

腸管出血性大腸菌O157:H7(-)の
疫学的解析に関する基礎的研究

増 田 高 志

2001

腸管出血性大腸菌 O157:H7 (-) の

疫学的解析に関する基礎的研究

増 田 高 志

2001

目次

緒言	-----	1
第一章		
ヒトおよび牛由来 EHEC 0157 の疫学マーカーの検討	-----	4
第二章		
物理的条件下における EHEC 0157 の増殖性の検討	-----	21
第三章		
食品（食肉，野菜）からの EHEC 0157 分離法の検討	-----	25
第四章		
野菜からの凍結損傷 EHEC 0157 分離法の検討	-----	32
第五章		
静岡県における食品，環境水などの EHEC 0157 の汚染状況調査	-----	36

総 括 ----- 40

謝 辞 ----- 42

参 考 文 献 ----- 43

英 文 要 旨 ----- 50

付 表 (表 1 ~ 26)

付 図 (図 1 ~ 6)

緒 言

大腸菌 (*Escherichia coli*)は、温血動物における腸内常在菌叢 (normal flora)を構成する細菌の一種であり、腸内細菌科 (family *Enterobacteriaceae*) の *Escherichia*属に属し、通性嫌気性、運動性あるいは非運動性、ブドウ糖発酵、硝酸塩還元、グラム陰性桿菌である。その種類も多く、細胞表面にあるリポポリサッカライド (LPS)の抗原構造の違いによりO1からO173に、鞭毛の抗原構造の違いによりH1からH56に区別され、これらの組合せにより血清型が決定される。また、大腸菌の中には、ヒトが食品とともに摂取すると下痢、腹痛などの食中毒様症状を示すものがあり、下痢原性大腸菌と呼ばれている。これらは患者が示す臨床症状と菌がもつ病原因子の違いにより主に次の4つのカテゴリーに分類されている(表1)。

1. 腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)
2. 腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)
3. 腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)
4. 腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) または Vero毒素産生性大腸菌 (verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, VTEC) または 志賀毒素産生性大腸菌 (shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)

これらの中で、EHEC感染症は、EPEC, ETEC, EIEC感染症が食中毒として取扱われるのに対して、1996年からは「伝染病予防法」の指定伝染病、1999年からは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の三類感染症として特別な行政的対応がなされてきた。その理由には、ヒトが食品などを介して感染した場合にはその産生する毒素(verocytotoxin:VTまたはshiga toxin:Stx)によ

り激しい腹痛と血性下痢を主徴とする出血性大腸炎(hemorrhagic colitis)を起し，重篤なケースでは溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome:HUS)や脳症などを併発し，死に至ることもあり，特に注目しなければならない感染症である[38]。

EHEC 0157:H7(-)（以下，EHEC 0157）は，1977年にKonowalchukら[29]によりその存在が明らかにされたが当時はあまり注目されなかった。1982年に米国のオレゴン州とミシガン州の同一チェーン店のレストランで販売されたハンバーガーを原因食品として発生した集団下痢症の起因菌としてRileyら[37]が報告し，世界的に注目されるようになった。

わが国では，1985年に小林ら[22]がさかのぼり調査により本菌による下痢症患者の存在をはじめて明らかにした。その後，全国各地で散発下痢症患者からの分離報告[23]があり，1990年には埼玉県幼稚園でわが国で最初の集団下痢症の発生があった[16，39]。さらに，1996年5月には岡山県の小学校で発生した集団下痢症を発端として，中国・関西地区を中心に全国的に多発し，同年7月には大阪府堺市の小学校で患者数が5,700名余の大規模集団下痢症の発生があった[17，24，25，26]。これらの事件の発生を契機として国民の間にも本菌は広く関心が持たれるようになった。

本感染症の原因食品として，米国，カナダ，英国ではハンバーガー（牛挽肉），ローストビーフ，牛肉，生牛乳，飲料水，アップルサイダー，生野菜類などがあげられている[14，17]。特に，牛は重要な保菌動物の一つと考えられている[7，8，11，12，18，18，32，33，34]。

わが国の集団下痢症の原因食品としては，カイワレ，おなかサラダ，ポテトサラダといった野菜類が多く，牛生レバーによる散発事例が報告されていたが牛肉による事例はあまり多くなかった。

しかし、近年牛ステーキや牛たたきといった牛に関連する diffuse outbreak の報告もあり、汚染源として牛の関わりが強く示唆されている [30, 34, 40]。しかし、わが国においては原因菌が分離されず原因食品や感染源が特定されない事件が多く、食肉、野菜からの原因菌の確実な分離法の確立が望まれている。また、ヒトや牛から分離された EHEC 0157 の疫学的解析を行うことはその発生防止対策上重要なことであり、近年、分子疫学的解析法であるパルスフィールド・ゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) が広く行われている。カナダ、英国などにおいては、ファージ型別は菌株の由来を特定する PFGE に次ぐ有用で簡便な方法として疫学調査に広く用いられている [1, 5, 9, 10, 21, 31]。しかし、わが国においては、ファージ型別に関しては Izumiya ら [15] や Akiba ら [2, 3] の報告があるのみでほとんど行われていない。

そこで、本研究では、EHEC 0157 の疫学的解析に関する基礎的研究は重要と考え、ヒトおよび牛由来 EHEC 0157 の疫学マーカーの検討、物理的条件下における EHEC 0157 の増殖性の検討、食品（食肉、野菜）からの EHEC 0157 分離法の検討、野菜からの凍結損傷 EHEC 0157 分離法の検討および静岡県における食品、環境水などの EHEC 0157 の汚染状況調査を行った。

第一章

ヒトおよび牛由来 EHEC 0157の疫学マーカーの検討

I. 材料および方法

1. 供試材料

(1)ヒト由来 EHEC 0157菌株

1987年から2000年の間に，静岡県内で発生した集団感染例，家族内感染例，散发例の下痢症患者糞便から分離されたヒト由来170菌株を供試した。

(2)牛由来 EHEC 0157菌株

1987年から1999年の間に，静岡県内の食肉衛生検査所における糞便や枝肉など検査において分離された牛由来50菌株および1996年から1999年の間に，全国食肉衛生検査所協議会に加盟している全国の食肉衛生検査所における糞便や枝肉などの検査において分離され，カジトン培地により送付された牛由来325菌株の計375菌株を供試した。

なお，EHEC 0157菌株を送付された全国の食肉衛生検査所は表2のとおりであった。

2. 検査方法

(1)EHEC 0157同定検査（図 1）

菌株をセフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）に再分離し，発育したソルビトール非分

解集落をセロピオース加LIG寒天培地（CLIG:極東）に接種した。37℃，24時間培養後，CLIGにおいて典型的な大腸菌の性状を示すとともに，インドール産生－陽性，チトクロームオキシダーゼろ紙（日水）によるチトクロームオキシダーゼ－陰性，MUG（ β -D-Glucuronidase）テスト－陰性および大腸菌0157検出キット

「UNI」（OXOID）によるスライドラテックス凝集反応－陽性を示した菌株をEHEC 0157と推定した。

続いて，EHEC 0157と推定した菌株について血清型別およびベロ毒素産生性確認検査によりEHEC 0157と同定した。

また，EHEC 0157と同定した菌株について薬剤感受性およびファージ型別検査を行った。

(2)血清型別検査

常法にしたがい病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて，スライド凝集反応によりO群型別試験を，また試験管内凝集反応によりH型別試験を行い血清型を決定した。

(3)ベロ毒素産生性確認検査

逆受身ラテックス凝集反応法（RPLA法）によるベロ毒素産生性確認検査およびPCR法によるベロ毒素産生遺伝子検査の両法によりVT型を決定した。

1)RPLA法によるベロ毒素産生確認検査

被検菌をCAYE培地（デンカ生研）に接種して37℃で16から20時間振盪培養後，培養液の1mlをマイクロチューブに移し，15,000回転で3分間遠心分離した。検査は上清を検体として，VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いて，キットの添付文

書の手順にしたがって行った。

2)PCR法によるペロ毒素産生遺伝子検査

ペロ毒素産生遺伝子検出用プライマーは、市販のVT1検出用EVT-1/2およびVT2検出用EVS-1/2（宝酒造）を用いた。

PCR反応液は、×10添付Buffer 5 μ l, dNTP Mixture(2.5mM each) 4 μ l, Primer 1/2 各々 0.5 μ l, Template DNA 5 μ l, TaKaRa TaqTM (5U/ μ l) 0.25 μ l, 滅菌蒸留水 34.75 μ lの計50 μ lとした。

Template DNAには、RPLA法に用いたCAYE培地培養液10 μ lを90 μ lのTE Buffer (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA pH8.0)に加え、95 $^{\circ}$ C 5分加熱後、15,000回転で3分間遠心した上清を用いた。

サーマルサイクラーは、ASTECC社PC-800を使用し、反応条件は熱変性94 $^{\circ}$ C 1分、アニーリング55 $^{\circ}$ C 1分、伸長72 $^{\circ}$ C 1分で35サイクル行った。増幅されるDNAサイズは、VT1が349bp, VT2が404bpであり、PCR反応産物は3%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネイターで観察した。

(4)薬剤感受性検査

アンピシリン(ABPC), テトラサイクリン(TC), ストレプトマイシン(SM), シプロフロキサシン(CPFX), カナマイシン(KM), ナリジクス酸(NA), ホスホマイシン(FOM), クロラムフェニコール(CP), セフトキシム(CTX), スルファキサゾール合剤(ST), トリメトプリム(TMP), ゲンタマイシン(GM)の12薬剤についてセンシ・ディスク(BBL)とミューラーヒントンII寒天培地を用いたKirby-Bauer法により行った[6]。

(5)ファージ型別検査

Darien Duck, Walter Demczuk, Jody Mckinnon, Mike Mulvey, Cliff Clarke, David Woodward, Rasik Khakhria, Rafiq Ahmed (BUREAU OF MICROBIOLOGY PHAGE TYPING, MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND SURVELLANCE, NATIONAL LABORATORY FOR ENTERIC PATHOGENS, LABORATORY CENTRE FOR DISEASE CONTROL, OTTAWA, ONTARIO)らによって編集された「STANDARD OPERATING PROCEDURES FOR *E. COLI* 0157 PHAGE TYPING」に示された次の方法よりファージ型別を行った。

1)ファージ型別検査法の原理

ファージ（バクテリオファージ：細菌を宿主として増殖するウイルスの一種）を用いた型別検査は、菌の由来を特定する検査法の一つで、ファージがある種の細菌に吸着、感染すると増殖し、溶菌斑（プラーク）を形成することを応用して行うもので、16種の型別用ファージ液をEHEC 0157に感染させ、溶菌により形成される溶菌斑のパターンにより型別した。

2)使用培地

① Phage Agar Plate(P.A.P.)

Nutrient Broth-dehydrated(Difco)	20.0 g
NaCl	8.5 g
Agar(Difco)	13.0 g
蒸留水	1,000ml
pH	6.8

加温溶解後、121℃、20分間滅菌し冷却して、シャーレ（10×10角型－FALCON Petori Dish）に分注した。

→固まった培地を乾燥のため37℃のふ卵器に一晩静置後、使

用までは冷蔵保存した。

→使用時には37℃のふ卵器に1～1.5時間に静置し、培地表面を十分乾燥させた。

② Phage Broth(P.B.)

Nutrient Broth-dehydrated(Difco)	20.0 g
NaCl	8.5 g
蒸留水	1,000ml
pH	6.8

加温溶解後、5mlずつ試験管に分注し、121℃、20分間滅菌した。

③ 再分離用培地

Nutrient Agar(1.5% Difco) Plateを用いた。

④ 保存用培地

Pepton Growth Medium SlopeまたはDorset Egg Slopeを用いた。

3) 手順

① EHEC 0157の確認

検査する菌株が生化学的性状、血清学的性状、ベロ毒素産生性確認検査などによりEHEC 0157であることを確認し、保存用培地に移植した。

② 型別用ファージ液

検査にはカナダのLaboratory Centre Disease Controlより分与された16種の型別用ファージ液を使用した。使用したファージ液はRTD(Routine Test Dilution:増殖用菌株で[SCL:半融合溶菌 Semi-confluent Lysis]を示す最高希釈濃度)であった。

③ 型別検査法

保存用培地から検査する菌株を再分離用培地に移植し、単一集落を形成させた。

→再分離用培地からスムーズな集落（実体顕微鏡で確認）をP.B.に接種し、37℃のウォーターバスで1.5時間あるいは菌による濁りがはっきり見えるまで振盪培養した。

→表面を十分に乾燥させたP.A.Pに振盪培養したP.B.を注ぎ余分な菌液はアスピレーターで吸引した。

→培地表面の菌液が乾いたら20 μ lずつ16種の型別用ファージ液を滴下する。滴下したファージ液を乾燥させた後、37℃のふ卵器で18～24時間培養した。

④ 判定法

プレート（P.A.P.）は裸眼やルーペを用い、直接または間接照明を通して、プレートの底から溶菌の状態を判定し、次のとおり記録した。

CL (Confluent Lysis) : 融合溶菌

SCL (Semi-confluent Lysis) : 半融合溶菌

OL (Opeque Lysis) : 半透明な溶菌

+++ : 71～100個の溶菌斑

++ : 21～70個の溶菌斑

+

- : 無反応

0 : 溶菌斑を伴う抑制反応

P : 5個以下の溶菌斑

± : -と+の間の反応

記録した結果とファージ型別表1～3（表3-1, 3-2, 3-3）によりファージ型（1～83）を決定した。

Ⅱ．成績

(1) ヒトおよび牛からの EHEC 0157 分離状況

1) 静岡県内のヒトからの EHEC 0157 の分離状況

1987年～2000年の14年間に集団感染例9名（2件），家族内感染例72名（26件），散发例89名の計170名の下痢症患者糞便から EHEC 0157 が検出され，特に，1996年以降に患者数が増加の傾向を示した。さらに，1997年9月に静岡市内の保育園において小規模（患者数7名）ではあるが最初の集団感染例の発生があった（表4）。

EHEC 0157患者の月別発生状況は，食中毒が多発する夏期に多い傾向にあり，8月が28名，7月が24名，9月が22名，3月が20名の順に多く，2月はわずかに1名の発生であった（図2）。また，患者の年齢・性別による分布をみると，年齢別では不明の2名を除き10才以下と60才以上が100名（男性51名，女性49名）で約60%を占め，性別では男性77名，女性93名と女性がやや多い傾向にあった（図3）。

2) 牛からの EHEC 0157 の分離状況

1996年～1999年の3年間に全国の食肉衛生検査所に搬入処理された牛のうち325頭（肉用牛－300頭，乳用牛－25頭）および静岡県内の48頭（肉用牛）の計373頭（肉用牛－348頭，乳用牛－25頭）から EHEC 0157 が分離された（表5）。なお，静岡県では1987年と1990年に肉用牛1頭ずつから EHEC 0157 が分離され，これらを加えると50頭となった（表4）。

