

200501023B

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16～17年度 総合研究報告書

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

平成18(2006)年

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

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 ブーノーシス研究室 室長

森元賢典 神戸市食肉衛生検査所 所長

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 総合研究報告書	1
2. 平成16年度 厚生労働科学研究費補助金事業実績研究報告書	
(1) 食肉衛生検査における O157 の検出と分子疫学的検討	5
(2) ウシ及びヒト由来 O157 株における病原遺伝子の保有状況ならびに 志賀毒素産生とファージ関連遺伝子との相関性について	15
(3) ウシ由来 O157 株における ETT2 遺伝子領域の分布	31
3. 平成17年度 厚生労働科学研究費補助金事業実績研究報告書	
(1) ウシ由来 O157 株における薬剤耐性の分布と伝達性に関する研究	37
(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	42
(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	47
(4) O157 及び <i>C. rodentium</i> における ETT2 保有状況に関する研究	64

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)
(総合研究報告書)

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 食品衛生管理部 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つ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考えられているが、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。まず、食肉汚染の実態を明らかにするため、食肉検査段階におけるウシの O157 保菌状況を明らかにし、PFGE を用いた疫学解析により、同一の菌株の複数汚染を見出し、食肉処理工程中における二次汚染の可能性を示唆した。更に薬剤耐性菌の分布ならびに耐性伝達性についての検討を行い、特定の飼育現場において薬剤耐性 O157 が常在している実態を考察した。

また、多検体のウシ由来株とヒト由来株を PFGE 解析により比較したが、本法では由来による分別はされなかった。本菌の最も主要な病原因子である志賀毒素の産生性については、多様性を示唆するデータを得ることができた。これを定量的にモニタリングすることで、ウシの保菌する O157 の一部のみがヒト由来株と同等の高い毒素産生性を示すことを明らかにした。更に、志賀毒素の産生性は *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。*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を推察され、O157 における病原性の強弱を迅速に捉える遺伝学的手法として有用と考えられた。

加えて、O157 の病原性を評価する動物モデル系は志賀毒素産生性に因る毒性評価にとどまることが多いが、代替菌種として有用と考えられている *Citrobacter rodentium* の病原遺伝子群の保有に関して同様であるか、O157 で新たに発見された、3 型分泌機構 (ETT2) を対象として検討を行ったが、本遺伝子領域は、*C. rodentium* には認められず、EHEC O157 ではほぼ共通に保有が認められたことから、両菌種は異なる宿主応答を引き起こすことが推察された。

協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所・部長	山本茂貴
国立医薬品食品衛生研究所・室長	五十君静信
帯広畜産大学・教授	牧野壮一
帯広畜産大学・助教授	川本恵子
動物衛生研究所・室長	中澤宗生
神戸市食肉衛生検査所・所長	森元賢典
神戸市食肉衛生検査所・検査員	大津(南川)総子

A. 研究目的

ヒトの腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 症は、96 年に全国的な流行を呈した後もその発生は絶えず、食肉製品を原因とした事例も依然として多い。食肉となる家畜の腸管内容から本菌は高頻度に検出されるが、分離株のすべてがヒトの感染源となっ

ているのかは未だ不明であり、その実態を把握することは、ヒトの O157 症との関連性をより明らかにすることから、食品のリスク評価を行う上で極めて重要である。ウシ等の家畜は高頻度に EHEC O157 を保有していることから、最も重要なヒトへの感染源として広く認識されている。また、近年の疫学

研究の成果として、確かに家畜は O157 を高頻度に保有しているが、これらの全てが病原性を持つのではなく、ヒトに感染して発症させるのはそのうちの一部に限られているかもしれないという新たな知見が得られている。本研究では、ウシが保菌している EHEC O157 の中でヒトに対して病原性を有する菌株がどの程度存在しているのか明らかにし、重点を置くべき制御箇所の設定を行うことでその対策を講じ、最終的にはヒトの O157 症の予防につながる科学的根拠を提供する。本研究の遂行により、家畜からの EHEC O157 に対する食品汚染状況の解明および集中的制御から、ヒトの O157 症に対する効率的な予防効果が期待される。

A. 研究方法

本研究では、まずウシに由来する O157 症の発生を鑑み、食肉処理段階におけるウシの O157 汚染実態を明らかにするため、計 301 頭のウシの糞便検査を実施した。同時に食肉処理工程における O157 の汚染頻度を検証するため、内臓肉についても併せて検査を実施し、ウシが保有する O157 の食肉への汚染頻度を検証するとともに、汚染経路ならびに汚染拡大の防除法について考察した。

