

平成 26 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
畜産食品の安全性確保に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題名 牛消化管内の大腸菌群等の分布状況

分担研究者：山崎 伸二 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究協力者：日根野谷淳 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

研究要旨：牛の肝臓内と胆汁を含む種々の消化管部位における大腸菌群細菌の分布及び陽性率と相関性を明らかにする目的で、牛の消化管内における大腸菌群の分布を調べた。その結果、唾液から牛の消化管内はほぼ 100%大腸菌群が検出され、細菌数は肛門に近づくに従い高くなった。一方、牛の肝臓内を 5 カ所に分けて同様に分布を調べた結果、非可食部位に相当する 3-5 での陽性率が約 52-57%と可食部に相当する 1 と 2 (26-34%) と比べた高かった。さらに、冬場に比べて夏場に高くなる傾向にあった。同様に *stx* 遺伝子を PCR で検出した結果、肛門の組織で 78.3%と最も高かったが、肝臓でも 3.3%の割合で検出されえた。しかし、*stx* 遺伝子陽性となった部位は全て非可食部位の 3-5 であった。

A. 研究目的

牛肝臓内から腸管出血性大腸菌 O157 が検出されたとの報告が切掛けで、生レバーの生食が禁止となった。一方、生レバーの需要は大きく、生レバーの復活が求められている。しかし、現状の牛肝臓を生で食すると腸管出血性大腸菌感染症に罹患する可能性が否定できず、特に小児や老人が感染すると溶血性尿毒症症候群や脳症を併発し重篤化する。

牛肝臓内に腸管出血性大腸菌が存在しているか、存在しているとどこに存在しているかを、牛肝臓内で腸管出血性大腸菌が陽性となる場合、他の消化管部位のどこに生息している可能性が高いかを明らかにすること目的とし、牛消化管内及

び肝臓内における大腸菌群細菌の分布を調べ、牛消化管内及び肝臓内における *stx* 遺伝子を検出し腸管出血性大腸菌の有無について検討した。

尚、牛の消化管の検体採取場所は、唾液、第一胃、十二指腸、盲腸及び直腸内容物又は組織、肝臓と胆汁で、大腸菌群の細菌数を調べた。さらに各消化管組織とその内容物について *stx* 遺伝子の検出を試みた。肝臓については可食部 1 と 2 に分け、非可食部については 3、4、5 に分けて大腸菌群の細菌数及び *stx* 遺伝子の検出を試みた。

B. 研究方法

1. 牛消化管組織内の大腸菌群細菌数の

測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出

牛の屠畜解体直後に唾液 (n=41)、第一胃 (n=46)、十二指腸 (n=68)、盲腸 (n=69)、直腸 (n=65) のそれぞれの内容物と胆嚢 (n=65)、肝臓 (n=69) と胆汁 (n=69) を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。肝臓については約 50 g を同量の滅菌 PBS に加え、ストマッカー処理を 30 秒間行なった。処理が不十分な場合は、さらに 30 秒間処理を行なった。得られた懸濁液と原液の胆汁を直接滅菌 PBS で希釈し、マッコスキー寒天培地に植菌して、37°C で一夜培養し大腸菌群細菌数を測定した。さらに、ストマッカー処理した肝臓検体と胆汁検体をそれぞれ 1 mL を 1.25 倍の TSB 4 mL に加え 37°C、18 時間、浸透培養し、得られた増菌培養液 100 µL を 900 µL の TE buffer (pH 8.0) に加え、100°C、10 分間加熱し、その上清を鋳型 DNA として *stx* 遺伝子の検出するための PCR を行なった。

2. 肝臓内の大腸菌群細菌の分布と *stx* 遺伝子の PCR による検出

牛肝臓を図に示したように可食部に相当する部位 1 と 2、非可食部の 3、4、5 とに分け、1 と同様の方法で胆汁と共に大腸菌群細菌数の測定と PCR 法による *stx* 遺伝子の検出を試みた。

