

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

腸管出血性大腸菌感染に併発する急性脳症の治療に関する研究

研究分担者	藤井 潤	九州大学大学院医学研究院細菌学分野准教授
研究協力者	木下 良正	宗像水光会総合病院脳神経外科医長
研究協力者	松川 昭博	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病理学 (免疫病理/第一病理) 教授
研究協力者	福田 賢治	聖マリア病院脳血管内科診療部長
研究協力者	湯通堂 隆	塩野義製薬株式会社・創薬研究所・疾患 PG 推 進部門 蛋白質創薬グループ・主幹研究員
研究協力者	小林 哲夫	岡崎市保健所生活衛生課食品衛生班 班長
研究協力者	吉田 真一	九州大学大学院医学研究院細菌学分野教授

研究要旨：

私たちは精製ベロ毒素 2 型 (Stx2) をウサギに静注して生じた脳浮腫を Magnetic Resonance Imaging (MRI), T2 強調像で検出できることを 1996 年に報告した。このウサギ急性脳症モデルを使い、ステロイドパルス治療を行った。その結果、ステロイドパルス療法は Stx2 静注による脳浮腫を軽減させ、ウサギを生存させた。また Stx2 静注ウサギのモデルにおいて enhanced MRI の方が T2W よりも血液脳関門の破綻を早期に診断できることを示した。過去の文献に腸管出血性大腸菌感染による脳浮腫の症例報告が存在していたので、ステロイドパルス治療が行われていたか再度検証した。Stx2 は IL-1 β を直接誘導しないことを、ウサギに Stx2 を静注したモデルの血清とウサギの胎児脳から抽出した初代培養細胞において確認した。

A. 研究目的

研究背景) 1980 年代、腸管出血性大腸菌 0157 (O157) 感染症により、ヒトは溶血性尿毒症症候群 (HUS) をきたして重症化することが Karmali らによって明らかにされていた。私達は腸管出血性大腸菌 0157 感染症による死因について解明するため、本補助金より、ベロ

毒素による急性脳症の動物モデルを開発し研究を重ねてきた。1994 年には 0157 をマウスに経口感染させ、マイトマイシン C を腹腔内投与することによってマウスが死亡するモデルを開発した。そのモデルの詳細な解析の結果、血液脳関門破綻が死因となっていることを証明し報告した。次にウサギに

精製ベロ毒素 2 型 (Stx2) を静注すると下肢の麻痺や痙攣といった症状を呈し、最終的にウサギは死亡した。このウサギのモデルを用いて、Stx2 による急性脳症を診断する研究を行った。下肢の麻痺や痙攣を発症したウサギの脳を Magnetic Resonance Images (MRI) を用いて、観察した結果、T2 強調像 (T2W) で脳浮腫を検出することに成功した。Computed tomography (CT) においては、O157 感染における脳浮腫は検出できないとされる。私達の研究結果は、O157 感染によって死亡をきたす大きな要因である急性脳症の早期診断法として臨床家に注目された。今回の研究の目的は、ベロ毒素がウサギに、もたらす急性脳症の治療に関する研究である。現在、ヒトにおいて O157 感染によって引き起こされる急性脳症には治療法がない。

研究目的 1) ウサギに Stx2 を静注した動物モデルで、Stx2 静注後に、ステロイドパルス療法が有効であるかどうか調べた。過去の文献から O157 感染後に急性脳症を発症し、ステロイドパルス療法が有効であった症例報告があるか検索を行った。

目的 2) O157 感染による脳浮腫は MRI, T2W で検出されることは、すでに私達によって報告されている。今回の研究により、MRI, T2W よりも、さらに感度の高い診断法を開発することを目的とした。

目的 3) Stx2 が炎症性サイトカインの一種である IL-1 β を誘導するかウサギに Stx2 を静注するモデルで調べた。

IL-1 β は自然免疫が誘導するサイトカインの一つとして、その重要性が見直されている。IL-1 β は、Toll like receptor (TLR) が リガンド (pathogen-associated microbial patterns; 病原体の有する発現する高度に保存された構造配列) と結合することによって誘導される。Nature Reviews Immunology (7, 31- 40, 2007, 1997) に図 1 として示されたように maitotoxin (shellfish toxin) など毒素も TLR を介して NALP3 inflammasome を形成し、IL-1 β を誘導することが知られている。ベロ毒素がウサギに IL-1 β を誘導することは知られていないので、このことを *in vivo* と *in vitro* の実験系で調べた。

B. 研究方法

(1) 1. 精製ベロ毒素静注によってもたらされるウサギ脳浮腫へのステロイドパルス療法効果に関する研究

1 群 5 羽、3kg のウサギに Stx2 (1.4 μ g/kg; 1.6LD₅₀) を静注し、静注直後から 4 日間、1 日 1 回、betamethasone sodium phosphate (BSP; Rinderon[®], Shionogi and Co. Ltd.) を 36mg/kg 静注した群と 2 日後から 2 日間、1 日 2 回、同量の BSP を投与した群と BSP を投与しなかった群の 3 群 (計 15 羽) について生存率を比較した。また Stx1 静注モデル (16.7ng/kg; 0.83LD₅₀) についても BSP の治療効果を同様に調べた。Stx2 を静注されたウサギのモデルで、血液脳関門の破綻が gadopentetate dimeglumine (Gd-DTPA) を用いた

enhanced MRI で観察できないか調べた。Stx2 で生じた脳浮腫を MRI で確認した後、1日2回、同量の BSP で治療して脳浮腫が縮小するか検討した。

次に過去の文献から O157 感染後に急性脳症を発症し、ステロイドパルス療法が有効であった症例報告があるか検索を行った。

2. ウサギに Stx2 を静注による IL-1 β 誘導能に関する研究

ウサギ(各群2羽)に Stx2 (5 μ g/kg, 5LD₅₀) または lipopolysaccharide (LPS; 100 μ g/kg) を静注して投与前、3、7、12、28、47時間後、に採血して enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により、血中の IL-1 β を測定した。

ウサギの胎児脳から、microglia と astrocyte を多く含む初代培養を行い、その培養上清に Stx2 を添加して、これら細胞が IL-1 β 誘導するかを ELISA 法で調べた。