更に、本研究事業ではウシ・食肉・ヒト臨床由来 O157 株を収集し、これらの疫学的関連性について、主要病原遺伝子の保有状況、志賀毒素型別、ならびに PFGE 法を用いて検討した。

また、本菌の主要な病原因子である志賀毒素について、産生量を定量的にモニタリングするため、抗原精製、抗体の作成ならびに ELISA 系の構築を行い、ウシ由来 O157 株のヒトへの感染源となるリスクについて検証した。加えて、毒素産生性の指標となる遺伝学的検査法を確立するため、毒素近傍遺伝子の保有状況を PCR 法により検討するとともに、それらの発現状況をリアルタイム RT-PCR 法により、検討した。

本菌の病原性を評価するもう一つの手立てとして、本研究事業では、近年新たに見出された *E. coli* Type III secretion system 2

(ETT2)を対象に、その保有状況ならびに、DNA 相同性の探索をサザンブロット法により行い、一部の塩基配列を決定した。また、*Citrobacter rodentium* における同配列の検出を試み、本菌の代替的動物感染モデルとしての有用性を検討した。

B. 研究結果

食肉処理段階における汚染実態を調査した結果、計 481 検体(直腸内容 301 検体、肝臓ふきとり 60 検体、舌ふきとり 60 検体、第三胃ふきとり 60 検体)のうち、直腸内容 10.3%(31/301)、ふきとり検査では肝臓 1.7%(1/60)、舌表面 6.7%(4/60)、第三胃 5.0%(3/60)の頻度で O157 が検出された。O157 陽性検体のうち、最終的に分離された菌株はいずれも血清型 O157:H7 であり、毒素遺伝子型は 92.3%が *stx2c* であった。PFGE 解析により、同一日に処理されたウシ由来である 5 株が同一のパターンを示していたが、このうち 3 株は同一農場のウシ由来であり、残り 2 株が検出されたウシもそれらと連続処理されていたことから、交差汚染したものと推察された。O157 の食肉汚染には農場における保菌のみならず、処理工程中の二次汚染も重要な汚染要因として考察された。

ウシ・食肉・ヒト由来 O157 株の比較分析を DNA レベルで行った結果として、主要病原遺伝子 (*EhlyA*, *eaeA*, *espA*, *katP*) の保有状況については由来による差異を認めなかった。また、志賀毒素型については、ウシ由来株では *stx2c* 保有株が 69.8%と、ヒト由来株(30.3%)に比べ、有意に高い割合を示した。しかしながら、これらは PFGE 解析による検討の結果、系統的に分別されなかった。

これらを明らかにする上で、病原因子を特定する必要があったが、その中でも最も主要な病原因子である志賀毒素に焦点を絞り、検討を行った。市販検出キットの評価を行うとともに、本研究事業で作成した抗 Stx2 抗体を用いた ELISA 系により、その定量的評価を実施した。その結果、ウシ由来株においては多くが 10ng/ml 以

下の値を示したが、ヒト由来株では約 50%が当該産生量以上の値を示した。一方で一部のウシ由来株はヒト由来株と同等もしくはそれ以上の毒素産生性を示し、これらがヒトに感染した場合には、発症する可能性が極めて高いことが推察された。

C. 考察

わが国において、ウシに関連する O157 症は発生してものの、その具体的規模や割合についての詳細な疫学的データは、未だ十分でなく、推測の域を出ない。本研究では、ウシに由来する O157 の食肉汚染実態を明らかにするとともに、処理工程における衛生管理の徹底により、防除できることを、工程を洗い直すことで、明らかにした。

更に毒素型別などの偏在性からウシ由来株の一部のみがヒトへの感染源となりうることを示し、中でも毒素産生性を定量的に比較することで、より留意すべき一群が局在することを明らかにした。しかしながら、こうした検討を食品検査段階に取り入れることは極めて困難であることから、特定の遺伝子をターゲットとした定量的検出を作成して、判断手法として有用であることを実証した。これらの成果は、ウシのみならず、環境を広く汚染している O157 に対して、ヒトへの感染・発症リスクの高い一群の迅速特定へと結びつき、ひいては食品の安全性を確保する手段となりうると考えられる。

