

肝臓における腸管出血性大腸菌の胆嚢および胆管からの
逆行性汚染に関する試験

(試験の背景および目的)

肝臓における腸管出血性大腸菌の汚染ルートとして、表面汚染からの浸潤と胆管経由での逆行性ルートが可能性として考えられる。

と殺後の肝臓では、胆汁本来の流動とは異なり、胆嚢内や胆管内に貯留する胆汁が胆管を経由して肝臓実質方向に逆行性に押し出される可能性があり、仮に胆汁内に大腸菌が存在する場合にはそれらが肝臓内の検査によって検出される可能性があることは否定できない。

本試験では、それらの疑問に答えるための実証実験を主体にした試験を行うとともに、腸管出血性大腸菌の汚染防御対策に資するデータを提供することを目的で行われる。

胆嚢および胆管からの逆行性汚染に関する試験

試験 1

試験 2

2012.1

2012.2～2012.3

2012.3末

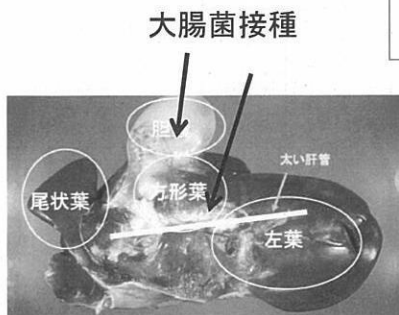
胆嚢および胆管の
大腸菌接種試験
(胆管ルートによる
菌拡散試験)

