

Vero 毒素産生性 *Escherichia coli* 0157 : H7 の牛糞便からの分離神田 隆*¹⁾ 塩沢寛治²⁾ 佐藤文一¹⁾ 青木慶祐¹⁾ 仁科徳啓²⁾

1) 静岡県東部食肉衛生検査所 (三島市新谷 46-13, 〒411)

2) 静岡県衛生環境センター (静岡市北安東 4-27-2, 〒420)

(平成 3 年 5 月 7 日受付・平成 3 年 9 月 20 日受理)

Isolation of *Escherichia coli* 0157: H7 from Feces of Cattle in JapanTAKASHI KANDA*¹⁾, KANJI SHIOZAWA²⁾, FUMIKAZU SATO¹⁾, KEISUKE AOKI¹⁾ and TOKUHIRO NISHINA²⁾ (¹⁾ Tobu Meat Inspection Center, Shizuoka Prefecture, Araya, Mishima-shi, Shizuoka 411, ²⁾ Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Kitaando, Shizuoka-shi, Shizuoka 420)

SUMMARY

Fecal samples from 300 cattle arriving at abattoir in Shizuoka Prefecture was examined for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157: H7 during the period from September to December 1987. *E. coli* 0157: H7 was isolated 1 (0.33%) out of 300 fecal samples from cattle. The culture filtrate caused a degenerative change in the HeLa cells and was lethal for ddY mice. The reversed passive latex agglutination (RPLA) technique demonstrated that the isolate produced verocytotoxin 2. This is probably the first report of the isolation of *E. coli* 0157: H7 from cattle in Japan. Our finding suggests that there is a close relationship between the existence of *E. coli* 0157: H7 in cattle and contamination of beeves with this serovar of *E. coli*.—**Key Words** : *Escherichia coli* 0157: H7, feces of cattle, verocytotoxin.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 45, 45~47 (1992)

要 約

人の出血性大腸炎の起因菌として注目されている Vero 毒素産生性 *Escherichia coli* 0157 : H7 の家畜における分布を知る目的で、1987 年 9 月から 12 月に牛 300 頭の糞便を対象に本菌の分離を試みた。その結果、国産の黒毛和種 1 頭 (0.33%) から本菌を分離した。本菌の培養上清は HeLa 細胞に対して細胞毒性を示し、マウス致死活性を有していた。また、本菌が Verocytotoxin 2 を産生することが特異抗体を感作させた逆受身ラテックス凝集反応で確認された。本菌は人以外の動物からの分離としてはわが国では初めての報告と思われる。

——キーワード : *Escherichia coli* 0157 : H7, 牛糞便, Vero 毒素.

日獣会誌 45 45~47 (1992)

1982 年にアメリカやカナダにおいて *Escherichia coli* 0157 : H7 による出血性大腸炎を主徴とする食中毒事例が発生した^{6, 11, 13}。本大腸菌の病原機序は、病原血清型大腸菌 (EPEC)、組織侵襲性大腸菌 (EIEC) および毒素原性大腸菌 (ETEC) のいずれとも異なるために、新しい型の下痢原性大腸菌として注目されている。本菌の主な特徴は細胞毒素²⁾ (Verocytotoxin : VT) を産生する

ことで、そのため Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) あるいは、出血便を伴うことから腸管出血性大腸菌 (EHEC) と呼称されている。また、本菌による感染病像の主体は出血性大腸炎による激しい腹痛と血便を伴う下痢であるが、小児ではしばしば溶血性尿毒症性症候群 (Hemolytic Uremic Syndrome : HUS) を続発することもある。また、基礎疾患のある患者、特に高齢者では死亡例も報告されている。

E. coli 0157 : H7 は、海外においては下痢症患者の他、人への感染源として注目されている食肉³⁾や家畜 (特に牛) の糞便^{1, 9)}、生乳¹⁴⁾等から分離されている。いっぽう、日本においては散発下痢症患者からの分離報告^{7, 8, 10, 12)}はあるが、家畜を含めた自然界における分布や

* 現所属 : 静岡県衛生環境センター (静岡市北安東 4-27-2, 〒420)

* Present address: Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Kitaando, Shizuoka 420

生態、食肉への汚染実態についての報告は1987年現在知られていない。今回、著者らは本菌の家畜における分布を知る目的で牛の糞便を対象に分離を試み、あわせてその病原性を確認した。

材料および方法

分離材料

1987年9月から12月に静岡県東部食肉衛生検査所管内のと畜場へ搬入された肉用牛300頭の糞便を材料として供試した。滅菌綿棒で採取した直腸便をキャリープレート培地（シードスワブ栄研）にとり、4℃で保存した。

