

201234009A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の有害衛生微生物を対象とした
ライブラリーシステム等の構築

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成25（2013）年3月

目次

I. 総括研究報告	
食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築.....	3
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
II. 分担研究報告	
1. 病原性大腸菌の病原性マーカーの検索、 食中毒原因食品からの原因菌確保手法の確立.....	17
工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
2. 細菌の分子疫学に関する基礎研究.....	45
泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)	
3. 真菌リスクプロファイルの作成および新規真菌分類法の確立.....	53
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
4. <i>Sarcocystis. fayeri</i> の輸入馬肉における汚染とその遺伝子型別.....	83
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部部長)	
5. 全国の地方衛生研究所におけるサルモネラおよび腸管出血性大腸菌に 関する試験研究の報告状況およびサルモネラの血清型別の検討.....	89
林 賢一 (滋賀県衛生科学センター)	
6. 地方衛生研究所のネットワーク構築に関する研究 市販の国産鶏肉におけるウェルシュ菌の汚染状況に関する調査.....	97
堀川 和美 (福岡県保健環境研究所)	
7. 地方衛生研究所のネットワーク構築班：市販鶏肉の食中毒菌汚染に関する研究 市販の国産鶏肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況.....	103
齊藤 志保子 (秋田県健康環境センター)	
8. 市販の国産鶏肉における <i>Campylobacter jejuni</i> 及び <i>C. coli</i> の汚染状況に関する研究.....	109
黒木 俊郎 (神奈川県衛生研究所)	
9. 地方衛生研究所のネットワーク構築班：市販鶏肉の食中毒菌汚染に関する研究...	117
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	123

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

主任研究報告書

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

主任研究者 小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)

要旨

毎年広域化食中毒の発生が絶えないが、その背景には食品流通の多様化・広範化が挙げられる。食中毒起因物質としては、食中毒細菌、真菌等の異物および寄生虫等の衛生微生物が挙げられる。そこで、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するため、これらの起因物質の科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関（国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所）と地方衛生研究所（地研）等の食品安全関係機関の間で、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することを目的とする。

本研究では1) 食品中から分離される食中毒細菌の汚染実態情報、菌株のPFGE解析等による分子疫学情報等の関連性を総合的に解析する手法を開発する。2) 消費者等から寄せられた食品中のカビ等に関する苦情について、地研が蓄積している情報を解析し、リスクプロファイルを作成する。3) 馬肉中のザルコシステイスの検査法を開発する。4) 1)~3)の情報を集約した効率的なライブラリーシステムを構築するため、地研等との間で共有を可能とする連携モデルを構築する。の4つの研究を行った。

今年度は1)の食品中から分離される食中毒細菌として、腸管出血性大腸菌とサルモネラを対象とした。腸管出血性大腸菌の主要な病原因子は志賀毒素であるが、志賀毒素以外にも多くの因子が病原性に関わるとされている。これまでに報告のある多数の病原因子について、様々な血清群の株においてその有無を調べ、包括的に解析することで腸管出血性大腸菌の高病原性の要因となる因子を特定し、腸管出血性大腸菌検出のマーカーとなる遺伝子の検索を試みた。その結果、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。特に*eae*、*espB*、*tir*はヒトに対する病原性の高いseropathotypeにおいて高頻度に検出され、高病原性の株を検出する指標として有用であることが示された。またこれまでヒトでの感染症発生が比較的稀な血清群にも高病原性を有する可能性のある菌が存在することが示唆された。サルモネラでは、主としてヒトからの食中毒細菌を対象にライブラリーシステムの構築を図ることを目的とし、サルモネラの病原因子パネルに基づくライブラリーの検討を行った。

次に真菌では、国立試験研究機関と地方衛生研究所などの間で、ネットワークシステムを介して食の安全に危害を及ぼすカビのリスクプロファイルを共有し、ヒトへの健康危害を防止することを目的とした。食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等の構築を行った。また、分子系統関係を利用した*Fusarium*属菌のマイコトキシン産生能の推定および黒コウジカビのカビ毒産生性を研究対象とした。危害カ

びに関する最新の情報を集めたリスクプロファイル集10菌種分を作成し、昨年度構築した厚労省食中毒調査支援システム（NESFD）にアップロードを行った。特定のマイコトキシンの産生性がこれまで確認されていなかった菌種について、*Fusarium*属菌の分子系統解析による分類および分子系統関係を元にしたマイコトキシン産生能の有無の推定を行い、従来マイコトキシン産生性が明らかにされていなかった数菌種について、潜在的な産生能の有無が示唆された。醸造用株を含む複数菌種の黒コウジカビを用い、フモニシン類およびオクラトキシンの産生性を検討した結果、全ての醸造用株ではいずれのカビ毒産生性も認められなかったが、非醸造用株である*A. niger*分離株では、株によりフモニシンB2およびオクラトキシンAの産生性が認められることが明らかになった。

*Sarcocystis. fayeri*に関する研究では、カナダ以外の馬肉生産国からの輸入馬肉に関して*S. fayeri*特異的定量PCR法を用いて、その汚染実態を調べた。生食用馬肉ではベルギー産、アルゼンチン産は残品以下のレベルであったが、メキシコ産において残品同等の食中毒リスクレベルの汚染が見られた。

地方衛生研究所との食品中の有害衛生微生物を対象としたネットワーク構築およびライブラリーのための情報発信方法の検討として、地方衛生研究所5機関を拠点としての実態調査機能を検討した。また、発信方法の基礎情報として、市販の国産鶏肉（非冷凍）各機関20検体ずつ合計100検体を対象に、サルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌およびウェルシュ菌の汚染実態について調査した。その結果黄色ブドウ球菌が最も高く、65.0%（黄色ブドウ球菌エンテロトキシン（以下、SEs）遺伝子陽性は、35.0%）。次いで、カンピロバクターが50.0%。ウェルシュ菌が35.0%（エンテロトキシン（以下、ET）遺伝子は、全て陰性）、サルモネラが30.0%であった。今後は、このような調査において得られた菌株を対象にして詳細な解析を行い、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、食品中の有害微生物の科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関と地方衛生研究所の間で効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することが重要である。

分担研究者	長谷川 朗生（東京大学大学院）
工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）	江藤 良樹（福岡県保健環境研究所 病理細菌課）
野崎 智義（国立感染症研究所 寄生動物部部長）	市原 祥子（福岡県保健環境研究所 病理細菌課）
泉谷 秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）	石川 和彦（滋賀県衛生科学センター）
林 賢一（滋賀県衛生科学センター）	福島 敬介（滋賀県衛生科学センター）
齊藤志保子（秋田県健康環境センター）	八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）
堀川 和美（福岡県保健環境研究所）	寺嶋 淳（国立感染症研究所 細菌第一部）
黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）	高橋 治男（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）
協力研究者	

