

果と比較して、*Campylobacter* では 0.9～2 倍、*Salmonella* では 4～6 倍、*Vibrio parahaemolyticus* では 1～4 倍の範囲に収まっていた。異なるデータ提供元および規模の異なる菌検出データを利用し、医療機関受診率および検便実施率も別個に推定を行うなど、種々異なる要素があったにも関わらず、推定値の違いはそれほど大きいものではなかった。この違いは、宮城県と全国とでの実被害発生率の違いと解釈できる範囲のものであろう。従って、本研究のアクティブサーベイランスデータからの推定という手法は、実際の患者発生およびその傾向を捉える上で、実用的かつ効果的であることを示していると考えられる。

今回の急性下痢症患者数推定において、宮城県の検査機関については検査機関からの情報で、全国を対象とした検査機関 3 社については全数報告疾患である腸管出血性大腸菌 (1 社は *O157*) の検出数と厚生労働省への全報告数とを比較することで住民カバー率を推定した。検査機関からの情報には不確定な要素が大きく含まれている可能性があり、また腸管出血性大腸菌は他の菌と比較して検出数が少ないため、検出率の年度による大きな変動が予想される。宮城県についての推定で腸管出血性大腸菌による手法を試みた際には検出数が少ないためにカバー率の年ごとのばらつきが大きくなり、推定に用いるのは現実的ではないと考えられた。今回使用した全国を対象としたデータでは検査件数、腸管出血性大腸菌の検出数ともに宮城県より大幅に多いため、ばらつきは宮城県の場合より小さいと考えられる。しかし特定地域において腸管出血性大腸菌による大規模アウトブレイク

が発生した際にはカバー率の推定に影響が出るのが予想される。複数年にわたるカバー率の把握等によりその影響を少なくすることも可能であると考えられ、今後も継続したアクティブサーベイランスが必要であると考えられる。

本研究での推定値は検査機関で検出された病原菌からの下痢症患者数の推定であり、食品由来の割合は不明である。米国における研究の推定結果を適用し、各菌の食品由来感染の割合を 65%～95%と仮定したが、米国と日本の食習慣の違い等から、今回適用した仮定が妥当であるかは今後の検討課題である。日本においては米国と比較して生食が多いことから、日本における上記 3 菌の食品由来感染の割合は米国よりも高い割合である可能性がある。

各種対策等の検討およびその効果の評価を行なうためには継続した定量的な患者数の把握が必要であり、本研究での推定値は不確実性が大きい要素等も含まれた推定値ではあるものの、実患者数が報告数より大幅に多いという可能性が定量的に、かつ多年度について示された点が重要であると考ええる。

アクティブサーベイランスにより検査機関からデータを得る対象地域をさらに拡大した上で、医療機関受診率、検便実施率等に関しても継続した住民調査を行うことによりさらに正確に把握することが必要であると考ええる。

E. 結論

宮城県および全国におけるアクティブサーベイランスを複数年にわたって行うことで、下痢症患者の菌検出データを継続して

収集し、急性下痢症発生実態の概略およびその動向の把握が可能となった。臨床検査機関からの *Campylobacter*、*Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus* の年間検出数、検査機関の住民カバー率、医療機関における検便実施率、医療機関受診率等の各種データを組み合わせることで、宮城県内での上記3菌に起因する食品由来患者数の推定を行い、その結果を宮城県内の食中毒報告数と比較した。その結果、食中毒患者報告数よりも大幅に多い患者が存在している可能性が示唆された。さらに、6年分の各菌の推定患者数と報告患者数の年次変化は互いに関連しておらず、食中毒統計からの報告数だけで実患者数の変動を把握することは難しいことが示唆された。

本年度から収集した5年分の全国のアクティブサーベイランスデータからも同様に上記3菌に起因する食品由来実患者数の推定を行い、宮城県データからの拡大推定と比較して各菌で1~6倍程度の違いという結果に収束した。対象地域や規模の大きく異なるデータからの推定値がそれほど大きく隔たっていなかったことは、本研究における推定手法の妥当性を裏付けると考えられる。今後もこれらの異なるデータからの推定結果を比較することで、年ごとの推定値の検証等に活用することが可能であると考えられる。さらに宮城県以外の地域でもアクティブサーベイランスを行い、宮城県推定や全国推定と比較することによって地域性等の検討がより詳細に可能になると考えられる。また全国についての住民カバー率のより詳細な推定、全国でのより大規模な電話住民調査による医療機関受診率および検便実施率の推定等により精度を向上さ

せることも考えられる。

これらの結果から平常時から散發事例等を含めたデータ収集を継続して行うアクティブサーベイランスシステムの有効性およびその必要性が強調された。このようなサーベイランスシステムでは、菌の検出のみならず、下痢症発生率（有病率）、医療機関受診率および検便実施率等の情報も継続して調査を行なうことでアウトブレイク等の特殊事例の影響を最小限にすることができ、より現実に即した実態把握が可能となることが示唆された。また継続調査により各項目の動向把握が可能となり、緊急事例の早期発見につながる可能性がある。菌検出件数を把握する検査機関データは、報告率等の不確定要素が少なく、推定を行う上でより直接的なデータであると考えられる。全国の急性下痢症実患者数のより正確な把握と地域差等の把握のために、より拡大したアクティブサーベイランスを行なうこと、および各不確定要素の精度向上を図っていくことが今後の検討課題である。

日本では過去に、ここに示したのと同様のアクティブサーベイランスデータや推定データ等の報告がないことから、下痢症の発生動向の実態把握、食中毒行政における食中毒対策立案、その効果の評価および各種リスク評価等に活用可能な基礎データの蓄積のために、今後も本研究によるアクティブサーベイランスを継続していく必要がある。

引用文献：

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.

Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5:607–625. 1999.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Kunihiro Kubota, Fumiko Kasuga, Emiko Iwasaki, Shunichi Inagaki, Yoshiharu Sakurai, Mayumi Komatsu, Hajime Toyofuku, Frederic J Angulo, Elaine Scallan and Kaoru Morikawa

Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis and Foodborne Illness Caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* by Using Population-Based Telephone Survey Data, Miyagi Prefecture, Japan, 2005 to 2006

Journal of Food Protection
Vol. 74, No. 10, 2011, Pages 1592–1598

2. 学会発表

① Kunihiro Kubota, Hiroshi Amanuma, Fumiko Kasuga, Emiko Iwasaki, Shunichi Inagaki, Yoshiharu Sakurai, Mayumi Komatsu, Fujio Kanno, Miyako Oguro, Hiroshi Oota, Sakura Yasaki, Hajime Toyofuku, Frederic J Angulo, Elaine Scallan and Kaoru Morikawa

Estimating the Burden of Foodborne Illness in Japan, Using Web-based Survey Data for Extrapolating Estimates in Miyagi Prefecture to Whole of Japan

国際食品保全学会 2011 年次総会 (International Association for Food Protection 2011 Annual Meeting)、ミルウォーキー、米国、2011 年 7 月

② Kunihiro Kubota, Hiroshi Amanuma, Fumiko Kasuga, Emiko Iwasaki, Shunichi Inagaki, Yoshiharu Sakurai, Mayumi Komatsu, Fujio Kanno, Miyako Oguro, Hiroshi Oota, Sakura Yasaki, Frederic J Angulo, Elaine Scallan and Kaoru Morikawa

Estimating the burden of foodborne diseases caused by *Campylobacter*, *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* in Japan, using laboratory active surveillance data and population telephone survey data.

国際微生物学会連合 2011 年次総会 (International Union of Microbiological Societies 2011 Congress)、札幌、2011 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. 病原細菌の検出状況（平成22年）

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計	
検査件数	608	573	510	502	552	627	606	688	597	493	481	548	6,785	
下痢原性細菌	<i>Escherichia coli</i>	268	252	262	234	298	288	279	288	255	211	216	273	3,124
	<i>Campylobacter sp</i>	17	13	24	25	21	40	41	41	29	35	43	25	354
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	2	6	1	3	2	1	4	15	4	6	2	52
	<i>Yersinia sp</i>	2	1	1	0	0	2	2	4	1	2	0	0	15
	<i>Salmonella sp</i>	3	0	2	3	2	4	4	12	11	6	4	0	51
	<i>Aeromonas sp</i>	1	0	2	0	1	2	3	4	0	3	1	1	18
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	1	7	5	1	1	0	15
	<i>Vibrio fluvialis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Vibrio mimicus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>Shigella flexneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
	<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	4
	小計	297	268	297	265	326	339	331	362	316	264	271	303	3,639
その他	<i>Clostridium difficile</i>	4	0	1	2	1	4	3	4	2	2	0	2	25
	<i>Candida sp</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	14	7	9	7	8	10	7	9	8	6	9	97
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	3	2	1	1	9
	<i>Streptococcus group A</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	305	282	305	277	334	352	344	373	330	276	278	315	3,771	
verotoxin 陽性検体数	0	0	0	0	0	3	3	6	3	3	2	1	21	
病原細菌検出率 (%)	50%	49%	60%	55%	61%	56%	57%	54%	55%	56%	58%	57%	56%	

図1 検出された下痢原性細菌の種類とその割合（平成22年、n=3,639）

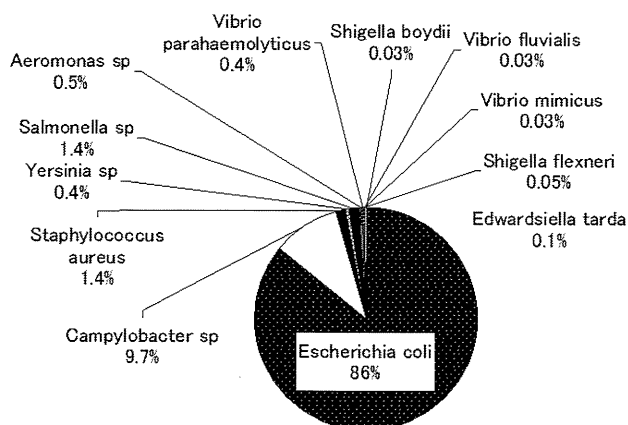


図2 Escherichia coli 及び腸管出血性大腸菌の月別検出状況
(平成22年・21年比較)

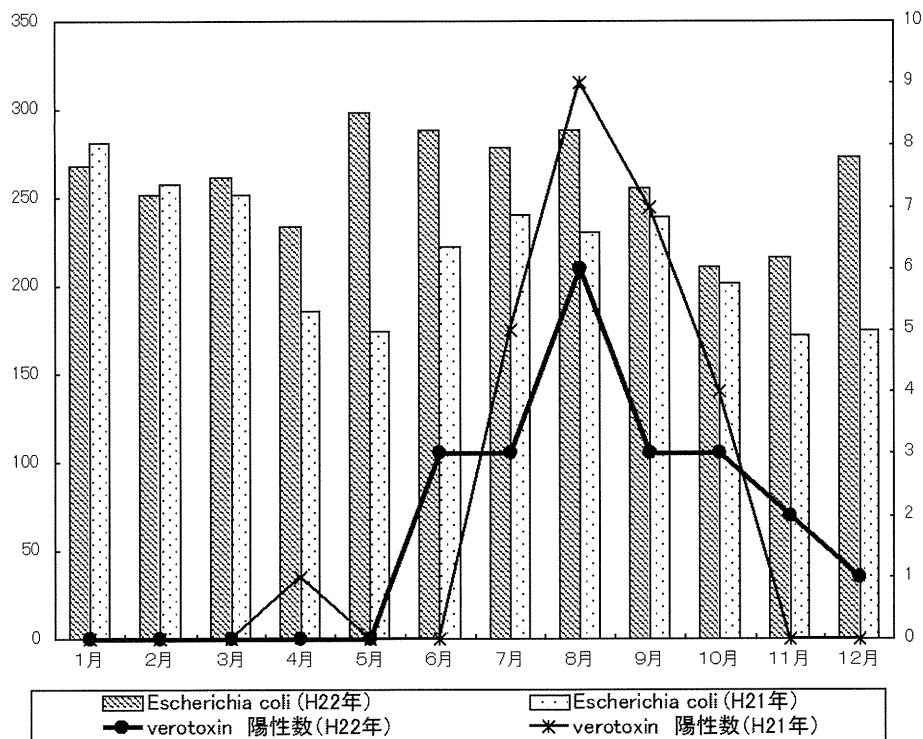


図3 宮城県腸管出血性大腸菌感染症患者届出数と本調査における
verotoxin 陽性数の比較 (平成22年)

