

## 12 牛糞堆肥及びその原料中の腸管出血性大腸菌 O157

—実態調査—

秋元里乃<sup>1</sup>, 中村志野<sup>1</sup>, 阿部文浩<sup>1</sup>, 大木純<sup>2</sup>

キーワード 牛糞, 堆肥, O157, PCR, ベロ毒素産生遺伝子

### 1. はじめに

近年, 夏季に人への食中毒発症例が多発している腸管出血性(ベロ毒素産生性)大腸菌 O157 (Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157(以下 VTEC O157))は, 牛などの反芻動物の腸管内に存在する細菌で人への強い感染力と病原性を有しており, 他の食中毒原因菌が 1 万個体以上で発症するのに対してわずか 100 個体程度でも発症するといわれている<sup>1, 2)</sup>. 牛糞便中で VTEC O157 は長期に生存可能であることも報告されている<sup>3)</sup>. また, 大腸菌 O26 及び O111 などの血清型の異なる大腸菌も食中毒原因菌として多く報告されている<sup>1)</sup>. そのため, 牛糞を原料とした堆肥が VTEC O157 等に汚染されていた場合, 食品に付着し食中毒の原因となることと, 汚染肥料散布時の吸入により感染すること等が危惧される.

堆肥生産過程における大腸菌群の消長についての研究<sup>4, 5)</sup>はこれまでも報告されており, 堆肥生産時に留意すべき病原菌として, 大腸菌, サルモネラ菌, リステリア・モノサイトゲネス等の細菌に対する対策<sup>6)</sup>が指針として出されている. しかし生産現場における牛糞堆肥中の VTEC O157 について全国的な実態調査が行われたことは無く, 牛糞堆肥がどれだけ汚染されているかについては十分には把握されていなかった.

この様な状況から, 2001 年から 2004 年にかけて独立行政法人肥飼料検査所(現在, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター)において検出感度試験を行うと共に, 牛糞堆肥中の VTEC O157 等の汚染状況について調査し, また牛糞に副資材(敷き藁・もみ殻等)が混ざり, まだ発酵していない段階で VTEC O157 等が含有されているかについても調べ, その現状を把握すると共に, 牛糞堆肥の生産方法について聞き取り調査をした.

その際, 感度試験方法及び同定方法については既往の方法<sup>7~10)</sup>を参考にした.

なお, 本研究は独立行政法人肥飼料検査所中期計画における「病原性大腸菌 O-157 含有実態調査」として行われ, 既に概要を FAMIC ホームページ等で報告済みであるが, 近年においても食中毒事件が発生し, 牛糞堆肥中の O157 について注目を浴びていることから, 再度とりまとめ直して報告する.

### 2. 材料及び方法

#### 1) 試料の収集

2001 年 7 月から 2004 年 8 月にかけて, 全国の 85 堆肥生産事業場より採取した牛糞堆肥及びその原料について調査を実施した(2001 年の調査は牛糞堆肥のみ). 夏季調査時期については 60 事業場を選定し, 冬季は 25 事業場を選定した.

各堆肥及びその原料について一事業場当たり堆積物の内部 3 ヶ所(2001 年については 5 ヶ所)から, アルコール消毒したスコップ及び滅菌済み手袋を用い, 滅菌済みサンプリングバックにサンプリングをした. 試料は冷

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

蔵状態で当検査所本部に送付し、実験に用いるまで冷蔵庫(4℃)で保管した。

VTEC O157, O26 及び O111 についての同定操作は、試料が当検査所に到着した後3日以内に開始し、それぞれのサンプリングバック毎に行った。

なお、2002年から2004年においては、試料を採取した各生産事業場の生産方法(原料の内容・発酵温度・切り返し方法等)についての聞き取り調査を実施した。

## 2) 試験方法の性能確認(牛糞堆肥及びその原料への適用)

VTEC O157 の同定は、「飼料分析基準<sup>7, 8, 10)</sup>」及び「腸管出血性大腸菌 O157 の標準検査方法について<sup>9)</sup>」を参考に、一部変更して以下のとおり行った。

### (1) 供試試料

国内の牛糞堆肥製造事業場の未発酵品(原料)から3)において分離した VTEC O157 菌株を 100 mL トリプトソイブイオン培地(栄研化学製)に 1 エーゼ分添加し、37℃において18時間静置培養し、その後2時間振とう培養した。

牛糞堆肥中の VTEC O157 については、堆肥生産時に加温され損傷を受けており、増菌培養及び選択増菌培養時に損傷菌の増殖が抑制されている可能性が考えられたため、牛糞堆肥及びその原料に培養した VTEC O157 を添加するに当たり、牛糞堆肥に添加する VTEC O157 については加熱損傷菌を作成して使用することとし、培養液 1 mL を 1.5 mL 容プラスチック製遠心沈殿管に分取し、57℃の温浴上にて10分間加熱処理し、その後急冷した。培養菌液及び加熱損傷菌液は滅菌水に懸濁させた後、段階的に $\times 10^{10}$ まで滅菌水で希釈した。希釈した菌液の菌濃度は Heart Infusion 寒天培地(Becton Dickinson 製)を用いて3枚並行で培養を行い、計測値を平均して菌濃度を算出した。

