

令和 6 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

#### 食品関連サンプル由来株の収集、解析

研究分担者 廣瀬 昌平 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

本研究では、2021 年から 2022 年までの間に国内の食肉処理施設 B に搬入された牛から分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 9 株の血清型および Stx サブタイプを同定し、MLVA 型を解析した。牛糞便由来 EHEC 株の血清型は、0157:H7 が 8 株、0182:H2 が 1 株であり、0157 株は 6 種類の MLVA 型に分類された。同一 MLVA 型の株が同一農場由来の異なる個体から分離されたことから、農場内で複数の個体が同一 MLVA 型の EHEC 株を保有している可能性が示唆された。食肉処理施設 B から収集した全ての牛糞便由来 EHEC 0157 株は、*stx2c* を保有していた。また、令和 5 年度に収集した食肉処理施設 A 由来の EHEC 0157 株（33 株）と、施設 B 由来の 0157 株（8 株）との MLVA 型比較から、由来施設ごとに異なるクラスターが形成される傾向が確認された。これらの知見から、今後の広域的な食中毒の早期探知には、地域ごとに牛糞便由来 EHEC 株の収集と MLVA 型およびゲノムデータの体系的蓄積が重要であると考えられた。

#### 研究協力者

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) による食中毒は、その届出数や重症度も相まって日本の食中毒対策として最も警戒が必要となっている。

EHEC 集団感染事例の発生時には、感染源や感染経路を把握し、全国的な感染拡大を予防するために患者や食品から分離された菌株の迅速な解析が求められる。近年で

は、反復配列多型解析法（MLVA 法）が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている。

EHEC 食中毒の原因として特定された原因食品としては、牛肉、牛レバー、チーズなど牛に関連する食品が多い。EHEC の主な生息場所は、ほ乳動物や鳥類の腸管内とされており、家畜の中では特に牛の腸管や糞便からの分離が多く報告されている。そのため、糞便を介した牛肉の汚染やその調理品に残存した EHEC の食中毒への関連が疑われている。そこで、本研究では、令和 5 年度に引き続き、食品関連サンプル由来株として食肉処理施設に搬入された牛の糞便由来 EHEC 株を収集し、MLVA 型およびゲノムデータを蓄積することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 菌株

2021 年 10 月から 2022 年 9 月に国内食肉処理施設 B に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 9 株を供試した。

### 2) DNA 抽出

カジトン培地に保存した牛糞便由来株を Tryptone soya agar (OXOID) に画線し、37℃にて 18

時間培養した。滅菌爪楊枝でコロニーを釣菌し、わずかに濁る程度の量を滅菌蒸留水 100  $\mu$ l に懸濁した。ヒートブロックで 100℃10 分間加熱した後、加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000  $\times g$  10 分間遠心した上清を DNA 溶液として保存した。

3) *stx* および *eae* の保有の確認ならびに O 血清群の決定

*stx* および *eae* の保有ならびに主要 7 血清遺伝子型 (026、045、0103、0111、0121、0145、0157) をマルチプレックスリアルタイム PCR によって判定した。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。いずれかの O 遺伝子型のプライマーで陽性と判定された株は、陽性となった O 群の抗血清を用いて O 血清群を決定した。いずれの O 遺伝子型も陰性となった株は、O-genotyping PCR

(Iguchi ら、2015) を用いて O 遺伝子型を決定し、陽性となった O 遺伝子型の抗血清を用いて O 血清型を決定した。

4) H 血清型の決定

H-genotyping PCR (Banjo ら、2018) を用いて H 遺伝子型を決定し、陽性となった H 遺伝子型の抗血清を用いて H 血清型を決定した。

