

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）

令和 4 年度分担研究報告書

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

動物由来株の収集と分子型別

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	山田翔子	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
研究協力者	推野千紘	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。また、豚では STEC による浮腫病が知られているがヒトへの病原性は低いと考えられており、Non-O157 STEC による食中毒が報告されている状況でも豚の保有する STEC に関する情報は少ない。したがって、汚染源となり得る牛及び豚の 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 2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 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豚の STEC 保持状況を調査した。分離できた STEC について凝集試験または Ogtyping PCR 法にて O 抗原型、Og 型を調べた。また PCR によって stx サブタイプ、病原性因子遺伝子を調べた。さらに、薬剤感受性試験を実施し株の薬剤耐性について調査し、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。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。一方で豚の STEC 保菌状況については報告が少なく、その実態については不明な部分が残る。本研究では、さまざまな農場に

由来する牛及び豚が搬入される食肉処理場において両者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) 豚の直腸便からの STEC の分離収集

2021 年の 4 月から 2022 年の 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された豚 521 頭の直腸便および市販の豚肉を材料とした。採取した検体については明確な由来農場を把握することができなかつたため、詳細な疫学的情報は不明である。糞便サンプル 1 g をノボビオシンナトリウム (ナカライテスク, 日本) 20 mg/L を添加した mEC 培地(日水製薬, 日本) 9 mL 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 3,000 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 3,000 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, 3,000 rpm, 10 分間遠心分離した。上清を捨て, 沈査を 450 µL の PBS で再懸濁し, 一部をコロニー PCR 用ストックとしてマッコンキー寒天培地(日水製薬, 日本)に画線し, 37°C, 一晚培養した。残りの沈査から以下の方法で DNA を抽出した。懸濁液をマイクロチューブに移して 15,000 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 µL の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて, 15,000 rpm, 10 分間遠心分離し, 得られた上清を回収し抽出 DNA とした。

抽出 DNA をテンプレート DNA とし, stx1, stx2 を検出する PCR をサーマルサイクラー (GeneAtlas G02, astec, 日本) を用いて行った。本 PCR には酵素として KAPA Taq ReadyMix(KAPA Biosystems, マサチューセッツ州)もしくは KAPA Taq Extra HS ReadyMix(KAPA Biosystems, マサチューセッツ州), プライマーとして Cebula の設計した stx1 および stx2 に特異的な LP30 / LP31 (stx1), LP43 / LP44 (stx2) を使用した(表 2) [Cebula et al., 1995]。反応液組成及び反応条件は以下のとおりである。

PCR 反応液(25 µL)

2×KAPA Taq (Extra HS) Ready Mix	12.5 µL
Water	11.0 µL
Forward Primer	0.25 µL
Reverse Primer	0.25 µL
Template DNA	1.0 µL

反応条件

95°C	3 分間	} 25 サイクル
94°C	20 秒間	
58°C	20 秒間	
72°C	30 秒間	
72°C	30 秒間	

PCR 後, 増幅産物をサブマリン型電気泳動装置 (Mupid-2 plus, タカラバイオ,

日本) を用いて 100V, 30~40 分間の条件で, 2%アガロースにより電気泳動を行った。泳動バッファーとして 1×TAE 緩衝液, 分子量マーカーとして 100 bp DNA パーソナルマーカー (eurofins, ルクセンブルク) を用いた。stx1 及び stx2 が陽性となった検体についてコロニーPCR を以下の手順で実施し STEC 株を分離した。前項でマッコンキー寒天培地に画線したストックから新たなマッコンキー寒天培地にコロニーができるように播種し 37°C, 一晚培養した。培地上に得られたコロニーを PCR 反応液に釣菌し, 懸濁した。釣菌した懸濁液から一部を LB 寒天培地 (Becton Dickinson, ニュージャージー州) に接種後 37°C, 一晚培養して STEC 分離株のストックとした。残りの懸濁液はそのまま PCR 反応させた。PCR 条件は前項と同様である。得られた各 STEC 分離株の DNA を以下の方法で抽出した。LB 寒天培地のストックから新たな LB 寒天培地全面に播種し, 37°C で一晚培養した。培養後, 菌体を 1.5 mL チューブに分注した TE buffer 1 mL に懸濁し, 100°C, 15 分間加熱した後, 18,000×g, 5 分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し, 抽出 DNA とした。超微量分光光度計 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州) で抽出 DNA の濃度を測定し, 約 10 ng/μL になるよう TE buffer で希釈し, これをテンプレート DNA として用いた。

(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, 病原性因子遺伝子の検出, 薬剤感受性試験及びパ

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。

2-1 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。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

