

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)

研究課題名：「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」

令和 2-4 年度 (総合) 分担研究報告書

分担研究者	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	推野千紘	岩手大学農学部	共同獣医学科
研究協力者	桑原多佳子	岩手大学農学部	共同獣医学科

研究要旨 2020年5月から2022年8月までに岩手県の食肉処理場で採取した牛の直腸便 591 検体及び豚の直腸便 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。また、市販の豚挽肉及び小腸検体について STEC の分離を試みた。牛では、stx 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出された。豚の直腸便 521 検体のうち 252 検体 (48.4%) が stx 陽性となり、20 検体 21 株が単離された。単離株はすべて stx 2e を保有しており、15 株は 08 または 0g8 であった。豚挽肉及び小腸検体から stx は検出されなかった。豚由来株における STEC の陽性率は高かったものの、主要な O 抗原をもつ株や、病原性因子 eae をもつ株など、食中毒リスクの高い株は分離されなかった。また、牛由来株との比較から、PFGE 解析の結果を含めて、牛と豚に共通した株が拡散している可能性は低いことが示唆された。

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が 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) 牛及び豚の直腸便からの STEC の分離収集

2020 年 5 月から 2022 年 8 月までに岩手県の食肉処理場に搬入された牛 591 頭の直腸便、豚 521 頭の直腸便及び市販の豚肉を材料とした。採取した豚直腸便については明確な由来農場を把握することができなかったため、詳細な疫学的情報は不明である。糞便サンプル 1 g をノボバイオシナトリウム (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 らの設計した 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
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, 一晩培養した。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, 一晩培養して 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 で一晩培養した。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 μ L)

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 μ L)

HotStarTaq	10 μL
Water	4.0 μL
Forward primer	0.25 μL
Reverse primer1	0.25 μL

Reverse primer2 0.25 μ L
Reverse primer3 0.25 μ L
Template DNA 5.0 μ L
・ 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 区画に対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 O_g 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 μL)

5 × KAPA Taq Extra buffer no Mg

(KAPA) 6.0 μL

Water 14.42 μL

Primer Mix 3.52 μL

MgCl₂ (KAPA) 3.0 μL

dNTP mix (KAPA) 0.9 μL

KAPA Taq DNA polymerase (KAPA)

0.16 μL

Template DNA 2.0 μL

・ PCR 反応条件

94°C, 1 分間

94°C, 30 秒間

58°C, 30 秒間 25 サイクル

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 μM 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 (20μL)

10×PCR buffer, -Mg (Invitrogen, カリフォルニア州) 2.0 μL

MgCl₂ (Invitrogen, カリフォルニア州) 3.0 μL

Primer Mix 1.92 μL

dNTP mix (Invitrogen, カリフォルニア州) 0.48 μL

Taq DNA polymerase (Invitrogen, カリフォルニア州) 0.5 μL

Water 11.1 μL

Template DNA 1.0 μL

PCR 反応条件

94°C 5 分間

94°C 30 秒間

58°C 30 秒間 25 サイクル

72°C 75 秒間

68°C 7 分間

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200µL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200µL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1mL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1.5mm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 500µL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 1mL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)200µL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、20unitsの制限酵素XbaIを含む反応液100µL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 とするよう調整とした。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) と同様に培地 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 μ L 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 μ L 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. 牛及び豚直腸便サンプル における STEC スクリーニング及び分離

牛の直腸便 591 検体のうち stx1 または stx2 が陽性を示した検体は 140 検体 (23.7%) であった。140 検体のうち、27 検体 (4.6%) は stx1 のみ、89 検体 (15.1%) は stx2 のみ、24 検体 (4.1%) は stx1 および stx2 について陽性を示した。stx 陽性を示した 140 検体についてコロニー PCR を実施し、STEC 株を分離した。140

検体のうち、全体の 5.9%、陽性検体の 25% に当たる 35 検体から 39 株の STEC が分離された。39 株のうち 10 株は stx1 のみ、19 株は stx2 のみ、10 株は stx1 および stx2 陽性であった。39 株について、各株における性状解析および PFGE の結果を表 1-牛、図 1-牛に示した。

