危惧されたが、宮城県及び岩手県ともに発生はなかった。

震災による行政や医療機関への甚大な被害のため、報告システムそのものが機能しなかった可能性や、避難所での消化器症状を有する者の探知や、あるいは行政への報告が不十分であった可能性も考えられる。特に、震災直後の3月と4月に食中毒事件の発生報告が無かったことや、震災被害の大きかった沿岸部において食中毒事件の増加が認められなかった点については、医療機関から保健所への既存の報告システム等の破綻が原因であった可能性も考えられるものの、全ての避難所には震災後の早期より、行政職員や県内外からの医療支援者が絶えず訪問していたことや、我々の講座と宮城県が協同で実施した合計約340か所に及ぶ避難所巡回でも胃腸炎の集団発生は認められなかったこと、さらに、2011年5月に宮城県で開始された国立感染症研究所症による症候群サーベイランスでも腸管感染症の明らかな流行がみられなかったことなどの複数の根拠から、少なくとも避難所における集団食中毒事件は無かったと推察された。この点については、今回協力を得られた宮城県及び岩手県の環境生活部の担当者も同意見であった。

ノロウイルスを原因とする食中毒事件が、過去4年間と比較して2011年で増加したが、宮城県における10件中4件、岩手県における11件中5件が、カキの関与が確定あるいは強く疑われる事件であった。さらに岩手県における震災後の4件全てのカキが宮城県産であった（震災前1件は岩手県産）。岩手県では、震災後は養殖場への大きな被害からカキの水揚げが困難となり、2012年10月まで出荷されない状況が続き、震災後に岩手県で消費されるカキのほとんどが宮城県産であった。2011年12月は宮城県近くの複数の海域で採取されたカキからノロウイルスが検出されているが、震災後の宮城県産カキの水揚げ量は例年の一割まで減少しており、このような状況でカキが原因と推定されるノロウイルス食中毒が増加した要因としては、下水道設備への被害や地震による海底土壌の撹拌が、海水汚染に繋がった可能性が考えられている。

高齢者におけるノロウイルス食中毒については、発生要因は、調理従事者を介した事件が多く、有症あるいは不顕性に関わらず、感染し汚染された調理従事者の手指が食品を汚染したことが原因と考えられる事件が多かったことから、施設内のマニュアルの順守、調理従事者の手洗い、衛生管理の徹底が必要であり、さらに調理従事者の食品衛生に対する意識の向上も必要であると考えられた。

患者年齢が高齢になるにつれて嘔吐の発症率が有意に高くなる傾向を示し、さらに他の症状はなく嘔吐のみが症状である患者の割合も高齢になるほど有意に増加し、80歳代以上では61.2%であった。よって、高齢になるほど嘔吐が唯一の症状であることが多くなる可能性があり、特に集団感染の初期では他疾患との鑑別が困難となり、感染者探知や感染対策導入の遅れに繋がる可能性のあることが示唆された。したがって、初期の発症者を見落とさないためには、利用者の日常の健康状態を注意深く観察し、何らかの消化器症状が見られた場合には、症状が嘔吐のみの場合であっても、ノロウイルス感染症を考慮した対応が必要といえ

る。また施設内で患者が発生した場合は、有症者以外にも、多くの利用者が既に感染している可能性を念頭に、手指衛生や環境消毒等の感染対策の強化が必要である。

E. 結論

今回の調査を通じ、2011年に食中毒事件の発生件数や患者数、事件当たりの患者数、患者年齢分布、主な原因病原体等に明らかな変化がなく、かつ食品の取り扱いや調理、保管方法の過誤等が主な発生原因であったことから、東日本大震災の食中毒発生に関与する明らかな影響はなかったか、あるいはノロウイルス食中毒の増加と関連した可能性など、限定的なものと考えられた。

震災後にも食中毒事件が増加しなかったという調査結果は、本邦においては、災害後のライフラインやインフラの被害、食材や食品の広域運送等は食中毒発生リスクに繋がりにくいことを示唆するものであり、災害後の食料や物資に乏しい不自由な生活の中でも、感染症や食中毒を発生させない努力をしていた住民（国民）の高い衛生観念や地域内外からの医療的及び公衆衛生的支援が効果的であったことを示すものと考えられた。

ノロウイルスによる食中毒では、年齢による症状の違いに有意な傾向が見られた。特に高齢者では、下痢、発熱の症状がなく嘔吐が唯一の症状であった患者が多かったため、非典型例であっても、ノロウイルス感染症を念頭に置いた感染対策が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

1) 徳田浩一、西順一郎、藺牟田直子、河野嘉文、賀来満夫．腸管出血性大腸菌サーベイランスにおける地理情報システム（GIS）を用いた効果的な情報還元に関する研究. 第43回日本小児感染症学会総会・学術集会、平成23年10月29日－30日、岡山

2) Koichi Tokuda, Hiroyuki Kunishima, Shiro Endo, Masumitsu Hatta, Hajime Kanamori, Noriomi Ishibashi, Kazuaki Arai, Yoshiaki Gu, Shinya Inomata, Tetsuji Aoyagi, Mitsuhiro Yamada, Miho Kitagawa, Hisakazu Yano, Yoichi Hirakata, Mitsuo Kaku, Assessment of Sanitary and Infectious Risk Factors in Evacuation Centers after the Great East Japan Earthquake. The 49th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), poster presentation, Boston, US, Oct 20-23. 2011

3) 徳田浩一、遠藤史郎、八田益充、具芳明, 山田充哲, 石橋令臣, 金森肇, 猪股真也、青柳哲史、國島広之、矢野寿一、賀来満夫：東日本大震災の食中毒発生への影響に関する検討、第53回日本社会医学会総会2012年7月15日大阪

