

資 料

大腸菌ベロ毒素の熱抵抗性

福田 伸治 山田 圭一 竹田 義弘 門田 達尚

Heat Stability of *Escherichia coli* Verotoxin

SHINJI FUKUDA, KEI-ICHI YAMADA, YOSHIHIRO TAKEDA and TATSUHISA MONDEN

(Received Sept. 29, 1995)

はじめに

Konowalchukら [1,2] は大腸菌の産生する易熱性毒素 (LT) および耐熱性毒素 (ST) 以外に, ベロ細胞に対し細胞毒性を示す毒素 (ベロ毒素, VT) を産生する大腸菌が存在することを報告した. その後1982年, アメリカでハンバーガーによる食中毒が発生し [3], ベロ毒素産生性大腸菌が注目されるようになった. わが国においては1990年, 埼玉県浦和市のS幼稚園で2名の幼児が死亡した事例 [4] を機に全国的に注目された. 広島県においても1994年, H保育園の園児にベロ毒素産生性大腸菌による下痢症が発生し, 溶血性尿毒症症候群を併発して1名が死亡する事件が発生した [5].

この下痢症の直接の原因となるVTは, 易熱性であることが認められているが [1,6,7], VTの熱抵抗性についての詳細な報告は見られない. 我々は加熱温度, 時間とベロ毒素の減衰との関係について検討したので報告する.

材 料

ベロ毒素産生性大腸菌血清型O157:H7 (保存株, VT1産生株), O111:H- (1992年外部精度管理用菌株, VT1&2産生株), O157:H7 (H保育園園児便分離株, VT2産生株) およびO136:H16 (食肉検査所分離株, VT1産生株) を用いた.

方 法

50mlのTrypticase Soy Broth (BBL) で37℃, 一夜振盪培養後, 遠心分離した上清を孔径0.2μmのフィルターでろ過した. そして, 2mlづつ試験管に分注し, 60, 70, 80, 90℃および沸騰水 (99℃) 中で, 10, 20および30分の加熱処理, オートクレーブ (121℃, 10分)

処理を行った. VT1産生株であるO157:H7については, さらに沸騰水中で40, 50および60分までの加熱処理を行った. 加熱処理したろ液および対照として用いた無加熱ろ液中のVT量は, 逆受身ラテックス凝集反応 (RPLA, デンカ生検) により測定した. VT量は, 検出感度を2ng/mlとして算出した.

結果および考察

ベロ毒素VT1およびVT2とも, オートクレーブ処理により完全に破壊 (<2ng/ml) され, 毒素活性を失うことが認められた.

ベロ毒素産生性大腸菌血清型O136:H16の産生するVT1は80℃, 10分以上の加熱処理で16ng/mlの毒素が完全に破壊された. 30分の加熱処理では温度の上昇に伴いほぼ直線的に減少する傾向を示した (図1). また, 血清型O111:H-の産生したVT1は, 80℃, 30分, 90℃, 10分以上の加熱処理で完全に破壊され, 70℃以上の加熱処理で急激な減少傾向を示した (図2). しかし, 血清型O157:H7の産生するVT1は70℃以上の加熱で急激な減少傾向を示したが, 沸騰水 (99℃), 30分の加熱処理でも, 512ng/mlの毒素が完全に不活化されず, 4ng/mlの毒素が残存した (図1). そのため, 煮沸水中で60分まで10分毎の毒素量の変化を検討したところ, VT1量は時間とともに減少し, 60分で完全に不活化された (図3).

血清型O157:H7の産生するVT2は80℃, 10分以上の加熱処理で512ng/mlの毒素が完全に不活化され, 70℃以上の加熱処理で急激な減少を示した (図4). また, 血清型O111:H-の産生するVT2は70℃の加熱処理を境に急激な減少を示し, 80℃, 10分以上の加熱処理で完全に不活化された (図2).

