

氏 名(本籍) はたけ 島 やま 山 たかし 敬

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 博 第 7 6 5 号

学位授与年月日 平 成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 農学研究科応用生命科学専攻
(博士課程)

学位論文題目 環境中の食中毒菌の動態に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 神 尾 好 是
(副 査) 教 授 勝 亦 瞭 一
教 授 中 島 佑

論文内容要旨

環境中の食中毒菌の動態に関する研究

はじめに

細菌はヒトを取り巻く環境中に数多く存在しその種類も生活環も多様である。それらのうち食を介して人に起病性を示すものが食中毒菌とされ、食品衛生において最も重視すべき病原菌である。これらの菌は個々の性状については詳しく研究されていても、食中毒菌本来の生息域である家畜や環境中での動態を研究した報告は少なく、それぞれの菌の存在形態やその変化についてさらに研究する必要がある。

本博士論文では、食中毒原因であるブドウ球菌、腸管出血性大腸菌、セレウス菌、腸炎ピブリオの4種類の菌について、様々な観点から環境中におけるそれらの動態を解明することを目的とした。

第1章:家畜環境におけるブドウ球菌の薬剤耐性化

畜産・水産領域では疾病予防や発育効率のため、飼料添加等の方法で抗菌性薬剤の大量投与が行われているが、家畜への抗生剤等の継続的な使用に関する報告は少なく、特に環境常在細菌への影響を調査した報告はほとんどなされていなかった。そこで、私は家畜・家禽等に常在するブドウ球菌について、家畜領域で汎用されている薬剤の感受性を調べ、畜種環境の違いによる耐性菌の状況や傾向、さらには家畜用抗生剤耐性の株の人用薬剤に対する効果を比較研究した。

まず、牛・豚・鶏体表から分離した株について耐性化の状況を調査した。試験薬剤は家畜領域で汎用されている抗生物質5剤(OTC:オキシテトラサイクリン TS:タイロシン ABPC:アミノベンジルペニシリン CEZ:セファゾリン KM:カナマイシン)と合成抗菌剤2剤(TP:チアンフェニコール ERFX:エンロフロキサシン)を系統ごとに選び、さらにMRSAの選択に使用されるMPIPC(オキサシリン)、VCM(バンコマイシン)を加えた9剤を使用した。MICの測定はNCCLSの基準に沿って行い、各菌株の感受性の判定は、NCCLSの基準に従って実施し、定めのないものについては学術文献等を引用した。

Fig. 1-1に牛由来株の結果を示した。90%以上の株がTPに対して耐性を示し、OTC耐性率も30%となり、疾病予防で投薬される薬剤への耐性率が高い傾向がみられた。豚由来株でも牛と同様で、TPに対する耐性率はほぼ100%であったのに加え、OTC、ABPC、TSやキノロン系抗生剤であるERFXに対しても多くの耐性株が分離された(Fig. 1-2)。これは、牛では主に治療目的に使用されている薬剤が、豚では予防投薬として飼料に配合されていることが原因と考えられ

た。さらにブドウ球菌に対して感受性の高い鶏については、予防投薬に由来すると考えられる TP、TS、OTC、ABPC、ERFX に対する耐性株が高率で存在していた (Fig. 1-3)。一方、いずれの株からも医療現場で問題となるバンコマイシン耐性株は検出されなかった。

以上の結果より、家畜の種類により耐性を示す薬剤に相違があることが確認されたことから、畜種ごとの多剤耐性状況を検討した (Fig. 1-4)。予防投薬をほとんど行わない牛由来株では1剤耐性をもっとも多いのに対し予防投薬の多い豚では3剤耐性株、鶏では4剤耐性株が多数を占め、多剤耐性化していた。また、牛ではいずれの薬剤にも耐性を示さない株が 13.5%存在したが、これは、ほとんど耐性菌の検出されない牛舎が存在したためと考えられる。

そこで、同じ家畜でも農場ごとに使われている薬剤に違いがあることを想定し、出荷農場ごとに各薬剤の耐性株の検出割合を比較した。比較的古くから使用されている TP などの抗生剤には、ほぼすべての畜舎由来株で耐性を示した。その一方、比較的新しい抗生剤である ERFX では、家畜・家禽ともに感受性のばらつきが顕著に認められた (Fig.1-5)。農家への聞き取りの結果、個々の使用状況と一致していたことから、耐性菌の出現は抗生剤の継続的投与によって起こることが裏付けられた。

次に、家畜用抗生剤に対して高度に耐性を獲得した株がその環境で従事する人に及ぼす影響を考察するため、各家畜用薬剤に対する耐性株の同系統のヒト用薬剤に対する感受性を調査した (Table 1-1)。ペニシリン系抗生剤 3 剤に耐性を示した株では、第二世代セフェム系のセフォチアムに対して MIC $64 \mu\text{g}$ 以上を示す株が存在したほか、第三世代抗生剤であるセフォタキシムでも MIC $8 \mu\text{g}$ 以上の株が存在した。OTC 耐性株ではミノサイクリン中等度耐性株が 2 株認められた。また、すべての TP 耐性株はクロラムフェニコールに対し高度に耐性を示した。さらに、アミノグリコシド系の被検薬剤に対しては多くの株が MIC $1 \mu\text{g}$ 以下であったが、いずれの抗生剤に対しても耐性と思われる株が少なからず存在し、特にゲンタマイシンに対しては $64 \mu\text{g}$ 以上の高度耐性を示す株が認められた。さらにマクロライド系被検薬剤については $64 \mu\text{g}$ 以上の耐性を示す株が 14 株存在し、供試した 2/3 の株で TS と同等以上の高度耐性を示した。

本章で私は、

- ・ 家畜の種類に拘わらず菌が高頻度に耐性を示す家畜用抗生剤が存在すること。
- ・ 畜舎ごとに菌の感受性が大きく異なること。
- ・ 牛は 1 剤、豚は 3 剤、鶏は 4 剤耐性株が多いこと。
- ・ 同系の人用抗生剤に高度に耐性を示す株が見出されること。

を明らかにした。

耐性菌の出現と予防投薬には相関が見られることから、既に菌が耐性化している薬剤の使用中止と、効率のみを優先する現在の家畜の飼養形態を変えていく必要性を強く示唆する結果と

なった。ブドウ球菌の薬剤耐性は、プラスミドなどの mobile elements を介して他のブドウ球菌に伝達可能であることを考えると、家畜に使用された抗生剤による耐性菌が医療にとって脅威になる可能性が十分考えられる。私の研究を始め、生物生産現場における抗生剤乱用が様々な菌の耐性化に関与しているという事実が明らかになるにつれ危機感が高まった。2003年12月になって、ようやく農林水産省による食品安全委員会へ家畜の抗生剤投与のヒトに与える影響調査に拘わる諮問がなされた。

この成果の一部は原著論文(1)で発表し、さらに原著論文(2)でも発表予定である。

第2章:家畜の腸管出血性大腸菌(EHEC)保有と分離方法の開発

堺市で起きた O157 の大規模感染をはじめとして、食肉を原因とする腸管出血性大腸菌(以下、EHEC) O157、O26 血清型による事例、あるいは市販大腸菌免疫血清に凝集しない血清型に起因する事例が県内でも多く発生している。宮城県でも、私の調査から飼育牛が人感染症の直接の原因であると解明された事例が新聞等でも大きく報道された。EHEC 感染症発生の実態を究明するためには、まず感染源となりうる牛の EHEC 保有状況を把握して、牛糞便から菌を分離すること、ついで牛由来株とヒト感染症由来株間の遺伝子パターンによる疫学的基礎データを集積することが必須である。そのために、私は、食肉処理場に搬入される食用牛等の糞便を材料とし、年間を通じた疫学的調査を行った。分離された菌株をもとに、パルスフィールド電気泳動によりヒト感染症由来株との遺伝子パターンの比較を行った。一方、現在の分離方法では菌を単離することが不可能な検体が多いことから、新しい分離方法の開発が必要とされた。そこで、ベロ毒素プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを応用した糞便試料からの効率的な EHEC 分離法を開発した。