D. 結論

本研究事業における結論は以下の通りである。

- 1) ウシに起因する O157 の食肉汚染頻度を明らかにし、食肉処理工程における衛生管理の不徹底も重要な汚染原因となることを示した。
- 2) ウシ・食肉・ヒト由来 O157 菌株間の DNA 相同性を、主要病原遺伝子の検出および PFGE 型別によって検討したが、各由来株間に有意な差異は認められなかった。
- 3) 志賀毒素型別の分布によると、ウシ由来株では *stx2c* 保有株がヒト由来株に比べて

有意に高く、それらの多くは低い毒素産生性を示したことから、ヒトへの感染源となる可能性は低いと考えられた。

- 4) 一方で、毒素産生性の高い一群を迅速に捕捉する手段として、*q* 遺伝子をターゲットとした遺伝学的検出法を検討し、有用性を実証した。

E. 研究発表

論文発表

- 1: Asakura H, Igimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S. (2005) Role of in vivo passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses. FEMS Microbiol Lett. 253: 243-9.
- 2: Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H, Makino S. (2006) Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. Int J Food Microbiol. 106: 241-7.
- 3: Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. (2004) Isolation of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg sensitive to NaCl-induced osmotic stress. Microbiol Immunol. 48: 981-4.
- 4: Asakura H, Kawamoto K, Shirahata T, Makino S. (2004) Changes in *Salmonella enterica* serovar Oranienburg viability caused by NaCl-induced osmotic stress is related to DNA relaxation by the H-NS protein during host infection. Microb Pathog. 36: 147-51.

学会発表

- 1: 朝倉宏, 度会雅久, 白幡敏一, 牧野壮一. マウス通過による *Salmonella* Oranienburg の食塩感受性変化に関する遺伝学的研究. 第 77 回日本細菌学会学術総会. 2004 年 4 月 (大阪)
- 2: 朝倉宏, 柳忠湖, 鈴木荘介, 春日文子, 山本茂貴, 熊谷進, 五十君静信. *Providencia alcalifaciens* 由来 LPS の病原性

に及ぼす影響について. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 2004 年 9 月(北海道)

3: 朝倉宏、川本恵子、度会雅久、五十君静信、塚本定三、山本茂貴、牧野壮一. モルヒネによる *Listeria monocytogenes* 及び *Brucella abortus* 感染に対する感受性変化についての検討. 第 79 回日本細菌学会学術総会. 2005 年 4 月(東京)

4: 朝倉宏、五十君静信、川本恵子、山本茂貴、牧野壮一. 腸管出血性大腸菌 O157 の VNC 移行の交差誘導性. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 2005 年 9 月(鹿児島)

5: 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

6: 朝倉宏、五十君静信、川本恵子、山本茂貴、牧野壮一. 生体通過により生じた腸管出血性大腸菌 O157 のストレス抵抗性変化と VNC 状態に関するプロテオーム解析. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月(つくば)

7: 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由来腸管出血性大腸菌 O157 の検出法に關す

る研究. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月(つくば)

8: 南敦嘉、川本恵子、Nantika Panutdaporn、朝倉宏、牧野壮一. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg *rpf* deletion mutant. 第 141 回日本獣医学会学術集会. 2006 年 3 月(つくば)

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 の汚染実態に関する分子疫学的検討

研究要旨

腸管出血性大腸菌は O157 をはじめとして、家畜から高頻度に分離されていることから、食肉の検査段階における汚染状況を明らかにする目的で、食肉センター搬入後のウシ直腸内容及び解体行程における各種検体について、O157 の検出を行った。

計 481 検体(直腸内容 301 検体、肝臓ふきとり 60 検体、舌ふきとり 60 検体、第三胃ふきとり 60 検体)のうち、O157 陽性のものは、直腸内容 10.3%(31/301)、ふきとり検査では肝臓 1.7%(1/60)、舌表面 6.7%(4/60)、第三胃 5.0%(3/60)であった。O157 陽性検体のうち、最終的に分離された菌株はいずれも血清型 O157:H7 であり、毒素遺伝子型は 92.3%が *stx2c* であった。PFGE による DNA 解析の結果、5 株が同一のパターンを示していたが、このうち 3 株は R 農場のウシ由来であり、残り 2 株が検出されたウシはこれらの前後に処理されていたことから、交差汚染の可能性が示唆された。こうした O157 の食肉汚染には農場でのウシの保菌状況が大きく関与していると考えられ、飼育段階における検査の必要性が改めて認識された。