375頭のブロック別の分離状況は，関東・甲信越ブロックが165頭（44.0%），近畿ブロックが63頭（16.8%），東海・北陸プロ

ックが60頭（16.0%）、九州・沖縄ブロックが47頭（12.5%）、北海道・東北ブロックおよび中国・四国ブロックがそれぞれ20頭（5.3%）であった（表5）。

また、部位別の分離状況は、糞便が241頭、枝肉が116頭であり、これらで全体の95.2%を占めていた。以下、体表と盲腸内容物が6頭ずつ、肝臓が3頭、第四胃内容物が2頭、第一胃内容物が1頭の順であった。静岡県の牛の分離部位は、糞便36頭、枝肉12頭、第四胃内容物2頭であった（表6）。

(2)血清型別

静岡県内のヒト由来株170株の血清型は、0157:H7が149株（87.6%）、残り21株（12.4%）が0157:H-であった。また、牛由来株375株の血清型は、0157:H7が357株（95.2%）、残り18株（4.8%）が0157:H-であった（表7）。

(3)VT型別

供試株のVT型は、ヒト由来株ではVT1,2産生が104株（61.2%）、VT2産生が65株（38.2%）であり、VT1産生株は1株（0.6%）であった。これに対して、牛由来株ではVT2産生が218株（58.1%）、VT1,2産生が133株（35.5%）、VT1産生は24株（6.4%）であった（表8）。

(4)薬剤感受性

ヒト由来株135株および牛由来株232株の計367株の薬剤感受性をみると、ヒト由来株では28株（20.7%）、牛由来株では48株（20.7%）がいずれかの薬剤に対して耐性を示した。

ヒト由来株ではSM、Te耐性が11株、NA、SM、TC耐性が10株の順

に多く、なかに1株ではあるがABPC, KM, NA, SM, TCの5剤耐性を示した株がみられた(表9)。

牛由来株ではSM, TC耐性が27株で耐性を示した株の56.3%を占めており、なかに1株ではあるがABPC, CP, KM, SM, TC 5剤耐性を示した株がみられた(表9)。また、主なファージ型のうち、23型は33株中14株(42.4%)、14型は30株中7株(23.3%)、54型は61株中13株(21.3%)と耐性株が多く、34型は64株中4株(6.2%)、39型は41株中2株(4.9%)と耐性株が少なく、ファージ型により薬剤耐性率が異なった(表10)。

(5)ファージ型別

ヒト由来株では非定型(AT:Atypical)および未検査のそれぞれ4株ずつ計8株を除いた162株(97.1%)が21のファージ型(1型, 2型, 4型, 8型, 14型, 21型, 23型, 24型, 28型, 31型, 32型, 33型, 34型, 37型, 41型, 45型, 49型, 54型, 56型, 61型, 72型)に型別され、2型が28株(16.5%)、32型が25株(14.7%)、4型と21型がそれぞれ18株(10.6%)の順に多かった(表11)。

EHEC 0157による集団感染例2例のファージ型は、21型と34型であり、家族内感染例26例のファージ型は、32型が7例(26.9%)と最も多く、以下2型が4例(15.4%)、4型, 21型, 23型が2例(7.7%)、1型, 8型, 14型, 24型, 37型, 45型, 49型, 54型, 56型がそれぞれ1例(3.8%)であった。また、集団感染例や家族内感染例からの分離株(81株)のファージ型において、同じ集団感染例や家族内感染例から分離された株はすべて同じファージ型を示した(表12)。

ヒト由来株の年次推移は、全国的な流行がなかった1995年までの29株は11のファージ型（2型，4型，14型，21型，28型，31型，34型，37型，45型，54型，61型）に型別され，主なファージ型は21型（24.1%），2型（20.7%）であったのに対して，1996年以降の141株は20のファージ型（1型，2型，4型，8型，14型，21型，23型，24型，28型，31型，32型，33型，34型，41型，45型，49型，54型，56型，61型，72型）に型別され，主なファージ型は32型（17.7%）および2型（15.6%）であった。また，年によって分離頻度の高いファージ型は異なっていたが，1996年以降2型，14型は毎年分離された（表13）。

牛由来株では非定型の29株を除いた346株（92.3%）が22のファージ型（1型，2型，4型，8型，14型，21型，23型，31型，32型，33型，34型，39型，40型，43型，45型，54型，56型，63型，67型，71型，74型，78型）に型別され，34型が68株（18.1%），54型が61株（16.3%），39型が41株（10.9%），23型が33株（8.8%），14型が30株（8.0%）の順に多かった（表11）。また，ファージ型のブロック別分離状況は，各ブロックによる偏りはほとんどみられなかったが，34型，39型，54型はすべてのブロックで分離された（表14）。さらに，年次推移では，年によって分離頻度の高いファージ型は異なるが，34型か54型が上位を占めていた（表15）。

ヒトおよび牛由来株において，14のファージ型（1型，2型，4型，8型，14型，21型，23型，31型，32型，33型，34型，45型，54型，56型）が両由来株に共通していた（表11）。

Ⅲ．考察

(1) ヒトおよび牛からの EHEC 0157 の分離状況

1) 静岡県内のヒトからの EHEC 0157 の分離状況

1996年～2000年の5年間における全国の EHEC 0157 感染症患者の発生状況は、厚生省の報告によれば、患者総数は8,303名で、多い年は1996年の2,689名、少ない年は2000年の1,158名であり、ほぼ毎年1,000名以上の患者の発生が確認されている[27, 28]。患者の発生は全国的にみれば東北、近畿、中国や九州に多いといった地域的偏りはあるが、静岡県においては、中部地区に発生が少ないもの全県的に発生がみられ、県内は EHEC 0157 に広く汚染されているものと考えられた。しかし、ほとんどの事例でその感染源や感染経路を特定することはできなかつた。その理由として、県内の事例は大部分が散発例や家族内感染例であり、潜伏時間が長い場合食品などが残っておらず検査がほとんどできなかつたことによるものと考えられた。

EHEC 0157 患者の年齢別分布をみると、甲斐ら[17]の報告と同様に小児における患者発生が多く、5歳以下で全体の34.7%を占めていた。静岡県では21歳～60歳の患者が52名(30.6%)がやや多い傾向がみられたが、これは家族内感染例が多いためと考えられた。また、月別患者発生状況では、食中毒の多発する夏期(7月～9月)に多発する傾向がみられたものの概ね年間を通して発生があり全国的な傾向に類似していた。なお、3月にやや発生が多かつたことは1997年3月、横浜市での集団発生を発端として関東から東海地方にある種の共通食品(不明)が原因となつた流行によるものと考えられた[26]。

2)牛からの EHEC 0157の分離状況

わが国での牛における全国的な実態調査は、1996年に全国食肉衛生検査所を中心として行われた。この報告によれば、牛からの EHEC 0157の分離率は、全国平均で糞便1.4%、枝肉0.3%、静岡県で糞便0.3%、枝肉0.5%であった[30]。これらの成績は、検査法や検体数により分離率に若干の差がみられたが、これまでの調査報告の成績と比べて大きな差はみられなかった[34]。

(2)血清型別

1996年～2000年の5年間における全国の EHEC 0157感染症患者8,303名の血清型は、厚生省の報告によれば、未検査の941株を除いて、0157:H7が6,964株(94.6%)、0157:H-が398株(5.4%)であった[27, 28]。

静岡県内のヒト由来株170株の血清型は、0157:H-(12.4%)がやや多い傾向にあったが、全国の未検査の菌株を考慮すればほぼ同様の傾向にあると考えられた。

また、牛由来株においても静岡県と全国各地で分離された株の血清型はほぼ同様の傾向にあると考えられた。

(3)VT型別

1996年～2000年の5年間における全国の EHEC 0157患者8,303名のVT型は、厚生省の報告によれば、不明15株を除いて、VT1,2産生が5,762株(69.5%)、VT2産生が2,423株(29.2%)、VT1産生が103株(1.2%)であった[27, 28]。静岡県内のヒト由来株もほぼ同様の傾向を示しており、ヒト由来株ではVT1,2産生が主流であった。

これに対して、牛由来株では、VT2産生が218株(58.1%)、

VT1,2産生が133株（35.5%）、VT1産生が24株（6.4%）であり、ヒト由来株と異なり、牛由来株ではVT2産生が主流であり、ヒト由来株の主なVT型と異なった。

(4)薬剤感受性

ヒト由来株、牛由来株ともにSM、TCの耐性化が進んでいることが注目された。両薬剤とも牛の治療薬として比較的多く使用されている薬剤であり、臨床現場における安易な使用は考えなければならない問題である。また、ABPC（牛でよく使用される薬剤）、CP、KM、NAの一部でも耐性株がみられたことや少数ではあるが5剤に耐性を示した株があり今後注目しなければならない。

(5)ファージ型別

感染症や食中毒の感染源を追求するためには、細菌の疫学マーカーを利用した疫学的解析が重要であり、EHEC 0157の疫学マーカーとしては、ファージ型、血清型別、VT型別、薬剤感受性パターン、生化学的性状など微生物の表現型を用いた方法のほか、パルスフィールド・ゲル電気泳動法（PFGE）、ランダムプライムPCR法（RAPD）など遺伝子型による方法が広く用いられている。

今回の成績でも、ヒトの同じ集団感染事例や家族内感染事例からの分離株は同一血清型、VT型、薬剤感受性パターンを示し、疫学マーカーとして有用性はみられたものの、分離株間の識別力には乏しく十分な疫学的解析ができない。また、PFGEは識別力が優れているものの検査手法の煩雑性、機器の維持管理、ランニングコストなどにより、どこの検査施設でも簡単には対応できない。一方、ファージ型別はPFGEに次ぐ識別力を有しており、しかも、操作性、経済性においても優れた検査法である。

そこで、83のファージ型に型別できるファージセットを導入して、静岡県内で分離されたヒト由来株および全国の牛由来株のファージ型別について検討した。

その結果、ヒト由来株では2型と32型が多く分離された。この理由として、2型による家族内感染例が多かったこと、1997年3月に関東南部から東海地方にかけて32型による散発的集団感染例 (Diffuse outbreak) の発生があったことによるものであった [26, 27]。次いで、21型、4型の順に多かったが、これらは集団感染例や家族内感染例の発生によるものであった。これらのうち、2型と14型は1996年以降は毎年分離され、ヒト由来株での主要ファージ型と考えられた。しかし、静岡県内の牛由来株からは分離されなかった。

また、牛由来株では34型、54型、39型、23型が多く分離され、特に、34型は1987年神田ら [18] が初めて牛から分離した株のファージ型であり、牛由来株の主なファージ型となっていた。さらに、8型、14型、21型、32型、34型、54型などがヒトおよび牛由来株に共通して比較的多く分離されていることからこれらが牛からヒトへの主な感染型と推察された。

欧米における EHEC 0157 のファージ型については、Barrettら [5] はヒト由来株が13のファージ型に型別され、主なファージ型は14型、2型、21型、32型、牛由来株が15のファージ型に型別され、主なファージ型は23型、43型、2型、14型であったことを報告している。Krauseら [31] はヒトや動物 (牛、豚) 由来株が12のファージ型に型別され、主なファージ型はヒト由来株では2型、49型、牛由来株では54型であったことを報告している。

また、Chapmanら [9, 10] は牛糞便由来株の主なファージ型は2型、4型、34型、食肉類由来株の主なファージ型は4型、2型、8型で

あったことを報告している。

一方，わが国においては，Izumiyaら [15]は国内のヒト由来株や食品および環境由来株が15のファージ型に型別され，ヒト由来株の主なファージ型は21型，14型，32型，食品・環境由来株の主なファージ型は39型，23型，54型であったことを報告している。また，Akibaら [2]は国内の牛由来株が15のファージ型に型別され，主なファージ型は21型，54型，34型であったことを報告している。

今回，静岡県におけるヒト由来株の主なファージ型は2型，32型，4型，21型であり，これらは欧米や国内の主なファージ型とほぼ一致していた。さらに，牛由来株でもほぼ同様の傾向を示した。また，今回調べたヒトおよび牛由来株のファージ型は，ヒトのみあるいは牛のみに見られるものがあり，両由来株のファージ型に若干の差異が見られた。さらに，例えば2型，34型はVT2産生菌のみ，21型はVT1,2産生菌のみと，特定のファージ型とVT型に関連性があるものが存在した。また，事例数は少ないが，同じ集団感染例や家族内感染例から分離された株はすべて同じファージ型を示した。

これらのことから，ファージ型別はその他の疫学マーカーとして比較して分離株間の識別力に優れており，疫学的解析に有用であることが示唆された。より詳細な疫学解析を行うためにはAkibaら [2]，Barrettら [5]，Izumiyaら [15]，Krauseら [41]が報告しているとおり，ファージ型別とPFGEなどの分子疫学的手法を組み合わせる活用することが必要と考えられた。

また，EHEC 0157による下痢症の感染源として牛が重要であることについては数々の指摘がある [14, 17, 30, 32]。今回の成績でも，8型，14型，21型，23型，32型，34型，54型などがヒトお

び牛由来株に共通して比較的多く検出されていることから、食肉などを介した牛からヒトへの感染も考えられた。しかし、ヒトおよび牛由来株間にはファージ型、VT型などの疫学マーカーに差異がみられ、ヒトへの感染源は牛のみではなく他の要因の関与も考えられた。

IV. 小括

細菌の疫学マーカーは感染症や食中毒の感染源を追求に不可欠な検査であり、微生物の表現型（フェノタイプ）のマーカーとして生物型、血清型、ファージ型、薬剤感受性などが用いられてきた。

静岡県のヒト由来株の血清型は0157:H7、VT型はVT1,2であったのに対して、牛由来株の血清型は0157:H7、VT型はVT2であった。両来株間に血清型では差がなかったが、VT型では主な型が異なった。また、薬剤感受性では、ヒトおよび牛由来株ともにSM、TCの耐性化が進んでいることが注目され、ABPC、CP、KM、NAに耐性株がみられたことや少数ではあるが5剤耐性を示した株があった。これらの成績から、血清型別、VT型別、薬剤感受性は疫学マーカーとして有用ではあるが、分離株間の識別力が乏しく十分な疫学的解析はできなかった。

そこで、ヒトおよび牛由来株のファージ型について検討した。

その結果、ヒト由来株では2型、32型、4型、21型、牛由来株では34型、54型、39型、14型、23型が多く検出され、両由来株の主要ファージ型は異なっていた。しかし、8型、14型、21型、32型、34型、54型などがヒトおよび牛由来株に共通して比較的多く分離されていることからこれらが牛からヒトへの主な感染型と推察された。

今回検討したヒトおよび牛由来株のファージ型は、過去の内外の報告とほぼ一致していたが、ヒトのみあるいは牛のみにみられるものがあり、両由来株のファージ型に若干の差がみられ、ヒトへの感染源は牛のみではなく他の要因の関与も考えられた。また、特定のファージ型とVT産生に関連性があるものが存在した。さらに、事例数は少ないが、同じ集団感染例や家族内感染例から検出された株はすべて同じファージ型であった。以上のことから、ファージ型別は疫学マーカーとして有用であることが示唆され、より詳細な疫学的解析を行うためにファージ型別とPFGEなどの分子疫学的手法を組み合わせる必要があると考えられた。

第二章

物理的条件下における EHEC 0157 の増殖性の検討

I. 材料および方法

1. 培地の pH

市販品の Trypticase Soy Broth (TSB) の pH を 11.0 から 3.0 まで 0.5 刻みで調整後、10ml ずつ中試験管に分注し、121℃ 15 分滅菌した。この培地に EDL 株 [4] および静岡県内の散発下痢症患者由来 EHEC 0157 を接種し、35℃ 24 時間培養後に培地の濁りにより菌の増殖性 (- ~ +++) を確認した。