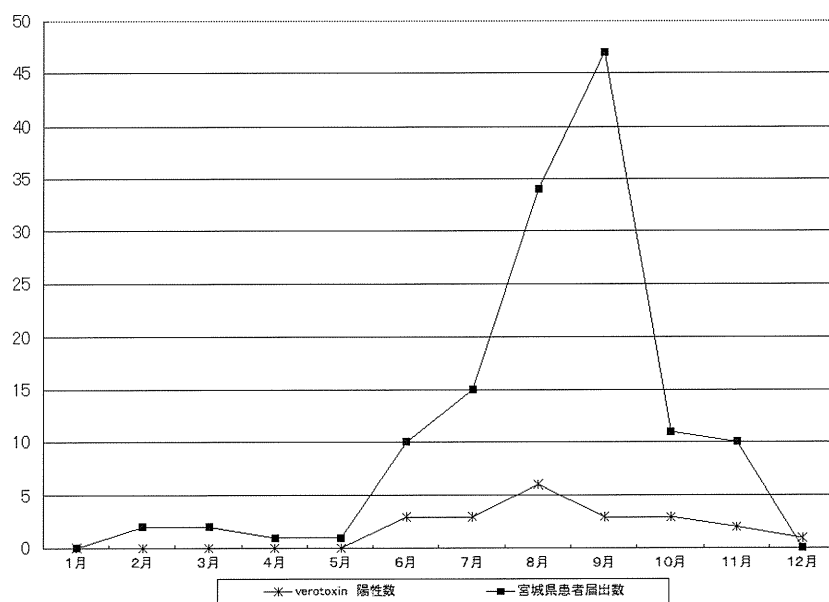


図4 *Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* の月別検出数
(平成 22 年)

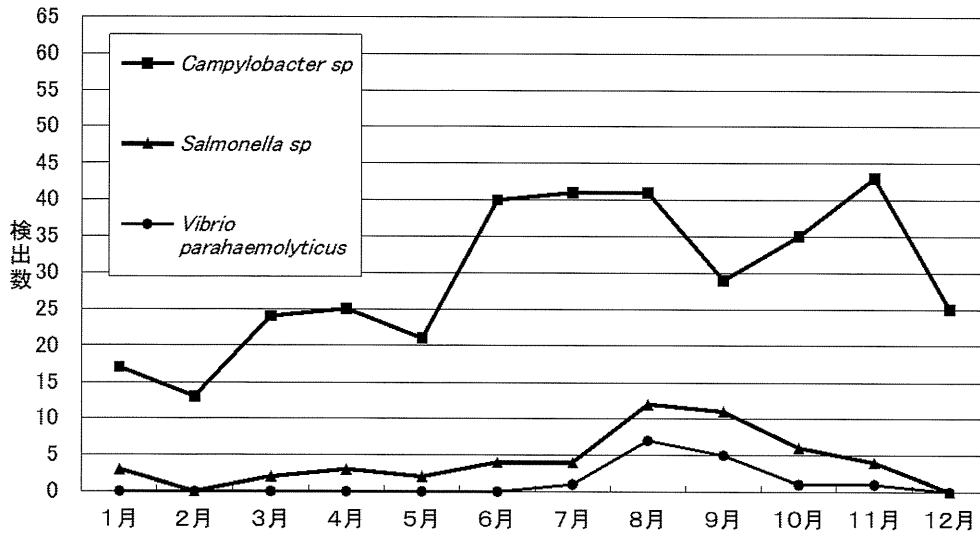


図5 *Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* の月別検出率
(平成 22 年)

