50	7	(14.0)	0	
一部剥皮後切皮部	90	9	(10.0)	0	
枝 肉	130	0		0	

表 2. 牛の種類別および月齢別 EHEC O157,O26 検出結果

月齢区分 (ヶ月)	黒毛和種			ホルスタイン種			交雑種(F1)			その他 (日本短角種、ジャージー種)		
	検査 頭数	O157 陽性 頭数	O26 陽性 頭数	検査 頭数	O157 陽性 頭数	O26 陽性 頭数	検査 頭数	O157 陽性 頭数	O26 陽性 頭数	検査 頭数	O157 陽性 頭数	O26 陽性 頭数
~20	0			16	6	0	0			0		
21,22	0			13	0	0	0			0		
23,24	0			0			1	0	0	1	0	0
25,26	2	0	0	0			31	5	1	2	0	0
27,28	13	2	0	0			26	5	0	2	0	0
29,30	7	0	0	0			4	0	0	0		
31~40	11	1	0	0			0			0		
41~	0			0			0			1	1	0
合計頭数 (%)	33	3 (9.1)	0 (0.0)	29	6 (20.7)	0 (0.0)	62	10 (16.1)	1 (1.6)	6	1 (16.7)	0 (0.0)

表 3. 検査月別による EHEC O157,O26 検出

検査月	検査頭数	EHEC O157 陽性頭数(%)*		EHEC O26 陽性頭数(%)*	
4月	10	0	(0.0)	0	(0.0)
5月	0	0		0	
6月	20	7	(35.0)	0	(0.0)
7月	20	0	(0.0)	1	(5.0)
8月	10	4	(40.0)	0	(0.0)
9月	10	5	(50.0)	0	(0.0)
10月	10	0	(0.0)	0	(0.0)
11月	10	1	(10.0)	0	(0.0)
12月	10	2	(20.0)	0	(0.0)
1月	10	1	(10.0)	0	(0.0)
2月	10	0	(0.0)	0	(0.0)
3月	10	0	(0.0)	0	(0.0)
合計	130	20	(15.4)	1	(0.8)

※当該検査月における陽性率

表 4. 生産者の出荷回数別による EHEC(O157 または O26)検出

検査回数	検査農場数	検査頭数		陽性農場数 (%)* <sup>1</sup>	陽性頭数 (%)* <sup>2</sup>
1	22	57	1頭のみ陽性	6 (22.2)	6 (4.6)
			2頭以上陽性	1 (3.7)	2 (1.5)
			小計	7 (25.9)	8 (6.2)
2	2	19	1頭のみ陽性	2 (7.4)	2 (1.5)
			2頭以上陽性		
			小計	2 (7.4)	2 (1.5)
4	2	35	1頭のみ陽性		
			2頭以上陽性	2 (7.4)	11 (8.5)
			小計	2 (7.4)	11 (8.5)
5	1	19	1頭のみ陽性		
			2頭以上陽性		
			小計		
合計	27	130		11 (40.7)	21 (16.2)

※1 全農場数に対する陽性率

※2 全検査頭数に対する陽性率

表 5. 同一個体における検体組み合わせと検査頭数

直腸 内容物	唾液	外皮	切皮部	枝肉	検査頭数
○	○	○	○	○	30
○	○			○	10
○	○	○		○	20
○			○	○	60
○				○	10
合計					130

表 6. 同一個体における検体組み合わせ別の EHEC O157 検出

直腸 内容物	唾液	外皮	切皮部	枝肉	陽性頭数
+	-	+	+	-	3
+	-	+	NT	-	1
+	-	-	+	-	1
-	-	+	+	-	1
+	-	- or NT	- or NT	-	8
- or NT	-	+	- or NT	-	2
-	-	NT	+	-	4

