

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究

研究分担者	寺嶋 淳	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	品川正臣	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	和賀萌美	岩手大学農学部	共同獣医学科

研究要旨

腸管出血性大腸菌（Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : STEC）は牛が腸管内にしばしば保菌していることが知られており、食肉や二次的に汚染した多様な食材や食品が STEC 食中毒の感染源となっている。したがって、汚染源となり得る牛の STEC 保菌状況を知ることは STEC 感染症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。

本研究では 2020 年の 5 月から 9 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 285 頭の直腸便における STEC について *stx* 遺伝子の PCR スクリーニングを行い対象牛の STEC 保持状況を調査した。分離できた STEC について O 抗原を血清凝集試験と *E. coli* O genotyping PCR で調べ、さらに *stx* のサブタイピングを行いパルスフィールドゲル電気泳動法によって遺伝的類似性を比較した。

A. 研究目的

STEC 感染症は、感染症法において三類感染症として規定され全数把握疾患となっている。本疾患は食品由来感染症として特徴づけられるものの、原因となる食品は非常に多様であり、主たる保菌動物である牛の腸管内容物による二次的な汚染を含め汚染源は広範な食品・食材に及んでいる。汚染経路も複雑であるがゆえに、STEC 食中毒の原因究明は困難な場合が多く、原因が明らかになることは稀である。一方で牛が主たる保菌動物であることから、汚染源となり得る牛の STEC 保菌状況を知ることは STEC 感染

症の制御にも極めて有効な情報と考えられる。本研究では、さまざまな農場に由来する牛が搬入される食肉処理場において牛の大腸内容物を調べることで STEC 保菌状況を明らかにし、STEC 感染症由来の菌株との比較を行うことで、原因となる STEC の動向を把握することで STEC 感染症の制御に資する情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

（1）STEC の分離収集

岩手県食肉衛生検査所において調べたと畜牛の直腸便 285 検体を収集し、以下

の手順にて STEC を分離収集した。1 g の糞便サンプルを 9 mL の m EC 培地(ニッスイ)に接種し、ボルテックスで混和した後 42°C、16 時間振盪培養した。培養後、培養液 7 mL を 15 mL チューブに移して 3000 rpm 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てた沈査に 6 mL の PBS を加えて懸濁し 3000 rpm 1 分間遠心分離して夾雑物を除いた。その後上清から 5 mL 採取し、3000 rpm 10 分間遠心分離した。上清を捨て得られた沈査の一部をコロニーPCR 用ストックとしてマッコスキー寒天培地ニッスイに画線し、37°C、1 晩培養した。残りの沈査から以下の方法で DNA を抽出し stx 遺伝子の PCR スクリーニング用のテンプレート DNA とした。沈査を 900 µL の PBS で再懸濁しマイクロチューブに移して 15000 rpm、10 分間遠心分離した。上清を捨てた沈査に 100 µL の 25 mM NaOH を加え再懸濁し、95°C、5 分でヒートブロックによる熱処理をした。熱処理後 8 mL の Tris-HCl を加えて 15000 rpm 10 分間遠心分離し得られた上清を回収してテンプレート DNA とした。テンプレート DNA を用いて、stx1 及び stx2 遺伝子を検出する PCR 反応によりスクリーニングを行った。さらに、stx 遺伝子が陽性となった検体ストックから単コロニーになるように LB 寒天培地に接種・培養した菌株について、各々の単コロニーの PCR による stx スクリーニングを行い stx 陽性株の選抜を行った。stx 陽性の単離株について、API20E による大腸菌の確認および病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた凝集反応により O 群を同定した(次項 1-2

参照)。

(2) 分離株の性状解析

Stx 陽性株について、PCR による毒素のサブタイピング、O 抗原の決定及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて詳細な性状解析を行った。