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 2)。

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 2 に示した。

2. stx サブタイプの特異性

牛では、コロニー PCR により分離された 39 株について stx subtyping PCR を実施した。stx1 陽性を示した 20 株は全てサブタイプ

stx1a に属した。stx2 陽性を示した 29 株は stx2a, 2c, 2d のいずれかまたは複数を有しており、stx2b, 2e, 2f, 2g を有する株は検出されなかった。stx サブタイプの組み合わせとして 1a/2a : 2 株, 1a/2d : 4 株, 1a/2a/2c : 2 株, 1a/2a/2d : 1 株, 1a/2c/2d : 1 株, 2a/2c : 2 株, 2a/2d : 1 株, 2c/2d : 2 株, 2a/2c/2d : 2 株が得られた。豚では、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。

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) の特定

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 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 0136 : 5 株, 08 : 4 株, 0157 : 2 株, 0103 : 1 株の 12 株であった。凝集試験で O 抗原が決定されなかった 27 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 Og113 : 7 株で、Og22 : 6 株, Og116 : 4 株, Og2, 50 : 2 株と続いた。他に Og136, Og103, Og117, 107, Og117, 107+Og179, Og130, Og163, Og171, Og183 が 1 株ずつ検出された (表 1 - 牛)。

コロニーPCRにより分離された豚由来 26 株の凝集試験で O 抗原が決定されたのは 08 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。

4. 病原性因子遺伝子の検出

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 株について、6 種類 (stx1, stx2, eae, fliC, hlyA, rfbE) の病原性因子遺伝子の保有状況を調べた。39 株のうち各遺伝子について陽性を示したのは stx1 : 20 株, stx2 : 29 株, eae : 4 株, fliC : 5 株, hlyA : 23 株, rfbE : 2 株であった。eae を有した株は 0103 株, Og136 株, 0157 株, 計 4 株であった。fliC を有した株は Og22 株, Og113 株, 0157 株, 計 5 株であった。hlyA を有した株は 0103 株, Og116 株, Og130 株, 0136 または Og136 株, 0157 株, Og163 株, Og2, 50 株, OgUT 株, 計 23 株であった。rfbE を有した株は 0157 株のみであった (表 1 - 牛)。

豚由来 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。

5. 薬剤感受性試験

牛では、コロニーPCRにより分離された 39 株について、10 種類 (ABPC, CEZ, CTX, GM, KM, TC, NA, CPF, CP, ST) 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 4 株で、他の 35 株は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。35 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 20 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 TC, ABPC, KM, CP で、KM については半分以上 (28 株) が中間耐性であった。また CP 耐性を示した 8 株のうち 3 株は ABPC と TC, 4 株は TC についても耐性を示した。一方、CEZ, CTX, NA については全てまたはほとんどの株が感受性を示した (表 1-牛)。

豚由来 26 株については、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。

6. PFGE の結果

牛では、コロニーPCR で得られた 39 株について PFGE を実施した。得られた泳動像は図 1-牛に示した。

0g113 の 7 株は PFGE により 3 グループ (a, b, c) に分類された。グループ a を構成する株番号 1, 2 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された黒毛和種であった。グループ a は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。グループ b

を構成する株番号 3, 4, 7 の株はそれぞれ別の都道府県から得られた株であった。個体はいずれも去勢された黒毛和種であった。性状について 7 番の株のみ stx2c, flhC を保有していた点や薬剤耐性、中間耐性を示す薬剤の種類について差異が見られたものの、stx1a/2d を有していた点、ABPC と TC に耐性を示した点は共通していた。グループ c を構成する株番号 5, 6 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも雌の交雑種であった。5 番は stx2c/2d を保有していたのに対し 6 番は stx2a/2c/2d を保有していた点で差が見られたが、保有していた病原遺伝子や薬剤耐性を示した薬剤は共通していた。

