研究課題の概要

研究課題名	腸管出血性大腸菌の牛肉を介したリスクに及ぼす要因についての解析
主任研究者	工藤　由起子
所属機関	国立医薬品食品衛生研究所
研究成果の概要	腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価のためには牛での保菌状況、牛および人由来株の病原性等の特徴、牛肉の消費過程での菌の動態の解析が必要とされている。国内の肉牛および乳牛での腸管出血性大腸菌の保菌を調査した結果、血清群0157など患者から分離される血清群の一部を牛が保有し、本菌保有率は乳牛より肉牛で高いことが判明した。また、牛および人由来株の遺伝子型および病原性を解析し、牛由来株の一部が人に病原性を示すこと、高病原性を示す株があることが判明した。この高病原性株を使用して、日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品である焼肉調理を想定し本菌の動態を解析した結果、加熱による菌数減少率や器具からの二次汚染率などが明らかになり、十分な加熱、調理器具からの加熱後の肉の汚染防止が食中毒防止に重要であることが示された。それら成果は食品健康影響評価のためのリスクプロファイル改訂に活用された。

評価所見	腸管出血性大腸菌の牛肉や牛内臓肉の保存・調理過程における消長、ヒト・牛由来腸管出血性大腸菌の病原性解析および血清型分布、病原性遺伝子検出率さらに薬剤感受性試験まで幅広く解析されており、リスク評価に必要なデータとして有用である。一部の成果は「食品健康影響評価のためのリスクプロファイル」改訂に活用された。現実にどれ位の菌量ならばリスクは減るのか等について、更なる研究が必要である。
評価結果	目標を達成した。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	腸管出血性大腸菌の牛肉を介したリスクに及ぼす要因についての解析
主任研究者名	所　属　：国立医薬品食品衛生研究所 氏　名　：工藤 由起子(研究課題番号：０７０６)

腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価のために必要とされるデータを得ることを目的とした。国内の肉牛および乳牛での腸管出血性大腸菌を調査した結果、血清群 0157 など患者から分離される血清群の一部を牛が保有していること、本菌保有率は乳牛より肉牛で高いことが明らかになった。また、牛および人由来株の遺伝子型および病原性を解析し、牛由来株の一部が人に病原性を示すこと、高病原性を示す株があることが判明した。この高病原性株を使用して、日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品にあげられる焼肉の調理過程を想定し本菌の挙動を解析した結果、加熱による菌数減少率や器具からの二次汚染率などが明らかになり、十分な加熱、調理器具からの加熱後の肉の汚染防止が食中毒防止に重要であることが示された。それら成果は食品健康影響評価のためのリスクプロファイル改訂に活用された。

別紙４

事後評価

研究成果報告書（本体）

研究課題名	腸管出血性大腸菌の牛肉を介したリスクに及ぼす要因についての解析 （研究期間：平成１９年度～２１年度）
主任研究者名	所　属　：国立医薬品食品衛生研究所 氏　名　：工藤 由起子(研究課題番号：０７０６）

１．研究の概要

食中毒を含め食品に媒介される病原微生物による感染症のリスク評価には、食品中での病原体の挙動や病原体のヒトへの病原性に関する研究データが必須である。本研究では、腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価のために必要とされるデータを得ることを目的とした。日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品として牛肉および牛内臓肉の焼肉調理、レバー、ユッケなど牛肉の生食などがあげられる。このため、焼肉の調理過程を想定し牛肉および牛内臓肉での腸管出血性大腸菌の挙動を明らかにすることを目的とした（主任研究者：工藤由起子)。また、腸管出血性大腸菌の主たる保菌動物である牛からは多様な血清群が分離されるにもかかわらず腸管出血性大腸菌感染事例全体の約 70%を血清群 0157 が占め、溶血性尿毒症症候群（HUS）の起因菌の約 90%以上が血清型 0157:H7 によるものである。このため、牛が保有する腸管出血性大腸菌の血清群、毒素産生型など性状の調査を行う（分担研究者：小林秀樹）とともに、ヒトおよび牛から分離された株の遺伝子による菌株相互間の DNA 型の比較や系統学的解析、既知の病原性遺伝子の分布解析や発現量の解析を行うことによって、牛由来の腸管出血性大腸菌によるヒトへの感染の実体を明らかにすること（分担研究者：伊豫田淳）を目的とした。

工藤由起子（腸管出血性大腸菌の食品中での動態解析）

焼肉調理料中での菌の挙動の解析：焼肉用調味料に牛由来の血清群 0157 を添加した直後、いずれの調味料においても初期菌数より若干減少した（10 株平均：約 0.30 log cfu/ml）調味料の条件および菌株の病原因子や病原性遺伝子保有の特徴による明確な差は認められなかった。

牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化：血清群 0157 のレバーでの内部汚染および表面汚染、大腸での内腔汚染では 4℃で 24 時間保存後の菌数はほとんど減少しなかった。血清群 026 についても同様の結果であり、血清群 0157 および 026 は牛内臓肉中において 24 時間の低温保存によって菌数がほとんど減少しないことが考えられる。

ホットプレートでの焼肉調理による菌数の減少：汚染肉の加熱調理による菌数の減少の結果では、血清群 0157 および 026 ともに、またレバーおよび大腸ともに、焼き方の程度が強い程菌数の減少が大きい結果であり、十分に焼けば１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/1000～1/5000 に菌数が減少した。

直火での焼肉調理による菌数の減少：カルビで最も菌の減少率が低く、生焼けでは１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/10、中程度焼けで 1/10,000、ロースでは生焼けで約 1/1,000、中程度焼けで約 1/100,000、大腸では生焼けおよび中程度焼けで約 1/1,000 であったが、いずれの肉でも十分焼けば約 1/100,000～1/1000,000 に減少した。

汚染肉からの調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉への汚染：汚染肉を調理器具で掴んだ時の器具汚染の結果では、１検体（焼肉用サイズの肉検体）に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染したことが明らかになった。汚染調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉の汚染の結果では、器具１検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉を汚染したことが認められた。

以上の結果から、以下の結論を得た。ただし、焼肉調理実験の結論については本研究で使用された器具および条件下に限定された結果に基づくものである。

・腸管出血性大腸菌の生残や増殖には温度、pH および水分活性が影響し酸耐性が通常の大腸菌よりも高いことが報告されていることから、焼肉調味料中での生残を確認したところ、pH が最低 4.5、塩分濃度が最高 11%まで菌数の減少などは見られず耐性が認められた。
・食肉処理の段階で牛肉が腸管出血性大腸菌に汚染された場合、低温保存で菌数は維持され減少しないことが示された。この牛肉をホットプレート使用の焼肉調理した場合、生焼けでは 1 検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/100、十分焼けで約 1/1000～1/5,000 に牛肉中の菌数が減少することが示されたが、直火での調理では十分焼けで約 1/100,000～1/1000,000 に菌数が減少したことから直火焼肉調理によって十分に調理すれば腸管出血性大腸菌の死滅が期待できることが示唆された。また、使用した肉の中ではロースにおいて菌数の減少が大きく、肉の種類によって加熱による菌数の減少率に差があることが明らかになった。さらに直火焼肉調理はホットプレートによる調理と比較して菌数の減少が大きいため、調理方法としては食中毒の発生を低めることが考えられる。
・調理器具を介した焼肉調理時の牛肉の汚染は、汚染肉を調理器具で掴んだ場合、1 検体（焼肉用サイズの肉検体）に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染し、汚染調理器具で焼成後の牛肉を掴んだ場合、器具 1 検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉に移ることが認められた。総ずると、十分に牛肉を焼肉調理した場合でも同一の調理器具を焼成前の汚染肉および焼成後の牛肉に共通して使用することによって、焼成前の牛肉から 1 検体あたり約 1/1000～1/100000 の菌数が焼成後の牛肉を汚染することが示唆された。

伊豫田淳（腸管出血性大腸菌の病原性評価）

国内でヒトから単離された腸管出血性大腸菌株（2007-2009 年：総計 8434 株）の O 血清群の解析から、依然として O157（約 73.9%）, O26（約 15.4%)および O111（約 3.2%)が多数分離されており、全体の約 92%を占めることが判明した。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の病原性遺伝子（*stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, eae, subA*）の分布の解析では、全ての株は *eae* を保有するが、*subA* は保有しないことが明らかとなった。*stx2c* は、ヒト由来株では 24%、牛由来株では 68.5%が陽性であった。また、バリアント *stx2c* のみを保有する株は牛由来株に多いことが明らかとなった。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の PFGE による系統解析では、相同性 80%で区切った場合には 12 のクラスター（I-1, I-2, II-1, II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2, V, VI, VII, VIII）に分類された。牛由来株は 11 に分類され、同じ血清群でも多様な集団である可能性が示唆された。一方、ヒト由来の 15 株のうち 14 株がクラスターII および IV に分類され、牛由来株に比べて菌株間の相同性は高いものと考えられた。以上の結果から、牛由来の O157:H7 株のいくつかは、有症者由来の株と類似した DNA 型を持つ株であることが示唆された。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の病原性の解析では、いずれの手法も定量性に問題があり志賀毒素産生量の解析を行うことは不可能であった。また、3 型分泌蛋白質とエンテロヘモリシンの発現量解析では由来の違いによる発現量の差は明確ではなかった。さらに、clade 解析による O157:H7 株の型別では、まず疫学情報がはっきりした菌株（重症例である HUS 発症者由来株と無症状保菌者由来株）を用いた系統解析から、HUS 患者由来の菌株に多く見られる遺伝系統を検出することを試みた。その結果、clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く存在することが明らかとなり、clade 8 株は高病原性を示す O157:H7 の遺伝系統であると推論された。次に、牛由来株の clade 解析を行ったところ、clade 8 株は少ないものの、高病原性と考えられる株が存在したことを示した意義は大きい。clade 8 株の病原性評価では、clade 8 株では clade 1, 2, 3 株と比較して、*in vivo*（嫌気条件下）での Stx2 の産生量が高いこと、LEE の発現量は clade 8 株で有意に高いことが示唆され、このことが重症化の一つの要因になっていると推測される。また、clade 8 株では LEE に加えて、

エンテロヘモリシンの発現活性も上昇していると推論された。

以上の結果から、以下の結論を得た。

・血清型 O157：H7 は HUS 症例の起因菌として最も多い（約 90%）血清型であった。

・血清群 O157, O26, O111 の分離割合が高いが、その他の血清群では O121, O103, O91, O165, O145 の分離頻度が高く、中でも O121 と O165 では重症者が多かったが現時点でその由来は不明である。

・無症状保菌者と HUS 由来株の clade 解析から、clade 8 は有意に HUS 由来株に多く存在することが明らかとなった。

・clade 8 の約半数はバリアント *stx2c* を保有していた。

・大腸菌が嫌気条件下で産生する NO（一酸化窒素： Stx2 発現の抑制因子）還元化酵素 NorV は clade 1, 2, 3 では遺伝子内部に欠失が見られる一方、clade 8 では欠失が見られないことから、clade 1, 2, 3 と比較して clade 8 では *in vivo* での Stx2 の発現が高いと推測された。

・clade 8 株は他の clade と比較して LEE の発現量が高い傾向が見られた。

・clade 8 株は他の clade と比較してエンテロヘモリシン活性が高い傾向が見られた。

・牛由来の O157:H7 の一部はヒトで有症者由来の O157:H7 と同様な DNA 型を持つことが判明したことから、これらはヒトでの感染原因菌となっている可能性が示唆された。

・ヒトでの重症例の原因となっている株（clade 8）が牛にも分布していることが明らかとなったことから、重症感染事例の原因株の一部が牛由来の大腸菌に分布していることが明らかとなった。

小林秀樹（牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析）

stx（志賀毒素遺伝子）検出率は、乳牛（2007 年）で 30.4%（283/932）、肉牛（2009 年）で 51%（49/96）であり、肉牛で有意に高かった。また、肉牛でのスクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生大腸菌：STEC）（61 株）が分離されたことは、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合が乳牛のそれよりも極めて高いことを示唆するものであった。また、*eae* 検出率は、乳牛および肉牛のいずれにおいても *stx* 陽性率を上回る結果となった。特に肉牛では約 70%（67/96）が陽性であった。本課題担当者が 2001 年に収集した乳牛直腸便 444 検体を調査したデータにおいて、*eae* 検出率は最も陽性率の高かった哺乳牛の 31.4%を加えても全体平均で 16.7%に過ぎなかった。STEC 保有率が低減化したのに *eae* 保有大腸菌（腸管病原性大腸菌）が増加した理由は不明である。さらに、*stx*&*eae* 検出率は、乳牛で 12.8%(119/932)、肉牛で 43.8%（42/96）であり、これも肉牛で高い結果であった。これらのことから、人への病原性を有する株が牛で保有されていることが示された

乳牛および肉牛からの分離 STEC 株の既知 O 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な O 群血清型は O1、O2、O7、O8、O20 および O150 の 6 血清型であった。また、以前に報告された国内乳牛由来株の O 群血清型の分布と比較して、今回調査した乳牛由来株の O 群血清型の大半が既報のそれと一致することが確認された。さらに、乳牛と肉牛の株の O 群血清型は異なっていた。これらのことから、多くの株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

薬剤平板希釈法を供試した薬剤感受性試験では、1998 年分離 STEC 92 株の薬剤耐性株は 8 株（8.7%）で、うち 6 株が単剤耐性、残りの 2 株が 2 剤耐性であったのに対し、2007 年分離株は 28 株（23.7%）が薬剤耐性を示し、うち 8 株が 3 剤以上の耐性、13 株が 2 剤耐性であった。近年分離株の薬剤耐性化が明らかであり、3 あるいは 4 剤耐性株が新たに見出されたことは公衆衛生上の観点からも懸念すべき状況と考えられる。一方、肉牛への抗菌剤使用は乳牛へのそれと比して非常に多いため、肉牛由来株の多剤耐性化は乳牛のそれよりいっそう顕著であると考えられる。

牛の分離株 232 株を分担研究者の研究に提供した。提供にあたり可能な限り同一クローンの重複を避けて選択した。

以上の結果から、以下の結論を得た。

・乳牛および肉牛で人に病原性を有すると考えられる腸管出血性大腸菌が保有されていることが示された。

・乳牛と肉牛の STEC 株の O 群血清型は異なっていたことから、多くの株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

・STEC 株の薬剤耐性化が明らかであり、肉牛由来株の多剤耐性化は乳牛よりいっそう顕著であると考えられる。

３者の協力体制から得られた成果

小林秀樹（分担研究者）から提供された牛由来 0157 株を伊豫田淳（分担研究者）が遺伝子解析をしたところ、牛由来株は人由来株より遺伝子型はバラエティーに富むが、ヒトと同じ PFGE クラスターに属するものや HUS の発症性が高いとされている clade 8 に属するものもあることが判明し、牛の株の一部が人に病原性を示すことが考えられた。しかし、工藤由起子（主任研究者）が調味料中での牛由来 0157 の生残性を解析したところ、菌株での差は大きくなかった。clade 2、clade 3 および１，2, 3, 8 以外の clade に属する９株は、一部低い生残性を示す調味料の組み合わせもあったが、clade との関連性を示す特徴はなかった。また、clade 8 であった CN16 株は、他の株に比べて生残性が高いことはなく、むしろ低い結果であった。このため、ヒトの病原性が高いと考えられる株についても他の株と同様の制御ができるものと考えられた。しかし、さらに株数や試験条件を加えて検討をする必要があるものと考えられる。また、焼肉調理での加熱での牛肉および牛内臓肉中の菌数の減少について、分担研究者の解析した病原性が高いとされる株を用いて検討を行うことができた。その結果、肉が重度に汚染されていても直火調理での十分な加熱によって菌の死滅が期待でき、中程度の加熱やホットプレートでの調理でも十分に加熱すれば約 1/1000 以上に菌数が減少することから、汚染菌数が多くなければ加熱によって食中毒の発生が防げるものと考えられた。

本研究では、肉牛および乳牛（最終的には国産牛肉として流通）での血清群 0157 など患者から分離される血清群の保有率のデータが得られ、これはリスク評価での生産段階での保有率の数値に貢献できる。牛内臓肉の低温保管中に腸管出血性大腸菌は増加しないが減少もせずに菌数が維持されていることが明らかになり、リスク評価には低温保管中の菌数の変化を大きな要因にはならないといえる。また、焼肉調理での調味料は比較的酸性で塩濃度が高いが、菌数の減少は期待できないことが明らかになった。焼肉調理を家庭でのホットプレートを使った調理および焼肉店での直火での調理を想定し加熱調理での菌数の減少を数値として求めた。これらのデータはリスク評価で具体的な数値として用いることができる。さらに、焼肉調理にともなう生肉から器具の汚染および器具からの焼成済みの肉への汚染が起こることが明らかになった。汚染する菌数の割合も求めることができたためリスク評価に用いることができる。これらのデータは、腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価に貢献するものと考える。

２．研究の成果

（１）研究の成果と概要

１）平成１９年度研究成果の概要

初年度の研究では、主任研究者（工藤由起子）および分担研究者（伊豫田淳、小林秀樹）が協力し、一部新たに腸管出血性大腸菌を牛から分離し、牛由来およびヒト由来菌株について病原因子および病原性遺伝子の解析およびそれら菌株での食品中での挙動の研究を行った。

①平成１９年度研究の目的

工藤由起子：腸管出血性大腸菌の生残や増殖には温度、pH および水分活性が影響し酸耐性が通常の大腸菌よりも高いことが報告されていることから、焼肉用調理料の菌の動態の解析を行うことを目的とした。

伊豫田淳：ヒトでの感染事例が最も多い血清群 0157 を中心に、ヒト由来および牛由来株における病原性の比較についてその予備的なデータを蓄積することを目的とし、各病原性遺伝子の分布解析および系統解析を行った。

小林秀樹：既に保有する牛由来血清群 0157 株を分担研究者に供与し実験に必要な情報提供を行った。

②平成１９年度研究の方法

工藤由起子：市販焼肉用調味料 15 種類の pH、塩分濃度を測定し、これらのうち異なる条件である４種類の調味料を選び、血清群 0157 の調味料中（25℃）での菌の挙動を経時的に計測した。

伊豫田淳：平成 19 年度に分離されたヒト由来株の血清型、ヒトまたは牛由来の血清群 0157 の病原性遺伝子、3 型分泌蛋白質の発現・分泌の分布について解析を行った。また、PFGE による系統解析を行った。

小林秀樹：既に保有する牛由来血清群 0157 株を分担研究者に供与し、さらに、国内 11 県 123 農場由来の 932 頭の乳牛直腸便から PCR およびコロニーハイブリダイゼーションによって腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生大腸菌：STEC）を分離した。

③平成１９年度研究の成果

工藤由起子：腸管出血性大腸菌 0157 菌数は、調味料に菌を添加した直後、いずれの調味料においても初期菌数より若干減少した（約 0.30 log cfu/ml）。しかし、全実験を通じて大きく菌数が変動した調味料は無かった。変化の比較的最も大きかった株でも１時間後に約 1/10 に減少する程度であった（図１）。これらのことから、牛由来の腸管出血性大腸菌 0157 は焼肉用調味料における消長は、調味料の条件および菌株の病原因子や病原性遺伝子保有の特徴による明確な差は認められなかった。

伊豫田淳：ヒト由来株(3,081 株)の大部分を血清群 0157 (77.7%), 026 (14.3%)および 0111 (3.3%)が占めた。ヒトまたは牛由来の血清群 0157 の解析では、バリアント *stx2c* は牛由来株に多く分布すること、3 型分泌蛋白質の発現・分泌レベルは株の由来の違いでの相関性は不明であること、ヒト由来株は限られたクラスターに、牛由来株はヒト由来株よりも広範囲なクラスターに分類されることが判明した。限られた菌株での解析結果でるが、牛由来の 0157 株のうち、ヒト有症者由来の 0157 株と相同性の高いグループとそうでないものに分類出来る可能性がある。

小林秀樹： stx_{1}, $_{2}$, $_{2f}$ -PCR スクリーニングで陽性を示したのは 84 農場（68%)、283 検体（30%）であった（図２)。このうち STEC 株は 59 農場由来 111 検体（12%）から 118 株が分離された。今回供試した牛直腸便サンプルから stx_{2f} 保有大腸菌は検出されなかった。932 頭の牛直腸便から分離した 116 株の STEC は 32 種以上の O 群血清型に分類され、インチミン遺伝子を同時に保有する腸管出血性大腸菌は 18 株（14%）（図２）であった。

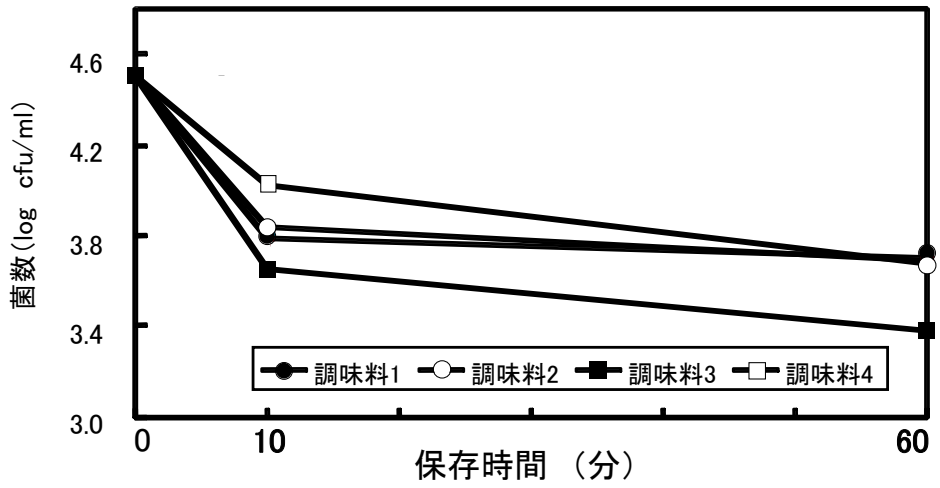


図1　調味料中の菌の推移

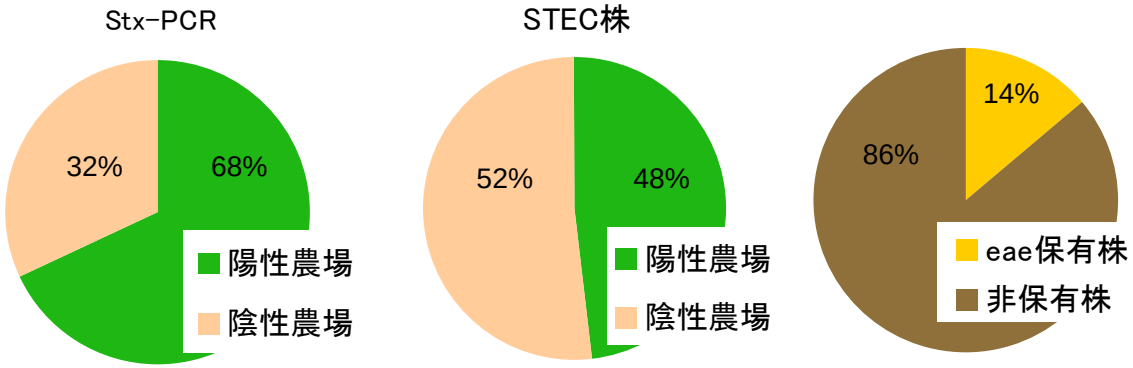


図2　農場での *Stx* 陽性率、STEC 分離率および分離株の *eae* 陽性率

２）平成２０年度研究成果の概要

２年目の研究では、工藤由起子は伊豫田淳が保有する食中毒株について牛肉での冷蔵保存中の挙動、焼肉の調理での肉および調理器具の汚染を検討した。伊豫田淳は、ヒト由来株の血清型解析を行い、小林秀樹が分離した牛由来株および自身の保有するヒト由来 0157:H7 株における高病原性株の検索を行った。小林秀樹は、初年度に収集していない地域から材料を収集し、STEC 株を分離し解析を行った。

①平成２０年度研究の目的

工藤由起子：牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化および焼肉調理での加熱による菌数の減少や調理器具および肉への二次汚染の菌数の割合を明らかにすることを目的とした。

伊豫田淳：ヒトでの感染事例が最も多い血清群 0157 を中心に、ヒト由来および牛由来株における病原性の比較についてその予備的なデータを蓄積することを目的とし、各病原性遺伝子の分布解析および系統解析を行った。

小林秀樹：昨年度分離した STEC 株の性状および病原性等を解析し、分担研究者の研究に提供を行った。

②平成２０年度研究の方法

工藤由起子：牛内臓肉（レバーおよび大腸）に血清群 0157 および 026 各２株について検体あ

たり約 10^4-10^6 CFU を内部および表面に接種し、4℃で保存中の菌数変化を測定した。また、焼肉調理での加熱程度による菌数の減少、調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉の汚染を測定した。

伊豫田淳：平成 20 年度に分離されたヒト由来株の血清型を解析した。また、国内で 2004-2008 年に単離された HUS 患者由来の O157:H7 株を SNP genotyping 法、PFGE およびタンデムリピート配列解析（MLVA）によって高病原性株の検索を行った。

小林秀樹：昨年度に収集していない地域（県）由来の乳牛の直腸便から PCR およびコロニーハイブリダイゼーションによって STEC 株を分離した。これらのうち人から分離される頻度の高い血清型株について PFGE 等を用いた株間比較を行った。また、各種薬剤に対する感受性を調べた。

③平成２０年度研究の成果（結果、考察、結論）

工藤由起子：牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化では、血清群 O157 および26 ともにレバーおよび大腸において菌数はほとんど減少しないことが示された(図３)。焼肉調理での加熱では生焼けでも、１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり未加熱の約 1/100 に菌数が減少し、十分焼けでさらに約 1/50 に減少した。調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉の汚染では、焼き方の程度が強い程菌数の減少が大きい結果であった。汚染肉１検体に付着している菌数の約１／1000 が器具を汚染し、汚染器具１検体に付着している菌数の 1/10 から 1/100 が肉を汚染することが認められた。

伊豫田淳：ヒト由来株（2,896 株）の大部分を血清群 O157（70.6%），O26（16.3%)および O111 (4.6%)が占めた。HUS 患者由来の O157:H7 株（n=144）を SNP genotyping 法にて解析したところ、高病原性株であることが予想されている clade8 型が 17.3%（図４）を占めた。PFGE および MLVA では､SNP genotyping 法の clade1-3 型はほぼ同一のクラスターに属し､clade8 型は、これらとは異なる少なくとも 2 つの異なるクラスターに属することが判明した。一方、牛由来の O157:H7 株（n=63）では clade8 型が 4.8%であり、PFGE および MLVA 解析は HUS 患者由来株のものと同様の結果であることが予想される。以上の結果から、牛由来 O157:H7 株の一部系統の株が HUS 発症患者株と同様な DNA 型の高病原性株であることが予想される。

小林秀樹：stx_{1}，$_{2}$，$_{2e}$，$_{2f}$ -PCR 陽性は 63%の農場、30%の検体であった。このうち STEC 株は 64 農場由来 130 検体（13%）から 137 株が分離された。なお、今回供試した牛直腸便サンプルから stx_{2e}，$_{2f}$保有大腸菌は検出されなかった。また、O26 株はほぼ同様な PFGE パターンを示し、Origin は限られたところから波及している可能性が高いと考えられた。さらに、アンピシリンなどの古典的な薬剤への耐性株が 28 株（24%）あったが、第三世代セフェム系抗生物質耐性株および拡張型β－ラクタマーゼ産生株は検出されなかった。

