

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

李 謙一

目次

略語	1
緒言	2
第一章: 酸性下における志賀毒素産生性大腸菌(STEC) O157 の挙動に与える チーズのカビスターターの影響	
序論	6
材料と方法	8
結果	15
考察	22
小括	25
第二章: カビの菌糸を介した STEC O157 の移動およびストレス抵抗性	
序論	27
材料と方法	28
結果	32
考察	41
小括	46
第三章: STEC O157 のストレス抵抗性と遺伝子型との関連性	
序論	48
材料と方法	50
結果	56
考察	72
小括	77
総括	79
謝辞	82
参考文献	83

略語

AIC	: Akaike's information criterion
ATCC	: American Type Culture Collection
APT	: alcohol percentage test
DW	: distilled water
F_{ST}	: fixation index
GFP	: green fluorescent protein
HUS	: hemolytic-uremic syndrome
IRI	: inactivation rate index
λ_{OD}	: lag time of bacterial growth measured by optical density
LSPA6	: lineage specific polymorphism assay with 6 markers
MCMC	: Markov chain Monte Carlo
OD ₅₉₅	: optical density at wave length of 595 nm
PBS	: phosphate buffered saline
PC	: principal component
PCA	: principal component analysis
PCR	: polymerase chain reaction
PDA	: potato dextrose agar
SD	: standard deviation
SMAC	: sorbitol MacConkey agar
Stx	: Shiga toxin
<i>stx</i>	: Shiga toxin-encoding gene
STEC	: Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>
TSA	: tryptone soya agar
TSB	: tryptone soya broth
UHT	: ultra-high temperature

緒言

ヒトに対して病原性を有する大腸菌のうち、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) は、日本において年間 2,000 人以上の患者が報告されており、感染の際には溶血性尿毒症症候群 (HUS) や出血性下痢などの重篤な症状を示すことがあるため、公衆衛生上の大きな問題となっている (65, 94, 117)。STEC は、菌体 (O) および鞭毛 (H) 抗原によって多数の血清型に分けられるが、血清群 O157 (STEC O157) を原因とするものが、STEC 感染症患者数の約 70%を占める (117)。STEC O157 は、ウシなどの反芻類を主な宿主としており、感染動物との直接接触、または、汚染された肉、乳製品、青果類などを介してヒトに感染することが知られている (3, 29, 36, 64, 71)。

食品中の STEC O157 は、pH、温度および浸透圧の変化や栄養の欠乏などの様々なストレスにさらされる (17, 93)。特に、チーズおよび青果類では表面および内部の pH が低く、低温で熟成や保存が行なわれるため、これら食品中では STEC O157 に対して大きなストレスが加わるものと考えられる。しかし、それにもかかわらず、チーズや青果類を原因とする STEC O157 食中毒が多発していることから (3, 27)、本菌のストレス抵抗性が食品中での挙動に大きな影響を与えている可能性がある。STEC O157 は感染菌数が少なく (66)、ヒトに引き起こす症状が重篤であるため、ストレス抵抗性に関連する要因を明確にし、疾病発生との関連性を明らかにすることは重要な課題である。過去の報告からは、他種の微生物による影響や STEC O157 の遺伝子型の差異が、食品中での STEC O157 のストレス抵抗性に影響を与える要因と考えられている (17, 41)。

チーズや青果類には、発酵スターターとして加えられる乳酸菌、カビ (糸状菌) および様々な環境中の微生物が多数存在し、STEC O157 のストレス応答に影響を与えていると考えられる (41)。このうち、発酵スターターとして用いられる乳酸菌や腐敗細菌が細菌に与える影響については多くの研究がなされている。STEC O157 に対する影響としては、乳酸菌が産生する乳酸やナイシンなどの抗菌物質による本菌への拮抗作用が報告されている (80, 84)。一方で、環境中の *Acinetobacter* は STEC O157 によるバイオフィーム形成を促進するなど (37)、食品中の微生物による影響が STEC O157 のストレス抵抗性を高める可能性も示唆されている。近年、腐敗に関与するカビが青果類上で発育することによって食

中毒菌の挙動に影響を与えることが報告されている。青果類に存在するカビの発育は、青果類表面の pH を上昇させることによって、*Salmonella* などの食中毒菌の増殖を促進することが認められている (5, 15)。加えて、カビの代謝物が、共存する乳酸菌などの有用菌 (67)、口腔内細菌 (7) および土壌細菌 (109) などの増殖を、pH 非依存的に促進することも知られている。食品中においても、*Fusarium* 属菌の生育が、STEC O157 の低温下での生残を pH 非依存的に高めることが認められている (12)。このような様々なカビが、共存する細菌の増殖などを促進する作用は、培養液中に存在するカビの代謝物などが関与するとされている。一方で、カビの菌糸自体が細菌の挙動に影響を与えることも知られており、Kohlmeier ら (99) は、カビの菌糸表面に形成された液体の層 (water film) において、共存する細菌が移動や増殖によってその分布を拡大させることを報告している。また、大腸菌は固体表面上で増殖した場合に、ストレス抵抗性関連遺伝子の発現を増加させることが示されていることから (20)、菌糸上での増殖が細菌のストレス抵抗性に影響を与える可能性もある。このように、カビは食品中の微小環境を変化させることによって、STEC O157 のストレス抵抗性に多様な影響を与えていると考えられるが、共培養モデル系などを用いた詳細な検討はほとんどなされていない。特に、カマンベールやブルーチーズなどのカビ熟成型チーズでは、熟成のための二次発酵スターターとして *Penicillium camemberti*、*Penicillium roqueforti* および *Geotrichum candidum* などのカビが加えられるため (34)、STEC O157 のストレス抵抗性に対するカビの影響は大きいと考えられる。このため、発酵食品のカビスターターが STEC O157 のストレス抵抗性におよぼす影響については、特に詳細に検討する必要がある。

一方、STEC O157 のストレス抵抗性と本菌感染症発生との関連性については、不明な点が多く残されている。ヒトへの感染成立に重要な酸抵抗性については多くの検討がなされているが、ヒト由来株がウシ由来株と比べて酸に高い抵抗性を有することに否定的な報告もあり (69)、更なる検討が必要とされている。この原因のひとつとして、宿主である反芻類が保有する多様な STEC O157 のうちの一部がヒトでの疾病発生に関与していること (29, 58) があげられる。*Listeria monocytogenes* では、高病原性の遺伝子型の菌が、高浸透圧抵抗性を有することが示されていることから (10)、STEC O157 についても遺伝子型とストレス抵抗性との関連性を検討することによって、ストレス抵抗性が本菌感染症発

生に果たす役割を明らかにできると考えられる。

本研究ではチーズや青果類などの食品にみられるような STEC O157 に対するストレスの大きい環境中での本菌の挙動に関わる要因を明らかにすることを目的とし、一連の研究を行なった。まず、STEC O157 のストレス抵抗性に影響を与えると考えられるカビが、本菌の挙動に与える影響について共培養モデル系を用いて検討した。すなわち、第一章では、カビ熟成型チーズの代表的なカビスターターである、*P. camemberti* および *P. roqueforti* の培養液および培養液中の物質が STEC O157 の挙動に与える影響を探究した。第二章では、チーズなど発酵食品の発酵スターターおよび一般的な食品汚染カビについて、カビの菌糸が STEC O157 の挙動に与える物理的影響を探究した。次に、第三章では、ヒトでの STEC O157 感染症に関与しやすい本菌の遺伝子型を特定し、ストレス抵抗性との関連性を明らかにすることによって、チーズや青果類中で STEC O157 のストレス抵抗性が果たす役割について考察することとした。以上から、STEC O157 のストレス抵抗性に対するカビの影響や本菌の遺伝子型の重要性を見出し、もって STEC O157 による食中毒発生のリスクに関わる重要な一側面を明らかにした。

第一章

酸性下における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O157 の挙動 に与えるチーズカビスターターの影響

序論

チーズの製造初期には、生乳を凝集させたカードの pH は、乳酸菌が産生した乳酸によって約 4.5 まで下がる。このような低 pH に加え、食塩による高浸透圧や熟成時の低温などのため、チーズは STEC O157 にとってストレスの大きい環境とされる (34)。しかし、チーズを原因とする食中毒は散発的に発生しており (3, 15, 64)、低 pH をはじめとするストレスへの抵抗性が STEC O157 などの食中毒菌の生残や増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。チーズには、発酵スターターとして加えられる乳酸菌などの様々な微生物が生息し、相互に影響を及ぼし合っているため (2, 54)、食中毒菌のストレス抵抗性に対しても大きな影響を与えていると考えられる。特に、カマンベールやブルーチーズなどのカビ熟成型チーズは、乳酸菌に加えて *P. camemberti* や *P. roqueforti* などのカビを発酵スターターとして用いており、これらのカビスターターが STEC の挙動に与える影響についても考慮する必要がある。乳酸菌スターターはチーズ中での STEC O157 の死滅を促進することが示されているが (80, 84)、*P. camemberti* や *P. roqueforti* などのカビスターターの影響についての詳細な検討はほとんどなされていない。

近年、カビの食品上での増殖が、食中毒菌の増殖や生残に影響を与えることが報告されている。Riordan ら (79) および Cibelli ら (18) の研究では、様々なカビがタンパク分解によって青果類の pH (3.5~4.5) を上昇させる結果として、STEC O157 や *Salmonella Infantis* の増殖を促進することが認められている。一方、Bevilacqua ら (12) は、トマト上 (pH 4.0~4.4) での *Fusarium* 属菌の発育が、pH 非依存的に STEC O157 の生残を促進することを示している。これらの研究から、カビの発育が酸ストレス下での食中毒菌の増殖や生残に有利に働く可能性が示唆されている。特にカビ熟成型チーズの製造時には、チーズ表面や内部に大量のカビを生育させるため、他の食品上に比べてカビの生育が STEC O157 の増殖や生残をより大きく促進する可能性がある。

そこで、本章ではチーズの製造モデル系における STEC O157 の挙動に *P. camemberti* および *P. roqueforti* が与える影響をカビの培養液および培養液中の物質に着目して検討した。すなわち、乳酸で酸性としたカビの培養液またはカビが生育する牛乳中での STEC O157 の増殖性に加え、乳酸で酸性としたカビの

培養ろ液中での本菌の低温下での生残性を、STEC O157 菌数の変化や損傷菌割合から調べた。

材料と方法

供試菌株および菌液の調整

STEC O157 の供試菌株として Table 1.1 に示した株を用いた。供試菌株における志賀毒素遺伝子 (*stx*) の有無の検索には、Wang ら (105) の方法を用いた。STEC O157 では菌株の由来や遺伝子型によってストレス抵抗性が異なる事が報告されているため (87, 101)、ヒトおよびウシから分離された様々な *stx* 型 (*stx* genotype) を示す菌株を用いた。志賀毒素遺伝子 (*stx*) は 1 型 (*stx1*) および 2 型 (*stx2*) に分けられ、*stx2* はさらに様々な変異型に分けられているため、本研究では、*stx2* の変異型を区別しない場合を「general-*stx*」と示し、*stx2c* や *stx2d* などの既知の変異型に当てはまらない *stx2* を「*stx2*」と示す。これらの菌株を、トリプトンソーヤブイヨン (TSB、Oxoid Ltd., Hampshire, UK) 中で 37°C で 20 時間培養し、供試菌液とした。

カビの供試菌株としてカマンベールチーズから分離された *P. camemberti* (C3-3 株) およびロックフォールチーズから分離された *P. roqueforti* (C10-1 株) を用いた。これらのカビを、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA、栄研化学株式会社、東京) 上で 25°C で 2~4 週間培養したものを実験に使用した。カビの孢子懸濁液としては、PDA 斜面培地上のコロニー表面を、1 ml の 0.05% Tween 80 (和光純薬株式会社、大阪) を加えたリン酸緩衝液 (PBS、日水製薬株式会社、東京) で洗浄した懸濁液を使用した (78)。孢子懸濁液中の孢子数の測定には、血球計算板 (サンリード硝子有限会社、埼玉) を用いた。

モデル 1: カビが STEC O157 の増殖に与える影響

カビが STEC O157 の挙動に与える影響を検討するために、本菌をカビの培養ろ液中およびカビの生育する牛乳中で培養し、STEC O157 菌数の変化を調べた (Fig. 1.1)。培養温度は STEC O157 およびカビの両者が増殖可能な 25°C とした。

(A) カビの培養ろ液中での STEC O157 の挙動

カビの培養液が STEC O157 の挙動に与える影響をスクリーニングするために、カビの培養ろ液 (spent culture) 中での STEC O157 の増殖を吸光度の変化で調べた (Fig. 1.1A.1)。カビの培養ろ液については、TSB 中で *P. camemberti* または *P. roqueforti* を培養して作製した。まず、乳酸 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis、

MO、USA) を用いて pH 5.0 とした TSB または乳酸無添加の TSB (pH 7.2) に *P. camemberti* または *P. roqueforti* の孢子懸濁液を最終濃度が 10^5 spores/ml となるように接種し、25°C で 4 日間振盪培養 (80 rpm; In Vitro Shaker、Shaker-LR、株式会社タイテック、埼玉) を行なった。培養後、カビの菌糸および孢子を孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (Millipore Corporation、Billerica、MA、USA) を用いて除去し、カビの培養ろ液とした。陰性対照としては、カビ未接種の TSB を孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したろ液を用いた。作製したカビの培養ろ液および陰性対照には、チーズ作製時の条件に近い、pH 4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 または 5.0 となるように乳酸を加えた。カビの培養ろ液および陰性対照を 200 μ l ずつ 96 穴マイクロプレートに分注後、STEC O157 を最終濃度が 10^3 CFU/ml となるように接種し、25°C で培養した。STEC O157 の増殖は、EL800 プレートリーダー (Bio-Tek Instruments Inc.、Winooski、VT、USA) を用いて 595 nm の波長における吸光度 (OD_{595}) で経時的に測定することによって調べた。本研究では、STEC O157 の増殖の指標として、誘導時間 (lag time) を用いた。 OD_{595} 値が 0.03 を越える時点から対数的な STEC O157 の増殖がみられたため、接種開始から OD_{595} 値が 0.03 となるまでの時間を OD_{595} による誘導時間 (λ_{OD}) とし、統計解析ソフト「R version 2.12.0」 (75) の drc 機能に含まれるロジスティックモデル (21) を用いて λ_{OD} を算出した。

吸光度の測定結果から、カビの培養ろ液による λ_{OD} の短縮作用が認められた pH で最もチーズの製造条件に近い pH 4.8 において、*P. camemberti* の培養ろ液が STEC O157 の増殖に与える影響を、菌数と pH を測定することによって詳細に検討した (Fig. 1.1A.2)。カビの培養ろ液作製時の接種孢子数としては、 10^5 および 10^3 spores/ml の 2 条件を用いた。STEC O157 の供試菌株として、EC32 株を用い、本菌の最終濃度が 10^3 CFU/ml となるようにカビの培養ろ液に接種し、25°C で培養を行なった。培養 1、2、4 および 7 日目に STEC O157 菌数および pH を測定した。培養液の一部を PBS で 10 倍段階希釈後、トリプトンソーヤ寒天培地 (TSA, Oxoid) に塗抹し、37°C で 48 時間培養後のコロニー数から STEC O157 菌数を算定した。pH 測定には IQ240 pH メーター (IQ Scientific Instruments, Inc.、Carlsbad、CA、USA) を用いた。本実験を 3 回繰り返して行なった結果から、平均値と標準偏差を算出した。

(B) 酸性化した牛乳中での *P. camemberti* との共培養時の STEC O157 の挙動

カビの培養ろ液中で認められた、STEC O157 の増殖促進を食品中で検討するため、STEC O157 (EC32 株) と *P. camemberti* を牛乳中で共培養 (coculture) した。供試牛乳としては、乳酸菌などの微生物の影響を排除するために、UHT 殺菌後 (140°C、2 秒) 無菌充填された市販のロングライフ牛乳を用いた。実験前に、供試した牛乳の一部 (1 ml) を TSA に塗抹後、25 および 37°C で 7 日間培養し、無菌状態を確認した。

まず、カビによる STEC O157 の増殖促進が強くみられる pH を検討するために、乳酸を用いて pH を 4.1、4.3、4.5 または 4.6 とした牛乳中で共培養を行なった (Fig. 1.1B.1)。40 ml の牛乳中に STEC O157 および *P. camemberti* を最終濃度がそれぞれ 10^3 CFU/ml および 10^3 spores/ml となるように接種した。陰性対照としては、STEC O157 のみを接種した牛乳を用いた。接種後の牛乳を 25°C で培養し、STEC O157 菌数および pH を前述の方法で 28 日目まで経時的に測定した。

次に、カビによる STEC O157 の増殖促進が認められた、pH 4.5 において同様の実験を 3 回繰り返して行なった (Fig. 1.1B.2)。さらに、カビによる pH 上昇の影響を排除するために、乳酸を経時的に加えて pH を 4.5 に保つ条件を設けた。酸性化した牛乳中に、STEC O157 および *P. camemberti* を最終濃度がそれぞれ 10^3 CFU/ml および 10^3 spores/ml となるように接種した。牛乳を 25°C で培養し、STEC O157 菌数および pH を前述の方法で 28 日目まで経時的に測定した。

モデル 2: カビの培養ろ液が STEC O157 の生残に与える影響

カビ熟成型チーズでは製造初期に pH が 4.5 まで下降し、その後およそ 10°C で熟成が行なわれるため (34)、この条件において STEC O157 の挙動がカビの培養液から受ける影響を検討した。すなわち、STEC O157 を pH 4.5 とした *P. camemberti* または *P. roqueforti* の培養ろ液中に最終濃度が 10^4 CFU/ml となるように接種後、10°C で保持し、経時的に菌数を測定した (Fig. 1.2)。STEC O157 は、由来および *stx* 型の異なる EC32 および ESC211 株を用いた。接種後 0、7、14、21 および 28 日目に、試験液の一部を TSA に塗抹し、37°C で 48 時間培養後のコロニー数から STEC O157 菌数を算出した。STEC O157 菌数測定時には、試験液の一部をソルビトールマッコニー寒天培地 (SMAC, Oxoid) にも塗抹し、

37°C で 48 時間培養後のコロニー数から SMAC 上での菌数を算出した。SMAC 上には損傷を受けていない菌のみコロニーを形成すると考えられるため、TSA および SMAC 上での菌数から、STEC O157 の損傷菌割合を次の式から求めた (100):

$$\text{損傷菌割合} = 1 - \frac{\text{SMAC 上での菌数}}{\text{TSA 上での菌数}}$$

また、 D 値は次の式から求めた:

$$D \text{ 値} = -\frac{1}{\text{傾き}}$$

ここでの傾きは、TSA での菌数から求められた死滅曲線の直線回帰式の傾きを示す。本実験を 3 回繰り返して行なった結果から、平均値と標準偏差を算出した。

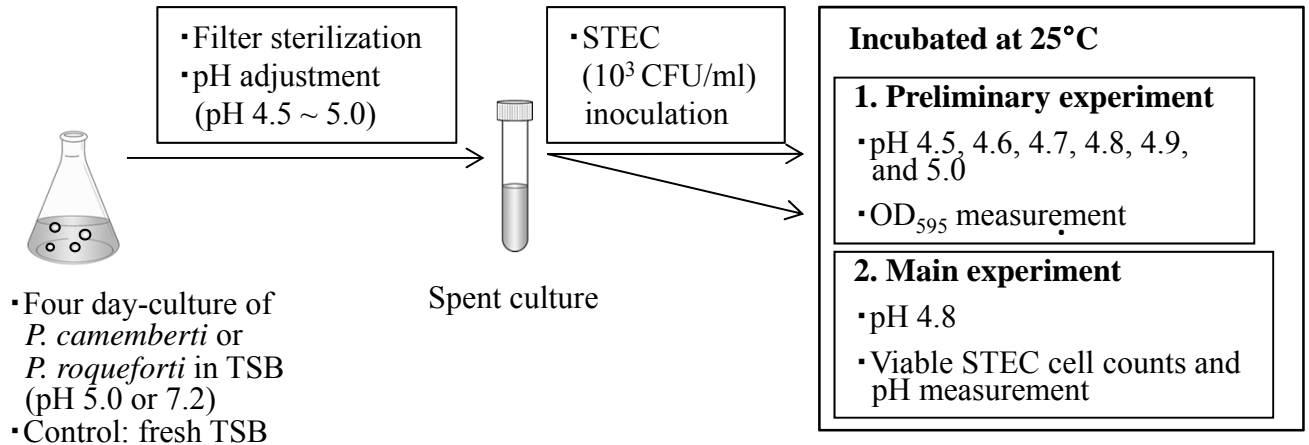
***P. camemberti* 培養ろ液の熱処理**

カビの培養ろ液中に存在すると考えられる STEC O157 の増殖促進原因物質の耐熱性を明らかにするために、pH 4.8 とした *P. camemberti* の培養ろ液を 95°C で 15 分間加熱した。加熱後のカビの培養ろ液に STEC O157 EC32 株を最終濃度が 10^3 CFU/ml となるように接種し、25°C で培養し、STEC O157 菌数および pH をモデル 1 での方法にしたがって測定した。本実験を 3 回繰り返して行なった結果から、平均値と標準偏差を算出した。

統計解析

本章では全ての統計解析で、対応のないスチューデント t 検定を用いた。有意水準 (α) は 0.05 とした。

(A) Behavior of STEC O157 in the spent culture of the mold



(B) Behavior of STEC cocultured with *P. camemberti* in acidified milk

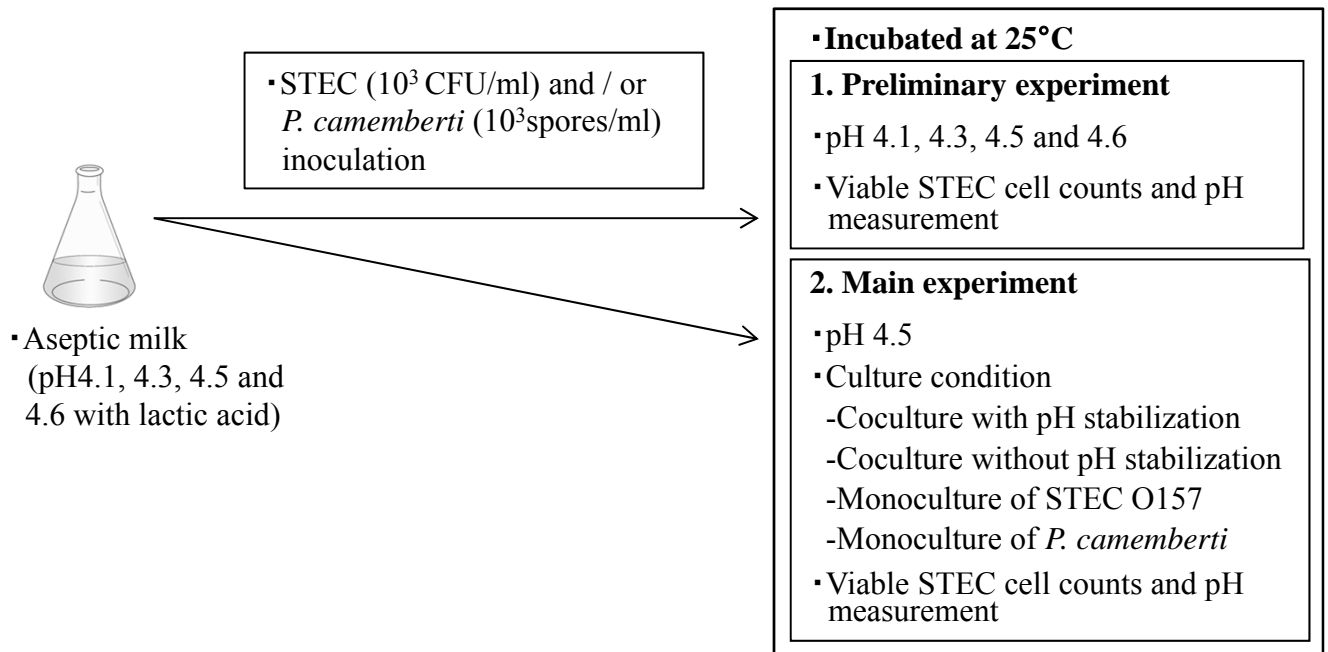


Fig. 1.1. Experimental model 1: Evaluation of the effect of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* on the growth of STEC O157.

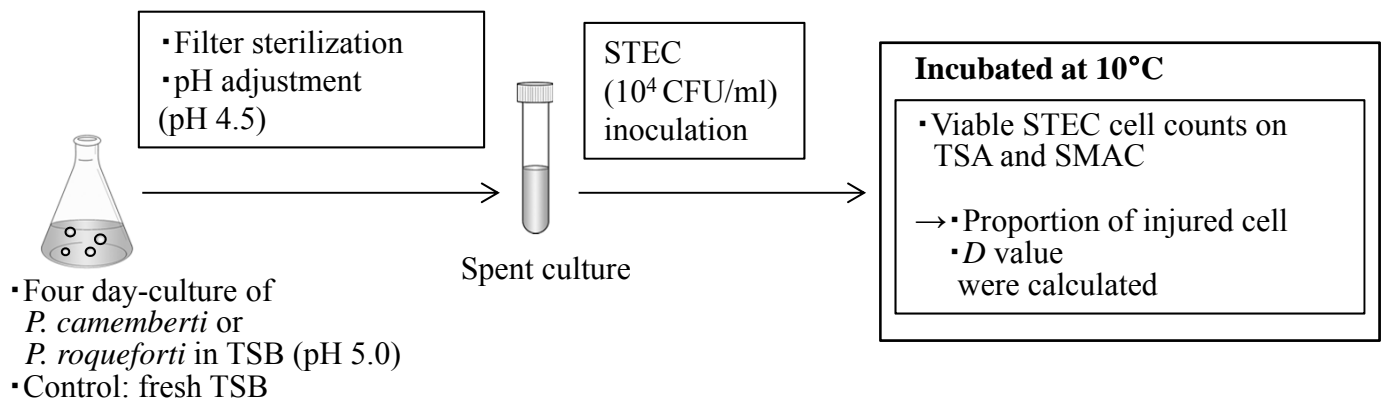


Fig. 1.2. Experimental model 2: Evaluation of the effect of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* on the survival of STEC O157.