結果 1. 精製ベロ毒素静注によってもたらされるウサギ脳浮腫へのステロイドパルス療法効果に関する研究

1日2回、BSP 静注した群は未治療群に比較して有意に生存期間が延長し、死亡率も低かった(図2)。Stx2 を静注し1日1回 BSP を投与された群では BSP の効果を認めなかった(図2)。一方、Stx1 静注モデル (16.7ng/kg; 0.83LD₅₀) について BSP の治療効果を同様に調べた結果、BSP の治療効果を認めなかった(図3)。

ステロイドパルスの効果をとガドリニウムを用いた enhanced MRI と T1W、

T2W で確認した結果を図4に示した。図4で示された図4Aはコントロールウサギの脳冠状断 MRI、図4Bは Stx2 (1.4 μ g/kg, 1.6LD₅₀) 静注後5日目の MRI 冠状断、図5Cは Stx2 (1.4 μ g/kg, 1.6LD₅₀) 静注後2日目からリンデロン[®] (37 mg/kg) を1日2回、2日間、治療したウサギの脳冠状断 MRI を示した。CはBと同じく、Stx2 静注後5日目に撮影された。ガドリニウム (Gd-DTPA) で強調された enhanced MRI を最下段に示した。T2W では Stx2 による病変は捕らえられていないが、ガドリニウムで強調された MRI ではガドリニウムがウサギの視床に強調され、血液脳関門の破綻が示されている (B; ガドリニウムで強調された MRI、矢印)。このことは MRI、T2 強調像よりも、ガドリニウムを用いた enhanced MRI が Stx2 による脳浮腫の検出に適していることが判明した。リンデロン[®] でステロイドパルス治療されたウサギではガドリニウムが脳実質内に検出されていない (C; ガドリニウムで強調された MRI) ことから、生存率のみならず、画像診断においてもステロイドパルス療法が有効であることが示された。次に私達はステロイドパルス療法が、すでに脳浮腫を発症しているウサギにも有効であるか検証した。Stx2 を静注し、MRI、T2W によって小脳に脳浮腫が存在していることを確認した後、ステロイドパルス療法を開始し、その2週間後に同じウサギの脳を MRI、T2W で観察した。その結果、MRI、T2W で捕らえられた脳浮腫 (図4 ;

control と比較して before BSP therapyの白い部分)は、消失していた(図5; after BSP therapy)。

2003年に報告されているJ. Neuroimaging(2003;13(1):75-788)によると22歳の女性がO157感染後、溶血性尿毒症症候群(Hemolytic Uremic Syndrome; HUS)を発症し、しかもMRI, T2Wで後頭葉、大脳基底核(図6; A)、小脳(図6; B)に広範囲な病変を認めたことを報告していた。聖マリア病院に共同研究を依頼して、この症例に関してretrospective studyを行った。この症例は、集中治療を施されるほどの重傷例であり、痙攣や意識消失を伴っていたが、回復し、現在では、ほとんど後遺症なく生活されている。J. Neuroimagingには治療法に関しては詳細に記載されていなかったもので、当時の診療記録を聖マリア病院の協力のもとで、閲覧した。その結果、ソルメドールのステロイドパルス療法が行われていたことが判明した(図7)。図6の2003年3月22日(発症後7ヶ月後)のMRI, T2W(図5のA、Bの最下段されている)には入院後22日に認められた広範囲な病変(後頭葉、大脳基底核、小脳病変)が消失していた。

2. ウサギにベロ毒素2型を静注によるIL-1 β 誘導能に関する研究

Stx2投与後の血液中の発現量はLPS静注後、3時間でピークを示したのに対して、Stx2静注後の血液中のIL-1 β はStx2静注前に比べて、減少していた(図8)。

ウサギの胎児脳から、microgliaとastrocyteを多く含む初代培養を行い、Stx2(10 ng/ml)またはLPS(100 ng/ml)を培養上清に添加後0, 4, 10, 24, 74時間後に培養上清中のIL-1 β の存在をELISAで調べた。その結果、LPSを添加された脳初代細胞は24時間後にIL-1 β の発現のピークを認めたのに対して、Stx2を添加された細胞では、10時間以降に低下傾向を示した(図9)。

(2) MRIのretrospective studyについては連結不可能匿名化された情報なので、臨床研究に関する倫理指針の適応外にあたり、倫理審査の対象外である。

ウサギに関する研究は産業医科大学動物研究センター実験指針に従い、実験の目的を考慮した上で、可能な限り動物の苦痛を軽減する実験法を採択した。具体的にはウサギの全身状態が悪化し、許容される苦痛の範囲を超えたときをエンドポイントとして設定し、ウサギに麻酔薬を使用して安楽死させた。MRI撮影中も、pentobarbitalやketamineを静注して苦痛の軽減を図った。

D. 考察

ウサギにベロ毒素2型を静注した後、2日目からステロイド(BSP)をパルス治療して、ステロイドパルス治療の効果を生存率と、ガドリニウムで強調されたenhanced MRIで調べた。その結果、1日2回、BSP静注した群は未治療群や1日1回、BSP治療された群に比較して有意に生存した。ウサギに対してStx2よりも致死活性の強い

Stx1 を静注した実験系では BSP の効果を認めなかった。本報告は、ヒトが 0157 感染によって重症化し、急性脳症にまで発展した症例にステロイドパルス療法が有効であると断言できるものではない。なぜなら 0157 の 80% は Stx1 と Stx2 の療法を産生するからである。今後、0157 感染が急性脳症にまで重症化した臨床例にステロイドパルス療法が効果を示した症例報告を期待する。今回注目したヒトの症例報告においても確かにステロイドパルス療法が行なわれており、しかも、脳浮腫が生じた後、1 ヶ月以上経て、ステロイドパルス療法が 2 回行われている。ステロイド療法は 0157 感染によってもたらさせる急性脳症の初期段階には効果あるも報告されているが、脳浮腫が生じた後においてもステロイドパルス療法に治療効果を認めたことは注目に値する。Enhanced MRI においても Stx2 による血液能関門の破綻が、ステロイドパルス治療により消失した。しかし、MRI, T2W では enhanced MRI で検出された病変が捕らえられていないことから、enhanced MRI は 0157 感染によってもたらさせる急性脳症の早期診断に有用であることが判明した。