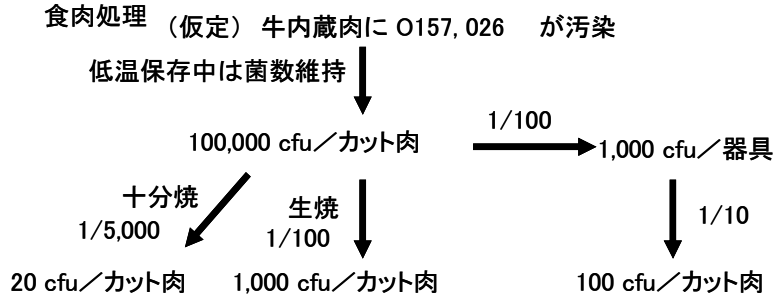


図3 焼肉調理での菌数の変化

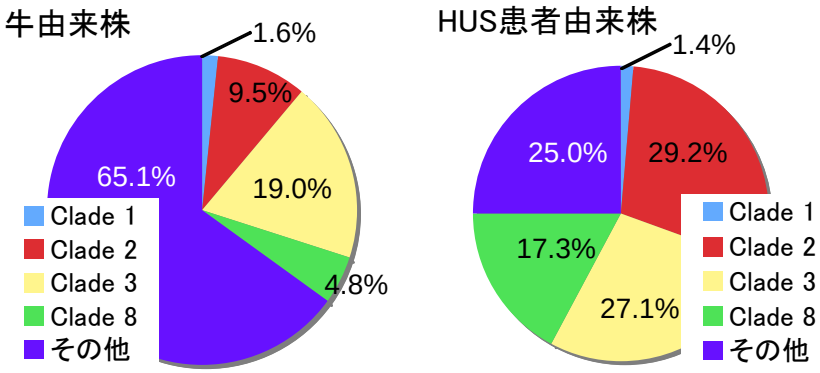


図 4. HUS 患者株および牛由来株の SNP genotyping 法解析結果

3）平成２１年度研究成果の詳細

「研究課題：腸管出血性大腸菌の牛肉を介したリスクに及ぼす要因についての解析」

1　研究全体の成果

①平成２１年度全体の研究目的

牛肉焼肉調理での挙動の解析（工藤由起子）では、分担研究者の研究成果および情報から HUS の発症が高いとされる血清群 0157 の clade 8 に型別される株について直火焼肉調理を想定した調理での菌数の減少を明らかにすることを目的とした。また、腸管出血性大腸菌の病原性評価（伊豫田淳）では、H21 年度に分離された人由来株の血清型の解析、牛およびヒト由来株の clade、PFGE、MLVA 解析、clade 8 の病原性の解明を行うことを目的とした。牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析・菌株の選定（小林秀樹）では乳牛および肥育肉牛からの分離株の血清型および病原遺伝子の保有の解析を行うことを目的とした。

②平成２１年度全体の研究方法

工藤由起子：牛肉焼肉調理での挙動の解析では、HUS 患者株由来の血清型 0157：H7（stx2 産生および clade8）３株を牛肉および牛内蔵肉（カルビ肉、ロース肉、大腸）に接種した検体（菌数 10^5 −10^6 cfu/牛肉検体）を直火での焼き肉調理を行った。カルビ肉は生焼けで 10 秒、中程度焼けで 30 秒、十分焼けで 90 秒、ロース肉は生焼けで 23 秒、中程度焼けで 45 秒、十分焼けで 90 秒、大腸は生焼けで 45 秒、中程度焼けで 90 秒、十分焼けで 210 秒であった。各片面加熱時間後に裏返して更に同時間加熱した。加熱後重量の４倍量の PBS を加え、ストマッカー１分行い乳剤を作製した。この乳剤原液を 10^{-2} 希釈まで 10 倍段階希釈し、セフィキシム・亜テルル酸加 SMAC(CT-SMAC)およびクロモアガー0157 に塗抹し 37℃20 時間培養し 0157 コロニー数を計測した。また、残り乳剤を Buffered peptone water にて増菌培養し、免疫磁気ビーズ法にて濃縮後さらに分離を行い、加熱による死滅を確認した。

伊豫田淳：腸管出血性大腸菌の病原性評価では、自家調製またはデンマーク血清学研究所製造の抗血清を用いて H21 年度分離のヒト由来株計 2436 株の血清型を解析した。また、国内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌 0157:H7 株から、HUS 患者由来と無症状保菌者由来株をほぼ同数抽出し、それらの株の clade 解析を行うと共に、牛由来の 0157:H7 株における clade 8 の分布について解析した。さらに、PFGE の定法に従ってアガロースゲル内に包埋した大腸菌を溶菌し、制限酵素 *Xba*I で切断後、電気泳動パターンを DNA フィンガープリンティング解析ソフト BioNumerics Ver 4.6 を用いて解析した。加えて、0157:H7 Sakai 株のゲノム配列情報を

元に、9 遺伝子座の繰り返し配列のリピート数をキャピラリー型オートシークエンサーで解析し、MLVA 解析を行った。clade 8 の病原性の解明のために、LEE にコードされる 3 型蛋白質輸送装置（宿主細胞へ注入する蛋白質の輸送装置）を介して分泌される分泌蛋白質量の測定およびエンテロヘモリシン活性測定を行った。

小林秀樹：牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析・菌株の選定では、牛直腸便材料を mEC 培地で増菌培養したものをマッコンキー寒天培地に塗抹培養後、密集落から作製した DNA テンペレートについて *stx*1, 2, 2e, 2f およびインチミン遺伝子（*eae*）の各遺伝子を PCR によりスクリーニングした。それぞれの遺伝子に特異的な DNA プローブによるコロニーハイブリダイゼーションまたはコロニー単位での PCR により目的とする STEC 株を分離した。分離株の O 群血清型別は O1～O176 までの抗血清を供試したマイクロプレート凝集反応で実施した。志賀毒素遺伝子の型別は各志賀毒素遺伝子特異 PCR で、*eae* も PCR で確認した。

③平成２１年度全体の研究成果

工藤由起子：牛肉焼肉調理での挙動の解析では、直火焼肉調理における菌数の減少は、カルビで最も菌の減少率が低く、生焼けでは１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/10 であり汚染菌が生残する可能性が考えられる。また、中程度焼けで約 1/10,000、十分焼けで 1/100,000 に至たり汚染菌数が高い場合でも十分に調理すれば菌が死滅することが考えられた。ロースでは生焼けで 1/10,000 には至らないものの約 1/1,000 には減少し、中程度焼けで約 1/100,000、十分焼けで約 1/1000,000 に減少したことから、調理を行えば菌の死滅が期待できると思われた。大腸では生焼けおよび中程度焼けで約 1/1,000、十分焼けで約 1/100,000 に減少したことから、ロースと同様に調理を行えば菌の死滅が期待できると思われた。直火焼肉調理はホットプレートによる調理と比較して菌数の減少が大きいため、調理方法としては食中毒の発生を低めることが考えられるが、生焼けの状態では十分な菌数の減少の期待ができず、十分に調理することが重要である。

伊豫田淳：腸管出血性大腸菌の病原性評価では、H21 年度分離株の O 血清群は依然として O157（約 73.9%）, O26（約 15.9%）が多く全体の約 89％を占め、これら以外では O121, O103, O111, O91, O145, O165 などが数多くいことが明らかになった。clade 解析を行ったところ、1999 -2003 年の株（計 197 株）および 2009 年の株（計 87 株）の両方において clade 1 および clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株で有意に多いことが明らかとなり、clade 8 株の動向に注意する必要があると考えられる。clade と PFGE および MLVA との関連性の解析を行ったところ、牛由来の clade 8 株（n=3）はヒト由来の clade 8 株の大部分と同じクラスターに分類出来ることが判明した。以上の結果を総合すると、ヒトの感染原因とくに重症化例の原因となっている牛由来の O157:H7 株は一部の系統の菌株であると予想され、その一部は HUS 発症の起因株と考えられるヒト由来株と同様な DNA 型を持つ株であることが判明した。Clade 8 株の病原性評価では、clade 8 株では clade 1, 2, 3 株と比較して、*in vivo*（嫌気条件下）での Stx2 の産生量が高いと予想され、このことが重症化の一つの要因になっていると推測される。また、培養上清中の 3 型蛋白質輸送装置から分泌される EspB, EspA および EspP 蛋白質は、clade 8 株でその他の株に比べて 1.5 倍以上の発現量であること、エンテロヘモリシンの発現活性も clade 8 株で上昇していることが示唆された。

小林秀樹：牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析・菌株の選定では、肉牛（黒毛和種）の STEC 保有率は 51%（49/96）であり、2007 年に乳牛から採材したそれの 30.4%（283/932）と比較して有意に高かった。また、スクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから 61 株（同一検体からの同一クローンは任意の１株を選出）の STEC が分離されたことは、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合が昨年度報告した乳牛のそれよりも極めて高いことを示唆

するものであった。乳牛および肉牛からの分離 STEC 株の既知 O 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な O 群血清型は 01、02、07、08、020 および 0150 の 6 血清型であった。また、以前に報告された国内乳牛由来株の O 群血清型の分布と比較して、今回調査した乳牛由来株の O 群血清型の大半が既報のそれと一致することが確認された。さらに、分離株の *eae* 保有率は乳牛と肉牛で大きな差異はなかったが、保有株の O 群血清型は異なっていた。これらのことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

2　各分担研究者（分担課題）の成果

1）「分担課題：腸管出血性大腸菌の牛肉焼肉調理での挙動の解析」主任研究者：工藤由起子
協力研究者　大塚佳代子（埼玉県衛生研究所)、和栗　敦（青森県環境保健センター)、
楠原　一　（三重県保健環境研究所）

①平成２１年度の研究目的

食中毒の主な原因食品として焼肉、生レバー、ユッケ、ホルモンなど牛肉および牛内臓肉の調理品があげられるが、焼肉等の調理品は日本で多く食されるものであるため、世界的には研究が行われておらず国内においてもデータがほとんどない。このため、食品中での腸管出血性大腸菌の動態を明らかにすることを目的に、本菌の生残性および増殖性を検討する。過去２年間の本研究では内蔵肉であるレバーや大腸での腸管出血性大腸菌の保管期間での生残性、調理器具への汚染、ホットプレートを想定した調理での菌数の減少を明らかにした。今年度は、分担研究者の研究成果および情報から HUS の発症が高いとされる血清群 0157 の clade 8 に型別される株について直火焼肉調理を想定して調理の菌数の減少について検討を行った。

②平成２１年度の研究方法

供試牛肉：焼肉用のカルビ肉（三重県保健環境研究所)、ロース肉（青森県環境保健センター)、大腸（埼玉県衛生研究所）を 3 機関で分担し試験した。サイズの目安は６X４cm とし厚みはカルビおよびロースで１ cm 、大腸では 3 mm 程度であった。平均重量はカルビでは 15.2g、ロースでは 18.0g、大腸では 5.7g あった。各試験について６検体を使用した。

供試菌株：ヒト由来（HUS 患者株）の血清型 O157：H7（stx2、clade8）３株（株番号 072508、071002、070575）を各機関ともに使用した。菌液は、供試株を Tryptic soy broth（TSB）で 2 代継代した後、Phosphate buffered saline（PBS)で 10 倍階段希釈して約 10^7 cfu/ml とした。接種菌数の算出のために、一部をさらに希釈して 10^{-5} 希釈液（約 10^3 cfu/ml）と 10^{-6} 希釈液（約 10^2 cfu/ml）を作製し、希釈液ごとに 0.1ml を Tryptic soy agar（TSA)2 枚に塗抹し 37℃20 時間培養しコロニー数を計測した。

菌接種方法：スライス肉表面に菌液（濃度約 10^7 cfu/ml）50μl をピペットで少量ずつ全面に接種し（接種菌数 5X10^5 cfu/牛肉検体)、1 条件あたり６検体を試験した

菌接種肉の加熱方法：加熱器具は焼肉用の直火ガスコンロとし、加熱温度は放射温度センサーで測定し鉄板中心温度が約 300℃となるように調節した。初めに菌を接種した側を上として焼いた。加熱程度は、生焼け、中程度焼け、十分焼けの３種類とし、予備実験で得られた加熱後の様子から各肉種類によって片面当たりの加熱時間を次のように設定した。カルビ肉は生焼けで 10 秒、中程度焼けで 30 秒、十分焼けで 90 秒、ロース肉は生焼けで 23 秒、中程度焼けで 45 秒、十分焼けで 90 秒、大腸は生焼けで 45 秒、中程度焼けで 90 秒、十分焼けで 210 秒であった。また、菌未接種検体を用いて各加熱条件による肉検体の重量減の測定を行った。各片面加熱時間後に裏返して更に同時間加熱した。この際に検体肉をつかむ部位は、菌液を接種して

いない検体部分である肉短端側とした。加熱実験中の検体表面の温度を、加熱開始直後、片面加熱終了直後、裏返した直後、加熱終了直後、冷却後の５時点で測定した。

菌数の測定方法：加熱終了後に検体肉をストマッカー袋にとり、余熱による加熱影響を避けるために直ちに氷水につけて室温程度まで温度を下げた。加熱後重量の４倍量の PBS を加え、ストマッカー１分行い乳剤を作製した。この乳剤原液を 10^{-2} 希釈まで 10 倍段階希釈し、セフィキシム・亜テルル酸加 SMAC(CT-SMAC)およびクロモアガー0157 に塗抹した。塗抹量等は、生焼けは 10^{-2} 希釈液 0.1ml を各平板２枚ずつに、10^{-1} 希釈 0.1ml および乳剤原液 0.1ml を各平板 10 枚ずつとした。中程度焼けおよび十分焼けは 10^{-1} 希釈 0.1ml および乳剤原液 0.1ml を各平板 10 枚ずつとした。平板培地は 37℃で 20 時間培養し疑わしいコロニーを 0157 血清にて凝集反応を確認した。残りの乳剤に 2 倍濃度の Buffered peptone water（BPW）を乳剤と同量加えて 37℃で 20 時間培養した。その後、免疫磁気ビーズ法（デンカ生研）および直接法にて CT-SMAC およびクロモアガー0157 に塗抹し 37℃20 時間培養し疑わしいコロニーを 0157 血清にて凝集反応を確認した。また、使用する検体の腸管出血性大腸菌 0157 の汚染有無の公定法に沿って試験して確認した。ただし、遺伝子スクリーニングは使えることとした。塗抹は免疫磁気ビーズ法と直接法を使用し、CT-SMAC およびクロモアガー0157 に塗抹した。

③平成２１年度の研究成果

（結果）

重量変化：牛肉の各種類での菌株間の重量減少率は大腸の十分焼けで約 10%異なった以外に大きな差は認められなかった。全株を合わせ牛肉の各種類で焼き方ごとに比較すると、カルビでは生焼けで 3.2%、中程度焼けで 14.6%、十分焼けで 33.1%あった。ロースでは生焼けで 7.1%、中程度焼けで 13.9%、十分焼けで 23.9%あった。大腸では生焼けで 17.0%、中程度焼けで 29.9%、十分焼けで 48.7%あった。カルビおよびロースでの重量の減少率は比較的近い値であったが、大腸では重量の減少率が大きく十分焼けで重量は加熱前の約半分まで減少した。

加熱時の検体温度の変化：いずれの肉検体も実験開始時には室温に戻したため、25℃くらいであった。加熱過程での平均温度は、カルビでは、生焼けで片面焼成直後（10 秒）136℃、裏返した直後 151℃、加熱終了時（20 秒）166℃、中程度焼けで片面焼成直後（30 秒）189℃、裏返した直後 185℃、加熱終了時（60 秒）191℃、十分焼けで片面焼成直後（90 秒）194℃、裏返した直後 182℃、加熱終了時（180 秒）208℃であった。ロースでは、詳細に温度変化を測定したところ、5 秒後には 207～251（平均 230）℃、10 秒では 227～263（平均 241）℃と急速な温度上昇が認められた。また、生焼けの片面焼成直後にあたる 23 秒では 232～275（平均 255）℃、裏返して加熱終了時（45 秒）では 264℃であった。中程度焼けの片面焼成直後にあたる 45 秒では 267～287（平均 278）℃、裏返して加熱終了時（90 秒）では 293℃であった。十分焼けで片面焼成直後にあたる 90 秒では 306℃、片面焼成直後にあたる 180 秒では 302℃であった。大腸では、生焼けで片面焼成直後 202℃、裏返した直後 203℃、加熱終了時 197℃、中程度焼けで片面焼成直後 218℃、裏返した直後 185℃、加熱終了時 202℃、十分焼けで片面焼成直後 182℃、裏返した直後 189℃、加熱終了時 202℃であった。いずれの肉検体も加熱終了時には 50℃以下に温度が下降したが、さらにストマッカー袋越しに氷水にて急速に冷却された。図１に示した焼成時間と温度推移を各牛肉の種類で比較すると、カルビでは温度上昇がロースより低くまた加熱時間が大腸の半分以下であった。

菌数の変化：各牛肉への３株の接種菌数は、カルビでは 5.3～5.9 log cfu/検体であり平均 5.6 log cfu/検体、ロースでは 6.4～6.5 log cfu/検体であり平均 6.6 log cfu/検体、大腸では 5.1～5.4 log cfu/検体であり平均 5.3 log cfu/検体であった（図 2）。直火焼肉調理時の菌数の測定は 2 種類の平板培地を用いて行われたが、両者に大きな差はなかったため両培地での

測定値の平均値を求めた。焼肉調理過程での菌数は、カルビでは生焼けで約 4.6 log cfu/検体、中程度焼けで約 1.7 log cfu/検体、十分焼けで約 0.7 log cfu/検体であった。ただし、中程度焼けで 18 検体中 15 検体、十分焼けで 18 検体中 7 検体について 0157 が死滅していなかった。ロースでは生焼けで約 2.8 log cfu/検体、中程度焼けで約 1.1 log cfu/検体、十分焼けで約 0.7 log cfu/検体であった。ただし、中程度焼けで 18 検体中 9 検体、十分焼けで 18 検体中 6 検体について 0157 が死滅していなかった。大腸では生焼けで約 2.2 log cfu/検体、中程度焼けで約 1.0 log cfu/検体、十分焼けで約 0.3 log cfu/検体であった。ただし、生焼けで 18 検体中 16 検体、中程度焼けで 18 検体中 9 検体、十分焼けで 18 検体中 4 検体について 0157 が死滅していなかった。

(考察)

直火焼肉調理における菌数の減少は、カルビで最も菌の減少率が低く、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/10 であり汚染菌が生残する可能性が考えられる（表１）。また、中程度焼けで約 1/10,000、十分焼けで約 1/100,000 に至たり汚染菌数が高い場合でも十分に調理すれば菌が死滅することが考えられた。ロースでは生焼けで約 1/10,000 には至らないものの約 1/1,000 には減少し、中程度焼けで約 1/100,000、十分焼けで約 1/1000,000 に減少したことから、調理を行えば菌の死滅が期待できると思われた。大腸では生焼けおよび中程度焼けで約 1/1,000、十分焼けで約 1/100,000 に減少したことから、ロースと同様に調理を行えば菌の死滅が期待できると思われた。カルビでは加熱時間が短く生焼けで片面 10 秒であり、カルビおよび大腸の 45 秒に比べて 1／２から１／４程度の時間である。カルビでは片面焼成時に 150℃に上昇していたが、ロースと大腸では 200℃以上に至った。カルビでは加熱によって焦げやすく、食するに適当な焼成程度がロースと大腸とは異なるため加熱による菌の減少効果が少ないものと考えられる。大腸では中程度に焼いた場合、生焼けと比べて検体の重量の減少は大きかったが、菌数の減少はほぼ同じであった。大腸は焼く過程で形態が変化し特に始めの片面を焼いている時に丸くなるため熱がかかりにくい場所が生じることが考えられる。十分焼けにおいては、ロースで最も菌数が減少し、大腸およびカルビではそれよりも約 10 倍高い菌数が生残した。加熱時間はカルビとロースはともに 90 秒であり、大腸では 210 秒もの加熱を行っていたことから、菌数の減少率には肉の種類における物性的特性が影響されることが考えられた。

昨年に行ったレバーと大腸を対象にしたホットプレート使用の焼肉調理では、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/100、十分焼けで約 1/5,000 に死滅することが明らかになったが、今年度の直火調理では大腸について生焼けで約 1/1,000, 十分焼けで 1/100,000 に死滅することからホットプレートでの調理に比べて直火での調理が加熱効果の高いことが明らかになった。しかし、直火の場合、調理器具の鉄板の場所によって火のあたり方が異なることが考えられ、ロースでは中程度焼けと十分焼けの両方で菌数の減少が大きい結果ではあったものの中程度焼けのほうが十分焼けよりも菌数の減少が大きい結果となっている。このため、加熱にムラがあることも考慮する必要があると考えられた。

(結論)

直火焼肉調理によって十分に調理すれば腸管出血性大腸菌の死滅が期待できることが示唆された。また、使用した肉の中ではロースにおいて菌数の減少が大きく、肉の種類によって加熱による菌数の減少率に差があることが明らかになった。さらに直火焼肉調理はホットプレートによる調理と比較して菌数の減少が大きいため、調理方法としては食中毒の発生を低めることが考えられるが、生焼けの状態では十分な菌数の減少の期待ができず、十分に調理することが重要である。

表１　牛肉の直火焼成モデルによる菌数および重量の減少のまとめ

牛肉の種類		焼成程度 生焼け	中程度焼け	十分焼け
カルビ	菌数減少率*	1/11 (0.09)	1/7080 (0.0001)	1/83176 (0.00001)
	死滅検体率（%）	0	16.7	61.1
	重量減少率（%）	3.2	14.6	33.1
	片面あたりの加熱時間（秒）	10	30	90
ロース	菌数減少率*	1/5754 (0.0002)	1/301995 (0.000003)	1/812831 (0.000001)
	死滅検体率（%）	0	50.0	66.7
	重量減少率（%）	7.1	13.9	23.9
	片面あたりの加熱時間（秒）	22.5	45	90
大腸	菌数減少率*	1/1202 (0.0002)	1/1950 (0.0005)	1/102329 (0.00001)
	死滅検体率（%）	11.1	50.0	50.8
	重量減少率（%）	17.0	29.9	48.7
	片面あたりの加熱時間（秒）	45	90	210

＊　初期菌数が5.0-6.0 log cfu/検体

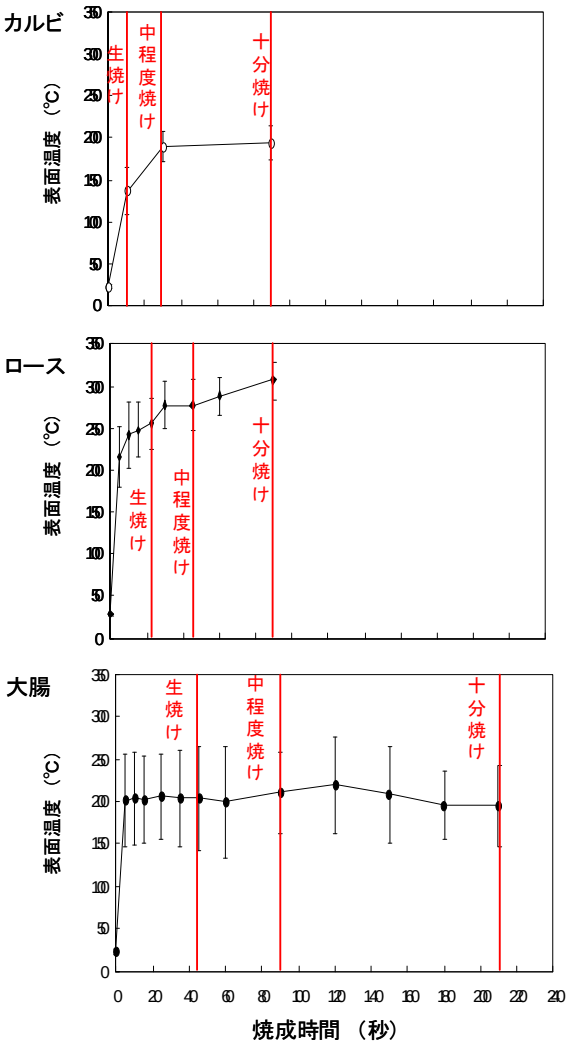


図1　片面焼成時の牛肉の温度推移

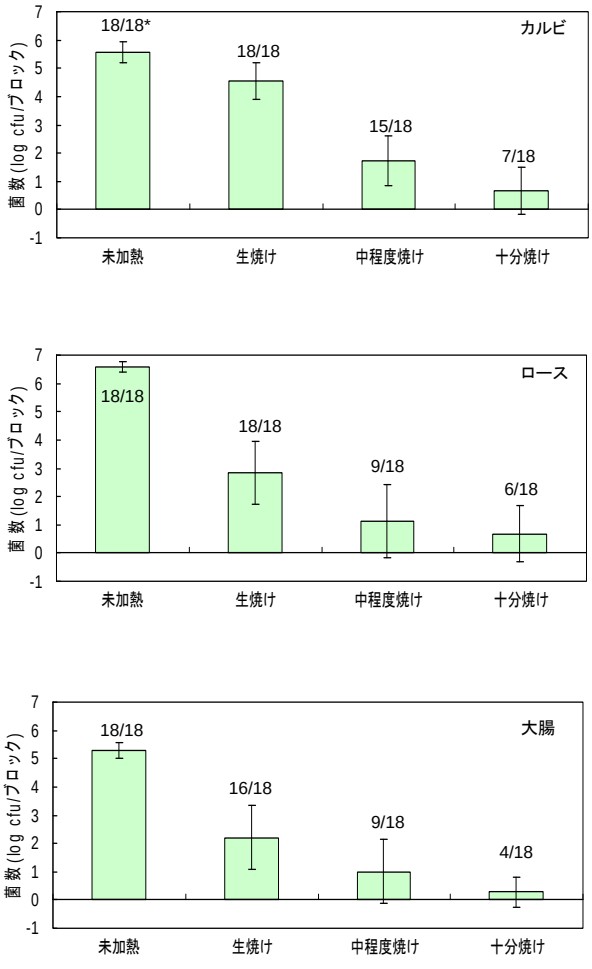


図2　焼成時の牛肉中の菌数の減少

*検出検体数／試験検体数

２）「分担課題：腸管出血性大腸菌の病原性評価」分担研究者：伊豫田淳
協力研究者：寺嶋淳、泉谷秀昌（国立感染症研究所・細菌第一部）

①平成２１年度の研究目的

血清型別：ヒト由来の腸管出血性大腸菌について血清学的な解析を行い、流行株の変化に関する情報を得ると共に、菌株情報を整理して下記で述べる解析を行う上での基礎データとすることを目的とする。

遺伝子型別：米国の研究者を中心とした研究グループによって、腸管出血性大腸菌 O157:H7 株における 96 遺伝子座における SNPs 解析に基づく DNA 型別法が開発された（文献 1, 2）。この clade 解析法によって、これまでに分離された集団発生由来の O157:H7 株はおおよそ 9 つの遺伝学的 clade（clade 1-9）に分類され、2006 年に米国で発生したホウレン草やレタスが原因となった二つの集団発生由来株は clade 8 として型別された。腸管出血性大腸菌感染による HUS の発症率（全患者数に対する HUS 発症数）は、通常の事例では 5%程度あるいはそれ以下と見積もられているが、clade 8 株による上記の 2 つの集団発生事例ではそれぞれ 15%と 11%であることが報告されており、このため clade 8 は高病原性であると推定されている（文献 1）。そこで我々は、国内でヒトから分離された O157:H7 株から、HUS 患者由来と無症状保菌者由来株をほぼ同数抽出し、それらの株の clade 解析を行うと共に、牛由来の O157:H7 株における clade 8 の分布について解析した。これまでの我々の研究成果から、日本国内において 2004 年-2008 年に分離された HUS 患者由来の O157:H7 株には、無症状保菌者由来株と比較して clade 8 が有意に多く存在することが明らかとなった。そこで、今年度は国内で 1999 年-2003 年、および 2009 年に単離された HUS 患者由来の O157:H7 株、およびこれらと同数の無症状保菌者由来株、さらに牛由来の新規 O157:H7 株について同様な解析を行うと共に、これらの株の PFGE および MLVA による解析結果との比較から、リスクが高いと考えられる O157:H7 株の由来および PFGE・MLVA 型について明らかにすること、clade 8 株の病原性について明らかにすることを目的とした。

②平成 21 年度の研究方法

（結果・考察）

血清型別：自家調製した抗大腸菌抗血清またはデンマーク血清学研究所（Statens Serum Institute: SSI）から購入したフルセットの抗血清を用い、オートクレーブ処理（121℃, 1 時間）した加熱死菌（O 抗原用）またはホルマリン固定菌（H 抗原用）を用いて、定法に従って血清型（O:H 型）を決定した。自家血清と SSI 血清を用いた結果が異なる場合には SSI 血清の結果を採用した。

