

家畜および食肉等における腸管出血性大腸菌の 血清型別分布状況に関する調査研究

吉田紀美 青木紀子 田中 博 大瀬戸光明 井上博雄

A surveillance on the serological types distribution of
enterohaemorrhagic *E.coli* in the domestic animals and meats

Kimi YOSHIDA, Noriko AOKI, Hiroshi TANAKA,
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE

We have investigated the distribution of Enterohaemorrhagic *Echerichia coli* (EHEC) in domestic animals, pets and meats by the screening test using the PCR methods detecting verotoxin (VT) producing gene in the m-EC medium after cultivation, and many serotypes of EHEC were isolated by serotyping with commercially available antisera.

The rectum swabs of 143 cows, 50 pigs, 258 dogs and 128 cats were tested. As the results, 137 strains of EHEC from 82 cows (57.3%) were isolated, in which the classification by VT typing and serotype with commercially antiseras showed 5 strains (O157 serotype), 11 (O26), 5 (O152), 3 (O74), 3 (O119), 2 (O6), 1 (O111), 1 (O8), 1 (O168) and 105 (O untypable : OUT). Furthermore as 29 strains were *eaeA* gene positive, it was suggested that those strains might be infected to human. On the other hand EHEC were not detected about pigs, dogs and cats. And from two commercial meats EHEC (OUT) were isolated.

Keywords : enterohaemorrhagic *Echerichia coli* (EHEC), serological types,
domestic animals, pets, meats, verotoxin (VT),

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、1990年埼玉県浦和市の幼稚園で発生した O157 による集団発生事例以降、社会的に注目されるようになった。わが国における EHEC 感染症の血清型菌は O157 が主流を成しているが、近年、O157 以外の血清型菌による事例が増加傾向にあり、その血清型も多岐にわたっている¹⁾。さらに既存の免疫血清では型別不能の EHEC も分離されており、これら O157 以外の EHEC 感染症の疫学を調査する必要がある。EHEC の分離培養において、O157 の場合には適切な選択分離培地があり、種々の検体から選択的に O157 を分離できるようになった²⁾。しかし、その他の血清型菌では、O26, O111 等一部の血清型菌を

除いて適当な選択分離培地が無く、精度の高い分離・同定方法が確立されていない。このことが自然界における O157 以外の EHEC の分布調査を行う上で障害となっており、確実な分離同定方法が必要とされている。この問題点を解決し、EHEC を高率に分離するため、我々はベロ毒素 (VT) 遺伝子検出の PCR 法と平板分離培養法とを組み合わせることとした。

また、EHEC の感染源としては、これまでに国内で発生した事例や調査研究の結果から、ウシや食肉に関連した食品が感染源、感染経路になることが多い¹⁾。また、牧場のウシ³⁾ や学校で飼育していた羊からの感染など、動物との接触による事例も報告されている。動物における保菌状況の把握は同感染症の予防対策上重要と考えられ、また O157 以外の EHEC 感染症の疫学を知る上においても自然界における分布状況を調査する必要がある

と考えられる。

以上のことから、今回は家畜・愛玩動物における EHEC 保菌状況と市販の食肉、食肉関連食品等から EHEC を分離し、血清型別の分布状況を調査したので報告する。

対象と方法

1 検査対象

平成18年8月から平成19年10月に愛媛県内のと畜場に搬入されたウシ143頭およびブタ50頭、また県内全域から動物愛護センターに収容されたイヌ259頭およびネコ108頭を対象とし、直腸便を用いた。また、市販の食肉(牛・豚・鶏等)71検体を購入し、検査対象とした。

2 検査方法

食肉製品については25gを採取し、mEC培地225mlとともにストマッカーで粉碎し乳剤とした。動物の直腸便は滅菌綿棒でmEC培地に接種した。いずれの場合も42℃で18時間培養後、遺伝子増幅法(PCR法)によりVT産生遺伝子の検出を行い⁴⁾、VT遺伝子陽性となった増菌液のみ分離培養を行った。用いた培地は、セフォキシム・テルライト(CT)を含有したCT-SMAC、CT-RMAC、CT-SorMACおよびCT不含のMAC培地の4種類の分離培地を用いて培養を行った。35℃で18時間培養後、1検体あたり10~20株を釣菌し、全株、逆受身ラテックス凝集反応試薬(VTEC-RPLA)でVT産生試験を実施した。VT産生株は、生化学的性状試験と病原大腸菌免疫血清を用いた血清型別試験を行った。さらに、PCR法でヒト腸管粘膜上皮への接着に関する*eaeA*遺伝子の有無を確認した⁵⁾。

