

200501023A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全性高度化推進研究事業

ウシ由来腸管出血性大腸菌O157の  
食品汚染制御に関する研究

平成17年度 研究報告書

主任研究者 朝倉 宏  
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

## ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究

### 主任研究者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

### 協力研究者

山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長

牧野壮一 帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター 教授

川本恵子 帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター 助教授

中澤宗生 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 産業機構

動物衛生研究所 安全性研究部 ブーノース研究室 室長

大津総子 神戸市食肉衛生検査所 検査員

## 目次

### 1. 厚生労働科学研究費補助金 総括研究報告書

ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究……………1

### 2. 研究報告書

- (1) ウシ由来O157株における薬剤耐性の分布と伝達生に関する研究……………3
- (2) パルスフィールドゲル電気泳動法を用いたO157の遺伝学的型別……………9
- (3) 志賀毒素を指標としたウシ由来O157株の選択的検出法に関する研究……………14
- (4) O157及び*C. rodentium*におけるETI2保有状況に関する研究……………31

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)  
(総括研究報告書)

ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究  
主任研究者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

研究要旨

ヒトの腸管出血性大腸菌感染症は、主に糞便に汚染された食肉、未殺菌乳、野菜、水及びジュース等が原因となって引き起こされることから、家畜についての調査が進められ、ウシを中心とした様々な動物より多くの血清型が分離されている。実際にこうした調査により3割近いウシが EHEC を保持していることも報告されており、家畜等動物の中でも特にウシがヒトへの EHEC 感染に関与していると一般的には考えられている。ヒトと異なり、ウシは本菌に感染しても症状を呈さないため、健康保菌動物として、ヒトへの感染伝播を果たしているとは推察されているが、わが国においてウシより分離される O157 株の多くは Stx2 もしくは Stx2c 産生性であり、ヒト患者由来株における毒素型の割合とは大きく異なっている。このことは、ウシのみがヒトへの感染源であるとはいえないこと、そしてウシ由来 O157 株の全てがヒトに感染性を有するかについても明らかな証拠はないことを示している。本研究では、わが国において食肉汚染を引き起こす O157 の分布を把握し、その遺伝学的特徴をターゲットとして、ヒト由来株と比較することで、ウシの保有する O157 の全てが果たしてヒトに感染性を有し、発病へといたるかについて明らかにすることを目的とした。2004 年度に食肉検査の段階でウシより分離された O157 株について、薬剤耐性株の分布ならびに耐性伝達性についての検討を行い、いずれも伝達性 R-plasmid により伝達されることを明らかにするとともに、ある農場では R-plasmid 依存性の薬剤耐性遺伝子が常在していることが推察された。

また、多検体のウシ由来株をヒト由来株とパルスフィールドゲル電気泳動パターンによる系統解析を行い、比較したが、本法では由来による分別はされなかった。一方で、前年度の毒素産生についての多様性を示唆するデータから、本年度は Stx2 を検出で

きる ELISA 系を構築し、毒素産生性を定量的にモニタリングしたところ、ウシ由来株では *stx2c* 保有株は *stx2* 保有株に比べて相対的に低い Stx2 産生量を示したが、菌株間に大きな差異を認めた。これは、*q* 遺伝子の保有状況と高い相関性を示したが、低産生性株も 30% では本遺伝子の保有を認めたため、その機能性との関連性を検討した。実際に、リアルタイム RT-PCR 法により、当該遺伝子の転写活性を検出したところ、毒素産生性と極めて高い相関性を示した。一方で、毒素遺伝子の発現は、毒素産生性と一致しておらず、*q* 遺伝子の発現解析は毒素産生性を知る指標となりうることが推察された。

更に、病原性に関連している可能性のある、3 型分泌機構 (ETT2) の保有状況について、O157 を含めた EHEC の病態モデルとして想定される *Citrobacter rodentium* を対象に加えて、検討を行った。本領域は、*C. rodentium* には認められなかったが、EHEC O157 ではほぼ共通に保有が認められた。

