

報

告

県内産牛肉および牛からのベロ毒素 産生性大腸菌（VTEC）の分離

八柳 潤 斎藤志保子 斎藤 博之 佐野 健
森田 盛大

秋田県内におけるEHECの感染源を検討する一環として、県内産牛肉、および県内で飼育されている牛のVTEC汚染、保菌状況について調査したところ、牛肉162検体中1検体からVT-1産生VTEC、および県内産牛186頭中7頭からVT-2産生VTECがそれぞれ検出された。

牛肉から分離されたVTECはヒトの出血性大腸炎の原因菌と同一の血清型でeaeも保有していたことから、出血性大腸炎を惹起し得るものと推察された。このようなVTECにより汚染された牛肉が県内においてもEHEC感染源の一つとなり得ると考えられた。従って、牛肉中におけるVTECの増殖を阻止するような処置、例えば牛肉の取り扱い温度や保管温度を低く保つことに留意することなどがEHEC感染予防策として有効であろうと考えられた。

これに対して、牛から分離されたVTECの出血性大腸炎起病性は現時点では不明であり、今後検討を要すると考えられると共に、このことを明らかにすることはEHEC感染予防対策を構築する上でも重要な点であると考えられた。

キーワード：Verotoxin-producing *Escherichia coli*、県内産牛、県内産牛肉、*Escherichia coli* Attaching Effacing Gene

I はじめに

腸管出血性大腸菌（以下EHECと略）は平成2年10月に埼玉県内の幼稚園で発生した集団中毒事件の原因菌として注目を集めた¹⁾。EHECは培養ベロ細胞を変成させる毒素（Vero cytotoxin 以下VTと略）を産生する²⁾。EHECの血清型としてはO157:H7が代表的なものであるが、これ以外の血清型の大腸菌にもVTを産生するものがあり、これらはベロ毒素産生性大腸菌（VTEC）とも呼ばれている³⁾。

秋田県においても平成3年に4名、平成5年に1名の散発的EHEC感染者が確認された。その際、分離株の疫学マーカーについて検討した結果、これらの株は異なる感染源から散発的に発生した可能性が示唆されたが、具体的な感染源は不明であった⁴⁾。

EHECの感染源としては、諸外国において牛肉、生牛乳など畜産製品が関与することが報告されている。また、牛などの家畜がVTECのキャリアーとなっていることも報告されている。日本国内においても田中たちが輸入食肉からVTECを分離したほか⁵⁾、肥育牛などの家畜からもVTECが分離されており、国内においても家畜がVTECのキャリアーとなっているものと考えられている⁶⁾。

我々は昨年度、秋田県内におけるEHECの感染源を知る目的で、秋田市内で市販されていた輸入牛肉からのVTECの検出を試み、オーストラリア産牛肉1件からVT-2産生VTECを分離した⁷⁾。今年度は秋田市内

で市販されていた県内産牛肉、および県内産食用牛を対象としてVTECの検出を試みた。さらに、分離されたVTECのヒトに対する病原性や出血性大腸炎起病性の有無について知るための基礎的検討として、*E. coli* attaching effacing gene（以下eaeと略）保有状況等について調査したので、得られた成績について報告する。

II 材料と方法

1. 材料

- (1) 食肉：表1に示すように秋田市内のスーパーマーケットT店から購入した県内産牛肉162検体、および秋田市内のS精肉店から購入した馬肉（海外産）23検体をVTEC検索対象とした。
- (2) 牛：秋田県食肉流通公社に屠殺目的で搬入された県内牛182頭の直腸スワブについてVTECの検出を試みた。当該県内産牛の産地別内訳は図1に示した如くであった。
- (3) 菌株：EHECの標準株には東京都立衛生研究所、微生物部の工藤泰雄博士から分与された *E. coli* O157:H7 EDL-931 株を使用した。また、Attaching and effacing *E. coli* の標準株には、米国マリーランド大学、Center for Vaccine development の James B. Kaper 博士から分与された *E. coli* E2348/69 株を使用した。ヒト由来EHEC菌株には秋田県で発生した散発事例から分離されたEC-16, EC-20, EC-21, EC-35, EC-