ウサギにベロ毒素 2 型を静注した実験系 (*in vivo*) やウサギの胎児脳を用いた初代培養の実験系 (*in vitro*) で、ベロ毒素は IL-1 β を誘導しないことも報告した。Stx1 がマクロファージに IL-1 β を誘導したことが報告されている。細胞の種類によってベロ毒素の

IL-1 β 誘導能は異なっている可能性がある。動物モデルで IL-1 β のみ静注しても血液能関門が破壊されることが判明しており、ベロ毒素と広範囲な出血性大腸炎によって強い炎症が TNF α や IL-1 β を誘導し、ベロ毒素の能への感受性を高めて急性脳症が増悪することも考えられる。

E. 結論

1. 0157 感染症で急性脳症をきたした症例には、ステロイドパルス療法が有効である可能性がウサギのモデルで証明され、ステロイドパルス療法が有効であったヒトの症例報告も存在していた。
2. enhanced MRI はベロ毒素によって生じる血液能関門の破綻を検出できる有用な検査法である。
3. Stx2 を静注したウサギのモデルや胎児脳を用いた初代培養細胞では Stx2 によって IL-1 β は誘導されない。

F. 健康危険情報

1. 今まで治療法がないとされた 0157 感染症による急性脳浮腫は CT ではなく、MRI, T2W で早期に検出できることは広く臨床家に浸透していないので、今後もあらゆる機会を通じて、MRI, T2W を 0157 感染症による急性脳浮腫に有用であることを紹介したい。今回の研究結果により、ガドリニウムを用いた enhanced MRI が Stx2 による血液能関門の破綻を検出する方法として有用な検査方法であり、T2W よりも感度が高い。

ステロイドパルス療法が 0157 感染症による急性脳浮腫に対して有効であることがウサギのモデルで証明できた。ヒトに対してステロイドパルス

療法が有効であるかは、さらなる症例報告がの検討が必要である。

2. 生食用食肉（生レバー、ユッケ、センマイなど）の細菌性食中毒（0157を含む）の危険性を広く国民に伝える必要がある。そのためには飲食店にリスク表示をメニューに表示させることを提言する（以下の3. その他に記載した我が国における0157感染症予防のための社会貢献・啓蒙活動報告を参照にこと）。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujii, J., Y. Kinoshita, A. Matsukawa, S. Villanueva, T. Yutsudo, S. Yoshida. 2009. Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbit. *Microb Pathog* 46(4): 179-184.

2) Matsuda, F., J. Fujii, S. Yoshida. 2009. Autophagy induced by 2-deoxy-D-glucose suppresses intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in A/J mouse macrophages, *Autophagy* 5(4): 484-493.

3) 藤井 潤. 2009. ベロ毒素に関する新たな知見, 化学療法の領域 25(5): 39-48.

2. 学会発表

1) 藤井 潤, 吉田真一 腸管出血性大腸菌 0157 感染症の重症化要因に関する研究 第 82 回日本細菌学会総会日本細菌学会誌 Vol. 64 No. 1 98 頁 演題番号 P1-098 132 頁 2009 年 3 月 12 日 名古屋

2) 藤井 潤. レジオネラ感染細胞の運命 第 82 回 日本細菌学会総会日本細菌学会誌 Vol. 64 No. 1 98 頁 演題番号 WS17-4 2009 年 3 月 14 日 名古屋

3) 藤井 潤 Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbits 日米コレラ部会（日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会）日本側総会 プログラム会務報告 2 番 3 頁 2009 年 7 月 29 日 京都

4) 藤井 潤. 松田史子, 吉田真一 A/J マウスマクロファージにおいてレジオネラは、オートファジーによって殺菌される 第 62 回日本細菌学会九州支部総会 プログラムおよび抄録集 4 頁 2009 年 9 月 4 日 佐賀

5) 藤井 潤. 牛レバーやユッケなどの生食の危険を伝えることによる腸管出血性大腸菌感染予防対策の実現性を考える 第 13 回腸管出血性大腸菌シンポジウム プログラム抄録集 6 頁 2009 年 10 月 16 日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
なし

3. その他

我が国における 0157 感染症予防のための社会貢献・啓蒙活動報告

病原微生物検出情報 (Vol. 30 No. 5 2009 年) によると 3 類感染症として腸管出血性大腸菌感染症届け出数は 2007 年 4,617 名、2008 年 4,330 名と 4000 名を超える患者数が報告されている。病原微生物検出情報のこの月報 4 頁には、0157 感染症の合併症と転機

に以下のことが報告されている。溶血性尿毒症症候群(HUS)以外の合併症、転機の詳細な情報収集の結果、0157感染症により、意識障害13例、脳症9例、痙攣8例が報告された。また全HUS発症例(94例)における致死率は5.3%と高く後遺症ありと報告された症例は5例で、そのうち2例が意識障害をきたしたことが報告されている。現在において0157感染症における急性脳症は重症例として報告され続けている。私は0157感染症の背景となっている生食用食肉安全基準が守られていないのではないかという懸念を持っている。この状況の中で食の安全を守るという立場で、国民の細菌性食中毒に対する意識改革が重要と考え、朝日新聞の「私の視点」(平成20年8月22日)に投稿した(図10)。この記事に注目した岡崎市長から昨年、講演の依頼があった。岡崎市保健所にて、平成21年8月10日、「食の安全 食肉の生食がもたらす細菌性食中毒の危険性 0157感染症の現状問題を中心に」という演題で、主に飲食店経営者に対して講演を行った。講演の要旨は、特に夏場には、食肉(牛・豚・鶏)の「刺身」、「たたき」、「ユッケ」、「湯引き」など、生もしくは十分に加熱していない料理メニューを「提供しない、注文しない、食べない」という従来の食中毒衛生月間の目標に則した内容に加え、私の持論を公表したので以下に示す。