2. 培地の塩分濃度

市販品の TSB は通常塩分濃度が 0.5% であり、これに NaCl (試薬特級) を加え、1.0 ~ 10.0% まで 0.5% 刻みで調整後、10ml ずつ中試験管に分注し、121℃ 15 分滅菌した。この培地に EDL 株 [4] および静岡県内の散発下痢症患者由来 EHEC 0157 を接種し、35℃ 24 時間培養後に培地の濁りにより菌の増殖性 (- ~ +) を確認した。

3. 培養温度

ダーラム管を入れた中試験管に 10ml の EC 培地を分注し、121℃ 15 分滅菌後に急冷した。この培地に EDL 株 [4] および静岡県内の散発下痢症患者由来 EHEC 0157 と EHEC 0157 以外大腸菌 (018 群) を接種し、5.0, 10.0, 25.0, 30.0, 35.0, 40.0, 41.0, 42.0, 42.5, 43.0, 43.5, 44.0, 44.5, 45.0, 45.5, 46.0, 46.5, 47.0, 48.0℃ の温度で 24 時間培養後に菌の濁りによる菌の増殖 (- ~ +++) とガス産生 (- ~ +++) を確認した。

Ⅱ．成績

1. 培地の pH

標準株（EDL）は，pH4.5～9.0の間の培地に増殖が確認され，pH5.0～7.5の間でその増殖は活発（++）であった。一方，散发下痢症患者由来株は，pH4.5～9.5の間の培地に増殖が確認され，pH5.0～8.0の間でその増殖は活発（++）であった（表17）。

2. 培地の塩分濃度

NaClを添加した培地での増殖は，標準株（EDL），下痢症患者由来株とも6.0%以下で発育が確認された（表18）。

3. 培養温度

培養温度が10℃以下では，全ての株において菌発育，ガス産生は確認されなかった。25～43.5℃の間では，全ての株において菌発育，ガス産生とも活発（+++）であった。

標準株（EDL），下痢症患者由来株では45℃以上で菌発育，ガス産生は確認できなかった。また，EHEC 0157以外の大腸菌では46.0℃までは菌発育，ガス産生が確認された（表19）。

Ⅲ．考察

食中毒の予防対策の上で，各種物理的条件による食品中のEHEC 0157の増殖性を把握し，これらを活用することにより微生物制御することは重要である。

そこで，培地のpH，塩分濃度および培養温度といった物理的条

件の違いによってEHEC 0157の増殖性に差があるのか基礎的な検討をした。

今回、物理的条件におけるEHEC 0157の増殖性を検討したところ、pH4.0以下の酸性食品などやpH10.5以上のアルカリ性の状態ではEHEC 0157の増殖は阻害される。したがって、有機酸などを食品に添加して、食品の特性を失わない程度にpHを調整することは有効な食品の保存法であり、これにより食品の安全性が確保できるものと考えられた。

また、塩分濃度が濃い状態では食品中は高浸透圧の状態になるので微生物は水分を奪われて増殖が阻害される。腸炎ビブリオなどの好塩性細菌では濃い塩分濃度でも発育するが、大腸菌では2%以下が最適な濃度である。EHEC 0157は海水中でも十分生存できることが判明し、北海道産のイクラを原因食品とした全国的な食中毒事件の発生と同様に他の海産物も食中毒の原因食品になり得る可能性が示唆された[27]。

さらに、食品衛生法ではEC培地を用いた大腸菌検査では、培養温度は44.5℃と規定されているが、この温度ではEHEC 0157以外の大腸菌は十分増殖できるが、EHEC 0157は増殖が抑制されるため、増殖に適した温度とは言えない。現在、食品からのEHEC 0157検査における増菌法として、検体25gに225mlのノボピオシン加mEC(NmEC)培地を加えて42±0.5℃で20～24時間培養する方法が一般的であり、この温度は他の細菌の増殖をある程度抑制させることから最も適当な方法と考えられた。

IV. 小括

食中毒の予防対策の上で、各種物理的条件による食品中のEHEC

0157の増殖性を把握し，これらを活用することにより微生物制御することが可能と考え，培地のpH，塩分濃度および培養温度などの物理的条件の違いによってEHEC 0157の増殖性に差があるのか基礎的な検討をした。

今回の成績から，有機酸などを食品に添加して，食品の特性を失わない程度にpHを調整することは有効な食品の保存法であり，これにより食品の安全性が確保できるものと考えられた。また，EHEC 0157は海水中でも十分生存できることが判明し，海産物も食中毒の原因食品になり得る可能性が示唆された。さらに，食品のEHEC 0157検査における増菌法として， $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で培養する方法が他の細菌の増殖をある程度抑制させることから最も適当な培養温度と考えられた。

第三章

食品（食肉，野菜）からのEHEC 0157分離法の検討

I. 材料および方法

1. 供試菌株

試験には国立予防衛生研究所より分与されたEHEC 0157:H7愛知56を使用した。

接種菌の調製は，Trypticase Soy Brothで数回継代した菌液を3,000回転20分遠心後，滅菌蒸留水に再浮遊させた。この菌液を，多菌数はgあたり数個，少菌数は多菌数の1/10となるように供試食品に接種した。なお，菌数の測定は10枚のセフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）に100 μ lずつコンラージ後培養し，発育した集落数により算出した。

2. 供試食品

試験1には牛挽肉にEHEC 0157の多菌数（5.6CFU/g）を接種したもの，少菌数（1.0CFU/g）を接種したものおよび菌未接種のものを10検体ずつ計30検体を準備した。これらの半数ずつを冷蔵（-5 $^{\circ}$ C）および冷凍（-20 $^{\circ}$ C）保存したものを供試した。

試験2にはカイワレ大根にEHEC 0157の多菌数（0.8CFU/g）を接種したもの，少菌数（0.1CFU/g）を接種したものおよび菌未接種のものを10検体ずつ計30検体を準備した。これらの半数ずつを冷蔵および冷凍保存したものを供試した。

試験3には牛挽肉とカイワレ大根にEHEC 0157（牛挽肉-0.6CFU/g，カイワレ大根-1.1CFU/g）を接種したものと菌未接種

のものをそれぞれ10検体ずつ計40検体準備し，冷蔵保存したものを供試した。

3. 試験方法

試験1および2では供試食品25gにノボピオシン加mEC (NmEC) 培地225mlを加え42℃18時間増菌培養後，各分離培地（ソルビトールマッコニキー培地：SMAC，CT-SMAC，クロモアガー 0157：CHR，BCM 0157：BCM）に直接塗抹する方法（以下，直接法）と増菌培養後に免疫磁気分離法（immunomagnetic separation）により集菌後，各分離培地に塗抹する方法（以下，IMS法）を行い，IMS法と各分離培地について分離率を比較検討した。なお，4種類の分離培地のいずれかの培地で分離された検体数で判定した。さらに，試験1および2の増菌培養液を検体としてイムノキット（NOW 0157:Binax，PATH-STIK:Lumac，VIP:Bio-control）を用いた検査を行った。なお，検査は各キットの使用書にしたがって行った。

試験3では供試食品25gにNmEC培地225mlを加え42℃18時間増菌培養する方法（以下，NmEC増菌法）とトリプトソイブロス（TSB）225ml加え35～37℃6時間増菌培養する方法（以下，TSB増菌法）を行った後，それぞれについて直接法とIMS法を行い，増菌培養条件と各分離培地（SMAC，CT-SMAC，CHR）の分離率を比較検討した。なお，判定は試験1および2と同様に行った。

なお，これらの試験において分離培地上の定型的集落について0157検出用ラテックス試薬UNI(Unipath)およびセロピオース加LIG培地での観察所見により確認を行った。

II. 成績

1. EHEC 0157接種検体における直接法とIMS法による分離の比較 (表19)

試験1での冷蔵、冷凍の牛挽肉からの分離率は、多菌数および少菌数で両法ともに100%で差はみられなかった。

試験2での冷蔵のカイワレ大根からの分離率は、多菌数で両法ともに100%であったが、少菌数で直接法は0%、IMS法は20%であった。しかし、冷凍のカイワレ大根からの分離率は、多菌数で両法ともに40%、少菌数で両法ともに0%であった。

試験3での牛挽肉とカイワレ大根からの分離率は、両検体ともに直接法では30%、IMS法では50%とIMS法の方が分離率が高かった。なお、菌未接種の牛挽肉2検体とカイワレ大根1検体から検出されたが、この原因については不明であった。

2. EHEC 0157接種検体における分離培地による分離の比較 (表20)

試験1での牛挽肉からの分離率は、菌接種量や検体処理法にかかわらず、いずれの分離培地においても100%であった。

試験2でのカイワレ大根からの分離率は、同様にいずれかの方法においてもCT-SMACでは35%、CHRでは27.5%、BCMでは25%、SMACでは20%の順で、CT-SMACの分離率が最も高かった。

試験3での牛挽肉からの分離率は、CT-SMACでは40%、CHRでは40%、SMACでは35%、カイワレ大根からの分離率は、CT-SMACでは35%、CHRでは30%、SMACでは30%の順であり、あまり差はなかった。

3. EHEC 0157接種検体における増菌培地による分離の比較

(表21)

試験3での牛挽肉とカイワレ大根からの分離率は、NmEC増菌法では直接法で60%、IMS法で100%であり、TSB増菌法では両法とも0%であった。

4. EHEC 0157接種検体におけるイムノキットの比較 (表22)

試験1での牛挽肉における各イムノキットの陽性率は、いずれのキットでも100%であったが、菌未接種検体のVIPにおいて冷蔵で60%、冷凍で40%が陽性を示した。

試験2でのカイワレ大根における各イムノキットの陽性率は、いずれの検体も同率で、冷蔵検体の多菌数では80%、冷蔵検体の少菌数では20%、冷凍検体の多菌数では40%、冷凍検体の少菌数では0%であった。

Ⅲ. 考察

1996年の関西地方を中心としたEHEC 0157による集団食中毒事件の後、厚生省は食品からのEHEC 0157検査法に関する通知を示した。これらの検査法の中で、より高感度かつ迅速な検査法が求められるようになった。

そこで、集団食中毒事件の原因食品と推定された食品（牛挽肉およびカイワレ大根）からのEHEC 0157分離における直接法とIMS法、分離培地、増菌培地による分離の比較およびイムノキットの比較について検討した。

下痢原性大腸菌による下痢症を発症する食品中の菌量は 10^6 CFU/g以上であると考えられてきたが，EHEC 0157では，感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の二類感染症である腸チフスや赤痢菌と同様に少ない菌量で発症するため，ヒトからヒトへの二次感染もみられている[14]。したがって，食品の汚染菌量が少なくてもヒトが感染する可能性は否定できない。

しかし，食品における汚染菌量が少ない場合，原因食品がなかなか特定できない事例が多いことから考えると菌を分離することは非常に難しいと考えられる。また，食品中でも加熱，凍結などいろいろなストレスを菌が受けており，菌分離に際して重要な影響を与えている。

今回，集団食中毒事件の原因食品と推定された食品（牛挽肉およびカイワレ大根）からのEHEC 0157分離法の検討を行ったところIMS法が直接法より分離率において優れていることが明らかとなった。特に，カイワレ大根の菌接種検体において直接法でいずれの方法でも分離できなかったが，IMS法を取り入れることによりいずれの培地からも分離できた検体があった。したがって，IMS法はEHEC 0157の分離には有効な方法と考えられた。ただし，IMS法は高感度な方法であるため検体間での菌の混入や誤った操作により間違った結果となる可能性があることから，多検体を一度に扱う場合などには十分な注意が必要である。

EHEC 0157の分離培地として，Zadicら[41]はCT-SMACの有用性を報告している。また，食肉からのEHEC 0157分離に同培地が優れていることは尾上ら[36]が報告している。今回の結果からも，CT-SMACは全体的に高い分離率を示しており，添加されているCT（セフィキシム亜テルル酸）により強い選択性がみられ，釣菌がしやすいことから分離培地として優れていると考えられた。

また、CHRやBCMといった酵素基質培地もCT-SMACとほぼ同等の分離率であり、今回の試験においてCT-SMACでは検出されなかったが酵素基質培地で分離された検体もあったことからCT-SMACと酵素基質培地を併用することにより分離率を上げることができると考えられた。しかし、SMACは他の3種類の培地と比べると分離率はやや低かった。

増菌培養法の検討では、NmEC増菌法で100%分離されるのに対して、TSB増菌法でまったく分離されなかった。このことは秦ら[13]の報告と同様に、TSBのように抑制力のない栄養豊かな培地では様々な菌が増殖して目的とするEHEC 0157の発育を抑制することを示すものであり、NmEC培養法が優れていると考えられた。

しかし、試験2のカイワレ大根において分離率が低かったように検査する食品の条件（汚染菌量、食品由来成分など）によって必ずしも有効方法とは言えない場合もあり、今後は二次増菌の導入や他の増菌法との併用などを考慮する必要があるがあった。

イムノキットについては、一部の検体において偽陽性が出現する場合があります。迅速で簡便なスクリーニング法としては有効であるが、イムノキットのみでEHEC 0157のスクリーニングすることは不適當であると考えられた。

IV. 小括

食中毒事件の原因食品と推定された食品（牛肉およびカイワレ大根）からのEHEC 0157分離における直接法と免疫磁気分離法（IMS法）、分離培地、増菌培地による分離の比較およびイムノキットの比較について検討した。

その結果、IMS法が直接法より分離法として優れていることが明らかとなり、EHEC 0157の分離に有効な方法と考えられた。ただしIMS法は高感度な方法であるため検体間での菌の混入や誤った操作により間違った結果となる可能性があることから、多検体を一度に扱う場合などは十分な注意が必要である。

CT-SMACは全体的に高い分離率を示しており、添加されているCTにより強い選択性がみられ、釣菌がしやすいことから分離培地として優れていると考えられた。また、CHRやBCMといった酵素基質培地もCT-SMACとほぼ同等の分離率であり、今回の実験においてCT-SMACでは検出されなかったが酵素基質培地で分離された検体もあったことからCT-SMACと酵素基質培地を併用することにより分離率を上げることができると考えられた。しかし、SMACは他の3種類の培地と比べると分離率はやや低かった。

増菌培養法の検討では、NmEC培養法が優れていたが、検査する食品の条件によって必ずしも有効とは言えない場合もあり、二次増菌の導入や他の増菌法との併用などを考慮する必要があった。

イムノキットについては一部の検体において偽陽性が出現する場合があります。イムノキットのみで判定することは不適當であった。

第四章

野菜からの凍結損傷EHEC 0157分離法の検討

I. 材料および方法

1. 凍結損傷EHEC 0157の作製

Tripticase Soy Broth (TSB) に発育させたEHEC 0157 (予研970056) を滅菌ミリQ水に懸濁後, 3,000回転, 20分, 3回滅菌ミリQ水で洗浄した。再度, 滅菌ミリQ水に懸濁し, -20°C で24時間以上保存した。

凍結保存した菌液を融解後, セフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC) およびTripticase Soy Agar (TSA) に塗抹培養し, TSAに発育し, CT-SMACに発育しなかった菌を凍結損傷EHEC 0157とした。

