健康な家畜における Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の 汚染状況, 特にヤギからの本邦初分離について

麻布大学環境保健学部環境微生物学講座¹⁾

麻布大学獣医学部微生物学講座²⁾

東京都立衛生研究所微生物部³⁾

福山 正文¹⁾ 今川 八束¹⁾ 原 元宣²⁾ 田淵 清²⁾
伊藤 武³⁾ 尾畑 浩魅³⁾ 甲斐 明美³⁾

(平成 5 年 11 月 30 日受付)

(平成 6 年 1 月 10 日受理)

Key words: cattle, swine goat, HUS, VTEC

要 旨

ヒトの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) 感染症に対する感染源や感染経路を究明する一環として, 1991 年 10 月から 1992 年 3 月までの期間に相模原市, 横浜市および平塚市で飼育されていた健康な家畜(ウシ, ブタおよびヤギ)の新鮮糞便を採取し, VTEC の分離を試みたところ, ブタ 105 例中 1 例 (1.0%), ウシ 55 例中 2 例 (3.6%) およびヤギ 13 例中 12 例 (15.4%) からそれぞれ VTEC が認められた. 特にヤギについてはわが国では初めての分離例であった. 分離菌株の血清型と毒素 (VT) 型の組み合わせはウシ由来株では O116:H21 (VT2) と O163:H19 (VT2), ブタ由来株では OUT:H19 (VT2vp), ヤギ由来株ではすべて OUT:H21 (VT1) であった.

以上の成績からウシおよびヤギから分離された VTEC は, ヒト由来の VTEC が産生する VT と同じ毒素型の VT を産生していることが明らかとなり, これらの家畜がヒトの感染源に関与していることが考えられた.

序 文

出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis; HC) や溶血性尿毒症性症候群 (hemolytic uremic syndrome) などの起因菌として, Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) が注目されている. 本菌感染症はカナダや米国における集団発症例の疫学調査から, 牛肉製品が原因食品となっていることが確認され, ウシがヒトの VTEC 感染症の感染源として重要視されている¹⁾²⁾. 最近, わが国でも O157 による散発下痢症³⁾⁴⁾や集団下痢症あるいは O145 による集団下痢症⁵⁾等が報告されているがいずれの症例においても明確な原因食品や感染経路の証明は

されていない.

そこで著者らは感染源や感染経路を究明する一環として, 国内で飼育されている健康な家畜 (ウシ, ブタ, ヤギ) から VTEC の分離を試み, 分離菌株の血清型別と Vero 毒素の毒素型別を行った.

材料および方法

検査対象: 1991 年 10 月から 1992 年 3 月にかけて, 相模原市, 横浜市および平塚市で飼育されていたウシ 55 例, ブタ 105 例およびヤギ 13 例の計 173 例から採取した新鮮糞便をキャリブレーション培地 (日水) に入れ持ち帰り, 検査材料とした (Table 1).

分離および同定: 糞便を直接 DHL 寒天培地 (日水) に塗抹し, 37°C 18~24 時間培養後, 乳糖あ

別刷請求先: (〒229) 神奈川県相模原市淵野辺 1
-17-71

麻布大学環境微生物学講座 福山 正文

Table 1 Detection of VTEC from domestic animals

Source	Sampling area	No. of samples examined	No. of VTEC positive samples	No. of VTEC strains isolated
Cattle	A (Sagami-hara)	9	0 (0.0)	0
	B (Hiratsuka)	9	0 (0.0)	0
	C (Sagami-hara)	21	1 (4.8)	1
	D (Sagami-hara)	5	1 (20.0)	2
	Total	55	2 (3.6%)	3
Swine	A (Sagami-hara)	9	0 (0.0)	0
	E (Yokohama)	96	1 (1.0)	1
	Total	105	1 (1.0%)	1
Goat	A (Sagami-hara)	6	2 (33.3)	5
	F (Sagami-hara)	7	0 (0.0)	0
	Total	13	2 (15.4)	5
Total		173	5 (2.9%)	9

るいは白糖を分解した桃～赤色コロニーを1平板あたり、1～5個釣菌後、TS1寒天培地(日水)とLIM培地(日水)に接種し37℃24時間培養後、その生化学的性状から大腸菌と推定した。続いて、後述の方法によりVero毒素産生試験を行い、Vero毒素産生が認められた菌株について、さらに腸内細菌同定用キット(API20E:アスカ純薬)を用い大腸菌と同定した。