94°C 50 秒間

64°C 40 秒間 35 サイクル

72°C 1 分間

72°C 3 分間

・ stx2a, stx2c, stx2d の PCR 反応条件

95°C 15 分間

94°C 50 秒間

66°C 40 秒間 35 サイクル

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。

2-2 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 μ L 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 \times 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應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 μ L 滴下した。調製した抗原液の各検体 10 μ L 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°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 K APA 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°C,	1 分間
94°C,	30 秒間
58°C,	30 秒間
72°C,	1 分間
72°C,	2 分間

2-3 病原性因子遺伝子の検出

病原性因子遺伝子として *stx1*, *stx2*, *eae*, *fliC*, *hlyA*, *rfbE* の 6 種類を Bai らの方法に準じたマルチプレックス PCR により検出した [Bai et al., 2010]。前項で調整した DNA をテンプレート DNA とした。50 μ M の各プライマー (12 種類) を等量ずつ混和したものをプライマーミックスとした。各プライマーの配列は表 6 に示した。PCR 反応液組成および PCR 条件は以下の通りである。

PCR 反応液(20 μ L)	
10 \times PCR buffer, -Mg (Invitrogen, カリフォルニア州)	2.0 μ L
MgCl ₂ (Invitrogen, カリフォルニア州)	3.0 μ L
Primer Mix	1.92 μ L
dNTP mix (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.48 μ L
Taq DNA polymerase (Invitrogen, カリフォルニア州)	0.5 μ L
Water	11.1 μ L

Template DNA	1.0 μ L
PCR 反応条件	
94°C	5 分間
94°C	30 秒間
58°C	30 秒間
72°C	75 秒間
68°C	7 分間

25 サイクル

2-4 薬剤感受性試験

ディスク拡散法により各株の薬剤感受性を調べた。分離した *stx* 陽性コロニーを LB 寒天培地上に塗り広げ 37°C, 一晚培養した。培養後, 菌体を小試験管に分注した滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁し McFarland Standard 0.5 (bioMérieux, フランス) と同等の濁度になるよう目視で調整した。これを菌液とした。菌液に滅菌綿棒を浸し, 余液を管壁で取り除いた後, 感性ディスク用培地 N (日水製薬, 日本) に綿棒で菌液を平板を約 60°ずつ回転させながら 3 回塗抹した。菌液を接種した平板を 3~5 分静置した後, ディスクデイスペンサー (Becton Dickinson, ニュージャージー州) でディスクを 1 枚の平板あたり 2~3 枚ずつ置いた。15 分以内に培地に蓋をして逆さにし, 37°C で 16~18 時間培養した。培養後, 形成された阻止円の直径を mm 単位で測定し, S (感受性), I (中間耐性), R (耐性) を判定した。

ディスクはセンシディスク (Becton Dickinson, ニュージャージー州) のアンピシリン 10 (ABPC), セファゾリン 30 (CEZ), セフォタキシム 30 (CTX), ゲンタマイシン 10 (GM), カナマイシン 30 (KM), テトラサイクリン 30 (TC),

ナリジクス酸 30 (NA) , シプロフロキサシン 5 (CPFX) , クロラムフェニコール 30 (CP) , SXT (ST) を用いた。S, I, R の判定基準は CLSI のディスク法の判定基準に従った [CLSI, 2022] 。

2-5 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

遺伝的異同を判定するため単離された全ての株について PFGE を行なった。

LB 寒天培地に保存した菌体を少量かき取り, 滅菌蒸留水 200 μ L に McFarland Standard 3.0 と同等の濁度となるよう目視で調整しながら懸濁した。懸濁液に, TBE に溶かした 1% SeaKem Gold Agarose (Lonza, スイス) 液 200 μ L を加えて混ぜ, プラグモールド (BioRad, カリフォルニア州)へ流し込み固化させ, プラグとした。固まったプラグを, proteinaseK を含む菌体処理溶液 1 mL が入った Sterile Tube (SARSTEDT, ドイツ)に移し, 50°Cで一晩振盪した。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 (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.016g (最終濃度 1 mg/mL)

N-Lauroysarcosine (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.16g (最終濃度 1%)

0.5M EDTA pH8.0 16mL

菌体処理後, プラグをシャーレへ取り出し, カバーガラスを用いて 1.5 mm 程度になるようプラグを切断し, プラグ断片とした。プラグ断片を 4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE 500 μ Lに移し, 50°Cで 15~20 分間振盪 (40min⁻¹) し, 洗浄

した。洗浄後, 4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE を新しい液に交換し, 同じ条件で振盪して再度洗浄した。続いて, 4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE を捨て, TE buffer 1 mL に交換し, 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 SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes(Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 200 μ Lに交換し, 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, 20 units の制限酵素 XbaI を含む反応液 100 μ L に交換し, 37°Cで一晩振盪した。4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE 及び XbaI 反応液の組成は以下のとおりである。