1-1 毒素のサブタイピング

Scheutz¹⁾らの方法に準じて stx サブタイプを決定した。各検体の DNA は以下のように調製した。Stx 陽性検体については保存したストックを LB 寒天培地にコロニーなるように播種し 37°C、1 晩培養した。得られたコロニーを 1 mL の LB broth BD) に接種し 37°C、1 晩培養した。培養後 100 µL の培養液を 900 µL の滅菌蒸留水に加え 100°C、15 分間加熱した後 18000×g で 5 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し DNA テンプレートとした。PCR 反応で stx1 陽性となった検体に対してさらに stx1a、stx1c、stx1d を特定するプライマーで PCR 反応を行った。stx2 陽性となった検体に対しては stx2a、stx2b、stx2c、stx2d、stx2e、stx2f、stx2g を特定するプライマーで PCR 反応を行った。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

・ stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2c, stx2e, stx2f, stx2g の PCR 反応液 (20 µL)

HotStarTaq (Q IAGEN)	10 µL
Water	4.5 µL
Forward primer	0.25 µL
Reverse primer	0.25 µL
Template DNA	5.0 µL
・ stx2a の PCR 反応液 (20 µL)	
HotStarTaq	10 µL
Water	4.25 µL

Forward primer1	0.25 μL	
Forward primer2	0.25 μL	
Reverse primer	0.25 μL	
Template DNA	5.0 μL	
・ stx2d の PCR 反応液 (20 μL)		
HotStarTaq	10 μL	
Water	4.0 μL	
Forward primer	0.25 μL	
Reverse primer1	0.25 μL	
Reverse primer2	0.25 μL	
Reverse primer3	0.25 μL	
Template DNA	5.0 μL	
・ stx1a, stx1c, stx1d, stx2b, stx2e, stx2f, stx2g の PCR 反応条件		
95°C	15 分間	} 35 サイクル
94°C	50 秒間	
64°C	40 秒間	
72°C	1 分間	
72°C	3 分間	
・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件		
95°C	15 分間	} 35 サイクル
94°C	50 秒間	
66°C	40 秒間	
72°C	1 分間	
72°C	3 分間	

PCR 反応後、増幅産物を TAE buffer を用いて 2%アガロースにより電気泳動を行った。

1-2 O 抗原の決定

単離した stx 遺伝子陽性株については、以下の手順で O 抗原を決定した。まず、stx 遺伝子陽性コロニーのストックを 100 μL の PBS に懸濁し、LB 寒天培地上でコンラージ棒を用いて塗り広げ 37°C、1 晩培養した。培養後マッシュ棒の頭 3~5 倍程度の菌体を回収し 3 mL の生理食塩液

を入れた小試験管で懸濁した。懸濁液を 121°C、15 分間高圧蒸気滅菌をした後、900×g で 20 分間遠心分離して沈査を回収した。沈査を 0.5 mL の生理食塩液で懸濁し凝集反応用の抗原液として用いた。スライドグラスを数区画に分け、区画毎に大腸菌セット病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) の混合血清 1 滴を滴加した。試料が自己凝集をおこしていないことを確認するため 1 区画に对照として混合血清の代わりに生理食塩液を 30 μL 滴下した。調製した抗原液の各検体 10 μL を混合血清及び生理食塩液に滴加した。ピペットチップを用いて検体と混合血清及び生理食塩液をよく混和させた。スライドグラスを前後に傾斜させながら 1 分間反応させて凝集の有無を目視で蛍光灯の透過光下で観察した。各血清との反応で 1 分間以内に透明な背景に凝集塊が生じる強い凝集が観察されたものだけを陽性とし 1 分以降に遅れて出現する凝集塊や乳白色の背景に凝集塊が観察された微弱な凝集は陰性とした。混合血清で陽性と判断された場合、その混合血清を構成する単味血清を用いて凝集試験を行った。いずれの混合血清及び単味血清も陰性となった検体は大腸菌セット病原大腸菌免疫血清に含まれる O 群には該当しないと判定し、単独の単味血清が陽性となった検体のみをその単味血清名を O 群と判定した。