2. 試験方法

カイワレ大根 (一般細菌数 $10^8/g$, 大腸菌群数 $10^6/g$), ヘタを除去したイチゴ (一般細菌数 $10^5/g$, 大腸菌群数 $<200/g$) および塩キャベツ (一般細菌数 $10^6/g$, 大腸菌群数 $10^4/g$) を滅菌袋に25gずつ入れたものを各々20袋ずつ準備した。

各々の袋に凍結損傷EHEC 0157 (12.4CFU/ml) 1mlを接種し全体によくなじませた。

予備試験の結果, 選択剤 (N.B: Novobiocin: CIGMA, Bile salts: Difco) を予め添加した増菌培地では凍結損傷EHEC 0157の発育が多少抑制されたため, 増菌培地としてNovobiocinおよ

びBile saltsを除いたmECとTSBを用いた。

それぞれの培地を各々の検体の10袋ずつに225ml加え，1分間ストマッカー処理後，室温（25℃）に2時間静置した。

その後，各々の袋にNovobiocin溶液（4.5mg/ml）1mlとBile salts No.3溶液（126mg/ml）2mlを加えて軽く振盪後，42℃18時間培養した。この培養液をCT-SMACとクロモアガー0157（CHR）に直接塗抹する直接法と免疫磁気分離法により処理後塗抹するIMS法により凍結損傷EHEC 0157の分離を行った。

なお，判定は発育した集落数により－～ +++（－：0，＋：1～10，++：10～50，+++：50以上）を判定した。

II. 成績

野菜類（カイワレ大根，イチゴ，塩キャベツ）からの凍結損傷菌の分離状況は，表23のとおりであった。

カイワレ大根からは，直接法，IMS法いずれの方法でも今回用いた増菌培地，分離培地の組合せでEHEC 0157は全く分離されなかった。

イチゴからは，直接法，IMS法いずれの方法でもEHEC 0157が分離され（1/10～2/10），集落数はほとんどが+++であったが増菌培地，分離培地の組合せによる差がなかった。

塩キャベツからも直接法，IMS法いずれの方法でもEHEC 0157は分離され（3/10～6/10），増菌培地としてmEC（N.B）を用いたほうがTSB（N.B）よりやや分離率が高かった。また，直接法では分離培地としてCT-SMACを用いた方が集落数は多かった。しかし，IMS法では分離培地による差は少なかった。

Ⅲ．考察

食品からのEHEC 0157の分離は食中毒事件における原因食品の追求や流通食品の汚染実態を把握するために重要である。現在、多くの食品は冷凍状態で流通するケースが多く、食品管理マニュアルでは検食は -20°C で2週間保管することが義務付けられている。したがって、食品中のEHEC 0157は凍結されることによる損傷を受けており発育し難い状態になっている。また、凍結損傷したEHEC 0157の分離法について十分検討されていない。

そこで、わが国における集団食中毒の主な原因食品である野菜からの効率的な凍結損傷EHEC 0157の分離を検討した。

今回、野菜からのEHEC 0157分離法の検討を行ったところ、直接法では、増菌培地としての差は検体によって大きな差はなかった。しかし、分離培地としてCT-SMACがやや優れていた。また、IMS法では、逆に分離培地による差は少なかったが、増菌培地としてmEC(N.B)がやや優れていた。

総合的に判断すると、増菌培地としてNovobiocinおよびBile saltsを除いたmECを用いて、 25°C 、2時間静置する。これにNovobiocinおよびBile saltsを添加して、 42°C 、18時間培養後に免疫磁気分離法処理してCT-SMACに塗抹する方法が最も良いと考えられた。また、EHEC 0157はCHRなどの酵素基質培地で特徴のある色彩の集落を形成することから、2種類以上の分離培地を併用することにより分離率を上げることができると考えられた。

IV. 小括

現在、多くの食品は冷凍状態で流通し、食品中のEHEC 0157は凍結による損傷を受け、発育し難い状態になっている。また、凍結損傷したEHEC 0157に対する分離法について十分な検討がされていない。そこで、野菜からの効率的な凍結損傷EHEC 0157の分離法の検討を行ったところ、ノボピオシンと胆汁酸を除いたmEC培地で25℃2時間培養後、これにノボピオシンと胆汁酸を加えて42℃18時間培養し、さらに、IMS処理をしてCT-SMACに塗抹する方法が最も良いと考えられた。また、酵素基質培地など2種類以上の分離培地を併用することにより分離率を上げることができると考えられた。

第五章

静岡県における食品，環境水などのEHEC 0157の汚染状況調査

I. 材料および方法

1. 供試材料

1996年から2000年の間に，静岡県内で販売されている食肉類333検体，野菜類191検体（市場購入品－102検体，スーパーマーケットなどの小売店購入品－89検体），その他の食品22検体および環境水など149検体の計695検体を供試した。

2. 検査方法

食品（食肉類および野菜類など）は25g，環境水など（100～1,000ml）および野菜洗浄水（3ℓ）はフィルター（0.45 μ m）で濾過し，そのフィルターを検体とした。

スーパーマーケットなどの小売店で購入した食肉および野菜類には225ml，環境水などを濾過したフィルターには15mlのノボピオシン加EC培地（NmEC）を加えて42 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 20～24時間培養後，培養液をセフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）とクロモアガー 0157（CHR）に直接塗抹する直接法を行った（図4）。

市場購入した野菜類および野菜洗浄水を濾過したフィルターについては，検体を入れた滅菌袋に約40 $^{\circ}$ Cに加温したバッファード・ペプトン・ウォーター（BPW）を野菜には225ml，野菜洗浄水を濾過したフィルターには100mlを加え，36 \pm 1 $^{\circ}$ C 6時間培養した。次に，この培養液の1mlをNmEC（10ml）に接種し42 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 20～24時間培養した。さらに，培養液をCT-SMACとCHRに直接塗抹する

直接法および免疫磁気分離法（immunomagnetic separation）で処理後，直接法と同じ培地に塗抹するIMS法を行った（図5）。

これらの分離培地を $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 20～24時間培養後，それぞれの培地に発育した疑わしい集落は厚生省が示した検出方法（図6）に準じた手順で検査した。

なお，市場購入の野菜類（102検体）については検体25gにBPW 225mlを加えたものおよび野菜洗浄水（50検体）については，スパイラル法による一般細菌数の測定とEC培地による大腸菌検査を行った。

II. 成績

今回検査した食肉類333検体，野菜類191検体（市場購入品：102検体，小売店購入品：86検体），その他の食品22検体および環境水など149検体の計695検体からEHEC 0157は直接法，IMS法いずれの方法でもまったく分離されなかった（表24）。

調査した市場購入の野菜類の一般細菌数は全体で $<10^2\sim 10^7$ CFU/gであった。その分布は $<10^2$ CFU/g：2検体（2%）， 10^2 CFU/g：1検体（1%）， 10^3 CFU/g：7検体（6.9%）， 10^4 CFU/g：16検体（15.7%）， 10^5 CFU/g：24検体（23.5%）， 10^6 CFU/g：43検体（42.2%）， 10^7 CFU/g：9検体（8.8%）であり，約半数が 10^6 CFU/g以上で20種類の野菜に及んでいた。一般細菌数の少ない野菜類にはイチゴがあり，多い野菜類にはエシャレット，ミツバ，大葉，クレソンなどがあつた。また，大腸菌は10検体（9.8%）から分離され，分離された野菜として大葉，クレソン，ハウレン草，モヤシがあり，それらの一般細菌数はすべて 10^6 CFU/g以上であつ

た（表25）。

調査した5小学校における野菜洗浄水の一般細菌数は全体で $<10\sim 10^5$ CFU/mlであった。その分布は <10 CFU/g：4検体（8%）， 10^1 CFU/g：3検体（6%）， 10^2 CFU/ml：9検体（18%）， 10^3 CFU/ml：11検体（22%）， 10^4 CFU/ml：18検体（36%）， 10^5 CFU/ml：5検体（10%）であった。5小学校給食施設のうち，4施設は1日当り10,000食以上を提供しており，一般細菌数の平均は 10^4 CFU/mlであり，残り1施設（食数が620食）の一般細菌数は 10^3 CFU/mlであった。また，大腸菌はまったく分離されなかった（表26）。

Ⅲ．考察

わが国で発生したEHEC 0157による集団食中毒事件の原因食品としてカイワレ大根，メロン，レタスサラダ，ポテトサラダなどの野菜類が報告されている[17, 25]。また，家畜および食肉におけるEHEC 0157汚染状況についても数々の報告がある[11, 12, 18, 19, 30, 32, 33, 34]。さらに，アルファルファ，キャベツ，キュウリなどの生野菜，アップルサイダー，イクラなどの海産物といった今まであまり問題にしていなかった食品の危険性が指摘されている[20, 27]。

そこで，過去に集団食中毒事件の原因食品として報告のあった食肉類や野菜類などおよび環境水（海水浴場海水，と畜場などの排水，野菜洗浄水－5小学校給食施設）について静岡県内のEHEC 0157汚染実態を調査した。

国内におけるEHEC 0157の食肉類から分離は，小田ら[35]は市販食肉の157検体のうち6検体（3.8%）から分離したと報告して

いる。また、田中ら[40]は輸入食肉の分離率は1.9%であったと報告している。しかし、今回調査では、食肉類から1件も分離されなかった。また、野菜類、その他の食品、環境水などからの分離は、小田ら[35]の報告と同様に1件からも分離されなかった。

このことから静岡県に流通する食品や環境におけるEHEC 0157汚染は低率であると考えられる。しかし、食品の汚染菌量が少ない場合には、食品からの菌分離が困難であることは、食中毒事例においてその感染源や原因食品がなかなか解明されないことが示しており、迅速かつ確実に分離できる検査法の導入が必要と考えられた。

IV. 小括

1996年から2000年の間に、静岡県内で販売されている食肉類333検体、野菜類191検体その他の食品22検体および環境水など149検体の計695検体についてEHEC 0157検査を行ったが、EHEC 0157はすべての検体から分離されなかった。このことから県内に流通する食品や環境におけるEHEC 0157汚染は低率であると考えられた。しかし、食品の汚染菌量が少ない場合には、食品からの菌分離が困難であることから迅速かつ確実な菌分離法の確立が望まれた。

総括

腸管出血性大腸菌 0157:H7(-) (以下, EHEC 0157) 感染症は, わが国のみならず全世界的に重大な問題となっている。

本菌感染症の原因食品として, 牛肉類, 野菜類など報告されており, 感染源として牛の関わりが強く示唆されている。しかし, 食品から原因菌が分離されず原因が特定されない事件が多く, 食品などからの原因菌の確実な分離法の確立が望まれている。さらに, ヒトや牛からの分離株について疫学的解析を行うことは発生防止対策上で重要であり, 様々な疫学マーカーが検討されているが, ファージ型別については, わが国ではあまり行われていない。

そこで, 本研究では, 1.ヒトおよび牛由来 EHEC 0157の疫学マーカーの検討, 2.物理的条件下における EHEC 0157の増殖性の検討, 3.食品からの EHEC 0157分離法の検討, 4.野菜からの凍結損傷 EHEC 0157分離法の検討, 5.食品および環境水などの EHEC 0157の汚染状況調査を行い, 以下の成績を得た。

1.ヒトおよび牛由来 EHEC 0157の疫学マーカーの検討

今回の検討結果から, ヒトおよび牛由来株のファージ型は, 過去の内外の報告とほぼ一致していたが, ヒト由来株と牛由来株ではファージ型などの疫学マーカーに若干の差がみられ, ヒトへの感染源は牛のみではなく他の要因の関与も考えられた。また, 特定のファージ型と VT産生に関連性があるものが存在した。さらに, 同じ感染例からの分離株は同じファージ型であった。以上のことから, ファージ型は株間の識別が可能で他の疫学マーカー比べて簡便で有用であることが示唆された。

2.物理的条件下における EHEC 0157の増殖性の検討

検討した結果から, 有機酸などを食品に添加して, 食品の特性を失わない程度に pHを調整することにより食品の安全性が確保できるものと考えられた。また, EHEC 0157は海水中でも十分生存できることが判明し, 海産物も食中毒の原因食品になり得る可能性が示唆された。さらに, 食品からの EHEC 0157検査における増菌培養温度

は42±0.5℃が他の細菌の増殖をある程度抑制させることから適切な培養温度であった。

3. 食品からのEHEC 0157分離法の検討

IMS法は直接法より分離法において優れており、EHEC 0157の分離に有効な方法であった。分離培地として、セフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）やクモアガー 0157、BCM 0157などの酵素基質培地は分離率が高く、これらの培地の併用が必要であった。また、増菌培養地として、ノボピオシン加mEC培地（NmEC）が優れており、イムノキットのみでのスクリーニングは不適當であった。

4. 野菜からの凍結損傷EHEC 0157分離法の検討

野菜類から効率的に凍結損傷EHEC 0157の分離する方法として、ノボピオシンと胆汁酸を除いたmEC培地で25℃2時間培養後、これにノボピオシンと胆汁酸を加えて42℃18時間培養し、さらに、IMS法処理をしてCT-SMACに塗抹する方法が最も良かった。また、酵素基質培地など2種類以上の分離培地を併用することにより分離率を上げることが可能であった。

5. 食品、環境水などからのEHEC 0157分離状況

静岡県内における流通食品や環境におけるEHEC 0157汚染は低率であったが、食品の汚染菌量が少ない場合には、食品からの菌分離が困難であり、迅速かつ確実な菌分離法の確立が望まれた。

以上の調査・検討の結果から、ファージ型別は今回実施した他の疫学マーカーと比べて分離株間の識別が可能であり、わが国ではあまり行われていないがどこの施設でも実施可能な簡便で有用な方法であった。また、食品からの凍結損傷菌を含むEHEC 0157の分離法には、mEC培地などの抑制力のない培地で前増菌（25℃2時間）を行って菌を回復させた後に、ノボピオシンなどの抑制剤を加えて42℃18時間培養し、免疫磁気分離法で処理してからCT-SMACと酵素基質培地に塗抹する方法が有効な分離法であった。さらに、様々な物理的条件下での増殖性を知り、これらを活用することにより食品でのEHEC 0157制御が可能なが示唆された。

謝 辞

稿を終わるに当たり本研究の御指導と論文の御校閲を賜った麻布大学獣医学部光崎研一教授，福安嗣昭教授，木内明男教授，金内長司名誉教授に深甚なる謝意を表するとともに，フアージ型別検査法について御指導を賜った Drs. Johnson W., Khakhiria R., Ahmed R.ら (Laboratory Centre for Disease Control, Health Canada)，フアージ型別検査法導入について御配慮を賜った岩手大学品川邦汎教授，国立感染研究所渡辺治雄部長に感謝申し上げます。また，本研究に御支援と御協力を賜った東海大学短期大学部仁科徳啓教授，(株)中部衛生検査センター赤羽荘資部長，静岡県環境衛生科学研究所微生物部の皆様，全国の食肉衛生検査所の皆様に心からお礼を申し上げます。

参考文献

1. Ahmed R, Bopp A, Borczyk A and Kasatiya S: Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*; 155, 806-809, 1987.
2. Akiba M, Masuda T, Samashima T, Katsuda K and Nakasawa M: Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7(H-) isolates from cattle in Japan. *Epidemiol Infect*; 122, 337-341, 1999.
3. Akiba M, M, Rice DH, Davis MA, Masuda T, Sameshima T, Nakasawa M and Hancock DD: A comparison of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle in Japan and the USA by Molecular methods. *Epidemiol Infect*; 125, 221-224, 2000.
4. Alison DO, Thomas AL, Melinda EC, Sara WR and Samuel BF: *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in The United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *The Lancet*; i, 702, 1983.
5. Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J and Griffin PM: Laboratory Investigation of a Multistate Food-Borne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Phage Typing. *J Clin Microbiol*; 32, 3013-3017, 1994.

