

ウシ、ブタの盲腸内容物からのVero毒素産生性大腸菌の分離法と分離された菌株の血清型と毒素型

岸田 一則¹⁾, 依田 清江¹⁾, 内村眞佐子¹⁾, 鶴岡 佳久¹⁾
湯浅 美香²⁾, 丸山 妙子²⁾, 菅沢 淳一²⁾, 大西 三郎²⁾

Detection, Serotyping and Toxin-Typing of Vero Cytotoxin-Producing *Esherichia coli* from Feces of Cattle and Swine

Kazunori KISHIDA¹⁾, Kiyoe YODA²⁾, Masako UCHIMURA³⁾
Yosihiko TURUOKA⁴⁾, Mika YUASA²⁾, Taeko MARUYAMA²⁾
Jyunichi SUGASAWA²⁾, Saburo OHNISHI²⁾

はじめに

Vero細胞に細胞毒性を示す毒素(VT)を産生するVero毒素産生性大腸菌(VTEC)は、ヒトの出血性大腸炎や溶血性尿毒症候群の原因菌の一つとして重要である。その汚染源として家畜、特にウシとのかかわりが指摘されている¹⁾。そのため家畜の保有状況調査が実施^{2,3)}されているが、VTECは適切な分離増菌培地がないため、多数の分離菌株を検査にしなければならず操作が繁雑である。菌株のVT産生性は、主にVero細胞を用いて確認しているが、この方法は、検出感度は優れているが、培養細胞を4日間観察する必要がある、検査の迅速性に欠けている。近年、VTECの検出、同定のためにpolymerase chain reaction(PCR)法、ハイブリダイゼーション(Hb)法によるVT産生遺伝子確認、ラテックス(LA)法によるVT検出など新たな検査法が導入され、迅速な検査が可能となった。われわれはPCR法、Hb法、LA法と従来からのVero細胞によるVT検出法を用いてウシ、ブタの盲腸内容物からのVTEC分離検出率について比較検討を行った。またその結果分離された菌株の血清型、毒素型について報告する。

材料および方法

<検体>1993年7月~8月(夏期)と1993年12月~1994年1月(冬期)の期間に、と畜場に搬入された健康なウシ110頭、ブタ120頭(夏期:ウシ40頭、ブタ50頭、冬期:ウシ70頭、ブタ70頭)の盲腸内容物を検体とした。検体は滅菌綿棒で採取し、検査に供するまで-20℃で保存した。

<直接培養法>検体をSIB寒天平板培地(極東製薬)に直接塗抹し、37℃、18~24時間培養した。

<増菌培養法>検体をmodified Trypticase soy broth(mTSB)⁴⁾培地に接種して43℃、18~24時間振盪培養後、DHL寒天平板培地(栄研化学)に1白金耳塗抹して37℃、18~24時間分離培養した。

<Vero細胞を用いたVT活性検査(Vero細胞法)>分離された菌株をTrypticase soy broth(TSB)2mlに接種し37℃、1晩振盪培養した。培養液にポリミキシンBを2000IU/mlになるように加え、37℃、30分反応後に遠心し、上清をろ過滅菌して試料とした。試料は細胞培養用培地で5倍に希釈して、単層培養したVero細胞に接種し、CO₂ふらん器で培養した。顕微鏡下で4日間観察し、細胞変性が観察されたものを陽性とした。

<PCR法を用いたVT遺伝子の検出(PCR法)>菌体を精製水に懸濁し、100℃10分加熱後急冷して被検菌液を作成した。PCR法は6種類のVT産生遺伝子(VT1, VT2, VT2_{vp}, VT2_{vha}, VT2_{vhb}, VT2_{vp2})を同時に検出するZaw Linら⁵⁾の方法に準じ、915bpのPCR増幅産物が認められたものを陽性とした。

<逆受身ラテックス凝集反応によるVT検出(LA法)>菌株をTSBに接種し、Vero細胞法と同様に試料を調整した。大腸菌ペロトキシン検出用キット(デンカ生研)を使用して、翌日凝集反応を観察した。

<コロニーハイブリダイゼーション(CH)法>普通寒天平板培地上にNylon membranes, positively charged(NM)を重ね、菌を接種して37℃、8~16時間培養した。NM上に発育したコロニーを0.5N NaHO、1%SLSで溶菌し、直ちに中和した後、菌体残物を洗浄してからハイブリダイゼーション(Hb)を実施した。プローブはPCR増幅産物を精製して作成した。プローブの標識とHbによる検出はDIG DNA Labeling and Detection Kit(Boehringer Mannheim)を使用した。ただしHb溶液組成は5×SSC、0.5%bovine serum albumin、0.5%polyvinylpyrrolidone K30、1%SDSでHb温度は65℃、Hb時間は15分とした。

<VTEC同定試験>菌株は定法⁶⁾にしたがい、生化学的性状検査を実施し大腸菌であることを確認した。VT産生性はVero細胞法によるVT活性測定とPCR法によるVT産生遺伝子確認により決定した。