#### 5) 生化学性状および運動性試験

カジトン培地に保存した EHEC 9 株を TSI 培地および LIM 培地に接種し、37℃で 24 時間培養し、生化学性状および運動性を確認した。

#### 6) マルチプレックス PCR および増幅産物の MLVA 解析

2 種類のプライマーミックスを調製した(表 2)。牛糞便由来 EHEC 株の抽出 DNA を鋳型として供試し、ProFlex PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いてマルチプレックス PCR 反応を行った。PCR 反応には 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) を使用した。95℃15 分の熱変性後、95℃20 秒—60℃90 秒—72℃60 秒を 30 サイクルの増幅反応後、72℃で 10 分間反応させた。増幅産物は Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた高精度電気泳動によってフラグメント解析を行い、GeneMapper Software 6.0 を用いて各遺伝子座のリポート数を決定した。遺伝子

座ごとのリポート数を菌株間で比較した。また、得られたピークデータを基に MLVA 型を決定した。

#### 7) Stx サブタイプ型別試験

Scheutz らの PCR 法 (J Clin Micro, 2012 50(9)2951) に従い、牛糞便由来 EHEC 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。2) で抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は ProFlex PCR System を使用した。PCR 反応には HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) を使用した。Stx サブタイプ型別用のプライマーを用いた (表 3)。

#### 8) 株間の類縁関係解析

令和 5 年度に収集した食肉処理施設 A 由来の牛糞便分離 EHEC 0157 株 (33 株: 菌株 1、3 から 13、15 から 34、36) と令和 6 年度に収集した食肉処理施設 B 由来の牛糞便分離 EHEC 0157 株 (8 株: 菌株 37 から 43、45) の株間の類縁関係を明らかにするため PHYLOViZ Online を用いて MLVA 解析結果の各遺伝子座リポート数を株間で比較し、Minimum spanning tree (MST) を作成した。

### C. 研究結果

### 1) 牛糞便由来 EHEC 株の血清型および MLVA 型

食肉処理施設 B から収集された牛糞便由来株 9 株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は 0157:H7 が 8 株、0182:H2 が 1 株であった (表 4)。MLVA 型は 21m0152、22m0067、22m0603、22m0604、22m0605 および 24m0510 の 6 種類に分類された。22m0603 および 24m0510 は、同一農場由来の異なる個体から分離された。0157 株の TSI および LIM 培地での生化学性状判定結果は、一般的な大腸菌と同様に乳糖および白糖分解 (+)、ガス産生 (+)、リジン (+)、インドール (+) および運動性 (+) であった。0182 株は、運動性 (-) であり、その他の性状は 0157 株と同じであった。

### 2) 牛糞便由来 EHEC 株が保有する *Stx* サブタイプ遺伝子パターン

保有する *Stx* サブタイプ遺伝子のパターンは、0157 株では全て *stx2c* 単独保有であり、0182 株は *stx1a* 単独保有であった (表 4)。

### 3) 由来施設間での菌株の比較

食肉処理施設 A 由来 EHEC 0157 株および食肉処理施設 B 由来 EHEC 0157 株は概ね別のクラスターを形成した (図 1)。しかし、菌株 13 および菌株 36 など一部の菌株はク

ラスターを超えて混在した。

### D. 考察

本研究では、国内の食肉処理施設 B から収集された牛糞便由来 EHEC 株 9 株について、血清型、*Stx* サブタイプ、MLVA 解析を実施し、施設 A 由来株との類縁関係を明らかにした。施設 B 由来の EHEC 株は主に 0157:H7 であり、特に *Stx* サブタイプ *stx2c* を保有することが特徴であった。一方で、0182:H2 という異なる血清型および *Stx* サブタイプ *stx1a* を保有する株も確認され、多様な EHEC 株が存在することが示唆された。MLVA 解析結果から、施設 B 由来の EHEC 株は 6 つの MLVA 型に分類され、一部の MLVA 型 (22m0603 および 24m0510) は同一農場由来の異なる個体から分離されていることから、特定の農場において複数の個体間で同一または近縁な株が広がっている可能性が示唆された。

