

非常時の対応マニュアル

	対策内容	保健所への対応
異物等の混入、調理不良品の発見などの連絡が入った場合	<p>村教育委員会に通報し、連携して次の情報収集、対策を行う。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発見日時及び場所 ・発見者の氏名及び連絡先 ・健康被害の発生の有無、発生していれば、その症状、診断結果等の把握。 ・当該品の確保、調査。 ・同様の他の事例の有無。 ・調理工程記録等の検索、原因究明。 ・原材料由来と疑われるなら、当該納入業者等より事情聴取 ・その他必要な事項 	<p>次の事態になった場合は、江別保健所に通報し、同所の調査に協力するため左記書類等を速やかに整備し、提出・報告できるようにする。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・重篤な被害が生じた場合 ・広範囲になった場合 ・他の地域にも広がる恐れがある場合 ・業者等からの事情聴取が不調になった場合 ・その他特別な場合
食中毒(疑いも含む)の発生	<p>村教育委員会に通報し、連携して次の情報収集、対策を行う。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発生日時及び場所 ・発症者の氏名、住所及び連絡先 ・症状、診断結果等の把握。 ・摂食者の全数(学校・クラス別)、欠席者数及び欠席理由 ・発症者が飲食した残品の確保。 ・発症時以前の保存食の確保(原材料も含めて2週間分)。 ・同様の他の発症者の把握。 ・調理工程記録等の整理・把握。 ・その他必要な事項 	<p>察知した時点で速やかに江別保健所へ通報し、左記の収集等を行って、同所の調査に協力するため書類整備し、提出・報告できるようにする。</p>

厚生科学研究費補助金

と畜場および食肉の HACCP に関する研究
- 危害評価のための腸管出血性大腸菌汚染調査 -

分担研究者： 品川 邦汎（岩手大学農学部）

研究要旨 岩手県内4農場およびと畜場において牛の直腸便を採取し、PCR法を用いSTx産生遺伝子を指標にSTECの存在を調べ、牛のSTEC保菌状況を調査した。また、免疫磁気ビーズ法により、ヒトへの感染源として重要視されているSTEC O157、O26およびO111の保菌状況も調査した。

農場およびと畜場における牛のSTEC陽性率は高率であり、特に生後1年未満の陽性率は60.0%で、生後1年以上の19.4%を上回るものであった。また生後1年未満の牛のSTEC陽性率は、月齢別では生後2~4ヶ月に最も高かった。牛品種間のSTEC陽性率には明らかな差があり、肉用種の黒毛和種が最も高かった。しかし、いずれの牛においてもSTECの保菌期間は長くないことがわかった。またヒトの感染症の分野で重要視されている血清型O157、O26およびO111のSTECの保菌は少ないことがわかった。

A. 研究目的

Escherichia coli (以下 *E. coli* と略す) は、腸内細菌科に属するグラム陰性の通性嫌気性の桿菌で、菌体表面のリポ多糖類の抗原構造の違いによってO1~O173、鞭毛の抗原構造の違いによってH1~H56に分類される(26)。一部のものには病原性が認められ、それらを総称して下痢原性大腸菌(diarrheagenic *E. coli*)と呼び、病原因子の違いによって腸管毒素原性大腸菌(enterotoxigenic *E. coli*; ETEC)、腸管病原性大腸菌(enteropathogenic *E. coli*; EPEC)、腸管侵襲性大腸菌(enteroinvasive *E. coli*; EIEC)、腸管凝集粘着性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*; EAggEC)、および腸管出血性大腸菌[enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC]または志賀毒素産生性大腸菌(Shigatoxin producing *E. coli*; STEC)と呼ばれる5つのカテゴリーに分類される(26)。そのうち志賀毒素産生性大腸菌(以下STE Cと略す)は志賀毒素と同一構造のShiga toxin(以下STxと略す)1と志賀毒素と免疫学的性状や物理化学的性状が異なる(相同性c.a.50%)STx2を産生する(26、27)。STECに感染した場合、ヒトでは出血性大腸炎に罹患し、重篤例では、溶血性尿毒症症候群(Hemolytic Uremic Syndrome; HUS)や血栓性血小板減少