PCR 法によりベロ毒素産生遺伝子(VT 遺伝子)陰性を確認している牛糞堆肥及びその原料 15 g を培養バックに取り、希釈菌液を約 1 CFU $\sim$ 10,000 CFU(colony forming unit)  $\cdot$  g<sup>-1</sup>となるように添加(牛糞堆肥については加熱損傷菌を添加)し、培養を行った。培養バックに緩衝ペプトン水<sup>7)</sup> 150 mL を加えて 37℃で18 $\sim$ 24時間前増菌培養した。この培養液 10 mL をノボビオシン添加 mEC 培地(栄研化学製) 100 mL に加え、42℃で18 $\sim$ 24時間培養した。

なお、検出感度は試料の性状により異なってくると考えられたため、異なる3ヶ所の生産事業場からの牛糞堆肥及びその原料を用いて試験した。

### (2) PCR 法における VTEC O157 の検出感度

各増菌培養液をプラスチック製遠心沈殿管(容量 1.5 mL)に入れ、9,000 $\times$ g で5分間遠心分離し、上澄み液の除去と生理食塩水による洗浄の操作を2回繰り返す。滅菌水 1 mL で懸濁した後に 98℃の温浴上で5分間 DNA の熱抽出を行った。精製した液の 2 及び 10  $\mu$ L を O157 PCR Screening Kit(宝酒造製)に加えて PCR 法を行った。反応条件は熱変性 94℃で1分、アニーリング 55℃で1分、伸長反応 72℃で1分の3ステップを1サイクルとして35サイクル行った。PCR 法の終了した反応液 10  $\mu$ L に泳動用色素溶液を加えて2%アガロースゲルに負荷し、電気泳動後に臭化エチジウム溶液に浸漬し、UV 照射下で VT 遺伝子の有無を確認した。

### (3) 免疫磁気ビーズ集菌法による VTEC O157 の検出感度

各培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管(容量 1.5 mL)に入れ、抗大腸菌 O157 ポリクロナール抗体で被覆された免疫磁気ビーズ(Dynabeads anti-E.coli O157, Dynal 製) 20  $\mu$ L と穏やかに混合した後、磁性ラック

(MPC-M, Dynal 製)を用いて集菌し上澄み液を除去した。次に PBS による洗浄と磁性ラックによる集菌, 上澄み液除去の操作を 3 回行った。沈渣に PBS 200  $\mu$ L を加えて懸濁させた。

この集菌液 50  $\mu$ L ずつを, クロモアガーO157 寒天培地 (CHROMagar 製), BCM O157 寒天培地 (栄研化学製), 及びレインボーアガーO157 寒天培地 (Biolog 製) に画線塗抹し, 37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。これらの培地表面のいずれかにおいて VTEC O157 と疑われる集落を確認出来た場合, その集落について VT 遺伝子陽性であるかを PCR 法により確認し, 「検出可能」とした。

### 3) 実態調査のための試験方法

#### (1) VTEC O157, O26 及び O111 の分離

冷蔵保存していた原料及び牛糞堆肥試料 15 g を培養バックに取り, 緩衝ペプトン水 150 mL を加えて 37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間増菌培養した。この培養液 10 mL をノボピオシン添加 mEC 培地 100 mL に加え, 42  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。

この試料培養液について感度試験と同様の PCR 法操作により VT 遺伝子の有無を確認した。

PCR 法はスクリーニング手段として用い, VT 遺伝子を示すバンドが得られなかった場合には VT 遺伝子陰性, すなわち VTECO157 を含むベロ毒素産生大腸菌陰性 (VTEC 陰性) として試験を終了し, VT 遺伝子陽性であった場合のみ, 引き続き免疫磁気ビーズ法による VTEC O157 の選択的集菌と純粋分離を行った。

VT 遺伝子陽性であった試料培養液 1 mL をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 感度試験と同様に免疫磁気ビーズを用いて選択的に VTEC O157 を集菌し, クロモアガーO157 寒天培地, BCM O157 寒天培地及びレインボーアガーO157 寒天培地に画線塗抹し, 37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。更に VTEC O26 及び O111 を釣菌する目的で, 試料培養液をレインボーアガーO157 に直接塗抹して分離培養を行った。

これらの培地表面において VTEC O157, O26 及び O111 と疑われる集落を釣菌し, 同種の平板培地に画線塗抹し, 37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養して純粋分離した。

