

秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に関する研究

## 秋田県における食用牛の腸管出血性大腸菌保菌状況と分離株の細菌学的性状に関する研究—2001～2003年と2012～2013年の調査成績

八柳 潤 今野貴之 樫尾拓子 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 齊藤志保子

腸管出血性大腸菌（EHEC）の感染予防策を構築するためには、感染源である食用牛の EHEC 保菌実態を把握する必要があるが、当センターでは 2003 年以降当該調査を行っていないことから、秋田県内でと殺される食用牛の EHEC 保菌実態解明と分離株の細菌学的性状の精査を実施した。2001～2003 年の調査と今回の調査結果を比較した結果、食用牛の EHEC O157 保菌率が約 2 倍となっていること、EHEC O157 を保菌する牛が県内の広範囲の農場に分布している実態が明らかとなった。加えて、重症例との関連が疫学的に示されている Clade 8 が患者由来 EHEC O157 に占める割合は、2001～2003 年に 10.3%であったのに対して今回の調査では 25.0%と増加傾向がみられた。以上の結果は、秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが共に増加していることを示唆していた。2003 年の米国産牛肉輸入禁止後に県内における EHEC 感染事例数は減少しなかったことから国産牛の EHEC 感染源としての重要性が示唆され、県内における EHEC 感染対策としては県産牛を感染源とする感染ルートに対する対策が重要と考えられる。2011 年にユッケ等生食用食肉の衛生基準が厳格化されるなど食品衛生対策が一層強化されたが、秋田県内の EHEC 感染事例発生数に及ぼす効果は限定的と思われた。従って、食品衛生の厳格化による従来の対策のみでは EHEC 感染症の発生を完全にコントロールすることは困難である可能性が考えられ、今後、畜産行政と連携し、感染源対策となる牛の EHEC 保菌コントロールを目的とする研究を企画・立案する必要がある。

### 1. 諸言

腸管出血性大腸菌（EHEC）はベロ毒素（VT）を産生する大腸菌であり、典型例ではヒトに下痢、激しい腹痛、出血性大腸炎を惹起する。さらに、出血性大腸炎を発症した患者の一部は溶血性尿毒症症候群（HUS）や、時に致命的となる脳症を発症する。1996 年、全国的に EHEC O157:H7 による食中毒事例が多発して以降、学校給食の衛生管理が強化され、更に、牛が EHEC の保菌動物であることから、と畜場の衛生管理も強化されるなど、種々の EHEC 食中毒対策が講じられてきた。それにもかかわらず、2011 年には富山県を中心として 5 名の死者を伴う EHEC O111 食中毒が発生するなど、EHEC による深刻な健康被害が依然として発生している。加えて、同年、ドイツを中心とするヨーロッパで腸管凝集付着性大腸菌（EAggEC）がベロ毒素（VT）遺伝子を獲得したとされる EHEC O104 による多くの死者を伴う大規模な食中毒が発生し、これまでに知られていない新たなタイプの EHEC（EAggEC-EHEC）による深刻な健康被害

の発生も注目された。秋田県においても 2001 年以降、EHEC による感染事例が年間 30 事例から 40 事例発生し、EHEC による健康被害の発生は未だに終息していない。2011 年の富山県の事例を契機として食品衛生法が厳格化され、同年にはユッケ等の生食用食肉の衛生基準が厳格化され、2012 年には生食用牛レバーの提供が禁止されたが、これらの規制強化が EHEC 感染事例発生状況に及ぼす効果については、今後の推移を見守る必要がある。

EHEC による健康被害予防策を構築するためには感染源の実態を把握することが第一歩となる。そのためには、県内における食用牛の EHEC 保菌実態を把握する必要があるが、当センターでは 2003 年<sup>1)</sup>以降当該調査を行っていない。とりわけ、富山県等で重篤な集団感染事例を惹起した O111 や、欧州で問題となっている O104、あるいは O104 と同様に重篤な症状を惹起する可能性の高い EAggEC-EHEC の県内への侵淫実態は不明である。このような背景から、本研究では秋田県内でと殺される食用牛の EHEC 保菌

実態解明と分離株の細菌学的性状の精査を実施した。得られた結果について、2001～2003年に実施した調査結果と比較し秋田県における EHEC 感染症発生リスクの推移について検討した。また、秋田県における EHEC 感染症発生事例数に及ぼす各種規制強化等の効果についても併せて考察した。

