

令和2～4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保

推進研究事業）

食中毒調査の迅速化・高速化及び広域食中毒発生時の早期探知に資する研究

研究代表者 明田幸宏 国立感染症研究所

分担研究報告書

食品由来株の収集

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究では、食中毒事例検体および食品検体から分離された志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の同一検体由来株間における反復配列多型解析(MLVA)型の多様性を明らかにするため、食中毒事例検体および食品検体由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。食中毒事例 2 事例検体、食品 5 検体由来の STEC 0157 菌株 215 株を解析した結果、同一検体中に MLVA 型が異なる STEC は殆ど存在しなかったことから、食中毒検査の際に同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一の MLVA 型の報告が過去に複数の地方自治体からあったことから、一層、食品を汚染する STEC の分離と分離株の MLVA 型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低い但し複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬 昌平

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

国立大学法人帯広畜産大学

佐々木 貴正

A. 研究目的

反復配列多型解析法 (MLVA 法) は迅速性、精微性に優れている。MLVA 型による広域食中毒の早期探

知には、食中毒事例の原因食品から分離された株の MLVA 型の迅速かつ正確な報告が必須である。しかし、仮に原因食品中に多様な MLVA

型の株が存在する場合、MLVA 法に供試する株数が少ないと、複数地域で食中毒事例に関連する同一 MLVA 型の株を見逃し、広域食中毒の早期探知に支障をきたす可能性がある。そのため、本研究では同一食中毒事例から分離された複数の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 菌株および同一食品から分離された複数の STEC 菌株について MLVA 法による比較解析と選択培地上での生育性の比較を行い、多様性を解析した。また、食品由来株の保有病原因子関連遺伝子を解析し、薬剤感受性を判定した。

B. 研究方法

1) 菌株

STEC 0157 菌株 215 株 (食中毒事例 A 由来非運動性株 25 株および運動性株 1 株、食中毒事例 D 由来 30 株、食品 E 由来 30 株、食品 F 由来 30 株、食品 G 由来 40 株、食品 H 由来 35 株、食品 I 由来 24 株) を供試した。

2) DNA 抽出

各菌株を Tryptone soya agar (TSA) に画線し、37°C にて 18 時間培養後、生育したコロニーから DNA を熱抽出した。

3) MLVA 解析

食中毒事例 A および D ならびに食品 E、F、G、H および I 由来株の抽出 DNA を鋳型として MLVA 解析用のマルチプレックス PCR 反応を行い、各遺伝子座ごとのリピート数

を菌株間で比較した。また、得られたデータを MLVA 情報共有リストと照合した。

4) Stx サブタイプ型別試験と病原因子関連遺伝子の解析

食品 E、F、G、H および I 由来株が保有する Stx サブタイプ

(*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) の型別を実施した。

また、病原因子関連遺伝子

(*eae*, *saa*, *iha*, *espB*, *espD*, *espP*, *tir*, *ehxA*, *subA*, *katP*, *stcE*) を PCR 法およびリアルタイム PCR 法で検出した。

5) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

令和 3 年度には、食中毒事例 D 由来株、食品 E および食品 F 由来株をセフェキシムおよび亜テルル酸添加クロモアガー STEC 培地

(CT-クロモアガー STEC) に画線し、37°C で 22±2 時間培養した後、コロニー生育状況を比較した。

6) 薬剤感受性試験

食品 E、F、G、H および I 由来株を TSA に画線し 37°C で 18 時間培養した。生育したコロニーを MUELLER-HINTON Broth に混合し、各ウェルごとに異なる濃度の薬剤 (アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコー

ル、トリメトプリム)が固着済の96wellプレートに接種した。35°Cで18±2時間培養し菌の増殖を判定した。

C. 研究結果

1) 同一食品由来 STEC 菌株間での MLVA リピート数の比較

食中毒事例 A 由来の非運動性 STEC 25 株のうち、22 株は 17 遺伝子座の各リピート数が全て同一であり、3 株は 1 遺伝子座のみリピート数が異なっていた。同事例由来の運動性 STEC 1 株の MLVA 型は非運動性株とは異なっていた。また、食品 I 由来の 23 株のうち、22 株は 17 遺伝子座の各リピート数が同一であり (食品 I 由来株 1)、1 株は 1 遺伝子座のみリピート数が異なっていた (食品 I 由来株 2)。食中毒事例 D 由来株、食品 E 由来株、食品 F 由来株、食品 G 由来株および食品 H 由来株の 17 遺伝子座の各リピート数は各由来食品ごとに全株で同一であった。また、食品 E、F、H 由来の全株および食品 I 由来の 22 株 (食品 I 由来株 1) の MLVA 型は、過去に地方自治体から報告された MLVA 型と同一であった。

2) Stx サブタイプ型別試験

食品 E 由来の STEC 0157 菌株は、*stx2a* および *stx2c* を保有していた。食品 F および G 由来株は、*stx2a* を保有していた。食品 H 由来株、食品 I 由来株 1 および食

品 I 由来株 2 は、*stx2c* を保有していた。

3) 病原因子関連遺伝子の解析

食品 E 由来株は、*eae*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった。食品 F、G、H および I 由来株では、*eae*、*iha*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*katP* および *stcE* が陽性となった。

4) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

食中毒事例 D 由来の 30 株のうち 14 株は、CT-クロモアガー STEC 上で生育したコロニー数が少なかった。食品 E 由来の 30 株のうち、11 株は CT-クロモアガー STEC 上で生育したコロニー数が少なく、9 株は非生育であった。食品 F 由来の 30 株のうち、10 株は CT-クロモアガー STEC で生育したコロニー数が少なく、13 株は非生育であった。

5) 薬剤感受性試験

食品 E 由来株は、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールおよびトリメトプリムに耐性が認められ、食品 F、G、H および食品 I 由来株では薬剤耐性が認められなかった。

D. 考察

食中毒事例 2 事例および食品 5 検体由来の STEC 0157 菌株 215 株のうち、同一検体由来で MLVA 型が異なる菌株は食中毒事例 A 由来株

4株と食品I由来株1株のみであった。MLVA型が異なるSTECは、同一食品中に出現する頻度が非常に低いことから、食中毒検査の際に同一検体から必要以上に多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株の一部は全国の地方自治体から報告されたSTECとMLVA型が一致し、共通して複数の病原因子関連遺伝子を保有していた。以上から、これらの食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。また、複数種類の寒天培地での生育性の比較から、同一MLVA型でもその生育状況には違いがあることが示された。また、食品E由来株は複数の薬剤耐性を保有しており、他の食品由来株は薬剤耐性が認められなかった。食品由来株が薬剤耐性を有する頻度は低いが、複数の薬剤に耐性を有する菌株も確認されたため、注視する必要があると考えられた。

E. 結論

食中毒事例2事例検体および食品5検体由来のSTEC 0157菌株215株は、殆どが由来検体ごとに同一のMLVA型であり、同一検体中に異なるMLVA型のSTECが存在する可能性は低いことから、食中毒検査の際に同一検体から多数のコロニーを分離する必要性は低いと考えられた。食品由来株と同一のMLVA型の報告が過去に複数の地方

自治体からあったことから、一層、食品を汚染するSTECの分離と分離株のMLVA型の解析が重要であると考えられた。また、食品由来株の病原因子関連遺伝子保有状況から食品由来株が食中毒を引き起こしうる菌株であることが推察された。さらに、頻度は低いが複数の薬剤に耐性を有する食品由来株も認められたため、注視する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

