

豚糞便中の食中毒起因菌保有状況調査

○高橋千鶴、菊地利紀

1. はじめに

豚の腸管内には様々な食中毒起因菌が存在していることから、腸管内容物による汚染はと畜場の解体工程における危害要因とされている。志賀毒素産生大腸菌(以下、STEC)も食中毒や感染症の重要な原因菌の一つであり、時に重症化することから社会的にも大きな問題となっている[1]。国内における STEC 感染症の患者および保菌者から検出される血清型は O157 が大部分を占め、O26 と O111 がそれに次ぐ主流とされてきたが、近年はこれら以外の血清型による事例が増加傾向にあり、その血清型も多岐にわたる[1]。2022 年の全国の STEC の菌検出数 1583 件のうち、O157 が約 60%、O26 が 15%、O103 が 5%、O111 が 4%であったが、これらの主要血清型以外の割合は約 12%あり、また、型別不能(以下、OUT)も 4.5%であった[1]。このことから、病原菌の究明には主要な血清型に限定せず、広く調査をすることが求められてきている。と畜牛の外皮または糞便における STEC 保菌率に関する報告[2-5]は多数あり、当所でも管轄と畜場に搬入された牛の STEC 保有状況調査を令和 3 年度まで継続的に実施してきた。しかしながら、豚糞便由来株と人の STEC 感染症との関連は調査事例が少なく、当所においても豚における調査実績はないため豚の STEC 保有状況は明らかになっていない。

本調査では、公衆衛生上のリスクマネジメントに寄与することを目的とし、と畜場に搬入された豚の糞便中における STEC の保有状況を調査し、分離された株について性状解析と志賀毒素(以下、STX)遺伝子の検索を実施したので報告する。

2. 材料および方法

(1)材料

令和 5 年 7 月から 10 月までに当所管轄と畜場に搬入された 25 農場、計 100 頭(1 生産者当たり 1~5 頭)の肥育豚について内臓摘出後、滅菌薬匙を用いて肛門から直腸内容物を採取し、検体とした。

(2)分離培養

検体 1g を PBS 9ml に接種し、菌液 1 白金耳量をクロモアガー STEC 培地に画線塗抹し、 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 20 ± 2 時間培養した。

(3)性状検査

培養後、疑わしいコロニーを各培地 1~3 個ずつ釣菌し、TSI 及び LIM 培地に接種して生化学性状を確認した。また、Api20E(ビオメリュー)を用いて菌の同定をし、大腸菌と同定された分離菌株については病原大腸菌免疫血清(デンカ)を用いて O 抗原血清型別試験を実施した。

(4)PCR

分離菌株 1 コロニーを滅菌生理食塩水に懸濁後、遠心分離して得られた沈査に 50mM NaOH を添加し、 100°C 10 分加熱後、中和してアルカリ熱抽出を行った。10000g×10 分間遠心後、得られた上清を用いて PCR 法により STX 遺伝子の検出を行った。

試薬は *Premix Ex TaqTM Hot Start Version*(タカラバイオ株式会社)を使用し、Scheutz ら [6]のプライマーセット(表 1)及び PCR 反応条件(表 2)を用いた。特に *stx 2* は複数のサブタイプに分かれ、全サブタイプを検出するため、*stx 2a*、*stx 2b*、*stx 2c*、*stx 2d*、*stx 2g* を検出するプライマーセット(以下、*stx2-1*)、*stx 2e*、*stx 2f* を検出するプライマーセット(以下、*stx2-2*)の 2 種を用いた。

表1 使用したプライマー

プライマー		配列(5'→3')	検出遺伝子	増幅サイズ (bp)
stx1	stx1-det-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	<i>stx 1a, stx 1c, stx 1d</i>	209
	stx1-det-R1	AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT		
stx2-1	F4	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	<i>stx 2a, stx 2b, stx 2c, stx 2d, stx 2g</i>	627
	R1	ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC		
stx2-2	F4-f	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT	<i>stx 2e, stx 2f</i>	625
	R1-e/f	TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC		

表2 PCR 反応条件

反応	温度(°C)	時間	サイクル
初期変性	95°C	15分	1
変性	94°C	50秒	35 ^{※1}
アニーリング	56°C ^{※1}	40秒	
伸長	72°C	60秒 ^{※1}	
最終伸長	72°C	3分	1

