(3)めん羊の STEC 保有状況調査及び遺伝学的解析

○加藤千尋、高橋千鶴

1 はじめに

志賀毒素産生大腸菌(以下「STEC」)は食中毒原因菌の一つであり、下痢や血便といった消化器症状のほか、高齢者や幼齢者等では溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症し、致命的な経過をたどる場合がある¹⁾。そのため、食品の STEC 汚染を防ぐことは重要である。食肉に供される家畜における STEC 保有状況は、牛や豚については多数報告されている一方、めん羊における調査報告は少ない。

羊肉については、外食チェーン店におけるメニュー化や特産品としてのブランド羊肉販売など、国内でも一定の需要が見込まれる。近年、所管と畜場におけるめん羊のと畜頭数は増加傾向にあり、食用に供されるめん羊における STEC 保有状況や病原性を把握することは、と畜場における衛生的な作業の指導助言を行う上でも重要である。そこで、所管と畜場に搬入されためん羊を対象に STEC 保有状況を調査した。

2 材料と方法

(1)STEC 保有状況調査

令和 6 年 3 月～11 月までに所管と畜場に搬入された 10 農場 125 頭のめん羊の直腸便を検体とした。採取した直腸便を滅菌 PBS に懸濁し、懸濁液 2mL をノボビオシン加 mEC 培地へ混和し 42°C18 時間増菌培養後、1 白金耳量をクロモアガーSTEC 培地に塗抹し 37°C22 時間±2 時間培養を行った。培地上に発育した STEC を疑う藤色のコロニーを普通寒天で純培養後、TSI 培地、LIM 培地を用いて生化学性状を確認した。大腸菌の典型的性状を示した株はアルカリ熱抽出法により DNA 抽出し、Scheutz ら²⁾のプライマーを用いた PCR を行い、志賀毒素(Stx)遺伝子の有無を確認した。Stx 遺伝子陽性となった株は Api20E により菌種同定し、大腸菌と同定された株を STEC とした。また、同定した STEC 株は、病原性関連遺伝子である *eae* 遺伝子³⁾、*astA* 遺伝子⁴⁾の有無についても PCR により調査するとともに、病原大腸菌免疫血清を用いて O 抗原血清型別試験を行った。

(2)DNA シーケンシングによる Stx サブタイプの決定

(1)で分離しためん羊由来株 41 株は、平成 26 年度大学派遣研修「腸管出血性大腸菌(EHEC)の系統解析」で報告された方法⁵⁾により Stx 遺伝子領域の塩基配列解析を行った。すなわち、Linらのプライマーを用いて Stx 遺伝子を標的とした PCR を行い、1%SeakemLE アガロースゲル電気泳動により 900bp 付近にバンドがあることを確認した。この増幅産物を Nucleospin Gel and PCR clean-up を用いて精製し、O-157PCR Typing Set Plus 付属のプライマーを用いてダイターミネーター法によるシーケンスリアクションを行った。その後、反応産物のゲルろ過処理を行い、DNA シーケンサーにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は BLAST 検索により相同性解析を行い、Stx のサブタイプを決定した。

(3)薬剤感受性試験

STEC が分離された農場ごとに 1～2 株を抽出し、これら 8 株についてディスク拡散法による薬剤感受性試験を行った。薬剤は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム、メロペネム、シプロフロキサシン、ナリジクス酸、テトラサイクリン、ST 合剤、クロラムフェニコールの 12 薬剤を対象とした。

3 結果

(1) STEC 保有状況調査

採材しためん羊 10 農場中 7 農場、125 頭中 41 頭(32.8%)から STEC が分離された。このうち 2 頭から O157 が分離され、1 頭から O103 が分離された。分離された STEC 株は、*stx1* のみを保有する株が 17 株 (O157:1 株、O103:1 株、O153:3 株、OUT:12 株)、*stx2* のみを保有する株が 7 株 (O128:1 株、OUT:6 株)、*stx1* 及び *stx2* を保有する株が 17 株 (O157:1 株、O153:1 株、OUT:15 株) だった。また、*eae* を保有する株は 11 株、*astA* を保有する株は 1 株だった。農場ごとの STEC 分離株の詳細は表のとおり。

表. STEC の分離状況

農場	検出数/検体数 (保有率%)	血清型	株数	Stx遺伝子			病原関連遺伝子	
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>	<i>eae</i>	<i>astA</i>
A	16/46 (34.8%)	OUT	16	4	4	8	4	0
B	13/45 (28.9%)	O157	2	1	0	1	1	0
		O153	4	3	0	1	0	0
		O128	1	0	1	0	0	0
		OUT	6	2	1	3	1	1
C	4/13 (30.8%)	OUT	4	3	0	1	2	0
D	5/9 (55.6%)	OUT	5	2	0	3	2	0
E	1/4 (25.0%)	OUT	1	0	1	0	0	0
F	1/1 (100%)	O103	1	1	0	0	1	0
G	1/1 (100%)	OUT	1	1	0	0	0	0
H	0/4	—	—	—	—	—	—	—
I	0/1	—	—	—	—	—	—	—
J	0/1	—	—	—	—	—	—	—
計	41/125 (32.8%)		41	17	7	17	11	1

