

ペット動物における病原大腸菌の保有実態調査

畠山 薫*, 奥野 ルミ*, 小西 典子**, 下島 優香子**
尾畑 浩 魅**, 遠藤 美代子*, 柳川 義 勢*

Research of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Pet animals

Kaoru HATAKEYAMA*, Rumi OKUNO*, Noriko KONISHI **, Yukako SHIMOJIMA**
Hiromi OBATA**, Miyoko ENDO* and Yoshitoki YANAGAWA*,

Keywords : イヌ, ネコ, 腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *E.coli*, 毒素原性大腸菌 enterotoxigenic *E.coli*, 腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *E.coli*, 組織侵入性大腸菌 enteroinvasive *E.coli*, 腸管凝集性大腸菌 enteroaggregative *E.coli*

はじめに

病原大腸菌 (Diarrheagenic *Escherichia coli*) は、ヒトおよび動物に下痢等の胃腸炎症状を起こす大腸菌の総称である。病原大腸菌は、その病原性の発生機序から①腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E.coli*, 以下 EPEC と略す), ②毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E.coli*, 以下 ETEC と略す), ③組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E.coli*, 以下 EIEC と略す), ④腸管出血性 (志賀毒素産生性) 大腸菌 (Enterohemorrhagic(Shiga-toxin producing) *E.coli*, 以下 EHEC と略す), ⑤腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *E.coli*, 以下 EAggEC と略す) に分類されている。

病原大腸菌の感染は、汚染された水や飲食物を介して感染する経口感染症であり、家畜の排泄物に汚染された水や食肉などを介したEHEC O157, O111, O26などのヒト感染症例がたびたび報告されている。しかしながら、ペット動物とヒトの関連性については、下痢を起こしているイヌ、ネコ等から分離された病原大腸菌の血清型は、ヒト下痢症の主要な血清型とは異なるという報告^{1, 2)}, あるいは下痢をしているペットのイヌからヒトのEPECが分離されたという報告³⁾もあるが、まだ不明な点が多い。

そこで、ペット動物における病原大腸菌の保有状況を調査したので報告する。

実験方法

1. 調査期間および検体

平成 17 年 4 月から平成 18 年 1 月に都内 24 カ所の動物飼養施設で飼養されていたイヌ 70 件, ネコ 44 件, げっ歯類 21 件, 鳥類 32 件およびフェレット 2 件, 計 169 件の糞便, および東京都動物愛護相談センターに収容されていたイヌ 105 件の糞便, 合計 274 件を対象とした。

2. 検査方法

1) 検出方法

糞便は EC 培地 (栄研化学) に接種後, 37°C 18 時間培養を行った。培養液 400 μ l を 12,000 rpm, 10 分間遠心分離し, その沈渣を PBS で 2 回洗浄した。次いで, 95°C 10 分間加熱をしたものを PCR 法に供した。

PCR 法は表 1 に示したプライマー^{4~11)}を用いて, それぞれの病原遺伝子の検出を行った。PCR 法で陽性になった検体は, その EC 培養液を DHL 寒天培地 (栄研化学) に塗布し 37°C 18 時間培養後, 発育してきたコロニーを 50 ~ 300 個菌落し, PCR 法により菌検索を行った。病原遺伝子陽性の株は, 生化学的性状試験を行い大腸菌の確認をするとともに, 市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて, O および H 血清型別を行った。また, 毒素産生遺伝子を保有する大腸菌株は, エンザイムイムノアッセイ (以下 EIA と略す) (デンカ生研) により大腸菌耐熱性エンテロトキシン (以下 ST と略す) を, また逆受身ラテックス凝集反応 (以下 RPLA と略す) (デンカ生研) によりベロ毒素 (以下 VT と略す) の検出を行い, 毒素産生性の確認をした。検出された病原大腸菌菌株については, 薬剤感受性試験を実施し, パルスフィールド電気泳動法 (以下 PFGE と略す) により遺伝子解析を試みた。