渡辺麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
小林 直樹 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
長尾 清香 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
久米田裕子 (大阪府公衆衛生研究所)
千葉 隆司 (東京都健康安全研究センター)
橋本ルイコ (千葉県衛生研究所)
小林 昭彦 (さいたま市健康科学研究センター)
相川 勝弘 (神奈川県衛生研究所)
渡辺 祐子 (神奈川県衛生研究所)
古川 一郎 (神奈川県衛生研究所)
石原ともえ (神奈川県衛生研究所)
福島 敬介 (滋賀県衛生科学センター)
向井 晃一 (滋賀県衛生科学センター)
青木 佳代 (滋賀県衛生科学センター)
梅原 成子 (滋賀県衛生科学センター)
河野 智美 (滋賀県衛生科学センター)
石川 和彦 (滋賀県衛生科学センター)
井上 剛彦 (滋賀県衛生科学センター)
白石 理奈 (さいたま市健康科学研究センター)
加藤 直樹 (さいたま市健康科学研究センター)
小田切正昭 (さいたま市健康科学研究センター)
千葉真知子 (秋田県健康環境センター)
和田恵理子 (秋田県健康環境センター)
八柳 潤 (秋田県健康環境センター)
熊谷 優子 (秋田県健康環境センター)
高橋 志保 (秋田県健康環境センター)
今野 貴之 (秋田県健康環境センター)
村上 光一 (福岡県保健環境研究所)
濱崎 光宏 (福岡県保健環境研究所)
江藤 良樹 (福岡県保健環境研究所)
大石 明 (福岡県保健環境研究所)
前田詠里子 (福岡県保健環境研究所)

A. 研究目的

食中毒の発生も広域化しやすい傾向にあり、国立試験研究機関と地方衛生研究所の情報の共有および研究体制の協力体制を強化する必要が強く望まれている。輸入食品等も増加の一途をたどっており、検疫では諸外国での食中毒情報を迅速に反映して、モニター検査等を行っている。しかしながら、検疫で検査される検体数は限られているため、市場におけるモニタリング、すなわち各自治体における収去検査等が食中毒予防に重要な位置を占めると考えられる。そこで、国立試験研究機関と地方自治体の衛生研究所又は食品衛生関連部署との情報の交換および場合によってはアラートの発信などが相互に行われることが必要である。

このような背景から、我が国の食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、食品中の食中毒細菌、カビおよび寄生虫を対象に、あたらしい病原性マーカーに関する知見を見出すとともに、市場における実態調査を地方自治体において行い、その結果を集約して、全国に発信できるシステムを構築することを本研究事業として目指す。

いままでに食中毒患者の情報は、国立感染症研究所を中心にシステムを構築されてきているが、食品を対象とした同様のシステムはまだない。しかしながら、米国では食品からの食中毒起因菌データベースを作成し、食中毒原因食品特定に役立てようとするシステムが動いている。

本研究では1) 食品中から分離される食中毒細菌(腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌)2) 消費者等から寄せられた苦情における食品中のカビのリスクプロファイルの作成と発信3) 輸入食品を含む食品中の寄生虫を対象に、市販食品を対象とした実態調査、検査法の確立・普及等を行う。最終年である本年は、地研ネットワークの試みとして、全国5カ所を拠点として市場の食品の実態調査を行い、その結果を集約して解析を試み

た。

B. 研究方法

1. 病原性大腸菌の病原性マーカーの検索と食中毒原因食品からの原因菌確保手法

供試菌株は、EHEC感染症患者および無症状病原体保有者などヒトから分離された130株、ウシなどの動物から分離された135株、食品から分離された16株、由来不詳の6株を含む54血清群287株を用いた。疫学情報をもとに判定した病原性の強さによって血清型を分類したseropathotypeに照らし合わせると、seropathotype Aが29株、seropathotype Bが92株、seropathotype Cが23株、seropathotype が143株であった。

病原遺伝子は、*stx*バリエーションから6遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) 染色体上に存在する病原遺伝子から5遺伝子 (*iha*, *espB*, *espD*, *tir*, *eae*) とプラスミド上に存在する6遺伝子 (*exhA*, *saa*, *espP*, *katP*, *stcE*, *subA*) を選択し、合計17遺伝子について保有性を検出した。

Population structure解析は供試菌株を17種の病原遺伝子保有パターンに基づきグループ分けするため、クラスター分析を行なった。

2. サルモネラ属菌の分子疫学

Huehnらの報告に基づいては病原因子等およびPathogenicity Islandデータベース (PAI) 等を参考に、指標となりうる69種類の遺伝子を選択し、それに対応するPCRプライマーを設計し、PCRによる(病原)因子パネルの作成を試みた。PCRは1反応あたり2-3遺伝子を検出するマルチプレックスPCRで行った。

3. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築、遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定および黒コウジカビのカビ毒産生能有害カビを対象にしたライブラリーシステム等

構築は、①ネットワークのリファレンスセンターである国立衛研、地域拠点である大阪府、東京都、千葉県 of 各地方衛研の協力研究者の間で議論を行い、カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して、今年度のリスクプロファイル個票作成対象菌種を10菌種選定した。結果を厚労省食中毒調査支援システム (NESFD) でのネットワークシステム「食品中のカビリスクプロファイル集」にアップロードした。さらに地方試験研究機関真菌担当の参加希望者を募り、「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会を開催した。Fusarium属菌の遺伝子塩基配列解析は、トリコテセン類を産生する菌種およびその近縁菌種を対象として、Fusarium属菌16菌種32菌株を供試した。これらの菌株について、rDNAクラスター領域、 β -tubulin遺伝子およびelongation factor 1 α 遺伝子塩基配列を、シーケンスの決定またはNCBIのデータベースGenBankからダウンロードすることによって収集した。解析は“phylotoxic relationships”に基づく解析法を行う、分子系統解析による分類およびマイコトキシン産生能有無の推定を行った。

4. Sarcocystis. fayeri の輸入馬肉における汚染実態とその遺伝子型別の決定

前年度報告した調整方法に基づいて馬肉試料からのDNA抽出ならびに精製を行った。定量PCRは前年度報告した方法に基づき、S. fayeri 特異的定量PCRを行った。