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

「ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究」

(1) ウシ由来 O157 株における薬剤耐性の分布と伝達性に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏

#### 研究要旨

ウシより分離された O157 計 45 株について、薬剤感受性試験を行ったところ、計 3 株 (6.7%) でアンピシリンおよびストレプトマイシン耐性を示した。これらの薬剤耐性は接合伝達試験により、プラスミドと共に伝達されたことから、これら薬剤耐性遺伝子は R-プラスミド上に位置すると推察された。また、このうちの 1 株は、pO157 の伝達によって認められたことから、同遺伝子は pO157 プラスミド上に座位していると考えられた。

協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所 山本茂貴  
神戸市食肉衛生検査所 大津総子

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 はウシやヒトあるいは河川など、我々の生活環境より広範に検出される。本感染症は、汚染された食品を介して生じることが多く、その予防には食品における汚染リスクの評価が重要と考えられている。

一方で、感染症の治療に当たっては、未だに抗生物質療法に頼るところが大きいが、薬剤耐性獲得機構の多様化から、近年では多剤耐性結核菌やバンコマイシン耐性腸球菌など多くの難問を抱えており、O157においても、こうした薬剤耐性菌の獲得はしばしば治療を妨げる因子となるのみならず、ヒトからヒトへの耐性菌の伝播も危惧されることから、その解析ならびに防除が必要とされている。

本研究では、ウシより分離された O157 株における薬剤耐性菌の分布を明らかにすると共に、それらの伝達性に関する検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 菌株ならびに培地

本研究には、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 血清型 O157 に属するウシ由来 45 株を供した。これら分離株の血清型の確認は、市販抗血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応により行った。また、毒素型別については、前年度用いた毒素遺伝子型

別用プライマーセットを用いた PCR 法により行った。

### 2. 抗菌性試験

ディスク法により、抗菌性物質に対する感受性試験を行った。薬剤としては、ホスホマイシン (50 µg, 以下単位略), オキシテトラサイクリン (30), シプロフロキサシン (5), ノルフロキサシン (10), オフロキサシン (5), セファゾリン (5), クロラムフェニコール (30), ストレプトマイシン (10), ゲンタマイシン (10), アンピシリン (10), カナマイシン (30), ナリジクス酸 (30) を用い、Mueller-Hinton 培地上での阻止円を観察し、定法に従って判定した。

### 3. 接合伝達試験

ウシ由来 O157 菌株 #6, 21, 42 を供与菌、予めリファンピシンマーカーを付与した *E. coli* C600 *recA* 株を受容菌として、10:1 の割合で一夜培養菌液を L-broth 10ml に接種し、37°C で 6 時間静置した。

Transconjugants は、100-200 µl の培養菌液をリファンピシン (50 mg/ml) 及びアンピシリン (100 mg/ml) 添加 LN 寒天培地上で選択し、少なくとも 5 コロニーを釣菌して、プラスミド伝達の有無を確認した。

### 4. Plasmid 精製

Kado-Liu らの方法に従い、Plasmid DNA を抽出した。一夜培養菌液 1.5ml をマイクロチューブにとり、遠心により集菌した後、バ

ッファーA (40mM Tris-Acetic acid, 2 mM EDTA (pH7.4)) 100 $\mu$ lで懸濁した。バッファ一B (3 % (w/v) SDS, 0.6 % Tris, pH12.6) 200 $\mu$ lを加え、55 $^{\circ}$ Cで30分間溶菌させた。バッファ一C (Phenol:Chloroform: Isoamylalcohol =25:24:1) 600  $\mu$ lを加えて、穏やかに転倒混和し、15,000 rpmで5分間遠心した後、下層を除去し、更に遠心後、上層 10 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色により、プラスミドDNAを検出した。

## C. 研究結果

### 1. 抗菌性試験

抗菌性試験の結果、計45株のウシ由来O157のうち、3株(#6, 21, 42)でABPCならびにSMに対する明らかな耐性を示した(表1)。このうち、2株(#21, 42)は同一の農場より搬出されたウシより分離された株であったことから、伝達性の薬剤耐性機構が介在していると推察された。