分離方法および同定

E. coli 0157 : H7はソルビット遅延酵性の特徴^{4,5)}を有するため、分離培地として変法マッコンキー培地（MacConkey Agar Base [Difco] にD-ソルビットを1%加える）を用い、37℃で24時間培養後、ソルビット非酵性集落を鉤菌した。分離株はTSI寒天、LIM培地およびオキシダーゼ反応によってスクリーニングし、大腸菌の性状を有した株に対して*E. coli* 0157の自家製家兎免疫血清を用いてスライド凝集反応を行った。凝集した株については、さらに同定用キット（ID-テストEB-20日水）を用いて生化学的性状を詳細に調べた。H抗原については東京都立衛生研究所に依頼し、*E. coli* H抗原免疫血清を用いた試験管内凝集反応によりH抗原の型を決定した。

また、1濃度または3濃度ディスク法（昭和ディスク、トリディスク栄研）により抗生物質感受性試験を行った。

VT産生試験

分離株をBrain Heart Infusion (Difco) に接種し、37℃、48時間培養後、15,000 rpm、2分間遠心し、遠心上清をポアサイズ0.22μmのミリポアフィルターでろ過し、そのろ液をHeLa細胞への接種液とした。細胞への接種はHeLa細胞を24穴のプラチック製マルチディッシュ（Nunc製）に単層培養した後、細胞増殖用培養液（非働化した7%牛胎子血清加Eagle's MEM培地）を吸引除去し、PBS（-）で細胞表面を洗浄した後、細胞維持用培養液（1%牛胎子血清加Eagle's MEM培地）を各穴1.0 mlずつ分注した。これに接種液を0.1 mlずつ接種し、37℃の炭酸ガスふ卵器中で培養した。また、細胞毒非産生株（食中毒患者由来株、*E. coli* 06 : H16）の培養上清のろ液を接種したHeLa細胞を対照とした。HeLa細胞は4日間観察し細胞の剝離、円形化が認められたものを細胞毒性陽性と判定した。

マウス致死活性は、VT産生試験に用いた培養ろ液をddYマウス腹腔内に1匹当たり0.5 ml接種して5日間観察した。

毒素の型別は東京都立衛生研究所へ依頼し、逆受身ラテックス凝集反応⁷⁾によって判定した。

成 績

肉用牛300頭の糞便のうち黒毛和種（3歳、宮城県産、去勢）1頭（0.33%）から*E. coli* 0157 : H7が分離された。分離株の生化学的性状は表1に示すとおりで、ソルビットが非酵性である点を除き定型的な*E. coli*の性状を示した。また、抗生物質感受性試験では、アミノペンシリン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、ホスホマイシン、セフェロリジン、ナリジキシン酸、ST合剤（スルファメトキサゾール、トリメトプリム）に対してはいずれも高い感受性（#）を示したが、

表1 分離菌の生化学的性状

テ ス ト (基 質)	反 応
オキシダーゼ	-
インドール	+
VP	-
クエン酸	-
硫化水素	-
尿 素	-
マロン酸	-
フェニルアラニン デアミナーゼ	-
リシン デカルボキシラーゼ	+
アルギニン ジヒドラーゼ	-
オルニチン デカルボキシラーゼ	+
エスクリン	-
ONPG	+
ブドウ糖	+
ガ ス	+
乳 糖	+
白 糖	+
アラビノース	+
ラフィノース	+
ラムノース	+
イノシトール	-
アドニット	-
マンニット	+
ソルビット	-
運 動 性	+

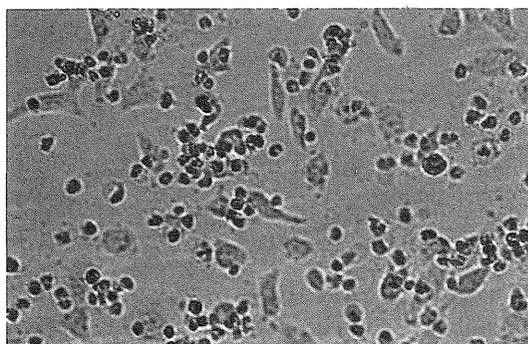


図1 分離菌の培養ろ液添加後4日目のHeLa細胞 (×50)

