

# Vero毒素産生性大腸菌（VTEC）感染症に関する研究 ハトおよびカラスからのVero毒素産生性大腸菌 （VTEC）の分離および血清型

*Studies on Vero toxin-producing Escherichia coli (VTEC) Infection:  
Isolation and serotypes of Vero toxin-producing Escherichia coli  
(VTEC) from pigeons and crows*

福山正文<sup>1</sup>, 角野洋一<sup>1</sup>, 原 元宣<sup>2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院環境保健学研究科,

<sup>2</sup>麻布大学大学院獣医学研究科

Masafumi Fukuyama<sup>1</sup>, Youichi Kakuno<sup>1</sup>, Motonobu Hara

<sup>1</sup>Graduate School of Environmental Health, Azabu University

<sup>2</sup>Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

---

**Abstract:** To clarify the source and route of infection with Vero toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in humans, we sampled gastrointestinal contents and isolated VTEC from wild birds captured to exterminate harmful birds between August 1997 and January 1998. Pigeons were caught in Sagamihara-shi and crows were caught in Sagamihara-shi, Kawasaki-shi, Yokohama-shi, and the Tokyo metropolitan area. The following results were obtained.

1) VTEC was isolated from 32 of 521 birds (6.1%) examined. Among pigeons, VTEC was isolated from 25 of 262 birds (9.5%) captured in Sagamihara-shi. Among crows, VTEC was isolated from 7 of 184 birds (3.8%) captured in Sagamihara-shi, but not isolated from any bird of 11, 4, and 60 birds captured in Yokohama-shi, Kawasaki-shi, and the Tokyo metropolitan area, respectively.

2) Toxin was typed in 33 isolates. There were four VT1-producing isolates (6.5%), 27 VT2-producing isolates (88.7%), and two VT1, VT2-producing isolates (4.8%).

3) The serotypes of the isolates were: O78: H-, 10; O152: H-, 7; O153: H19,2; O164: H-, 1; O128: H-, 1; O164/143: H-, and O1: HUT, 1. The serotype was unknown in 10 isolates. Among 10 isolates for which the serotype could not be determined, auto-aggregation was observed in one isolate.

4) *EaeA* was investigated in the 33 isolates, and 31 isolates (93.9%) possessed *eaeA*.

The above findings showed that strains with same toxin types and serotypes of human diarrhea-derived VTEC were isolated from pigeons and crows, and the isolates frequently possessed *eaeA*, which is considered to have an important association with its pathology, suggesting that birds are involved in VTEC infection in humans as a source of infection.

## 序 文

著者らは VTEC 感染症の基礎的研究の一環として、牛、山羊、豚および鹿から VTEC の汚染状況について調査<sup>1, 2, 3)</sup>を行い、牛から 3.6～39.2%，山羊から 15.4%，豚から 1.0% および鹿から 10.5% に保菌していることを報告した。また、これらの血清型は人の腸管感染症から分離されている O157 以外に、O26 や O111 などの散発性下痢症から分離されている血清型と一致していた。毒素型では人から分離されている菌株と同様に VT1 単独、VT2 単独や両毒素産生株が存在していることなどを確認した。これらのことから、VTEC に汚染された動物の糞便が人への感染源として密接に関わりのあることが推察された。そこで、今回、公共の場である公園や仏閣に飛来し、人と密接に関わりがあり、人への感染源の一つとして考えられるハトやカラスを対象に VTEC の汚染状況について調査を行った。

## 材料および方法

検査材料：1997年8月から1998年1月の期間に害鳥駆除として捕獲されたハト 262 例（相模原市内 262 例）とカラス 259 例（相模原市内 184 例、横浜市内 11 例、川崎市内 4 例および東京都内 60 例）の計 521 例を調査対象とした。

分離および同定：供試糞便をマッコンキー寒天（日水）、DHL 寒天（日水）、Rainbow agar O157（Biolog）の各分離培地に直接画線塗抹し、37℃ 24 時間培養後、各平板から大腸菌を疑うコロニーを 3～5 個釣菌し、TSI 寒天（日水）、LIM 培地（日水）および普通寒天培地（オキシダーゼ試験用）に接種して 37℃ 24 時間培養後、その生化学的性状から大腸菌を推定した。続いて、腸内細菌同定キットエンテオグラム（和光純薬）を用いて性状試験を行い、大腸菌と同定した。