### 2. 接合伝達性プラスミドによるアンピシリンおよびストレプトマイシン耐性の付与

実際に、*E. coli* C600recA-Rif株への接合伝達試験により、これらはいずれも薬剤耐性を付与し、#6については、約kb、#21および#42では約kbのプラスミドが伝達されたことが明らかとなり(図1)、これらがR-plasmidとして薬剤耐性の伝達を生じたと考えられた。

## D. 考察

腸管出血性大腸菌における薬剤耐性機構の分布は広範にわたり、インテグロンやR-plasmidを介した伝播経路がこうした耐性遺伝子の伝播を促していると考えられている。本研究では、ABPCおよびSM耐性を示す3株のO157について、耐性伝達機構に着目し、R-plasmid依存性の伝達によることを明らかにした。クラスIインテグロン遺伝子はいずれの耐性株からも検出されなかった(データ未載)が、plasmid pO157は病原性プラスミドとして多数の機能遺伝子を有していることが明らかとなっている。従って、O157株間における伝播は、病原性の多様化を招く可能性を示唆しているといえよう。

## E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

- (1) ウシ由来O157計45株について、薬剤感受性試験を行ったところ、3株でアンピシリンおよびストレプトマイシン耐性を認めた。
- (2) これらの薬剤耐性はR-plasmidによる伝達性を有していることを接合伝達試験により明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし



## G. 研究発表

1) 大津(南川)総子, 下川英子, 高田信子, 小林典章, 宅見雄志, 松田守弘, 高尾稔治, 朝倉宏. 神戸市立食肉センターに搬入された牛からの腸管出血性大腸菌 O157 検出状況およびその分子疫学的検討. 全国食肉衛生検査員技術協議会. 2006 年 2 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

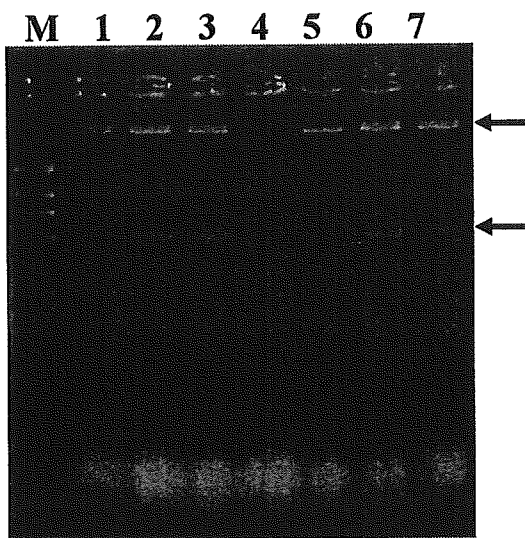


図1. R-plasmidの接合伝達  
矢印は伝達されたPlasmid DNAを示している。

表1. ウシ由来O157株における薬剤感受性試験

薬剤略号	FF	OTC	CIP	NOR	OFX	CZ	CP	SM	GM	AP	KM	NA
薬剤名(ug)	ホスホマイシン(40)	オキシテトラサイクリン(40)	シプロフロキサシン(40)	ノルフロキサシン(10)	オフロキサシン(6)	セフゾリン(40)	クロラムフェニコール(40)	ストレプトマイシン(10)	ゲンタマイシン(10)	アンピシリン(10)	カナマイシン(40)	ナリジクス(30)
菌株No.1								I				
2								I				
3												
4												
5								I				
6								R		R		
7												
8												
9												
10								I				
11								I				
12								I				
13												
14												
15												
16												
17												
18								I				
19												
20												
21								R		R		
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34								I				
35												
36								I				
37		I						I				
38								I				
39												
40												
41												
42								R		R		
43												
44												
45		I										

まとめ:耐性株数(%)