#### (2) VTEC O157, O26 及び O111 の確認

純粋分離した集落を, CLIG 寒天培地 (極東製薬工業製), SIM 寒天培地 (栄研化学製), 及びシモンズクエン酸ナトリウム培地 (栄研化学製) に接種し, 37  $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。VTEC O157 等の多くが示す生化学的性状<sup>10)</sup>をこれらの培地で確認し, CLIG 寒天培地において乳糖発酵 (+), セロビオース分解能 (-),  $\beta$ -グルクロニターゼ活性 (-) であり, SIM 寒天培地において硫化水素産生性 (-), インドール (+), IPA 反応 (-) であり, シモンズクエン酸ナトリウム培地においてクエン酸利用能 (-) の条件に合致した VTEC O157 及びその他の VTEC と疑われる菌株について, 抗原の確認を行った。

VTEC と疑われる菌株を Heart Infusion 寒天培地で 37  $^{\circ}$ C, 24 時間培養し, 1 mL の生理食塩水に 1 ユーゼ分の菌体を懸濁して 60 分間煮沸した。その加熱処理菌を, VTEC O157, O26, O111 血清 (デンカ生研) とそれぞれスライドガラス上で混合し, 1 分以内に強い凝集を示したものについて陽性とし, 更にこの菌株が VT 遺伝子陽性であるかを PCR 法により確認した。

### 4) 牛糞堆肥及びその原料の性状

VTEC O157 等の生存条件に関連するファクターとして, 堆肥及びその原料の性状を示すと考えられる水分活性, 含水率及び pH を測定した。水分活性はロトロニック水分活性測定装置で, 含水率はハロゲン水分計で, pH は試料の 5 倍量の水を加えて抽出し, ガラス電極法で測定した。

## 3. 結 果

## 1) 牛糞堆肥及びその原料中の VTEC O157 の検出感度

PCR 法においては UV 照射により VT 遺伝子のバンドが確認出来たものを「+」とし、免疫磁気ビーズ集菌法においては 3 種類の選択培地上のいずれかで VTEC O157 とと思われる集落が確認出来た場合に、釣菌可能と判断して「+」とした。使用する堆肥及びその原料の状態によって、PCR 法による感度は表 1 のとおり、免疫磁気ビーズ集菌法の感度は表 2 のとおりで異なった結果が得られた。事業場 B の原料では PCR 法でも免疫磁気ビーズ集菌法でも  $1000 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  以上で「+」と感度が低く、事業場 A 及び C の原料では両方法とも  $10 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  以上で「+」と感度が良かった。一方、牛糞堆肥については 3 ヶ所の事業場の試料でも大きな感度の差は認められなかった。

表1 PCR法における感度

添加菌濃度 <sup>1)</sup> ( $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ )	原料			牛糞堆肥		
	事業場A	事業場B	事業場C	事業場A	事業場B	事業場C
$10^4$	+ <sup>2)</sup>			+		
$10^3$	+	+	+	+	+	+
$10^2$	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
1	+	-	-	-	+	-
無添加	-	-	-	-	-	-

1) PCR法によるスクリーニングにおいてVT遺伝子陰性が確認されている試料に添加したVTEC O157の菌濃度

なお、牛糞堆肥には加熱損傷菌を添加

2) PCR法の結果VT遺伝子のバンドを確認

表2 免疫磁気ビーズ集菌法における感度

添加菌濃度 <sup>1)</sup> ( $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ )	原料			牛糞堆肥		
	事業場A	事業場B	事業場C	事業場A	事業場B	事業場C
$10^4$	+ <sup>2)</sup>			+		
$10^3$	+	+	+	+	+	+
$10^2$	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
1	+	-	-	+	+	+
無添加	-	-	-	-	-	-

1) PCR法によるスクリーニングにおいてVT遺伝子陰性が確認されている試料に添加したVTEC O157の菌濃度

なお、牛糞堆肥には加熱損傷菌を添加

2) レインボーアガー、BCM、クロモアガーのいずれかの培地でVTEC O157と疑われる集落を確認

原料についてはPCR法でも免疫磁気ビーズ集菌法でも  $10,000 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  以上、牛糞堆肥についてはPCR法

では 100 CFU $\cdot$ g<sup>-1</sup>以上, 免疫磁気ビーズ集菌法では 10 CFU $\cdot$ g<sup>-1</sup>以上の菌量が試料中に存在すると, 本試験方法で検出可能であることが分かった。

事業場 B の原料における検出が困難であったのは, その内容がほとんど生糞で, 敷料に使用されていたもみ殻が少量混ざっているだけであり, もともと菌が多く存在したため, 添加した VTEC O157 以外の菌も培養時に増菌され, 培養液中の VTEC O157 の割合が低下し, 検出感度の低下につながったのではないかと考えられた。この様に大部分が生糞である試料の場合には, 加熱損傷菌を回復させ少ない菌数を増加させるために行っている緩衝ペプトン水での培養を省略することにより, VTEC O157 の感度を上げることは可能だと考えられるが, どの程度生糞に近ければ培養方法を変更するべきか, といった点については今回検討しなかった。

