

令和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、食品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、食品由来 STEC 菌株を MLVA 法に供試し、MLVA 型多様性を解析した。その結果、MLVA 法に供試した STEC 菌株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝子座のリピート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことから、食中毒検査で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、頻度は低いながらも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

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、感染源や感染経路の把握し、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。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、本研究では食品が同時に複数種類の EHEC 菌株に汚染されているかを確認するため、同一食品から分離された複数の志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) について MLVA 法による比較解析を行い、多様性を解析した。また、食品由来 STEC 菌株の基礎情報を蓄

積し、食中毒予防に資するために、令和 2 年度から令和 4 年度までに分離し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

令和 2 年度に食品 E (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 30 株、令和 3 年度に食品 F (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 30 株、令和 4 年度に食品 G (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 40 株、食品 H (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 35 株、食品 I (国産牛肉) 培養液から分離した STEC 0157:H7 を 24 株、合計 159 株を供試した (表 1)。

2) DNA 抽出

カジトン培地に保存していた食品 G、H および I 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 μ 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) 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)。食品 G、H および I 由来の STEC 0157:H7 の抽出 DNA を鋳型として供試し、PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ research) 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°C の 15 分の熱変性ののち、95°C 20 秒—60°C 90 秒—72°C 60 秒を 30 サイクルの増幅反応後、72°C で 10 分間反応させた。増幅産物は Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシュ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。各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 MLVA 情報共有リストと照合し、過去に同一 MLVA 型の報告があるかを確認した。

4) 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、食品 E、F、G および H 由来 STEC 0157:H7 各 1 株、I 由来の MLVA 型が異なる STEC 0157:H72 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。3) の方法で食品 E、F、G および H 由来 STEC 0157:H7 各 1 株、I 由来の MLVA 型が異なる STEC 0157:H72 株から抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ research) および ProFlex PCR System (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) 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)。

5) 病原因子関連遺伝子の解析

4) で抽出した DNA を PCR およびリアルタイム PCR 法の鋳型として供試した。*saa*、*iha*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、*ehxA*、*subA*、*katP*、*stcE* は、PCR 法で検出し、*eae* はリアルタイム PCR 法で検出した。機器は PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ research)、VeritiPro 96 (Applied Biosystems) および QuantStudio5 リアルタイム PCR システム

(Applied Biosystems) を使用した。プライマーおよびプローブの配列を表 4 に示す。

6) 薬剤感受性試験

食品 E、F、G、H 由来の各一株、食品 I 由来株 1 および食品 I 由来株 2 を Tryptic soy agar (TSA、BD) に画線し 37°C にて 18 時間培養した。培地上に生育したコロニーを滅菌 DW で懸濁した後、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、セフトキシム、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 16 から 20 時間培養し、ウェル底に直径 1mm 以上の菌体ペレットが確認できたウェルで菌の増殖を陽性と判定した。

C. 研究結果

1) 同一食品由来 STEC 菌株間での MLVA リポート数の比較

食品 G 由来の STEC 0157 菌株 40 株および食品 H 由来の STEC0157 菌株 35 株の 17 遺伝子座の各リポート数は各由来食品ごとに全株で同

一であった（表 5）。食品 I 由来株の STEC 0157 菌株は、23 株の 17 遺伝子座の各リポート数が同一であり、1 株が 1 遺伝子座のみリポート数が異なっていた。

2) 過去に報告された MLVA 型との照合

食品 E、F、H 由来の全株および食品 I 由来の 23 株（食品 I 由来株 1）の MLVA 型は、過去に自治体から報告された MLVA 型と同一であった（表 6）。食品 G 由来の全株および食品 I 由来の 1 株（食品 I 由来株 2）の MLVA 型は、未報告であった。

3) 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（表 7）。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。

4) 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（表 8）。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（表 8）。

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 由来株および食品 I 由来株 1、2 では薬剤耐性が認められなかった（表 9）。

D. 考察

食品 G 由来株 40 株および食品 H 由来株 35 株は各由来食品ごとに全株が同一の MLVA 型であった。食品 I 由来株 24 株のうち、23 株は同一 MLVA 型であり、1 株は 1 遺伝子座のリピート数のみが異なる MLVA 型であった。以上の結果から、同一食品中に MLVA 型が大きく異なる STEC が存在する可能性は低いことが示唆された。このため、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 E、F、G、H および I 由来株の一部は全国の自治体から報告された STEC と MLVA 型が一致した。これらの STEC が食品を介して広く食卓まで運ばれることで、食中毒リスクにつながる可能性が示唆された。また、食品由来 E、F、G、H および I 株は *stx2a* および *stx2c* を単独あるいは両方保有しており、共通して *eae*、*espB*、*espD*、*espP*、*tir*、

ehxA、*katP* および *stcE* といった病原因子関連遺伝子を保有していた。そのため、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。食品 E（国産牛肉）由来株で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確認された。2020 年に動物医薬品検査所が行った調査では、ウシ由来大腸菌における耐性菌の出現頻度は、ストレプトマイシンで 14.6%、テトラサイクリンで 19.8%、クロラムフェニコールで 5.9% およびトリメトプリム（スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤）で 2.8% であり、食品 E 由来株の薬剤耐性と矛盾しない。その他の食品由来株では薬剤耐性が認められなかった。以上から、食品由来株が薬剤耐性を有する頻度は低い、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

令和 4 年度に MLVA 解析に供試した食品 G、H および I 由来の STEC 0157 菌株 99 株は、殆どが由来食品ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であり、1 株のみ 1 遺伝

子座のリポート数が異なる株であった。同一検体中に MLVA 型が大きく異なる 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