薬剤名	FF	OTC	CIP	NOR	OFX	CZ	CP	SM	GM	AP	KM	NA
耐性(R)								4(8.9%)		3(6.7%)		
中間(I)		2(4.4%)						11(24.4%)				
感受性(S)	45	43(95.6%)	45	45	45	45	45	30(66.7%)	45	42(93.3%)	45	45

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)  
「ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究」

(2) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた腸管  
出血性大腸菌 O157 の遺伝学的型別

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏

研究要旨

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析手法として広く用いられている。ウシなどの動物、環境、あるいはヒトなど、本菌の分布は多様であることから、本菌の疫学的関連性を検証する上で有用である。本研究では、ウシ・ヒトより分離された EHEC O157 株について、PFGE 法による型別を実施した。分離由来による型別の可能性も考えられたが、本法でこれらを分別することはできなかった。また、毒素産生性との関連性についても併せて考察したが、毒素産生性との検証も不可能であった。PFGE 法は食中毒感染事例における分離菌株の一致を判断する上では有用であるが、分離株の由来あるいは毒素産生性といった特徴を比較する手段とはなりえないことが明らかとなった。

協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所  
(独) 動物衛生研究所

五十君静信  
中澤宗生

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 症は、食品を介して感染する事例が多いことから、原因食品の特定、あるいは患者の分布を調べるための手法として、パルスフィールドゲル (PFGE) 法が現在広く用いられている。本法は、DNA 相同性を指標としていることから、O157 菌株間における多様性を調べる上でも有用と考えられる。

本研究では、ウシより分離された O157 菌株とヒト臨床由来株について、PFGE 法による系統解析を行い、由来あるいは表現形質としての毒素産生性に基づく菌株の分別が可能となるか検証した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

本研究には、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 血清型 O157 に属するウシ由来 (129 株)、食肉由来株 (36 株)、ヒト由来株 (66 株、うち食中毒事例由来 (3 事例) より計 12 株含) を供した (表1)。

### 2. PFGE

#### 1) 溶菌・プラグの作成

トリプトソイ寒天培地上で一夜培養したコロニーをかきとり、2-3ml の TE バッファー (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0) に懸濁し、OD<sub>610</sub>=1.2-1.4 に調整した。

調整懸濁菌液 100 $\mu$ l に対し、Lysozyme および Proteinase K を最終濃度 1 mg/ml とな

るように加え、ゆっくりとピペッティングで混和する。37 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した後、予め 55 $^{\circ}$ C に保温した 1% 低融点アガロース 140 $\mu$ l および 20% SDS 溶液 7 $\mu$ l を加え、速やかにプラグモールドに注入する。室温にて固形化させ、1.5ml の ESP バッファー (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium lauryl sarcosine; 1 mg of proteinase K/ml) 中に移して、55 $^{\circ}$ C で 2 時間保温した。

#### 2) 制限酵素反応

8-10ml の 50 $^{\circ}$ C 加温済 T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> バッファー (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) で 4 回洗浄した後、50 Units の *Xba*I で制限酵素反応を行った (37 $^{\circ}$ C, 3.5 h)。

#### 3) 電気泳動

サンプルは 1.0% アガロースゲルに包埋し、0.5x TBE バッファー中で電気泳動を行った。泳動プログラムは CHEF-MAPPER (Bio-Rad Laboratories) を用いて、以下の条件に従い検討した。

Initial/final switch times=2.16s and 35.07s

Angle, 120 $^{\circ}$ ; gradient, 6.0 V/cm

Temperature, 14 $^{\circ}$ C

Ramping factor, linear.