## 2) 牛糞堆肥及びその原料における VTEC O157 等の確認

調査の概要を夏季及び冬季に分け, 表 3 及び表 4 のとおりまとめた。その製造方法や期間, 昇温条件等もまちまちであった。これらの PCR 法の結果及び VTEC O157 の確認結果は表 5 及び表 6 のとおりであり, 検体中 1 つでも陽性となっていたらその事業場は「+」としている。表 3 の事業場 No. と表 5 の No. は対応して整理し, 表 4 及び表 6 についても同様に整理した。表 5 及び表 6 より, 原料においては多くの事業場 (43 %) の検体が VT 遺伝子陽性となったが, 牛糞堆肥については VT 遺伝子陽性となるものは少数 (10 %) であった。

2001 年には, 全国 25 の堆肥生産事業場からそれぞれ 5 サンプルずつ採取した 125 検体の牛糞堆肥のみについて VTEC O157 等の試験を実施しており, PCR 法において VT 遺伝子陽性が 7 検体 (5 事業場) あったが, 生化学的性状を調べたところ全てのサンプルが VTEC O157 陰性であった。この 2001 年の調査では製品しか検査しておらず, 製造方法や期間等についての聞き取り調査も行っていなかったため, 表 3 及び表 5 への記載を省略した。なお 2001 年分も含めた調査検体数中, VT 遺伝子陽性となった検体数は表 7 のとおりである。

夏季における調査では, 原料について PCR 法により VT 遺伝子陽性と判定された生産事業場は, 表 5 より 35 事業場中 20 事業場であった。また, このうち 5 検体 (2 事業場) から VTEC O157 を釣菌分離した。なお, これらから VTEC O26, O111 は分離されなかった。

牛糞堆肥について VT 遺伝子陽性となった検体はわずかに存在し, VT 遺伝子陽性となる生産事業場は, 表 5 の結果に平成 13 年調査分を含めて 60 事業場中 9 事業場となった。しかし, VTEC O157, O26, O111 のいずれも牛糞堆肥からは釣菌分離されなかった。

一方, 冬季における調査では VT 遺伝子陽性となる検体の存在はわずかであり, 表 6 より原料において 25 生産事業場中 6 事業場, 製品においては 25 生産事業場中 2 事業場のみであった。また, これらから VTEC O157, O26, O111 は分離されなかった。

表 3 及び表 4 より, 一部発酵温度が低く管理があまりされていない事業場が見受けられたが, ほとんどの事業場においては 60 °C ~ 70 °C 以上の温度で一次発酵が行われており, 特に原料段階で VT 遺伝子陽性となったが製品では VT 遺伝子陰性の結果が得られている事業場においては, 必ず 60 °C 以上まで昇温して発酵処理が行われていた (No.52 の事業場については温度非測定のため不明)。

表3 夏季:生産方法概要(2002年~2004年)