定法による EHEC の分離成績は全検査検体 1327 頭のうちの 35 頭(2.64%)にすぎなかった(Table 2-1)。そこで増菌培地から PCR を用いてベロ毒素遺伝子の有無を調べたところ、調査した 733 頭中 157 頭が毒素遺伝子陽性となり、約 20%の牛が糞便中に EHEC を排泄していることが分かった。しかし、それらのサンプルのうち菌が分離されたのは 20%であり、これは全検体数の 4%であった(Fig. 2-1)。この結果は、定法による増菌培養法では分離不能な菌が多く存在することを意味している。さらに、分離された菌は O157、O26 以外にも多くの血清型を含み、既知の血清型別が不能な抗原型を持つ株も確認されるなど、牛糞便中には临床上知られていない多様な血清型の EHEC が存在することが判明した。

牛から分離した菌株について、同時期に分離された同じ血清型のヒト EHEC 感染症由来株とそのパルスフィールド電気泳動パターンを比較した。前述の新聞で報道された事例では牛と患者由来 O26 の泳動パターンが完全に一致したことから、疫学的に感染原因が解明され

た(Fig. 2-2)。一方、原因究明には至らなかった事例では、O26 患者由来株のうち1株に牛に由来する O26 株と類似したパターン(F)が認められた(Fig. 2-3)。これらの患者は、感染原因が不明で、かつ、この牛の飼育場所との隣接地域を居住地としていることから、牛に由来する感染が強く疑われた。このような事例では、糞便からの分離効率を上げ、さらに周辺で飼育されている牛も含めた調査を進めることにより、これら健康保菌牛からの感染の可能性を証明できることが十分考えられた。そこで、定法で分離不能の腸管出血性大腸菌を効率よく検出し分離するために、従来の血清型による従来の分離方法ではなく、ベロ毒素遺伝子を標的とすることにより、多様な血清型を持つ腸管出血性大腸菌に対応可能で、かつ1つの検体から多くのシグナルを得ることが期待できるコロニーハイブリダイゼーション法の応用を試みた。コロニーハイブリダイゼーション法の手技は定法に従い、糞便材料を mEC プイオンで 37°C、一晚増菌した後に、EC 寒天培地で培養したコロニーをメンブレンにレプリケーションした。検出用プローブは、プロトタイプのベロ毒素遺伝子を持つ O157 菌株を鋳型とし、タカラ社製のベロ毒素検出用プライマーを用いて PCR 増幅した断片をビオチン標識して作製し、化学発光で検出した(Fig. 2-4)。しかし通常の増菌方法では、牛糞便中に存在していて発育速度の早い好気性菌であるシュドモナス属菌に由来する疑似シグナルが多数検出される検体が多く、本来の EHEC のシグナルが埋没して分離困難であった。

そこで疑似シグナルを減らすため、EHEC を優先的に増殖させる条件を検討した。種々の条件を検討した結果、増菌培養での温度を雑菌汚染が多い検体の大腸菌群検査法に準じて 44°C とすること、さらに、オイルを重層して脱気し嫌気的条件を作り出すことを組み合わせた簡易な増菌培養により、好気性菌の発育が極端に抑制されることを見いだした(Fig. 2-5)。この増菌方法を一段階、あるいは二段階経た後にコロニーハイブリダイゼーションによる検出を行うと、非特異的なシグナルが劇的に減少し EHEC のシグナル検出に非常に有効であった(Fig. 2-6)。さらに、本法では検体に混在する複数の腸管出血性大腸菌株を一度に効率よく分離することができた。

本章で私は、

- ・ 牛糞便の 20% に O157, O26 のほか多くの EHEC が存在し、季節を問わず排泄されること。
- ・ EHEC 感染症多発地帯の牛由来株とヒト由来から、PFGE パターンが同じ、または類似した菌株が存在したことから、EHEC による感染が食品を介するだけでなく、牛とヒトの間の接触による感染を高い可能性で起こし得ること。

を明らかにした。さらに、

- ・ パルスフィールドゲル電気泳動による疫学的解析に用いる EHEC の分離効率を向上させるため、改良増菌培養とコロニーハイブリダイゼーション法組み合わせた方法を確立した。

本法はO157、O26以外の、血清型が未知でかつ特別な分離鑑別培地のないEHECの検出に最適な方法であり、これらのEHECによる食中毒や感染症事例の疫学調査が可能となった。

この成果の一部は原著論文(3)で発表予定である。

第3章、嘔吐型食中毒由来 *B.cereus* の遺伝子解析

環境常在菌である *B.cereus* (以下、セレウス菌) による食中毒は「嘔吐型」と「下痢型」の2種類に大別され、その臨床症状は産生する毒素に関係している。下痢型菌の産生する腸管毒素(エンテロトキシン)は蛋白質毒素で市販キットが販売されているため、測定が容易である。しかし、嘔吐型菌毒素はペプチド抗原であり、標準品もないために、その検出には実験動物、あるいは細胞を用いた生理活性試験が必要とし簡便な測定方法はない。さらに、この菌には型別用抗血清が市販されていないため、食中毒事例において、現場で環境株と嘔吐型セレウス菌株を型別することは困難である。そこで、パルスフィールドゲル電気泳動法によるセレウス菌分別のための条件を検討し、血清型及び保有毒素型との関係を調査した。

食中毒と食品や環境由来の81株を従来法で解析した結果、細胞による嘔吐毒素試験陽性株は12株、エンテロトキシン陽性株は57株、両毒素とも陰性は12株であった(Table 3-1)。血清型はエンテロトキシン陽性株ではH1血清型を持つものではなく、型別不能株も24株(44%)と約半数を占めたのに対し、嘔吐毒素試験陽性株はH1とH17またはH18の混合血清型であった。これは嘔吐毒素試験陽性株がH1抗原を持つという以前の報告と一致した。そこで、次に、これらの株についてパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた型別を試みた。

セレウス菌のGC含量は35%程度であることから、GC含量の高い場合に使用する制限酵素を用いてゲノムを切断し、パルスフィールドゲル電気泳動に供した。6塩基認識の *SmaI* では400 Kbp以下に20~30本のバンドが観察され、株により様々なパターンを示した。一方、同じ検体を8塩基認識の *NotI* で処理した場合、400 Kbp以下に10から15本のバンドが観察された(Fig. 3-1)。さらに、*NotI* を用いた場合、嘔吐毒素試験陽性株(No.4、5、7)では嘔吐毒素試験陰性の株と比較してバンド数が多く、特に200-350 Kbp付近のバンド数に差があることを見いだした(Fig. 3-2)。そこで81株について200-350 Kbpまでのバンド数を調べた結果、バンド数5本を境にして2つのグループに分類された(Fig. 3-3)。すなわち、嘔吐毒素試験陽性株12株ではバンド数が12株ともすべて6本以上あったのに対し、エンテロトキシン陽性株では6本以上観察された株はなかった。また、両毒素とも陰性の株ではバンド数6本以上のものが8株存在したが、それらはすべて血清型がH1、18に含まれた。

本章で私は、セレウス菌のパルスフィールドゲル電気泳動は *NotI* が型別検定に使用可能であり、*NotI* 切断パターンで200-350 Kbpに6本以上のバンドが観察された株は嘔吐毒素試験陽

性株、または H1 血清型を持つ株であることを明らかにし、食中毒事件での原因菌の特定における本法の有用性を示した。

この成果の一部は原著論文(4)で発表した。

第4章:腸炎ビブリオの環境中における動態

腸炎ビブリオ食中毒菌は、夏季に集中して発生する。1990年代前半にベンガル湾での O4:K68 の流行がみられたが、日本でも 1996 年を境として患者由来の血清型が従来の型から O3:K6 そして 1998 年から O4:K68 に移行しはじめ、近年の病原性ビブリオは輸入感染症の様相を呈している。本菌は患者便からの分離率は高いにもかかわらず食材や環境等からはほとんど分離されず、疫学的にも不明な点が多く存在する。さらに環境中には多くの非病原性ビブリオが存在するが、その中に存在する病原性ビブリオの動態については知られていない。そこで腸炎ビブリオ食中毒発生の背景を研究するために、宮城県内沿岸部の海水・海泥などの環境と市販魚介類におけるビブリオの動態を調査した。また、医療機関での患者発生動向と原因血清型の把握を実施した。

まず、海岸環境ならびに魚介類でのビブリオ菌数の変化を調べた。菌数は MPN 管法を用いて測定し、PCR でビブリオ ToxR 遺伝子が確認された試験管から腸炎ビブリオが分離されたものを陽性として扱った。