2) 薬剤感受性試験

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の薬剤感受性試験に準拠した Kirby-Bauer 法により行った。すなわち, MacFarland 0.5 に調整した菌液をミュラーヒントン寒天培地 (栄研化学) に塗布後, アンピシリン (ABPC) 10 μ g, カナマイシン (KM) 30 μ g, ストレプトマイシン (SM) 10 μ g, テトラサイクリン (TC) 30 μ g, ナリジクス酸 (NA) 30 μ g, スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) 23.75 / 1.25 μ g, クロラムフェニコール (CP) 30 μ g, フォス

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

表 1. 病原大腸菌検出に用いたプライマー塩基配列

遺伝子	プライマー	増幅サイズ
EPEC eaeA	sk-1	5'-CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC-3'
	sk-2	5'-CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTC TTC
		863 bp
bfpA	BFP-1	5'-CGC TGA TTC CAA TAA GTC GT-3'
	BFP-2	5'-GCC GCT TAT CCA ACA TGG TA-3'
		265 bp
ETEC LT	LT-1	5'-AGC AGG TTT CCC ACC GGA TCA CCA-3'
	LT-2	5'-GTG CTC AGA TTC TGG GTC TC-3'
		132 bp
STh	ST I b-1	5'-TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG-3'
	ST I b-2	5'-GCA CCC GGT ACA AGC AGG ATT-3'
		169 bp
STp	ST I a-1	5'-CCG TGA AAC AAA TGA CG-3'
	ST I a-2	5'-ACA TCC AGC AGG CAG GAT T-3'
		240 bp
EIEC invE	I-1	5'-ATA TCT CTA TTT AA CCT CGC GT-3'
	I-5	5'-GAT GGC GAG AAA TTA TAT CCC G-3'
		382 bp
EHEC VT	Lin-up	5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'
	Lin-down	5'-TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'
		900 bp
VT1	VT1a	5'-GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG-3'
	VT1b	5'-AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA-3'
		130 bp
VT2	VT2a	5'-TTA ACC ACA CCC ACG GCA GT-3'
	VT2b	5'-GCT CTG GAT GCA TCT CTG GT-3'
		346 bp
VT2c	VT2v-1	5'-CAT TCA CAG TAA AAG TGG CC-3'
	VT2v-2	5'-GGG TGC CTC CCG GTG AGT TC-3'
		386 bp
VT2e	VT2vp1-u	5'-AAG CCT TAC GGT TCA GGC AA-3'
	VT2vp1-d	5'-CAG TTA AAC TT CACC TGG GC-3'
		686 bp
hlyA	hlyA1	5'-GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G-3'
	hlyA4	5'-TCT TCG CCT GAT AGT GTT TGG TA-3'
		1,551 bp
EAggEC aggR	AggR-1	5'-CAG AAT ACA TCA GTA CAC TG-3'
	AggR-2	5'-GAA GCT TAC AGC CGA TAT AT-3'
		433 bp
astA	EASTOS1	5'-GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG-3'
	EASTOAS2	5'-CGC GAG TGA CGG ATT TGT AG-3'
		109 bp

表 2. 病原大腸菌検出結果

	動物飼養施設		動物愛護相談センター		合計	
	検査頭数	陽性数	検査頭数	陽性数	検査頭数	陽性数
イヌ	70	14 (20.0%)	105	4 (3.8%)	175	18 (10.3%)
ネコ	44	8 (15.9%)	—	—	44	8 (15.9%)
げっ歯類	21	1 (4.8%)	—	—	21	1 (4.8%)
鳥類	32	—	—	—	32	—
その他	2	—	—	—	2	—
計	169	23 (7.1%)	105	4 (3.8%)	274	27 (9.9%)