Table 1.1. STEC O157 strains used in this study

Strain	Source	<i>stx</i> genotype
EC1	Human	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>
EC32	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>
EC70	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>
EC160	Cattle feces	<i>stx2</i>
ESC211	Cattle feces	<i>stx2c</i>
ESC213	Cattle feces	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>
ATCC43890	Human	<i>stx1</i>
ATCC43895	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>

結果

モデル 1: カビが STEC O157 の増殖に与える影響

乳酸を加えて酸性としたカビの培養ろ液および対照 (TSB ろ液) のいずれにおいても、STEC O157 の増殖は pH 4.8 以上でみられた (Table 1.2)。 *P. camemberti* の培養ろ液中では、pH 4.8 では 2 株、pH 5.0 では 1 株を除いて、全ての菌株において STEC O157 の λ_{OD} が対照と比べて有意に ($P < 0.05$) 短縮した (Table 1.2)。 *P. roqueforti* の培養ろ液中では、pH 5.0 では全ての菌株において STEC O157 の λ_{OD} が対照と比べて有意に短縮したが、pH 4.8 および 4.9 では、それぞれ 6 株および 4 株でのみ λ_{OD} の短縮がみられた (Table 1.2)。一方、乳酸を加えない TSB (pH 7.2) でカビを培養して作製した培養ろ液中では、pH 5.0 では全ての STEC O157 においては対照と比べて有意に短い λ_{OD} がみられたが、pH 4.8 および 4.9 では対照と比べて同等か、有意に長い λ_{OD} がみられた (Table 1.2)。STEC O157 の λ_{OD} の短縮は、*P. camemberti* においてより広い pH で認められたため、モデル 1 の以下の実験は、*P. camemberti* に着目して行なった。上記実験でみられたカビの培養ろ液による STEC O157 の λ_{OD} の短縮を、より詳細に評価するために pH 4.8 のカビの培養ろ液中での STEC O157 菌数および pH を測定した (Fig. 1.3)。カビの培養ろ液中では、STEC O157 菌数は、培養 2 日目から増加し、最大で 10^8 CFU/ml まで達した (Fig. 1.3)。一方、カビ未接種の TSB ろ液中では、培養 7 日目にわずかな菌数の増加のみみられた。また、 10^5 spores/ml のカビを接種して作製した培養ろ液中では、 10^3 spores/ml のカビを接種して作製した培養ろ液中での培養に比べて、培養 2 日目の菌数が有意に高く ($P = 0.007$)、誘導時間が有意に短かった ($P = 0.04$)。pH は、STEC O157 が増殖した場合のみ上昇した (Fig. 1.3)。

乳酸を加えて酸性とした牛乳中では、*P. camemberti* との共培養時には STEC O157 の増殖は、pH 4.3、4.5 および 4.6 で認められたが (Fig. 1.4A)、STEC O157 単独培養時には、pH 4.6 でのみ STEC O157 の増殖が認められた (Fig. 1.4B)。共培養時には、pH は 7 日目から上昇しており、pH 4.3 および 4.5 における STEC O157 菌数の増加は、pH の上昇とほぼ同時に認められた。pH 4.1 および 4.6 では、共培養時と単独培養時との間で STEC O157 の挙動に差は認められなかった。さらに、pH 4.5 において経時的な乳酸添加によって pH を一定に保持しながら共培養を行なった場合にも、STEC O157 の増殖が認められた (Fig. 1.5)。STEC O157

菌数は、pH 調整を行なわなかった場合には 4 日目から、pH 調整を行なった場合には 7 日目から増加した。培養 14 日目以降には、共培養中の STEC O157 菌数は、対照と比べて有意に高かった ($P < 0.01$)。また、培養 21 および 28 日目の STEC O157 菌数は、pH 調整を行なわなかった場合の方が pH 調整を行なった場合よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。培養時の pH の上昇は、*P. camemberti* を接種した場合のみ認められた (Fig. 1.5)。特に STEC O157 と *P. camemberti* との共培養時 (pH 調整なし) の pH は、*P. camemberti* 単独培養時と比べて高く、培養 14、21 および 28 日目には、その差は有意であった ($P < 0.05$) (Fig. 1.5)。

モデル 2: カビの培養ろ液が STEC O157 の生残に与える影響

P. camemberti および *P. roqueforti* の培養ろ液中では、培養 7 日目の STEC O157 の損傷菌割合は対照と比べて有意に低かった (Table 1.3)。その後、多くの菌が損傷し、有意な差は検出されなかった。*D* 値においても、カビの培養ろ液中での培養時には、*P. camemberti* の培養ろ液中での EC32 株を除いて、有意に高い値が認められた (Table 1.3)。

P. camemberti 培養ろ液の熱処理

加熱処理後のカビの培養ろ液中では、STEC O157 菌数は培養 2 日目から増加した。加熱処理を行っていないカビの培養ろ液中で STEC O157 (EC32 株) を培養した場合と比べると、培養 2 日目には加熱処理したろ液中の方では菌数が有意に高かったが ($5.4 \log_{10}\text{CFU/ml}$, $P < 0.001$)、培養 1, 4 および 7 日目の菌数 (3.1 、 7.8 および $7.9 \log_{10}\text{CFU/ml}$) に有意な差は認められなかった。

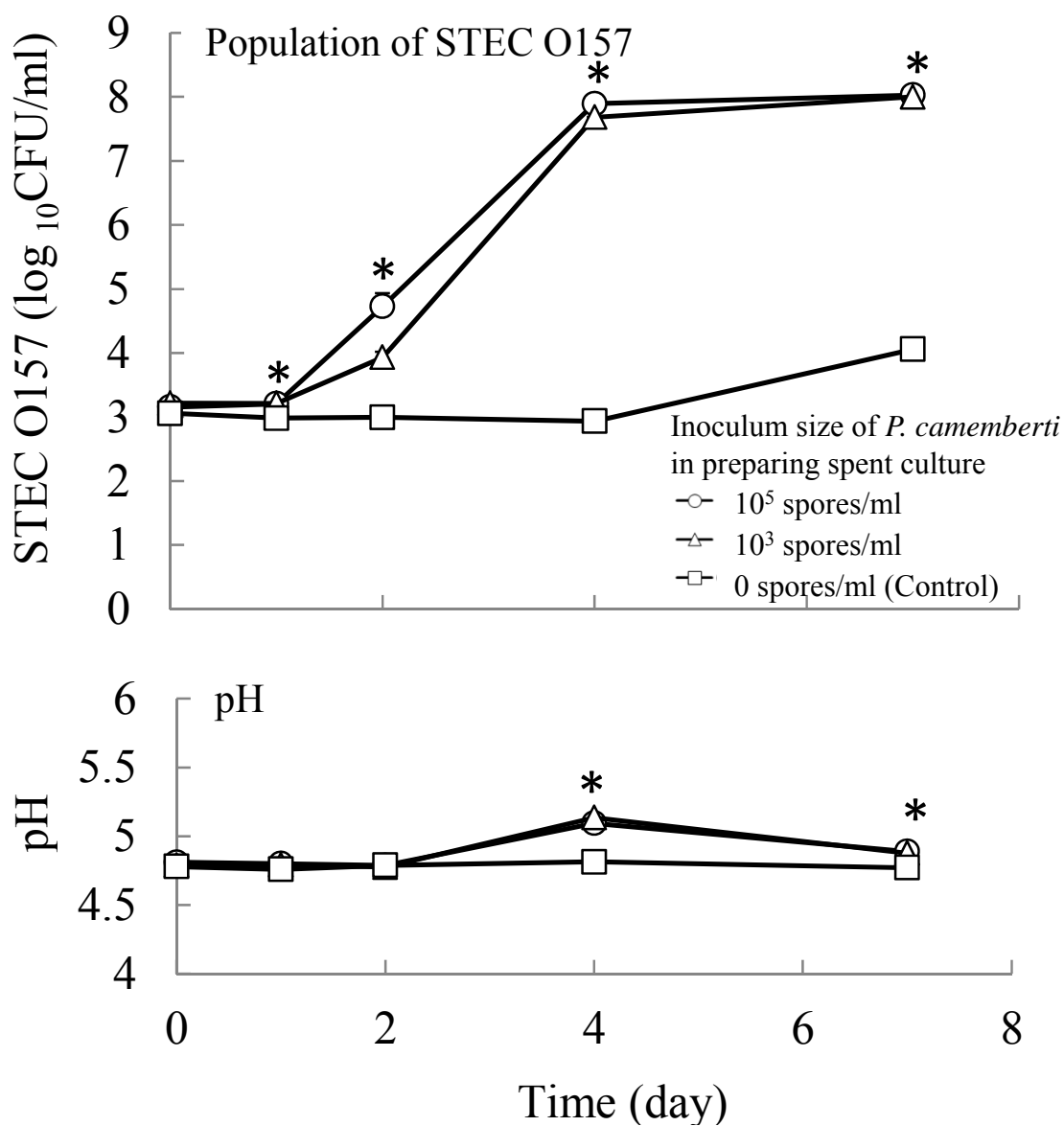
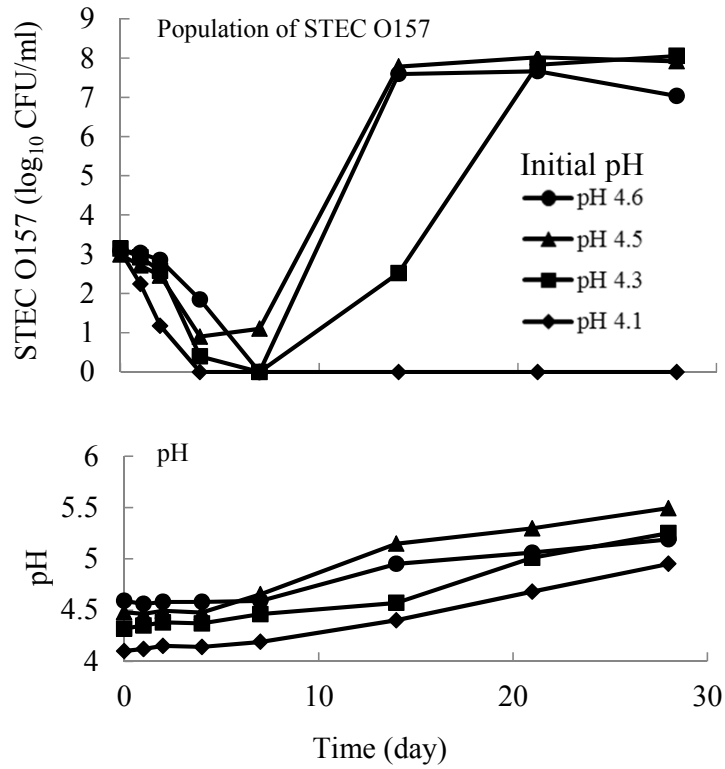


Figure 1.3. Change in population of STEC O157 and pH values in spent cultures of *Penicillium camemberti*. Each symbol represents mean of three trials and error bars represent the standard deviation. Asterisks represent the significantly ($P < 0.01$) higher values in spent culture prepared with 10⁵ and 10³ spores/ml compared to the control.

(A) Coculture of STEC O157 and *P. camemberti*



(B) Monoculture of STEC O157

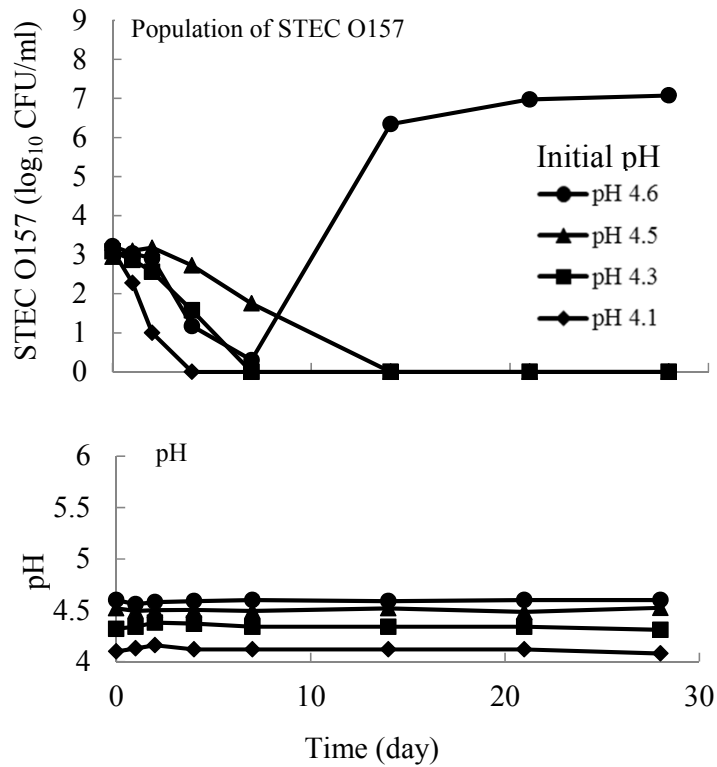


Figure 1.4. Change in population of STEC O157 and pH values of inoculated milk samples cocultured (A) with *Penicillium camemberti* or (B) without *P. camemberti*. Each symbol represents the result of one trial.

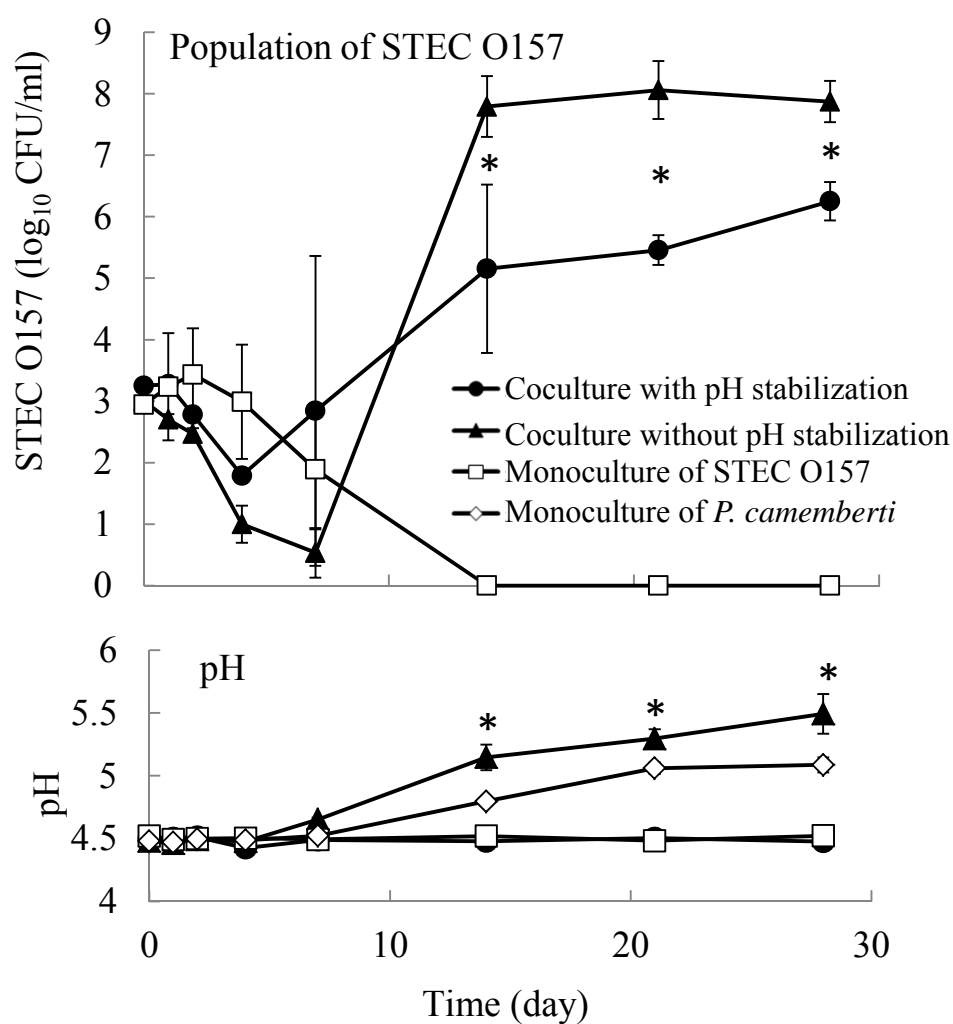


Figure 1.5. Change in population of STEC O157 and pH values of inoculated milk during coculture with *Penicillium camemberti*. Each symbol represents mean of three trials and error bars represent the standard deviation. Asterisks represent the significantly ($P < 0.01$) higher values in coculture with or without pH-stabilization compared to control (upper graph) and coculture without pH-stabilization and monoculture of *P. camemberti* compared to the control (lower graph).

Table 1.2. Lag time of STEC O157 growth (λ_{OD}) in spent culture of molds

Bacterial strain	pH ^a	λ_{OD} (h; mean \pm SD) in					
		<i>P. camemberti</i> ^b		<i>P. roqueforti</i> ^b		Control ^c	
		Acid ^d	Neutral ^d	Acid ^d	Neutral ^d		
EC1	5.0	27.1 \pm 1.0 ^e	25.9 \pm 1.6 ^e	24.4 \pm 1.4 ^e	25.2 \pm 0.9 ^e	34.3 \pm 1.6	
	4.9	41.2 \pm 3.6 ^e	61.8 \pm 0.9	41.6 \pm 2.3 ^e	62.3 \pm 1.8 ^e	53.5 \pm 0.7	
	4.8	57.4 \pm 3.3	NG ^f	NG	NG	56.8 \pm 10.6	
EC32	5.0	26.2 \pm 0.3 ^e	26.3 \pm 0.0 ^e	27.2 \pm 0.8 ^e	24.6 \pm 1.8 ^e	37.2 \pm 3.1	
	4.9	34.5 \pm 0.7 ^e	45.7 \pm 2.3	44.6 \pm 3.7	48.3 \pm 4.1	46.7 \pm 1.0	
	4.8	39.4 \pm 1.1 ^e	NG	NG	NG	56.9 \pm 3.9	
EC70	5.0	25.7 \pm 3.9	22.2 \pm 1.2 ^e	18.4 \pm 2.1 ^e	21.0 \pm 1.0 ^e	30.0 \pm 0.7	
	4.9	35.4 \pm 2.0 ^e	56.6 \pm 1.0 ^e	27.8 \pm 5.2 ^e	49.4 \pm 1.3	41.2 \pm 1.1	
	4.8	45.2 \pm 3.8 ^e	NG	35.5 \pm 2.4 ^e	NG	57.2 \pm 1.9	
EC160	5.0	24.2 \pm 0.9 ^e	18.4 \pm 0.5 ^e	17.3 \pm 0.6 ^e	17.1 \pm 0.9 ^e	30.0 \pm 3.3	
	4.9	35.2 \pm 0.5 ^e	46.0 \pm 1.3 ^e	25.8 \pm 3.6 ^e	40.8 \pm 2.0	40.1 \pm 0.2	
	4.8	39.2 \pm 2.1 ^e	NG	26.3 \pm 3.1 ^e	NG	50.9 \pm 2.5	
ESC211	5.0	24.7 \pm 1.3 ^e	25.9 \pm 1.7 ^e	20.0 \pm 1.6 ^e	24.7 \pm 1.3 ^e	31.2 \pm 2.7	
	4.9	40.9 \pm 0.7 ^e	56.7 \pm 1.7 ^e	34.7 \pm 0.5 ^e	53.6 \pm 1.9	45.6 \pm 0.5	
	4.8	56.2 \pm 8.9	NG	NG	NG	63.9 \pm 3.9	
ESC213	5.0	30.1 \pm 2.5 ^e	35.3 \pm 0.9 ^e	24.1 \pm 2.4 ^e	34.4 \pm 1.5 ^e	44.9 \pm 1.8	
	4.9	55.4 \pm 9.0 ^e	112.3 \pm 4.0 ^e	NG	101.6 \pm 10.1	68.9 \pm 9.8	
	4.8	74.6 \pm 18.2 ^e	NG	NG	NG	127.1 \pm 26.6	
ATCC43890	5.0	20.4 \pm 2.4 ^e	20.8 \pm 0.3 ^e	13.0 \pm 0.8 ^e	22.2 \pm 2.2 ^e	30.6 \pm 2.3	
	4.9	29.5 \pm 0.1 ^e	51.7 \pm 10.8	30.2 \pm 1.9 ^e	45.3 \pm 1.1	41.1 \pm 0.7	
	4.8	37.3 \pm 1.0 ^e	NG	36.0 \pm 3.7 ^e	NG	46.4 \pm 1.8	
ATCC43895	5.0	25.6 \pm 0.5 ^e	19.7 \pm 1.6 ^e	17.5 \pm 1.7 ^e	20.4 \pm 1.8 ^e	31.5 \pm 1.4	
	4.9	33.2 \pm 0.6 ^e	49.9 \pm 1.6	26.3 \pm 3.6 ^e	46.9 \pm 2.5	45.1 \pm 1.1	
	4.8	39.2 \pm 2.4 ^e	NG	29.4 \pm 5.0 ^e	NG	51.5 \pm 3.0	

^a No bacterial growth was observed below pH 4.7.^b Spent culture prepared by preinoculation of the mold.^c Prepared by filter sterilization of fresh TSB.^d Acid, spent culture was prepared by preinoculation of the mold to TSB acidified with lactic acid (pH 5.0); Neutral, spent culture was prepared by preinoculation of the mold to fresh TSB (pH 7.2).^e Significant difference ($P < 0.05$) compared to the control.^f NG, no growth.

Table 1.3. Proportion of injured cells and *D* values of STEC O157 in spent culture of molds

Bacterial strain	Mold species used for spent culture	Proportion of injured cells (mean \pm SD) at				<i>D</i> value (day; mean \pm SD)
		Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
EC32	<i>P. camemberti</i>	0.44 \pm 0.11 ^a	0.87 \pm 0.16	0.98 \pm 0.01	1 ^b	11.6 \pm 1.3
	<i>P. roqueforti</i>	0.43 \pm 0.09 ^a	0.81 \pm 0.13	0.99 \pm 0.01	1	19.2 \pm 1.4 ^a
	Control	0.63 \pm 0.06	0.69 \pm 0.00	0.96 \pm 0.02	1	10.7 \pm 1.0
ESC211	<i>P. camemberti</i>	0.41 \pm 0.10 ^a	0.72 \pm 0.16	1.00 \pm 0.01	1	17.1 \pm 0.7 ^a
	<i>P. roqueforti</i>	0.42 \pm 0.05 ^a	0.96 \pm 0.04	0.99 \pm 0.01	1	19.4 \pm 1.3 ^a
	Control	0.59 \pm 0.04	0.84 \pm 0.09	1	1	10.8 \pm 0.4

^a Significant difference ($P < 0.05$) compared to the control.

^b No viable cells were detected in SMAC and all the bacterial cells were regarded as injured.