事業場 No.	家畜の 種類	糞尿の処理	牛糞以外の原料	一次堆積発酵 <sup>1)</sup>					
				温度	期間	切り返し	切り返し方法	強制通気	製造期間
1	肉牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	80℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
2	肉牛	固液混合	おがくず	60℃	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	— <sup>2)</sup>	3ヶ月
3	肉牛	固液混合	おがくず	60~70℃	5ヶ月	1回/月	ショベルローダー	—	5ヶ月
4	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	50~70℃	9ヶ月	3回/月	ショベルローダー	—	10ヶ月
5	肉牛	固液混合	麦わら, 乾草	30~70℃	3ヶ月	2回/月	ショベルローダー	—	3ヶ月
6	肉牛	固液混合 (全部)	樹皮	不明	20~30日	2回/月	ショベルローダー	—	20~30日
7	肉牛	固液混合	麦わら, おがくず, パーク	70~85℃	14日	1回/週	ショベルローダー	ブローア	1.5ヶ月
8	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	80日	40回/80日	スクープ式	ブローア 20分 間/1時間	2.5ヶ月
9	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	80日	40回/80日	スクープ式	ブローア	2.5ヶ月
10	肉牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 食品残渣	75~80℃	25日	1回/日	ロータリー式	ターボブローア	3ヶ月
11	肉牛	固液混合	稲わら, おがくず, 戻し堆肥	80℃	—	—	—	—	不明
12	肉牛	固液混合		80℃	1ヶ月	—	—	ブローア	6ヶ月
13	肉牛	固液混合	稲わら, おがくず, 戻し堆肥	70℃	1ヶ月	—	—	—	6ヶ月
14	肉牛+ 乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻	75℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
15	肉牛+ 乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, 乾草	70℃	2週	2回/週	スクープ式	ブローア	3ヶ月
16	肉牛+ 乳牛	固液混合	もみ殻	60℃	3週	2回/日	ロータリー式	—	6ヶ月
17	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	70℃	1.5~2ヶ月	3回/月	サイロクレーン	—	18~24ヶ月
18	乳牛	固液混合	おがくず	70~80℃	1ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	1ヶ月
19	乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~70℃	2~3ヶ月	1回/週	ショベルローダー	—	2~3ヶ月
20	乳牛	固液分離	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~70℃	3~4ヶ月	3日目, 1週間目, 2 週間目, 1ヶ月目	ショベルローダー	ブローア	3~4ヶ月
21	乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, 戻し堆肥	50~80℃	4ヶ月	3回/週	ショベルローダー	ブローア	6ヶ月
22	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 飼料残さ, ごま殻, 戻し堆肥	40℃	3日	2回/週	ショベルローダー	—	2ヶ月
23	乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	80℃以上	2~3ヶ月	1回/週	ショベルローダー	—	2~3ヶ月
24	乳牛	固液混合	パーク, チップ, 生活 系・水産系廃棄物	80~85℃	10~14日	1回/5日	ショベルローダー	ブローア	1.5ヶ月
25	乳牛	固液分離		74℃	1ヶ月	約10回/月	ショベルローダー	—	12ヶ月
26	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	65~70℃	1~2ヶ月	2回/月	ショベルローダー	ブローア	3~6ヶ月
27	乳牛	固液混合 (一部)	おがくず, もみ殻, 鶏糞	60℃	3週	3回/月	ショベルローダー	—	6ヶ月
28	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	70℃	15~20日	—	ショベルローダー で移動	ブローア	2~2.5ヶ月
29	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	70℃	1ヶ月	1回/日	スクープ式	ブローア	1ヶ月
30	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 残飼料	60℃	2ヶ月	1.5回/日	スクープ式	—	2ヶ月
31	乳牛	固液混合	もみ殻	60℃	3週	1回/日	バドル式	—	1.3ヶ月
32	乳牛	固液混合	おがくず	70~80℃	1.5ヶ月	1回/日	ロータリー式	ブローア	1.5ヶ月
33	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみがら	70℃	40日	2回/日	ロータリー式	—	3ヶ月
34	乳牛	固液分離	麦わら, おがくず	70℃	1週	4回/日	ロータリー式	—	100日
35	乳牛	固液分離	おがくず, 戻し堆肥	35℃	40日	3回/日	ロータリー式	ブローア	7ヶ月

1) 2次発酵, 3次発酵方法は省略

2) 調査票に記載がなかった事項

表4 冬季:生産方法概要 (2003年)

事業場 No.	家畜の 種類	糞尿の処理	牛糞以外の原料	一次堆積発酵 <sup>1)</sup>					
				温度	期間	切り返し	切り返し方法	強制通気	製造期間
36	肉牛	固液混合	麦わら, 乾草	30~70℃	3ヶ月	2回/月	ショベルローダー	- <sup>2)</sup>	3ヶ月
37	肉牛	固液混合	おがくず	75℃	1ヶ月	-	ショベルローダー	ブローア	2ヶ月
38	肉牛	固液混合	敷きわら, 赤土, 二酸化第二鉄	50℃以下	3週	2回/日	ショベルローダー	-	3週
39	肉牛	固液混合	麦わら, おがくず, パーク	70~80℃	0.5ヶ月	1回/週	ショベルローダー	ブローア	2.5ヶ月
40	肉牛	固液混合 (全部)	-	-	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	-	4ヶ月
41	肉牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻, 戻したい肥	70℃	2週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	3.5ヶ月
42	肉牛	固液混合 (全部)	おがくずパーク	70~80℃	10日	1回/5日	ショベルローダー	ブローア	3~6ヶ月
43	肉牛	固液混合	おがくず, 鶏糞, 腐菌床	80℃	4週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	8ヶ月
44	肉牛	固液分離	鶏糞	70~85℃	1ヶ月	1回/月	ショベルローダー	ブローア	3ヶ月
45	肉牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	70~75℃	約1週	1回/週	ショベルローダー	ブローア	6~7週
46	肉牛	固液混合	もみ殻, 鶏糞	60℃	2ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	2ヶ月
47	肉牛	固液混合	おがくず	80℃	2週	-	-	ブローア	4.5ヶ月
48	肉牛+ 乳牛	固液混合	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥, パーク	60℃	40日	1回/日	スクープ式	ブローア	6ヶ月
49	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, 戻し堆肥	70~80℃	45日	-	スクープ式	ブローア	3~6ヶ月
50	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	もみ殻, 戻し堆肥	80℃	2週	-	スクープ式	ブローア	2~3ヶ月
51	肉牛+ 乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻, 米ぬか, 廃食用油	70~80℃	80日	1回/20日	ショベルローダー	-	3~6ヶ月
52	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻	不明	2ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	3ヶ月
53	肉牛+ 乳牛	固液混合	おがくず, 戻し堆肥	60℃	1ヶ月	-	-	ブローア	6ヶ月
54	肉牛+ 乳牛	固液混合 (全部)	稲わら, おがくず, もみ殻	70~80℃	1ヶ月	-	-	-	3~6ヶ月
55	乳牛	固液混合 (全部)	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	60~80℃	2週	4回/日	ロータリー式	-	2週
56	乳牛	固液混合	おがくず, 鶏糞	75℃	40日	2回/日	スクープ式	ブローア	70日
57	乳牛	固液混合	稲わら, もみ殻	70℃	3ヶ月	2~3ヶ月	ショベルローダー	-	9ヶ月
58	乳牛	固液分離	おがくず, パーク	62℃	1年	1回/月	ショベルローダー	-	2年
59	乳牛	固液分離	おがくず, もみ殻, 戻し堆肥	70℃	6ヶ月	1回/週	ショベルローダー	-	6ヶ月
60	乳牛		麦わら, 戻し堆肥	60~70℃	12ヶ月	-	-	-	12~24ヶ月