性紫斑病(Thrombotic Thrombocytopenic Purpura; TTP)などを引き起こし、死亡者も見られる(26、28)。特に、ヒトにおけるHUSを発症した例ではO157、O26およびO111などの血清型のSTE Cの排菌がよく見られ(1、5)、ヒトの感染症の分野で重要視されている。現在、STE Cの健康保菌動物として牛が重要視されており、牛の胃腸内容物からはSTE Cが検出されており、特に直腸内容物にはSTE Cが高率に存在している(1、7、8、9、10、14、16、19、22)。事実、米国において1982年から1995年にかけて報告された、約80件のSTE Cによる集団食中毒事例の最も共通した原因は、調理前の牛の挽き肉であり(16、22、26)、また欧米でも1990年代からSTE C感染症が急増し、原因として牛肉や加工過程の汚染が指摘されている(19)。我が国においても、1996年からSTE Cによる集団食中毒事例が急増しており、発生原因食品は未だ不明な点が多いが、海外同様に感染源として牛が疑われている(7、16、22)。

本研究は、生産農場およびと畜場へ搬入された牛のSTE C保菌状況を調べるとともに、免疫磁気ビーズ法(Immunomagnetic separation; IMS)を用いて、ヒトの感染症の分野で重要視されている

STEC O157、O26およびO111の保菌率を検査した。これらの成績を総合して、HACCP構築のための危害評価データに活用することを目的とした。

B. 研究方法

I. 実験材料

1. 材料採取

岩手県内の4農場A~Dと、県内および隣県から牛が搬入される、県内のと畜場1ヶ所に搬入された牛の直腸便(糞便)を直腸検査用手袋を用いて採取(約10g)し、冷蔵して研究室に搬入し、検査に供した(表1)。

2. 増菌培地

糞便および汚水、堆肥の増菌培養には、ノボピオシン加mEC培地(極東化学、東京)を使用し、二次増菌培養にはトリプトソイブイオン(日水製薬、東京)を使用した。

3. PCR用試薬

PCR法によるSTx遺伝子の検出には、Takara PCRキット(宝酒造、滋賀)、腸管出血性大腸菌VT1遺伝子検出用プライマーEVT1、EVT2、腸管出血性大腸菌VT2遺伝子検出用プライマーEVS1、EVS2(宝酒造、滋賀)を使用した。

4. 免疫磁気ビーズ法(Immunomagnetic separation; IMS)

STEC O157、O26およびO111の検出には、Dynabeads anti-*E.coli* O157(DYNAL、Norway)とO26免疫磁気ビーズ、O111免疫磁気ビーズ(デンカ生研、東京)を使用した。

5. 大腸菌用選択培地

DHL寒天培地(日水製薬、東京)、ハートインフュージョン寒天培地(日水製薬、東京;以下HI agarと略す)、CEFIXIME TELLURITE(CT) SELECTAVIAL、SORBITOL MacCONKEY AGAR(Mast Group Ltd.、UK;以下CT-SMC agarと略す)、CHROM agar O157(クロモアガー社、フランス)を使用した。

6. スライド凝集試験用血清およびO157感作ラテックス

病原大腸菌免疫血清 混合1、O157、O26およびO111(デンカ生研、東京)、Serobact *E.coli* O157(Medvet Science Pty Ltd.、Australia)を使用した。

II. 実験方法

1. PCR法によるSTx1、STx2遺伝子の検出

糞便(1g)をノボピオシン加mECブイオン(20ml)に接種し、培養(37℃、24h)後、その培養液を採取(1ml)し、トリプトソイブイオン(10ml)に接種し、再度培養(37℃、24h)を行っ

た。その培養液(1ml)を、ロック付きマイクロチューブ(QSP、USA)に分注し、遠心分離(10,000rpm、5min)後、沈渣に滅菌MQ水(600μl)を加えて懸濁した。次いで、遠心分離(10,000rpm、5min)後、沈渣に滅菌MQ水(100μl)を加えて懸濁し、加熱(100℃、10min)した後に遠心分離(10,000rpm、10min)、その上清(10μl)に滅菌MQ水(1,000μl)を添加し、その10μlを試料とした。PCR用試薬は、1検体につき10倍濃度のTBE buffer(Mg⁺⁺ plus; 5.0μl)、dNTPs(4.0μl)、滅菌MQ水(28.75μl)、Taq polymerase(0.25μl)、VT1遺伝子検出用プライマーEVT1、EVT2、VT2遺伝子検出用プライマーEVS1、EVS2(0.5μl)を水中にて0.2ml Micro PCR Tube(宝酒造、滋賀)に混合(40μl)したものを用いた。これに、試料(10μl)を加え、Thermal Cycler(宝酒造、滋賀)を用い、94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1minを1サイクルとして35サイクル行った。この産物(10μl)に0.25% BPB(SIGMA CHEMICAL CO.、USA)と5%グリセロール(関東化学、東京)を加えた染色液を混和し、2%アガロースゲル(FMC、USA)を用い電気泳動を行い、エチジウムブロマイド(和光純薬、東京)で染色後、トランスイルイルミネーターにより、UV下でバンドの有無を確認した。

