

野生鳥獣肉からの腸管出血性大腸菌及び サルモネラ属菌の検出状況

池田 伸代 竹原 佑美 清水 裕美子 京塚 明美
松室 信宏 坂本 綾

は じ め に

近年、野生鳥獣の生息数増加による被害が深刻化しており、野生鳥獣の適正な管理を行うべく、平成 26 年に鳥獣保護法が「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律」として一部改正された。これに伴い野生鳥獣の捕獲数が増加し食用としての利活用が増加することが見込まれる一方で、加熱不十分な野生鳥獣肉等による食中毒事例も報告されており、広島市ではジビエとして利用される野生鳥獣の筋肉及び肝臓からの腸管出血性大腸菌(EHEC)及びサルモネラ属菌の行政検査を行っている。この検査概要と EHEC 等の検出状況について報告する。

方 法

1 材料

平成 28 年 11 月から平成 30 年 1 月に、保健所から当所に搬入された野生鳥獣肉(筋肉又は肝臓)24 検体(シカ 7 検体, イノシシ 17 検体)を検査に供した。

2 EHEC 検査

平成 26 年 11 月 20 日食安監発 1120 第 1 号通知「腸管出血性大腸菌 026, 0103, 0111, 0121, 0145 及び 0157 の検査法について」を参考に次のように行った。

原則 25g の検体を 9 倍量の mEC 培地で培養した。その培養液をアルカリ熱抽出したものを鋳型試料としてベロ毒素(VT)遺伝子検出試験(サイクリング・プローブ法, CycleavePCR 0-157(VT gene)Screening Kit Ver. 2.0, タカラバイオ)に供し、VT 遺伝子を検出した。陽性反応を示した検体について、培養液から各種選択培地を用いて分離培養を行った。選択培地は CT-SMAC, DHL 及び酵素基質培地(CT-クロモアガーSTEC, クロモアガーSTEC, ViEHEC のいずれか)を使用した。分離された菌株について VT 遺伝子を確認し、血清型別を行った。VT 遺伝子の確認は mMK1, mMK2 及び stx2fk プライマー(平成 23 年度国立保健医療科学院短期研修「細菌コース」で示されたもの)による PCR 法又は 0-157 One Shot PCR Typing Kit Ver.2(タ

カラバイオ)により行った。血清型の決定は市販免疫血清(デンカ生研)による血清凝集法で行った。

分離された菌株について、イムノクロマト(IC)法(デュオパス・ベロトキシン, メルク)及び逆受身ラテックス凝集反応(RPLA)法(VTEC-RPLA, デンカ生研)により VT 産生性の確認を行った。RPLA 法は静置培養法及びマイトマイシン C(MMC)添加振盪培養法を行った。MMC 添加振盪培養法による RPLA は, MMC を $0.1 \mu\text{g/ml}$ 添加した CAYE 培地で振盪培養したものを 5,000 単位/ml の硫酸ポリミキシン B で処理したのち, 12,000rpm で 10 分間遠心分離した上清を用いて行った。

3 サルモネラ属菌検査

原則 25g の検体を採取し、平成 5 年 3 月 17 日衛乳第 54 号通知の別紙 1 の別添 2「サルモネラ属菌試験法」に準じて行った。

結 果

1 EHEC 及びサルモネラ属菌の検出状況

表 1 に EHEC 及びサルモネラ属菌の検出検査結果を示す。シカ肉は 7 検体中 3 検体(43%)から EHEC を検出した。陰性となった 4 検体のうち 1 検体は mEC 培養液から VT 遺伝子が検出されたが、分離培養の結果 EHEC は分離されなかった。またシカ肉からサルモネラ属菌は検出されなかった。イノシシ肉は 17 検体全て、EHEC 及びサルモネラ属菌陰性であった。

2 分離された EHEC 株

表 2 に EHEC 陽性の検体から分離された菌株の性状等を示す。平成 28 年 11 月のシカ筋肉では CT-SMAC に発育した集落から VT2 遺伝子陽性の 0146:HNM が分離された。VT2 の産生性は IC 法で陰性、静置培養による RPLA 法では凝集価 1:2 で判定保留となったが、MMC 添加振盪培養による RPLA 法では凝集価 1:64 を示した。平成 29 年 1 月のシカ筋肉では DHL に発育した集落から VT2 遺伝子陽性の OUT:HNM が分離され、VT2 産生性は IC 法、静置培養による RPLA 法及び MMC 添加振盪培養による RPLA 法の全てで陰性であった。平成 29 年 11 月のシカ筋肉では DHL に発育した集落から VT2 遺伝子

陽性の 0146:HUT 及び 0146:HNM が分離された。VT2 産生性は IC 法では陰性であったが、RPLA 法では静置培養法で凝集価がそれぞれ 1:4, 1:8 を示し、MMC 添加振盪培養法で凝集価がそれぞれ 1:64, 1:128 を示し陽性であった。