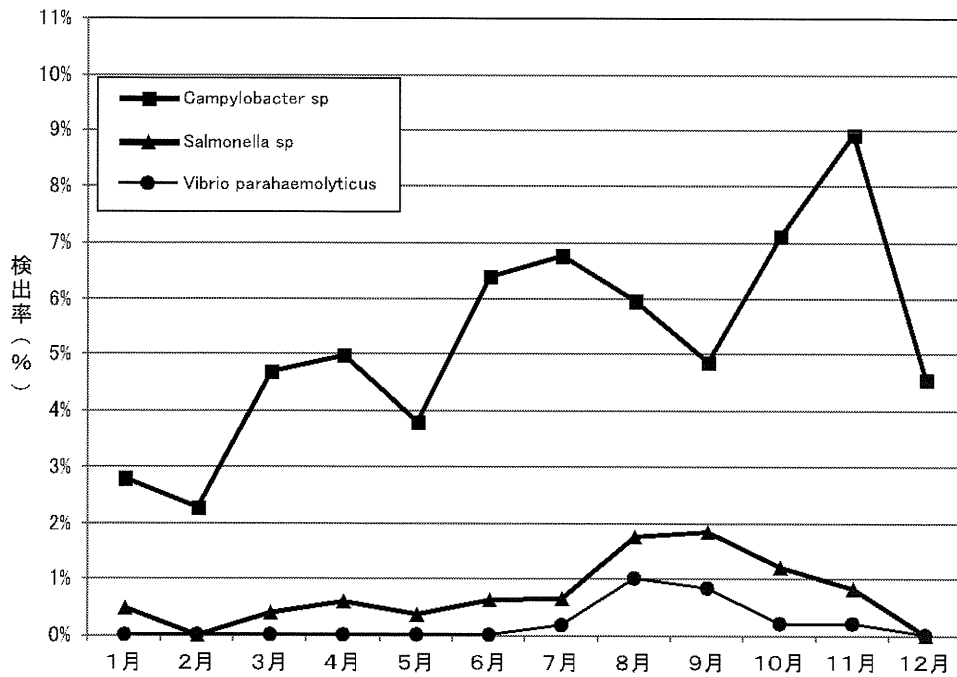


表 2 宮城県食中毒事件発生状況（平成 22 年） * 初発患者発病年月日

発生年月日*	摂食者数	患者数	原因食品	病因物質	原因施設
1月5日	184	74	社員食堂の食事	ノロウイルス	飲食店
1月10日	46	28	飲食店の食事	ノロウイルス	飲食店
1月10日	1,591	85	ソフトクリーム	黄色ブドウ球菌	飲食店
1月16日	52	23	かき酢	ノロウイルス	飲食店
1月17日	18	9	飲食店の食事	ノロウイルス	飲食店
2月8日	10	6	生食用かき(推定)	ノロウイルス	旅館
3月1日	240	78	旅館の食事	ノロウイルス	旅館
4月17日	13	5	不明	カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	不明
5月31日	63	7	飲食店の食事	カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	飲食店
6月10日	11	7	飲食店の食事	ウエルシュ菌	飲食店
7月30日	39	13	不明	カンピロバクター・ジェジュニ	不明
8月7日	102	16	飲食店の食事	腸炎ピブリオ	飲食店
9月7日	14	13	飲食店の弁当	サルモネラ・トンブソン	飲食店
9月21日	815	153	鯨肉	不明	魚介類販売業
10月17日	62	15	飲食店の食事	不明	飲食店
10月18日	70	23	おにぎり	黄色ブドウ球菌	旅館
10月25日	350	9	弁当	黄色ブドウ球菌	飲食店
12月23日	55	24	飲食店の食事	ノロウイルス	飲食店

表 3 平成 21、22 年 病因物質別月別食中毒発生状況（厚生労働省、食中毒統計）

原因物質	総数			総数		
	平成21年			平成22年		
	事件	患者	死者	事件	患者	死者
総数	1,048	20,249	-	1,254	25,972	-
細菌	536	6,700	-	580	8,719	-
サルモネラ属菌	67	1,518	-	73	2,476	-
ぶどう球菌	41	690	-	33	836	-
ポツリヌス菌	-	-	-	1	1	-
腸炎ピブリオ	14	280	-	36	579	-
腸管出血性大腸菌(VTEC産生)	26	181	-	27	358	-
その他の病原大腸菌	10	160	-	8	1,048	-
ウエルシュ菌	20	1,566	-	24	1,151	-
セレウス菌	13	99	-	15	155	-
エルシニア・エンテロコリチカ	-	-	-	-	-	-
カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	345	2,206	-	361	2,092	-
ナグピブリオ	-	-	-	-	-	-
コレラ菌	-	-	-	-	-	-
赤痢菌	-	-	-	1	2	-
チフス菌	-	-	-	-	-	-
パラチフスA菌	-	-	-	-	-	-
その他の細菌	-	-	-	1	21	-
ウイルス	290	10,953	-	403	14,700	-
ノロウイルス	288	10,874	-	399	13,904	-
その他のウイルス	2	79	-	4	796	-
化学物質	13	552	-	9	55	-
自然毒	92	290	-	139	390	-
植物性自然毒	53	195	-	105	337	-
動物性自然毒	39	95	-	34	53	-
その他	17	19	-	28	29	-
不明	100	1,735	-	95	2,079	-

図 6. 急性下痢症疾患の実患者数の把握

(各段階における不確定要素を検討、積算することで検出数から実被害推定を行う)

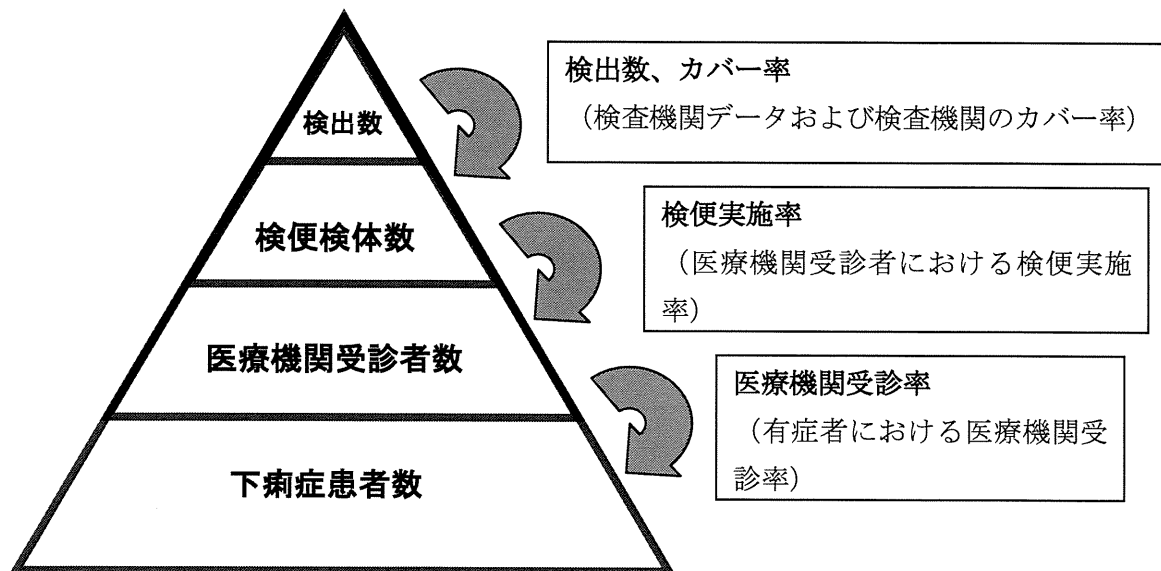


表 4. 全国および宮城県における電話住民調査結果（2009年冬）と2006年冬および2007年夏の宮城県における電話住民調査結果。

	2009年冬全国	2009年冬宮城県	2006年冬宮城県	2007年夏宮城県
合計コール数	12,265件	6,093件	10,021件	11,965件
有効コール数 (有効回答率)	2,077件(16.9%)	1,069件(17.5%)	2,126件(21.2%)	2,121件(17.7%)
有症者数(有病率)	77人(3.7%)	25人(2.3%)	70人(3.3%)	74人(3.5%)
医療機関受診者数 (受診率)	23人(29.9%)	4人(16.0%)	27人(38.6%)	23人(31.1%)
検便実施者数 (検便実施率)	2人(8.7%)	0人(—)	4人(14.8%)	2人(8.0%)