2. 免疫磁気ビーズ法を用いたSTEC O157、O26およびO111の検出

PCR法においてSTx遺伝子が認められた糞便(1g)をノボピオシン加mECブイオン(9ml)で培養(37℃、24h)後、Dynabeads anti-*E.coli* O157(DYNAL、Norway)と、O26およびO111免疫磁気ビーズ(デンカ生研、東京)を各々20μl添加した菌液 1ml(1.5mlマイクロチューブ; QSP、USA)を専用のラック(DYNAL、Norway)に入れ、室温で震盪し、混和(30min)後、専用の磁石板(DYNAL、Norway)をあて、ビーズ(菌体が吸着)を集めた。残液を捨てた後、滅菌PBS 1mlを加え3分間洗浄し、再度磁石板をあてビーズを集めた。この操作を3回繰り返してビーズを洗浄した後、ビーズを滅菌PBS 0.1mlに懸濁し、CT-SMC agar、CHROM agar O157に白金耳で塗抹、培養をおこなった(37℃、24h)(2、5)。

3. 免疫血清およびO157感作ラテックスを用いたスライド凝集試験

免疫磁気ビーズを用いて集菌し、培養した各平板培地から、STEC O157の場合、CT-SMC agarからソルビトール非(遅)発酵性の灰白色のコロニーを(24、26)、CHROM agar O157からは薄桃色のコロニーを、それぞれ5~6個約菌

し、Serobact *E.coli* O157を用いてスライド凝集試験を行い、凝集陽性のは病原大腸菌免疫血清のO157による凝集試験を行った。同様にO26およびO111ではCHROM agar O157より紺色のコロニーを5~6個釣菌し、病原大腸菌免疫血清 混合1を用いてスライド凝集試験を行い、凝集陽性のもについて、病原大腸菌免疫血清O26、または病原大腸菌免疫血清 O111による凝集試験を行った(2、24)。また、スライド凝集試験によりO157、O26およびO111と判断された菌株は、HI agarによる画線培養(37℃、24h)をした。次いで、コロニー(1個)を滅菌マイクロチップに釣菌、滅菌MQ水(0.1ml)で懸濁し、加熱(100℃、10min)後、その10 μ lを採取、実験方法1と同様の方法によりSTx遺伝子の有無を調べた。

4. PCR法によるSTx遺伝子検出の向上に関する手法の検討

目的とするSTECを選択的に増菌するために、ノボピオシン加mECプライオンを用いるが、この菌液をそのまま上述の方法でPCRを行うと、糞便中の夾雑物や培地中の成分によるPCR反応の阻害が起こる。そのため、トリプトソイプライオンによる二次増菌培養を行った。しかしその菌液をそのまま上述の方法でPCRを行うと、サンプルが濃厚すぎてバンドが検出されない場合があり、サンプルを10²倍希釈してPCRに供した。

C. 実験結果

1. 牛および堆肥、汚水の、PCR法を用いたSTEC陽性率の調査

1) 各農場別およびと畜場の牛のSTEC陽性率

STEC陽性率は農場において大きな差が見られ、A農場においては糞便169検体中115検体(68.0%)がSTx陽性を示し、そのうちSTx1型が39検体、STx2型が22検体、STx1と2両方産生型が54検体であった。次いで、C農場で74検体中31検体(41.9%)、D農場は22.2%、B農場は12.2%であった(表2)。STECは、子牛からの検出率が高いことが報告されており(16、22、23)、今回調査した農場においても、AおよびC農場の、すべての牛に対する生後1年未満の牛の割合は、BおよびD農場に比べて高かった。他方、と畜場においては、367検体中144検体(39.2%)が陽性で、そのうちSTx1型が39検体、STx2型が50検体、STx1と2両方産生型が55検体であった。農場およびと畜場を合わせた854検体中、STx1型は97検体(11.4%)、STx2型は101検体(11.8%)、STx1と2両方産生型は138検体(16.2%)であった。検出されたSTx型は、STx1型やSTx2型に比べてSTx1と2両方産生型にやや高い傾向が見られ