結果と考察

ウシの保菌調査の結果、29農場143頭のうち23農場82頭(57.3%)からEHECが分離された。分離株は計137株で、VT毒素型および血清型等で分別すると、1頭のウシから分離されるEHECの種類は1~6種類となった(図2)。1~2種類のEHECを保菌するウシが69頭と大半を占める一方で、5~6種類のEHECを保菌するウシも存在した。表1に6種類のEHECが分離されたNo.367の例を示した。4種類の分離培地からコロニーの色調の違いにより、15株を釣菌したところ、そのうち9株がVT陽性となった。血清型、毒素型の違いから少なくともO26(VT1), O74(VT2), O152(VT2), OUT(VT1), OUT(VT2), OUT(VT1,2)の6種類のEHECが分離され、ウシの腸管内には多種類のEHECが存在して

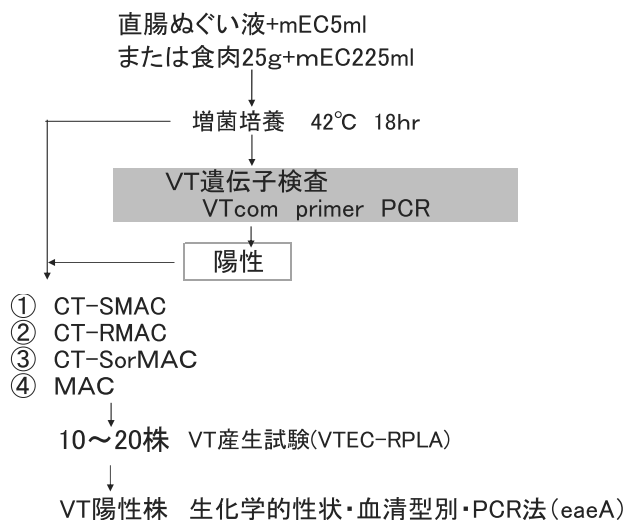


図1 PCR法を併用したEHEC検査方法

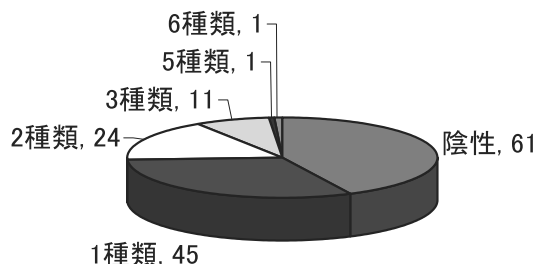


図2 ウシ143頭のEHEC保有状況(陽性82頭)

表1 EHEC釣菌・同定の具体例(ウシNo.367)

分離培地	集落の色調	VT	O血清型
CT-SMAC	white	1	OUT
	red	1.2	OUT
	red	1	O26
CT-RMAC	red	-	
	white	1	O26
CT-SorMAC	red	1.2	OUT
	white	2	O152
	red	1	O26
MAC	red	-	
	red	2	OUT
	red	-	
	red	2	O74

表2 ウシから分離されたEHECのO血清型別

O血清型	毒素型	株数	(<i>eaeA</i> +再掲)
O157	(VT1・2)	4	(4)
O157	(VT1)	1	(1)
O 26	(VT1)	11	(11)
O111	(VT1・2)	1	(1)
O 6	(VT1)	2	(0)
O 8	(VT2)	1	(0)
O 74	(VT1・2)	1	(1)
O 74	(VT2)	2	(1)
O119	(VT1)	3	(1)
O152	(VT2)	5	(0)
O168	(VT2)	1	(0)
小 計		32	(20)
O UT	(VT1)	9	(4)
O UT	(VT2)	79	(4)
O UT	(VT1・2)	17	(1)
小 計		105	(9)
計		137	(29)