培養上清蛋白質の解析：三大血清群（O157, O26, O111）のほぼすべての腸管出血性大腸菌株は病原性遺伝子群として、LEE（locus of enterocyte effacement）を染色体上に持つ。LEE にコードされる 3 型蛋白質輸送装置（宿主細胞へ注入する蛋白質の輸送装置）を介して分泌される分泌蛋白質（EspA, B, P など）の培地上清中への分泌量について、培養細胞用の培地 DMEM（Dulbecco’s modified Eagle medium）培地で振とう培養した。OD_{600}=0.8 の培養上清 6ml を遠心して菌体成分と分離した後、0.45μm のフィルターでろ過し、トリクロロ酢酸溶液（最終濃度 10%（v/v））で培養上清中の蛋白質を濃縮沈殿させ、常法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で蛋白質のバンドを検出した。コントロールとして O157:H7 Sakai 株、および Sakai 株の *grlR* 欠損変異株（LEE 遺伝子群の発現量が顕著に上昇する変異株）における分泌蛋白質のバンドをデンシトメータでスキャンして数値化することで、各蛋白質の発現量を定量比較した。

エンテロヘモリシン活性の解析：LB 培地中で 37℃越夜静置培養した菌液を数μl EHT 寒天培

地（極東製薬）上に直接スポットして乾燥後、37℃, 5% CO2 インキュベーターで一晩培養して溶血環（ハロ）形成能を比較した。コントロール株としては上記 2)と同じ株を用いた。

志賀毒素産生レベルの解析：VTEC-RPLA（デンカ生研)、ノバパス ベロ毒素 EIA キット(Bio-Rad)、各種抗 Stx1A,B および抗 Stx2A,B 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって定量解析を試みた。

PFGE 解析：定法に従ってアガロースゲル内に包埋した大腸菌を溶菌し、制限酵素 *Xba*I で切断後、電気泳動パターンを解析した。系統解析には DNA フィンガープリンティング解析ソフト BioNumerics Ver 4.6 (Applied Maths)を用いた。

MLVA 解析：O157:H7 Sakai 株のゲノム配列情報を元に、9 遺伝子座の繰り返し配列のリピート数をキャピラリー型オートシークエンサーで解析し、型別を行った（Izumiya et al., unpublished)。系統解析には上記の PFGE 解析に用いた同じソフトによって行った。

clade 解析：文献 6, 7 に記載の方法に従って、clade 1, 2, 3, 8 およびその他の clade に型別した。実際には、O157:H7 Sakai のゲノム配列情報から、次の 4 つの ORF、ECs2357, ECs4130, ECs3881, ECs2521 の内部にプライマーをデザインし、PCR 反応をセットアップ後、PCR 産物の DNA シークエンシングによって、各 clade に特徴的な SNPs の解析を行った。解析順序としては、まず clade 8 に特徴的な SNP が見られる ECs2357 について解析した後、ECs4130 の SNP で clade 1, 2, 3 を抽出し、最後に ECs3881 と ECs2520 の SNPs で clade 1, 2, 3 を識別した。

③平成 21 年度の研究成果

ヒト由来の腸管出血性大腸菌の血清型別：国内でヒトから単離された腸管出血性大腸菌株（2009 年：総計 2436 株）の O 血清群の解析から、依然として O157（約 73.9%), O26（約 15.9%）の腸管出血性大腸菌が多数分離されており、全体の約 89%を占めることが判明した。一方、これら以外の O 血清群では O121, O103, O111, O91, O145, O165 などが数多く単離されている。このうち、O121 と O165 による感染者の多くは重症化していることから、今後の動向に注意を要する。O121 と O165 はいずれの血清群もこれまでのところ牛由来株にはほとんど存在しないことから、これらの由来については現時点では不明である。

1999 年-2003 年, 2009 年に分離されたヒト由来 O157:H7 株の clade 解析：1999 年-2003 年の HUS 患者由来株は 98 株で、clade 1（6 株），clade 2（27 株），clade 3（24 株），clade 8（17 株），その他の clade（24 株）で、これとほぼ同数の無症状保菌者由来株では 99 株中、clade 1（1 株），clade 2（12 株），clade 3（18 株），clade 8（5 株），その他の clade （63 株）であった。これらの解析から、clade 1 および clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株で有意に多いことが明らかとなった。2009 年に新たに分離された HUS 患者由来の O157:H7 株は 39 株（clade 1 [0 株], clade 2 [12 株], clade 3 [7 株], clade 8 [7 株], その他の clade [13 株]）で、同じく 2009 年の無症状保菌者由来株は 48 株（clade 1 [0 株], clade 2 [12 株], clade 3 [11 株], clade 8 [1 株], その他の clade [24 株]）であった。依然として clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く存在することが明らかとなったことから、国内において今後も clade 8 株の動向に注意する必要があると考えられる。

牛由来株の clade 解析：2005 年から 2009 年に牛から分離された O157:H7 株（n=21）について新たに clade 解析を行ったところ、clade 1（0 株），clade 2（1 株），clade 3（5 株），clade 8（0 株），その他の clade（15 株）となった。今年度の解析では clade 8 は牛由来の株には存在しなかったが、これまでの解析から少なくとも 3 株の clade 8 に属する株が牛由来株に存在することが明らかとなっている。このように、数は少ないものの、ヒトでの重症例の原因となっている clade 8 が牛由来の O157:H7 株に存在したことは、牛由来の重症例が存在する可能性

を示唆するデータとして重要であると考えられる。

clade と PFGE および MLVA との関連性の解析：HUS 患者由来株（n=148）および牛由来株（CN 株 n=20, KB 株 n=8 の計 28 株）について PFGE による解析を行ったところ、HUS 由来株は大きく分けて 3 つのクラスターに分類出来ることが明らかとなった（図 1）。クラスター2 は最も大きな集団であるが、I-V までのサブクラスターに分類出来る。clade 1-3 はほぼ同一のサブクラスター（2-II）に属し、clade 8 はこれらとは異なる少なくとも 2 つの異なるクラスター（2-III と 3）に属することが判明した。clade 8 と型別された株のうち、図 1 において緑で囲んだ菌株には、2006 年に東京都 M 大学で発生した集団発生由来株（PFGE 型 c47）を含まれることが判明した。この集団発生は過去 10 年間に国内で発生した集団発生としては最も規模が大きく、同じ PFGE 型 c47 を持つ株はその後 2009 年まで多数分離されている。この様に、clade 8 株が国内においても実際に大規模な散在的集団発生事例の原因株となっていることは注目に値する。

また、MLVA による解析では、HUS 株は大きく 2 つのクラスターに分けられることが判明した。クラスター1 には clade 8 以外の clade 株が含まれ、クラスター2 には解析に用いた clade 8 の全ての株とその他の clade 株の一部が含まれることが判明した（図 2）。

PFGE および MLVA による解析から、牛由来の clade 8 株（n=3, CN12, CN16, CN24）はヒト由来の clade 8 株の大部分と同じクラスターに分類出来ることが判明した。以上の結果を総合すると、ヒトの感染原因とくに重症化例の原因となっている牛由来の O157:H7 株は一部の系統の菌株であると予想され、その一部は HUS 発症の起因株と考えられるヒト由来株と同様な DNA 型を持つ株であることが判明した。

clade 8 株の病原性評価：腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素には抗原性の異なる 2 種類（Stx1 と Stx2）が存在し、このうち、患者の重症化により関連していると考えられているのが Stx2 である。各種キットあるいは特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング等による志賀毒素（Stx）の産生量の解析は定量性に欠けること、現在入手可能な Stx 検出キットは Stx2 バリアントをカバーするものではないことから、*in vitro* において clade 8 株とそれ以外の株で Stx の発現量に差があるかどうかは現時点では不明である。Stx2 の *in vivo* における発現レベルは、一酸化窒素 NO によって抑制されると報告されている（文献 3）。嫌気条件下（例えば腸管内）で活性化し、NO の還元化酵素（不活化酵素）をコードしていると考えられる *norV* はホウレン草由来株（clade 8）では保存されているが、他のシークエンス解析株（Sakai 株 [clade 1]および EDL933 [clade 3]）では遺伝子内部に欠失が見られる（文献 4）。したがって、少なくとも clade 8 株が感染した腸管内では clade 1, clade 3 の場合と比較して NO の存在量が低く、Stx2 の発現量が高い可能性がある。そこで、*norV* の遺伝子内部欠失について国内株を用いてさらに解析した。その結果、少なくとも clade 1 (n=6), clade 2 (n=15), clade 3 (n=16) では全ての株が *norV* 遺伝子内部に欠失を持っている一方、解析したすべての clade 8 株 (n=25) では同様な欠失は見られないことが判明した。以上の結果から、clade 8 株では clade 1, 2, 3 株と比較して、*in vivo*（嫌気条件下）での Stx2 の産生量が高いと予想され、このことが重症化の一つの要因になっていると推測される。

また、LEE にコードされる 3 型蛋白質分泌装置を介して 30 以上もの蛋白質が分泌されることが明らかとなっており、それらの機能は腸管出血性大腸菌の病原性に必須であると考えられている。そこで、これらの分泌蛋白質のうち、菌体外への分泌量が多い蛋白質の培養上清への分泌量を定量することで、LEE の発現レベルを解析した。培養上清中の EspB, EspA および EspP 蛋白質を SDS-PAGE で可視化した後、各蛋白質のバンドをデンシトメータで測定して数値化した。解析には clade 8 (n=18) とそれ以外の clade (n=17) 株を用いた。すべてのバンドスキ

ャンデータを平均した後、clade 8 株とそれ以外における発現量の割合を求めたところ、全ての蛋白質で clade 8 株はその他の株に比べて 1.5 倍以上の発現量を示すことが判明した。

さらに、エンテロヘモリシンの発現レベル解析をした。我々の研究成果（文献 5）から、LEE の発現とエンテロヘモリシンの発現は協調的に行われていることが明らかとなっている。すなわち、LEE の発現上昇が見られる *grlR* 欠損株では、野生株と比較して LEE のみならず、エンテロヘモリシンの発現が顕著に上昇する。上記の通り、clade 8 株では LEE の発現上昇が見られる。そこで、clade 8 株のエンテロヘモリシン活性を EHT 寒天培地上で解析した。各菌株のエンテロヘモリシン活性を溶血環（ハロ）形成能で解析した。その結果、clade 8 株は *grlR* 変異株と同様に明確なハロ形成を行う株が数多く存在することが明らかとなった。以上の結果から、clade 8 株では LEE に加えて、エンテロヘモリシンの発現活性も上昇しているものと推論された。

以上の結果から、以下の結論を得た。

・高病原性と考えられる腸管出血性大腸菌 O157:H7 株（clade 8)による感染例は 1999 年から国内で発生していることが明らかとなった。
・clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して、HUS 患者由来株に有意に多く存在した。
・clade 8 株は clade1, 2, 3 と比較して腸管内での志賀毒素 2 型の発現量が高い可能性が予想された。
・clade 8 は他の clade と比較して病原性因子（LEE およびエンテロヘモリシン）の発現量が上昇していたことから、高病原性の一要因となっていることが予想された。

【参考文献】

1) Proc. Nat. Acad. Sci. 105: 4868-4873, 2008.
2) J. Clin. Microbiol. 46: 2070-2073, 2008.
3) Proc. Nat. Acad. Sci. 104: 10199-10204, 2007.
4) Infect. Immun. 77: 3713-3721, 2009.
5) J. Bacteriol. 190: 4822-4830, 2008.

図 1. HUS 由来株および牛由来 clade 8 株の PFGE 解析

黄色：clade 1，ピンク：clade 2，白抜き：clade 3，緑：clade 8，青色：other clades。紫で囲んだ PFGE 型は 2006 年に発生した東京都 M 大学の集団発生事例株を含む（本文参照）。茶色のドットは牛由来株を示す。

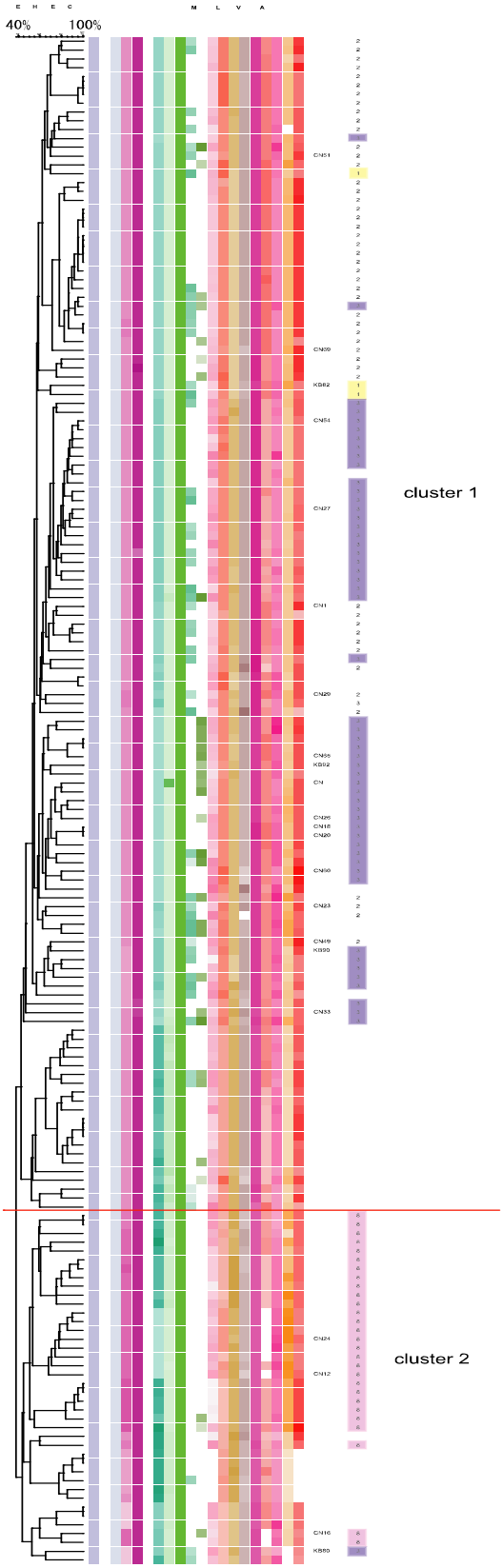


図 2. HUS 由来株および牛由来 clade 8 株の MLVA 解析

右端のカラムが clade を示す(黄色塗り:clade 1, 青色塗り:clade 2, 黒字:clade 3, ピンク塗り:clade 8, 空白:other clades)。右から二番目のカラムの菌株番号記載株は牛由来の株を示す。

３）「分担課題：牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析」分担研究者：小林秀樹

①平成２１年度の研究目的

平成２０年度に 2 県 50 農場、200 頭の乳牛から分離した 45 株の STEC について 0 群血清型別とインチミン遺伝子（*eae*）の保有状況を調べる。また、肥育肉牛（黒毛和種）の STEC 保有状況を調査するため、２県 19 農場 96 頭の直腸便を材料として志賀毒素遺伝子を PCR で間接的にスクリーニングする。さらに、分離した STEC 株について乳牛由来株と同様に 0 群血清型別や *eae* 遺伝子の保有状況の調査を行う。

②平成２１年度の研究方法

牛直腸便材料からの STEC の分離は検査材料を mEC 培地で 37℃、6～18 時間増菌培養したものをマッコンキー寒天培地に塗抹培養（37℃、18 時間）後、密集落から作製した DNA テンペレートについて各種志賀毒素遺伝子である *stx*1，2，2e，2f および腸管出血性大腸菌株が保有する細胞外膜蛋白をコードする *eae* 遺伝子の各遺伝子を PCR によりスクリーニングした。スクリーニング陽性平板はそれぞれの遺伝子に特異的な DNA プローブによるコロニーハイブリダイゼーションまたはコロニー単位での PCR により目的とする STEC 株を分離した。陽性検体あたりの検査コロニー数は 16～24 個とし、STEC 株と同定されたコロニーは１検体あたり 3 株までを以降の検査に供試した。分離 STEC 株の 0 群血清型別は 01～0176 までの抗血清を供試したマイクロプレート凝集反応で実施した。志賀毒素遺伝子の型別は各志賀毒素遺伝子特異 PCR で、インチミン遺伝子も PCR で確認した。同一検体から収集した STEC 株でこれらの性状が一致した場合は同一クローンと判定した。

③平成２１年度の研究成果

（結果・考察・結論）

肉牛（黒毛和種）の STEC 保有率は 51%（49/96）でり、2007 年に乳牛から採材したそれの 30.4%（283/932）と比較して有意に高かった。また、スクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから 61 株（同一検体からの同一クローンは任意の１株を選出）の STEC が分離されたことは、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合が乳牛のそれよりも極めて高いことを示唆するものであった。これは昨年度報告した乳牛での成績（陽性 283 検体、分離株数 118 株）との比較である。

乳牛(表１)および肉牛(表 2)からの分離 STEC 株の既知 0 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な 0 群血清型は 01、02、07、08、020 および 0150 の 6 血清型であった。また、以前に報告された国内乳牛由来 STEC の 0 群血清型の分布と比較して、今回調査した乳牛由来株の 0 群血清型の大半が既報のそれと一致することが確認された。さらに、分離株の *eae* 保有率は乳牛と肉牛で大きな差異はなかったが、保有株の 0 群血清型は異なっていた。これらのことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

表1　2008年度分離乳牛由来STEC 45株の
O群血清型と*eae*遺伝子保有状況

O群血清型	志賀毒素遺伝子タイプ	*eae*遺伝子	菌株数
O1	2	−	1
O2	1	−	2
O2	1&2	−	5
O7	1	+	1
O8	1	−	1
O8	1&2	−	3
O13	1	−	1
O15	1&2	−	1
O17	1	−	1
O20	1&2	−	1
O28	1	−	1
O28	1&2	−	1
O55	1	−	2
O84	1	+	1
O91	1&2	−	1
O113	1&2	−	2
O116	1&2	−	2
O117	1&2	−	1
O125	1&2	+	1
O130	1&2	−	2
O150	1&2	−	1
O151	2	−	1
O153	1&2	−	3
O163	1&2	−	1
O163	2	−	6
ONT	2	−	2

ONT: 既知O群血清と反応が確認されなかったもの

表2　2009年度分離肉牛由来STEC 61株の
O群血清型と*eae*遺伝子保有状況

O群血清型	志賀毒素遺伝子タイプ	*eae*遺伝子	菌株数
O1	1&2	−	1
O1	1	−	2
O2	1	−	1
O7	1	−	1
O8	1	−	3
O9	1	−	2
O18	1	−	1
O20	1	+	1
O21	1	−	1
O22	1	−	1
O25	1	+	1
O26	1	−	1
O32	1	−	1
O36	1	−	1
O39	1	+	1
O41	1	−	1
O42	1	−	1
O44	1	−	1
O49	1	+	1
O53	1	−	2
O57	1	−	1
O74	1	+	1
O78	1	−	1
O112	1	−	2
O120	1	−	2
O126	1	−	1
O128	1	+	1
O128	1	−	1
O136	1	−	1
O139	1	−	2
O142	1	−	1
O150	1	−	1
ONT	1	+	4
ONT	1	−	11
OUT	1	−	6

ONT: 既知O群血清と反応が確認されなかったもの
OUT: 自発凝集を示したもの

４）３年間の研究成果のまとめ

１　研究全体の成果

①全体の研究目的

食中毒を含め食品に媒介される病原微生物による感染症のリスク評価には、食品中での病原体の挙動や病原体のヒトへの病原性に関する研究データが必須である。本研究では、腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価のために必要とされるデータを得ることを目的とした。日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品として牛肉および牛内臓肉の焼肉調理、レバー、ユッケなど牛肉の生食などがあげられる。このため、焼肉の調理過程を想定し牛肉および牛内臓肉での腸管出血性大腸菌の挙動を明らかにすることを目的とした（主任研究者：工藤由起子)。また、腸管出血性大腸菌の主たる保菌動物である牛からは多様な血清群が分離されるにもかかわらず腸管出血性大腸菌感染事例全体の約 70%を血清群 O157 が占め、溶血性尿毒症症候群（HUS）の起因菌の約 90%以上が血清型 O157:H7 によるものである。このため、牛が保菌する腸管出血性大腸菌の血清群、毒素産生型など性状の調査を行う（分担研究者：小林秀樹）とともに、ヒトおよび牛から分離された株の遺伝子による菌株相互間の DNA 型の比較や系統学的解析、既知の病原性遺伝子の分布解析や発現量の解析を行うことによって、牛由来の腸管出血性大腸菌によるヒトへの感染の実体を明らかにすること（分担研究者：伊豫田淳）を目的とした。

②全体の研究方法

工藤由起子（腸管出血性大腸菌の食品中での動態解析）

［１］焼肉調理料中での菌の挙動の解析：

市販焼肉用調味料 15 種類を対象に pH、塩分濃度を測定し異なる条件の４種類を選び試験した。試験菌株は、分担研究者保有の牛由来血清群 O157 の 10 株とした。試験条件は 25℃とし、60 分まで菌の挙動を経時的に計測した。

［２］牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化：

血清群 O157 および O26 の汚染のないことを確認した牛レバーおよび大腸を実験に使用した。汚染方法は牛レバーでの内部汚染および表面汚染、大腸での内腔側汚染とした。接種菌株は分担研究者保有の HUS 患者株の血清群 O157 および O26 とした。汚染後、４℃で０、３、６、24 時間保存した。菌数の測定のために、各検体に PBS を加えストマッカー処理して乳剤原液を作製した。これを 10 倍階段希釈して各希釈液を血清群 O157 分離のために CT-SMAC、血清群 O26 分離のために CT-RMAC に塗抹した。37℃20 時間培養しコロニーを各血清にて凝集反応を確認した。

［３］ホットプレートでの焼肉調理による菌数の減少：

牛レバーおよび大腸に国立感染症研究研保有の HUS 患者株の血清群 O157 および O26 を接種した。加熱調理器具は温度設定のできるヒートブロックを使用した。焼き方は生焼け、中程度焼け、十分焼けの３種類とし、菌数の測定は、前述と同様に乳剤希釈液を作製し血清群 O157 では CT-SMAC およびクロモアガーO157、血清群 O26 では CT-RMAC および RX-O26 に塗抹し、37℃ 20 時間培養しコロニーを各血清にて凝集反応を確認した。

［４］直火での焼肉調理による菌数の減少：

焼肉用にスライスした牛カルビ肉、ロース肉および大腸を使用した。分担研究者の研究成果および情報から HUS の発症が高いとされる血清群 O157 の clade 8 に型別されるヒト由来 O157:H7（stx2、clade8）３株を使用した。加熱器具は焼肉用の直火ガスコンロとし、加熱程度は、生焼け、中程度焼け、十分焼けの３種類とした。菌数の測定は、ホットプレートでの焼肉調理と同様に行った。

［５］汚染肉からの調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉への汚染：

汚染した牛レバーおよび大腸の両面を箸およびトングの表面に付くようにして掴んだ。さらに、調理器具の肉をつかむ部分を菌液に漬け、あらかじめ焼いた非汚染肉を上記と同様に掴んだ。汚染肉を取り扱い調理器具で掴んだときの調理器具はストマッカー袋に入れた 100 ml の PBS に汚染部位をつけて 1 分間洗った。汚染取り扱い調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉をストマッカー袋に入れて PBS を加えストマッカー処理を行った。原液および希釈液を前述と同様に培地に塗抹して行った。

伊豫田淳（腸管出血性大腸菌の病原性評価）

［１］供試菌株：

PFGE 解析用 O157 株として、国内有症者由来株 50 株、牛由来の 97 株を用いた。O157：H7 の系統学的解析（clade 解析）には、国内 HUS 患者由来 311 株、無症状保菌者由来株 312 株、牛由来株 83 株を用いた。また、一部の株を病原性遺伝子の分布および病原性因子の発現レベル解析に用いた。

［２］血清型別：

自家調製した抗大腸菌抗血清またはデンマーク血清学研究所（Statens Serum Institute: SSI）から購入したフルセットの抗血清を用い定法に従って血清型（O:H 型）を決定した。

［３］病原性遺伝子の分布解析：

stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, eae, sub, AnorV について、特異的な PCR 反応系を行って解析を行った。

［４］培養上清蛋白質の解析：

菌を培養細胞用の培地 DMEM（Dulbecco’s modified Eagle medium）培地で振とう培養し、ろ液中の分泌蛋白質（EspA, B, P など）を常法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分泌蛋白質のバンドをデンシトメータでスキャンして数値化することで、各蛋白質の発現量を定量比較した。

［５］エンテロヘモリシン活性の解析：

EHT 寒天培地（極東製薬）に接種後、37℃, 5% CO2 インキュベーターで一晩培養して溶血環（ハロ）形成能を比較した。

［６］志賀毒素産生レベルの解析：

VTEC-RPLA（デンカ生研）、ノバパス ベロ毒素 EIA キット（Bio-Rad）、各種抗 Stx1A,B および抗 Stx2A,B 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって定量解析を試みた。

［７］PFGE 解析：

定法（文献 5）に従ってアガロースゲル内に包埋した大腸菌を溶菌し、制限酵素 *Xba*I で切断後、電気泳動パターンを解析した。系統解析には DNA フィンガープリンティング解析ソフト BioNumerics Ver 4.6 (Applied Maths)を用いた。

［８］MLVA 解析：

O157:H7 Sakai 株のゲノム配列情報を元に、9 遺伝子座の繰り返し配列のリピート数をキャピラリー型オートシークエンサーで解析し、型別を行った（Izumiya et al., unpublished)。系統解析には上記の PFGE 解析に用いた同じソフトによって行った。

［９］clade 解析：

既存の方法に従って、clade 1, 2, 3, 8 およびその他の clade に型別した。実際には、O157:H7 Sakai のゲノム配列情報から、次の 4 つの ORF、ECs2357, ECs4130, ECs3881, ECs2521 の内部にプライマーをデザインし、PCR 反応をセットアップ後、PCR 産物の DNA シークエンシングによって、各 clade に特徴的な SNPs の解析を行った

小林秀樹（牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析）

［１］乳牛由来株：

1998 年分離実験室保存 92 株：1998 年に関東甲信越地域の 78 農場から収集した 358 頭の乳牛直腸便から分離した 92 株の STEC をミストディスカンスに浮遊し、-80℃で凍結保存した。2006～2007 年分離 118 株：関東甲信越地域を中心に 11 県 123 農場の 932 頭の直腸便から分離した。2008 年分離 45 株：九州地域の 2 県 50 農場 200 頭の直腸便から分離した。腸管出血性大腸菌の分離は、検査材料を mEC 培地で 37℃、6～18 時間増菌培養したものをマッコンキー寒天培地に塗抹培養（37℃、18 時間）後、密集落から作製した DNA テンペレートについて各種志賀毒素遺伝子である *stx*1，2，2e，2f およびほとんど全ての腸管出血性大腸菌株が保有する細胞外膜蛋白をコードするインチミン遺伝子（*eae*）の各遺伝子を PCR によりスクリーニングした。スクリーニング陽性平板はそれぞれの遺伝子に特異的な DNA プローブによるコロニーハイブリダイゼーションまたはコロニー単位での PCR により目的とする株を分離した。陽性検体あたりの検査コロニー数は 16～24 個とした。分離株の O 群血清型別は 01～0176 までの抗血清を供試したマイクロプレート凝集反応で実施した。志賀毒素遺伝子の型別は各志賀毒素遺伝子特異 PCR で、*eae* のサブタイピングは各サブタイプ特異 PCR と DNA シーケンスを併用して実施した。肉牛由来 STEC 分離株は *eae* 保有の有無のみを PCR で確認した。

