

## 管内と畜場搬入牛より分離した腸管出血性大腸菌 O157 の性状

豊橋市食肉衛生検査所 ○高木慎介 清水隆博 西谷小百合 森本賢治  
松本 圭 山内俊平 細井美博

### はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）は主要な食中毒の原因菌の1つであり、2011年には富山県を中心に発生した牛肉の生食を原因とするO111の集団食中毒やドイツを中心に発生したO104の集団食中毒、2012年には北海道で白菜の浅漬けを原因とするO157の集団食中毒が起きたことは記憶に新しい。

牛はEHECの保菌動物であり、EHECによる食中毒の原因食品は牛に関連する食品が多い。フードチェーンの上流であると畜場での解体時の汚染防止は重要な課題であり、当所では2011年4月より管内と畜場搬入牛のEHEC保菌状況を調査しているところである。

今回、これまでに分離されたEHEC O157の性状を分析し、若干の知見を得たので報告する。

### 材料と方法

2011年4月から2013年10月に行った当所のEHEC保菌状況調査において、管内と畜場搬入牛のうち肥育牛1,156頭(78農場)中42頭(19農場)の直腸便から分離されたEHEC O157、42株を用いてベロ毒素（VT）産生性試験、薬剤感受性試験、菌株のタイピングを目的としてIS-Printing及びパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を行った。

- 1 VT産生性試験：デュオパス・ベロトキシン（Merck社製キット）を用いた。
- 2 薬剤感受性試験：アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、アモキシシリン・クラブラン酸（AMPC/CVA）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ST合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、オフロキサシン（OFLX）、シプロフロキサシン（CPLX）、及びノルフロキサシン（NFLX）の14薬剤について、センシディスク（ベクトン・ディッキンソン）によるK-B法で添付マニュアルに従い実施した。

なお、同試験で中間を示したものについては耐性を含め、ABPCとCEZに耐性を示した

株については、さらにセフトキシム (CTX)、セフェピム (CFPM) について追加試験を行った。

3 IS-Printing : IS-Printing は、EHEC O157 のゲノムに分布する 32 か所の挿入配列 (Insertion Sequence) と病原性関連遺伝子 (*vtx1*, *vtx2*, *eaeA*, *hlyA*) をマルチプレ

ックス PCR で検出することにより、タイピングをする手法である。

試験は、IS-Printing System (東洋紡) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。バンドパターンを比較すると同時に、VT 産生遺伝子である *vtx1*, *vtx2*、腸管粘膜への接着に必要なインチミンの遺伝子 *eaeA*、溶血素であるエンテロヘモリシンの遺伝子 *hlyA* の各遺伝子の有無についても確認した。

4 PFGE : 制限酵素に *Xba* I を用い、泳動後 SYBR-Green で染色、紫外線撮影を行った。

## 結 果

42 株について、分離年月日及び農場別の VT 産生性試験、薬剤耐性、IS-Printing 及び PFGE パターン並びに病原性関連遺伝子 (*vtx1*、*vtx2*、*eaeA* 及び *hlyA*) の結果について次表に示した。

### 1 VT 産生性試験

VT1 のみを産生したものが 5 株 (11.9%)、VT2 のみを産生したものが 15 株 (35.7%)、VT1、VT2 両方を産生したものが 22 株 (52.4%) であった。

### 2 薬剤感受性試験

13 株 (31.0%) が試験した薬剤のいずれかに耐性で、そのうち 6 株 (14.3%) は複数の薬

剤 (2~6 薬剤) に対して耐性を示した。

薬剤別では、13 株全てが SM に、ついで ABPC に 5 株 (11.9%)、TC に 4 株 (9.5%)、CEZ と CP にそれぞれ 2 株 (4.8%)、KM と ST にそれぞれ 1 株 (2.4%) で耐性を示した。No.35 と No.39 は ABPC と CEZ に耐性を示したため、CTX と CFPM についても感受性試験を行ったが、いずれも両薬剤に感受性であった。