種内変異の検出に有用とされるITS-1 (internal transcribed spacers 1) のDNA増幅は、すでに報告されたプライマーを用いて行った。また制限酵素解析のためにAse1, Hae3, Hpa2, Mse1, Mps1, Rsa1を用いてPCR産物を消化し、3%アガロースゲルで電気泳動を行い切断パターンを調べた。

5. 食品中の食中毒菌実態調査

平成24年7月22日～10月29日の間に、本研究に参加している地方衛生研究所5機関が、国産

の凍結されていない市販鶏肉を20検体ずつ、計100検体（モモ肉49検体、ムネ肉36検体、ササミ12検体およびその他3検体）を購入し調査対象とした。

サルモネラの検査法は、国立医薬品食品衛生研究所「食品からの微生物標準試験法検討委員会」が定めたサルモネラ属菌標準試験法NIHSJ-01-ST4（090218、090623一部修正、091014一部修正37℃対応）に準拠し、O群型別に加えてH型別も行い、血清型名を調べた。

カンピロバクターは、プレストン増菌培地で培養法を行い、*Campylobacter jejuni/coli*の鑑別同定は、グラム染色、カタラーゼ試験およびオキシダーゼ試験を実施し、らせん状または球状のグラム陰性桿菌、カタラーゼ陽性およびオキシダーゼ陽性の集落を選択した。菌種の決定には、馬尿酸塩加水分解試験、インドキシル酢酸塩加水分解試験、PCR法による*C. jejuni*および*C. coli*の判別を行った。PCR法による*C. jejuni*および*C. coli*の判別は、5機関の地方衛生研究所において通常利用している市販のキットあるいは既報のプライマーを用いたPCRシステムにより行った。

黄色ブドウ球菌検査方法は、「食品衛生検査指針2004（微生物編）厚生労働省監修」、「食品からの微生物標準試験法検討委員会 プロトコールNo.NIHSJ-03黄色ブドウ球菌試験法 最終案091117」に準拠した。すなわち直接分離培養は卵黄加マンニット食塩寒天培地、卵黄加ベアード・パーカー培地、食塩卵黄寒天培地のうちいずれか2種類を使用した。

増菌培養は7.5%NaCl加トリプトケースソイブロスを用い35～37℃で48時間培養した。

卵黄反応陽性の定型コロニーについて、確認試験として、コアグララーゼ試験、クランピングファクター試験、グラム染色を実施し、コアグララーゼ試験陽性、グラム染色陽性のブドウ状球菌を

黄色ブドウ球菌と確定した。

黄色ブドウ球菌と確定された株について、ブドウ球菌エンテロトキシン(SEs)遺伝子の検出をPCR法により実施した。標的遺伝子はブドウ球菌エンテロトキシンSEA～SEEの遺伝子、*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*とし、一部の検体についてはSEG, SEH, SEIの遺伝子、*seg*, *seh*, *sei*のPCRも実施した。

ウェルシュ菌は、推定ウェルシュ菌数をパウチ法、ウェルシュ菌の検出はパウチ法および増菌培養法により実施した。検査方法は食品衛生検査指針¹⁾に準拠した。エンテロトキシン産生遺伝子の確認は、ウェルシュ菌と同定された菌株について、ウェルシュ菌毒素産生遺伝子検出用プライマー（TaKaRa）を用い、PCRによりエンテロトキシン産生遺伝子の有無を確認した。

C. 研究結果および考察

1. 病原性大腸菌の病原性マーカーの検索と食中毒原因食品からの原因菌確保手法

各seropathotype間での病原遺伝子保有率の比較を行った。*stx*のバリエーション6遺伝子の内、*stx1*についてはseropathotype Bで82%、次いでseropathotype Aで66%、seropathotype D・Eで43%、seropathotype Cで26%であった。*stx2*についてはseropathotype Aで86%、次いでseropathotype Cで74%、seropathotype D・Eでは52%、seropathotype Bでは38%であった。*stx2c1*はいずれのseropathotypeでも50%以下の低い保有率であった。*stx2d*の保有はseropathotype D・Eで42%の保有が見られたものの他のseropathotypeでは低く、特にseropathotype Bでは2%、seropathotype Aでは保有する株は存在しなかった。*iha*, *espP*, *ehxA*の3遺伝子はseropathotype Aで95%以上の高い保有率を示すものの、他のseropathotypeにおいても高い保有率が見られた。その結果、*stx*については*stx1*が高い病原性を示すseropathotype

eであるseropathotype Aおよびseropathotype Bで共に高く、高病原性に関与する可能性が示唆された。*stx2*は特に病原性の高いseropathotype Aにおいて最も高い保有率を示したが、感染症発生率の低いseropathotype CにおいてAに次ぐ保有率が示され、高病原性に関連があるとは言えなかった。

*stx*以外の遺伝子については、病原性の高いseropathotype Aおよびseropathotype Bでともに高く、その他のseropathotypeで低い遺伝子として、*eae*、*espB*、*espD*、*tir* が検出され、これらは病原性を誘起する因子と考えられた。また、*stcE*は特に高い病原性を示すseropathotype Aの株全てで保有が確認されたことから、*stcE*はseropathotype Aに特異的な遺伝子であると考えられた。今回対象とした病原遺伝子の中で、*iha*、*espP*、*ehxA*は全てのseropathotypeにおいて高い保有率が検出され、高病原性との相関は見られなかった。

集団遺伝学的手法による解析を行った結果、Population structure解析によるクラスタリングでは、*K*=6および*K*=7では各クラスターに属する確率*Q*値ごとにグループ分けが可能であった。

Seropathotype Aではすべての株においてクラスター1に属する確率が最も高くなった。seropathotype Bでは5株（5%）がクラスター1に、38株（41%）がクラスター2に、49株（53%）がクラスター3に属する確率が最も高くなった。血清群ごとに見ると、O26は主にクラスター2に対する*Q*値が高い株が多く、O103、O111、O121はクラスター3に対する*Q*値が高い株が多かった。O26およびO145にクラスター1に対する*Q*値が高い株が存在した。seropathotype Cではクラスター1に対する*Q*値が最も高い株が4株（17%）、クラスター4が12株（52%）、クラスター6が7株（30%）であった。血清群ごとにみるO165の4株全てがクラスター1に対する*Q*値が最も高くなり、O91およびO104はクラスター6に対する*Q*値、O113はクラスター4に対する

*Q*値が最も高かった。最後にseropathotype D・Eはクラスター1に対する*Q*値が最も高くなる株は検出されず、クラスター2から6のいずれかのクラスターに対する*Q*値が最も高くなった。クラスター4、5、6に属する株が全体の9割を占めた。残りの1割であるクラスター2及び3に属する株の血清群は、O14、O16、O45、O63、O74、119、128、OUTであった。