海水中のビブリオは、採材地点の海水温が 20℃ 以上で増殖が盛んに見られ、6 月から 9 月にピークを示した。具体的には、潮の動きの比較的遅い埠頭内側及び漁港では 6 月からすでに高い菌数を示し、さらに 8 月と 9 月の漁港海水からはビブリオ菌の病原性遺伝子である耐熱性溶血毒素 (TDH) 及び耐熱性溶血毒素類似毒素 (TRH) 遺伝子が検出された (Table 4-1)。また、潮の動きの早い砂地海岸 (A 点) の海水中では 8 月から腸炎ビブリオが確認され、菌数は 9 月以降に上昇した。潮の動きがほとんどない泥砂海岸 (B 点) の海水中では 5 月から 11 月までの全ての期間でビブリオが検出され、菌数も 5 月時点で他の地点と比べ高く、特に 6 月から 10 月までは高値を維持した。一方、海泥からは B 点で 5 月から 12 月までビブリオが確認され、菌数は 7 月以降急激に上昇し 7 月から 9 月まではミリリットル換算で海水の 1000 倍以上の値を示した。また 9 月にはこの調査点から TRH 遺伝子陽性株 (O3:KUT) を分離した。B 点で購入した魚介類からは 6 月に菌が確認され、その菌数は海泥での変動と関連し 10 月調査の時点でも高い値を示した。これらの検体からは病原性ビブリオは検出されなかったが、同調査点では 9 月に TRH 遺伝子陽性株が分離されていることから、これによる魚介類汚染が懸念された。

環境からの分離株は 45 種類の血清型に分離され、O・K 血清型不明の菌株を除き検出頻度の高い血清型は O4:K34、O1:K25 及び O3:K33 であった。ヒト病原性株と同じ血清型の株も少数

分離されたがそれらは毒素遺伝子を持たず、パルスフィールドゲル電気泳動によるパターンも臨床株と異なっていた。

次に、宮城県内の医療機関より供与された腸炎ビブリオ患者から分離された菌株の血清型の変化調べた。1995年以降、血清型 O3:K6 が激増し、1998年以降は O4:K68 が出現している。2000年度には O3:K6、O4:K68、O1:K56 の3血清型で食中毒発生原因の約90%を占めており本県においても他の県と同じ動向を示した(Fig. 4-1)。

腸炎ビブリオによる患者発生のピークは8月であり、これは海水中の菌数のピークと近似している。宮城県では夏場に「腸炎ビブリオ注意報」を発令しているが、これを検証するために実際の腸炎ビブリオ患者発生数と宮城県沖の海水温を1週間おきに比較した。患者発生は6月中旬に発生が認められた後に一時沈静化し、8月前半から再び発生し9月にはピークを迎えた。この患者発生状況にこの期間の海水温度の変化を重ねると、海水温度と患者数は全く同様の推移を示した(Fig. 4-2)。この結果、海水温度19℃前後から患者数が増加し、海水温の下降とともに患者数が減少することを具体的に確認した。

本章で私は、

- ・ 腸炎ビブリオは海泥のない流れの速い海水域よりも、潮の動きの少ない沿岸部及び海泥で長期間分離され、海泥が増殖の温床となっていること。
- ・ 環境株の大部分は腸炎ビブリオ患者の主流である血清型 O3:K6、O4:K68、O1:K25 とは異なるが、菌数のピーク時には環境中に病原性遺伝子を保有する株が存在すること。
- ・ 環境中の病原性ビブリオの動態が腸炎ビブリオ患者発生のピークと重なることから、海水温度の変化からビブリオ食中毒発生時期を推定できること。

を明らかにした。

現在宮城県は、数年後を目処により精度の高い「腸炎ビブリオ警報」を発令するための準備を行っている。本研究のデータはその基礎となるものである。

この成果の一部は原著論文(5)で発表した。

第5章:総括

食中毒菌は古くから人間とともに存在し、人は何時の時代もそれを克服するために知恵をしばり努力を行ってきた。科学が進んだ現在、食中毒の発生機序は明らかになりつつある。しかし、未だ食中毒の撲滅に至っていない。この問題を解決するためには環境中におけるそれぞれの菌について、その存在様式を十分に把握することが必要である。

本博士論文では、4種類の食中毒菌についてそれぞれの環境における動態を解析し、

(1)ブドウ球菌では畜産現場における抗生剤多用という人為的な環境が人用抗生剤高度耐

性を生む一因となることを強く示唆した。また、(2)飼育されている牛は EHEC 食中毒の原因菌を高率に保菌する動物であることを明らかにし、その疫学解析に必須な EHEC の簡便で効率のよい分離方法を開発した。さらに、(3)セレウス菌では嘔吐毒産生菌を簡易に識別できる PFGE 条件を決定し、(4)腸炎ビブリオ菌は沿岸部における生息状態並びに、本菌による食中毒が海水温度と関係していることを明らかにした。これらの結果、食中毒菌の環境における動態の一端を明らかにした。

私は本博士論文を通じ、人の食環境を守るためには、人間の住環境のみでなく、広く生物生産の現場における環境中の食中毒菌の動態を解明することが重要であるということをあらためて示した。

原著論文

- (1) 畠山敬, 畠山貞夫, 神尾好是 家畜環境におけるブドウ球菌の薬剤耐性について. 宮城県仙南食肉衛生検査所年報, 第 17 巻, 36-37 (1999).
- (2) 畠山敬, 神尾好是 家畜環境におけるブドウ球菌の薬剤耐性化. 宮城県獣医師会会誌 掲載予定 (2003).
- (3) 畠山敬, 山口友美, 佐々木美江, 渡邊節, 齋藤紀行, 秋山和夫, 今野明日香, 小川今日子, 千葉文明, 川向和雄 県内の牛における腸管出血性大腸菌 (EHEC) 保有状況. 宮城県獣医師会会誌 掲載予定 (2003).
- (4) 山口友美, 野池道子, 佐々木美江, 畠山敬, 齋藤紀行, 白石廣行, 後藤つね子, 日野久美子, 氏家雪乃, 小林妙子 セレウス菌のパルスフィールドゲル電気泳動による解析. 宮城県保健環境センター年報, 第 19 巻, 51-54 (2001).
- (5) 畠山敬, 山口友美, 齋藤紀行, 秋山和夫, 白石廣行, 小笠原久夫 宮城県における腸炎ビブリオ調査. 宮城県保健環境センター年報, 第 18 巻, 56-60 (2000).

参考論文

- (1) 鈴木健, 畠山敬 食肉中における抗菌性物質簡易検査法の検討. 宮城県仙北食肉衛生検査所事業概要, 第 4 巻, 42-43 (1987).
- (2) 佐々木素子, 畠山敬 当検査所におけるリステリア菌の検査状況. 宮城県仙北食肉衛生検査所事業概要, 第 7 巻, 38-39 (1990).
- (3) 畠山敬, 泉智子, 荒井富雄, 山本仁 犬猫糞便中からの病原細菌の分離状況について. 宮城県獣医師会会報, 第 50 巻 4 号 211-216 (1997).
- (4) 御代田恭子, 中村知子, 荒井富雄, 白石廣行, 畠山敬, 茨木隆雄, 畠山貞夫 豚の腸内容物における病原性大腸菌および食中毒起因菌の検索. 宮城県保健環境センター年報, 第 16 巻, 106-107 (1998).
- (5) 秋山和夫, 後藤郁夫, 畠山敬, 沖村陽子, 齋藤紀行, 白石廣行 過去 4 年間におけるかき及び環境水中の SRSV 検出状況. 宮城県保健環境センター年報, 第 18 巻, 49-55 (2000).
- (6) 山口友美, 畠山敬, 齋藤紀行, 白石廣行 パルスフィールドゲル電気泳動法による STEC の分子疫学. 宮城県保健環境センター年報, 第 18 巻, 61-64 (2000).
- (7) 畠山敬, 山口友美, 佐々木美江, 齋藤紀行, 白石廣行 食品中で産生される黄色ブドウ球菌毒素とセレウス菌の耐熱性嘔吐毒素の検出, 宮城県保健環境センター年報, 第 19 巻, 48-50 (2001).
- (8) 齋藤紀行, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 畠山敬, 白石廣行 腸管出血性大腸菌 STX2 バリエントの遺伝子解析, 宮城県保健環境センター年報, 第 19 巻, 55-58 (2001).

