

原 著

山口県内で飼養される子牛の口腔内における
志賀毒素産生性大腸菌の保有状況亀山光博 矢端順子 野村恭晴 富永 潔[†] 富田正章

山口県環境保健センター保健科学部 (〒753-0821 山口市葵2-5-67)

(2013年5月29日受付・2013年9月17日受理)

要 約

2006～2009年に、山口県内A農場で飼養される子牛の口腔内における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の保有状況を検討した。186頭のうち24頭 (12.9%) から27株のSTECが分離され、O群型は、O26が13株と最も多く、次いで型別不能株 (OUT: 5株), O8 (4株), O111 (3株), O119 (2株) であった。12薬剤による薬剤感受性試験の結果、24株 (89%) が供試した1剤以上に耐性を示し、O8の4株とO111の1株はシプロフロキサシンに、O26の1株はホスホマイシンに耐性を示した。O26及びO111分離株のパルスフィールドゲル電気泳動解析の結果、各血清型の中で同一あるいは非常に類似したパターンを示す株がみられたことから、農場内で由来の同じ株が個体間で水平伝搬した可能性が示唆された。——キーワード: 子牛, 口腔, 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)。

----- 日獣会誌 67, 73～78 (2014)

牛は志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) の主要な保菌動物である [1, 2]。牛から人への感染は主としてSTECに汚染された牛肉等を介した経口感染によるが、近年、牛とのふれあいイベントによるSTEC感染症の報告が相次いでいる (病原微生物検出情報)。これらの事例では、牛糞便由来のSTECに汚染された体表等との直接接触による感染であったと推察されている。しかしながら、STECの第一胃内保菌状況 [2, 3] や、と畜場搬入牛の舌スワブからのSTEC分離報告 (大分県食肉衛生検査所平成22年度事業概要) から推察すると、第一胃内に保菌されたSTECが反芻に伴って間歇的あるいは持続的に口腔内に出現することで、舌との接触や唾液を介して人がSTECに感染する可能性は十分考えられる。実際、海外では牛におけるSTECの口腔内保菌が確認されているが [1]、国内では牛口腔内のSTEC保菌状況を調査した報告はない。

そこでわれわれは、山口県内で飼養される子牛の口腔内におけるSTEC保菌状況を4年間にわたって調査し、その保菌状況並びに分離株の血清型及び産生する志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) の毒素型及びサブタイプを明らかにした。さらに、近年、人や家畜由来大腸菌のキノロ

ン系薬剤等に対する耐性化が問題視されていることから、分離株の各種薬剤に対する感受性についても調査・検討した。

材料及び方法

供試材料: 2006～2009年の各9～11月に、山口県内のA肥育農場に導入された牛200頭 (50頭/年) を対象とした。200頭のうち、12カ月齢未満 (子牛) が186頭 (平均58日齢)、12カ月齢以上 (成牛) が14頭 (平均81カ月齢) であった。牛の口腔内をふき取りキット (ふきとりエースL, 栄研化学株, 栃木) で拭い、付属のPBSに十分懸濁し、検査開始まで冷蔵保管した。

増菌培養: ①2006年及び2007年に採取された検体については、検体のPBS懸濁液20mlをノボピオン加mEC培地 (NmEC, 栄研化学株, 栃木) 200mlに接種し、42℃, 24時間の選択増菌培養を行った。②2008年及び2009年に採取した検体は、検体のPBS懸濁液20mlをトリプトソーヤブイオン (TSB, 日本製薬株, 東京) 200mlに接種し、37℃, 18時間増菌培養後、その10mlをNmEC 100mlに接種し、42℃, 24時間の選択増菌培養を行った。

[†] 連絡責任者: 富永 潔 (山口県環境保健センター保健科学部)

〒753-0821 山口市葵2-5-67 ☎083-922-7630 FAX 083-922-7632

E-mail: tominaga.kiyoshi@pref.yamaguchi.lg.jp

表1 牛口腔内のSTEC分離状況及び分離株の血清型

調査年	成牛/子牛 ¹⁾ (平均日/月齢)	検体数	stx 陽性数 ²⁾ (%)	STEC 分離		
				陽性数 (%)	株数	血清型(株数) ³⁾
2006	成牛 (81カ月)	14	NT	0	0	
	子牛 (104日)	36	NT	2 (5.6)	2	O26:H11/NM (2)
2007	子牛 (39日)	50	NT	0	0	
2008	子牛 (69日)	50	26 (52)	11 (22.0)	14	OUT:H16 (5), O8:H19 (4), O26:H11 (2), O119:H4/NM (2), O111:HUT (1)
2009	子牛 (34日)	50	16 (32)	11 (22.0)	11	O26:H11 (9), O111:HNM (2)