このことから、seropathotypeの分類と病原遺伝子の保有パターンは相関していることが示された。つまり、クラスター1、2、3に分類される病原遺伝子保有パターンは病原性を示す可能性が高く、特にクラスター1の保有パターンは最も強い病原性を示す可能性がある。一方でクラスター4、5、6に分類される病原遺伝子保有パターンは病原性を発揮する可能性が低いと考えられた。病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。

Population structure解析において*K*=7としたときの*Q*値が最大となるクラスターごとに供試菌株を分類し、各クラスターの病原遺伝子保有率を算出した。*stx*のバリエーション6遺伝子のうち、*stx1*はクラスター2および5で95%以上の高い保有率を示し、クラスター4および6では保有率が低かった。*stx2*はクラスター1で最も高い保有率（89%）を示し、次いでクラスター4（73%）となった。クラスター2では*stx2*の保有率は低かった（12%）。*stx2*のバリエーションはいずれのクラスターにおいても高い保有率は示されず特徴的な分布はなかった。これらの結果から病原性を示す可能性の高い遺伝子保有パターンであるクラスター1、2、3において保有率が高く、病原性を示す可能性の低い保有パターンであるその他のクラスターにおいて保有率の低い遺伝子である*eae*、*espB*、*tir* は病原性の発揮に強く関与する可能性がある。また、クラスター1のみで保有率の高い遺伝子として*stcE*が挙げられ、

この遺伝子は特に強い病原性を付与する主要な因子として機能している可能性が考えられた。

2. サルモネラ属菌の分子疫学

invAなどSPIに含まれる代表的な遺伝子のほか、SGII (Salmonella Genomic Island-1) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロフェージ、線毛などの遺伝子も含まれた。およそ30血清型からなる150株について解析した。invAなどの主要なSPIに含まれる遺伝子は全ての株に共通に保有されていた。亜種IVに属す株ではsseCなどが欠けており、最も離れたグループを形成した。

Enteritidis、Saintpaulなど複数株試験した血清型の大半は、血清型ごとにクラスターを形成した。これらの血清型についてはより多くの菌株を試験し、典型的なグループを見出していく必要があると考えられる。

S.Infantisも血清型特異的なクラスターを形成した。S.Infantisのクラスターには、irp2遺伝子の有無によって分けられる2つのグループの存在が示唆された。

3. 食品中の有害カビ

1) 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築

カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して、10菌種を対象にリスクプロファイル個票を作成し、NESFDシステムを利用した「食品中のカビリスクプロファイル集」にアップロードした。「食品中のカビリスクプロファイル集」評価会では、リスクプロファイル集を参照しながら食品由来カビを同定したところ、同定技術が向上したという評価を得た。

2) 分子系統関係を利用したFusarium属菌のマイコトキシン産生能の推定

分子系統解析の結果、供試した16菌種はクレード1および2に分かれ、この分類は従来認識されるトリコテセン類の産生性の有無と概ね一致した。

トリコテセン類の産生性が確認されている菌種が多く入るクレード1は、さらにサブクレードa~dに分かれた。マイコトキシン産生性マトリックスをもとに、図12の分子系統関係を利用してマイコトキシン産生能有無の推定を行った結果、Fusarium属菌の進化の歴史において、産生能の獲得・喪失が起こった頻度が最も高かったものはTriAで、最も頻度が低かったものはMONおよびZENであり、マイコトキシンの種類間で獲得・喪失の起こり易さに差が認められた。

3) 黒コウジカビのカビ毒産生性

焼酎醸造株は、そのタイプ種とされるA. imuiiを含め、これまでの結果と同様に、フモニシン、オクラトキシンの産生性は認められなかった。醸造株とA. nigerは系統的に極めて近縁であるが醸造株は酵素力などの形質を重視した淘汰の繰り返しにより作出されたもので、カビ毒産生能を喪失した可能性もある。一方、A. niger分離株では、株によりオクラトキシンA、あるいはフモニシンB2の産生が認められた。蔗糖を添加し浸透圧を高めたCY20S培地では、コメ（白米）培地よりフモニシンの産生量は上昇し、これまでの報告と一致した。糖添加は、食品の微生物制御に、一般的に用いられることから、糖濃度を高めたA. niger汚染食品におけるフモニシン汚染は、注意を要することを示唆した。

4. Sarcocystis. fayeri の輸入馬肉における汚染実態とその遺伝子型別の決定

生食用として販売されていた馬肉の中ではベルギー産馬肉およびアルゼンチン産馬肉は食中毒残品より低いDNA量であった。特にメキシコ産馬肉は、カナダの高汚染馬肉とほぼ同等の結果であった。一方、ペットフード用として販売されている馬肉に関しては、メキシコ産馬肉では残品同等のDNA量が認められる場合があった。結果を全体的にみると、国によらずザルコシストの分布には偏

りがあることが示された。

馬肉は日本の他にヨーロッパ諸国のいくつかの国であるが、生食あるいはそれに近い形で食されてきた歴史がある。その中で馬肉に感染するザルコシスティスがヒトの健康被害を起こすという事例は、わが国の*S.fayeri*による食中毒発生が明らかになるまでひとつの報告もなかった。ゆえに*S.fayeri*による食中毒は極めてユニークな問題であると言えるものであり、発生原因の解明、そしてリスク要因の解明とリスク評価など今後の課題が多数残されている。本年度研究では、日本とカナダ以外の馬肉生産国より生産される馬肉中に*S.fayeri*を探索し、カナダ産馬肉の一部に見られる食中毒残品と同等の汚染が、メキシコ産馬肉でも見られることを明らかにした。国外の複数国（現状ではカナダとメキシコ）で食中毒リスクのある*S.fayeri*汚染が見られる現状は、各国間で生体馬体および馬肉が牛、豚とそれらの肉と同様、活発に輸出入される貿易状況がその背景にあり、*S.fayeri*汚染もそれに伴って移動、拡散する可能性を示すものである。日本が経験したこれまでになかった馬肉食中毒が、馬や馬肉製品の消費と流通の変化により世界の馬肉消費国でも起こりうることは、現状で想定範囲内のことと考える必要があるであろう。馬肉の安全性確保の面からは*S.fayeri*汚染の地域特定、拡散防止は将来的な問題になると思われる。