凝集試験で凝集塊が認められなかった検体に対しては Og typing PCR²⁾によって O 抗原の遺伝子を同定し Og 抗原とした。stx 遺伝子陽性検体のコロニーを 1 mL の LB broth に接種し 37°C、1 晩培養

した。100 μ L の培養液を 10,000 \times g で 10 分間遠心分離し上清を捨て得られた沈査に 1000 μ L の TE buffer を加えて懸濁した。懸濁液を 100 $^{\circ}$ C、10 分間加熱した後 10,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移し DNA テンプレートとした。20 種類のマルチプレックス PCR により Og 抗原を特定した。PCR 反応液組成及び PCR 条件は以下のとおりである。

- ・ PCR 反応液 30 μ L)
- 5 \times KAPA Taq Extra buffer no Mg

(KAPA)	6.0 μ L
Water	14.42 μ L
Primer Mix	3.52 μ L
MgCl ₂ (KAPA)	3.0 μ L
dNTP mix (KAPA)	0.9 μ L
KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)	0.16 μ L
Template DNA	2.0 μ L

- ・ PCR 反応条件

94 $^{\circ}$ C、	1 分間	} 25 サイクル
94 $^{\circ}$ C、	30 秒間	
58 $^{\circ}$ C、	30 秒間	
72 $^{\circ}$ C、	1 分間	
72 $^{\circ}$ C、	2 分間	

1-3 パルスフィールドゲル電気泳動 stx 陽性株のうち O 抗原及び Og 抗原が同一となった検体に対して PFGE を行った。

LB 寒天培地に保存した菌体を少量かき取り 200 μ L の滅菌蒸留水にマクファーランド比濁法で 4 番の濁度となるように懸濁した。菌の懸濁液に対して 200 μ L の TBE に溶かした 1% seaKem Gold Agarose (Lonza)液を加えて混ぜプラグ

モールド BIO-RAD へ流し込み固化させ以降のプラグとして用いた。固まったプラグを 1 mL の 1 mg/mL の proteinaseK を含む菌体処理溶液が入った Sterile Tube (SARSTEDT)に移し、50 $^{\circ}$ C、一晩振盪しながらインキュベートした。菌体処理溶液の組成は以下のとおりである。

- 菌体処理液 (16 mL)
- proteinaseK (Roche)
- 0.016g (最終濃度 1 mg/mL)
- N-Lauroysarcosine SIGMA
- 0.16g (最終濃度 1%)
- 0.5M EDTA pH8.0 (ナカライテスク)
- 16mL

菌体処理後、アガロースプラグを取り出しシャーレにいれ、カバーガラスを用いて 1/3 から 1/2 になるように切り 500 μ L の 4 mM Pefabloc SC (AEBSF) in TE に移し 50 $^{\circ}$ C で 15~20 分間振盪 (40 min⁻¹) しながら洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。さらに 1 mL の TE にバッファーを変え 15 分以上氷上にて平衡化した。TE buffer を捨て酵素処理の前段階として 200 μ L の SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes (Roche)を加え、氷上で 35 分以上インキュベートした。SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes を捨て 100 μ L の 20 units の制限酵素 XbaI を含む反応液を加え 37 $^{\circ}$ C、一晩振盪しながらインキュベートした。TE、4 mM Pefabloc SC (AEBSF) in TE 及び XbaI 反応液の組成は以下のとおりである。

- ・ 10 mM EDTA (4 mL)
- 0.5M EDTA pH8.0 80 μ L
- milliQ 水 3.92 mL

- ・ TE (pH8.0) (202.4 mL)
 - 100 mM Tris-Cl (pH8.0) 2.4 mL
 - 10 mM EDTA 4 mL
 - milliQ 水 196 mL
- ・ 4 mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE (15 mL)
 - 100mM Pefabloc SC (Roche) 0.0144 g
 - TE (pH8.0) 14.9856 mL
- ・ XbaI 反応液 (15 mL)
 - XbaI (Roche) 30 μ L
 - H buffer (Roche) 147 μ L
 - 滅菌蒸留水 1323 μ L