- (9)野池道子, 佐々木美江, 山口友美, 有田富和, 畠山敬, 齋藤紀行, 白石廣行 食品からの腸炎ビブリオ O3:K6 の分離と水産加工施設の腸炎ビブリオ汚染実態調査. 宮城県保健環境センター年報, 第 19 巻, 59-61 (2001).
- (10)佐々木美江, 野池道子, 山口友美, 畠山敬, 齋藤紀行, 白石廣行 宮城県の温泉施設におけるレジオネラ属菌の実態調査(第1報). 宮城県保健環境センター年報, 第 19 巻, 62-64 (2001).
- (11)佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 齋藤紀行, 白石廣行 宮城県の温泉施設におけるレジオネラ属菌の実態調査(第2報). 宮城県保健環境センター年報, 第 20 巻, 64-67 (2002).
- (12)齋藤紀行, 佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 渡邊節, 白石廣行 宮城県内の市販魚介類及び海水・海泥からのビブリオ・ハルニフィカスの検出. 宮城県保健環境センター年報, 第 20 巻, 68-71 (2002).

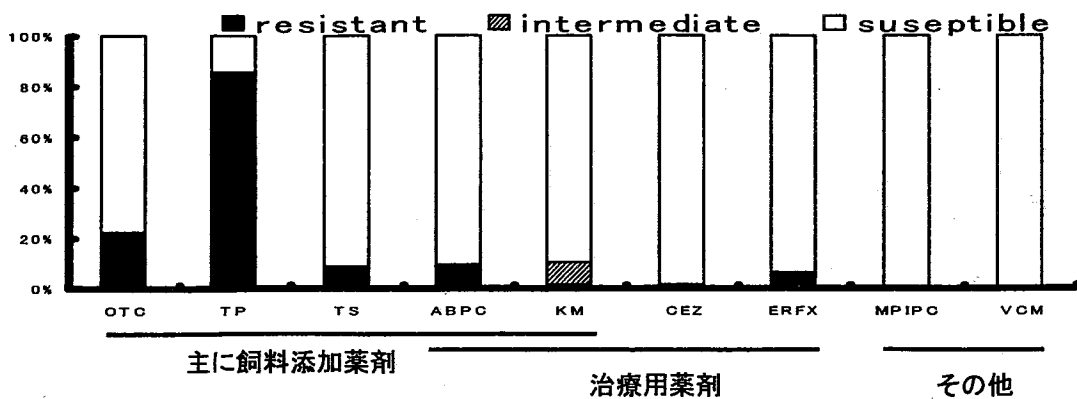


Fig. 1-1. 牛由来178株の各薬剤に対する感受性

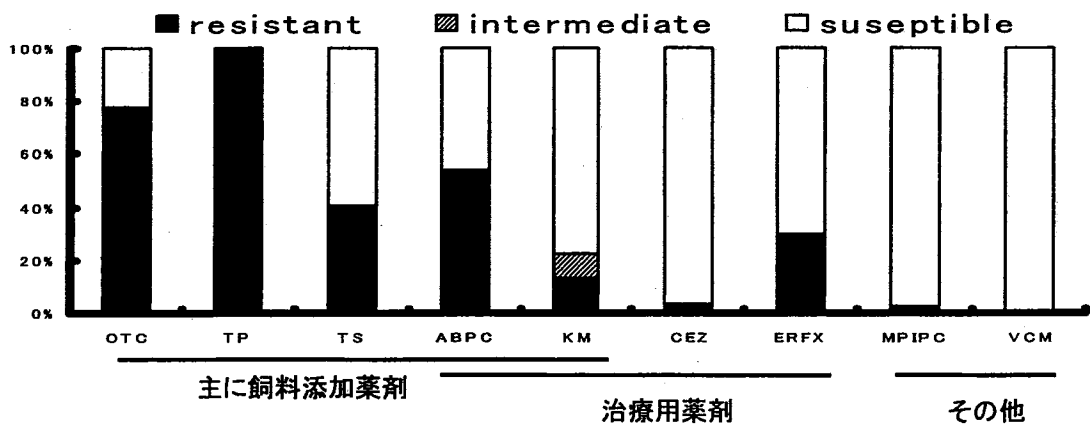


Fig. 1-2. 豚由来214株の各薬剤に対する感受性

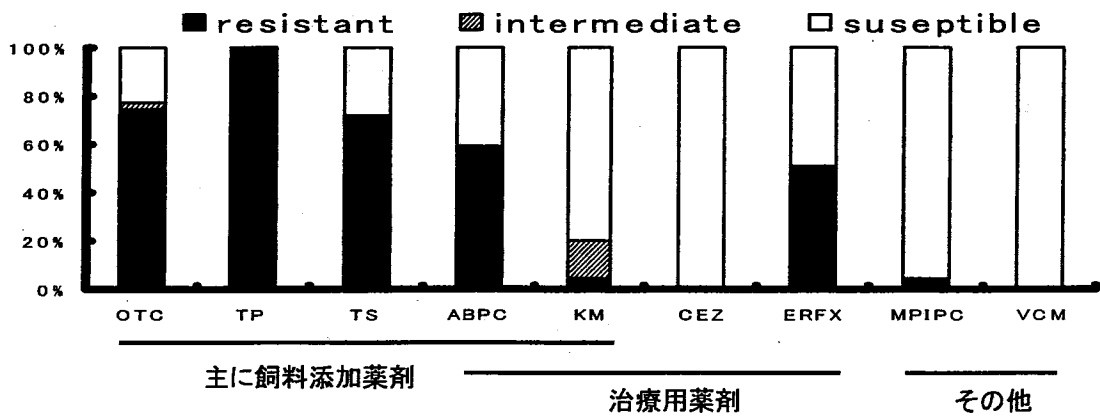


Fig. 1-3. 鶏由来240株の各薬剤に対する感受性

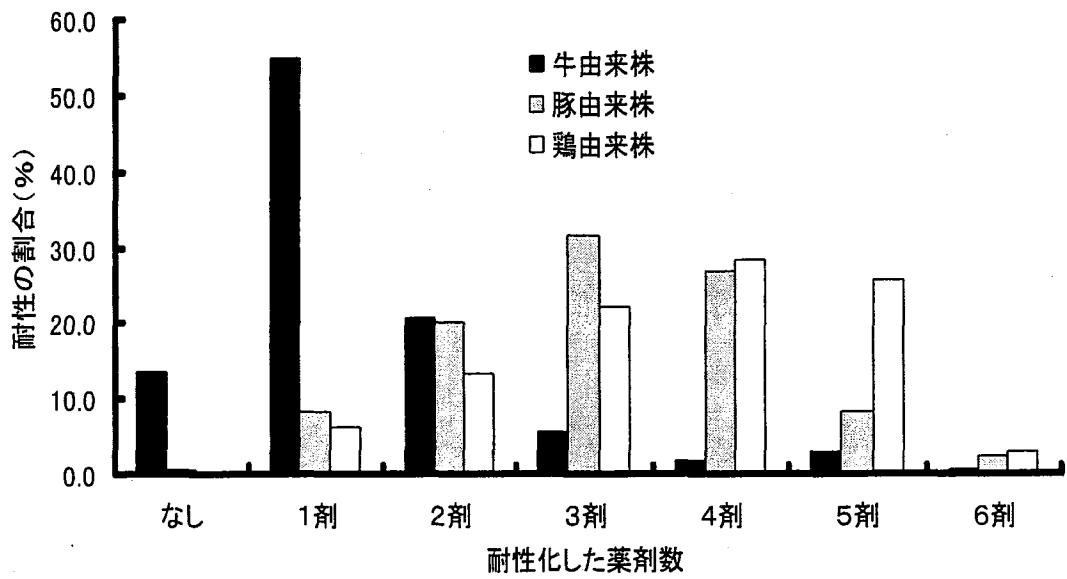


Fig. 1-4. 家畜・家禽由来株の多剤耐性状況

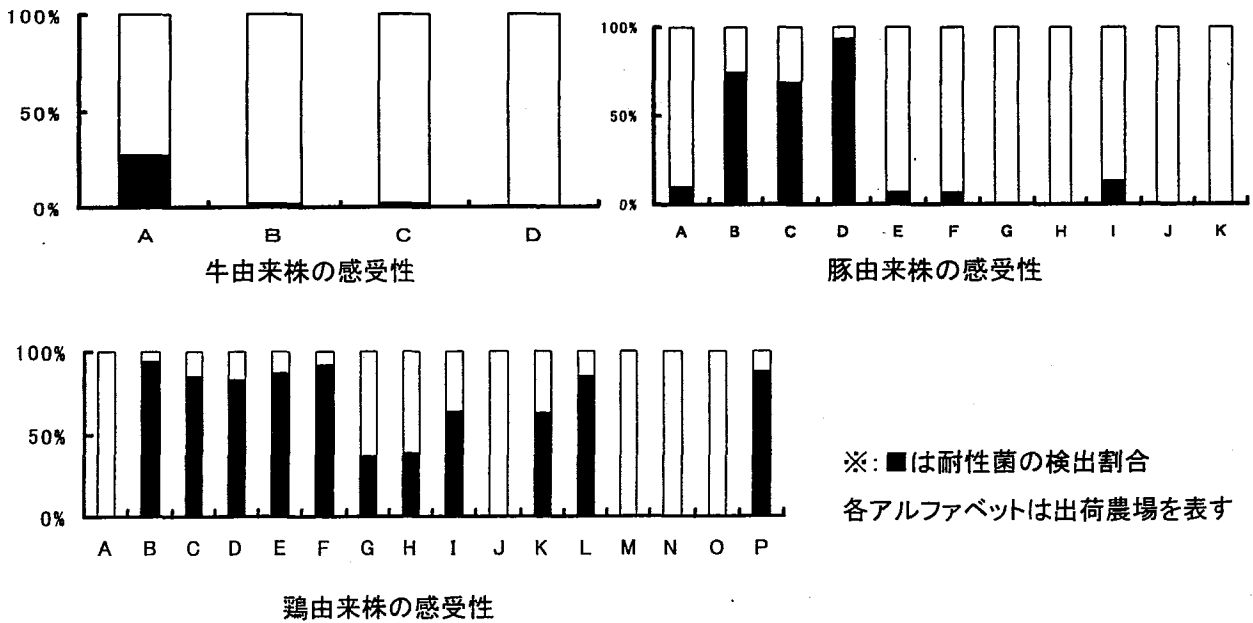


Fig. 1-5. 各出荷農場由来株のERFXに対する感受性の比較

Table 1-1. 家畜用薬剤耐性株の人用抗生剤に対する感受性

家畜用薬剤耐性株	ヒト用抗生剤名	各薬剤のMIC ($\mu\text{g/ml}$)						
		≤ 1	2	4	8	16	32	$64 \leq$
ABPC, CEZ耐性株	CTM (セフトリアム)			1	2	1		2
	CTX (セフトキシム)	<u>2</u>		<u>2</u>	<u>2</u>			
OTC耐性株	MINO (ミノサイクリン)	<u>20</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>			
CP耐性株	CP (クロラムフェニコール)							<u>22</u>
KM耐性株	DKB (ジベカシン)	13	2		1	1		1
	AMK (アミカシン)	<u>9</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	
	GM (ゲンタマイシン)	<u>13</u>	<u>1</u>	<u>2</u>		<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
TS耐性株	EM (エリスロマイシン)	<u>6</u>			<u>1</u>			<u>14</u>
	JM (ジヨサマイシン)	<u>1</u>	3	2	<u>1</u>			<u>14</u>

