

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 謙一

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 血清群 O157 は、重篤な感染症を起こし、日本における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一つである。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。本研究ではチーズや青果類における STEC O157 の挙動に関わる因子を解明するために、本菌のストレス抵抗性、遺伝子型および微生物間作用との関連性についての一連の研究を行なったものである。

第一章では、チーズや青果類において重要な微生物であるカビに着目し、主に代謝物が STEC O157 に与える影響を検討した。このため、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* または *Penicillium roqueforti* が STEC O157 に与える影響を三つのモデル系を用いて評価した。モデル 1 では、8 株の STEC O157 を酸性条件の *P. camemberti* または *P. roqueforti* の培養ろ液に接種し、25°C での挙動を観察した。pH 4.8 から 5.0 の酸性環境および熱負荷に関する実験から、STEC O157 の増殖促進作用の原因物質は、酸性条件下で産生される耐熱性の物質であると考えられた。モデル 2 では、*P. camemberti* と STEC O157 を酸性の牛乳中で共培養した。STEC O157 生菌数はカビの存在下では 10^8 CFU/ml まで達したが、単独培養時には減少した。培養中の pH を一定に保った際にも、本菌の増殖促進作用は認められたため、pH 非依存性の機序の存在が示唆された。モデル 3 では、2 株の STEC O157 を pH 4.5 のカビ培養ろ液中で 10°C での生残性を観察した。この結果、カビ培養ろ液中では、いずれの STEC O157 の株も損傷菌率が低いことが認められた。これらの結果から、チーズのカビスターターは食品環境を変化させ、酸性下での STEC O157 の増殖や生残を促進させることが示された。

第二章においては、カビの菌糸が STEC O157 の挙動に及ぼす影響を評価した。発酵食品のカビスターター 4 菌種および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 との共培養を行なった。カビの菌種によって STEC O157 の移動距離が異なること、

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 菌種中 9 菌種のカビ上で STEC O157 の増殖がみられた。一方、*Emmericella nidulans* および *Aspergillus ochraceus* 上では、STEC O157 生菌数は接種菌数から有意に減少していた。緑色蛍光タンパクを発現させた株を作製し、カビとの共培養を行ない、共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、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観察された。これらの結果から、食品上でのカビの菌糸の存在は、STEC O157 の汚染を広げ、ストレスへの抵抗性を高める可能性があることが示唆された。

第三章においては、ストレス抵抗性とヒトの疾病発生との関連性を評価した。まずヒトおよびウシ由来 STEC O157 の遺伝子型の違いを、単変量および多変量解析を用いて明らかにした。続いて、遺伝子型解析の結果をもとに 6 種類のストレスへの抵抗性との関連性を検討した。5 種類の病原因子 (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *eae* および *ehxA*) および lineage-specific polymorphism assay with 6 markers (LSPA6) 型別の結果をもとに、重回帰分析および集団遺伝学解析を行ない、人の疾病と有意に相関する遺伝子型を特定した。重回帰分析の結果から、*stx2* の保有が特にヒト由来株とウシ由来株を区別する上で重要であることが示された。集団遺伝学解析の結果からは、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された。さらに、用いた STEC O157 は遺伝的に 3 つのクラスターに分けられることが示された。ヒト由来株の多くは、*stx1*・*stx2* を同時保有する LI の株および *stx2* 単独保有または *stx2*・*stx2c* を同時保有する LSPA6 lineage I/II の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に加えて、*stx2c* を単独保有または *stx2*・*stx2c* を同時保有する LII の株から構成されていた。

次いで、上記の STEC O157 の株のうち、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。その結果、ヒトでの疾病に関連する *stx1*・*stx2* 同時保有株や LI の株は、他の遺伝子型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示唆された。

以上の研究から、病原性の高い遺伝子型の STEC O157 は同時に高いストレス抵抗性を有することが明らかになった。また、カビは食品中の環境を変化させる結果として、STEC O157 へのストレスの緩和や、食品内での分布拡大を促進することが示唆された。

以上を要するに、本研究は、腸管出血性大腸菌症をもたらす O157 の食品中の増殖環境要因を解明するとともに、ウシおよびヒトとの間での O157 の遺伝的関連性を実証したものであり、学術上、応用上、資するところが大きい。よって、審査委員一同は、本研究論文が博士 (獣医学) を授与するにふさわしいものと認めた。