考察

酸性下での STEC O157 の挙動がカビの培養液から受ける影響を検討したモデル 1 の実験のうち、カビの培養ろ液を用いた実験では、*P. camemberti* および *P. roqueforti* の培養ろ液が STEC O157 の λ_{OD} を短縮させる作用がみられた。特に *P. camemberti* の培養ろ液中で、STEC O157 の λ_{OD} の短縮が強く認められた。STEC O157 未接種時には、カビの培養ろ液の pH は変化しなかったことから、カビの培養ろ液による STEC O157 の増殖促進は、pH の上昇によらないことが明らかとなった。

カビの培養ろ液で明らかとなった STEC O157 の増殖促進が、チーズの製造条件で果たす役割については、酸性化した牛乳中での共培養実験において検討した (Fig. 1.4)。この結果、初期 pH が 4.3 および 4.5 においては、STEC O157 の増殖は単独培養時にはみられなかったが、*P. camemberti* との共培養時にはみられた。この STEC O157 の増殖開始と、牛乳の pH 上昇開始とは、ほぼ同時に認められた。チーズ製造時には、*P. camemberti* による乳酸の消費と、アンモニア産生の結果、pH が上昇するため (34)、本研究においても pH の上昇が STEC O157 の増殖に促進的に働いたと考えられる。カビによる pH の上昇が酸性の食品中で食中毒菌の増殖を促進させる現象は、STEC O157、*Salmonella* spp.、*Clostridium botulinum* および *L. monocytogenes* において報告されている (12, 18, 24, 78)。本研究では、カビによる食品の pH 上昇が、チーズの製造条件においても STEC O157 の増殖を促進することが明らかとなった。しかし、酸性とした牛乳中での共培養実験において、pH を一定に保った場合にも STEC O157 の増殖がみられたことから (Fig. 1.5)、同増殖促進には pH 以外の要因も働いていることが示唆された。この際、培養 7 日目までは STEC O157 菌数は減少したものの、14 日目には増殖が認められた。このことから、培養 7 日目までには、増殖を促進する物質が STEC O157 の挙動に影響を与えるほどには蓄積していなかったと考えられる。また、培養 28 日目の STEC O157 菌数は、pH 調整なしの検体で有意に高かったことから、カビによる pH の上昇は、共培養後期での STEC O157 菌数増加に寄与していることが示された。以上の結果から、酸性化した牛乳中での STEC O157 の増殖は、カビの生育による pH の上昇および pH 非依存性の作用によって促進されることが示された。

一方で、カビの存在下で STEC O157 は、pH の上昇を促進する作用が明らかとなった (Fig. 1.5)。すなわち、牛乳中での共培養時において、*P. camemberti* 単独培養の場合よりも pH が上昇することが示された。Aziza ら (6) は、*P. camemberti* と *G. candidum* の共培養下での同様の現象を報告している。この報告では、*P. camemberti* がタンパク質をペプチドやアミノ酸に分解し、*G. candidum* がさらにそれらを利用してアンモニアを産生するという協調的代謝が行なわれたことが示唆されている。本研究の実験では、STEC O157 が *G. candidum* と同様に *P. camemberti* の代謝物からアンモニアなどを産生したと考えられる。

モデル 1 での結果から、*P. camemberti* および *P. roqueforti* は食品中の pH を上昇させることに加えて、培養液中の物質が細菌の増殖可能な pH を広げ、細菌の増殖を促進することが示唆された。増殖促進は 25°C で認められたことから、食品が室温で保管された場合にこれらのカビが食中毒菌を増殖しやすくする危険性が示唆された。また、チーズなど低温で熟成、保管される食品においても管理不備のために温度が上昇する場合があります (4, 97)、そのような場合にも、食中毒菌のリスクを高める危険性がある。

青果類での腐敗カビによる食中毒菌の増殖促進作用では、pH 上昇に加えて食品成分の変化が、食中毒菌の増殖を促進する可能性が示唆されている (78, 104)。TSB や牛乳中においても、カビの発育による培養液の組成変化が、STEC O157 に対して保護的に働いた可能性が考えられる。しかし、カビの培養ろ液が pH 非依存的に食中毒菌の増殖および生残を促進する作用については、現在までにほとんど報告がなされていないため、その機序の解明が求められる。そこで本研究では、培養ろ液の加熱を行ない、加熱によっても *P. camemberti* の培養ろ液の増殖促進は不活化されないことを示した。このことから、増殖促進の原因は単一あるいは複数の易熱性の物質ではないことが示された。*P. camemberti* や *P. roqueforti* はチーズ熟成中に様々な揮発性物質、脂肪酸およびペプチドなどの低分子化合物を産生することが知られている (34, 45, 55, 56)。これらの物質は、発酵食品中で酵母から産生された場合、乳酸菌の増殖を促進することが知られている (33, 59)。*P. camemberti* や *P. roqueforti* の培養液中においても、これらの低分子化合物が STEC O157 に対して保護的に働く可能性が考えられる。特に、カビを中性の TSB で培養して作製したろ液には、このような作用が認められなかったため、カビが酸性下で産生する物質が STEC O157 の増殖促進に関与してい

ることが示唆された。*P. camemberti* および *P. roqueforti* の有する酵素のうち、酸性プロテアーゼでは至適 pH が 5.0 付近であるのに対して、メタロプロテアーゼやリパーゼなどの至適 pH は中性である (34)。これらの酵素の至適 pH に代表される、pH によるカビの代謝の差異が、STEC O157 の挙動にも影響を与える可能性が考えられる。

モデル 2 では、カビの培養液が低温下および酸性下での STEC O157 の生残性を高めることが示された。損傷菌割合がカビの培養液では、対照と比べて有意に低かったことから、カビの培養液が酸ストレス下の STEC O157 に保護的に作用し、STEC O157 の生残を促進したと考えられる。Bevilacqua ら (12) は、本研究と同様の STEC O157 の生残促進を *Fusarium* 属菌との共培養下で示しているが、詳細な機序については検討していない。有機酸は、酸ストレス下の大腸菌に保護的に働くため (113)、前述の STEC O157 の増殖促進のみならず、本菌の生残についても促進する可能性がある。チーズの製造時にも、カビの産生する有機酸などによる組成の変化は、STEC O157 の増殖および生残促進をもたらす可能性があり、今後質量分析などによって培養液の組成変化と STEC O157 の挙動との関連性について検討する必要がある。

また、STEC O157 の増殖および生残促進は、カビの菌種によって異なっていた。モデル 1 でみられた増殖促進は、*P. camemberti* がより強い作用を示し、モデル 2 でみられた生残促進は *P. roqueforti* がより強い作用を示した。*P. camemberti* および *P. roqueforti* は菌種および菌株によって、タンパク分解活性や脂肪分解活性が異なることが知られている (34, 45)。このような多様な代謝活性と食中毒菌への影響との関連性を明らかにすることは、STEC O157 の制御に有効な発酵スターター株などの特定につながると期待される。

以上の研究によって、チーズのカビスターターはチーズ製造時の条件に近い酸性下で、pH の上昇によってのみならず pH 非依存性の作用によって、STEC O157 の増殖および生残を促進することが明らかとなった。

小括

カビ熟成型チーズの代表的なカビスターターである *P. camemberti* および *P. roqueforti* が STEC O157 に与える影響を 2 つのモデル系を用いて評価した。モデル 1 ではカビの生育が STEC O157 の増殖に与える影響を、カビの培養ろ液および *P. camemberti* が生育する牛乳中で STEC O157 を培養することによって検討した。まず、8 株の STEC O157 をそれぞれ乳酸で酸性 (pH 4.5~5.0) とした *P. camemberti* または *P. roqueforti* の培養ろ液に接種し、25°C 下での菌数変化を経時的に測定した。この結果、pH 4.8、4.9 および 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。このような STEC O157 の増殖促進は、カビを酸性下で培養した場合の培養ろ液でのみ認められた。次に、*P. camemberti* と STEC O157 を酸性の牛乳中で共培養し、STEC O157 菌数および pH を測定した。STEC O157 菌数はカビとの共培養時には 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 を一定に保った場合にも、本菌の増殖促進は認められたため、pH の上昇以外の要因が示唆された。モデル 2 では、カビの生育が STEC O157 の低温下 (10°C) での生残に与える影響を検討するため、pH 4.5 のカビの培養ろ液中に 2 株の STEC O157 をそれぞれ接種し、経時的な菌数変化から *D* 値および損傷菌割合を算出した。この結果、カビの培養ろ液中ではいずれの STEC O157 株も損傷菌割合が低いことが認められた。また、*D* 値は、*P. roqueforti* の培養ろ液中ではいずれの STEC O157 の株も、*P. camemberti* の培養ろ液中では 1 株の STEC O157 において、対照と比べて高かった。さらに、カビの培養液による STEC O157 の増殖促進は、95°C で 10 分間加熱処理後の *P. camemberti* 培養ろ液によっても認められたことから、カビ自体によって産生された、またはカビの発育下で増加した有機酸などの耐熱性物質が本菌の増殖促進に関与する可能性が示された。これらの結果から、チーズのカビスターターは、チーズの製造条件に近い酸ストレス下での STEC O157 の増殖および生残を促進することが示された。

第二章

カビの菌糸を介した **STEC O157** の移動および

ストレス抵抗性

序論

第一章の結果から、食品中のカビは培養液中の成分を変化させることによって STEC O157 のストレス下での増殖性や生残性を高めることが明らかとなった。このようなカビの代謝が関与する影響に加えて、カビの菌糸による物理的な影響も、共存する細菌にとっては重要であることが一部のカビと細菌の組み合わせについて知られている (13)。カビは土壌や食品表面上においても発育し、細菌と比してコロニーを大きく広げることができる。また、菌糸が食品内部へ貫入することによって、食品深部への浸食を可能とする。このような土壌中や食品上でのカビのコロニーの広がりに伴って、共存する細菌はカビの菌糸へ附着し、増殖や鞭毛運動によってカビ菌糸上を移動することが報告されている (13, 48, 111)。カビの菌糸に沿った細菌の移動は、土壌菌である *Achromobacter* 属菌、*Bacillus* 属菌、*Pseudomonas* 属菌などにおいて報告されており、これら細菌の植物根への定着や土壌中での分布拡大に重要な役割を果たしているとされる (13, 48, 111)。チーズや青果類などの食品中では STEC O157 は限定的に存在している (5)。しかし、カビが表面に発育したメロンでは、*Salmonella Poona* が果肉深部に到達するという報告がなされており (77)、カビの存在によって細菌が食品上で広がる可能性について詳細に検討する必要がある。

また、細菌はカビ菌糸上でバイオフィルムを形成することが知られている (107)。細菌は、液体中での浮遊時とバイオフィルム形成時などの物質表面への付着時にはストレス抵抗性が変化するが (25, 50)、カビと共存する細菌のストレス抵抗性の変化については、詳細な研究はなされていない。

そこで本章では、これまでほとんど検討されてこなかった、STEC O157 がカビの菌糸から受ける物理的な影響を探究した。このために、食品関連カビの菌糸を介した STEC O157 の移動距離や増殖の有無を、共培養によって検討した。次に、緑色蛍光タンパク (GFP) で標識した STEC O157 を用いた蛍光観察によって、カビの菌糸上での本菌の局在を観察した。続いて、カビのコロニー上で共培養した後の STEC O157 のストレス抵抗性を、酸抵抗性試験によって評価した。

材料と方法

供試菌株および STEC O157 の運動性の評価

STEC O157 の供試菌株として、運動性株 [ATCC43895 株、患者由来、*stx1*・*stx2* の両遺伝子を保有 (*stx1*・*stx2* 保有)] および非運動性株 (ESC138 株、ウシ由来、*stx1*・*stx2c* 保有) を用いた。これらの菌株を、TSB 中で 37°C で 20 時間培養し、供試菌液とした。供試菌株の運動性は、Li ら (61) の方法を用いて測定した。すなわち、1% (w/v) のトリプトン (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)、0.5% (w/v) NaCl (和光純薬) および 0.3% (w/v) アガロース (Becton, Dickinson and Company) を含む平板培地 (直径 90 mm) の中心に STEC O157 を接種し、37°C で 24 時間培養後の STEC O157 の増殖地点と接種地点との距離を測定し、運動性の指標とした。

カビの供試菌株として、発酵食品の発酵スターターとして、*G. candidum* (C4-1 株)、*P. camemberti* (C3-3 株)、*Penicillium nalgiovense* (M3-1 株) および *P. roqueforti* (C10-1 株)、一般的な食品の汚染菌として、*Alternaria alternata* (TSY213 株)、*Aspergillus ochraceus* (TSY119 株)、*Cladosporium sphaerospermum* (TSY380 株)、*Collectotrichum* sp. (TSY208 株)、*Emmericella nidulans* (TSY100 株)、*Fusarium oxysporum* (TSY0965 株)、*Rhizopus* sp. (TSY79 株)を用いた。いずれの菌株も、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部で保存および継代されている株を用いた。これらのカビを、PDA 上で 25°C で 2 週間培養したものを供試菌とした。

カビのコロニー上での STEC O157 移動距離および菌数の測定

カビのコロニー上での STEC O157 の移動距離および菌数の測定を、Kohlmeier ら (48) の方法を一部改変して行なった (Fig. 2.1A)。まず、直方体型 (幅 40 mm × 長さ 10 mm × 高さ 10 mm) に切り出した PDA の端にカビを接種し、25°C で培養した。カビのコロニー径が 20 mm に到達した時点で、カビの接種地点と同じ場所に STEC O157 を 10⁶ CFU 接種した。これを 25°C で 7 日間共培養後、PDA の上面および側面を TSA 上にスタンプした。TSA を 37°C で一晩培養後の STEC O157 のコロニーの大きさを、本菌の移動距離とした。また、共培養後の PDA を細切後、PBS に懸濁した。懸濁液の一部を 10 倍段階希釈後 TSA に塗抹し、37°C で 48 時間培養後のコロニー数から STEC O157 菌数を算定した。本実験を 3 回繰

り返して行なった結果から、平均値と標準偏差を算出した。

カビのコロニー表面の疎水性評価

カビのコロニー表面の疎水性をアルコール濃度試験 (APT) (16) によって評価した。まず、カビを PDA 上に接種し、前述の実験でカビのコロニー径が 20 mm に到達するのに要した日数培養した。続いて、発育したカビのコロニー表面に、0 から 100% まで 2.5% 刻みに希釈したエタノール (Sigma-Aldrich) を 4 μ l 滴下し、5 秒以内にコロニー中に吸収された場合を陽性とした。陽性となったエタノール溶液のうち、最も低い濃度を疎水性の指標とした。

カビの菌糸上での STEC の局在観察

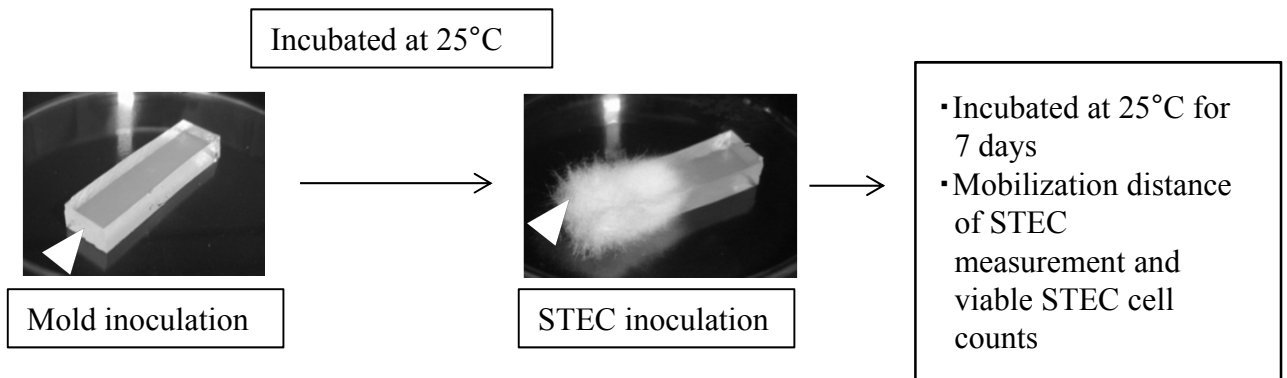
GFP 遺伝子が含まれるプラスミド (pAcGFP1; Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) を STEC O157 運動性株および非運動性株へ塩化カルシウム法 (85) を用いて導入した。GFP 標識 STEC O157 は、100 μ g/ml アンピシリン (和光純薬) 加ルリアーベルターニ寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) 上で 37°C で一晚培養後、コロニーを PBS に懸濁し、供試菌液とした。

底面に厚さ 0.1 mm のカバーガラスが貼付されたガラスベースディッシュ (旭硝子株式会社、東京) 中で、GFP 標識 STEC O157 とカビとの共培養を行なった (Fig. 2.1B)。PDA 中のグルコースが pAcGFP1 中の *lac* プロモーターを抑制し、その結果 *lac* プロモーターの下流に存在する GFP 遺伝子の発現を抑制することから、共培養にはグルコースを含まない TSA を用いた。まず、100 μ g/ml アンピシリン加 TSA 小片 (幅 10 mm \times 長さ 10 mm \times 高さ 10 mm) の上面にカビを接種し、25°C で培養した。カビの菌糸がガラスベースディッシュの底面に到達した時点で、カビの接種地点と同じ場所に GFP 標識 STEC O157 を接種した。これを 25°C で培養し、7 日間経時的に蛍光観察を行なった。蛍光観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D、オリンパス株式会社、東京)、100 倍油浸対物レンズ (UplanApo 100 \times 、オリンパス) および FLUOVIEW (オリンパス) を用いて行なった。GFP 標識 STEC O157 の観察には、青色光 (励起波長、488 nm; 蛍光波長、510 nm) を用いた。

カビのコロニー上で培養した STEC O157 のストレス抵抗性

カビのコロニー上で培養した STEC O157 のストレス抵抗性の変化を検討するために、共培養後の STEC O157 を酸抵抗試験に供試した。PDA 上で 25°C で 7 日間培養した *Collectotrichum* sp.、*E. nidulans*、*F. oxysporum*、*G. candidum*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* のコロニーに、STEC O157 を 10^8 CFU 接種した。陰性対照として、カビ未接種の PDA 上に同量の STEC O157 を接種した。さらに、カビの菌糸による影響と表面積の増加のみの影響とを区別するために、カビ未接種の PDA 上に置いた脱脂綿 (幅 20 mm × 長さ 40 mm × 厚さ 4 mm) 上に 10^8 CFU の STEC O157 を接種した (以下、脱脂綿対照と示す)。STEC O157 を接種した PDA を 25°C で 7 日間共培養した。共培養後の PDA を細切し PBS に懸濁した後に、試験管ミキサー (Automatic mixer S-100、タイテック) の最大速度で 30 秒間攪拌処理し、菌糸に付着している STEC O157 を脱離させた。この懸濁液 1 ml を採取し、 $4,000 \times g$ で 10 分間遠心分離後に、上清を除き、沈査を 1 ml の PBS に再懸濁した。遠心分離を再度繰り返した後に、沈査を 1 ml の PBS に再懸濁した液を菌液として用いた。菌液の一部を PBS で 10 倍段階希釈後、TSA および SMAC に塗抹し、37°C で 48 時間培養後に現われたコロニー数から損傷菌割合を、第一章で示した方法で算出した。酸抵抗性試験では、菌液を塩酸 (関東化学株式会社、東京) で pH 2.5 とした 100 倍量の 0.4% グルコース (和光純薬) 加最小 E 培地 (EG 培地) (103) 10 ml に最終濃度が 10^6 CFU/ml となるように接種した。EG 培地を 37°C で保持し、0 (接種時)、2 および 4 時間後に菌数を測定した。培養液の一部を PBS で 10 倍段階希釈後 TSA に塗抹し、37°C で 48 時間培養後に現われたコロニー数から菌数を算出した。算出された菌数から、*D* 値を第一章で示した方法で算出した。本実験を 3 回繰り返して行なった結果から、平均値と標準偏差を算出した。

(A) Bacterial mobilization distance measurement.



(B) Fluorescence microscopic observation of GFP tagged-STECC O157 on a mold colony.

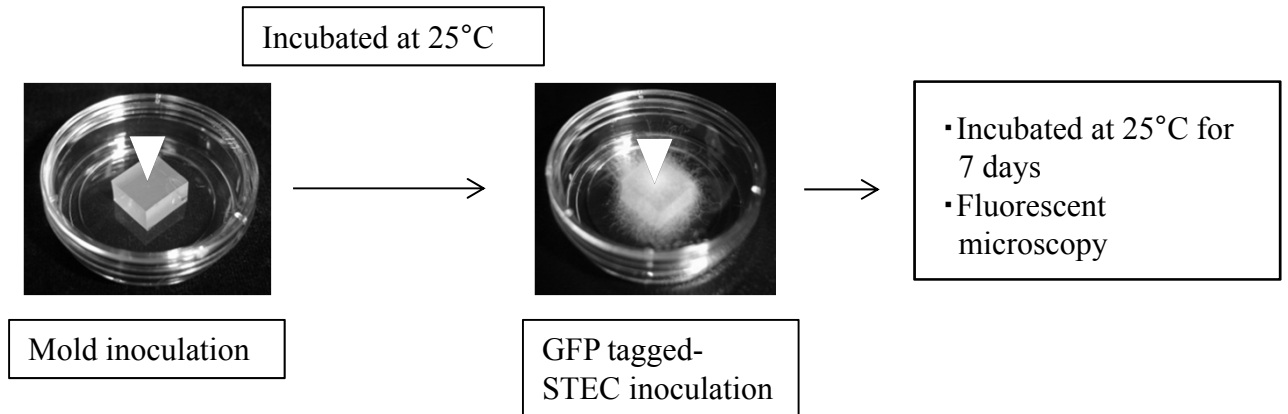


Fig. 2.1. Methods of (A) bacterial mobilization measurement and (B) fluorescence microscopic observations. For fluorescence microscopic observation, mold and STECC O157 were inoculated on TSA in glass base-dish, in which coverslip was attached to the base of a 35 mm polystyrene dish. Arrowheads indicate the point of mold or bacterial inoculation.

結果

STEC O157 の運動性の評価

0.3% アガロースを含む平板培地上で、STEC O157 の運動性株を 24 時間培養したところ、本菌は平板培地の辺縁 (中心から 45 mm) まで移動した。一方、STEC O157 の非運動性株では、接種後 24 時間での移動はまったく認められなかった。

カビのコロニー上での STEC O157 移動距離および菌数の測定

カビのコロニー上での STEC O157 の移動距離は、カビの菌種および STEC O157 の運動性の有無によって異なっていた (Table 2.1)。*Rhizopus* sp. のコロニー上での STEC O157 の移動距離は、供試したカビのうちで最も大きく、供試したいずれの STEC O157 株もカビのコロニーの先端部分まで移動した。*G. candidum* のコロニー上においては、STEC O157 の運動性の有無に関わらず STEC O157 の移動距離はカビコロニーの長径の 50%以上に達していた。*A. alternata*、*C. sphaerospermum*、*Collectotrichum* sp. および *F. oxysporum* のコロニー上では、STEC O157 の運動性の有無によって、カビのコロニー上での STEC O157 の移動距離が大きく異なっていた。運動性株の移動距離はカビのコロニーの長径の 50%以上に達していたのに対し、非運動性株の移動距離はカビのコロニーの長径の 50%以下に留まり、STEC O157 株間の移動距離の差は有意 ($P < 0.05$) であった。*P. nalgiovense* および *P. camemberti* のコロニー上では、いずれの STEC O157 の移動距離もカビコロニーの長径の 50%以下に留まっていた。*A. ochraceus*、*E. nidulans* および *P. roqueforti* のコロニー上では、STEC O157 の移動はまったくみられなかった。

移動距離測定に用いた PDA 上での STEC O157 菌数については、供試した STEC O157 株間で顕著な差は認められなかった (Table 2.1)。供試したカビのうち、*A. ochraceus* および *E. nidulans* を除く 9 菌種のコロニー上においては、STEC O157 菌数は接種菌数よりも有意に高い値 ($P < 0.05$) を示した。*E. nidulans* のコロニー上では、STEC O157 菌数は接種菌数よりも有意に低い値 ($P < 0.01$) を示した。*A. ochraceus* のコロニー上での STEC O157 菌数は、検出限界値未満 (< 10 CFU) であり、カビの存在が STEC O157 の死滅を促進したことが示された。

カビのコロニー表面の疎水性評価

カビの菌種による STEC O157 移動距離の違いについて検討するために、カビのコロニー表面の疎水性を APT によって評価した。*Collectotrichum* sp.、*F. oxysporum* および *P. camemberti* では、コロニー中心部と外縁部で疎水性が大きく異なっていた (Table 2.1)。STEC O157 の移動距離と疎水性との相関性を決定係数 (determination coefficient, R^2) で評価したところ、コロニー中心部および外縁部いずれの疎水性とも明らかな相関性はみられなかった (Table 2.1)。

カビの菌糸上での STEC の局在観察

カビの菌糸上での STEC O157 の局在を観察するために GFP 標識 STEC O157 をカビと共培養し、蛍光観察を行なった (Fig 2.2-4)。

STEC O157 の運動性株は、共培養 1 日目から *A. alternata*、*Collectotrichum* sp.、*G. candidum* および *Rhizopus* sp. の菌糸上で観察された (Fig. 2.2)。これらのカビ菌種は、STEC O157 の移動距離を測定した実験において、コロニー上での運動性株の移動距離が長かった菌種であった。STEC O157 は主にカビの菌糸上および菌糸間に形成された water film 中に観察された。water film 中では、浮遊または運動で移動している細菌が観察された。共培養 7 日目には、water film 中で浮遊している STEC O157 は少なくなり、菌糸上でのバイオフィーム様集落の形成が認められた (Fig. 2.2)。*F. oxysporum* および *P. camemberti* の菌糸上では共培養 3 日目に、カビの菌糸上に STEC O157 が観察されたが (Fig. 2.2)、その菌数はわずかであった。共培養 7 日目には、カビの菌糸上や菌糸間において STEC O157 のバイオフィーム様集落が観察された (Fig. 2.2)。*P. roqueforti* の菌糸上では、共培養 3 日目には、多くの STEC O157 が菌糸上に認められた (Fig. 2.2)。共培養 7 日目には、カビの菌糸上や菌糸間において STEC O157 のバイオフィーム様集落が観察された (Fig. 2.2)。*A. ochraceus*、*C. sphaerospermum*、*E. nidulans* および *P. nalgiovense* の菌糸上では STEC O157 は観察されなかった。

STEC O157 の非運動性株は、*Rhizopus* sp. および *G. candidum* の菌糸上では、運動性株と同様に、共培養 1 日目から菌糸上および菌糸間に多数の STEC O157 が観察された (Fig. 2.3)。*Collectotrichum* sp. の菌糸上では、STEC O157 が観察されるまでに 2 日を要したが、*Rhizopus* sp. および *G. candidum* の菌糸上と同様の挙動を示した (Fig. 2. 3)。*F. oxysporum* の菌糸上では、運動性株と同様に、共培養 3

日目から菌糸間に少数の STEC O157 が観察され (Fig. 2.3)、7 日目にはより多数の STEC O157 が観察された (Fig. 2.3)。非運動性株では、運動性株で STEC O157 が観察されなかったカビ菌種に加えて、*A. alternata*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* の菌糸上で、STEC O157 が観察されなかった。また、全てのカビ菌種において water film 中での STEC O157 の運動は認められなかった。

共培養 1 日目に STEC O157 が観察された *A. alternata*、*Collectotrichum* sp.、*G. candidum* および *Rhizopus* sp. では、カビ菌糸上および菌糸間に厚い water film が広範囲に形成されているのが観察された (Fig. 2.4)。一方で、*F. oxysporum* などでは、薄い water film のみが観察された (Fig. 2.4)。

