

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成20年度博士課程 入学

氏名 李謙一

指導教員名 局博一

論文題目: 志賀毒素産生性大腸菌 O157 のストレス抵抗性および遺伝子型
に関する研究

志賀毒素産生性大腸菌血清群 O157 (STEC O157) は、重篤な感染症を起こし、日本における感染症報告数も多いことから公衆衛生上重要な食中毒起因菌のひとつである。STEC O157 の主な宿主はウシなどの反芻類であるが、感染動物によって汚染されたチーズや青果類を原因とする食中毒も多く報告されている。これらの食品中では、酸、低温、高浸透圧などの STEC O157 に対するストレスが大きい。そのため、同菌のストレス抵抗性がヒトの疾病発生に重要な役割を果たしていると考えられる。細菌のストレス抵抗性には、食品中のカビなどの微生物による作用や細菌の遺伝子型による差異が関与すると考えられるが、STEC O157 においてこの点は不明である。本研究では、チーズや青果類などの食品における STEC O157 のストレス抵抗性に関わる要因を究明するために、STEC O157 のストレス抵抗性におよぼすカビの影響および STEC O157 の遺伝子型によるストレス抵抗性の相違に関して、一連の研究を行なった。

第一章では、チーズや青果類に広く認められるカビに着目し、カビ熟成型チーズの代表的なカビスターターである *Penicillium camemberti* および *Penicillium*

roqueforti が STEC O157 に与える影響を 2 つのモデル系を用いて究明した。モデル 1 では、STEC O157 を酸性とした *P. camemberti* または *P. roqueforti* の培養ろ液に接種し、25°C 下での挙動を調べた。この結果、pH 4.8 から 5.0 のカビの培養ろ液中では、STEC O157 の誘導時間が対照と比べて有意に短縮した。次に、カビの培養ろ液で認められた STEC O157 の増殖促進作用をチーズの製造モデル系でも検討するために、*P. camemberti* と STEC O157 を酸性とした牛乳中で共培養した。STEC O157 菌数はカビの存在下では増加し 10^8 CFU/ml まで達したが、単独培養時には減少した。カビによる STEC O157 の増殖促進作用は、培養液中の pH を一定に保持した条件下でも認められたため、pH 非依存性の機序の存在が考えられた。モデル 2 では、STEC O157 を接種した pH 4.5 のカビの培養ろ液を 10°C で保持し、STEC O157 の生残性を調べた。この結果、カビの培養ろ液中では、STEC O157 の損傷菌割合が対照と比べて減少すること、また、死滅速度の指標である *D* 値が増大することが認められた。カビの培養ろ液の熱処理やカビ培養条件の影響を検討した結果から、STEC O157 の増殖に対する促進作用には、酸性下でカビによって産生される耐熱性の物質が関与するものと考えられた。以上から、チーズのカビスターターは酸性ストレス下での STEC O157 の増殖や生残を促進することが明らかにされた。

第二章では、STEC O157 の挙動にカビの菌糸が与える影響を究明するために、まず、発酵食品のカビスターター 4 菌種または一般的な食品汚染カビ 7 菌種と運動性または非運動性 STEC O157 との共培養を平板培地上で行なった。カビコロニー上での STEC O157 の移動距離を測定したところ、カビの菌種によって STEC O157 の移動距離が異なり、特に運動性 STEC O157 の移動距離が長いことが認められた。また、カビコロニー上での STEC O157 菌数の変化を測定したところ、11 菌種のカビのうち 9 菌種のコロニー上で STEC O157 の増殖がみられた。一方、*Emericella nidulans* および *Aspergillus ochraceus* 上では、STEC O157 菌数は接種菌数から有意に減少していた。さらに、緑色蛍光タンパクを発現する STEC O157 とカビとの共培養を行ない、共焦点走査型レーザー顕微鏡下でカビの菌糸上での STEC O157 の局在を観察した結果、STEC O157 は主にカビの菌糸上および菌糸間に形成された水膜中に存在することが明らかとなった。特に、コロニー上で STEC O157 の大きな移動がみられた *Rhizopus* sp.、*Geotrichum candidum*、*Alternaria alternata* および *Collectotrichum* sp. のコロニー上では広範囲に厚い水膜層の形成がみられた。このことから、菌糸上および菌糸間での水膜形成が、カビのコロニー上での STEC O157 の移動距離の決定因子として重要であることが示唆された。また、カビのコロニー上で共培養後の STEC O157 の変化を酸抵抗性試験によって調