0136 または 0g136 を示した 6 株のうち 3 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ d)。グループ d を構成する株番号 11, 12, 13 の株は同一都道府県内の 2 農場から得られた株であった。個体はいずれも雌の交雑種であった。薬剤耐性について 11, 12 は KM に中間耐性を示したが、13 は感受性であった点で差異が見られたが、stx サブタイプや保有していた病原遺伝子については共通していた。

0g22 の 6 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ e)。個体はどちらも雌であり、一方は黒毛和種、一方は交雑種であった。グループ e を構成する株番号 14, 15 の株は異なる都道府県から得られた株であった。グループ e は PFGE パターンとともに解析した全ての性状も同じ結果を示した。

0g116 の 4 株のうち 2 株で同一 PFGE パターンが確認された (グループ f)。グループ f を構成する株番号 25, 26 の株は同一農場内の別個体から得られた株であった。個体はどちらも去勢された交雑種であった。薬剤耐性について 25 は KM に対して中間耐性であったのに対し 26 は感受性であった点で差異が見られたが, stx サブタイプや保有していた病原因子遺伝子, 耐性を示した薬剤については共通した結果が得られた (図 1-牛)。

豚由来 26 株について得られた泳動像を図 3-1 に示した。08 または 0g8 の 16 株から 2 つ (g, h), 0g9 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 3-2)。グループ g は株番号 6~8 (表 2) 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。

7. 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 とともに陰性であり, 陽性を示した検体はなかった。

D. 考察

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚の直腸便 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

まず牛では, 検体における stx のスクリーニングにおいて 23.7%に当たる 140 検体で stx1, stx2 のいずれかまたは複数が陽性を示した。

李らの報告において国内 7 地域 15 県の 110 農場から収集した 551 の牛糞便検体の PCR による stx 陽性率は 24.1% (133 検体) とされており¹⁾, 本研究ではこれに近い結果が示された。本研究で対象となった牛は北日本 6 道県に限定されていたが, 李らの

報告の結果と stx 陽性率に大きな差がないことから、STEC の保有に地域差はなく、北日本6道県の牛でも国内の他の地域と同様の STEC 保菌率であると考えられる。本研究では凝集試験法または 0g-typing PCR 法で 0 抗原型、0g 抗原型を決定し、4 種類の 0 抗原型と 12 種類の 0g 型が検出された。最も得られた株数の多かった 0 型、0g 型は 0g113 であった。026, 0103, 0111, 0121, 0145, 0157 は国内におけるヒト由来腸管出血性大腸菌の主要な 0 抗原とされているが²⁾、このうち本研究で検出されたのは 0103, 0157 の 2 種類のみであった。また stx のサブタイプと病原性因子遺伝子 (stx1, stx2 の他に、eae, fliC, hlyA, rfbE) を PCR で調べた結果、検出されたサブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であった。FAO/WHO STEC Expert Group の報告では、HUS などの重篤な病態と関連している stx サブタイプは stx1a, stx2a, stx2c, stx2d の 4 種類であり、加えて eae の存在が病原性に大きく関与している³⁾。また Ethelberg らは特に stx2 と eae の両方を保有することが HUS を引き起こす重要な因子であるとしている⁴⁾。本研究で得られた株のうち、eae を保有した株は 0103 株、0g136 株、0157 株であったが、stx2 もともに保有していたのは 0157 株のみであった。0157 株は今回調査した病原性因子遺伝子を全て保有していた。以上より、本研究で得られた STEC の分離株のうち、0157 株は高い病原性を有している可能性があると考えられた。0g113 については stx の他に hlyA を有する株が 2