血清型別：大腸菌と同定した菌株を病原大腸菌診断用血清(デンカ生研)を用い、スライド凝集反応および100℃60分加熱菌による試験管内凝集反応により凝集の有無を観察し、型別した。また、病原大腸菌診断用血清に凝集しない菌株については、自家製(都衛研)の抗血清を用い型別を行った。

Vero毒素の検出法：大腸菌と推定したすべての菌株をそれぞれ普通寒天(日水)に培養後、1コロニーをBrain heart infusion(Difco)に接種し、24時間振盪培養した。続いて、培養液を3,000rpm 10分遠心し、その上清をメンブランフィルター(0.22μ)で濾過した。その濾液10μlを10%仔牛血清加イーグルMEM培地(日水)で増殖させたVero細胞液に接種し、37℃5%炭酸ガス存在下のフラン器で培養を行い、細胞変性を2日間観察し毒素産生の有無を判定した。

Vero毒素の毒素型別：毒素型別試験はラテッ

クス凝集反応法⁶⁾で行った。すなわち、V型マイクロトレイにVero細胞に接種したものと同様に調製した培養上清の濾液とVT検出用ラテックス試薬をそれぞれ25μlずつ加え、よく混和後室温で3時間反応させ、その凝集像の有無を観察した。

PCR法は、VT1およびVT2検出用プライマーとして、小林ら⁷⁾が報告したものをを用い、VT2vpについては、山崎ら⁸⁾が報告したプライマーを用いて検討した。PCR反応液は加熱した被検菌の培養液5μl(template DNA)に、プライマーを含む各試薬を加え、全量が50μlとなるように調製した。反応の温度条件は、熱変性(94℃→1分)、アニーリング(55℃→1分)、伸長(72℃→1分)の合成を1サイクルとし、これを35回繰り返した。増幅されたDNAは、2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマ이드染色後、トランスイルミネーター(300nm)で目的としたサイズのDNA断片を観察し、それぞれのVT遺伝子の有無を確認した。

成 績

1. Vero毒素産生性大腸菌の分離状況

家畜173例中5例(2.9%)から分離された9菌株にVero細胞に対する毒素の産生が認められた。その家畜別のVTEC分離状況はTable 1に示すとおりである。ブタ由来105例中1例(1.0%)の1株とウシ由来55例中2例(3.6%)の3株は典

Table 2 Serotypes and toxintypes of VTEC isolated from domestic animals

Source	Serotypes	Toxintypes	No. of samples	No. of strains
Cattle	O116 : H21	VT2	1	2
	O163 : H19	VT2	1	1
Swine	OUT : H19	VT2vp	1	1
Goat	OUT : H21	VT1	2	5
Total			5	9

型的大腸菌の性状を示した。しかしヤギ由来13例中2例(15.4%)の5株は大腸菌と同定されたがソルビット非分解であり、その他の性状については一般大腸菌の性状を示した。

2. Vero 毒素産生株の血清型別および毒素型別

Vero 細胞で毒素産生性が確認されたウシ由来2例(3株)、ブタ由来1例(1株)およびヤギ由来2例(5株)から分離した9株について、血清型別と毒素型別を行った成績をTable 2に示した。ウシ由来株はO116 : H21 (VT2)とO163 : H19 (VT2)に、ブタ由来株はOUT : H19 (VT2vp)に、ヤギ由来株はすべてOUT : H21 (VT1)にそれぞれ型別された。

考 察

著者らはVTECの感染源や感染経路を究明する一環として、国内で飼育されている健康な家畜(ウシ、ブタ、ヤギ)からVTECの分離を試みたところ、ウシ3.6%、ブタ1.0%およびヤギ15.4%からVTECを分離した。その分離株の血清型と毒素型の組合せは、ウシ由来株ではO116 : H21 (VT2)とO163 : H19 (VT2)、ブタ由来株ではOUT : H19 (VT2vp)、ヤギ由来株ではOUT : H21 (VT1)であった。家畜からのVETCの分離状況について、ウシでは健康なウシ^{9)~15)}から0.3~48.9%、胃腸炎や下痢症¹³⁾¹⁴⁾から10.7~22.2%、ブタでは健康なブタ¹²⁾¹³⁾¹⁵⁾から0~7.5%、下痢症を呈したブタ¹³⁾から5.1~6.4%の頻度でVTECを分離した報告がある。これらの成績と比較すると、著者らのウシやブタにおける分離率はかなり低かった。この要因として検査法の相違も無視できないが、調査対象とした地域差あ

