豚浮腫病由来大腸菌のVero毒素産生性

目見田 清¹⁾ 菊地正健¹⁾ 大澤哲也¹⁾山崎 勝¹⁾ 藤岡一彦²⁾ 田中 博³⁾山崎伸二⁴⁾ 竹田美文⁴⁾

1) 愛媛県家畜病性鑑定室 (伊予郡松前町昌農地 641, 〒791-31)

2) 愛媛県中央家畜保健衛生所 (伊予郡松前町昌農地 641, 〒791-31)

3) 愛媛県伊予保健所 (伊予市米湊 269 番地, 〒799-31)

4) 京都大学医学部 (京都市左京区吉田近衛町, 〒606)

(平成2年12月18日受付・平成3年7月19日受理)

Vero Toxigenicity of *Escherichia coli* Isolated from Pigs with Edema Disease

KIYOSHI MEMIDA¹⁾, MASATAKE KIKUCHI¹⁾, TETSUYA OSAWA¹⁾, MASARU YAMAZAKI¹⁾, KAZUHIKO FUJIOKA²⁾, HIROSI TANAKA³⁾, SHINJI YAMASAKI⁴⁾ and YOSHIFUMI TAKEDA⁴⁾ (¹⁾ Veterinary Diagnostic Laboratory, Ehime Prefecture, Masaki-cho, Iyo-gun, Ehime 791-31, ²⁾ Chuo Livestock Hygiene Service Center, Ehime Prefecture, Masaki-cho, Iyo-gun, Ehime 791-31, ³⁾ Iyo Public Health Center, Ehime Prefecture, Kominato, Iyo-shi, Ehime 799-31, ⁴⁾ Kyoto University School of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606)

SUMMARY

From August through December in 1988, edema disease sporadically broke out in piglets 30 - 43 days of age raised on three pig farms within the jurisdiction of Ehime's Chuo Livestock Hygiene Service Center, and pathological and bacteriological examinations were carried out.

A bacteriological examination was carried in 7 dead animals which had been diagnosed as edema disease from the clinical signs and pathological findings and in one slaughtered case according to the results of a diagnostic test, and *Escherichia coli* was isolated from the small intestines at the ratio of 10^{7-10} cfu/g. Serotype of the isolates turned out to be 0139 and these bacteria were found to produce Vero toxin. Furthermore, this toxin was identified as VT2vp by a DNA hybridization test using beads-ELISA and an oligonucleotide probe.

From these findings, VT2vp-toxigenic *Escherichia coli* was considered to be a causative organism of swine edema disease. In addition, since some pigs having VT2vp-toxigenic *Escherichia coli* were confirmed, it was suggested that these carriers could possibly be an infection source. The present study is the first to isolate VT2vp-toxigenic *Escherichia coli* from pigs with edema disease or healthy pigs in Japan.

—Key Words : swine, edema disease, Vero toxin, *Escherichia coli*.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 1167~1171 (1991)

要 約

1988年8月から12月にかけて、愛媛県中央家畜保健衛生所管内の3養豚場で30～43日齢豚に浮腫病が散発し、病理学的、細菌学的検索を行った。

臨床症状および病理学的所見から浮腫病と診断され、死亡子豚7頭と病性鑑定殺豚1頭について細菌学的検査を行ったところ、小腸内から 10^{7-10} cfu/gの菌数で大腸菌が分離された。これらの分離菌の血清型は0139で、Vero毒素を産生していることが確認された。さらに、beads-ELISAとオリゴヌクレオチドプローブを用いたDNAコロニーハイブリダイゼーション試験により、この毒素はVT2vpと型別された。

以上の結果から、VT 2 vp 産生大腸菌が豚浮腫病の原因菌となると考えた。また、VT 2 vp 産生大腸菌の保菌豚を確認したことから、保菌豚が感染源となる可能性が考えられた。なお、今回の豚浮腫病および健康豚からの VT 2 vp 産生大腸菌の分離は、わが国で最初である。——キーワード：豚、浮腫病、ベロトキシン産生性。