カビのコロニー上で培養した STEC O157 のストレス抵抗性

PDA に発育したカビのコロニー上で STEC O157 を 7 日間培養した後に回収し、酸抵抗試験に供試した。本試験では、カビのコロニー上での STEC O157 移動距離が様々なカビ菌種を用いた。この結果、運動性および非運動性のいずれの STEC O157 においても、脱脂綿対照における *D* 値が対照よりも高い値を示した (Table 2.2)。運動性株では、*Collectotrichum* sp.、*G. candidum*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* との共培養後には、対照および脱脂綿対照と比べて有意に高い *D* 値を示した。*P. camemberti* および *G. candidum* との共培養後には、特に高い *D* 値を示した。*F. oxysporum* との共培養後には、脱脂綿対照と比べて有意に低い *D* 値を示したが、対照との差は認められなかった。*E. nidulans* との共培養後には、いずれの対照と比べても有意に低い *D* 値を示した。非運動性株では、運動性株と同様に *Collectotrichum* sp.、*G. candidum*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* との共培養後には、対照および脱脂綿対照と比べて有意に高い *D* 値を示した。*F. oxysporum* および *E. nidulans* との共培養後には、脱脂綿対照と比べて有意に低く、対照と比べて有意に高い *D* 値を示した。

損傷菌割合を比較したところ、運動性株では *D* 値が対照と比べて高かった *Collectotrichum* sp.、*G. candidum*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* との共培養後に、いずれの対照と比べても有意に低い損傷菌割合が認められた (Table 2.2)。しかし、対照と *D* 値の差が認められなかった *F. oxysporum* においても、損傷菌割合は対照と比べて有意に低かった。非運動性株においても、カビとの共培養後には対照と比べて損傷菌割合が低い傾向がみられたが、有意な差が認められた

のは *F. oxysporum* および *P. roqueforti* との共培養後のみであった。

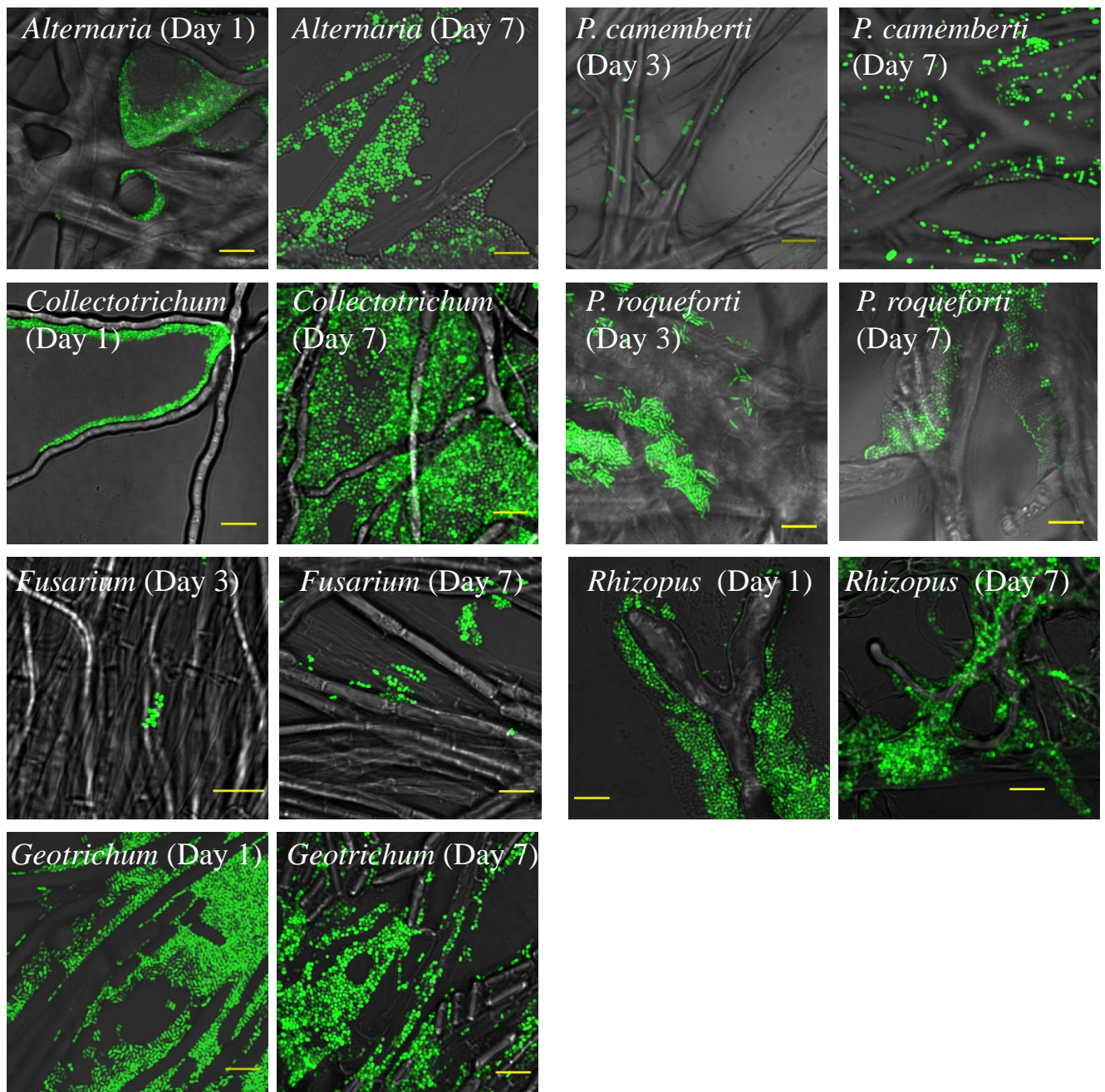


Fig. 2.2. Confocal laser scanning microscope analysis of various mold mycelia and colonization by a motile strain of STEC O157 ATCC43895 on mycelia of various molds at initial stage of coculture (day 1-3) and day 7 of coculture. GFP-tagged STEC O157, which here appear as green cells, were inoculated on two to seven-old mold colony on TSA. The size bars represent 8 μm in all panels.

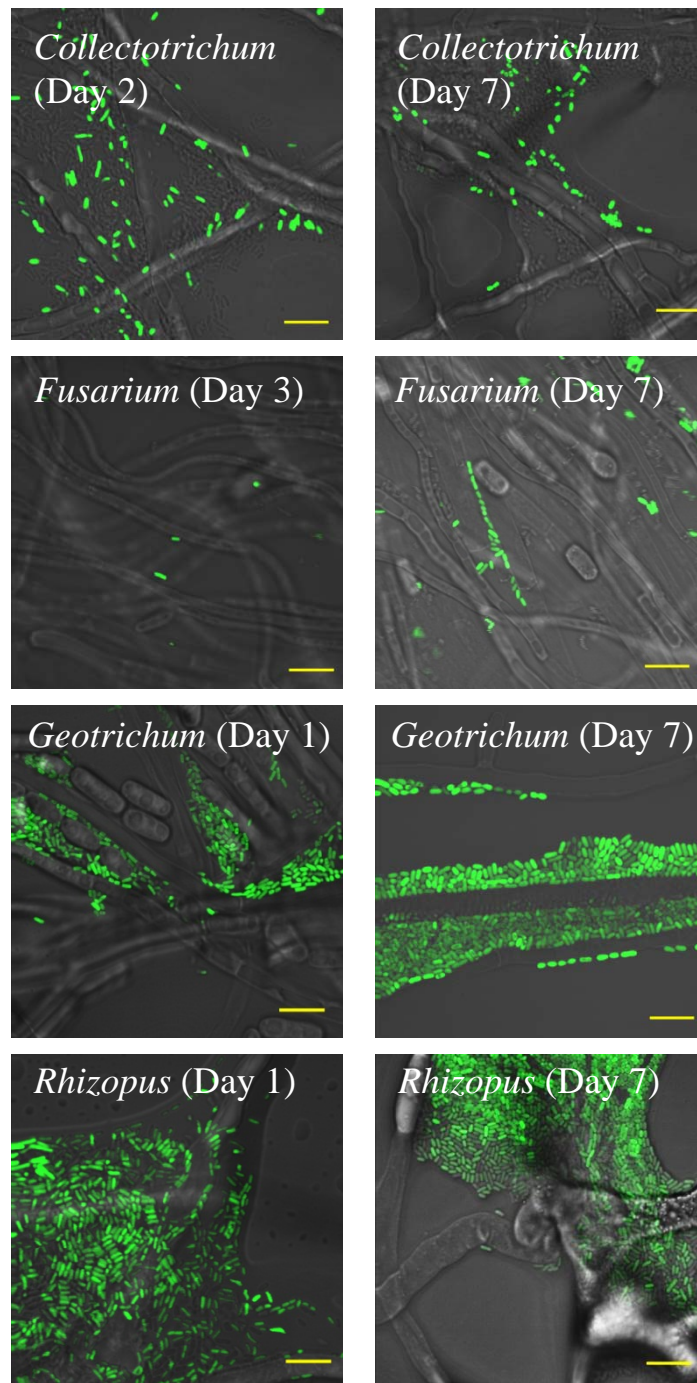


Fig. 2.3. Confocal laser scanning microscope analysis of various mold mycelia and colonization by a non-motile strain of STEC O157 ESC138 on mycelia of various molds at initial stage of coculture (day 1-3) and day 7 of coculture. GFP-tagged STEC O157, which here appear as green cells, were inoculated on two to seven-old mold colony on TSA. The size bars represent 8 μ m in all panels.

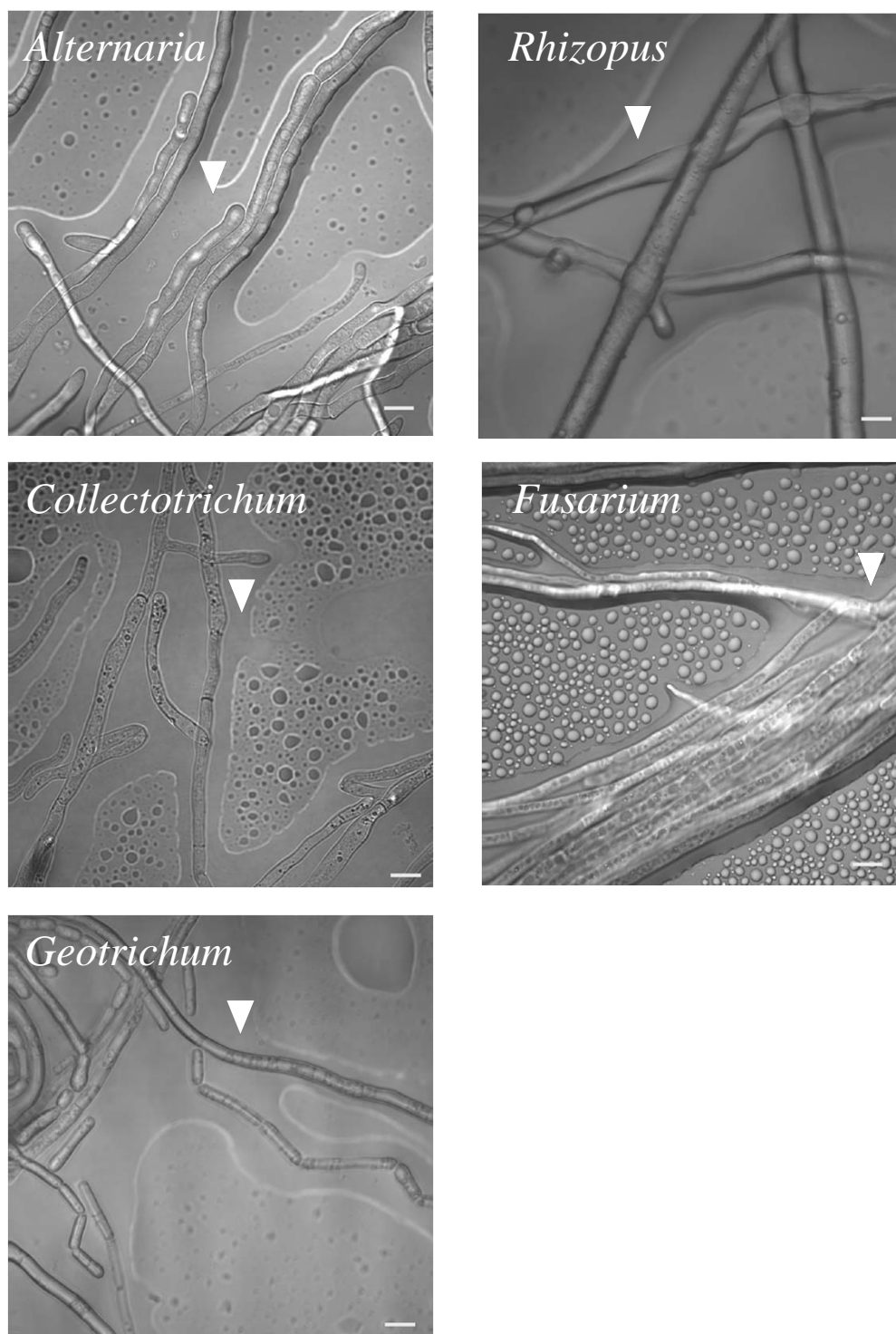


Fig. 2.4. Confocal laser scanning microscope analysis of mold mycelia and surrounding water film. The size bars represent 8 μm in all panels. Arrowheads indicate water film.

Table 2.1. Mobilization distance and number of viable cells of STEC O157 on PDA surface covered by various molds and hydrophobicity of molds measured by APT

Mold species	Day when the mold colony diameter reached to 20 mm ^a	Mold colony diameter (mm; mean \pm SD)	Maximum mobilization distance (mm; mean \pm SD)		Viable bacterial cells (log ₁₀ CFU; mean \pm SD)		Hydrophobicity of molds by APT (%) ^b	
			Motile ^c	Non-motile ^c	Motile ^c	Non-motile ^c	Outer ^d	Inner ^d
<i>Alternaria alternata</i>	6	40 ^e	40 ^f	10.7 \pm 5.5 ^f	8.6 \pm 0.4 ^g	8.3 \pm 0.2 ^g	17.5 ⁱ	15 ^j
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6	38.7 \pm 2.3	0	0	<1 ^{gh}	<1 ^{gh}	67.5	62.5
<i>Collectotrichum</i> sp.	4	40	35.3 \pm 5.7 ^f	5.0 \pm 4.6 ^f	8.6 \pm 0.2 ^g	8.1 \pm 0.1 ^g	17.5	2.5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	17	33.3 \pm 5.9	21.7 \pm 7.6 ^f	3.3 \pm 0.6 ^f	7.8 \pm 0.6 ^g	7.6 \pm 0.1 ^g	42.5	42.5
<i>Emericella nidulans</i>	14	40	0	0	6.1 \pm 0.2 ^g	5.5 \pm 0.3 ^g	62.5	55
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	40	30.7 \pm 10.1 ^f	3.7 \pm 3.2 ^f	8.1 \pm 0.0 ^g	7.7 \pm 0.1 ^g	45	57.5
<i>Geotrichum candidum</i>	6	36.3 \pm 1.5	35.0 \pm 1.7	29.3 \pm 7.8	8.9 \pm 0.1 ^g	8.5 \pm 0.0 ^g	65	65
<i>Penicillium camemberti</i>	11	29 \pm 4.0	5 \pm 2.0	2.3 \pm 1.5	8.2 \pm 0.1 ^g	7.8 \pm 0.1 ^g	65	92.5
<i>Penicillium nalgiovense</i>	14	33.3 \pm 1.5	12.3 \pm 11.9	10.0 \pm 4.6	7.9 \pm 0.1 ^g	7.9 \pm 0.1 ^g	85	87.5
<i>Penicillium roqueforti</i>	8	38.3 \pm 1.5	0	0	8.1 \pm 0.1 ^g	8.1 \pm 0.0 ^g	60	62.5
<i>Rhizopus</i> sp.	4	40	40	40	8.2 \pm 0.2 ^g	8.1 \pm 0.1 ^g	55	55

^a STEC was inoculated on the day.

^b Minimum ethanol concentration that was infiltrated in a mold colony.

^c STEC O157 strains used. Motile strain, ATCC43895; non-motile strain, ESC138.

^d Zone in a mold colony where ethanol droplets were applied.

^e Mold or STEC reached to the opposite side of the inoculation point.

^f Significant difference ($P < 0.05$) between STEC strains by Student's t -test.

^g Significant difference ($P < 0.05$) compared to the inoculum size (the motile strain, 6.8 ± 0.1 ; the non-motile strain, 6.5 ± 0.1 log₁₀CFU) by Student's t -test.

^h Below detection limit.

ⁱ Determination coefficients, R^2 , between the hydrophobicity and maximum mobilization distance of STEC were 0.38 and 0.004 in the motile strain and the non-motile strain, respectively.

^j R^2 between the hydrophobicity and maximum mobilization distance of STEC O157 were 0.32 and 0.0003 in the motile strain and the non-motile strain, respectively.

Table 2.2. *D* value at pH 2.5 and proportion of injured cells of STEC O157 after coculture with various molds

Mold species	<i>D</i> value (h; mean \pm SD)		Proportion of injured cells (mean \pm SD)	
	Motile ^a	Non-motile	Motile	Non-motile
<i>Collectotrichum</i> sp.	1.40 \pm 0.10 ^{bc}	0.74 \pm 0.01 ^{bc}	0.31 \pm 0.14 ^{bc}	0.20 \pm 0.35
<i>Emericella nidulans</i>	0.23 \pm 0.02 ^{bc}	0.22 \pm 0.01 ^{bc}	0.52 \pm 0.27	0.60 \pm 0.07
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.80 \pm 0.03 ^c	0.22 \pm 0.01 ^{bc}	0.47 \pm 0.18 ^b	0.20 \pm 0.18 ^b
<i>Geotrichum candidum</i>	2.15 \pm 0.13 ^{bc}	0.69 \pm 0.03 ^{bc}	0.06 \pm 0.01 ^{bc}	0.27 \pm 0.24
<i>Penicillium camemberti</i>	3.40 \pm 0.38 ^{bc}	0.41 \pm 0.01 ^{bc}	0 ^{bc}	0.29 \pm 0.26
<i>Penicillium roqueforti</i>	1.62 \pm 0.13 ^{bc}	0.39 \pm 0.01 ^{bc}	0.10 \pm 0.07 ^{bc}	0.01 \pm 0.02 ^b
Control with cotton wool	1.12 \pm 0.05 ^b	0.35 \pm 0.01 ^b	0.68 \pm 0.03 ^b	0.56 \pm 0.48
Control	0.80 \pm 0.02	0.16 \pm 0.00	0.78 \pm 0.04	0.63 \pm 0.06

^a STEC O157 strains used. Motile strain, ATCC43895; non-motile strain, ESC138.

^b Significant difference ($P < 0.05$) compared to the control by Student's *t*-test.

^c Significant difference ($P < 0.05$) compared to the control with cotton wool by Student's *t*-test.

考察

本研究では、食品上で広く認められるカビの菌糸が、STEC O157 の分布を広げる役割を明らかにした。カビの菌糸に沿った STEC O157 の移動距離は、カビの菌種および STEC O157 の運動性に影響を受けていた。STEC O157 の移動および増殖との関係から、供試したカビは次のような 4 種のカテゴリーに分類された (Table 2.3): (A) STEC O157 の運動性の有無に関係なく本菌は大きく移動し、カビのコロニー上での本菌の増殖がみられる、*Rhizopus* sp. および *G. candidum*; (B) 運動性の STEC O157 のみが長い距離を移動するが、カビのコロニー上での STEC O157 の増殖は本菌の運動性の有無に関係なく認められる、*A. alternata*、*C. spheerospermum*、*Collectotrichum* sp. および *F. oxysporum*; (C) カビのコロニー上での STEC O157 の移動はわずかまたは認められないが、増殖は認められ、本菌の運動性による差異は明らかでない、*P. nalgiovense*、*P. camemberti* および *P. roqueforti*; (D) STEC O157 の運動性の有無に関係なく、本菌のコロニー上での移動および増殖が認められない、*A. ochraceus* および *E. nidulans*。

これまでに、カビの菌種による細菌の移動性の差異には、カビのコロニーの疎水性が重要な役割を果たしていることが報告されている (48)。しかし、本研究では STEC O157 の移動距離とカビのコロニーの疎水性との相関性はみられなかった。カビのコロニーは、表層の菌糸が疎な気中菌糸の層および深層の密な菌糸および浸出液からなるバイオフィーム層で形成されている (76)。本研究で用いたアルコール濃度試験は、カビのコロニー表層の疎水性を示すと考えられる。カビの菌糸の疎水性と細菌の移動性との関連性の評価には、カビのコロニーのより深層の疎水性を測定する必要があると考えられた。

カビのコロニー上での細菌の移動には、運動性を有する細菌が効率的に移動することが知られている (48, 110)。本研究では、STEC O157 の運動性株は非運動性株に比べてより長い距離の移動が認められたが、*Rhizopus* sp. や *G. candidum* などのコロニー上では非運動性 STEC O157 においても長い距離の移動が認められた。Kohlmeier らの報告では (48)、ラテックスビーズはカビの菌糸の伸長に伴って移動しないことが示されており、STEC O157 の非運動性株の移動には生物学的要因が働いていると考えられる。非運動性 STEC O157 株はカビのコロニー上の増殖がみられたため、菌糸上での増殖自体も移動に寄与していると考えら

れる。カビのコロニー上には、アミノ酸や多糖類に富むカビの死菌体や浸出液が存在するため、様々な細菌が増殖可能である (60, 95, 106)。このため、カビのコロニー上での細菌の増殖による移動は、他の病原菌においても広く認められる可能性が高い。対照的に、*A. ochraceus* および *E. nidulans* のコロニー上では、STEC O157 の増殖がみられなかった。これらの 2 菌種と近縁な *Aspergillus niger* のコロニー上においても STEC O157 の死滅が促進された (データ未掲載) ことから、*Aspergillus* 属菌および近縁なカビは、STEC O157 の増殖に対して抑制的に働くことが示唆された。

菌糸上での GFP 標識 STEC O157 の局在観察では、STEC O157 は菌糸上および菌糸間の water film 中で主に増殖していることが明らかとなった。Kohlmeier ら (48) は、カビの菌糸の伸長に伴う細菌の受動的な移動に加えて、カビの菌糸上および菌糸間に形成される water film 中での増殖や移動が、細菌の分布拡大に大きな役割を果たしていることを示している。共培養での移動距離測定において、STEC O157 の移動距離が長かったカビ菌種で広範囲に厚い water film がみられたことは、菌糸上の water film 形成が細菌の移動を促進することを裏付けている。今後、浸出液の産生量や菌糸表面の疎水性の定量によって、菌糸上および菌糸間での water film 形成能をより詳細に検討する必要がある。

一方、*C. sphaerospermum* および *P. nalgiovense* では、コロニー上での STEC O157 の移動がみられたものの、ガラスベースディッシュを用いた実験では GFP 標識 STEC O157 は菌糸上に認められなかった。また、*P. roqueforti* の菌糸上では STEC O157 の移動は認められなかったが、運動性 STEC O157 との共培養時の蛍光観察では *F. oxysporum* や *P. camemberti* との共培養時よりも多数の STEC O157 が認められた。カビは、用いる培地によって菌糸などの形態が大きく異なることから (86)、それぞれの実験で用いた PDA および TSA では、STEC O157 の挙動も異なる可能性が示された。このため、食品上におけるカビの菌糸上での STEC O157 の局在をさらに究明するためには、対象となる食品や類似した成分を含む培地を用いる必要性が示された。

ガラスベースディッシュ上でのカビとの共培養 7 日目には、*Rhizopus* sp. をはじめとする多くのカビの菌糸上でバイオフィーム様の STEC O157 集落が認められた (Fig 2.2、2.3)。様々な細菌において、液体中とバイオフィーム中では、ストレス抵抗性が異なることが知られている (25, 50)。そこで、カビのコロニー上

で7日間共培養した STEC O157 を酸抵抗性試験に供試したところ、*P. camemberti* などのカビとの共培養後の STEC O157 は、平板上で単独培養した場合と比べて高い酸抵抗性を有することが示された。本研究では PDA 上の脱脂綿中で STEC O157 を培養した場合でも、対照よりも高い酸抵抗性が認められたことから、固体表面積の増加のみでも STEC O157 の酸抵抗性を高めることが示された。この結果は、大腸菌が固体表面で増殖する場合に *rpoH* などのストレス抵抗性関連遺伝子の発現が増加する報告と一致する (20)。しかし、*Collectotrichum* sp.、*G. candidum*、*P. camemberti* および *P. roqueforti* と共培養した場合には、脱脂綿対照よりも高い抵抗性を有したため、STEC O157 の酸抵抗性の変化にはカビの菌糸による表面積の増加のみならず、他の生物的要因が働いていると考えられた。カビと共培養後の STEC O157 の損傷菌割合は、*D* 値との明らかな相関性は認められなかったため、カビが STEC O157 の損傷を抑制する影響と本菌のストレス抵抗性の変化との関連性は低いと考えられた。一方、共培養後に STEC O157 の酸抵抗性に変化が認められなかった *F. oxysporum* の菌糸上に形成された STEC O157 のバイオフィーム様集落は、他のカビの菌糸上よりも小規模であったため (Fig. 2.2、2.3)、カビの菌糸上でのバイオフィーム形成が、酸への抵抗性にも関与している可能性が示された。

カビの菌糸への付着時には、STEC O157 のストレス抵抗性以外の変化も起きている可能性がある。これまでに、細菌の産生するセルロースや III 型分泌装置が、カビの菌糸への付着に関与していることが報告されている (32, 108)。STEC O157 は植物の葉への付着の場合に III 型分泌装置を利用することが知られており (91)、付着やバイオフィーム形成に伴う生理的变化について、さらに検討する必要がある。

以上の結果から、STEC O157 はカビのコロニー上で、増殖や運動を行なうことによって、カビの菌糸に沿った移動をすることが明らかとなった。STEC O157 の移動距離や増殖性はカビの菌種によって異なっていたが、発酵食品のカビスターターおよび一部の腐敗関連カビでは、カビコロニー上での STEC O157 の移動や増殖が認められた。このため、チーズや青果類上にカビが発育する場合には、カビの菌糸上での STEC O157 の増殖や移動によって本菌の汚染が拡大する可能性がある。また、カビのコロニー上での共培養後での STEC O157 は、対照と比べて高い酸抵抗性を有していた。このような STEC O157 の生理的な変化は、

本菌の固体表面への付着やバイオフィルム形成などに関連していると考えられる。以上の結果および第一章で認められたカビによる STEC O157 の増殖および生残の促進から、食品上でのカビの発育は、ストレス下の STEC O157 に保護的に作用し、物理的に汚染を広げる可能性が明らかとなった。

Table 2.3. Variation in mobilization and growth of STEC O157 on various mold colonies

Category	Mold species	Mobilization of STEC O157		Growth of STEC O157 in the colony
		Motile ^a	Non-motile	
A	<i>Rhizopus</i> sp. <i>Geotrichum candidum</i>	++ ^b	++	+ ^c
B	<i>Alternaria alternata</i> <i>Collectotrichum</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	++	+	+
C	<i>Penicillium camemberti</i> <i>Penicillium nalgiovense</i> <i>Penicillium roqueforti</i>	+ or —	+ or —	+
D	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Emericella nidulans</i>	—	—	—

^a STEC strains used. Motile strain, ATCC43895; non-motile strain, ESC138.