+: 陽性

-: 陰性

NT: not tested

表 7. O26、O157 が分離された牛および分離菌株の概要

個体 番号	分離年月日	牛の種類	材料	O	H	VT 型	eae	PFGE 型	薬剤耐性 (中間型)	生産者
79	2005/6/6	F1	便	157	7	1,2	+	G	SM,TC	青森県上北郡 E
80	2005/6/6	F1	便	157	7	1,2	+	G	SM,TC	青森県上北郡 E
84	2005/6/6	ホルス	便	157	7	2	+	H	SM	青森県三戸郡 A
90	2005/6/27	黒毛	外皮	157	7	2	+	I-1	感受性	宮城県登米市 D
91	2005/6/27	ホルス	便	157	7	2	+	I-3	(SM)	青森県三戸郡 A
92	2005/6/27	ホルス	便	157	7	2	+	I-3	感受性	青森県三戸郡 A
94	2005/6/27	ホルス	外皮	157	7	2	+	I-2	(SM)	青森県三戸郡 A
	2005/6/27	ホルス	便	157	7	2	+	I-3	感受性	青森県三戸郡 A
102	2005/7/4	F1	便	26	-	1	+	O26Q	ABPC,SM, TC,ST	青森県上北郡 C
119	2005/8/22	F1	便	157	7	2	+	K	感受性	青森県十和田市 A
123	2005/8/22	F1	外皮	157	7	2	+	L	(TC,CTX)	青森県十和田市 A
	2005/8/22	F1	切皮部	157	7	2	+	L	(TC,CTX)	青森県十和田市 A
124	2005/8/22	F1	便	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/8/22	F1	外皮	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/8/22	F1	切皮部	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
125	2005/8/22	F1	便	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/8/22	F1	外皮	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/8/22	F1	切皮部	157	7	1,2	+	M	SM,TC	青森県上北郡 E
130	2005/9/5	ジャージー	便	157	7	2	+	N	(SM,TC)	岩手県二戸郡 A
131	2005/9/5	F1	便	157	7	2	+	O	感受性	岩手県稗貫郡 A
	2005/9/5	F1	切皮部	157	7	2	+	P	感受性	岩手県稗貫郡 A
133	2005/9/5	F1	外皮	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
134	2005/9/5	F1	便	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/9/5	F1	便	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/9/5	F1	外皮	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
135	2005/9/5	F1	外皮	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
	2005/9/5	F1	切皮部	157	7	1,2	+	Q	SM,TC	青森県上北郡 E
147	2005/11/7	ホルス	切皮部	157	7	2	NT	NT	NT	福島県双葉郡 A
158	2005/12/5	黒毛	切皮部	157	7	2	NT	NT	NT	岩手県九戸郡 J
159	2005/12/5	黒毛	切皮部	157	7	2	NT	NT	NT	青森県十和田市 C
174	2006/1/30	ホルス	切皮部	157	7	1,2	NT	NT	NT	青森県十和田市 B



厚生科学研究費補助金  
(食品の安全性高度化推進事業)  
分担研究報告書

群馬県食肉衛生検査所 間 渕 徹

と畜場における HACCP に関する研究

と畜場における高度衛生管理システムを確立する基礎的データを得るため、と畜場に搬入された牛の EHEC O157、O26 の汚染実態調査を行った。EHEC O157 のみ、外皮から 60 頭中 3 頭(5%)、直腸便から 125 頭中 12 頭(9.6%) 検出された。同一と体の直腸便と外皮から同一菌株が検出(1 頭)され、同一農場で飼育された牛から同一菌株が検出(2 頭)された。このことから、衛生的なと殺解体処理工程の確立や農場での衛生的な施設・飼育管理が EHEC 汚染防止対策に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(以下、EHEC)は、牛がその腸管内等に保菌していることが知られており、と畜場での衛生的なと殺解体処理工程を確立することが重要な課題とされてきた。

そこで今回、と畜場における衛生管理システムを構築するための基礎的データを得る目的で、当検査所が管轄する県内 A と畜場に搬入された牛の EHEC O157(以下、O157)、O26 の保菌および汚染調査を実

施した。

B. 検査方法

1) 材料および方法

平成17年3月～平成18年3月の間、県内 A と畜場に健康牛として搬入された牛125頭(黒毛和種31頭、交雑種94頭)について、1と体あたり5検体(外皮、一部剥皮後と体、枝肉、口腔、直腸便)を採材した。ただし、平成17年3～5月採材の30頭分は3検体(枝肉、口腔、直腸

便)、平成17年12月～平成18年3月採材の35頭分については直腸便のみを採材した。なお、これらの対象牛は全体で33農場から出荷されたもので、このうち複数頭(2～31頭)を出荷した農場は22農場(全体で114頭)であった。