Running times: 22 h

#### 4) 画像の取り込み及び系統解析

SYBRGREEN I で染色後、Fx-Imager (Bio-Rad Laboratories) を用いて画像を取り

込んだ。画像は Tiff-image で保存後、FingerPrinting II (Bio-Rad Laboratories)を用いてバンドパターンの比較を行い、UPGMA 法に基づき、系統樹を作成した。

## C. 研究結果

### 1. PFGE 系統解析

PFGE パターンによる系統解析の結果、計 XX の O157 株は % 以内の相同性を示した。また、毒素型別あるいは由来による分類が行えるか検証した結果を以下に記す。

#### i) 由来による比較

ウシ由来株は XX つのクラスターに分類され、菌株間の

#### ii) Stx2 産生性との比較

## D. 考察

PFGE による系統解析は、食中毒が発生した際の原因食品の特定、あるいは同一集団感染事例であることを明らかにする上で、患者分離株の相同性を明らかにする上で有用な疫学ツールとして汎用されている。実際に、本手法により多くの原因食品の特定あるいは集団食中毒事例について明らかにされた部分も多い。一方で、O157 菌株間における多様性については推測はされてきたものの、PFGE によりこれを明らかにするといった方向性での検討はなされてこなかった。

本研究における多様な PFGE パターン

の結果は、O157 菌株間における多様性を示唆している。しかしながら、ウシ由来株におけるヒトへの感染リスクの高い菌株の選択的検出は本法では明らかにすることができないということも判明し、その他の疫学手法による検討を行う必要性が考えられた。こうした検討は現在進行中であり、ある領域をターゲットとした PCR-RFLP による解析手法により一定の成果が見込まれているところである。

## E. 結論

本研究では、以下の結論を得た。

1) PFGE パターンによる系統解析の結果、ウシ由来 O157 はヒト由来株と明らかな分類はされなかった。

2) 菌株間の毒素産生性についても同様に、PFGE 法では分別されなかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

学会発表

1) 朝倉宏、藤田美幸、秋山奈美、牧野壮一、倉園久夫、中澤宗生、山本茂貴、五十君静信. 志賀毒素 (Stx) 産生を指標としたウシ腸管出血性大腸菌 O157 の検出法に関する研究. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月. 茨城県つくば市.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 引用文献

1. Asakura H., Makino S., Kobori H., Watarai M., Shirahata T., Ikeda T., and Takeshi K. 2001. Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (Stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals. *Epidemiol Infect.* 127: 27-36.