表5. 宮城県における急性下痢症疾患の患者数推定結果とその食中毒患者報告数との比較
(2005～2010年、シミュレーション試行回数：1万回、宮城県人口:236万人)

検出菌	年	検出数	推定患者数(宮城県)	推定患者数 (10万人あたり)	※ ¹ 推定食品由来患者数	※ ² 食中毒患者数
カンピロバクター	2005	562	37,019(平均値)	1,569	29,615 (80%)	143
	2006	550	36,238(平均値)	1,536	28,990 (80%)	109
	2007	538	35,437(平均値)	1,502	28,350 (80%)	32
	2008	468	30,786(平均値)	1,305	24,629 (80%)	33
	2009	339	26,272(平均値)	1,113	21,018 (80%)	9
	2010	354	23,291(平均値)	987	18,633 (80%)	25
サルモネラ	2005	78	5,134(平均値)	218	4,877 (95%)	12
	2006	46	3,028(平均値)	128	2,877 (95%)	11
	2007	46	3,028(平均値)	128	2,877 (95%)	25
	2008	56	3,690(平均値)	156	3,506 (95%)	0
	2009	33	2,169(平均値)	92	2,061 (95%)	23
	2010	51	3,358(平均値)	142	3,190 (95%)	13
腸炎ビブリオ	2005	36	2,369(平均値)	100	1,540 (65%)	32
	2006	27	1,778(平均値)	75	1,156 (65%)	0
	2007	24	1,582(平均値)	67	1,028 (65%)	※ ³ 627(17)
	2008	8	527(平均値)	22	343 (65%)	37
	2009	6	395(平均値)	17	257 (65%)	19
	2010	15	988(平均値)	42	642 (65%)	16

※¹ 米国での胃腸炎疾患における食品由来感染の割合(カッコ内)より算出(Mead et al. 1999)

※² 宮城県食中毒患者報告数(厚生労働省食中毒統計、平成17～22年食中毒発生事例)

※³ 620人は1アウトブレイクにおける東日本1都7県での患者を宮城県がとりまとめて報告したもので、2007年度の宮城県の実際の腸炎ビブリオ患者報告数は17人である。

表6. 宮城県データからの日本全国の食品由来下痢症患者数の推定とその食中毒患者報告数との比較（2005～2010年、日本全国人口1億2777万人）

検出菌	年度	推定食品由来患者数	※食中毒患者数
カンピロバクター	2005	1,603,183	3,439
	2006	1,569,361	2,297
	2007	1,534,672	2,396
	2008	1,333,251	3,071
	2009	1,137,763	2,206
	2010	1,008,664	2,092
	サルモネラ	2005	264,027
2006		155,721	2,053
2007		155,721	3,603
2008		189,768	2,551
2009		111,545	1,518
2010		172,692	2,476
腸炎ビブリオ		2005	83,358
	2006	62,562	1,236
	2007	55,666	1,278
	2008	18,544	168
	2009	13,899	280
	2010	34,765	579

※全国食中毒患者数（厚生労働省食中毒統計資料、平成17～22年食中毒発生状況）

表7. 全国についてのアクティブサーベイランスデータからの日本全国の食品由来急性下痢症疾患の患者数推定結果とその食中毒患者報告数との比較（2006～2010年、シミュレーション試行回数：1万回、日本全国人口1億2777万人）

検出菌	年	※ ¹ 検出数	推定患者数 (全国)	推定患者数 (10万人あたり)	※ ² 推定食品由来患者 数(全国)	※ ³ 食中毒患者数 (全国)
カンピロバクター	2006	4,065	1,731,780(平均値)	1,362	1,385,424 (80%)	2,297
	2007	4,398	1,871,147(平均値)	1,471	1,496,918 (80%)	2,396
	2008	5,453	2,323,078(平均値)	1,827	1,858,462 (80%)	3,071
	2009	7,189	2,421,085(平均値)	1,904	1,936,868 (80%)	2,206
	2010	8,531	2,680,190(平均値)	2,108	2,144,152 (80%)	2,092
サルモネラ	2006	1,971	839,690(平均値)	660	797,706 (95%)	2,053
	2007	1,975	840,272(平均値)	661	789,258 (95%)	3,603
	2008	1,989	847,350(平均値)	666	804,983 (95%)	2,551
	2009	2,157	726,426(平均値)	571	690,105 (95%)	1,518
	2010	2,532	795,480(平均値)	626	755,706 (95%)	2,476
腸炎ビブリオ	2006	534	227,496(平均値)	179	147,872 (65%)	1,236
	2007	423	179,967(平均値)	142	116,979 (65%)	1,278
	2008	219	93,298(平均値)	73	60,644 (65%)	168
	2009	232	78,132(平均値)	61	50,786 (65%)	280
	2010	568	178,449(平均値)	140	115,992 (65%)	579