［２］肉牛（黒毛和牛）由来株：

2009 年度に 2 県 19 農場 96 頭から採材した直腸便材料について前述と同様の方法で STEC を分離し、各種性状を調べた。

［３］実験室保存 0157 株：

当課題分担担当者らが分離保存していた株、あるいは各県より病性鑑定依頼のあった株の合計 26 株とした。

［４］分離 STEC 株の薬剤感受性試験：

乳牛および肉牛由来の STEC 株についてアンピシリン、カナマイシン、硫酸ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、オキシテトラサイクリン、コリスチン、クロラムフェニコール、ナルジクス酸、セファレキシンおよびエンロフロキサシンに対する薬剤感受性試験を実施した。

③研究成果

工藤由起子（腸管出血性大腸菌の食品中での動態解析）

［１］焼肉調理料中での菌の挙動の解析：

牛由来の血清群 0157 を焼肉用調味料に菌を添加した直後、いずれの調味料においても初期菌数より若干減少した（10 株平均：約 0.30 log cfu/ml）調味料の条件および菌株の病原因子や病原性遺伝子保有の特徴による明確な差は認められなかった。

［２］牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化：

血清群 0157 のレバーでの内部汚染および表面汚染、大腸での内腔汚染では 4℃で 24 時間保存後の菌数はほとんど減少しなかった。血清群 026 についても同様の結果であり、血清群 0157 および 026 は牛内臓肉中において 24 時間の低温保存によって菌数がほとんど減少しないことが考えられる。

［３］ホットプレートでの焼肉調理による菌数の減少：

汚染肉の加熱調理による菌数の減少の結果では、血清群 0157 および 026 ともに、またレバーおよび大腸ともに、焼き方の程度が強い程菌数の減少が大きい結果であり、十分に焼けば 1 検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/1000～1/5000 に菌数が減少した。

［４］直火での焼肉調理による菌数の減少：

牛肉の種類で比較すると、カルビおよびロースでの重量の減少率は比較的近い値であったが、大腸では重量の減少率が大きく十分焼けで重量は加熱前の約半分まで減少した。焼成時

間と温度推移を各牛肉の種類で比較すると、カルビでは温度上昇がロースより低くまた加熱時間が大腸の半分以下であった。

［５］汚染肉からの調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉への汚染：

汚染肉を調理器具で掴んだ時の器具汚染の結果では、１検体（焼肉用サイズの肉検体）に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染したことが明らかになった。汚染調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉の汚染の結果では、器具１検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉に移ることが認められた。

以上の結果から、以下の結論を得た。ただし、焼肉調理実験の結論については本研究で使用された器具および条件下に限定された結果に基づくものである。

・腸管出血性大腸菌の生残や増殖には温度、pH および水分活性が影響し酸耐性が通常の大腸菌よりも高いことが報告されていることから、焼肉調味料中での生残を確認したところ、pH が最低 4.5、塩分濃度が最高 11％まで菌数の減少などは見られず耐性が認められた。

・食肉処理の段階で牛肉が腸管出血性大腸菌に汚染された場合、低温保存で菌数は維持され減少しないことが示された。この牛肉をホットプレート使用の焼肉調理した場合、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/100、十分焼けで約 1/1000～1/5,000 に牛肉中の菌数が減少することが示されたが、直火での調理では十分焼けで約 1/100,000～1/1000,000 に菌数が減少したことから直火焼肉調理によって十分に調理すれば腸管出血性大腸菌の死滅が期待できることが示唆された。また、使用した肉の中ではロースにおいて菌数の減少が大きく、肉の種類によって加熱による菌数の減少率に差があることが明らかになった。さらに直火焼肉調理はホットプレートによる調理と比較して菌数の減少が大きいため、調理方法としては食中毒の発生を低めることが考えられる。

・調理器具を介した焼肉調理時の牛肉の汚染は、汚染肉を調理器具で掴んだ場合、１検体（焼肉用サイズの肉検体）に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染し、汚染調理器具で焼成後の牛肉を掴んだ場合、器具１検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉を汚染することが認められた。総ずると、十分に牛肉を焼肉調理した場合でも同一の調理器具を焼成前の汚染肉および焼成後の牛肉に共通して使用することによって、焼成前の牛肉１検体あたり約 1/1000～1/100000 の菌数が焼成後の牛肉を汚染することが示唆された。

伊豫田淳（腸管出血性大腸菌の病原性評価）

国内でヒトから単離された腸管出血性大腸菌株（2007-2009 年：総計 8434 株）の O 血清群の解析から、依然として O157（約 73.9%），O26（約 15.4%）および O111（約 3.2%）が多数分離されており、全体の約 92％を占めることが判明した。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の病原性遺伝子（*stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, eae, subA*）の分布の解析では、全ての株は *eae* を保有するが、*subA* は保有しないことが明らかとなった。*stx2c* は、ヒト由来株では 24%、牛由来株では 68.5％が陽性であった。また、バリアント *stx2c* のみを保有する株は牛由来株に多いことが明らかとなった。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の PFGE による系統解析では、相同性 80%で区切った場合には 12 のクラスター（I-1, I-2, II-1, II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2, V, VI, VII, VIII）に分類された。牛由来株は 11 に分類され、同じ血清群でも多様な集団である可能性が示唆された。一方、ヒト由来の 15 株のうち 14 株がクラスターII および IV に分類され、牛由来株に比べて菌株間の相同性は高いものと考えられた。以上の結果から、牛由来の O157:H7 株のいくつかは、有症者由来の株と類似した DNA 型を持つ株であることが示唆された。

ヒトまたは牛由来 O157:H7 株の病原性の解析では、いずれの手法も定量性に問題があり志賀毒素産生量の解析を行うことは不可能であった。また、3 型分泌蛋白質とエンテロヘモリシンの発現量解析では由来の違いによる発現量の差は明確ではなかった。さらに、clade 解析による O157:H7 株の型別では、まず疫学情報がはっきりした菌株（重症例である HUS 発症者由来株と無症状保菌者由来株）を用いた系統解析から、HUS 患者由来の菌株に多く見られる遺伝系統を検出することを試みた。その結果、clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く存在することが明らかとなり、clade 8 株は高病原性を示す O157:H7 の遺伝系統であると推論された。次ぎに、牛由来株の clade 解析を行ったところ、clade 8 株は少ないものの、高病原性と考えられる株が存在したことを示した意義は大きい。Clade 8 株の病原性評価では、clade 8 株では clade 1, 2, 3 株と比較して、*in vivo*（嫌気条件下）での Stx2 の産生量が高いこと、LEE の発現量は clade 8 株で有意に高いことが示唆され、このことが重症化の一つの要因になっていると推測される。また、clade 8 株では LEE に加えて、エンテロヘモリシンの発現活性も上昇していると推論された。

以上の結果から、以下の結論を得た。

- 血清型 O157：H7 は HUS 症例の起因菌として最も多い（約 90%）血清型であった。
- 血清群 O157, O26, O111 の分離割合が高いが、その他の血清群では O121, O103, O91, O165, O145 の分離頻度が高く、中でも O121 と O165 では重症者が多かったが現時点でその由来は不明である。
- 無症状保菌者と HUS 由来株の clade 解析から、clade 8 は有意に HUS 由来株に多く存在することが明らかとなった。
- clade 8 の約半数はバリアント *stx2c* を保有していた。
- 大腸菌が嫌気条件下で産生する NO（一酸化窒素： Stx2 発現の抑制因子）還元化酵素 NorV は clade 1, 2, 3 では遺伝子内部に欠失が見られる一方、clade 8 では欠失が見られないことから、clade 1, 2, 3 と比較して clade 8 では *in vivo* での Stx2 の発現が高いと推測された。
- clade 8 株は他の clade と比較して LEE の発現量が高い傾向が見られた。
- clade 8 株は他の clade と比較してエンテロヘモリシン活性が高い傾向が見られた。
- 牛由来の O157:H7 の一部はヒトで有症者由来の O157:H7 と同様な DNA 型を持つことが判明したことから、これらはヒトでの感染原因菌となっている可能性が示唆された。
- ヒトでの重症例の原因となっている株（clade 8）が牛にも分布していることが明らかとなったことから、重症感染事例の原因株の一部が牛由来の大腸菌に分布していることが明らかとなった。

小林秀樹（牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析）

Stx 検出率は、乳牛（2007 年）で 30.4%（283/932)、肉牛（2009 年）で 51%（49/96）であり、肉牛で有意に高かった。また、肉牛でのスクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから STEC（61 株）が分離されたことは、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合が乳牛のそれよりも極めて高いことを示唆するものであった。また、*eae* 検出率は、乳牛および肉牛のいずれにおいても stx 陽性率を上回る結果となった。特に肉牛では約 70%（67/96）が陽性であった。本課題担当者が 2001 年に収集した乳牛直腸便 444 検体を調査したデータにおいて、*eae* 検出率は最も陽性率の高かった哺乳牛の 31.4%を加えても全体平均で 16.7%に過ぎなかった。STEC 保有率が低減化したのに *eae* 保有大腸菌（腸管病原性大腸菌）が増加した理由は不明である。さらに、stx&eae 検出率は、乳牛で 12.8%(119/932)、肉牛で 43.8%（42/96）であり、これも肉牛で高い結果であった。これらのことから、人への病原性を有する株が牛で保有されている

ことが示された

乳牛および肉牛からの分離 STEC 株の既知 O 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な O 群血清型は 01、02、07、08、020 および 0150 の 6 血清型であった。また、以前に報告された国内乳牛由来 STEC の O 群血清型の分布と比較して、今回調査した乳牛由来株の O 群血清型の大半が既報のそれと一致することが確認された。さらに、乳牛と肉牛の STEC 株の O 群血清型は異なっていた。これらのことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

薬剤平板希釈法を供試した薬剤感受性試験では、1998 年分離 STEC 92 株の薬剤耐性株は 8 株（8.7%）で、うち 6 株が単剤耐性、残りの 2 株が 2 剤耐性であったのに対し、2007 年分離株は 28 株（23.7%）が薬剤耐性を示し、うち 8 株が 3 剤以上の耐性、13 株が 2 剤耐性であった。近年分離株の薬剤耐性化が明らかであり、3 あるいは 4 剤耐性 STEC 株が新たに見出されたことは公衆衛生上の観点からも懸念すべき状況と考えられる。一方、肉牛への抗菌剤使用は乳牛へのそれと比して非常に多いため、肉牛由来 STEC 株の多剤耐性化は乳牛のそれよりいっそう顕著であると考えられる。

牛の分離株 232 株を分担研究者の研究に提供した。提供にあたり可能な限り同一クローンの重複を避けて選択した。

以上の結果から、以下の結論を得た。

・乳牛および肉牛で人に病原性を有すると考えられる腸管出血性大腸菌が保有されていることが示された。
・乳牛と肉牛の STEC 株の O 群血清型は異なっていたことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。
・STEC 株の薬剤耐性化が明らかであり、肉牛由来 STEC 株の多剤耐性化は乳牛よりいっそう顕著であると考えられる。

３者の協力体制から得られた成果

小林秀樹（分担研究者）から提供された牛由来 0157 株を伊豫田淳（分担研究者）が遺伝子解析をしたところ、牛由来株は人由来株より遺伝子型はバラエティーに富むが、ヒトと同じ PFGE クラスターに属するものや HUS の発症性が高いとされている Clade8 に属するものもあることが判明し、牛の株の一部が人に病原性を示すことが考えられた。しかし、工藤由起子（主任研究者）が調味料中での牛由来 0157 の生残性を解析したところ、菌株での差は大きくなかった。Clade２、clade３および１,2,3,8 以外の clade に属する９株は、一部低い生残性を示す調味料の組み合わせもあったが、clade との関連性を示す特徴はなかった。また、Clade8 であった CN16 株は、他の株に比べて生残性が高いことはなく、むしろ低い結果であった。このため、ヒトの病原性が高いと考えられる株についても他の株と同様の制御ができるものと考えられた。しかし、さらに株数や試験条件を加えて検討をする必要があるものと考えられる。また、焼肉調理での加熱での牛肉および牛内臓肉中の菌数の減少について、分担研究者の解析した病原性が高いとされる株を用いて検討を行うことができた。その結果、肉が重度に汚染されていても直火調理での十分な加熱によって菌の死滅が期待でき、中程度の加熱やホットプレートでの調理でも十分に加熱すれば１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/1000 以上に菌数が減少することから、汚染菌数が多くなければ加熱によって食中毒の発生が防げるものと考えられた。

本研究では、本研究では、肉牛および乳牛（最終的には国産牛肉として流通）の血清群 0157 など患者から分離される血清群や STEC の保有率のデータが得られ、これはリスク評価での生産段階での保有率の数値に貢献できる。牛内臓肉の低温保管中に腸管出血性大腸菌は増加しないが減少もせずに菌数が維持されていることが明らかになり、リスク評価には低温保管中の菌数の変化を

大きな要因にはならないといえる。また、焼肉調理での調味料は比較的酸性で塩濃度が高いが、菌数の減少は期待できないことが明らかになった。焼肉調理を家庭でのホットプレートを使った調理および焼肉店での直火での調理を想定し加熱調理での菌数の減少を数値として求めた。これらのデータはリスク評価で具体的な数値として用いることができる。さらに、焼肉調理にともなう生肉から器具の汚染および器具からの焼成済みの肉への汚染が起こることが明らかになった。汚染する菌数の割合も求めることができたためリスク評価に用いることができる。これらのデータは、腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価に貢献するものと考える。

④今後のリスク評価への貢献、リスク評価との関係

腸管出血性大腸菌の牛肉を介した感染症のリスク評価のために必要とされるデータを得ることを目的とした。特に、日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品として牛肉および牛内臓肉の焼肉調理、レバー、ユッケなど牛肉の生食などがあげられるため、焼肉の調理過程を想定し牛肉および牛内臓肉での腸管出血性大腸菌の挙動を明らかにすることを目的とした。本研究では、肉牛および乳牛（国産牛として肉が販売される）の血清群 0157 など患者から分離される血清群の保有率のデータが得られ、これはリスク評価の農場での汚染率の数値に貢献できる。食肉処理場での牛内臓肉の低温保管中に腸管出血性大腸菌は増加しないが減少もせずに菌数が維持されていることが明らかになり、リスク評価には低温保管中の菌数の変化を大きな要因にはならないといえる。また、焼肉調理での調味料は比較的酸性で塩濃度が高いが、菌数の減少は期待できないことが明らかになった。焼肉調理を家庭でのホットプレートを使った調理および焼肉店での直火での調理を想定し加熱調理での菌数の減少を数値として求めた。これらのデータはリスク評価で具体的な数値として用いることができる。さらに、焼肉調理にともなう生肉から器具の汚染および器具からの焼成済みの肉への汚染が起こることが明らかになった。汚染する菌数の割合も求めることができたためリスク評価に用いることができる。本研究では、人への病原性が高い腸管出血性大腸菌の解析も進めており、焼肉調理実験ではそれら腸管出血性大腸菌を含めて検討した。

２　各分担研究者（分担課題）の成果

１）「分担課題：腸管出血性大腸菌の食品中での動態解析」

主任研究者　工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所)
協力研究者　大塚佳代子（埼玉県衛生研究所)、森田幸雄（群馬県環境保健センター)、
宮坂次郎（熊本県食肉検査センター)、
和栗　敦（青森県環境保健センター)、楠原　一（三重県保健環境研究所）

①研究目的

日本での腸管出血性大腸菌食中毒の主な原因食品として牛肉および牛内臓肉の焼肉調理、レバー、ユッケなど牛肉の生食などがあげられる。焼肉調理は日本などの限られた国でしか食されていないため、研究データがほとんどない。このため、本研究では焼肉の調理過程を想定し牛肉および牛内臓肉での腸管出血性大腸菌の挙動を明らかにすることを目的に研究を実施した。また、汚染されたこれら食品を取り扱う箸などの調理器具を介した二次汚染の科学的な検証を行うために、汚染菌数が調理器具の汚染を介し非汚染食品を汚染する菌量を測定した。分担研究者の解析した人への感染リスクが高いと考えられる血清群や遺伝子型を保有する菌株を含めて検討した。

②研究方法

［１］焼肉調理料中での菌の挙動の解析

市販焼肉用調味料 15 種類を対象に pH、塩分濃度を測定したところ、それらの pH は 4.4 から 5.3、塩分濃度は 6.3 から 12.0％であった。これらのうち、異なる条件である４種類の調味料（調味料１：辛口、pH 4.5, 塩分 6.8%、調味料２：塩だれ、pH 5.3, 塩分 11.4%、調味料３：辛口、pH 4.6, 塩分 10.2%、調味料４：中辛、pH 5.1、塩分 7.5%）を選び試験した。試験菌株は、本年度は血清群 0157 として動物衛生研究所保有の牛由来の 10 株とし、志賀毒素（stx）産生性が多様になるように選択した。店舗での焼肉調理品を対象とした調味料の使用方法について保健所等の衛生指導担当者の情報から、焼肉用の肉に調味料をかけてから客に提供するまでの時間は数分から数十分程度と考えられた。肉の温度は冷蔵から取り出して調理場に置くとして室温程度であることから、試験条件は 25℃とし、60 分まで菌の挙動を経時的に計測した。

［２］牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化

牛レバーおよび大腸は埼玉県、群馬県、熊本県の食肉衛生検査所から入手し、事前に大腸菌血清群 0157 および 026 の汚染のないことを確認し実験に使用した。汚染方法は牛レバーでの内部汚染（血中や胆嚢に菌が存在、また取り扱い中の傷からの汚染を想定）および表面汚染（解体時に刀で腸管が傷つき内容物が汚染、腸管内容物で汚染された手や器具で触る、などを想定)、腸（大腸）での内腔側汚染の３種類とした。接種菌株は国立感染症研究研保有のヒト由来（HUS 患者株）の血清群 0157 および 026 とした。牛レバーの内部汚染については、表面５ｃｍ四方で厚さ２ｃｍのブロック（約 60ｇ）のレバー表面側から深さ１ｃｍに菌液（濃度 10^7 cfu/ml）50μｌを注射器で 10 カ所に分けて接種した（接種菌数 $5X10^5$ cfu/ブロック)。牛レバーの表面汚染についてはレバーブロックに表面に菌液（濃度 10^7 cfu/ml）50μｌを全面に接種した。大腸の内腔側汚染については、下処理（裂いて内容物を除き水洗い）した腸管 10ｃｍ（約 35ｇ）の内側に菌液（濃度 10^7 cfu/ml）50μｌを全面に塗抹した。各条件あたり 3 検体とした。密閉容器にいれ４℃で０、３、６、24 時間保存した。菌数の測定のために、各検体をストマッカー袋に入れて PBS を加えストマッカー処理によって乳剤原液を作製した。これを 10 倍階段希釈して各希釈液を血清群 0157 分離のために CT-SMAC、血清群 026 分離のために CT-RMAC に塗抹した。37℃20 時間培養し疑わしいコロニーを各血清にて凝集反応を確認した。

［３］ホットプレートでの焼肉調理による菌数の減少

レバー（5 cm X 2 cm X 厚さ 0.5 cm）（約７ｇ）および大腸（5 cm）（約７ｇ）にヒト由来（HUS 患

者株）の血清群 0157 および 026 を接種した。肉の表面の片面に菌液（濃度 10^7 cfu/ml）50μl をピペットでできるだけ全面に接種し、1 条件あたり 5 検体とした。加熱調理器具は温度設定のできるヒートブロックを使用した。焼き方は生焼け、中程度焼け、十分焼けの３条件とし、菌の付いた側を上としていずれも半分の時間で裏返した。肉の重量変化も焼け方の指標にした。菌数の測定は、（２）と同様に乳剤希釈液を作製し血清群 0157 では CT-SMAC およびクロモアガー0157、血清群 026 では CT-RMAC および RX-026 に塗抹し、37℃20 時間培養し疑わしいコロニーを各血清にて凝集反応を確認した。

［４］汚染肉からの調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉への汚染

牛レバーおよび大腸を検体とし、取り扱い調理器具には箸（割り箸）およびトング（金属製）を使用した。汚染肉の両面かつ長辺（５cm）を箸およびトングの表面に付くようにして 10 秒間掴んだ。さらに、汚染取り扱い調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉の汚染を調べるために、取り扱い調理器具の肉をつかむ部分を菌液（10^7 cfu／ml）に 10 秒間漬け、あらかじめ中程度焼けに焼いた非汚染肉を上記と同様に 10 秒間掴んだ。菌数の測定方法は、汚染肉を取り扱い調理器具で掴んだときの器具の汚染については、調理器具はストマッカー袋に入れた 100 ml の PBS に汚染部位をつけて 1 分間洗った。汚染取り扱い調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉の汚染については、検体をストマッカー袋に入れて PBS を加えストマッカー処理を行った。原液および希釈液を血清群 0157 では CT-SMAC およびクロモアガー0157、血清群 026 では CT-RMAC および RX-026 に塗抹し、37℃20 時間培養し疑わしいコロニーを各血清にて凝集反応を確認した。

［５］直火での焼肉調理による菌数の減少

焼肉用にスライスしたカルビ肉、ロース肉および大腸を使用した。分担研究者の研究成果および情報から溶血性尿毒素症症候群（HUS）の発症が高いとされる血清群 0157 の clade 8 に型別される株としてヒト由来（HUS 患者株）の血清群 0157：H7（stx2、clade8）３株を使用した。スライス肉表面に菌液（濃度約 10^7 cfu/ml）50μl を全面に接種し（接種菌数 $5X10^5$ cfu/検体）、1 条件あたり６検体を試験した。加熱器具は焼肉用の直火ガスコンロとし、鉄板中心温度が約 300℃となるように調節した。初めに菌を接種した側を上として焼いた。加熱程度は、生焼け、中程度焼け、十分焼けの３種類とし片面当たりの加熱時間はカルビ肉は生焼けで 10 秒、中程度焼けで 30 秒、十分焼けで 90 秒、ロース肉は生焼けで 23 秒、中程度焼けで 45 秒、十分焼けで 90 秒、大腸は生焼けで 45 秒、中程度焼けで 90 秒、十分焼けで 210 秒であった。また、各加熱条件による肉検体の重量減の測定を行った。各片面加熱時間後に裏返して更に同時間加熱した。加熱実験中の検体表面の温度を、加熱開始直後、片面加熱終了直後、加熱終了直後などで測定した。菌数の測定は検体に PBS を加えストマッカー処理にて乳剤を作製し、これを 10 倍段階希釈し CT-SMAC およびクロモアガー0157 に塗抹した。残りの乳剤に BPW を加えて 20 時間培養した後、免疫磁気ビーズ法にて CT-SMAC およびクロモアガー0157 に塗抹し 37℃20 時間培養し疑わしいコロニーを 0157 血清にて凝集反応を確認した。

③研究の成果

［１］焼肉調理料中での菌の挙動の解析

血清群 0157 は、調味料に菌を添加した直後、いずれの調味料においても初期菌数より若干減少した（10 株平均：約 0.30 log cfu/ml）。しかし、その後、調味料１、２および４では添加 60 分でもほとんど菌数は変化しなかった（約 0.35 log cfu/ml）（図２）。最大に減少した調味料３でも約 0.46 log cfu/ml であり、全実験を通じて大きく菌数が変動した調味料は無かった。これらを菌株別に解析したところ、添加直後において KB94 のみ若干増加する傾向があったが、その他の株は減少し、特に CN54 および CN60 株は 0.48～0.57 log cfu/ml 減少した。添加 10 分後においては、いずれの株も初期菌数より減少し、特に CN16、CN33、CN44、CN54 および CN60 は 0.41～0.68 log cfu/ml

減少した。添加 60 分後において、いずれの株も初期菌数より減少し、CN44、CN54 および CN60 は 0.40～0.48 log cfu/ml、CN16 は 0.89±0.20 log cfu/ml 減少した。これらのことから、牛由来の血清群 0157 の焼肉用調味料における消長は、調味料の条件および菌株の病原因子や病原性遺伝子保有の特徴による明確な差は認められなかった。

［２］牛内臓肉の低温保存中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化

血清群 0157 のレバーでの内部汚染および表面汚染、大腸での内腔汚染では 4℃で 24 時間保存後の菌数はほとんど減少しなかった（図３）。血清群 026 についても同様の結果であり、血清群 0157 および 026 は牛内臓肉中において 24 時間の低温保存によって菌数がほとんど減少しないことが考えられる。

［３］ホットプレートでの焼肉調理モデルでの菌数の減少

汚染肉の加熱調理による菌数の減少の結果では、血清群 0157 および 026 ともに、またレバーおよび大腸ともに、焼き方の程度が強い程菌数の減少が大きい結果であった（図４、表１）。レバーでは特にその差が大きく生焼けに比べ十分焼けで 1 検体あたり約 1/50 に減少した。また、生焼けでも全く焼かないものよりも約 1/50～1/400 に減少していることから、加熱の効果はあるものと思われた。

［４］汚染肉からの調理器具への汚染および汚染調理器具からの肉への汚染

汚染肉を調理器具で掴んだ時の器具汚染の結果では、１検体に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染したことが明らかになった（図５）。レバーおよび大腸、トングおよび箸に著しい特徴的な差は認められず、いずれの条件でも汚染が起こることが示された。汚染調理器具で焼いた肉を掴んだ時の肉の汚染の結果では、器具１検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉を汚染することが認められた（図６）。

［５］直火での焼肉調理モデルでの菌数の減少

牛肉の種類で比較すると、カルビおよびロースでの重量の減少率は比較的近い値であったが、大腸では重量の減少率が大きく十分焼けで重量は加熱前の約半分まで減少した。

焼成時間と温度推移を各牛肉の種類で比較すると、カルビでは温度上昇がロースより低くまた加熱時間が大腸の半分以下であった（図７）。

各牛肉への３株の平均接種菌数は、カルビでは 5.6、ロースでは 6.6、大腸では 5.3 log cfu/検体であった（図８、表 2)。焼肉調理過程での菌数は、カルビでは生焼けで約 4.6、中程度焼けで約 1.7、十分焼けで約 0.7 log cfu/検体であった。ただし、中程度焼けで 18 検体中 15 検体、十分焼けで 18 検体中 7 検体について 0157 が死滅していなかった。ロースでは生焼けで約 2.8、中程度焼けで約 1.1、十分焼けで約 0.7 log cfu/検体であった。ただし、中程度焼けで 18 検体中９検体、十分焼けで 18 検体中 6 検体について 0157 が死滅していなかった。大腸では生焼けで約 2.2 log、中程度焼けで約 1.0、十分焼けで約 0.3 log cfu/検体であった。ただし、生焼けで 18 検体中 16 検体、中程度焼けで 18 検体中９検体、十分焼けで 18 検体中 4 検体について 0157 が死滅していなかった。

直火焼肉調理における菌数の減少は、カルビで最も菌の減少率が低く、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/10 であり汚染菌が生残する可能性が考えられる。ロースおよび大腸では生焼けで約 1/1,000 には減少した。中程度焼けで大腸では約 1/1,000 と減少が弱かったが、十分焼けでいずれの牛肉でも約 1/100,000～1/1000,000 に減少した。カルビでは加熱時間が短く生焼けで片面 10 秒であり、カルビおよび大腸の 45 秒に比べて 1／２から１／４程度の時間である。カルビでは片面焼成時に 150℃に上昇していたが、ロースと大腸では 200℃以上に至った。カルビでは加熱によって焦げやすく、食するに適当な焼成程度がロースと大腸とは異なるため加熱による菌の減少効果が少ないものと考えられる。大腸では中程度に焼いた場合、生焼けと比べて検体の重

量の減少は大きかったが、菌数の減少はほぼ同じであった。大腸は焼く過程で形態が変化し特に始めの片面を焼いている時に丸くなるため熱がかかりにくい場所が生じることが考えられる。十分焼けにおいては、ロースで最も菌数が減少し、大腸およびカルビではそれよりも約 10 倍高い菌数が生残した。加熱時間はカルビとロースはともに 90 秒であり、大腸では 210 秒もの加熱を行っていたことから、菌数の減少率には肉の種類における物性的特性が影響されることが考えられた。［３］に記述したレバーと大腸を対象にしたホットプレート使用の焼肉調理では、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/100、十分焼けで 1/5,000 に死滅することが明らかになったが、今年度の直火調理では大腸について生焼けで約 1/1,000, 十分焼けで 1/100,000 に死滅することからホットプレートでの調理に比べて直火での調理が加熱効果の高いことが明らかになった。