・4mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE (15 mL)

100mM Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 0.0144 g

TE (pH8.0) 14.9856 mL

・XbaI 反応液 (1.5 mL)

XbaI (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 30 μ L

H buffer (Sigma-Aldrich, ミズーリ州) 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(BioRad, カリフォルニア州)をシャーレへ取り出し, カバーガラスで約 2 mm の短冊状に切断し使用した。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、プラグに付着した余分な Buffer をキムワイプ (Kimberly Clark, テキサス州) で取り除いた後、数分間乾燥させた。プラグを貼り付けたコームをゲル作成台にセットし、1% SeaKem Gold Agarose in TBE 100 mL を流し込んだ。ゲルが固まるまで 20~30 分間静置した。水準器を用いて泳動槽が水平になるように調整した。また 2.2 L の 0.5 × TBE (BioRad, カリフォルニア州) を泳動 buffer とした。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)秒, buffer 温度 14°C, 泳動時間 22 時間, ポンプの循環速度 100 とした。電流は最初 90~100 mA, 最終的には 150 mA となるように調整とした。泳動装置は CHEF-DR II システム (BioRad, カリフォルニア州) を用いた。泳動後、ゲルを染色し、イルミネーターにて泳動像を確認した。また、制限酵素 XbaI を用いて実験を行った結果類似したパターンを示した株の一部について、別の制限酵素である Bln I を用いて同様に PFGE を行った。制限酵素 Bln I は 20 units を使用し、制限酵素 Bln I を含む反応液の組成は、酵素を変更した点を除いて XbaI のものと同様である。

(3) 豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況調査

2022 年の 6 月から 11 月までに岩手県内で購入した豚ミンチ肉 48 検体および豚小腸 4 検体を材料とした。用いた検体の購入日、商品名、購入場所は表 10 に示した。

3-1 stx の PCR によるスクリーニング

本試験は「食品からの腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法」[厚生労働省, 2014] を参考とした。

食品検体 25 g をストマッカー袋に秤量し、ノボビオシン加 mEC (1) と同様) 培地 225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行った後、42°C で 22±2 時間培養した。培養液 0.1 mL をマイクロチューブにとり、10,000 ×g, 10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50 mM NaOH 85 μL を添加して 100°C で 10 分間加熱した。その処理液に滅菌した 1M Tris-HCl (pH7.0) 15 μL を加えて中和し、10,000 ×g, 10 分間遠心した。得られた上清を抽出 DNA とした。50 mM NaOH, 1M Tris-HCl (pH7.0) の組成は以下の通りである。

50 mM NaOH (20 mL)	
1 M NaOH	1 mL
Milli-Q water	19 mL
1 M Tris-HCl (pH 7.0)	
Trizma base	12.1 g
Milli-Q water	80 mL

Milli-Q water に Trizma base を溶解させたのち、塩酸を加え、pH 計測器で計測しながら pH 7.0 に調整した。その後 Milli-Q water で 100 mL に調整した。

抽出 DNA をテンプレート DNA とし、stx1, stx2 を検出する PCR を行った。本 PCR で用いた酵素、プライマー、サーマルサイクラーならびに PCR 反応液組成、

PCR 条件は前項 (1) と同様である。PCR 反応後、増幅産物を 2 %アガロースにより電気泳動を行った。泳動後、染色し、イルミネーターにて泳動像を確認した。用いた泳動バッファー、分子量マーカー、染色剤、イルミネーターは前項 (1) と同様である。

3-2. 分離培養

ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養した培養液をマッコンキー寒天培地に塗抹し、37°Cで 18~24 時間培養した。

C. 研究結果

(1)-1. 豚直腸便検体における STEC スクリーニング及び分離

豚の直腸便 521 検体について stx1, stx2 遺伝子の有無を調べた。521 検体のうち stx1 または stx2 について陽性を示した検体は 252 検体 (48.4%) であった。内訳としては、stx1 のみが 3 検体 (0.6%), stx2 のみが 246 検体 (47.2%), stx1 および stx2 について陽性を示したのが 3 検体 (0.6%) であった。採材日別の stx 陽性率は表 6 に示した。最も高い陽性率を示したのは 2022 年 6 月 22 日の 59.3% であり、最も低い陽性率を示したのは 2022 年 8 月 2 日の 38.0% であった。また、各採材日ごとに検体を採取した順に並べると、陽性検体が続く箇所とほとんどない箇所があり、陽性検体はある程度まとまっていた (図 1)。

stx 陽性を示した 252 検体についてコロニーPCR を実施し、STEC 株を分離した。252 検体のうち、全体の 4.8%, 陽性検体の 9.9% に当たる 25 検体から 26 株の STEC が分離された。26 株は全て stx2 の