豚の浮腫病は通常 1～4 カ月齢豚に散発的に発生する疾病で、世界各地の豚生産国において報告されている。本疾病に罹患した豚は、神経症状、体表の浮腫、下痢等を呈し、発病後 24 時間以内に急死することが多い。

本疾病の原因菌は 0138, 0139, 0141 等の血清型を有する大腸菌で、これら的大腸菌が産生する浮腫病因子 (edema disease principle: EDP) の作用により症状が発現するとされているが⁶⁾、EDP の性状やその作用機序については不明な点が多い。

いっぽう、近年 Vero 細胞に細胞毒性を示す毒素 (Vero toxin: VT) を産生する大腸菌による疾病が獣医学領域においても注目され、本毒素による牛の下痢や豚の浮腫病等が報告されている^{7,14)}。VT には Vero toxin 1 (VT1)^{2,10)}、Vero toxin 2 (VT2)^{2,17)} および 2 種類の Vero toxin 2 variant (VT2 vp⁴⁾ と VT2 vh¹²⁾ が報告されており、これらの毒素を検出するための免疫学的検査法¹³⁾や遺伝学的検査法⁸⁾が開発されている。

今回、われわれは愛媛県内の 1 養豚団地内で発生した浮腫病について病理学的調査を行うとともに、分離された大腸菌が産生する Vero 毒素の型別を bead-ELISA とオリゴヌクレオチドプローブを用いた DNA コロニーハイブリダイゼーション試験により行った。

材料および方法

発生状況の概要と供試材料

1988 年 8 月から 12 月にかけて愛媛県内にある 3 養豚場で浮腫病が散発的に発生した。この 3 養豚場は 1 農場当たり繁殖母豚を約 100 頭飼養する一貫経営農家である。浮腫病は 30 日から 43 日齢の子豚に多発し、灰黄色下痢便がほぼすべての病豚に認められた。さらに、眼瞼浮腫や神経症状を示すものもみられた。この期間に離乳した子豚 2280 頭、斃死頭数は 252 頭、斃死率は約 11% にも達した。また、斃死例うち 2% が眼瞼浮腫、3% が神経症状を発現した。

これらの発病した子豚のうち 8 頭を病性鑑定のため検査に供試し、病理組織学的・細菌学的検索を行った。検体番号 1 から 5 は 1988 年 8 月から 10 月までに A, B および C の 3 養豚場で発病した病豚であり、検体番号 6 から 8 までは 12 月に A および B 養豚場で発生した病豚である。なお、検体番号 2 は病性鑑定殺豚であるが、他はすべて死後約 2 時間経過した病豚である。

さらに、3 養豚場において浮腫病発生後、これらの養豚場の健康豚における Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC)

の保菌状況を調べるため、繁殖母豚 14 頭、種雄豚 4 頭、肥育豚 37 頭および子豚 12 頭の直腸便から VTEC の分離を試みた。

病理組織学的検査

死亡および鑑定殺した病豚から採材した各臓器を 10% ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的に検査した。

細菌学的検査

病原菌の検索：死亡子豚 7 頭と病性鑑定殺豚 1 頭の主要臓器、脳、腸間膜リンパ節および腸内容物から大腸菌の分離を試みた。また、腸管系病原菌として *Salmonella*, *Yersinia*, *Clostridium perfringens* 等の分離も試みた。これらの病原菌を分離するため、トリプトソイ寒天培地、マッコンキー寒天培地を用いた好気培養の他、5% 羊血液寒天培地を用いた 10% 炭酸ガス培養と GAM 寒天培地を用いたガスバック法による嫌気培養を実施した。また、小腸内の大腸菌数はマッコンキー寒天培地を用いた平板希釈法で測定した。

大腸菌の同定：同定キット (ID テスト EB—20, 日水) を用い、分離した大腸菌の生化学的性状検査を行った。

分離大腸菌の毒素産生能検査：

試料の調整：分離した大腸菌をブレインハートインフュージョン (Difco) に接種し、37℃ で 20 時間振とう培養後、その遠心上清をメンブランフィルターで濾過したものを試料とした。