表 1. 供試菌株

分離年度	由来	株数
令和2年度	食品E	30
令和3年度	食品F	30
令和4年度	食品G	40
	食品H	35
	食品I	24

表 2. MLVA 解析用プライマーミックス

プライマー	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
Mix1	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGT	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTT
			TATATTTAGTG	ACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCT	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAA
			TCC	TATTTTTTG
	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
			EH111-8	PET
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAA
			GCTG	GCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTT	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
			TGAATTG	
O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTC	
Mix2	EH26-7	PET	CCCCTATCAAAACTGATACCCGAT	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
			AAG	
	O157-19	NED	GCAAGTATCATTATTAGCACCGCT	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAG
			TTCTGGATGTTC	C
	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATT	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EH26-7	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCGGCTCAAC
			GAAGA	
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
			GA	
	O157-17	VIC	GCAAGTTCGCTGGTTTTAACATTGC	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGG
O157-36	NED	AGTGATGA	CGATC	
		GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGT	GCCGCTGAAAGCCCACACCATGC	
EH111-14	5-FAM	TAAAC		
		ATGAAATTATCGCAGCATACAATC	GGGTTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG	
G				

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
stx1a	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
stx1c	CCTTTCCTGGTACAACGCGGTT	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA
stx1d	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTACC	CTCTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA
stx2a	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG
stx2b	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	CAGCAAATCCTGAACCTGACG
stx2c	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA
stx2d	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC
stx2e	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT
stx2f	TGGGCGTCATTCCTGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
stx2g	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 主要病原因子関連遺伝子のプライマーおよびプローブ配列

遺伝子	Forward	Reverse	Probe
eae	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	CTCATGCGGAAATAGCCGTTM	HEX-ATAGTCTCGCCAGTAT TCGCCACCAATACC-BHQ
saa	CGTGATGAACAGGCTATTGC	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	None
iha	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	TCCTTAAGCTCCCGGGCTGA	None
espB	GCCGTTTTTGAGAGCCAGAAT	ATCATCCTGCGCTCTGCGAAC	None
espD	CGCTGGATTTACAACGTTA	CCAGCTCAACCTTCGCACTCT	None
espP	GCTGGCAACCAGCAACAGCG	CGGTAGCCCGCTTCTGCACC	None
tir	CATTACCTTCACAAACCGAC	CCCCGTTAATCCTCCAT	None
ehxA	ACAGCTGCAAGTGCGGGTCTG	GGGATGCACTGGAGGCTGCAC	None
subA	TATGGCTTCCTCATTGCC	TATAGCTGTTGCTTCTGACG	None
katP	GCGCCAGTGGTGTCAGCAA	ATATCGGGCTGCCGTCCCA	None
stcE	GGCTCCGAGGTGGGGGAAT	GAAGCCGGTGGAGGAACGGC	None

表5. 食品 G、H および I 由来 STEC 0157 菌株の MLVA リポート数

菌株由来	株数	MLVA リポート数																
		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37
食品G	40	2	-2	1	3	-2	13	5	-2	-2	4	9	-2	4	4	8	6	5
食品H	35	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	10	7
食品I	23	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	10	7
	1	2	-2	1	1	-2	7	8	10	-2	-2	5	12	5	3	6	8	7

表6. 食品由来 STEC 0157 菌株の MLVA 型と過去の報告の照合

菌株由来	分離年	株数	MLVA型	MLVA情報共有リストでの同一MLVA型の報告
食品E	令和2年	30	20m0445	令和3年 6自治体 令和4年 3自治体
食品F	令和3年	30	17m0142	令和3年 2自治体
食品G	令和4年	40	22m0469	該当なし
食品H	令和4年	35	21m0453	令和3年 1自治体
食品I	令和4年	23	21m0453	令和3年 1自治体
		1	22m0470	該当なし

表7. 食品由来 STEC 0157 菌株が保有する Stx サブタイプ

菌株	Stxサブタイプ
食品E由来株	stx2a, 2c
食品F由来株	stx2a
食品G由来株	stx2a
食品H由来株	stx2c
食品I由来株1	stx2c
食品I由来株2	stx2c

表8. 食品由来 STEC 0157 菌株が保有する主要病原因子関連遺伝子

菌株	<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>iha</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>tir</i>	<i>ehxA</i>	<i>subA</i>	<i>katP</i>	<i>stcE</i>
食品E由来株	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
食品F由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品G由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品H由来株	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品I由来株1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
食品I由来株2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

表9. 食品由来 STEC 0157 菌株の薬剤耐性

菌株	最小発育阻止濃度 (mg/L)											
	ABPC (32)*	CEZ (32)	CTX (4)	SM (32)	GM (16)	KM (64)	TC (16)	NA (32)	CPFX (4)	CL (16)	CP (32)	TMP (16)
食品E由来株	2	<1	<0.5	128	<0.5	<1	32	<1	<0.03	<0.12	32	>16
食品F由来株	2	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	<0.12	4	<0.25
食品G由来株	2	<1	<0.5	2	<0.5	<1	1	2	<0.03	<0.12	2	<0.25
食品H由来株	2	<1	<0.5	2	<0.5	2	1	2	<0.03	<0.12	2	<0.25
食品I由来株1	1	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	0.25	2	<0.25
食品I由来株2	1	<1	<0.5	4	<0.5	2	1	2	<0.03	0.25	1	<0.25

*Resistance breakpoint (mg/L)は Clinical And Laboratory Standards Institute に準じた。

AMPC:アンピシリン、CEZ:セファゾリン、CTX:セフォタキシム、SM:ストレプトマイシン、GM:ゲンタマイシン、KM:カナマイシン、TC:テトラサイクリン、NA:ナリジクス酸、CPFX:シプロフロキサシン、CL:コリスチン、CP:クロラムフェニコール、TMP:トリメトプリム