株検出された。0113 は牛検体から分離される株の 0 抗原型として最も一般的であるとされており^{5), 6)}、今回はこれを支持する結果が得られた。Karmali らによる血清型を用いた STEC 病原性の疫学的分類では、0113 の一部はまれに HUS 散発例から検出されるグループ C に分類されており⁷⁾、実際にヒト臨床例から検出される例や HUS を引き起こす例も報告されている。1999 年の Paton らによって報告された、0113 が HUS を引き起こした例では、原因株は eae を欠損していた⁸⁾。また 2012 年の Monaghan らは臨床例から分離された 0113 株は hly を保有していたとしていたと報告している⁶⁾。以上より本研究で得られた 0g113 株の中にヒトに対して病原性を有する株が含まれている可能性は否定できない。ただし本研究で調べられた病原因子の数は stx を除いて 4 種類であり病原性を断定するには不十分であった可能性が高い。特に大腸菌の接着に関わる因子は病原性の決定に重要であり、saa や iha など eae 以外にも複数調べる必要があると考えられる。調査する病原性因子を増やすことで 0157 以外の株の病原性が明らかになることも十分に考えられる。

本研究で得られた株の 0 抗原型、0g 型と stx サブタイプについて、同じ 0 抗原または 0g 型を示した株では共通の stx サブタイプを保有している例が見られた。0g113 に分類された 7 株は全て stx2d を有しており、0136, 0g136 を示した 6 株は全て stx1a を有していた。0113 については共通して stx2d を有しているという報告が複数

存在する^{6), 9)}。今回の結果は O 抗原型と stx サブタイプにはある程度の相関があるとする説を支持するものとなった。stx サブタイプと病原性の関連が指摘されていることから、O 抗原型と stx サブタイプの相関が明らかになることで O 抗原型のみでの信憑性の高い病原性の推測ができるようになる可能性が考えられる。

薬剤感受性について、テトラサイクリン、アンピシリン、クロラムフェニコール、ST 合剤の順に耐性を示した株が多く、カナマイシンでは 28 株が中間耐性を示した。テトラサイクリン、アンピシリン、サルファ剤、カナマイシンは牛での使用量の多い抗菌薬である¹⁰⁾。これら 4 剤については抗菌薬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。一方でクロラムフェニコールについては使用実態が無いのにも関わらず耐性菌が複数認められた。クロラムフェニコール耐性を示した株はアンピシリン、テトラサイクリンについても耐性を示している株が多く、原田らの報告ではクロラムフェニコール耐性が他薬剤によって共選択されている可能性が指摘されている¹¹⁾。したがって今回検出されたクロラムフェニコール耐性はアンピシリンやテトラサイクリンによって共選択されたものと考察された。このように抗菌薬の乱用は使用していない薬剤に対する耐性菌の出現も促進すると考えられるため、抗菌薬の慎重な使用が引き続き求められる。

STEC の主要 6 抗原に分類される O103, O157 の株はどの薬剤に対しても耐性を示

さなかった。また 3 剤以上耐性を示した株は 39 株中 4 株であった。ヒトの医療に重要とされる第三世代セファロスポリンのセフトキシムや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全てまたはほとんどの株が感受性を示した。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由々しき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。STEC における薬剤耐性菌の出現状況が悪化しないよう、抗菌薬の慎重な使用に加え定期的なモニタリングも求められる。

PFGE では個体、農場、都道府県をまたいで同一泳動パターンの株が得られた。調査した遺伝子の保有状況や薬剤感受性については差異が見られたが、PFGE パターンが同一であった株は由来が同じまたは比較的近縁であった可能性が高いと考えられる。今回の結果より農場内のみならず農場、都道府県をまたいで菌株が拡散している可能性が示唆された。今回拡散していることが確認された菌株は比較的病原性が低いと考えられるものであったが、高病原性の STEC が同様に拡散した場合、食中毒リスクが上昇する可能性が考えられる。菌株の拡散状況についてモニタリングを継続するとともに拡散経路を解明することで食中毒予防に貢献するものと考えられる。一方で PFGE では株の遺伝的近縁性のある程度予測することが限界であり、詳細な遺伝的近縁性を判断するには MLVA 法など別の方法により分子疫学的解析を強化することや全ゲノムシー

クエンスが必要である。STEC 分離株の解析情報と菌株に関する疫学情報を組み合わせることで、食中毒予防に向けたより信頼性の高い情報提供が可能になるものと考えられる。