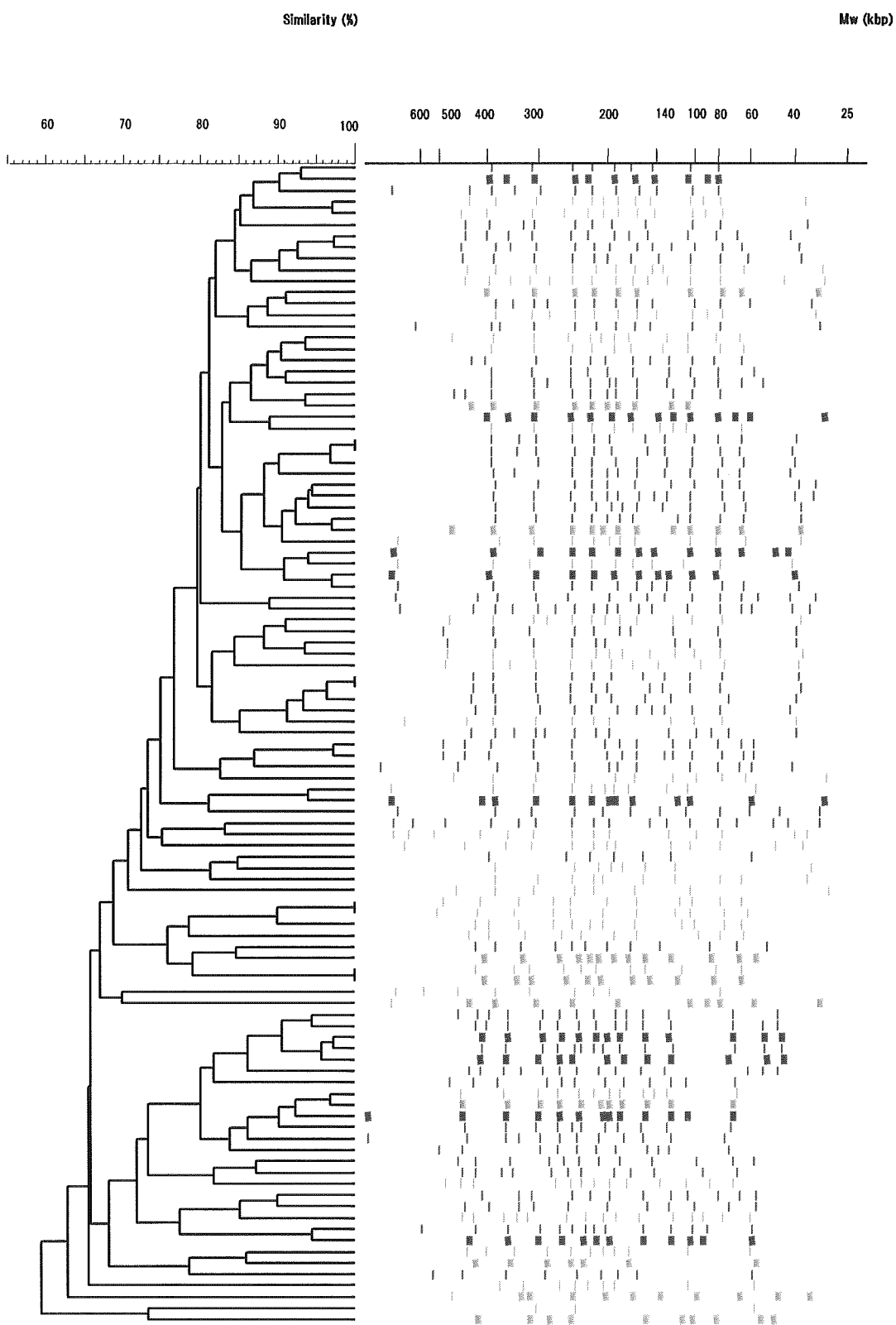


図1 Stx2 (+) O157 菌株における PFGE パターン

ウシ及びヒト由来株におけるPFGEパターンをそれぞれ赤及び青で表示した。またVTEC-RPLAにおいて1:64以上のStx2活性を示した菌株については太線で表示した。



厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

「ウシ由来腸管出血性大腸菌 O157 の食品汚染制御に関する研究」

(3) 志賀毒素を指標としたウシ由来 O157 株の選択的検出法に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 朝倉宏

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 はウシ等の家畜から多数分離されているが、それらがどの程度、ヒトへの感染源となっているかについては明らかではない。前年度の研究においては、ウシ由来株とヒト由来株の間で毒素型が大きく異なること、そして市販キットを用いた半定量的(定性的)な志賀毒素(Stx)産生の違いを認めたことから、本研究では、これを定量的に解析することとした。

ウシ由来株のうち、*stx2* および *stx2c* 保有株における毒素産生量は、ヒト由来株に比べて相対的に低かった。更に、この値と *q* 遺伝子の保有状況とは相関性を認めたが、一部の Stx2 低産生性の株においても同遺伝子を認めたことから、毒素産生性のリスクを考える上で本遺伝子検出は十分ではないと考えられた。このことは、*q* 遺伝子の定量的 mRNA 検出により、解決された。すなわち、毒素産生性と *q* 遺伝子の mRNA レベルは極めて高い相関性を示し、本遺伝子の mRNA 定量検出法により、毒素産生性を判断し、ひいては菌株の病原性の強弱を示すことが可能になると考えられた。

協力研究者

帯広畜産大学  
大阪府立大学

牧野壮一  
倉園久夫

## A. 研究目的

EHEC感染症は、主に糞便に汚染された食肉、未殺菌乳、野菜、水およびジュース等を介して引き起こされる。ウシを中心とした家畜は多くの血清型のEHECを保有しているため、重要な感染源の一つとして目されている。一方で、ウシはヒトとは異なり、本菌に感染しても症状を呈さないため、健康保菌動物として、ヒトへの感染伝播を果たしていると推察されている。家畜を中心とした各種動物がヒトへのSTEC感染に関与していることは確かであろうが、前年度に報告したとおり、ウシより分離されるO157菌株の多くはStx2c産生性であり、下痢などの症状を呈したヒト患者由来株の毒素型の分布とは明らかに異なっている。このことは、ウシ由来株の保有するO157株の全てがヒトの感染源とはなりえないことを示唆している。