\* 脚注は表3を参照

表5 PCR法によるスクリーニング結果  
及びVTEC O157分離結果(夏季)

No. <sup>1)</sup>	PCR結果		VTEC O157 釣菌分離
	原料	製品	
1	+ <sup>2)</sup>	-	-
2	+	-	-
3	+	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	+	-	-
9	+	+	+ <sup>3)</sup>
10	+	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	+	+	-
15	-	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	+	-
21	+	-	-
22	+	+	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	+	-	+
30	+	-	-
31	+	-	-
32	+	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-

表6 PCR法によるスクリーニング結果  
及びVTEC O157分離結果(冬季)

No. <sup>1)</sup>	PCR結果		VTEC O157 釣菌分離
	原料	製品	
36	+ <sup>2)</sup>	-	-
37	+	+	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	+	-
50	-	-	-
51	+	-	-
52	+	-	-
53	+	-	-
54	-	-	-
55	-	-	-
56	-	-	-
57	+	-	-
58	-	-	-
59	-	-	-
60	-	-	-

1) No.は表4の事業場No.と対応

2) 3検体中1つでもVT遺伝子陽性の  
結果が得られた事業場

1) No.は表3の事業場No.と対応

2) 3検体中1つでもVT遺伝子陽性の  
結果が得られた事業場3) VTEC O157を釣菌分離された事  
業場(原料のみから分離. 製品から  
は分離されず.)



表7 調査件数及びVT遺伝子陽性件数

調査時期	調査事業場数	堆肥検体数	原料検体数
		(うちVT遺伝子陽性件数)	(うちVT遺伝子陽性件数)
2001年夏季	25	125 (7)	—
2002年夏季	25	75 (6)	75 (29)
2003年冬季	25	75 (2)	75 (7)
2003年夏季	7	21 (2)	21 (8)
2004年夏季	3	9 (0)	9 (0)

### 3) 牛糞堆肥及びその原料の性状

検体毎に含水率、pH 及び水分活性を測定したが、同じ事業場の牛糞堆肥及びその原料 3 検体毎のバラツキはほとんど見られなかった。含水率はバラツキが大きく、原料で夏季 47%～87% (平均 72%)、冬季 50%～86% (平均 69%)、製品で夏季 15%～75% (平均 51%)、冬季 23%～77% (平均 54%) だった。pH も広い範囲にバラツキが見られ、原料で夏季 pH 5.6～pH 8.8、冬季 pH 6.0～pH 9.5、製品で夏季 pH 6.6～pH 9.5、冬季 pH 6.7～pH 9.8 だった。水分活性 (製品のみ測定) については夏季 0.79～0.99 (平均 0.97)、冬季 0.86～0.99 (平均 0.98) であったが、ほとんどの事業場 (87%) については 0.97～0.99 であった。

VT 遺伝子陽性の結果が得られた事業場の牛糞堆肥及びその原料の性状は、陰性だった事業場と比べて特段の傾向は見いだされなかった。

## 4. 考 察

### 1) VT 遺伝子の確認と牛糞堆肥の生産方法

生産事業場毎の生産方法及び PCR 法の結果を表 3～表 6 に示した。調査は北海道から九州まで全国規模で行ったが、肉牛・乳牛の別、製造方法、製造期間等に特に地域性は認められなかった (調査を行った事業場の場所等については、生産事業場への配慮から記載を省略した)。

今回の調査では夏季に原料が VT 遺伝子陽性となる検出率は調査事業場あたり 57% で、牛糞堆肥における検出率は 11% であり、全国的に VTEC が広く分布していることが分かった。肥育牛糞便中における VT 遺伝子の検出割合は 29%<sup>11)</sup> と報告されているが、VTEC を保菌している牛からの糞も保菌していない牛の糞も一緒に集められ堆積されるため、堆肥生産事業場として考えるとその検出割合はかなり高いものとなった。