## 2) 分離培養

外皮はと殺直後の肛門周囲部を、一部剥皮後と体については後肢部を剥皮した状態における肛門周囲部を、枝肉については洗浄後の胸部及び肛門周囲部の2ヶ所を、滅菌スポンジ(Nasco WHIRL-PAK、mEC ブイヨン(以下、mEC)(OXOID)10mlを予め添加)で、各10×10cmを拭き取った。口腔については滅菌綿棒で唾液を拭き取り、直腸便は直腸を切開し滅菌薬匙で採取し、それぞれ1gを検体とした。

外皮、一部剥皮後と体および枝肉については、拭き取ったスポンジにノボビオシン加mEC(以下、N加mEC)40mlを加え、2分間のストマッキングにより均質化し、42℃にて18時間培養した。なお、増菌培養前に各検体とも陽性検体定量用として試料原液2mlを小分けし、冷蔵にて保存した。

唾液および直腸便については、それぞれ1gに50mlのN加mECを加え、2分間のストマッキングにより均質化し、42℃にて18時間培養した。これらについても、増菌培養前に陽性検体定量用として試料原液3mlを小分けし、冷蔵にて保存した。

増菌培養後、ビーズ(DYNAL社)法にて集菌し、O157分離にはセフェキシム亜テルル酸カリウム(OXOID)加ソルビトールマッコンキー寒天培地(OXOID)(以下、CT-SMaC)およびクロモアガーO157

寒天培地(関東化学)を、O26分離にはセフェキシム亜テルル酸カリウム(OXOID)加ラムノースマッコンキー寒天培地(ラムノース/関東化学 MacConkey Agar Base/DIFCO)(以下、CT-RMaC)を用い、37℃にて24時間培養した。

## 3) 同定・定量・各種試験

選択培養後、疑わしいコロニーをO抗原免疫血清(デンカ生研)でスクリーニングし、生菌凝集が認められたものをCLIG(O157のみ、KYOKUTO)、TSI培地(ニッスイ)およびLIM培地(ニッスイ)にて生化学性状を確認し、IDテストEB-20(ニッスイ)を用いて菌の同定を行った。

O157またはO26が分離された検体については、菌数測定を行った。冷蔵にて保存しておいた該当の試料原液1mlを用い、3枚のCT-SMaC平板に0.3、0.3、0.4mlずつコンラージにて塗布し、37℃にて24時間培養した。培養後、典型的なコロニーを数え、各培地から5コロニーについて性状試験を行い、その結果から定量を行った。

O157またはO26と判定された菌株については、TaKaRa One Shot PCR Kit(TaKaRa)を用いベロ毒素(VT)遺伝子の検出を、逆受身ラテックス凝集試験(デンカ生研、VTEC-RPLA)によりVT産生性試験を行い、VT産生性の確認された菌をEHECとした。

また、EHECと確認された菌株について、薬剤耐性試験、パルスフィールド・ゲル電気泳動法(以下、PFGE)を行い[いずれも山形衛生研究所で実施]、これにより得られたDNA切断パターンをもとに菌株間の関係を比較・解析した。

## C. 研究結果（別表参照）

### 1) 検出状況

O157 は外皮においては60頭中3頭(5.0%)から、直腸便においては125頭中12頭(9.6%)から検出された。このうち、同一と体の外皮および直腸便から検出されたものは個体 No. 111 の1頭であった。それ以外については、外皮のみ、あるいは直腸便のみから検出された。

また、一部剥皮後と体、枝肉および口腔のいずれからでもO157 は検出されなかった。

畜種別では、O157 の直腸便からの検出(12頭)は、黒毛和種で3/31(9.7%)、交雑種で9/94(9.6%)であった。これら12株は33農場中9農場から検出された。

外皮からの検出はいずれも交雑種においてであり、33農場中3農場からであった。

なお、O26 はどの検体からも検出されなかった。

### 2) 菌数測定

O157 陽性検体で菌数測定を行った13検体(外皮試料3検体、直腸便試料10検体)のうち、8検体が検出限界以下で測定不可能であった。他の5検体は $10^2$ ~ $10^5$ CFU/g と検体により差が認められた。

(いずれも、直腸便試料)

### 3) 毒素産生試験等

VT 産生性は分離された15株すべてで確認され、毒素型別では2型が9株で最も多く、1・2型が5株、1型が1株であった。由来別では外皮由来(3株)は2型が2株、1・2型が1株であり、直腸便由来(12株)は、2型が7株、1・2型が4

