

氏名(本籍)	増田高志(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第91号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	腸管出血性大腸菌O-157:H7(一)の疫学的解析に関する基礎的研究
論文審査委員	(主査) 光崎研一 (副査) 福安嗣昭 木内明男 金内長司(本学名誉教授)

## 論文内容の要旨

腸管出血性大腸菌O157:H7(一)(以下、EHEC O157)は、1977年にKonowalchukらによりその存在が明らかにされ、1982年に米国の同一チェーン店のレストランで販売されたハンバーガーを原因食品として発生した集団下痢症の起因菌として世界的に注目されるようになった。

わが国でも、1996年に本菌による集団食中毒事件が全国的に多発し、現在では、本感染症は全世界的に重大な問題となっている。

本感染症の原因食品として、諸外国では牛肉類、生乳、生野菜など、わが国ではカイワレ大根、おほかさサラダ、ポテトサラダといった野菜類が報告されている。近年、牛ステーキやたたきによる集団的散発事例(diffuse outbreak)もあり、感染源として牛の関わりが強く示唆されている。しかし、わが国では原因菌が分離されず原因食品や感染源が特定されない事件が多く、食肉、野菜などからの原因菌の確実な分離法の確立が望まれている。また、ヒトや牛から分離されたEHEC O157について疫学的解析を行うことはその発生防止対策の上で重要でありファージ型別については、わが国ではあまり実施されていない。

そこで、本研究では、1.ヒトおよび牛由来EHEC O157の疫学マーカーの検討、2.物理的条件下におけるEHEC O157の増殖性の検討、3.食品からのEHEC O157分離法の検討、4.野菜からの凍結損傷EHEC O157分離法の検討、5.食品および環境水などのEHEC O157の汚染状況調査を行った。

### 1. ヒトおよび牛由来EHEC O157の疫学マーカーの検討

細菌の疫学マーカーは感染症や食中毒の感染源を追求するのに不可欠な検査であり微生物の表現型(フェノタイプ)のマーカーとして、生物型、血清型、ファージ型、薬剤感受性などが用いられてきた。

静岡県の人由来株の血清型は、87.6%がO157:H7、VT型は61.2%がVT1,2であったのに対して、牛由来株の血清型は95.2%がO157:H7、VT型は58.1%がVT2であり、両由来株間で産生する主なVT型が異なった。また、薬剤感受性では、ヒトおよび牛由来株ともにストレプトマイシン、テトラサイクリン耐性化が進んでいることが注目され、アンピシリン、ナリジクス酸、カナマイシン、クロラムフェニコールの耐性株がみられたことや少数ではあるが5剤耐性を示した株があった。これらの成績から血清型別、VT型別、薬剤感受性は疫学マーカーとして有用であるが、分離株間の識別力が乏しく疫学的解析には不十分であった。

そこで、ヒトおよび牛由来株のファージ型について試験した。その結果、ヒト由来株では2、32、4、21型、牛由来株では34、54、39、14、23型が多く分離され、両由来株の主要なファージ型は異なっていた。しかし、8、14、21、32、34、54型などがヒトおよび牛由来株に共通して比較的多く分離されていることからこれらが牛からヒトへの主な感染型と推察された。今回試験したヒトおよび牛由来のファージ型は、過去の内外の報告とほぼ一致していたが、ヒトのみあるいは牛のみにみられるものがあり、両由来株のファージ型に若干の差がみられ、ヒトへの感染源は牛のみでなく他の要因の関与も考えられた。また、特定のファージ型とVT産生に関連性があるものが存在した。さらに、同じ集団感染例や家族内感染例からの分離株はすべて同じファージ型であった。

以上のことから、ファージ型別は分離株間の識別が可能で疫学マーカーとして有用であることが示唆された。

## 2. 物理的条件下におけるEHEC O157の増殖性の検討

食中毒の予防対策の上で、各種物理的条件による食品中のEHEC O157の増殖性を把握し、これらを活用することにより微生物制御することが可能と考え、培地のpH、塩分濃度および培養温度といった物理的条件の違いによってEHEC O157の増殖性に差があるのか基礎的な検討を行った。

