

# 牛レバー内部における腸管出血性 大腸菌等の汚染実態調査(概要)

岩手大学 特任教授・名誉教授  
品川邦汎

## ○内容

牛レバーの腸管出血性大腸菌の汚染実態状況について、全国16か所の食肉衛生検査所における調査及び文献調査を行った。

・ 調査項目:

1. 同一牛の糞便、胆嚢胆汁、肝臓表面(拭き取り)及び肝臓内部について、腸管出血性大腸菌の分離培養及び遺伝子検査(一部の機関で大腸菌、大腸菌群の検査も実施)
2. 胆汁中及び肝臓表面の大腸菌群の汚染実態調査(追加試験)
3. 牛胆汁における腸管出血性大腸菌の増殖性試験

・ 調査期間: 8~11月

## ○調査協力機関

秋田県、山形県、埼玉県、さいたま市、東京都、神奈川県、静岡県、岐阜県、大阪市、兵庫県、岡山県、鳥取県、徳島県、愛媛県、大分県及び宮崎県の食肉衛生検査所

## 汚染実態調査

### ○ サンプルング方法

- ・糞便：肛門もしくは直腸より採取
- ・肝臓：内臓摘出時に滅菌トレイで衛生的に採取した検体、通常の内臓検査前後、もしくは内臓業者から購入したものを使用
- ・肝臓表面は拭き取り、肝臓内部は左葉を中心に採取（アルコール綿で表面の清拭、火炎殺菌等実施し、交差汚染のないよう採取）
- ・胆汁は注射器により採取