株、1型が1株であった。

また、PFGE 試験の結果では、複数の菌株で同一型を示したものが2グループ(群J: 個体 No. 111 の外皮・直腸便由来株および No. 117 の外皮由来株/群 N-1: No. 149 および No. 150 それぞれの直腸便由来株)認められ、他の9株はすべて異なる型であった。(1株は未検査)

薬剤耐性試験の結果では、6株で耐性が認められ、うち4株(個体 No. 127、142、146、151)は同一のパターン(SM・TC 耐性)を示し、他の8株は感受性であった(1株は未検査)。これらの試験結果が、複数の個体由来株で、すべて同一のパターンを示す菌株が2株認められた。(①No. 111 および 117/②No. 149 および 150)。

## D. 考察およびまとめ

今回の調査の結果、健康牛の9.6%の直腸便からO157 が検出されたことにより、と殺解体処理工程での汚染防止が重要であるということが再認識された。

また、一部剥皮後と体および剥皮・洗浄後枝肉からは検出されなかったものの、外皮からO157 が検出されていることから、不適切な処理方法によっては枝肉の汚染が懸念された。

直腸便からのO157 の検出率においては黒毛和種・交雑種に差はなかったが、同一農場で複数頭から検出していることから、牛の飼育段階での汚染伝搬が示唆された。

同一個体(No. 111)の外皮および直腸便から同一性状のO157 が検出されたことは、農場段階での直腸便からの外皮汚染が考えられた。

また、他農場の牛にもかかわらず、同日搬入牛の外皮から同一性状のO157 が検出されたことは、両者のと殺順番が近いことから、係留場内での汚染が疑われた。

また、同一農場から出荷され同日にと殺された牛でも、同一の性状のO157 を保菌するものであれば、異なる性状（PFGE・薬剤耐性）のO157 を保菌するものも認められ、同一農場でも多様なO157 による汚染があるものと考えられた。

以上のことから、と殺解体処理工程において次のことが重要であると思われた。

- ① 糞便が外皮に付着した牛（いわゆるヨロイ牛）の搬入はさせない。
- ② 生体の洗浄を十分行い、係留場内での牛同士の接触を防止する。
- ③ 処理工程中では食道結紮、肛門結紮等の消化管内容物の漏出防止処理を適切に行う。
- ④ 剥皮作業において、ナイフ等の器具使用手順の遵守、器具・手指の適切な洗浄消毒を行う。
- ⑤ 内臓摘出時には消化管等を損傷することなく適切に行う。

また、同一農家の複数牛からO157 が検出されていることから、調査結果を当該農場へフィードバックし、農場内の施設管理・飼育管理等の改善を促すことも重要と考えられた。

別表 分離 EHEC 株の血清型・ベロ毒素(VT)産生性・各種性状一覧

個体 No.	検 体		血清型		VT 産 生性	PFGE	薬剤耐性		農家
	採材日	部位	O	H			R	I	
99	5/24	便	157	7	1	群 F-2	感受性		群馬県前橋市C
109	7/25	便	157	7	2	群 I		SM,KM,NA	群馬県新田郡E
111	7/25	外皮	157	7	2	群 J	感受性		群馬県新田郡B
		便	157	7	2	群 J	感受性		
117	7/25	外皮	157	7	2	群 J	感受性		群馬県新田郡A
120	7/27	便	157	7	2	群 K	感受性		群馬県新田郡A
127	7/27	便	157	7	1・2	群 L-1	SM,TC		群馬県前橋市L
140	8/25	便	157	7	2	群 M-1	感受性		群馬県北群馬郡G
142	8/25	便	157	7	2	群 M-2	SM,TC		群馬県北群馬郡H
146	8/25	外皮	157	7	1・2	群 L-2	SM,TC		群馬県新田郡D
149	9/26	便	157	7	1・2	群 N-1	感受性		埼玉県大里郡B
150	9/26	便	157	7	1・2	群 N-1	感受性		埼玉県大里郡B
151	9/26	便	157	7	1・2	群 O	SM,TC		埼玉県大里郡B
163	9/29	便	157	7	2	群 N-2		SM,KM	群馬県前橋市L
190	12/20	便	157	未	2	未検査	未検査	未検査	群馬県伊勢崎市A

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金事業協力研究報告書

と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査

(と畜場搬入牛の O26、O157 保菌調査)