C. 研究結果

1-1. 牛消化管組織内容物の大腸菌群細菌数の測定

表 1 に示した通り、唾液から肛門にかけてほぼ 100% で大腸菌群細菌が検出さ

れた。データには示していないが、検出された細菌数も第一胃から肛門に近づくに従って高くなった。しかしながら、胆汁では 14%、肝臓では 68% で陽性となった。

1-2. 牛消化管組織内容物の *stx* 遺伝子の PCR 法による検出

表 2 に示した通り、*stx* 遺伝子は肛門組織で 78.3% と最も陽性率が高かった。しかしながら、肛門内容物では 45%、盲腸組織では 29%、盲腸内容物で 26%、十二指腸組織で 5.8%、十二指腸内容物で 15%、第一胃内容物で 8.6% であった。

一方、唾液で 22% とやや高めの値を示した。胆汁では調べた 149 検体全てで検出されなかったが、肝臓では 3.3% で陽性となった。

2-1. 肝臓内の大腸菌群細菌の分布

1-1 で肝臓から 68% の割合で大腸菌群細菌が検出されたため、肝臓を 5 つの部位に分けてどの部位で大腸菌群細菌が多く分付するかについて調べた。その結果、表 3 にまとめたように可食部に相当する部位 1 と 2 では、陽性率が 26 と 34% と低かったのに対し非可食部位の 3、4、5 ではそれぞれ 52、57、53% と高かった。さらに、季節性を考慮して比較すると、比較的気温の高い High シーズンでは、非可食部位の陽性率は 70% まで上がるのに対し、可食部位の陽性率は 20% 以下と低くなった。

2-2. 肝臓内の *stx* 遺伝子の分布

1-2 で肝臓から 3.3% の割合で *stx* 遺伝

子が検出されたため、2-1 とどうよう肝臓を 5 つの部位に分けてどの部位で *stx* 遺伝子が検出されるかについて調べた。その結果、可食部位に相当する 1 と 2 では全く検出されず、*stx* 遺伝子が検出されたのは、非可食部位の 3、4、5 であった。尚、現在得られた PCR 産物が *stx2* に特異的なものであるか確認中である。

D. 考察

当初、牛肝臓内で検出される腸管出血性大腸菌及び大腸菌群細菌は、胆汁に汚染している菌が胆管を通して肝臓内を汚染すると考えていた。しかし、今回得られた結果では、胆汁中の大腸菌群細菌と肝臓内で検出された大腸菌群細菌とは相関性が無く、単純にと畜解体後に胆汁中の菌が肝臓内を汚染しているのではない可能性が示された。*stx* 遺伝子についても同様に、今回調べた範囲で胆汁からは *stx* 遺伝子は全く検出されなかった。肝臓内で *stx* 遺伝子が検出された場合も、非可食部位に相当する 3、4、5 であった。一方、可食部位に相当する 1 と 2 では大腸菌群細菌が検出されたが、その割合は気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。しかし、*stx* 遺伝子は、夏場、冬場に関わらず検出されな

った。このことは、可食部位に STEC 存在する可能性は低く、何らかの方法で大腸菌群細菌のみならず腸内細菌科菌群を殺菌することができれば、生食用のレバーが提供できる可能性が考えられる。何故、非可食部位の 3、4、5 で *stx* 遺伝子が検出されたかは、今後の課題である。

E. 結論

牛肝臓内の大腸菌群汚染は、単純にと畜解体後の細菌汚染でなく、現在は不明であるが別の理由が考えられる。牛の肝臓内の大腸菌群細菌による汚染は、気温の高い夏場に多く、気温の低い冬場に少ない傾向にあった。さらに、通常生レバーとして提供される可食部位では検出される大腸菌群細菌数、陽性率も低く *stx* 遺伝子は検出されなかった。

F. 健康危機情報

無し

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

無し

表 1 . 消化管内の大腸菌群細菌陽性率

	陽 性 数 / 検 体 数 (%)
唾液	41/41 (100)
第一胃内容物	46/46 (100)
十二指腸内容物	67/68 (98)
盲腸内容物	69/69 (100)
直腸内容物	65/65 (100)
胆汁	10/69 (14)
肝臓	47/69 (68)
胆嚢	14/65 (21)