## 2. 方法

### 2.1 牛便からの EHEC の分離・同定

秋田市食肉衛生検査所の協力を得て牛便 211 検体を採取し、EHEC の検索に供した。EHEC O157 は牛便をノボビオシン加変法 EC 培地 (NmEC) に接種・培養後、ダイナビーズ O157 と CT 加ソルビトールマッコンキー平板を併用して分離した。O26, O111 は牛便を変法 EC 培地 (mEC) に接種・培養後、免疫磁気ビーズ O26 と CT 加ラムノースマッコンキー平板、免疫磁気ビーズ O111 と CT 加ソルボースマッコンキー平板をそれぞれ併用して分離した。その他の血清型の EHEC は次の方法により分離した。牛便を mEC 培地に接種・培養した後、培養液を塩酸処理<sup>2)</sup>し、DHL 平板に接種・培養した。生じた菌苔について VT のスクリーニングを実施し、VT スクリーニング陽性となった平板について、VT 陽性コロニーを特定した。EHEC O104 を含む EAggEC-EHEC は、塩酸処理後の DHL 平板に発育した菌苔を対象として VT, *aggR*, O104 O 抗原合成遺伝子を標的とする PCR 法<sup>3)</sup>により検索した。VT, *eaeA*, *uidA*, *saa*, 大腸菌 O 抗原合成遺伝子 (O157, O26, O111 他) を標的とする PCR 法は、既報<sup>1)</sup>のとおり実施した。

### 2.2 EHEC O157 の Clade 解析

EHEC O157 の病原性と関連すると報告されている Clade 解析を実施した。解析は Manning らの原報<sup>4)</sup>に従い、Hairpin Primer 法<sup>5)</sup>を応用した SNP 検出により実施し、SNP #96, #89, #36, #47, #93, #6 を解析対象とした。解析には 2001 年～2003 年に牛から分離された 7 株、ヒトから分離された 29 株、2012～2013 年に牛から分離された 7 株、ヒトから分離された 16 株、計 59 株を供試した。

### 2.3 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

2001 年～2003 年に患者から分離された EHEC O157 Clade 8 の 3 株、2012 年～2013 年に患者と牛から分離された EHEC O157 Clade 8 それぞれ 4 株と 1 株の計 8 株、対照として牛由来 EHEC O157 Clade 7 の 2 株、患者由来 EHEC O157 Clade 7 の 1 株、業態者(無症状)由来 EHEC O157 Clade 7 の 1 株、2014 年 4 月に発生した福島県産馬刺を原因とする食中毒患者から分離された EHEC O157 Clade 2 の 1 株の計 5 株を供試して VT-2 産生を比較検討した。供試株を LB 培地に接種し、35℃ 1 夜培養した後、その培養液 100 μl を 5 ml の LB 培地 2 本に接種し、37℃ で振盪培養した。3 時間後に 1 本の LB 培地にマイトマイシン C (MMC) を 0.2 μg/ml の濃度に添加し、さらに 3 時間振盪培養した。2 本の LB 培地を遠心して得られた上清を試料とし、VTEC RPLA (デンカ生研) を使用して VT-2 の産生量を測定した。VT-2 産生量はタイター(希釈倍数)として表現した。

### 2.4 薬剤感受性

2001～2003 年及び 2012～2013 年に分離された EHEC O157 牛由来 14 株、ヒト由来 45 株、non-O157 8 株についてドライプレート DP35 により 18 薬剤に対する感受性を検討した。

### 2.5 秋田県における EHEC 感染事例発生状況の推移

1996 年から 2013 年の EHEC 感染事例発生状況を集計し、BSE 問題による米国産牛肉輸入禁止 (2003 年 12 月)、生牛肉の衛生基準厳格化 (2011 年)、牛生レバーの提供禁止 (2012 年) 後の県内における EHEC 感染事例発生状況の推移について検討した。

## 3. 結果

### 3.1 牛便からの EHEC の分離・同定

2012 年～2013 年に牛便 211 検体からの EHEC 分離結果を 2001～2003 年に牛便 452 検体を対象に実施した調査の結果と併せて表 1 に示した。2012～2013 年の調査では O157 が 211 検体中 7 検体 (3.3%) から検出されたのに対して、2001～2003 年の調査では 452 検体中 7 検体 (1.5%) から EHEC O157 が検出されており、秋田県における食用牛の EHEC O157 保菌率が 10 年前と比較して約 2 倍となっていることが明らかとなった。