(2) DNA シーケンシングによる Stx サブタイプの決定

めん羊由来株において、*stx1* 領域は *stx1a* または *stx1c* のいずれかであった。*stx2* 領域においては、*stx2a*、*stx2c* がそれぞれ 1 株、残りはすべて *stx2d* であった。保有パターンは、*stx1a* のみが 11 株、*stx1c* のみが 6 株、*stx2a* のみが 1 株、*stx2d* のみが 6 株、*stx1a/stx2c* が 1 株、*stx1a/stx2d* が 7 株、*stx1c/stx2d* が 9 株だった。

(3) 薬剤感受性試験

試験した 8 株の中では、12 薬剤に対して耐性を示す株はなかった。なお、8 株中 6 株がストレプトマイシンに対し「中間」の判定となった。

4 考察

今回調査しためん羊の 125 頭中 41 頭(32.8%)から STEC が分離され、このうち 2 頭から O157 が分離され、1 頭から O103 が分離された。また、41 頭から分離した STEC 41 株中 11 株(26.8%)が人の重症化との関連がある *eae* を保有していた。北海道のめん羊の STEC 保有状況調査⁶⁾では、北海道内めん羊 60 頭中 19 頭(31.7%)が STEC を保有していたと報告されており、今回の調査と STEC 保有率は同程度であった。一方、北海道のめん羊からは分離されなかった O157 が 2 株分離された。また、*eae* 保有率も高

かった。DNA シーケンシングにより Stx サブタイプを調べた結果、めん羊由来株は、人の有症患者からも検出される *stx1a*、*stx1c*、*stx2a*、*stx2c*、*stx2d* のいずれかまたは複数を保有していることが明らかとなった。これらのことから、所管と畜場に搬入されためん羊は牛同様 O157 を保有しており、その他の血清型の株も人へ病原性を示す可能性があることが明らかとなった。

5 今後の調査

(1) PCR-based ORF Typing 法 (以下「POT 法」⁷⁾) を利用した遺伝学的解析

POT 法は、2 種類のマルチプレックス PCR を行い、標的とする 22 の遺伝子について保有の有無を判定し、遺伝子保有パターンを数値に変換して POT 型として型別する方法であり、PCR サーマルサイクラーがあれば検査可能である。今回分離しためん羊由来株と当所で保存している牛由来株を対象に POT 型を決定し、POT 型と O 抗原血清型及び Stx サブタイプの保有パターンとの傾向を比較し、関連の有無を調査する。特定の POT 型に病原性を有する STEC が型別される傾向が示唆されれば、POT 法を利用した病原性推定ができる可能性がある。特に Stx サブタイプは人の重症化との関連があることが知られており、病原性を推測する上でも重要である。POT 型と Stx サブタイプ保有パターンに関連が認められれば、シーケンサー等を所有しない検査機関でも、簡便・迅速に Stx サブタイプを推定できる可能性がある。

(2)めん羊由来株における薬剤耐性保有状況調査

薬剤耐性菌については One Health の観点から課題となっており、家畜由来株における薬剤耐性獲得状況の把握は重要である。牛・豚・鶏由来株は、農林水産省におけるモニタリング調査⁸⁾をはじめ多くの検査機関で調査が行われているが、めん羊由来株の調査報告はほとんどない。このため、めん羊由来株についても継続的に調査を行い検体数を増やすとともに、ディスク拡散法に加え最小発育濃度を調査し、より正確な薬剤耐性獲得状況の把握に努めたい。

6 まとめ

めん羊も O157 をはじめとした人への病原性を示す可能性がある STEC を保有していることが明らかとなった。と畜解体処理工程において、糞便や消化管内容物の付着による枝肉汚染のほか、剥皮工程における不適切な取り扱いが被毛や外皮を介し枝肉を汚染する可能性がある。羊の解体処理工程における枝肉の汚染は STEC 食中毒の原因となるおそれがあることから、適切なと畜解体処理が重要である。今回、所管と畜場に搬入されためん羊における STEC 保有が確認されたことから、と畜作業従事者へのめん羊の STEC 汚染リスクについての周知や、衛生的な作業の遵守徹底を図るための指導助言の一助としたい。

本調査研究において遺伝学的解析を行うにあたり、多大なるご指導をいただきました石巻専修大学理工学部柴田清孝教授に深謝いたします。

参考文献

1) 国立感染症研究所 HP 「腸管出血性大腸菌とは」

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/439-ehc-intro.html>

2) Scheutz *et al*: Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature *Journal of Clinical Microbiology*, Sep.2012, p. 2951-2963

3) 中澤宗生、伊藤健一郎:ウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の幼若ウサギ感染実験

感染症学雑誌第69巻第7号

4) Tatsuo Yamamoto, Peter Echeverria: Detection of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene Sequences in Enterotoxigenic *E. coli* Strains Pathogenic for Humans

INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 1996, p. 1441-1445

- 5) 上村健人: 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の系統解析 平成26年度宮城県大学派遣研修
- 6) 稲田和也、大野祐太、石田祥士、清水俊一、本郷健雄: 道内産めん羊における志賀毒素産生性大腸菌及びサルモネラ属菌の保有状況 日獣会誌 77 e14~e20 (2024)
- 7) 鈴木正弘: 院内感染対策に有用なPCR-based ORF Typing法の原理 THE CHEMICAL TIMES 221 (3) 16-21 (2011)
- 8) 農林水産省動物医薬品検査所 2021年度JVARM(動物由来薬剤耐性モニタリング)年次報告書