表 2 . 牛の消化管部位における *stx* 遺伝子の分布

採取部位 (検体数)	<i>stx1</i> 陽性数	<i>stx2</i> 陽性数	<i>stx1/2</i> 陽性数	合計 (%)
舌 (46)	1	1	1	(6,5)
唾液 (41)	1	3	5	6 (21.9)
胆汁 (149)	0	0	0	0 (0)
肝臓 (149)	0	5	0	5 (3.3)
第一胃内容物 (46)	2	1	1	4 (8.6)
十二指腸 (68)	1	2	1	4 (5.8)
十二指腸内容物 (68)	2	6	2	10 (14.7)
盲腸 (69)	4	14	2	20 (28.9)
盲腸内容物 (69)	4	12	2	18 (26)
肛門 (120)	7	61	26	94 (78.3)
肛門内容物 (65)	6	16	7	29 (44.6)

表 3. 季節ごとの肝臓部位別大腸菌群細菌陽性率

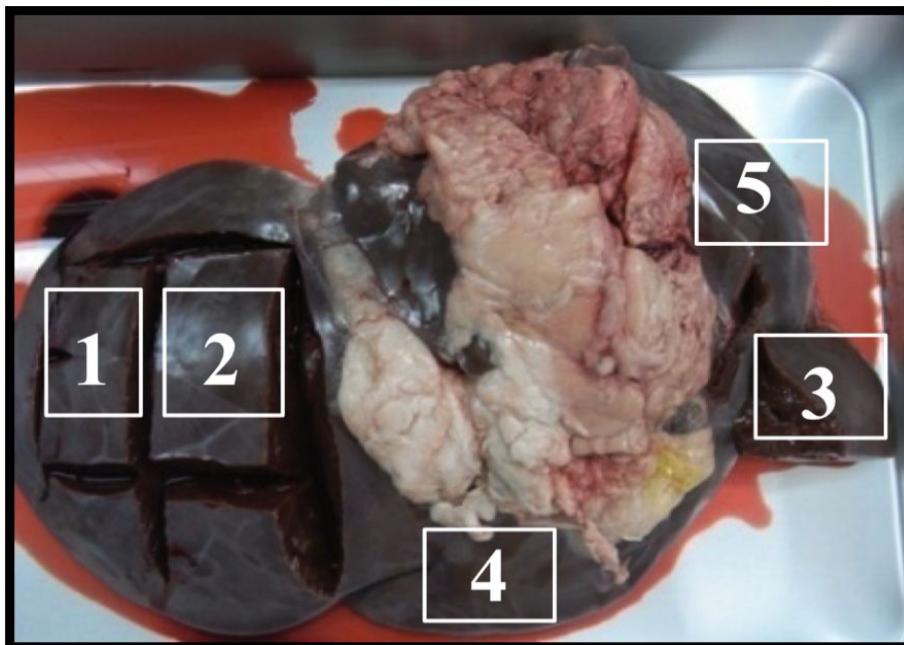
月/年	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
<u>5/13-10/13</u>	<u>10/23 (43)</u>	<u>15/23 (65)</u>	<u>20/23 (87)</u>	<u>16/17 (94)</u>	<u>16/17 (94)</u>	<u>8/23 (35)</u>
11/13-5/14	7/33 (21)	8/33 (24)	16/33 (49)	17/33 (52)	15/33 (45)	4/33 (12)
<u>8/14-11/14</u>	<u>10/35 (29)</u>	<u>12/35 (34)</u>	<u>18/34 (53)</u>	<u>22/35 (63)</u>	<u>21/35 (60)</u>	<u>9/35 (26)</u>
11/14-2/15	1/17 (5.9)	2/17 (12)	2/17 (12)	3/17 (18)	2/17 (12)	1/14 (7.1)
<u>High (計)</u>	<u>20/58 (34)</u>	<u>27/58 (47)</u>	<u>38/57 (67)</u>	<u>38/52 (73)</u>	<u>37/52 (71)</u>	<u>17/58 (31)</u>
Low (計)	8/50 (16)	10/50 (20)	18/50 (36)	20/50 (40)	17/50 (34)	5/47 (11)
合計	28/108 (26)	37/108 (34)	56/107 (52)	58/102 (57)	54/102 (53)	22/75 (29)

下線はハイシーズン（陽性率の高い）夏場を示す

表 4. 肝臓の部位別 *stx* 遺伝子の検出率

部位	陽性数/検体数 (%)
1	0/145 (0)
2	0/149 (0)
3	2*/147 (1.4)
4	3*/135 (2.2)
5	2*/135 (1.5)

*1 検体、3 箇所では *stx* 遺伝子が検出



図．肝臓から採取した部位 1-5 を示す