表1 牛便から分離された EHEC

検体数	2001～2003年		2012～2013年	
	452	(%)	211	(%)
O157	7	(1.5)	7	(3.3)
O26	1	(0.2)	6	(2.8)
O111	0	(0)	1	(0.5)
O103	2	(0.4)	0	(0)
O165	1	(0.2)	0	(0)
O113	1	(0.2)	5	(2.4)
O156:H25	1	(0.2)	0	(0)
O178:H19	2	(0.4)	0	(0)
Out	0	(0)	2	(0.9)
合計	15	(3.3)	21	(9.9)

また、EHECの保菌率も3.3%から9.9%に増加した。EAaggECは1検体から検出されたが、EHEC O104を含むEAaggEC-EHECは検出されなかった。患者から分離されるEHECと同じ血清型の株としては、2012～2013年の調査ではEHEC O111、EHEC O26が、2001～2003年の調査ではEHEC O26、O103、O165が牛便から分離された。いずれの調査においてもEHEC O113が牛便から分離されたが、秋田県においてはこれまでEHEC O113による感染事例は確認されていない。

表2に2001～2003年の調査と2012～2013年の調査で牛便から分離されたEHEC O157 14株の一覧を示す。2001～2003年に分離された7株のうち2株は北海道産牛から分離されたが、2012～2013年に分離された7株は全て県内産牛から分離された。EHEC O157が分離された牛の

産地に関して、県内の特定の地域や特定の農場から出荷された牛からのみEHEC O157が分離される傾向は認められず、県内の広範囲の農場にEHEC O157を保菌する牛が分布している実態が明らかとなった。

### 3.2 EHEC O157のClade解析

表3に示すように、重症例との関連が疫学的に示されているClade 8が患者由来EHEC O157に占める割合は2001～2003年に10.3% (29株中3株)であったのに対して2012～2013年には25.0% (16株中4株)となり、増加傾向がみられた。Clade 8に感染した患者全員に血便がみられ、また、2013年に横手保健所管内で死亡した女児から分離されたEHEC O157もClade 8であった。一方、2001～2003年に44.8%を占めていたClade 2は2012～2013年に全く検出されず、県内で患者から分離されるEHEC O157のClade分布に年次推移が認められることが示された。牛由来株では2001～2003年にはEHEC O157

表3 EHEC O157 59株のClade

Clade	2001～2003年		2012～2013年	
	ヒト	牛	ヒト	牛
2	13	1	0	0
3	7	0	6	2
6	2	1	0	0
7	4	5	5	4
8	3	0	4	1
計	29	7	16	7

表2 牛便から分離された EHEC O157

検体採取年月日	血清型	VT型	産地	Clade	菌株番号
2002.7.1	O157:H7	VT-1,2	秋田市	2	EC6741
2002.7.1	O157:H7	VT-2	西木村	7	EC6740
2002.6.14	O157:H7	VT-2	大館市	7	EC6742
2002.9.20	O157:H7	VT-2	湯沢市	7	EC7120
2002.10.29	O157:H7	VT-2	若美町	6	EC7187
2003.6.24	O157:H7	VT-1,2	北海道	7	EC8040
2003.7.22	O157:NM	VT-1,2	北海道	7	EC8068
2012.10.26	O157:NM	VT-2	羽後町	7	EC15423
2012.10.26	O157:H7	VT-1,2	能代市	3	EC15425
2013.5.31	O157:H7	VT-2	由利本荘市	7	EC15657
2013.6.28	O157:NM	VT-1	能代市	3	EC15678
2013.6.28	O157:H7	VT-2	由利本荘市	7	EC15679
2013.8.2	O157:H7	VT-1,2	由利本荘市	7	EC15721
2013.12.10	O157:H7	VT-2	大潟村	8	EC15883

Clade 8 が検出されなかったのに対して、2012～2013 年には Clade 8 が 1 株確認された。

### 3.3 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

表 4 に示すように、Clade 8 株は全て MMC 非存在下で 640 倍又は 1,280 倍、MMC 存在下では 327,680 倍又は >655,360 倍の VT-2 RPLA タイターを示した。これに対して、2013 年の牛便由来 Clade 7 EC15657 株と 2003 年の無症状業態者由来 EC7496 株の RPLA タイターは MMC 非存在化でそれぞれ <20 倍と 80 倍、MMC 存在化ではいずれも 320 倍と Clade 8 株の RPLA タイターと比較して顕著に低かった。また、2002 年の患者由来 Clade 7 EC6835 株は MMC 存在下での RPLA タイターが 40,960 倍と Clade 8 株と比較して明らかに低かった。なお、2012 年の牛便由来 Clade 7 EC15423 株及び 2014 年馬刺食中毒由来 Clade 2 EC16029 株の RPLA タイターは、Clade 8 株と同等であった。