胆管の結紮処置の効果に
関する試験

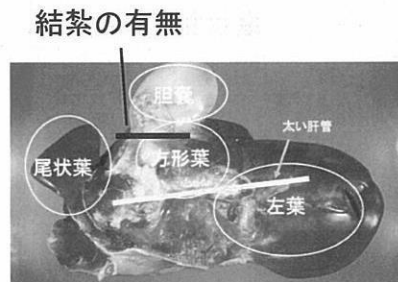
試験結
果の最
終報告



試験結
果の中
間報告
2/24



27ヶ所より採材、PCR分析
(3, 5, 7日目) 15検体



トリミング後25ヶ所より採材
(3, 5日目)、培地培養判定
4検体

試験 1

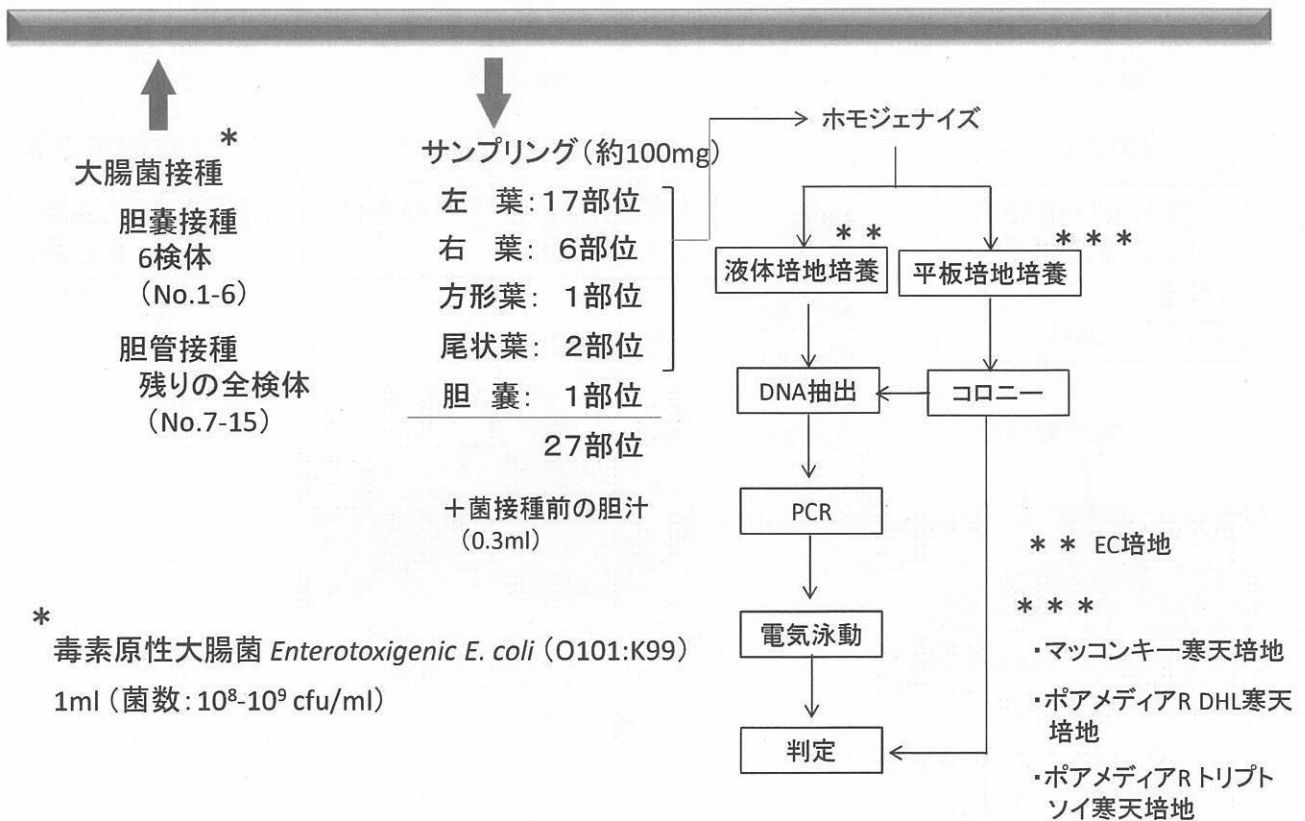
レバー搬入、菌接種、採材の実施日程

	1月 18 水	19 木	20 金	21 土	22 日	23 月	24 火	25 水	26 木	27 金	28 土	29 日	30 月
レバー搬入	○(No.1,2,3)	○(No.4,5,6)		○(No.7,8,9)				○(No.10,11,12)	○(No.13,14,15)				
菌接種	○(No.1,2,3)	○(No.4,5,6)		○(No.7,8,9)				○(No.13,14,15)	○(No.10,11,12)				
サンプリング					○(No.1,2,3) (5日目)	○(No.4,5,6) (5日目)					○(No.7,8,9)7日目	○(No.10,11,12)	○(No.13,14,15)3日目 (3日目)

試験 1

試験方法

← 3、5、7日間 →



今回用いたPCR法の概要

接種菌:

毒素原性大腸菌 *Enterotoxigenic E. coli* (O101:K99)

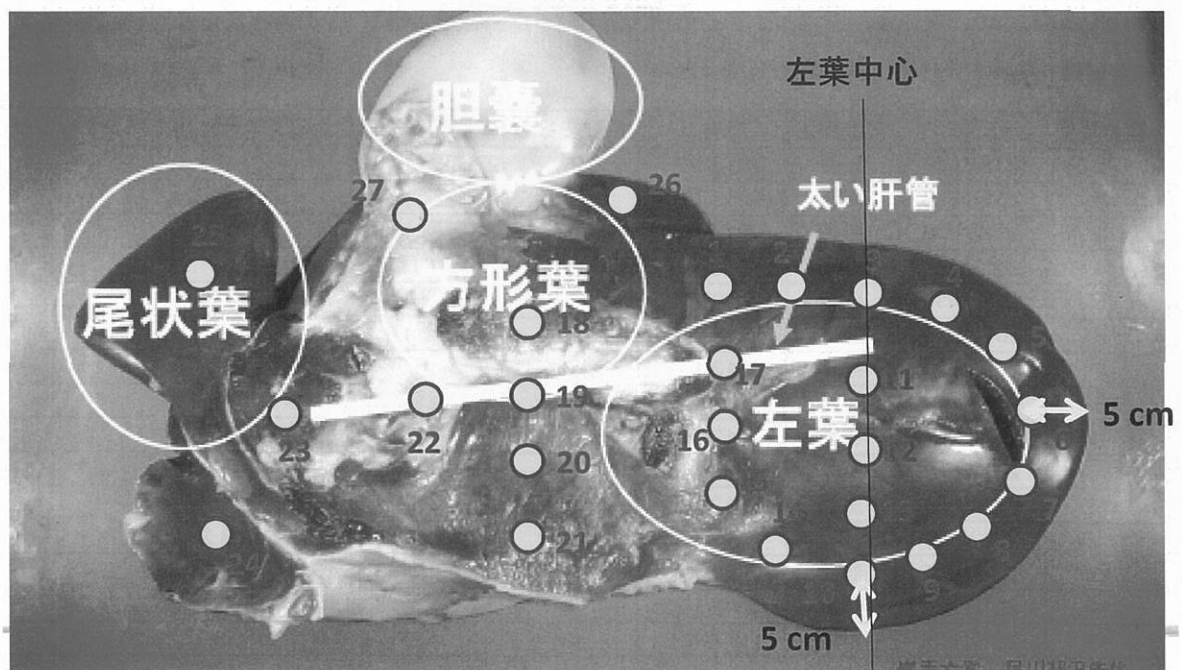
標的遺伝子・特異性:

EPECのプラスミドST1a遺伝子(ST1bと区別できる)

感度:

数10~100個程度の菌数で検出(今回は培養しているのでさらに少ない菌数で検出可能)

試験 1 サンプリング部位



試験 1

PCR検査結果

【菌接種後7日目】

胆管内接種を実施した3検体(採材数:81)からは検出されなかった。
ただし、接種部位の胆管(胆汁)1部位から検出された。

【菌接種後5日目】

胆嚢内接種を実施した6検体(採材数:162)中、1検体の尾状葉でのみ検出された(1/162)。ただし、接種部位の胆嚢からは全検体で検出された。胆管(胆汁)からは検出されなかった。

【菌接種後3日目】

胆管内接種を実施した6検体(採材数:162)のすべての検体で検出された(77/162)。接種部位の胆管(胆汁)からはすべての検体で検出された。

試験 1

全検体の結果一覧

検査結果一覧表

検体番号	接種日	接種部位	採材日	接種後日数	腸管毒素原性大腸菌陽性が出たサンプリング部位 ^a
1	2012/1/18	胆嚢	2012/1/23	5	27(胆嚢)
2	2012/1/18	胆嚢	2012/1/23	5	27(胆嚢)
3	2012/1/18	胆嚢	2012/1/23	5	27(胆嚢)
4	2012/1/19	胆嚢	2012/1/24	5	25,27 (尾状葉、胆嚢)
5	2012/1/19	胆嚢	2012/1/24	5	27(胆嚢)
6	2012/1/19	胆嚢	2012/1/24	5	27(胆嚢)
7	2012/1/21	胆管	2012/1/28	7	-
8	2012/1/21	胆管	2012/1/28	7	22 (胆管)
9	2012/1/21	胆管	2012/1/28	7	-
10	2012/1/27	胆管	2012/1/30	3	2,3,4,8,13,19,22,25,26
11	2012/1/27	胆管	2012/1/30	3	4,5,8,20,21,26
12	2012/1/27	胆管	2012/1/30	3	3,7,12,15,16,17,19,20,21,23,24,25
13	2012/1/25	胆管	2012/1/28	3	2,9,10,11,13,15,16,17,18,19,21,22,24,25
14	2012/1/25	胆管	2012/1/28	3	1,2,3,4,5,6,8,11,12,14,15,16,19,20,22,24,26
15	2012/1/25	胆管	2012/1/28	3	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,15,16,17,19,20,22,24,25

^a 培養液またはコロニーから抽出DNAのいずれかで、STを標的としたPCRが陽性であった部位

サンプル番号	1
大腸菌接種日	2012/1/18
採材日	2012/1/23
接種部位	胆嚢
培養日数	5

検査結果例
(検体番号1)