VTは, ①98℃, 15分の熱処理で破壊され, 65℃, 15分でVT量が半分に減少する [1], ②煮沸により2

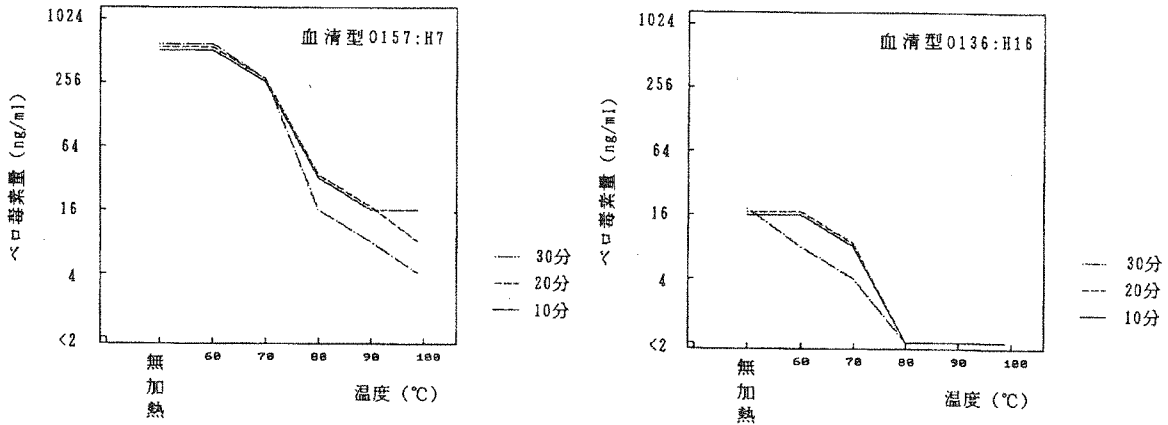


図1 VT1単独産生株におけるペロ毒素量と加熱温度および時間との関係

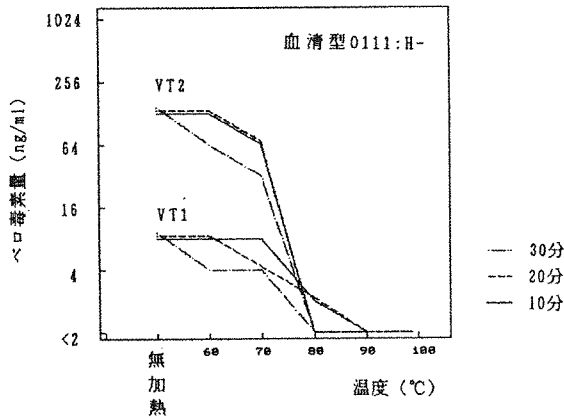


図2 VT1&2産生株におけるペロ毒素量と加熱温度および時間との関係

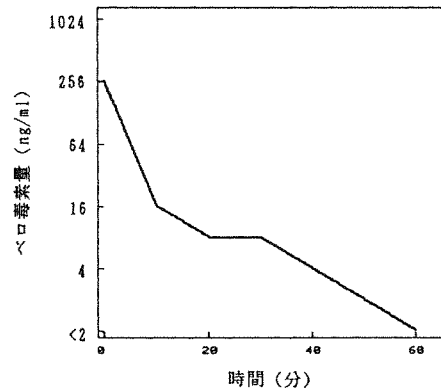


図3 *Escherichia coli* O157:H7の産生するVT1量と加熱時間との関係

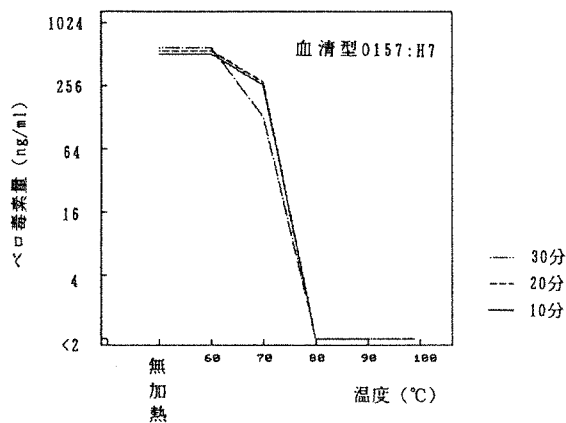


図4 VT2単独産生株におけるペロ毒素量と加熱温度および時間との関係

分で完全に不活化される [6], ③80°C, 10分で不活化される [7] ことが報告されている。我々の結果では, VT量は, 加熱時間および温度に比例して減少することが認められた。VT2は80°C, 10分以上の熱処理で完全に破壊されることが認められた。VT1については, 加熱処理前のVT1量にもよるが, 血清型O136:H16で80°C, 10分以上, 血清型O111:H-で90°C, 10分以上, 血清型O157:H7で60分以上と菌株による違いが見られ, VT2に比較して熱抵抗性が高いことが認められた。VT1は *Shigella dysenteriae* 1の産生する志賀毒素とほぼ同様の毒素で志賀毒素抗体により活性が不活化される。VT2はVT1と同様の生物活性を示すが, 志賀毒素抗体によって不活化されず, アミノ酸組成および理化学的性状も異なっている [8] ことから, 熱抵抗性についても差異が認められたものと考えられる。また, 毒素原性大腸菌の産生するLTは60°C, 10分の熱処理

で活性を失い、STは100℃、30分の加熱でもほとんど活性を失わない毒素である [9] が、熱抵抗性の面からみると、VTはLTとSTの中間に位置する毒素であることが認められた。

#### まとめ

ベロ毒素の熱抵抗性について検討し、以下の結果を得た。

- 1) VT1は80℃、10分以上で活性を失うものから、沸騰水中で60分以上の熱処理が必要なものなど、菌株による差異が認められた。
- 2) VT2は80℃、10分以上の熱処理で完全に活性を失うことが認められた。

#### 文献

- [1] Konowalchuk, J., Speirs, J. I. and Stavric, S. (1977) :Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18, 775-779.
- [2] Konowalchuk, J., Dickie, N., Stavric, S. and Speirs, J. I. (1978) : Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 22, 644-648.
- [3] Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L. (1983) :Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308, 681-685.
- [4] 城 宏輔 (1991) : 埼玉県某幼稚園で流行したE. coli O157:H7 による出血性大腸炎. *臨床と微生物*, 18, 457-465.
- [5] 恒松義明, 菊池和子, 福田伸治, 門田 達尚 (1995) : 保育園児に発生した腸管出血性大腸菌の検出事例. *広島県獣医学雑誌*, 投稿中.
- [6] O'Brien, A. D. and LaVeck, G. D. (1983) : Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 40, 675-683.
- [7] 伊藤 武 (1993) : ベロ毒素産生性大腸菌と食品衛生. *モダンメディア*, 39, 307-322.
- [8] 竹田美文, 山崎伸二 (1991) : 腸管出血性大腸菌とVero毒素. *臨床と微生物*, 18, 443-455.
- [9] 坂崎利一編 (1981) : 食中毒. p.148-191, 東京, 中央法規出版.