^b ++, Maximum mobilization distance of STEC was more than 50% of the diameter of the mold; +, maximum mobilization distance of STEC was less than 50% of the diameter of the mold; —, no mobilization of STEC O157.

^c Viable STEC O157 cells after 7-day coculture. +, significantly ($P < 0.05$) higher values; —, significantly lower values, compared to the inoculum size.

小括

STEC O157 の挙動がカビの菌糸から受ける影響を探究するために、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 の移動距離が異なっており、特に運動性株の移動距離が長いことが認められた。しかし、カビのコロニー表面の疎水性と STEC O157 の移動距離との間では、明らかな相関はみられなかった。また、カビのコロニー上での STEC O157 菌数の変化を測定したところ、供試した 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、*Emmericella nidulans* のコロニー上では、STEC O157 菌数は接種菌数から減少し、*Aspergillus ochraceus* のコロニー上では検出限界値以下まで菌数が減少した。GFP 標識 STEC O157 とカビとを共培養し、蛍光観察を行なった結果、STEC O157 は主にカビの菌糸上および菌糸間に形成された water film 中に局在することが明らかとなった。このことから、カビ菌種間における菌糸上および菌糸間での water film 形成能の差が、STEC O157 の移動距離の差につながっている可能性が示された。また、カビのコロニー上で共培養した後の STEC O157 のストレス抵抗性の変化について調べるために、STEC O157 をカビのコロニー上で 7 日間共培養後に回収し、酸抵抗性試験に供試した。この結果、供試した 6 菌種のカビのうち、*P. camemberti* などの 4 菌種のカビと共培養した場合の STEC O157 は、平板上で単独培養した場合と比べて、より高い酸抵抗性を有することが認められた。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示唆された。以上、第一章の結果と考えあわせ、カビは生化学的および物理的な両側面から STEC O157 の増殖と生残を促進するものと考えられた。

第三章

STEC O157 のストレス抵抗性と遺伝子型との関連性

序論

第一章および第二章では、チーズや青果類で認められるカビスターターなどのカビの発育が、ストレス下での STEC O157 の増殖や生残を促進する作用が明らかとなった。カビが発育する食品のリスクをさらに分析するためには、STEC O157 のストレス抵抗性とヒトでの本菌感染症との関連性を明らかにする必要がある。STEC O157 ではウシが保有する複数の遺伝子型のうちの一部がヒトでの感染症発生に関与していることが知られている (29, 58)。したがって、STEC O157 感染症と関連する遺伝子型を明らかにし、それら遺伝子型間でストレス抵抗性を比較することによって、ストレス抵抗性と本菌感染症との関連性を明らかにできると考えられる。

しかし、日本で分離された STEC O157 株については、感染症と関連する本菌の遺伝子型について、統計的に検討した報告は少ない。そこで、STEC O157 の遺伝子型をヒト由来株とウシ由来株との間で比較することによって、本菌感染症と関連する遺伝子型を特定する必要がある。STEC O157 の遺伝子型別法としては、PCR 法による病原因子の検出、LSPA6 型別、制限酵素断片長多型、パルスフィールドゲル電気泳動法および multilocus variable-number tandem-repeat analysis などが用いられている (40, 98, 112)。これらの型別法の中でも、*stx* 保有状況による *stx* 型別および LSPA6 型別がヒト由来株およびウシ由来株の遺伝子型を分けるためには適している。*stx* は STEC O157 において最も重要な病原因子であり、特に *stx2* を保有する STEC が STEC 感染症の重症化に関与していることが疫学的に明らかにされている (26)。対照的に、ウシからは *stx2c* 保有株が分離されることが多く、*stx* の保有状況はヒト由来株およびウシ由来株間で大きく異なる可能性がある。また、LSPA6 型別は大腸菌の比較ゲノム解析によって明らかとされた、3 つの系統 (lineage I、I/II および II) に STEC O157 の株を型別する方法である。LSPA6 型別では、遺伝子間領域などの遺伝的に中立な 6 つのマーカー領域に存在する、9~78 bp の挿入による多型を型別に用いる (47, 112)。LSPA6-lineage I (LI) はヒト由来株において高頻度でみられる一方、LSPA6-lineage II (LII) はウシ由来株において高頻度でみられる。また、LSPA6-lineage I/II (LI/II) は LI および LII の中間的な遺伝子型であるとされる (116)。LSPA6 型別に用いられるマーカー領域の多型は遺伝的に中立であると考

えられているため (112)、本型別の結果を加えることによって STEC O157 の遺伝的分化を反映した解析となる。これらの遺伝子型情報を、近年多くの病原菌において実用化されている疫学および集団遺伝学的手法を用いた解析 (14, 53, 73) に供することによって、ヒトでの STEC O157 感染症と関連する本菌の遺伝因子を明らかにできると考えられる。

一方、ストレス抵抗性の評価としては、単一のストレスに対する研究が多くなされているが、実際の食品中の病原菌の増殖抑制の場合には、比較的軽度な処理 (ハードル) を複数組み合わせるハードルテクノロジーが用いられている (44)。ハードルとしては、酸性、熱、低温などのストレスが用いられるため、複数のストレスに対する STEC O157 の抵抗性を検討することは、有効な制御法確立のために重要である。しかし、交差耐性などの 2 種のストレス抵抗性の関係性については検討されているものの (17, 57, 83)、3 種以上のストレス抵抗性を解析した報告は少ない。近年、主成分分析 (PCA) やクラスター分析などの多変量解析によって、複数のストレスへの抵抗性と微生物の由来および生息環境との相関性が明らかにされている (22, 51, 70, 92)。これらの多変量解析は、STEC O157 のストレス抵抗性と遺伝子型との関連性を明らかにする上でも有用であると考えられる。

そこで、本章では STEC O157 のストレス抵抗性と遺伝子型との関連性を明らかにするために、まず、*stx* を含む 5 種の病原因子の保有状況および LSPA6 型を、ヒトおよびウシから分離された STEC O157 菌株において明らかにした。得られた結果を重回帰ロジスティック分析などの疫学および集団遺伝学的手法を用いた解析に供試し、日本においヒトでの STEC O157 感染症と関連する本菌の遺伝子型を特定した。次に、様々な *stx* 型および LSPA6-lineage を含む STEC O157 を酸、熱、凍結融解、高浸透圧、酸化および飢餓ストレス抵抗性試験に供試し、それぞれのストレスへの抵抗性を算出した。この結果を PCA およびクラスター分析で解析し、遺伝子型との関連性について検討した。

材料と方法

供試菌株

遺伝子型別には、ATCC から入手した 5 株を含むヒト患者由来 78 株、ウシ由来 66 株を供試した。ATCC から入手した株以外は、日本において 1995 年から 2009 年の間に分離されたものである。ストレス抵抗性試験にはこのうち、ヒト由来 27 株およびウシ由来 30 株を用いた (Table 3.1)。

病原因子の検出および LSPA6 型別

テンプレート DNA として用いるために、STEC O157 菌株を 10 ml のルリアーベルターニ培地 (LB 培地、Becton, Dickinson and Company) 中で 37°C で一晩培養した培養液から Beige ら (8) の方法にしたがって DNA を抽出した。病原遺伝子である *stx1*、*stx2*、*stx2c*、*eae* および *ehxA* は、PCR によって検出した (88, 89, 105)。LSPA6 型別は Ziebell ら(116) の方法にしたがって行なった。各マーカー領域について、PCR での増幅産物のサイズから、LI 特異的なサイズ (アレル型) には 1、LII 特異的なアレル型には 2、その他のアレル型は任意の整数 (3 から 5) を割り当てた。増幅が見られなかった場合には 0 を割り当てた。割り当てた数字を以下のマーカー領域の順番で示したものを LSPA6 型 (LSPA6 genotype) とした: *folD-sfmA*、Z5935 遺伝子、*yhcG*、*rtcB*、*rbsB* および *arp-iclR*。LSPA6 型で 111111 となった株を LI、211111 となった株を LI/II、222222、221222、222212 および 221212 となった株を LII とした。

単回帰および重回帰ロジスティック分析

STEC O157 における由来と遺伝子型との関連を明らかにするために、統計解析ソフト「R version 2.11.1」 (75) の glm 機能を用いて、単回帰および重回帰ロジスティック分析を行なった。菌株の由来を結果変数とし、ヒト由来株では 1、ウシ由来株では 0 のダミー変数を割り当てた。説明変数としては、病原因子の保有状況および LSPA6 の 6 つのマーカー領域のアレル型を用いた。病原因子保有の場合は 1、非保有の場合は 0 のダミー変数を割り当てた。LSPA6 の 6 遺伝子のアレル型では、LI 特異的なアレル型に 1、その他のアレル型に 0 のダミー変数を割り当てた。重回帰ロジスティック分析では、R の stepAIC 機能を用いて、

統計モデルの選択基準である、赤池情報量 (AIC) を算出した。AIC が最大となるように、不適切な説明変数を除いたモデル式を構築し、最終的なモデルからオッズ比を算出した。

集団遺伝学的手法による解析

病原因子保有状況および LSPA6 型の情報を、3 種の集団遺伝学的手法による解析に供試した。まず、ヒト由来株およびウシ由来株間の遺伝的多様性の差を検討するために rarefaction 解析を ANALYTIC RAREFACTION version 1.3 (<http://www.uga.edu/strata/software/>) を用いて行なった。本解析は、異なるサンプルサイズの集団間の遺伝的多様性を比較するために用いられる (39)。作製される rarefaction カーブでは、より急な傾きを示す集団が、遺伝的多様性が高いことを示している。次に、rarefaction 解析でみられた遺伝的多様性の差を定量的に検討するために、ヒト由来株とウシ由来株との間での pairwise F_{ST} を ARLEQUIN version 3.5.1.2 (28) を用いて推定した。pairwise F_{ST} は遺伝的多様性の差の指標として用いられ、次のような解釈がなされる: pairwise $F_{ST} = 0 \sim 0.05$ 、遺伝的多様性の差が小さい; $0.05 \sim 0.15$ 、中程度; $0.15 \sim 0.25$ 、大きい; > 0.25 、非常に大きい (38)。最後に、供試菌株を遺伝的類似度にもとづきグループ分けするために、STRUCTURE (74) を用いたクラスター分析を行なった。本解析は、対象集団の遺伝子型がハーディー・ワインベルグ平衡となっていると仮定し、遺伝子型の情報から菌株を K 個のグループに分け、各株がそれぞれのグループに属する確率を算出する。マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) 解析のサンプリング回数としては、収束前の「burn-in」として 10,000 回、収束後として 100,000 回を設定した。グループ数は 1 から 10 まで、それぞれ 10 回の解析を行なった。最も適切なグループ数 (K) は、各解析で算出される対数確度 [log probability; $LnP(D)$] を用いた以下の式から、事後確率 [$Pr(X|K)$] が最大となるものを選択する (74)。

$$Pr(X|K) = \frac{e^{LnP(D)_k}}{e^{LnP(D)_1} + e^{LnP(D)_2} + e^{LnP(D)_3} \dots + e^{LnP(D)_{10}}}$$

ここでは、 $Pr(X|K)$ はデータ X におけるグループ数が K の場合の事後確率、 e は自然対数の底、 $LnP(D)_i$ ($i = 1-10$) はグループ数を i として解析を行なった場合の対数確度の値を示す。本研究では、10 回の解析における $LnP(D)$ の平均値を比較することによって、適切なグループ数を推定した。得られた結果から CLUMPP および DISTRUCT (43, 81) を用いて、図を作製した。

ストレス抵抗性試験

菌株を 10 ml の TSB 中で 37°C (Incubator MIR-262、三洋電機株式会社、大阪) で 20 時間培養したものを接種菌液とした。酸抵抗性試験では、菌液を塩酸 (関東化学) で pH 2.5 とした 100 倍量の EG 培地 10 ml に接種した。EG 培地は 37°C で保持し、0 (接種時)、2、6、8 および 12 時間後に生菌数を測定した。培養液の一部を PBS で 10 倍段階希釈後 TSA に塗抹し、37°C で 48 時間培養後に現われたコロニー数から生菌数を算出した。熱抵抗性試験では、菌液を 100 倍量の TSB 1.5 ml に接種し、52°C とした恒温槽 (Thermominder EX; タイテック) 中に保持した。0、2、4 および 6 時間後に、生菌数を前述の方法で測定した。凍結融解抵抗性試験では、菌液を 100 倍量の TSB 10 ml に接種した。1 回の凍結融解サイクルは、-20°C (Medicool MPR-411 FRS、三洋電機) で 22.5 時間保持後に 37°C で 1.5 時間の融解とした。0、1、2、4 および 7 サイクル後に、前述の方法で生菌数を測定した。高浸透圧抵抗性試験では、菌液を 100 倍量の 20% (w/v) NaCl (和光純薬) 溶液 10 ml に接種し、37°C で培養した。0、1、2、4 および 7 日後に、前述の方法で生菌数を測定した。酸化ストレス抵抗性試験では、菌液を 100 倍量の 1 mM H₂O₂ (和光純薬) 溶液 10 ml に接種し、37°C で保持した。0、2、4、6、8 および 12 時間後に、前述の方法で生菌数を測定した。飢餓ストレス抵抗性試験では、菌液を 4,000 × g で 20 分間遠心分離し、沈査を 10 ml の DW (Millipore) で洗浄した。この操作を 2 回行なった後に、沈査を 10 ml の DW で再懸濁し、25°C で保持した。0、7、14、21 および 28 日後に、前述の方法で生菌数を測定した。

死滅速度係数 (IRI) の算出と妥当性評価

供試菌株のストレス抵抗性を、1 つの変数で表すために、ストレス抵抗性試験の結果から log-hazard モデル (19) を利用して IRI を算出した。ストレス抵抗性試験時の生菌数は、対数的に減少していくと考えられる。このため、初期生菌数 (CFU/ml) を C_0 、試験開始後の時間を t_i 、STEC O157 の死滅速度を α とすると、 i 時間後における生菌数 C_i は、以下の式で表される。

$$\log C_i = \log C_0 - \alpha t_i \quad (1)$$

また、1 枚の TSA におけるコロニー数 μ_i は、 t_i および塗抹された菌液の希釈倍率 D_i から以下の式で表される。

$$\mu_i = D_i C_i \quad (2)$$

(1) および(2) の式を利用し、以下のモデルを構築した:

$$\log \mu_i = \log D_i + \log C_0 - \alpha t_i \quad (3)$$

このモデルでは、 α は死滅曲線の傾きであるため、負の値となる。各ストレス抵抗性試験で経時的に測定した生菌数を、「R version 2.11.2」の `glm` 機能に含まれる一般線形化モデルを用いて (3) の式に当てはめ、 α を算出した。 α は対数変換を行なった結果、多変量解析に適する正規分布となった。このため、 $\log \alpha$ を IRI として、以下の解析に使用した。 α は死滅曲線の傾きであるため、IRI は値が小さいほどストレスへの抵抗性が高いことを示す。

STEC O157 における遺伝子型間でのストレス抵抗性の比較

stx 型または LSPA6-lineage 間での IRI の差は、チューキーの方法で P 値を補正したスチューデントの t 検定の多重比較で検討した。

ストレス抵抗性試験における IRI の多変量解析

複数のストレスへの抵抗性パターンを明らかにするために、6 種のストレス抵抗性試験における IRI を主成分分析 (PCA) およびクラスター分析に供試した。

PCA は、元のデータを少数の主成分 (PC) に集約し、多変量データの概要を明らかにする方法として使用されている (102)。PCA には、R の `princomp` 機能を用いた。PCA では、まず各株の IRI に適切な重み (因子負荷量、 a_l) をつけ、以下の式から第 1 主成分 (PC1) における主成分得点 (PC score、 Z_l) を算出する:

$$Z_l = a_{l\text{acid}}x_{\text{acid}} + a_{l\text{freeze}}x_{\text{freeze}} + a_{l\text{heat}}x_{\text{heat}} + a_{l\text{osmotic}}x_{\text{osmotic}} + a_{l\text{oxidative}}x_{\text{oxidative}} + a_{l\text{starvation}}x_{\text{starvation}}$$

ここで、 a_l は各ストレスにおける因子負荷量 (factor loading)、 x は各ストレスにおける IRI を示す。この際、 a_l は、 Z_l の分散 (固有値) が最大となるように求められる。この結果、PC1 における因子負荷量や PC score は、元のデータが持つ分散をもっともよく説明する変数となる。次に、第 2 主成分 (PC2) における主成分得点 Z_2 を同様の方法で、かつ Z_l と無相関となるように算出する。この結果、PC2 における変数は、元のデータが持つ分散を PC1 の次によく説明するものとなる。この計算は、変数の数である第 6 主成分まで続けられる。しかし、PCA は累積寄与率 (cumulative proportion of variance) が 70%に達した場合や固有

値が 1 以上の主成分までの結果で解釈を行なうことが一般的である (42, 68)。因子負荷量の値は、変数間の相関関係を示すため、正負の符号が同一である場合、両者は正の相関を示している。また、主成分得点は各株の相対的な位置関係を示すもので、因子負荷量によってその解釈が決定される。さらに、PCA の結果から PCA biplot を作製した。PCA biplot では、各株が PC1 における主成分得点 (x 軸)、PC2 における主成分得点 (y 軸) にもとづきプロットされ、類似したストレス抵抗性パターンの株間の距離が近くなる。

クラスター分析は、R の cluster パッケージ中の partitioning-around-medoids clustering method (pam) (46) の機能を用いて行なった。本解析は、STEC O157 の各株を複数のストレスへの抵抗性パターンの類似度によって、クラスター化する方法である。作製された各クラスターの特徴を明らかにするために、クラスター間の IRI の差を、チューキーの方法で P 値を補正したスチューデントの t 検定の多重比較で検討した。

カビによる STEC O157 の増殖促進の遺伝子型による差異

カビによる STEC O157 の増殖促進の *stx* 型および LSPA6 lineage による差異について、第一章のモデル 1 の実験系を用いて比較した。すなわち、乳酸で pH 4.8、4.9 および 5.0 とした *P. camemberti* または *P. roqueforti* の培養ろ液に STEC O157 を最終濃度が 10^3 CFU/ml となるように接種し、25°C で培養し、吸光度の変化から λ_{OD} を算出した。カビ培養ろ液中での λ_{OD} と陰性対照である TSB ろ液中での λ_{OD} との比をカビによる増殖促進の指標とし、*stx* 型または LSPA6 lineage 間での差を比較した。供試菌株として Table 1.1 に示した 8 株を用いた。

Table 3.1. STEC O157 strains used in this study and their genotypic characteristics

Strain	Source	<i>stx</i> genotype	LSPA6 genotype ^a	LSPA6-lineage ^a
EC1	Human	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
EC10	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC157	Cattle	<i>stx2c</i>	211111	I/II
EC160	Cattle	<i>stx2</i>	211111	I/II
EC164	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
EC169	Cattle	<i>stx2c</i>	222212	II
EC170	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC175	Human	<i>stx2c</i>	212111	Other
EC18	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC181	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	221222	II
EC183	Cattle	<i>stx2c</i>	222212	II
EC28	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC32	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC33	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC37	Human	<i>stx2c</i>	222212	II
EC38	Human	<i>stx2c</i>	222212	II
EC42	Human	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
EC43	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC44	Human	<i>stx2</i>	231111	Other
EC45	Human	<i>stx2</i>	231111	Other
EC52	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
EC55	Human	<i>stx2</i>	111111	I
EC59	Human	<i>stx2c</i>	211111	I/II
EC66	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
EC70	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
ESC138	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
ESC206	Cattle	<i>stx2c</i>	211111	I/II
ESC209	Cattle	<i>stx2c</i>	222212	II
ESC211	Cattle	<i>stx2c</i>	222222	II
ESC213	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC214	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC215	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC216	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC219	Cattle	<i>stx2c</i>	211111	I/II
ESC220	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC222	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC223	Cattle	<i>stx2c</i>	212211	Other
ESC225	Cattle	<i>stx2</i>	211111	I/II
ESC226	Cattle	<i>stx1</i>	111111	I
ESC228	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
ESC229	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	222222	II
ESC231	Cattle	<i>stx2c</i>	221111	Other
ESC339	Cattle	<i>stx2c</i>	252211	Other
ESC340	Cattle	<i>stx2c</i>	222212	II
ESC342	Cattle	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I
ESC343	Cattle	<i>stx1</i>	111111	I
ESC344	Cattle	<i>stx2</i>	211111	I/II
ESC349	Human	<i>stx2</i>	211111	I/II
ESC356	Human	<i>stx2c</i>	221212	II
ESC360	Human	<i>stx2</i>	211111	I/II
ESC361	Human	<i>stx2</i>	111111	I
ESC362	Human	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
ESC367	Cattle	<i>stx2c</i>	221211	Other
ATCC35150	Human	<i>stx1</i>	111111	I
ATCC43889	Human	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	211111	I/II
ATCC43890	Human	<i>stx1</i>	111111	I
ATCC43895	Human	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	111111	I

^a The LSPA6 alleles were placed in the following order: *folD*-*sfmA*, Z5935 gene, *yhcG*, *rtcB*, *rbsB* and *arp-iclR*. Designation of LSPA6 lineage by LSPA6 genotypes were as follows: LI, 111111; LI/II, 211111; LII, 222222, 221222, 222212 and 221212.