Vero 細胞に対する細胞毒性試験：Vero 細胞に対する細胞毒性試験は CHO 細胞法⁵⁾に準じて行い、細胞変性効果 (CPE) を 5 日間観察した。さらに、試料を段階希釈しその希釈試料を Vero 細胞に作用させ、CPE が発現した最高希釈値を VT の CPE 力価とした。

マウス致死活性試験：試料をマウスの腹腔内に 0.5 ml 接種し生存の有無を 7 日間観察した。さらに、コロジオンバックで約 50 倍濃縮した試料についても同様な方法で致死活性を調べた。

ウサギ結紮腸管ループ試験：ウサギの結紮腸管ループを常法⁵⁾に準じて作製し試料 0.5 ml を接種した。翌日、剖検し浸出液の貯留量を測定した。

大腸菌の O 群血清型別試験：農林水産省家畜衛生試験場に依頼し O 抗原の血清型別を行った。

LT および ST の産生能試験：易熱性エンテロトキシン (LT) は逆受身ラテックス凝集反応 (デンカ生研) により、また耐熱性エンテロトキシン (ST) は乳のみマウ

表1 剖 検 所 見

所 見/	養豚場 検体No.	A		B		C		A		B
		1	2	3	4	5	6	7	8	
脳：血管充盈				+	+	+	+			
心：点状出血				+	+	+		+		
肺：肝変化				+	+		+	+	+	
充 血								+		
腎：点状出血				+	+		+	+		
胃：粘膜充血				+	+			+		
粘膜糜爛							+			
小腸：粘膜充出血		+	+	+	+	+		+	+	
腸間膜リンパ節：腫 脹		+	+	+	+	+	+	+	+	
充出血		+	+	+	+	+	+	+	+	

注) +：所見を認める

表2 病理組織所見

所 見/	養豚場 検体No.	A		B		C		A		B
		1	2	3	4	5	6	7	8	
脳：うっ血		+	NT	+	+		+	+	+	
出 血				+				+		
皮質浮腫		+		+					+	
血管壁の疎鬆化				+				+		
神経細胞の変性				+						
心：出 血			NT			+				
肺：うっ血		+	NT	+	+	+	+	+	+	
小葉間質の浮腫性										
拡張										+
肝：うっ血		+	NT	+	+	+	+	+	+	+
リンパ球集簇				+						+
ヘモジデリン沈着								+	+	
腎：出 血		+	NT	+	+	+	+	+	+	
血管壁の疎鬆化		+								
脾：うっ血		+	NT				+	+	+	
細網細胞活性化		+		+			+	+	+	
小腸：うっ血, 出 血		+	NT	+	+	+		+	+	
上皮細胞の壊死剥離		+		+	+	+		+	+	
下織の浮腫		+		+	+	+	+	+	+	
好酸球浸潤		+		+	+	+				
血管壁の疎鬆化		+				+				
腸間膜リンパ節：			NT	NT						
充 出 血		+			+	+	+	+	+	
血管壁の疎鬆化		+			+	+	+			
好酸球浸潤		+			+			+	+	
ヘモジデリン沈着		+					+	+	+	
浮 腫					+	+				

注) ++：中等度病変 +：軽度病変 ++：極めて微弱な病変 NT：検索せず

ス胃内投与法⁵⁾により実施した。

腸管付着因子の検査：付着因子免疫血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応により調べた。

bead-ELISA による Vero 毒素の毒素型別：精製 VT¹⁰⁾, VT 2¹⁷⁾, VT 2 vh¹²⁾ をウサギに免疫して得られた抗 VT 1 血清, 抗 VT 2 血清, 抗 VT 2 vh 血清を用いた bead-ELISA¹³⁾ により Vero 毒素の毒素型別を行った。このうち, VT 2 vh に特異的な bead-ELISA 系の作製は精製 VT 2 結合 Sepharose 4 B カラムに西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗 VT 2 vhFab⁺ をアブライし, VT 2 と VT 2 vh の共通抗原を認識する標