いた。

82頭のウシから分離された137株のうち血清型別できたものは9種類の血清型に型別された。O157が5株、O26が11株、O152が5株、O74・O119が各3株、O6が2株、O111・O8・O168が各1株であった。その他の105株は市販免疫血清で型別できない株（OUT株）であった。分離株の中で *eaeA* 遺伝子陽性の株はO157・O26・O111・O74・O119・OUT等の29株で、この遺伝子がヒト腸管粘膜上皮への接着に関与していることから、ヒトに対して感染力を持つ可能性が示唆された。さらに、ウシから分離されたEHECのなかにはO157・O26・O111等ヒトからの分離頻度の高い型が含まれており、ウシ腸管内の保菌EHECとヒトのEHEC感染症が密接に関連していることが示唆された。

一方、ブタ・イヌ・ネコの結果、いずれの検体からもEHECは分離されなかった。イヌ・ネコにおけるEHECの保菌状況については、これまで全国的な調査も少なく、十分に把握できていない状況である。家畜や愛玩動物におけるEHECの保菌調査は動物由来感染症の予防対策上必要であると思われる。

次に、食肉製品を県内のスーパー等小売店において購入し、調査を実施した（表4）。牛肉を中心として計71検体を対象とした検査の結果、牛肉46検体中1検体からVT2型産生のOUTが、また牛豚混合のミンチ肉6検体中1検体からVT1型産生のOUTが分離された。今

回の調査では、EHEC感染症患者から高率に分離されるO157、O26、O111等の血清型菌は分離されなかったが、今後とも引続き食肉の衛生管理と家畜等からの感染防止策を徹底させることの重要性が示唆された。

これまでに全国で発生したEHECの集団発生事例では、O157が原因菌の主流を成している。しかし、集団発生事例の一部や散発例、家族内発生事例の中にはO血清型別不能の症例も1～2%の割合で含まれている¹⁾。こうした症例の分離・同定検査では、多数の大腸菌を釣菌後、血清型別を行い、型別できない分離株についてVT試験を行って同定できたものである。O157、O26といったEHECの主要原因菌は、それぞれ選択培地が考

表3 ブタ・イヌ・ネコにおけるEHEC検査結果

種別	地域等	検査数	EHEC陽性数
ブタ	県下	50	0
	東予	78	0
	中予	27	0
	南予	36	0
	譲渡前後	118	0
	計	259	0
ネコ	東予	43	0
	中予	16	0
	南予	69	0
	計	128	0

表4 食肉におけるEHEC検査結果

種別	検体数	陽性数	検出されたEHECの血清型(毒素型)
牛肉	46	1	OUT (VT2)
鶏肉	3	0	—
ミンチ肉(牛)	7	0	—
ミンチ肉(牛豚混合)	6	1	OUT (VT1.2)
ミンチ肉(鶏)	1	0	—
牛レバー	5	0	—
豚レバー	1	0	—
ホルモン	2	0	—
計	71	2	

案されているため、比較的分離が容易である。それに対し、OUT株は分離培地上で通常の大腸菌と区別できないため、同定検査上の問題点となっている。今回の我々の方法では、PCRによるVT産生試験を併用させることにより高い分離率が得られた。今後、VT産生性に重点を置き、O血清型にとらわれないEHECの同定法がさらに進展することが望まれる。

今回の調査結果は、農場における家畜の衛生管理、と畜場の処理工程における衛生管理の向上、食品取扱業者に対する意識啓発に寄与するとともに、家庭における正しい食品の取り扱いを含めた食中毒予防対策の一助になると思われる。

今回の調査研究を進めるにあたり、(財)大同生命厚生事業団による多大な助成に深謝いたしますとともに、検体採取等にご協力いただいた関係各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 病原微生物検出情報, 28, 131-135 (2007)
- 2) 腸管出血性大腸菌 O157の検出・解析等の技術研修会資料 (1997)
- 3) 病原微生物検出情報, 25, 302-303 (2004)
- 4) Yamasaki S: Microbiol Immunol 40, 345
- 5) 小林一寛ら: 感染症学雑誌, 76, 911-920