協力研究者

神戸市食肉衛生検査所 所長 森元賢典
検査員 南川総子

A 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 は、ウシより高頻度に分離されているが、主にウシ生体からの検出報告が多く、米国の調査では 0.2-60.4%程度の汚染が確認されている。

一方で、食肉処理工程における検出報告は少ない。実際に検出された場合には、当該肉について十分な消毒を行うこととされており、ウシ生体における汚染実態の把握と、処理工程の精度管理を行うために、その把握は食肉衛生上、極めて重要といえる。これまでもいくつか汚染実態調査があり、汚染頻度は明らかにされてきている。今回は食肉検査の個々の段階において、検出を試みたので、報告する。

O157 陽性検体については、保有毒素遺伝子型別および毒素産生についてスクリーニング的に検査を実施するとともに、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法を用いた DNA 解析を行うことで、それらの遺伝

学的関連性を明らかにした。感染源の特定へと結びつくこうした知見により、食肉におけるリスク評価のための基礎資料を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検査材料

2004 年 7 月から 10 月までに、神戸市食肉衛生検査所に搬入されたウシ由来の舌・肝臓および第 3 胃ふき取り各 60 検体、および直腸内容物 301 検体、合計 481 検体を使用した。また上記検体採取後には、肝臓の処理台についても併せてふき取りを実施した。検体は採材後、速やかに試料に供した。

2. O157 の検出方法

1) 試料の調整: 検体は無菌操作のもとに、ストマッカー袋に入れ、ノボビオシン加 mEC ブロスを 20ml 加え、1 分間ストマッキングしたものを試料原液とした。

2) 増菌培養: ノボビオシン加 mEC ブロスを

いれ、スタマッキングした検体について、42°Cで20時間培養を行った。

3) O157 抗原の検出: 培養液をミニバイダス ICE O157 検出用キット(日本ビオメリュー)を用いて、O157 陽性検体のスクリーニングを行った。

4) 分離培養: 分離に際しては、ミニバイダス ICE O157 確認用キット(日本ビオメリュー)で O157 の濃縮を行い、CT-SMAC とクロモアガー O157、もしくはレインボーアガー O157 に塗抹し、37°Cで24時間培養した。

5) O157 の同定: 上記平板培地に生えた疑わしいコロニーを釣菌して、性状試験ならびに、大腸菌 O157:H7 テスト「ニッスイ」(日水製薬)を用いて血清型別を行うことで、同定した。

3. 毒素遺伝子の検出と毒素産生の評価: *stx* 遺伝子は Lin らの報告しているプライマーセット(Forward: 5'-gaacgaataatttatatgt -3', Reverse: 5'-tttgattgttacagtcacat-3')を用いた

PCR により検出を行い、増幅断片について *HincII* 処理を行い、得られた切断断片パターンから遺伝子型を特定した(表 2)。

4. 毒素産生試験: 志賀毒素産生試験は逆受身ラテックス凝集反応(デンカ生検)を用いて行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による DNA 解析: 試料の調整は Gautomら⁸⁾の方法⁸⁾に準じて行った。*XbaI* を用いた制限酵素処理の後、電気泳動は CHEFF-Mapper (日本バイオラッド)を用いて行い、得られた画像については Fingerprinting II (日本バイオラッド)を用いてデンドログラムを作成した。

C. 研究結果

直腸内容計 301 検体のうち、O157 が陽性であったものは、31 検体(10.3%)であった。

月別の検出状況としては、7 月が 9/83

(10.8%)、8月が12/136(8.8%)、9月が10/75(13.3%)、10月が0/8(0%)であった(表1)。また、出荷地別の内訳は、近畿が4.3%(2/46)、四国が2.7%(2/75)であったのに対し、中国27.2%(6/22)、九州13.3%(21/158)と有意に高値を示していた(表1)。このうち、農場L, N, P, Rでは異なる個体から異なる時期に複数回O157が分離されていた(表2)。

一方、ふき取り検査においては舌表面から6.7%(4/60)、肝臓表面からは1.7%(1/60)、第三胃からは5.0%(3/60)でO157が検出された。また、肝臓の処理台からは調査期間を通じてO157は検出されなかった。

分離されたO157株、計39株について、毒素遺伝子型別を行ったところ、*stx2c*が92.3%(36株)と優位を占め、その他は、*stx1*、*stx1+2c*、*stx1+2+2c*が各1株であった(表2)。また、いずれの株も毒素産生性