Vero 毒素および *eaeA* 両遺伝子の検出：Vero 毒素の遺伝子検出については、既報<sup>1)</sup>に準拠して PCR 法によって遺伝子の有無を確認した。また、*eaeA* 遺伝子の検出については、供試菌株を普通寒天培地に塗抹して 37℃ 24 時間培養後、1 コロニーを釣菌し、LB broth（Difco）に接種して 37℃ 18 時間培養した菌液 100μl を滅菌蒸留水 900μl に懸濁し、100℃ 10 分

間加熱処理したものを鋳型 DNA として PCR に用いた。PCR 反応液は *eaek1*、*eaek4* および 10× buffer（Takara）を各 2.5μl、dNTP（Takara）を 2μl、Tag DNA Polymerase（Takara）を 0.2μl および滅菌蒸留水 12.75μl の中に鋳型 DNA を 2.5μl 加えた計 25μl に調製した。PCR 反応は中澤らの方法<sup>4)</sup>に準拠して行った。増幅反応物は 1.5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色して紫外線下で観察して遺伝子の有無を確認した。

Vero 毒素の毒素型別：既報に準拠して、逆受身ラテックス凝集反応による大腸菌ベロトキシン検出用キット VTEC-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いた。

血清型別：供試菌株について病原大腸菌診断用血清（デンカ生研）を用い、既報に準拠して行った。

## 成 績

### 1. Vero 毒素産生性大腸菌の分離状況

ハトおよびカラスからの VTEC の分離状況は Table1 に示すとおり、ハトでは 262 例中 25 例（9.5%）から、カラスでは 259 例中 7 例（2.7%）からそれぞれ VTEC が分離された。その内訳において、ハトは相模原市のみで実施し 262 例中 25 例（9.5%）から、カラスは相模原市 184 例中 7 例（3.8%）から VTEC が分離されたが、横浜市 11 例、川崎市 4 例および東京都内 60 例からは 1 例も分離されなかった。

### 2. 分離菌株の毒素型

分離した 33 株についての毒素型別は Table2 に示すとおり、VT1 産生株が 4 株（6.5%）、VT2 産生株が 27 株（88.7%）、VT1 と VT2 の両毒素産生株が 2 株（4.8%）であった。その内訳において、ハトでは 26 株中 25 株（96.2%）が VT2 産生株を、残り 1 株（3.8%）が VT1 と VT2 の両毒素産生株であった。カラスでは 7 株中 4 株（57.1%）が VT1 産生株を、2 株（28.6%）が VT2 産生株を、1 株（14.3%）が VT1 と VT2 の両毒素産生株であった。

### 3. 分離菌株の血清型

分離した 33 株について血清型別を行った成績は Table2 に示すとおり、O78 : H- に 10 株、次に O152 : H- に 7 株、O153 : H19 に 2 株、O164 : H-、O128 : H-、O164 / O143 : H- および O1 : HUT に各 1 株が型別されたが、残り 10 株は型別不能であった。また、分離さ

れた型別不能7株のうち、1株は自家凝集が認められた。由来別において、ハトではO78:H-に10株、次にO152:H-に7株、O164:H-に1株、O128:H-およびO164/O143:H-に各1株が型別されたが、残り6株は型別不能であった。カラスではO153:H19に2株、O1:HUTに1株が型別されたが、残り4株は型別不能であった。

血清型別された23株について、毒素型別との組合せをみると、VT2毒素産生型に20株が該当し、O78:H-が10株と最も多く、次にO152:H-が7株、O128:H-, O164:H-, O164/O143:H-が各1株であった。VT1毒素産生型はO1:HUTとO153:H19が各1株であった。VT1とVT2の両毒素産生型はO153:H19が1株であった。

#### 4. 分離菌株における *eaeA* の保有状況

供試した33株（ハト26株、カラス7株）について *eaeA* の保有状況について検討したところ、Table3に示すように31株（93.9%）が *eaeA* を保有していた。その内訳では、ハト由来は全株が *eaeA* を保有していたが、カラス由来では7株中5株（71.4%）が *eaeA* を保有し、2株（28.6%）は *eaeA* を保有していなかった。