み陽性であった。26 株について、各株における性状解析結果を表 1 に示した。

(1)-2. stx サブタイプの特異

コロニーPCR により分離された 26 株について stx subtyping PCR を実施した。全ての株が stx2 のみ陽性であったため stx2 のサブタイプについてのみ調べた。結果、26 株全て stx2e 陽性を示し、stx2a, 2b, 2c, 2d, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。

(1)-3. 凝集試験または 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) の特異

コロニーPCR により分離された 26 株について抗病原性大腸菌血清を用いた免疫血清凝集試験を行った。凝集試験で O 抗原が決定されたのは O8 で 5 株であった。凝集試験で O 抗原が決定されなかった 21 株は Og-typing PCR によって Og 型が決定された。最も多かったのは Og8 の 11 株で、次に Og9 の 4 株であった。他に Og89,101,162 が 2 株、Og22, Og100, Og180 が 1 株ずつ検出された。1 株 (表 7 の株番号 11) は凝集試験および Og-typing PCR で O 抗原型または Og 型を決定することができなかった。

(1)-4. 病原性因子遺伝子の検出

コロニーPCR により分離された 26 株について、6 種類 (stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE) の病原性遺伝子の保有状況を調べた。26 株全てで stx2 は検出されたものの、stx 以外の病原性遺伝子は検出されなかった。

(1)-5. 薬剤感受性試験

コロニーPCR により分離された 26 株について、11 種類 (ABPC, CEZ, CTX,

GM, KM, TC, NA, CPF, CP, ST, MEPM)の薬剤に対する感受性を調べた。全ての薬剤に対して感受性であった株は無く、全ての株が単一または複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した。26株のうち複数の薬剤に対して中間耐性または耐性を示した株は23株であった。中間耐性または耐性を示した株が多かった薬剤はABPC, ST, KM, TCで、これらの薬剤に対して半分以上の株が耐性または中間耐性を示した。また、KMについては感受性を示した株は認められなかった。一方、CEZ, CTXについては全ての株が感受性を示した。

(1)-6. PFGEの結果

コロニーPCRで得られた26株について制限酵素Xba Iを用いたPFGEを実施した。得られた泳動像を図2-1に示した。O8またはOg8の16株から2つ(g, h), Og9の4株から1つ(i), PFGEパターンの類似したグループがあった。グループg, hについては制限酵素Bln Iを用いたPFGEを実施した(図2-2)。グループgは株番号6~8(表1)の3株で構成された。採材日は3株とも2021年7月27日で検体番号が8, 9, 10と連続していた。この3株はXba I, Bln Iともに類似したパターンを示し、薬剤感受性についてABPC, STに耐性, KMに中間耐性を示した点は共通であったが、TCに6番は耐性を示したのに対し7, 8番は中間耐性であった点, GMに6, 8番は感受性を示したのに対し7番は中間耐性であった点で差異が見られた。グループhは株番号13~16の4株で構成された。採材日は4株とも2021年7月

27日で検体番号は78, 80, 83, 89であった。この4株はXba Iでは類似したパターンを示したが、Bln Iで切断した場合に株14と15は類似したパターンだったものの、株13と16では類似性は高いが少し違うパターンとなった。13, 14, 15番は薬剤感受性の結果は全て共通していたが、16番のみABPCとSTに対し感受性を示した点で他の3株と異なっていた。

グループiは株番号22, 23の2株で構成された。採材日は2株とも2022年6月22日で検体番号は25, 31であった。この4株はXba Iでは一見類似したパターンであったが、一部若干の違いがみられた。株番号25はGMに感受性であったが、株番号31は中間耐性を示した点で異なっていた。

(2)-1 豚肉検体におけるSTECスクリーニング及び分離

豚ミンチ肉48検体および豚小腸4検体についてstx1, stx2遺伝子の有無を調べた。すべての検体でstx1, stx2ともに陰性であり、陽性を示した検体はなかった。検体の情報と結果の一覧を表2に示した。分離培養では豚ミンチ肉48検体のうち24検体, 豚小腸は4検体すべてでマッコスキー寒天培地に大腸菌と推測される乳糖発酵菌がみられた。豚ミンチ肉11検体では大腸菌の可能性が低い菌がみられ、13検体ではコロニーがみられなかった。