結果

病原因子の保有および LSPA6-lineage の分布状況

供試菌株における *stx1*、*stx2*、*stx2c*、*eae* および *ehxA* の保有率および *stx* 型の分布を Table 3.2 に示した。ヒト由来株およびウシ由来株における *general-stx2* の保有率はそれぞれ 97.4%および 95.5%で、有意な差は認められなかった ($P = 0.66$)。しかし、*stx2* の変異型の保有率を算出すると、由来間で顕著な違いが認められた。ヒト由来株では、ウシ由来株と比べて *stx2* の保有率が有意に高く ($P < 0.00001$)、*stx2c* の保有率は有意に低かった ($P < 0.00001$)。供試した全ての菌株は *eae* を保有しており、97.2%の菌株は *ehxA* を保有していた。このため、*eae* および *ehxA* 保有率に由来による差はみられなかった。また、*stx* 型の分布は、ヒト由来株およびウシ由来株との間で大きく異なっていた。*stx1*・*stx2* 保有株はヒト由来株において有意に高率で検出された ($P < 0.00001$)。一方、*stx2c* 単独保有株および *stx1*・*stx2c* 保有株はウシ由来株において有意に高率で検出された ($P < 0.00001$)。LSPA6 型と LSPA6-lineage の分布を Table 3.3 に示した。ヒト由来株においては、69.2%が LI 株であり、次に LI/II 株が高頻度 (21.8%) でみられた。3 株の LII 株を除いたその他の株は、非定型的な LSPA6-lineage であった。これらの株の LSPA6 型は、LI および LI/II の LSPA6 型と 1 つのアレル型のみが異なっていたため、それぞれ LI および LI/II と近縁な遺伝子型と考えられた。一方、ウシ由来株においては、より多様な LSPA6 型が認められた。最も高頻度であったのは LII 株 (36.7%) であり、同等の頻度で LI/II 株 (33.3%) もみられた。ヒト由来株では、ウシ由来株に比べて LI の頻度が有意に高く ($P < 0.00001$)、LII の頻度が有意に低かった ($P < 0.00001$)。*stx* 型と LSPA6 型の分布を比較したところ、両者には強い相関関係がみられた (Table 3.3)。すなわち、LI 株は *stx1* 単独保有株、*stx2* 単独保有株および *stx1*・*stx2* 保有株からのみ構成されていた。一方で、LII 株は、*stx2c* 単独保有株および *stx1*・*stx2c* 保有株からのみ構成されていた。LI/II 株には、多様な *stx* 型の株が含まれていた。

単回帰および重回帰ロジスティック分析

ヒト由来 STEC O157 に特徴的な遺伝因子を解明するために、5 種の病原因子の検出結果と LSPA6 型別の結果をもとにした、ロジスティック回帰分析を行な

った。単回帰ロジスティック分析では、*eae* および *ehxA* を除く全ての遺伝因子で、ヒト由来株との有意な相関が認められた (Table 3.4)。しかし、重回帰ロジスティック分析で、遺伝因子間の交絡因子を調整した結果、*stx2* 保有および *fold-sfmA* の LI 特異的アレル型のみが最終的なモデルの説明変数として選択され、ヒト由来株と有意な相関を示したのは *stx2* 保有 ($P < 0.00001$) のみであった (Table 3.4)。

集団遺伝学的手法による解析

Rarefaction 解析の結果、ウシ由来株はより勾配の急な曲線を示したことから、ヒト由来株よりも遺伝的に多様であることが示された (Fig. 3.1)。遺伝的多様性の差を pairwise F_{ST} の算出によって統計的に評価したところ、ヒト由来株とウシ由来株との間での pairwise F_{ST} は 0.35 ($P < 0.001$) となり、両者の遺伝的多様性が大きく異なることが示された。STRUCTURE によるクラスター分析の結果、グループ数を 1 から 10 として解析した場合の対数確度から適切なグループ数は 3 であることが示された (事後確率 = 0.95)。グループ数を 3 とした場合の解析結果を Fig. 3.2 に示す。各グループにおける、典型的な遺伝子型は次のようであった: グループ 1 (Fig. 3.2 における白色部分)、*stx1*・*stx2* 保有の LI 株; グループ 2 (灰色部分)、*stx2c* 単独保有または *stx2*・*stx2c* 保有の LI/II 株; グループ 3 (黒色部分)、*stx2c* 単独保有または *stx1*・*stx2c* 保有の LII 株。ヒト由来株では、3 株を除く全ての株はグループ 1 および 2 に分類された。一方、ウシ由来株はグループ 1 および 2 に加えて、グループ 3 にも多くの株が分類された。ヒト由来およびウシ由来株における同一グループ間の pairwise F_{ST} を算出したところ、グループ 1 では 0.19 ($P = 0.009$)、グループ 2 では 0.08 ($P = 0.045$) であった。このため、同一のグループに属する株においても、由来が異なる株では遺伝的多様性に差がある可能性が示唆された。

IRI の算出および妥当性評価

IRI は、6 種のストレス抵抗性試験から得られた (Table 3.5)。IRI は死滅曲線の傾きから求められたものであるが、対数変換を行なったため、正および負の値をとることとなった。IRI は対数変換の結果、多変量解析に適する正規分布となった。IRI の平均値および標準偏差は、ストレス抵抗性試験ごとに異なっていた。

したがって、ストレス抵抗性試験間での分散の差の影響を排除するために、各 IRI をストレス抵抗性試験ごとに平均 0、分散 1 となるように標準化 (72) した後に、多変量解析に供試した。

STEC O157 における遺伝子型間でのストレス抵抗性の比較

由来および遺伝子型間での IRI の差を多重比較によって検討した。ヒト由来株およびウシ由来株間では、IRI に有意な差は認められなかった。しかし、遺伝子型間では、熱および飢餓ストレス抵抗性において有意な差が認められた。*stx1*・*stx2* 保有株は *stx1*・*stx2c* 保有株に比べて有意に高い熱抵抗性 ($P = 0.011$) および *stx2* または *stx2c* 単独保有株に比べて有意に高い飢餓ストレス抵抗性を示した (*stx1*・*stx2* vs. *stx2*、 $P = 0.019$; *stx1*・*stx2* vs. *stx2c*、 $P = 0.011$)。LI および LI/II 株は LII 株に比べて有意に高い熱抵抗性を示した (LI vs. LII、 $P = 0.005$; LI/II vs. LII、 $P = 0.015$)。また、LI 株は LII 株に比べて有意に高い飢餓ストレス抵抗性を示した ($P = 0.024$)。

ストレス抵抗性試験における IRI の多変量解析

PCA では、PC1 および PC2 の寄与率 (proportion of variance) はそれぞれ 45.8 および 22.1%であった (Table 3.6)。分散の大部分 (67.9%) がこれらの主成分中に含まれ、他の主成分では固有値が 1 以下であったため、これら 2 つの主成分に着目して解析を行なった。PC1 における因子負荷量は、全ての変数において負の値であった (Table 3.6)。このことから、PC1 における主成分得点は大きい値ほど、複数のストレスへの高い抵抗性を示すことが示された。遺伝子型間の PC1 における主成分得点を比較したところ、*stx1*・*stx2* 保有株および LI 株がそれぞれ *stx1*・*stx2c* 保有株および LII 株より高い主成分得点を示した (*stx1*・*stx2* vs. *stx1*・*stx2c*、 $P = 0.0099$; LI vs. LII、 $P = 0.0088$) (Table 3.7)。このことから *stx1*・*stx2* 保有株および LI 株は、複数のストレスへの高い抵抗性を有していることが明らかとなった。一方、PC2 における主成分得点は大きい値ほど、酸、熱および飢餓ストレスへの抵抗性が高く、高浸透圧、酸化および凍結融解ストレスへの抵抗性が低いことが示された。PC2 における主成分得点では、遺伝子型による有意な差は認められなかった (Table 3.7)。

クラスター分析では、クラスター数を3として解析を行なった (Fig 3.3)。クラスター1、2および3にはそれぞれ31、7および19株が分類された。それぞれのクラスターにおけるストレス抵抗性パターンを明らかにするために、IRIを比較した (Table 3.8)。クラスター1におけるIRIは全てのストレス抵抗性試験においてクラスター3よりも有意に低かった。したがって、クラスター1は全てのストレスに対して比較的高い抵抗性を有し、クラスター3は低い抵抗性のみ有することが示唆された。一方、クラスター2では、酸、凍結融解および熱抵抗性試験においては、IRIはクラスター1および3の中間であり、高浸透圧および酸化ストレスにおいては最も高い抵抗性を示した。しかし、飢餓ストレスにおいては最も抵抗性が低かった。

STEC O157の遺伝子型ごとのクラスターの分布は、大きな偏りが認められた (Fig 3.4)。全ての *stx1*・*stx2* 保有株および75.0% (4株中3株) の *stx2*・*stx2* 保有株がクラスター1に分類された。一方で、72.7% (11株中8株) の *stx1*・*stx2c* 保有株がクラスター3に分類された。クラスターの分布の偏りは、LSPA6-lineageにおいてより顕著であった。LI株においては、77.8% (18株中14株) がクラスター1に属した。一方で、LII株においては64.7% (17株中11株) がクラスター3に属した。LI/II株はLIおよびLII株の中間型のクラスター分布を示した。1種の *stx* のみ有する株や非定型的 LSPA lineage の株では、クラスターの大きな偏りは認められなかった。

カビによる STEC O157 の増殖促進の遺伝子型による差異

カビの培養ろ液中での STEC O157 の増殖促進は、*P. camemberti* の培養ろ液では *stx1* 単独保有株において、*P. roqueforti* の培養ろ液では *stx2* 単独保有株において比較的高い傾向であったが、遺伝子型間で明確な差は認められなかった (Table 3.9)。

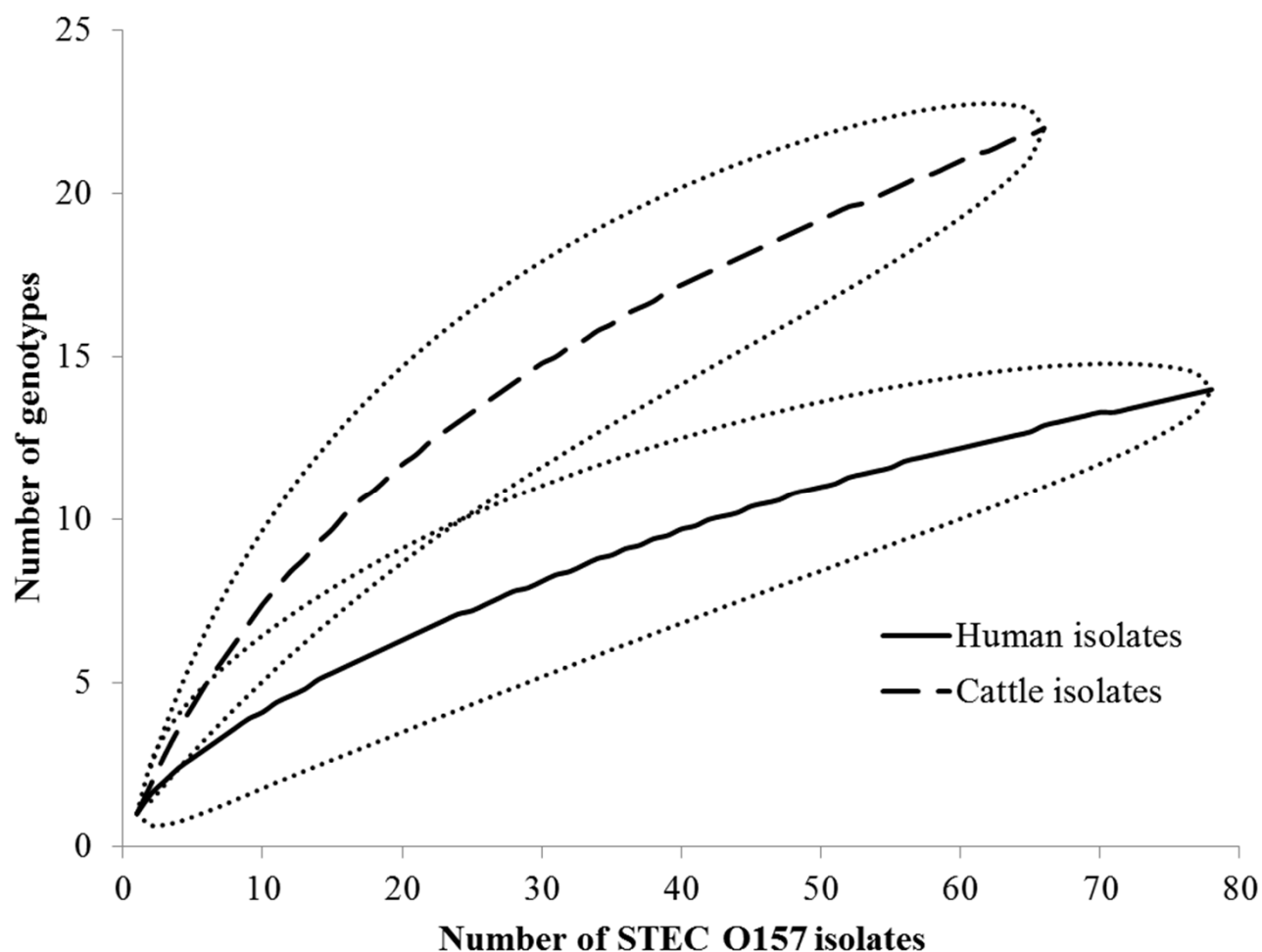
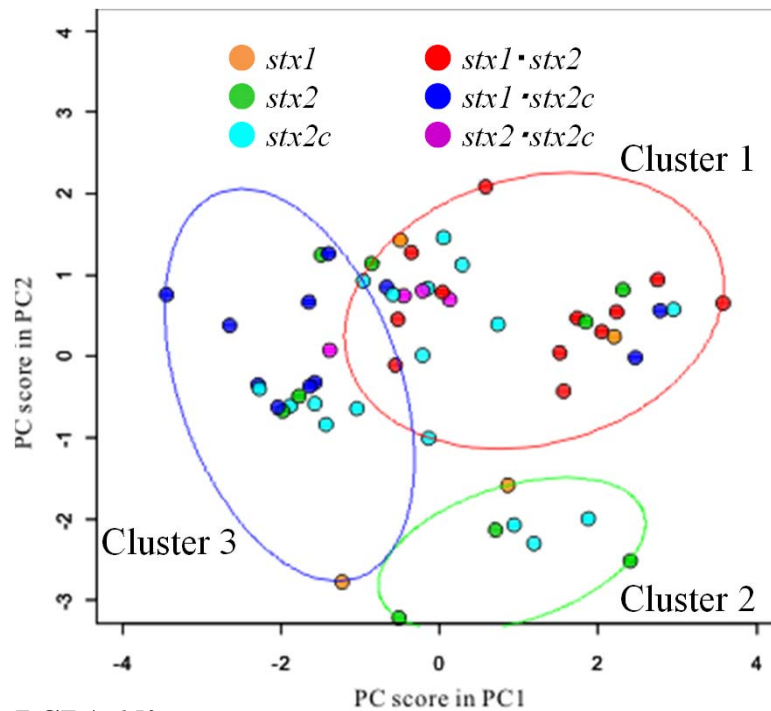


Fig. 3.1. Rarefaction curves of STEC O157 population by origin of isolates. The *y-axis* represents the number of genotypes from 11 locus-specific tests, including virulence factors and LSPA6 alleles. Broken lines show upper and lower 95% confidence limits.



Fig. 3.2. Population structure of STEC O157 from human and cattle. Graph of structure results were produced using CLUMPP and DISTRUCT programs. Number of group (K) was predefined as three. Each haplotype is represented by a thin vertical line. Confluent stacked bar plot showed the probabilities (y -axis) that each of the individual 144 STEC O157 isolates (x -axis) belongs to each of three MCMC model-derived group. Each color represents a population, and the color of individual haplotypes represents their proportional membership in the different group. Populations: white, group 1; gray, group 2; black, group 3.

(A) *stx* genotype



(B) LSPA6 lineage

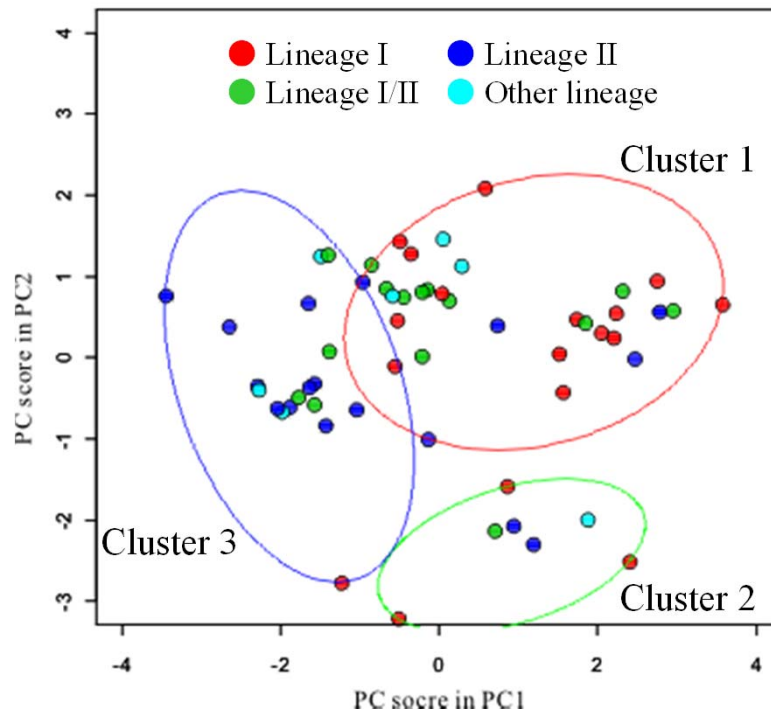
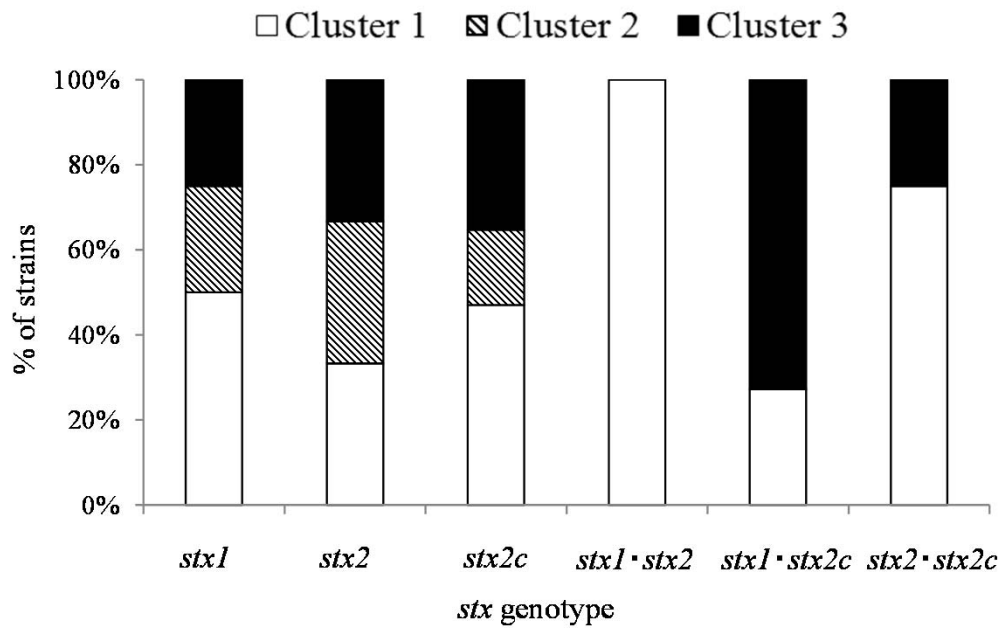


Fig. 3.3. The results of cluster analysis in PCA biplots. Distances between points represent the similarities in stress resistant patterns between strains. Each (A) *stx* genotype and (B) LSPA6 lineage of STEC O157 corresponds to a color as shown in the legends. Plots located inside the circle belong to each cluster: red, cluster 1; green, cluster 2; blue, cluster 3. PCA shows that higher values on the *x*-axis indicate greater multiple stress resistance to six stresses and higher values on the *y*-axis indicate greater resistance to acid, heat and starvation stresses and lower resistance to freeze-thaw, osmotic pressure and oxidative stresses.

(A) *stx* genotype



(B) LSPA6-lineage

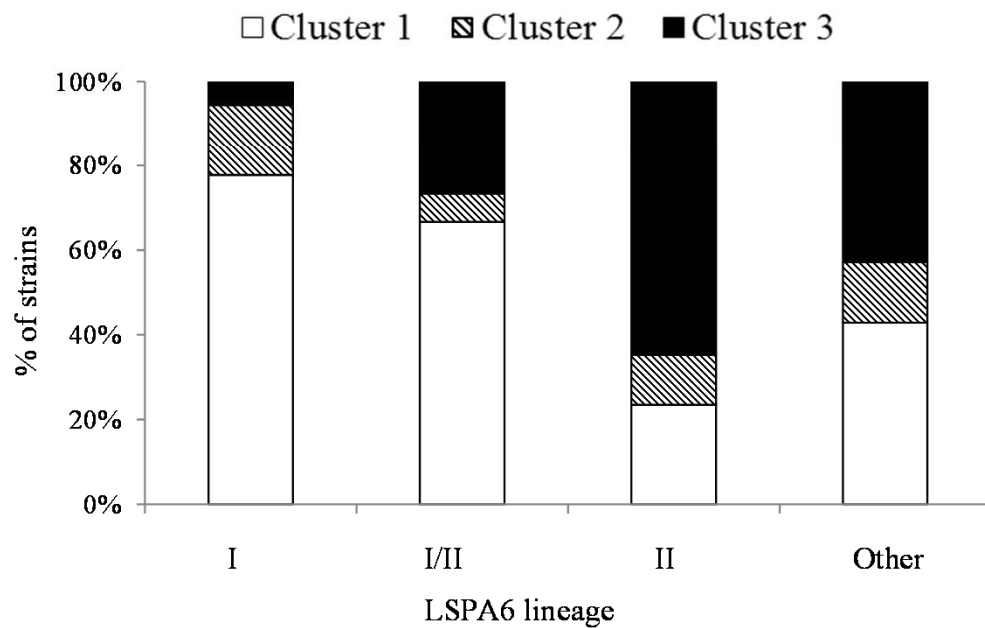


Fig. 3.4. Associations between clusters and (A) *stx* genotypes and (B) LSPA6-lineages of STEC O157. Cluster 1 and cluster 3 were characterized as stress-resistant and stress-susceptible clusters, respectively. Stress resistance of strains in cluster 2 varied depending on the stress.

Table 3.2. Distribution of five virulence factors and *stx* genotypes among STEC O157 isolates

Genotype		Origin		Total
		Human	Cattle	
Virulence factors	<i>stx1</i>	53 (68.0) ^{a,b}	27 (40.9) ^b	80 (55.6)
	<i>stx2</i>	69 (88.5) ^b	18 (27.3) ^b	87 (60.4)
	<i>stx2c</i>	18 (23.1) ^b	49 (74.2) ^b	67 (46.5)
	<i>eae</i>	78 (100)	66 (100)	144 (100)
	<i>ehxA</i>	76 (97.4)	64 (97.0)	140 (97.2)
<i>stx</i> genotype	<i>stx1</i>	2 (2.6)	3 (4.5)	5 (3.5)
	<i>stx2</i>	8 (10.3)	3 (4.5)	11 (7.6)
	<i>stx2c</i>	6 (7.7) ^b	32 (48.5) ^b	38 (26.4)
	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	50 (64.1) ^b	11 (16.7) ^b	61 (42.4)
	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	1 (1.3) ^b	13 (19.7) ^b	14 (9.7)
	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	11 (14.1)	4 (6.1)	15 (10.4)

^a Number of positive strains (%) among the isolates from the same origin.

^b Significant difference in prevalence between human and cattle isolates ($P < 0.001$).

Table 3.3. Distribution of LSPA6 genotypes among STEC O157 isolates

LSPA6 lineage	LSPA6 genotype	No. (%) of isolates							
		Origin		<i>stx</i> genotype					
		Human	Cattle	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>
I	111111	54 (69.2) ^a	13 (19.7) ^a	5 (100)	3 (27.3)	0	59 (96.7)	0	0
I/II	211111	17 (21.8)	22 (33.3)	0	5 (45.5)	16 (42.1)	1 (1.6)	2 (14.3)	15 (100)
II	221212	1 (1.3)	6 (9.1)	0	0	6 (15.8)	0	1 (7.1)	0
	221222	0	2 (3.0)	0	0	0	0	2 (14.3)	0
	222212	2 (2.6)	5 (7.6)	0	0	7 (18.4)	0	0	0
	222222	0	11 (16.7)	0	0	2 (5.3)	0	9 (64.3)	0
	Subtotal	3 (3.8) ^a	24 (36.4) ^a	0	0	15 (39.5)	0	12 (85.7)	0
Other	111211	0	1 (1.5)	0	0	0	1 (1.6)	0	0
	212111	1 (1.3)	0	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	212211	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	221111	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	221211	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	221213	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	231111	3 (3.8)	0	0	3 (27.3)	0	0	0	0
	241222	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
	252211	0	1 (1.5)	0	0	1 (2.6)	0	0	0
Total		78 (100)	66 (100)	5 (100)	11 (100)	38 (100)	61 (100)	14 (100)	15 (100)

^a Significant difference in prevalence between human and cattle isolates ($P < 0.001$).

Table 3.4. Results of univariable and multivariable logistic regression analyses between human and cattle isolates of STEC O157

Variable	Univariable analysis		Multivariable analysis	
	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> value	OR (95% CI)	<i>P</i> value
<i>stx1</i>	3.06 (1.56 - 6.14)	0.001	ND ^c	
<i>stx2</i>	20.44 (8.83 - 52.03)	< 0.00001	12.70 (4.82 - 36.76)	< 0.00001
<i>stx2c</i>	0.10 (0.05 - 0.22)	< 0.00001	ND	
<i>eae</i>	NA ^b		NA	
<i>ehxA</i>	1.19 (0.14 - 10.12)	0.87	ND	
<i>folD-sfmA</i>	8.36 (3.99 - 18.42)	< 0.00001	2.33 (0.86 - 6.06)	0.09
<i>Z5935</i>	9.41 (3.81 - 26.94)	< 0.00001	ND	
<i>yhcG</i>	9.38 (2.98 - 41.56)	5.80×10^{-4}	ND	
<i>rtcB</i>	20.83 (6.85 - 90.99)	< 0.00001	ND	
<i>rbsB</i>	NA		NA	
<i>arp-iclR</i>	16.25 (5.31 - 71.13)	1.34×10^{-5}	ND	

^a OR, Odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval. Odds ratio above one indicate that the presence of virulence factors or LSPA6 lineage I-specific allele is positively associated with human isolates.

^b Not available. Odds ratio could not be calculated because all of strains used in this study carry *eae* and none of the bovine isolates showed LI-specific allele type in *rbsB* loci. In *rbsB* locus, the prevalence between human and bovine isolates was significantly different by Fisher exact test ($P < 0.00001$).

^c Not determined. These variables were eliminated from the model through backward elimination.