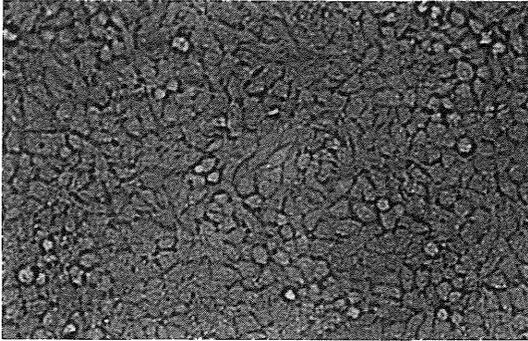


図2 細胞毒 (VT) 非産生株の培養ろ液添加後4日目のHeLa細胞 (×50)

エリスロマイシンに対する感受性は低かった (+)。

分離株の細胞毒素 (VT) 産生性を調べたところ、培養ろ液添加後の HeLa 細胞において細胞の剥離および円形化の細胞毒性が観察された。図1はろ液接種後4日目の HeLa 細胞、図2は細胞毒素非産生株の培養ろ液を同様に接種した HeLa 細胞であるが、後者は正常な HeLa 細胞との間に差は認められなかった。

また、この培養ろ液をマウスの腹腔内に接種したところ3日後に死亡した。このマウス致死活性は本培養ろ液を 100°C、15 分間加熱処理することによって失活した。また、この毒素は逆受身ラテックス凝集反応により VT 2 であることが確認された。

考 察

E. coli 0157:H7 による食中毒はアメリカやカナダでしばしば発生しているが、主な感染源として家畜や食肉等が注目され動物由来であることを示唆する報告^{1,3,9,11,14)}が多い。

いっぽう、わが国においては大阪⁸⁾、東京⁷⁾、静岡¹²⁾等で散発下痢症患者から本菌が分離されているが、その感染源は明らかにされていない。今回、われわれは牛の糞便から本菌を分離したが、人以外の動物からの分離はわが国では最初の事例と思われる、国内における本症の感染源も国外と同様であることを示唆する貴重な手掛かりが得られた。今回、本菌が分離された牛は健康畜としてと畜場に搬入され、と殺解体後の検査においても異常が

認められなかった。このように、一見健康な家畜が汚染源となり、飼育時には環境等を、また、と殺処理の過程においては枝肉や内臓等を汚染している可能性が考えられた。しかし、本菌に関してはまだ未知の部分が多いので、家畜や自然界における生態、下痢症患者からの分離、家畜から人への感染経路等の解明に努め、本菌による出血性大腸炎や食中毒の発生を防止することが重要である。

稿を終るにあたり、VT 型別にご指導とご協力をいただいた東京都立衛生研究所甲斐明美博士に深謝いたします。

本論文の要旨は昭和63年度日本獣医公衆衛生学会(中部)1988年8月において発表した。

引用文献

- 1) BORCZYK A. A., KARMALI A. A., LIOR H. and DUNCAN L. M. C.: *Lancet*, i, 98 (1987).
- 2) CANTLEY J. R.: *J. Infect. Dis.*, 151, 766~771 (1985).
- 3) DOYLE M. P. and SCHOENI J. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2394~2396 (1987).
- 4) FARMER J. J. and DAVIS B. R.: *J. Clin. Microbiol.*, 22, 620~625 (1985).
- 5) GRANSDEN W. R., DAMM S. and ANDERSON J. D.: *Ann. Intern. Med.*, 103, 160 (1985).
- 6) JOHNSON W. M., LIOR H. and BEZANSON G. S.: *Lancet*, i, 76, (1983).
- 7) 甲斐明美, 山田澄夫, 伊藤 武, ほか: 日本細菌学雑誌, 43, 307 (1988).
- 8) 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, ほか: 感染症学雑誌, 59, 1056~1060 (1985).
- 9) MARTIN M. L., SHIPMAN L. D., WELLS J. G., et al.: *Lancet*, i, 1043 (1986).
- 10) 小川正之, 中村武雄: 病原微生物検出情報, 6, No. 6 (1985).
- 11) RILEY L. W., REMIS R. S., HELGERSON S. D., et al.: *New Engl. J. Med.*, 308, 681~685 (1983).
- 12) 塩沢寛治, 仁科徳啓, 杉枝正明, ほか: 静岡県衛生環境センター報告, 31, 41~48 (1988).
- 13) WELLS J. G., DAVIS B. R., WACHSMUTH I. K., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 18, 512~520 (1983).
- 14) WELLS J. G., SHIPMAN L. D., GREENE K. D., et al.: *Abstr. Int. Symp. Workshop Verocytotoxin Producing Escherichia coli Infections* (1987).