サンプリング部位	PCR 結果 ^a				寒天平板での結果 ^b		
	培養液	LB agar	MacConkey	DHL	LB agar	MacConkey	DHL
1	-	NT	NT	NT	-	-	-
2	-	NT	NT	NT	-	-	-
3	-	NT	NT	NT	-	-	-
4	-	NT	NT	NT	-	-	-
5	-	NT	NT	NT	-	-	-
6	-	NT	NT	NT	-	-	-
7	-	NT	NT	NT	-	-	-
8	-	NT	NT	NT	-	-	-
9	-	NT	NT	NT	-	-	-
10	-	-	NT	NT	+	w	w
11	-	NT	NT	NT	-	-	-
12	-	NT	NT	NT	-	-	-
13	-	NT	NT	NT	-	-	-
14	-	NT	NT	NT	-	-	-
15	-	-	NT	NT	+	w	w
16	-	NT	NT	NT	-	-	-
17	-	NT	NT	NT	-	-	-
18	-	NT	NT	NT	-	-	-
19	-	-	NT	NT	+	w	w
20	-	-	NT	NT	+	w	w
21	-	NT	NT	NT	-	-	-
22	-	-	NT	NT	+	w	w
23	-	-	NT	NT	+	w	w
24	-	NT	NT	NT	-	-	-
25	-	NT	NT	NT	-	-	-
26	-	NT	NT	NT	-	-	-
27	-	NT	+	NT	+	r	r

^a+, 特異的なサイズのバンド検出; -, 特異的なサイズのバンド非検出; NT, コロニーの発育がなし(LB)または特徴的なコロニーがなかった (MacConkey, DHL) ため, PCRを行なわなかった。

^b+, コロニーの発育あり; w, 白色コロニーの発育あり; r, 赤色コロニーの発育あり (大腸菌はMacConkeyおよびDHL上では、赤色のコロニー)。

サンプル番号	12
大腸菌接種日	2012/1/27
採材日	2012/1/30
接種部位	胆管
培養日数	3

検査結果例
(検体番号12)

サンプリング部位	PCR 結果 ^a				寒天平板での結果 ^b		
	培養液	LB agar	MacConkey	DHL	LB agar	MacConkey	DHL
1	-	NT	NT	NT	-	-	-
2	-	NT	NT	NT	-	-	-
3	+	NT	NT	NT	-	-	-
4	-	NT	NT	NT	-	-	-
5	-	NT	NT	NT	-	-	-
6	-	NT	NT	NT	-	-	-
7	+	NT	NT	NT	-	-	-
8	-	NT	NT	NT	-	-	-
9	-	NT	NT	NT	-	-	-
10	-	NT	NT	NT	-	-	-
11	-	NT	NT	NT	-	-	-
12	+	NT	NT	NT	-	-	-
13	-	NT	NT	NT	-	-	-
14	-	NT	NT	NT	-	-	-
15	+	NT	NT	NT	-	-	-
16	+	NT	-	NT	-	r	-
17	+	NT	NT	NT	-	-	-
18	-	NT	NT	NT	-	-	-
19	+	+	NT	NT	+	-	-
20	+	+	NT	NT	+	-	-
21	+	+	+	+	+	r	r
22	-	NT	NT	NT	-	-	-
23	+	NT	NT	NT	-	-	-
24	+	NT	NT	NT	-	-	-
25	+	NT	NT	NT	-	-	-
26	-	NT	+	+	-	r	r
27	-	NT	-	NT	-	-	-

^a+, 特異的なサイズのバンド検出; -, 特異的なサイズのバンド非検出; NT, コロニーの発育がなし(LB)または特徴的なコロニーがなかった (MacConkey, DHL) ため, PCRを行なわなかった。