「我が国では牛の生食を自己責任の範囲としてとらえる人が多い。しか

しリスクを認識して自己責任において食べることと、リスクを知らさずに小児や高齢者にまで積極的に肉の生食をすすめることとは問題点が大きく異なると考える。米国においては1996年にパスツリゼーション(加熱による滅菌)を行っていない生リンゴジュースによって0157感染症が相次ぎ、2名の幼児が死亡した。こうした緊急事態に際し、生リンゴジュースを提供する場合、WARNING(警告); This product has not been pasteurized and, therefore, may contain harmful bacteria that can serious illness in children the elderly, and person with weakened immune system(この産物はパスツリゼーションがなされていないので、有害な細菌を含む可能性があり、子供や老人、免疫の低下した人にとっては重大な疾患を起こしうる)と表示することが米国食品医薬品局(FDA)によって2年後の1998年に義務化された。我が国でもタバコの箱に肺ガンや虚血性心疾患のリスク表示を行うことが通例となっており、ユッケや牛レバーを提供する際に、子供や老人には溶血性尿毒症症候群や急性脳症によって死亡することがあることをメニューに表示することを我が国においても提言したい。また鶏さしなど鶏肉の生食を喫食することによるキャンピロバクター感染の増加が問題となっている。生食用食肉から検出されてはならない菌として大腸菌とサルモネラ以外にキャンピロバクターを含め

るなど法的対策が急務であると考え
る。仮に生肉を食べたいという我が国
特有の食文化を否定することができ
ないとすれば、リスクをきちんと表示
し、リスクをしっかりと理解して食べ
る、こうした判断が出来ない年齢では
親の判断によって食べさせない環境
作りが必要になってきたと、食の安全
を守る立場から消費者に訴えたい。ま
たリスク表示により2次的な衛生上
の波及効果も期待できると考える。す
なわち生食用食肉基準の遵守がとち
く場に限定されることなく、販売提供
する焼肉店、ステーキなどの飲食店に
まで浸透することを期待する。牛の生
レバーやユッケなどを提供する生産
者にも生食用と表示されていない加
熱用食肉（特に牛生レバー）は人を死
に至らしめるほど非常に危険である
という自覚を促し、これらを生食とし
て提供しないことはもとより、生食用
食肉は加熱用食肉とはっきり区別し

て解体や調理を行うなどの意識改革
につながることを期待したい。」

この私の提言を受け、岡崎市は「レ
バ刺し、ハツ刺し、ユッケ、センマイ
は、加熱していないため食中毒を含む
可能性があります。子供、高齢者、免
疫力が低下している方は食べないで
ください。」(図11)とメニューに表
示する行政指導を行っている。平成21
年12月3日、岡崎市議会において、
飲食店でのメニュー表への食中毒リ
スク表記への協力もお願いしながら、
飲食店の店舗内に掲示しやすく、かつ、
市民の皆さんへ注意喚起ができるよ
うな内容のポスターを検討し、配布し
たいという提案がなされた。岡崎市の
取り組みは、東海・北陸7県10市食
品衛生主管課長会議で議題にしたほ
か、全国食品衛生主管課長連絡協議会
からの厚生労働省への要望事項にも
盛り込まれるよう要請している。