表1 食肉からのVTEC検索結果

種類	購入年月	検体数	大腸菌陽性数 (%)	VTEC検出数
牛肉	'93.6	30	18 (60.0)	1
牛肉	'93.12~'94.1	132	43 (32.6)	0
馬肉	'94.1	23	3 (13.0)	0

52, EC-108株(全て血清型O157:H7)を使用した。

2. 方法

- (1) 食肉からのVTECの検出と分離: 既報のEC-PCR法によった⁷⁾。
- (2) 牛直腸スワブからのVTECの検出と分離: 検体を接種したEC培地を37℃で培養した以外はEC-PCR法に準じた⁷⁾。
- (3) Polymerase Chain Reaction (PCR) による eae およびEPEC Entero Adherent Factor の検出: eae 検出用プライマーには, Jerse たちがクローニング, シーケンスを行い報告したEPEC の eae の塩基配列⁸⁾, および Yu たちがクローニング, シーケンスを行い報告したEHEC の eae の塩基配列⁹⁾を比較し, オープンリーディングフレ

ム内で塩基配列の相同性が高かった5'末端から約2 kbpの領域のうち, 454bpのDNA断片が増幅されるように設計したものを使用した(EA-1およびEA-2)。EPEC Entero Adherent Factor (以下EPEC EAFと略) 検出用プライマーには Jerse たちが報告したEPEC EAF 検出用合成オリゴヌクレオチドプローブであるEAF 21, およびEAF 25の塩基配列¹⁰⁾の20baseの領域を選定したものを使用した(EAF-B, およびEAF-SR)。本プライマーペアにより, EPEC EAF遺伝子のうち, Nataro たちの報告したEAFプローブ¹¹⁾のほぼ全領域に該当する約1 KbのDNA断片が増幅された。なお, eae とEPEC EAFは本誌別項で述べる混合プライマーPCR法により検出した。

- (4) 分離VTEC菌株の生化学的性状, 薬剤感受性, プラスミドプロファイル, 血清型別: 分離VTEC菌株の生化学的性状, 薬剤感受性, プラスミドプロファイルは既報の方法に従い検査した¹⁾。血清型別は国立予防衛生研究所, 細菌部の田村和満博士に依頼した。