Table 3.5. IRI values of STEC O157 strains used in this study

Strain	Stress					
	Acid	Freeze-thaw	Heat	Osmotic	Oxidative	Starvation
EC1	-1.01 ^a	-2.95	0.49	-2.32	0.71	-4.18
EC10	-0.57	-3.30	-0.03	-3.65	0.11	-4.68
EC18	-0.93	-3.11	0.34	-2.31	0.60	-5.95
EC28	-0.97	-3.05	0.80	-2.87	0.98	-4.13
EC32	-0.82	-2.84	0.87	-2.87	0.53	-4.03
EC33	-0.83	-2.42	0.20	-2.97	0.92	-4.91
EC37	-0.23	-2.97	0.68	-1.94	0.38	-3.53
EC38	-0.60	-2.70	0.99	-2.63	1.00	-3.16
EC42	-1.20	-3.00	0.39	-2.61	0.57	-4.16
EC43	-1.04	-3.05	-0.71	-3.79	-0.01	-5.49
EC44	-0.68	-2.65	1.14	-2.49	0.85	-3.07
EC45	-0.70	-2.06	0.09	-2.35	1.07	-4.37
EC52	-0.89	-3.11	-0.33	-3.35	0.13	-4.92
EC55	0.52	-3.03	0.49	-3.22	-0.33	-3.13
EC59	-0.93	-3.00	-0.01	-2.32	0.80	-4.13
EC66	-0.93	-2.11	0.16	-2.19	0.93	-4.14
EC70	-1.84	-3.17	0.30	-3.65	-0.09	-4.40
EC157	-1.09	-3.17	-0.89	-3.61	-0.23	-5.09
EC160	-0.51	-2.83	0.13	-3.64	-0.40	-3.11
EC164	-1.28	-3.26	-0.41	-3.47	-0.33	-5.04
EC169	-0.83	-2.80	0.37	-3.87	-0.49	-3.06
EC170	-1.08	-3.24	-0.43	-3.46	0.12	-4.57
EC175	-1.06	-3.08	0.41	-4.36	-0.57	-3.35
EC181	-1.11	-3.09	-0.33	-3.71	-0.35	-4.72
EC183	-0.91	-2.99	0.61	-4.24	-0.43	-3.03
ESC138	-1.26	-2.89	0.92	-2.39	0.75	-4.14
ESC206	-0.38	-2.75	-0.44	-2.87	0.80	-3.96
ESC209	-0.78	-3.08	0.32	-2.31	1.35	-4.07
ESC211	-0.92	-2.88	0.48	-3.26	0.38	-3.09
ESC213	-0.34	-2.56	1.45	-1.77	1.75	-4.02
ESC214	-0.86	-2.65	1.34	-2.38	1.06	-3.02
ESC215	-0.93	-2.94	1.04	-2.45	0.99	-3.07
ESC216	-0.51	-2.69	1.83	-1.79	0.93	-4.32
ESC219	-0.10	-3.28	0.88	-1.96	0.79	-3.84
ESC220	-0.65	-2.83	0.89	-1.91	0.55	-3.37
ESC222	-0.72	-2.78	0.99	-2.25	1.13	-4.17
ESC223	-0.91	-1.38	0.86	-3.07	0.58	-3.07
ESC225	-0.92	-2.49	-0.44	-2.04	1.00	-3.77
ESC226	-0.98	-2.29	0.06	-2.54	0.75	-4.70
ESC228	-0.82	-3.17	-0.12	-2.40	0.88	-4.22
ESC229	-0.67	-2.97	1.30	-2.55	1.18	-3.05
ESC231	-0.97	-2.90	0.08	-2.58	0.94	-4.83
ESC339	-1.09	-3.12	1.09	-2.85	1.09	-4.36
ESC340	-0.84	-2.87	0.70	-2.83	0.81	-3.04
ESC342	-1.11	-3.06	0.29	-3.51	-0.05	-4.61
ESC343	-0.91	-3.07	0.37	-3.94	0.09	-3.12
ESC344	-1.01	-3.18	-0.36	-3.89	0.32	-5.34
ESC349	-1.21	-3.10	-0.26	-3.53	0.18	-4.53
ESC356	-1.05	-2.92	0.11	-3.03	0.31	-4.35
ESC360	-0.83	-2.47	0.89	-2.51	0.74	-3.03
ESC361	-0.96	-3.23	0.15	-5.30	-0.25	-3.10
ESC362	-1.12	-2.66	0.00	-2.33	0.55	-3.94
ESC367	-0.91	-3.23	0.35	-2.57	0.77	-4.91
ATCC35150	-1.12	-3.19	-0.20	-3.35	-0.27	-4.80
ATCC43889	-0.77	-2.85	0.94	-2.84	1.21	-3.70
ATCC43890	0.56	-3.15	0.58	-2.48	-0.06	-3.09
ATCC43895	-1.22	-3.41	-1.20	-3.71	-0.21	-5.01

^a IRI value. These values are calculated from inactivation rate. Because of log-transformation, some values are positive, whereas the others are negative. Smaller IRI values correspond to greater stress resistance.

Table 3.6. Results of PCA using IRIs in six stress resistance assays

Variable	Factor loading ^a in	
	PC1	PC2
Acid	-0.30	-0.43
Freeze-thaw	-0.36	0.12
Heat	-0.48	-0.21
Osmotic	-0.48	0.37
Oxidative	-0.47	0.44
Starvation	-0.31	-0.65
Proportion of variance	0.46	0.22
Cumulative proportion of variance	0.46	0.68

^a Factor loading indicates the relative weight of the individual stress resistance assay on each of PC.

Table 3.7. Differences in PC scores between *stx* genotypes and LSPA6-lineage

Genotype	PC score (mean \pm SD) in	
	PC1 ^a	PC2 ^b
<i>stx</i> genotype		
<i>stx1</i>	0.33 \pm 1.51	-0.67 \pm 1.87
<i>stx2</i>	0.07 \pm 1.78	-0.59 \pm 1.67
<i>stx2c</i>	-0.14 \pm 1.38	-0.25 \pm 1.16
<i>stx1</i> • <i>stx2</i>	1.21 \pm 1.37 ^c	0.59 \pm 0.66
<i>stx1</i> • <i>stx2c</i>	-1.11 \pm 1.98 ^c	0.26 \pm 0.62
<i>stx2</i> • <i>stx2c</i>	-0.49 \pm 0.64	0.59 \pm 0.34
LSPA6 lineage		
I	0.99 \pm 1.41 ^d	-0.07 \pm 1.49
I/II	-0.06 \pm 1.44	0.34 \pm 0.87
II	-0.75 \pm 1.79 ^d	-0.32 \pm 0.92
Other	-0.60 \pm 1.46	0.23 \pm 1.28

^a Higher PC scores indicate greater resistance to the six stresses.

^b Higher PC scores indicate greater resistance to acid, heat and starvation stresses and lesser resistance to freeze-thaw, high osmotic pressure and oxidative stresses.

^c Significant ($P = 0.0099$) difference in mean PC scores in pairwise t test with adjusted P values.

^d Significant ($P = 0.0088$) difference in mean PC scores in pairwise t test with adjusted P values.

Table 3.8. Difference in IRIs between clusters in each stress resistance assay

Cluster	Stress					
	Acid	Freeze-thaw	Heat	Osmotic	Oxidative	Starvation
1	-1.02 ± 0.24^{abc}	-3.00 ± 0.26^c	0.02 ± 0.53^c	-3.03 ± 0.56^c	0.41 ± 0.45^c	-4.55 ± 0.57^{cd}
2	-0.67 ± 0.55^b	-3.00 ± 0.15	0.36 ± 0.17^b	-4.08 ± 0.66^c	-0.34 ± 0.22^c	-3.13 ± 0.10^c
3	-0.61 ± 0.37^c	-2.68 ± 0.44^c	0.90 ± 0.43^{bc}	-2.35 ± 0.36^c	0.91 ± 0.39^c	-3.53 ± 0.51^d

^a Mean \pm SD of IRI values.

^b Values with the same letter designation in each assay have a statistically significant difference ($P < 0.05$) in mean IRI values in pairwise t test with adjusted P values.

^{c,d} Values with the same letter designation in each assay have a statistically significant difference ($P < 0.01$) in mean IRI values in pairwise t test with adjusted P values.

Table 3.9. Difference in growth enhancement of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* on STEC O157

Genotype	<i>P. camemberti</i> ^a			<i>P. roqueforti</i> ^a		
	pH			pH		
	5	4.9	4.8	5	4.9	4.8
<i>stx</i> genotype						
<i>stx1</i>	0.67 ^c	0.72	0.80	0.43	0.74	0.77
<i>stx2</i>	0.81	0.88	0.77	0.58	0.64	0.52
<i>stx2c</i>	0.79	0.90	0.88	0.64	0.76	NG ^d
<i>stx1</i> ▪ <i>stx2</i>	0.79	0.78	0.75	0.63	0.74	0.60
<i>stx1</i> ▪ <i>stx2c</i>	0.67	0.80	0.59	0.54	NG	NG
<i>stx2</i> ▪ <i>stx2c</i>	0.79	0.77	1.01	0.71	0.78	NG
LSPA6 lineage ^b						
lineage I	0.76	0.76	0.76	0.58	0.74	0.66 ^e
lineage I/II	0.80	0.82	0.89	0.64	0.71	0.52 ^f
lineage II	0.73	0.85	0.73	0.59	0.76 ^g	NG

^a Spent culture prepared by preinoculation of the mold.

^b Number of strains was as follows: lineage I, four (EC32, EC70, ATCC43890 and ATCC43895); lineage I/II, two (EC1 and EC160); lineage II, two (ESC211 and ESC213).

^c Ratio of lag time of STEC O157 growth in the mold spent culture and control. Smaller values indicate more intense growth enhancement on the STEC O157 growth.

^d No growth of STEC O157 in the spent culture.

^e Mean of the result of three strains (EC70, ATCC43890, and ATCC43895).

^f The result of one strain (EC160).

^g The result of one strain (ESC211).

考察

本研究で供試したヒト由来株では、*stx1*・*stx2* 保有株が最も頻度が高く、次に *stx2* 単独保有および *stx2*・*stx2c* 保有株の頻度が高かった。このうち、*stx1*・*stx2* 保有株の頻度は、ヒト由来株ではウシ由来株と比べて有意に高く、*stx1*・*stx2* 保有は、ヒト由来株の大きな特徴であると考えられた。一方、ウシ由来株の *general-stx2* 保有率は、ヒト由来株の保有率と同等であった。しかし、ウシ由来株で頻度が高かった *stx2c* 単独保有株および *stx1*・*stx2c* 保有株は、ヒト由来株での頻度は低く、ヒトでの本菌感染症との関連性は低かった。このことから、*stx2* および *stx2c* の区別を行なわない場合、ウシ由来 STEC O157 のヒトへのリスクを過大評価する可能性がある。ドイツやフィンランドでは、*stx2* 単独保有株や *stx2*・*stx2c* 保有株が患者から最も多く分離されており (11, 26)、本研究の結果とは *stx* 型の分布が異なっていた。LSPA6 型の分布では、ヒト由来株では LI、LI/II およびそれらに近縁な LSPA6 型が 96.1%を占めた。このような由来による分布の偏りは、北米における報告より顕著であった (90, 116)。本研究でみられた LII 株と *stx2c* 保有との強い相関は、Ziebell ら(116) により既に報告されているが、LI 株と *stx2* 保有との相関が本研究で新たに見出された (Table 3.3)。対照的に LI/II 株は、様々な *stx* 型を示しており、このことは LI/II が LI および LII の中間型の遺伝子型であるとする系統解析の結果と一致する (114)。

遺伝子型と菌株の由来との関連性については、ロジスティック回帰分析を用いた詳細な解析を行なった。単回帰ロジスティック分析では、説明変数として用いたすべての *stx* 保有状況および LSPA6 のアレル型と菌株の由来との間で有意な相関がみられた (Table 3.4)。しかし、重回帰ロジスティック分析を用いて、全ての説明変数を 1 つの回帰式で解析すると、*stx2* 保有のみがヒト由来株と有意な相関を示した。この単回帰および重回帰ロジスティック分析間の相違は、交絡因子の影響によるものと考えられる。例えば、単回帰分析における *stx1* 保有とヒト由来株との相関性は、ヒト由来株における *stx1*・*stx2* 保有株の頻度の高さを反映しており、*stx2* 保有が交絡因子であったと考えられる。前述のドイツやフィンランドの報告においても、患者からは *stx2* を含む *stx* 型の株の分離頻度が高いため、ヒト由来株が高率に *stx2* を保有することは国際的に共通の特徴と考えられる (11, 26)。

集団遺伝学的手法を用いた解析のうち、rarefaction 解析および pairwise F_{ST} によって、ウシ由来株はヒト由来株に比べて遺伝的に多様であることが明らかとなった。クラスター分析の結果からは、供試した STEC O157 は 3 つの遺伝的に異なるグループに分けられ、それぞれが 3 つの LSPA6-lineage とほぼ対応することが明らかとなった (Fig. 3.2)。比較ゲノム解析やマイクロアレイ解析の結果からも、同様の 3 つのクラスターは支持されており (47, 52, 116)、本研究での結果は STEC O157 の系統を正確に反映しているといえる。また、pairwise F_{ST} の結果から、異なる由来のグループ 1 および 2 の株は、遺伝的な差が大きい可能性も示唆され、他の遺伝子マーカーによる型別結果を解析に加えることによって、さらにグループが細分化される可能性がある。

これらの結果から作製した、STEC O157 の遺伝子型の分布に関するモデルを Fig. 3.5 に示す。ウシ由来株には多様な遺伝子型の STEC O157 が存在すること、このうちヒトでの STEC O157 感染症に関与するのは主に *stx2* 保有株、LI および LI/II 株であることが明らかにされた。このため、*stx* 型および LSPA6-lineage 間でのストレス抵抗性の差を検討することによって、ストレス抵抗性がヒトでの STEC O157 感染症発生に果たす役割を推定できると考えられた。

ストレス抵抗性試験ごとの IRI の比較では、由来間での差は認められなかったが、遺伝子型間での差は認められた。ヒト由来株およびウシ由来株では、グループ 1 および 2 の遺伝子型は共通しているため (Fig. 3.2)、由来間では差が検出されにくいと考えられた。STEC O157 の *stx* 型間および LSPA6-lineage 間で有意な差が認められたストレスは、熱ストレスおよび飢餓ストレスのみであった。大腸菌では、熱ストレスおよび飢餓ストレスはそれぞれ熱ショックタンパクや転写因子である RpoS 発現を誘導することが知られている (17, 35, 93)。これらのタンパクは、細菌の代謝や細胞構成成分に多様な影響を及ぼすため、熱および飢餓ストレスは他のストレスよりも、STEC O157 の遺伝子型間での差異が大きくなった可能性がある。また、Dowd および Ishizaki (23) は熱ショックタンパクおよび低温ショックタンパクの発現が LI および LII 株間で異なっていることを示している。したがって、熱ショックタンパクおよび低温ショックタンパクの発現やタンパク構造の遺伝型による差異が、STEC O157 の遺伝子型間のストレス抵抗性の差に関与している可能性が考えられた。

複数のストレスへの抵抗性パターンを明らかにするために、6 種のストレス抵

抗性試験結果を1つのデータセットとして行なったPCAでは、PC1において全ての因子負荷量が負の値を示した (Table 3.6)。このことから、STEC O157のストレス抵抗性パターンにおいて、最も重要な要素は複数のストレスへの抵抗性であることが明らかとなった。すなわち、1種のストレスに抵抗性の高い菌株は、他のストレスへの抵抗性も高い傾向が明らかとなった。同様の傾向は、STEC O157の静水圧、熱、酸、酸化および浸透圧の各ストレスへの抵抗性に関しても報告されている (9)。さらに、PC1における主成分得点を遺伝子型ごとに比較したところ、*stx1*・*stx2* 保有株およびLI株がそれぞれ *stx1*・*stx2c* 保有株およびLII株より有意に高い値を示した。PC1における主成分得点は複数のストレスへの抵抗性の度合いを示すため、*stx1*・*stx2* 保有株およびLI株は、複数のストレスに対して比較的高い抵抗性を有することが示された。

供試したSTEC O157は、複数のストレスへの抵抗性パターンから、クラスター分析によって3つのクラスターに分かれた。クラスター間のIRIを比較したところ、クラスター1は複数のストレスへの抵抗性が高く、クラスター3は低いことが示された (Table 3.8)。この結果は、複数のストレスへの抵抗性がストレス抵抗性パターンの最も大きな特徴であるというPCAの結果と一致する。前述の熱ストレスおよび飢餓ストレスから誘導されるヒートショックタンパクやRpoSは、細胞構成成分など多様なタンパク群の発現制御に関与しているため、複数のストレスへの抵抗性に影響している可能性がある。

各遺伝子型におけるクラスターの分布には偏りがあったため、ストレス抵抗性パターンとSTEC O157の系統とは、関連していることが示唆された。LI株では多数の株がクラスター1に分類された一方で、LII株では多数の株がクラスター3に分類された (Fig. 3.4)。LI/II株は、両者の中間型の分布であった。同様の結果は、2種以上の*stx*を保有する株においてもみられた。この結果は、LSPA6-lineageと*stx*型が密接に関係している結果と考えられる (Table 3.3)。一方で、1種の*stx*のみ保有する株では、より多様なストレス抵抗性パターンを示した。*stx*を1種のみ保有する株は、多様なLSPA6型を示しており (Table 3.3)、遺伝的に多様であることがひとつの要因と考えられた。

STEC O157の遺伝子型による表現型の差異は、病原性や宿主への適応能に関して報告されている。Loweら (63) およびZhangら (115) はLII株に比べてLI株がより高いStx産生能や小腸細胞への付着能を有することを報告している。さ

らに、LI 株においては DNA 修復機構である SOS 反応系および *stx* の発現が同時に増加することが報告されている (23)。複数のストレスに対して高い抵抗性を有する LI 株のこのような特徴を勘案すると、病原性とストレス抵抗性が協調して疾病発生に寄与する可能性があり、今後検討を要する課題と考えられる。

PCA とクラスター分析の結果から明らかとなった、ヒト由来株で有意に高頻度であった *stx1*・*stx2* 保有株および LI 株が比較的高いストレス抵抗性を有することは、公衆衛生上重要である。食品や環境中で STEC O157 が晒される様々なストレスへの抵抗性は、STEC O157 の一部の遺伝子型がヒトでの本菌感染症に関与することを説明すると考えられる。*L. monocytogenes* や乳酸菌においては、ストレス抵抗性が病原性や生息環境を反映することが示されており (10, 70, 92)、STEC O157 においても同様の選択圧が働いている可能性がある。すなわち、チーズや青果類でみられるような、STEC O157 に対するストレスの大きい環境においても、ストレス抵抗性の高い遺伝子型の菌は選択的に生残し、ヒトでの本菌感染症に関与すると考えられる。しかし、第一章および第二章で明らかにされたように、カビはストレス下の STEC O157 に対して保護的に作用するため、比較的低いストレス抵抗性の低い遺伝子型の菌についても増殖や生残を促進し、これらの株による疾病発生リスクを上昇させる可能性がある。このような STEC O157 のリスクの変化をより詳細に検討するには、カビによる STEC O157 のストレス抵抗性を高める作用と、本菌の遺伝子型との関連性を解明する必要がある。第一章で認められたカビの培養液中での増殖促進では、遺伝子型間の差は認められなかったため (Table 3.9)、カビによる増殖および生残の促進に関する物質の解明によって、効率的な評価系を確立することが求められる。

以上、本章の結果から、次のことが明らかにされた: (i) 日本における STEC O157 はウシが保有する多様な遺伝子型のうち、一部がヒトでの本菌感染症に関与する、(ii) STEC O157 においては 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へも高い抵抗性を有する傾向がある、(iii) ヒトでの本菌感染症との関連性が高い *stx1*・*stx2* 保有株や LI 株は、他の遺伝子型の菌と比べて比較的高いストレス抵抗性を有する。これらのことから、STEC O157 における高いストレス抵抗性はヒトでの本菌感染症発生に密接に関与していることが明らかとなった。

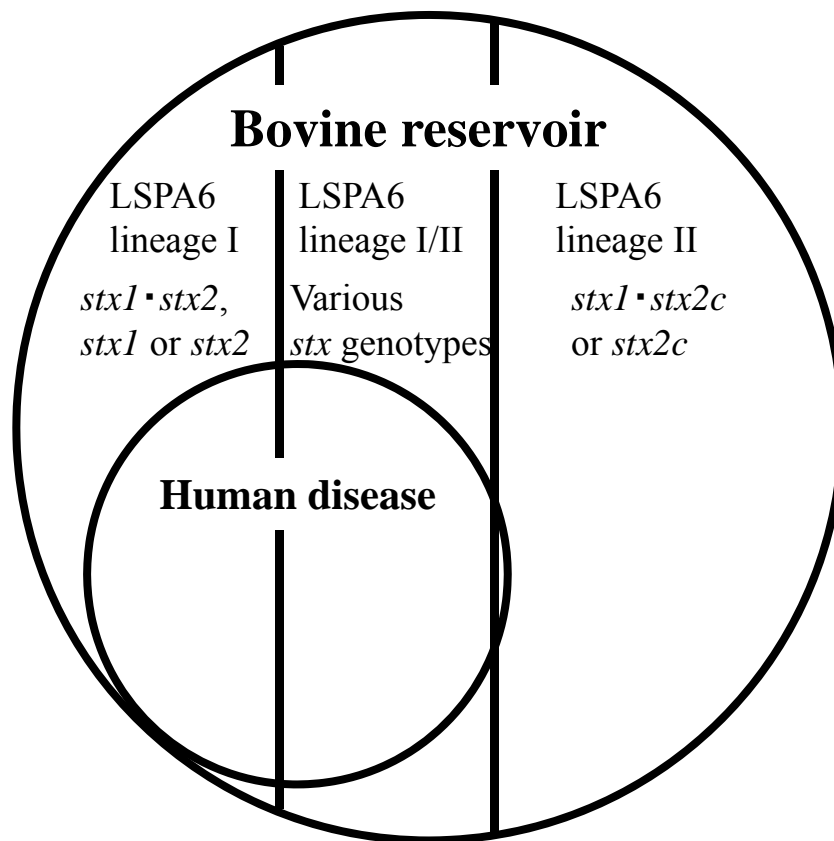


Fig. 3.5. Hypothetical model of association between genotypes and origins of STEC O157.

小括

STEC O157 におけるストレス抵抗性とヒトの疾病との関連を探究するために、本菌感染症と関連する本菌の遺伝子型を、単変量および多変量解析を用いて明らかにし、この結果をもとに 6 種類のストレスへの抵抗性との関連性を検討した。ヒトでの STEC O157 感染症と関連する本菌の遺伝子型は、5 種類の病原因子検出 (*stx1*、*stx2*、*stx2c*、*eae* および *ehxA*) および LSPA6 型別の結果を、回帰分析および集団遺伝学的手法などを用いてヒト由来株とウシ由来株との間で比較することによって特定した。ヒト由来株では、ウシ由来株と比べて、*stx1*・*stx2* 保有株および LI 株が有意に高率で認められた。5 種の病原因子保有状況および LSPA6 の 6 種のマーカー領域のアレル型を説明変数とした、単回帰ロジスティック分析では、すべての *stx* 保有と LSPA6 の 6 種のマーカー領域が STEC O157 の由来と有意な相関を示した。しかし、重回帰ロジスティック分析で交絡因子を調整した結果、*stx2* の保有のみがヒト由来株と有意に関連していることが示された。集団遺伝学的手法による解析結果からは、STEC O157 が遺伝的に 3 つのクラスターに分けられることが示された。これらの結果から、ウシ由来株が保有する遺伝的に多様な STEC O157 のうち、*stx1*・*stx2* 保有の LI 株、および、*stx2* 単独保有または *stx2*・*stx2c* 保有の LI/II 株が、ヒトでの本菌感染症に関与しやすいことが明らかとなった。次に、遺伝子型の解析で用いた STEC O157 の株のうち、すべての *stx* 型および LSPA6-lineage を含む 57 株について 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。試験結果から死滅速度を算出し、多重比較、PCA およびクラスター分析を用いて上記遺伝子型との関連性を解析した。多重比較の結果から、*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していた。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していた。主成分分析では、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。クラスター分析では、供試した STEC O157 株はストレス抵抗性、ストレス感受性および中間型のクラスターに分けられることが示された。ヒトから高率で分離される *stx1*・*stx2* 保有株、*stx2*・*stx2c* 保有株および LI 株の多くは、ストレス抵抗性のクラスターに分類された。一方でヒトから分離

される頻度が低い *stx1*・*stx2c* 保有株や LII 株の多くは、ストレス感受性のクラスターに分類された。これらの結果から、高いストレス抵抗性を有する STEC O157 が、ヒトでの本菌感染症発生に関与しやすいことが示唆された。

総括

チーズや青果類は、低 pH など細菌にとってストレスの高い環境であるものの、STEC O157 などを原因とする多くの食中毒が多数発生している (3, 29, 30)。このため、STEC O157 のストレス抵抗性がチーズや青果類中での増殖や生残に重要な役割を果たしていると考えられる。チーズや青果類中には、発酵スターターや環境由来の様々な微生物が存在しており、本菌のストレス抵抗性に影響を与えると考えられる (31, 41)。また、STEC O157 は遺伝子型によってストレス抵抗性や病原性などの表現型が異なっていることが知られている (1, 63, 101)。このため、チーズや青果類を原因とする STEC O157 食中毒の発生機序の解明には、これらのストレス抵抗性に関与する要因を明らかにする必要がある。しかし、他種の微生物による影響や STEC O157 の遺伝子型の差異とストレス抵抗性との関連性を詳細に検討した報告は少ない。

そこで、第一章および第二章ではチーズや青果類で広く認められる微生物としてカビに着目し、STEC O157 とカビとの共培養によって、STEC O157 のストレス抵抗性などに与えるカビの影響を明らかにした。第一章では、主にカビの培養液が STEC O157 の挙動に与える影響を探究した。チーズのカビスターターである *P. camemberti* および *P. roqueforti* との培養液および *P. camemberti* が発育する牛乳中での STEC O157 の菌数変化を調べた結果、カビの培養液が、酸性下で STEC O157 の増殖や生残を促進することが明らかとなった。認められた STEC O157 の増殖および生残促進には、従来から指摘されていたカビによる pH の上昇 (18, 24, 78, 104) 以外の機序も存在することが示された。また、STEC O157 の増殖促進は、カビを酸性で培養した場合でのみ認められ、熱処理では不活化されなかった。このことから、STEC O157 の増殖促進には、培養液中の耐熱性物質が関与していることが明らかとなった。