图1

Effects of intravenous injections of BSP on Stx2 toxemia rabbits

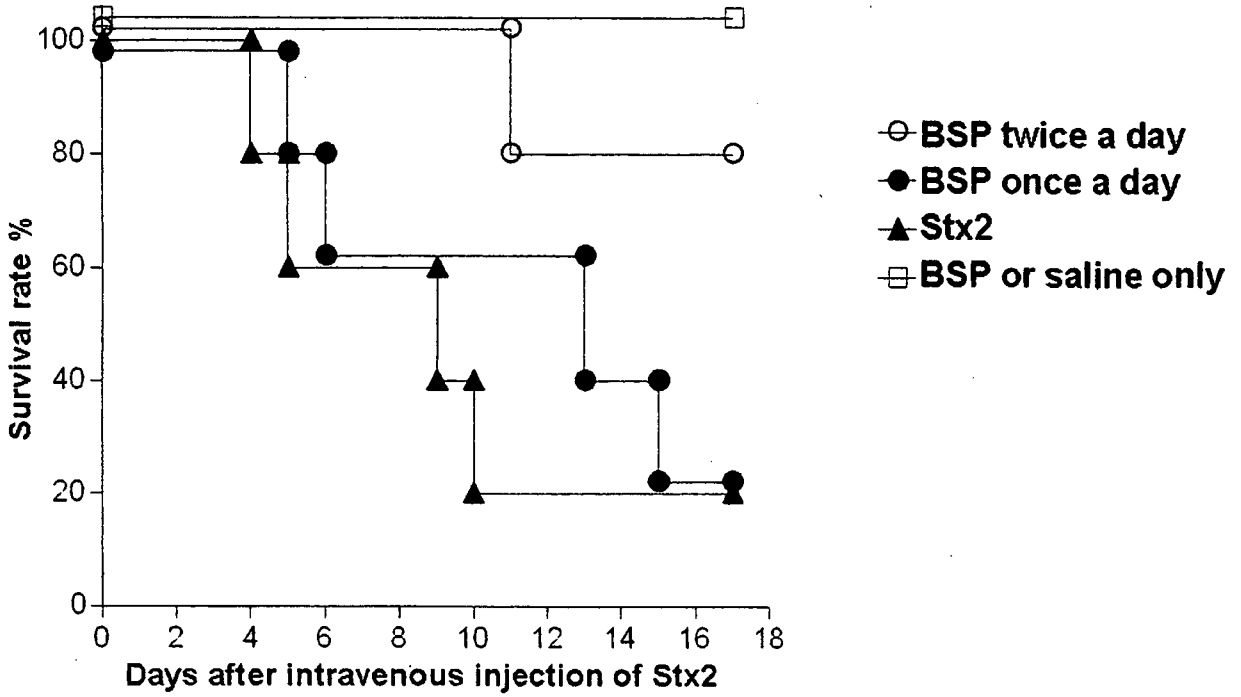


图2

Effects of intravenous injections of BSP on Stx1 toxemia rabbits

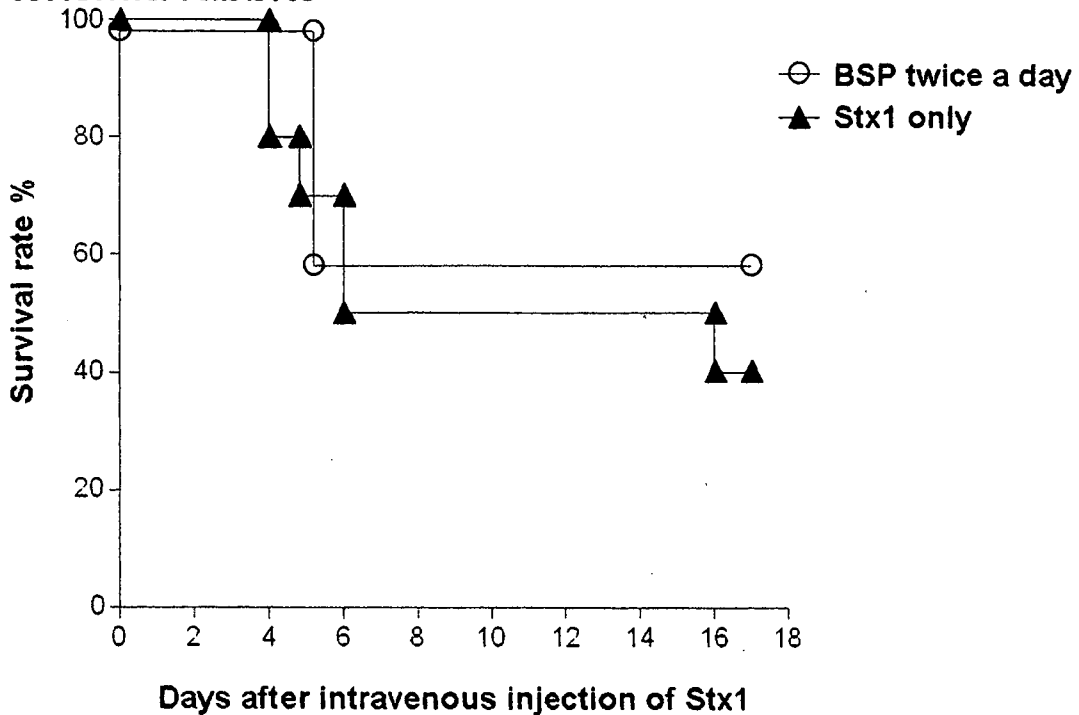


図3

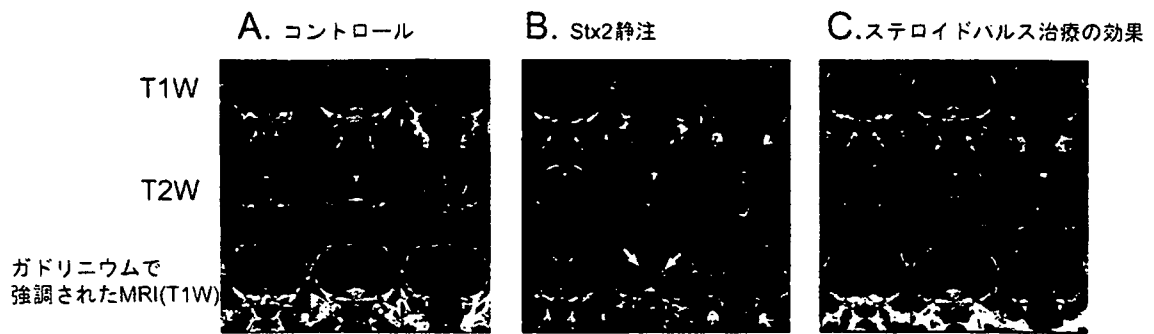


図4

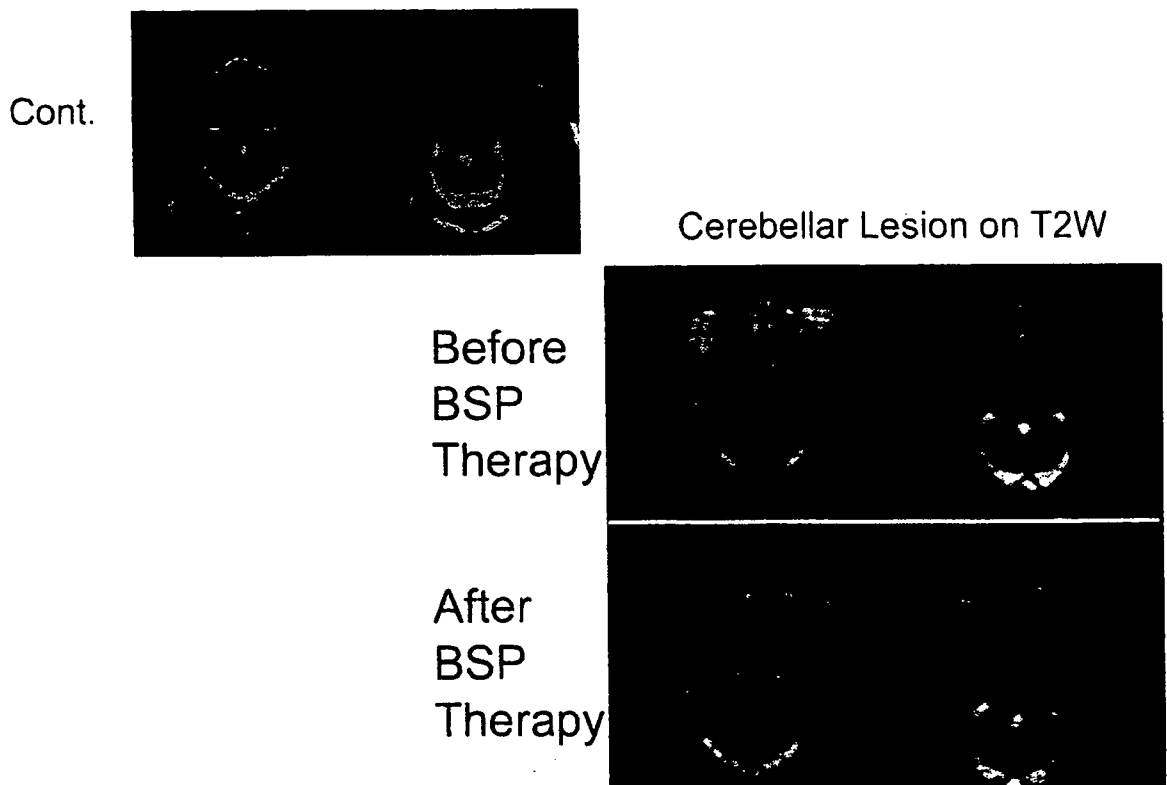
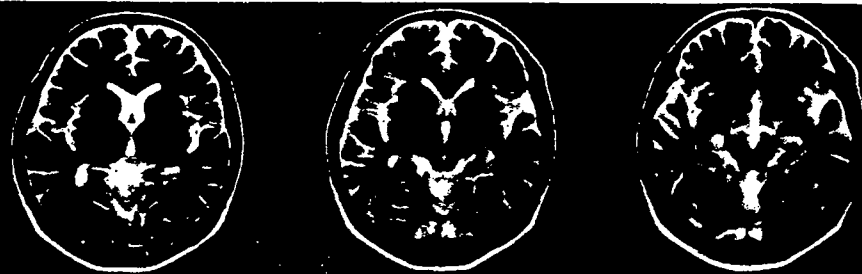
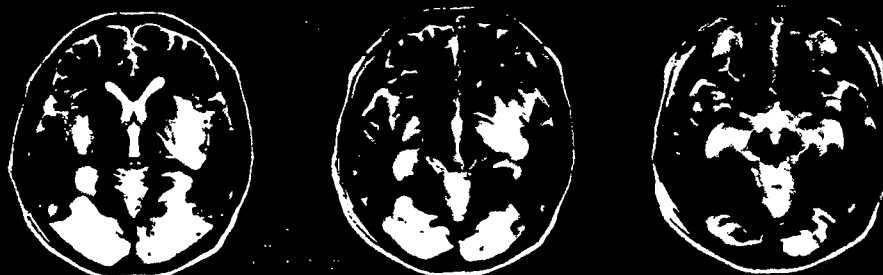