冬季に原料が VT 遺伝子陽性となる検出率は調査事業場あたり 24% で、牛糞堆肥においては検出率 8% であることから、夏季よりも冬季においては検出率が低いことが分かった。このことは、冬季には排出された VTEC の活性が低下し再度経口感染しにくくなり、牛の保菌率が低下したため<sup>12)</sup> と考えられる。季節により VT 遺伝子の検出率に差があることから、地域差 (気温差) が予想されるが、地域的偏りは今回認められなかった。

2002～2004 年の調査で、原料から VT 遺伝子を検出した事業場 26 ヶ所のうち製品から検出されなかった事業場は 21 ヶ所 (81%) であった。花島の報告<sup>4)</sup> によると、堆肥化の過程で 55℃ 以上の高温が 18 時間以上持続した場合、堆肥中の VTEC 数は検出出来ない程度まで減少する。今回の調査では VT 遺伝子が原料中から検出されたが、牛糞堆肥中からは検出されなかった 21 ヶ所の事業場では、一部 30℃～50℃ と低温で発酵を始めるところもあるが、必ず 70℃～80℃ まで昇温しており、60℃ 以上で一次発酵を行っていた (No.52 の事業場については温度非測定のため不明)。また更に切り返し及び又は通気を行うことにより全体の発酵の状態を均一にしていた。

原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場は 5 ヶ所(19 %)あった。そのうち、事業場 No.14, No.20 及び No.37 について聞き取り調査を更に行ったところ、いずれの事業場内でも、原料から製品に至るまでの繰り返し作業を 1 機のショベルローダーによって行っていた。

室内実験では、発酵温度の上昇により一旦検出出来ない程度に減少した VTEC 群が 40 °C 以下に温度が低下したときに再増殖することが報告<sup>5)</sup>されており、また VTEC を未熟堆肥に接種して 30 °C で 5 日間培養したところ、その菌数が接種時の 10 倍以上になったと報告<sup>4)</sup>されている。このことから、原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場では、原料に存在していた VTEC が繰り返しに使用されているショベルローダーに付着し、温度が低下した牛糞堆肥に混入して再増殖したのではないかと考えられた。

これらのことは、日本施設園芸協会が堆肥生産時に留意すべき病原菌対策<sup>5, 6)</sup>として示している①原料区画と製品区画の物理的隔離、②作業機械の専用化、③60 °C 以上を 2 週間以上保持する等、推奨される堆肥化の要点と一致していた。

## 2) VT 遺伝子の確認と堆肥の性状

牛糞を堆肥化する過程により、含水率は 70 %程度から 50 %に低下し、pH は pH 5.6~pH 8.8 から pH 6.6~pH 9.5 へと若干上昇する傾向が見られた。しかし、水分活性も含め、VT 遺伝子の検出傾向と試験値とに有意差は認められなかったため、牛糞堆肥及びその原料の性状を示すファクターと VTEC O157 の消長の関係については把握出来なかった。

製品の含水率が 15~75 %と異なっても、その水分活性は 0.97~0.99 だった。VTEC の繁殖可能な水分活性は 0.94 以上とされている<sup>13)</sup>ことから、VTEC の堆肥中での繁殖が可能であることが推察された。

## 5. まとめ

牛糞堆肥中に VTEC O157 が生菌として残存した場合、食品に付着し食中毒の原因となること等が危惧されることから、2001 年 7 月から 2004 年 8 月にかけて牛糞堆肥生産施設 85 ヶ所において、牛糞堆肥及びその原料中の VTEC O157 について調べたところ、以下の結果を得た。

1) 感度試験の結果、一部の原料を除き牛糞堆肥及びその原料において VTEC O157 10 CFU・g<sup>-1</sup>以上で VT 遺伝子の検出及び VTEC O157 の確認が出来た。

2) 調査した事業場中 2 事業場の原料から VTEC O157 を分離したが、牛糞堆肥からは分離されなかった。また、VTEC O26, O111 は原料及び牛糞堆肥共に分離されなかった。

3) 原料から VT 遺伝子を検出した 26 ヶ所の事業場のうち、21 ヶ所(81 %)の事業場の牛糞堆肥からは VT 遺伝子は検出されなかった。これらの事業場においては堆積発酵が 60 °C・1 ヶ月以上の条件で行われていた。

4) 原料及び牛糞堆肥共に VT 遺伝子を検出した事業場は 5 ヶ所(19 %)であった。これらの事業場では発酵温度が不十分であるか又は併用されていたショベルローダーを経由して原料中の病原性 VTEC が牛糞堆肥に混入し、再増殖したと考えられた。