### 3 IS-Printing

IS パターンのうち複数株で同一パターンを示したものが、 $\alpha \sim \iota$  及び  $\gamma'$  の 10 に区分された。また、パターン  $\gamma$ 、 $\theta$ 、 $\kappa$  及び  $\lambda$  に 1 バンド違いで近似したパターンをそれぞれ  $\gamma'$ 、 $\theta'$ 、 $\kappa'$ 、 $\lambda'$  で示した。なお、病原性関連遺伝子は、42 株全てで *vtx2*、*eaeA*、*hlyA* を保有し、27 株が *vtx1* を保有していた。

### 4 PFGE

PFGE パターンのうち複数株で同一パターンを示したものが、I ~ V 及び I' の 6

つに区分された。また、パターンⅠ、Ⅲ、Ⅵ及びⅦに3バンド以内の違いで近似したパターンをそれぞれⅠ′、Ⅲ′、Ⅵ′及びⅦ′で示した。

表：分離されたEHEC 0157の性状

No.	分離年月日	農場	VT*	耐性パターン	IS パターン**	PFGE パターン**	病原性関連遺伝子			
							<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>
1	2011.4.5	A	1,2	ABPC-SM-ST			+	+	+	+
2	2011.4.6	B	2	-	α	Ⅵ		+	+	+
3	2011.5.11	B	2	-	α	Ⅵ′		+	+	+
4	2011.6.7	C	2	-	β			+	+	+
5	2011.8.2	D	1,2	-	γ	Ⅰ	+	+	+	+
6	2011.8.2	E	2	ABPC-SM	δ	Ⅱ		+	+	+
7	2011.8.2	E	2	-	δ	Ⅱ		+	+	+
8	2011.8.3	F	2	ABPC-SM-TC				+	+	+
9	2011.9.6	A	1,2	SM-TC-CP			+	+	+	+
10	2011.9.6	D	1,2	-			+	+	+	+
11	2011.9.9	F	1,2	-	ε	Ⅶ	+	+	+	+
12	2011.10.4	C	2	-	β			+	+	+
13	2011.10.4	D	1,2	-	γ	Ⅰ	+	+	+	+
14	2011.10.7	F	1,2	SM	ε	Ⅶ′	+	+	+	+
15	2011.11.4	F	1,2	SM	ε		+	+	+	+
16	2012.1.16	G	2	SM				+	+	+
17	2012.7.6	H	2	-	κ			+	+	+
18	2012.7.9	I	1,2	SM	ξ		+	+	+	+
19	2012.8.24	J	1	-	ξ		+	+	+	+
20	2012.9.4	C	2	-				+	+	+
21	2012.9.7	H	2	SM	κ′			+	+	+
22	2012.9.11	D	1	-	γ′	Ⅰ′	+	+	+	+
23	2012.9.11	D	1	-	γ′	Ⅰ′	+	+	+	+
24	2012.9.11	D	1	-	γ′	Ⅰ′	+	+	+	+
25	2013.6.10	K	2	-	η			+	+	+
26	2013.6.11	A	1,2	-	θ	Ⅲ	+	+	+	+
27	2013.6.17	A	1,2	-	θ	Ⅲ	+	+	+	+
28	2013.7.3	L	1,2	-			+	+	+	+
29	2013.7.9	M	2	-	η	Ⅳ		+	+	+
30	2013.7.16	N	1,2	-	θ′	Ⅲ′	+	+	+	+
31	2013.8.5	O	1,2	SM			+	+	+	+
32	2013.8.5	J	1,2	SM	λ		+	+	+	+
33	2013.8.19	A	1,2	-	θ	Ⅲ	+	+	+	+
34	2013.8.19	P	2	-				+	+	+
35	2013.8.20	Q	1,2	ABPC-CEZ-SM-TC			+	+	+	+
36	2013.8.20	M	2	-	η	Ⅳ		+	+	+
37	2013.9.3	M	1,2	-	ι	Ⅴ	+	+	+	+
38	2013.9.9	M	1,2	-	ι	Ⅴ	+	+	+	+
39	2013.9.10	D	1	ABPC-CEZ-SM-KM-TC-CP	λ′		+	+	+	+
40	2013.10.2	G	1,2	-			+	+	+	+
41	2013.10.4	R	1,2	-			+	+	+	+
42	2013.10.22	S	1,2	-			+	+	+	+

