

(2) 豚糞便中の食中毒起因菌保有状況調査(第二報)

○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)は食中毒や感染症の重要な起因菌の一つであり、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]。STEC を起因菌とする食中毒において国内で検出される血清型は O157 が大部分を占めるが、近年では O26、O111 等の O157 以外の血清型の検出報告もあり、血清型を O157 に限定せず、広く調査をすることが求められる[1]。

と畜場における牛の外皮または糞便における STEC 保菌率に関する報告や、牛糞便由来株と人の STEC 感染症との関連調査事例[2-5]は多数あり、当所では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。一方で、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かったことから、昨年度豚における同調査を開始したところであったが、PCR 結果に問題があったため、志賀毒素(以下、STX)遺伝子の有無の判定ができなかった。今年度は検査系を見直し、継続調査を行った。

併せて、STEC 同様に畜産物を介した食中毒起因菌として適切な制御が求められているサルモネラ属菌[6]についても、近年、世界各地で人と動物において *Salmonella* Typhimurium (以下、*S.*Typhimurium) のファージ型 DT104 という多剤耐性菌が分離され問題となっており[7]、国内でも DT104 による大規模な食中毒事例があったことから[8]、サルモネラ属菌の薬剤耐性動向にも注意が必要である。

本調査では、と畜場に搬入された豚の STEC 保有状況の継続調査と併せて、分離されたサルモネラ属菌株の薬剤感受性試験を実施したのでその概要を報告する。

2. 材料および方法

(1) 材料

第一報[9]の令和 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 頭の豚から分離した STEC 疑い株 32 株に加え、令和 6 年 6 月から 10 月までに当所管轄と畜場に搬入された計 100 頭の豚(6 ヶ月齢;60 頭、繁殖豚;40 頭)の直腸便を検体とした。なお、6 ヶ月齢の豚は 1 生産者当たり 1 ~10 頭とした。直腸便は内臓検査終了後、滅菌薬匙を用いて肛門から採取した。また、100 頭のうち 6 ヶ月齢の 22 頭、繁殖豚の 16 頭については腸炎等の理由により廃棄された直腸から採材した。なお、サルモネラ属菌については第一報[9]の検体を調査対象とした。

(2) 分離培養

【大腸菌】

第一報[9]では、以下の直接分離培養のみを行ったが、本調査では増菌分離培養も並行して実施した。直接分離培養;検体 1g を PBS 9ml に接種し、検液 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。

増菌分離培養;滅菌綿棒に付着させた検体 0.3g をノボビオシン加 mEC 培地 10ml に接種し、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。培養液 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。分離された株を STEC 疑い大腸菌(以下、単に「大腸菌」と記載する)として以降の検査に供した。

【サルモネラ属菌】

検体 1g を PBS 9ml に接種し、検液 0.1ml をラパポート・バシリアデイス培地 10ml に接種し、 $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 20 ± 2 時間培養した。培養液 1 白金耳量をクロモアガーサルモネラ培地および DHL 培地に画線塗抹し、 37°C 、 20 ± 2 時間培養した。

(3) 性状検査

【大腸菌】

培養後、疑わしい藤色コロニーを釣菌し、TSI 及び LIM 培地に接種し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を大腸菌と同定し、市販の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。

【サルモネラ属菌】

培養後、疑わしい藤色コロニーを釣菌し、TSI 及び LIM 培地に接種して生化学性状を確認した。サルモネラの典型的性状を示した株をサルモネラと同定し、市販のサルモネラ免疫血清(デンカ)を用いて O 抗原および H 抗原血清型別試験を実施した。H 抗原血清型別試験は 1 相目を決定した後、陽性となった H 型の相誘導用培地(デンカ)に菌を接種し 2 相目を発現させ、同様に免疫血清を用いて 2 相目の H 型別を行った。

(4) 薬剤感受性試験

分離されたサルモネラ属菌について、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のディスク拡散法に基づく薬剤感受性試験を実施した。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、ナリジクス酸(NA)、レボフロキサシン(LVFX)、スルファキサゾール・トリメプリーム合剤(ST)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM) の 10 種類とした。