DNA サイズマーカーである CHEF DNA Size Standard Lambda ladder (BIO RAD)をシャーレに取り出し、カバーガラスで約 2 mm の短冊状に切り使用した。コームにマーカーと制限酵素処理をしたプラグを静置した。プラグに付着した余分な Buffer をキムワイプ等で取り除き、数分間乾かした。プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし、100 mL の 1 %になるよう TBE に溶かした SeaKem Gold Agarose を流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分静置した。水準器を用いて泳動槽が水平になるように調整し 2.2 L の 0.5×TBE (BIO-RAD)を泳動 buffer として使用した。固まった泳動用ゲルを泳動槽に設置し、再び水平になるように調整した。泳動条件は 6.0 V/cm、スイッチ時間 2.2 (initial sw time)-54.2 (final sw time)s、buffer 温度 14°C、泳動時間 22 時間、pump の循環速度 100 とした。電流は最初 90~100 mA、最終的には 150 mA、となるような調整とした。泳動後、染色、脱色をした。

C. 研究結果

1. 牛直腸便サンプル における STEC スクリーニング及び分離

牛の直腸便 285 検体から作製した DNA 抽出物を使用し、stx1 及び stx2 遺伝子に対するスクリーニングを実施したところ 46 検体 (16.1%)が stx 陽性となった。その内 11 検体が stx1 のみ陽性 25 検体が stx2 のみ陽性 stx1 及び 2 陽性が 10 検体となった (表 1)。stx 遺伝子が陽性となった 46 検体のうち、さらに コロニー PCR で陽性となり菌が分離できた検体は 12 検体 (4.2%) 14 株であった (表 2)。

2. stx サブタイプの特定

コロニーPCR により分離できた 12 検体 14 株に対して stx subtyping PCR を実施したところ、サブタイプは stx1 陽性であった 7 検体すべてで stx1a となった。Stx2 が陽性であった 9 株 (stx1 陽性の 3 株を含む) は stx2 a が 3 検体、 stx2c が 2 検体、stx2d が 1 検体、stx2a/2d が 2 検体と stx サブタイプ不明が 1 検体となった (表 3)。

3. 抗病原性大腸菌血清を用いた凝集試験による O 抗原の特定

コロニーPCR により分離できた 12 検体 14 株に対して抗病原性大腸菌血清を用いた血清凝集試験を行った。混合血清を滴下したところ 3 検体それぞれ混合血清 3、7、9 で凝集塊を示した。残りの 9 検体 11 株では凝集塊は観察されなかった。混合血清で凝集塊を示した 3 検体に対して単味血清による O 抗原の特定を実施したところ 3 検体はそれぞれ O157、 O136、 103 のみで凝集塊を示した (表 3)。

4. O 抗原遺伝子の有無を標的とした PCR

による O 抗原 (Og 抗原) の特定

血清凝集試験によって O 抗原が特定出来なかった 9 検体 11 株に対しては O 抗原遺伝子の有無を標的とした PCR を行い、その結果を Og 抗原として特定した (Og typing PCR)。

Og39、Og8、Og171、Og2 または Og50、Og130 がそれぞれ 1 検体ずつとなり Og113 は 2 検体 4 株 (同一農場検体)、Og22 が 2 検体 (異なる農場検体) となった (表 3)。

5. パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)

異なる農場で同一 Og 抗原が観察された 2 検体の Og22 及び同一農場で同一 Og 抗原が観察された 2 検体 4 株の Og113 とその他 1 検体ずつ O 抗原 Og 抗原が同定された検体について PFGE による遺伝的類似性を調べた。その結果 2 検体の Og22 は異なるバンドパターンを示し、Og113 となった 2 検体のうち 3 株は同じバンドパターンを示し、1 株は確認できなかった。また、1 検体ずつ観察された異なる O 抗原 Og 抗原はすべて異なるバンドパターンを示した (図 1)。