III 結 果

1. 食肉からのVTECの分離

表1に秋田市内で購入した県内産牛肉162検体, および馬肉23検体についての大腸菌, およびVTECの検出

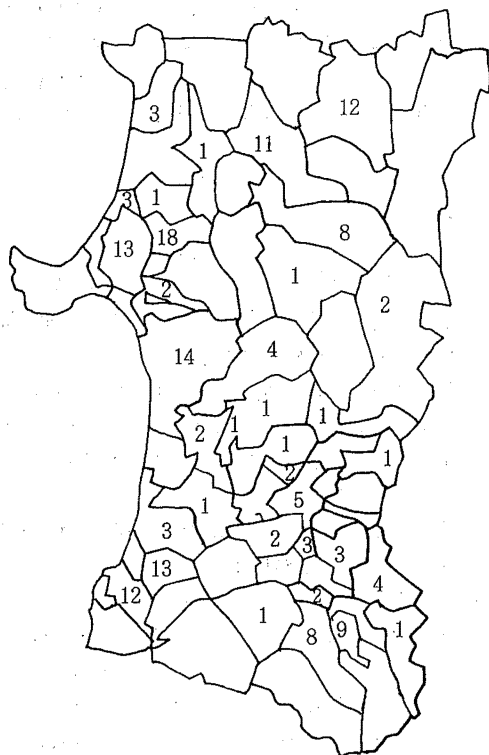


図1 VTEC検索対象とした牛の生産地, 検索頭数

生産地	検体数
県北	58
中央地区	64
県南	47
県内産地不詳	13
合計	182

表2 県内産牛, および牛から分離したVTECの血清型, Vero毒素産生性

由来	購入/採取年月	血清型	VT型	Vero CPE	菌株番号
牛肉	'93. 6	0145:NM	1	+	9307143-1
牛, 県南	'93. 7	0168:H8	2	+	93081019-1
牛, 県南	'93. 8	028ac:H19	2	+	9308301-13
牛, 中央	'93. 8	01:H27	2	+	93083118-4
牛, 県北	'94. 1	044:H21	2	+	9402153-1
牛, 県南	'94. 2	0160:NM	2	+	94021794-1
牛, 中央	'94. 1	091:H8	2	+	94021873-2
牛, 不祥	'94. 1	015:NM	2	+	94031738-3

状況を示した。なお、馬肉は秋田県内で生産されたものは入手し難く、今回検査に供したものは輸入品であった。

6月に購入した県内産牛肉30検体のうち18検体(60%)から大腸菌が検出され、そのうち1検体からVTECが検出された。これに対して、12月から1月にかけて購入した県内産牛肉(6月に購入したものと同一品)132検体のうち大腸菌が検出されたのは43検体(32.6%)であり、同一スーパーマーケットで市販されている同一生産地の牛肉であっても、購入時期により大腸菌検出率が異なっていた。なお、12月から1月に購入した牛肉からVTECは検出されなかった。また、秋田市内で購入した馬肉からVTECは検出されなかった。

2. 県内産牛からのVTECの分離

図1中の表に今回VTECの検索対象とした県内産牛の地域別検体採取数を、また、図1中の地図には市町村別検体数を示した。検索を実施した県内産牛182頭のうち7頭からVTECが検出された。牛からのVTEC検出状況に時期的、地域的な傾向は認められなかった。なお、今回VTECが検出された牛は全て秋田県食肉流通公社における屠殺時の検査で健康牛と判定され、解体後食用牛肉として流通したものであった。

以上の結果から、VTECを保菌している健康牛が秋田県内に分布していること、さらにこれらの牛が何らかの病態を示すものでない限り、食用として流通しているということが明らかになった。

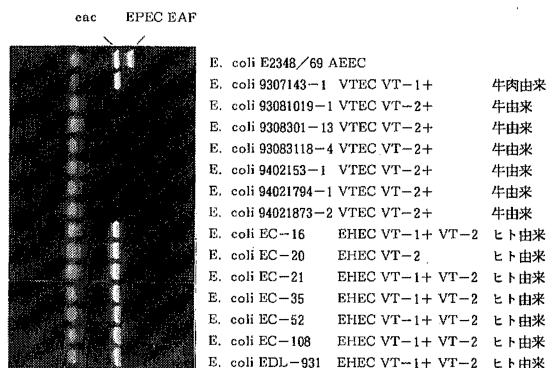


図2 分離VTEC, およびヒト由来のEHECのeac保有状況

表3 県内産牛肉, および牛から分離したVTECの薬剤感受性

	TC	ST	NA	ABPC	Ct	EM	SM	GM	KM	CP
9307143-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
93081019-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9308301-13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
93083118-4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9402153-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
94021794-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
94021873-2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
94031738-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

3. 県内産牛肉, および牛から分離したVTECのペロ毒素産生性, 血清型

表2に県内産牛肉, 牛から分離したVTEC計8株についてペロ毒素産生性, 血清型, および菌株番号を示した。これらの株のCAYE培地培養液はすべて、培養ペロ細胞にCPEを惹起した。また、PCR法により、牛肉から分離された9307143-1株がVT-1産生遺伝子を、また牛から分離された7株が、いずれもVT-2遺伝子を保有していた。

これらのVTECのうち、牛肉から分離された9307143-1株の血清型は、東京都で発生したEHEC集団感染事例の原因菌の血清型¹²⁾と同一であった。これに対して、牛から分離された7株のいずれにもヒトのEHEC感染事例から分離された原因菌の血清型と一致するものは認められなかった。