今回の成績から、pH4.0以下の酸性食品やpH10.5以上のアルカリ性の状態ではEHEC O157の増殖は阻害されるため、有機酸などを食品に添加して、食品の特性を失わない程度にpHを調整することは有効な食品の保存法であり、これにより食品の安全性が確保できるものと考えられた。また、EHEC O157は海水中でも充分生存できることが判明し、イクラのみならず他の海産物も食中毒の原因食品になり得る可能性が示唆された。さらに、食品衛生法におけるEC培地を用いた大腸菌検査では、培養温度は44.5℃と規定されているが、この温度ではEHEC O157は増殖が抑制されるため、増殖に適した培養温度とは言えない。現在、食品からのEHEC O157検査における増菌法として、 $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で培養する方法が一般的であり、この温度は他の細菌の増殖をある程度抑制することから適当な方法と考えられた。

## 3. 食品からのEHEC O157分離法の検討

食中毒事件の推定原因食品（牛挽肉およびカイワレ大根）からのEHEC O157分離法における直接法

と免疫磁気分離法（IMS法）、分離培地、増菌培地による分離の比較およびイムノキットの比較について検討した。

その結果、IMS法は直接法より分離感度において優れており、EHEC O157の分離に有効な方法であった。特に、カイワレ大根において直接法で分離できなかった検体がIMS法により分離できた。ただし、IMS法は高感度な方法であるため検体間の菌混入や誤った操作により間違った結果となる可能性があることから多検体を一度に扱う場合などは十分な注意が必要であった。

分離培地の検討では、セフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）は添加されているCTにより強い選択性がみられ、釣菌しやすいことから全体的に高い分離率を示した。また、クロモアガーO157（CHR）やBCM O157（BCM）などの酵素基質培地もCT-SMACとほぼ同等の分離感度であり、今回の実験において、酵素基質培地のみで分離された検体もあったことからCT-SMACと酵素基質培地を併用することにより分離率を上げることが可能と考えられた。

増菌培養地の検討では、トリプトソイブロスのように抑制力のない栄養豊かな培地では様々な菌が増殖して、目的とするEHEC O157の発育が抑制されるため、ノボビオシン加mEC培地による培養法が優れていた。しかし、検査する食品の条件（汚染菌量、食品由来成分など）によって必ずしも有効とは言えない場合もあり、今後、二次増菌の導入や他の増菌法との併用などを考慮する必要がある。

イムノキットについては一部の検体で偽陽性が出現する場合があります。迅速で簡便なスクリーニング法としては有効であるが、イムノキットのみでEHEC O157をスクリーニングすることは不相当であると考えられた。

#### 4. 野菜からの凍結損傷EHEC O157分離法の検討

現在、多くの食品は冷凍状態で流通するケースが多く、食品管理マニュアルでは検食は-20℃で2週間保管することが義務付けられている。したがって、食品中で凍結されることによる損傷を受け、発育し難い状態になっている。また、凍結損傷したEHEC O157分離法について十分な検討がされていない。

そこで、わが国における集団食中毒事件の主な原因食品である野菜類から効率的な凍結損傷EHEC O157の分離法の検討を行ったところ、ノボビオシンと胆汁酸を除いたmEC培地で25℃2時間培養後、これにノボビオシンと胆汁酸を加えて42℃18時間培養し、さらに、IMS法処理をしてCT-SMACに塗抹する方法が最も良いと考えられた。また、EHEC O157はCHR、BCMなどの酵素基質培地上では特徴のある色彩の集落を形成することから、2種類以上の分離培地を併用することにより分離率が上がると考えられた。

#### 5. 食品、環境水などのEHEC O157の汚染状況調査

食中毒事件の原因食品として報告のあった食品についてEHEC O157汚染状況を調査した。1996年から2000年の間に、静岡県内で販売されている食肉類333検体、野菜類191検体、その他の食品22検体お

よび環境水など149検体の計695検体についてEHEC O157検査を行ったが、EHEC O157はすべての検体から分離されなかった。

このことから県内に流通する食品や環境におけるEHEC O157汚染は低率であると考えられた。しかし、食品の汚染菌量が少ない場合には、食品からの菌分離が困難であることは、食中毒事例においてその感染源や原因食品がなかなか解明されないことが示しており、迅速かつ確実に菌分離できる検査法の確立が望まれた。

以上の調査・検討の結果、ヒトおよび牛由来EHEC O157のファージ型別に関して新しい知見が得られるとともに、ファージ型別は今回実施した他の疫学マーカーと比べて分離株間の識別が可能であり、わが国ではあまり行われていないが簡便で有用な方法であることが判明した。また、食品（食肉、野菜）からの凍結損傷菌を含むEHEC O157の分離法には、mEC培地など抑制力の弱い培地で前増菌（25℃2時間）を行って菌を回復させた後に、ノボピオシンなどの抑制剤を添加して42℃18時間培養し、免疫磁気分離法で集菌してからセフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）と酵素基質培地に塗抹する方法が有効な分離法であった。さらに、様々な物理的条件下での増殖性を知り、これを活用することにより食品でのEHEC O157制御の可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