图5 A

1999.8.30
Day 12



1999.9.8
Day 22



2000.3.22



图5 B

1999.8.30
Day 12



1999.9.8
Day 22



2000.3.22



図6A

Case report

The authors report the magnetic resonance imaging (MRI) findings in a 22-year-old woman with hemolytic uremic syndrome and encephalopathy secondary to verotoxin-producing *Escherichia coli*. Multiple lesions in the midbrain, cerebellum, occipital lobe, and basal ganglia showed high signal intensity on T2-weighted images with widespread symmetrical distribution. Most of these findings showed remarkable reduction on MRI images obtained 7 months after the onset.

Time course

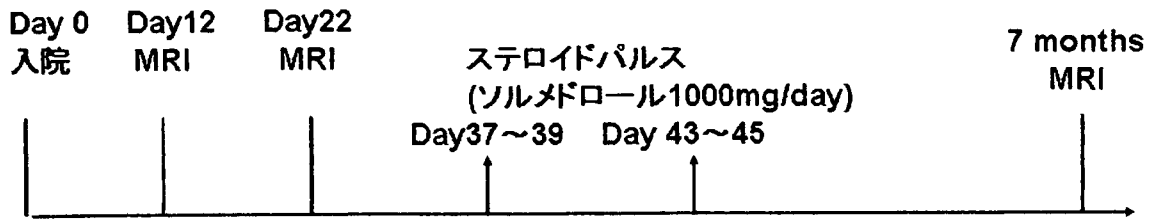


図6B

Time course of IL-1 β activities in the serum after injection of Stx2 or LPS as measured by ELISA

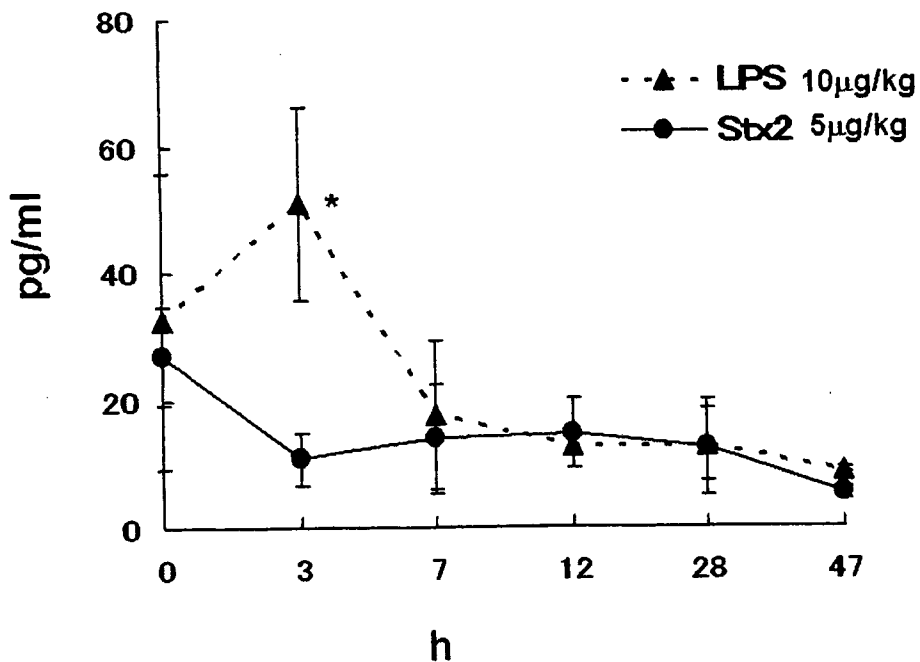
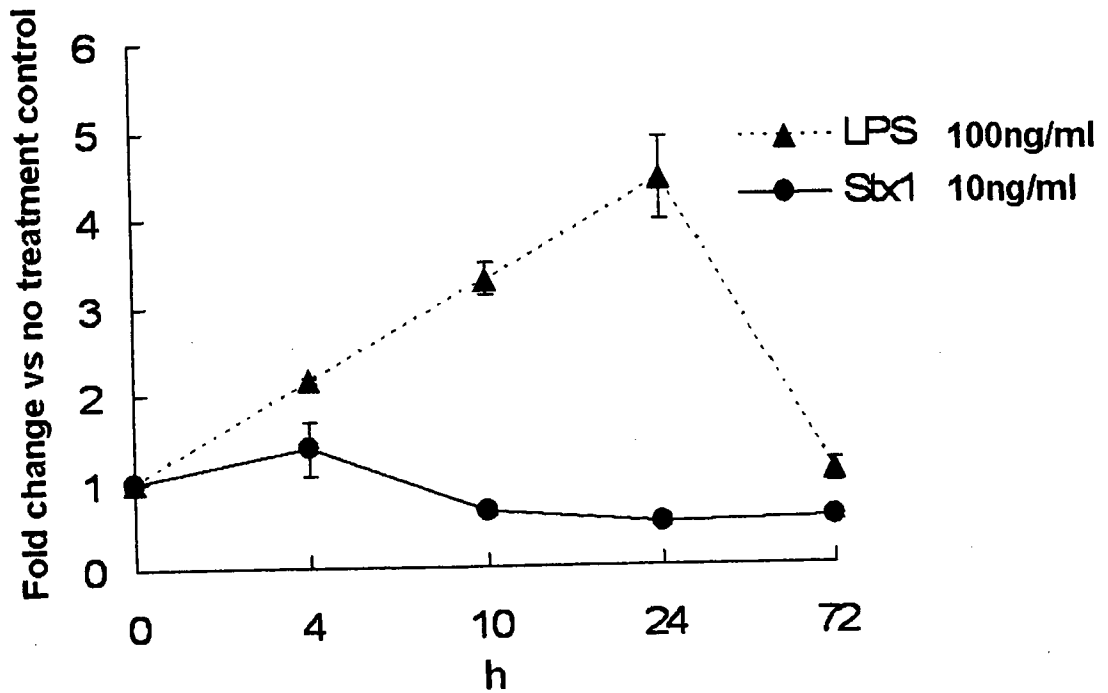