静岡県東部食肉衛生検査所

研究要旨

管内のと畜場に搬入された牛 61 頭の糞便 (61 検体)、唾液 (61 検体) および外皮 (25 検体) から腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26、O157(以下 O26、O157 と略す)の分離を試みた結果、2 頭 (3.3 %) の糞便から O26 が分離され、13 頭 (21.3%) の糞便、2 頭の唾液 (3.3%)、2 頭の外皮 (8.0%) から O157 が分離された。

生産者別では 30 生産者のうち 14 生産者 (46.6%) で O26 または O157 が分離された。このうち 1 生産者由来の牛 (1 頭) の糞便から O26 と O157 が同時に分離された。また、同一生産者が同じ日に出荷した複数の牛から同一の PFGE パターンの O157 が分離された。一方、同一生産者が異なる日に出荷した牛からは PFGE パターンの異なる O157 が分離され、O157 に高度に汚染された農場の存在が確認された。

分離菌株の薬剤感受性試験では、O26 (1 株) が ABPC、SM、KM に耐性を示し、O157 (2 株) は ST、TC に 1 株は SM に耐性を示した。

これらの結果から、と畜場に搬入される牛は EHEC 特に O157 の重要な汚染要因であることが再確認された。

今後、と畜場における高度衛生管理のためには生産段階からと畜場搬入、解体処理にわたる全ての過程で EHEC 特に O157 のコントロールが重要と考えられた。

A. 研究目的

と畜場における高度衛生管理 (HACCP) 確立のための基礎資料とするため平成 16 年度に実施した病原体汚染実態調査に継続して、牛が保有する重要な危害である O26、O157 を対象にと畜場搬入牛の保菌状況を調査した。

B. 検査方法

1. 検査材料

平成 17 年 4 月～17 年 9 月に管内の A 食肉センターに搬入された牛 61 頭の糞便 (61 検体)、唾液 (61 検体) および外皮 (25 検

体) を検査材料とした (表 1、2、3)。

糞便は内臓摘出後、汚染しないように直腸便を採取した。

唾液はと殺放血後、滅菌綿棒 (メンテップ綿球径 20 mm) で口腔内をぬぐって唾液を採取した。

外皮はと殺後、剥皮前に増菌培地 (novobiocin 添加 mE C) 10ml を加え拭取り検査用滅菌スポンジ (WHIRL PAK) で肛門周囲部を 10×10cm<sup>2</sup> を拭取った。

2. 方法

1) O26、O157 分離

材料 (糞便、唾液は各 1g、スポンジは 1 個) を novobiocin 添加 mE C (NmE C)

に接種し 42℃で 18～24 時間培養後、O26 および O157 免疫磁気ビーズ (DYNAL) で集菌処理して各分離培地を用い 36℃で 18～24 時間分離培養を行った。O26 の分離培地は Cefixime-Tellurite 添加 Rhamnose MacConkey (CT-RMAC) を O157 は CT 添加 Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) およびクロモアガー O157 (CHROM agar) を用いた。O26、O157 を疑うコロニーについて TSI、LIM、cLIG で生化学性状を確認し、O26、O157 診断用免疫血清 (デンカ生研) でスライド凝集反応を行った。

スライド凝集反応で陽性の菌株については市販の RPLA 法による毒素検出キット (デンカ生研) を用いて志賀毒素 (Stx) の試験を行った。

## 2) 分離菌株の血清型別、病原因子、パルスフィールドゲル電気泳動、薬剤感受性試験

山形県衛生研究所において O26、O157 について血清型別、PCR による病原因子 (Stx、eae) の確認、PFGE (制限酵素: Xba I) および薬剤感受性試験 (ABPC、SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、NFLX、GM、NA、FOM) を実施した。

## 3) 外皮の汚染状況調査

肛門周囲部 20×20 cm 程度の範囲について糞便等の汚染状況を目視で観察記録した。判定は糞便等の汚染なし (-)、面積の 1/4 の汚染 (+)、1/2 汚染 (++)、3/4 以上の汚染 (+++) に分類した。

## C. 結果

### 1) EHEC (O26、O157) 分離成績

4 月～9 月の期間に牛 61 頭について検査した結果、O26 は 5 月に 2 頭の糞便から分離され、O157 は 5 月～9 月に 13 頭の糞便、2 頭の唾液、2 頭の外皮から分離された (表 4、5、6)。

