

令和7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

腸管出血性大腸菌（EHEC）は、重症化リスクの高さから重要な食中毒起因菌とされている。本研究では、食品関連サンプル由来 EHEC 株に関する分子疫学的知見の蓄積を目的として、牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 解析結果と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析するとともに、牛関連食品検体からの EHEC 分離を実施した。牛由来 EHEC 0157 41 株について MLVA 解析結果に基づく Minimum spanning tree を作成した結果、分離年による明確なクラスターは認められなかった一方で、*stx2c* 単独保有株によるクラスターが認められた。また、市販牛関連食品 49 検体および牛盲腸 66 検体から EHEC 分離を実施した結果、市販食品検体では 8 検体から 9 株、牛盲腸検体では 16 検体から 20 株の EHEC が分離された。市販食品由来株は全て *eae* 陽性であり、Og103 および Og157 などヒト感染事例で報告頻度の高い O 遺伝子型も検出された。一方、牛盲腸由来株では *eae* 陰性株が多く認められた。以上の結果から、*stx* subtype 保有パターンと系統学的背景との関連性が示唆された。また、牛関連食品および牛盲腸には多様な EHEC が存在しており、その一部にはヒト感染症との関連が懸念される血清群や遺伝子型が含まれることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒は、届出数の多さや重症化リスクの高さから、日本におい

て特に重要な食中毒対策対象となっている。EHEC 集団感染事例発生時には、感染源および感染経路を迅速に把握し、感染拡大を防止す

るため、患者由来株や食品由来株の迅速かつ高精度な菌株解析が求められる。近年では、反復配列多型解析法（multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis：MLVA 法）が迅速性および識別能に優れることから、国内の分子疫学解析に広く利用されている。EHEC 食中毒の原因食品としては、牛肉、牛レバー、チーズなど牛関連食品が多く報告されている。EHEC は哺乳動物や鳥類の腸管内を主な生息場所とし、特に牛の腸管内容物や糞便から高頻度に分離されることが知られている。そのため、牛糞便による食品汚染や、牛関連食品中に残存した EHEC が食中毒発生に関与している可能性が指摘されている。そこで本研究では、食品関連サンプル由来 EHEC 株に関する分子疫学的知見の蓄積を目的として、令和 5～6 年度に収集した牛由来 EHEC 0157 株について、MLVA 解析結果と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析した。さらに、食品関連由来株を追加収集するため、牛関連食品検体からの EHEC 分離を実施した。

B. 研究方法

1. 牛由来 EHEC 株の MLVA 型と分

離年および *stx* subtype 保有パターンの関係の解析

1) 供試菌株

令和 5 年度および令和 6 年度に国内食肉処理施設に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 0157 41 株を供試した。

2) 分離年および *stx* subtype 保有パターンの解析

供試菌株の MLVA 型、分離時期および *stx* subtype 保有パターンの関連を明らかにするため、令和 6 年度までに取得した MLVA 解析結果に基づき、各遺伝子座のリポート数を用いて GrapeTree により菌株間の比較解析を行った。作成した Minimum spanning tree (MST) 上に各菌株の分離年および *stx* subtype 保有パターンを図示した。

2. 牛関連食品検体からの EHEC 株の分離

1) 検体

小売店で購入した食品検体（牛小腸 12 検体、牛大腸 25 検体および牛スライス肉・牛小間切れ肉 12 検体：計 49 検体）および家畜の内蔵臓器専門店を介して入手した牛盲腸検体（66 検体）を供試した。

2) EHEC の分離培養

小売店で購入した食品検体 50 g

に modified Tryptic Soy Broth (mTSB) 150 mL を加え、ストマッカー処理後に $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22～24 時間培養した。培養液から DNA をアルカリ熱抽出し、表 1 のプライマーおよびプローブを用いて multiplex real-time PCR で *stx*、*eae* および主要 7 血清 O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 関連遺伝子をスクリーニングした。*stx* 陽性かつ O26、O45、O103、O111、O121、O145 あるいは O157 のいずれかが陽性となった培養液は、陽性血清群を対象とした免疫磁気ビーズ法で濃縮した。濃縮液を塩酸で酸処理し、濃縮液および酸処理液をソルビトールマッコンキー培地 (SMAC)、セフィキシム・亜テルル酸添加 SMAC (CT-SMAC)、クロモアガー STEC 培地 (CHSTEC)、セフィキシム・亜テルル酸添加 CHSTEC (CT-CHSTEC) に塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18～24 時間培養した。*stx* 陽性かつ O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 のいずれかも陰性であった培養液は、免疫磁気ビーズ法を実施せず、酸処理後に同様に培養した。培地上に形成された大腸菌様コロニーから DNA を熱抽出し、上述の multiplex real-time PCR で *stx* 陽性となったコロニーを単離