1) 子牛: 12カ月齢未満 成牛: 12カ月齢以上

2) PCR法によるNmEC増菌培養液中のstx陽性数 NT: 未実施

3) NM: 非運動性 UT: 型別不能

STECの分離培養: 血清群O157, O26及びO111については, ①, ②の増菌培養液をそれぞれの免疫磁気ビーズ (Dynabeads anti-E. coli O157, Dynabeads EPEC/VTEC O26, Dynabeads EPEC/VTEC O111, 株ベリタス, 東京) を用いて濃縮し [4, 5], その25 μ l をセフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT, Oxoid LTD, England) 加マッコンキーソルビトール寒天培地 (日水製薬株, 東京) 及びクロモアガーO157TAM (CHROMagar, France) (以上O157分離用), CT加1%ラムノース加マッコンキー寒天培地及びCT加ViRXO26 (栄研化学株, 東京) (以上O26分離用), CT加1%ソルボース加マッコンキー寒天培地 (O111分離用) 上に画線塗抹後, 37°C, 24時間培養した. その他のO血清群の大腸菌については, NmEC増菌培養液の1白金耳量をXM-G寒天培地 (日水製薬株, 東京) 上に画線塗抹後, 37°C, 24時間培養した. おのおのの平板上のSTECを疑うコロニーを8個以上釣菌し, ミュラーヒントン寒天培地 (MHA, Oxoid LTD, England) に純培養した. 純培養株をCAYE培地 (自家調製) に接種して37°C, 24時間振盪培養後, 逆受身ラテックス凝集反応法 (VTEC-RPLA「生研」, デンカ生研株, 東京; RPLA法) によりStx産生を確認した.

菌種同定及び血清型: Stx産生株について, グラム染色及びTSI寒天培地 (極東製薬工業株, 東京), LIM培地 (極東製薬工業株, 東京), SIM培地 (栄研化学株, 栃木) に接種して生化学性状を確認後, IDテストEB-20 (日水製薬株, 東京) を用いて大腸菌であることを確認した. 血清型は市販血清 (デンカ生研株, 東京) を用いて添付の説明書に従いO群, H抗原を決定した. 各検体分離株のうち, 同一血清型を示した株は1検体につき代表1株を選択し, 以降の試験に用いた.

増菌培養液中のstxの検出: 2008年及び2009年の検体については, ②の増菌培養液200 μ lから市販キット (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Sciences, U.S.A.) を用いてDNAを抽出し, 市販のstx1, 2検出用プライマーセット (EVC-1&2 primer set, タカラバ

イオ株, 滋賀) を用いたPCR法を行った.

stxサブタイピング及びeaeの検出: 市販キットを用いてDNA抽出後, Scheutzら [6] のPCR法によりstxのサブタイプ (stx1a, 1c, 1d, stx2a~2g) を決定した. また, eaeはNarimatsuら [7] のprimer (mSK1/eaekas_1) を用いたPCR法により検出した.

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析: 制限酵素XbaI (Roche, Germany) を用いてPFGE解析を実施した [8]. 得られた泳動像から解析ソフト (Molecular Analyst Finger printing PLUS Ver: 3 software, Bio-Rad, U.S.A.) を用いてデンドログラムを作成し, 90%以上の相同性を示した株を遺伝的に近縁な株とみなした.

薬剤感受性試験: 薬剤感受性キット (センシ・ディスク, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京) を用いてKirby-Bauer法により実施した. 供試薬剤は, 腸管出血性大腸菌の治療に用いられるシプロフロキサシン (CPFX), ホスホマイシン (FOM) に加え, アンピシリン (ABPC), セファゾリン (CEZ), セフォタキシム (CTX), 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), クロラムフェニコール (CP), テトラサイクリン (TC), ナリジクス酸 (NA) 及びスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の12種類を用いた.