4. 分離VTECのeae保有状況, プラスミドプロファイル

図2に今回牛肉, および牛から分離したVTEC, および秋田県で発生した散発的感染者から分離したEHECのeae保有状況を示した。VTECの中では牛肉から分離された9307143-1株がeaeを保有していたが、牛から分離された株はいずれもeaeを保有していなかった。これに対して、ヒト由来のEHECは、米国の集団事例において分離されたEDL-931株を含めて、検討したすべての株がeaeを保有していた。なお、今回検討したVTEC, EHECのいずれにもEPEC EA Fを保有する株は認められなかった。

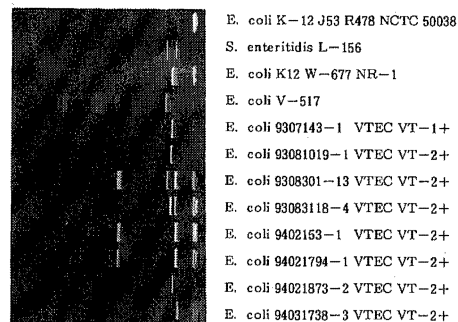


図3 分離VTECのプラスミドプロファイル

図3に分離VTECのプラスミドプロファイルを示した。8株のVTECはいずれも60kb以上の大分子量プラスミドを単独、もしくは複数保有していた。また、比較的分子量の小さいプラスミドを保有している株も認められた。

5. 分離VTECの薬剤感受性

表3に分離VTECの薬剤感受性を示した。今回分離した8株のVTECの中に、表中に示した10種類の常用抗生物質に耐性を獲得しているものは認められなかった。

IV 考察

平成2年に埼玉県県の幼稚園でEHECの集団感染事例が発生して園児2名が死亡して以来¹⁾、国内においてEHEC感染症に対する関心が高まった。この事例を契機として秋田県においてもEHECに対する臨床医の関心が高まり、翌平成3年に初めてEHECの散発的感染者が確認されたが、これらの散発事例におけるEHECの感染源は不明であった¹⁾。秋田県におけるEHECの感染源を明らかにすることはEHEC感染の予防対策を構築する上で重要と考えられたため、我々は、国内外の報告を検討した上で昨年、秋田市内で市販されていた輸入牛肉を対象としてVTECの検出を試みた。その結果、実際にオーストラリア産の牛肉からVTECが検出され、これらが秋田県内においてもEHECの感染源となっている可能性が示唆された⁷⁾。今年度は県内産牛肉、県内の地域によっては生食する習慣があるとされる馬肉、および県内産牛肉を対象としてVTECの検索を実施した。

検体の牛肉は、昨年の調査において輸入牛肉の大腸菌検出率が顕著に高かったT店から購入した。購入時期は比較的気温の高い6月、および寒冷な12月から1月とした。同様に牛の直腸スワブも7から8月、および1から2月に採取した。6月に購入した牛肉からの大腸菌検出率は、12月から1月にかけて購入した牛肉の約2倍であり、検体の購入時期により大腸菌の検出率が異なる傾向が認められた。このことは、牛肉の取扱い温度、店舗での保管温度などの条件が季節により異なり、その温度条件の違いにより解体時に牛肉に付着した大腸菌の消長が影響されることに起因するものと推察され、VTECに関しても一般の大腸菌と同様に、比較的温暖な時期のほうが寒冷な時期よりも検出率が高くなることが推測された。実際、わずかに1株に過ぎなかったが、我々の成績でもVTECが検出されたのは6月に購入した牛肉からであった。