### 考 察

Vero毒素産生性大腸菌（VTEC）感染症の感染源や感染経路を解明する一環として、4ヶ所の地区で害鳥駆除で捕獲したハトやカラスからVTECの分離を試みたところ、ハト9.5%、カラス3.8%からそれぞれ分離された。その内訳において、ハトでは相模原市において実施し9.5%から、カラスでは相模原市3.8%から分離されたが、横浜市、川崎市および東京都内からは1例も分離されなかった。鳥類からのVTECの汚染状況についての調査は少なく、ハトについてはSchmidtら<sup>5)</sup>が糞便から新たにVT2 variantを産生する株やDell'Omoら<sup>6)</sup>が糞便からVT2産生株を12.5%に分離している報告があるに過ぎない。また、野鳥についてはWallaceら<sup>7)</sup>が主にカモメからVTEC O157を0.9-2.9%に分離しているに過ぎない。今回の成績を比較するとハトについてはDell'Omoら<sup>6)</sup>の成績と類似していた。これらのことから、わが国のハトにおいてもVTECが高率に存在していることが明らかとなり、ハトが自然界の

保菌宿主となっている可能性が示唆された。また、カラスについては報告例が見当たらずに比較することはできないが、今回の調査においてカラスが保菌していることが明らかとなった。

分離型の毒素型は、VT1単独、VT2単独、両毒素産生株のいずれかに該当し、人由来株と類似していた<sup>8,9)</sup>。また、ハトについてはDell'Omoら<sup>6)</sup>と同様に著者らもVT2産生株を高率に認めた。さらに、ハトやカラス由来株がヒト由来株と同じ毒素型のVero毒素を産生するVTECを保有していることが明らかとなり、これらの鳥類もヒトへの感染源として関わりのある可能性が示唆された。

血清型において、今回、著者らはO78:H-, O152:H-, O153:H19, O164:H-, O128:H-およびO164/O143:H-の7菌型とO157:H7の菌を分離したがO157:H7は一株も分離できなかった。鳥類から分離したVTEC株で血清型が明らかになっているのは、Wallaceら<sup>7)</sup>が野鳥からO157:H7を分離したに過ぎない。ハトについてはSchmidtら<sup>5)</sup>やDell'Omoら<sup>6)</sup>が分離したVTEC株について血清型を行っているが型別不能であったことから、著者等が示した血清型と比較することが出来なかった。一方、ヒトの腸管感染症から分離されているVTECの主な血清型としてO26:H11, O26:H-, O111:H-, O128:H2, O128:H-, O145:H, O157:H7, O157:H-などが多く認められている<sup>10,11,12,13)</sup>。今回の分離株の血清型の中にはわが国の散发性下痢症事例<sup>9)</sup>から分離されているO128の血清型と一致するものが分離されていることから、ヒトの腸管感染症の感染源の一つとして、公園や仏閣などでヒトと接触する機会が多いハトやカラスもヒトの腸管感染症に関与する可能性が考えられた。さらに、ヒトの病原性の発現に関与していると考えられている *eaeA* 遺伝子について、Sandhuら<sup>14)</sup>は *eaeA* 陰性株のVTECは *eaeA* 陽性株に比べ病原性の発現との関連性が低いと報告している。今回、著者らが鳥類から分離した株の内、93.9%と高率に *eaeA* 陽性株が認められることから、Sandhuら<sup>14)</sup>が報告しているように病原性と密接に関わりがあるのではないかと推察された。

これらのことから、今後公衆衛生方面において、ハトやカラスが排泄する糞便にVTECが存在している可能性が十分に考えられるので衛生状態について

監視して行く必要がある。

## 要 約

ヒトの Vero毒素産生性大腸菌 (VTEC) 感染症における感染源や感染経路を明らかにするため、1997年8月から1998年1月までの期間にハトは相模原市で、カラスは相模原市、川崎市、横浜市および東京都内で害鳥駆除のために捕獲した野鳥の腸管内容物を採材し、VTECの分離を試みたところ、以下の成績が得られた。

1) 供試した521例中32例(6.1%)からVTECが分離された。その内訳において、ハトでは相模原市262例中25例(9.5%)から、カラスでは相模原市184例中7例(3.8%)からそれぞれ分離されたが、横浜市11例、川崎市4例および東京都内60例からは1例も分離されなかった。

2) 分離された33株について毒素型別を行ったところ、VT1産生株が4株(6.5%)、VT2産生株が27株(88.7%)、VT1とVT2両毒素産生株が2株(4.8%)であった。