を有していた。

PFGE法を用いてDNA解析を行ったところ、直腸内容・ふきとりを問わず、複数回にわたって別個体からの検出を認めた農場R由来の株はいずれも同一のパターンを示しており、更に同じ日に処理を受けた別農場A, B由来株とも100%一致していた(図1)。

また、農場Pのウシからは合計3株が分離されたが、同一出荷日に分離された2菌株(#H1057, #1058)は100%の相同性を示しており、約1ヶ月の出荷時期の異なる株(#H1208)とも90.0%と高い相同性を示していた(図1)。

D. 考察

わが国におけるO157のウシ汚染は、多くの研究報告により明らかにされているが、今回も直腸内容の検査により同程度の汚染があることが確認された。ただ、これらの

汚染が、ウシの飼育環境に由来するものなのか、食肉処理段階における汚染なのかについては定かではない。

対象としたウシの出荷地別の割合を比較したところ、中国および九州地方で高頻度に検出された(27.2 および 13.3%)。その原因としては、食肉センターまでの輸送時間の長いことが考えられる。これまでの研究報告の中で輸送ストレスによるウシの O157 排菌の多いことは指摘されており¹⁰⁾、輸送距離の長い九州および四国地方からの出荷牛の高い保菌率には、こうした影響が関与していたのかもしれない。

また、分離株の多くが *stx2c* であったことはこれまでの報告¹¹⁾と同様に、ウシ由来株の特徴として挙げられる。

PFGE 解析において、舌表面より分離された 3 菌株のパターンが全て一致したことは同一菌の可能性を示している。さらに、このうちの 1 株を分離した個体(#H207)からは、

肝臓表面からもやはり同一の PFGE パターンを示す株が分離されており、この個体が上記 5 株の感染源となっていたとも推察される。これらの結果は、5 株が何れも農場 R 由来であることを示唆しており、その汚染の程度は高いと推察された。

また、農場 P 由来株についても、異なる時期に分離されているにもかかわらず高い相同性を有しており、特定農場から持ち込まれた O157 が、食肉処理工程への汚染拡大の要因となることが推察された。

E. 結論

わが国の食肉処理段階におけるウシ生体ならびに処理工程中に検体を得ることで O157 の検出を行い、下記の結論を得た。

1. 481 検体より 39 検体(8.1%)で O157 陽性となった。
2. 直腸内容では 301 検体中、31 検体(10.3%)が、舌表面・肝臓表面・第三胃