D. 考察

本研究では豚の直腸便521検体よりSTECを分離し、その株について性状解析した。

検体における *stx1*, *stx2* のスクリーニングでは 48.4%に当たる 252 検体で *stx1*, *stx2* のいずれかまたは両方が陽性を示した。また陽性になった 252 検体のうち 246 検体は *stx2* 陽性であった。また STEC 株分離率は 4.8%であった。

日本における豚糞便から分離された STEC について、木島らは STEC 分離率 14%, 小林は *stx* 陽性率 4.9%, 福山らは STEC 分離率 10.7%と報告している^{1), 2), 3)}。一方、アメリカでは Cha らの縦断的コホート研究で調査期間中に 68.3%の豚から少なくとも1回は STEC が検出され、Fratamico らは *stx* 陽性率 70%, Remfry らはリアルタイム PCR による調査で *stx* 陽性率 70.1%であったと報告している^{4), 5), 6)}。本研究では分離率は 4.8%とそれほど高くなかったものの、*stx* 陽性率は 48.8%とこれまで国内で報告されてきたものより高い数値となった。アメリカでは先述のように高い STEC 陽性率、分離率が報告されており、国内では 1999 年に中沢ら、2003 年には福山らによって健康な豚から O157:H7 の分離が確認されているため^{7), 8)}、引き続き国内の豚の STEC 陽性率や分離株の性状について調査する必要があると考えられる。分離率が低かった理由としてはバックグラウンドの微生物が多かった可能性や、目的の大腸菌が VBNC の状態であった可能性、手技的な問題等が挙げられる。

本研究で分離された 26 株は全て *stx2e* を保有していた。また 26 株中 16 株は O8 または Og8 に分類され、続いて Og9 が 4 株、Og89,101,162 が 2 株、他には Og100, Og22, Og180, Og 不明が 1 株ずつ得ら

れた。豚では *Stx2e* 産生性 STEC による浮腫病が知られている。浮腫病が発生するためには *Stx2e* 産生性 STEC が小腸に移行し、定着することが前提条件となる⁹⁾。Parma らはアルゼンチンにおける調査で O8, O138, O139 が浮腫病と関連していると報告している¹⁰⁾。またアメリカにおける Remfry らの報告では O8 が豚で最も頻繁に分離されており、今回の結果と一致した⁶⁾。よって今回分離された株は浮腫病原因菌の特徴である F18 線毛の有無を調査するなどさらなる検討が必要であると考えられる。

一方、ヒトで食中毒の原因となることが多い O26, O103, O111, O121, O145, O157 といった主要 6 抗原の血清型の株は本研究では分離されなかった。病原性因子についても *eae* や *hlyA* といった病原性に大きく関わりとされる遺伝子は検出されなかった。Friedrich らによると *stx2e* はヒトの下痢症に関連している可能性はあるが HUS との関連はないとされるため¹¹⁾、本研究で豚より分離された株はヒトに重篤な病態をもたらす可能性は低いと考えられる。一方、緒言でも述べたように下痢症や HUS 患者から *Stx2e* 産生株が検出された例もあり、Zweifel らは豚の *Stx2e* 産生 STEC がヒトへの感染源となる可能性を排除できないと報告していることから¹²⁾、病原性因子についてさらに調査するなど、ヒトへの影響についてはさらなる検討が必要であると考えられる。

薬剤感受性試験ではアンピシリン、ST 合剤、カナマイシン、テトラサイクリンに

ついて耐性または中間耐性を示す株が多数得られた。本研究で薬剤感受性試験に使用した薬剤では、テトラサイクリン、スルファメトキサゾール、アンピシリン、トリメトプリム、カナマイシンの順に実際の使用量が多い¹³⁾。したがって今回得られた結果については抗菌薬の使用量の多さが原因となり耐性菌が認められたと考えられる。一方、ヒトの医療に重要とされる第三代セファロスポリンのセフォタキシムについては全ての株が感受性を示した。フルオロキノロン系薬剤のシプロフロキサシンについては中間耐性を示した株が認められたものの耐性を示した株は認められなかった。以上のことから薬剤耐性のみについて考えるとヒトの医療に重大な影響を与えうるような STEC の薬剤耐性状況ではないと言える。

PFGE の結果、類似したパターンを示したグループが 3 つ (g, h, i) あった。グループ g の株は Xba I, Bln I 共に類似したパターンを示した。これらは採材日が同じかつ検体番号が近いこと、同一農場由来の可能性が高いと考えられる。また、グループ h と i では類似したパターンをもつ株の中に、わずかに相違がある株がみられた。よってこれらは関連性を示唆する株と考えられる。さらに、スクリーニングにおいて陽性検体がある程度まとまっていたこともあわせて考えると、農場ごとに STEC の保持状況に差がある可能性が示唆される。