フォマイシン (FOM) 50 µg, ノルフロキサシン (NFLX) 10 µg の 9 薬剤のディスクを配置し, 37°C 18 時間培養後, それぞれのディスクの阻止円を測定し薬剤感受性の判定をした。

3) PFGE 型別

検出された病原大腸菌株の PFGE は, 定法に従いブロックを作製し, 制限酵素 *Xba* I で処理後, 1% アガロースゲルを用い, 泳動時間 20 時間 18 分, 泳動条件は電圧 6.0 V/cm, スイッチタイム 0.47 秒から 35.38 秒, 0.5% TBE バッファーで泳動を行った。泳動後は, エチジウムブロマイドで染色後, Unweighted pair group method-determined 法 (以下, UPGMA 法と略す) により系統樹を作製し解析を行った。

結果及び考察

1. 年齢および健康状態

動物飼養施設で飼養されていたイヌ 70 頭の年齢は, 生後 2 ヶ月から 14 才であり, 平均 1.86 才であった。また, ネコ 44 頭の年齢は生後 1 ヶ月~19 才であり, 平均 2.5 才であった。げっ歯類 21 匹は生後 1 ヶ月~1 才であり平均 6 ヶ月であった。鳥類は生後 1 ヶ月~7 才であり平均 1.2 才であった。

動物愛護相談センターで管理されていたイヌは生後 1.5 ヶ月~18 才 (推定年齢を含む) であり, 平均 7.7 才であった。動物飼養施設で飼養されている個体は幼弱な個体が多かった。

両施設で飼養されていたいずれの個体も明確な下痢等の症状はなかった。

2. 病原大腸菌検出結果

検体からの病原大腸菌検査成績は, 表 2 に示した。

イヌでは, 動物飼養施設で 14 件 (20.0%), 動物愛護相談センターで 4 件 (3.8%), 合計 18 件 (10.3%) から病原大腸菌が検出された。ネコでは, 動物飼養施設の 44 件中 8 件 (15.9%) から検出された。これらイヌおよびネコから検出された病原大腸菌は, すべて ETEC であり, EPEC, EHEC, EIEC, EAaggEC は検出されなかった。

げっ歯類 21 件中 1 件から検出された病原大腸菌は EHEC OUT:HNM であった。この株は, PCR 法では, VT2 亜型 VT2c の遺伝子を保有する株であったが, RPLA 法では VT1, VT2 は検出されなかった。また, EHEC の VT 以外の病原因子であるインチミン蛋白をコードする *eae* 遺伝子および, ヘモリシン蛋白発現遺伝子は保有していなかった。

鳥類およびフェレットからは, 病原大腸菌は検出されなかった。

イヌ 175 件中 18 件および, ネコ 44 件中 8 件から検出された ETEC 合計 26 株は, いずれも EIA 法により ST 産生株であり, PCR 法による遺伝子型はすべて ST I a (STp) 型であった。ほとんどの株が市販の大腸菌 O 血清では型別不能であり, 血清型別ができた 3 株は O153 と O26 であ

ったが, ヒトの ETEC から分離される主な血清型ではなかった。

3. 薬剤感受性試験と PFGE 型別結果

分離された ETEC 26 株について, 薬剤感受性試験および PFGE 型別を行った (表 3) (図 1)。このうち, ETEC が分離された動物飼養施設 6 施設中 4 施設で同時飼育されていたイヌ, ネコ複数頭から, ETEC が分離された。

施設 P で飼育されていたイヌ, ネコから分離された ETEC 5 株は, 薬剤耐性パターンおよび PFGE 型で同一となった。また, 施設 T でイヌから分離された ETEC 4 株は PFGE 型はほぼ同一であったが, 薬剤耐性パターンは一致しなかった。これは 4 株共通の薬剤耐性は ABPC・SM であり, それ以外の TC, CP 等は薬剤耐性プラスミド上にコードされており, このプラスミドは PFGE 型別上反映されないサイズのものとして推測される。