考 察

野生鳥獣の EHEC 保有については、シカの EHEC 保有率は 20~44%¹⁾⁻⁴⁾で、特に 0146 が高率に分離された^{3), 4)}との報告がある。今回の調査でもシカ肉の 43%から EHEC が分離され、その血清型は 0146 及び OUT であった。分離された EHEC 株は IC 法では VT 産生性が確認できず、静置培養による RPLA 法でも陰性となる株及び判定保留となる株があった。MMC 存在下で VT 産生性が増強される株があることが知られている⁵⁾ことから、MMC 添加振盪培養による RPLA 法を行ったところ、MMC 無添加の場合と比較し 16~32 倍の VT を検出した株があった一方、MMC 無添加の場合と同様に VT 産生性が確認できなかった株も存在した。この株については RPLA 法で毒素を検出できない VT2 バリエーションである可能性も否定できない。また、分離された EHEC 株は DHL 及び CT-SMAC で分離された株で、クロモアガー STEC 等の酵素基質培地では分離されなかった。クロモアガー STEC に発育しない 0146 もシカから検出されており³⁾、酵素基質培地は主要な血清型について有用であるが、多様な血清型を目的とした検査では比較的選択性の弱い培地 (DHL 等) も併用する必要があると考えられる。

イノシシの 3.4%が EHEC を保有するという報告²⁾や、厚生労働省によるエゾシカ、シカ及びイノシシの計 295 検体を用いた病原微生物保有状況調

査においてシカ 1 検体及びイノシシ 1 検体の糞便よりサルモネラ属菌が検出されたとの報告⁶⁾があるが、今回の筋肉及び肝臓の調査ではイノシシ肉から EHEC は検出されず、またシカ肉、イノシシ肉ともにサルモネラ属菌は検出されなかった。

謝 辞

本調査を実施し、情報提供等にご協力いただいた本市保健所食品指導課に深謝いたします。

文 献

- 1) 青木佳代 他:滋賀県に生息するシカの病原体保有状況調査について、第 36 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 78(2015)
- 2) 富野由通 他:食用となる野生シカ、イノシシの糞便からの食中毒菌分離、第 36 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 76(2015)
- 3) 井口 純 他:野生シカから高頻度に分離される腸管出血性大腸菌 0146, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 60(2016)
- 4) 茂田万沙美 他:野生シカから高頻度に分離される腸管出血性大腸菌 0146, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 85(2017)
- 5) 真子俊博 他:マイトマイシン C による EHEC の stx 産生性、亜テルル酸カリウム感受性、溶血性に関する疫学的検討, 福岡市保健環境研究所報, 26, 82~87(2000)
- 6) 平成 25 年度厚生労働科学研究「野生鳥獣由来食肉の安全性確保」研究班:野生鳥獣食肉の安全性確保に関する報告書, (2014)

表 1 野生鳥獣肉からの EHEC 及びサルモネラ属菌の検出検査結果

	検体名	検体搬入月	EHEC	サルモネラ属菌
1	シカ 筋肉	H28. 11	0146 (VT2 遺伝子+)	(-)
2	シカ 肝臓	H28. 11	(-)	(-)
3	シカ 筋肉(バラ)	H28. 12	(-) (VT 遺伝子+)	(-)
4	シカ 筋肉(モモ)	H29. 1	OUT (VT2 遺伝子+)	(-)
5	シカ 筋肉(ヒレ)	H29. 1	(-)	(-)
6	シカ 筋肉	H29. 11	0146 (VT2 遺伝子+)	(-)
7	シカ 筋肉	H29. 12	(-)	(-)
8	イノシシ 筋肉	H28. 11	(-)	(-)
9	イノシシ 肝臓	H28. 11	(-)	(-)
10	イノシシ 筋肉(ヒレ)	H28. 12	(-)	(-)
11	イノシシ 筋肉(首)	H28. 12	(-)	(-)
12	イノシシ 肝臓	H28. 12	(-)	(-)
13	イノシシ 筋肉(首)	H29. 1	(-)	(-)
14	イノシシ 肝臓	H29. 1	(-)	(-)
15	イノシシ 筋肉	H29. 11	(-)	(-)
16	イノシシ 肝臓	H29. 11	(-)	(-)
17	イノシシ 筋肉	H29. 12	(-)	(-)
18	イノシシ 肝臓	H29. 12	(-)	(-)
19	イノシシ 筋肉	H29. 12	(-)	(-)
20	イノシシ 肝臓	H29. 12	(-)	(-)
21	イノシシ 筋肉(ホホ)	H30. 1	(-)	(-)
22	イノシシ 肝臓	H30. 1	(-)	(-)
23	イノシシ 筋肉(ホホ)	H30. 1	(-)	(-)
24	イノシシ 肝臓	H30. 1	(-)	(-)

表 2 EHEC 陽性検体から分離された EHEC 菌株の性状等

検体 搬入月	検体名	血清型	VT 遺伝子	VT 産生性 IC	RPLA※	TSI 糖分解	H2S	ガス	Lys	LIM Ind	運動性	ソルビトール 分解
H28. 11	シカ筋肉	0146:HNM	VT2	-	VT2 64	A/A	-	+	+	+	-	-
H29. 1	シカ筋肉(モモ)	OUT:HNM	VT2	-	-	A/A	-	+	+	+	-	+
H29. 11	シカ筋肉	0146:HUT	VT2	-	VT2 64	A/A	-	+	+	+	+	+
同上	同上	0146:HNM	VT2	-	VT2 128	A/A	-	+	+	+	-	-

※MMC 添加振盪培養法による