し、市販食品分離株として保存した。

牛盲腸検体 25g に mTSB あるいは NmEC 225 mL を加え、ストマッカー処理後に $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22～24 時間培養した。以降の分離培養は、市販食品検体と同様の手順で実施した。分離株のうち、multiplex real-time PCR でいずれの 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 遺伝子型を決定した。本報告書では、*stx* 陽性大腸菌を EHEC と表記した。

C. 研究結果

1. 牛由来 EHEC 株の MLVA 型と分離年および *stx* subtype 保有パターンの関係の解析

菌株の MLVA 型による MST と分離年の関係を図 1 に示した。分離年による偏りは認められなかった。また、菌株の MLVA 型による MST と保有する *stx* subtype パターンの関係を図 2 に示した。*stx2c* を単独保有するクラスターが認められた。

2. 牛関連食品検体からの EHEC 株の分離

市販食品検体 49 検体のうち 8 検体が EHEC 分離陽性となり、9 株

の EHEC が分離された（表 1）。各検体からの分離株の内訳は、牛小腸検体から 0g103 が 1 株、牛大腸検体から 0g103 が 3 株、0g157 が 3 株および 0gUT が 1 株、牛スライス肉検体から 0g103 が 1 株であった。全ての分離株が *eae* 陽性であった。また、牛盲腸検体 66 検体のうち 16 検体が EHEC 分離陽性となり、20 株の EHEC が分離された（表 2）。分離株の内訳は、0g103 が 5 株、0g109 が 1 株、0g116 が 2 株、0g119 が 1 株、0g157 が 1 株、0g171 が 1 株、0g5413 が 8 株および 0gN10 が 1 株であった。分離株のうち、0g103、0g109 および 0g157 は全て *eae* 陽性であった。

D. 考察

本研究では、牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 型と分離年および *stx* subtype 保有パターンとの関連を解析するとともに、牛関連食品検体および牛盲腸検体からの EHEC 分離を実施した。牛由来 EHEC 0157 株の MLVA 解析では、分離年ごとの明確なクラスター形成は認められなかったことから、特定年度に限定して流行した菌株が優占しているというよりも、複数系統の菌株が継続的に牛群内に維持されている可能性が示唆された。一方で、

stx subtype 保有パターンとの関連性解析では、*stx2c* 単独保有株が一定のクラスターを形成していた。*stx* subtype は志賀毒素産生性や病原性評価に関連する重要な指標であり、本結果は、特定の *stx* subtype 保有パターンと系統学的背景との間に一定の関連が存在する可能性を示していると考えられた。

牛関連食品検体からの EHEC 分離では、市販食品検体 49 検体中 8 検体から 9 株の EHEC が分離された。特に牛大腸検体からは 0g103、0g157 および 0gUT が分離され、牛内臓肉が EHEC 汚染源となり得ることが改めて確認された。また、市販食品由来株はいずれも *eae* 陽性であり、付着因子を保有する株が一定頻度で流通食品中に存在していることが示された。0g103 および 0g157 は国内外のヒト感染事例でも報告頻度の高い血清群であることから、牛関連食品における継続的な監視の必要性が示唆された。牛盲腸検体では、66 検体中 16 検体から 20 株の EHEC が分離され、市販食品検体と比較して多様な 0 遺伝子型が検出された。特に 0g5413 が最も多く分離された一方で、0g103 および 0g157 も検出された。さらに、*eae* 陽性株は

Og103、Og109 および Og157 に限られ、多くの株は *eae* 陰性であった。本報告書では *stx* 陽性大腸菌を EHEC として取り扱ったが、*eae* 陰性 *stx* 陽性大腸菌についてはヒトに対する病原性が明確でない株も含まれる可能性がある。その一方で、牛腸管内には多様な *stx* 保有大腸菌が存在していることが示され、牛が *stx* 遺伝子保有菌の重要なリザーバーであることを支持する結果と考えられた。