一方, 2 施設からは, PFGE 型および薬剤耐性パターンが異なる複数の ETEC が分離された。施設 N からは, 3 株中イヌ, ネコから分離された 2 株で薬剤耐性パターンおよび PFGE 型が同一となった。施設 M では, 同一検査日に分離された ETEC 7 株のうち, 血清型 O153:H21 の 2 株は薬剤耐性パターンおよび PFGE 型は同一であった。血清型 OUT:HNM 5 株のうち, 薬剤耐性パターンが ABPC・SM であった 4 株は PFGE 型も同一であったが, ABPC 単剤耐性の株は異なる PFGE 型であった。また, この施設で別の検査日に分離された ETEC は血清型 O26:HNM でまったく異なるものであった。

4. UPGMA 法によるクラスター解析

今回 26 株中 22 株を占めた ETEC OUT:HNM について, PFGE 後 UPGMA 法により系統樹 (図 2) を作製し, クラスター解析を行った。相似係数 50% で大きく I および II の 2 つのクラスターに分けることができた。すなわち, 相似係数 77% で, 施設 P で分離された 5 株と, 動物愛護相談センターで分離された 2 株の計 7 株が I のクラスターを形成し, 残りの 15 株が相似係数 66.7% で II のクラスターを形成している。うち, 施設 A の No.1 株と施設 U の No.22 株が相似係数 96% と近縁度が高いことが示唆された。しかしながら, それ以外では, 各々の施設で分離された株間は, 相似係数より遺伝的に距離があり別々の由来であることが示唆された。

以上の結果から, 動物飼養施設で飼養されていたペット動物は幼弱な個体が多く, 病原大腸菌を始め多くの病原菌に感受性が高い年齢層であり, かつ集団飼育されていることから, 相互に感染していると推測する。

今回検査対象としたイヌ, ネコは下痢等の症状を呈しておらず, 糞便中の排菌量は少ないと推測するが, こうしたペットが存在する可能性があることを考慮するならば, 糞便の取り扱いや, 動物を触った後の手指の洗浄および器具器材の消毒は重要である。

表3. ペット動物から分離されたETEC菌株の疫学解析結果

菌株 No.	検査日	飼養施設	動物種	年齢 (推定)	性別	ETEC		薬剤耐性パターン	PFGE型
						血清型	毒素		
1	6月7日	施設A	イヌ	3M	♀	OUT:HNM	ST	SM	II a-2
2	9月13日	施設M	イヌ	5M	♂	O153:H21	ST	ABPC・TC	O153- I
3	9月13日		ネコ	7M	♀	O153:H21	ST	ABPC・TC	O153- I
4	9月13日		イヌ	4M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II d
5	9月13日		イヌ	7M	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II d
6	9月13日		ネコ	7M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II d
7	9月13日		ネコ	5M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II d
8	9月13日		イヌ	7M	♀	OUT:HNM	ST	ABPC	II a-4
17	11月15日		イヌ	10M	♂	O26:HNM	ST	ABPC・SM	O26- I
9	9月13日	施設N	イヌ	2M	♂	OUT:HNM	ST	SM	II a-3
10	9月13日		イヌ	3M	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・KM・SM・TC	II b
11	9月13日		ネコ	1M	不明	OUT:HNM	ST	ABPC・KM・SM・TC	II b
12	10月18日	施設P	イヌ	11Y	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-1
13	10月18日		ネコ	8Y	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-1
14	10月18日		ネコ	7Y	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-1
15	10月18日		ネコ	7Y	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-1
16	10月18日		ネコ	5Y	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-1
18	1月17日	施設T	イヌ	2.5M	♂・♀	OUT:HNM	ST	ABPC・SM・CP	II a-1
19	1月17日		イヌ	5M	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II a-1
20	1月17日		イヌ	4M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM・TC・ST	II a-1
21	1月17日		イヌ	7M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM・TC・ST・CP	II a-1
22	1月17日	施設U	イヌ	3M	♂	OUT:HNM	ST	ABPC・SM	II a-2'
23	9月21日	動物愛護相 談センター Y	イヌ	4Y	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I a-2
24	10月12日		イヌ	11Y	♀	OUT:HNM	ST	ABPC・KM	I b
25	10月12日		イヌ	5M	♂	OUT:HNM	ST	-	II c
26	10月18日		イヌ	7M	♂	OUT:HUT	ST	ABPC	UT- I