以上の結果から、以下の結論を得た。ただし、焼肉調理実験の結論については本研究で使用された器具および条件下に限定された結果に基づくものである。

- 腸管出血性大腸菌の生残や増殖には温度、pH および水分活性が影響し酸耐性が通常の大腸菌よりも高いことが報告されていることから、焼肉調味料中での生残を確認したところ、pH が最低 4.5、塩分濃度が最高 11%まで菌数の減少などは見られず耐性が認められた。
- 食肉処理の段階で牛肉が腸管出血性大腸菌に汚染された場合、低温保存で菌数は維持され減少しないことが示された（図９）。この牛肉をホットプレート使用の焼肉調理した場合、生焼けで１検体（焼肉用サイズの肉検体）あたり約 1/100、十分焼けで約 1/1000～1/5,000 に牛肉中の菌数が減少することが示されたが（図９）、直火での調理では十分焼けで約 1/100,000～1/1000,000 に菌数が減少したこと（図 10）から直火焼肉調理によって十分に調理すれば腸管出血性大腸菌の死滅が期待できることが示唆された。また、使用した肉の中ではロースにおいて菌数の減少が大きく、肉の種類によって加熱による菌数の減少率に差があることが明らかになった。さらに直火焼肉調理はホットプレートによる調理と比較して菌数の減少が大きいため、調理方法としては食中毒の発生を低めることが考えられる。
- 調理器具を介した焼肉調理時の牛肉の汚染は、汚染肉を調理器具で掴んだ場合、１検体（焼肉用サイズの牛肉）に付着している菌数の約１／100 から１／1000 が器具を汚染し、汚染調理器具で焼成後の牛肉を掴んだ場合、器具１検体に付着している菌数の約 1/10 から 1/100 が肉に移ることが認められた（図９）。総ずると、十分に牛肉を焼肉調理した場合でも同一の調理器具を焼成前の汚染肉および焼成後の牛肉に共通して使用することによって、焼成前の牛肉から１検体あたり約 1/1000～1/100000 の菌数が焼成後の牛肉を汚染することが示唆された。

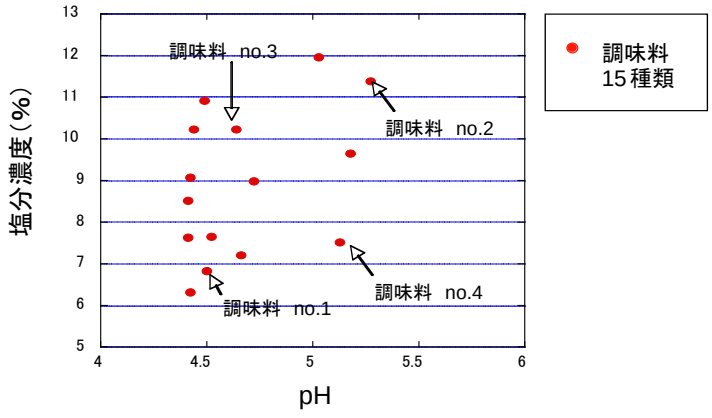


図１　市販焼肉調味料の　　性質

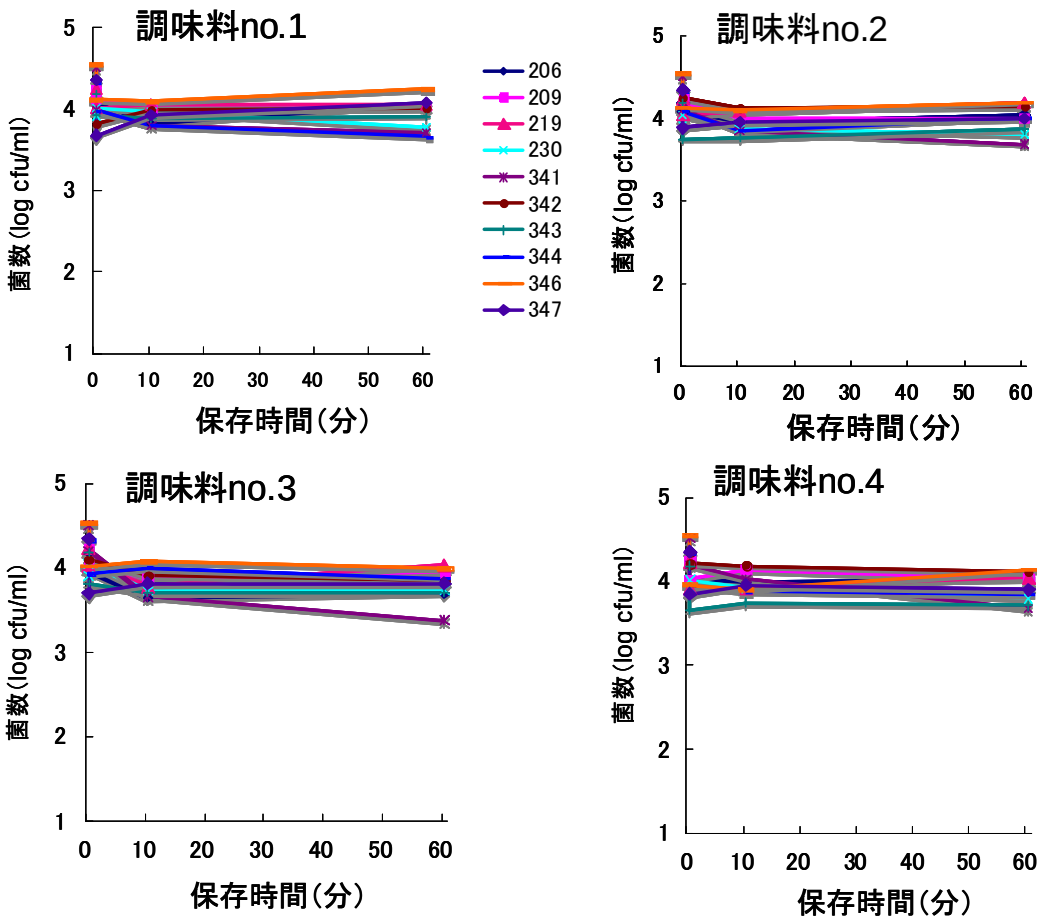


図2　　焼肉調味料中での腸管出血性大腸菌O157菌数の変化

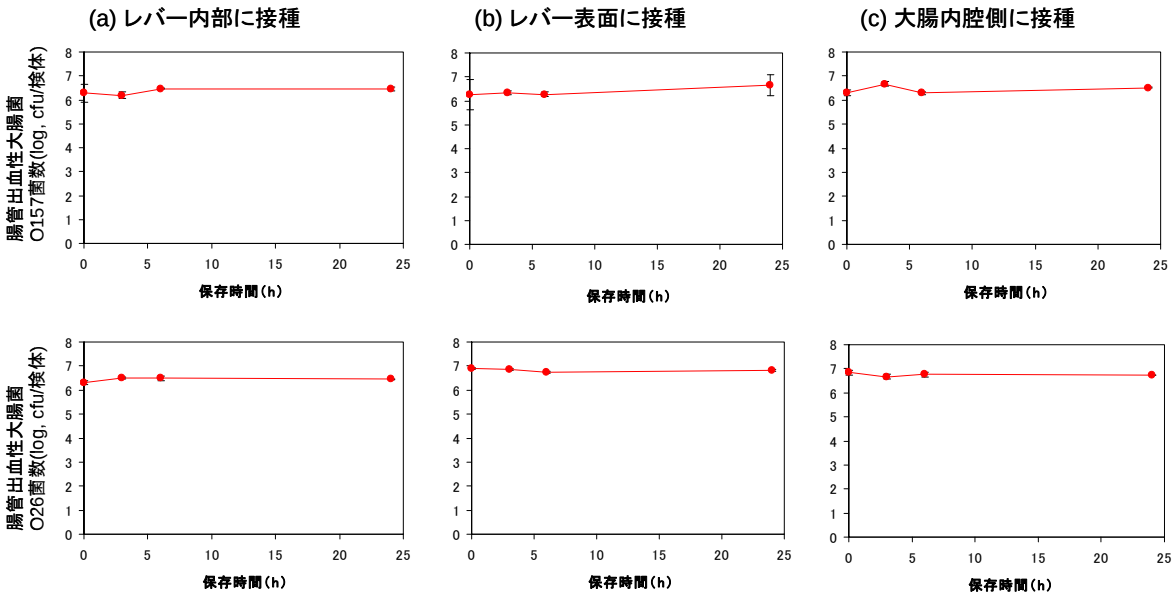


図3　低温保存の牛内臓肉中での腸管出血性大腸菌の菌数の変化

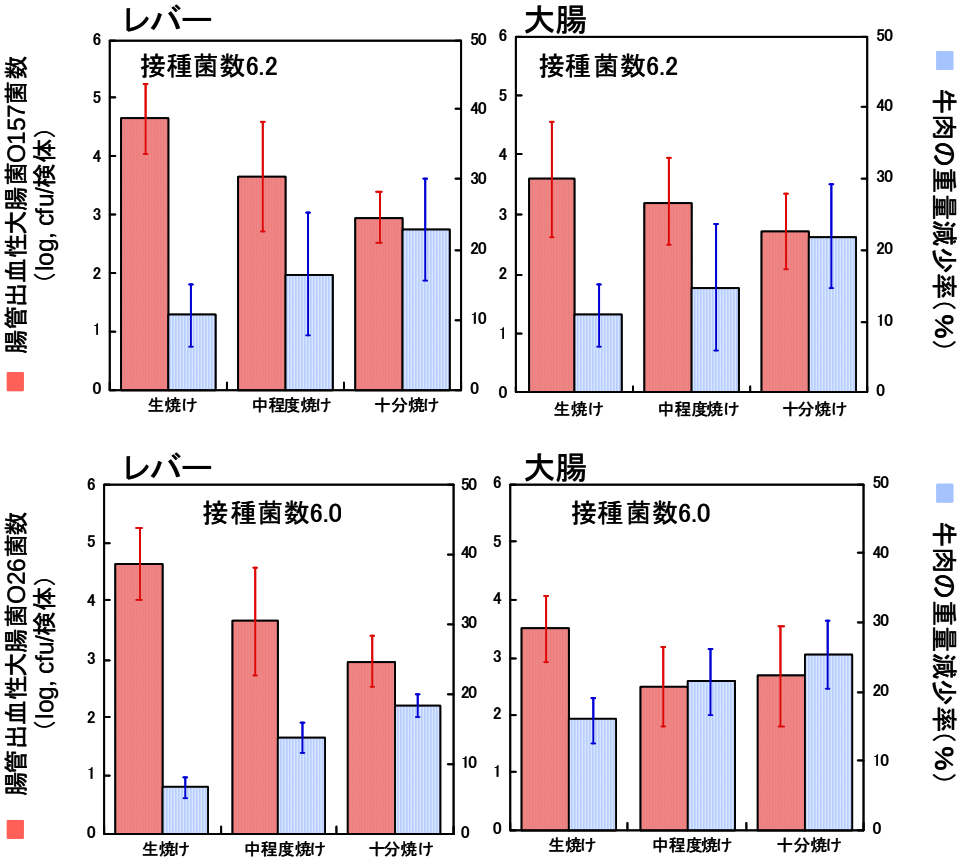


図4　ホットプレートでの焼肉調理モデルでの牛内臓肉中の腸管出血性大腸菌の菌数および肉の重量の減少

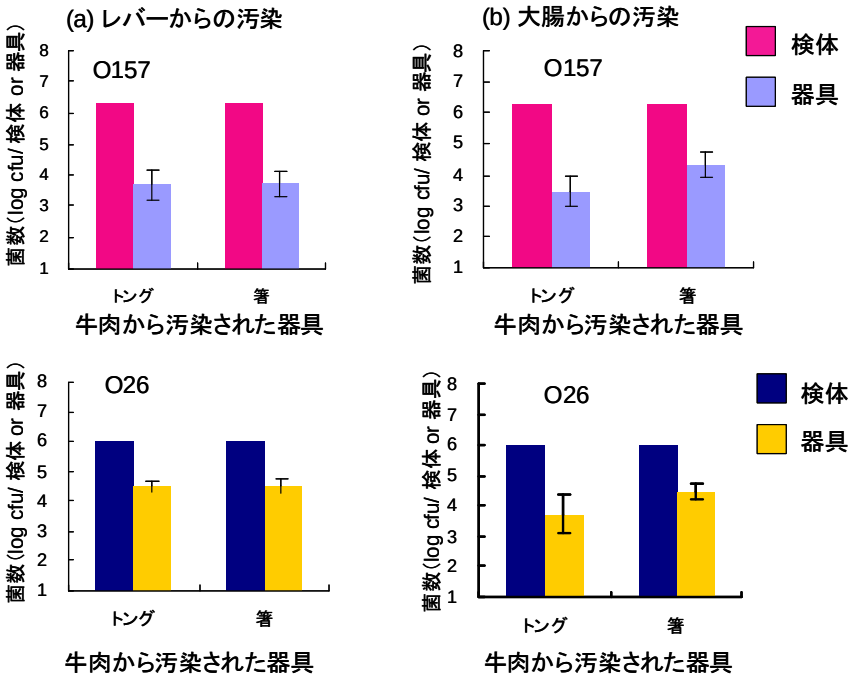


図5　汚染肉からの調理器具の汚染

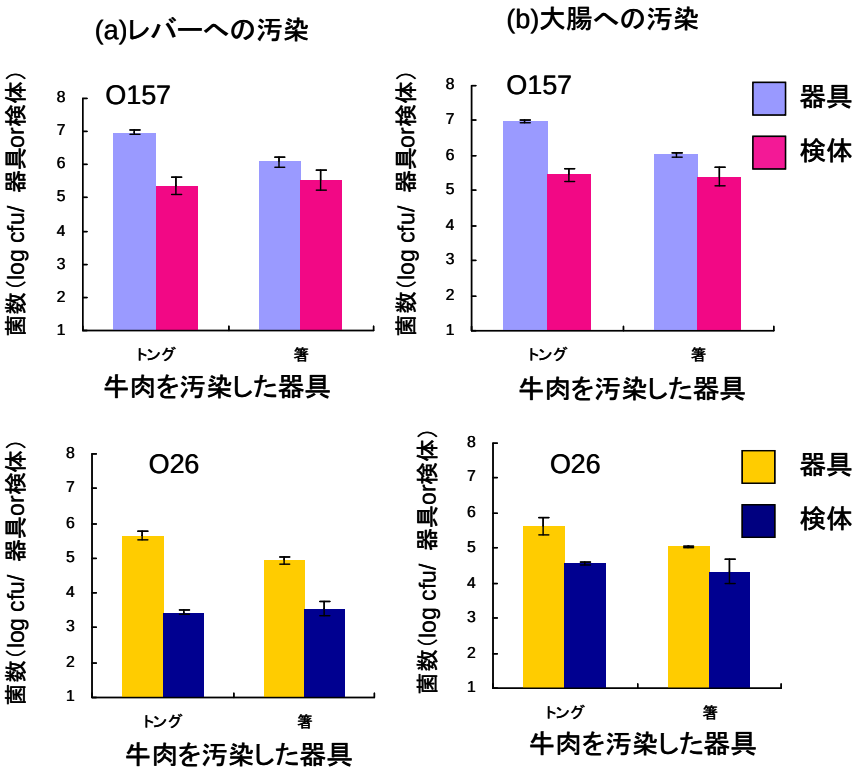


図6　汚染調理器具からの焼成牛肉の汚染

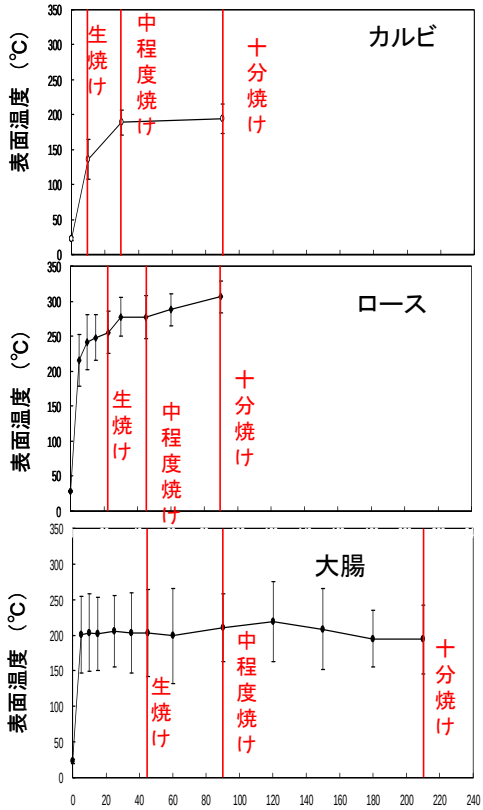
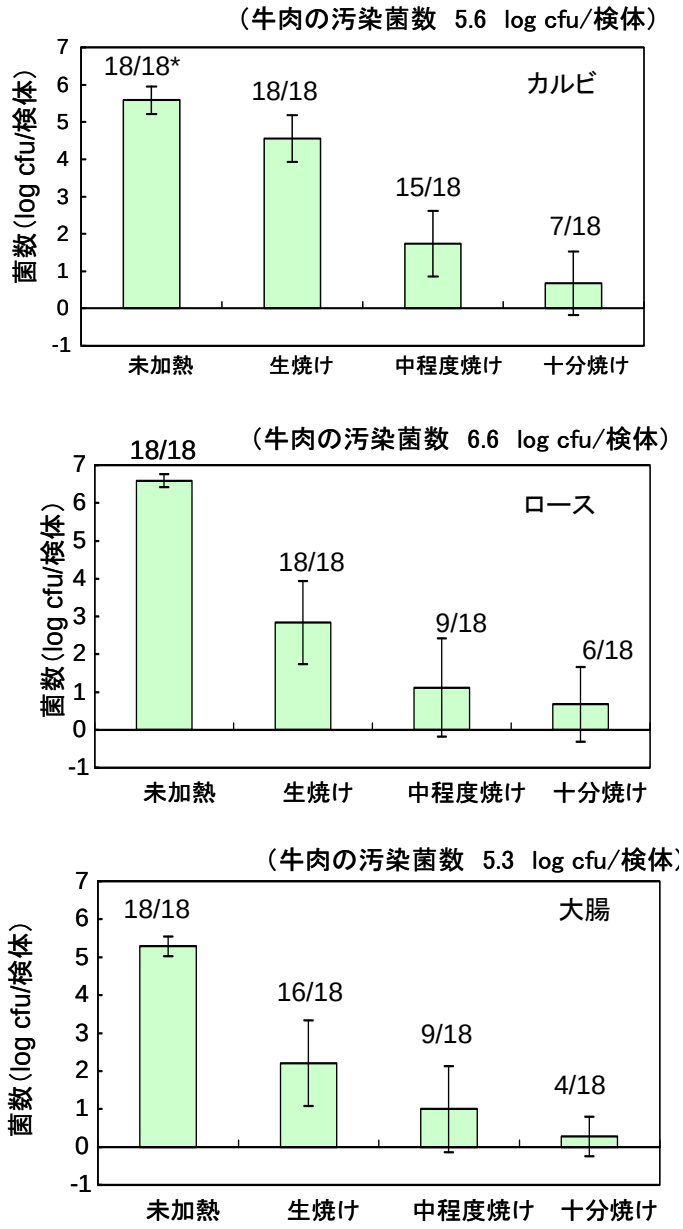


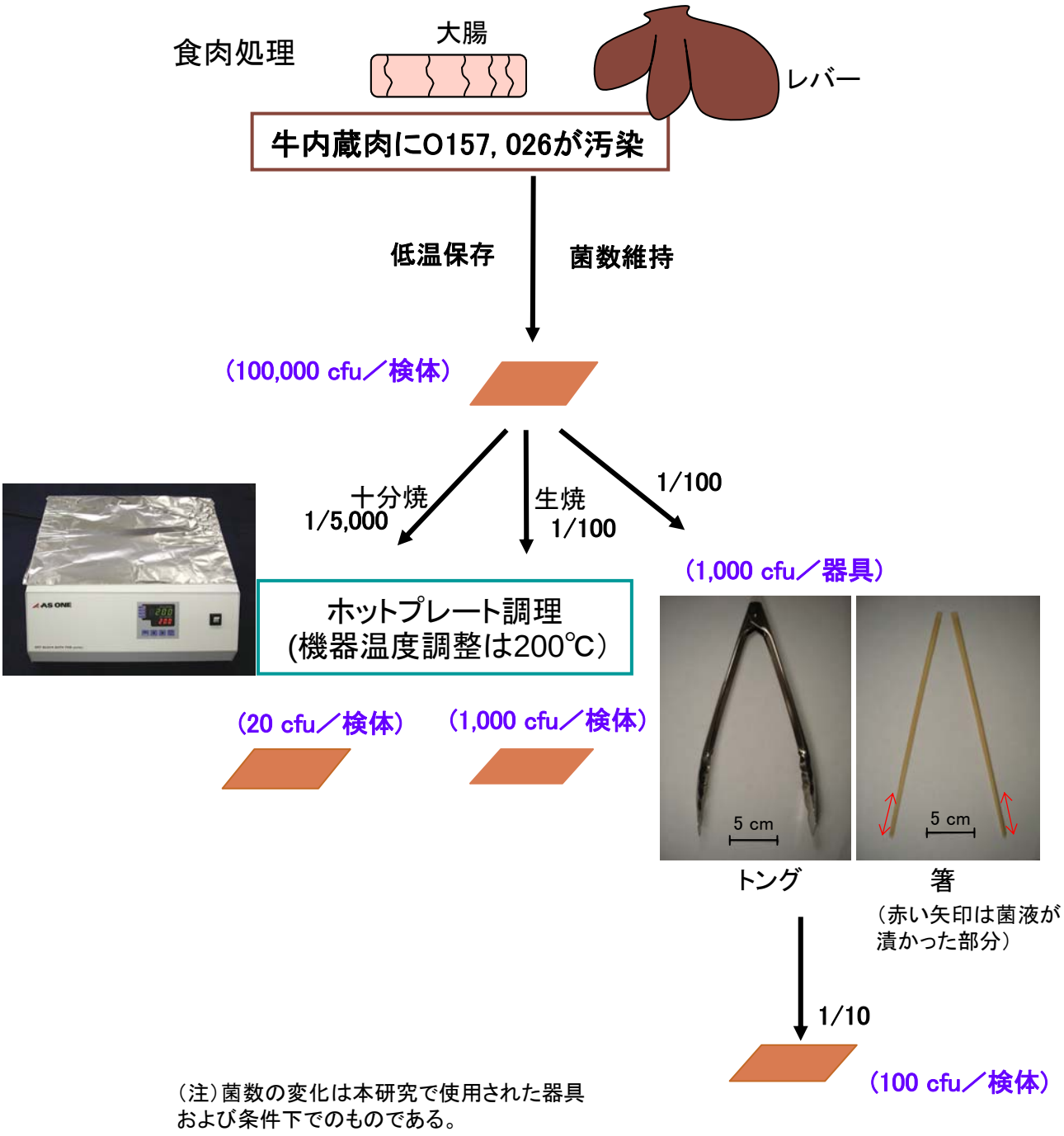
図7　直火での焼肉調理モデルでの片面焼成時の生肉の温度推移



生焼け（大腸）　　中程度焼け（大腸）　　十分焼け（大腸）

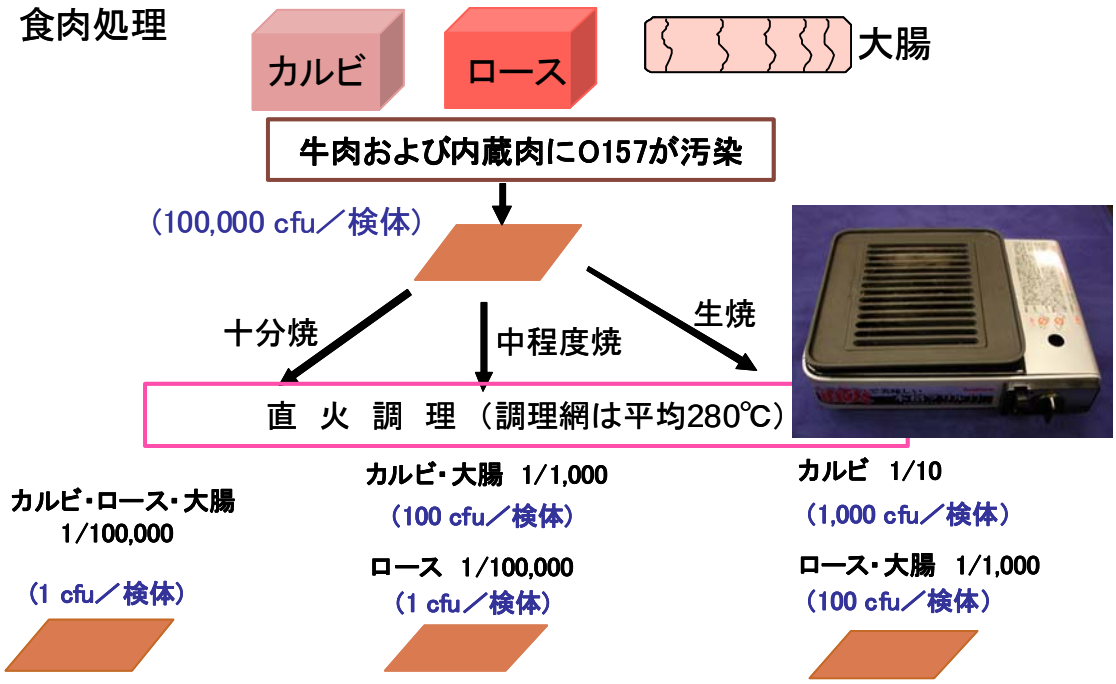
図8　直火での焼肉調理モデルでの牛肉中の腸管出血性大腸菌O157の菌数の減少

*検出検体数／試験検体数



(注)菌数の変化は本研究で使用された器具
および条件下でのものである。

図9　ホットプレート焼肉モデルでの菌数の変化



(注) 菌数の変化は本研究で使用された器具および条件下でのものである。

図10　直火焼成モデルでの菌数の変化

表１　　牛内臓肉のホットプレート焼成モデルによる菌数および重量の減少のまとめ

牛肉の種類	血清型		焼成程度		
			生焼け	中程度焼け	十分焼け
レバー	0157	菌数減少率*	1/50 (0.02)	1/340 (0.003)	1/1500 (0.0007)
		検出限界以下検体率（%）	0	0	0
		重量減少率（%）	11	16	23
		片面あたりの加熱時間（秒）	60	120	180
	026	菌数減少率*	1/180 (0.0001)	1/7000 (0.0001)	1/5000 (0.0002)
		検出限界以下検体率（%）	0	40	100
		重量減少率（%）	6.7	13.7	18.3
		片面あたりの加熱時間（秒）	60	120	180
大腸	0157	菌数減少率*	1/400 (0.003)	1/740 (0.001)	1/3000 (0.0003)
		検出限界以下検体率（%）	0	0.0	40
		重量減少率（%）	11.0	15.0	22.0
		片面あたりの加熱時間（秒）	60	90	120
	026	菌数減少率*	1/320 (0.003)	1/3200 (0.0003)	1/2000 (0.0005)
		検出限界以下検体率（%）	0	0.0	40
		重量減少率（%）	15.9	21.5	25.4
		片面あたりの加熱時間（秒）	60	90	120

＊　初期菌数が 6.2 log cfu/検体　（レバー），6.0 log cfu/検体（大腸）

表2 牛肉の焼成による菌数および重量の減少のまとめ

牛肉の種類		焼成程度 生焼け	中程度焼け	十分焼け
カルビ	菌数減少率*	1/11 (0.09)	1/7080 (0.0001)	1/83176 (0.00001)
	死滅検体率(%)	0	16.7	61.1
	重量減少率(%)	3.2	14.6	33.1
	片面あたりの加熱時間(秒)	10	30	90
ロース	菌数減少率*	1/5754 (0.0002)	1/301995 (0.000003)	1/812831 (0.000001)
	死滅検体率(%)	0	50.0	66.7
	重量減少率(%)	7.1	13.9	23.9
	片面あたりの加熱時間(秒)	22.5	45	90
大腸	菌数減少率*	1/1202 (0.0002)	1/1950 (0.0005)	1/102329 (0.00001)
	死滅検体率(%)	11.1	50.0	50.8
	重量減少率(%)	17.0	29.9	48.7
	片面あたりの加熱時間(秒)	45	90	210

