

## 県内の牛における腸管出血性大腸菌（EHEC）保有状況

Detection of Entero Hemorrhagic E.coli from Slaughtered Cattle in Miyagi Prefecture.

畠山 敬 山口 友美 佐々木 美江  
渡邊 節 斎藤 紀行 秋山 和夫  
今野 明日香<sup>1)</sup> 小川 今日子<sup>2)</sup> 千葉 文明<sup>2)</sup>  
川向 和雄<sup>2)</sup>

Takashi HATAKEYAMA, Yumi YAMAGUCHI, Mie SASAKI  
Setsu WATANABE, Noriyuki SAITO, Kazuo AKIYAMA  
Asuka KONNO, Kyoko OGAWA, Fumiaki CHIBA  
Kazuo KAWAMUKAI

キーワード：腸管出血性大腸菌，コロニーハイブリダイゼーション

Keywords : Entero hemorrhagic E.coli, Colony Hybridization

宮城県では平成11年に飼育牛から感染したと考えられる幼児の血清型O26による事例が発生した。さらに、平成14年度には市販大腸菌免疫血清に凝集しない血清型の菌に起因する家族内感染が発生した。これらのことから、ヒトEHEC感染症防止対策の基礎研究として、感染源となりうる牛のEHEC保有状況の把握と効率的な分離方法の検討を行い、分離された菌株とヒト感染症株の遺伝子パターンの比較を実施した。

### 1 はじめに

牛が感染原因と思われる腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は全国的に報告されており、宮城県でも平成11年に飼育牛が感染源と考えられる血清型O26による事例が発生した。また、平成14年度、県内において市販大腸菌免疫血清に凝集しない血清型に起因する家族内感染が発生し注目された。さらに、全国的にも牛肉等の食肉製品を原因とした広域的なEHEC感染症が発生している。

一方、牛はEHEC保菌家畜として、また牛肉製品はEHEC汚染の可能性が高い食品として食品及び食肉衛生検査の監視対象となっている。しかし、厚生労働省への食肉衛生検査所の報告はO157に限られ、その内容も検出件数にとどまりEHEC感染症との関連性や詳細な菌の性状は調査されていない。

これらのことから、ヒトEHEC感染症防止対策には、感染源となりうる家畜（牛）のEHEC保有状況の把握と効率的な分離方法の検討、及び県内で発生するEHEC感染症の原因となった菌株の毒素型と遺伝子パターンを含めた分子疫学解析は重要である。そこで、食肉衛生検査所管轄のと畜場で処理される牛を対象に、EHEC保有状況、分離菌の種類・性状の確認と保有動向を把握し、さらに人から分離した菌株と分子学的に比較を行い、今後

- 1) 環境生活部生活衛生課
- 2) 宮城県食肉衛生検査所

のEHEC感染症対策のための基礎的研究とすることを目的とした。

### 2 材料と方法

#### 2.1 材料

平成12年4月から平成15年3月までにと畜場に搬入された1,327頭の糞便を検体とし食肉衛生検査所でEHECの分離を行った。

#### 2.2 菌の分離および血清型

菌の分離は、糞便を増菌培地に接種し37℃で一晩培養した後、ペロ毒素遺伝子検出用プライマー（Takara社製 primer vt1およびvt2）を用いたPCRを行った（以下、増菌PCR）。遺伝子陽性となった増菌液を寒天培地に塗抹し、以下定法に従って分離同定を行った。また、寒天培地から一度で毒素産生菌が分離困難な場合には、菌の密に生えているエリアを掻き取り、PCRによる毒素遺伝子の確認を実施した。エリア中に遺伝子陽性の菌が存在する場合には、菌の再分離を繰り返し行い単一の菌とした。分離した菌は「デンカ生研」病原性大腸菌免疫血清を用いて血清型を決定した。

#### 2.3 毒素の検出法

分離した菌はCAYE培地2ml中に接種し、37℃で18-20時間振とう培養後遠心し、上清に存在する毒素をラテックス凝集（RPLA）法で検出した。

2.4 コロニーハイブリダイゼーションによるEHECの分離

前述した1,327頭の牛糞便検体のほかに、新たに103頭の牛糞便検体を採取しコロニーハイブリダイゼーションによるEHECの分離を試みた。コロニーハイブリダイゼーションには増菌PCRで毒素遺伝子陽性となった18検体を供試した。増菌培地はミネラルオイルを重層して半嫌気状態にしたmECブイオンを使用し、検体を接種後44で一晚培養した。増菌PCRでVT遺伝子の存在が確認されたブイオン100μlをmEC寒天培地に塗抹し、37で培養した後コロニーハイブリダイゼーションに供試した。コロニーをハイボンドN+に転写し、水酸化ナトリウムの存在下で菌を破壊して遺伝子を膜に転写固定した。Takara社製のプライマーで増幅した産物(VT1・2)をピオチン化したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、シグナル陽性コロニーの毒素型および血清型