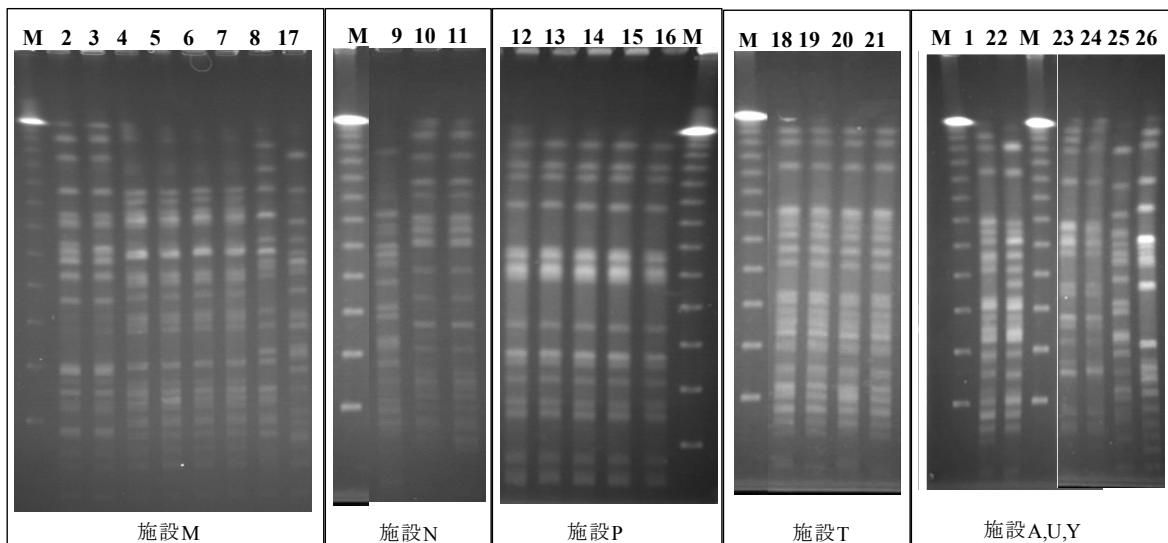
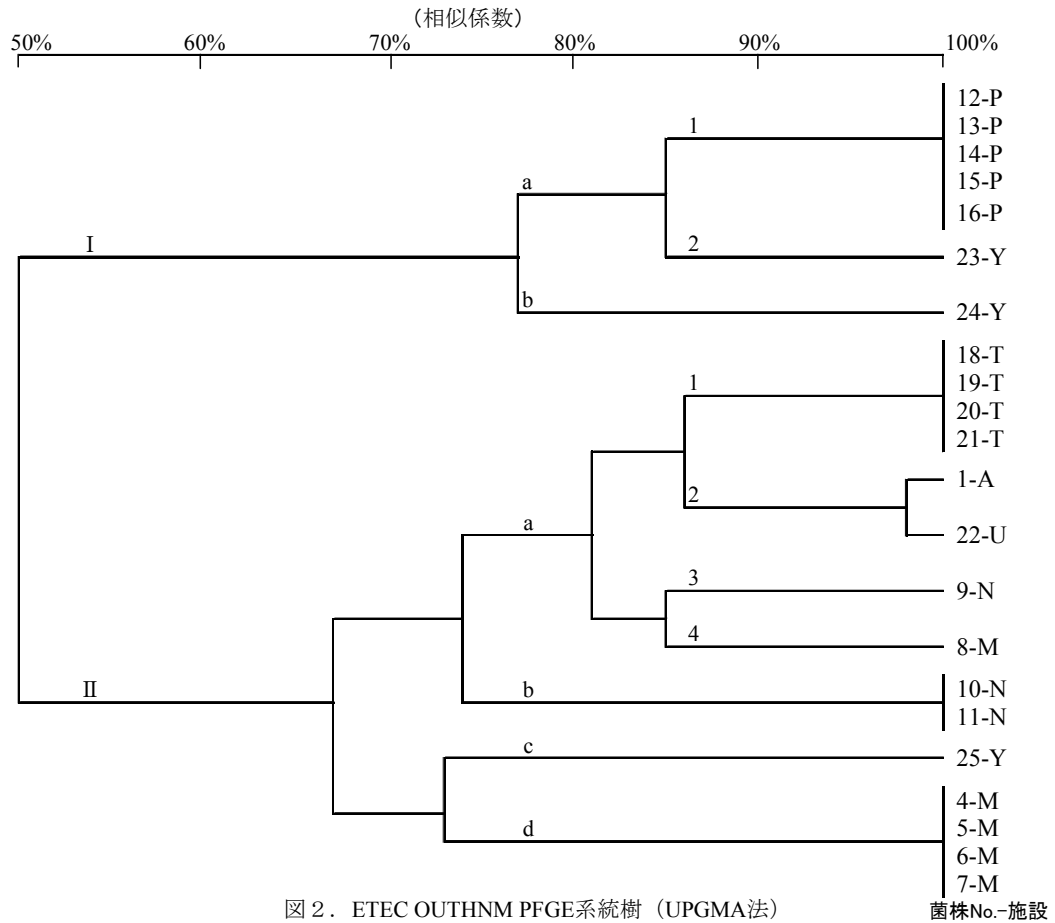