4) 田内絢子、徳田浩一、賀来満夫：高齢者施設におけるノロウイルスによる食

中毒の臨床的特徴、第 72 回日本公衆衛生学会総会 2013 年 10 月 23 日、三重県

H. 知的財産権の出願・登録状況

１．特許取得

なし

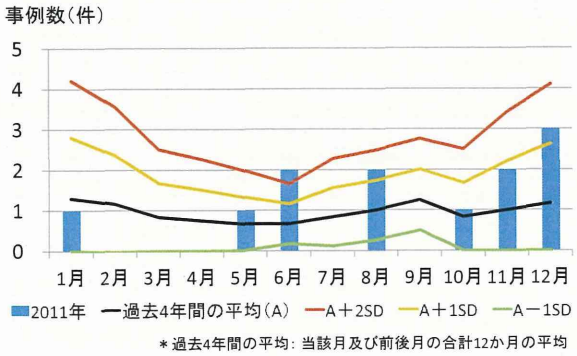
２．実用新案登録

なし

３．その他

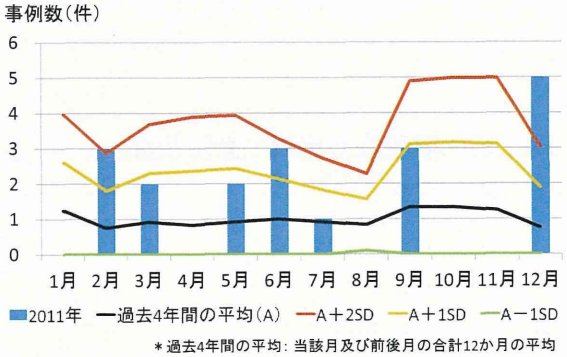
本分担研究において、調査にご協力いただきました宮城県環境生活部 食と暮らしの安全推進課 及び 岩手県環境生活部 県民くらしの安全課、盛岡市保健所、八王子市保健所、町田市保健所、杉並保健所、東京都多摩小平保健所、池袋保健所、文京保健所の方々に深謝いたします。

図1　食中毒事例の月別発生状況（宮城県）



＊過去4年間の平均：当該月及び前後月の合計12か月の平均

図2　食中毒事例の月別発生状況（岩手県）



＊過去4年間の平均：当該月及び前後月の合計12か月の平均

図3　保健所管轄区域別事件数（宮城県）2007～2011年

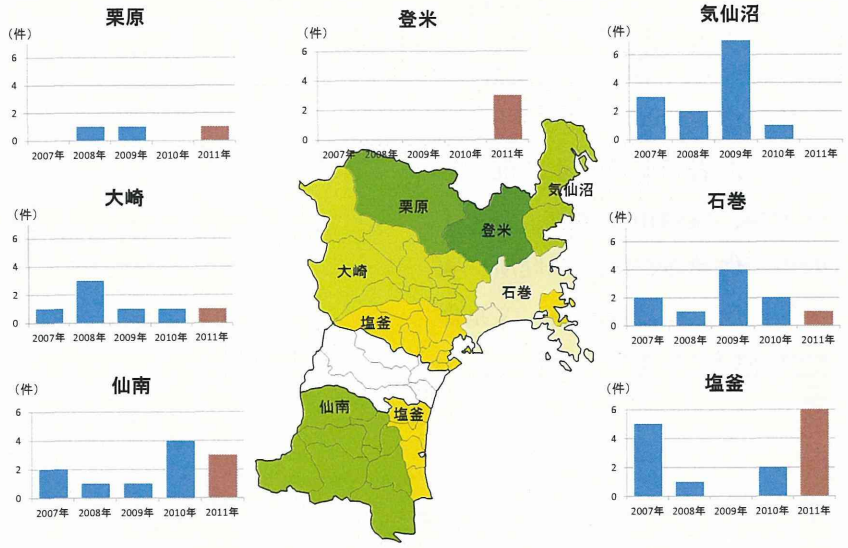


図4　保健所管轄区域別事件数（岩手県）2007～2011年

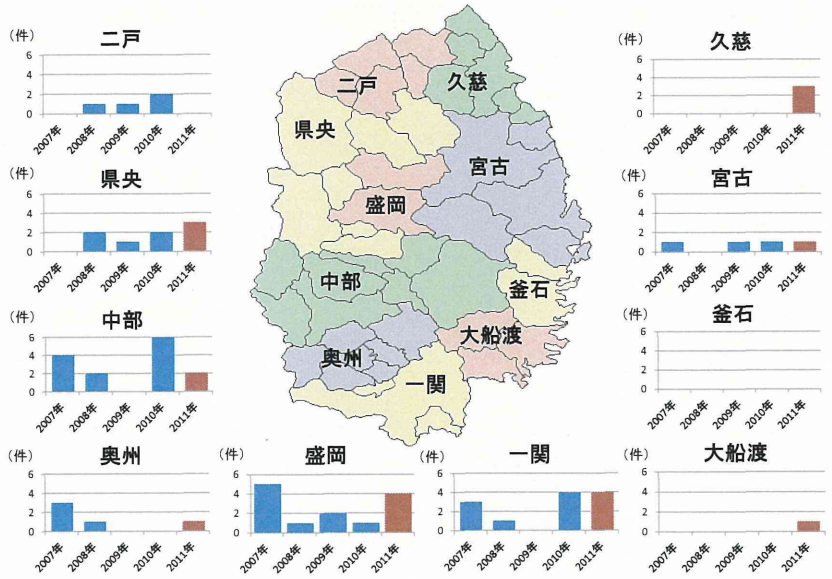
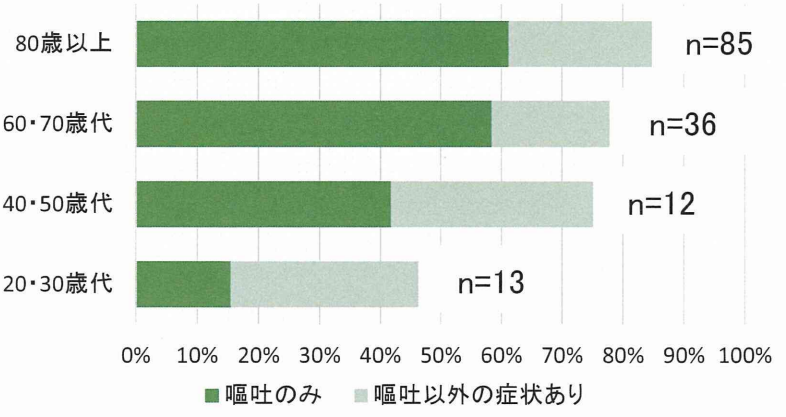
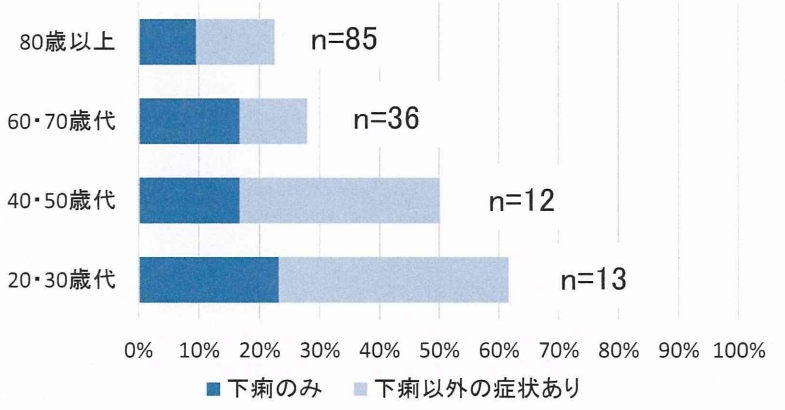


