

所管と畜場に搬入されためん羊のSTEC保有状況調査

宮城県東部保健福祉事務所

加藤 千尋

宮城県食肉衛生検査所

高橋 千鶴

石巻専修大学理工学部

柴田 清孝

1 はじめに

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は食中毒原因菌の1つであり、下痢や血便などの消化器症状のほか、高齢者や幼齢者等では溶血性尿毒症症候群を発症し、致死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℃ 18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℃ 22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、志賀毒素遺伝子 (*stx*) の有無を確認した。*stx*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インチミン遺伝子 (*eae*)、*astA*遺伝子保有の有無についてもPCR^{3) 4)}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年度宮城県大学派遣研修「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*領域の塩基配列解析を行った。すなわち、Linら⁶⁾のプライマーを用いて*stx*を標的としたPCRを行い、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*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、セフォタキシム、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STEC41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⁷⁾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た。今回分離されたO157のうち1株は、*stx*サブタイプは*stx1a/stx2c*であり、*eae*を保有していた。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。

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。今回調査した8株において明らかな薬剤耐性を示す株はなかったものの、継続的に調査を行いめん羊由来株の検体数を増やすことにより正確な薬剤耐性獲得状況を把握することが重要と考えられた。

5 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。めん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、適切に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感謝いたします。

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 p.772-776 (1995)
- 4) Tatsuo Yamamoto, Peter Echeverria : Detection of the Enteraggregative Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene Sequences in Enterotoxigenic E. coli Strains Pathogenic for Humans
INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 1996, p. 1441–1445s
- 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) Lin et al : Detection of various variant verotoxin genes in Escherichia coli by polymerase chain reaction
Microbiol Immunol.1993;37 (7) : 543-548
- 7) 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77e14～e20 (2024)
- 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