(5) PCR

第一報[9]及び本調査における大腸菌の分離菌株 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。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 HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) を使用し、Scheutz ら [10] 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 *stx2* 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、*stx 2-1*)、*stx 2e*, *stx 2f* を検出するプライマーセット(以下、*stx 2-2*) 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(℃)	時間	サイクル
初期変性	95℃	15 分	1
変性	94℃	50 秒	35
アニーリング	56℃	40 秒	
伸長	72℃	60 秒	
最終伸長	72℃	3 分	1
最終伸長	72℃	3 分	1

3. 結果

(1) 菌分離

【大腸菌】

本調査において直接分離培養では 47 頭(6 ヶ月齢;11 農場 19 頭、繁殖豚;28 頭)、増菌分離培養では 76 頭(6 ヶ月齢;11 農場 41 頭、繁殖豚;35 頭)から STEC 疑いのコロニーを分離し、分離したコロニーについて性状検査に供した。

【サルモネラ属菌】

第一報[9]の検体のうち、3 農場由来の 3 頭からそれぞれ 1 株の計 3 株を分離した。

(2) 性状検査

【大腸菌】

性状検査の結果、直接培養法では 100 頭中 40 頭 48 株(O145:5 株、O136:4 株、O26:1 株、O111:1 株、O86a:1 株、O25:1 株、O63:1 株 O28ac:1 株、OUT:33 株)、増菌培養法では 100 頭中 58 頭 70 株(O159:2 株、O8:2 株、O29:2 株、O157:1 株、O145:1 株、O136:1 株、O86a:1 株、O20:1 株、O28ac:1 株、O158:1 株、O168:1 株、O126:1 株、OUT:55 株)を大腸菌と同定した。月齢別、解体所見別の大腸菌検出率を表 3、表 4 に示した。分離株の血清型別の詳細は表 5、表 6 のとおりである。なお、廃棄した腸の検体において直接分離培養では 38 頭中 17 頭から 23 株、増菌培養では 38 頭中 20 頭から 25 株が分離された。

表 3 月齢別 大腸菌の検出頭数および検出率

月齢	直接分離培養	増菌培養
6 ヶ月	15/60(25%)	32/60(53.3%)
繁殖豚	25/40(62.5%)	26/40(65%)
計	40/100(40%)	58/100(58%)

表 4 解体所見別 大腸菌の検出頭数および検出率

腸疾患	直接分離培養	増菌培養
有	17/38(44.7%)	20/38(52.6%)
無	23/62(37.1%)	38/62(61.3%)
計	40/100(40%)	58/100(58%)

表 5 大腸菌の血清型 (6 ヶ月齢)

直接分離培養			増菌培養		
農場	血清型	株数	農場	血清型	株数
A	O145	1(1)	A	O159	2(2)
	OUT	8(3)		O8	1(1)
				OUT	8(1)
B	O86a	1(0)	B	O29	2(0)
	OUT	1(1)		O86a	1(0)
				OUT	1(1)
C	O145	2(0)	C	O145	1(0)
D	OUT	1(0)	D	OUT	1(0)
E	-	0	E	-	-
F	-	0	F	O20	1(0)
				OUT	1(0)
G	O26	1(1)	G	-	-
H	OUT	1(1)	H	O8	1(1)
				OUT	4(2)
I	O25	1(1)	I	OUT	3(0)
	OUT	1(1)			
J	-	0	J	OUT	2(0)
K	OUT	1	K	O28ac	1(1)
				OUT	6(1)
計		19(9)			39(10)

※ () 内は廃棄された腸の検体からの分離株数を再掲

表 6 大腸菌の血清型(繁殖豚)

直接分離培養		増菌培養	
血清型	株数	血清型	株数
O136	4(2)	O157	1(0)
O145	2(2)	O136	1(1)
O111	1(1)	O158	1(0)
O63	1(0)	O168	1(0)
O28ac	1(0)	O126	1(0)
OUT	20(9)	OUT	26(14)
計	29(14)		31(15)

※()内は廃棄された腸の検体からの分離株数を再掲

【サルモネラ】

分離株の血清型を表 7 に示した。血清型は *S. Typhimurium*、*Salmonella* Infantis(以下、*S. Infantis*)、*Salmonella* Anatum(以下、*S. Anatum*)が各 1 株であった。

表 7 サルモネラ分離株の血清型

農場	O 抗原	H1 相	H2 相	血清型	分離株数
ア	4	i	－	<i>S. Typhimurium</i>	1
イ	7	r	1,5	<i>S. Infantis</i>	1
ウ	3,10 群	e,h	1,6	<i>S. Anatum</i>	1