たが、STx1と2両方産生型が単独の菌に由来するものか、STx1型とSTx2型の両菌が混在していたのかは不明であり、今後、プライマーを別に加えてPCR法を行い、調査する必要がある。

2) 堆肥、汚水のSTEC陽性率

農場から採取した堆肥は8検体中4検体がSTEC陽性であった。また、汚水は農場採取の2検体からは検出されなかった。と畜場の汚水は15検体中7検体が陽性であった(表2)。

3) 年齢、性別および品種別のSTEC陽性率の比較

(1) 年齢とSTEC陽性率

冬季(2月)の調査では、生後1年未満の子牛は、75頭中30頭(40.0%)が陽性であったのに対し、生後1年以上の成牛は、74頭中21頭(28.4%)が陽性であった。同様に、春季(5月)は、生後1年未満が60.3%陽性であったのに対し、生後1年以上は21.5%が陽性、さらに秋季(10月)は、生後1年未満が77.0%陽性であったのに対し、生後1年以上は8.8%が陽性であった。全計では、生後1年未満の子牛は60.0%が陽性であるのに対し、生後1年以上の成牛は19.4%が陽性であり、両群の陽性率の間には明らかな差が見られた(表3)。

(2) 生後1年未満の子牛の、月齢別のSTEC陽性率

生後2~4ヶ月の子牛の陽性率は86頭中64頭、74.4%と最も高かった。これは仁科ら(16)が報告している、4ヶ月齢以下の子牛に高い傾向が見られたという結果と同様の成績であった。陽性率はそれぞれ、出生~2ヶ月が49.9%、生後4~6ヶ月が56.6%、6~8ヶ月が57.1%、8~10ヶ月が61.1%、10ヶ月~1年が62.5%であった(表4)。

(3) 生後1年未満の牛の、性別によるSTEC陽性率

雄は109検体中78検体(71.6%)が陽性で、雌は131検体中66検体(50.4%)が陽性で、両者の間には差が見られた(表5)。

(4) 品種別のSTEC陽性率

農場から採取した検体は、乳用種としてホルスタイン種、肉用種として黒毛和種、ホルスタイン種と黒毛和種との交配によって得られたF1種の3種で、と畜場から採取した検体は、ホルスタイン種、黒毛和種、F1種、日本短角種、ジャージー種の5種であったが、ジャージー種は検体数が少なく、除外した。これらの種類別のSTEC陽性率は、農場においては、黒毛和種が最も高く79.6%、次いでF1種が50.0%、ホルスタイン種が32.8%であった。同様に、と畜場においても黒毛和種の陽性率が最も高く56.2%、次いでF1種が40.7%、その他日本短角種が35.8%、ホルスタイン種が18.9%であった(表6)。農場およびと畜場の、品種間の陽性率には統計学的に明らかな差があることが分かった。

4) 農場におけるSTEC保菌牛の継時的調査

農場において冬季(2月)にSTEC陽性であった牛を無作為に選び、それらについて4、5および10月にSTECの保菌状況を調査した結果、A~Dの4農場のいずれにおいても、2、4、5および10月に連続して同じSTx型が検出された牛は見られなかった。しかし、2、4および5月に3回連続して同じSTx型が検出されたのは、A農場では7頭中3頭、2月と4月に同じSTx型が検出されたのはB農場では7頭中2頭、C農場では7頭中1頭、4月と5月に同じSTx型が検出されたのはA農場では1頭、D農場では1頭であった(表7)。これに対して、4月にSTEC陽性であった牛からは、10月には同じSTx型は検出されず、5月にSTEC陽性であった牛18頭中に、10月にも同じSTx型が検出されたのはわずか3頭にすぎなかった。これらのSTECが同一の血清型によるものであるか否かは、今回の結果からは明らかではないが、STECの保菌期間は短い(<5ヶ月)と思われた。この他の牛は、調査した時に単発的に陽性を示した。