成 績

口腔内のSTEC保有状況: 表1に示すとおり, 子牛186頭のうち24頭 (12.9%) からSTECが分離され, 成牛からは分離されなかった. 陽性2頭 (いずれも2008年) から2種類及び3種類の血清型のSTECが同時に分離され, 24頭から27株が得られた. そのうちO26が13株と最も多く, 次いでO群型別不能株 (OUT) が5株, O8が4株, O111が3株, O119が2株であった. また増菌培養液中のstx陽性率は52% (2008年) 及び32% (2009年) であった.

分離株のStx産生性と遺伝子サブタイプ及びeae保

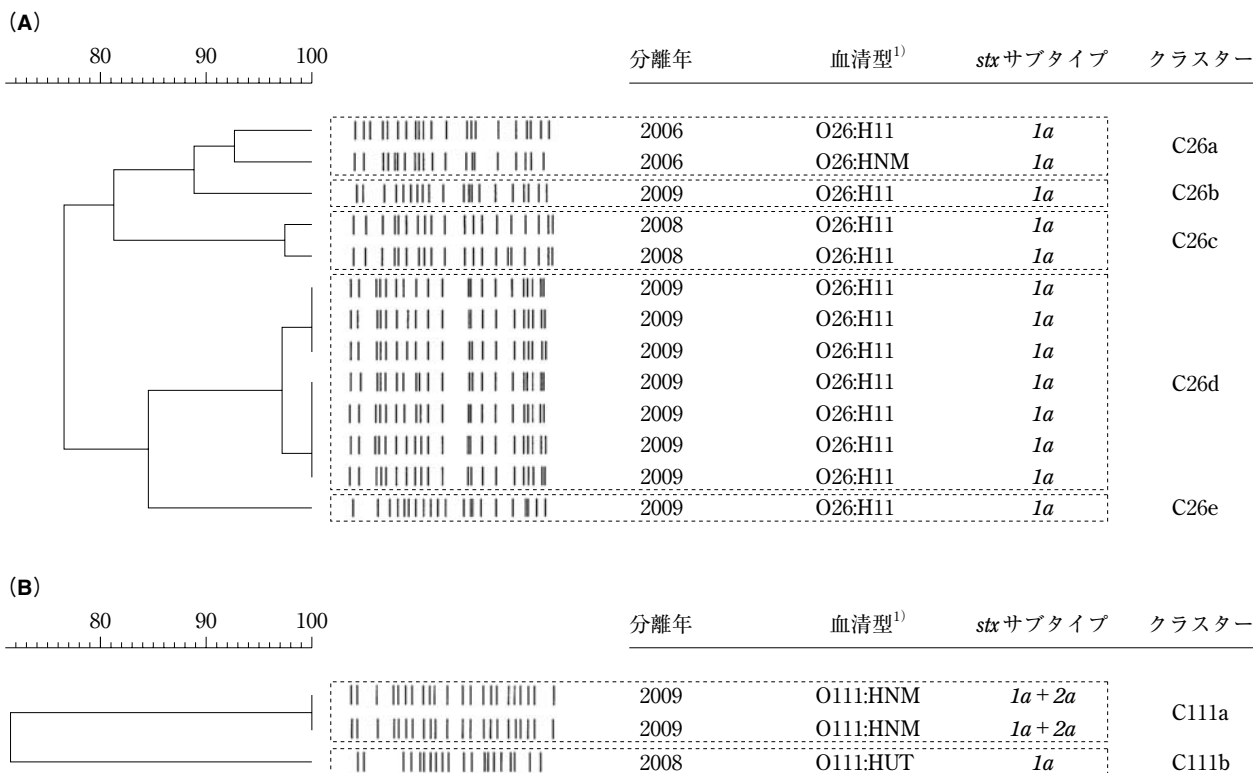


図 STEC O26 13株 (A) と O111 3株 (B) の PFGE によるクラスター解析
90%以上の相同性を示した株を破線で囲んだ。
1) NM：非運動性 UT：型別不能