### ○ 供試検体量

糞便（1g）、胆汁（5ml）、肝臓内部（25g）又は肝臓表面（100cm<sup>2</sup>以上）を増菌培養後、分離培養又は遺伝子検出を実施

### ○ 使用培地

- ・増菌用培地：ノボビオシン加mEC培地
- ・O157分離培養：O157（CT-SMAC、クロモアガー）等

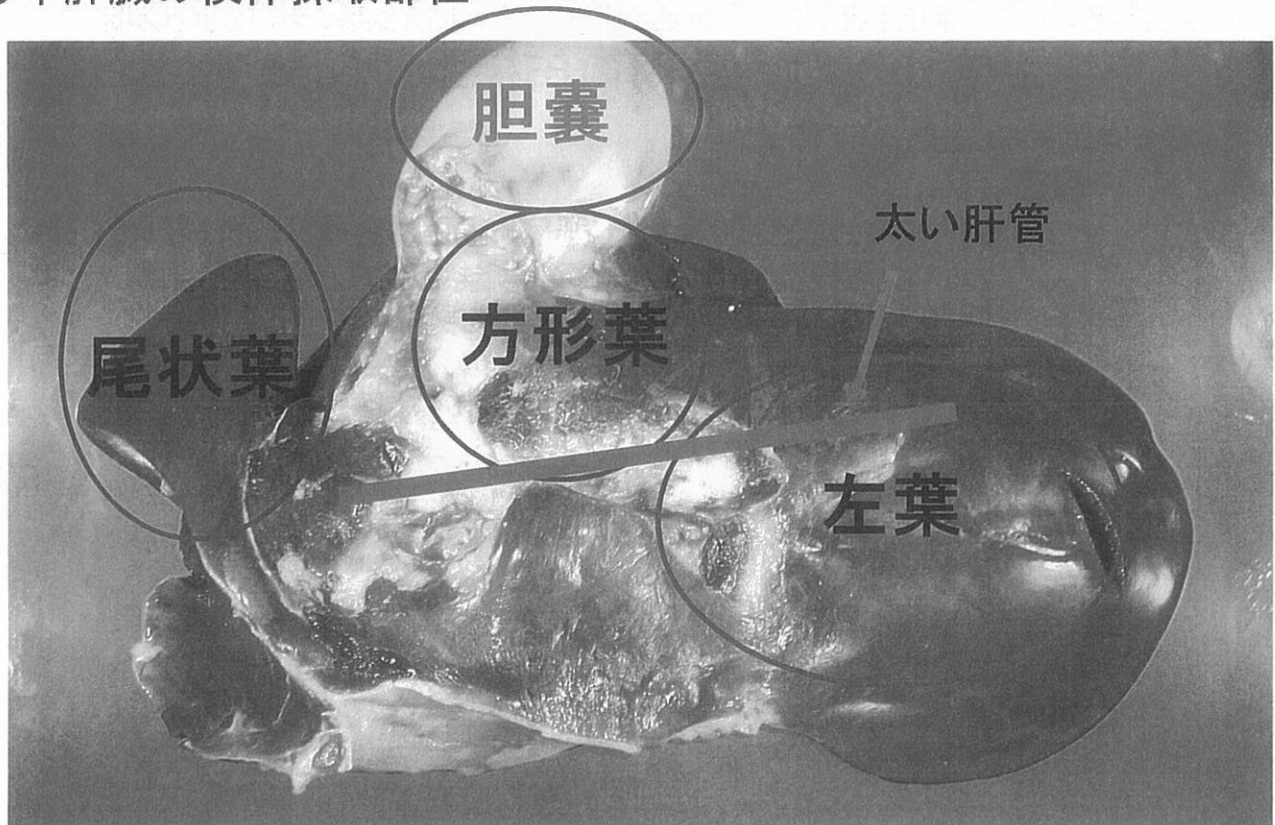
### ○ 遺伝子検出

- ・O157、VT-1、VT-2の混合プライマー

（O157&ペロ毒素遺伝子同時検出キット、O157 VT1/2 One Shot PCR Typing Kit Ver.2（いずれもタカラバイオ社製）等）

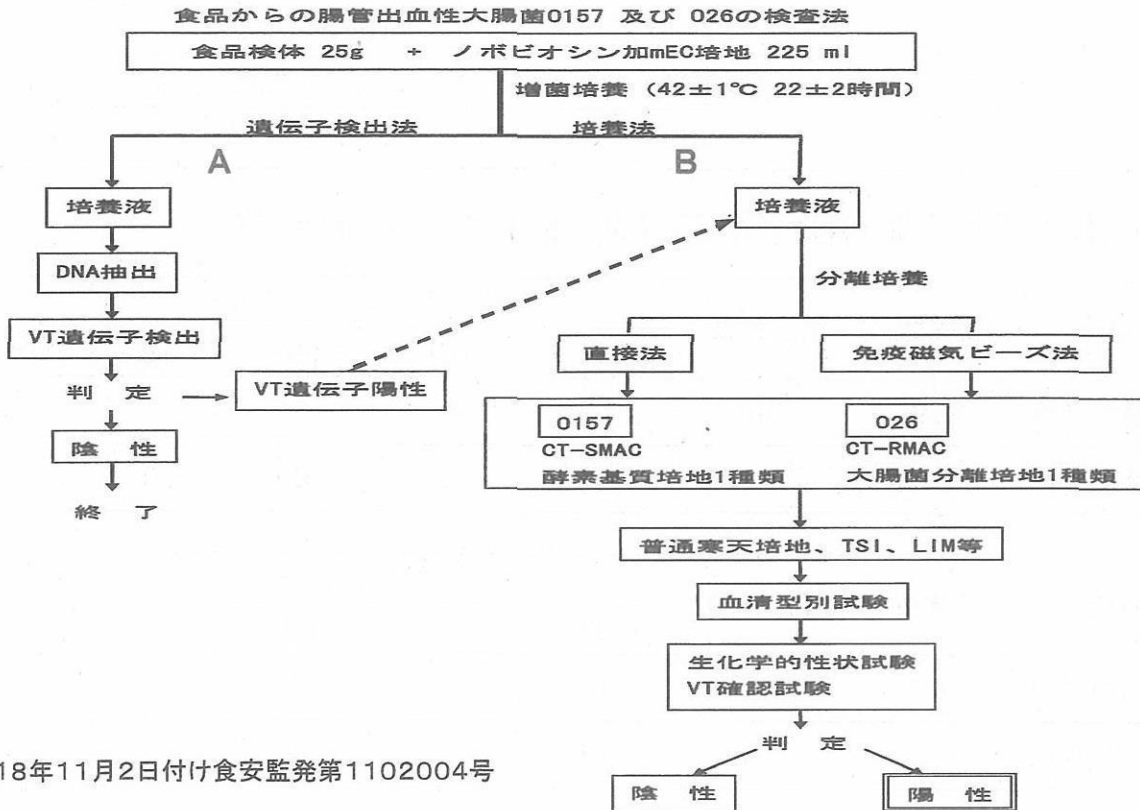
## 汚染実態調査

### ○牛肝臓の検体採取部位



# 汚染実態調査

## ○ 検査方法フローチャート



# 汚染実態調査

## ○ 結果(腸管出血性大腸菌EHEC)

		糞便	胆汁	肝臓表面	肝臓内部
B 分離培養	検体数	173	186	193	173
	EHEC	20	0	13	3
	うちO157	11	0	5	2
A 遺伝子	検体数	127	154	168	146
	検出数(検出率)	58 (45.7%)	1 (0.6%)	37 (22.0%)	13 (8.9%)
	うちVT1	5	1	1	0
	うちVT2	30	0	12	5
	うちVT1 or 2	13	0	23	4
	うちVT1 & 2	10	0	1	4

VT: ベロ毒素

# 汚染実態調査

## ○ 結果(大腸菌)

実施機関	検体数	陽性数			
		糞便	胆汁	肝臓表面	肝臓内部
4	50	45	9	28	13

## ○ 追加試験結果(胆汁及び肝臓表面の大腸菌群数)

胆汁	検体数	検出件数	陽性数(/ml)				
			10以下	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> 以上
大腸菌群数	159	29	16	4	3	1	5
大腸菌数	41	4	1	0	0	0	3

肝臓表面	検体数	検出件数	陽性数(/cm <sup>2</sup> )			
			10以下	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
大腸菌群数	140	110	87	9	7	7
大腸菌数	43	36	27	3	4	2

## 牛胆汁における腸管出血性大腸菌の増殖性①

### ○ 調査概要

供試検体:牛胆汁

調査期間:平成23年9月下旬

### ○ 調査概要

採取した10頭分の牛胆嚢胆汁のうち菌未発育の6頭分の胆汁を用いて、以下の①、②の腸管出血性大腸菌の増殖試験を実施。

#### ① プール胆汁における腸管出血性大腸菌の増殖態度

6頭分の胆汁全てを混合したプール胆汁に3種類の菌液(A、B、C)を接種し、37℃で一晩培養。