品種別の糞便からの分離状況は O26 が F1、ジャージ (各 1 頭)、O157 は黒毛和種 (3 頭)、F1 (7 頭)、ホルスタイン (3 頭) であった。唾液では O157 が黒毛和種、ホルスタイン (各 1 頭)、外皮では F1 (2 頭) から分離された (表 7、8、9)。

性別の糞便からの分離状況は O26 は去勢と牝 (各 1 頭) から、O157 は去勢が 3 頭、牝が 10 頭であった (表 10、12)。

EHEC が分離された牛の月齢は、18～36 ヶ月齢であった (表 10、12)。

検体の組み合わせ別では、糞便・唾液・外皮を検査した 25 頭のうち 1 頭で糞便と外皮から O157 が同時に分離されたが、その他の検体では同時に複数の検体からは分離されなかった (表 11)。

## 2) 分離菌株の病原因子、PFGE パターン、薬剤感受性

分離株のうち eae の検査と PFGE を実施した 14 頭由来の菌株はすべて EHEC の病原因子の一つである eae を保有していた。また、PFGE パターンは同じ日に同じ生産者が出荷した 2 頭由来の O157 (牛 No.5、6) で一致していたが、その他は生産者が同じ場合 (牛 No.10、17) も含め異なっていた。

薬剤感受性は O26 では 1 株 (1 頭由来) が ABPC、SM、KM に耐性を示し、1 株 (他の 1 頭由来) は中間型を示した。O157 で SM、TC に耐性を示す株が 2 頭由来 2 株、SM 耐性株 1 頭由来 1 株で、その他は耐性と感受性の中間性を示した (表 12)。

## 3) 外皮の汚染状況

外皮の汚染度を観察した 15 頭は汚染度 (-) が 3 頭、(+) が 9 頭、(++) が 2 頭、(+++) が 1 頭であった。このうち、汚染度 (+) の 1 頭の糞便と別の 1 頭の外皮から O157 が分離され、汚染度 (-) の 1 頭の糞便と外皮から O157 が分離された。

#### D. 考察

今回の調査では、検査した牛糞便の3.3%から O26 が分離され、21.3%から O157 が分離されたことからと畜場搬入牛は腸管出血性大腸菌の重要な汚染要因であることが再確認された。

O157については全国的に調査が行われ、牛からは季節的には夏期に高率に分離されること、搾乳牛に比べ和牛やF1などの肥育牛で高い保菌の傾向があること、生産者によって分離率に差があることなどが報告されている。

今回、4月～9月に行った調査では、O26は5月に1回だけ分離されたが、O157は4月を除き、5月～9月の毎月分離され、多くの調査成績と同様に春～夏の時期には牛の保菌率も高いことが推測された。

今回の調査でも、1頭の牛から O26 と O157 が同時に分離された。また、同一生産者由来の複数の牛で同じ PFGE パターンの O157 が分離されたことから同一牛舎内で牛の間に同じクローンの O157 が維持されている高度に汚染された生産者の存在が確認された。一方、複数回の調査で同じ生産者由来の牛から異なる PFGE パターンの O157 が分離されたことから、O157 は遺伝子変異をしながら牛群内で維持されていることや、人や物の移動に伴って新しい遺伝子型の O157 が牛群に入っている可能性が考えられた。

O157 は搾乳牛に比べ肥育牛で高率に分離されることが報告されているが、牛の O157 保菌については濃厚飼料多給の影響も指摘されており、今回の調査でも、黒毛和種、交雑種 (F1)、ホルスタインのいずれの種類からも O157 が分離されたことから、牛の O157 保菌は、牛の品種よりも飼育環境 (牛群) の O157 の汚染の有無や飼料など飼育管理の影響が大きいと推測され、生産者毎に O157 などの EHEC の汚染 (保菌) 状況を把握しておくことはと畜場の衛

生管理において重要な情報となると思われる。

次に、今回分離株の薬剤感受性を調査した結果、O26 で1株が ABPC、SM、KM に耐性を示し、O157 で2株が SM、TC に、1株が SM に対して耐性を示した。また、ほとんどの株で、複数の薬剤に対して耐性と感受性の中間の反応を示したことから、生産段階で新たな薬剤耐性菌を作らないための対策と薬剤耐性菌に汚染された食肉を介した人へ感染防止対策の重要性が確認された。

また、今回、食肉の細菌汚染確認の指標として、生体の肛門周囲部の糞便等による汚染状況を観察した結果、目視観察による汚染度 (一) の牛の外皮の拭取り検体から O157 が分離されており、牛の体表は一見汚染が無いように見えても、常に O157 の汚染の危険があることが確認された。