よって今後、農場間の差や農場をまたいで同一株が拡散しているかについて調査するためには、検体の由来農場につい

て把握することが必要だと考えられる。

本研究ではさらに豚検体および豚小腸検体における STEC 汚染状況を調査した。PCR によるスクリーニングの結果 stx 遺伝子陽性の検体はなく、今回調べた豚肉の STEC 汚染は極めて少ないと考えられた。その理由としては、今回調査した豚肉を処理した処理場や加工場での衛生管理レベルが高いことが考えられる。しかし今回の調査では検体数も少なく、前述のように糞便における STEC 陽性率は高い値であったことから、今後も調査を継続する必要があると考えられる。

(参考文献)

1. Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Kojima A, Morioka A, Nagata R, Kawanishi M, Nakazawa M, Tamura Y and Takahashi T. (2005). A national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 52(5): 230-237.
2. 小林秀樹. (2014). 牛・豚が保有する病原性大腸菌の細菌学的特性の解明と疫学的解析基盤の構築. 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 技術情報集: 149-155.
3. 福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二, 八木原怜子, 小泉雄史, 原元宣, 堂ヶ崎知格, 島田時博, 栗林尚志, 中澤宗生, 渡邊忠男. (2003). 豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型. *感染症学雑誌*. 77(12): 1032-1039.
4. Cha P, Fratamico PM, Ruth LE,

Bowman AS, Nolting JM, Manning SD and Funk JA. (2018). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *Int J Food Microbiol.* 264: 8-15.

5. Fratamico PM, Bagi LK, Bush EJ and Solow BT. (2004). Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study. *Applied and Environmental Microbiology.* 70(12): 7173-7178.

6. Remfry SE, Amachawadi RG, Shi X, Bai J, Woodworth JC, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, DeRouchey JM and Nagaraja TG. (2020). Polymerase Chain Reaction-Based Prevalence of Serogroups of *Escherichia coli* Known to Carry Shiga Toxin Genes in Feces of Finisher Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease.* 17(12):782-791.

7. Nakazawa M, Akiba M and Sameshima T. (1999). Swine as a Potential Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerging Infectious Diseases.* 5(6): 833-834.

8. 福山正文, 古畑勝則, 大仲賢二, 八木原怜子, 小泉雄史, 原元宣, 堂ヶ崎知格, 島田時博, 栗林尚志, 中澤宗生, 渡邊忠男. (2003). 豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型. *感染症学雑誌.* 77(12): 1032-1039.

9. 小林秀樹. (2018). 豚の浮腫病と離乳

後下痢ならびにそれらの対策について. *All about SWINE.* 53: 13-24.

10. Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J and Blanco M. (2000). Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Veterinary Microbiology.* 72(3-4): 269-276.

11. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A and Karch H. (2002). *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Diseases.* 185: 74-84.

12. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J and Stephan R. (2006). Virulence profiles of Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Veterinary Microbiology.* 117(2-4): 328-332.

13. 農林水産省動物医薬品検査所. (2020). 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量. *動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報 別冊.*

E. 結論

本研究では豚糞便 521 検体より STEC を分離し, その株について性状を解析した。*stx* 陽性率は 48.8% となり, 25 検体から 26 の株が分離された。陽性率はこれまで国内で報告されてきたものより高い値となったが, 公衆衛生学的に重要である, 主要な O 抗原や病原性因子を保有するような食中毒リスクの高い株は分離されなかつ

た。

さらに本研究では豚ミンチ肉 48 検体および小腸 4 検体における STEC 汚染状況を調査した。*stx* 陽性検体はなく、STEC による汚染の可能性は低いと考えられた。

今後は豚糞便由来株について由来農場の情報を収集する他、調査を継続し情報を蓄積すること、また調査する豚肉製品の種類を増やすことが必要であると考え。豚糞便や豚肉由来 STEC について日本国内における報告は限られているため、本調査を継続することは STEC 食中毒の原因究明の一助となると考えられる。

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

・山田翔子, 和賀萌美, 推野千紘, 山崎朗子, 寺嶋淳. 岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便および豚肉における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会 令和 4 年 11 月 9 日~11 月 11 日

・山田翔子, 和賀萌美, 推野千紘, 山崎朗子, 寺嶋淳. 岩手県の食肉処理場に搬入された豚の直腸便における志賀毒素産生性大腸菌の性状解析. 第 24 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 令和 4 年 10 月 13 日~10 月 14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

図1 採材日別陽性率

210419		
1		51
2		52
3		53
4		54
5		55
6		56
7		57
8		58
9		59
10		60
11		61
12		62
13		63
14		64
15		65
16		66
17		67
18		68
19		69
20		70
21		71
22		72
23		73
24		74
25		75
26		76
27		77
28		78
29		79
30		80
31		81
32		82
33		83
34		84
35		85
36		86
37		87
38		88
39		89
40		90
41		
42		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
50		