<血清型別、VT型別>ウシ110検体、ブタ120検体をmTSB培地で増菌後、DHL寒天平板培地で菌株を分離し、Vero細胞法によって細胞変性作用を示した株について同定検査を実施した。分離されたVTEC株は、病原性大腸菌型別用免疫血清(デンカ生研)を用い血清型を決定した。VTはLA法(デンカ生研)と

1) 千葉県衛生研究所

2) 千葉県中央食肉衛生検査所
(1994年11月15日受理)

PCR法によってVT1およびVT2 (VT2, VT2_{vha}, およびVT2_{vhb}) に型別した。PCR法は山崎ら⁷⁾のプライマーと腸管出血性大腸菌VT遺伝子検出用プライマーセット (宝酒造) を併用した。

結 果

<直接培養法と増菌培養法の比較>ウシ25検体, ブタ20検体から直接培養法と増菌培養法で分離されたコロニーについてVero細胞法を用いてVTECを検出した。ブタ2検体からVTEC 2株が検出された。このうち1株は, 直接培養法と増菌培養法の2つの方法で分離することができたが, 他の1株は, 増菌培養法によってのみ分離された。

<増菌培養菌液のスクリーニング試験>ウシ50検体, ブタ45検体の増菌培養液についてVero細胞法, LA法およびPCR法でVT産生性を検査した。それぞれの方法でVT陽性を示した培養液をDHL寒天培地に1白金耳塗抹してVTECを分離した。結果を表1に示す。Vero細胞法, LA法, PCR法によりそれぞれ20検体, 12検体, 18検体がVT陽性を示したが, DHL寒天培地で分離培養後VTECが分離できた検体数は, Vero細胞法およびPCR法が15検体, LA法12検体であった。

表1. Vero細胞法, PCR法, LA法による増菌培養液のスクリーニング試験

由来	検体数	VT陽性検体数		
		Vero細胞法	LA法	PCR法
ウシ	50	1 (0)	0	0
ブタ	45	19 (15)	12 (12)	18 (15)
計	95	20 (15)	12 (12)	18 (15)

(): VTECが分離された検体数

表3. VTEC季節別分離状況

由来	夏期 (7月~8月)		冬期 (12月~1月)		計	
	検査頭数	VTEC	検査頭数	VTEC	検査頭数	VTEC
ウシ	40	4(10.0%)	70	0(0%)	110	4(3.6%)
ブタ	50	1(2.0%)	70	22(31.4%)	120	23(19.1%)
計	90	5(6.0%)	140	22(15.7%)	230	27(11.7%)

(): VTEC/検査頭数

表4. 分離されたVTECの血清型, 毒素型

血清型	由来	株数	LA法	PCR法
O136:HUT	ウシ	1	VT1	VT1
O152:H-	ウシ	1	VT2	VT2
O157:H7	ウシ	1	VT1, VT2	VT1, VT2
UT	ウシ	1	VT2	VT2
O8:H9	ブタ	1	VT2	VT2
O8:H19	ブタ	3	VT2	VT2
O8:H20	ブタ	1	VT2	VT2
O8:H42	ブタ	3	VT2	VT2
O8:H-	ブタ	2	VT2	VT2
O18:H9	ブタ	1	VT2	VT2
O18:H42	ブタ	1	VT2	VT2
O128:H9	ブタ	2	VT2	VT2
O128:H20	ブタ	3	VT2	VT2
O159:H-	ブタ	1	VT2	VT2
OUT:H-	ブタ	4	VT2	VT2
OUT:H9	ブタ	1	VT2	VT2

UT型別不能

<CH法による分離菌株からのVT産生遺伝子検出>増菌培養液をVero細胞法で検査し, 細胞変性が認められた5検体をDHL寒天平板培地で分離培養した。それぞれの平板より25コロニーずつ無作為に釣菌し, Vero細胞法によりVT産生性を調べると共に, CH法によりVT産生遺伝子を検出した。成績を表2に示す。VT陽性を示した株数は, Vero細胞法53株, CH法47株であったが, VTEC同定試験の結果, Vero細胞法陽性株はすべてVTECであったが, CH法ではVTEC以外の大腸菌1株が陽性と判定された。

表2. DHL寒天培地に分離されたVT陽性菌株数

由来	検査株数	VT陽性菌株数	
		Vero細胞法	CH法
ブタ	25	18 (72%)	16 (64%)
ブタ	25	10 (40%)	7 (28%)
ブタ	25	23 (92%)	21 (84%)
ブタ	25	1 (4%)	2* (8%)
ブタ	25	1 (4%)	1 (4%)
計	125	53 (42%)	47 (38%)