6. Bauer AL, Kirby WMM, Sherris JC and Truck M: Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*; 45, 493-496, 1966.
7. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S and Scheutz F : Prevalence and some properties verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*; 31, 2483-2488, 1993.
8. Caprioli A, Nigrelli A, Gatti R, ZaVanello M, Blando AM, Minelli F and Donelli G: Characterisation of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec*; 25, 323-324, 1993.
9. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan AT and Harkin MA: A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect*; 119, 245-250, 1997.
10. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan AT and Harkin MA: A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect*; 124, 207-213, 2000.
11. 藤田雅弘, 塩野雅孝, 森田幸雄, 鈴木宣夫, 井上ますお, 清水泰美, 加藤行男, 金内長司, 柴崎洋行: 牛ふん便からのベロ毒素産生性大腸菌の分離. *日獣会誌*; 47, 875-878, 1994.

12. 古畑勝則, 坂田慎治, 岡本倫明, 山本静雄, 本田政幸, 甲斐明美, 伊藤 武, 原 元宣, 田淵 清, 福山正文: 乳牛におけるVero毒素産生性大腸菌 (VTEC) の汚染状況および分離株の血清型. 感染症誌;73,445-450,1999.
13. 秦 昌紫子, 檀上博子, 檜原真弓, 吉村由美, 井上正直: 食品からの腸管出血性大腸菌 0157の検出法に関する検討. 日食微誌;14,169-173,1997.
14. 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌 0157感染症と食品. 食衛誌;38,275-285,1997.
15. Izumiya H, Masuda T, Ahmed R, Khakhria R, Wada A, Terashima J, Itoh K, Johnson WM, Konuma H, Shinagawa K, Tamura K and Watanabe H: Combined Use of Bacteriophage Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in the Epidemiological Analysis of Japanese isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. Microbiol Immunol;42,515-519, 1998.
16. 城 宏輔: 埼玉県某幼稚園で流行した *Escherichia coli* 0157:H7による出血性大腸炎. 臨床と微生物;18,457-465,1991.
17. 甲斐明美, 尾畑浩魅, 伊藤 武, 工藤泰雄: わが国におけるVero毒素産生性大腸菌の分離状況. 臨床と微生物;23,827-834, 1996.

18. 神田 隆, 塩沢寛治, 佐藤文一, 青木慶祐, 仁科徳啓: Vero毒素産生性 *Escherichia coli* 0157:H7の牛糞便からの分離.
日獣会誌;45,45-47,1992.
19. 神田 隆, 仁科徳啓, 岩田正明: と畜場搬入牛からのペロ毒素産生性大腸菌分離. 日獣会誌;48,978-980,1995.
20. 金子賢一: 生食用野菜及び果物が媒介食品となる感染症.
食衛誌;40,417-425,1999.
21. Khakhria R, Duck D and Lior H: Extended Phage-typing scheme for *Escherichia coli* 0157:H7. *Epidemiol Infect*; 105,511-520,1990.
22. 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, 神野逸郎, 石井経康, 下辻常介, 田村和満, 坂崎利一: *Escherichia coli* 0157:H7による出血性大腸炎の“さかのぼり”調査. *感染症誌*;59, 1056-1060,1985.
23. 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局結核感染症課: Vero毒素産生性大腸菌 1991~1995.11.病原微生物検出情報・月報;17,1-2,1996.
24. 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局結核感染症課: 腸管出血性大腸菌 0157:H7 1996.病原微生物検出情報・月報;17, 180-181,1996.

25. 国立感染症研究所，厚生省保健医療局結核感染症課：Vero毒素產生性大腸菌（腸管出血性大腸菌）感染症 1996～1997.6.
病原微生物検出情報・月報；18,153-154,1997
26. 国立感染症研究所，厚生省保健医療局結核感染症課：腸管出血性大腸菌（Vero毒素產生性大腸菌）感染症 1996～1998.4.
病原微生物検出情報・月報；19,122-123,1998.
27. 国立感染症研究所，厚生省保健医療局結核感染症課：腸管出血性大腸菌感染症 2000年3月現在. 病原微生物検出情報・月報；21,92-93,2000.
28. 国立感染症研究所，厚生省労働省健康局結核感染症課：腸管出血性大腸菌感染症 2001年4月現在. 病原微生物検出情報・月報；22,135-141,2001.
29. Konowalchuk J, Speirs JI and Stavric S: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*;18,775-779,1977.
30. 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：腸管出血性大腸菌に関する研究班「食肉の汚染実態に関する調査研究班」中間報告について. 1996.
31. Krause U, Thomson-Carter FM and Pennington TH: Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Comparison with That by

Bacteriophage Typing. J Clin Microbiol;34,959-961,1996.

32. 宮尾陽子，吉原雅子，鈴木輝康，白石義明，尾崎正美，木下正彦，甲斐明美，金子誠二，尾畑浩魅，伊藤 武：牛の糞便と枝肉および食肉市場の環境におけるベロ毒素産生性大腸菌の調査。日獣会誌；47,288-292,1994.
33. 宮尾陽子，宗林佳子，鈴木輝康，甲斐明美，伊藤 武，平山和宏，伊藤喜久治：牛の直腸および盲腸内容物からのベロ毒素産生性大腸菌分離。日獣会誌；49,46-51,1996.
34. 仁科徳啓，品川邦汎：家畜および食肉におけるVero毒素産生性大腸菌汚染。臨床と微生物；23,835-842,1996.
35. 小田隆弘，椿本 亮，財津修一，池田嘉子，樋脇 弘，金堂正也：市販食品からの志賀毒素産生性大腸菌の検出。日食微誌；14,169-173,1997.
36. 尾上洋一，古川一郎，寺西 大，長谷川幸江，森 實，小沼博隆：挽き肉からの*Escherichia coli* O157:H7の検出法の検討。食衛誌；38,185-189,1997.
37. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med;308, 681-685, 1983.

38. 坂崎利一：志賀毒素産生正性（腸管出血性）大腸菌－細菌学的性状，病原性および発生機序－．日食微誌，13.187-193,1997.
39. 鈴木忠義：－埼玉県浦和市S幼稚園－病原大腸菌による下痢症患者の集団発生の概要．公衆衛生情報；3,39-45,1991.
40. 田中 博，西内 力，近藤玲子，木村真里，目見田 清，菊地正健，塚本定三，奥 裕一，山崎伸二，竹田美文：Vero毒素産生性大腸菌（VTEC）の輸入食肉からの分離．感染症誌；65,175-180,1992.
41. Zadic PM, Chapman PA and Siddons CA: Use of tellulite for the selection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. J Med Microbiol; 39, 155-158, 1993.

Fundamental Studies of Epidemiological Analysis
on
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7(-)

Summary

Takashi Masuda

2001

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7(-):(EHEC O157) [also called Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*:(VTEC) or Shiga toxin-producing *Escherichia coli*:(STEC)] was first identified in an outbreak caused by undercooked hamburger at same fast food restaurant chain in Oregon and Michigan(USA) in 1982. EHEC O157 infection has become a worldwide serious problem.

In Japan, the first outbreak of this pathogen occurred at kindergarten in Urawa city(Saitama prefecture) in 1990. Since May 1996, outbreaks and sporadic cases have increased. In July 1996, big outbreaks(cases-5,727, deaths-3) occurred at primary school in Sakai city(Osaka prefecture). According to the reports by the Ministry of Health and Welfare, total reported cases of EHEC O157 infection numbered 9,451, hospitalized 1,808 and deaths 12 in 1996.

In USA, Canada, United Kingdom, EHEC O157 was isolated specimens of hamburger(minced beef), roast beef, raw milk, vegetables. Therefore, cattle are suspected to be one of the most significant sources of EHEC O157.

In Japan, EHEC O157 was isolated specimens of radish sprouts(Kaiware daikon), okaka salad, potato salad. In epidemiological investigation, beef have been suspected for the source of diffuse outbreaks. But rapid and accurate

methods for the isolation of EHEC O157 is not established yet. And also in Japan, EHEC O157 isolates were hardly analyzed by the phage typing scheme for epidemiological investigations.

This study has evaluated that phage types of EHEC O157 isolated from human and cattle, effects of pH, sodium chloride(NaCl) cocentration and temprature on the growth of EHEC O157, methods for isolation of EHEC O157 from commercial foods(meats and vegetables), methods for isolation of freeze-injured EHEC O157 from vegetables, and EHEC O157 contamination in food and water samples in Shizuoka prefecture.

1. Phage types of EHEC O157 isolated from human and cattle

From 1987 to 2000, a total of 545 EHEC O157 strains(170 from human feces and 375 from cattle sources) collected were submitted for phage typing and others(serotyping, VT typing, drug resistance).

Of these, 508 strains (162 from human and 346 from cattle) were phage typed. In human strains, 21 different phage types(PT1, 2, 4, 8, 14, 21, 23, 24, 28, 31, 32, 33, 34, 37, 41, 45, 49, 54, 56, 61, 72) were identified. And in cattle strains, 22 different phage types (PT1, 2, 4, 8, 14, 21, 23, 31, 32, 33, 34, 39, 40, 43,

45, 54, 56, 63, 67, 71, 74, 78) were also identified. Predominant phage types were PT2(16.5%), 32(14.7%), 4 and 21(10.6%) in human strains, PT34(18.1%), 54(16.3%), 39(10.9%), 23(8.8%) in cattle strains. Fourteen phage types(PT1, 2, 4, 8, 14, 21, 23, 31, 32, 33, 34, 45, 54, 56) were common in both sources. Phage types of strains isolated from the same outbreaks(group or family) were the same.

These result suggest that the phage typing scheme is useful in the studying causative factors in epidemiological investigations.

2. Effects of pH, sodium chloride cocentration(NaCl) and temprature on the growth of EHEC O157.

Effects of pH(3.0-11.0), NaCl(0.5-10.0%) and temperature (5.0-48.0 $^{\circ}$ C) in TSB on the growth of EHEC O157 were examined. Growth of EHEC O157 occurred $4.5 < \text{pH} < 9.0$ or 9.5 , between 25 $^{\circ}$ C and 44.5 $^{\circ}$ C. After 35 $^{\circ}$ C·24hr enrichment at 6.0% NaCl, there was no EHEC O157 detected.

These result suggest that EHEC O157 survive in sea water and seafoods except salmon roe result the food poisoning-causative foods.

EC medium for isolation of *Escherichia coli* are incubated at 44.5 $^{\circ}$ C as the official method by Ministry of Welfare. But in this temperature, EHEC O157 cannot be grown.

Therefore, for isolation of EHEC O157 from foods, 42°C enrichment in modified EC broth with novobiocin is the useful method.

3. Evaluation of methods for isolation EHEC O157 from commercial Foods(meats and vegetables)

This study has evaluated methods for isolation and identification of EHEC O157 inoculated into minced beef and radish sprouts(chilled and freezeed), i.e., 42°C·24hr enrichment in modified EC broth with novobiocin(NmEC), or 35°C·24hr enrichment in tryptic soy broth(TSB) followed by planting onto sorbitol MacConkey agar(SMAC), SMAC with cefixime-tellurite(CT-SMAC), CHROM ager O157(CHR), BCM 0157 agar(BCM), or immunomagnetic separation(IMS) followed by planting onto these four same media.

The isolation and identification of EHEC O157 was better on CT-SMAC than SMAC. CHR and BCM were as good as CT-SMAC. Using CT-SMAC and CHR or BCM together was of importance. Then 42°C·24hr enrichment in NmEC was better than 35°C·24hr enrichment in TSB.

These result suggest that using 42°C·24hr enrichment in NmEC, followed by IMS and inocuration onto CT-SMAC and CHR or BCM was the most useful method.

Also rapid immunochromatographic assay(Now O157, PATH-STIK, VIP) were of use for screening test of EHEC O157. But it was necessary to take care of using these assay because these assay somemtimes showed false-positive reaction.

4.Evaluation of methods for isolation of freeze-injured EHEC O157 from vegetables

This study has evaluated methods for isolation and idenfication of freeze-injured EHEC O157 inocurated into radish sprouts, strawberry, salted cabbage.

Incubation in mEC without novobiocin and bile salts at 25℃ for 2hr followed at 42℃ for 18hr with addition of novobiocin and bile salts gave good recovery of freeze-injured EHEC O157 from vegetables.

And the incubation at 25℃ for 2hr in non-selective broth was good for the recovery of freeze-injured EHEC O157 from freezen strawberry and salted cabbage.

5.EHEC O157 contamination in food and water samples in Shizuoka prefecture

From 1996 to 2000,EHEC O157 contamination in 546 food samples(333 meats, 191 vegetables and 22 others) and 149 water samples(sea, sewage, etc) in Shizuoka prefecture were

Investigated.

EHEC O157 was not detected from these 695 samples.

These results suggest that EHEC O157 contamination ratio of commercial foods in Shizuoka prefecture is low.

The results of this study obtained as follows:

1) The phage typing scheme is useful in the studying causative factors in epidemiological investigations. But the combined use of phage typing and molecular biological method (pulsed-field gel electrophoresis) can provide a more detailed classification of EHEC O157.

2) Effects of pH, NaCl and temperature on the growth of EHEC O157 were examined.

The results suggested the possibility for the control of growth of EHEC O157 in foods.

3) In evaluation of methods for isolation of EHEC O157 from commercial foods (meats and vegetables) and of freeze-inured EHEC O157 from vegetables, the useful method would be confirmed.