べた。すなわち、STEC O157 を平板培地上に発育させたカビのコロニー上で7日間共培養した後に回収し、塩酸で pH 2.5 とした培地中での *D* 値を求めた。その結果、供試した6菌種のカビのうち、カビスターターである *P.camemberti* など4菌種のカビとの共培養後の STEC O157 は、平板培地上で単独培養した場合と比べて、高い酸抵抗性を示した。以上から、食品上でのカビの菌糸は、STEC O157 の汚染を物理的に広げるとともに、同菌のストレスへの抵抗性を高めることが明らかにされた。

第三章では、STEC O157 におけるストレス抵抗性と遺伝子型との関連性を解析することで、ストレス抵抗性とヒトの疾病との関連性を究明した。まず、ヒトの疾病と有意に相関する STEC O157 の遺伝子型を特定するために、ヒトおよびウシから分離された144株の STEC O157 について、5種類の病原因子 (*stx1*、*stx2*、*stx2c*、*eae* および *ehxA*) の保有率調査および lineage-specific polymorphism assay with 6 markers (LSPA6) 型別を行い、その結果に基づいてロジスティック回帰分析および集団遺伝学解析などを行なった。STEC O157 の遺伝子型の比較によって、ヒト由来株では、ウシ由来株と比べて *stx1*・*stx2* の両遺伝子保有 (*stx1*・*stx2* 保有) 株および LSPA6-lineage I (LI) 株の頻度が有意に高く、*stx2c* 単独保有株、*stx1*・*stx2c* 保有株および LSPA6-lineage II (LII) 株の頻度が有意に低いことが判明した。ロジスティック回帰分析によって、用いた遺伝子型のうち *stx2* の保有が特にヒト由来株と関連していることが示唆された。集団遺伝学解析によって、ウシ由来株はヒト由来株よりも遺伝的に高い多様性を有することが示唆された。さらに、STEC O157 は遺伝的に3つのクラスターに分けられ、ヒト由来株の多くは、*stx1*・*stx2* 保有の LI 株および *stx2* 単独保有または *stx2*・*stx2c* 保有の LSPA6 lineage I/II 株であることが示された。一方、ウシ由来株は、ヒト由来株で多い遺伝子型の株および *stx2c* 単独保有または *stx2*・*stx2c* 保有の LII 株から構成されることが明らかとなった。

次に、上記の遺伝子型解析で用いた STEC O157 の株から、全ての *stx* 型および LSPA6 lineage を含むように選んだ57株を用いて6種類のストレス抵抗性試験(酸、凍結融解、熱、高浸透圧、酸化および飢餓ストレス)を実施した。試験結果からストレス抵抗性の指標である死滅速度係数を算出し、遺伝子型間での多重比較、主成分分析およびクラスター分析を用いて *stx* 型および LSPA6-lineage との関連性を解析した。死滅速度係数の多重比較によって、*stx1*・*stx2* 保有株は、*stx1*・*stx2c* 保有株より高い熱抵抗性を、*stx2* 単独保有株および *stx2c* 単独保有株より高い飢餓ストレス抵抗性を有することが示唆された。また、LI 株は、LII 株より高い熱抵抗性および飢餓ストレス抵抗性を有することが示唆された。主成分分析に

よって、1 種のストレスに高い抵抗性を有する株は、他のストレスに対しても高い抵抗性を有することが示された。クラスター分析によって、供試した STEC O157 はストレス抵抗性のクラスター1、ストレス感受性のクラスター3 および中間型のクラスター2 に分けられることが示された。 *stx1*・*stx2* 保有株の全株はクラスター1 に分類され、 *stx1*・*stx2c* 保有株の 72.7 % (8/11 株) はクラスター3 に分類された。一方、LI の株の 77.8 % (14/18 株) はクラスター1 に分類され、LII の株の 64.7 % (11/17 株) はクラスター3 に分類された。以上の結果から、ヒトでの疾病に関連する *stx1*・*stx2* 保有株や LI の株は、他の遺伝子型の株よりも複数のストレスに対して、より高い抵抗性を有することが明らかとなった。

以上の一連の研究から、STEC O157 によるヒトの疾病発生には同菌のストレス抵抗性が重要な役割を果たすこと、すなわち、宿主であるウシが保有する STEC O157 のうち、ストレス抵抗性の高い一部の株がヒトの疾病に関与することが示唆された。STEC O157 は、チーズや青果類などの食品にみられるような STEC O157 にとってストレスの大きい環境中でも、ストレス抵抗性の遺伝子型の菌が生残り、さらに、カビスターターや食品に広く分布するカビは、STEC O157 に対するストレスを緩和する作用を発現する。その結果として、食中毒リスクを高めるものと考えられる。以上、本研究によって、チーズなどの食品上での STEC O157 の挙動を理解し、効果的に制御する上では、同菌の遺伝子型やカビによる作用を考慮する必要があることが判明した。