一方、豚の直腸便 521 検体に由来する STEC 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^{12), 20), 21)}。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^{14), 22), 18)}。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 0157:H7 の分離が確認されているため^{15), 21)}、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 08 または 0g8 に分類され、続いて 0g9 が 4 株、0g89, 101, 162 が 2 株、他には 0g100, 0g22, 0g180, 0g 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²³⁾。Parma らはアルゼンチンにおける調査で 08, 0138, 0139 が浮腫病と関連していると報告している¹⁷⁾。またアメリカにおける Remfry らの報告では 08 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¹⁸⁾。よって今回分離された株は浮腫病との関連が疑われるため、今後浮腫病原菌の特徴である 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 026, 0103, 0111, 0121, 0145, 0157 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¹⁹⁾、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²⁴⁾、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²⁵⁾。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世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. Lee K, Kusumoto M, Iwata T, Iyoda S and Akiba K. (2017). Nationwide investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among cattle in Japan revealed the risk factors and potentially virulent subgroups. *Epidemiology & Infection*.**145**:1557-1566.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. (2014). 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について. 食安監発 1120 第 1 号.
3. FAO/WHO STEC Expert Group. (2019). Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-

- Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *Journal of Food Protection*. 82 (1) : 7-21.
4. Ethelberg S, Olsen KEP, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen AM, Olsen B, Gerner-Smidt P and Mølbak K. (2004). Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5): 842-847.
 5. Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I and Misawa N. (2014). Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *Journal of Food Protection*. 77(8):1269-1274.
 6. Monaghan AM, Byrne B, McDowell D, Carroll AM, McNamara EB and Bolton DJ. (2012). Characterization of farm, food, and clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O113. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9(12):1088-1096.
 7. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K and Kaper JB. (2003). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(11):4930-4940.
 8. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA and Paton JC. (1999). Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10):3357-3361.
 9. Miko A, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N, Krause G and Beutin L. (2009). Assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from wildlife meat as potential pathogens for humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(20):6462-6470.
 10. 農林水産省動物医薬品検査所. (2019). 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.
 11. Harada K, Asai T, Kojima A, Ishihara K and Takahashi T. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 67 (2) : 230-235.
 12. 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. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 52: 230-237.
 13. 小林秀樹. (2013). 動物における人獣共通病原性大腸菌の保有状況と特徴. 農林水産省委託プロジェクト 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 p26.
14. 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. *International Journal of Food Microbiology*. 264: 8-15.
 15. 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.
 16. 石川弘道 (2005). カラー版すぐに役立つ現場の豚病対策. 有限会社ベネット, 東京.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius 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 Disease*. 185: 74-84.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J and Stephan R. (2006). Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Veterinary Microbiology*. 117(2-4): 328-332.
 25. 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

本研究では牛の直腸便 591 検体及び豚 521 検体より STEC を分離しその株について性状解析した。

牛では、stx 陽性率は 23.7%となり、35 検体から 39 株が分離された。病原因子、薬剤感受性の観点から公衆衛生学的に対応が求められるような菌株の検出は少数にとどまった。一方、農場や都道府県をまたいで拡散している遺伝学的に近縁と考えられる菌株が検出された。

豚では、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った。

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。

また、本研究で得られた牛由来 STEC と豚由来 STEC を比較した結果、菌株の性状に関して共通点よりも相違点の方が多く認められた。豚由来 STEC について由来農場の情報を収集する他、調査を継続し結果を蓄積することが必要であると考えられる。豚由来 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 食中毒の原因究明に大きく貢献すると期待される。また牛由来 STEC との比較により拡散経路の解明の一助になると考えられる。

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

・和賀萌美，品川正臣，山田翔子，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志賀毒素産生性大腸菌の性状解析 第 42 回日本食品微生物学会学術総会(WEB 開催) 令和 3 年 9 月 21 日 (火) ～10 月 20 日 (水)

・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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