### 3.4 EHEC の薬剤感受性

供試した 67 株は全て治療の第一選択であるホスホマイシンに感受性であった。

### 3.5 秋田県における EHEC 感染事例発生状況の推移

図 1 に秋田県における 1996 年から 2013 年までの EHEC 感染事例数を示す。2001 年以降、EHEC 感染事例発生数は年間 30～40 事例で推移していたが、冷夏であった 2003 年と 2009 年に

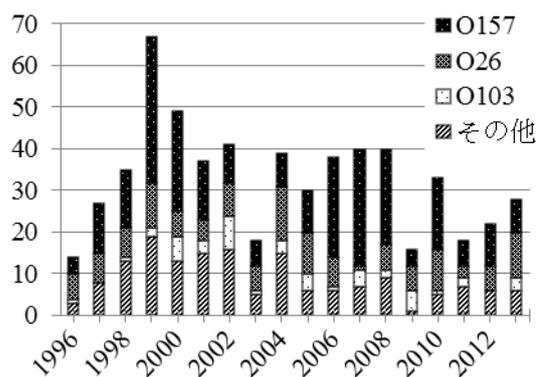


図 1 秋田県における EHEC 感染事例数 (1996-2013 年)

は事例数が 20 事例を下回った。一方、2003 年 12 月に BSE 問題で米国産牛肉の輸入が禁止された以降も、秋田県内における EHEC 感染事例発生数は 30～40 事例で推移する傾向がみられた。ユッケ等の生牛肉の衛生基準が厳格化された 2011 年は 18 事例、牛生レバーの提供が禁止された 2012 年は 22 事例と EHEC 感染事例数に減少傾向がみられたものの、2013 年には 28 事例となり、一旦減少した EHEC 感染事例数が増加に転じる傾向がみられた。

## 4. 考察

今回の調査では、10 年前の県内における食用牛の EHEC O157 保菌率 1.5% に比して 3.3% と 2 倍の保菌率であることが明らかとなった。また、EHEC O157 を保菌する牛は 2001～2003 年の調査、今回の調査のいずれにおいても県内の広範

表 4 EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生

菌株番号	由来	VT 型	Clade	VT-2 産生量 (RPLA タイター)	
				-MMC	+MMC
EC5454	2001 年患者	VT-2	8	640	> 655,360
EC5458	2001 年患者	VT-2	8	640	> 655,360
EC7662	2003 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15233	2012 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15330	2012 年患者	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15332	2012 年患者	VT-2	8	1,280	327,680
EC15696	2013 年患者 (死亡)	VT-2	8	1,280	> 655,360
EC15883	2013 年牛便	VT-2	8	640	327,680
EC15423	2012 年牛便	VT-2	7	640	> 655,360
EC15657	2013 年牛便	VT-2	7	< 20	320
EC6835	2002 年患者	VT-2	7	640	40,960
EC7496	2003 年業態者	VT-2	7	80	320
EC16029	2013 年馬刺食中毒	VT-1,2	2	1,280	> 655,360

圃の農場に分布している傾向が示された。Manning らはこれまで世界各地で発生した EHEC O157 集団感染事例において、HUS の発症などを指標とする重症化率に顕著な違いがあることに着目し、全染色体遺伝子の SNP 解析に基づいた EHEC O157 の Clade 解析法を確立<sup>4)</sup>し、HUS の発症率が Clade 8 で有意に高いことを示した。この報告を受け、我々は秋田県で 2001～2003 年、そして 2012～2013 年にヒトと牛から分離された EHEC O157 計 59 株について Clade 解析を実施した。その結果、患者由来株に占める高病原性 Clade である Clade 8 の比率が 10 年間で 10.3% から 25.0% に増加していること、牛由来株にも Clade 8 が存在することが明らかとなった。確認された EHEC O157 Clade 8 株の VT-2 産生能について RPLA 法により検討した結果、Clade 8 株は MMC 非存在下ではほぼ同程度である 640～1,280 倍のタイターの VT-2 産生能を示し、MMC 存在下では全ての株が高タイターを示した。一方、対照として比較した Clade 7 株の中には Clade 8 株よりも MMC 存在下において明らかに VT-2 産生能が低い株が存在することが示され、また、Clade 7 の牛由来株の 1 株と無症状業態者由来株は VT-2 RPLA タイターが極端に低いことも示された。データは示さないが、これらの 2 株は VT-2a 遺伝子を保有せず、VT-2c 遺伝子のみを保有するタイプであり、このことがこれらの株の VT-2 RPLA タイターが極端に低いことの原因と考えられた。なお、MMC は EHEC O157 に SOS 信号を誘起することにより溶原化していた VT-2 ファージの放出を促し、これにより VT-2 産生を促進するとされており、この現象は腸管内において EHEC O157 が一酸化窒素を含む各種のストレスに暴露された際の状態を模倣するものと考えられている。