腸管出血性大腸菌O157:H7（-）（以下、EHEC O157）感染症は、現在ではわが国のみならず全世界的に重大な問題となっている。

本感染症の原因食品として、諸外国では牛肉類、生乳、生野菜など、わが国ではカイワレ大根、おなかサラダ、ポテトサラダといった野菜類が報告されている。また、近年、牛ステーキやたたきによる集団的散発事例の発生もあり、感染源として牛の関わりが強く示唆されている。しかし、わが国では、原因菌が分離されず原因食品や感染源が特定されない事例が多く、食肉、野菜などからの原因菌の確実な分離法の確立が望まれている。また、ヒトや牛の分離株について細菌の疫学マーカーを用いた疫学的解析を行うことは発生防止対策上で重要であり、ファージ型別は、わが国ではあまり実施されていないが、カナダ、英国などでは菌株の由来を特定する有用で簡便な方法として広く用いられている。

そこで、本研究では、1.ヒトおよび牛由来EHEC O157の疫学マーカーの検討、2.物理的条件下におけるEHEC O157の増殖性の検討、3.食品からのEHEC O157分離法の検討、4.野菜からの凍結損傷EHEC O157分離法の検討、5.食品および環境水などからのEHEC O157の汚染状況調査を行った。

### 1. ヒトおよび牛由来EHEC O157の疫学マーカーの検討

細菌の疫学マーカーは感染症や食中毒の感染源を追求に不可欠な検査であり微生物の表現型（フェノタイプ）のマーカーとして、生物型、血清型、ファージ型、薬剤感受性などが用いられている。

静岡県のヒト由来株の血清型はO157:H7、VT型はVT1,2産生、全国の牛由来株の血清型はO157:H7、VT型はVT2産生が主であり、両由来株間で産生する主なVT型が異なった。また、薬剤感受性では、ヒトおよび牛由来株ともにストレプトマイシン、テトラサイクリン耐性化が進んでいることが注目され、アンピシリン、ナリジクス酸、カナマイシン、クロラムフェニコールの一部耐性株がみられたことや少ないが5剤耐性を示した株があった。これらの成績から血清型別、VT型別、薬剤感受性は疫学マーカーとして有用であるが、分離株間の識別力が乏しく疫学的解析には不十分であった。

そこで、本研究ではヒトおよび牛由来株のファージ型別について検討した。

その結果、ヒト由来株では2、32、4、21型、牛由来株では34、54、39、14、23型が多く分離され、両由来株の主要なファージ型は異なっていた。しかし、8、14、21、32、34、54型などがヒトおよび牛由来株に共通して比較的多く分離されていることからこれらが牛からヒトへの主な感染型と推察された。

今回検討したヒトおよび牛由来のファージ型は、過去の内外の報告とほぼ一致していたが、ヒトのみあるいは牛のみにみられるものがあり、両由来株のファージ型に若干の差がみられ、ヒトへの感染源は牛のみではなく他の要因の関与も考えられた。また、特定のファージ型とVT産生に関連性があるものが存在した。さらに、同じ集団感染例や家族内感染例からの分離株はすべて同じファージ型であった。以上のことから、ファージ型別は分離株間の識別が可能で疫学マーカーとして有用であった。

## 2. 物理的条件下におけるEHEC O157の増殖性の検討

食中毒の予防対策の上で、各種物理的条件による食品中のEHEC O157の増殖性を把握し、これらを活用することにより微生物制御することが可能と考え、培地のpH、塩分濃度および培養温度といった物理的条件の違いによってEHEC O157の増殖性に差があるのか基礎的な検討を行った。

今回の成績から、pH4.0以下の酸性やpH10.5以上のアルカリ性の状態ではEHEC O157の増殖は阻害されるため、有機酸などを食品に添加して、食品の特性を失わない程度にpHを調整することは有効な食品の保存法であり、これにより食品の安全性が確保できるものと考えられた。また、EHEC O157は海水中でも十分生存できることが判明し、イクラのみならず他の海産物も食中毒の原因食品になり得る可能性が示唆された。さらに、食品衛生法におけるEC培地を用いた大腸菌検査では、培養温度は44.5℃と規定されているが、この温度ではEHEC O157は増殖が抑制されるため、増殖に適した培養温度とは言えない。現在、食品からのEHEC O157検査における増菌法として、 $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で培養する方法が一般的であり、この温度は他の細菌の増殖をある程度抑制させることから最も適当な方法と考えられた。様々な物理的条件下での増殖性を知り、これらを活用することにより食品でのEHEC O157制御の可能性が示唆された。