图7

Time course of IL-1 β activities in the brain primary mixed cell culture after the addition of Stx2 or LPS as measured by ELISA



12月3日(木)

一般質問

質問順位	8	神谷 寿広 議員 (一括質問一括答弁方式)	回答	保健所生活衛生課
通 告 事 項	3 食中毒について (3) 食中毒防止対策			
質 問 内 容	現状を踏まえた保健所における食品衛生監視の視点と市民への啓発			

通告事項 3(3)

12月3日(木)

<質問・回答>

現状を踏まえた保健所における食品衛生監視の視点と市民への啓発

食品衛生監視は、専門的知識を有する職員を食品衛生監視員に任命して実施しているところでございますが、最近の食中毒事件の原因や傾向を踏まえ、科学的な視点で食中毒を未然に防ぐよう、より具体的で、きめ細かな監視指導となるよう努めて参ります。

市民の皆さんへの食中毒予防啓発については、ホームページやチラシの他、職員による出前講座、市政だよりも活用して行ってきたところですが、依然として、レバ刺しやとり刺し、ユッケ等を食べての食中毒の発生が後を絶たないことから、本年8月10日には、「食肉の生食がもたらす細菌性食中毒の危険性」と題した特別講演会を開催する等積極的に啓発しているところでございます。さらに、飲食店に対しては、食肉を生で提供する場合には、その食中毒リスクをメニュー表等に記載することを普及させたいと考えているところでございます。

12月3日(木)

二次質問

質問順位	8	議員 (一括質問一括答弁方式)	回答	保健所生活衛生課
通告事項	3 食中毒について 二次質問			
質問内容	今後、さらに保健所として取り組むことがあるか。			

通告事項 3 二次質問

12月3日(木)

<質問・回答>

今後、さらに保健所として取り組むことはあるか。

昨年、本市において、食肉を原因とする食中毒が増加傾向であったため、焼肉店、焼鳥店等の飲食店に対し、「食肉を生もしくは十分に加熱しない料理の提供自粛」を文書で要請いたしました。

その反響といたしまして、飲食店としては、生食肉の提供は危険であるため、中止したい意識はあるが、客の要望により提供せざるを得ない現状があるとの意見が寄せられました。

全国的なデータでは、食中毒の一つである腸管出血性大腸菌O157感染症が小児において、重症化し、脳症や腎臓等を侵す病気である「溶血性尿毒症候群（HUS）」となり、死亡した事例の報告があります。

これらの症例を調査すると、発症前に焼肉店等でユッケなどの生肉が喫食されている等の背景があることも報告されています。

このように小児や高齢者、免疫力が低下している方が生の食肉を口にすることは、時として重大な結果に繋がっているというような、より具体的な情報も市民の皆さんにお知らせして参りたいと考えております。

また、併せて、飲食店でのメニュー表への食中毒リスク表記への協力もお願いしながら、飲食店の店舗内に掲示しやすく、かつ、市民の皆さんへ注意喚起ができるような内容のポスターを検討し、配布したいと考えているところでございます。

九州大准教授 細菌学

藤井 潤

私 視点

shiten@asahi.com

◆食の安全 牛レバーの生食、危険伝えよ



ケ、焼き肉料理が原因だった可能性があると判断された。06年は24件のうち13件、05年は24件のうち17件で生レバーなどが関係していたとみられ、原因の多くを占めている。

牛の生レバーやユッケなどを食べて、O157など腸管出血性大腸菌に感染する人が目立つ。きわめて危険で死亡することもあるのに、飲食店では幼児や児童、老人までもが平気で生肉を口にしている。これは、私

のように細菌学を専門とする立場からは自殺行為に映る。国や自治体は十分な啓発や防止措置を講じてほしい。

厚生労働省によると、腸管出血性大腸菌が原因で07年に発生した食中毒事件は25件。このうちの10件は牛の生レバーやユ

しかし強制力はないので、多くの飲食店はいまも加熱用の肉を生で客に出している。事実、埼玉県が8月、119店の飲食店を調べた結果でも、83.2%にあたる約100店が「生食用」の表示がない肉を生で提供していた。それどころか、驚くべきことに厚生労働省の調査では、07年度に全国のとちく場から出荷された生食用の牛レバーはゼロだった。牛レバーに限れば、市場には厚生労働省基準を満たす食材はそもそも存在しないことになる。

06年にレバーの生食で食中毒が発生したため、厚生労働省は98年に牛と馬の生食に関する衛生基準を定めた。それによれば、とちく場や食肉処理場、飲食店の肝臓処理は専用のまな板や包丁を使い、販売時は「生食用」と表示することなどがとされた。

厚生労働省はまた、若齢者や高齢者らが生肉を口にしないようにという注意喚起をしている。しかし、ほとんどの国民はいまだレバー刺しなどの危険を認識せず、「生食用」と表示された牛肉や馬肉が存在することさえ知

らないのではないかと。最近の知見では、牛の肝臓には、一定の割合で食中毒原因菌のカンピロバクターが存在することもわかってきた。厚生労働省は通知を出してよとせず、特に牛レバーの危険についてより積極的に国民に周知してほしい。