D. 考察

本研究では 2020 年の 5 月から 9 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 285 頭の直腸便における STEC について、stx 遺伝子の PCR スクリーニングを行い対象牛の STEC 保持状況を調査した。既報では、日本の健康な乳牛の PCR による stx 陽性率は 932 頭のうち 283 頭 (30.4%)、分離率は 111 頭 (12%) であるとされて

いる³⁾。季節ごとに牛糞便からの分離率を調べた報告において STEC O157H7 では夏に最も多く分離され、冬が最も低く分離されている⁴⁾。また STEC による食中毒事例も夏に発生が多い。本研究の対象牛は 5~9 月の期間にかけて調査しており、時季としては stx 遺伝子の陽性率が高くなると考えられる。しかし、本研究では stx 陽性率は 285 頭のうち 46 頭 (16.1%) で分離率は 12 頭 (4.2%) と低い値であった。STEC 分離頻度の高い時期が含まれるにもかかわらず低い陽性率であったことは今回直腸便を採取した牛が由来する農場の多くは比較的衛生管理が整っていた可能性が考えられる。また、分離法や牛の年齢なども陽性率に影響を及ぼす可能性があると考えられる。加えて STEC は VBNC (Viable but Non culturable State) と呼ばれる損傷菌として生存可能だが培養ができない状態になる可能性がある。したがって stx 遺伝子が糞便には存在するためスクリーニング PCR で陽性となるが mEC 培地内で増殖ができず LB 培地に接種したストックに stx 保持の大腸菌が生えずにコロニー PCR の検出率が下がり stx 陽性株を分離できなかったことが考えられる。今後スクリーニング検体数を増やすことで陽性率を向上させることが可能かもしれない。また 検体数の増加に伴い、各時季からスクリーニングをすることや牛の年齢も考慮に入れることでより正確なデータが得られると考えられる。本実験では直腸便からの大腸菌のスクリーニングでまず mEC 培地を使用し、分離をする際にマッコニー寒天培地を使用しているが、選

択性が異なる他の培地を使用することも STEC 分離率の向上に貢献できるものと考えられる。さらに、免疫磁気ビーズ法は、標的とする O 抗原の大腸菌を少数の菌でも効率よく集菌できるため主要 O 抗原を検出する際には有効な手段であり免疫磁気ビーズ法を使用することも分離率の向上分離率の向上につながるものと期待できる。

本研究で分離した STEC 14 株に対して stx 遺伝子のサブタイピングを行った結果では、stx1 については、7 検体でサブタイプが stx1a となった。Stx2 については、stx2a, stx2c, stx2d の 3 種類のみが検出された。stx 遺伝子のサブタイプの中でも stx2a、stx2c 及びその変異体の存在は疾患の重症度と密接に関係しており、stx1a、stx2a、stx2c、stx2d は HC 及び HUS に密接に関係しているという報告がある⁵⁾。本研究で検出されたサブタイプ 4 種類は重度の疾患 HC 及び HUS の発症に関係しており stx のサブタイプという点に関してのみ着目するとこれらの株が原因となる食中毒が起こった場合、患者が重篤な症状になる可能性が考えられる。今後は stx1 及び stx2 遺伝子のみならず、eaeA、hlyA 及び saa などの病因因子も検査することによりスクリーニング検体のヒトへのリスクを評価することも可能であると考えられる。

STEC による食中毒の原因として挙げられる主要な O 群の抗原に O157 があるが、非 O157 による食中毒も近年増加しており、O26、O103、O111、O121、O45 及び O145 は非 O157 の STEC の中では多く検出されており、これら O 群に属す

る STEC は O157 を含め主要 7O 群とされている。我が国では、2007 年 11 月から 2008 年 3 月までに牛直腸便から検出された STEC O157 及び O26 は、2436 頭の肉牛のうち、それぞれ 8.9%と 0.4%という報告がある⁶⁾。また、別の調査では 932 頭の乳牛のうち STEC O157 陽性検体がなく、O26 が 0.9%、O103 が 0.5%という報告がある³⁾。本研究では主要 7O 群と言われる食中毒に関する主要 O 群に属する STEC は 12 検体中 O157 及び O103 が各 1 検体の計 2 検体で、ともに 0.4% となり他の主要 O 抗原は検出されなかった。わが国では 2014 年から 2018 年の 5 年間において食中毒事例での主要 O 抗原は全体の 94%を占めている⁷⁾が、先行研究並びに本研究結果から主要 7O 群は牛糞便内では優位に多い訳ではなくその他の O 抗原が占めていることが示唆された。