表2 分離された STEC の Stx 産生能, stx サブタイプ 及び eae 保有状況

血清型	分離株数	分離年 (株数)	Stx ¹⁾ 産生能	stx ²⁾ サブタイプ	eae ²⁾
O26:H11	12	2006 (1), 2008 (2), 2009 (9)	1	1a	+
O26:HNM	1	2006 (1)	1	1a	+
O8:H19	4	2008 (4)	2	2a	-
O111:HNM	2	2009 (2)	1	1a+2a	+
O111:HUT	1	2008 (1)	1	1a	+
O119:H4	1	2008 (1)	1	1a	-
O119:HUT	1	2008 (1)	1	1a	-
OUT:H16	5	2008 (5)	2	2a+2g	-

1) RPLA 法 2) PCR 法

有状況：O26 の 13 株, O119 の 2 株及び O111 の 3 株中 1 株は Stx1 産生株で, そのサブタイプはいずれも 1a であった。O8 の 4 株と OUT の 5 株は Stx2 産生株で, そのサブタイプは O8 が 2a であったが, OUT は 2a と 2g であった。また 2009 年に分離された O111 の 2 株も Stx1 産生株であったが, そのサブタイプは 1a と 2a であった (表2)。

eae の保有状況は, O26 と O111 のすべての株は陽性であったが, O8, O119, OUT のすべての株は陰性であった。

PFGE 解析：O26 (13 株) と O111 (3 株) のデンドログラムを図に示す。O26 は 5 種類 (C26a ~ C26e), O111 は 2 種類 (C111a, C111b) のクラスターを形成した。O26, O111 の分離年の異なる株はそれぞれ個別のクラスターを形成した。また OUT (5 株), O8 (4 株) 及び O119 (2 株) についてはそれぞれ同一あるいはきわめて類似した PFGE パターンを示した (データ未掲載)。

分離株の薬剤感受性：24 株 (89%) が 1 剤以上に耐性を示した (表3)。供試薬剤別の耐性率は, TC が 59%, SM が 48%, CP が 48%, ABPC が 26%, KM が 26%, ST が 22%, NA が 19%, CPFX が 19%, CEZ が 11%, GM が 4%, FOM が 4% であり, CTX 耐性株は認められなかった。また, O8 の 4 株及び O111 の 1 株は CPFX 耐性であり, O26 の 1 株は FOM 耐性であった。

考 察

本研究により, 県内の 1 肥育農場に飼養される子牛の 12.9% はその口腔内に STEC を保有していることが判明した。分離株のうち, OUT を除く 4 種の O 血清群 (O26, O8, O111, O119) はいずれも国内で人から分離された事例があることから, 今後牛との接触が疑われる STEC 感染症が発生した際には, 口腔内に保菌されて

表3 分離株の薬剤感受性

血清型	分離株数	耐性株数 (%)	耐性パターン ¹⁾ (株数)
O26:H11/NM	13	10 (76.9)	ABPC・SM・KM・GM・TC・CP・ST (1) ABPC・SM・KM・TC・CP・ST (1) SM・CP (1) SM・FOM (1) CP (6)
OUT:H16	5	5 (100)	TC (5)
O8:H19	4	4 (100)	ABPC・CEZ・SM・TC・CP・NA・CPFY (2) ABPC・CEZ・SM・TC・CP・NA・CPFY (1) ABPC・SM・TC・CP・NA・CPFY (1)
O111:HUT/NM	3	3 (100)	ABPC・SM・KM・TC・NA・CPFY (1) SM・KM・TC (2)
O119:H4/UT	2	2 (100)	SM・KM・TC・ST (2)
計	27	24 (88.9)	

1) ABPC: アンピシリン CEZ: セファゾリン SM: ストレプトマイシン KM: カナマイシン GM: ゲンタマイシン TC: テトラサイクリン CP: クロラムフェニコール NA: ナリジクス酸 CPFY: シプロフロキサシン FOM: ホスホマイシン ST: スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤

いるSTECも考慮して疫学調査を進める必要があると考えられた。また本研究では1歳以上の成牛からはSTECは分離されなかった。成牛は2006年に14頭についてのみ実施したにすぎないため、今後はさらに多くの成牛について口腔内保菌調査を行う必要があると思われた。