衛生基準のあり方も再検討すべきであろう。多くの店が基準が守られていない以上、メニューに生食用の肉を使っていることへの記載を義務づけるなど、より強い措置が必要ではないか。

私たちも、牛の生肉は時に人を死に至らしめることをよく認識し、飲食店は少なくとも加熱用牛レバーを生食用として提供するのをやめ、消費者も口にすることを避けてほしい。

朝日新聞社・主筆室「私視点」からshiten@asahi.comへ。電子メールアドレスは掲載しません。

© 朝日新聞社 無断複製転載を禁じます。すべての内容は日本の著作権法並びに国際条約により保護されています。

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

鶏肉を介する下痢症関連菌の分子診断と分子疫学
研究分担者 山本達男 新潟大学大学院教授

研究要旨

Campylobacter 感染症は鶏肉の消費に伴って増加してきた食中毒で、発生件数で見ると細菌性食中毒の一位を占める（2008年）。原因菌は主に *C. jejuni* で、*C. coli* も分離されるが、ともにグラム陰性のらせん菌で、両端に1本ずつ鞭毛をもつ双毛性菌で強い運動性を示す。本研究では、*C. jejuni* と *C. coli* の菌体構造を電子顕微鏡を用いて解析し、運動性に関連する特異な菌端構造（カップ様構造）を見いだした。この構造はらせん菌であるコレラ菌（*Vibrio cholerae* 01 や 0139）やヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）には存在しなかった。分子疫学として、わが国での鶏肉、ヒト腸炎、そしてギランバレー症候群（GBS）由来の *C. jejuni* と *C. coli* について multilocus sequence type（ST型）解析とパルスドフィールドゲル電気泳動解析を行った。タイ国の GBS 株についても解析を行った。その結果、*C. jejuni* と *C. coli* では ST 型が明確に異なっていた。*C. jejuni* の場合には、鶏肉由来株で6種類の ST 型が、ヒト腸炎由来株で11種類の ST 型が、そして GBS 由来株で5種類（うちタイ株で2種類）の ST 型が検出された。この内9つの ST 型（47.4%；9/19）は新型であった。世界分布型の ST21 型の検出は稀であった。ただし、頻度は低いながらもやはり世界分布型の ST22 型が鶏肉、ヒト腸炎、GBS から分離された。また、同一 ST22 型株が鶏とヒトで分離され、鶏・ヒト間の伝播が確認された。また10年以上にわたる定着も確認された。*C. coli* では、鶏肉由来株で1種類の ST 型が、ヒト腸炎由来株で4種類の ST 型が検出された。この内1種類が新型であった。*C. jejuni* でも *C. coli* でも、新型の ST 型はそれぞれの国・地域の土着株である可能性がある。

A. 研究目的

Campylobacter 感染症は鶏肉の消費に伴って増加してきた食中毒で、多くの国で頻度が高く、わが国の場合でも発生件数で見ると細菌性食中毒の一位を占める（2008年）。原因菌は主に *C. jejuni* で、*C. coli* も分離される。ともにグラム陰性のらせん菌で、両端に1本ずつ鞭

毛をもつ双毛性菌で強い運動性を示す。*C. jejuni* は経口的に摂取され、腸管に至ると腸炎（水様下痢、発熱を伴った血性下痢、腹痛）を発症する。さらに深部感染症である菌血症や Guillan-Barré syndrome（GBS）あるいは Miller Fisher syndrome（MFS）とも関連する。後者は特定の血清型（Penner heat-stable（HS）

serotype) と関連することが多い。近年、病原細菌の型別手法として multilocus sequence typing (MLST) による ST 型別解析が行われることが多くなってきた。*C. jejuni*でも2001年以降英国のDingleらのグループによって提案され、多くの報告がなされてきたが、わが国での解析報告はない。本研究では、まず *C. jejuni/coli* の構造的な特徴を電子顕微鏡を用いて解析した。次に、わが国とタイ国で分離された *C. jejuni/coli* について ST 型別解析を行った。動物とヒト間での伝播そして国・地域での定着を解析するためにパルスドフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を併用した。

B. 研究方法

1) 菌株

C. jejuni と *C. coli* は multiplex PCR 法によって同定した。解析した菌株は *C. jejuni* 37 株、*C. coli* 10 株の計 47 株であった。内訳は、2001 年から 2007 年に新潟県及び千葉県のプロイラー鶏で分離された *C. jejuni* 16 株及び *C. coli* 5 株、2001 年から 2009 年に新潟県及び千葉県の腸炎患者から分離された *C. jejuni* 14 株及び *C. coli* 5 株、1997 年に京都府の病院から分与された GBS 患者由来 *C. jejuni* 5 株、1997 年にタイ国から分与された GBS 患者由来 *C. jejuni* 2 株であった。プロイラー鶏由来株は、全てそれぞれ異なる農場で分離した菌株を用いた。また、運動解析と電子顕微鏡解析には *Campylobacter* と同様にらせん菌であるヘリコバクター・ピロリ

(*Helicobacter pylori*) とコレラ菌 (*Vibrio cholerae* 01/0139) を用いた。

2) 運動性解析

10%血清 (Fatal bovine serum) ブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で培養し、運動解析装置を用いて解析した。

3) 電子顕微鏡解析

C. jejuni を plastic coverslips 及び HEp-2 cell に粘着・感染させ、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定し、脱水後、臨界点乾燥を行い、金属蒸着しサンプルとした。サンプルは走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析用には、上記の脱水処理資料を EPOK812 処理し、超薄切片化した後、酢酸ウラニウム・クエン酸鉛で染色して解析に供した。

4) MLST 解析

MLST ウェブサイトに示された方法に従い 7 種類の必須遺伝子 house keeping gene (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* [*atpA*]) を解読、MLST ウェブサイト上で ST 型を決定した。さらに、ウェブ上の eBURST ソフトウェアを用いて clonal complex (CC 型) を決定した。

5) PFGE 解析

制限酵素 SmaI を用いて米国 PulseNet が推奨する方法に従って実施した。

C. 研究結果

1) 運動性に関連する特異な菌端構造

C. jejuni と *C. coli* はともに *H. pylori* や *V. cholerae* 01/0139 に比べて極めて強い運動性を示し、37°C での遊走速度は >100 $\mu\text{m/s}$ であった。