表面のふきとり検体では、それぞれ4
(6.7%)、1(1.7%)、3(5.0%)検体が
O157 陽性であった。

3. 複数回分離された農場由来の代表株に
ついて PFGE 解析を行い、交差汚染の
可能性および農場における持続的な保
菌が推察された。

以上のことから、農場における検査が
食肉検査段階への衛生向上に直接的に
寄与すると思われる。

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

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

図1 ウシ由来0157代表株におけるPFGE解析

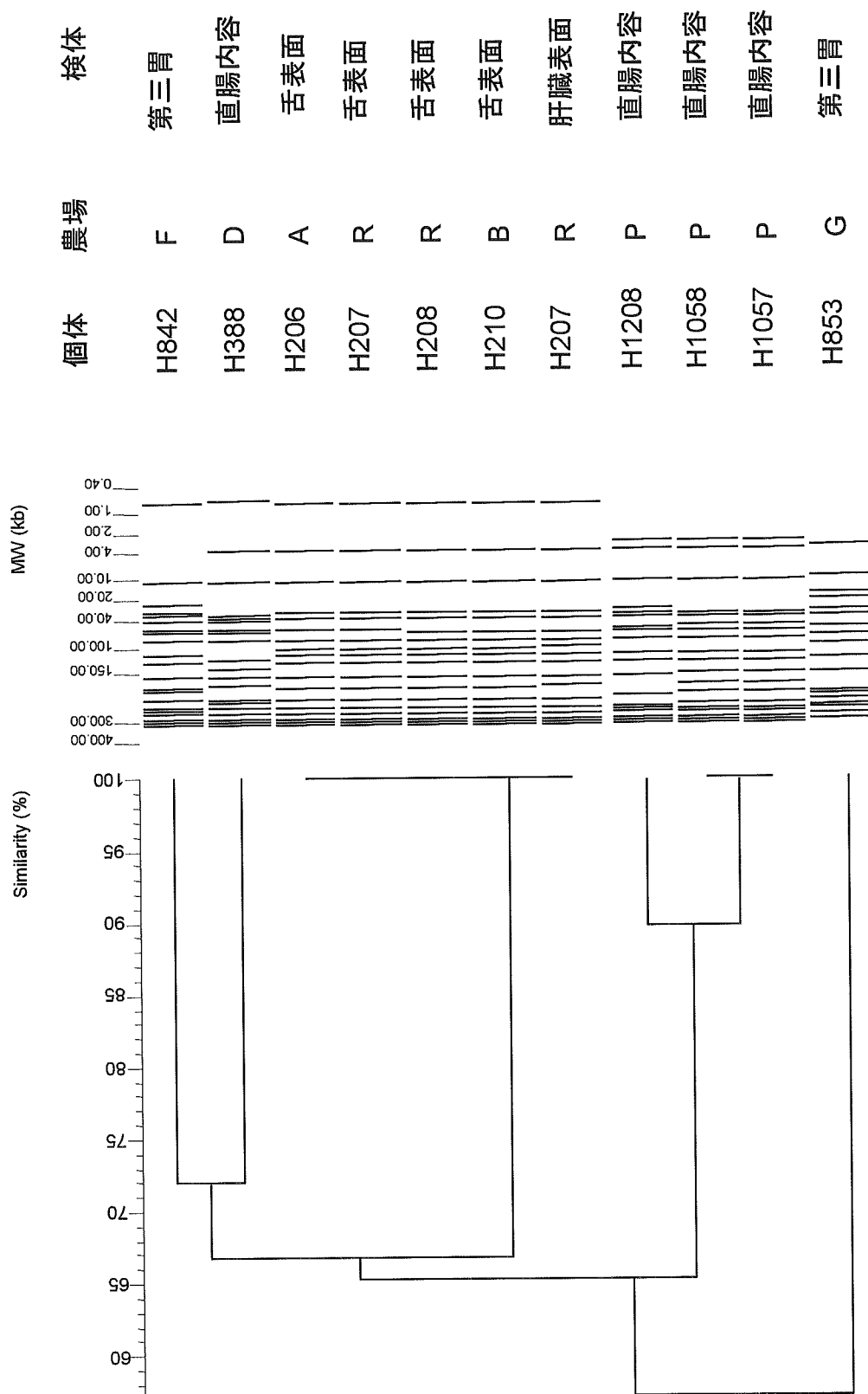


表 1 出荷地別にみた O157 株の検出状況

地方	都道府県	検査頭数	陽性数 (%)
九州	I	74	8 (10.8)
	II	32	7 (21.9)
	III	28	3 (10.7)
	IV	24	3 (12.5)
	他	0	0 (0)
四国	V	29	0 (0)
	VI	23	2 (8.7)
	VII	23	0 (0)
	他	0	0 (0)
中国	VIII	20	6 (30.0)
	他	2	0 (0)
近畿	IX	43	2 (4.7)
	他	3	0 (0)
計		301	30 10.3

表 2 農場別にみた直腸内容由来 O157 株の検出状況

農場	陽性数/検体数	<i>stx</i> 遺伝子型*1
A	1/1	<i>stx2c</i> (1)
B	1/1	<i>stx2c</i> (1)
C	1/1	<i>stx2c</i> (1)
D	1/1	<i>stx2c</i> (1)
E	1/2	<i>stx2c</i> (1)
F	1/2	<i>stx2c</i> (1)
G	1/3	<i>stx2c</i> (1)
H	1/3	<i>stx2c</i> (1)
I	1/5	<i>stx2c</i> (1)
J	1/13	<i>stx1+stx2+stx2c</i> (1)
K	2/4	<i>stx2c</i> (2)
L	2/5	<i>stx1</i> (1), <i>stx1+stx2c</i> (1)
M	2/6	<i>stx2c</i> (2)
N	2/6	<i>stx2c</i> (2)
O	3/4	<i>stx2c</i> (3)
P	3/9	<i>stx2c</i> (3)
Q	3/27	<i>stx2c</i> (3)
R	3/9	<i>stx2c</i> (3)

別個体より複数回検出された農場については、太字で記した。

*1 () 内の数字は *stx* 型毎の菌株数を示している。

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) ウシ及びヒト由来 O157 株における病原遺伝子の保有状況ならびに志賀毒素産生とファージ関連遺伝子との相関性について