#### ② 胆汁の違いによる腸管出血性大腸菌の増殖態度

各胆汁(6頭分)に菌液Aを接種し、37℃で一晩培養。

### <増殖試験に用いた菌液>

菌液A:O157VT1&2、菌液B:O157VT2、菌液C:O26VT1

# 牛胆汁における腸管出血性大腸菌の増殖性②

## ○ 結果

### ① プール胆汁における腸管出血性大腸菌の増殖態度

	スタート時菌量(/ml)	培養後菌量(/ml)
①プール胆汁10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
②プール胆汁10ml+菌液B 0.1ml	$2.3 \times 10^2$	$> 10^6$
③プール胆汁10ml+菌液C 0.1ml	$1.5 \times 10^2$	$> 10^6$
④プール胆汁10ml+生理食塩水0.1ml	0	0

### ② 胆汁の違いによる腸管出血性大腸菌の増殖態度

	スタート時菌量(/ml)	培養後菌量(/ml)
⑤胆汁No.2 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑥胆汁No.4 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑦胆汁No.5 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑧胆汁No.7 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑨胆汁No.8 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑩胆汁No.9 10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	$> 10^6$
⑪生理食塩水10ml+菌液A 0.1ml	$1.9 \times 10^2$	50

## 文献調査：国内文献①

### 食肉処理場での腸管出血性大腸菌汚染実態

検体	検体数	菌株 分離数	分離率 (%)	血清型	stx型	stx遺伝子 検出数	検出率 (%)	検体採取時期	備考
胆嚢胆汁	548	0	0.0	-	-	2	0.4	2001年9月-2005年3月	*1
胆嚢胆汁	119	0	0.0	-	-	1	0.8	2005年4月-2006年3月 (12月、2月を除く)	
肝臓中心部 (尾状葉)	102	4	3.9	OUT:H11 O157:H21 OUT:HUT OUT:H21	2 1,2 1,2 2	5	4.9	2005年5月-2006年1月 (12月除く)	*2
胆嚢胆汁	318	1	0.3	O91:HUT	1,2	-	-	2004年6月-2007年1月	
肝臓中心部 (尾状葉)	165	7	4.2	OUT:H11 O157:H21 OUT:HUT OUT:H21 O28:HUT O91:HUT OUT:HUT	2 1,2 1,2 2 2 1,2 1,2	-	-	2005年5月-2007年1月	*3