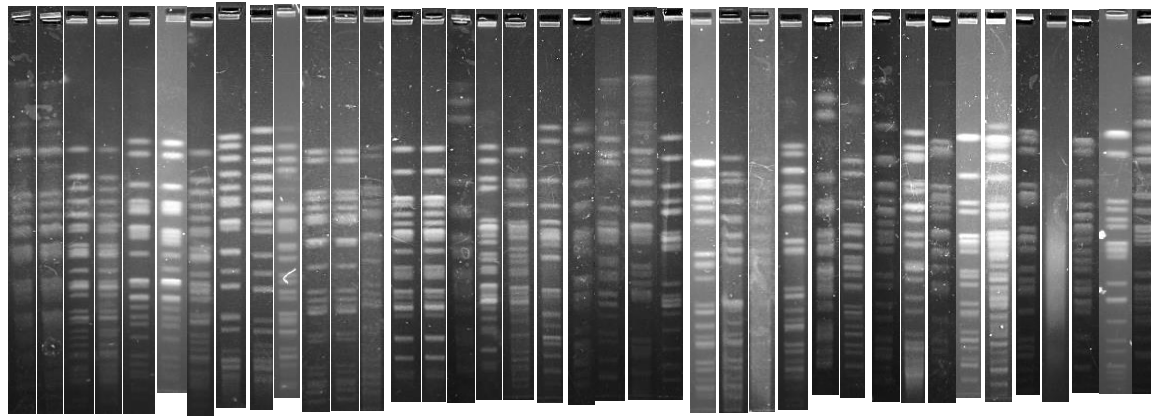
表-1 (牛)

株番号	採材日 (年月)	stx	O抗原	Og-typing	農場	齢(月-日)	品種	性別	病原性因子							薬剤耐性							PFGE		
									stx1	stx2	fla-C	eae	rfbE	hlyA	ABPC	CEZ	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX		CP	ST
1	200915	1a/2d	×	Og113	A	29-15	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	a
2	200915	1a/2d	×	Og113	A	30-3	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	a
3	210405	1a/2d	×	Og113	B	27-5	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	I	I	R	I	S	S	R	b
4	210405	1a/2d	×	Og113	C	30-2	黒毛和種	去勢	○	○	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	b
5	210609	2c/2d	×	Og113	D	25-3	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c
6	210609	2a/2c/2d	×	Og113	D	26-4	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	c
7	210714	1a/2c/2d	×	Og113	E	27-14	黒毛和種	去勢	○	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	b
8	200703	1a	O136	—	F	64-1	黒毛和種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
9	210205	1a	O136	—	G	27-27	交雑種	去勢	○	×	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
10	210205	1a	×	Og136					○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
11	210609	1a	O136	—	D	25-24	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d
12	210609	1a	O136	—					○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	d
13	210623	1a	O136	—	H	26-13	交雑種	雌	○	×	×	×	×	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	d
14	200610	2d	×	Og22	I	26-14	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e
15	200703	2d	×	Og22	J	28-27	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	e
16	200703	2c	×	Og22	K	25-2	交雑種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	
17	210405	2d	×	Og22	C	29-16	黒毛和種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
18	210714	2c/2d	×	Og22	E	27-14	黒毛和種	去勢	×	○	○	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
19	210714	1a/2a/2c	×	Og22	L	26-1	交雑種	去勢	○	○	○	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
20	200703	2a/2d	O8	—	F	37-16	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
21	210205	2c	O8	Og8	M	71-15	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
22	210205	2c	O8	Og8					×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
23	210405	1a/2a/2c	O8	Og8	N	26-14	交雑種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
24	210609	2a/2c	×	Og116	O	24-5	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	
25	210623	2a	×	Og116	H	26-5	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	f
26	210623	2a	×	Og116	H	25-28	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	f
27	210714	2a/2c	×	Og116	L	25-27	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	
28	200731	2a	×	Og2,50	P	27-4	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	
29	210714	2a/2c/2d	×	Og2,50	Q	26-19	交雑種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	
30	200731	1a/2a	O157	—	R	25-21	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
31	210714	1a/2a/2d	O157	—	L	26-7	交雑種	去勢	○	○	○	○	○	○	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	
32	200703	1a	O103	Og103	K	25-12	交雑種	雌	○	×	×	○	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
33	210609	1a	×	Og117,107	S	28-17	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	
34	210609	1a	×	Og117,107+Og179					○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	R	S	R	R	R	
35	200915	2a	×	Og130	T	189-24	黒毛和種	雌	×	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
36	210609	1a/2a	×	Og163	U	155-25	黒毛和種	雌	○	○	×	×	×	○	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
37	200731	2c	×	Og171	P	27-21	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	×	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	
38	210405	1a	×	Og183	C	29-30	黒毛和種	去勢	○	×	×	×	×	×	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	
39	210205	2a	×	OgUT	V	27-6	交雑種	去勢	×	○	×	×	×	○	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	