MST を用いた MLVA 型の比較では、施設 A と施設 B の EHEC 0157 株が概ね別のクラスターを形成したことから、施設の地域あるいは農場ごとに偏りがある可能性が推察された。しかし、一部の株が施設を超えて混在していたことから、MLVA のみの情報で分離地域を

特定することは困難であると推察された。

#### E. 結論

農場内で同一 MLVA 型の EHEC 株が複数の個体に存在する可能性が示唆された。また、EHEC の MLVA 型には食肉処理施設や農場ごとの偏りが見られることから、広域的な食中毒の早期探知を可能にするためには、地域ごとに牛糞便由来株などの EHEC 株を収集し、MLVA 型およびゲノムデータを体系的に蓄積することが重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

• Shouhei Hirose, Hidemasa Izumiya, Yoshimasa Sasaki, Yukihiro Akeda and Yukiko Hara-Kudo : Multilocus variable-number tandem-repeat analysis genotype diversity, pathogen-related genes and antimicrobial susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in the same food sample,

International Association for Food Protection Annual Meeting 2024, 2024  
(令和 6) 年 7 月 15 日, ロサンゼルス.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 腸管出血性大腸菌検出用プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

| アッセイ名  | 標的<br>遺伝子     | プライマー<br>とプローブ | 配列                              | 出典   |
|--------|---------------|----------------|---------------------------------|------|
| Assay1 | <i>stx</i>    | Stx-F          | TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG    | USDA |
|        |               | Stx-R          | CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACDTC      |      |
|        |               | Stx1-P         | CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA |      |
|        |               | Stx2-P         | TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC     |      |
|        | <i>eaeA</i>   | Eae-F          | CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA      | USDA |
|        |               | Eae-R          | CTCATGCGGAAATAGCCGTTM           |      |
|        |               | Eae-P          | ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC  |      |
| Assay2 | 16S rRNA gene | 16S rRNA-F     | CCTCTTGCCATCGGATGTG             | USDA |
|        |               | 16S rRNA-R     | GGCTGGTCATCCTCTCAGACC           |      |
|        |               | 16S rRNA-P     | GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC      |      |
|        | RfbEO157      | RfbE O157-F    | TTTCACACTATTGGATGGTCTCAA        | EFSA |
|        |               | RfbE O157-R    | CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT        |      |
|        |               | RfbE O157-P    | AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG  |      |
| Assay3 | WzxO26        | Wzx O26-F      | GTATCGCTGAAATTAGAAGCGC          | USDA |
|        |               | Wzx O26-R      | AGTTGAAACACCCGTAATGGC           |      |
|        |               | Wzx O26-P      | TGGTTCGGTTGGATTGTCCATAAGAGGG    |      |
|        | WbdIO111      | WbdI O111-F    | TGTTCCAGGTGGTAGGATTCG           | USDA |
|        |               | WbdI O111-R    | TCACGATGTTGATCATCTGGG           |      |
|        |               | WbdI O111-P    | TGAAGGCGAGGCAACACATTATATAGTGC   |      |
| Assay4 | WzxO45        | Wzx O45-F      | CGTTGTGCATGGTGGCAT              | USDA |
|        |               | Wzx O45-R      | TGGCCAAACCAACTATGAACTG          |      |
|        |               | Wzx O45-P      | ATTTTTTGCTGCAAGTGGGCTGTCCA      |      |
|        | WzxO121       | Wzx O121-F     | AGGCGCTGTTTGGTCTCTTAGA          | USDA |
|        |               | Wzx O121-R     | GAACCGAAATGATGGGTGCT            |      |
|        |               | Wzx O121-P     | CGCTATCATGGCGGACAATGACAGTGC     |      |
| Assay5 | WzxO103       | Wzx O103-F     | TTGGAGCGTTAACTGGACCT            | USDA |
|        |               | Wzx O103-R     | ATATTCGCTATATCTTCTTGCGGC        |      |
|        |               | Wzx O103-P     | AGGCTTATCTGGCTGTTCTTACTACGGC    |      |
|        | WzxO145       | Wzx O145-F     | AAACTGGGATTGGACGTGG             | USDA |
|        |               | Wzx O145-R     | CCCAAACTTCTAGGCCCG              |      |
|        |               | Wzx O145-P     | TGCTAATTGCAGCCCTTGCACTACGAGGC   |      |