これに対して、牛の直腸スワブからのVTEC検出状況に時期的、地域的なかたよりは認められなかった。

以上のことから、秋田県内にVTECを保菌している牛が点在しており、それらの牛が解体される時にVTE

Cが牛肉に付着する可能性が考えられ、これがEHECの感染経路の一つとなっているものと推察された。今回牛肉から分離されたVTECは、東京都で発生した集団事例の原因菌と同一の血清型であったが、このVTECももともと牛に保菌されていたものと推察され、さらに、このようなVTECが付着している牛肉は実際にEHEC感染症の原因となり得るものと考えられた。このようなことから、牛肉の取扱い温度や保管温度を低くすることに留意することなどにより牛肉に付着したVTECの増殖を防止することがEHEC感染の予防策として有効である可能性が考えられた。

一方、今回牛から分離されたVTEC7株の血清型は、すべてヒトのEHEC感染事例から分離された原因菌の血清型¹³⁾とは異なっていた。このような株が実際にヒトに出血性大腸炎を惹起し得るか否かということは、VTECの病原性を理解する上で、また、EHECの感染源の一つとして牛を位置付け、感染予防対策を構築して行く上で極めて重要なポイントになるものと考えられた。

VTECが出血性大腸炎を惹起するためにはベロ毒素を産生することに加えて、当該菌が腸管内に定着することも重要であると考えられる。近年、EHECにeaeと呼ばれる染色体性遺伝子が存在することが報告されている⁹⁾。このeaeはEPECにも存在し⁸⁾、菌の腸管粘膜への直接接着と絨毛の破壊(Attaching and Effacing Lesionの形成:A/Eの形成)を司ることが報告されており¹⁴⁾、EPECの病原因子の一つであると考えられている。実際、EHECもEPECと同様にA/Eを形成することが報告されており、このことがEHECの病原性発現や出血性大腸炎起病性に重要な役割を果たしているとの考えもある¹⁵⁾。そこで、我々はPCRによるeaeの検出法を確立し、今回分離したVTECのeae保有状況について検討したところ、今回牛肉から分離されたVTEC、およびヒト由来のEHECの全てがeaeを保有していたのに対して、牛から分離されたVTECはいずれもeaeを保有していないことが明らかとなった。VTECのeae保有状況については、ヒト由来株においては大半がeaeを保有している一方、牛由来株ではその1部のみがeaeを保有しているという報告の他¹⁶⁾、牛由来株においても大半がeaeを保有しているという報告もあり¹⁵⁾、未だに不明な点が多い。

一方、EHECの培養細胞への付着に関して、60Mdプラスミドが重要な役割を果たしていると報告されている¹⁷⁾。実際我々が秋田県の散発事例から分離されたEHECのプラスミドプロファイルを測定したところ、1株を除いて約90Kbのプラスミドを保有していた¹⁾。今回牛肉と牛から分離されたVTECは全て、約60kbから約200Kbのプラスミドを保有しており、これらがVT

EHECの腸管粘膜への付着に關与している可能性が考えられるが、現時点ではその実態は不明である。我々はEHECの60Mdプラスミド検出用DNAプローブの分与を受け、現在そのシーケンスを決定しているところであり、そのPCRによる検出法を確立する予定である。今後、今回分離されたVTECがEHECの60Mdプラスミドのプローブと反応するかどうかについても検討する必要があると考えられる。

EHECのA/Eの形成にはeae, 60Mdプラスミドに加えて他の遺伝子要素が必要であるとの報告もあり¹⁰⁾、EHECの病原因子に關しての考え方には未だ混沌としている面がある。このことに関する研究は近年ようやく開始されたばかりである。従って、今回牛から分離されたVTECが出血性大腸炎を惹起し得るかどうかについては、現時点では、遺伝的な検討のみならず、動物の感染モデル実験系も使用するなどして検討する必要があると考えられる。