5. 食品中の食中毒菌実態調査

1) 鶏肉のサルモネラ汚染

サルモネラの調査結果から鶏肉100検体中54検体（54.0%）からサルモネラが分離された。

検出されたサルモネラの血清型は、54検体のうち6検体からは2種の血清型のサルモネラが検出された。また、検出されたサルモネラ血清型は、型別不明を除き9種に分別された。

平成21～23年度に厚生労働省事業として行われた「食品の食中毒菌汚染実態調査」由来のサルモ

ネラの検出状況と比較すると、厚生労働省事業由来（鶏肉ミンチ肉）のサルモネラの血清型は、Infantis(O7群)が最も多く、次いでSchwarzengrund(O4群)、Manhattan(O8群)、Typhimurium(O4群)の順であったが、今回の調査成績は、Infantis(O7群)が最も多く、次いでSchwarzengrund(O4群)の検出頻度が高かったことは同様であったが、その他の血清型の検出傾向はやや異なっていた。サルモネラは食中毒の原因菌として重要な位置にある。今回、5機関の地方衛生研究所で実施した成績では100検体中54検体（54.0%）の鶏肉からサルモネラが検出され、先の厚生労働省事業における調査成績とほぼ同様の傾向であることが伺えた。生産地域別に集計したところ、四国・九州地域、北海道・東北地域、近畿地域の順で検出率が高かったが、大きな差異は認められず、鶏肉への汚染は全国的であることが再確認された。

2) 鶏肉のカンピロバクター汚染

*C. jejuni*あるいは*C. coli*の汚染実態は、分離された鶏肉は71検体であり、市販されている国産鶏肉の71%が*C. jejuni*あるいは*C. coli*に汚染されていた。菌種別の分離率は、*C. jejuni*が65%、*C. coli*が13%となっており*C. jejuni*の汚染率が*C. coli*より高かった。同一検体から*C. jejuni*および*C. coli*の両菌種が分離された検体は7検体（7%）であった。*C. lari*が1検体（モモ）から検出された。鶏肉の産地の地域別の*C. jejuni*あるいは*C. coli*が分離された割合は、62.5%から82.4%で、菌種別の分離率ではいずれの地域でも*C. jejuni*のほうが*C. coli*よりも分離率が高かった。 χ^2 検定により部位別及び産地の地域別の分離率を比較したところ、有意差は得られなかった。今回の調査では国産の市販鶏肉の71%が*C. jejuni*あるいは*C. coli*に汚染されていることが確認され、各機関ともに高い汚染率が得られた。さらに鶏肉の部位別の汚染率は、ムネ、モモ、ササミおよび3部位以外のいずれに

においても60%以上を示した。菌種別に見ると、*C. jejuni*は部位別で53.1~77.8%となり、*C. coli*と比較して高い汚染率を示し、全体では65.0%であった。*C. coli*が分離された13検体については、半数以上の7検体から*C. jejuni*が分離されており、本研究では各検体から2~5菌株を分離したが、*C. coli*の分離率が低かったのは釣菌数が少なかったことが関連していることも推定されることから、菌種別の汚染率について詳細な解析を可能にするにはより多くの菌株を釣菌することが必要であると思われる。地域別の汚染率に有意差はなく、国内に流通する国産鶏肉については、産地あるいは部位別にかかわらずその50%以上が*Campylobacter*に汚染されており、特に*C. jejuni*の汚染率が高いことが確認された。今回の鶏肉における食中毒原因菌の汚染実態調査では、*C. jejuni/coli*に高率に汚染されている実態が改めて明らかになった。*C. jejuni/coli*の感染菌量は100個程度とされており、比較的少数の菌により感染が成立する可能性があり、鶏肉を介して*C. jejuni/coli*に感染するリスクが高いことが推測される。

今年度の研究においては、鶏肉における食中毒原因菌の汚染状況調査を実施し、ライブラリーシステム構築のための基礎的データの蓄積を行った。今後は、このような調査において得られた菌株を対象にして型別などの詳細な解析を行い、そのデータを公表して食中毒や感染症の解明や予防に役立てることが重要である。

3) 鶏肉のブドウ球菌汚染実態

鶏肉100検体中47検体から黄色ブドウ球菌が分離された。その陽性検体47検体中34検体(72.3%)が増菌培養でのみ分離陽性であり、その汚染菌数は1以上100未満/gと考えられた。肉の部位別汚染率は、ムネ肉が最も高く58.3%、次いでモモ肉46.9%、ササミは最も低く16.7%であった。

また、生産地域別の分離率をみると、四国・九

州地域産が59.4%、次いで北海道・東北地域産が43.8%、近畿地域産が35.3%、そして生産地の記載が‘国産’であった鶏肉が42.1%であった。生産地域別の分離率に有意差は認められなかった

($P < 0.05$)。SEs遺伝子のPCR検査結果については、直接培養及び増菌培養において分離された黄色ブドウ球菌162株についてSEs遺伝子の保有を検索したところ60株(37.0%)でSEs遺伝子が確認された。検体としては黄色ブドウ球菌分離陽性47検体中SEs遺伝子保有株が分離された検体は19検体(40.4%)であった。

黄色ブドウ球菌の食中毒事例の原因としては人に定着しているブドウ球菌が重要とされているが、今回鶏肉においても黄色ブドウ球菌の汚染率が47%と非常に高率であることが確認された。鶏肉部位別では汚染率に差がみられたが、食鳥処理行程における汚染を反映しているものと考えられた。汚染菌数は本調査では1g当たりの汚染菌数が 10^2 個未満の検体が多く、最も高濃度の検体でも 6.2×10^3 であった。しかし、鶏肉における高率な汚染は、不適切な取り扱いにより、食中毒の原因となる可能性を有することから、その取り扱いなどにさらなる注意喚起が必要と考えられた。ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるSEsについては、SEA,SEB,SEC,SED,SEEがブドウ球菌食中毒原因の95%とされているが、近年SEA~SEE以外の新しい型が報告されている。今回は検体・分離株の一部について新型のSEG(*seg*)、SEH(*seh*)、SEI(*sei*)について検索したが、その保有株が確認された。

4) 鶏肉のウェルシュ菌実態調査

パウチ法にて実施した鶏肉100検体の推定ウェルシュ菌数は、48検体が1 CFU/g未満であった。推定ウェルシュ菌数の最大値は190 CFU/gで、近畿地域で生産された鶏のムネ肉から検出された。各部位のパウチ法および増菌培養法によるウェルシュ菌の検出率は、モモ36.7%、ムネ41.7%およ

びササミ33.3%で、部位による有意差は認められなかった。パウチ法により分離されたウェルシュ菌68株および増菌培養法により分離された23株について、PCR法によりエンテロトキシン産生遺伝子保有の確認を行ったが、91株すべて陰性であった。