\*1~3： 参考資料8を参照

## 文献調査：国内文献②

### 市販流通品の腸管出血性大腸菌汚染実態

検体	検体数	菌株 分離数	分離率 (%)	血清型	stx型	stx遺伝子 検出数	検出率 (%)	検体採取時期	備考
肝臓(生食用)	10	1	10.0	O127a:H-	-	-	-	1994年 (6月、7月、9月)	*4
肝臓(生食用)	24	0	0.0	-	-	-	-	1998年8月-12月	*5
肝臓(生食用)	16	0	0.0	-	-	-	-	1998年度	*6
肝臓(生食用) (肝臓と挽 肉合計)	50	0	0.0	-	-	1	-	1999年9月-2000年1月	菌株分離数、stx遺 伝子検出数は肝臓 のデータ *7
肝臓(生食用)	10	0	0.0	-	-	-	-	1999年度	*8
肝臓	24	2	8.3	O157	1,2	-	-	2000-2004年 (各年7-9月の間)	2分離菌株ともに O157、stx1,2産生 *9
肝臓	15	0	0.0	-	-	-	-	2007年9月-11月	*10
肝臓	15	0	0.0	-	-	-	-	2008年9月-2009年1月	*11
肝臓	36	0	0.0	-	-	5	13.9	2010年7月-11月	stx遺伝子を検出し た5検体のうち1検 体はO157遺伝子 *12

\*4~12: 参考資料8を参照

## 文献調査：海外文献①

### 肉牛の糞便、胆嚢からの腸管出血性大腸菌O157

	検体数	陽性検体数 (%)
直腸便	933	66 (7.1)
胆嚢粘膜スワブ	933	1 (0.1)
胆嚢粘膜組織	933	4 (0.4)

USA:2か所の食肉処理場での調査(2005年5~7月)

参考資料9-1 Reinstein, S. et al. (2007) Prevalence of Escherichia coli O157:H7 in Gallbladders of Beef Cattle. Applied and Environmental Microbiology 73(3): 1002-1004.

## 文献調査：海外文献②

### 感染実験牛からの糞便、第一胃、胆嚢からの腸管出血性大腸菌 O157

感染牛	1グループ	8頭 (雄仔牛：投与菌数 $10^6$ cfu, 36日後)
	糞便 (結腸)	7頭陽性 (菌数 $10^2 \sim 10^3$ cfu)
	第一胃	2頭陽性
	胆汁	5頭陽性
感染牛	2グループ	7頭 (雄仔牛：投与菌数 $10^6$ cfu, 15日後)
	糞便 (結腸)	5頭陽性 (菌数 $10^2 \sim 10^3$ cfu)
	第一胃	4頭陽性
	胆汁	全て陰性 (-)
感染牛	3グループ	8頭 (雄仔牛：投与菌数 $10^6$ cfu, 9日後)
	糞便 (結腸)	8頭陽性 (菌数 $10^2 \sim 10^6$ cfu)
	第一胃	8頭陽性
	胆汁	8頭陽性

参考資料9-2 Jeong, KC. et al. (2007) Isolation of Escherichia coli O157:H7 from the gall bladder of inoculated and naturally-infected cattle. Veterinary Microbiology 119: 339-345.

## 文献調査：海外文献③

### 正常及び富脈斑の牛肝臓における細菌叢

#### 方法:

- ・正常及び富脈斑の牛肝臓(各50検体)をと畜場で採取
- ・右葉及び左葉の表面をプロパントーチで焼いた後、内部を無菌的に採取

#### 結果:

	正常な肝臓			富脈斑		
	右葉	左葉	両方	右葉	左葉	両方
O157:H7 以外のE.coli	4	0	5	1	5	1
O157:H7	0	0	1	0	2	4

※富脈斑: 円形あるいは不整形の直径1~10mm大の暗赤色斑が認められ、表面は陥凹。毛細血管拡張症。(食肉衛生検査病理学カラーアトラス 全国食肉衛生検査所協議会より)

参考資料10 Stotland, El. et al. (2001) Bacterial microflora of normal and telangiectatic livers in cattle. JAVMA(219)1:36-39.