O157以外の血清型に属するEHEC株の毒素産生性については詳細に検討されており、ウシ由来EHEC株の中にはヒト由来株、特にHUSを発症した患者由来EHEC株に比べ、有意に低い値を示す株が多数存在している。このことは、ウシの保有するO157の多様性を物語っており、ウシからのO157汚染拡大を予防する意味からも、本菌の制御をどのように行うべきかという食品衛生へ疫学的な見地から科学的根拠を確立する必要があるといえる。

本研究ではウシより分離されたO157菌

株について、ヒト由来株と毒素産生性の比較を定量的に行うべく、Stx2に対する高感度ELISA系を構築した。更に、毒素遺伝子の発現に関与する関連因子として、*q*遺伝子の発現解析をおこない、毒素産生性との相関性について検証を行った。これにより、最も主要な病原因子である志賀毒素の定量を行い得る、検出評価系の有用性を基礎資料として作成した。

## B. 研究方法

### 1. 菌株ならびに培地

本研究には、志賀毒素産生性大腸菌(STEC)血清型O157に属するウシ由来56株、ヒト由来20株を供した。これら分離株の血清型の確認は、市販抗血清(デンカ生研)を用いたスライド凝集反応により必要に応じて行った。

### 2. 培養条件

分離菌株におけるStx2の定量性試験は、マイトマイシンCを用いたRitchieらの方法<sup>20)</sup>に準じて行った。L-broth一夜培養液をL-broth 10 ml中でOD<sub>600</sub>=0.6となるまで培養した。最終濃度200 ng/mlとなるようにマイトマイシンC(和光純薬)を添加し、37°Cにて3時間振とう培養した後、超音波処理を行い、上清をStx2検出用試料とした。

3. RNA精製、ならびに純度・濃度測定  
前述の試料からのRNA抽出・精製にはRiboPure Bacteria RNA Isolation kit

(Ambion) を用いた。

また、RNA サンプルの純度ならびに濃度は、Agilent Bioanalyser S2100 を用いて検証した。

#### 4. Stx 産生性の定量的モニタリング

##### 1) Stx2 毒素の精製:

6 liter の L-broth 一夜培養液より、遠心により菌体を回収し、ポリミキシン B(6000U/ml) 含 PBS 中に懸濁後、超音波処理により菌体を破碎した。硫酸沈殿後、ペレットを 50mM Tris-HCl (pH8.6) 50ml に懸濁し、透析した。DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにかけ、0-0.5M の NaCl 濃度勾配で溶出を行い、液を回収し、各フラクションについてオクタロニー試験により抗原スクリーニングを行った。濃縮には Amicon YM-10 を用い、更に HPLC 精製を行った後、SDS-PAGE 中で A,B-subunit を確認し、Bradford 法により蛋白濃度を測定した。

##### 2) ウサギ抗 Stx2IgG 抗体の作成:

上述の Stx2 毒素を日本白色ウサギに静脈内接種し、計 3 回のブースターを実施した 4 ヶ月後に、全血を回収し、血清分画を HPLC 精製し、毒素に対する反応性をオクタロニーにより評価した。

##### 3) HP-conjugates 作成:

上述の抗 Stx2IgG 抗体より Fab' Fragment を単離し、maleimide 法により horseradish peroxidase コンジュゲ

トを作成した。

#### 4) ELISA 測定:

100  $\mu$ l の抗 Stx2 IgG 抗体(10 $\mu$ g/ml)を Microtiter plate に加え、4C で一夜静置した。PBS で 3 回洗浄した後、100 $\mu$ l を加え、室温で 1 時間ブロッキング反応を行った。PBS で洗浄後、精製 Stx2 毒素および O157 供試株由来調整検体 100 $\mu$ l を加え、4C で一夜保存した。洗浄後、HP-conjugates 溶液 100  $\mu$ l と 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、TMBZ60  $\mu$ l を加えて、30 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。呈色には H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用い、2.0M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止させた後、450nm における吸光度を測定し、精製毒素のデータから作成した検量線に従い、毒素量を算出した。