2. 農場およびと畜場におけるSTEC O157、O26およびO111の分離

A~Dの4農場において、PCRでSTEC陽性とされた140頭中5頭(3.6%)からO157が分離され(全検体に対する陽性率; 1、5%)、1頭(0.7%)からO26が分離された(全検体に対する陽性率; 0.3%)。同様に、と畜場においてはSTEC陽性の144頭中3頭(2.1%)からO157が分離された(全検体に対する陽性率; 0.8%) (表8)。これらのSTECがヒトに対して病原性を示すか否かは不明であるが、ヒトへの感染が懸念されるSTEC O157、O26およびO111の、牛の保菌は少ないと思われた。

3. PCR法によるSTx遺伝子検出率の向上

トリプトソイブイオンによる二次増菌と、サンプルの 10^2 倍希釈によって、STx産生遺伝子の検出率が向上したことを図に示した。

D. 考察

本研究は、県内の農場およびと畜場の牛を対象に、STEC陽性率を調査したが、その結果、農場、と畜場共に高率であった。品川ら(22)は、海外における陽性率は0.2~6.8%であったと報告している。特にWELLSら(6)によれば、米国(ウィスコンシン州)においては、成牛が8%、未経産牛が19%、MARIAら(10)によれば、ドイツにおいては、健康牛259頭中28頭(10.8%)がSTEC陽性であった。我が国においても、甲斐ら(7)は、牛785頭中60頭(7.6%)がSTEC陽性であったことを報告している。これらの結果と比べても、今回対象とした農場およびと畜

場の牛のSTEC陽性率が高率であったことは明らかである。考えられる要因として、PCR法の改良が挙げられる。ADRIENNEら(1)は、液体培地による増菌培養の目的は、PCRの反応の阻害物質の希釈と、目的とする塩基配列のコピー数の増加であるとし、従来法が、牛の糞便の希釈液(11)をそのまま用いていたのに対し、液体培地による初代培養液をサンプルとして用いた(1、17)。本実験では、糞便を液体培地で培養後、別の液体培地で二次培養を行い、熱抽出したサンプルをさらに 10^2 倍希釈することにより夾雑物を希釈し、非常に高い検出率を得ている。また、今回調査した4農場およびと畜場に搬入された牛が飼育されていた農場が、汚染地域であった可能性がある。品川ら(22)は、STECによる食中毒事例に関連した農場においては、その農場の牛のSTEC陽性率は高率であったと報告しており、もし、STEC陽性率が牛個体よりも農場単位で推移すると仮定すれば、STEC陽性率が高値を示したことは当然のことと思われる。

牛のSTEC陽性率は、生後1年未満の個体と生後1年以上の個体の間には、明らかな差が見られた。特に、生後2~4ヶ月の個体の陽性率が最も高かった。

この結果は、HANCOCKら(3)の、離乳した未経産牛のSTEC陽性率は、離乳前の子牛や成牛に比べて高かったことという報告や、多田ら(23)の、子牛(1~3週齢)のSTEC陽性率が最も高く(32.9%)、次いで5ヶ月齢(31.3%)、10ヶ月、18ヶ月、23ヶ月と成牛になるにつれて低下していったという報告とほぼ一致している。WILLIAMら(25)は、STEC O157:H7を用いた子牛(離乳前)と成牛の感染実験において、菌接種後2、7、14、20週後の糞便中への排菌は、子牛が、成牛に比べて長期に亘っており、子牛と成牛との間には統計学的に明らかな差が見られたと報告し、また、DEANら(4)は、生後12時間後の新生牛にSTEC O157を経口投与したところ、若牛や成牛には見られない、腸の上皮への菌体の接着や、粘膜の脱落像が見られたと報告し、子牛のSTEC O157の保菌が成牛に比べ容易に成立することを裏付けている。以上の報告から、生後1年未満の子牛のSTEC陽性率が、生後1年以上の成牛に比べて高率であるのは、何らかの生物学的要因により、成牛に比べある種のSTECに高い感受性を示し、その腸管内に比較的長期の保菌をもたらすことが原因ではないかと思われる。