表 1. 下痢原性大腸菌の概要

項 目	腸管病原性大腸菌 (EPEC)	組織侵入性大腸菌 (EIEC)	毒素原性大腸菌 (ETEC)	腸管出血性大腸菌 (EHEC) Veroto毒素産生性大腸菌 (VTEC) 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)
感染部位	小 腸	大 腸	小 腸	大 腸
主症状	水様下痢, 腹痛	粘血便, 発熱 嘔吐, 腹痛	水様下痢 嘔吐, 腹痛	下痢 (水様→血性) 腹痛, 脳症 溶血性尿毒症症候群 (HUS)
病原機序	定着	組織侵入・増殖	エンテロトキシ (LT, ST) 定着因子	Veroto毒素 (VT) 志賀毒素 (Stx) 定着因子
潜伏時間	2~6日	2~3日	12~72時間	4~10日
罹患年齢	乳小児, 学童	全年齢層	乳小児 成人 (海外旅行者)	全年齢層
罹患病日	1~3週間	1~2週間	1週間	7~10日 (合併症で長期化)
感染様式	食品, 水, (接触)	食品, 水, (接触)	食品, 水, (接触)	食品, 接触, 水
主なO血清群	1, 18, 20, 26, 44, 55, 86 111, 114, 119, 125, 126 127, 128, 142, 146, 158	28, 29, 112, 121, 124 136, 143, 144, 152 159, 164, 167	6, 8, 11, 15, 20, 25 27, 78, 148, 159	157, 26, 111, 128, 145

表 2. EHEC 0157菌株を送付された食肉衛生検査所一覧

ブロック	都道府県	食肉衛生検査所名
北海道・東北	北海道 青森県 宮城県 秋田県 山形県 福島県	早来 十和田 仙北 中央 内陸 郡山
関東・甲信越	茨城県 栃木県 埼玉県 千葉県 東京都 神奈川県 新潟県 山梨県 長野県	県西, 県南, 県北 宇都宮市 中央食肉衛生センター 中央, 東総 芝浦 神奈川県, 横浜市 新潟県, 新潟市 山梨県 上田, 飯田, 松本
東海・北陸	岐阜県 愛知県 静岡県	岐阜県 愛知県, 名古屋市 東部, 西部, 静岡市, 浜松市
近畿	滋賀県 京都府 大阪府 兵庫県 奈良県	滋賀県 京都市, 京都府保健環境部生活衛生課 大阪市, 堺市環境保健局環境衛生課 兵庫県食肉衛生検査センター 奈良県食品衛生検査所
中国・四国	鳥取県 島根県 岡山県 広島県 香川県 高知県	鳥取県 島根県 岡山市 広島市 香川県 中央
九州・沖縄	福岡県 佐賀県 長崎県 大分県 宮崎県 鹿児島県 沖縄県	福岡県, 北九州市立食肉センター 佐賀県 諫早 大分県 日向 鹿屋, 鹿児島市 北部

表3-1. ファージ型別表1

型別用ファージ液番号

Phage type	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<CL	CL	SCL	<SCL	SCL	-	<SCL	CL	-	-	CL	CL	-	<SCL	CL	SCL
2	CL	CL	<CL	<<SCL / -	-	<SCL	<SCL	CL	OL	-	CL	CL	CL	-	CL	SCL
3	+++	-	SCL	-	-	-	<SCL	°	OL	OL	SCL	CL	-	-	SCL	SCL
4	CL	CL	SCL	<<SCL	<<SCL	-	<SCL	CL	OL	OL	CL	CL	-	<SCL	CL	<CL
5	-	-	SCL	SCL	-	SCL	SCL	-	OL	OL	<OL	<OL	CL	-	-	-
6	-	-	SCL	SCL	-	+++	SCL	-	-	-	SCL	-	SCL	-	-	-
7	-	-	SCL	SCL	SCL	-	-	-	-	-	SCL	-	-	SCL	-	-
8	CL	CL	<CL	<<SCL	SCL	SCL	SCL	CL	-	-	CL	CL	CL	<SCL	CL	<SCL
9	SCL	SCL	SCL	CL	SCL	+++	SCL	SCL	-	-	SCL	CL	-	-	-	CL
10	SCL	SCL	-	SCL	SCL	-	-	SCL	<<OL	<OL	+++	CL	-	CL	CL	CL
11	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	-	-	SCL	<<OL	-	SCL	SCL	-	SCL	SCL	SCL
12	SCL	SCL	SCL	CL	CL	-	SCL	SCL	-	-	+++	SCL	SCL	-	SCL	SCL
13	-	-	SCL	SCL	-	+++	+++	°	<<OL	<<OL	<<OL	-	SCL	-	-	-
14	CL	CL	SCL	<<SCL	<SCL	<SCL	<<SCL	CL	OL	OL	CL	CL	CL	<<SCL	CL	<CL
15	SCL	+++	SCL	SCL	-	+++	SCL	SCL	-	-	SCL	SCL	SCL	-	SCL	SCL
16	-	+++	SCL	+++	-	+++	<SCL	-	<OL	<OL	-	+++	SCL	-	-	-
17	-	+++	+++	+++	-	-	SCL	-	<OL	-	SCL	-	+++	-	-	-
18	-	-	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	<<OL	-	<CL	-	-	-
19	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-	-	<OL	+++	-	-	-	+++
20	-	-	+++	+++/-	-	++	-	-	-	-	-	-	<SCL	-	-	-
21	-	-	<<SCL	-	-	-	+++	°	<OL	<OL	P-°	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	+++	<OL	<OL	-	SCL	-	-	-	-
23	<CL	CL	SCL	-	-	-	SCL	CL	-	-	CL	<CL	-	-	CL	SCL
24	CL	CL	SCL	-	-	-	+++	CL	OL	-	CL	CL	-	-	CL	<<SCL
25	-	-	SCL	+++	-	<SCL	<SCL	°	-	-	<<OL	<<OL	CL	-	-	-
26	<CL	SCL	+++	+++	+++	-	+++	CL	<OL	<OL	CL	CL	-	-	CL	SCL
27	+++	<OL / -	SCL	+++/-	-	<<SCL	<<SCL	CL / -	+++	+++	CL	CL	CL	-	SCL	+++
28	°	-	SCL	°	-	-	<<SCL	-	<OL	<OL	<<OL°	<<OL°	-	-	-	-
29	<OL°	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++

CL : 融合溶菌
 SCL : 半融合溶菌
 OL : 半透明な溶菌
 +++ : 71 ~ 100個の溶菌斑
 ++ : 21 ~ 70個の溶菌斑
 + : 5 ~ 20個の溶菌斑
 - : 無反応
 0 : 溶菌斑を伴う抑制反応
 P : 5個以下の溶菌斑
 ± : -と+の間の反応

表 4. 静岡県内のヒトおよび牛からの EHEC 0157 の分離状況

年	ヒト由来			牛由来		合計
	集団感染例(事例数)	家族内感染例(事例数)	散发例	小計		
1987			1	1	1	2
1990			1	1	1	2
1991		4 (1)	5	9	9	9
1992		4 (2)	7	7	7	9
1993			2	2	2	7
1995			12 (4)	24	24	26
1996			25 (9)	43	43	36
1997	7 (1)		11	18	17	53
1998	2 (1)		10	26	19	35
1999			19	30	9	35
2000		14 (5)	16			30
合計	9 (2)	72 (26)	89	170	50	220

表 5. 牛からのブロック別のEHEC 0157の分離状況

ブロック名	分離株数
北海道・東北	20
北海道	2
青森県	4
宮城県	1
秋田県	10
山形県	1
福島県	2
関東・甲信越	165
茨城県	26
栃木県	2
群馬県	4
埼玉県	10
千葉県	7
東京都	48
神奈川県	22
新潟県	4
長野県	13
山梨県	29
東海・北陸	60
岐阜県	1
静岡県	50
愛知県	9
近畿	63
滋賀県	1
京都府	19
大阪府	33
兵庫県	2
奈良県	8
中国・四国	20
鳥取県	3
島根県	1
岡山県	2
広島県	6
香川県	6
高知県	2
九州・沖縄	47
福岡県	11
佐賀県	2
長崎県	11
大分県	10
宮崎県	1
鹿児島県	5
沖縄県	7
合計	375

表 6. 牛からの部位別の EHEC 0157 の分離状況

部 位	静岡県	静岡 の都道	以外 府県	合 計
糞 便	3 6	2 0 5		2 4 1
枝 肉	1 2	1 0 4		1 1 6
体 表		6		6
盲腸内容物		6		6
肝 臓		3		3
第四胃内容物	2			2
第一胃内容物			1	1
合 計	5 0	3 2 5		3 7 5

表 7. ヒトおよび牛由来 EHEC 0157 の血清型

血清型	ヒト由来株 (%)	牛由来株 (%)	合計 (%)
0157:H7	149 (87.6)	357 (95.2)	506 (92.8)
0157:H-	21 (12.4)	18 (4.8)	39 (7.2)
合計	170	375	545

表 8. ヒトおよび牛由来 EHEC 0157 の VT 型

VT 型	ヒト由来株 (%)	牛由来株 (%)	合計 (%)
VT1	1 (0.6)	24 (6.4)	25 (4.6)
VT2	65 (38.2)	218 (58.1)	283 (51.9)
VT1, 2	104 (61.2)	133 (35.5)	237 (43.5)
合計	170	375	545

表9. EHEC 0157の由来別薬剤耐性パターン

薬剤耐性パターン	ヒト由来 (135株)	牛由来 (232株)	合計 (367株)
SM	3	7	0
KM		3	3
CP		2	2
TC		2	2
SM, TC	11	27	8
ABPC, SM	2		2
ABPC, FOM	1		1
KM, SM		1	1
NA, SM, TC	10	2	2
ABPC, SM, TC		2	2
CP, SM, TC		1	1
ABPC, CP, KM, SM, TC		1	1
ABPC, KM, NA, SM, TC	1		1
合計 (%)	28 (20.7)	48 (20.7)	76 (20.7)

ABPC: アンピシリン
 FOM: ホスホマイシン
 NA: ナリジクス酸
 TC: テトラサイクリン

CP: クロラムフェニコール
 KM: カナマイシン
 SM: ストレプトマイシン

表10. 牛由来EHEC 0157の主なファージ型における薬剤耐性パターン

薬剤耐性パターン	主なファージ型				
	14型 (30株)	23型 (33株)	34型 (67株)	39型 (41株)	54型 (61株)
SM			4		3
KM		1		1	1
CP	1			1	
TC	1				1
SM, TC	5	10			4
KM, SM					1
ABPC, SM, TC					2
NA, SM, TC					1
CP, SM, TC					1
ABPC, CP, KM, SM, TC					1
合計 (%)	7 (23.3)	14 (42.4)	4 (6.0)	2 (4.9)	13 (21.3)

ABPC: アンピシリン
 NA: ナリジククス酸
 CP: クロラムフェニコール
 SM: ストレプトマイシン
 KM: カナマイシン
 TC: テトラサイクリン

表 11. ヒトおよび牛由来 EHEC 0157 の ファージ型および VT 型

ファージ型	ヒト由来株 (%)		VT 型		牛由来株 (%)		VT 型		合計
	VT1 産生	VT2 産生	VT1 産生	VT2 産生	VT1 産生	VT2 産生	VT1 産生	VT2 産生	
1	5	(2.9)	1	4	15	(4.0)	5	1	20
2	28	(16.5)			7	(1.9)		7	35
4	18	(10.6)		13	8	(2.1)		2	26
8	15	(8.9)		5	21	(5.6)		9	26
14	11	(6.5)		9	30	(8.0)		14	41
21	18	(10.6)		18	3	(0.8)		3	41
23	7	(4.1)		6	33	(8.8)		1	10
24	2	(1.2)		2					4
28	2	(1.2)		2					2
31	2	(1.2)		2					2
32	25	(14.7)		25	2	(0.5)		1	4
33	3	(1.8)		3	15	(4.0)		5	40
34	11	(6.5)		3	1	(0.3)		10	4
37	3	(1.8)			68	(18.1)		68	79
39			11						3
40	1	(0.6)			41	(10.9)		2	41
41					5	(1.3)		39	15
43	5	(2.9)			9	(2.4)		2	19
45	5	(2.9)		3	5	(1.3)		7	10
49	6	(3.5)			61	(16.3)		32	57
54	2	(1.2)		1	2	(0.5)		1	4
56	2	(1.2)		1	1	(0.3)		1	2
61					1	(0.3)		2	1
63	1	(0.6)		1	10	(2.7)		9	10
67	4	(2.4)			2	(0.5)		2	2
71					29	(7.7)		14	10
72					2	(0.5)		14	2
74					10	(2.7)		9	10
78	4	(2.4)		3	2	(0.5)		2	2
非定検	4	(2.4)		1	1	(0.3)		1	1
未検査	4	(2.4)		3	29	(7.7)		14	33
合計	170		1	104	375		24	218	545

表12. 静岡県内の集団および家族内感染例におけるEHEC 0157のファージ型

ファージ型	事例数 (分離株数)					合計
	1991年	1992年	1996年	1997年	1998年	
1	1 (4)		1 (2)	1 (4)	1 (3)	1 (3)
2			1 (5)			1 (3)
4					1 (3)	1 (2)
8						1 (2)
14		1 (2)	1 (3)		1 (2)*	1 (2)
21			1 (2)		2 (5)	3 (2)
23						2 (5)
24						1 (7)
32				7 (19)*		1 (7)
34				1 (7)		1 (7)
37		1 (2)		1 (2)		1 (2)
45						1 (5)
49					1 (2)	1 (2)
54						1 (2)
56						1 (2)
合計	1 (4)	2 (4)	4 (12)	10 (32)	3 (8)	3 (7)
						5 (14)
						28 (81)

* : 集団感染例

表13. 静岡県内のヒト由来EHEC 0157のファージ型の年次推移

ファージ型	1987年	90年	91年	92年	93年	95年	96年	97年	98年	99年	2000年	合計
1			4		1		5	5	1		4	5
2			1				7		1	8	3	28
4			1	1					1	5	3	11
8							1	2	1	3	3	11
14			1	1	2	1	8		6	3	1	18
21				3						1		7
23							2					2
24								1				2
28			1							1		2
31					1							2
32								23	1	1		25
33							1	8	1		1	11
34												3
37						1						1
41				1				2		1		5
45			1								5	6
49			1						1	3		5
54								1				6
56											2	2
61											1	1
72								1				4
非定型		1			2						4	4
未定検					1							1
合計	1	1	9	9	7	2	24	43	18	26	30	170

表14. 牛由来EHEC 0157のファージ型ブロック別の分離状況

ファージ型	ブロック						合 計
	北海道 ・東北	関東 ・甲信越	東海・ 北陸	近 畿	中国・ 四国	九州・ 沖縄	
1		10	1	3	1		15
2	2	3		1		1	7
4	2	3		2		1	8
8		13	4	3		1	21
14		9	6	5	1	9	30
21		2		1			3
23		11	8	5		9	33
31		2					2
32		4	2	8	1		15
33			1				1
34	2	24	20	9	3	10	68
39	5	19	6	6	1	4	41
40	4	1					5
43		7	1		1		9
45	2	1		1	1		5
54	1	28	7	15	2	8	61
56		2					2
63			1				1
67		4				1	5
71		2					2
74		7	1	1	1		10
78					2		2
非定型	2	13	2	3	6	3	29
合 計	20	165	60	63	20	47	375

表15. 牛由来EHEC 0157のファージ型の年次推移

ファージ型	1987年	1990年	1996年	1997年	1998年	1999年	合 計
1			3	3	9		15
2			5	1	1		7
4			1	1	5	1	8
8			12	2	6	1	21
14			9	9	12		30
21			1	1	1		3
23			14	7	12		33
31			1	1			2
32			5	1	9		15
33					1		1
34	1		18	9	30	10	68
39		1	20		17	3	41
40			5				5
43				1	8		9
45			2	1	2		5
54			22	14	24	1	61
56				2			2
63				1			1
67			1	3	1		5
71				2			2
74			1		9		10
78					2		2
非定型			5	8	14	2	29
合 計	1	1	125	67	163	18	375

表16. 培地のpHにおけるEHEC 0157の増殖性

菌株	11.0	10.5	10.0	9.5	9.0	8.5	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0
EDL株	-	-	-	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
散発下痢症 患者由来株	-	-	±	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