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 はウシから多数分離されるが、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。本研究では、はじめに O157 における主要な病原遺伝子(*eaeA*, *EhxA*, *espP*, *katP*)の保有状況を調査することで、その可能性について検討した。ウシ、食品およびヒト由来株として 129 株、36 株および 66 株を供したところ、由来間の保有率に有意な差異は認められなかったが、検出された *eaeA* はいずれも γ 型を示し、血清型 O157 における共通性が示された。

一方、志賀毒素遺伝子型別を行ったところ、ウシ由来株では *stx2c* 保有株が全体の 69.8%を占め、ヒト由来株の 30.3%に比べ明らかに高い値を示した。また、各由来株の毒素産生について比較した。Stx1 では、ヒト由来株はいずれも高値を示したが、ウシ由来株では多様な分布を示した。また、Stx2 の産生パターンは、ヒト由来株の中で集団事例由来株はいずれも高値を示したが、散発事例由来株およびウシ由来株では多様であった。ウシ由来株における Stx2 発現のエフェクターである、ファージ遺伝子の分布を明らかにしたところ、*Q* 遺伝子に毒素産生との相関性が認められ、毒素型別ならびに毒素産生マーカーとしての有用性が示唆された。

協力研究者

帯広畜産大学 牧野壮一
国立医薬品食品衛生研究所 山本茂貴
動物衛生研究所 中澤宗生

A. 研究目的

ヒトの STEC 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が原因となって引き起こされていることからウシを中心とした家畜についての調査が進められ、様々な動物より多くの血清型が分離されている。ヒトと異なり、本菌はウシに感染しても症状を呈さないため、これらは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。実際にこうした調査によって3割近いウシが STEC を保持していることも報告されており、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る。しかしながら、先の報告にあるとおり、ウシより分離される O157 菌株の多くは Stx2c 単独産生性であり、下痢などの症状を呈したヒト患者由来株に比べると、ウシのみがヒトへの感染源であるとはいえず、ウシ由来株の保有する 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のが現状である。

O157 以外の血清型に属する STEC 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 STEC 株の中にはヒト由来株、特に HUS を発症した患者由来 STEC 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 STEC O157 菌株の各種病原因子の保有状況を明らかにすることで、菌株間の遺伝的関連性について検討した。更に、ウシおよびヒト由来株について毒素産生性について比較するとともに、毒素遺伝子の発現に関与する関連因子との相関性について考察した。これにより、それぞれの保有する病原性についての評価を行い、リスク評価を行うための基礎資料とすることを目的とした。

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 (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)。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. DNA 精製

L-broth 培養菌体より、QIAGEN DNA tissue kit (キアゲン) を用いて全 DNA を抽出し、PCR 鋳型サンプルとした。

3. PCR 法による病原遺伝子の検出

代表的な病原因子として知られている病

原遺伝子の保有状況について明らかにするため、*eaeA*, *ehxA*, *espP*, *katP*, *stx* 各遺伝子に対して特異的なプライマーセットを用い、PCRを行った。PCR反応溶液は、鋳型DNA 1 ul に対して、プライマー(20 pmol) 1 ul, 10 x Ex Taq buffer 2.5 ul, dNTP 2 ul, Ex Taq 0.25 ul (タカラバイオ)を添加し、滅菌再蒸留水(DDW)で計 25 ul に調整した。

3. Stx 産生量の比較

分離菌株の Stx1 および Stx2 の定量については、Syncase broth 一夜培養液を L-broth 5ml 中で OD₆₀₀ = 0.6 となるまで培養した。その後、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 時間振とう培養後、超音波処理を行い、上清を Stx 測定用サンプルとした。測定には、逆受身ラテックス凝集反応法(VTEC-RPLA、デンカ生検)を用いた。

C. 研究結果

1. 病原遺伝子群の保有状況

ヒト及びウシ由来 O157 株において、腸管上皮細胞への付着に関連する *eaeA* 遺伝子は 2 株のウシ由来株を除いては全てが保有しており、いずれも γ 型であった(表 1)。また、病原性プラスミド pO157 上に座位する *EhxA* 遺伝子はウシ由来株 4 株、ヒト由来株 3 株をのぞいて、全てに共通に認められた。同じくプラスミド性の *katP* 遺伝子については、ヒト由来株では保菌者由来の 2 株を