本研究では異なる農場で同一 Og 抗原となった 2 検体の Og22 と同一農場で同一 Og 抗原となった 2 検体 4 株の Og113 を中心に STEC が分離できた 12 検体、14 株に対して PFGE 法による解析を行った。その結果、Og22 株ではバンドパターンが異なることからこれら 2 株はゲノム構成が異なっておりその由来が異なる菌株であることが示唆された。したがって、異なる 2 農場間で分離された同一 O 抗原 (Og22) の STEC は相互の関連性が低い分離株であることが考えられた。また Og113 では、バンドパターンが確認されなかった 1 株を除き残りの 3 株については泳動像がシャープではないため確実性はないが類似したバンドパターンが確

認められた。同一農場において異なる牛の直腸便から遺伝的に極めて類似した同一 O 抗原の STEC 株が分離されたことから当該農場における Og113 株による汚染率の高さが推測された。一方、これら Og113 の 3 株はそれぞれ stx1a 陽性が 2 株 stx1a 及び stx2d 陽性が 1 検体であり、バンドパターンが確認できなかった 1 株は stx1a stx2c 及び stx2d 陽性と異なる stx 遺伝子のサブタイプを示していた。ゲノム構成が近縁と考えられるこれらの株における stx のサブタイプの違いは、プロフェージ上から stx2c 及び stx 2d 遺伝子が欠落したために起きたと考察された。今後、さらに検体数を増加させることで、異なる農場における同一の O 抗原となる STEC 検体が増えれば、PFGE による遺伝的類似性の比較をすることで疫学調査に有用な菌株解析情報を得ることができるものと期待される。また、STEC の PFGE 解析に加えて、反復配列多型解析 (MLVA) による菌体解析を実施し、疫学調査を強化することで、岩手県を中心とした本地域で発生する食中毒集団発生事例の対応に貢献することが期待される。

(参考文献)

(1) Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Toz z oli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton Celsa AR, Sanchez M, Persson S and O'Brienb AD(2012). Multicenter Evaluation of a Sequence Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. J Clin Microbiol. 50,2951-2963

(2) Iguchi A, Iyoda S, seto K, Morita Ishihara T, Scheutz F and Ohnishi M, Pathogenic E.coli Working Group in Japan (2015). *Escherichia coli* O Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. J Clin Microbiol . 53(8) 2427-2432

(3) Kobayashi H, Kanazaki M, Ogawa T, L yoda S, Hara Kudo Y. (2009). Changing Prevalence of O serogroups and Antimicrobial Susceptibility Among STEC Strains Isolated from Healthy Dairy Cows Over a Decade in Japan Between 1998 and 2007. J. Vet. sci. 71(3):363-366.

(4) Genevieve AB, Terrance MA, Mildred R, Xiangwu N, Steven DS, Tommy LW and Mohammad Koohmaraie (2003). Seasonal Prevalence of Shiga t oxin Producing *Escherichia coli*, Including O157 :H7 and Non O157 Serotypes, and Salmonella in Commercial Beef Processing Plants. Journal of Food Protection . 66(11):1978-1986

(5) Group FWSE (2019). Hazard identification and characterization: criteria for categorizing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on a risk basis. J Food Prot. 82(1):7-21

(6) Sasaki Y Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S and Yamada Y (2011). Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. Vet Microbiol. 150(1 2):140-5