図５　嘔吐の発症率



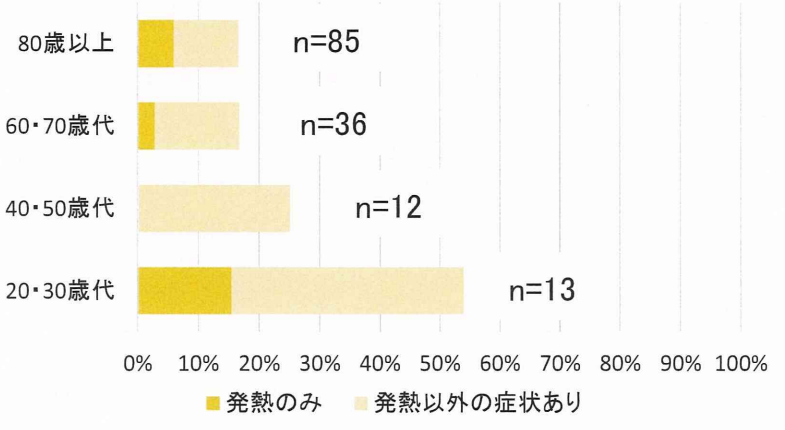
p=0.0031

図６　下痢の発症率



p=0.0014

図７　発熱の発症率



p=0.0068

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）

総合研究報告書

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

地域における原因食品推定法の検討

研究分担者	小澤　邦壽	群馬県衛生環境研究所
研究協力者	森田　幸雄	東京家政大学
	木村　博一	国立感染症研究所
	石岡　大成	国立感染症研究所
	小畑　　敏	群馬県食肉衛生検査所
	藤田　雅弘	群馬県食肉衛生検査所
	杢代　俊枝	群馬県食肉衛生検査所
	坂野智恵子	群馬県食肉衛生検査所
	櫻井　敏子	群馬県食肉衛生検査所
	杉田　裕子	群馬県食肉衛生検査所
	菊池茉莉花	群馬県食肉衛生検査所
	静野　直穂	高崎市食肉衛生検査所
	久保　雅敏	高崎市食肉衛生検査所
	森　　典子	高崎市食肉衛生検査所
	須藤　真登	高崎市食肉衛生検査所
	井上　伸子	群馬県衛生環境研究所
	河合　優子	群馬県衛生環境研究所
	塚越　博之	群馬県衛生環境研究所
	丹羽　祥一	群馬県衛生環境研究所
	佐々木佳子	群馬県衛生環境研究所
	吉住　正和	群馬県衛生環境研究所
	横田　陽子	群馬県衛生環境研究所
	下田　雅昭	群馬県衛生環境研究所
	黒澤　　肇	群馬県衛生環境研究所

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として、平成 23～25 年度に地域における原因食品推定法の検討を実施した。平成 23 年度から、牛肉における腸管出血性大腸菌（EHEC）検査スクリーニングの検討、市販食肉の細菌汚染状況および各分離培地を使用した比較検討およびアルコバクターの汚染調査における Arcobacter Selective Broth など選択分離培地を使用した検討を行った。さらに食鳥処理場に搬入された鶏から

分離される大腸菌の血清型別と薬剤耐性に関与するβラクタマーゼ産生株の調査、食肉処理場に搬入された牛の肝臓等から分離される EHEC とカンピロバクター属菌の検索とその臓器内の分布を調査した。牛肉の EHEC スクリーニングでは、食肉の成分は PCR 検査に影響を及ぼすことが確認されたが、培養法および PCR 法の検出感度は 1.0×10^4 cfu/mL 以上あり、厚生労働省通知で示された EHEC O111 の検査法における感度を満たしていた。また、食肉においても培養法および PCR 法による EHEC O157 のスクリーニング検査が可能であることが推定された。市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討では、牛ひき肉からは、サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌および EHEC は検出されなかったが、鶏ひき肉からサルモネラ属菌が 38%、カンピロバクター属菌が 23%、豚ひき肉からは、それぞれ 8%および 4%で検出された。サルモネラの増菌培地では 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。関東の 5 県から購入した牛、豚および鶏ひき肉のアルコバクターの汚染調査では、各選択培地を使用した検討で、牛は 18%、豚は 29.4%、鶏は 55.6%が分離された。また、食鳥処理場に搬入された鶏から分離される大腸菌の血清型別とβラクタマーゼ産生株の調査では、本県および近県から食鳥処理場へ搬入された鶏での肝臓の炎症部位から大腸菌が合計 159 株分離された。血清型別は、O25 が 41 株（25.8%）、O78 が 31 株（19.5%）などであった。市販血清で型別不能となった分離株は 64 株（40.3%）あった。また、高頻度に分離された血清型 O25 と O78 は、各地域の農場で確認された。薬剤耐性試験では、10 剤耐性が 10 株（6.3%）、9 剤耐性が 19 株（11.9%）、8 剤耐性が 5 株（3.1%）、7 剤耐性が 22 株（13.8%）などで、農場や地域間差は少ないが、その大部分は多剤耐性株であった。基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ（ESBL）産生では、159 株中 32 株（20.1%）にみられ、また、同遺伝子（CTX-M 型）の保有も確認された。ESBL 産生株は、地域別および同じ県内の農場においても分離差が認められた。食肉処理場に搬入された牛の肝臓等から分離される EHEC およびカンピロバクター属菌の調査は、解体処理されたと体（牛 11 頭）から採材した肝臓実質 198 検体、胆汁 11 検体、盲腸便 11 検体の計 220 検体を対象に実施した。EHEC 検索における O-157（ベロ毒素遺伝子）Screening PCR では、盲腸便 2 検体からの分離株が陽性を示した。カンピロバクター属菌は、肝臓実質から 11 と体中 5 と体（45%）、胆汁から 11 と体中 5 と体（45%）、盲腸便から 11 と体中 9 と体（82%）で分離された。肝臓の葉別では、肝管・総胆管に近接する方形葉および左葉からも本菌が検出され、感染牛での肝臓の汚染範囲は、ほぼ全体に及んでいることが推定された。さらに本菌は出荷別（農場別）に不検出あるいは個体別でも共通した血清型が分離されることが確認された。