## 3. 食品からのEHEC O157分離法の検討

食中毒事件の推定原因食品（牛挽肉およびカイワレ大根）からのEHEC O157分離法における直接法

と免疫磁気分離法（IMS法）、分離培地、増菌培地による分離の比較およびイムノキットの比較について検討した。

その結果、IMS法は直接法より分離感度において優れており、EHEC O157の分離に有効な方法と考えられた。特に、カイワレ大根において直接法で分離できなかった検体がIMS法により分離できた。ただしIMS法は高感度な方法であるため検体間の菌混入や誤った操作により間違った結果となる可能性があることから多検体を一度に扱う場合などは十分な注意が必要である。

分離培地の検討では、セフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）は添加されているCTにより強い選択性がみられ、釣菌しやすいことから全体的に高い分離率を示した。また、クロモアガーO157（CHR）やBCM O157（BCM）などの酵素基質培地もCT-SMACとほぼ同等の分離率であり、今回の実験において、酵素基質培地のみで分離された検体もあったことからCT-SMACと酵素基質培地を併用することにより分離率が上がると考えられた。

増菌培養地の検討では、トリプトソイブロスのように抑制力のない栄養豊かな培地では様々な菌が増殖して、目的とするEHEC O157の発育が抑制されてしまうため、ノボビオシン加mEC培地による培養法が優れていた。しかし、検査する食品の条件（汚染菌量、食品由来成分など）によって必ずしも有効でない場合もある。したがって、今後、二次増菌の導入や他の増菌法との併用などを考慮する必要があった。

イムノキットについては一部の検体で偽陽性が出現することがあり、迅速で簡便なスクリーニング法としては有効であるが、イムノキットのみでEHEC O157をスクリーニングすることは不適當であった。

#### 4. 野菜からの凍結損傷EHEC O157分離法の検討

現在、多くの食品は冷凍状態で流通するケースが多く、食品管理マニュアルでは検食は-20℃で2週間保管することが義務付けられている。したがって、食品中のEHEL O157は凍結されることによる損傷を受け、発育し難い状況になっているEHEC O157に対する分離法について十分な検討することは重要である。

そこで、わが国における集団食中毒事件の主な原因食品である野菜類から効率的な凍結損傷EHEC O157の分離法の検討を行ったところ、ノボビオシンと胆汁酸を除いたmEC培地で25℃2時間培養後、これにノボビオシンと胆汁酸を加えて42℃18時間培養し、さらに、IMS法処理をしてCT-SMACに塗抹する方法が最も良いと考えられた。また、EHEC O157はCHR、BCMなどの酵素基質培地上では特徴のある色彩の集落を形成することから、2種類以上の分離培地を併用することにより分離率が上がると考えられた。

#### 5. 食品、環境水などからのEHEC O157の汚染状況調査

食中毒事件の原因食品として報告のあった食品についてEHEC O157汚染状況を調査した。1996年か

ら2000年の間に、静岡県内に流通し販売されている食肉類333検体、野菜類191検体、その他の食品22検体および環境水など149検体の計695検体についてEHEC O157検査を行ったが、EHEC O157はすべての検体から分離されなかった。

このことから静岡県に流通する食品や環境におけるEHEC O157汚染は低率であると考えられる。しかし、食品の汚染菌量が少ない場合には、食品からの菌分離が困難であることは、食中毒事例においてその感染源や原因食品がなかなか解明されないことが示しており、迅速かつ確実に菌分離できる検査法の確立が望まれる。

これまでわが国では疫学的解析にあまり行われていないファージ型別は他の表現型の疫学マーカーと比べて分離株間の識別が可能であり、簡便で有用な方法であることを明らかにした。また、食品から凍結損傷菌を含むEHEC O157の分離法には、mEC培地など抑制力の弱い培地で前増菌（25℃2時間）を行って菌を回復させた後に、ノボジオシンなどの抑制剤などを加えて42℃18時間培養し、免疫磁気分離法で処理してからセフィキシム亜テルル酸カリウム加ソルビトールマッコンキー培地（CT-SMAC）と酵素基質培地に塗抹する方法が有効な分離法であることを提唱したものである。このように本研究は、獣医公衆衛生学分野における重要な学術的知見、特に疫学上意義ある業績として博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものと判定した。