＊ 初期菌数が10^5-10^6cfu/検体

２）「分担課題：腸管出血性大腸菌の病原性評価」

分担研究者：伊豫田淳（国立感染症研究所・細菌第一部）

協力研究者：佐藤人美，陸彦，大西真，寺嶋淳，泉谷秀昌，渡邉治雄（国立感染症研究所・細菌第一部）

①研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌の約 80%は血清群 O157, O26 または O111 の三大 O 血清群に分類され、中でも血清群 O157（そのほとんどが血清型 O157:H7）の腸管出血性大腸菌感染事例が全体の約 70%を占める。腸管出血性大腸菌感染によって引き起こされる重篤な臨床症状である、溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome: HUS）の起因菌としては、約 90%以上が血清型 O157:H7 によるものである。腸管出血性大腸菌の主たる保菌動物は畜牛であると考えられているが、実際に畜牛に存在する腸管出血性大腸菌がどの程度ヒトでの感染起因菌となっているかについては、ほとんど不明である。本研究では、ヒトおよび牛から単離された腸管出血性大腸菌について、血清型別や PFGE（pulsed-field gel electrophoresis）, MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis) による菌株相互間の DNA 型の比較、clade 解析による系統学的解析、および既知の病原性遺伝子の分布解析や発現量の解析から、各菌株の病原性を評価し、牛由来の腸管出血性大腸菌によるヒトへの感染の実体を明らかにすることを目的とした。特に、人での重篤感染事例の原因菌として最も頻度の高い血清型 O157:H7 について焦点を絞り、臨床症状と系統学的解析から、リスクの高いと考えられる菌株のヒトおよび牛由来株における分布と系統ごとの病原性について解析することを目的とした。

②研究方法

［１］供試菌株

図 2 における PFGE 解析用のヒト由来の O157 株として、2004-2006 年に国内で単離された感染研保存株 50 株（HN 株：すべて散発事例由来で有症者由来株)、牛由来の O157 株として、動物衛生研究所・小林秀樹博士から分与された菌株 26 株（KB 株）と感染研保存株 71 株（CN 株）を用いた。

O157：H7 の系統学的解析（clade 解析）には、1999-2009 年までに国内で分離された HUS 患者由来の O157:H7 株として 311 株、これらとほぼ同時期に分離された無症状保菌者由来の O157:H7 株（すべて散発事例由来で、調理従事者等の定期検便由来株を多数含む）として 312 株、さらに、上記の牛由来株のうち、63 株（KB 株 n=23, CN 株 n=40）に加えて、新規に牛から分離した感染研保存株として 21 株（計 84 株）の O157:H7 株を使用した。clade 解析を行った株のいくつかについて、病原性遺

伝子の分布および病原性因子の発現レベル解析に用いた。

［２］血清型別

自家調製した抗大腸菌抗血清またはデンマーク血清学研究所（Statens Serum Institute: SSI）から購入したフルセットの抗血清を用い、オートクレーブ処理（121℃, 1 時間）した加熱死菌（O 抗原用）またはホルマリン固定菌（H 抗原用）を用いて、定法に従って血清型（O:H 型）を決定した。自家血清と SSI 血清を用いた結果が異なる場合には SSI 血清の結果を採用した。

［３］病原性遺伝子の分布解析

stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, eae, subA について、特異的な PCR 反応系を行って解析を行った（*stx*：志賀毒素遺伝子（文献 1, 2)、*eae*：LEE 領域にコードされる接着因子 Intimin の構造遺伝子[プライマー配列:5’-GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT-3’／5’-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3’]、*subA*：LEE 非保有型腸管出血性大腸菌が保有する新規ベロ細胞毒素遺伝子[プライマー配列：Izumiya et al., unpublished])。clade 解析に供したいくつかの株については、嫌気条件下において志賀毒素 2 型（Stx2）の発現を抑制する作用のある一酸化窒素（NO）の還元化酵素（不活化酵素）をコードする遺伝子（*norV*）について PCR を行った。*norV* はゲノム解読株である Sakai 株、EDL933 株では遺伝子内部に欠失が見られる一方、clade 8 株であるホウレン草事例株（下記参照）はその欠失が見られないと報告されている（文献 3)。そこで、内部欠失の両端にプライマーをデザインし（5’-ATGTCGAATAACACCCGCAT-3’／5’-GCCTTTTGCCGGATCGTAAA-3’)、特異的な PCR 反応をセットアップした。

［４］培養上清蛋白質の解析

三大血清群（O157, O26, O111）のほぼすべての腸管出血性大腸菌株は病原性遺伝子群として、LEE（locus of enterocyte effacement）を染色体上に持つ。LEE にコードされる 3 型蛋白質輸送装置（宿主細胞へ注入する蛋白質の輸送装置）を介して分泌される分泌蛋白質（EspA, B, P など）の培地上清中への分泌量について、培養細胞用の培地 DMEM（Dulbecco’s modified Eagle medium）培地で振とう培養した。OD_{600}=0.8 の培養上清 6ml を遠心して菌体成分と分離した後、0.45μm のフィルターでろ過し、トリクロロ酢酸溶液（最終濃度 10%（v/v））で培養上清中の蛋白質を濃縮沈殿させ、常法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で蛋白質のバンドを検出した。コントロールとして O157:H7 Sakai 株、および Sakai 株の *grlR* 欠損変異株（LEE 遺伝子群の発現量が顕著に上昇する変異株：文献 4）における分泌蛋白質のバンドをデンシトメータでスキャンして数値化することで、各蛋白質の発現量を定量比較した。

［５］エンテロヘモリシン活性の解析

LB 培地中で 37℃越夜静置培養した菌液を数μl EHT 寒天培地（極東製薬）上に直接スポットして乾燥後、37℃, 5% CO2 インキュベーターで一晩培養して溶血環（ハロ）形成能を比較した。コントロール株としては上記 4)と同じ株を用いた。

［６］志賀毒素産生レベルの解析

VTEC-RPLA（デンカ生研)、ノバパス ベロ毒素 EIA キット（Bio-Rad)、各種抗 Stx1A,B および抗 Stx2A,B 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって定量解析を試みた。

［７］PFGE 解析

定法（文献 5）に従ってアガロースゲル内に包埋した大腸菌を溶菌し、制限酵素 *Xba*I で切断後、電気泳動パターンを解析した。系統解析には DNA フィンガープリンティング解析ソフト BioNumerics Ver 4.6（Applied Maths)を用いた。

［８］MLVA 解析

O157:H7 Sakai 株のゲノム配列情報を元に、9 遺伝子座の繰り返し配列のリピート数をキャピラリー型オートシークエンサーで解析し、型別を行った（Izumiya et al., unpublished)。系統解析には

上記の PFGE 解析に用いた同じソフトによって行った。

［９］clade 解析

文献 6，7 に記載の方法に従って、clade 1，2，3，8 およびその他の clade に型別した。実際には、O157:H7 Sakai のゲノム配列情報から、次の 4 つの ORF、ECs2357，ECs4130，ECs3881，ECs2521 の内部にプライマーをデザインし、PCR 反応をセットアップ後、PCR 産物の DNA シークエンシングによって、各 clade に特徴的な SNPs の解析を行った。解析順序としては、まず clade 8 に特徴的な SNP が見られる ECs2357 について解析した後、ECs4130 の SNP で clade 1，2，3 を抽出し、最後に ECs3881 と ECs2520 の SNPs で 1，2，3 を識別した。

③研究の成果

［１］ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清型別

国内でヒトから単離された腸管出血性大腸菌株（2007-2009 年：総計 8434 株）の O 血清群の解析から、依然として O157（約 73.9%），O26（約 15.4%)および O111（約 3.2%)の腸管出血性大腸菌が多数分離されており、全体の約 92%を占めることが判明した（図１-1）。一方、上記の三大血清群以外では O121，O103，O91，O145，O165 などが数多く単離されている（図 1-2）。O121 と O165 による感染者の多くは重症化していること（表 1）から、今後の動向に注意を要する。O121 と O165 はこれまでのところ牛由来の腸管出血性大腸菌株にはほとんど存在しないことから、これらの由来については不明である。 腸管出血性大腸菌感染症で最も重篤な臨床症状である HUS を発症した患者由来株だけを集計すると、2007-2009 年においても血清型 O157:H7 が最も多く、全体の約 90%を占めることから、依然として O157:H7 が最重要検討課題であることが明らかとなっている。

［２］ヒトまたは牛由来腸管出血性大腸菌 O157:H7 株の病原性遺伝子の解析

ヒト由来の 50 株（HN 株)、牛由来の 26 株（KB 株）と 71 株（CN 株）の腸管出血性大腸菌 O157:H7 について、病原性遺伝子（*stx1, stx2, stx2c, stx2d, stx2e, stx2f, eae, subA*）の分布について解析を行った。全ての株は *eae* を保有するが、*subA* は保有しないことが明らかとなった。*stx2* バリアントのうち、*stx2d, stx2e, stx2f* はいずれの菌株にも存在しなかった。*stx2c* については、ヒト由来の O157:H7 株では 50 株中 12 株が陽性（24%）であった一方、牛由来の O157:H7 株では 92 株（CN 株 65 株と KB 株 27 株）中 63 株（CN 株 38 株と KB 株 25 株）が陽性（68.5%）であった。これらの *stx2c* 陽性株には *stx2* を同一菌株に保有する株がいくつか見られるが、*stx2c* のみを保有する株に限定すると、ヒト由来の O157:H7 株では 50 株中 7 株（14%)、牛由来の O157:H7 株では 92 株中 58 株（63%）が陽性であった。このように、バリアント *stx2c* のみを保有する株は牛由来の O157:H7 株に多く分布していることが明らかとなった。

［３］PFGE による系統解析

ヒト（15 株）および牛（17 株）由来の O157 株について PFGE 解析を行い、その泳動パターンについて DNA フィンガープリンティング解析ソフトを用いて系統解析を行った。泳動パターンが全く同じ株は存在しなかったことから、解析に供した株はすべて由来の異なる株であると考えられる。この結果を踏まえ、相同性 75%で区切った場合には 8 つのクラスター（I－VIII）に、80%で区切った場合には 12 のクラスター（I-1，I-2，II-1，II-2，III-1，III-2，IV-1，IV-2，V，VI，VII，VIII）に分類された（図 2)。牛由来の O157:H7 は 80%相同性の 12 のクラスターのうち、11 に分類され、同じ血清群でも多様な集団である可能性が示唆された。一方、ヒト由来の 15 株のうち、14 株までがクラスターII および IV に分類され、牛由来の O157 に比べて菌株間の相同性は高いものと考えられた。クラスターII-1 は最も大きな集団であり、牛由来の 4 株（CN31，CN54，CN60，CN33）株が分類されている。以上の結果から、牛由来の O157:H7 株のいくつかは、有症者由来の株と類似した DNA 型を持つ株であることが示唆された。

［４］ヒトまたは牛由来腸管出血性大腸菌 O157：H7 株の病原性の解析

a. 志賀毒素産生量の解析

VTEC-RPLA、ノバパス ベロ毒素 EIA キットあるいは特異抗体によるウエスタンブロッティングによって志賀毒素産生量の比較を試みたが、いずれの手法も定量性に問題があり、毒素産生量の解析を行うことは不可能であった。

b. 3 型分泌蛋白質とエンテロヘモリシンの発現量解析

これまでの我々の研究成果から、LEE 保有型の O157 株において、LEE 内部にコードされ、LEE 遺伝子群の発現を正に制御する因子 GrlA は LEE 領域以外にコードされる病原性関連遺伝子群も正または負に制御しているグローバルレギュレーターとして機能していることが明らかになりつつある。GrlA に結合してその活性を阻害する GrlR を欠損した株では、GrlA の機能に依存して LEE 遺伝子群の発現上昇が見られる一方で、多くの O157 が保有する溶血素（エンテロヘモリシン）の活性が著しく上昇することが明らかとなった(Saitoh et al., 2008:発表論文リスト参照)。O157 のゲノム解読株である Sakai 株、およびその *grlR* 欠失株のエンテロヘモリシン活性をコントロールに、本研究で解析した株のエンテロヘモリシン活性を測定した。さらに、同じ菌株を用いて、LEE 領域にコードされる 3 型分泌蛋白質（ここでは EspB 蛋白質）の培地上清中への分泌量を解析した。その結果、Sakai 株の *grlR* 欠損株と同様にエンテロヘモリシンまたは EspB の発現が上昇している菌株は存在したが、両者が同時に上昇している株は KB 株でいくつか見られたものの、その他の菌株ではほとんど存在しなかった。また、由来の違いによる発現量の差は明確ではなかった（データ省略)。

［5］clade 解析による O157:H7 株の型別

a. clade 解析

上記のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による解析から、牛由来の O157 株の一部がヒト由来の O157:H7 株と類似した DNA 型を持つことが明らかとなった。この様に、PFGE は菌株間の相同性を検出する手法としては有用であるが、PFGE の解析結果からそれぞれの菌株の系統学的な関係を類推することは困難である。また、上記の PFGE 解析で用いられているヒト由来の O157:H7 株はすべて有症者由来株であり、PFGE 型と菌株の病原性の関連性については不明である。そこで、疫学情報がはっきりした菌株（重症例である HUS 発症者由来株と無症状保菌者由来株）を用いた系統解析から、HUS 患者由来の菌株に多く見られる遺伝系統を検出することを試みた。他の細菌種で一般的に用いられている、5 個ないしは 7 個のハウスキーピング遺伝子を標的とした SNPs 解析（いわゆる MLST: multi locus sequencing typing）では O157:H7 はすべて同じ系統に分類されてしまうため、系統解析には用いることが出来ない。折しも、米国の研究者を中心とした研究グループによって、腸管出血性大腸菌 O157:H7 株における 96 遺伝子座における SNPs 解析に基づく DNA 型別法が開発された（文献 6, 7）。この clade 解析法によって、これまでに主として米国で分離された集団発生由来の O157:H7 株はおおよそ 9 つの遺伝学的 clade（clade 1-9）に分類され、2006 年に米国で発生したホウレン草やレタスの喫食に由来する二つの集団発生由来株は clade 8 として型別された。腸管出血性大腸菌感染による HUS の発症率（全患者数に対する HUS 発症数）は、通常の事例では 5%程度あるいはそれ以下と見積もられているが、clade 8 が関連した上記の 2 つの集団発生事例ではそれぞれ 15%と 11%であることが報告されており、このため clade 8 は高病原性であると推定されている（文献 6）。しかし、これらの集団発生では、原因食材となったホウレン草やレタスへの腸管出血性大腸菌による汚染度は明らかになっておらず、患者あたりの菌の暴露率も不明であることから、必ずしも菌側に必要条件があるとは結論できない。文献 6 では過去の米国での分離株のうち、HUS 患者由来株として 10 株を解析し、このうち 7 株までが clade 8 株、残り 3 株が clade 2 株であったと述べているが、これらの解析は HUS 由来株の解析数が少ない上、無症状保菌者由来株の解析も行われていないこと

から、clade 8 の HUS 発症への関与について不明な点が多い。そこで我々は、国内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株から、HUS 患者由来と無症状保菌者由来株をほぼ同数抽出し、それらの株の clade 解析を行うことにした。

b. ヒト由来株の clade 解析

国内で 1999-2009 年に単離された HUS 患者由来の O157:H7 株(n=311)を解析したところ、clade 1 (2.6%), clade 2 (28.9%), clade 3 (26.1%) および clade 8 (16.7%) とその他の clade (25.7%) に分類されることが判明した（図 3-1）。一方、上記の同じ期間に国内で分離されたほぼ同数の無症状保菌者由来株（n=312）は、clade 1（1%），clade 2（19.2%），clade 3（18.3%）および clade 8（3.5%）とそれら以外（58%）に分類された（図 3-1）。以上の結果を統計学的に解析したところ、clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く存在することが明らかとなった（clade 8 とそれ以外の clade の、無症状保菌者由来株と HUS 患者由来株における分布について χ 二乗検定を行った場合、p=5.0E-8 となった）。したがって、clade 8 株は高病原性を示す O157:H7 の遺伝系統であると推論された。

1996 年に日本国内で大規模な集団発生を引き起こす原因となった、いわゆる Sakai 株は clade 1 に型別されるが、これらの株は 1999 年までは HUS 患者由来株から無症状保菌者由来株と比較して多数分離されているものの、それ以降はほとんど分離されなくなった（図 3-2）。以上の結果は、Sakai 株がもはや国内で発生する重症例の主たる原因株ではなくなったことを示唆している。

c. 牛由来株の clade 解析

牛由来の O157:H7 株（KB 株 n=23, CN 株 n=40, 追加株 n=21 の計 84 株）を同様に clade 解析に供したところ、clade 1（1.2%），clade 2（8.3%），clade 3（19%）および clade 8（3.6%）とその他の clade（67.9%）に分離されることが判明した（図 4）。clade 8 株は分離数こそ少ないものの、牛から分離される O157:H7 株の中にも高病原性と考えられる株が存在したことを示した意義は大きい。

［6］clade 解析と PFGE および MLVA 解析との関連性

a. PFGE 解析結果との関係

HUS 患者由来株（n=148）および牛由来株（CN 株 n=20, KB 株 n=8 の計 28 株）について PFGE による解析を行ったところ、HUS 由来株は大きく分けて 3 つのクラスターに分類出来ることが明らかとなった（図 5）。クラスター2 は最も大きな集団であるが、I-V までのサブクラスターに分類出来る。clade 1-3 はほぼ同一のサブクラスター（2-II）に属し、clade 8 はこれらとは異なる少なくとも 2 つの異なるクラスター（2-III と 3）に属することが判明した。

同じ clade 8 株であっても PFGE のパターンが異なる株が存在することから、clade 8 株は完全にクローナルな集団を意味するものでは無いことがわかる。実際に、文献 6 で明らかとなっている clade 8 株はさらにいくつかの細かいシークエンスグループに分けられることが判明している。clade 8 と型別された株のうち、図 5 において紫で囲んだ菌株には、2006 年に東京都 M 大学で発生した集団発生由来株（PFGE 型 c47）を含まれることが判明した。この集団発生は過去 10 年間に国内で発生した集団発生としては最も規模が大きく、同じ PFGE 型を持つ株はその後 2009 年まで多数分離されている。この様に、clade 8 株が国内においても実際に大規模な集団発生または散在的散発事例の原因株となっていることは注目に値する。

b. MLVA 解析結果との関係

一方、MLVA による解析では、HUS 株は大きく 2 つのクラスターに分けられることが判明した。クラスター1 には clade 8 以外の clade 株が含まれ、クラスター2 には解析に用いた clade 8 の全ての株とその他の clade 株の一部が含まれることが判明した（図 6）。

PFGE および MLVA による解析から、牛由来の clade 8 株（n=3, CN12, CN16, CN24）はヒト由来の clade 8 株の大部分と同じクラスターに分類出来ることが判明した。以上の結果を総合すると、ヒトの感染原因とくに重症化例の原因となっている牛由来の O157:H7 株は一部の系統の菌株であると予想され、その一部は HUS 発症の起因株と考えられるヒト由来株と同様な DNA 型を持つ高病原性株であることが判明した。

［7］clade 8 株の病原性評価

a. 志賀毒素産生性の解析

これまでの研究から、clade 8 株の約 58%が *stx2c* バリアント遺伝子を保有していることが明らかとなっている（文献 6）。そこで、上記で明らかとなった国内分離の clade 8 株における *stx2c* の分布を解析した。その結果、53.7%（n=54）の株で *stx2c* が存在することが判明し、米国での調査結果とほぼ同じであった。しかし、clade 8 の全ての株が *stx2c* を保有しているわけではないことから、バリアント Stx2 の保有率と病原性との関与は現時点では不明である。

腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素には、抗原性の異なる 2 種類（Stx1 と Stx2）が存在し、このうち、患者の重症化により関連していると考えられているのが Stx2 である。上述したように、各種キットあるいは特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング等による志賀毒素（Stx）の産生量の解析は定量性に欠けること、現在入手可能な Stx 検出キットは Stx2 バリアントをカバーするものではないことから、*in vitro* において clade 8 株とそれ以外の株で Stx の発現量に差があるかどうかは現時点では不明である。Stx2 の *in vivo* における発現レベルは、一酸化窒素 NO によって抑制されると報告されている（文献 8）。嫌気条件下（例えば腸管内）で活性化し、NO の還元化酵素（不活化酵素）をコードしていると考えられる *norV* はホウレン草由来株（clade 8）では保存されているが、他のシークエンス解析株（Sakai 株 [clade 1]および EDL933 [clade 3]）では遺伝子内部に欠失が見られる（文献 3）。したがって、少なくとも clade 8 株が感染した腸管内では clade 1, 3 株と比較して NO の存在量が低く、Stx2 の発現量が高い可能性がある。そこで、*norV* の遺伝子内部欠失について国内株を用いてさらに解析した。その結果、少なくとも clade 1, 2, 3 ではほぼ全ての株が *norV* 遺伝子内部に欠失を持っている一方、解析したすべての clade 8 株では欠失は見られないことが判明した（表 2）。以上の結果から、clade 8 株では clade 1, 2, 3 株と比較して、*in vivo*（嫌気条件下）での Stx2 の産生量が高いと予想され、このことが重症化の一つの要因になっていると推測される。

b. LEE の発現レベル解析

LEE にコードされる 3 型蛋白質分泌装置は、様々な病原性細菌において宿主への病原性因子として機能する蛋白質の特異的な輸送装置として機能している。腸管出血性大腸菌においても、30 以上もの分泌性蛋白質がゲノム上にコードされていることが明らかになりつつあり、それらの機能発現は腸管出血性大腸菌の病原性に必須であると考えられている。そこで、これらの分泌蛋白質のうち、菌体外への分泌量が多い蛋白質の培養上清への分泌量を定量することで、LEE の発現レベルを解析した。培養上清中の EspB, EspA および EspP 蛋白質を SDS-PAGE で可視化した後、各蛋白質のバンドをデンシトメータで測定して数値化した。解析には clade 8（n=18）とそれ以外の clade（n=17）株を用いた。すべてのバンドスキャンデータを平均した後、clade 8 株とそれ以外における発現量の割合を求めたところ、全ての蛋白質で clade 8 株はその他の株に比べて 1.5 倍以上の発現量を示すことが判明した（表 3）。*grlR* 欠損株（LEE 発現上昇株）における EspB 蛋白質の存在量を 1 とした場合の各菌株における発現量をプロットし、平均値の有意差を T 検定によって統計処理したところ、EspB, A, P の発現レベルは clade 8 株で有意に（それぞれ p=0.0017, 0.00063, 0.00044）高いことが判明した。

したがって、LEE の発現量は clade 8 株で有意に高いと考えられ、このことは高病原性の一つ

の原因であると推測される。以上の結果をサポートする知見として、つい先頃、米国の研究グループはSakai株とclade 8株のLEEの発現量および宿主細胞への接着能を解析した結果、clade 8株の方がいずれの活性も高いことを示している（文献9）。

c. エンテロヘモリシンの発現レベル解析

我々の研究成果（Satoh et al., 2008）から、LEEの発現とエンテロヘモリシンの発現は協調的に行われていることが明らかとなっている。すなわち、LEEの発現上昇が見られる *grlR* 欠損株では、野生株と比較してLEEのみならず、エンテロヘモリシンの発現が顕著に上昇する（Satoh et al., 2008：論文リスト参照）。②で示した様に、clade 8株ではLEEの発現上昇が見られる。そこで、clade 8株のエンテロヘモリシン活性をEHT寒天培地上で解析した。各菌株のエンテロヘモリシン活性を溶血環（ハロ）形成能で解析した。その結果、clade 8株は *grlR* 変異株と同様に明確なハロ形成を行う株が数多く存在することが明らかとなった（表4）。以上の結果から、clade 8株ではLEEに加えて、エンテロヘモリシンの発現活性も上昇していると推論された。

（まとめ）

- 血清型O157：H7の腸管出血性大腸菌はHUS症例の起因菌として最も多い（約90%）血清型であった。
- 血清群O157, O26, O111の分離割合が高いが、その他の血清群ではO121, O103, O91, O165, O145の分離頻度が高く、中でもO121とO165では重症者が多かったが現時点でその由来は不明である。
- 無症状保菌者とHUS由来株のclade解析から、clade 8は有意にHUS由来株に多く存在することが明らかとなった。
- clade 8の約半数はバリアント *stx2c* を保有していた。
- 大腸菌が嫌気条件下で産生するNO（一酸化窒素： Stx2発現の抑制因子）還元化酵素NorVはclade 1, 2, 3では遺伝子内部に欠失が見られる一方、clade 8では欠失が見られないことから、clade 1, 2, 3と比較してclade 8では *in vivo* でのStx2の発現が高いと推測された。
- clade 8株は他のclade と比較してLEEの発現量が高い傾向が見られた。
- clade 8株は他のcladeと比較してエンテロヘモリシン活性が高い傾向が見られた。
- 牛由来のO157:H7の一部はヒトで有症者由来のO157:H7と同様なDNA型を持つことが判明したことから、これらはヒトでの感染原因菌となっている可能性が示唆された。
- ヒトでの重症例の原因となっている株（clade 8）が牛にも分布していることが明らかとなったことから、重症感染事例の原因株の一部が牛由来の大腸菌に分布していることが明らかとなった。

【参考文献】

1) J. Clin. Microbiol. 40: 3613-3619, 2002.
2) J. Clin. Microbiol. 33: 248-250, 1995.
3) Infect. Immun. 77: 3713-3721, 2009.
4) J. Bacteriol. 187: 4086-4094, 2005.
5) J. Clin. Microbiol. 35: 1675-1680, 1997
6) Proc. Nat. Acad. Sci. 105: 4868-4873, 2008.
7) J. Clin. Microbiol. 46: 2070-2073, 2008.
8) Proc. Nat. Acad. Sci. 104: 10199-10204, 2007.
9) Microbiology. [Epub ahead of print, PMID: 19892762]

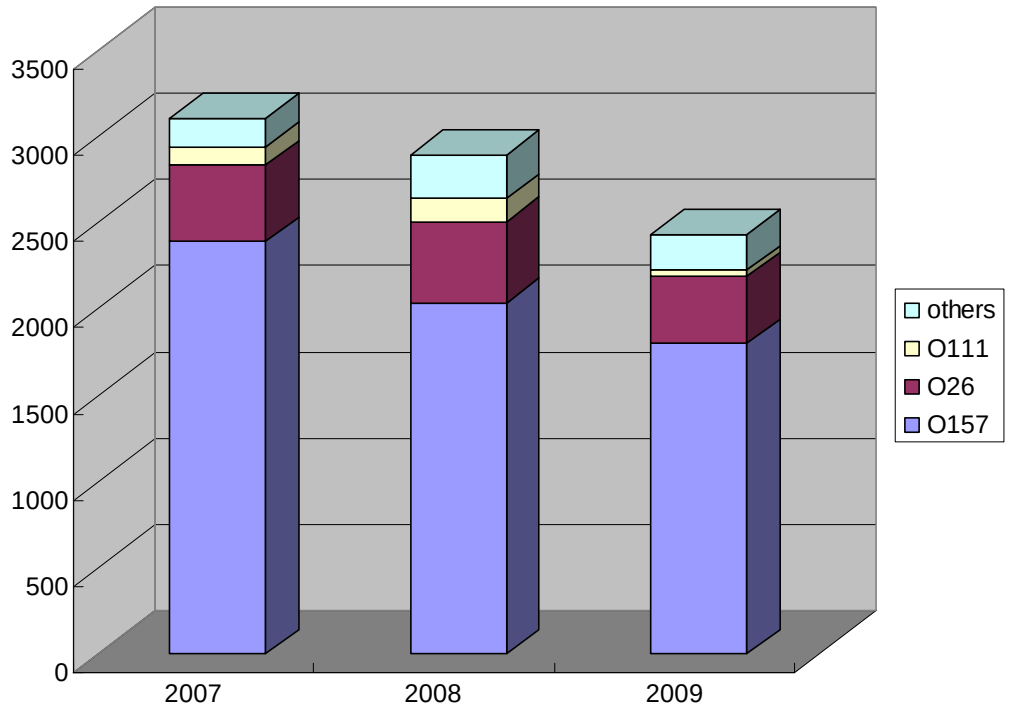


図 1-1. 2007 年から 2009 年までの腸管出血性大腸菌の O 血清群ごとの分離比率
（分離総数：2007 年, n=3,105;　2008 年, n=2,896;　2009 年, n=2,433.　O157, O26, O111 で全体の約 92.5%を占める）