本調査の結果は、食用牛の EHEC O157 保菌率と、県内における患者由来株の Clade 8 の比率が増加していることを示すものであり、このことは秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが共に増加していることを示唆していると考えられる。実際、2013 年に秋田県で 2 人目となる EHEC O157 感染による死者が発生し、その患者から分離された EHEC O157 (EC15696) は Clade 8 であった。なお、治療の第一選択であるホスホマイシンに耐性を獲得し

た EHEC O157 は認められなかったことから、EHEC 感染者の抗菌剤治療におけるリスクは現在においても非常に小さいと考えられる。

一方、EAggEC が VT を獲得することにより派生した EHEC O104 は重症化リスクが大きいですが、この EAggEC-EHEC は今回実施した牛便の調査では全く検出されなかったことから、食用牛を介して県内で EAggEC-EHEC 患者が発生する可能性は非常に小さいと考えられた。なお、今回の調査において牛便 1 検体から EAggEC が分離された。EAggEC の感染源や保菌動物は殆ど明らかとなっていないが、この結果は牛が EAggEC の保菌動物の一つである可能性を示すものとして興味を持たれる。

2003 年 12 月に BSE 問題で米国産牛肉の輸入が禁止された以降も、秋田県内における EHEC 感染事例発生数は 30 から 40 事例で推移し、明らかな減少傾向はみられなかった。このことは、県内で発生する EHEC 感染事例の原因に米国産牛肉は殆ど関与していない実態を示し、その他の感染源、例えば国産牛等の関与が考えられる。このことから、県内における EHEC 感染対策としては県産牛を汚染源とする感染ルートに対する対策が重要と考えられる。これまでに国内で講じられてきた EHEC 感染症対策は、と畜場の衛生管理の厳格化等、食肉生産現場における汚染防止対策と学校給食衛生管理の厳格化等、食品衛生対策に大別される。富山県における EHEC O111 食中毒事例を受けて 2011 年には生牛肉の衛生基準が厳格化され、2012 年には牛生レバーの提供が禁止されるなど、食品衛生対策が一層厳格化されたが、秋田県内の EHEC 感染事例発生数の推移をみるかぎり、それらの効果は限定的と思われる。このことは、秋田県では EHEC 感染症の発生にユッケなどの生肉や牛レバー以外の原因食品も関与していることを示唆していると考えられ、県内における EHEC の感染疫学は複雑であることが伺われる。このため、食品衛生の厳格化を推し進める従来の対策のみでは EHEC 感染症の発生を完全にコントロールすることは困難である可能性が考えられ、今後、EHEC の感染源である保菌牛のコントロールなど、従来は行われてこなかった EHEC の感染源対策を推し進める必要があると考えられる。

## 5. まとめ

秋田県における EHEC O157 感染リスクと重症化リスクが増加している可能性が示唆された一方、県内における EHEC O104 とその類似株による健康被害発生リスクは小さいことが示された。今後、EHEC の感染源である保菌牛のコントロールなど、従来は行われてこなかった EHEC の感染源対策に取り組む必要があると考えられ、畜産行政と連携し、感染源対策となる牛の EHEC 保菌コントロールを目的とする研究を企画・立案することが必要と考えられる

### 参考文献

- 1) 八柳 潤, 齊藤志保子, 今野貴之: 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染疫学解明に関する調査研究, 秋田県衛生科学研究所報, **48**, 2005, 45-53.
- 2) Fukushima, H. et al.: Hydrochloric acid treatment for rapid recovery of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from faeces, foods and environmental samples, *Zentralbl. Bakteriol.*, **289**, 1999, 285-299.
- 3) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: *E. coli* O104 同定用 PCR の確立と陽性対照専用株の作出, 秋田県健康環境センター年報, **8**, 2012, 31-33.
- 4) Manning, S.D. et al.: Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157 associated with disease outbreaks, *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 2008, 4868-4873.
- 5) Hazbon M.H. and alland D.: Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and other organisms, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 2004, 1236-1242.