※¹ 菌検出数：下記の民間検査機関での検出データを合計した。

2010年1～12月：3社（株式会社ミロクメディカルラボラトリー、株式会社ビー・エム・エル、菱科学メディエンス株式会社）

2009年1～12月：2社（株式会社ビー・エム・エル、三菱科学メディエンス株式会社）

2006～2008年の1～12月：1社（株式会社ビー・エム・エル）

※² 米国の胃腸炎疾患における食品由来感染の割合（カッコ内）より算出（Mead et al. 1999）

※³ 全国食中毒患者報告数（厚生労働省食中毒統計、平成17～22年食中毒発生事例）

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究

分担研究報告書

地域における原因食品推定法の検討

研究分担者	群馬県衛生環境研究所	小澤 邦壽
研究協力者	東京家政大学	森田 幸雄
	岐阜医療科学大学	鈴木 智之
	群馬県食肉衛生検査所	星野 利得
		杵代 俊枝
		高橋 敏子
	高崎市食肉衛生検査所	小畑 敏
		新井奈々子
		森 典子
		須藤 真登
	群馬県衛生環境研究所	石岡 大成
		吉住 正和
		塩原 正枝
		坂野智恵子
		丹羽祥一

研究要旨

食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究の一環として、地域における原因食品推定法の検討を実施した。詳細な検討内容としては、牛肉の腸管出血性大腸菌検査スクリーニングの検討、食鳥から分離される大腸菌の血清型および毒素遺伝子、市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討とした。牛肉の腸管出血性大腸菌検査スクリーニングの検討については、食肉の成分はPCR法による検査に影響を及ぼすことが確認されたものの、培養用およびPCR法の検出感度は、 1.0×10^4 cfu/mL以上であったことにより、厚生労働省通知で示された腸管出血性大腸菌 O111 の検査法における感度を満たしていることが確認された。これらのことから、食肉においてもPCR法および培養法による腸管出血性大腸菌 O157 のスクリーニング検査が可能であることが示唆された。食鳥から分離される大腸菌の疫学調査については、大腸菌症を呈した鶏の臓器炎症部位および他の疾病による炎症部位から大腸菌は高率に分離され、これらの分離菌株の血清型は O78 が最も多く、次いで O18 であった。分離株の一部について、毒素遺伝子保有の有無をPCR法により確認したが、保有していなかった。また、農場により分離される血清型に特異性が認められ、地域別によっても分離血清型に偏りがあることが確認された。これらのことから、食鳥か

ら分離される大腸菌を詳細に調べることにより、地域における原因食品の推定に寄与できることが示唆された。市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討については、牛ひき肉からはサルモネラ、カンピロバクター、および腸管出血性大腸菌は検出されなかったが、鶏ひき肉からはサルモネラおよびカンピロバクターがそれぞれ 38%および 23%検出され、豚ひき肉からは、それぞれ 8%および 4%検出された。また、培地に関しては、サルモネラについて増菌培地では RV ブイヨン、選択分離培地では Brilliance Salmonella Agar の検出率が高かった。以上のことから、培養レベルにおける検査法の検討、遺伝子レベルにおける検査法の検討、および地域レベルにおける食材の推定などを実施することにより、地域における食中毒事件に対して原因食品推定に寄与することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

A-1. 牛肉の腸管出血性大腸菌スクリーニング検査の検討

平成 23 年 6 月 3 日付け厚生労働省監視安全課長通知により、腸管出血性大腸菌 O111 の検査法が示されたことから、O157 についての適用が可能かどうかについて検討する。また、食肉の成分が検出に与える影響について把握する。

A-2. 鶏から分離される大腸菌の血清型および毒素遺伝子

食鳥処理場で処理された鶏を対象に、大腸菌症および類似症状を呈する鶏の炎症部位から大腸菌の分離を実施する。これら分離株の血清型および各種毒素遺伝子の保有状況を把握、検討することにより、地域における食中毒事件に関する及ぼす影響について検討する。

A-3. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

市販食肉の各種食中毒菌による汚染状況を把握するとともに、培養検査に使用した培地の分離成績を比較する。これらのこと

から、食中毒事件に関与する各種食肉の影響を把握し、かつ、食中毒菌の検査における最適な培養法について検討を加える。

B. 研究方法

B-1. 牛肉の腸管出血性大腸菌スクリーニング検査の検討

管内食肉処理場より採材した牛脂肪および牛モモ肉（赤身部位）を検査材料とし、*Escherichia coli* O157:H7（VT1, 2 陽性）牛糞便由来株を各種条件下で添加し、以下の方法により回収試験を行った。細切した試料 25 g を、ノボビオシン加 mEC 培地 225ml に加えて 42±1°C、22±2 時間培養各濃度で供試菌株を添加した。ベロ毒素遺伝子（VT1 および VT2）の検出については、アルカリ熱抽出法による DNA 抽出後、TaKaRaO-157（ベロ毒素遺伝子）PCR Screening Set および O-157&ベロ毒素遺伝子同時検出キットを使用して検討した。また、培養法による *E. coli* O157 の検出については、ダイナビーズ O157 を用いた免疫磁気ビーズ法を実施した。mEC 培養液処理後のビーズ濃縮液 30μl を選択分離平板（CT-SMAC、CIX、クロモアガーSTEC）

に塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、18~24 時間培養し、CT-SMAC については無色透明コロニーを、CIX については青色から青緑色のコロニーを、クロモアガー-STEC については藤色で UV 照射により蛍光を示さないコロニーを O157 陽性と判定した。

B-2. 鶏から分離される大腸菌の血清型および毒素遺伝子

ブロイラーを扱う大規模食鳥処理場に搬入された鶏を対象に、疾病検査時に大腸菌症および類似症状を呈する個体から肺、肝臓などを採取した。これらの組織表面を火炎滅菌後、無菌的に剖面を入れ DHL 平板に直接スタンプを実施し、画線後 37°C 、24 時間培養した。大腸菌が疑われるコロニーを釣菌して各生化学性状試験用培地に移植した。生化学性状試験の結果から大腸菌の性状を示す菌株について市販血清を用いて血清型別 (O 群) を実施した。また、分離菌株について、加熱抽出法による DNA の抽出後、PCR 法によりベロ毒素遺伝子 (VT)、易熱性エンテロトキシン遺伝子 (LT) および耐熱性エンテロトキシン遺伝子 (ST) 保有の有無を検索した。