るいは下痢症などの症状を呈していなかったためと思われた。

一方、ヤギについてはBeutinら¹⁵⁾が56.1%にVETCを分離した報告があるに過ぎない。今回調査した健康なヤギから、わが国において、初めてVTECが分離され、ヤギもVTECの保菌動物であることが明らかとなった。

ヒトのEHEC感染症から分離される大腸菌の血清型^{1)17)~22)}は諸外国ではO5 : H-, O5 : H16, O6 : H-, O25 : H-, O26 : H-, O26 : H11, O38 : H21, O91 : H-, O103 : H2, O104 : H2, O111 : H-, O111 : H8, O113 : H21, O121 : H19, O146 : H21, O153 : H25, O157 : H7, O157 : H-, O163 : H19, O165 : H19, O165 : H25などが報告されている。わが国においても下痢症患者や溶血性尿毒症症候群患者からO26 : H11, O26 : H-, O18 : H-, O111 : H-, O128 : H2, O145 : H-, O157 : H7, O157 : H-など^{3)~5)21)22)}が、分離されているが、その主体はO157 : H7である。今回、著者らが分離したウシ由来株の中には、ヒトの感染症から分離されているO163 : H19の血清型が含まれているが、ヒトからの報告例のないO116およびOUTもウシやヤギから分離された。また、ウシ、ヤギ由来株はヒトから分離されるVT1あるいはVT2産生株であり、ウシに限らずヤギも本感染症の感染源となりうるだろう。ただし、ブタ由来株はウシやヤギ由来株と異なりVT2vp産生株であった。現在までのところ、ヒト下痢症例からはVT2vpが検出されていないことから、本菌株のヒトに対する病原性については今後の検討が必要であろう。わが国では報告のなかったヤギからの分離株はソルビット非分解の性状を有していた。今後、これら動物由来株のヒト腸管定着性などの病原性を明らかにするとともに、ヤギについてはVTECが認められた飼育場の汚染状況を経時的に調査し、更に他の家畜、愛玩動物においてもVTECの汚染状況の調査を行い、ヒトの感染症との関わりについて検討する必要があると考えられる。