以上のことから、培養および遺伝子レベルでの EHEC 検査法の検討、市販食肉の細菌汚染を調査、食鳥処理場で鶏から分離される多剤耐性大腸菌等の疫学調査、牛の肝臓、胆汁などから分離されるカンピロバクター属菌の保有調査は、経時的な実態を把握することで、食中毒発生時の疫学調査において、発生地域における原因食品の推定に寄与できる有効な方法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、EHEC O111 の検査法が示されているが、EHEC O157 についての適用が可能かどうか検討する。また、検査において、食肉の成分が細菌の検出に与える影響などについて検討する。

A-2.　市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

市販食肉の各食中毒原因菌による汚染状況を調査するとともに、培養検査に使用する培地の分離成績を比較する。そして、細菌の各種食肉への汚染の影響を把握して、食中毒原因菌検索における適切な培養法について検討する。

A-3.　市販ひき肉におけるアルコバクター属菌汚染状況

市販ひき肉からは種々の食中毒原因が検出され、特に鶏ひき肉からは、サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌などが高率に検出されている。近年、海外では食肉の汚染細菌としてアルコバクター属菌が注目され、集団食中毒事件も発生している。今回は市販食肉を対象にアルコバクター属菌の汚染実態を調査して、食中毒における新たな起因菌としての指標について検討する。

A-4.　食鶏由来大腸菌の血清型と薬剤耐性遺伝子の検索および地域別の検出状況

院内感染症の原因となるグラム陰性桿菌の多くは、接触感染等によって患者間を伝播することが知られているが、近年はこの原因菌の多剤耐性化が進み、家畜等動物の保菌からの二次感染も問題視されている。こうした現状から、今回は食鶏から高率に分離される大腸菌について、病原大腸菌 O 群の血清型別、ESBL 産生等の多剤耐性に関与する薬剤耐性遺伝子の保有を調査し、地域における検出状況を確認する。そして、食中毒調査における原因食品推定に関与する可能性について検討する。

A-5.　牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

牛生肉および牛生レバーの喫食が関係する EHEC 等の食中毒事件の発生状況から、食品、添加物の規格基準の一部を改正がなされた。昭和 34 年厚生省告示 370 号の一部改正（平成 23 年厚生労働省告示第 321 号）により適用されてきた生食用食肉の規格基準がより厳格に規定され、平成 23 年 10 月 1 日に施行された。また、昭和 34 年厚生省告示 370 号の一部改正（平成 24 年厚生労働省告示第 404 号）により、平成 24 年 7 月 1 日から牛肝臓の生食での安全性を確保する知見が得られるまでの間、牛肝臓を生食用として販売することが禁止された。しかし、平成 25 年 8 月には違法に提供された生レバーを原因としたカンピロバクター属菌による広域食中毒事件が発生しており、依然として牛肝臓の生食提供での取扱いが問題となっている。そこで今回は、牛肝臓等における食中毒原因物質（EHEC およびカンピロバクター属菌）の検索を行い、保菌状況および肝臓内部の分布状況を把握して、食中毒調査における EHEC およびカンピロバクター属菌の原因食品推定に寄与する可能性について検討する。

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

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、EHEC O157：H7（VT1-2陽性）牛糞便由来株について、以下の条件下で添加・回収試験を実施した。細切した試料25gを、ノボビオシン加mEC培地225mlに加えて42±1℃で22±2時間培養し、各濃度の供試菌株を添加した。ベロ毒素（VT）遺伝子の検出では、アルカリ熱抽出法によるDNA抽出後、O-157（ベロ毒素遺伝子）PCR Screening Set（タカラバイオ）、VT（VT1,VT2）型別は、O-157 &ベロ毒素遺伝子同時検出キット（タカラバイオ）を使用した。また、培養法によるEHEC O157の検出は、ダイナビーズO157を用いた免疫磁気ビーズ法で実施した。mEC培養液を処理して、そのビーズ濃縮液30μlを選択分離培地（CT-SMAC、CIX、クロモアガーSTEC）に塗抹し、36±1℃で18～24時間培養した。CT-SMAC培地では無色透明コロニー、CIX培地では青色から青緑色のコロニー、クロモアガーSTECでは藤色かつUV照射下で蛍光を示さないコロニーをEHEC O157と判定した。

B-2. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

市販の牛ひき肉50検体、鶏ひき肉26検体および豚ひき肉26検体を購入し、各25gを試料として、サルモネラ属菌、カンロバクター属菌およびEHEC（牛ひき肉のみ）の分離を試みた。サルモネラに属菌ついては、前培養培地としてBuffered Peptone Water（225mL）を使用し、37±1℃で22±2時間培養した。増菌培地では、RVブイヨンおよびTTブイヨンを使用し、42±0.5℃で22±2時間培養した。選択分離培地は、DHL、クロモアガーSalmonellaおよび国内で未発売であるBrilliance Salmonella Agar（Oxoid）を用いて、37±1℃で22±2時間培養した。カンピロバクター属菌については、増菌培地にprestonを使用し、42±1℃で24～48時間培養した。選択分離培地は、mCCDA、Butzler培地および国内で未発売であるBrilliance Campycount Agar (Oxoid)を用いて検討を行った。