※下線なし：耐性基準値未定薬 .. : susceptible - : intermediate = : resistant

Table 2-1. 牛糞便からのEHEC分離

検査件数	1327件
分離件数	35件
分離率	2.64%

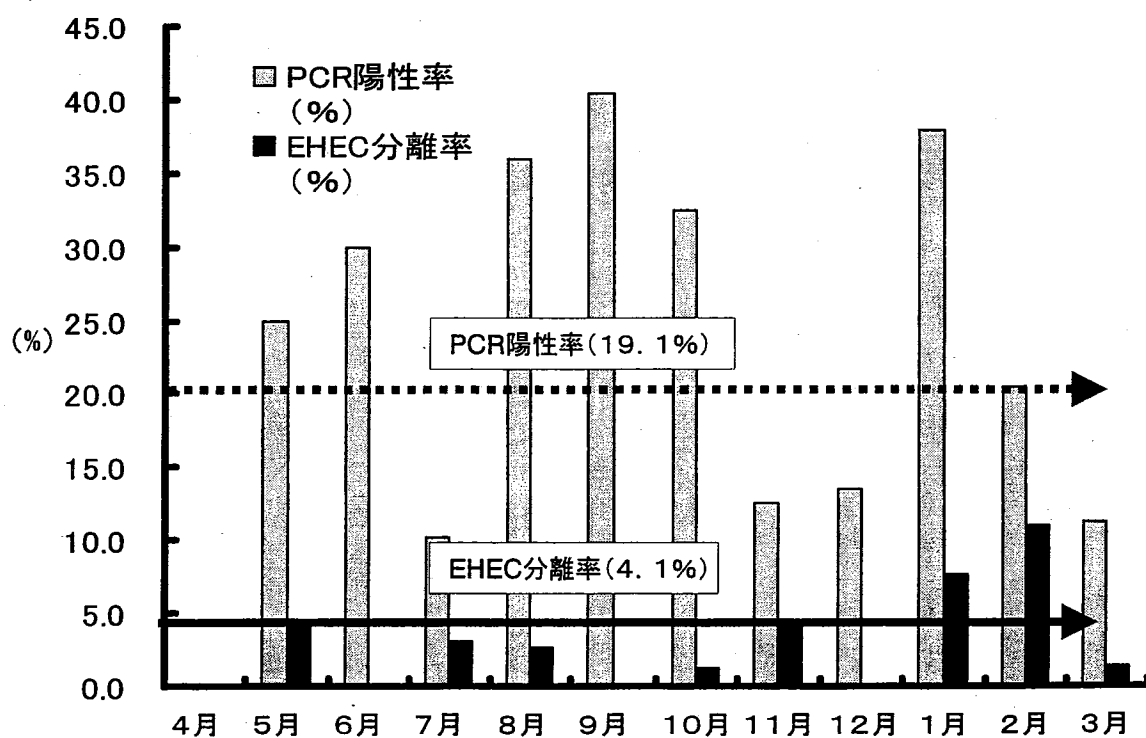


Fig. 2-1. 牛糞便のPCRによるベロ毒素遺伝子陽性率及びEHEC分離率

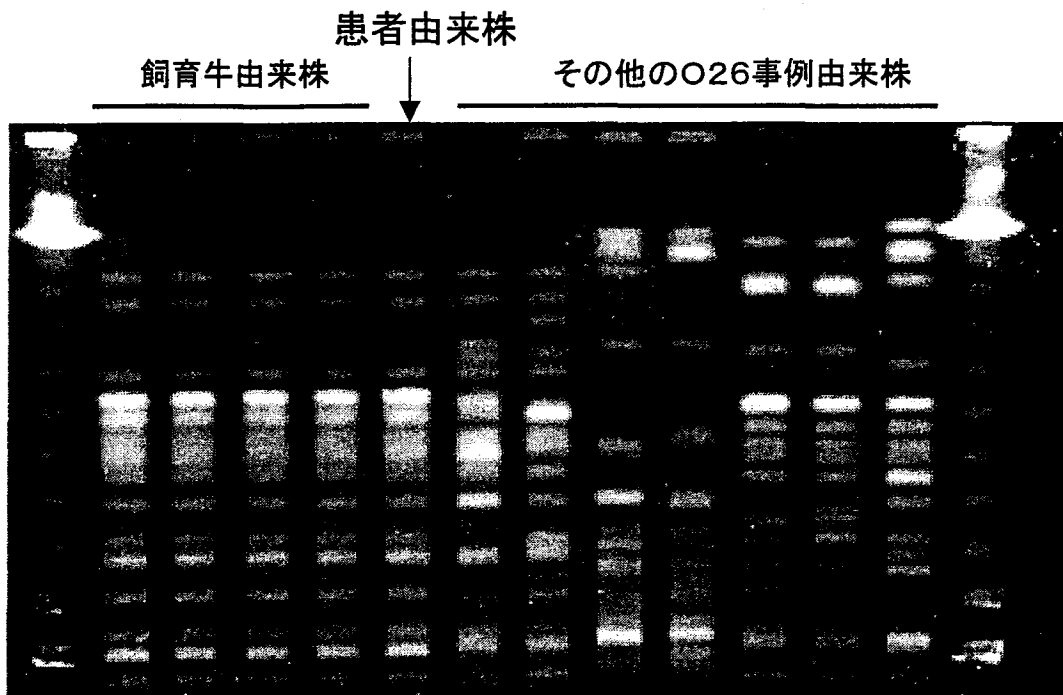
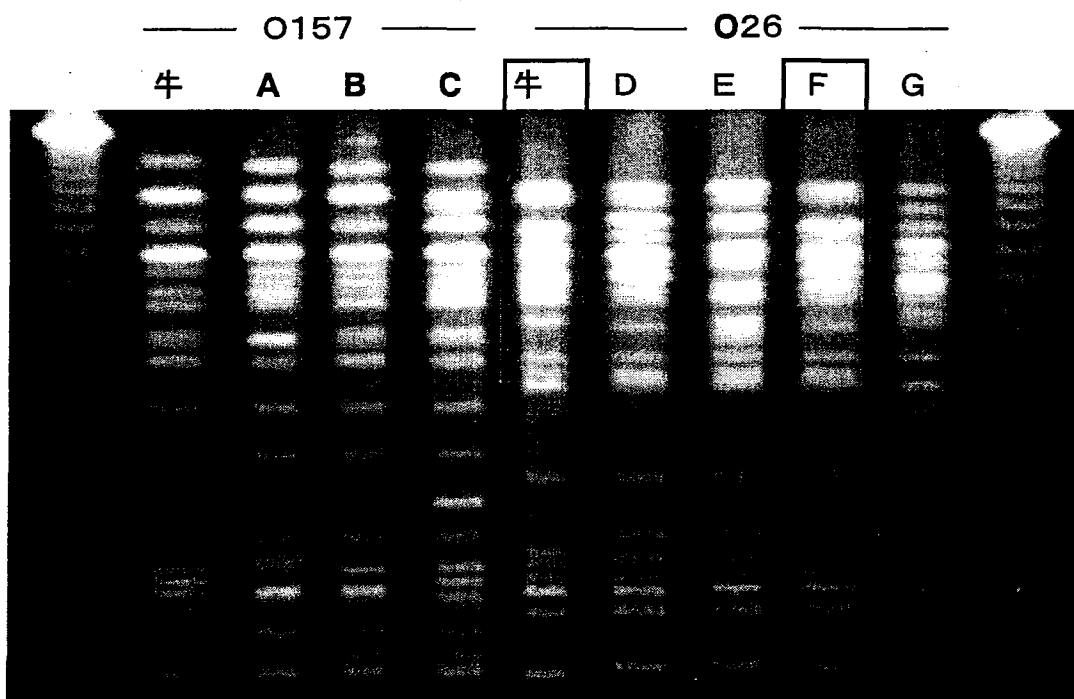


Fig. 2-2. 飼育牛からEHEC(O26)に感染した事例のPFGEパターン



A~G: 感染症患者由来株 □: 類似するパターン

Fig. 2-3. 牛由来株及びヒト感染症由来株のPFGEパターンの比較

検体を、mECブイヨンで18時間培養
 ↓
 増菌PCR陽性検体を寒天培地に広げ
 VT1・VT2プローブを用いて
 コロニーハイブリダイゼーション
 ↓
 シグナルに該当するコロニー(エリア)を
 PCRで確認
 ↓
 再分離して菌を単離
 ↓
 血清型と毒素産生の確認