を確認した。

2.5 パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

分離した菌株は、遺伝子抽出後に制限酵素 Not を用いて切断し、Bio-RAD社製 Chef Mapper を用いて定法に従いPFGEを行った。

3 結 果

3.1 EHECの分離成績

牛のEHECの保有状況は、増菌PCR法の陽性頭数が平成13年度は315頭中66頭(検査頭数の21%)、平成14年度が418頭中91頭(検査頭数の22%)と全検査頭数の約20%であった。また、牛糞便からは季節を問わず毒素遺伝子が検出された。しかし、増菌PCR法で遺伝子陽性を示した157頭(平成13年度及び14年度合計)からの菌分離率は約20%(30頭)であった(表1)。

表1 3年間の月別検査頭数とEHEC分離件数

分 離 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
H12年度検査頭数	9	46	16	110	114	78	65	24	35	49	24	24	594
分 離 頭 数 (株)	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0	5
H13年度検査頭数	0	4	20	62	36	13	0	74	15	25	33	33	315
P C R 陽 性 件 数	0	1	10	7	9	2	0	9	6	11	5	6	66
分 離 頭 数 (株)	0	1	0	2	1	0	0	4	0	3	2	1	14
H14年度検査頭数	26	20	20	37	39	34	40	46	37	41	40	38	418
P C R 陽 性 件 数	0	5	2	3	19	17	13	6	1	14	10	2	91
分 離 頭 数 (株)	0	0	0	1	1	0	5	1	0	2	6	0	16
検 査 頭 数 合 計	35	70	56	209	189	125	105	144	87	115	97	95	1,327
分 離 頭 数 (株)	0	1	0	3	3	1	5	5	3	5	8	1	35
分 離 率 (%)	0	1.4	0	1.4	1.6	0.8	4.8	3.5	3	4.3	8.2	1.1	2.64

3.2 分離菌株の血清型

分離された菌の血清型はO26、O157以外にもO161、O165、あるいは市販抗血清で凝集しないO138やOUT(O antigen untyped)も分離された(表2)。

3.3 コロニーハイブリダイゼーションによる分離

今回行ったコロニーハイブリダイゼーションの手技と具体例を図1に示した。これらの方法により、103頭の検体から、増菌PCRが陽性になった18頭(17.5%)にコロニーハイブリダイゼーションを実施した。その結果、5頭(検査頭数の4.9%、PCR陽性頭数の27.8%)の糞便からO15、O119やOUTなど合計22株のEHECが分離された(表3)。

3.4 PFGEによる遺伝子パターンの比較

EHEC感染症患者由来の菌株についてPFGEにより比較検討した結果、平成13年度に分離されたO26患者由来株8株のうち2株(金成町在住者)に同時期に分離した牛由来O26株(栗駒町で飼育)とパターンの類似性が見られた(図2)。

表2 分離した菌の性状

分離年度	血 清 型	産 生 毒 素
平成12年度	O157:H7	VT1・2
	OUT:HNM	VT2
平成13年度	O26:H11	VT1
	O138:HUT	VT1
	O157:H7	VT1・2
	O161:H11	VT1
	O165:HUT	VT1・2
	OUT:H19	VT1
平成14年度	OUT:HUT	VT1・2
	O157:H7	VT1・2
	O157:H7	VT2
	OUT:HUT	VT1・2
	"	VT1

図1 コロニーハイブリダイゼーションでのEHEC分離チャート  
検体をmECブイオンで44 嫌気性培養

増菌PCR陽性：寒天培地に蒔きハイブリダイゼーション

シグナル陽性：該当するコロニーまたはエリアをPCRで確認

PCR陽性：平板培地で純培養の確認と分離

分離株の毒素確認（菌分離）

好気性菌による疑似シグナル

毒素遺伝子陽性シグナル

再分離後

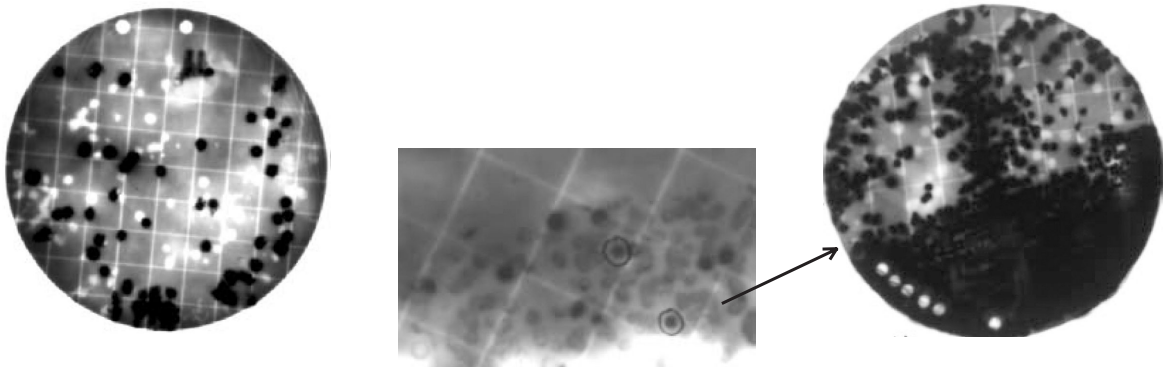
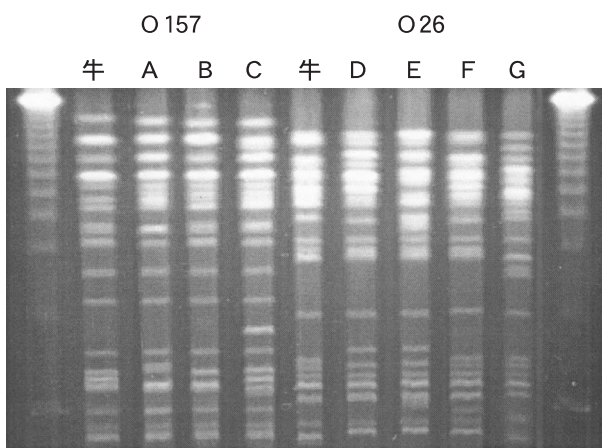