(3) 薬剤感受性試験

分離したサルモネラ属菌 3 株について薬剤感受性試験を行ったところ、3 株とも SM において中間耐性を示したが、その他の薬剤はすべて感受性であった。

(4) PCR

昨年度の 32 株および本調査で大腸菌と同定された 118 株について *stx* の PCR を実施したが、いずれの株も *stx* を保有していなかった。

4. 考察

第一報[9]では、PCR による *stx2-2* の検索において非特異的増幅が多数の株で生じたため、判定が不可能であった。そこで本調査では、試薬を *Premix Ex Taq™* Hot Start Version(タカラバイオ株式会社)から HotStarTaq Master Mix Kit(Qiagen)へと変更したところ非特異的増幅が抑えられた。なお、陽性対照で目的の増幅サイズにバンドが得られたことから反応条件も適正であったと考えられた。

第一報[9]では直接分離培養のみ、月齢はすべて 6 ヶ月齢のと畜検査合格後の正常な直腸から糞便を採取したが、本調査では月齢、培養法、腸疾患の有無が STEC 分離率に及ぼす影響を調べるため、第一報から調査対象を拡大し、かつ増菌培養を並行して実施した。結果、月齢別では繁殖豚、培養法においては増菌培養のほうがクロモアガー STEC を用いた大腸菌の分離率が高かったものの、すべての株で *stx* が検出されなかった。また、腸疾患の有無による大腸菌の分離率に差は見られなかった。平田ら[11]は、養豚場の下痢子豚で 6.4%、子豚と同農場の健康妊娠豚で 6.8%から STEC を分離しており、分離

率は子豚と母豚間において同程度であった。平田ら[11]の分離率の結果は豚の健康状態が影響している可能性があるが、健康豚で月齢ごとに STEC 分離率を比較した報告は見当たらなかった。一方で、本調査ではクロモアガーSTEC を用いた大腸菌の分離率と月齢に関係があることが示唆された。クロモアガーSTEC には STEC 以外の細菌の発育を抑制するための発育阻害物質が含まれており、この発育阻害物質に抵抗性をもつ大腸菌が繁殖豚の腸管内に多かったため、分離率に差が生じたと考えられた。発育阻害物質に対する抵抗性の獲得には曝露機会が重要であり、繁殖豚は飼養期間が長いこと曝露機会を多く得たと推察される。また、成松ら[12]は、STEC 陽性豚 25 頭の肉眼的解体所見において出血性大腸炎像を認めたのは 2 頭のみであったと報告している。本調査で分離した大腸菌は STEC ではなかったため、既報との直接の比較はできないが、本調査でも病変の有無で大腸菌の分離率に差は無く、大腸菌保有率と病変との関連は明らかにできなかった。

血清型について、第一報[9]では分離された大腸菌 32 株すべてが OUT であった。今回の調査では全体の 74.6%が OUT であったが、人に病原性を示す主要な血清型である O157、O26、O111 が 3 頭から 1 株ずつ分離された。O145 も人からの検出数が増加傾向にある血清型である[1]。また、本調査では O8 も分離されたが、O8 は豚から高頻度に分離される病原性大腸菌の血清型の一つであり、*stx2e* を保有するものも多い[13]。寺嶋ら[14]は豚の STEC 陽性豚から O8 を最も多く分離していた。本調査ではこれらの株は STEC ではなかったが、人に病原性を示すリスクを評価するには、他の病原因子の有無についても調べる必要がある。また、今回は複数の農場から多様な血清型が分離された。分離数としては OUT を除き O145、O136 が比較的多く、O145 と O8 がそれぞれ異なる 2 つの農場から分離されたが、型別できたものの中で全農場で認められた共通の血清型はなく、同一血清型の蔓延は認められなかった。当所管内の豚における大腸菌の血清型別の分離割合や農場別分布の傾向については継続した調査が必要である。