B-3. 市販ひき肉におけるアルコバクター属菌の汚染状況

関東地方の5県内にある小売店から、牛ひき肉50検体、鶏ひき肉27検体および豚ひき肉17検体を購入した。各々の25gをArcobacter Selective Broth（ASB）225mLに加え、25℃で48時間増菌培養し、その1エーゼ量を変法CIN寒天培地およびArcobacter Selective Medium（ASM）に画線塗抹し、25℃で3～5日間培養した。それぞれの寒天培地上に発育したアルコバクター属菌を疑うコロニーをブルセラ寒天培地で純培養後、生化学性状試験およびPCR法により属種を決定した。

B-4. 食鶏由来大腸菌の血清型と薬剤耐性遺伝子の検索および地域別の検出状況

食鳥処理場に搬入された鶏を対象として、疾病検査時に大腸菌症などを伴ったと体から肝臓を採材し検体とした。肝臓表面に火炎滅菌後に割面を入れ、DHL寒天培地に

直接スタンプ塗抹を行った。37℃で 24 時間培養し、大腸菌と疑われるコロニーは、TSI や LIM 寒天培地などで確認し、他生化学的性状試験の結果から大腸菌を同定した。大腸菌と同定された菌株は、市販血清（病原大腸菌免疫血清：デンカ生研）を用いて血清型別（O 群）試験を行った。

薬剤耐性菌の検索では、薬剤ディスク（センシディスク：BD）12 剤（LCM, OTC, CET, AMPC, ABPC, LVFX, NFLX, NA, ST, KM, FOM, CL）を用いてスクリーニングを行った。判定は CLSI（米国臨床検査標準化協会）が示すブレイクポイントに基づいて実施した。ESBL 産生菌の検出は、薬剤耐性菌検査用ディスク（ESBLs-CAZ/CVA、ESBLs-CTX/CVA、ESBLs-CPX/CVA：栄研化学）を用いて、β-ラクタマーゼ阻害を確認した。また、薬剤感受性試験紙（シカベータテスト：関東化学）を用いて ESBL、メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）、AmpC 型 β-ラクタマーゼの検索を行った。PCR 法による ESBL 産生遺伝子（TEM 型、SHV 型、CTX-M 型）の検出は、以下の反応系で実施した。反応条件は初期変成 94℃ 2 分、熱変性 94℃ 1 分、アニーリング 55℃ 1 分、伸長 72℃ 1 分 30 秒を 30 サイクルとした。各種プライマーは、TEM-型（PCR 産物サイズ 824bp）、SHV-型（PCR 産物サイズ 1,051bp）、CTX-M-1 グループ（PCR 産物サイズ 516bp）、CTX-M-2 グループ PCR 産物サイズ 780bp）CTX-M -9 グループ（PCR 産物サイズ 393bp）を使用した。

B-5. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

食肉処処理場へと畜解体のため搬入された牛 11 頭を対象として、牛肝臓および同一個体の胆汁、盲腸便を採取し検体とした。盲腸便と肝臓を内臓検査場所から採取、別室にて滅菌済み注射針および注射筒で胆汁を約 10ml 採取した、次に胆嚢を取り除き、肝臓実質は全体を 18 ブロックに分割した。牛 11 と体から採取した検体は、肝臓実質が 198（11×18）検体、胆汁が 11 検体、盲腸便が 11 検体の計 220 検体であった。EHEC 検索では、生化学的性状を確認してから血清型別試験を実施した。PCR 法による VT 遺伝子の検出は、以下の方法で実施した。肝臓実質はコンタミネーションを防止するためブロック周囲をアルコール消毒および火炎滅菌してから無菌的に中心部を 10g 採取した。mEC ブロス 90ml を加え、約 1 分間ストマッキングして、42℃で 18～20 時間培養した。胆汁と盲腸便は各 1ml（≒1g）に mEC ブロス 9ml を加えて撹拌した後、同様に 42℃で 18～20 時間培養した。肝臓実質を培養した mEC ブロスは、遺伝子抽出キット（Qiamp DNA Mini Kit：QIAGEN）を用いて処理した後、胆汁、盲腸便を培養した mEC ブロスは、アルカリ熱抽出法で処理した後、それぞれ O-157（ベロ毒素遺伝子） Screening PCR（タカラバイオ）で PCR 検査を実施した。PCR 陽性検体については、O-157 &ベロ毒素遺伝子同時検出キット（タカラバイオ）で VT の型別を実施した。

カンピロバクター属菌の検索では、EHEC と同様に採取した検体について、肝臓実質および盲腸便は 1g、胆汁は 1ml（≒1g）を 9ml のプレストン培地に入れ、42℃で 22～24 時間微好気培養した。培養液を

CCDA 培地に画線塗抹し、42℃ で 48 時間微好気培養した。カンピロバクター属菌を疑うコロニーは 1～5 個釣菌し、純培養した後、生化学的性状試験および PCR 法にて属種を判定した。さらに分離されたカンピロバクター属菌は、1 と体内の複数箇所からの同一血清型の分離株と同一の出荷者および血清型の分離株について、菌株間の相同性確認のため、制限酵素 *Sma* I、*Kpn* I で消化後、PFGE（pulsed-field gel electrophoresis）法で遺伝子多型解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では個人が特定される情報、不利益を被る情報は用いていない。

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 いずれの分離培地からも O157 の検出が可能であった（表 1）。

C-2. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

牛ひき肉 50 検体から調査対象としたサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌および EHEC は検出されなかった。しかし、鶏ひき肉の 38.5%（10/26）からサルモネラ属菌、23.1%（6/26）からカンピロバクター属菌が検出された。また、豚ひき肉については、サルモネラ属菌が 7.7%（2/26）、カンピロバクター属菌が 3.8%（1/26）から検出された。鶏ひき肉からのサルモネラ属菌およびカンピロバクター属菌の検出状況では、カンピロバクター属菌は、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。しかし、サルモネラ属菌については、分離培地にかかわらず RV の方が高い検出率をであった。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、Brilliance Salmonella Agar は、特に高い検出率を示した（表 2）。