国内におけるウェルシュ菌食中毒は、厚生労働省の食中毒統計によると、その年により変動はあるものの年間約20-40件で平均約30件に留まり、全事例数の数%である。しかし、本菌による食中毒は1事例あたりの患者数が多く、患者数で見ると10%を超え、重大な事件となった事例が多い。この要因として、煮込み料理など大量に調理された食品が原因食品であることが挙げられる。特に食肉が関係した原因食品が多い。今回100検体ではあるが、部位別のウェルシュ菌の検出率に大差がないことから、食肉の生産工程での汚染であると推察された。一方で、ウェルシュ菌による食中毒は、ウェルシュ菌が芽胞を形成する際に産生・放出されたエンテロトキシンにより下痢を伴った食中毒症状が引き起こされる。今回調査では、エンテロトキシン産生遺伝子を保有するウェルシュ菌は分離されなかった。しかし、パウチ法に比べ増菌培養法では検出率が低かったことなどから、使用培地や検査法について十分な検討が必要であると考えられた。

D. 結論

病原性大腸菌の病原性マーカーに関する研究から、疫学情報を基に病原性の強さにより血清群を分けたseropathotypeの分類は病原遺伝子の保有パターンとよく相関しており、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。ヒトに対する病原性が高いEHECを検出する指標として*eae*、*espB*、*tir*が有用であり、また*katP*および*stcE*は特に強い病原性を持つEHECの指標となることが示唆された。

サルモネラの病原性マーカーに関する研究では、病原因子パネルの検討を行い、いくつかの血清型については特異的クラスターを形成することが示唆された。また、*Infantis*には2つのグループが存在することが示唆された。

リスクプロファイル作成対象カビとして、今年度は10菌種を対象にリスクプロファイル個票を成した。NESFDに構築済みの「食品中のカビリスクプロファイル集」に、リスクプロファイル個票を始めとした情報のアップロードを行った。分子系統関係を利用した*Fusarium*属菌のマイコトキシン産生能の推定、および醸造用黒コウジカビのカビ毒産生能についての検討を行った。今後、本研究で得られた研究結果のアップロードを中心としてライブラリーシステムの内容を充実させていくとともに、NESFDの周知を行って、これの積極的な活用を促進していく必要がある。

馬肉のザルコシスティスに関する研究では、国内で馬肉生食による食中毒の原因となった*S.fayer*は、*S.fayer*特異的定量PCRによる解析の結果、世界の馬肉生産国において存在し、地域によっては食中毒リスクの汚染が見られることが判明した。

地方衛生研究所5カ所を拠点に行った試行的実態調査では、対象を鶏肉としてサルモネラ、カンピロバクター、ブドウ球菌、ウェルシュ菌の4菌種を測定した。その結果サルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌の高率な汚染実態を示す資料が得られた。ウェルシュ菌においては40%近い汚染が見られた。この結果から、食中毒の予防を目的とした地方自治体レベルでの収去検査とその結果共有を国立試験研究機関との連携で行っていく必要があることが強く示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Lee, K., French, N. P., Jones, G., Hara-Kudo,

- Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., Sugita-Konishi, Y. and Kumagai, S. Variation in stress-resistance patterns among stx genotypes and genetic lineages in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3361-3368. 2012.
- 2) Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 157:95-101. 2012.
- 3) Izumiya, H., Terajima, J., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Watanabe, H., Kai, A., Kurazono, T., Taguchi, M., Asai, T., Akiba, M., Matsumoto, Y. and Tamura, Y.: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg. Infect. Dis.* (in press)
- 4) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishi Y. and Kamata Y. Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin producing potential. *Food additives and contaminants.* (in press)
2. 学会発表
- 1) 長尾清香, 李 謙一, 小西良子, 工藤由起子 : 志賀毒素産生性大腸菌が保有する病原因子と血清群との関連性の解析. 第33回日本食品微生物学会学術総会, 平成24年10月, 福岡
- 2) 福島敬介, 河野智美, 梅原成子, 青木佳代, 坂口初美, 向井晃一, 石川和彦, 林 賢一 : 滋賀県内で処理された食鳥肉の食中毒菌汚染の実態について. 第43回滋賀県公衆衛生学会, 平成25年2月, 大津
- 3) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishi Y. and Kamata, Y. Application of phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species to the prediction about the potential mycotoxin-productivity. *MycoRed 2012 (2012.6)*(Ottawa)
- 4) 渡辺麻衣子, 米澤隆弘, 小西良子, 鎌田洋一 : *Fusarium*属菌のマイコトキシン産生能を推定する—分子系統解析の有用性—. 日本マイコトキシン学会第71回学術講演会, 平成24年7月, 那覇
- 5) 渡辺麻衣子, 北山真弓, 吉成知也, 橋本レイコ, 川上 浩, 高橋治男, 小西良子, 鎌田洋一 : 食品由来*Aspergillus niger*のフモニシン類産生性スクリーニング手法についての検討. 日本食品微生物学会第33回学術総会, 平成24年10月, 福岡
- 6) 渡辺麻衣子, 大波純一, 足立淳, 小西良子, 鎌田洋一 : *Fusarium proliferatum*ゲノム中の転移因子探索のためのドラフトゲノム解析. 第7回日本ゲノム微生物学会年会, 平成2013年3月, 長浜

II. 分担研究報告

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進事業

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築

分担研究報告書

病原性大腸菌の病原性マーカーの検索、食中毒原因食品からの
原因菌確保手法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

研究協力者 齊藤志保子 秋田県健康環境センター
古川一郎 神奈川県衛生研究所
河野智美、青木佳代 滋賀県衛生科学センター
前田詠里子、江藤良樹、堀川和美 福岡県保健環境研究所
小林直樹、長尾清香 国立医薬品食品衛生研究所

要旨

腸管出血性大腸菌は下痢性大腸菌の中でも病原性が強く重症者や死者も発生するため、社会的に大きな問題となる危害性微生物である。腸管出血性大腸菌の主要な病原因子は志賀毒素であるが、志賀毒素遺伝子を有する血清群間でも発症率の高さや症状の重篤度に違いがあることが知られている。志賀毒素以外にも多くの因子が病原性に関わるとされており、病原性を決定する因子についての議論は尽きない。本研究では、これまで腸管出血性大腸菌において報告のある多数の病原因子について、様々な血清群の株においてその有無を調べ、包括的に解析することで腸管出血性大腸菌の高病原性の要因となる因子を特定し、腸管出血性大腸菌検出のマーカーとなる遺伝子の検索を試みた。病原性遺伝子の保有パターンと疫学情報をもとに判定した病原性の強さにより血清型を分類した seropathotype との間に相関が見られ、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。特に *eae*、*espB*、*tir* はヒトに対する病原性の高い seropathotype において高頻度に検出され、高病原性の株を検出する指標として有用であることが示された。また *katP* および *stcE* は特に強い病原性を持つ腸管出血性大腸菌の指標となることが示唆された。さらに、これまでヒトでの感染症発生が比較的稀な血清群にも高病原性を有する可能性のある菌が存在することが示唆された。