表19. EHEC 0157接種検体における直接法と免疫磁気分離法による分離の比較

試験	検体名	検体数	接種菌量 [CFU/g]	分離数 (%)	
				免疫磁気分離法	直接法
1	牛挽肉 (冷蔵)	5	5.6	5 (100)	5 (100)
		5	1.0	5 (100)	5 (100)
		5	0	0	0
	牛挽肉 (冷凍)	5	5.6	5 (100)	5 (100)
		5	1.0	5 (100)	5 (100)
		5	0	0	0
2	カイワレ大根 (冷蔵)	5	0.8	5 (100)	5 (100)
		5	0.1	1 (20)	0
		5	0	0	0
	カイワレ大根 (冷凍)	5	0.8	2 (40)	2 (40)
		5	0.1	0	0
		5	0	0	0
3	牛挽肉 (冷蔵)	10	0.6	5 (50)	3 (30)
		10	0	2 (20)	0
	カイワレ大根 (冷蔵)	10	1.1	5 (50)	3 (30)
		10	0	1 (10)	0

表20. EHEC0157接種検体における分離培地による分離の比較

試験	検体名	検体数	分 離 数 (%)			
			SMAC	CT-SMAC	C H R	B C M
1	牛挽肉	40	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)
2	カイワレ大根	40	8 (20)	14 (35)	11 (27.5)	10 (25)
3	牛挽肉	20	7 (35)	8 (40)	8 (40)	NT
	カイワレ大根	20	6 (30)	7 (35)	6 (30)	NT

SMAC：ソルビトールマッコンキー培地

CT-SMAC：セフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地

C H R：クロモアガー 0157

B C M：BCM 0157

NT：未実施

表21. EHEC 0157接種検体における増菌培地による比較

試験	検体名	接種菌数	処理方法	検体数	増菌培地 (%)	
					NmEC	TSB
3	牛挽肉	0.6CFU/g	免疫磁気分離法	5	5 (100)	0
			直接法	5	3 (60)	0
	カイワレ大根	1.1CFU/g	免疫磁気分離法	5	5 (100)	0
			直接法	5	3 (60)	0

NmEC：ノボピオシン加mEC培地

TSB：トリプトソイブロス

表22. EHEC 0157接種検体におけるイムノキットによる分離の比較

試験	検体名	検体数	接種菌量 [CFU/g]	イムノキット (%)		
				NOW 0157	PATH-STIK	VIP
1	牛挽肉 (冷蔵)	5	5.6	5 (100)	5 (100)	5 (100)
		5	1.0	5 (100)	5 (100)	5 (100)
		5	0	0	0	3 (60)
	牛挽肉 (冷凍)	5	5.6	5 (100)	5 (100)	5 (100)
		5	1.0	5 (100)	5 (100)	5 (100)
		5	0	0	0	2 (40)
2	カイワレ大根 (冷蔵)	5	0.8	4 (80)	4 (80)	4 (80)
		5	0.1	1 (20)	1 (20)	1 (20)
		5	0	0	0	0
	カイワレ大根 (冷凍)	5	0.8	2 (40)	2 (40)	2 (40)
		5	0.1	0	0	0
		5	0	0	0	0

表23. 野菜からの凍結損傷 EHEC 0157の分離状況

増菌培地	直 接 法						免 疫 磁 気 分 離 法							
	野菜名		カイワレ大根		イチゴ		塩キヤベツ		カイワレ大根		イチゴ		塩キヤベツ	
	分 離 培 地	集 落 数	CT-SMAC	CHR	CT-SMAC	CHR	CT-SMAC	CHR	CT-SMAC	CHR	CT-SMAC	CHR	CT-SMAC	CHR
mEC (N.B)	-	(0)	1	0	9	9	5	6	1	0	10	9	8	4
	+	(1~10)					1	4					1	2
	++	(10~50)												2
	+++	(50以上)			1	1	4					1	1	4
	-	(0)	1	0	9	9	6	7	1	0	10	9	9	6
TSB (N.B)	+	(1~10)					2							
	++	(10~50)					1							
	+++	(50以上)			1	1	4				1	1	4	4
	-	(0)	1	0	9	9	6	7	1	0	10	9	9	6
	+	(1~10)						2						

CT-SMAC: セフイキシム亜テレル酸カリウム加ソルピトールマッコンキー培地

CHR: クロモアガー 0157

TSB: トリブチケースソイブロス

N.B: Novobiocin+Bile salts

表24. 食肉類, 野菜類, その他の食品および環境水などからのEHEC 0157の分離状況

検体の種類	品 名	検体数	陽性数
食肉類	牛 肉	122	0
	牛レバー・タン・ホルモン	9	0
	牛・豚(挽肉)	2	0
	豚 肉	68	0
	豚レバー	4	0
	鶏 肉	124	0
	ソーセージ	3	0
小 計		333	0
野菜類	レタス	15	0
	ミツバ, キャベツ	26 (各13)	0
	ハウレン草	10	0
	モヤシ	9	0
	カイワレ	8	0
	タマネギ, 大葉	14 (各 7)	0
	クレソン, サラダ菜, サンチュ, トマト		
	エシャレット, セロリ, パセリ	42 (各 6)	0
	チンゲン菜, 白菜, カブ, イチゴ, 山芋		
	キュウリ	30 (各 5)	0
	モロヘイヤ, つまみ菜, 春菊, ズッキーニ		
	マッシュルーム	20 (各 4)	0
	オクラ, 食用菊, ルッコラ	9 (各 3)	0
	アルファルファ, チシャ菜, 豆苗	6 (各 2)	0
つるむらさき, 野菜炒め	2 (各 1)	0	
小 計		191	0
その他の食品	こんにやく	9	0
	豆 腐	7	0
	魚肉練製品	3	0
	まぐろ	3	0
小 計		22	0
環境水など	海水浴場海水	55	0
	下水処理場下水	24	0
	と畜場排水	4	0
	食鳥処理場排水	8	0
	鰻処理場排水	4	0
	尿尿処理場排水	4	0
	野菜洗浄水		
	キャベツ	8	0
	キュウリ	6	0
	ハウレン草, 白菜, タマネギ	15 (各 5)	0
	ニンジン	4	0
	レタス, 大根	6 (各 3)	0
	ネギ, ジャガイモ	4 (各 2)	0
	リンゴ, キウイ, イチゴ, ゴボウ		
ネーブル, パセリ, パナナ	7 (各 1)	0	
小 計		149	0
合 計		695	0

表25. 野菜類（市場購入）の一般細菌数および大腸菌

一般細菌数 (CFU/g)	野菜数	大腸菌陽性数	野菜名
< 10 ²	2	0	
10 ²	1	0	
10 ³	7	0	
10 ⁴	16	0	
10 ⁵	24	0	
10 ⁶	43	8	大葉-3, クレソン-3 ハウレン草-2
10 ⁷	9	2	大葉-1, モヤシ-1
合計	102	10	

表26. 学校給食施設における野菜洗浄水の
一般細菌数および大腸菌

一般細菌数 (CFU/ml)	野菜洗浄水数	大腸菌陽性数
< 10	4	0
10 ¹	3	0
10 ²	9	0
10 ³	11	0
10 ⁴	18	0
10 ⁵	5	0
合計	50	0

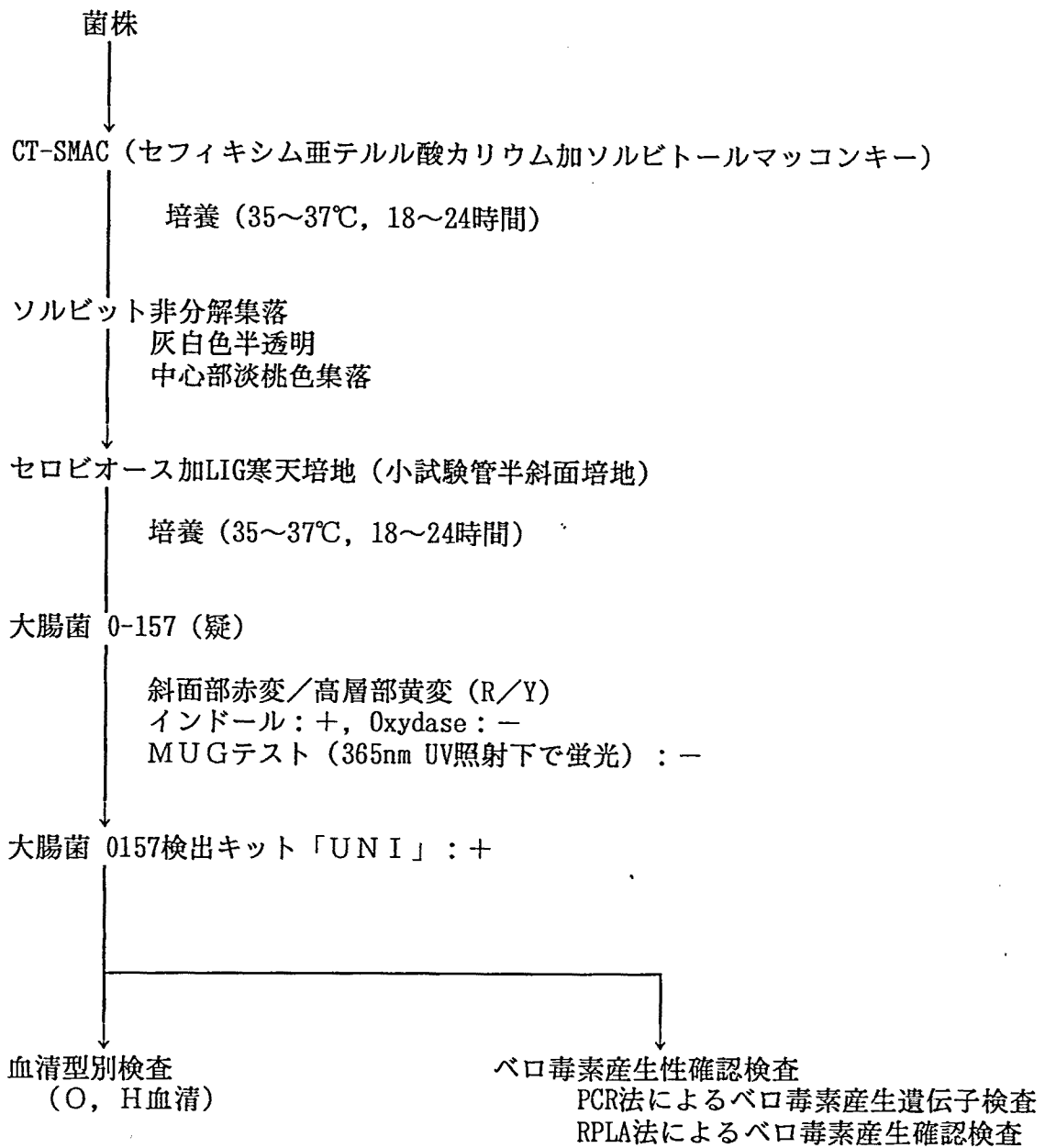


図 1. EHEC 0157同定検査手順

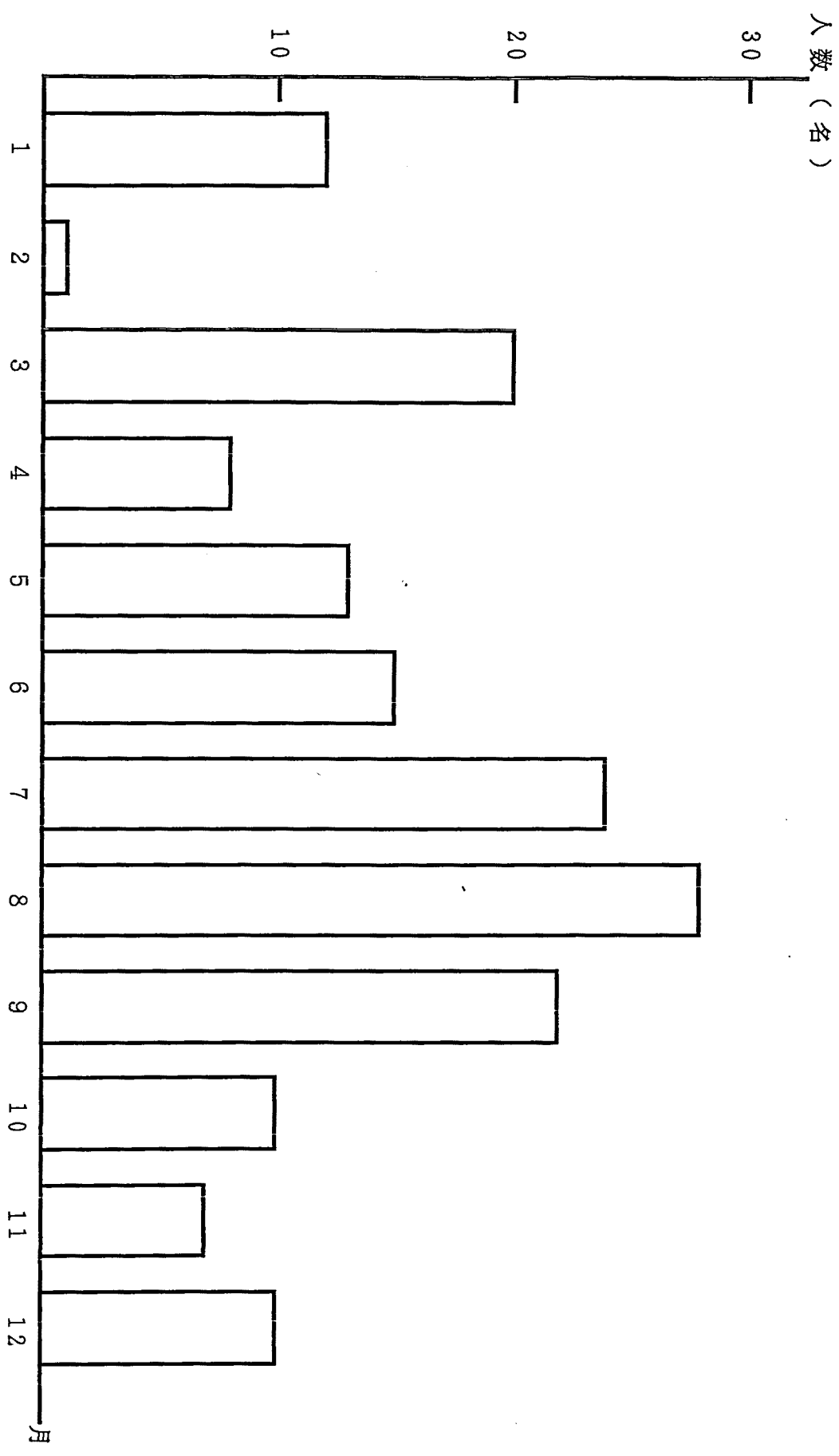


図 2. 静岡県における EHEC 0157 患者 月別 発生 状況 (1987 ~ 2000 年)

人数 (名)