5) 堆肥の性状を示す指標として含水率、pH 及び水分活性について調べたが、VT 遺伝子の検出結果との間に傾向は認められず、これらのファクターと VTEC O157 の消長の関係については把握出来なかった。

## 謝 辞

本研究は独立行政法人肥飼料検査所中期計画における「病原性大腸菌 O-157 含有実態調査」として行われ、その際とりまとめるに当たり、肥飼料検査所肥料等技術検討会検討委員として多大なる助言をいただきました、越野正義氏(元農業環境技術研究所)に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅: 病原大腸菌, 臨床栄養, **89**(7), 832~838 (1996)
- 2) 小檜山津, 佐々木一雅, 太田拔徳, 櫻林郁之介: Verotoxin 産生大腸菌(VTEC)と出血性大腸炎・溶血性尿毒症症候群, Medical Tecnology, **24**(10), 957~962 (1996)
- 3) 伊藤 武: 腸管出血性大腸菌の食品および環境中における抵抗性, 獣医畜産新報, **50**(3), 246~249 (1997)
- 4) 花島 大: 大腸菌を死滅させる堆肥化等安全な処理方法の改善, 農林水産物における病原性大腸菌等の汚染防除に関する研究(病原大腸菌), 独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所, 19~22 (2003)
- 5) 染谷孝, 井上興一: 堆肥施用と病原菌汚染, 農業技術体系 土壌施肥編, 追録第 14 号, 第 7-①, 資材 64 の 84~99, 農文協, 東京 (2003)
- 6) 社団法人日本施設園芸協会: 生鮮野菜衛生管理ガイドー生産から消費までー, 35~39 (2003)  
<[http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k\\_yasai/pdf/guide.pdf#search=社団法人日本施設園芸協会%20生鮮野菜衛生管理ガイド](http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_yasai/pdf/guide.pdf#search=社団法人日本施設園芸協会%20生鮮野菜衛生管理ガイド)>
- 7) 草間豊子, 杉中求: 飼料中の大腸菌 O157 の検出方法の検討, 飼料研究報告, **23**, 128~140 (1998)
- 8) 農林水産省畜産局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号, 最終改正平成 24 年 5 月 25 日, 農林水産省消費・安全局長通知 24 消安第 752 号 (2012)
- 9) 小沼博隆: 腸管出血性大腸菌 O157 の標準検査法について, 食品衛生管理技術セミナー, 日本食品微生物学会, 7~35 (1997)
- 10) 飼料分析基準研究会編: 飼料分析法・解説(2004), 財団法人日本科学飼料協会, 16-18~40, 東京 (2004)
- 11) 安岡富久, 松本紀子, 谷脇妙, 干場浩, 岡本周一, 長崎英二, 小松照子: 病原微生物環境汚染サーベランス, 高知県衛生研究所報, **47**, 31~39 (2001)
- 12) 小沢義博: 欧米の家畜における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の研究と対策, 獣医畜産新報, **50**(9), 733~737 (1997)
- 13) 藤井建夫: 微生物制御の基礎知識ー食品衛生のための 90 のポイントー, 85~88, 中央法規出版, 東京 (1997)

## Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Bovine Fecal Compost and Its Raw Material

Satono AKIMOTO<sup>1</sup>, Shino NAKAMURA<sup>1</sup>, Fumihiko ABE<sup>1</sup> and Jun OHKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

<sup>2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now) Sapporo Regional Center

If Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) including O157 survived during composting, they can be attached to foods and be risk to the human health. We collected some bovine fecal composts and their raw material samples from 85 compost plants where bovin feces were used from July 2001 to August 2004, and surveyed verotoxin producing genes (VTgenes) and VTEC O157 in bovine fecal compost and its raw material. 1) Sensitivity of PCR for VTgenes detection and immunomagnetic method for VTEC O157 detection were estimated to be more than 10 CFU·g<sup>-1</sup> in bovine fecal composts. 2) We separated VTEC O157 from raw materials of 2 plants. But we did not separate VTEC O157 from bovine fecal composts made in those plants. Other VTEC O26 and O111 were not detected from both of them. 3) VTgenes were not detected from bovine fecal composts of 21 plants (81 %) among 26 plants where VTgenes were detected from raw materials. We found that these composts were made in conditions more than 1 month at over 60 °C in these plants. 4) VTgenes were detected from both bovine fecal composts and their raw materials from 5 plants (19 %). In these plants, composting temperature may be insufficient. Or composts may be contaminated by VTEC via a shovel loader that was also used for handling feces and VTEC multiplied again in these plants. 5) We examined bovine fecal composts and their raw materials about moisture content, pH and water activity for an index to show a property of compost, but the significant difference was not accepted by the result and a tendency to detection of a VTgene.

*Key words* bovine feces, compost, O157, PCR, verotoxin

(Research Report of Fertilizer, **5**, 126~137, 2012)