B-3. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

市販牛ひき肉 50 検体、鶏ひき肉 26 検体および豚ひき肉 26 検体を購入し、それらの 25 g を検体として、サルモネラ属、カンピロバクター属および腸管出血性大腸菌 (牛ひき肉のみ) の分離を試みた。サルモネラについては、前増菌培地として Buffered Peptone Water (225mL) を使用し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。増菌培地については、

RV ブイヨンおよび TT ブイヨンを使用し、 $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。選択分離培地については、DHL、クロモアガー Salmonella および日本国内未発売である Brilliance Salmonella Agar (Oxoid) を用いて、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。カンピロバクターについては、増菌培地として preston を使用し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、24~48 時間培養した。選択分離培地として、mCCDA、Butzler 平板、および日本国内未販売である Brilliance Campycount Agar (Oxoid) を用いて検討を行った。

C. 研究結果

C-1. 牛肉の腸管出血性大腸菌スクリーニング検査の検討

供試菌液を各濃度で添加した牛肉培養液 (以下、肉液)、牛脂肪を加えた培養液 (以下、脂肪液)、対照 (培養液のみ) について PCR を実施した結果、対照は 1.0×10^2 CFU/mL 以上で、肉液および脂肪液は 1.0×10^3 CFU/mL 以上で VT 遺伝子の検出が可能であった。また、免疫磁気ビーズ法による分離培養法では、肉液、脂肪液および対照における 1.0×10^4 CFU/mL の全ての培養液において、CT-SMAC、CIX、およびクロモアガー-STEC のいずれの分離培地からも O157 の検出が可能であった (表 1)。(本成績は、平成 23 年度全国食肉衛生検査所協議会微生物部会で口頭発表済みである。)

C-2. 鶏から分離される大腸菌の血清型および毒素遺伝子

大腸菌症およびその他の疾病症状を呈する鶏の炎症部位から大腸菌は 83 株分離さ

れ、それらは3県11農場から得られた。分離株の6割以上がO78であり(52株, 62.7%)、次いでO18(11株, 13.3%)であった(表2)。その他の血清型の分離率はほぼ同様であった。農場により分離される大腸菌の血清型には違いが認められ、複数の血清型が分離される農場が半数を占めた(表3)。また、行政区別で比較した場合、地域により分離される血清型に明確な特徴が認められた(表4)。分離株の一部について、VT、LTおよびST遺伝子の検出を試みたが、全ての遺伝子において検出されなかった。

C-3. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

調査対象としたサルモネラ、カンピロバクターおよび腸管出血性大腸菌は、牛ひき肉50検体全てから検出されなかった。一方、鶏ひき肉の38.5%(10/26)からサルモネラが、23.1%(6/26)からカンピロバクターが検出された。また、豚ひき肉については、7.7%(2/26)からサルモネラが、3.8%(1/26)からカンピロバクターが検出された。鶏ひき肉からのサルモネラおよびカンピロバクター検出状況について表5に示した。カンピロバクターについては、分離培地の違いによる検出率に明確な差異は認められなかった。一方、サルモネラについては、増菌培地では、分離培地にかかわらずRVの方が高い検出率を示した。また、分離培地については、DHLと比較してクロモアガー Salmonella および Brilliance Salmonella Agar (Oxoid) の分離率は非常に高く、特に、Brilliance Salmonella Agar は高い検出率を示した(表5)。

(本成績は、平成23年度食品微生物学会にて発表済みであり、また、論文投稿する予定である。)

D. 考察

D-1. 牛肉の腸管出血性大腸菌スクリーニング検査の検討

PCR法において検出可能な菌濃度は、対照で 1.0×10^2 CFU/mL、肉液と脂肪液で 1.0×10^3 CFU/mLであり、検出感度として1オーダー低下した。このことから、肉成分や脂肪成分は、O157関連遺伝子のPCR法による検出を阻害することが認められた。しかしながら、肉液および脂肪液の検出感度の方が、平成18年11月2日付け食安監発第1102004号通知「O157及びO26の検査方法について」において示された検出感度(1.0×10^4 CFU/mL)よりも高感度であったことから、今回実施したPCR法によるスクリーニング検査は、食肉におけるO157検査に適応可能であることが示唆された。

また、同通知で推奨されている培養法についても、同様に調整した検体について実施した結果、各検体についてPCR法で示された検出感度(1.0×10^4 CFU/mL)以上でO157の検出が可能であった。さらには、本研究においては、厚労省監視安全課長通知で示されたO111検査法で新たに採用された分離培地を併用したが、この培地でもO157の検出が可能であったことから、分離培地を併用することは有用であると考えられた。

PCR法によるスクリーニングは、培養法と比較すると迅速に結果が得られ、ベロ毒素を産生する異なる血清型の腸管出血性大腸菌を同時に検出できることから、腸管出

血性大腸菌の検査に有用であると考えられる。これらのことから、今後、類似の検査工程である他の腸管出血性大腸菌についても、同時検出の可能性について検討を重ねたい。

D-2. 鶏から分離される大腸菌の血清型および毒素遺伝子

鶏肉や鶏卵から分離される食中毒菌として、サルモネラやカンピロバクターが問題になることは多々あるが、大腸菌が取りざたされることは多くはない。市場に流通している鶏肉は、食鳥検査に合格したものであるが、食鳥検査において認められる疾病の中でも、鶏大腸菌症は頻繁に遭遇する疾病の一つである。今回、大腸菌症のみならず、他疾病炎症部位からも大腸菌が高率に分離されたことは、鶏と体の解体工程において、大腸菌に汚染する可能性があることが示唆された。また、血清型については、O78 が最も多く分離され、次いで O18 であったことは、過去の報告とほぼ同じ傾向であった。しかしながら、農場により分離される血清型に特異性が確認されたこと、また、行政区ではあるが地域別にみても分離血清型に偏りがあることが確認されたことから、鶏から分離される大腸菌には地域特異性があることが認められた。今回、分離株から種々の毒素遺伝子の保有は認められなかったが、分離株の血清型は EHEC などの病原大腸菌にカテゴライズされるものも含まれていることから、今後、鶏から分離される大腸菌の調査は重要であると思われる。また、鶏からは高度の薬剤耐性大腸菌が見つかってきていることから、薬剤感受性についても実施したい。