\*：デュオパス・ベロトキシンによる

\*\*：ISパターン、PFGEパターンについてはそれぞれ同一、もしくは近似したもののみ記した

## 考 察

今回、試験した42株全てが病原性関連遺伝子 (*vtx2*、*eaeA* 及び *hlyA*) を有しており公衆衛生上留意すべきと考えられた。VT2はVT1よりもヒトに対する毒性が高いと考えられている<sup>1)</sup>。

42株中37株(88.1%)にVT2の産生が認められたが、VT1のみを産生した5株(11.9%)も *vtx2* を保有しており、発現していないか、若しくは本試験で用いたデュオパス・ペロトキシンがVT2のバリエーションによっては検出感度が低い<sup>2)</sup>ことから、これら5株は検出困難なバリエーションを産生していた可能性も考えられた。

薬剤感受性試験の結果、複数の薬剤に耐性を示す多剤耐性株が6株見られた。その中で最多の6薬剤に耐性を示したNo.39はヒトの治療に用いられることがあるKMに対して耐性だった。ヒトの治療に用いられる他の薬剤については、FOMやニューキノロンに耐性の株はなかったが、今後、ヒトの治療薬の耐性の動向や多剤耐性の動向に注意する必要があると考えられた。また、No.35とNo.39の2株はABPCとCEZに耐性を示したため、CTXとCFPMについても感受性試験を行ったが、2株ともにCTXとCFPMに対しては感受性だった。このことから基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)のような第3世代セファロスポリンを分解可能な酵素を保有していないことがわかったが、2011年にドイツを中心にアウトブレイクを引き起こしたO104はESBLを保有していた<sup>3)</sup>ことから、今後、当と畜場搬入牛が保有するO157がこのような耐性機構を獲得する可能性は十分に考えられた。

IS-PrintingとPFGEを併用してタイピングを行った結果、これらの結果が一致もしくは近似し、同一の菌株と考えられたものの多くは同一農場の牛から分離され、分離の間隔は1~2ヶ月が中心であった。なお、D農場では2011年に分離されたNo.5、No.13と2012年に分離されたNo.22、No.23、No.24の結果が近似しており、同農場では1年近くもの間、同一のO157株が存在していたか若しくは導入元が汚染され、間欠的に保菌牛がD農場に導入されていた可能性が考えられた。一方、A農場の牛から分離されたNo.26、No.27、No.33とN農場のNo.30で結果が近似していたが、トレーサビリティシステムによる牛の履歴からは疫学的関連性は認められなかった。

今後もと畜場で分離されるEHECの病原性関連遺伝子の有無や遺伝子型別、薬剤耐性等について継続調査し、家畜衛生並びに食中毒発生時の遡り調査等広く公衆衛生に貢献していきたいと考えている。

最後に、本調査にあたってご尽力いただきました豊橋市健康部生活衛生課衛生試験所の関係者の皆様に深謝致します。

#### 引用文献

- 1) 西川禎一ら：腸管出血性大腸菌の疫学。モダンメディア, 58(4), 103-112 (2012)
- 2) 勢戸和子：腸管出血性大腸菌(志賀毒素産生性大腸菌)。モダンメディア, 56(12), 337-340 (2010)
- 3) Frank C *et al.* : Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli O104:H4 Outbreak in Germany. The New England Journal of Medicine. 365, 1771-1780 (2011)