A. 研究目的

食品汚染の原因微生物として重要な病原性大腸菌は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) や腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) など5つのカテゴリーに分けられる。中でも EHEC は多くの患者が出血性大腸炎を起こすほか、重症化して溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などを引き起こすこともあるなど病原性が強いことが知られている。日本国内では 1996 年に大阪府堺市をはじめ各地で起こった集団食中毒[1]により広く認知されるようになり、現在は全数把握の対象疾患として発生動向調査が行われている。感染症発生動向調査によると EHEC 感染症は毎年 4,000 例前後が報告され、約 2,000 人の患者が発生している[2]。感染者から分離される株の約 7 割は血清群 O157 であり、次いで多数検出される血清型として O26、O111、O103、O145、O121 などがある。これら主要な血清群で全体の 9 割以上を占めるが、そのほかにも多様な血清群の EHEC も報告されている[2]。EHEC の主な病原因子は志賀毒素 (STX) (またはベロ毒素、VT) であり、志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有する。検査室においては、STX の産生性もしくは *stx* の保有を基準に検出が行われている。しかし、*stx* を保有していても、その臨床症状は非常に幅が広い。血便や HUS などの重篤な症状や死亡に至る事例もある一方で、軽度な下痢患者や無症状者からも検出される。そのため、STX 産生性大腸菌 (STEC) として、STX を産生する大腸菌と定義されることも多い。病原性の違いに関わる要因として、*stx* のタイプが挙げられる。*stx* には二つのサブタイプ (*stx1* および *stx2*) が知られており、さ

らに各サブタイプはそれぞれ複数のバリエーションが存在する。疫学的に臨床症状と *stx* の型の関連が示唆されており、また各バリエーションの培養細胞への毒性の違いも示されている[3,4]。

STX 以外にも多くの因子が EHEC の病原性に関わるとされている。EHEC の病原性発揮には腸間膜への定着が必要であり、付着因子や III 型分泌装置が重要な役割を果たしている。多くの EHEC は腸管上皮細胞への定着に必要な遺伝子群として LEE 領域 (Locus of enterocyte effacement) を持つ[5]。LEE 領域には付着因子であるインチミン (*eae*)、インチミン受容体である *tir*、III 型分泌装置の構成要素である *esp* 群などがコードされている。また、LEE を保有しない菌株についても、*saa* や *iha* などの定着に必要な因子が存在し、病原性に関わるとされている。他にもエンテロヘモリシン (*ehxA*) や各種酵素などの病原因子が知られており、病原性プラスミドなどの外来性ゲノム領域にコードされている。このように、様々な因子が EHEC の病原性に関与することが示唆されているが、同じ病原因子を持っていても一部の株のみが重篤な症状を示し、一方で同様の病原因子を持つ株が健常者から検出されることもしばしば起こるため、病原性を決定する因子についての議論は尽きない。

本研究では、これまで報告のある多数の EHEC 病原因子について、様々な血清群の株においてその有無を調べ、包括的に解析することで EHEC の高病原性の要因となる因子の特定し、EHEC 検出のマーカーとなる遺伝子の検索を試みた。昨年度までに動物から分離される STX 産生性大腸菌を

中心に多様な血清群の EHEC について病原遺伝子保有パターンの解析を進め、病原遺伝子の保有パターンと疫学的な分類の間の相関を示した。本年度は感染症患者や無症状病原体保有者などのヒトから分離された菌株を追加し、より広範な解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

様々な検体から分離した STX 産生性大腸菌を本研究に供試した。EHEC 感染症患者および無症状病原体保有者などヒトから分離された 130 株、ウシなどの動物から分離された 135 株、食品から分離された 16 株、由来不詳の 6 株を含む 54 血清群 287 株を用いた(表 1)。これらの株を Karmali ら[6]の提唱する、疫学情報をもとに判定した病原性の強さによって血清型を分類した seropathotype (表 2)に照らし合わせると、seropathotype A が 29 株、seropathotype B が 92 株、seropathotype C が 23 株、seropathotype が 143 株であった。

2. ゲノム DNA の抽出

Trypticase soy broth を用いて 37°C にて 18 時間培養した菌液から DNA を熱抽出法にて抽出した。菌液 100 μ l を 10,000 \times g で 10 分間遠心し、得られた沈渣を滅菌蒸留水 100 μ l で懸濁した。懸濁液を 100°C にて 10 分間加熱した後、氷上で急冷した。10,000 \times g で 10 分間遠心を行い上清をゲノム DNA 試料とした。保存は -20°C で行なった。

3. 病原遺伝子の検出

表 3 に示す病原遺伝子の遺伝子を標的遺伝

子とした。stx バリエーションから 6 遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) 染色体上に存在する病原遺伝子から 5 遺伝子 (*iha*, *espB*, *espD*, *tir*, *eae*) とプラスミド上に存在する 6 遺伝子 (*exhA*, *saa*, *espP*, *katP*, *stcE*, *subA*) を選択し、合計 17 遺伝子について保有性を検出した。各病原遺伝子は参考文献[7-13]に記載されているプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅を行った。PCR の条件は参考文献を参考に改良を加え最適化した。標的遺伝子の内、プラスミド上にある *katP*, *stcE*, *espP*, *exhA*, *subA* は参考文献[11]に記載されている方法では multiplex PCR 法を用いて増幅が行われているが、本研究では各遺伝子を個別に増幅した。PCR の後、アガロースゲル電気泳動法により増幅産物の検出を行った。

4. Population structure 解析

供試菌株を 17 種の病原遺伝子保有パターンに基づきグループ分けするため、STRUCTURE version 2.3.4 [14]を用いてクラスター分析を行なった。病原遺伝子保有が検出された場合には 1、非保有には 0 のダミー変数を割り当て、17 種の病原遺伝子の保有パターンを 17 桁の数字として表しデータとした。