□ : 男
□ : 女

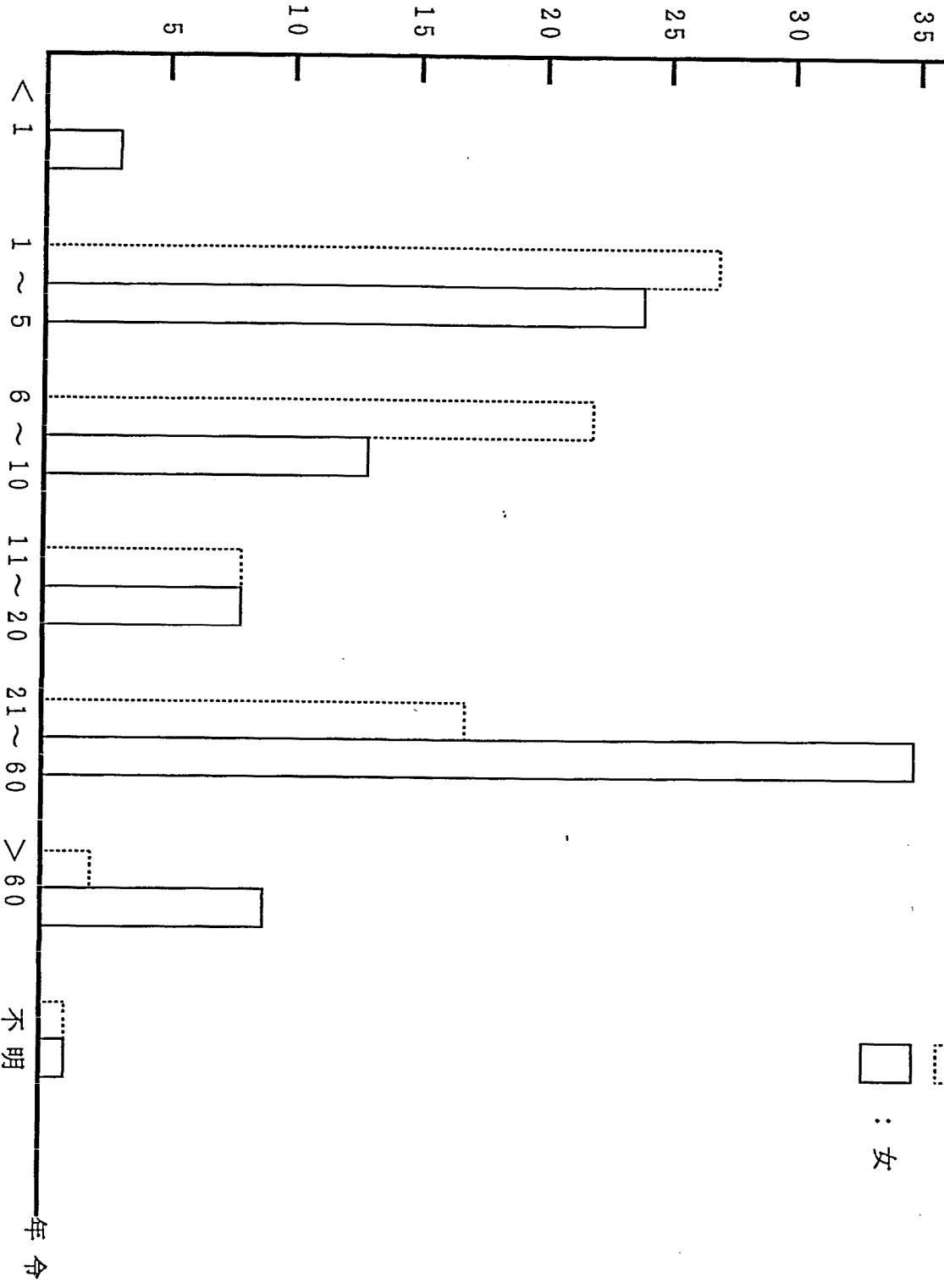


図 3. 静岡県における EHEC O157 患者の年齢・性別分布 (1987~2000年)

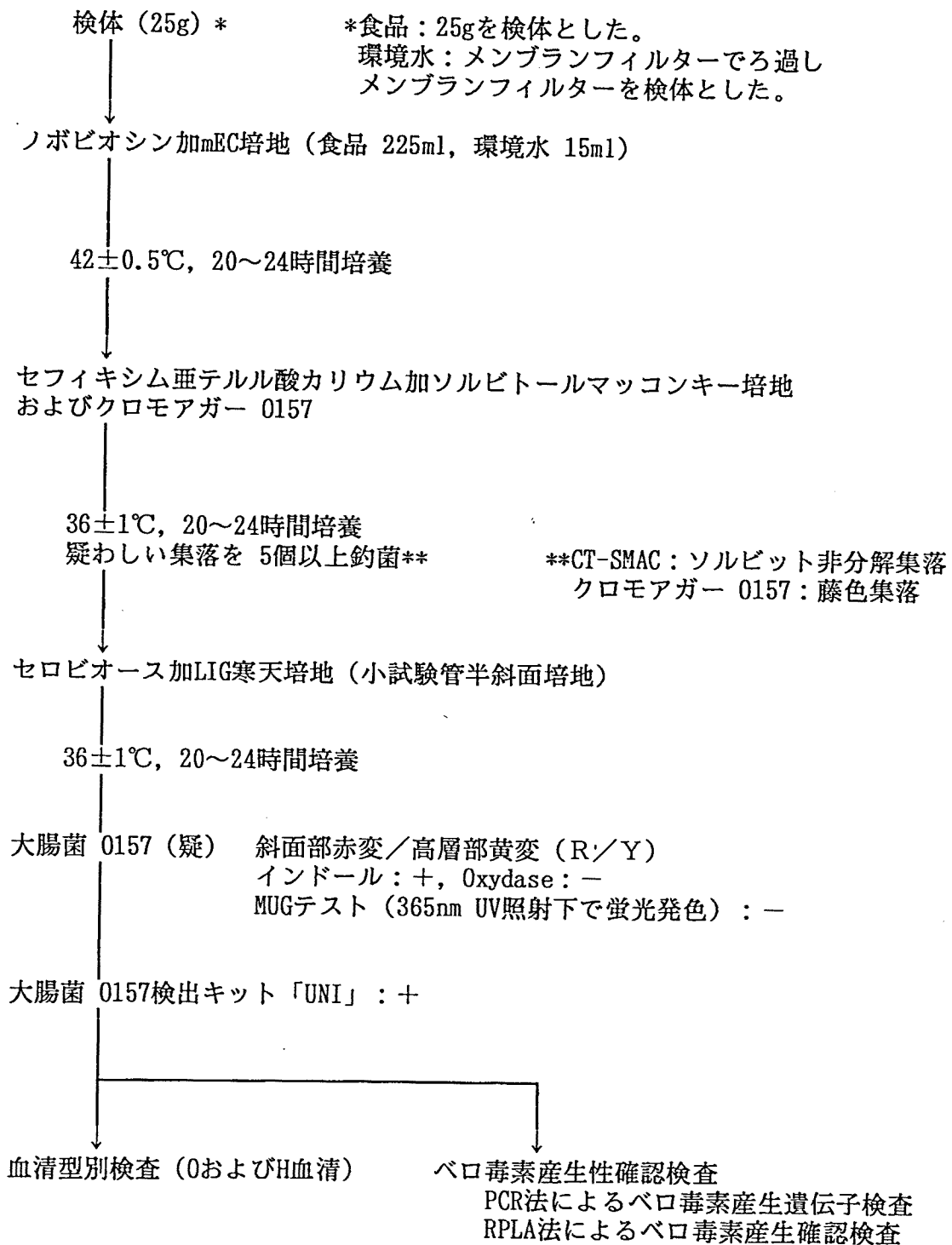


図 4. 小売店で購入した食品および環境水からのEHEC 0157検査手順

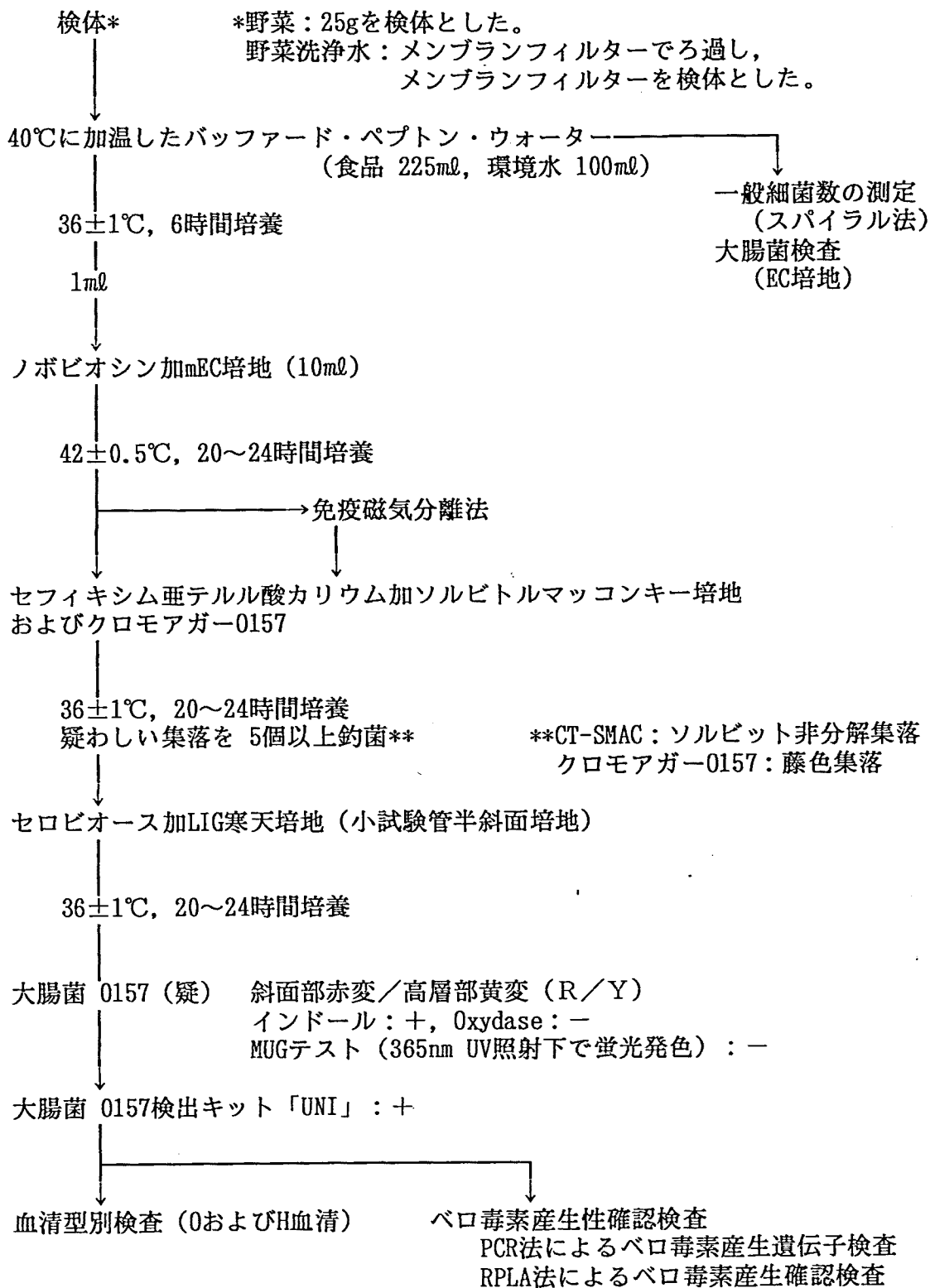


図 5. 市場購入野菜および野菜洗浄水からのEHEC 0157検査手順

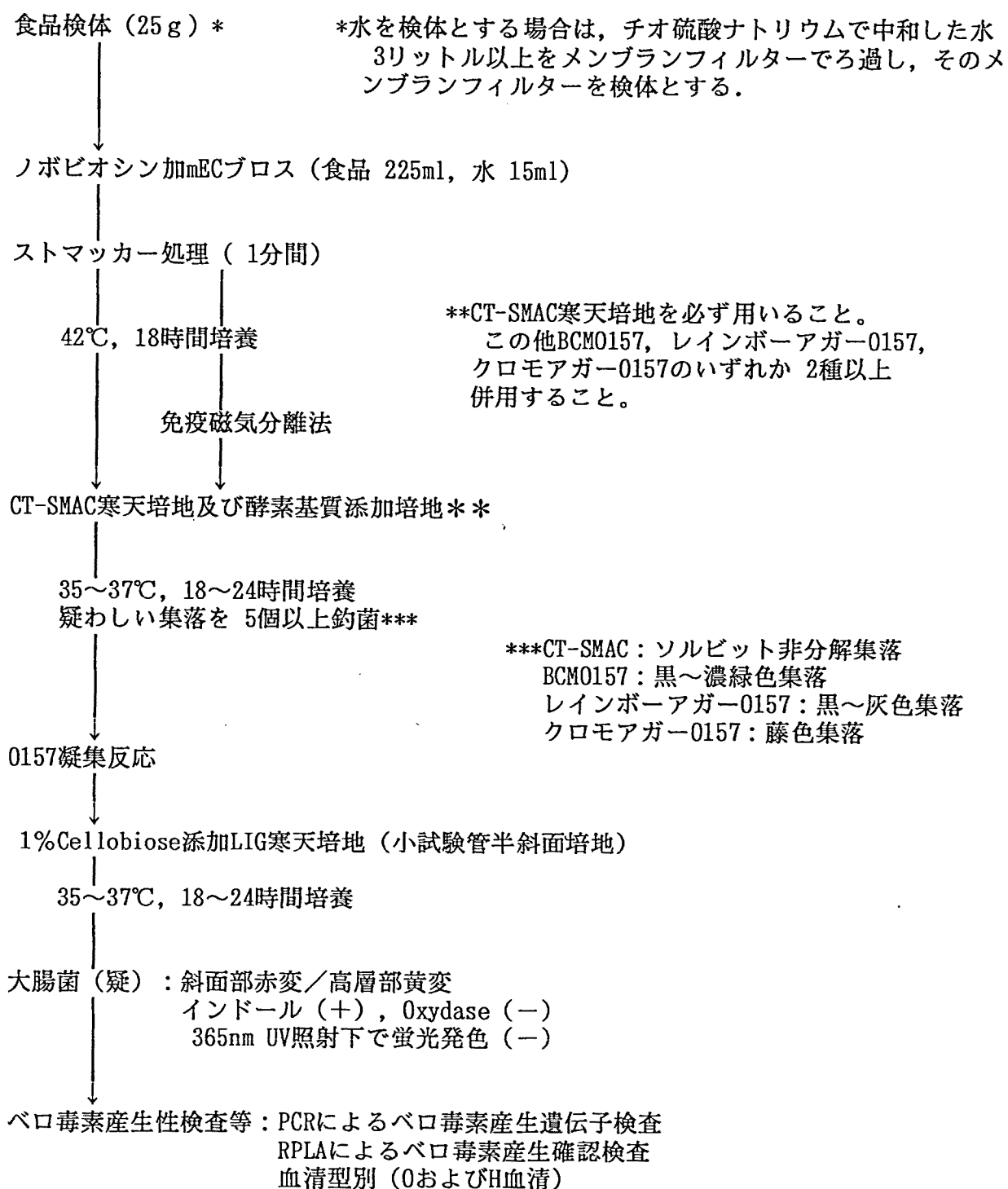


図 6. 食品からの腸管出血性大腸菌 0157検出方法
 (平成9年7月4日 衛食第207号, 衛乳第199号)