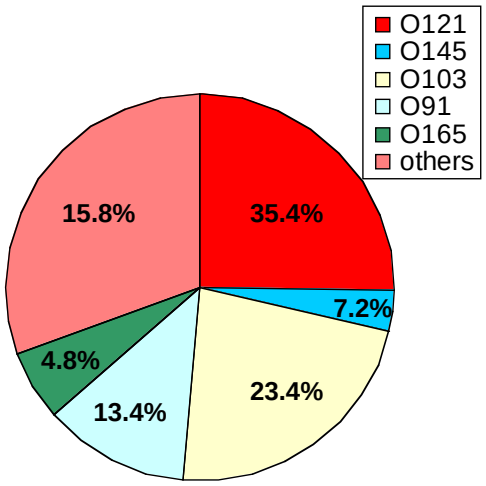


図 1-2. 2007 年から 2009 年までの O157, O26, O111 以外の腸管出血性大腸菌の分離比率（総数 632：全体の約 7.5%）

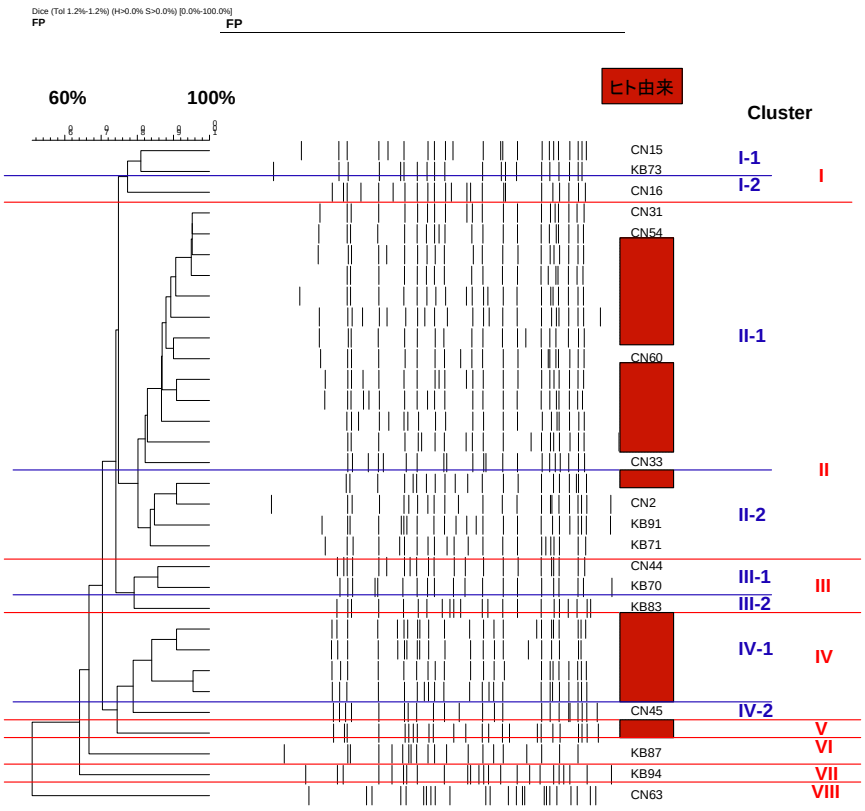


図 2. ヒトおよび牛由来腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 解析と系統解析
オレンジで囲まれた領域はヒト由来株をその他は牛由来株を示す。

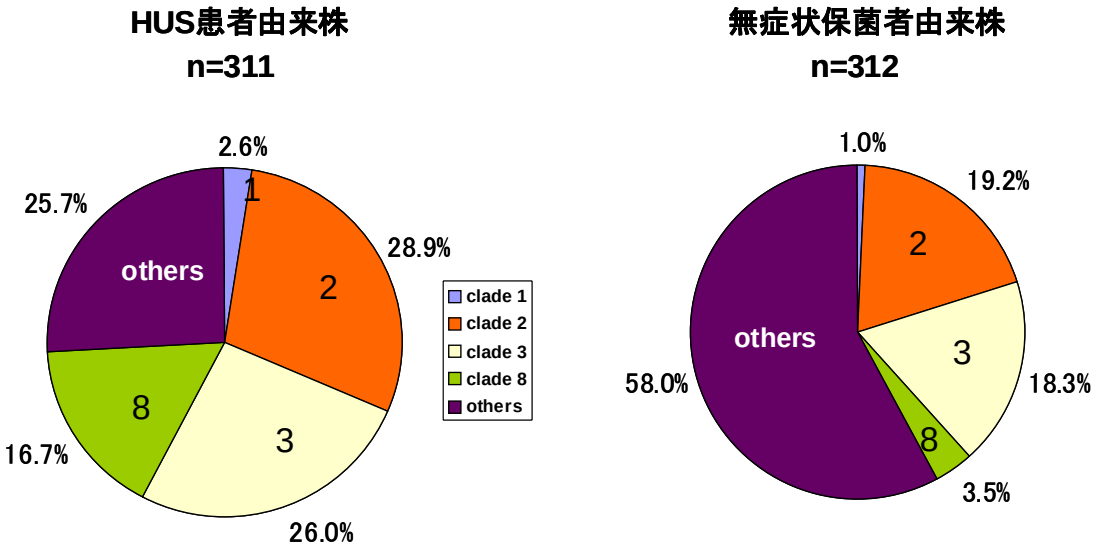


図 3-1. HUS 患者由来および無症状保菌者由来 O157:H7 株の clade 解析
（1999-2009 年のまとめ）

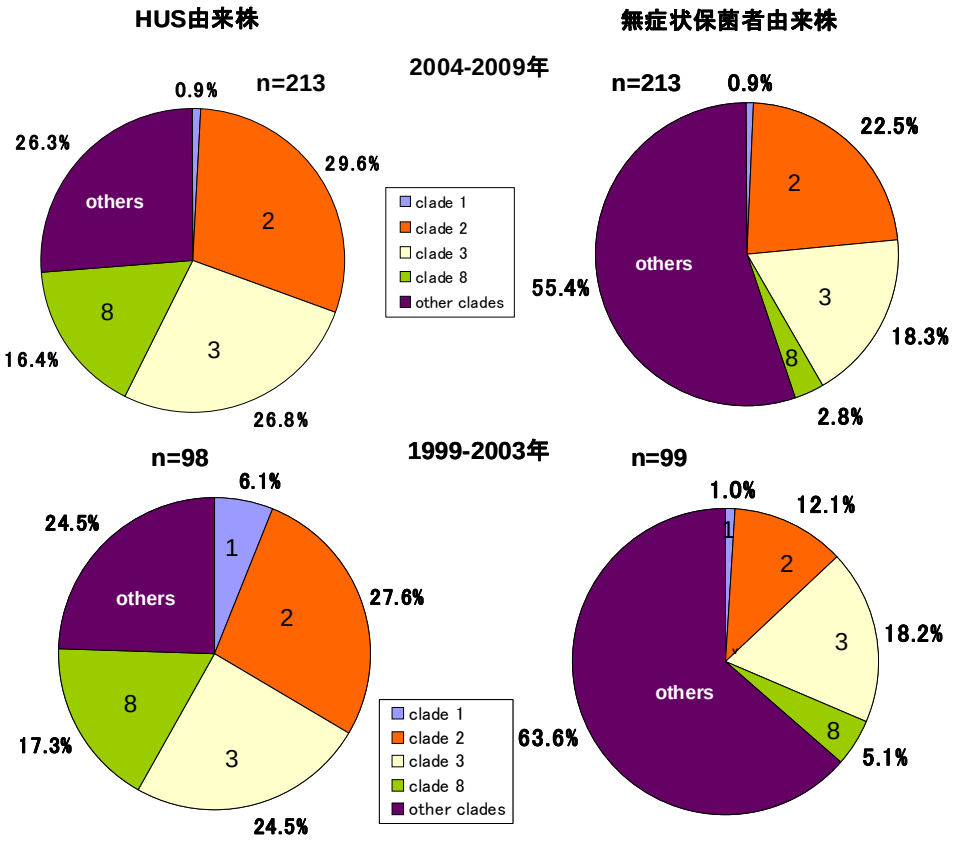


図 3-2. HUS 患者由来および無症状保菌者由来 O157:H7 株の clade 解析
（2004-2009 年：上段, 1999-2003 年：下段）
χ 二乗検定（自由度 1: clade 8 / other clades in HUS 由来株 / 無症状保菌者由来株）p=5.0E-8 , OR (95% CI): 5.49 (2.81-10.75)

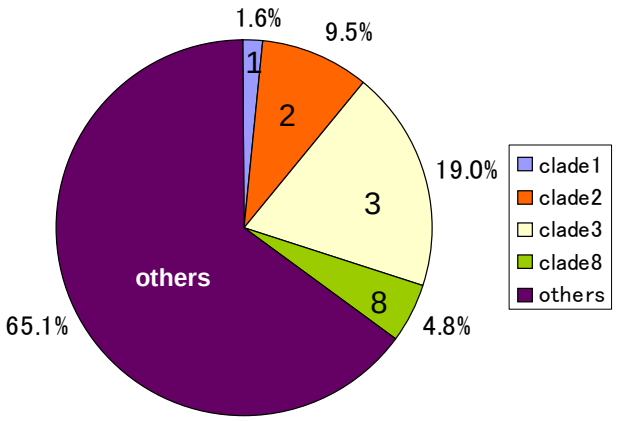


図 4. 牛由来 O157:H7 株（n=84）の clade 解析

図 5. HUS 由来株および牛由来 clade 8 株の PFGE 解析

右から二番目のカラムは clade を示す（黄色：clade 1, ピンク：clade 2, 白抜き：clade 3, 緑：clade 8, 青色：other clades）。右端のカラムで空白の株は牛由来のものを示す。紫で囲んだ PFGE 型は 2006 年に発生した東京都 M 大学の集団発生事例株を含む（本文参照）。茶色のドットは牛由来株を示す。

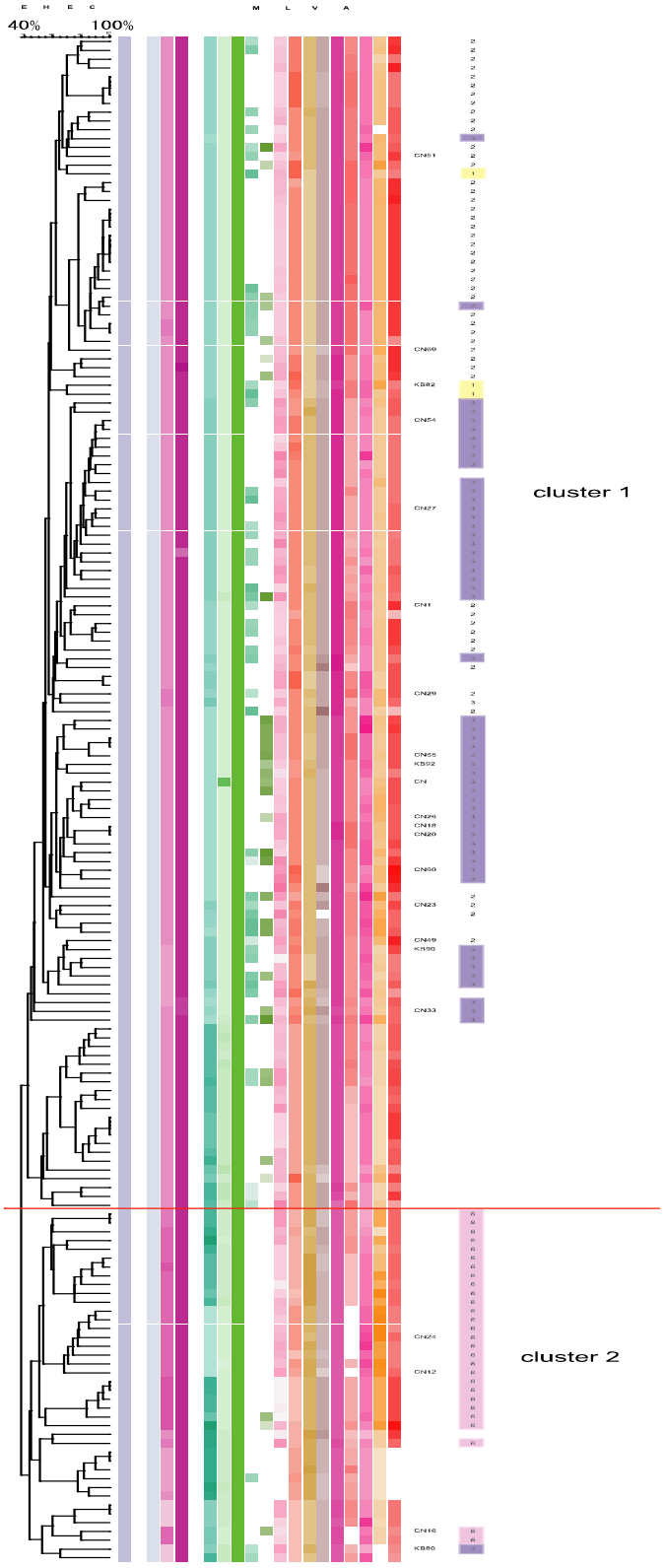


図 6. HUS 由来株および牛由来 clade 8 株の MLVA 解析
右端のカラムが clade を示す(黄色塗り:clade 1, 青色塗り:clade 2, 黒字:clade 3, ピンク塗り:clade 8, 空白:other clades)。右から二番目のカラムの菌株番号記載株は牛由来の株を示す。

表 1.　O 血清群ごとの総分離数と HUS 患者由来株数（2004-2009 年）

O 血清群	総数	HUS 患者由来株数 （%）
O157	12,650	194 （1.5）
O121	259	6 (2.3)
O111	514	5 (0.97)
O165	45	4 (8.9)
OUT	120	2 (1.7)
O26	2,766	1 (0.1>)
O103	193	O
O91	135	O

表 2. *norV* PCR の結果

clade	*norV*	
	欠失なし	欠失あり
clade 1	0	6
clade 2	1	15
clade 3	0	16
clade 8	25	0

表 3. LEE にコードされる 3 型分泌蛋白質輸送装置から分泌される蛋白質の発現量解析

分泌蛋白質	発現量比 [clade 8 (n=18) / other clades(n=17)] (Student's t-test, unmached, 2-tailed)
EspB	1.505 （p=0.0017）
EspA	1.547 （p=0.00063）
EspP	1.519 （p=0.00044）

表 4. エンテロヘモリシン活性

ヘモリシン活性レベル	菌株数	
	clade 8	other clades
0 (陰性)	0	3
1(野生株レベル)	2	6
2(中間レベル)	7	9
3 (*grlR* 変異株レベル)	12	1

３）「分担課題：牛由来腸管出血性大腸菌の分布解析・菌株の選定」

分担研究者名：小林秀樹（(独）農業・食品産業技術総合研究機構　動物衛生研究所）

①研究目的

本研究は、腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生大腸菌：STEC）の牛肉を介した感染症のリスク評価のために、焼肉など牛肉および牛内臓肉の調理品中での本菌の動態について解明し、また、ヒトの発症率が高い血清型の病原性の特徴および食品中での動態の特徴を明らかにすることを目的とする。

本研究推進のため分担担当課題には大きく２つの目的があり、ひとつは農場における牛の STEC 保有率を調査すること、および分離 STEC 株の性状解明を行うことである。もうひとつの目的は、牛由来 STEC 分離株について人由来 STEC 株との比較解析を目的とし、国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所の研究分担共同研究員に提供することである。

②研究方法

［１］乳牛直腸便からの STEC 分離と同定

a. 1998 年分離実験室保存 STEC 92 株

当分担課題担当者らが 1998 年に関東甲信越地域の 78 農場から収集した 358 頭の乳牛直腸便から分離した 92 株の STEC[1)]。菌株はミストディスカンスに浮遊し、-80℃で凍結保存した。

b. 2006～2007 年分離 STEC 118 株

関東甲信越地域を中心に 11 県 123 農場の 932 頭の直腸便から分離した[2)]。

c. 2008 年分離 STEC 45 株

九州地域の 2 県 50 農場 200 頭の直腸便から分離した。

［２］2009 年採材の肉牛直腸便の STEC スクリーニングと分離株の性状

2009 年度に 2 県 19 農場 96 頭から採材した直腸便材料について STEC のスクリーニングを実施した。また、分離 STEC 株について各種性状を調べた。

［３］実験室保存 0157 株

当課題分担担当者らが分離保存していた株、あるいは各県より病性鑑定依頼のあった株の合計 26 株を実験室保存 0157 株として本研究に使用した。

［１］、［２］における STEC の分離は検査材料を mEC 培地で 37℃、6～18 時間増菌培養したものをマッコンキー寒天培地に塗抹培養（37℃、18 時間）後、密集落から作製した DNA テンペレートについて各種志賀毒素遺伝子である *stx*1, 2, 2e, 2f およびほとんど全ての腸管出血性大腸菌株が保有する細胞外膜蛋白をコードするインチミン遺伝子(*eae*)の各遺伝子を PCR によりスクリーニングした。スクリーニング陽性平板はそれぞれの遺伝子に特異的な DNA プローブによるコロニーハイブリダイゼーションまたはコロニー単位での PCR により目的とする株を分離した。陽性検体あたりの検査コロニー数は 16～24 個とした[3-10)]。（図１）

分離した STEC 株の O 群血清型別は 01～0176 までの抗血清を供試したマイクロプレート凝集反応で実施した。志賀毒素遺伝子の型別は各志賀毒素遺伝子特異 PCR で、*eae* のサブタイピングは各サブタイプ特異 PCR と DNA シーケンスを併用して実施した。肉牛由来 STEC 分離株は *eae* 保有の有無のみを PCR で確認した。

［４］分離 STEC 株の薬剤感受性試験

［１］および［２］の STEC 株についてアンピシリン、カナマイシン、硫酸ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、オキシテトラサイクリン、コリスチン、クロラムフェニコール、ナルジクス酸、セファレキシンおよびエンロフロキサシンに対する薬剤感受性試験を実施した。

③研究結果

（結果）

［１］乳牛および肉牛の直腸便における STEC スクリーニング成績

乳牛および肉牛の直腸便における *stx* と *eae* の PCR スクリーニング成績を表 1 にまとめた。乳牛の直腸便における *stx* 遺伝子の検出率は 2007 年採材が 1998 年のそれと比べ有意に減少していた。一方、2009 年に収集した肉牛の直腸便材料からの検出率では 2007 年に採集した乳牛直腸便材料よりも *stx* と *eae* ともに高い検出率であった。また、*stx*2e と *stx*2f による PCR スクリーニングで陽性を示す直腸便検体はなかった。

［２］2006～2007 年分離 STEC 118 株の O 群血清型とインチミンタイプ

2006～2007 年に収集した乳牛直腸便でスクリーニング陽性検体から分離した STEC 株のうち、性状検査成績から１頭１株を選出したところ 118 株となった。これら 118 株について O 群血清型別や種々の病原遺伝子について検査した。O 群血清型別ではこれらの株は既知 31 の O 群に分類されたほか、5 株が既知 O 群には型別されなかった（表 2)。*eae* を保有する株は 18 株（15.3%）であり、8 株全ての 026 がインチミンβを、5 株全ての 0103 がインチミンεであり *eae* 保有株の大半を占めた。また、腸管出血性大腸菌性エンテロヘモリシン遺伝子（EHEC-*ehly*）は大半の株で検出されたが、人の典型的腸管病原性大腸菌株が保有する結束性線毛遺伝子（*bfp*）を保有する株はなかった。なお、全ての *stx*2 を保有する株は *stx*2e や *stx*2f にはサブタイピングされなかった。

［３］乳牛由来 STEC 株の O 群血清型推移

1998 年分離 STEC 株と 2007 年分離のそれの O 群血清型を比較したところ、優位な O 群血清型が大きく推移していることが明らかとなった（図 2)。すなわち、1998 年に分離した STEC 株の O 群血清型のうち分離株数の最も多かったのは 026 であり、次いで 0113、08、084、0116 の順で多かったのに対し、2007 年分離の STEC 株では 08 が最も多く、次いで 0153、02、026、0117、0163 の順であった。

［４］肉牛由来 STEC 株および 2008 年分離乳牛由来 STEC の性状

スクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから 61 株（同一検体からの同一クローンは任意の１株を選出）の STEC が分離された。乳牛での成績（陽性 283 検体、分離株数 118 株）との比較から、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合は乳牛のそれよりも極めて高かった。乳牛および肉牛からの分離 STEC 株の既知 O 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な O 群血清型は 01、02、07、08、020 および 0150 の 6 血清型であった。（表 3、4）

［５］共同研究者への送付菌株

共同研究者に送付した STEC 菌株とそれらの簡単な性状をまとめたリストについて表 5 に示した。送付総菌株数は 232 株で、うち 26 株が 0157 株であった。通番で 1～161 が 1998 年以降 2007 年までの間に野外分離された STEC 株であり、通番で 162～206 が 2008 年分離の菌株である。これらの菌株はほとんどが上述の試験に供試したものである。また送付にあたり可能な限り同一クローンの重複を避けて選択したので、送付菌株数は当課題担当者が供試した STEC 菌株数よりも若干少ない。

［６］分離 STEC 株の薬剤感受性試験

薬剤平板希釈法を供試した薬剤感受性試験では、1998 年分離 STEC 92 株の薬剤耐性株は 8 株（8.7%）で、うち 6 株が単剤耐性、残りの 2 株がアンピシリン・硫酸ストレプトマイシンまたはオキシテトラサイクリン・硫酸ストレプトマイシンの 2 剤耐性であったのに対し、2007 年分離株は 28 株（23.7%）が薬剤耐性を示し、うち 8 株が 3 剤以上の耐性、13 株が 2 剤耐性であった（表 6)。いずれの STEC 株もキノロン、ニューキノロンおよび第三世代セフェム系薬剤に耐性を示さなかった。

(考察)

［１］乳牛と肉牛における STEC の保有率について

乳牛の直腸便材料について *stx* 遺伝子を標的とした PCR でスクリーニングすると 1998 年採材では総検査個体の 80%が陽性であったが、10 年後の 2007 年採材では 30%程度と大きく減少した。この理由は不明であるが、2001 年に国内で初めて確認された BSE とその対応による給餌飼料の変更、近年の輸入穀物飼料の高騰から自給粗飼料の割合が増加したこと等が影響している可能性がある。このこ

とは粗飼料割合を増加して給餌することにより直腸便の 0157 をはじめとする大腸菌数が減少する実験成績からも推察できる。一方、2009 年採材の約半数の肉牛の直腸便から *stx* 遺伝子が検出され、2008 年採材の乳牛直腸便材料よりも高い検出率であった。以前の肉牛での調査結果が無いため比較は不可能であるが、乳牛同様肉牛も飼料の大幅変更があったことから *stx* 遺伝子検出割合は以前より低下しているかもしれない。飼料の変更に加え、牛の飼育環境、衛生対策および流通などの改善も考えられる。いずれにしても *stx* 遺伝子検出割合が以前より低下した理由は明らかではないが、生産現場での STEC 保有率が低減したことは公衆衛生上大きな意義がある。

［２］乳牛と肉牛における *eae* の保有率について

2007 および 2009 年の乳牛および肉牛直腸便の *eae* のスクリーニングでは *stx* 遺伝子の検出率を上回る結果となった。特に肉牛では約 70%が陽性であった。本課題担当者が 2001 年に収集した乳牛直腸便 444 検体を調査したデータにおいて、*eae* の検出率は最も陽性率の高かった哺乳牛の 31.4%を加えても全体平均で 16.7%に過ぎなかった [11)]。STEC 保有率が低減化したのに *eae* 保有大腸菌（腸管病原性大腸菌）が増加した理由は不明である。

［３］乳牛由来 STEC 株の特性について

1998 年と 2007 年分離株の 0 群血清型を比較すると保菌している STEC 株が変遷していることが明らかとなった。牛をはじめとする反芻獣分離株に多くみられた 0113 や 0116 は近年ではあまり分離されなくなった。これとは対照的に、これまでほとんど分離報告のなかった 02、0117 あるいは 0153 等が優位に分離されている。しかしながら、人の腸管出血性大腸菌として 0157 に次いで分離される 026 や 0103 等は分離頻度に大きな増減はみられなかった。おもしろいことに、これら 026 や 0103 は *eae* を保有している株が多かった。これらのことから反芻獣に特異性が高いと考えられる STEC は時系的あるいは給餌飼料の変更等で大きく変遷しうることが示唆された。もし、これら反芻獣の STEC 株の腸管定着様式が通常線毛性なら、これらの STEC 株は公衆衛生上ほとんど問題とならないかもしれない。

公衆衛生上問題となる STEC はインチミンも産生する株である。直腸便の *eae* のスクリーニング結果から、近年分離 STEC 株の多くが *eae* を保有するものと懸念されたが、2007 年分離 STEC 株の *eae* 保有率は 1998 年分離のそれとほとんど変わらなかった。2007 年分離の *eae* 保有株の多くが *stx* 遺伝子を保有しておらず、多くの乳牛直腸便には *stx* あるいは *eae* 遺伝子のどちらか一方のみを保有する大腸菌株が混在する様相が伺えた。また、*eae* と *bfp* 遺伝子を同時保有する株はないことから、現在のところ、牛は人の典型的腸管病原性大腸菌のレゼルボアではないことも示唆された。

［４］肉牛由来 STEC 株および 2008 年分離乳牛由来 STEC の性状比較

肉牛（黒毛和種）の STEC 保有率は 51%（49/96）でり、2007 年に乳牛から採材したそれの 30.4%（283/932）と比較して有意に高かった。また、スクリーニングで陽性を示した 49 検体のほぼ全てから 61 株の STEC が分離されたことは、肉牛の直腸便に生息する大腸菌のうち STEC の割合が乳牛のそれよりも極めて高いことを示唆するものであった。乳牛および肉牛からの分離 STEC 株の既知 0 群血清型分布は、それぞれ 20 および 30 血清型に型別され、そのうち共通な 0 群血清型は 01、02、07、08、020 および 0150 の 6 血清型であった。また、以前に報告された国内乳牛由来 STEC の 0 群血清型の分布と比較して、今回調査した乳牛由来株の 0 群血清型の大半が既報のそれと一致することが確認された。さらに、分離 STEC 株の *eae* 保有率は乳牛と肉牛で大きな差異はなかったが、保有株の 0 群血清型は異なっていた。これらのことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。

［５］乳牛由来 STEC 分離株の薬剤感受性試験

1998 年と 2007 年分離株を比較すると近年分離株の耐性化が明らかである。ニューキノロンや新世代セフェム系薬剤にこそ耐性を示す株はなかったものの、3 あるいは 4 剤耐性 STEC 株が新たに見

出されたことは公衆衛生上の観点からも懸念すべき状況と考えられる。一方、肉牛への抗菌剤使用は乳牛へのそれと比して非常に多いため、肉牛由来 STEC 株の多剤耐性化は乳牛のそれよりいっそう顕著であると考えられる。

以上の結果から、以下の結論を得た。ただし、焼肉調理実験の結論については本研究で使用された器具および条件下に限定された結果に基づくものである。

・乳牛および肉牛で人に病原性を有すると考えられる腸管出血性大腸菌が保有されていることが示された。
・乳牛と肉牛の STEC 株の O 群血清型は異なっていたことから、多くの STEC 株は互いに異なるクローンとして乳牛と肉牛のそれぞれに保持されている可能性が示唆された。
・STEC 株の薬剤耐性化が明らかであり、肉牛由来 STEC 株の多剤耐性化は乳牛よりいっそう顕著であると考えられる。

【引用文献】

1) Kobayashi, H. et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67: 484-489.
2) Kobayashi, H. et al. (2009) J. Vet. Med. Sci. 71: 363-366.
3) Yamasaki, S. et al. (1996) Microbiol. Immunol. 40: 345-352.
4) Johnson, W. M. et al. (1990) J. Clin. Microbiol. 28: 2351-2353.
5) Schmidt, H. et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 1205-1208.
6) Gannon, V. P. J. et al. (1993) J. Clin. Microbiol. 31: 1268-1274.
7) Olsvik, O. et al. (1993) In: Diagnostic molecular Microbiology, ASM, pp. 271-276.
8) Wieler, L. et al. (1996) J. Clin. Microbiol. 34: 1980-1984.
9) Paton, A. et al. (1998) Clin. Microbiol. 36: 598-602.
10) Adu-Bobie, J. et al. (1998) J. Clin. Microbiol. 36: 662-668.
11) Kobayashi, H. et al. (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69: 5690-5692.