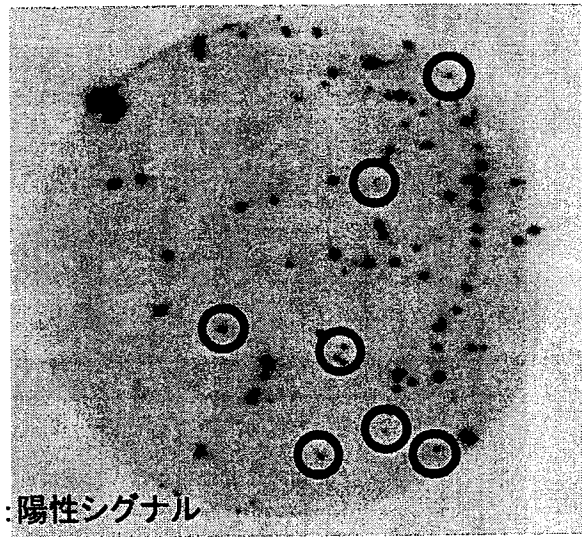


Fig. 2-4. コロニーハイブリダイゼーション法でのEHECの分離

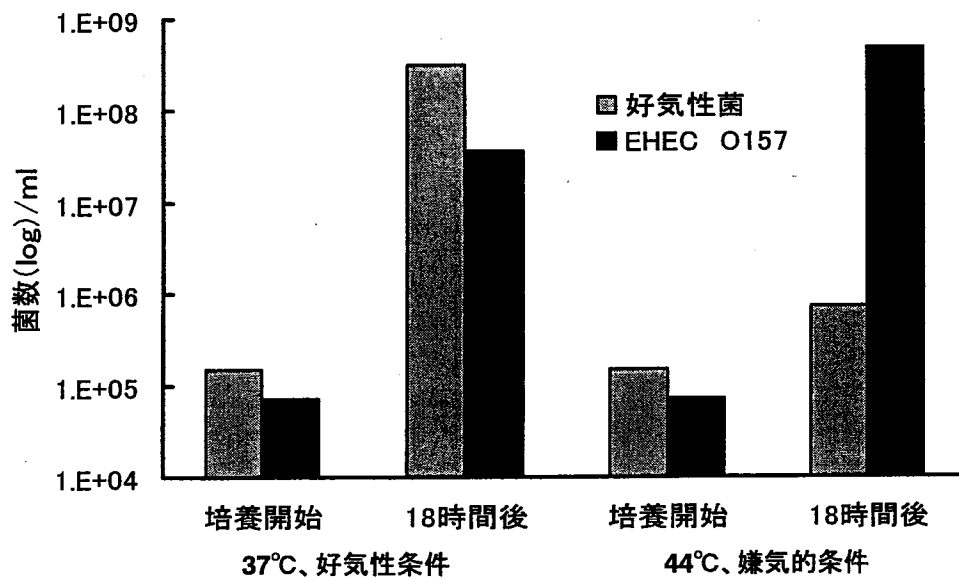


Fig. 2-5. 各培養条件下での増菌培地における菌数の変化

通常の増菌培養法による擬似シグナル

44°C、嫌氣的増菌培養後のシグナル

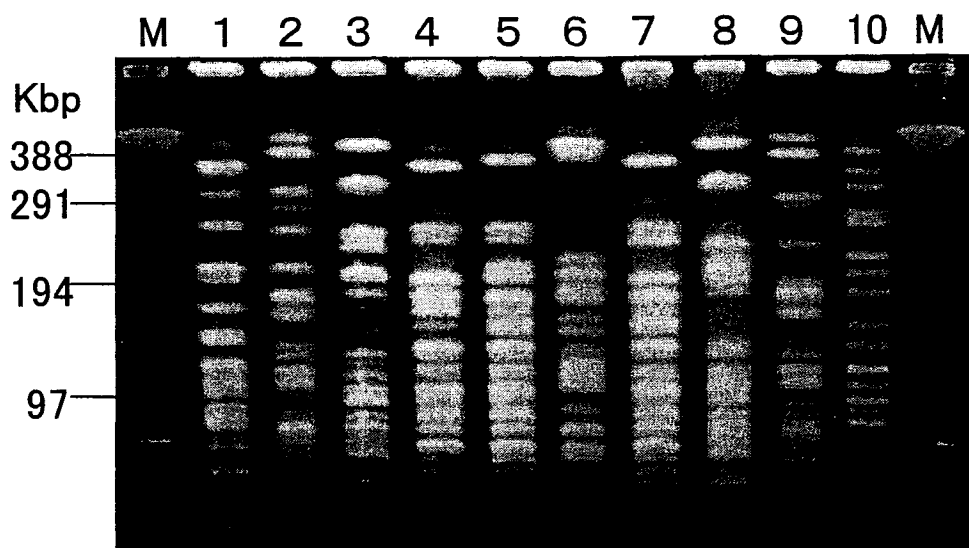


Fig. 2-6. 増菌培養条件によるシグナルの違い

Table 3-1. セレウス菌のH血清型と保有毒素

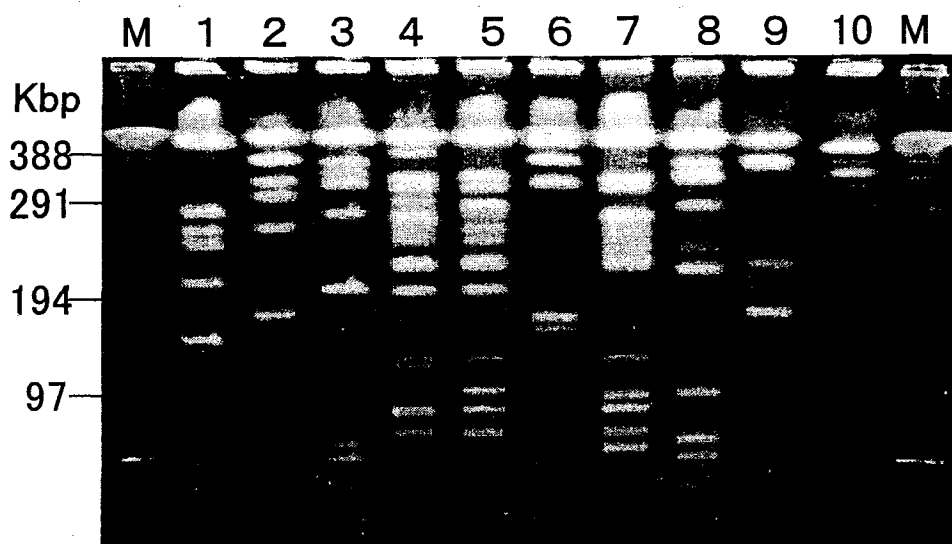
H血清型	嘔吐毒素	エンテロキシン	陰性
1,17	1	0	0
1,18	11	0	8
4	0	2	0
11,15	0	4	0
13	0	2	0
17	0	1	0
20	0	1	0
23	0	4	0
型別不能	0	24	0
NT	0	19	4
計	12	57	12

NT:検査未実施



*Sma*I によるPFGEパターン

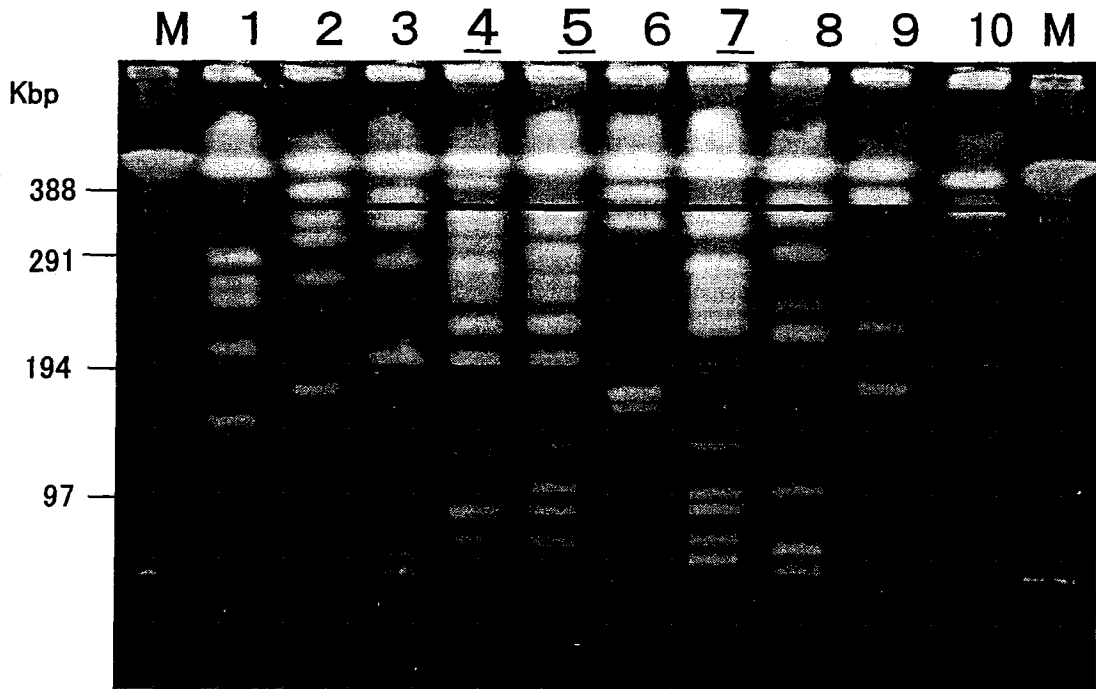
*Sma*I の認識配列
CCC ↓ GGG



*Not*I によるPFGEパターン

*Not*I の認識配列
GC ↓ GGCCGC

Fig. 3-1. *Sma*I 及び *Not*I によるセレウス菌のPFGEパターン



※: 下線太字番号は嘔吐毒素試験陽性株