210727		
1		51
2		52
3		53
4		54
5		55
6		56
7		57
8		58
9		59
10		60
11		61
12		62
13		63
14		64
15		65
16		66
17		67
18		68
19		69
20		70
21		71
22		72
23		73
24		74
25		75
26		76
27		77
28		78
29		79
30		80
31		81
32		82
33		83
34		84
35		85
36		86
37		87
38		88
39		89
40		
41		
42		
43		
44		
45		
46		
47		
48		
49		
50		

211221		
1		51
2		52
3		53
4		54
5		55
6		56
7		57
8		58
9		59
10		60
11		61
12		62
13		63
14		64
15		65
16		66
17		67
18		68
19		69
20		70
21		71
22		72
23		73
24		74
25		75
26		76
27		77
28		78
29		79
30		80
31		81
32		82
33		83
34		84
35		85
36		86
37		87
38		88
39		89
40		90
41		91
42		92
43		93
44		94
45		95
46		96
47		97
48		98
49		99
50		100
		101

220602			
1		51	101
2		52	102
3		53	103
4		54	104
5		55	105
6		56	106
7		57	107
8		58	108
9		59	109
10		60	110
11		61	111
12		62	112
13		63	113
14		64	
15		65	
16		66	
17		67	
18		68	
19		69	
20		70	
21		71	
22		72	
23		73	
24		74	
25		75	
26		76	
27		77	
28		78	
29		79	
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41		91	
42		92	
43		93	
44		94	
45		95	
46		96	
47		97	
48		98	
49		99	
50		100	

220802			
1		51	101
2		52	102
3		53	103
4		54	104
5		55	105
6		56	106
7		57	107
8		58	108
9		59	109
10		60	110
11		61	111
12		62	112
13		63	113
14		64	114
15		65	115
16		66	116
17		67	117
18		68	118
19		69	119
20		70	120
21		71	121
22		72	122
23		73	123
24		74	124
25		75	125
26		76	126
27		77	127
28		78	128
29		79	129
30		80	
31		81	
32		82	
33		83	
34		84	
35		85	
36		86	
37		87	
38		88	
39		89	
40		90	
41		91	
42		92	
43		93	
44		94	
45		95	
46		96	
47		97	
48		98	
49		99	
50		100	

表1 豚由来 26 株の性状一覧

株番号	採材日 (年月)	検体番号	stx	O抗原	Og-typing	病原性因子							薬剤耐性							PFGE				
						stx1	stx2	fli-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST	MEPM	Xba I	Bln I
1	210419	#3-2	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	I	S	I	S	S	S		
2	210419	#77-1	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	S	S	R	I	S		
3	210419	#78-7	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	S	S	I	S	R	S		
4	210419	#78-11	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	R	S	S		
5	210727	#1-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	R	R	S	S	R	R	S		
6	210727	#8-20	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	R	S	g	g
7	210727	#9-2	2e	O8	—	×	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	I	S	S	S	R	S	g	g
8	210727	#10-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	g	g
9	210727	#23-1	2e	—	Og100	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	I	S	R	S		
10	210727	#38-15	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	I	I	R	S		
11	210727	#40-1	2e	—	OgUT	×	○	×	×	×	×	R	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S		
12	210727	#70-3	2e	—	Og180	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	S		
13	210727	#78-20	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h'
14	210727	#80-18	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
15	210727	#83-1	2e	O8	Og8	×	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	h	h
16	210727	#89-5	2e	—	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	h	h''
17	211221	#2-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S	S		
18	211221	#3-2	2e	-	Og89,101,162	×	○	×	×	×	×	S	S	S	R	I	S	S	I	S	S	S		
19	211221	#24-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S		
20	211221	#87-2	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S		
21	211221	#93-1	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S		
22	220622	#25-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	i	
23	220622	#31-5	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	i'	
24	220622	#39-3	2e	-	Og8	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S		
25	220622	#66-7	2e	-	Og9	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S		
26	220802	#124-10	2e	-	Og22	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S		