^b+, コロニーの発育あり; w, 白色コロニーの発育あり; r, 赤色コロニーの発育あり (大腸菌はMacConkeyおよびDHL上では、赤色のコロニー)。

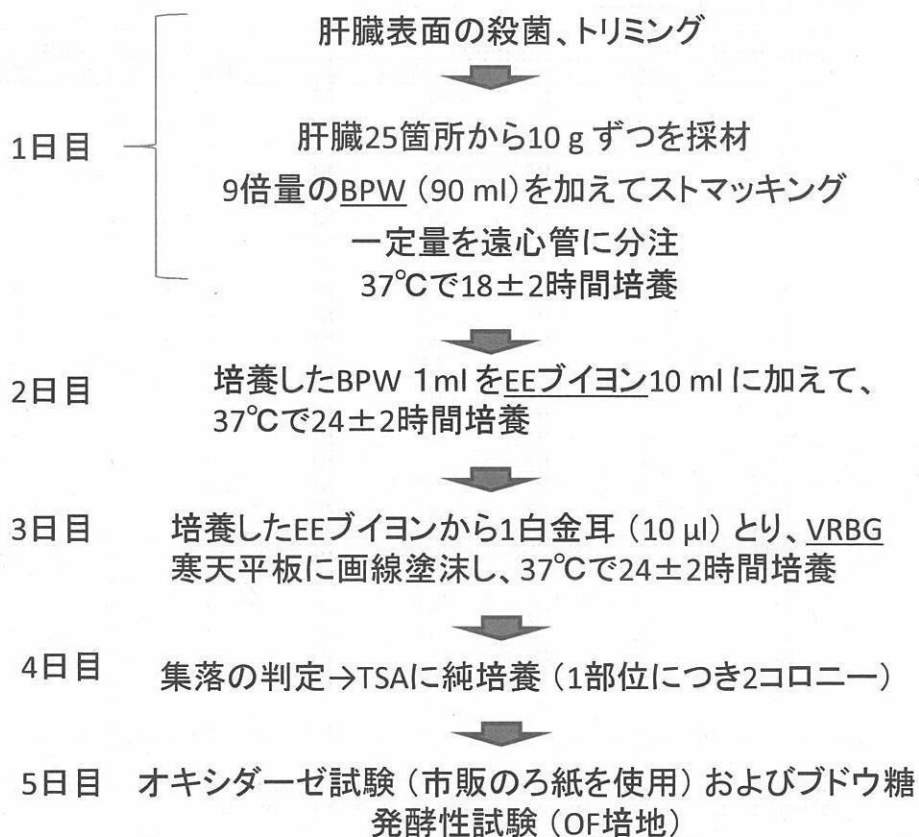
試験 2

2月												
17(金)	18(土)	19(日)	20(月)	21(火)	22(水)	23(木)	24(金)	25(土)	26(日)	27(月)	28(火)	29(水)
No.1 搬入								No.2 搬入				
					No.1 採材					No.2 採材		
器具準備					採材	EE培地接種	VRBG接種	判定・純培養			オキシダーゼ試験・OF試験	OF試験判定
							器具準備			採材	EE培地接種	VRBG接種

3月									
1(木)	2(金)	3(土)	4(日)	5(月)	6(火)	7(水)	8(木)	9(金)	10(土)
		No.3 搬入					No.4 搬入		
				No.3 採材					
結果まとめ・片付け									
判定・純培養	オキシダーゼ試験・OF試験	OF試験判定			結果まとめ・片付け				
	器具準備			採材	EE培地接種	VRBG接種	判定・純培養	オキシダーゼ試験・OF試験	OF試験判定

試験 2

大腸菌培養試験



胆嚢、胆管からの逆行性汚染範囲の特定

2012.1に実施済み



(結果)胆管接種では広範囲に汚染(PCR検査)



胆管汚染の源である胆嚢を結紮した場合と結紮しない場合と
で、自然感染している大腸菌分布の相違を検査

実施中



?

胆嚢結紮の効果がみられ
た場合

胆嚢結紮の効果がみられない場合
(同程度に菌が検出された場合)

(現場対策) 胆嚢結紮除去
表面殺菌洗浄
冷蔵保管の徹底

(現場対策) と殺時の一律PCR検査の実施?
表面殺菌洗浄
冷蔵保管の徹底