農場で飼育されていた3種(ホルスタイン種、黒毛和種、F1種)間、また、と畜場に搬入されていた4種(ホルスタイン種、黒毛和種、F1種、日本

短角種；ジャージー種は頭数が少ないので除外した)間のSTEC陽性率には、品種間で、統計学的に明らかな差があることがわかった。STEC O157のみに関しては、品川ら(22)は、肉用牛(黒毛、褐毛、ホルスタイン去勢)におけるSTEC O157の保菌率は1.8%であったのに対して、乳用牛(ホルスタイン種)では0.9%であり、両群の保菌率には差が見られたが、乳用種でも肉用として飼育されている場合があり(例；ホルスタイン去勢牛)、肉、乳用の区別は明確ではなく、肉用牛と乳用牛の間のSTEC O157の保菌率には有意な差は認められなかったと報告している。しかし今回は、すべてのSTECを対象とし、また、肉、乳用という観点ではなく、品種別という観点で調査を進めており、ホルスタイン種においては、乳用と肥育用では飼養形態に若干の相違点はあるものの、品種間のSTEC陽性率には明確な差はあると思われた。しかし、STEC陽性率に品種間で差が見られたという報告は少なく、今後さらに調査する必要がある。

また、ヒトの感染症の分野で重要視されているSTEC O157、O26およびO111の、牛における保菌率は、O157のみに関しては、仁科ら(16)は、外国においては、米国0.2~6.8%、カナダ3.0%、英国1.0~8.2%、ドイツ0.8%と報告している。甲斐ら(7)は、我が国においては、O157を0.1%、O26も0.1%程度保菌していたと報告している。これらの結果と比較しても、本研究における牛のSTEC O157、O26およびO111の保菌率は低かったと見ることができる。STEC陽性牛はヒトの食中毒の感染源とされ、また、農場においては、他の個体ひいては農場全体の汚染源としても重要視されている。しかし、STECの腸管内の保菌が継続する期間については、詳しいことはわかっていない。MECHIERら(21)は、STEC O157を保菌していた雌牛と未経産牛73頭と子牛の44頭、計117頭を継続的に調査したところ、87頭が1回のみ保菌で、雌牛と未経産牛73頭中23頭と、子牛の44頭中7頭に2回以上の保菌が認められたが、最長の保菌は4週間であったと報告している。また、多田ら(23)は、STECが検出された1~3週齢の子牛10頭を、5ヶ月後にもう一度検査したところ、5頭がSTECを保菌し4頭から菌が検出され、前回にO157:H7が検出された1頭からは、5ヶ月後もO157:H7が検出されたが、残りの3頭は、前回とは違う血清型のSTECが検出されたと報告している。これらの報告と、今回の結果を加味して、牛のSTEC保菌期間は長くはないと思われる。

E. 結論

岩手県内4農場およびと畜場において牛の直腸便を採取し、PCR法を用いSTx産生遺伝子を指標にSTECの存在を調べ、牛のSTEC保菌状況を調査した。また、免疫磁気ビーズ法により、ヒトへの感染源として重要視されているSTEC O157、O26およびO111の保菌状況も調査した。その結果、以下のことが明らかになった。

1. 農場およびと畜場における牛のSTEC陽性率は高率であり、特に生後1年未満の陽性率は60.0%で、生後1年以上の19.4%を上回るものであった。また生後1年未満の牛のSTEC陽性率は、月齢別では生後2~4ヶ月に最も高かった。
2. 牛品種間のSTEC陽性率には明らかな差があり、肉牛の黒毛和種は他品種(乳牛:ホルスタイン、肉牛:短角)に比べ高率に保有していた。
3. STECのStx産生性から、牛の保菌期間は数ヶ月間であり、また再度新しく感染することがわかった。
4. ヒト感染症として重要視されている血清型O157、O26およびO111のSTECの保菌は今回調査では少ないことがわかった。

文献

1. ADRIENNE W.PATON AND JAMES C.PATON
Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assay for stx₁, stx₂, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb_{O111}, and rfb_{O157}
J. Clin. Microbiol. 36, 598-602 (1998)
2. 浅井良夫、村瀬敏之、大澤 朗、沖津忠行、鈴木理恵子、佐多 辰、山井志朗 和田昭仁、田村和満、渡邊治雄
免疫磁気分離(IMS)法による腸管出血性大腸菌O157の検出
感染症学雑誌 71, 46-54 (1998)
3. D.D.HANCOCK, T.E.BESSER, D.H.RICE, D.E.HERRIOTT
A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds
Epidemiol. Infect. 118, 193-195 (1997)
4. Dean-Nystrom-EA, bosworth BT, Moon-HW
Pathogenesis of O157:H7 *Escherichia coli* infection in neonatal calves
Adv-Exp-Med-Biol. 412; 47-51 (1997)
5. HELGE KARCH, CLAUDIA JANETZKI-MITTMANN, STOJANKA ALEKSIC, AND MARTINA DAZZ
Isolation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains from Patients with Hemolytic-

- Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture.
J. Clin. Microbiol. 34:516-519(1995)
6. J.G. WELLS, L.D. SHIPMAN, K.D. GREENE, E.G. SOWER, J.H. GREEN, D.N. CAMERON, F.P. DOWNES, M.L. MARTIN, P.M. GRIFFIN, S.M. OSTROFF, M.E. POTTER, R.V. TAUXE, AND I.W. WACHSMUTH
 Isolation of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Other Shiga-Like-Toxin-Producing *E. coli* from Dairy Cattle
J. Clin. Microbiol. 29:985-989(1991)
7. 甲斐明美、尾畑浩魅、伊藤 武、工藤泰雄
 我が国における Vero 毒素産生性大腸菌の分離状況
臨床と微生物. 近代出版, 東京:827-834(1996)
8. L.H. WEILER, E. VIELER, C. ERPENSTEIN, T. SCHLAPP, H. STEINRUCK, R. BAUERFEIND, A. BYOMI, AND G. BALJAR
 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Bovines: Association of Adhesion with Carriage of *eae* and Other Genes
J. Clin. Microbiol. 34:2980-2984(1996)
9. LOTHAR BEUTIN, DOROTHEE GEIER, SONJA ZIMMERMANN, AND HELGE KARCH
 Virulence Markers of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* Strain Originating from Healthy Domestic Animal of Different Species
J. Clin. Microbiol. 33:631-635(1995)
10. MARIA A. MONTENEGRO, MICHAEL BULTE, THORSTEN TRUMPF, STOJANKA ALEKSIC, GERHARD REUTER, EBERHARD BULLING, AND REINER HELMUTH
 Detection and Characterization of fecal Verotoxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle
J. Clin. Microbiol. 28:1417-1421(1990)
11. MICHAEL J. BRAIN, MIRA FROSOLONO, BARBARA E. MURRAY, ABRAHAM MIRANDA, EDUARDO L. LOPEZ, HENRY F. GOMEZ, AND THOMAS G. CLEARY
 Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Infection and Hemolytic-Uremic Syndrome
J. Clin. Microbiol. 30:1801-1806(1992)
12. 宮原美知子、小沼隆博
 PCR法による食肉からの腸管出血性大腸菌 O157 のベロ毒素産生遺伝子の検出について
食品衛生学雑誌 9:315-317(1998)
13. M.W. SANDERSON, J.M. GAY, D.D. HANCOCK, K.C.C. GAY, L.K. FOX, AND T.E. BESSER
 Sensitivity of Bacteriologic Culture for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine Feces
J. Clin. Microbiol. 33:2616-2619(1995)
14. 中澤宗生、甲斐明美
 日本のウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の性状
感染症学雑誌. 68:1437-1439(1994)
15. 中澤宗生、末吉益雄
 豚の浮腫病
臨床と微生物. 23:843-849(1996)
16. 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)
17. 大村真理、山崎伸二、竹田美文
 腸管出血性大腸菌の PCR 法による同定
臨床と微生物. 23:813-819(1996)
18. ORASA SUTHIENKUL, J. EDWARD BROWN, JITVIMOL SERIWATANA, SANYA TAENTHON-GDEE SUVONG SASTRAVAHA, AND PETER ECHEVERRIA
 Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Cattle in Thailand
Applied and Environmental Microbiology. 56:1135-1139(1990)
19. P.A. CHAPMAN, C.A. SIDDSOON, D.J. WRIGHT, P. NORMAN, J. FOX AND E. CRICK
 Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in man
Epidemiol. Infect. 111:439-447(1993)
20. PINA M. FRATAMICO, SOLOMON K. SACKITEY, MARTIN WIEDMANN, AND MING YI DING
 Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR
J. Clin. Microbiol. 33:2188-2191(1995)
21. S.C. MECHIE, P.A. CHAPMAN AND C.A. SIDDSOON
 A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd
Epidemiol. Infect. 118:17-25 (1997)
22. 品川邦汎
 腸管出血性大腸菌による食肉汚染とその対策
獣医畜産新報 JVM, Vol.50:237-242(1997)
23. 多田 博、伊丹幸子、山本保男、小林一寛、田口真澄、中澤宗生
 PCR法を用いた肥育牛からの Vero 毒素産生性大腸菌の検出
感染症学雑誌. 66:1383-1388(1992)
24. 塚本定三
 腸管出血性大腸菌の分離培養法