図1. ETEC菌株のPFGE型別 (制限酵素Xba- I)



謝 辞 本資料は、平成17年度東京都福祉保健局健康安全室環境衛生課が実施した動物由来感染症調査事業より得られたデータおよび動物愛護相談センターの協力により採取した検体から得られたデータに基づいています。検体採取にご協力いただきました動物監視員および動物保護相談センターの方々に深謝します。

文 献

- 1) A.A.SANCAK, H.C.RUTGERS, C,A,HART : *The Veterinary Record*, **24**, 101-105, 2004
- 2) Maryvonne Dho-Moulin, John Marris Fairbrother : *Vet.Res.*, **30**, 299-316,1999
- 3) Josias Rodrigues, Cristiane M.Thomazini, Carlos A. Lopes : *J. Clin. Micorbiol*, **42**, 1388-1389,2004
- 4) H.Schmid, H. Karch : *Med Microbiol Immunol*, **183**, 23-31, 1994
- 5) 塚本定三 : 感染症学雑誌, **70**(6), 569-573, 1996
- 6) 伊藤文明, 荻野武雄, 伊藤健一郎 他 : 日本臨床, **50**, 343-347, 1992
- 7) AKIKO ABE, HIROMI OBATA, SHIGERU MATSUSHIYA, *et al.* : *Zbl.Bakt*, **277**, 170-178,1992
- 8) D.R.POLLARD, W.M.JOHNSON, H.LIOR, *et al.* : *J. Clin. Microbiol*, **28**, 540-545,1990
- 9) S.D.TYLER, W.M.JOHNSON, H.LIOR, *et al.* : *J. Clin. Microbiol*, **29**, 1339-1343, 1991
- 10) Shinji Yamazaki, Zaw Lin, Hiromasa Shirai, *et al.* : *Microbiol Immunol*, **40**, 345-352, 1996
- 11) 河野喜美子, 山田亨, 八木利喬 : 感染症学雑誌, **72**, 1275-1278,1997