第二章では、カビが STEC O157 の挙動に与える影響を、主にカビの菌糸の物理的影響に着目して探究した。第一章で用いたカビスターターを含む、食品に広く認められるカビを平板培地上で STEC O157 と共培養したところ、カビの菌糸に沿った STEC O157 の移動が認められた。STEC O157 の移動距離はカビの菌種によって異なっており、*Rhizopus* sp. などのカビのコロニー上では STEC O157 はカビのコロニー先端まで移動したが、*P. roqueforti* などのカビ上では STEC

O157 の移動は認められなかった。さらに、*A. alternata* などのコロニー上では、STEC O157 の運動性株が非運動性株より長い距離を移動していた。これらの結果から、カビのコロニー上での STEC O157 の移動距離には、カビの菌種および STEC O157 の運動性の有無が関与していることが明らかとなった。また、供試した 11 菌種のカビのうち 9 菌種のコロニー上では、STEC O157 は、運動性の有無に関係なく増殖した。一方、*E. nidulans* や *A. ochraceus* のコロニー上では STEC O157 菌数は減少しており、本菌の増殖に抑制的に働くカビの存在が明らかとなった。また、STEC O157 を *P. camemberti* などのカビのコロニー上で共培養した場合には、培地上で発育した場合と比べて、本菌は高い酸抵抗性を有することが示された。

第一章および第二章の結果から、カビスターターや一部の食品関連カビはストレス下での STEC O157 に保護的に作用し、食品中での STEC O157 の増殖、生残および移動を促進することが示された。一方で、*Aspergillus* や *Emmericella* などの STEC O157 の増殖に対して抑制的に働くカビの存在も明らかとなった。

第三章では、STEC O157 の遺伝子型とストレス抵抗性との関連性を統計的に解析することによって、ストレス抵抗性とヒトでの STEC O157 感染症との関連性を考察した。まず、日本においては本菌感染症と関連する遺伝子型が明らかでないため、疫学および集団遺伝学的手法を用いた解析を行い、ヒトでの本菌感染症と関連する遺伝子型の特定を試みた。この結果、ウシが保有する多様な遺伝子型の STEC O157 のうち、*stx1*・*stx2* 保有株、LI 株および LII 株がヒト由来株と有意な相関を示すことが示された。次に、6 種のストレス抵抗性試験を行ない、得られた結果と STEC O157 の遺伝子型との関連性を多変量解析などで解析した結果、ヒト由来株と有意な相関を示した *stx1*・*stx2* 保有株および LI 株は、比較的高いストレス抵抗性を有することが明らかとなった。このことから、STEC O157 のストレス抵抗性は、宿主動物からヒトへの伝播の過程で重要な役割を果たすと考えられた。また、*stx2* 保有株や LI 株は、高い病原性を有することが報告されており (26, 63)、今後ストレス抵抗性と病原性との関連性を詳細に調べる必要がある。

以上の結果から、STEC O157 では病原性の高い遺伝子型の菌が高いストレス抵抗性を有するため、チーズや青果類でみられるような STEC O157 に対するストレスの大きい環境においても、これらの遺伝子型の菌は増殖や生残をしやす

い可能性が示された。このため、STEC O157 に対する殺菌条件の検討などの際には、ストレス抵抗性の高い遺伝子型の菌を考慮する必要があると考えられる。さらに、カビスターターや一部の食品汚染カビは、食品中での代謝やコロニー形成によって微生物の生息環境を変化させることによって、ストレス下の STEC O157 に対して保護的に作用し、本菌の増殖や生残を促進することが明らかとなった。このため、チーズや青果類上でカビが発育する場合には、ストレスへの抵抗性の高い遺伝子型の菌に加えて、抵抗性のより低い遺伝子型の菌がヒトの疾病に関与するリスクを高める可能性がある。近年、食品の生産や流通過程での食中毒菌の増殖や生残を予測するために、様々なストレスおよび微生物の影響を考慮した数理モデルが提唱されている (49, 62, 82, 96)。チーズや青果類などの食品での STEC O157 の挙動と疾病との関連性を解明し、効果的な制御法を確立する上では、本研究で明らかとなったカビによる影響や STEC O157 の遺伝子型による差異を考慮したモデルの構築が有用であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行および論文執筆にあたり終始的確なご指摘とご指導を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科の熊谷 進名誉教授に厚く御礼申し上げます。研究計画や論文執筆について、ご指導を頂きました同大学院農学生命科学研究科の局 博一教授に厚く御礼申し上げます。博士課程の全研究における実験の遂行、結果の解釈および論文執筆に至るまで、丁寧にご指導くださいました国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の工藤由起子室長に深甚の謝意を表します。博士課程の全研究における実験結果の解釈や論文執筆に至るまで、丁寧にご指導くださいました同研究所衛生微生物部小西良子部長に深甚の謝意を表します。カビを用いた実験では、NPO 法人カビ相談センター代表の高鳥浩介博士に懇切なご指導を頂きましたことに深謝いたします。カビを用いた実験や分子生物学の実験では、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の渡辺麻衣子博士に多大なるご協力を頂きましたことに深謝いたします。カビを用いた実験では、同研究所衛生微生物部の鎌田洋一室長のご協力を頂けましたことに深謝いたします。GFP 標識 STEC O157 を用いた実験では、同研究所衛生微生物部の菊池 裕室長にご協力を頂きましたことに深謝いたします。Massey University、Institute of Veterinary、Animal and Biomedical Sciences の Nigel P. French 教授には、疫学などの統計解析でのご協力のみならず、ニュージーランドでの生活面でのご援助に深謝いたします。同大学 Institute of Fundamental Sciences の Geoff Jones 博士には統計解析での協力を頂きましたことに深謝いたします。また、本研究の遂行および大学院生活を通じて様々な点でご協力を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学研究室および比較病態生理学研究室および国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. **Abu-Ali, G. S., L. M. Ouellette, S. T. Henderson, D. W. Lacher, J. T. Riordan, T. S. Whittam, and S. D. Manning.** 2010. Increased adherence and expression of virulence genes in a lineage of *Escherichia coli* O157:H7 commonly associated with human infections. *PLoS One* **5**: e10167.
2. **Aldarf, M., A. Amrane, and Y. Prigent.** 2002. Carbon and nitrogen substrates consumption, ammonia release and proton transfer in relation with growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* on a solid medium. *J. Biotechnol.* **95**: 99-108.
3. **Altekruse, S. F., B. B. Timbo, J. C. Mowbray, N. H. Bean, and M. E. Potter.** 1998. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *J. Food Prot.* **61**: 1405-1407.
4. **Aureli, P., M. Di Cunto, A. Maffei, G. De Chiara, G. Franciosa, L. Accorinti, A. M. Gambardella, and D. Greco.** 2000. An outbreak in Italy of botulism associated with a dessert made with mascarpone cream cheese. *Eur. J. Epidemiol.* **16**: 913-918.
5. **Auty, M., G. Duffy, D. O'Beirne, A. McGovern, E. Gleeson, and K. Jordan.** 2005. *In situ* localization of *Escherichia coli* O157:H7 in food by confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* **68**: 482-486.
6. **Aziza, A., C. Couriol, A. Amrane, and R. Boutrou.** 2005. Evidences for synergistic effects of *Geotrichum candidum* on *Penicillium camemberti* growing on cheese juice. *Enzyme Microb. Technol.* **37**: 218-224.
7. **Bamford, C. V., A. d'Mello, A. H. Nobbs, L. C. Dutton, M. M. Vickerman, and H. F. Jenkinson.** 2009. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect. Immun.* **77**: 3696-3704.
8. **Beige, J., J. Lokies, T. Schaberg, U. Finckh, M. Fischer, H. Mauch, H. Lode, B. Kohler, and A. Rolfs.** 1995. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 90-95.

9. **Benito, A., G. Ventoura, M. Casadei, T. Robinson, and B. Mackey.** 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1564-1569.
10. **Bergholz, T. M., H. C. den Bakker, E. D. Fortes, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2010. Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**: 1537-1549.
11. **Beutin, L., S. Kaulfuss, T. Cheasty, B. Brandenburg, S. Zimmermann, K. Gleier, G. A. Willshaw, and H. R. Smith.** 2002. Characteristics and association with disease of two major subclones of Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) O157 that are present among isolates from patients in Germany. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**: 337-346.
12. **Bevilacqua, A., F. Cibelli, D. Cardillo, C. Altieri, and M. Sinigaglia.** 2008. Metabiotic effects of *Fusarium* spp. on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on raw portioned tomatoes. *J. Food Prot.* **71**: 1366-1371.
13. **Bianciotto, V., D. Minerdi, S. Perotto, and P. Bonfante.** 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* **193**: 123-131.
14. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 497-503.
15. **Centers for Disease, C. a. P.** 2000. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds--Wisconsin, June 1998. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **49**: 911-913.
16. **Chau, H. W., Y. K. Goh, B. C. Si, and V. Vujanovic.** 2010. Assessment of alcohol percentage test for fungal surface hydrophobicity measurement. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**: 295-300.
17. **Chung, H. J., W. Bang, and M. A. Drake.** 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* **5**: 52-64.
18. **Cibelli, F., C. Ciccarone, C. Altieri, A. Bevilacqua, and M. Sinigaglia.** 2008.

- Proteolytic activity of molds and their metabiotic association with *Salmonella* in a model system. J. Food Prot. **71**: 2129-2132.
19. **Collet, D.** 2003. Modelling survival data in medical research. CRC press, Boca Raton, FL, USA.
 20. **Cuny, C., M. N. Lesbats, and S. Dukan.** 2007. Induction of a global stress response during the first step of *Escherichia coli* plate growth. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 885-889.
 21. **Dalgaard, P., and K. Koutsoumanis.** 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. J. Microbiol. Methods **43**: 183-196.
 22. **Diezmann, S., and F. S. Dietrich.** 2009. *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. PLoS One **4**: e5317.
 23. **Dowd, S. E., and H. Ishizaki.** 2006. Microarray based comparison of two *Escherichia coli* O157:H7 lineages. BMC Microbiol. **6**: 30.
 24. **Draughon, F. A., S. Chen, and J. O. Mundt.** 1988. Metabiotic association of *Fusarium*, *Alternaria*, and *Rhizoctonia* with *Clostridium botulinum* in fresh tomatoes. J. Food Sci. **53**: 120-123.
 25. **Dykes, G. A., B. Sampathkumar, and D. R. Korber.** 2003. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. Int. J. Food Microbiol. **89**: 1-10.
 26. **Eklund, M., K. Leino, and A. Siitonen.** 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. J. Clin. Microbiol. **40**: 4585-4593.
 27. **Erickson, M. C., and M. P. Doyle.** 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Food Prot. **70**: 2426-2449.
 28. **Excoffier, L., and H. E. L. Lischer.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. **10**: 564-567.
 29. **Ferens, W. A., and C. J. Hovde.** 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. Foodborne Pathog. Dis. **8**: 465-487.

30. **Franz, E., and A. H. C. van Bruggen.** 2008. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. *Crit. Rev. Microbiol.* **34**: 143-161.
31. **Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, and A. Sarniguet.** Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 583-609.
32. **Gardini, F., R. Tofalo, N. Belletti, L. Iucci, G. Suzzi, S. Torriani, M. E. Guerzoni, and R. Lanciotti.** 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* **23**: 641-648.
33. **Gobbetti, M., A. Corsetti, and J. Rossi.** 1994. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 275-279.
34. **Gripon, J. C.** 2001. Mould-ripened cheeses, p. 111-136. *In* P. F. Fox (ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2. Elsevier Applied Science, London, UK.
35. **Guisbert, E., T. Yura, V. A. Rhodius, and C. A. Gross.** 2008. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 545-554.
36. **Gyles, C. L.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* **85**: E45-E62.
37. **Habimana, O., E. Heir, S. Langsrud, A. W. Asli, and T. Moretro.** 2010. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4557-4559.
38. **Hard, D. L., and A. G. Clark.** 1997. Population substructure. p. 111-162. *In* D. L. Hard and A. G. Clark (ed.), *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
39. **Heck, K. L., G. Vanbelle, and D. Simberloff.** 1975. Explicit calculation of rarefaction diversity measurement and determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**: 1459-1461.

40. **Hyytia-Trees, E., S. C. Smole, P. A. Fields, B. Swaminathan, and E. M. Ribot.** 2006. Second generation subtyping: A proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog. Dis.* **3**: 118-131.
41. **Irlinger, F., and J. Mounier.** 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 142-148.
42. **Jacobs, J., M. Rhodes, B. Sturgis, and B. Wood.** 2009. Influence of environmental gradients on the abundance and distribution of *Mycobacterium* spp. in a coastal lagoon estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7378-7384.
43. **Jakobsson, M., and N. A. Rosenberg.** 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**: 1801-1806.
44. **Jay, J. M., M. J. Loessner, and D. A. Golden.** 2005. *Modern Food Microbiology* 7th ed. Springer, Berlin, Germany.
45. **Jollivet, N., J.-M. Belin, and Y. Vayssier.** 1993. Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* Thom. *J. Dairy Sci.* **76**: 1837-1844.
46. **Kaufman, L., and P. J. Rousseeuw.** 1990. *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis.* Wiley, Hoboken, NJ, USA.
47. **Kim, J., J. Nietfeldt, and A. K. Benson.** 1999. Octamer-based genome scanning distinguishes a unique subpopulation of *Escherichia coli* O157:H7 strains in cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 13288-13293.
48. **Kohlmeier, S., T. H. M. Smits, R. M. Ford, C. Keel, H. Harms, and L. Y. Wick.** 2005. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 4640-4646.
49. **Koutsounianis, K.** 2009. Modeling food spoilage in microbial risk assessment. *J. Food Prot.* **72**: 425-427.
50. **Kubota, H., S. Senda, H. Tokuda, H. Uchiyama, and N. Nomura.** 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol.* **26**: 592-597.
51. **Kvitek, D. J., J. L. Will, and A. P. Gasch.** 2008. Variations in stress sensitivity

- and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. PLoS Genet. **4**: e1000223.
52. **Laing, C. R., C. Buchanan, E. N. Taboada, Y. Zhang, M. A. Karmali, J. E. Thomas, and V. P. Gannon.** 2009. *In silico* genomic analyses reveal three distinct lineages of *Escherichia coli* O157:H7, one of which is associated with hyper-virulence. BMC Genomics **10**: 287.
 53. **Lang, P., T. Lefebure, W. Wang, P. P. Bitar, R. J. Meinersmann, K. Kaya, and M. J. Stanhope.** 2010. Expanded multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization of *Campylobacter coli* isolates from multiple hosts. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 1913-1925.
 54. **Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, E. Latrille, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. J. Dairy Res. **71**: 346-354.
 55. **Leclercq-Perlat, M. N., G. Corrieu, and H. E. Spinnler.** 2007. Controlled production of Camembert-type cheeses: Part III role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. J. Dairy Res. **74**: 218-225.
 56. **Leclercq-Perlat, M. N., E. Latrille, G. Corrieu, and H. E. Spinnler.** 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part II. Changes in the concentration of the more volatile compounds. J. Dairy Res. **71**: 355-366.
 57. **Leenanon, B., and M. A. Drake.** 2001. Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. J. Food Prot. **64**: 970-974.
 58. **Leopold, S. R., V. Magrini, N. J. Holt, N. Shaikh, E. R. Mardis, J. Cagno, Y. Ogura, A. Iguchi, T. Hayashi, A. Mellmann, H. Karch, T. E. Besser, S. A. Sawyer, T. S. Whittam, and P. I. Tarr.** 2009. A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**: 8713-8718.
 59. **Leroi, F., and M. Pidoux.** 1993. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. J. Appl. Bacteriol. **74**: 54-60.

60. **Leveau, J. H. J., and G. M. Preston.** 2008. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol.* **177**: 859-876.
61. **Li, Y. L., H. M. Xia, F. Bai, H. J. Xu, L. Yang, H. M. Yao, L. Zhang, X. M. Zhang, Y. L. Bai, P. E. J. Saris, T. Tolker-Nielsen, and M. Q. Qiao.** 2007. Identification of a new gene *PA5017* involved in flagella-mediated motility, chemotaxis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **272**: 188-195.
62. **Liu, S., and V. M. Puri.** 2008. Dynamic growth models for *L. monocytogenes* during ripening in Camembert cheese. *Lwt-Food Science and Technology* **41**: 511-520.
63. **Lowe, R. M. S., D. Baines, L. B. Selinger, J. E. Thomas, T. A. McAllister, and R. Sharma.** 2009. *Escherichia coli* O157:H7 strain origin, lineage, and Shiga toxin 2 expression affect colonization of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5074-5081.
64. **Marier, R., J. G. Wells, R. C. Swanson, W. Callahan, and I. J. Mehlman.** 1973. Outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* **2**: 1376-1378.
65. **Meng, J., M. P. Doyle, T. Zhao, and S. Zhao.** 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 249-269. In M. P. Doyle and L. R. Beuchat (ed.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 3rd ed. ASM press, Washington D.C., USA.
66. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
67. **Nout, M. J. R.** 1995. Fungal interactions in food fermentations. *Can. J. Bot.* **73**: S1291-S1300.
68. **Oda, Y., and K. Ouchi.** 1989. Principal component analysis of the characteristics desirable in bakers yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1495-1499.
69. **Oh, D. H., Y. W. Pan, E. Berry, M. Cooley, R. Mandrell, and F. Breidt.** 2009. *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from environmental sources differ

- significantly in acetic acid resistance compared with human outbreak strains. *J. Food Prot.* **72**: 503-509.
70. **Parente, E., F. Ciocia, A. Ricciardi, T. Zotta, G. E. Felis, and S. Torriani.** 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *Int. J. Food Microbiol.* **144**: 270-279.
 71. **Pennington, H.** 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet* **376**: 1428-1435.
 72. **Petrie, A., and P. Watson.** 2006. Statistics for veterinary and animal science, 2nd ed. ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
 73. **Pleydell, E., L. Rogers, E. Kwan, and N. French.** 2010. Evidence for the clustering of antibacterial resistance phenotypes of enterococci within integrated poultry companies. *Microb. Ecol.* **59**: 678-688.
 74. **Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
 75. **R Development Core Team** 2010, R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.
 76. **Rahardjo, Y. S. P., and A. Rinzema.** 2007. Transport phenomena in fungal colonisation on a food matrix, p. 241-253. *In* J. Dijksterhuis, R. A. Samson (ed.), Food Mycology. CRC press, Boca Raton, FL, USA
 77. **Richards, G. M., and L. R. Beuchat.** 2005. Infection of cantaloupe rind with *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium expansum*, and associated migration of *Salmonella* poona into edible tissues. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 1-10.
 78. **Richards, G. M., and L. R. Beuchat.** 2005. Metabiotic associations of molds and *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind. *Int. J. Food Microbiol.* **97**: 327-339.
 79. **Riordan, D. C. R., G. M. Sapers, and B. A. Annous.** 2000. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of *Penicillium expansum* and *Glomerella cingulata* in wounds on apple surfaces. *J. Food Prot.* **63**: 1637-1642.
 80. **Rodriguez, E., J. L. Arques, M. Nunez, P. Gaya, and M. Medina.** 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic

- acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 3399-404.
81. **Rosenberg, N. A.** 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Mol. Ecol. Notes **4**: 137-138.
 82. **Ross, T., D. A. Ratkowsky, L. A. Mellefont, and T. A. McMeekin.** 2003. Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. **82**: 33-43.
 83. **Rowe, M. T., and R. B. Kirk.** 2000. Effect of nutrient starvation on the resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to subsequent heat stress. J. Food Prot. **63**: 1745-1748.
 84. **Saad, S. M. I., C. Vanzin, M. N. Oliveira, and B. Franco.** 2001. Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated Minas cheese during storage at 8.5 degrees C. J. Food Prot. **64**: 1151-1155.
 85. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 86. **Samson, R. A., E. S. Hoekstra, and J. C. Frisvad.** 2004. Introduction to food- and airborne fungi, Seventh ed. Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands.
 87. **Saridakis, C. E., R. P. Johnson, A. Benson, K. Ziebell, and C. L. Gyles.** 2004. Influence of animal origin and lineage on survival of *Escherichia coli* O157:H7 strains in strong and weak acid challenges. J. Food Prot. **67**: 1591-1596.
 88. **Schmidt, H., L. Beutin, and H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. **63**: 1055-1061.
 89. **Schmidt, H., B. Plaschke, S. Franke, H. Russmann, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and H. Karch.** 1994. Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Med Microbiol Immunol **183**: 23-31.
 90. **Sharma, R., K. Stanford, M. Louie, K. Munns, S. J. John, Y. X. Zhang, V. Gannon, L. Chui, R. Read, E. Topp, and T. McAllister.** 2009. *Escherichia coli*

- O157:H7 lineages in healthy beef and dairy cattle and clinical human cases in Alberta, Canada. *J. Food Prot.* **72**: 601-607.
91. **Shaw, R. K., C. N. Berger, B. Feys, S. Knutton, M. J. Pallen, and G. Frankel.** 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2908-2914.
 92. **Siezen, R. J., V. A. Tzeneva, A. Castioni, M. Wels, H. T. K. Phan, J. L. W. Rademaker, M. J. C. Starrenburg, M. Kleerebezem, D. Molenaar, and J. Vlieg.** 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ. Microbiol.* **12**: 758-773.
 93. **Stortz, G., and R. Hengge-Aronis.** 2000. Bacterial stress responses. ASM press, Washington DC, USA.
 94. **Su, C. Y., and L. J. Brandt.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann. Intern. Med.* **123**: 698-714.
 95. **Sun, Y. P., T. Unestam, S. D. Lucas, K. J. Johanson, L. Kenne, and R. Finlay.** 1999. Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza* **9**: 137-144.
 96. **Sutherland, J. P., A. J. Bayliss, and D. S. Braxton.** 1995. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* **25**: 29-49.
 97. **Tamagnini, L. M., G. B. de Sousa, R. D. Gonzalez, and C. E. Budde.** 2008. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. *Small Ruminant Res.* **76**: 177-182.
 98. **Thomson-Carter, F.** 2001. General recovery, characterisation and typing protocols for VTEC. p. 91-111. *In* G. Duffy, P. Garvey, and D. A. McDowell (ed.), Verocytotoxigenic *E. coli*. Food and Nutrition Press, Inc., Malden, MA , USA.
 99. **Uhlich, G. A., J. R. Sinclair, N. G. Warren, W. A. Chmielecki, and P. Fratamico.** 2008. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with two multistate food-borne outbreaks that occurred in

2006. Appl. Environ. Microbiol. **74**: 1268-1272.
100. **Ukuku, D. O., and D. J. Geveke.** 2010. A combined treatment of UV-light and radio frequency electric field for the inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice. Int. J. Food Microbiol. **138**: 50-55.
 101. **Vanaja, S. K., A. C. Springman, T. E. Besser, T. S. Whittam, and S. D. Manning.** 2010. Differential expression of virulence and stress fitness genes between *Escherichia coli* O157:H7 strains with clinical or bovine-biased genotypes. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 60-68.
 102. **Venables, W. N., and B. D. Ripley.** 2002. Modern applied statistics with S, 4th ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 103. **Vogel, H. J., and D. M. Bonner.** 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. **218**: 97-106.
 104. **Wade, W. N., R. Vasdinnyi, T. Deak, and L. R. Beuchat.** 2003. Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. **86**: 101-111.
 105. **Wang, G., C. G. Clark, and F. G. Rodgers.** 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **40**: 3613-3619.
 106. **Warmink, J. A., R. Nazir, and J. D. van Elsas.** 2009. Universal and species-specific bacterial 'fungiphiles' in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. Environ. Microbiol. **11**: 300-312.
 107. **Warmink, J. A., and J. D. van Elsas.** 2009. Migratory response of soil bacteria to *Lyophyllum* sp strain karsten in soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 2820-2830.
 108. **Warmink, J. A., and J. D. van Elsas.** 2008. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? ISME J. **2**: 887-900.
 109. **Whipps, J. M.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. **52**: 487-511.
 110. **Wick, L. Y., R. Remer, B. Wurz, J. Reichenbach, S. Braun, F. Scharfer, and**

- H. Harms.** 2007. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 500-505.
111. **Wong, P. T. W., and D. M. Griffin.** 1976. Bacterial movement at high matric potentials--II. In fungal colonies. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 219-223.
112. **Yang, Z., J. Kovar, J. Kim, J. Nietfeldt, D. R. Smith, R. A. Moxley, M. E. Olson, P. D. Fey, and A. K. Benson.** 2004. Identification of common subpopulations of non-sorbitol-fermenting, β -glucuronidase-negative *Escherichia coli* O157:H7 from bovine production environments and human clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6846-6854.
113. **Yousef, A. E., and V. K. Juneja.** 2003. Microbial stress adaptation and food safety. CRC press, Boca Raton, FL, USA.
114. **Zhang, Y., C. Laing, M. Steele, K. Ziebell, R. Johnson, A. K. Benson, E. Taboada, and V. P. Gannon.** 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics* **8**: 121.
115. **Zhang, Y. X., C. Laing, Z. Z. Zhang, J. Hallewell, C. P. You, K. Ziebell, R. P. Johnson, A. M. Kropinski, J. E. Thomas, M. Karmali, and V. P. J. Gannon.** 2010. Lineage and host source are both correlated with levels of Shiga toxin 2 production by *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 474-482.
116. **Ziebell, K., M. Steele, Y. Zhang, A. Benson, E. N. Taboada, C. Laing, S. McEwen, B. Ciebin, R. Johnson, and V. Gannon.** 2008. Genotypic characterization and prevalence of virulence factors among Canadian *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4314-4323.
117. 国立感染症研究所感染症情報センター. 2011. 腸管出血性大腸菌感染症 2011 年 4 月現在. *Infect. Agen. Survei. Rep.* **32**: 125'-126'.