表3 β 溶血性大腸菌の検索成績

養豚場	検体No.	日 齢	肝 臓	脾 臓	腎 臓	肺 臓	心 臓	脳	腸 間 膜 リンパ節	小腸内容物 (log10cfu/g)
A	1	38	-	-	-	-	-	+	+	9
A	2	31	-	-	-	-	-	-	-	7
B	3	38	-	-	-	-	-	-	-	8
B	4	30	-	-	-	-	-	-	-	7
C	5	40	-	-	-	-	-	-	-	7
A	6	43	-	-	-	+	-	-	-	10
A	7	40	-	-	-	-	-	-	-	9
B	8	40	-	-	-	-	-	-	-	10

注) +：大腸菌分離陽性 -：大腸菌分離陰性

識抗体を樹脂に結合させもとの画分を VT 2 vh 特異標識抗体とした。この抗体が VT 2 および VT 1 と反応しないことを確認して, VT 2 vh 特異抗体として用いた。

オリゴヌクレオチドプローブを用いた Vero 毒素の毒素型別：VT 1¹⁵⁾, VT 2¹¹⁾, VT 2 vh¹⁾, VT 2 vp¹⁶⁾ それぞれの構造遺伝子に対する³²P でラベルした特異的オリゴヌクレオチドプローブを作製し, DNA コロニーハイブリダイゼーション試験により遺伝学的に Vero 毒素の型別を行った。

成 績

病 理 学 的 所 見

剖検所見は表1に示すとおりで, ほとんどすべての検体に腸間膜リンパ節および小腸粘膜における充出血が認められた。また, 約半数の検体では脳, 心臓, 肝臓, 腎臓および胃に充血, 点状出血等の病変が認められた。

病理組織所見は表2に示すとおり病変の強さに差はあるが, 全例をつうじて全身性のうっ血や出血を認め1部充血も認めた。その他, 小腸粘膜下織の浮腫や小腸, 脳, 腎臓および腸間膜リンパ節で血管壁の疎鬆化, また1例では神経細胞の核融解や濃縮を伴う変性がわずかにみられた。

細 菌 学 的 検 査

大腸菌の分離状況：大腸菌の分離状況は表3に示したとおりβ溶血性の大腸菌が全例の小腸内容物から分離され, その菌数は10⁷⁻¹⁰ cfu/g であった。その他, 肺, 脳および腸間膜リンパ節からも同様な溶血性大腸菌が分離された検体がみられた。なお, 大腸菌以外は対象とした腸管系病原菌はいずれの検体からも分離されなかった。

分離菌の血清型と生化学的性状：分離菌の生化学的性状はいずれも定型的性状を示したが, 検体 No. 3 と 7 から分離された2株 (K 3 および K 7) が非運動性であった。血清型別試験の結果はすべての菌株が 0139 に型別された。なお, 全菌株とも LT および ST の産生能はなく, K 88, K 99, 987 P 等の付着因子の存在も認めら

表4 VT の 性 状 検 査

菌株No.	検体No.	養豚場	由来	Vero 細胞毒性	細胞毒性力価	ウサギループ試験	マウス致死毒性	TV 毒素型
K1	1	A	小腸	+	80	+	—*	VT2vp
K2	2	A	小腸	+	160	+	—	VT2vp
K3	3	B	小腸	+	160	+	—	VT2vp
K4	4	B	小腸	+	80	+	—	VT2vp
K5	5	C	小腸	+	80	+	—	VT2vp
K6	6	A	小腸	+	40	—	—	VT2vp
K7	7	A	小腸	+	40	—	—	VT2vp
K8	8	B	小腸	+	40	—	—	VT2vp

注) *: VT 濃縮液 (2000~4000 力価) では致死毒性を認める

れなかった。

分離株の産生する毒素の生物学的性状: 検査に供した子豚8頭の小腸から分離した β 溶血性大腸菌8菌株(K1~K8)について、Vero細胞に対する細胞毒性試験を行った。その結果、すべての菌株がVero細胞に細胞毒性を示す毒素を産生することがわかった。各菌株が産生する毒素の生物学的性状は表4に示したとおりVero細胞に対するCPE力価は40~160倍であった。ウサギ結紮腸管ループ試験では5菌株が陽性を示し、浸出液の貯留量は1.0~1.2 ml/cmであった。マウス致死活性試験ではすべての菌株が陰性であった。しかし、培養上清を濃縮した試料では全菌株とも致死活性が認められた。