謝辞 稿を終るにあたり、材料の採取に協力して頂いた関係者各位に深謝いたします。さらに、実験に協力願った麻布大学環境微生物学講座室員各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Riley, L.W., Remis, R.S., Helgersson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N. T., Blake, P.A. & Cohen, M.L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med., 308: 681—685, 1983.
- 2) Karmali, M.A.: Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev., 2: 15—38, 1989.
- 3) 花岡正秀: 腸管出血性大腸菌 0157: H7 による集団下痢症—大阪市における事例. 食品と微生物, 9: 121—126, 1991.
- 4) 城 宏輔: 埼玉県某幼稚園で流行した *E. coli* 0157: H7 による出血性大腸炎. 臨床と微生物, 18: 457—465, 1991.
- 5) 伊藤 武, 甲斐明美, 斎藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 高橋正樹, 高野伊知郎, 松下 秀, 工藤泰雄, 寺山 武, 大橋 誠, 唐木一守, 山下征洋, 池上重明, 佐藤穂積, 関 友次, 加藤喜市, 弘岡淑夫, 山田幸正, 秋山 博, 大関哲也, 大茂 豊, 山之内淳, 土谷啓文, 細川敏夫, 田崎達明: Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* 0145: H- による集団食中毒の細菌学的, 疫学的検討. 東京都立衛生研究所年報, 36, p. 16—22, 1985.
- 6) 甲斐明美, 山田澄夫, 伊藤 武, 工藤泰雄, 大橋 誠: 大腸菌が産生する Verocytotoxin の逆受身ラテックス凝集反応による検出法の検討とその応用. 日細誌, 43: 307, 1988.
- 7) 小林一寛: 腸管出血性大腸菌の PCR 法による検出. 臨床と微生物, 18: 507—513, 1991.
- 8) 山崎伸二, 白井宏政, 西沢光昭, 竹田美文: Vero 毒素産生性大腸菌の PCR (DNA 増幅) 法による迅速同定. 日細誌, 46: 279, 1991.
- 9) Montenegro, A.M., Bulte, M., Trumpf, T., Aleksic, S., Reuter, G., Bulling, E. & Helmuth, R.: Detection and characterization of fecal Verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. J. Clin. Microbiol., 28: 1417—1421, 1990.
- 10) Wells, J.G., Shipman, L.D., Greene, K.D., Sowers, E.G., Green, J.H., Cameron, D.N., Downes, F.P., Martin, M.L., Griffin, P.M., Ostroff, S.M., Potter, M.E., Tauxe, R.V. & Wachsmuth, I.K.: Isolation of *Escherichia coli* serotype 0157: H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. J. Clin. Microbiol., 29: 985—989, 1991.
- 11) 神田 隆, 塩沢寛治, 佐藤文一, 青木慶祐, 仁科徳啓: Vero 毒素産生性 *Escherichia coli* O157: H7 の牛糞からの分離. 日獣会誌, 45: 45—47, 1992.
- 12) 田中 博, 近藤玲子, 西内 力, 村田 均, 木村眞理, 目見田清, 菊池正健, 塚本定三, 山崎伸二, Zaw Lin, 竹田美文: 家畜および愛玩動物からの Vero 毒素産生性大腸菌の分離. 感染症誌, 66: 448—455, 1992.
- 13) 平田和則, 井上英幸, 光野貴文, 天野 武, 中澤宗生, 山崎伸二, Zaw Lin, 竹田美文: 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. 感染症誌, 66: 950—955, 1992.
- 14) 多田 博, 伊丹幸子, 山本保男, 小林一寛, 田口真澄, 中澤宗生: PCR 法を用いた肥育牛からの Vero 毒素産生性大腸菌の検出. 感染症誌, 66: 1383—1389, 1992.
- 15) Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S. & Scheutz, F.: Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-Like Toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin. Microbiol., 31: 2483—2488, 1993.
- 16) Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. & Lim, C.: Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet, 619—620, 1983.
- 17) Scotland, S.M., Rowe, B., Smith, H.R., Willshaw, G.A. & Gross, R.J.: Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. J. Med. Microbiol., 25: 237—243, 1988.
- 18) 竹田美文: 病原大腸菌に関する最近の動向について. 食品衛生研究, 41: 7—16, 1991.
- 19) Pai, C.H., Ahmed, N., Lior, H., Johnson, W.M., Sims, H.V. & Woods, D.E.: Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. J. Infect. Dis., 157: 1054—1057, 1988.
- 20) Dorn, C.R., Scotland, S.M., Smith, H.R., Willshaw, G.A. & Rowe, B.: Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than 0157: H7. Epidemiol. Inf., 103: 83—95, 1989.
- 21) 伊藤 武: ベロ毒素産生大腸菌と食品. Modern Media, 39: 307—322, 1993.
- 22) 田中 博, 大瀬戸光明, 山下育孝, 篠原信之, 井上博雄, 佐々木嘉忠, 柿原良俊, 湯通堂隆, 奥 裕一, 竹田美文: Vero 毒素産生性大腸菌 0111: H- による集団下痢症の細菌学的研究. 感染症誌, 63: 1187—1194, 1988.

Contamination of Healthy Livestock with Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* (VTEC),
The First Isolation from Goats in Japan

Masafumi FUKUYAMA¹⁾, Yatsuka IMAGAWA¹⁾, Motonobu HARA²⁾, Kiyoshi TABUCHI²⁾,
Takeshi ITOH³⁾, Hiromi OBATA³⁾ & Akemi KAI³⁾

¹⁾Department of Environmental Microbiology, ²⁾Veterinary Microbiology, Azabu University and

³⁾Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

As part of the investigation on the source and route of infection with Verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) in human beings, isolation of VTEC was attempted using fresh feces collected from healthy livestock (cattle, swine and goat) raised in Sagami-hra, Yokohama and Hiratsuka cities from October, 1991 to March, 1992. VTEC could be isolated from 1 (1.0%) of 105 swine, 2 (3.6%) of 55 cattle and 2 (15.4%) of 13 goats. VTEC was isolated for the first time from goats in Japan. The combinations of the serotype and toxin type of the isolated strains were O116:H21 (VT2) and O163:H19 (VT2) for those isolated from the cattle, OUT:H19 (VT2vp) for that from the swine and OUT:H21 (VT1) for those from the goats. Since VTEC isolated from the cattle and goats were found to produce VT of the same serotypes as human VTEC, domestic animals were considered to be involved as a source of VTEC infection in human beings.