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138、2013

表 2. MLVA 解析用プライマーミックス

| プライマー<br>ミックス | 遺伝子座     | Dye   | Forward                              | Reverse                              |
|---------------|----------|-------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Mix1          | EHC-2    | VIC   | CCAGTTCGGCAGTGAGCTG                  | ACGCTGGTCCGGGAGATTAT                 |
|               | O157-25  | PET   | GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATTTAGTG     | GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACAC    |
|               | O157-9   | VIC   | GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC          | TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG |
|               | O157-9   |       |                                      | GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC      |
|               | EH157-12 | PET   | ACAGTACCCATGCCAGCAA                  | GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC            |
|               | EH111-8  | PET   | CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA              | CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG    |
|               |          | PET   | CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA              | CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG    |
|               | EHC-1    | VIC   | GTGCGTAACCTGCTGGCACA                 | CGCGGCTGCCGGAGTATC                   |
|               | EHC-5    | NED   | ATACTACAGACGTCTGCTGATGA              | CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC             |
|               | O157-3   | NED   | GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTAATTG        | GAACAACCTAAACCCGCTCGCCATCG           |
|               | O157-34  | 5-FAM | TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG             | AGGCATTAATAGCAGATGTTT                |
| Mix2          | EH26-7   | PET   | CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG           | CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT                |
|               | O157-19  | NED   | GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT | CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC        |
|               | EH111-11 | 5-FAM | GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA        | CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG            |
|               | EHC-6    | NED   | ATGGAGAACCGTCTGAGTGC                 | TCAGAAATCATCTCCGGCTCAAC              |
|               | O157-37  | PET   | AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA            | GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG              |
|               | O157-17  | VIC   | GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA     | AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC   |
|               | O157-36  | NED   | GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC        | GCCGCTGAAAGCCACACCATGC               |
|               | EH111-14 | 5-FAM | ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG            | GGGTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG            |

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

| 遺伝子          | Foward                         | Reverse                                                                    |
|--------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <i>stx1a</i> | CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT        | GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG                                                  |
| <i>stx1c</i> | CCTTTCCTGGTACAACAGCGGTT        | CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA                                                 |
| <i>stx1d</i> | CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC  | CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA                                               |
| <i>stx2a</i> | GCGATACTGRGBACTGTGGCC          | CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG<br>GCCACCTTCACTGTGAATGTG                          |
| <i>stx2b</i> | AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC    | CAGCAAATCCTGAACCTGACG                                                      |
| <i>stx2c</i> | GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA | CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA                                                   |
| <i>stx2d</i> | AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG  | TTYCCGGCCACTTTTACTGTG<br>TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG<br>GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC |
| <i>stx2e</i> | CGGAGTATCGGGGAGAGGC            | CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT                                                 |
| <i>stx2f</i> | TGGGCGTCATTCACTGGTTG           | TAATGGCCGCCCTGTCTCC                                                        |
| <i>stx2g</i> | CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC  | GATGGCAATTCAGAATAACCGCT                                                    |