3) 分離株の血清型では、O78:H-に10株、次にO152:H-に7株、O153:H19に2株、O164:H-、O128:H-、O164/O143:H-およびO1:HUTに各1株が型別されたが、残り10株は型別不能であった。また、型別不能10株のうち、1株は自家凝集が認められた。

4) 供試した33株について *eaeA* を確認したところ、31株(93.9%)が保有していた。

以上のことから、ヒト下痢症由来VTECの毒素型や血清型と一致する菌株がハトやカラスから分離されたことや病原性の発現に重要な関与が考えられる *eaeA* を高率に保有していたことから、ヒトVTEC感染症の感染源の一つとしてこれらの鳥類も関与する可能性が考えられた。

## 文 献

- 1) 福山正文, 今川八東, 原 元宣, 田淵 清, 伊藤武, 尾畑浩魅: 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, 感染症誌 1994; 68: 508-12.
- 2) 古畑勝則, 坂田慎治, 岡本倫明, 山本静雄, 本田政幸, 甲斐明美, 他: 乳牛における Vero毒素産生性大腸菌 (VTEC) の汚染状況および分離菌株の血清型, 感染症誌, 1999; 73: 445-9
- 3) 福山正文, 横山里恵, 坂田慎治, 古畑勝則, 大仲賢二, 原 元宣, 他: Vero毒素産生性大腸菌 (VTEC) 感染症に関する研究一鹿からの本菌分離について一, 感染症誌, 1999; 73: 1140-4.
- 4) 中澤宗生, 伊藤健一郎: ウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の幼若ウサギ感染実験, 感染症誌 1995; 69: 772-6
- 5) Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H., Karch, H: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environ. Microbiol 2000; 66: 1205-8.
- 6) Dell'Omo, G., Morabito, S., Quondam, U., Agrimi, Ciuchini, F., Macri, A., Caprioli, A: Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Vet Rec 1998; 142: 309-310.
- 7) Wallace, J. S., Cheasty, T., Jones, K. : Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J. Appl. Microbiol 1997; 82: 399-404.
- 8) 城 宏輔: 埼玉県某幼稚園で流行した *Escherichia coli* O157:H7による出血性大腸炎, 臨床と微生物 1996; 23: 869-878.
- 9) 甲斐明美, 尾畑浩魅, 伊藤 武, 工藤康雄: わが国における Vero毒素産生性大腸菌の分離状況, 臨床と微生物 1996; 23: 827-834.
- 10) Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Megee HB, Wells JG, Davis BR et al: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Me 1983; 308-681-5.
- 11) 田中 博, 近藤玲子, 西内 力, 松田 均, 木村真理, 目見田 清, 他: 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, 1992; 66: 448-455.
- 12) 甲斐明美, 工藤康雄: 下痢原生大腸菌 (腸管病原性大腸菌) の分類. 臨床と微生物 1991; 18: 493-8.
- 13) 川村智行, 西本佳代: 出血性大腸炎感染症, 検査と技術, 1997; 25: 308-313.
- 14) Sandhu, K. S., Clarke, R. C., Mcfadden, K., Brouwer, A., Louie, M., Wilson, J., Lior, H., Gyles, CL.: Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. Epidemiol Infect 1966; 116: 1-7.

Table 1 Detection of VTEC from pigeons and crows

Source	Sampling area	No. of Samples examined	No. of positive samples
Pigeons	Sagamihara	262	25 (9.5)
Crows	Sagamihara	184	7 (3.8)
	Yokohama	11	0
	Kawasaki	4	0
	Tokyo	60	0
Total		521	32 (6.1)

Table 3 *EaeA* gene of VTEC isolated from pigeons and crows

Source	No. of strains	No. of <i>eaeA</i> gene positive strains (%)
Pigeon	26	26 (100.0)
Crow	7	5 ( 71.4)
Total	33	31 ( 93.9)

Table 2 Serotypes and toxintypes of VTEC isolated from pigeons and crows

Source	Serotype	Toxin type			Total
		VT1	VT2	VT1 + VT2	
Pigeon	O78: H-		10		10
	O152: H-		7		7
	O128: H0		1		1
	O164: H-		1		1
	O164/O143: H-		1		1
	OUT: HUT		5	1	6
Crow	O153: H19	1		1	2
	O1: HUT	1			1
	OUT: HUT	2	2		4
Total		4	27	2	33