除いて保有していたが、ウシ由来株では 4 株が陰性であったことに加え、異なるサイズの DNA 断片が増幅されるケースが 5 株で認められた(表 1)。*katP* 陰性であった保菌者由来の 2 株は、*espP* 遺伝子も陰性であったが、そのほかの株は *espP* 遺伝子を共通に保有していた。

2. 志賀毒素および関連因子の遺伝子型 PCR 法により、ウシ、ヒト、食肉およびその他食品由来株の *stx* 遺伝子型別を行った。結果として、ウシ由来株(129 株)では、*stx1* (+)が 6 株(4.7%)、*stx1* (+)および *stx2* (+)が 36 株(27.9%)、*stx2* (+)が 74 株(57.4%)、*stx* (-)が 3 株(2.3%)、食肉由来 26 株の内訳は、*stx1* + *stx2* が 9 株(34.6%)、*stx2* が 13 株(50.0%)であり、このうち食中毒事例由来 2 株はいずれも *stx1* + *stx2* であった。一方、ヒト由来株(66 株)の内訳は、*stx1* + *stx2* が 35 株(53.0%)、*stx2* が 28 株(42.4%)、*stx* (-)が 1 株(1.5%)であった(表 2)。また、食肉を除いた食品由来 10 株(レタス、和風キムチ、カブ浅漬、イクラ、菓子、黄金焼)のうち、8 株は *stx1* + *stx2* 株であったことから、ウシ以外からの感染ルートが優勢であることが推察された。

更に、*stx2* については変異型の型別を行った。ウシ由来株では、*stx1* + *stx2* を示す 36 株のうち、*stx2c* 陽性となったものが計 21 株(58.3%)を占め、*stx2* 単独産生株(65 株)においても、50 株(76.9%)を占めていた

(表 2)。食肉由来株では、*stx1*, *stx2* 両産生を示す 10 株のうち、3 株 (30.0%)、*stx2* 単独産生株 (13 株) では、9 株 (69.2%) が *stx2c* 型に分類された。一方、ヒト由来株における *stx2c* の割合は、*stx1*, *stx2* 両産生性では 35 株中 8 株 (22.9%)、*stx2* 単独産生株では 22 株中 6 株 (27.3%) と明らかに低い値を示した(表 2)。これらのことから、ヒト由来株の中でも特に *stx1* + *stx2* 産生性の株については、ウシに由来する可能性は低いと推察された。

3. Stx 産生の比較解析

ファージ誘導因子であるマイトマイシンは、Stx ファージの溶原化を引き起こし、結果として Stx 産生を促すことが知られている。本研究では、O157 の *in vivo* における病態を知るために、マイトマイシン C によるファージ誘導を行い、各由来株における Stx 産生の比較を行った。

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 Stx 産生について検討したところ、Stx1 については、ヒト由来株はいずれも高い産生 (1:128) を示していたのに対し、ウシ由来および食肉由来株では、1:0~1:128 と多様であった(図 1)。また、変異型を含めた Stx2 についてみると、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(図 2)。

Stx2c 産生のみについて比較することで、その分布はより詳細に区別された。すなわち、ウシ由来株の中で食中毒事例に関連していることの明らかな菌株(#H02E035)は、高い産生を示していたが、ウシ由来株全体における分布は不均一であり、ピークは 1:8 に局在していた(図 3)。これはヒト由来株におけるピークが 1:64 であるのに比べると明らかに低い傾向を示していた。

4. Stx 産生と Q_{933} 及び S_{933} 遺伝子の相関
ウシ・ヒト由来代表株について、それぞれ Stx 産生と Q および S 配列との相関性を考察したところ、Stx1 産生はウシ由来株で多様 (1:0~1:128) であったが、1 株(#N34, Stx1=1:8)を除いて、いずれもファージ上の Q , S 配列を保有しており、直接的な相関性は認められなかった(表 3, 4)。

一方、Stx2 については、 Q 配列が増幅されなかった株はいずれも 1:32 以下の Stx 産生を示していた。 Q および S 配列が共に増幅されなかった全 10 株のうち、8 株では Stx2 産生が認められず、残り 2 株の Stx2 産生も 1:2 および 1:16 と低値であった。

また、*stx2, 2c* に関わらずウシ由来株には、ヒト由来株に比べて高い割合で Q 配列のみ増幅されない株が存在しており、食中毒事例由来株である H02E035 株を除いて、Stx2 産生は 1:8 以下であった(表 3, 5)。
stx2 株で Q , S 配列が共に陰性の場合、