口腔拭い液の増菌培養法に関して、2006～2007年の検体では1段階増菌法を用いたが、分離培地上の大腸菌の発育自体が悪かったことから、2008～2009年の検体には2段階増菌法を用いたところ、大腸菌の十分な発育が認められ、かつSTEC分離率は0～4%から22%に上昇した。牛口腔内はpHが8.5前後と高く[9]、栄養分も少ないことから大腸菌が生残する上で不利な環境であり、菌数も腸管内に比べ少なく、菌の活性も低下していると考えられる。したがって、口腔内から効率的にSTECを分離するためには、TSB等の非選択培地による1次増菌培養を行った後に、NmECによる選択増菌培養を行うことが有効であると思われる。

本研究で分離されたSTECの*stx*サブタイプには、1*a*, 2*a*, 1*a* + 2*a*, 2*a* + 2*g*の4パターンが認められた。国内では人と牛由来STECでは1*a*, 2*a*, 2*c*, 1*a* + 2*a*, 1*a* + 2*c*, 2*a* + 2*c*の6パターンが主流であるとされ[10]、本研究の結果とはOUTが保有する2*a* + 2*g*を除き同様の傾向であった。

O111の3株のうち2株は*stx1a*に加えて*stx2a*も保有していたにもかかわらず、RPLA法ではStx2は検出さ

れなかった。この理由として、Kusumotoら[11]の報告による*stx*内へのISの挿入などが考えられる。

intimin蛋白をコードする*eae*は、人由来STEC株の大部分が保有し[10]、腸管粘膜への付着に関与する主要な遺伝子の一つであるといわれている。本研究で分離されたO26とO111は*eae*保有株であったため、これらの株が人に感染した場合、病原性を示す可能性がある。またO8の4株、O119の2株並びにOUTに属する5株(計11株、41%)は*eae*非保有株であった。牛由来STECの*eae*保有率は低いことが報告されている[10, 12]。これまで*eae*非保有株は人に病原性は示さないと考えられていたが、下痢症患者やHUS患者から*eae*非保有株が分離されること[13]やintimin以外の接着因子(Saa等)も病原因子である可能性が報告[14]されていることから、近年では*eae*非保有株も人に病原性を示すものがあると考えられている。今後、牛由来株を含む*eae*非保有株の人に対する病原性発現機構について詳細な解析を行う必要があると思われる。

O26とO111のPFGE解析では、2009年に分離されたO26の9株は、2株を除き同一か非常に類似したPFGEパターン(C26d)を示した。さらに、このクラスターC26dに属する7株のうち、6株はCP耐性、1株はSMとCP耐性であり、やはり類似した耐性パターンを示したことから、農場内で同じ由来の株が個体間で水平伝搬した可能性が考えられた。また分離年の異なる株はそれぞれ別個のクラスターを形成したことから、農場内で同一株が定着して起こった持続的な感染ではなく、由来の異なるSTECを保有した子牛が年度ごとに農場に導入されたことが原因と考えられる。

薬剤感受性試験の結果、89%の株が供試したいずれかの薬剤に耐性を示し、特にSMとTCの2剤の耐性率が高かった。過去の牛由来株の薬剤耐性率(31～71%)と比べて高率であったが、SM, TCの耐性率はほぼ同様の傾向であった[15, 16]。またニューキノロン系であるCPFY耐性株が5株、FOM耐性株が1株認められた。両抗菌剤は国内では人のSTEC感染症の治療に用いられることから、これらの耐性菌が人に感染した場合には治療が困難となる可能性が考えられる。このため、今後も継続して牛由来STEC耐性株の動向を注視し、拡散を防止するとともに、耐性機構を解明する必要がある。

牛は体表等さまざまな部位にSTECを保有していることから[1]、接触によっても人に感染することがある。実際に、本県においても2012年に牛との接触によるSTEC O26感染事例が発生している(病原微生物検出情報)。本研究により、子牛は口腔内にSTECを保菌していることが明らかになったことから、牛とのふれあいイベントや牛の飼育に際しては、舐められない、触れた後は必ず手を洗う等の十分な感染防止対策を講ずる必要が