C-3. 市販ひき肉におけるアルコバクター属菌の汚染状況

アルコバクター検出状況では、牛ひき肉からは 9/50 (18.0%)、豚ひき肉からは 5/17 (29.4%)、鶏ひき肉からは 15/27 (55.6%)検出された。分離菌種は、牛ひき肉については、8 検体から *Arcobacter*（*A.*）*butzlei* のみ検出され、1 検体から *A. butzlei* および *A. creaerophilus* が検出された。豚ひき肉については、5 検体から *A. butzlei* のみ検出された。鶏ひき肉については、10 検体から *A. butzlei* のみ検出され、4 検体から A. *butzlei* および *A. creaerophilus* が、また、1 検体から *A. creaerophilus* のみ検出された。検出された *A. creaerophilus* の遺伝子型は、全て group1B であった。

C-4. 食鶏由来大腸菌の血清型と薬剤耐性遺伝子の検索および地域別の検出状況

今回の調査では、肉眼所見から大腸菌症と判定された 107 羽（7 県 27 農場）のうち 37 羽（6 県 18 農場）の疾病症状を呈する鶏肝臓の炎症部位から、大腸菌が 159 株分離された。大腸菌の血清型別試験では、O25 が 41(41/159)株、O78 が 31(31/159)株、O153 が 7 (7/159) 株、O8 が 4 (4/159) 株 O142 が 3 (3/159) 株、O1 および O6 が各 2 株、他は O15、O55、O103、O114、O124 が各 1 株であった。また、市販血清で型別不能 (UT) である株が 64 (64/159) 株（40.3%）認められた。高頻度に分離された血清型 O25 と O78 は、各地域の農場から共通して検出されたが、検出率の低い血清型では各農場や地域間で明瞭な違いは見られなかった。

薬剤耐性試験では、使用した 12 薬剤に対して、大腸菌 159 株は、10 剤耐性が 10 株、9 剤耐性が 19 株、8 剤耐性が 5 株、7 剤耐性が 20 株、6 剤耐性が 22 株、5 剤耐性が 35 株、4 剤耐性が 4 株、3 剤耐性が 5 株、2 剤耐性が 21 株、単剤耐性が 18 株であった。薬剤別耐性株数は、CET 121 株（76.1%）、AMPC 114 株 (71.7%)、AMPC 112 株（70.4%）など高頻度あった。大腸菌の薬剤耐性パターンでは、農場や地域による明瞭な分布の違いはなかったが、その大部分が多剤耐性株であることが認められた。ESBL 産生株の検出では、薬剤感受性試験のシカベータテストは 31 (31/159) 株（19.5%）が陽性を示したが、CLSI によるディスク拡散法では、32 (32/159) 株 (20.1%) が陽性と判定された。PCR 法では CTX-M1 グループ 16 株 (16/159)、CTX-M2 グループ 16 株 (16/159) から ESBL 産生遺伝子が検出されたので、計 32 株 (20.1%) を同産生株と判定した。そして、MBL 産生遺伝子および AmpC 産生遺伝子の検出はなかった。今回分離された ESBL 産生大腸菌は、地域別および同一県内の農場別にも分離差が認められた（表 3）。

C-5. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

EHEC の検索では、牛 11 頭のと体から採取した肝臓実質 198 (11×18) 検体、胆汁 11 検体、盲腸便 11 検体の計 220 検体は、O-157（ベロ毒素遺伝子）Screening PCR において、盲腸便 2 検体からの分離株は陽性を示したが、他は全て陰性であった。この盲腸便 2 検体の分離株について、EHEC 検索のため生化学的性状等の培養による同定を試みた。1 検体は病原大腸菌 O6 と血清型別されたが、O-157 &ベロ毒素遺伝子同時検出キットで VT 遺伝子の保有はなかった。他 1 検体は、病原大腸菌免疫血清では型別不能で、同検出キットでの VT 遺伝子の保有は認められなかった。今回の検索では 11 と体の採材からは、いずれも EHEC は検出されなかった。

カンピロバクター属菌の検索では、肝臓実質からは 11 と体中 5 と体（45%）、胆汁からは 11 と体中 5 と体（45%）、盲腸便からは 11 と体中 9 と体（82%）から本菌が検出された（表 4）。また、4 と体においては、肝臓実質の複数ブロックから同属菌が分離された。肝臓実質から分離された部位は、左葉・方形葉・尾状葉であった。カンピロバクター属菌の型別では、*Campylobacter*（*C.*）*coli*、は 3 と体の盲

腸便、1と体の胆汁、1と体の1ブロックから検出された。また、*C. jejuni*は1と体の盲腸便、4と体の胆汁、4と体の肝臓実質の18ブロックから検出された。また、1と体の盲腸便は血清型別不能（推定：*C. jejuni*）であった。今回の検索では、1と体からは、*C. coli*と*C. jejuni*の同時検出はなかった。さらにPFGEによる遺伝子多型解析では、同じ個体から採取された同一血清型の株でDNA切断パターンが一致したと体および数グループ（パターン）に分かれると体とがあった。また、同一出荷（農場別）での比較では、DNA切断パターンの一致する株はなかった。

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1.0×10^3CFU/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、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、厚生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が有用であると考えられた。 PCR法によるVT遺伝子スクリーニングは、培養法と比較すると迅速に結果が得られ、VT産生が異なる血清型のEHECを同時に検出できることから、同検査に大変有用であると考えられた。