#### 5. Real-Time RT-PCR

##### 1) プライマーデザイン:

*stx2*、*stx2c* 配列、および両遺伝子の上流に位置する *Q* 遺伝子配列は、NCBI accession No. NC\_003525 及び AJ605767 より入手し、PrimerExpress ver, 3.0 (Applied Biosystems) を用いてプライマーの作成を行った。反応の内部標準コントロールには *icdA* 遺伝子を用いた。

##### 2) SYBR-Green による検出:

前述の RNA を検体として、100ng/5 $\mu$ l に濃度調整後、プライマー溶液(各 10 pmol, 表 XX) 2  $\mu$ l, 2 $\times$ One Step RT-PCR Buffer 25

μl, TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl) 1 μl, MMLV RTase (RNase H free) (200 U/μl) 0.5 μl, RNase Inhibitor (40 U/μl) 1 μl, RNase Free dH<sub>2</sub>O 14.5 μl, ROX Reference Dye (50×) 1 μl を加え、計 50μl の反応液を調整した。これを ABI PRISM 7000 にセットし、以下の温度条件で逆転写ならびに増幅反応を 1 step で実施した。

42°C, 15min	(1 cycle)
95°C, 2min.	(1 cycle)
95°C, 5sec.	(40 cycles)
60°C, 31sec.	
95°C, 15sec.	(1 cycle)
60°C, 1 min	
95°C, 15sec.	

プライマーセット毎に、得られた標準曲線に対して、サンプルの Ct 値を Plot し、RNA 活性を求めた。また、*Q* および *stx2* 遺伝子の定量については、いずれも *icdA* 値に対する相対値として表示した。

### C. 研究結果

前年度はラテックス凝集反応により、ウシならびにヒト由来代表株の Stx2 産生について検討し、ウシ由来および食肉由来株では、1:0~1:128 と多様な分布を示したことを報告した。すなわち、ヒト集団食中毒由来株はいずれも 1:128 以上の力価を示していたのに対し、ヒト散发事例由来株は、ウシ由来株と同様にその産生は一定ではなく、不均一

ながらも相対的に低値に集中した分布を示していた。

本年度は、これを定量的に比較するため、ウシ由来 56 株およびヒト由来 20 株について、マイトマイシンによりファージ誘導を行い、Stx2 産生量を検証した。その定量は、抗 Stx2 抗体を用いた ELISA 系により行った。Stx2 の精製はアフィニティークロマトグラフィーを用い(図 1)、得られた溶出液についてゲル内沈降反応により特異的抗原性を有することを確認した(図 2)。更に、SDS-PAGE により、A, B 両サブユニットを確認した(図 3)後、これをウサギに免疫し、抗 Stx2 抗体を用いて、精製 Stx2 毒素に対する反応を Chromometric ELISA により検討した。図 4 に示したとおり、精製毒素に対する応答性は定量性を担保しており、本法を用いて供試菌株の Stx2 産生性を評価した。その一例を図 5 に示す。赤枠および青枠で囲った株間で認められるように、Stx2 産生性は菌株間で大きく異なっていることが明らかとなった。精製毒素を Standard として作成した検量線をもとに、各供試株の吸光度を Plot したところ、表 1 のような結果を得た。更に、ウシ由来株において *q* 遺伝子の保有状況と毒素産生値との相関性を検討したところ、明らかな相関性を示し、毒素値が 10ng/ml 以上の菌株はいずれも *q* 遺伝子を保有していた(表 2)。一方で、1ng/ml 以下の菌株でも一部は同遺伝子を保有してい