

## 牛由来STEC O157の遺伝子多型解析

寺下明子、寺嶋昌宏、藤井康三、今川 哲  
薦田博也<sup>1)</sup>、久保由美子<sup>1)</sup>

1) 香川県環境保健研究センター

### はじめに

腸管出血性大腸菌感染症は、現在までに各分野で感染防止対策が実施されてきたが、感染者数の減少には至っていない。また本菌が有する酸耐性応答等の病原因子の特性により推定感染経路の不明症例が多く<sup>1)</sup>、感染源の排除は困難な状況である。更に、血清型が判明した症例の中ではSTEC O157（以後O157）が約70%と全国の集計で最も多く<sup>2)</sup>、本県も同様な傾向が確認されており<sup>3)</sup>、また環境汚染株と推定された集団発生事例により死亡例も確認されている<sup>4)</sup>。

当所も食肉への汚染防止の為、チェック表による生体洗浄の徹底・従事者の衛生管理等を実施し、と畜場全体の意識向上に努めているところである。そのような状況の中、食材等に起因する健康被害防止を進める上で、検出株の細菌学的特性を把握し、本症の排除にむけて各分野協力することが必要である。今回、当所では、と畜場に搬入された牛のO157保菌状況の調査及び薬剤感受性試験・遺伝子多型解析を実施し、牛由来O157を基とした公衆衛生分野の連携の重要性について検討したので報告する。

### 材料

#### 1. O157 検出

2007年5月～2009年3月までに、県内Sと畜場に健康畜として搬入された牛81頭（県内20・県外61）の糞便を、綿棒で直腸より直接採取し検体とした。

#### 2. eaeA遺伝子試験・薬剤感受性試験・遺伝子多型解析

上記期間中に検出した分離株3株及び、1997年と2006年に検出した4株合計7株を検体とした。

### 方法

#### 1. O157 検出

食品衛生検査指針を参考とし免疫磁気ビーズ（ベリタス社製）法で検出した<sup>5)</sup>。同時にテンプレートを増菌培地からアルカリ熱抽出後、スクリーニング PCR を実施し、陽性検体について BTB 培地に分離培養し、更に乳糖分解コロニー50個以上を EHT 培地に穿刺培養し、典型的溶血を呈したのものから同様に O157 検出し<sup>6)</sup>、Stx 産生性およびH型別を確認した。後者については環境保健研究センターで実施した。（図1）

スクリーニング PCR プライマー：

MK1:5'-TTTACGATAGACTTCTCGAC-3'  
MK2:5'-CACATATAAATTATTTTCGCTC-3'

変性	94℃	30sec	} 30 サイクル
アニール	50℃	60sec	
伸長	72℃	90sec	
最終	72℃	180sec	

Stx 遺伝子プライマー：

EVT-1:5'-CAACACTGGATGATCTCAG-3'

EVT-2:5'-CCCCCTGAACTGCTAATA-3'

EVS-1:5'-ATCAGTCGTCACACTCACTGGT-3'

EVC-2:5'-CTGCTGTCACAGTGACAAA-3'

## 2. eaeA 遺伝子試験

PCR 法でヒト腸管膜上皮接着に關与する eaeA 遺伝子の有無を確認した。

eaeA 遺伝子プライマー：

5'-AGGCTTCGTCACAGTTG-3'

5'-CCATCGTCACCAGAGGA-3'

変性	94℃	60sec	} 35 サイクル
アニール	52℃	144sec	
伸長	72℃	60sec	
最終	72℃	180sec	

## 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はNCCLS法に準拠した。培地には、ミューラーヒントンⅡ寒天培地を用い、菌液をマクファランド0.5に設定し、塗布した。感受性ディスクにはセンシディスクを用い、薬剤には以下の12薬剤、アンピシリン(ABPC)、クラブラン酸アモキシシリン(AMPC/CVA)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)、ST合剤:サルファ・トリメトプリム(ST)を使用した。

## 4. 遺伝子多型解析

制限酵素Xba1を用い、国立感染症研究所より提示された方法に準拠してパルスフィールド電気泳動(以後PFGE)を実施し、その結果をFingerprintingⅡによりクラスター解析し、相似度を確認した。更に、香川県下で発生した事例のヒト由来株と比較した。遺伝子多型解析は環境保健研究センターで実施した。

## 結果

### 1. 0157検出

0157は免疫磁気ビーズ法及びスクリーニングPCR法ともに82頭中3頭から検出され、保有率は3.7%であった。検出株はすべて県外産で3株とも0157:H7、1株からStx1のみ、残りの2株からStx1,2の両方が検出された。(表1)