以上のように、今回の調査により秋田県内にVTECを保有する牛が点在していること、および県内産牛肉がVTECに汚染されていることが初めて明らかとなった。これらのVTECのうち牛肉から分離されたものはヒトの感染事例から分離されたEHECと同一の血清型であり、かつeaeも保有していたことから、出血性大腸炎の原因菌となり得るものと考えられた。従って、このような牛肉がEHEC感染症における感染源となり得ること、また、牛肉中においてこのような菌が増殖することを阻止する、上述のような処置、さらに、牛肉からの2次汚染を避けるように生牛肉を扱った調理器具の消毒に留意する等の処置がEHEC感染予防策となり得ると思えられた。一方、これらに由来するVTECがすべてヒトに出血性大腸炎を惹起し得るかどうかということについては、さらに今後の検討課題として明らかにしていくべき点であると同時に、このことはVTEC感染予防対策を構築する上においても重要と考えられた。

V 文 献

- 1) 城宏輔. 埼玉県某幼稚園で流行した E. coli O157 : H 7 による出血性大腸炎. 臨床と微生物, 1991 ; 18 : 457-465.
- 2) A. D. O'Brien et al. Escherichia coli O157 : H 7 Strains Associated with Hemorrhagic Colitis in the United States Produce a Shigella Dysenteriae (shiga) Like Cytotoxin. Lancet, 1983 ; i : 702.
- 3) 伊藤武, 他. 新しく認識された Verocytotoxin 産生大腸菌による感染と本菌の病原性に関する研究の現況. モダンメディア, 1988 ; 34 : 12-23.

- 4) 八柳潤, 他. 平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について. 秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47.
- 5) 田中博, 他. Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の輸入食肉からの分離. 感染症学雑誌, 1991 ; 65 : 175-180.
- 6) 多田博, 他. PCR法を用いた肥育牛からの Vero 毒素産生性大腸菌の検出. 感染症学雑誌, 1992 ; 66 : 1383-1389.
- 7) 八柳潤, 他. 秋田市内で市販されていた輸入牛肉からの腸管出血性大腸菌の分離. 秋田県衛生科学研究所報, 1993 ; 37 : 39-44.
- 8) Ann E. Jerse et al. A Genetic Locus of Enteropathogenic Escherichia coli Necessary for the Production of Attaching and Effacing Lesions on Tissue Culture Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990 ; 87 : 7839-7843.
- 9) J. Yu and J.B. Kaper. Cloning and Characterization of the eae Gene of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H 7. Molecular Microbiology, 1992 ; 6 : 411-417.
- 10) Ann E. Jerse et al. Oligonucleotide Probe for Detection of the Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Adherence Factor of Localized Adherent EPEC. J. Clin. Microbiol., 1990 ; 28 : 2842-2844.
- 11) J.P. Nataro et al. Detection of an Adherence Factor of Enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. J. Infect. Dis., 1985 ; 152 : 560-565.
- 12) 伊藤武, 他. Cytotoxin を産生する Escherichia coli O145 : 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, 1985 ; 36 (別冊) : 16-22.
- 13) M.A. Karmali. Infection by Verocytotoxin-producing Escherichia coli, Clin. Microbiol. rev., 1989 ; 2 : 15-38.
- 14) M.S. Donnenberg and J.B. Kaper. Construction of an eae Deletion Mutant of Enteropathogenic Escherichia coli by Using a Positive-Selection Suicide Vector. Infection and Immunity, 1991 ; 59 : 4310-4317.
- 15) V.P.J. Gannon et al. Detection and Characterization of the eae Gene of Shiga-like Toxin-Producing Escherichia coli Using Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol., 1993 ; 31 : 1268-1274.

- 16) T.J. Barrett et al. Virulence Factors in Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Humans and Animals. *J. Infect. Dis.*, 1992 ; 165 : 979–980.
- 17) I. Toth et al. Influence of the 60-Megadalton Plasmid on Adherence of *Escherichia coli* O157 : H 7 and Genetic Derivatives. *Infection and Immunity*, 1990 ; 58 : 1223–1231.
- 18) M. Dytoc et al. Multiple Determinats of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* O157 : H 7 Attachment-Effacement. *Infection and Immunity*, 1993 ; 61 : 3382–3391.