Vero 毒素の毒素型別: bead-ELISAによるVero毒素の免疫学的性状。試験の結果、全菌株とも抗VT2血清と反応する毒素を産生することがわかった。さらに、オリゴヌクレオタイドプローブを用いたDNAコロニーハイブリダイゼーション試験を行い、このVero毒素はVT2vpであることが確認された。

健康豚におけるVTECの保菌状況: 前述した方法により健康豚67頭からVTECの分離を試みた。その結果、A養豚場の繁殖豚およびC養豚場の肥育豚の1頭ずつからVTEC(K9, K10)が分離された。この分離株のO抗原の血清型は0139であり産生するVTの毒素型はVT2vpであった。また、生化学的性状検査においてK9は他の浮腫病由来株と同様な性状を示したが、K10は溶血性、糖の分解能等において異なる性状を示した。

考 察

通常、家畜の腸管内に存在する大腸菌は非病原菌とされているが、ある種の大腸菌は下痢等の疾病の原因となることが古くから知られている。最近、本菌の感染機序に関する研究の進展により、豚における大腸菌感染症は下痢症、腸管毒血症、敗血症の3つの病型に大別されている。これらの3つの病型は、好発月齢、発生状況、病理所見、血清型、病原因子等において明らかな相違があり、これらの所見が診断上重要な手がかりとなっている⁹⁾。

腸管毒血症は小腸における特定の大腸菌の異常増殖の結果、産生された毒素が吸収されることによって発生するとされており、病勢の違いにより浮腫病、ショック症候群、出血性腸炎に区別されている⁹⁾。このうち浮腫病は腸管毒血症の典型とされ、通常1~4カ月齢の幼豚に散発する。その症状は体表の浮腫、下痢、神経症状、急死とされている。さらに、剖検所見では胃、腸管壁および肺のうっ血、浮腫等がみられ、組織学的所見でもこれらの臓器の浮腫病変に加えてうっ血、血栓形成、血管壁の硝子様変化等の循環系の病変が顕著である³⁾。今回、われわれが調査対象とした事例でも生後約1カ月齢の幼豚が散発的に発症しており、供試豚8頭のうち病性鑑定殺した1頭以外はすべて急死したものであった。いずれも神経症状、眼瞼浮腫がみられ、剖検所見、組織学的所見においても浮腫病特有の浮腫病変やうっ血等の循環障害が認められたため浮腫病と診断した。

浮腫病の原因菌は0138, 0139, 0141等の血清型を有する溶血性的大腸菌とされており、これら的大腸菌の産生する浮腫病因子の作用により症状が発現するとされている⁶⁾。しかし、これまで明確な浮腫病因子とされる物質を精製した報告はなく、その作用機序についても不明な点が多い。SMITHら¹⁴⁾は浮腫病から分離した0138, 0139, 0141の血清型を有する大腸菌がVero毒素を産生すること、さらにこれら的大腸菌のVT産生遺伝子を導入した大腸菌K12を豚に接種すると浮腫病に類似した病像がみられることを報告している。Vero毒素はVero細胞に細胞毒性を示す毒素で免疫学的性質や物理学的性質からVT1とVT2が報告されている^{2,10,17)}。さらに、この2種類のVero毒素以外にMARQUESら⁴⁾は豚の浮腫病の原因菌からVT2と共通抗原性を有するがVT2とは異なり、しかもVT1とは共通抗原性のないVero毒素をみだし、Shiga-like toxin II variant (VT2v)と報告している。また、OKUら¹²⁾は人の溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome)患者から分離した大腸菌の産生するVero毒素を精製し、VT2と免疫学的に関連しているが同一でないことを報告した。そして、Itoら¹⁾はOKUら¹²⁾の精製した毒素を

コードする遺伝子のヌクレオチド配列が MARQUES ら⁴⁾の VT 2 v 遺伝子のヌクレオチド配列¹⁶⁾と異なることをみだし, それぞれの毒素を VT 2 vp および VT 2 vh と呼称することを提案している. これらの Vero 毒素の毒素型別法には bead-ELISA 等の免疫学的検査法¹³⁾や DNA プローブ等の遺伝学的検査法⁸⁾が最近開発されている.