### 2. eaeA 遺伝子試験

1で検出した0157 3株および、試供株として以前に分離していた0157 4株の計7株を調査した結果、7株ともeaeA 遺伝子を保有していた。(表2)

### 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果、2006年と2007年に分離した3株にTC耐性が認められ、SMは判定不能であった。1997年試供株には薬剤耐性は認められなかった。(表3)

#### 4. 遺伝子多型解析

PFGEは、2007年8月6日分離2株が相同したパターンを示した。(図2)更にFingerprinting IIによるクラスター解析の結果、今回検出した3株での相似度は72.6～92.2%であった。また、検出株と試供株全体での相似度は28.8～92.2%であり、特徴的な差異が確認された。(図3)

牛由来株とヒト由来株を比較した結果、2007年8月6日検出の牛由来株と2008年4月22日検出のヒト由来株で相似度100%が確認され、その他に同一パターンを示すものは確認されなかった。(図4)

#### 考察及びまとめ

0157保有状況は、他県の報告例とほぼ同様であった<sup>7) 8)</sup>。免疫磁気ビーズ法、スクリーニングPCR法ともに同数の0157を分離しているため両者に差はないと考える。又、牛由来0157:H7, 7株は、全てStx及びeaeA遺伝子を保有しており、ヒトに病原性を示すものと推察する。

薬剤感受性試験において、近年分離した菌株のみに薬剤耐性が認められたことから、薬剤耐性獲得の進行が伺えた。又、重茂らは牛由来0157の薬剤感受性試験を実施し、1剤耐性ではTC耐性が最も多く、多剤耐性ではTC, SMを含んだ耐性が大部分であると報告をしており、本結果も同様な傾向を示していると推察する<sup>9)</sup>。

遺伝子多型解析において、牛由来株と相似度100%を示したヒト由来株は、疫学調査により食肉販売時の不適切な取り扱いによるものと推定感染源は判明しており、今回の牛由来株とは検出時期がかなり離れていることから直接的に両者を結びつけることは困難であるが、何らかの関連がある可能性が高いと推察する。

腸管出血性大腸菌0157感染症の感染源は多様であるが、本来の原因は食材に起因する事例が多く、また、本症感染の特異性・少菌量での発症・無症状保菌者・ヒト-ヒト感染等により、推定食材を判断する情報量が少ないのが現状である。今回検出株の遺伝子多型解析により、ヒト感染例と牛由来株3頭中1頭に同一パターンが確認された。このことから本調査の継続は、感染源の不明症例発生時に、この手法を用い容易に原因食材を特定できる可能性が示唆された。更にこれを基に、疫学調査及び詳細な遺伝子解析により、野菜等の本菌汚染を含め、感染源の排除は進展すると推察する。

現在、食中毒等は広域化し、単県での感染源特定は困難な状況である。人及び食材由来0157の細菌学的特性は、国立感染症研究所に於いて集積されている。これに加え、今回実施した牛由来0157の調査を全国規模で進め、両者を解析すれば、感染源が推定可能な症例は多く存在すると考えられる。更に疫学調査等を基に公衆衛生分野で連携することが重要であり、また、畜産分野との協力により、本症を排除できる可能性が示唆されている。

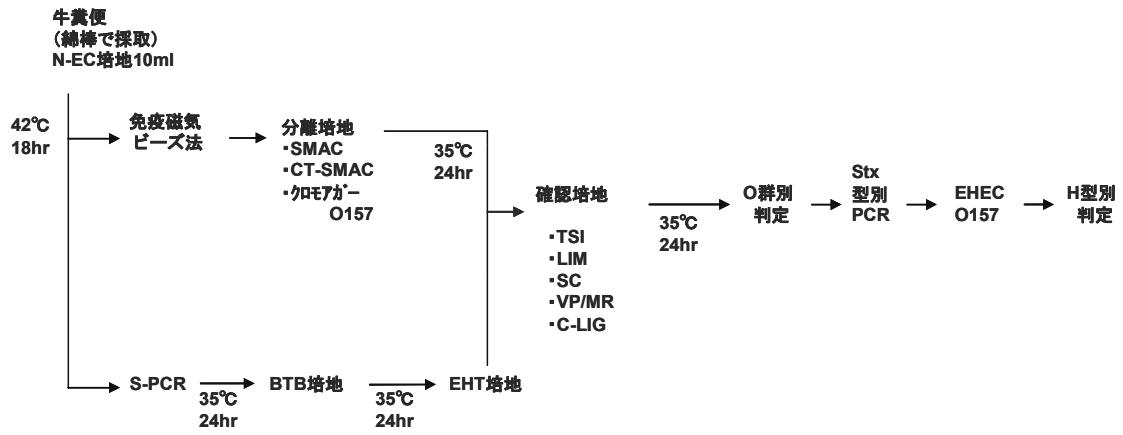


図1. O157 検出フロー

採取日	生産地	血清型	Stx 産生性
08.10.6	岡山県	O157:H7	1
07.8.6	群馬県	O157:H7	1,2
07.8.6	埼玉県	O157:H7	1,2