臨床と微生物.23:801-806(1996)

25. WILLIAM C. CRAY, JR AND HARLEY W. MOON

Experimental Infection of Calves and Adult Cattle with *Escherichia coli* O157:H7

Applied and Environmental Microbiology. 61:1586-1590(1995)

26. 山本達男
病原性大腸菌O157とは
臨床と微生物.23:781-784(1996)

27. 山崎伸二、竹田美文
Vero毒素の構造と生物活性(1996)
臨床と微生物. 23:785-799(1996)

28. 吉矢邦彦
溶血性尿毒症症候群
臨床と微生物. 23:859-867(1996)

表1

		検体の内訳			合計 検体数
		季節別検体数			
		冬季 (H10, 2月)	春季 (H10, 5月)	秋季 (H10, 10月)	
農場 (糞便)	A	50	49	70	169
	B	24	30	28	82
	C	25	30	19	74
	D	50	62	50	162
小計		149	171	167	487
と畜場 (H9.11月～H10.7月)					計367検体
(糞便; 20～30農場より搬入)					
堆肥	各農場から冬、春各4検体				計 8検体
汚水	と畜場から15検体、農場より2検体				計 17検体

表2

牛糞便および汚水、堆肥からのPCR法によるSTEC 検出

検体採取場所	検査 検体数	PCR 陽性検体数			計 (%)	
		STx 1	STx 2	STx 1+2		
農場 (糞便)	A	169	39	22	54	115(68.0)
	B	82	-	7	3	10(12.2)
	C	74	4	12	15	31(41.9)
	D	162	15	10	11	36(22.2)
と畜場	367	39	50	55	144(39.2)	
小計	854	97	101	138	336(39.3)	
農場 (汚水)		2	-	-	-	0
	(堆肥)	8	2	2	-	4(50.0)
と畜場 (汚水)	15	2	1	4	7(46.7)	

表5

牛の性別によるSTEC検出

		検体数	STx 1	STx 2	STx1+2	計(%)
生後1年未満	雄	109	21	14	43	78(71.6)
	雌	131	21	20	25	66(50.4)
生後1年以上	雄	3	1	—	—	1(33.3)
	雌	235	15	17	15	47(20.0)

表6

牛の品種別によるSTEC検出

採取場所	用途	品種	検体数	PCR 陽性検体数			計(%)
				STx 1	STx 2	STx 1+2	
農場	乳牛	ホルスタイン	393	39	34	56	129(32.8)
	肉牛	黒毛和種	54	10	10	23	43(79.6)
		F1	40	9	7	4	20(50.0)
と畜場	乳牛	ホルスタイン	111	6	9	6	21(18.9)
	肉牛	黒毛和種	146	24	23	35	82(56.2)
		F1	54	3	15	4	22(40.7)
		短角	53	6	3	10	19(35.8)
		ジャージー	3	0	0	0	0

表7

STEC保菌牛の継続的調査

農場	検体数 (頭数)	STx型	STEC陽性検体				検出状況(月)
			2月	4月	5月	10月	
A	7	1	1	-	1	5	1頭(2,10)
		2	4	5	5	-	3頭(2,4,5) 1頭(2,5) 1頭(4,5)
		1+2	2	-	-	1	
		-	-	2	1	1	
B	7	1	-	-	-	-	
		2	5	3	-	1	2頭(2,4) 1頭(2,10)
		1+2	2	1	-	-	
		-	-	3	7	6	
C	7	1	-	-	-	-	
		2	4	2	2	-	1頭(2,4) 1頭(2,5)
		1+2	3	-	-	2	1頭(2,10)
		-	-	5	5	5	
D	6	1	2	-	1	-	
		2	1	1	1	-	1頭(4,5)
		1+2	3	-	-	-	
		-	-	5	4	6	

表8

農場およびと畜場におけるSTEC O157,O26およびO111の分離

検体採取場所	PCR陽性 検体数	STEC 陽性検体数			計
		O157	O26	O111	
農場 (糞便) A	93	5	-	-	5
B	3	-	-	-	-
C	23	-	1	-	-
D	21	-	-	-	-
と畜場	144	3	NT	NT	3
計	284	8	1	-	8
農場 (汚水)	0	-	-	-	-
(堆肥)	4	-	-	-	-
と畜場 (汚水)	7	-	NT	NT	-