図 2-1 XbaI を用いた PFGE 結果

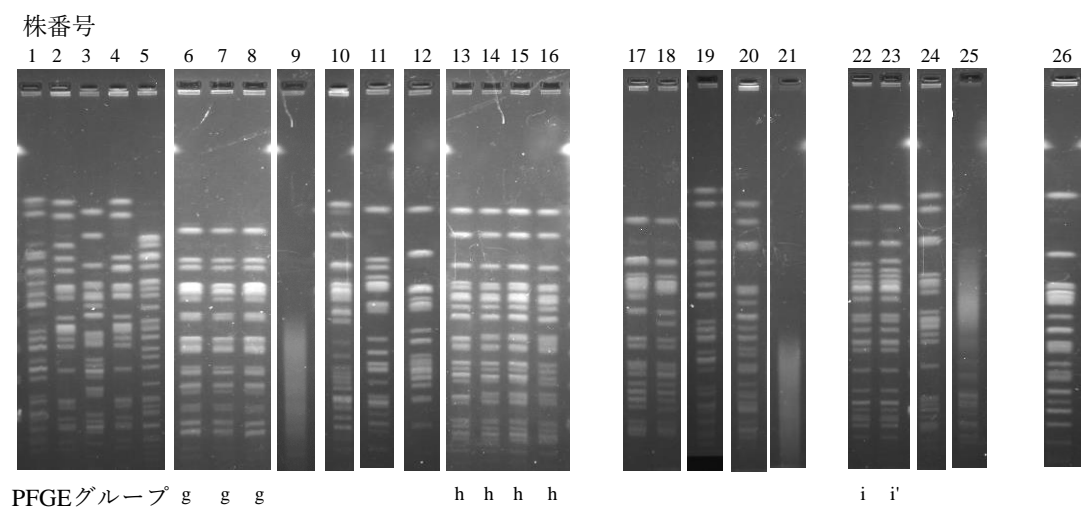


図 2-2 BlnI を用いた PFGE 結果

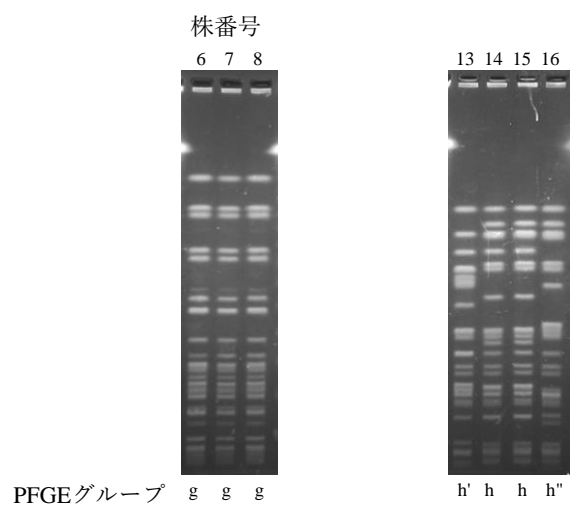


図 2 豚糞便から分離された STEC 26 株 PFGE 結果

表 2-1 豚ミンチ肉における結果

	購入日	購入場所	stx1	stx2	分離培養	
					(○:大腸菌)	(△:その他の菌)
1	220630	A	-	-		△
2	220630	A	-	-		△
3	220630	B	-	-	○	
4	220630	B	-	-		-
5	221017	A	-	-		△
6	221017	A	-	-		-
7	221017	B	-	-		△
8	221017	C	-	-		△
9	221017	C	-	-	○	
10	221017	D	-	-		△
11	221017	E	-	-	○	
12	221017	E	-	-	○	
13	221019	F	-	-		-
14	221019	F	-	-		-
15	221023	C	-	-		-
16	221023	C	-	-		○
17	221024	F	-	-		○
18	221024	F	-	-		○
19	221024	G	-	-		○
20	221024	E	-	-		△
21	221024	E	-	-	○	
22	221024	E	-	-	○	
23	221026	A	-	-		-
24	221026	A	-	-		△
25	221026	B	-	-		-
26	221026	B	-	-	○	
27	221026	E	-	-		-
28	221026	E	-	-		○
29	221031	A	-	-		-
30	221031	A	-	-		△
31	221031	B	-	-	○	
32	221031	B	-	-	○	
33	221031	I	-	-		△
34	221031	E	-	-		-
35	221031	E	-	-	○	
36	221102	F	-	-		-
37	221102	F	-	-		△
38	221103	I	-	-		○
39	221103	E	-	-		○
40	221103	E	-	-		○
41	221107	A	-	-		-
42	221107	A	-	-		-
43	221107	B	-	-		○
44	221107	B	-	-		○
45	221107	I	-	-		○
46	221107	E	-	-		○
47	221107	E	-	-		○
48	221107	E	-	-		○

表 2-2 豚小腸における結果

	購入日	購入場所	stx1	stx2	分離培養	
					(○:大腸菌)	(△:その他の菌)
1	220630	A	-	-	○	
2	221026	A	-	-	○	
3	221031	A	-	-	○	
4	221107	A	-	-	○	