今回, われわれが浮腫病の子豚から分離したすべての菌株は溶血性を示し, 血清型は 0139 であった. これらの分離菌株の培養上清は Vero 細胞に細胞毒性を示し, ウサギ結紮腸管ループ試験でも陽性株が認められた. さらに, マウス致死活性試験でも濃縮上清において致死活性を示した. これらの菌株が産生する毒素は bead-ELISA において抗 VT 2 血清とのみ反応した. しかもオリゴヌクレオチドプローブを用いた DNA コロニーハイブリダイゼーションにより MARQUES ら⁴⁾が報告した Vero 毒素と遺伝学的に同一であることから VT 2 vp であると確認した. 分離株の産生する毒素の毒素型別試験, 毒性試験の結果に加えて前述した臨床症状, 病理学的所見から分離された大腸菌 0139 が今回の浮腫病の原因菌であり, 産生する VT 2 vp が EDP ではないかと推察した. さらに, 保菌調査において健康な肥育豚から浮腫病由来株と同様な性状を有する大腸菌 (K 9) が分離されたことから, 保菌豚が感染源となり免疫力の低い幼豚に感染すると推察した.

なお, この VT 2 vp 産生大腸菌の浮腫病の病豚および健康豚からの分離報告例はわが国における最初のものと思われる.

稿を終えるにあたり, 大腸菌の O 群型別試験を実施していただいた農林水産省家畜衛生試験場の中沢宗生博士に深謝いたします.

なお, この論文の要旨は第 109 回日本獣医学会 (1990 年

3 月, 東京) において発表した.

引用文献

- 1) ITO H., TERAJ A., KURAZONO H., et al.: *Microb. Pathog.*, 8, 47~60 (1990).
- 2) KARMALI M. A.: *Microbiol. Rev.*, 2, 15~38 (1989).
- 3) 柏崎 守: 豚病学, 熊谷哲夫, ほか編, 第 3 版, 395~486, 近代出版, 東京 (1987).
- 4) MARQUES L. R. M., PEIRIS J. S. M., CRYZ S. J. and O' BRIEN A. D.: *FEBS Lett.*, 44, 33~38 (1987).
- 5) 三輪谷俊夫, 神中 寛, 竹田美文, 工藤泰雄: コレラ菌と毒素産生大腸菌の検査法, 第 1 版, 菜根出版, 東京 (1981).
- 6) MOON H. W.: *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 18, 179~211 (1974).
- 7) MOHAMMAD A., J. S. M. PEIRIS and E. A. WIJEWANTA: *FEBS Lett.*, 35, 261~265 (1986).
- 8) NEWLANA J. W. and NEILL R. J.: *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1292~1297 (1988).
- 9) 中沢宗生: 動生協会会報, 20, 13~20 (1987).
- 10) NODA M., YUTSUDO T., NAKABAYASHI N., et al.: *Microb. Pathog.*, 2, 339~349 (1987).
- 11) NISHIBUCHI M., YAMASAKI S., ITO H., et al.: R. B. Sack and Y. Takeda, *KTK Scientific Publisher*, in press, 9, TOKYO.
- 12) OKU Y., YUTSUDO T., HIRAYAMA T., et al.: *Microb. Pathog.*, 6, 113~112 (1989).
- 13) OKU Y., UESAKA Y., HIRAYAMA T. and TAKEDA Y.: *Microbiol. Immunol.*, 38, 807~817 (1988).
- 14) SMITH H. W., P. GREEN and Z. PARSELL: *J. Gen. Microbiol.*, 192, 3121~3137 (1983).
- 15) TAKAO T., TANABE T., HONG Y. M., et al.: *Microb. Pathog.*, 5, 357~369 (1988).
- 16) WEINSTEIN D. L., JACKSON M. P., SAMUEL J. E., et al.: *J. Bacteriol.*, 170, 4233~4230 (1988).
- 17) YUTSUDO T., NAKABAYASHI N., HIRAYAMA T. and TAKEDA Y.: *Microb. Pathog.*, 3, 21~30 (1987).