D-2. 市販食肉の細菌汚染状況および各培地の比較検討

今回、市販の牛肉、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属菌、カンピロバクター属菌およびEHECは検出されなかった。しかし、牛肉のEHEC汚染については、社会問題にもなっているので、衛生的かつ適正に処理され、取り扱うことが必要と考えられる。一方、鶏ひき肉については、38.5%からサルモネラ属菌、23.1%からカンピロバクター属菌が検出されたが、過去にも同様の報告があり、全国的に鶏肉の汚染度は高いことが示唆された。食鳥処理施設における処理行程での汚染や鶏肉の流通過程および一般食肉店における鶏肉の不適切な取り扱いによる原因も考えられる。今回検討した培地では、カンピロバクター属菌について明確な差は確認されなかったが、サルモネラ属菌については、増菌培地でRV、分離培地では、Brilliance Salmonella Agarが高い検出率を示した。今回の調査では、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率に差のある

ことも確認された。今後、食中毒事例の原因食品推定に係る有用な分離方法について、さらに検討を進めたい。

D-3. 市販ひき肉におけるアルコバクター属菌の汚染状況

牛、豚および鶏の市販ひき肉におけるアルコバクター属菌の汚染実態調査では、すべての動物種から本菌が検出され、特に鶏ひき肉からは高率に分離された（55.6%）。牛肉等の EHEC 汚染については、社会的にも問題になっているが、アルコバクター属菌は、本邦において食中毒原因物質に認められていないので、あまり知られていないものと推測される。アルコバクター属菌は、グラム陰性、S 字状桿菌でカンピロバクター科に属するが、好気的条件および低温（15℃）でも発育可能な食品由来感染の起因菌である。また、*A. butzlei*、*A. creaerophilus* および *A. skirrowii* は、人と動物の両者に病原性を有することが報告されており、海外ではこれらの菌による集団食中毒が報告されている。2000～2001 年の調査によると、鶏肉の 43%、また、2010 年の調査では 52%から本菌が分離されている。今回分離されたアルコバクターも上記菌種であったことから、現在においても感染リスクは依然高いことが確認された。今後、食肉における汚染指標菌として、継続監視が必要であると考えられた。

D-4. 食鶏由来大腸菌の血清型と薬剤耐性遺伝子の検索および地域別の検出状況

近年は薬剤耐性菌の増加が大きな社会問題になっており、医療現場での各種抗菌剤の使用のみならず、畜産や養鶏場などでの多目的な使用も無視できない。特に食肉（鶏、豚、牛）の中で、鶏肉から多剤耐性大腸菌が頻繁に分離されている。食鶏の主要細菌性疾患である大腸菌症は、食鳥処理場（臨場検査）で多数見受けられるが、処理工程で完全に菌を排除することは極めて困難な状況にある。今回の調査でも鶏肝臓の炎症部位から大腸菌が高率に分離されていることは、食用の鶏肉が大腸菌汚染を受け、不十分な加熱調理等によりヒトが感染する機会の高いことが示唆される。また、感染が起こっても無症状保菌の状態であれば、他のヒトへの二次感染あるいは食中毒原因の媒介となる可能性も否定できない。今回の調査において、鶏肝臓の炎症部位から高率に多剤耐性大腸菌、ESBL 産生大腸菌が分離されていることから、食中毒事件調査で、鶏肉の喫食歴があれば、これらを主軸に検索することにより原因食品の推定に役立つものと考えられる。また、今回の調査では、O25 と O78 の血清型が高率に分離されているが、医療現場では、消化器症状を伴ったヒトからの分離は散見される程度である。しかし、各地域の農場から共通して検出される現状から、食中毒事件で患者の複数からこれらの血清型が分離された場合、鶏肉が原因となっている可能性が推測される。

薬剤耐性試験においては、CLSI によるディスク拡散法では、32（32/159）株（20.1%）が ESBL 陽性を示した。また、ESBL 産生遺伝子（TEM 型、SHV 型、CTX-M 型）の検索では、供試した 159 株中、CTX-M1 グループは 16 株（16/159）、CTX-M2 グループは 16 株から当該遺伝子の保有が確認された。ESBL 産生遺伝子である TEM 型および SHV 型遺伝子の不検出については、

今後の検討が必要であると思われた。

以上のことから、食鶏の肝臓から高率に分離される大腸菌には、血清型に地域共通性があり大部分が多剤耐性菌であること、また、ESBL 産生菌では、地域別および農場別に分離差のあることが確認された。今後、食中毒発生時の疫学調査において、生物学的のみならず、遺伝子レベルの分析を行うことは、発生地域における原因食品を推定する有用な方法であると考えられた。

D-5. 牛肝臓から分離される食中毒原因菌および肝臓内部における分布状況

今回の調査における EHEC の検索では、牛 11 頭のと体から採取した肝臓実質、胆汁、盲腸便の全てにおいて検出されなかった。一方、国内で O157 による食中毒事件が多発した 1996 年頃は、国産牛からの検出率は 1.6%前後であると報告されていたが、2007～2008 年に農林水産省が実施した調査では、国内の牛飼育農場での O157 の保有率は 27.9%、個体別では 9.3%であったと報告されている。今回の調査では、肝臓実質、胆汁を対象に実施しているが、EHEC は検出されなかったことから、腸管内からの EHEC の二次汚染は考えにくい。今後も食中毒における原因食品を推定する疫学情報として、牛肝臓の EHEC 汚染について継続した調査が必要であると思われた。

カンピロバクター属菌の検索では、盲腸便から 82%と高率に分離されており、牛の多くが腸管内に保菌していることが確認された。また、胆嚢内の胆汁および肝臓実質からも各 45%と高率に汚染されていた。肝臓の葉別では、肝管・総胆管に近接する方形葉や、離れた左葉からも本菌が検出されており、感染牛での汚染範囲は、ほぼ肝臓全体に及んでいることが推定された。今回、11 頭分の検査では、肝臓の分割区分で 18 ブロック中 6 ブロックは不検出であったので、今後の採材や検査法などの検討が必要と思われる。また、本菌の肝臓内への汚染経路は、本来腸管内に生息している菌が総胆管を経由して胆汁中で増殖し肝臓の各葉に到達するものと考えられている。今回の PFGE 法でも同一と体において、胆汁由来株と複数の肝臓ブロック由来株とで DNA 切断パターンが一致したことは、腸管からの汚染の可能性が推定された。