※1 必要に応じて条件を変更した

3. 結果

(1) 菌分離

17 農場 34 検体から STEC 疑いのコロニーを分離した。

(2) 性状検査

性状検査の結果、16 農場 32 株が大腸菌の性状を示し、これらの株は Api20E ではすべて95%以上の高い推定確率で大腸菌と同定された。同株の O 抗原型はすべて OUT であった。

(3) PCR

大腸菌と同定された 32 株について *stx* の PCR を実施したところ、*stx1* 及び *stx2-1* についてはすべての株において陰性であった。一方、*stx2-2* では目的のサイズを含む複数のバンドが認められ、非特異的な増幅産物が多く存在していることから判定不能と判断した。また、非特異的な増幅産物は目的サイズよりかなり大きなサイズで生じているものと、小さなサイズのものが見られた。条件の変更による改善を試み、アニーリング温度 58°C、60°C、伸長時間の短縮(60 秒→40 秒)やサイクル数の削減(35→33)をそれぞれ試行したが、いずれも問題の解決には至らなかった。

4. 考察

今回の調査では、32%の豚から STEC 様の株を分離した。これらは Api20E により大腸菌と同定されたが、STX が判定不能であったため、STEC との断定には至らなかった。また、分離株はすべて OUT であったことから主要な血清型以外の大腸菌であった。他自治体のと畜場搬入牛の STEC 保菌率は 2.9% [3]、4~6%[5]であり、血清型はすべて O157 であったとの報告がある。また、坂口ら[4]は 5.2%の牛から O157 を検出したと報告している。当所の過去の調査[7-10]では季節変動性はあるが約 2~18%の牛から O157 が検出されていた。ただし、平成 27 年度の調査[11]では STEC 分離率は 16.7%であり、血清型はすべて OUT であった。一方、豚においては、福山ら[12]は 10.7%から STEC を分離しており、そのうち 91%が OUT であったと報告している。また、他自治体の報告[13]では 34%の豚から STEC が分離さ

れ、すべて OUT であった。これらの既報と同様、今回の調査結果からも豚は牛と比べて主要血清型の保菌率が低いことが示唆された。しかしながら、主要血清型以外による人の STEC 感染症が増加傾向にある[1]ことから豚においても汚染防止対策が求められる。

今回 PCR を行ったところ、判定困難となる問題が多数生じたため、反応条件の至適化を試みた。stx2-2 については陽性疑いの株が多数確認されたものの、目的バンドの薄さや複数の非特異的増幅産物により判定はできなかった。一般的に非特異的増幅が起こる要因としてサイクル開始前のミスプライミングや、短いサイズとして形成されるプライマーダイマーに由来するものがある。しかしながら、今回はホットスタート PCR 法[14]を採用しており、初期変性温度(95℃)に達するまでポリメラーゼ活性は抑制されるため、これらが原因である可能性は低いと考えられた。目的バンドの増幅量を増やし、かつ単一のバンドを得るための改善方法としてアニーリング温度を上げることが有効とされている[15]が、58℃では非特異的な増幅産物が消失せず、60℃では目的バンド自体が薄くなってしまふことからアニーリング温度をさらに上げることは難しいと考えられた。また、伸長時間の短縮やサイクル数の削減[15]でも良好な結果が得られなかったことから、今後は別のプライマーでの試行や DNA シーケンス解析などを検討していく必要がある。

既報[3-5]では、牛から分離された STX 型は STX2 単独産生株が最も多く、次いで STX1 と STX2 両方産生株となり、STX1 単独産生株が最も少ないとされている。また、牛で O157 および O26 から分離されるサブタイプでは *stx* 1a, *stx* 2a, *stx* 2c の単独またはこれらの組み合わせが多いとされている[2, 5]。人の有症者から分離される菌株は *stx* 2a (*stx* 2a, *stx* 1a+*stx* 2a, *stx* 2a+*stx* 2c, *stx* 1a+*stx* 2a+*stx* 2c)を保有するものが多く、牛との相関性が示唆されている[2]。一方、福山ら[12]は豚で STX2 単独産生株、STX1 単独産生株、STX1 と 2 両方産生株の順に多く分離している。また、他自治体の報告[13]では、豚で分離された STEC はすべて STX2 単独産生株であり、サブタイプは STX2e であった。今回の調査では、stx2-2 を用いた検索の際に陽性疑い株が多数確認できたが、*stx* 2e の人からの分離率は低く[16]、人の感染症との関連性は認められていない[17]。また、*stx* 2f についても人からの検出報告例は少ない。しかしながら、STEC 感染症の重症化は STX サブタイプだけではなく、その他の病原因子の関与が示唆されており[18]、さらなる調査が必要である。