以上、今回の調査から EHEC 特に O157 は牛が保有する重要な微生物学的危害であり、と畜場の衛生を確保していくためには生産段階からと畜場搬入、解体処理の全て過程で O157 のコントロールが重要と考えられた。



表 1 調査した牛の内訳(生産者と品種)

品種	検査頭数	生産者
黒毛和種	11	5
交雑種(F1)	24	9
ホルスタイン	24	15
ジャージー	2	2
合計	61	31(*1)

\*1:生産者総数 30

表 2 調査した牛の内訳(品種、性別、月齢)

品種	性別	月齢					合計 1	合計 2
		20 以下	21~30	31~40	41~50	51 以上		
黒毛和種	牝	0	8	3	0	0	11	11
交雑種(F1)	去勢	0	2	0	0	0	2	24
	牝	2	19	1	0	0	22	
ホルスタイン	去勢	4	0	0	0	0	4	24
	牡	0	0	1	0	0	1	
	牝	2	0	3	1	13	19	
ジャージー	牝	0	1	1	0	0	2	2
合計		8	30	9	1	13	61	61

合計 1:品種(性別)の合計頭数を示す。

合計 2:品種の合計頭数を示す。

表 3 検体(組み合わせ)内訳

検体	直腸便	唾液	外皮	頭数
	○	○	○	25
	○	○	—	36
合計	61	61	25	61

表4 糞便からの菌分離状況(月別)

月	検査頭数	O26	O157
4月	11	0	0
5月	10	2	4
6月	10	0	2
7月	10	0	4
8月	10	0	1
9月	10	0	2
合計	61	2	13

表5 唾液からの菌分離状況(月別)

月	検査頭数	O26	O157
4月	11	0	2
5月	10	0	0
6月	10	0	0
7月	10	0	0
8月	10	0	0
9月	10	0	0
合計	61	0	2

表6 外皮からの菌分離状況(月別)

月	検査頭数	O26	O157
7月	10	0	0
8月	5	0	0
9月	10	0	2
合計	25	0	2

表7 糞便からの菌分離状況(品種別)

品種	検査頭数	O26	O157
黒毛和種	11	0	3
交雑種(F1)	24	1	7
ホルスタイン	24	0	3
ジャージー	2	1	0
合計	61	2	13

表8 唾液からの菌分離状況(品種別)

品種	検査頭数	O26	O157
黒毛和種	11	0	1
交雑種(F1)	24	0	0
ホルスタイン	24	0	1
ジャージー	2	0	0
合計	61	0	2

表9 外皮からの菌分離状況(品種別)

品種	検査頭数	O26	O157
黒毛和種	5	0	0
交雑種(F1)	11	0	2
ホルスタイン	9	0	0
ジャージー	0	0	0
合計	25	0	2

表 10 品種、性別および月齢別のEHEC(O26 または O157)分離状況

品種(性別)	性別	月齢					合計
		20 以下	21~30	31~40	41~50	51 以上	
黒毛和種	牝	0	8	3	0	0	11
			(2)	(3)			(5)
交雑種(F1)	去勢	0	2	0	0	0	2
			(2)				(2)
交雑種(F1)	牝	2	19	1	0	0	22
			(5)				(5)
ホルスタイン	去勢	4	0	0	0	0	4
		(1)					(1)
ホルスタイン	牡	0	0	1	0	0	1
ホルスタイン	牝	2	0	3	1	13	19
		(1)		(2)			(3)
ジャージー	牝	0	1	1	0	0	2
				(1)			(1)
合計		8	30	9	1	13	61
		(1)	(9)	(3)			(17)

二段表示: 上段は検査頭数、下段( )は分離陽性頭数を示す。

一段表示: 検査頭数(分離陽性なし)を示す。

表 11 検体(糞便・唾液・外皮)の分離成績

検体の組み合わせ			O26	O157
糞便	唾液	外皮		
○	○	○		
+	+	+	0	0
+	+	-	0	0
+	-	+	0	1
-	+	+	0	0
+	-	-	2	11
-	+	-	0	2
-	-	+	0	1
-	-	-	34	23
-	-	NT	25	23
合計			61	61

○: 検体あり、+: 菌分離陽性、-: 菌分離陰性