D-3. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

今回、市販されている牛肉、豚肉、および鶏肉の汚染実態調査を実施したが、牛肉からはサルモネラ、カンピロバクターおよび腸管出血性大腸菌（EHEC）は検出されなかった。牛肉の EHEC 汚染については社会的にも問題になっているところではあるが、適正に処理され、取り扱われた牛肉であれば衛生的であることが示唆された。一方、鶏ひき肉については、38.5%からサルモネラが、23.1%からカンピロバクターが検出されたが、過去にも同様の報告があることから、全国的にも鶏肉の汚染度は高いことが示唆された。この理由として、鶏肉の流過程および食肉処理施設や一般食肉店における鶏肉の不適切な取り扱いによることも考えられるが、他の食肉と違う鶏肉特有の原因も推定される。

今回検討した培地に関して、カンピロバクターについては明確な差は確認されなかったが、サルモネラについては、増菌培地で RV、分離培地では、特に、日本国内未発売の Brilliance Salmonella Agar において高い検出率を示した。培養法でのサルモネラ検出については、食品をターゲットにしたものでも数多くの培地が市販されている。今回 Brilliance Salmonella Agar は良好な分離成績を示したことから、今後食肉からのサルモネラの分離には必要な培地であると考えられる。したがって、メーカーには日本での販売についての検討をお願いしたいところである。本研究により、市販食肉の汚染実態を把握することができたが、使用する培地によっては検出できないことが

あることが認められた。このことは、食中毒の検査においては非常に問題となるところである。今後、他の食中毒菌についても分離方法について検討し、あわせて食品別による検出法の検討をしたい。

E. 謝辞

本研究を実施するにあたり、材料の採取に快くご協力いただいた食肉処理施設および食鳥処理施設の関係者の方々に深謝いたします。

F. 発表論文

古茂田恵美子、森田幸雄、田村真理、山本茂貴、野田雅博、小澤邦壽、木村博一：市販鶏ひき肉中の *Arcobacter* , *Campylobacter*, *Salmonella* 汚染状況, 日本家政学会誌, 62, 721-725, (2011)
藤井聖士、山本純子、向井博之、藤田雅弘、塚越博之、吉住正和、齊藤美香、小澤邦壽、木村博一：リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルスの定量的迅速検出, 日本食品微生物学会誌, 28, 139-142, (2011)
黒澤肇、鈴木智之、塩原正枝、横田陽子、小畑敏、小澤邦壽、前橋市保健所衛生検査課、群馬県藤岡保健福祉事務所保健係、群馬県西部保健福祉事務所保健課：ステーキチェーン B を原因とした腸管出血性大腸菌 O157 による広域散発事例, 病原微生物検出情報, 31, 158-159, (2010)
森田幸雄、古茂田恵美子、塩飽二郎、細見隆夫、板垣基樹、中田恵三、中井博康、渡邊昭三、小澤邦壽、山本茂貴、木村博一：と畜場における牛および豚枝肉の衛生状況, 日本食品微生物学会雑誌, 27, 90-95, (2010)
Sakano C, Morita Y, Goto K, Yokota Y,

Annaka H, Fujita M, Kobatake S, Ishioka T, Hoshino T, Boonmar S, Pulsrikarn C, Nishina A, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H: Prevalence and genotype of *Salmonella Choleraesuis* in Gunma prefecture, Japan, *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41, 321-326(2011)
Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H: Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan, *Journal of Medical Microbiology*, 61, 410-419(2012)
Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S: Superoxide anion-scavenger, 1, 3-selenazolidin-4-one suppress serum deprivation induced apoptosis in PC12 cells by activating MAPkinase, *Toxicology and applied pharmacology*, 15, 257(3), 388-395(2011)
Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S: 3-(2,6-Dimethylphenyl)-2-selenoxo-1,3-thiazolidin-4-one suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK. *International journal of toxicology*, 30(6), 690-699(2011)

表1 培養法および遺伝子検査法におけるO157の検出状況

試料名	培地またはキット名	菌濃度 (CFU/mL)					
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
control	CT-SMAC	+	+	+	+	+	+
	クロモアガー-STECC	-	-	+	+	+	+
	CIX	-	+	+	+	+	+
	kit A	-	+	+	+	+	+
	kit B	-	-	+	+	+	+
モモ肉 (赤身)	CT-SMAC	+	+	+	+	+	+
	クロモアガー-STECC	+	+	+	+	+	+
	CIX	+	+	+	+	+	+
	kit A	-	-	+	+	+	+
	kit B	-	-	+	+	+	+
脂肪	CT-SMAC	-	+	+	+	+	+
	クロモアガー-STECC	-	-	+	+	+	+
	CIX	-	+	+	+	+	+
	kit A	-	-	+	+	+	+
	kit B	-	-	+	+	+	+

kit A, TaKaRaO-157(ベロ毒素遺伝子)PCR Screening Set
 kitB, O-157 & ベロ毒素遺伝子同時検出キット

表2 *E. coli* の分離状況および血清型

血清型 (O群)	分離株数	分離率 (%)
1	3	3.6
15	2	2.4
18	11	13.3
78	52	62.7
115	1	1.2
125	1	1.2
143	2	2.4
159	1	1.2
161	4	4.8
UT	6	7.2
	83	

表3 農場別*E. coli*分離状況および血清型

農場名	血清型(O群)	分離株数	分離率(%)
A(群馬)	78	10	100
B(群馬)	78	11	78.6
	125	1	7.1
	143	2	14.3
C(群馬)	78	4	100
D(長野)	18	1	10.0
	78	6	60.0
	UT	3	30.0
E(長野)	15	1	100
F(長野)	78	19	100
G(長野)	78	1	25.0
	UT	3	75.0
H(長野)	161	4	100
I(長野)	15	1	50.0
	115	1	50.0
J(千葉)	18	7	87.5
	78	1	12.5
K(千葉)	1	3	42.9
	18	3	42.9
	159	1	14.3
		83	