表3 コロニーハイブリダイゼーションにより分離した菌の性状

検体番号	O血清型	産生毒素	同一シャーレからの分離株数	生化学的性状
5	O157	VT2	1	一般大腸菌の性状
26	O119	VT1・2	1	〃
42	O15	VT2	10	〃
48	O119	VT1・2	6	〃
49	O119	VT1・2	4	〃

図2 P F G E による牛由来株と感染症由来株の比較



A～G：感染症由来株

#### 4 考 察

我々はこの調査の中で、平成14年度に起こった家族内感染事例の原因菌であるO138を平成13年度に既に牛から分離し、その保有を確認している。よって、ヒトEHEC感染症防止対策には、感染源となりうる家畜（牛）のEHEC保有状況の把握と、今まで以上に効率的な分離方法の検討を行うことが重要である。

と畜場に搬入された牛糞便からのEHEC遺伝子の検出状況は、初年度である平成12年度が検査頭数の約0.8%であったのに対し、平成13年度は21%、平成14年度が22%と大幅に増加した。これは、特異性の高い検出用プライマーの選択とPCRの基礎的な技術が向上した結果と思われる。また、牛便から毒素遺伝子の検出される時期は、ヒト感染症が多発する夏場のみでなく検査を行ったほとんどすべての期間を通して検出されることから、EHEC

は牛に常在していることが確認された。さらに、EHECの分離成績は、全検査検体1,327頭のうちの35頭（全体の2.6%）であり、これは全国食肉衛生協議会や公衆衛生獣医師協議会等での分離報告とほぼ一致する。しかし、増菌PCR法で遺伝子陽性を示した157頭からの分離率は約20%であった。

このように、増菌PCR法で陽性を示したにもかかわらずEHEC分離率が2割と低値であったことから、分離率を高めるためコロニーハイブリダイゼーション法の応用を試みた。当初、我々はポラードらの考案した遺伝子配列をそのままハイブリダイゼーションに利用し分離を試みたが、毒素遺伝子に対する結合特異性が低いため、検出用としては不適であった。そこで、検出用のプローブをTakara社製プライマーの遺伝子配列とし、大腸菌以外の菌の増殖を排除するため増菌温度を44℃に変更して嫌気性培養を実施したところ、EHECの分離に良好であることが判明した。コロニーハイブリダイゼーションは一度に数千ものコロニーのスクリーニングが可能で血清型を問わないため、この方法の活用はEHECの分離に非常に有効な手段であると思われた。しかし、今回プロトタイプVT2プロダクトを使用して作成したプローブがバリエーションに対して有効か否かは未知である。今後の検討課題としたい。

分離された血清型は、ヒトEHEC感染症の原因の中で最も多く分離されるO157、O26のほかにO15、O119、O138、O161、O165など多様な血清型が存在することが示された。さらに、大腸菌の性状を示しながら通常の市販血清型に凝集しないOOUT（O antigen untyped）も分

離されるなど、牛が保有する大腸菌にはヒトには稀な血清型が多く存在する可能性が考えられた。特にO138は平成14年度に家族内感染の原因菌となったが、免疫血清が市販されていないなど、行政検査を行う上で問題である。

EHEC感染症患者由来の菌株についてPFGEにより比較検討した結果、平成13年度に分離されたO26患者由来株8株のうち1株（金成町在住者）に同時期に分離した牛由来O26株との類似性が見られた。牛の出荷地（栗駒町）及び患者の居住地がともにEHEC患者多発地帯である保健所管内であったことは興味深く、今後とも牛・人の両面から継続調査が必要な地域であると思われた。

## 5 ま と め

最後に、この調査で、牛はO157、O26以外にも多くのEHECを保有し、その排泄は季節を問わず行われていることが確認された。また、動物由来株・ヒト感染症由来株の遺伝子パターンの相同性は新たな発生疫学的調査の方向性を示したものであると思われる。今後とも、牛保有EHECの追跡を行い、どのようなEHECが人に病原性を有するのか、どのような因子が病原性発揮のための指標となるのかを確認していく必要がある。

## 参 考 文 献

1. 京都市衛生公害研究所調査研究部門：ハイブリダイゼーション法によるEHECの検出と単離の試み、京都市公害衛生研究所年報 65, p105～108（1999）
2. 1990年度版、食品衛生検査指針、微生物編 p67～107