表1. 検出株一覧

採取日	血清型	Stx産生性	eaeA	
2008.10.6	O157:H7	1	+	検出株
2007.8.6	O157:H7	1,2	+	
2007.8.6	O157:H7	1,2	+	
2006.11.18	O157:H7	1,2	+	試供株
1997 No.11	O157:H7	1,2	+	
1997 No.12	O157:H7	1,2	+	
1997 No.13	O157:H7	1,2	+	

表2. 薬剤感受性試験及び遺伝子多型解析実施株の一覧

採取日 採取No.	A B P C	A M P C / C V A	C T X	K M	G M	S M	T C	C P	C P F X	N A	F O M	S T
'08 10/6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
'07 8/6-1	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
'07 8/6-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
'06 11/18	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S
'97 No.11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
'97 No.12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
'97 No.13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

表 3. 薬剤感受性試験

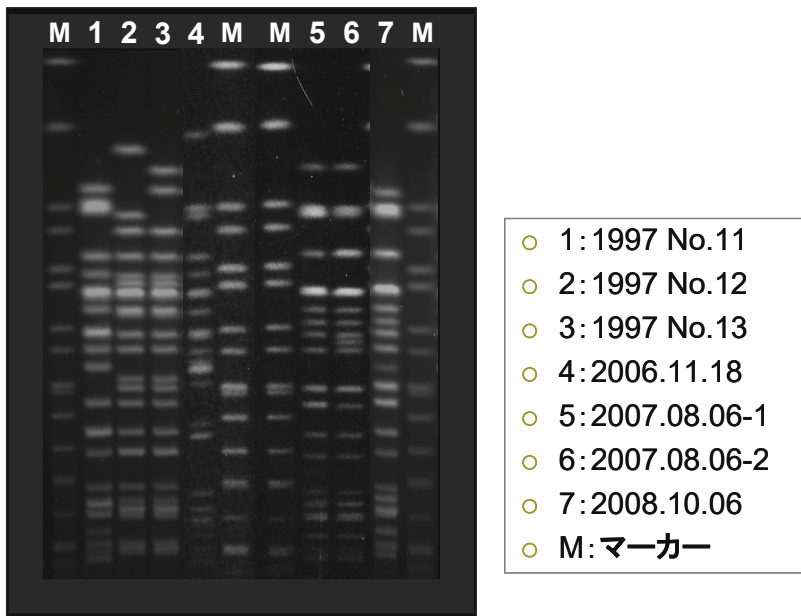


図 2. 検出株と試供株の PFGE 像

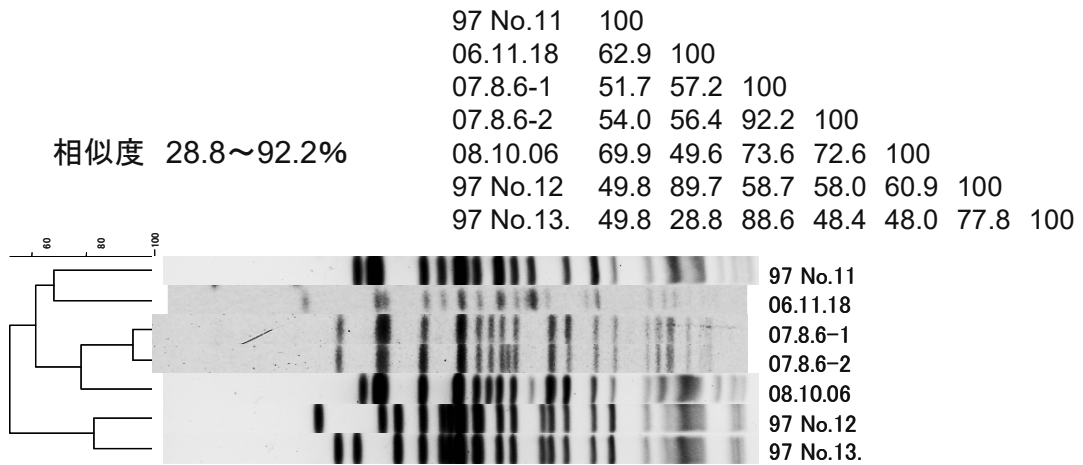