E. 結論

牛関連食品および牛盲腸には多様な EHEC が存在しており、その一部にはヒト感染症との関連が懸念される遺伝子型が含まれることが示された。今後は、全ゲノム配列を用いた臨床分離株との比較解析を組み合わせることで、牛由来株、食品由来株およびヒト感染事例との関連性をさらに詳細に評価する必要があると考えられた。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

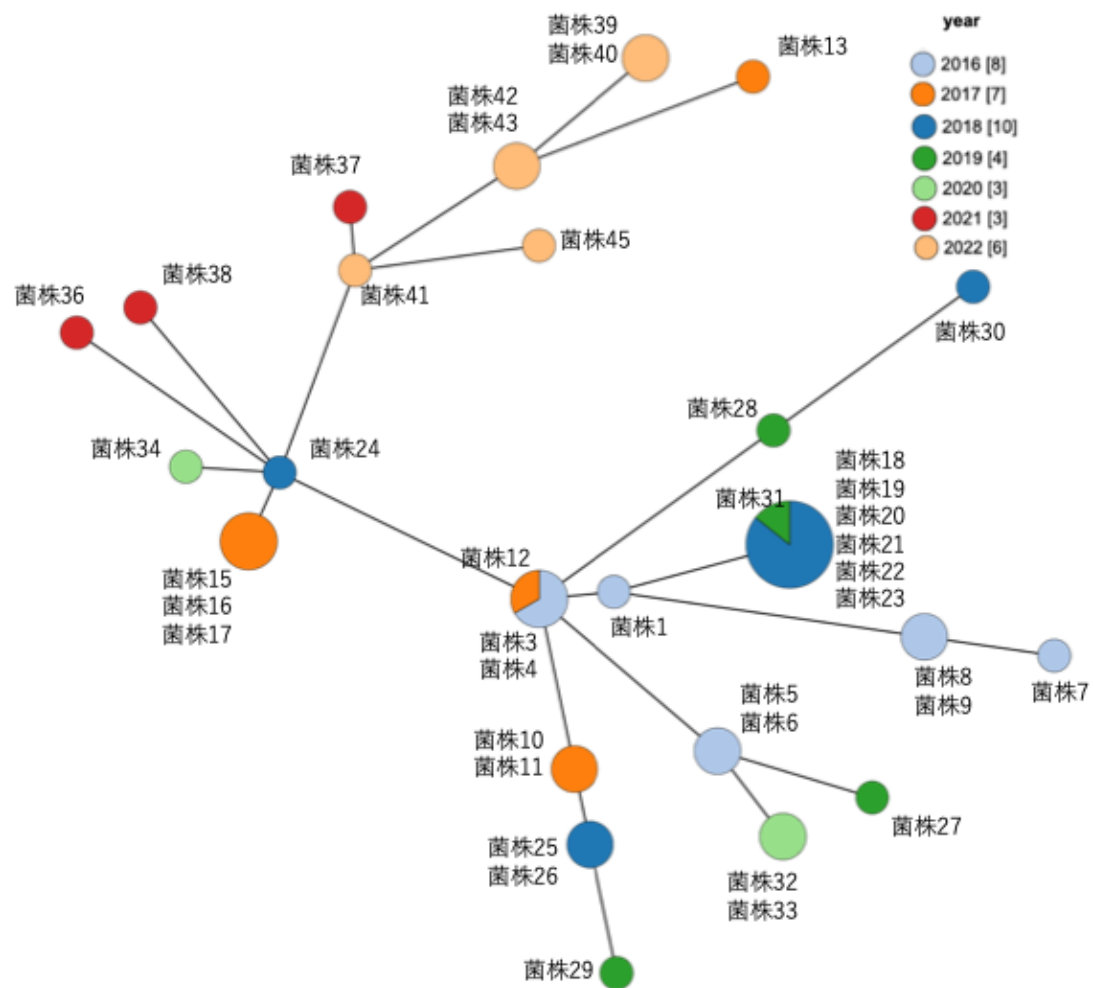


図1 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と分離年との関連

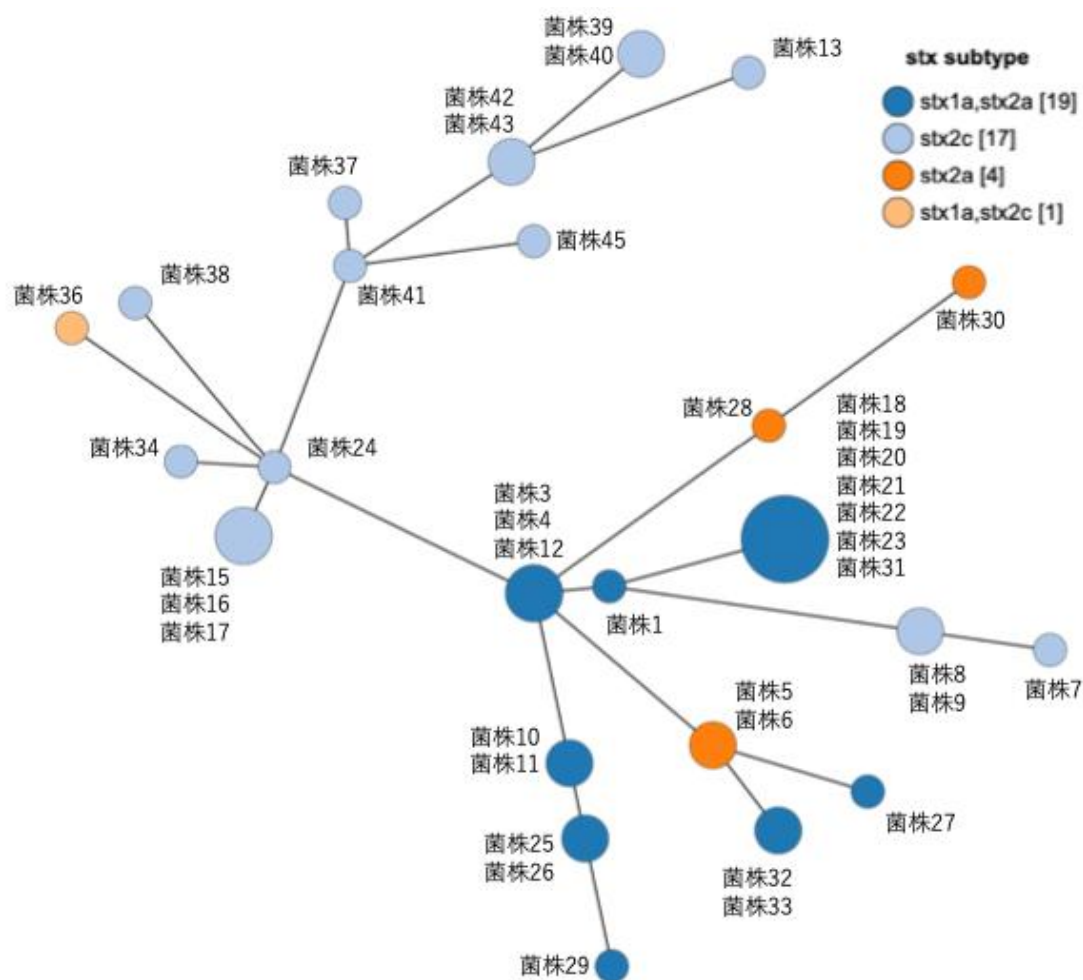


図2 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と *stx* subtype 保有パターンとの関連

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 遺伝子	プライマー 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	TCGTCAGGCACTGTCTGAACTGCTCC	
	<i>eaeA</i>	Eae-F	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	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	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA	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	TGAAGCGGAGGCAACACATTATATAGTGC	
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. 市販の牛関連食品からの EHEC 分離結果

検体種類	検体数	分離陽性検 体数	分離株			
			O遺伝子型	stx	eae	菌株数
牛小腸	12	1	Og103	+	+	1
牛大腸	25	6	Og103	+	+	3
			Og157	+	+	3
			OgUT	+	+	1
牛スライス肉・ 牛小間切れ肉	12	1	Og103	+	+	1
計	49	8				9

表 3. 牛盲腸検体からの EHEC 分離結果

検体種類	検体数	分離陽性検 体数	分離株			
			O遺伝子型	stx	eae	菌株数
牛盲腸	66	16	Og103	+	+	5
			Og109	+	+	1
			Og116	+	-	2
			Og119	+	-	1
			Og157	+	+	1
			Og171	+	-	1
			Og5413	+	-	8
			OgN10	+	-	1
計	66	16				20