(7) NIID 国立感染症研究所 (2020) 病原微生物検出情報 .IASR, 41(5):66-88

E. 結論

2020年の5月から9月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛285頭の直腸便におけるSTECについてstx遺伝子のPCRスクリーニングを行い対象牛のSTEC保持状況では、46検体(16.1%)がstx陽性となった。その内11検体がstx1のみ陽性、25検体がstx2のみ陽性、stx1及び2陽性が10検体となった。市販抗血清に反応したO抗原はO157、O103、O136がそれぞれ1検体あり、凝集試験で凝集しなかった検体はOg-typing PCRにより、Og39、Og8、Og171、Og2またはOg50、Og130が1検体ずつとなり、Og113は2検体(同一農場)、Og22(異なる農場)となった。Stxのサブタイプについては、stx1が8検体すべてでstx1aとなった。Stx2はstx2aが3検体、stx2cが2検体、stx2dが1検体とstx2a/2dが2検体となった。PFGEの結果、別の農場から分離されたOg22は異なるバンドパターンを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・品川正臣、和賀萌美、山崎朗子、寺嶋淳
岩手県の食肉処理場に搬入された牛の直腸便における腸管出血性大腸菌の保持状況 日本食品衛生学会第116回学術講演会(WEB開催)令和2年11月24日(火)～令和2年12月8日(火)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 牛直腸便サンプルのstx遺伝子スクリーニング結果

スクリーニング結果				
検体数	stx1のみ陽性	stx2のみ陽性	stx1及び2陽性	総陽性数(%)
285	11	25	10	46(16.1)

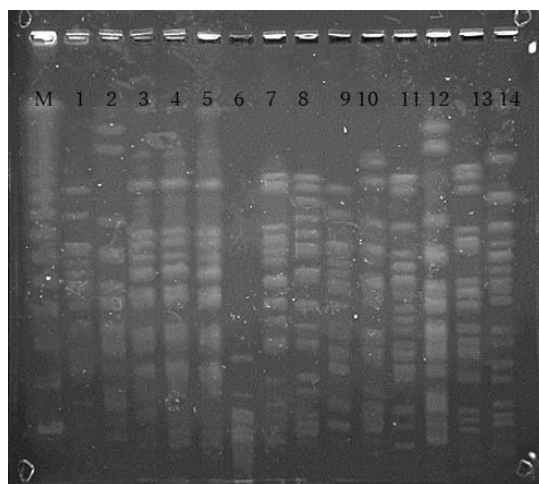
表2 コロニーPCR結果

コロニーPCR		
検体数	分離できた検体数(%)	分離できた株
285	12 (4.2)	14

表3 分離株におけるO抗原群、stx1及びstx2サブタイピング結果

samples	O抗原	Og-typing	subtyping
A農場 検体	-	Og22	stx2d
C農場 検体2	-	Og22	stx2c
G農場 検体1	-	Og113	stx1a
G農場 検体2-colony1	-	Og113	stx1a
G農場 検体2-colony2	-	Og113	stx1a/2d
G農場 検体2-colony3	-	Og113	stx1a/2a/2d
C農場 検体1	O103	Og103	stx1a
D農場 検体1	O136	-	stx1a
B農場 検体	-	Og39	不明
D農場 検体2	-	Og8	stx2a/2d
F農場 検体1	-	Og171	stx2c
F農場 検体2	-	Og2,Og50	stx2a
H農場 検体	-	Og130	stx2a
E農場 検体	O157	Og157	stx1a/2a

図 1 パルスフィールドゲル電気泳動による STEC 分離株の比較



Lane

1. A 農場検体 O g22
 2. C 農場検体 O g22
 3. G 農場検体 1Og113
 4. G 農場検体 2 colony1 Og113
 5. G 農場検体 2 colony2 Og113
 6. G 農場検体 2 colony3 Og113
 7. C 農場検体 1 O103
 8. D 農場検体 1 O136
 9. B 農場検体 Og39
 10. D 農場検体 2 Og8
 11. F 農場検体 1 Og171
 12. F 農場検体 2 Og2, Og50
 13. H 農場検体 Og130
 14. E 農場検体 O1 157
- M: DNA サイズマーカー (λラダー)