Fig. 3-2. *NotI* によるPFGEパターンの200~350kbpにおける多様性

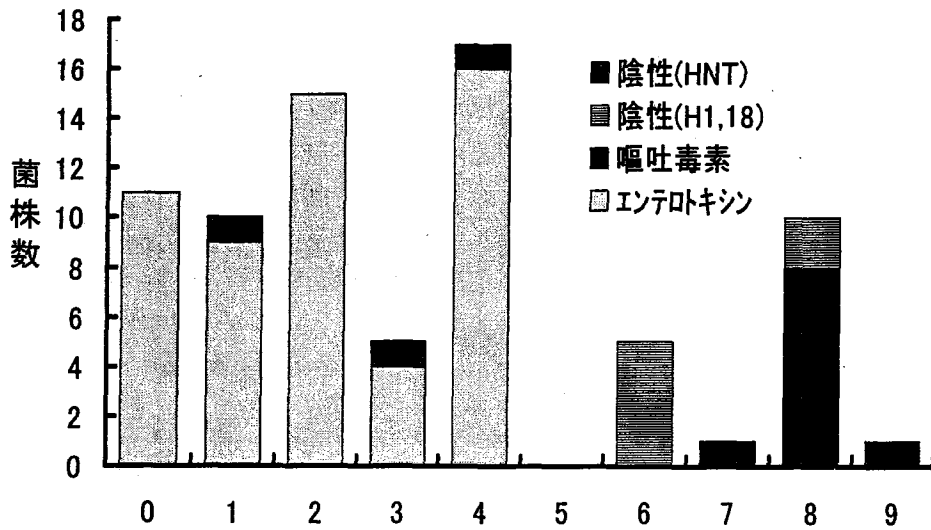


Fig. 3-3. *NotI* を使用したPFGEでの200-350Kbpにおけるバンド数

Table 4-1. 環境中の腸炎ビブリオ菌数(MPN値¹⁾)

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	血清型
埠頭及び漁港海水									
埠頭内湾海水	—	>1100	64	64	460	460	—	—	11種
漁港海水	—	3	>1100	460	240	—	—	—	5種
				tdh(+) ²⁾ trh(+) ²⁾					
海岸海水及び海泥									
砂地沿岸(A点)海水	—	—	—	3	460	460	<3	<3	4種
" 海泥	<30	—	380	380	460	<30	—	<30	4種
泥砂沿岸(B点)海水	240	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100	23	—	11種
" 海泥	2400	2400	>11000	>11000	>11000	2400	230	230	18種
				trh(+) ³⁾					
魚介類									
ほや	—	<30	>11000	>11000	>11000	3500	n,t	n,t	3種
アサリ	—	<30	2400	4600	>11000	2100	n,t	n,t	8種