第一報[9]、本調査ともに検体は複数の生産農場から採取していたが、STEC が分離されなかったため、当所管内には保菌率の高い汚染源となる農場が少ない可能性がある。吉田ら[15]は、と畜場に搬入された豚 50 頭の直腸便を検体として調査を実施したが、本調査と同様に全ての検体で STEC が分離されなかったと報告している。一方、福山ら[16]は農場の豚の 10.7%、寺嶋ら[14]、山本ら[17]はそれぞれと畜場に搬入された豚の 4.8%、34%から STEC を分離しており、豚の STEC 保有率には地域差がある可能性がある。豚では STX2 単独産生株が最も多く[14、16、17]、寺嶋、山本ら[14、17]はすべて *stx2e* であったと報告している。一方、牛では *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]が、豚の *stx2e* と人の感染症との関連性は不明である。しかし、稀ではあるが人からの *stx2e* の分離例も確認されており[18]、豚が人への感染源となる可能性を排除できないことから、引き続きと畜場での衛生管理の徹底が求められる。

当所では平成 16 年と 20 年に管内と畜場に搬入された豚の盲腸便を検体としてサルモネラ属菌保菌状況および薬剤感受性を調査した。豚のサルモネラ属菌保菌率は平成 16 年で 4.35%、平成 20 年は 2.5%であった。本調査でのサルモネラ属菌保菌率は 3%であり、過去の調査と同様に低かったものの、分離された血清型には、*S. Typhimurium*、*S. Infantis* が含まれており、これらは人の食中毒の原因菌として多く報告されているものであった[19]。また、当所における過去の調査と本調査で *S. Typhimurium* が共通して分離されていた。薬剤感受性試験では、過去の調査で多剤耐性を示す *S. Typhimurium* 株が認められたが、本調査では全ての株において耐性を認めなかった。近年、薬剤耐性菌の対策として、家畜の抗菌剤の適正使用が推進されてきた。本調査の結果から、当所管内での耐性菌の増加および拡大は認められず、飼養衛生管理が適正に行われていると考えられるが、薬剤耐性を獲得したサルモネラ属菌が食中毒の原因菌として人に危害を及ぼす可能性があることから今後も調査を継続し動向を注視する必要がある。

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] 山口成夫: 畜産物により媒介される 人獣共通感染症 (3) -サルモネラ感染症-, 畜産技術 9 月号 2010 年
- [7] 新井暢夫: 非定型 *Salmonella* Typhimurium 流行系統の遺伝的特徴, 日獣会誌 77 94～100 (2024)
- [8] 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium による大規模食中毒 病原微生物検出情報 Vol.25 No.4 (2004.4) p6-p7
- [9] 高橋千鶴, 菊地利紀: 豚糞便中の食中毒起因菌保有状況調査 令和 5 年度宮城県食肉衛生検査所調査研究
- [10] 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
- [11] 平田和則, 井上英幸, 光野貴文, 天野武: 家畜よりの Vero 毒素産生性大腸菌の分離と分離菌の血清型と Vero 毒素型, 感染症学雑誌 第 66 巻 第 7 号 p950-955
- [12] 成松浩志, 小林貴廣, 世古庄太, 後藤祐司, 木元正一, 尾形長彦, 淵祐一, 伊藤健一郎: と畜場に搬入された豚の糞便中におけるベロ毒素産生性大腸菌(VTEC)の分布と病原性関連因子保有状況調査, 日本食品微生物学会雑誌 19 (1), 21-26, 2002
- [13] 楠本正博: 豚の病原性大腸菌, 日本獣医師会雑誌 77 p200-205 (2024)
- [14] 寺嶋淳, 山田翔子, 和賀萌美, 推野千紘: 食中毒調査の迅速化・高度化及び広域食中毒発生時の早期探知等に資する研究 動物由来株の収集と分子型別, 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業) 令和 4 年度分担研究報告書
- [15] 吉田紀美, 青木紀子, 田中博, 大瀬戸光明, 井上博雄: 家畜および食肉等における腸管出血性大腸菌の血清型別分布状況に関する調査研究, 平成 18 年度愛媛衛環研年報 9 (2006)
- [16] 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 巻 12 号 p1032-1039
- [17] 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)
- [18] Anne-Katharina Sonntag, Martina Bielaszewska, Alexander Mellmann, Nadine Dierksen, Peter Schierack, et al.: Shiga Toxin 2e-Producing *Escherichia coli* Isolates from Humans and Pigs Differ in Their Virulence Profiles and Interactions with Intestinal Epithelial Cells, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Dec. 2005, p. 8855-8863

- [19] 国立感染症研究所 病原微生物検出情報 速報集計表
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-table/1525-iasrb.html>