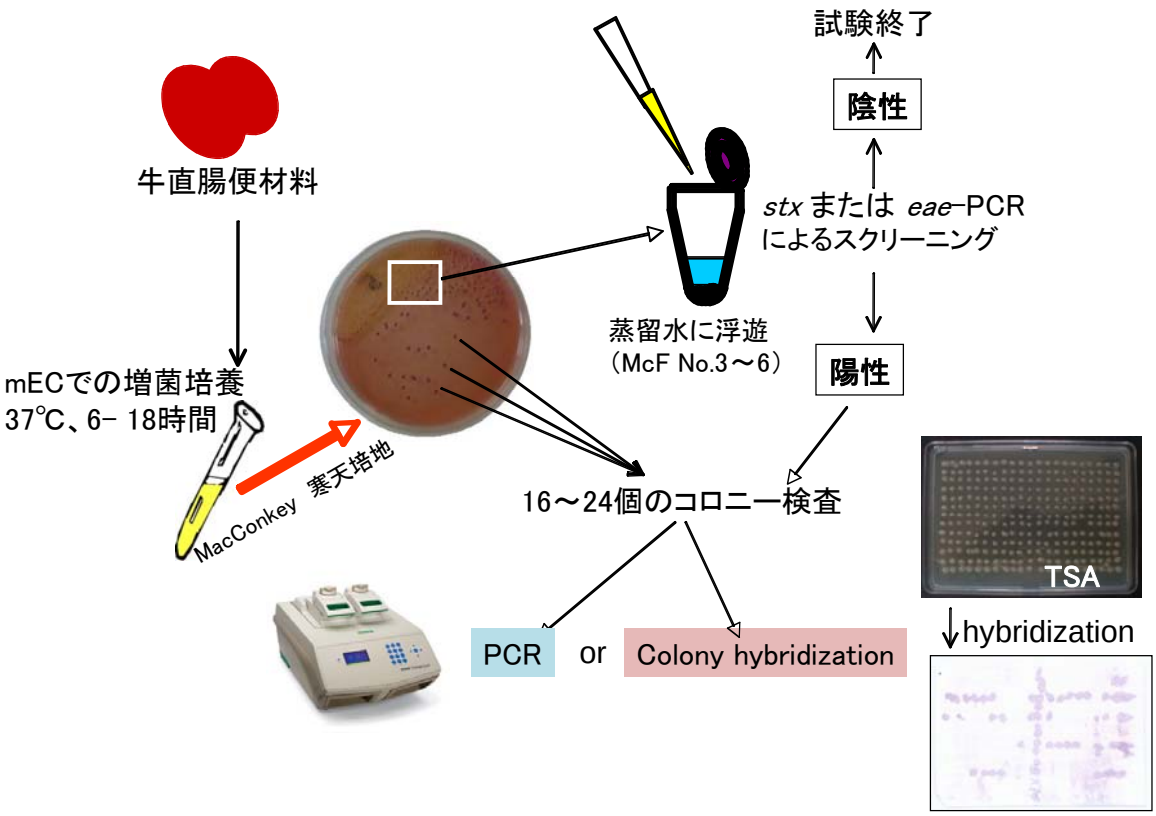


図1　牛直腸便材料からの STEC 株の分離手順

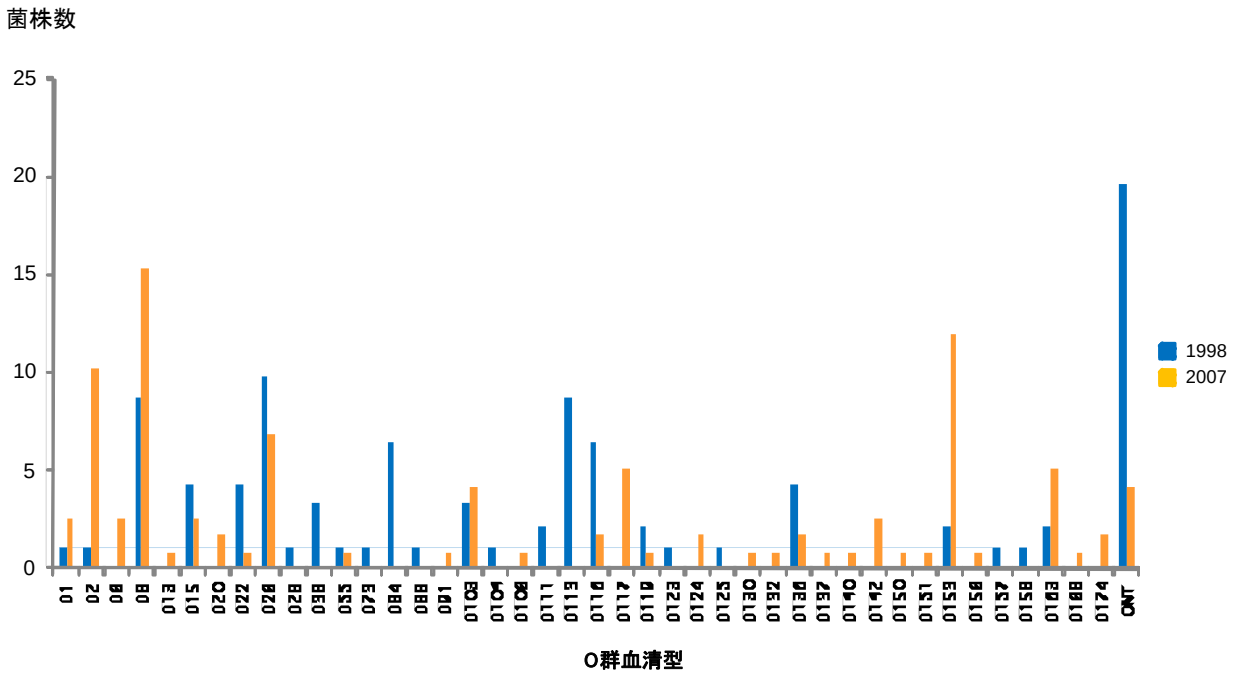


図2　1998 年および 2007 年に乳牛から分離された O 群血清型別 STEC 株数の比較

表1. 乳牛および肉牛の直腸便における *stx* および *eae* 遺伝子検出情報

収集年	材料／農場	検査数	*stx* 陽性 (%)	*eae* 陽性 (%)	*stx* & *eae* 陽性 (%)
1998年	乳牛直腸便	(n=358)	285 (80.0)	NT	NT
	農場	(n=78)	78 (100)	NT	NT
2007年	乳牛直腸便	(n=932)	283[a] (30.4)	404 (43.3)	119 (12.8)
	農場	(n=123)	84 (68.3)	88 (71.5)	55 (44.7)
2009年	肉牛直腸便	(n=96)	49[b] (51.0)	67 (69.8)	42 (43.8)
	農場	(n=19)	15 (78.9)	19 (100)	15 (78.9)

a) Stx陽性の283頭のうち115頭から118株のSTEC（同一固体から分離された性状の異なるSTECを3株含む）が分離された。

b) Stx陽性の49頭のうち47頭から61株のSTEC（同一固体から分離された性状の異なるSTECを14株含む）が分離された。

表2 2007 年分離乳牛由来 STEC 118 株の O 群血清型と *eae* 保有状況

O群血清型	志賀毒素遺伝子タイプ	インチミンタイプ	菌株数	O群血清型	志賀毒素遺伝子タ	インチミンタイプ	菌株数
O 1	1	−	2	O 117	イプ	−	2
O 1	2	−	1	O 117	2	−	2
O 2	1	NT[a]	1	O 117	1&2	−	2
O 2	1	−	1	O 119	1	γ	1
O 2	2	−	10	O 124	2	−	2
O 6	1&2	−	3	O 130	1&2	−	1
O 8	1	−	2	O 132	2	−	1
O 8	2	−	4	O 136	1	−	2
O 8	1&2	−	12	O 137	1	−	1
O 13	1	−	1	O 140	1	−	1
O 15	1	ε	1	O 142	2	−	1
O 15	1&2	−	2	O 142	1&2	−	2
O 20	1&2	−	2	O 150	1&2	−	1
O 22	2	−	1	O 151	2	−	1
O 26	1	β	8	O 153	2	−	1
O 55	1	−	1	O 153	1&2	−	13
O 91	1&2	−	1	O 156	1	γ	1
O 103	1	ε	5	O 163	2	−	6
O 106	2	−	1	O 168	1&2	−	1
O 113	2	−	3	O 174	1&2	−	1
O 113	1&2	−	5	O 174	1	NT	1
O 116	2	−	1	O NT	2	−	4
O 116	1&2	−	1	O NT	1&2	−	1

a) 型別不能を示す

表3 2008年度分離乳牛由来STEC 45株の O群血清型と*eae*遺伝子保有状況

O群血清型	志賀毒素遺伝子タイプ	*eae*遺伝子	菌株数
O1	2	−	1
O2	1	−	2
O2	1&2	−	5
O7	1	+	1
O8	1	−	1
O8	1&2	−	3
O13	1	−	1
O15	1&2	−	1
O17	1	−	1
O20	1&2	−	1
O28	1	−	1
O28	1&2	−	1
O55	1	−	2
O84	1	+	1
O91	1&2	−	1
O113	1&2	−	2
O116	1&2	−	2
O117	1&2	−	1
O125	1&2	+	1
O130	1&2	−	2
O150	1&2	−	1
O151	2	−	1
O153	1&2	−	3
O163	1&2	−	1
O163	2	−	6
ONT	2	−	2

ONT: 既知O群血清と反応が確認されなかったもの

表4 2009年度分離肉牛由来STEC 61株の O群血清型と *eae* 遺伝子保有状況

O群血清型	志賀毒素遺伝子タイプ	*eae* 遺伝子	菌株数
O1	1&2	−	1
O1	1	−	2
O2	1	−	1
O7	1	−	1
O8	1	−	3
O9	1	−	2
O18	1	−	1
O20	1	+	1
O21	1	−	1
O22	1	−	1
O25	1	+	1
O26	1	−	1
O32	1	−	1
O36	1	−	1
O39	1	+	1
O41	1	−	1
O42	1	−	1
O44	1	−	1
O49	1	+	1
O53	1	−	2
O57	1	−	1
O74	1	+	1
O78	1	−	1
O112	1	−	2
O120	1	−	2
O126	1	−	1
O128	1	+	1
O128	1	−	1
O136	1	−	1
O139	1	−	2
O142	1	−	1
O150	1	−	1
ONT	1	+	4
ONT	1	−	11
OUT	1	−	6

ONT: 既知O群血清と反応が確認されなかったもの
OUT: 自発凝集を示したもの

表5 共同研究者宛て送付菌株一覧

通番	菌株名	O群血清型	志賀毒素型	*eae* 保有	由来県-農場	分離年
1	KB 1	26	1	+	n-0	1998
2	KB 2	157	2	+	n-1	1998
3	KB 3	145	2	+	n-2	1998
4	KB 4	145	2	+	n-3	1998
5	KB 5	15	2	−	c-1	1998
6	KB 6	15	2	−	c-2	1998
7	KB 7	15	2	−	c-2	1998
8	KB 8	116	2	−	c-3	1998
9	KB 9	153	2	−	c-4	1998
10	KB 10	113	2	−	n-4	1998
11	KB 11	113	2	−	n-5	1998
12	KB 12	22	2	−	n-6	1998
13	KB 13	84	1	+	n-7	1998
14	KB 14	84	1	+	n-7	1998
15	KB 15	84	1	+	n-8	1998
16	KB 16	158	2	−	n-7	1998
17	KB 17	NT	2	−	n-9	1998
18	KB 18	153	2	−	c-5	1998
19	KB 19	163	2	−	c-6	1998
20	KB 20	15	2	−	c-7	1998
21	KB 21	8	1&2	−	c-8	1998
22	KB 22	119	2	−	c-9	1998
23	KB 23	NT	2	−	c-10	1998
24	KB 24	116	2	−	c-11	1998
25	KB 25	116	2	−	c-12	1998
26	KB 26	116	2	−	c-12	1998
27	KB 27	113	2	−	c-12	1998
28	KB 28	84	1	+	c-13	1998
29	KB 29	NT	2	−	c-14	1998
30	KB 30	8	2	−	c-15	1998
31	KB 31	104	2	−	c-16	1998
32	KB 32	8	2	−	c-17	1998
33	KB 33	116	2	−	c-18	1998
34	KB 34	28	2	−	c-19	1998
35	KB 35	113	2	−	c-20	1998
36	KB 36	26	1	+	c-21	1998
37	KB 37	113	2	−	c-22	1998
38	KB 38	113	2	−	c-23	1998
39	KB 39	NT	2	−	c-24	1998
40	KB 40	1	2	−	c-25	1998
41	KB 41	NT	2	−	c-26	1998
42	KB 42	8	1	−	c-27	1998
43	KB 43	2	2	−	c-28	1998
44	KB 44	NT	2	+	c-28	1998
45	KB 45	119	1	−	c-29	1998
46	KB 46	38	1&2	−	c-30	1998
47	KB 47	38	1&2	−	c-31	1998
48	KB 48	73	1&2	−	c-32	1998
49	KB 49	NT	1&2	−	c-33	1998
50	KB 50	NT	1&2	−	c-34	1998
51	KB 51	NT	2	−	c-35	1998
52	KB 52	125	1&2	−	c-36	1998
53	KB 53	55	2	−	c-37	1998
54	KB 54	38	1&2	−	c-38	1998
55	KB 55	8	1&2	−	c-39	1998
56	KB 56	116	2	−	c-40	1998
57	KB 57	NT	2	−	c-41	1998
58	KB 58	136	1	−	c-42	1998
59	KB 59	8	1	−	c-43	1998
60	KB 60	8	1	−	c-44	1998
61	KB 61	NT	1&2	−	c-45	1998
62	KB 62	136	1	−	c-46	1998
63	KB 63	136	1	−	c-46	1998
64	KB 64	NT	2	−	c-47	1998
65	KB 65	NT	2	−	c-48	1998
66	KB 66	123	2	−	c-49	1998
67	KB 67	NT	1&2	−	c-50	1998
68	KB 68	8	1	−	c-51	1998
69	KB 69	NT	2	−	c-52	1998
70	KB 96	20	1&2	−	a-1	2007
71	KB 97	2	2	−	a-2	2007
72	KB 98	8	2	−	a-3	2007
73	KB 99	8	2	−	a-3	2007
74	KB 100	142	2	−	a-3	2007
75	KB 101	124	2	−	a-4	2007
76	KB 102	124	2	−	a-4	2007
77	KB 103	2	1	+	a-4	2007
78	KB 104	NT	2	−	c-53	2007
79	KB 105	113	2	−	c-54	2007
80	KB 106	NT	2	−	c-54	2007
81	KB 107	26	1	+	c-55	2007
82	KB 108	26	1	+	g-2	2007
83	KB 109	26	1	+	g-3	2007
84	KB 110	26	1	+	g-3	2007
85	KB 111	103	1	+	g-4	2007
86	KB 112	8	1&2	−	g-4	2007
87	KB 113	15	2	+	g-4	2007
88	KB 114	8	2	−	g-4	2007
89	KB 115	116	2	−	i-1	2007
90	KB 116	22	2	−	i-1	2007
91	KB 117	153	2	−	i-2	2007
92	KB 118	163	2	−	i-3	2007
93	KB 119	117	2	−	i-4	2007
94	KB 120	113	2	−	i-4	2007
95	KB 121	117	2	−	i-4	2007
96	KB 122	106	2	−	i-5	2007
97	KB 123	142	1&2	−	i-6	2007
98	KB 124	26	1	+	i-7	2007
99	KB 125	119	1	+	i-8	2007
100	KB 126	8	1&2	−	n-10	2006

表5 続き

通番	菌株名	O群血清型	志賀毒素型	*eae* 保有	由来県-農場	分離年
101	KB 127	8	1&2	−	n-11	2007
102	KB 128	8	1&2	−	n-11	2007
103	KB 129	6	1&2	−	n-12	2007
104	KB 130	153	1&2	−	n-12	2007
105	KB 131	113	1&2	−	n-12	2007
106	KB 132	153	1&2	−	t-2	2007
107	KB 133	153	1&2	−	t-2	2007
108	KB 134	153	1&2	−	t-3	2007
109	KB 135	8	1&2	−	t-4	2007
110	KB 136	113	1&2	−	ai-2	2007
111	KB 137	26	1	+	ai-3	2007
112	KB 138	163	2	−	ai-5	2007
113	KB 139	15	1&2	−	ai-5	2007
114	KB 140	103	1	+	ai-5	2007
115	KB 141	113	2	−	n-13	2007
116	KB 142	84	1	+	n-14	2007
117	KB 143	142	1&2	−	n-15	2007
118	KB 144	153	1&2	−	c-56	2007
119	KB 145	116	1&2	−	c-56	2007
120	KB 146	116	1&2	−	c-56	2007
121	KB 147	116	1&2	−	c-56	2007
122	KB 148	NT	1&2	−	c-57	2007
123	KB 149	132	2	−	c-58	2007
124	KB 150	2	2	−	y-1	2007
125	KB 151	26	1	+	y-1	2007
126	KB 152	2	2	−	y-1	2007
127	KB 153	2	2	−	y-1	2007
128	KB 154	153	1&2	−	y-2	2007
129	KB 155	8	1	−	y-2	2007
130	KB 156	136	1	−	s-2	2007
131	KB 157	1	1	−	s-2	2007
132	KB 158	168	1&2	−	s-3	2007
133	KB 159	136	1	−	s-4	2007
134	KB 160	136	1	−	s-4	2007
135	KB 161	2	1	−	s-4	2007
136	KB 162	103	1	+	s-4	2007
137	KB 163	103	1	+	s-4	2007
138	KB 164	103	1	+	s-4	2007
139	KB 165	2	2	−	s-5	2007
140	KB 166	153	1&2	−	f-1	2007
141	KB 167	153	1&2	−	f-1	2007
142	KB 168	153	1&2	−	f-1	2007
143	KB 169	153	1&2	−	f-1	2007
144	KB 170	174	1&2	−	f-3	2007
145	KB 171	156	1	+	f-3	2007
146	KB 172	117	1&2	−	f-5	2007
147	KB 173	2	2	−	f-5	2007
148	KB 174	153	1&2	−	f-9	2007
149	KB 175	8	1&2	−	si-1	2007
150	KB 176	8	1&2	−	si-1	2007
151	KB 177	2	2	−	si-1	2007
152	KB 178	8	1&2	−	si-1	2007
153	KB 179	26	1	+	si-2	2007
154	KB 180	6	1&2	−	si-4	2007
155	KB 181	6	1&2	−	si-4	2007
156	KB 182	1	1	−	s-6	2007
157	KB 183	117	1&2	−	s-6	2007
158	KB 184	117	1	−	s-6	2007
159	KB 185	117	1	−	s-6	2007
160	KB 186	8	1&2	−	s-7	2007
161	KB 187	8	1&2	−	s-7	2007
162	KB 188	91	1&2	−	f-13	2008
163	KB 189	NT	2	−	f-13	2008
164	KB 190	13	1	−	f-15	2008
165	KB 191	2	2	−	f-17	2008
166	KB 192	15	1&2	−	f-26	2008
167	KB 193	163	2	−	f-26	2008
168	KB 194	150	1&2	−	f-29	2008
169	KB 195	55	1	−	f-29	2008
170	KB 196	151	2	−	f-29	2008
171	KB 197	2	2	−	f-30	2008
172	KB 198	2	2	−	f-30	2008
173	KB 199	153	1&2	−	f-30	2008
174	KB 200	153	1&2	−	f-30	2008
175	KB 201	163	2	−	f-33	2008
176	KB 202	8	1&2	−	f-33	2008
177	KB 203	163	2	−	f-33	2008
178	KB 204	1	2	−	f-33	2008
179	KB 205	8	1&2	−	f-33	2008
180	KB 206	8	1	−	f-39	2008
181	KB 207	8	1&2	−	f-39	2008
182	KB 208	163	2	−	f-40	2008
183	KB 209	2	2	−	f-43	2008
184	KB 210	116	1&2	−	f-43	2008
185	KB 211	20	1&2	−	f-43	2008
186	KB 212	130	1&2	−	f-45	2008
187	KB 213	140	1	−	f-49	2008
188	KB 214	113	1&2	−	f-50	2008
189	KB 215	163	2	−	f-50	2008
190	KB 216	117	1&2	−	f-55	2008
191	KB 217	55	1	−	f-56	2008
192	KB 218	113	1&2	−	o-4	2008
193	KB 219	163	1&2	−	o-5	2008
194	KB 220	130	1&2	−	o-7	2008
195	KB 221	163	2	−	o-7	2008
196	KB 222	28	1&2	−	o-8	2008
197	KB 223	17	1	−	o-8	2008
198	KB 224	116	1&2	−	o-10	2008
199	KB 225	2	1	−	o-10	2008
200	KB 226	28	1	−	o-10	2008

表5 続き

通番	菌株名	O群血清型	志賀毒素型	*eae* 保有	由来県−農場	分離年
201	KB 227	2	1	−	o−11	2008
202	KB 228	125	1&2	+	o−12	2008
203	KB 229	153	1&2	−	o−13	2008
204	KB 230	7	1	+	o−14	2008
205	KB 231	2	2	−	o−14	2008
206	KB 232	84	1	+	o−14	2008
O157−1	KB70	157	2	+		1998
O157−2	KB71	157	2	+		1998
O157−3	KB72	157	2	+		1998
O157−4	KB73	157	2	+		1998
O157−5	KB74	157	2	+		1998
O157−6	KB75	157	2	+		1998
O157−7	KB76	157	2	+		1998
O157−8	KB77	157	1&2	+		1998
O157−9	KB78	157	1&2	+		1998
O157−10	KB79	157	1&2	+		1998
O157−11	KB80	157	1&2	+		1998
O157−12	KB81	157	1&2	+		1998
O157−13	KB82	157	1&2	+		1998
O157−14	KB83	157	2	+		1998
O157−15	KB84	157	1&2	+		1998
O157−16	KB85	157	2	+		1998
O157−17	KB86	157	1&2	+		1998
O157−18	KB87	157	2	+		1998
O157−19	KB88	157	2	+		1998
O157−20	KB89	157	2	+		1998
O157−21	KB90	157	1	+		1998
O157−22	KB91	157	2	+		1998
O157−23	KB92	157	1&2	+		1998
O157−24	KB93	157	1&2	+		1998
O157−25	KB94	157	1&2	+		1998
O157−26	KB95	157	2	−		1998

*O群血清型「NT」は既知血清型に型別されないもの、あるいは型別不能株を表す。

**由来県名はアルファベット1～2文字で、農場名は数字で表した。

表 6 2007 年分離乳牛由来 STEC 薬剤耐性株(n=28)の耐性薬剤パターン

	耐性薬剤パターン[a)]	菌株数	O群血清型
4剤耐性	ABPC・KM・DSM・OTC	7	O2 (2)[b)], O15, O26, O103, O117, O153
3剤耐性	ABPC・DSM・OTC	1	O8
	ABPC・OTC	1	O8
2剤耐性	KM・DSM	1	ONT[c)]
	DSM・OTC	10	O2 (3), O20, O124 (2), O151, O168, O174, ONT
	OTC・CP	1	O8
単剤耐性	ABPC	2	O26, O132
	DSM	5	O1, O117 (4)

a) ABPC: アンピシリン, KM: カナマイシン, DSM: 硫酸ストレプトマイシン, OTC: オキシテトラサイクリン, CP: クロラムフェニコール

b) 括弧内数字は菌株数を表す.括弧内数がないのは1株を示す

c) 不明O群血清型

（2）本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は添付すること）

Saitoh T, Iyoda S, Yamamoto S, Lu Y, Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190: 4822-4830, 2008.

伊豫田淳、寺嶋淳、泉谷秀昌、渡邉治雄. 「日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現況と分離株の性状」. 獣医畜産新報, 62: 801-806, 2009.

Kobayashi, H., Kanazaki, M., Ogawa, T., Iyoda, S., Hara-Kudo, Y. Changing prevalence of O-serogroups and antimicrobial susceptibility among STEC strains isolated from healthy dairy cows over a decade in Japan between 1998 and 2007. J. Vet. Med. Sci. 71: 363-366, 2009.

（3）特許及び特許出願の数と概要

なし

（4）その他（各種受賞、プレリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

３．今後の問題点等

乳牛における STEC の保有状況や保有する STEC 株の特性についてほぼ解明することができたが、肉牛のそれは未解明部分が多い。特に肉牛は病原性大腸菌の食肉汚染源として最もリスクの高い家畜と考えられ、肉牛を対象とした病原性大腸菌のスクリーニングならびに分離株の性状解明について人由来病原性大腸菌株と比較解析することが極めて重要である。しかしながら、農場等の現場では家畜の生産性に大きなダメージをあたえることのない病原性大腸菌の調査に極めて消極的である。また別目的で収集された検査材料の利用はコンプライアンスや個人情報保護などの観点から目的外の使用はできない。一方、食肉検査所での採材は、交差汚染防止の観点から直腸肛門部は厳重に結紮され、また腸管を傷つけることは厳禁とされている。このように肉牛からの糞便サンプリングは極めて困難な状況にある。

また、本研究で用いた牛由来の腸管出血性大腸菌 O157:H7 分離株数は多いとはいえないため、牛における腸管出血性大腸菌株のどの程度の割合を本研究でカバーしているか現時点では不明である。今後、出来るだけ多くの牛由来株について clade 解析を行い、clade 8 が含まれるかどうか解析することが必要である。O157 以外の血清群の牛由来株についても同様な解析が必要と考えられるが、現時点で多数の遺伝子における一塩基変異に基づく DNA 型別法が確立されていない。次世代シークエンサー等を活用した塩基配列情報の蓄積から、SNPs 解析法を確立して系統学的な解析を行った後、患者情報と各菌株の病原性の解析から、高病原性株の存在を明らかにする必要がある。腸管出血性大腸菌の病原性について実験室内での評価する手法について、少なくとも LEE およびエンテロヘモリシン活性の測定によって一部可能であることが明らかとなったが、今後さらに clade 8 株に特異的な病原性の指標について解析する必要がある。すでに clade 8 のゲノム配列は明らかになっていることから、これまでの研究成果とゲノム情報をベースにした in silico における解析も必要であろう。

さらに、焼肉調理に関連する状況において牛肉および牛内臓肉での菌の挙動について解析したが、限られた条件での検討であった。想定した状況は低温保存中、焼肉調味料中、家庭でのホットプレートでの焼肉調理、飲食店での直火での焼肉調理、調理後肉の二次汚染が対象であったが、焼肉調理実験では検体および焼成器具の特徴から加熱を均一に行うことが難しく同一条件でも測定値の幅が大きい場合が多かった。このため、さらに詳細な条件設定を行い、同一条件下での測定値の幅が大きくならない実験が必要と考えられる。現実の焼肉調理はさまざまな条件下で行われているが、適切な加熱が行える条件が示せることも食中毒防止につながるため、実験的に得られた詳細な条件が加熱の指標として役立つと思われる。