図3. 検出株および試供株の遺伝子多型解析

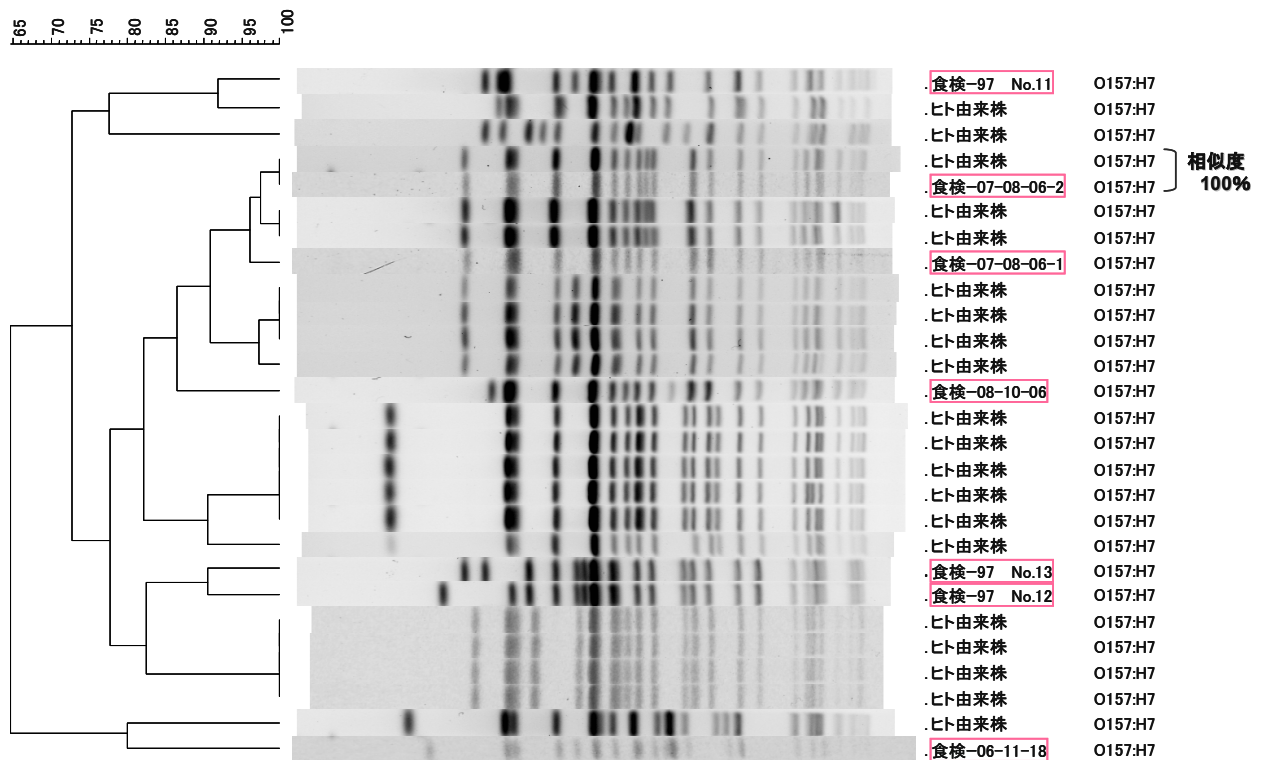


図4. 牛由来株とヒト由来株との比較

## 参考文献

- 1) 伊豫田 淳：日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現況と分離株の性状（2009）  
JVM 62(10),801-806
- 2) 病原微生物検出情報：＜特集＞腸管出血性大腸菌感染症 （2009）30(5), 119-134
- 3) 香川県病原微生物検出情報：＜感染症情報＞ （2008）5,
- 4) 老人福祉施設における O157 集団感染事例について 平成 18 年 香川県  
[http://www.pref.kagawa.jp/pubsys/cgi/updfiles/contents/14000/13825/xml\\_upd\\_file6/O157180215.pdf](http://www.pref.kagawa.jp/pubsys/cgi/updfiles/contents/14000/13825/xml_upd_file6/O157180215.pdf)
- 5) 日本食品衛生協会 食品衛生検査指針 微生物編（2004）168-179
- 6) 服部幸子：溶血素エンテロヘモリシンを指標とした STEC：O157 の分離および病原因子の検索 平成 19 年度徳島県食肉衛生検査所事業概要 38
- 7) 齋藤直：H19 年度牛の腸管出血性大腸菌 O157,O26 保有状況 平成 19 年度宮城県食肉衛生検査所報
- 8) 吉田紀美：家禽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(2006) 平成 18 年度愛媛衛環境研年報,9,6-9
- 9) 重茂克彦：日本国内における牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離菌株の薬剤感受性（2009） JVM ,62(10),807-811