1): MPNは海水100mlまたは海泥1gあたりの値

2): □はTDH、TRHの遺伝子を検出。

3): TRH遺伝子陽性株(O3:KUT)1株を含む

4): 網掛けは海水温20℃以上の地点

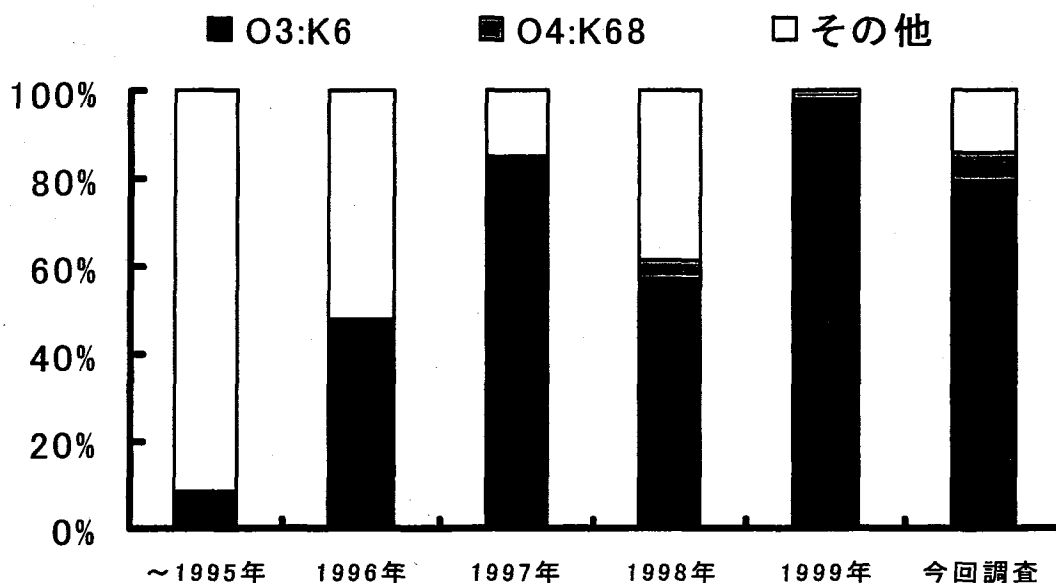


Fig. 4-1. 患者から分離した腸炎ビブリオ血清型の推移

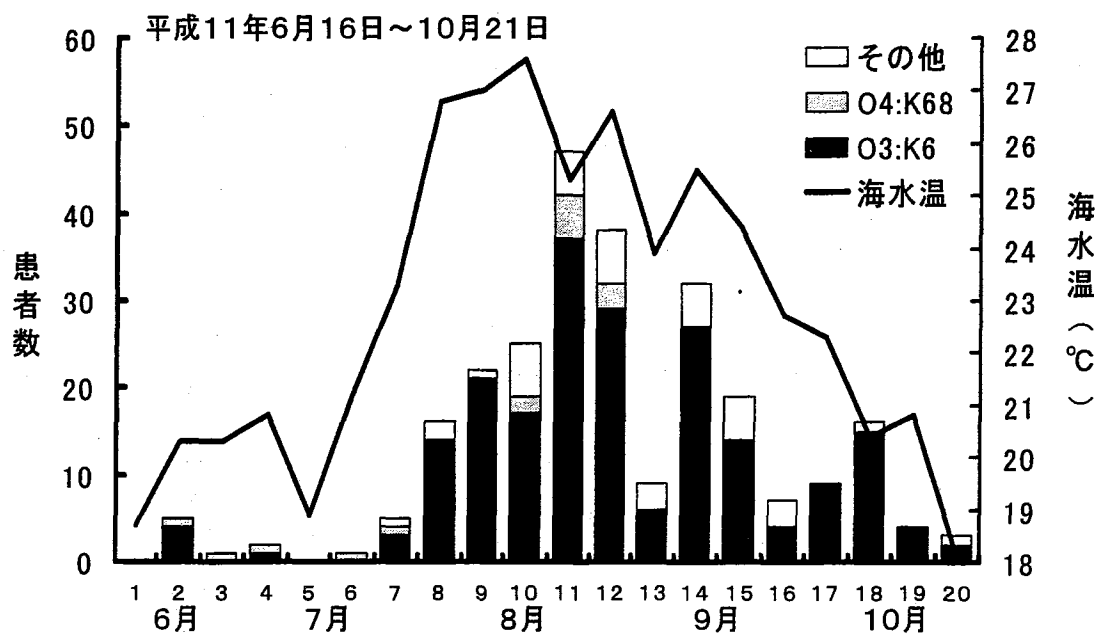


Fig. 4-2. ビブリオ患者の発生状況と海水温度の関係(週集計)

論文審査結果要旨

食中毒菌はヒトを取り巻く環境中に数多く存在しその種類も生活環も多様である。これらの菌の個々の性状については詳しく研究されているが、それらの菌の本来の生息域である家畜や環境中での動態を研究した報告は少なく、自然界からヒトに至る様々な環境におけるそれぞれの菌の存在形態やその変化についてさらに研究する必要がある。我々のもっと身近に存在するブドウ球菌は食中毒を引き起こすだけでなく薬剤耐性の問題など、様々な形でヒトに被害を及ぼす。また、腸管出血性大腸菌もブドウ球菌と同様に食中毒菌とヒト感染症原因菌としての二面性を持っている。近年では、O157以外の血清型による食中毒・感染症事例が増加していることから、腸管出血性大腸菌の環境中での動態と疫学的な把握は予防対策上必須である。セレウス菌は環境にも常在するため、食中毒原因菌として特定することは従来から非常に困難で、その疫学的対策を行うためにも、非病原性セレウス菌と病原性セレウス菌を何らかの方法で簡便に区別する必要がある。さらに、腸炎ビブリオは夏場に集中的に発生する代表的な食中毒菌であるが、その環境動態と食中毒の関連性については明らかにされておらず、防疫対策の上でもこれらの研究をさらに進めて行く必要がある。

以上のことを前提として、本研究者らは、畜産環境中に常在するブドウ球菌を用いて各種抗生剤に対する感受性のモニタリングを行い、菌が高頻度に耐性を示す家畜用抗生剤が既に多数存在し、豚・鶏では多剤耐性化が起こっていること。また、畜舎ごとに菌の感受性が大きく異なり、使用している薬剤に依存することなど、畜産環境での耐性菌の出現と予防投薬には強い相関が見られることを明らかにした。さらに、家畜用抗生剤に高度に耐性を示している株の中には、同系の医療用抗生剤にも高度に耐性を示す株が存在していることを明らかにし、これらの菌によるヒトへの影響を考察した。また、腸管出血性大腸菌では、PCRを用いたモニタリングにより牛の糞便に腸管出血性大腸菌毒素（Vero毒素）の遺伝子が季節を問わず検出されること（平均約20%）を明らかにし、牛からヒトへの直接的感染が起きていることを疫学的に証明した。さらに、腸管出血性大腸菌の検出効率を上げることを目的として実施したコロニーハイブリダイゼーション法では、牛糞便に混在する擬似陽性を示す菌を選択的に除去する技術を確立することにより、既存の検査方法では分離不能であった菌株も含めて腸管出血性大腸菌株を一度に効率よく検出することに成功した。セレウス菌の分別は、制限酵素 *NotI* 及び *SmaI* を使用したパルスフィールドゲル電気泳動電気泳動法（PFGE）による遺伝子の型別検定法が有効であることを明らかにした。さらに、同酵素を使用した PFGE での 200～350kbp に出現する遺伝子バンドの数により H1 を血清型に持つ株が鑑別可能で、この中に嘔吐毒素陽性株がすべて含まれることを発見することにより嘔吐毒素型菌の簡易分別法を確立した。また、環境中の腸炎ビブリオは潮の動きの少ない沿岸部の海泥に長期間存在していることを明らかにした。特に腸炎ビブリオ患者の発生数が多い8月及び9月には、非病原性ビブリオの増殖に加え、病原性遺伝子保有株が環境中でも増殖していることを宮城県で初めて確認した。さらに患者の発生期間は海水温度の変化と高い相関が認められることから、これにより腸炎ビブリオ食中毒の発生時期を推定できることを明らかにした。以上のように本研究は、人の食環境や生活環境を微生物から守るための方法として、薬剤過剰使用に対するコントロールの重要性と、人間を中心とした生活環境のみでなく、食を得るために必須の「生物生産の場」を含めた環境中での食中毒菌の動態を解明していくことが重要であることを示した。

以上のことから、審査員一同は本研究者に博士（農学）の学位を授与するのに値するものと認定した。