* 陽性2株のうち1株はVTEC以外

(): 陽性菌株数/検査株数

<分離菌株の血清型, VT型>ウシおよびブタからのVTEC分離状況を表3に示した。ウシ110頭から分離された4株 (3.6%), ブタ120頭から分離した23株 (19.2%) がVTECと同定された。検体採取季節別の分離状況は, ウシ由来4株はすべて夏期 (7~8月) に分離された。ブタ由来株は夏期1株, 冬期 (12~1月) 22株分離された。分離された菌株の血清型とVT型を表4に示す。ウシ由来4株は血清型はO136:HNM, O152:H-, O157:H7, 型別不明株であった。ブタ由来23株のO型血清型はO8が10株

(43.5%) と最も多く, ついでO128が5株 (21.7%), O18が2株 (8.7%), O159が1株 (4.3%) であり, 型別不明が5株 (21.7%) があった。毒素型はウシ由来4株はVT1が1株, VT2が2株, VT1およびVT2が1株であったがブタ由来23株はすべてVT2であった。

考 察

Michaelら⁹⁾が報告したmTSB培地によるVTEC増菌培養について, 直接培養法と検出率を比較して検討した。その結果, 増菌培養法でVTECが多く分離された。検体を接種してVTECが増菌されたmTSB培地をDHL寒天培地に分離培養して得られた集落は, 1平板当たり4~72%がVTECであり, 他の大腸菌も増菌されていた。このことからmTSB培地を使用して43℃で増菌培養することによって雑菌の発育が抑制され糞便性大腸菌が良好に発育し, 結果としてVTECの検出が容易になったと考え

られる。mT S B増菌培地中には他の大腸菌も増殖しているため、VTECを検出するためには、できるだけ多くの菌株を検査しなければならず、効率的にVTECを検出するために増菌培地のスクリーニング試験が必要である。

Vero細胞法、LA法、PCR法によりスクリーニング試験を実施し、その有用性を検討した。PCR法はVero細胞法と比べ、VTEC検出率は同等であったが、非特異反応は少く、数時間で判定が可能であり迅速性に優れるが、試薬類は高価で経済性に問題があった。LA法はVTEC検出率はVero細胞法より劣るが、特異性は高く、キットが市販されているため入手が容易であり、培養細胞や特殊な装置を必要としないため、手技は簡便である。

Vero細胞法とPCR法で陽性を示した培養液からVTECが分離されない場合があった。この原因としては、菌数が少なく検出限界以下であった場合が考えられるが、その他Vero細胞法ではVT以外の毒素等による細胞変性、PCR法では死菌等培養不能菌の検出、偽陽性なども考えられる。

CH法は多数の分離菌から目的とする菌株を的確に検出することが可能な方法であり⁹⁾、分離培養菌からのVTEC検出に適するので、プローブを作成して検討した。感度、特異性とともVero細胞法より低く、プローブ等条件検討が今後の課題である。以上からウシ、ブタの盲腸内容物からVTECを効率的に分離するにはmT S B培地による増菌とVero細胞法あるいはPCR法によるスクリーニングが有効と考えられた。

わが国ではヒトのVTEC感染症は夏季多発のパターンを示したと報告⁹⁾されているが、今回VTECはウシからは夏期に多く、ブタからは冬期に多く分離されたが、家畜の保有状況に季節変動があるかはさらに調査が必要である。

わが国で患者から分離されたVTECの血清型はO157、O18、O26、O128等であり、その多くをO157:H7が占めている⁹⁾。今回の調査でヒト由来株と同じ血清型を示す株は、ウシからO157:H7が1株分離され、ブタからO18が2株分離された。しかしブタ由来株はH血清型、VT型がヒト報告例⁹⁾と異なっていた。家畜から分離されたVTECのヒトに対する病原性の有無は不明であり今後の研究課題である。

文 献

- 1) C. Richard Dorn and Elisabeth J. Angrick (1991): Serotype O157:H7 *Escherichia coli* from Bovine and Meat Sources, *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1225-1231.
- 2) 玉得吉信, 津曲洋明, 八木利喬, 元日田敏, 長友英俊 (1993): 牛の腸内容物から分離されたVero毒素産生性大腸菌, *日獣会誌*, 46, 67-70.
- 3) 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 (1992): 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.
- 4) Michael P. Doil and Jean L. Schoeni (1987): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2394-2396.
- 5) 厚生省監修: 細菌・真菌検査 (第3版), D30-D40, (財)日本公衆衛生協会, 東京, 1987.
- 6) Zaw Lin, Hisao Kurazono, Shinji Yamasaki, and Yosihumi Takeda (1993): Detection of Variant Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by Polymerase Chain Reaction, *Microbiol. Immunol.*, 37, 543-548.
- 7) 山崎伸二, 白井宏政, 西光 昭, 竹田美文 (1991): Vero毒素産生性大腸菌のPCR (DNA増幅)法による迅速同定, *日本細菌学雑誌*, 46, 280.
- 8) 西湖光昭: DNAコロニーハイブリダイゼーションによる細菌毒素遺伝子検出 (1990), *臨床病理*, 特85, 149-158.
- 9) 国立予防衛生研究所: 病原微生物検出状況 (1993), 14, 219-220.