継続して豚における STEC 保有状況の調査を行うことで、と畜場の解体工程のリスクマネジメントおよび人の STEC 感染症と豚由来株の関連性の解明の一助となることが期待される。今後、STX 遺伝子の検索方法について検証し直し、他の病原因子の解析と併せて信頼性のあるデータの蓄積に努めたい。

参考文献

- [1] 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 Vol.44 No.5 (2023.5)
- [2] 農林水産省 肉用牛農場のシガ毒素産生性大腸菌保有状況調査 (H19 年～H26 年度)
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/kekka/gyuniku/stec/01.html#23111>
- [3] 森本賢治, 本多弥生, 菅麻美子, 森洋子, 山口貴宏, 山内俊平, 細井美博: と畜場搬入牛における農場別腸管出血性大腸菌保菌状況 (H23 年度)
<https://www.city.toyohashi.lg.jp/37698.htm>
- [4] 坂口浩章, 京塚明美, 児玉実, 佐伯幸三, 山岡弘二: 牛の腸管出血性大腸菌 O157 の保菌状況と分離株の性状, 日獣会誌 56 745~749 (2003)
- [5] 中村祥人, 川瀬遵, 菅美穂, 藤田葉子, 村上佳子, 川上優太, 田原研司, 平田克: 島根県内のと畜場搬入牛における腸管出血性大腸菌保有状況と分離株の分子疫学解析, 日獣会誌 69 101~106 (2016)
- [6] Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G et al.: Multicenter evaluation of a sequencebased protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, J.Clin.Microbiol., 50, 2951-2963, 2012

- [7] 平成 18 年度宮城県食肉衛生検査所調査研究
- [8] 平成 19 年度宮城県食肉衛生検査所調査研究
- [9] 平成 25 年度宮城県食肉衛生検査所調査研究
- [10] 平成 26 年度宮城県食肉衛生研究所調査研究
- [11] 平成 27 年度宮城県食肉衛生検査所調査研究
- [12] 福山正文,古畑勝則,大仲賢二,八木原怜子,小泉雄史,原元宣,堂ヶ崎知格,島田時博,栗林尚志,
中澤宗生,渡邊忠男:豚からの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型,感染症学雑誌 第 77 卷 12 号 p1032-1039
- [13] 山本智美,大橋比奈子,池田直弥,小林甲斐,海津健治,佐藤勝,恵内幸子,門間千枝,石塚理恵,
下島優香子,畠山薫:豚の糞便中における食中毒起因菌保有状況調査(平成 26 年度)
全国食肉衛生検査所協議会 HP(https://mic-net.ne.jp/micnet/data/bio/bio_bukai_H27.pdf)
- [14] タカラバイオ Hot Start PCR 法
https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100003179
- [15] タカラバイオ PCR実験の手引き
https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_1.pdf
- [16] 仲敦史,河合央博,中嶋洋,狩屋英明:志賀毒素産生性大腸菌の疫学調査(平成 29 年度)
岡山県環境保健センター年報 42 35-42 2018
- [17] 甲斐明美,尾畑浩魅,畠山薫,五十嵐英夫,伊藤武,工藤泰雄:ラテックス凝集反応法による Vero 毒
素産生性大腸菌の同定:大腸菌ベロトキシン検出用試薬の評価,感染症学雑誌 第 71 卷 第 3 号
p248-254
- [18] 齋藤悦子,秋山由美,荻田堅一,坂野桂,二井洋子,辻英高:2012~2015 年度に搬入された腸管出血
性大腸菌のベロトキシンサブタイプと病原遺伝子及び細胞付着因子の保有状況について,兵庫県
立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告 第 8 号 2017 p1-6