あると考えられる。

本研究は、2006～2009年に実施された「山口県動物由来感染症予防体制整備事業」の一環として行われたものである。

本稿を終えるにあたり、*stx* サブタイプの陽性コントロール DNA を分与していただいた国立感染症研究所細菌第一部伊豫田淳博士に深謝する。

引用文献

- [1] Keen JE, Elder RO : Isolation of shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 from hide surfaces and the oral cavity of finished beef feedlot cattle, *J Am Vet Med Assoc*, 220, 756-763 (2002)
- [2] 前原智史, 木太俊雅, 藤野靖子, 辻本光宏 : 夏季における牛の腸管出血性大腸菌 O157 保菌状況と分離株の薬剤感受性, *日獣会誌*, 58, 205-208 (2005)
- [3] Laven RA, Ashmore A, Stewart CS : *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157, *Vet J*, 165, 78-83 (2003)
- [4] Department of Communicable Disease Surveillance Response, World Health Organization : Zoonotic non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC): Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, Berlin, Germany (1998)
- [5] Parham N, Spencer J, Taylor D, Ternent H, Innocent G, Mellor D, Roberts M, Williams A : An adapted immunomagnetic cell separation method for use in quantification of *Escherichia coli* O157:H7 from bovine faeces, *J Microbiol Methods*, 53, 1-9 (2003)
- [6] Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing *stx* nomenclature, *J Clin Microbiol*, 50, 2951-2963 (2012)
- [7] Narimatsu H, Ogata K, Makino Y, Ito K : Distribution of non-locus of enterocyte effacement pathogenic island-related genes in *Escherichia coli* carrying *eae* from patients with diarrhea and healthy individuals in Japan, *J Clin Microbiol*, 48, 4107-4114 (2010)
- [8] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ : Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog Dis*, 3, 59-67 (2006)
- [9] McDougall EI : Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva, *Biochemical J*, 43, 99-109 (1948)
- [10] 塚本定三, 山崎伸二, 牧野壮一, 朝倉 宏, 竹田美文 : ヒト及び動物由来の志賀毒素産生性大腸菌の血清型と毒素型, *感染症誌*, 76, 167-173 (2002)
- [11] Kusumoto M, Nishiya Y, Kawamura Y, Shinagawa K : Identification of an insertion sequence, IS1203 variant, in a shiga toxin 2 gene of *Escherichia coli* O157:H7, *J Biosci Bioeng*, 87, 93-96 (1999)
- [12] 神田 隆, 佐々裕一郎, 漆畑 健, 小長井春夫, 江成博, 光崎研一, 金内長司, 渡邊茂廣 : 牛からの志賀毒素産生性大腸菌の分離と病原因子, *日獣会誌*, 56, 267-271 (2003)
- [13] Käppeli U, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R : Human infections with non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009, *Emerg Infect Dis*, 17, 180-185 (2011)
- [14] Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC : Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans, *Infect Immun*, 69, 6999-7009 (2001)
- [15] 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)
- [16] 又吉正直 : 沖縄県における子牛下痢由来腸管毒素原性大腸菌と志賀毒素産生大腸菌の薬剤耐性と耐性遺伝子, *日獣会誌*, 63, 620-624 (2010)

Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in the Oral Cavity of Calves
Raised in Yamaguchi Prefecture

Mitsuhiro KAMEYAMA, Junko YABATA, Yasuharu NOMURA, Kiyoshi TOMINAGA[†]
and Masaaki TOMITA

* *Department of Health Science, Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan*

SUMMARY

During the period from 2006 to 2009, the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the oral cavity of calves raised at Farm A in Yamaguchi Prefecture was examined. STEC was isolated in 24 out of 186 oral samples (12.9%). Among the 27 strains of the 24 positive samples, the predominant O serogroup was O26 (13 strains), followed by O untypeable (5 strains), O8 (4 strains), O111 (3 strains) and O119 (2 strains). The strains' antimicrobial susceptibility to 12 different drugs resulted in 24 strains (89%) being resistant to one or more drugs. Among the resistant strains, four O8 and one O111 strains showed resistance to ciprofloxacin, whereas one O26 strain was resistant to fosfomycin. From the results of a pulsed-field gel electrophoresis analysis on the O26 and O111 strains, several strains in each serogroup showed identical or similar patterns, indicating that horizontal transmission of the same clones had occurred among the calves at the farm.

— Key words : calf, oral cavity, shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC).

[†] *Correspondence to : Kiyoshi TOMINAGA (Department of Health Science, Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment)*

2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan

TEL 083-922-7630 FAX 083-922-7632 E-mail : tominaga.kiyoshi@pref.yamaguchi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 73 ~ 78 (2014)