表 4. 食肉処理施設 B から収集した牛糞便由来 EHEC 株の分離年月、血清型、MLVA 型  
および Stx サブタイプ

| 菌株名  | 分離年月     | 血清型     | MLVA型   | Stx subtype  |
|------|----------|---------|---------|--------------|
| 菌株37 | 2021年10月 | O157:H7 | 22m0067 | <i>stx2c</i> |
| 菌株38 | 2021年10月 | O157:H7 | 21m0152 | <i>stx2c</i> |
| 菌株39 | 2022年6月  | O157:H7 | 22m0603 | <i>stx2c</i> |
| 菌株40 | 2022年6月  | O157:H7 | 22m0603 | <i>stx2c</i> |
| 菌株41 | 2022年6月  | O157:H7 | 22m0604 | <i>stx2c</i> |
| 菌株42 | 2022年9月  | O157:H7 | 24m0510 | <i>stx2c</i> |
| 菌株43 | 2022年9月  | O157:H7 | 24m0510 | <i>stx2c</i> |
| 菌株44 | 2022年9月  | O182:H2 | NA      | <i>stx1a</i> |
| 菌株45 | 2022年9月  | O157:H7 | 22m0605 | <i>stx2c</i> |

NA: Not applicable

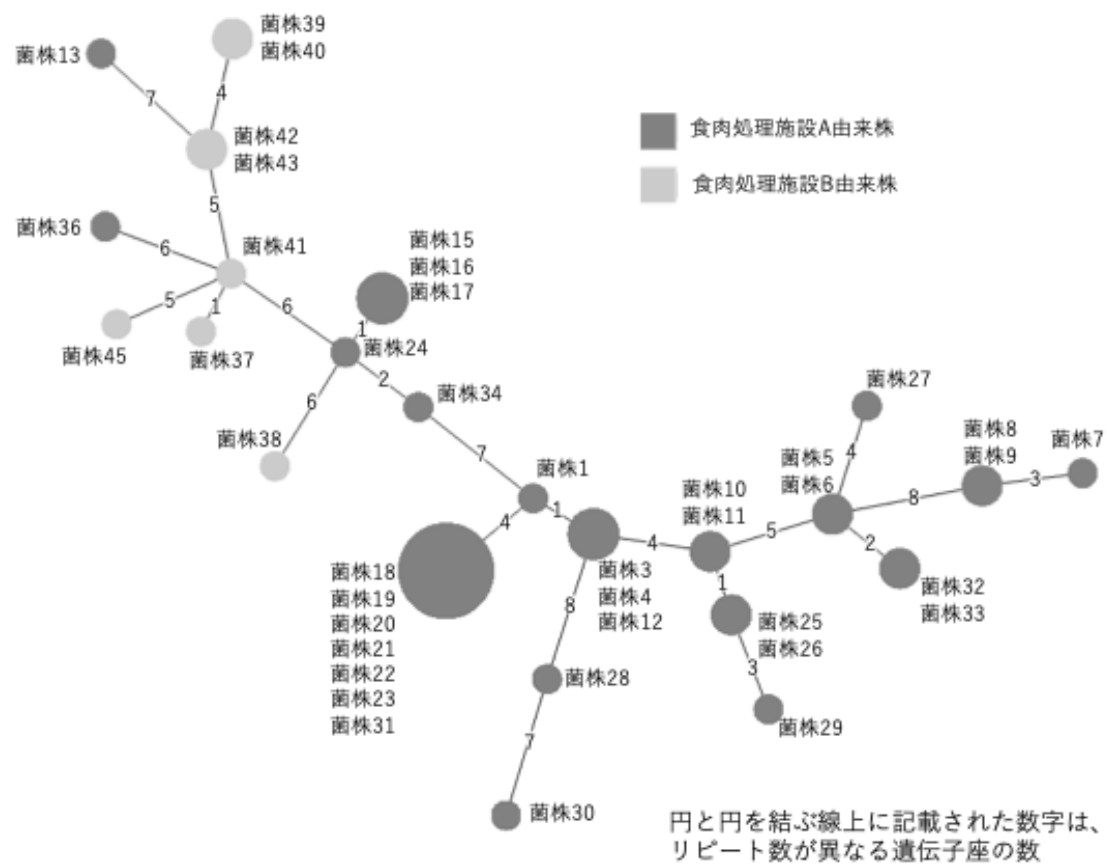


図1. MLVA 解析に基づく EHEC 株の類縁関係