图 1 - 牛

No.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 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 36 37 38 39



a a b b c c b
PFGE Group

d d d e e

f f

図2 豚採材日別陽性率

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2 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 3-1 XbaI を用いた PFGE 結果

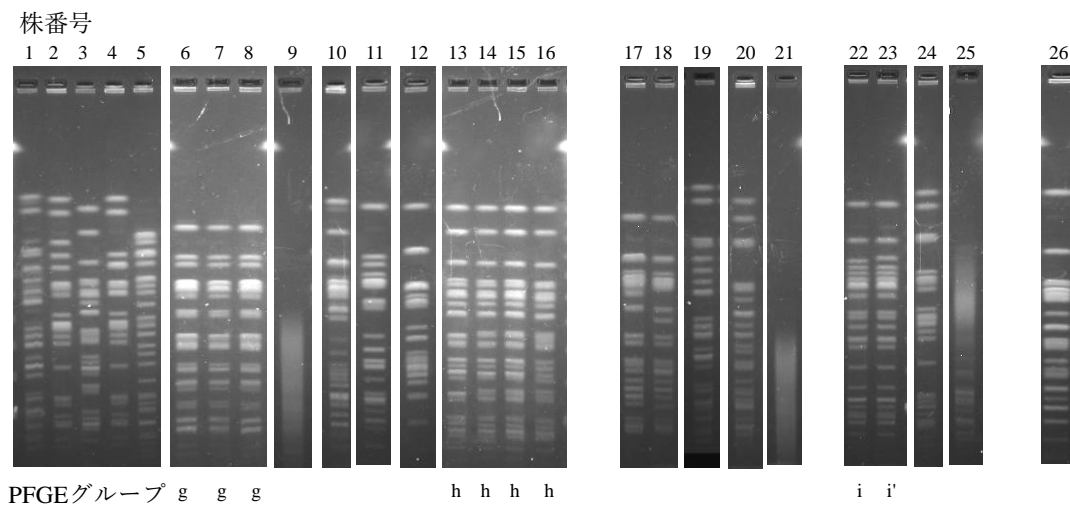


図 3-2 BlnI を用いた PFGE 結果

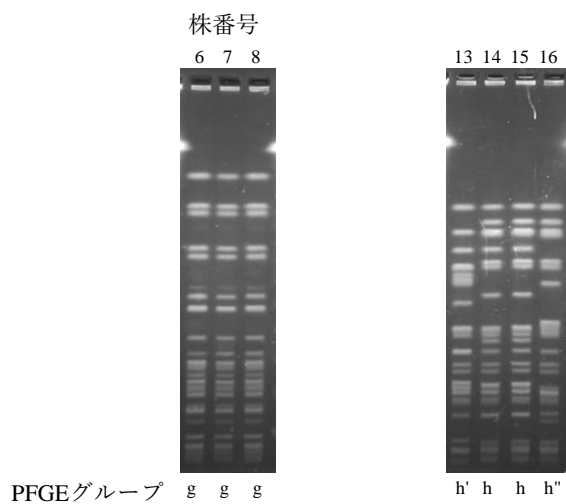


図 3 豚糞便から分離された STEC 26 株 PFGE 結果