本解析は、対象集団の遺伝子型がハーディー・ワインベルグ平衡となっていると仮定し、遺伝子型の情報から菌株を K 個のクラスターに分け、各株がそれぞれのグループに属する確率を算出する。マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 解析のサンプリング回数としては、収束前の「burn-in」として 1,000,000 回、収束後として 1,000,000 回を

設定した。クラスター数を2から10まで、それぞれ20回の解析を行ない、得られた結果を CLUMPP [15]により集計してそれぞれのグループに属する確率 (Q 値) を算出した。Q 値を元に各菌株のグループ分けを行った。すなわち、各菌株において Q 値が最大となるクラスターに、各菌株を分類した。

C. 結果

1. 各 seropathotype 間での病原遺伝子保有率の比較

表3に示した17の標的病原遺伝子について seropathotype ごとに保有率を算出し比較した(表4)。*stx* のバリエント6遺伝子の内、*stx1* については seropathotype B で最も高い82%の保有が見られ、次いで seropathotype A で66%と高く、seropathotype D・Eで43%、seropathotype Cで26%の順であった。*stx2* については seropathotype A で86%、次いで seropathotype C で74%と高く、seropathotype D・Eでは52%、seropathotype Bでは38%であった。*stx2c* はいずれの seropathotype でも50%以下の低い保有率で、特に seropathotype Bでは4%と低い値であった。*stx2d* の保有は seropathotype D・Eで42%の保有が見られたものの他の seropathotype では低く、特に seropathotype Bでは2%、seropathotype Aでは保有する株は存在しなかった。また、*stx2e* および *stx2f* については、seropathotype D・Eで1株ずつの保有が見られたのみで、他の seropathotype においては保有が認められなかった。

stx 以外の病原遺伝子については、*ae*

espB、*espD*、*tir* の病原遺伝子が seropathotype A と B で高い保有率を示し、一方で seropathotype C および D・E で低い保有率であった。特に *ae*、*espB*、*tir* の3遺伝子は seropathotype A ではすべての株での保有が確認され、seropathotype B においても90%以上の保有率であった。*katP* と *stcE* は seropathotype A で100%の保有率を示したが、他の seropathotype では低い保有率であった。特に *stcE* は seropathotype D・E で1株保有が見られたのみで他の株はすべて陰性であった。一方で *saa* 及び *subA* では seropathotype A、B では保有する株が検出されなかった。*saa* は seropathotype C で52%、seropathotype D・Eで48%であり、*subA* は seropathotype C で48%、seropathotype D・Eで33%であった。*iha*、*espP*、*ehxA* の3遺伝子は seropathotype A で95%以上の高い保有率を示すものの、他の seropathotype においても高い保有率が見られた。

2. 集団遺伝学的手法による解析

1) Population structure 解析によるクラスタリング

17 病原遺伝子の保有パターンを指標にした population structure 解析結果を図1に示す。縦軸は各クラスターに属する確率を示しており、積み上げグラフで表した。横軸は供試した各菌株を並べ、クラスター数を2から10まで検討した結果を各パネルで示した。

クラスター数2 ($K=2$)での解析結果から、今回供試した菌株は二つのグループにはっきりと分かれることが示された(図1)。 $K=3$ での解析では、 $K=2$ で二つに分かれた

グループの一つが新たに二つのグループに分かれもう一方のグループ分けに変化はなかった。 $K=4$ とした場合、 $K=3$ で分けられたグループの一つがさらに二つに分かれ、他のグループ分けに変化はなかった。 $K=5$ での解析では、最大となる Q 値が小さくなる株が多数みられ、適当なクラスター分けができなかった。さらにクラスター数を増やした場合、 $K=6$ および $K=7$ では各クラスターに属する確率 Q 値ごとにグループ分けが可能であった。しかし $K=8$ 以上では、最大の Q 値が小さくなる株が増え、的確なクラスター分けが出来なかった。本研究では検討したクラスター数のうち、グループ分けが可能であったクラスター数のうち最大である $K=7$ におけるクラスター分けを基準に考察を行った。 $K=7$ の場合の population structure 解析結果を seropathotype ごとに並べ替えた結果を図 2 に示し、株ごとの詳細な Q 値を図 3 - 6 に示した。また、表 5 にクラスターと seropathotype の比較を示した。

Seropathotype A ではすべての株においてクラスター 1 に属する確率が最も高くなった (表 5、図 3)。seropathotype B では 5 株 (5%) がクラスター 1 に、38 株 (41%) がクラスター 2 に、49 株 (53%) がクラスター 3 に属する確率が最も高くなった (表 5)。血清群ごとに見ると、O26 は主にクラスター 2 に対する Q 値が高い株が多く、O103、O111、O121 はクラスター 3 に対する Q 値が高い株が多かった。O26 および O145 にクラスター 1 に対する Q 値が高い株が存在した (表 6、図 4)。seropathotype C ではクラスター 1 に対する Q 値が最も高い株が 4 株 (17%)、クラスター 4 が 12 株

(52%)、クラスター 6 が 7 株 (30%) であった (表 5)。血清群ごとにみる O165 の 4 株全てがクラスター 1 に対する Q 値が最も高くなり、O91 および O104 はクラスター 6 に対する Q 値、O113 はクラスター 4 に対する Q 値が最も高かった (表 6、図 5)。最後に seropathotype D・E はクラスター 1 に対する Q 値が最も高くなる株は検出されず、クラスター 2 から 6 のいずれかのクラスターに対する Q 値が最も高くなった。クラスター 4、5、6 に属する株が全体の 9 割を占めた (表 5)。残りの 1 割であるクラスター 2 及び 3 に属する株の血清群は、O14、O16、O45、O63、O74、119、128、OUT であった (表 6、図 6)。

2) 各クラスター間での病原遺伝子保有率の比較

Population structure 解析において $K=7$ したときの Q 値が最大となるクラスターごとに供試菌株を分類し、各クラスターの病原遺伝子保有率を算出した (表 7)。なお、クラスター 7 に対する Q 値が最も高くなる株は検出されなかったためクラスター 7 における保有率は示していない。

stx のバリエーション 6 遺伝子のうち、*stx1* はクラスター 2 および 5 で 95% 以上の高い保有率を示し、クラスター 4 および 6 では保有率が低かった。*stx2* はクラスター 1 で最も高い保有率 (89%) を示し、次いでクラスター 4 (73%) となった。クラスター 2 では *stx2* の保有率は低かった (12%)。*stx2* のバリエーションはいずれのクラスターにおいても高い保有率は示されず特徴的な分布はなかった。

stx 以外の病原遺伝子については、*eae*、