カンピロバクター属菌は、ノロウイルスに続きサルモネラ属菌と並んで食中毒の主要な原因物質となっている。平成 24 年 7 月 1 日から牛肝臓の生食での販売が禁止されたが、本調査での検出率からみても高濃度汚染は明らかなので、食肉の加熱調理には十分な注意が必要とされる。今後も本菌による食中毒事件は推測されるので、牛肝臓のみならず、食材等の継続した細菌汚染の実態調査をすることは、食中毒事件の疫学調査において、地域における原因食品を推定する有効な方法になると考えられた。

E. 結論

食中毒事件の疫学調査における原因食品の推定には、食中毒様症状を引き起こす原因物質を収去食品等から分離することが事件の究明に向けての重要な手がかりとなる。また、疫学調査においては、市販されている食品や食材が原因物質にどの程度汚染されているのか実態を事前に把握することは、検索を実施するうえでの有力情報となる。さらに原因物質検索では、厚生労働省通知

で示される方法等に基づき実施するが、同時に検査法についての手法的検討も必要である。本研究では牛肉のEHECのスクリーニング法の検討、市販食肉の細菌汚染調査、食鶏から分離される多剤耐性大腸菌の薬剤耐性調査、牛の肝臓、胆汁などから分離されるカンピロバクター属菌の保有調査を実施した。食肉等から分離される原因物質(細菌)の生物学的および遺伝子レベルでの分析情報は、患者便等から分離される菌(原因物質)との相同性をみるうえで事件の原因究明に不可欠であると思われる。

以上のことから、一般に市販・流通する食肉等の細菌汚染について継続な調査を実施することは、食中毒発生地域における原因食品の推定に寄与できる極めて有用な手段であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

Sakano C, Kuroda M, Sekizuka T, Ishioka T, Morita Y, Ryo A, Tsukagoshi H, Kawai Y, Inoue N, Takada H, Ogasawara Y, Nishina A, Shimoda M, Kozawa K, Oishi K, Kimura H. Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing sulfide-producing *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. J Clin Microbiol. 51(1):328-30. 2013

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

謝辞：本研究の実施にあたり、検査材料の採取および調査に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。

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STEC	－	－	＋	＋	＋	＋
	CIX	－	＋	＋	＋	＋	＋
	kit A	－	＋	＋	＋	＋	＋
	kit B	－	－	＋	＋	＋	＋
モモ肉（赤身）	CT-SMAC	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	クロモアガーSTEC	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	CIX	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	kit A	－	－	＋	＋	＋	＋
	kit B	－	－	＋	＋	＋	＋
脂肪	CT-SMAC	－	＋	＋	＋	＋	＋
	クロモアガーSTEC	－	－	＋	＋	＋	＋
	CIX	－	＋	＋	＋	＋	＋
	kit A	－	－	＋	＋	＋	＋
	kit B	－	－	＋	＋	＋	＋

kitA，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　*Campylobacter* および *Salmonella* の分離状況（鶏ひき肉）

Campylobacter				
増菌培地	Preston			合計
分離培地	mCCDA	Butzler	BCA	
分離株数	5	5	6	6
（%）	(19.2)	(19.2)	(23.1)	(23.1)

Salmonella							
増菌培地	RV			TTH			合計
分離培地	DHL	CHROM	BSA	DHL	CHROM	BSA	
分離株数	3	8	9	1	3	4	10
（%）	(11.5)	(30.8)	(34.6)	(3.8)	(11.5)	(15.4)	(38.5)

表 3　各農場におけるESBL 産生株の検出数

農　場		菌株数	陽性数	陽性率
千葉県	A	12	7	(58.3%)
栃木県	B	13	9	(69.2%)
	C	15	1	(6.6%)
長野県	D	13	6	(46.2%)
	E	5	1	(20%)
	F	18	0	
	G	3	0	
	H	1	0	
群馬県	I	3	3	(100%)
	J	2	1	(50%)
	K	9	4	(44.4%)
	L	20	0	
	M	14	0	
	N	12	0	
	O	12	0	
茨城県	P	4	0	
	Q	2	0	
静岡県	R	1	0	
合計		159	32	(20.1%)

表 4　カンピロバクター属菌の検出状況

検 出 部 位	と体(個体)数
検出なし	1
盲腸便のみ	4
胆汁・盲腸便	1
肝臓実質・胆汁	1
肝臓実質・盲腸便	1
肝臓実質・胆汁・盲腸便	3
合　計	11

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）
総合研究報告書
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

広域食中毒疫学調査ガイドラインの作成

研究分担者　杉下由行
東京都健康安全研究センター
研究協力者　高橋琢理、八幡裕一郎、砂川富正
国立感染症研究所感染症疫学センター
春日文子
国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

本研究の目的は広域食中毒疫学調査ガイドラインを作成することである。作成に当たり、行政関係者等へのインタビューに加え、資料文献、各種対応マニュアル、関連法規について情報収集し、作業部会を開催した。

平成23年度、広域食中毒調査票を作成し、平成24年度に、「広域食中毒調査票に関する利用マニュアル（案）」を作成した。平成25年度には、「広域食中毒疫学調査ガイドライン」の作成とともに今後のわが国における広域食中毒事例対応の姿について提言としてまとめた。

本ガイドラインの策定により疫学調査について一定の方向性が示され、広域食中毒事例の対応への共通理解が進むものと思われる。また、自治体の機能やネットワークを高めていくためにも提言に沿った今後の取り組みが期待される。

A．研究目的

本研究の目的は広域食中毒疫学調査ガイドラインを作成することである。

B．研究方法

行政関係者や専門家等へのインタビューに加え、国内外の資料文献、各種食中毒対応マニュアル、関連法規について情報収集し、定期的な作業部会を開催した。

（倫理面への配慮）

研究に当たり、既に公表されている情報のみを収集し、個人情報を含む情報は取り扱わなかった。各種研究倫理指針に該当する項目はなく、倫理面への配慮は特段必要としなかった。

C．研究結果

平成23年度は、広域食中毒調査票を作成した。平成24年度は、自治体向けに「広域食中毒調査票に関する利用マニュアル（案）」を作成した。平成25年度は、広域食中毒疫学調査に関するガイドラインを作成し、今後のわが国における広