

令和5～7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

食品関連サンプル由来腸管出血性大腸菌（EHEC）株に関する分子疫学的知見の蓄積を目的として、食肉処理施設に搬入された牛由来 EHEC 株の MLVA 解析および牛関連食品検体からの EHEC 分離を実施した。2つの食肉処理施設から収集された牛由来 EHEC 0157 41 株について MLVA 型に基づいた比較系統解析を実施した結果、施設ごとに概ね異なるクラスターを形成した。施設が所在する地域あるいは搬入牛の由来農場ごとに EHEC 株の系統的な偏りがある可能性が推察された。しかし、一部の株はクラスター間で混在していたことから、MLVA 型の情報のみで分離地域を特定することは困難であると推察された。牛関連食品検体からの EHEC 分離では、市販牛関連食品 49 検体から 9 株、牛盲腸 66 検体から 20 株の EHEC が分離され、Og103 および Og157 などヒト EHEC 感染事例で主要な遺伝子型も検出された。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。

研究協力者

国立感染症研究所

泉谷 秀昌

国立医薬品食品衛生研究所

工藤 由起子

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、食肉処理施設に搬入された牛由来の EHEC 株を収集し、MLVA 型に基づいた系統解析を実施した。また、食品関連サンプル由来株として牛関連食品検体から EHEC を分離し、分離株を収集した。

B. 研究方法

1. 食肉処理施設から収集された牛由来 EHEC 株の系統解析

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 A および B に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 45 株を供試した。また、EHEC 45 株のうち EHEC 026、0111 および 0157 の計 44 株について MLVA 型を決定し、さらに EHEC 0157 41 株について比較系統解析を実施した。

2) 菌株の性状解析

表 1 のプライマーおよびプローブを用いて、*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。H 遺伝子型を H-genotyping PCR（Banjo ら、2018）で決定し、抗血清を用いて O/H 血清型を決定した。また、表 2 のプライマーを用いて、供試菌株の MLVA 型を決定し、各遺伝子座のリピート数に基づき phyloviz2.0 および GrapeTree で菌株間の比較解析を行った。作成した Minimum spanning tree（MST）上に分離由来牛の処理施

設、各菌株の分離年および *stx* subtype 保有パターンを図示した。*stx* subtype は、表 3 のプライマーを用いて Scheutz らの PCR 法 (J Clin Micro, 2012 50(9)2951) に従い判定した。

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、牛大腸および牛スライス肉・牛小間切れ肉：計 49 検体）および家畜の内臓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マルチプレックスリアルタイム PCR で *stx*、*eae* および主要 7 血清 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 関連遺伝子をスクリーニングした。*stx* 陽性かつ 026、045、0103、0111、0121、0145 あるいは 0157 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 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 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、上述のマルチプレックスリアルタイム 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 0 遺伝子型も陰性となった株は、0-genotyping PCR (Iguchi ら、2015) を用いて 0 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 型に基づいた系統解析

食肉処理施設 A および B から収集された牛由来株 45 株は、全て *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は 0157:H7 が 41 株、026:H11 が 2 株、0111:HUT が 1 株、0182:H2 が 1 株であった（表 4）。MLVA 型は、EHEC 0157 が 24 種類、EHEC 026 が 2 種類、EHEC 0111 が 1 種類に分類された。一部の MLVA 型の株は、異なる月にまたがって 2 回以上分離された。MLVA 型に基づく MST では、施設 A 由来株および施設 B 由来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、クラスター間で混在する菌株も認められた。また、分離年による偏りは認められなかったが（図 2）、*stx2c* 単独保有株のクラスターは認められた（図 3）。

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 4）。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 5）。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、食肉処理施設から収集された牛由来 EHEC 株のうち、EHEC 0157 株の MLVA 型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。MLVA 解析では、同一 MLVA 型の株が異なる月にまたがって 2 回以上分離されたことから、異なる牛が同一 MLVA 型の EHEC 株に汚染され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、施設が所在する地域あるいは搬入牛の由来農場ごとに EHEC の系統的な偏りがある可能性

が推察された。しかし、一部の株がクラスター間で混在していたことから、MLVA 型の情報のみで分離地域を特定することは困難であると推察された。また、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 O 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 0g103、0g109 および 0g157 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

EHEC の MLVA 型には食肉処理施設ごとの偏りが示唆されたことから、広域食中毒の早期探知を可能にするためには、地域ごとに牛由来 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。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で主要な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

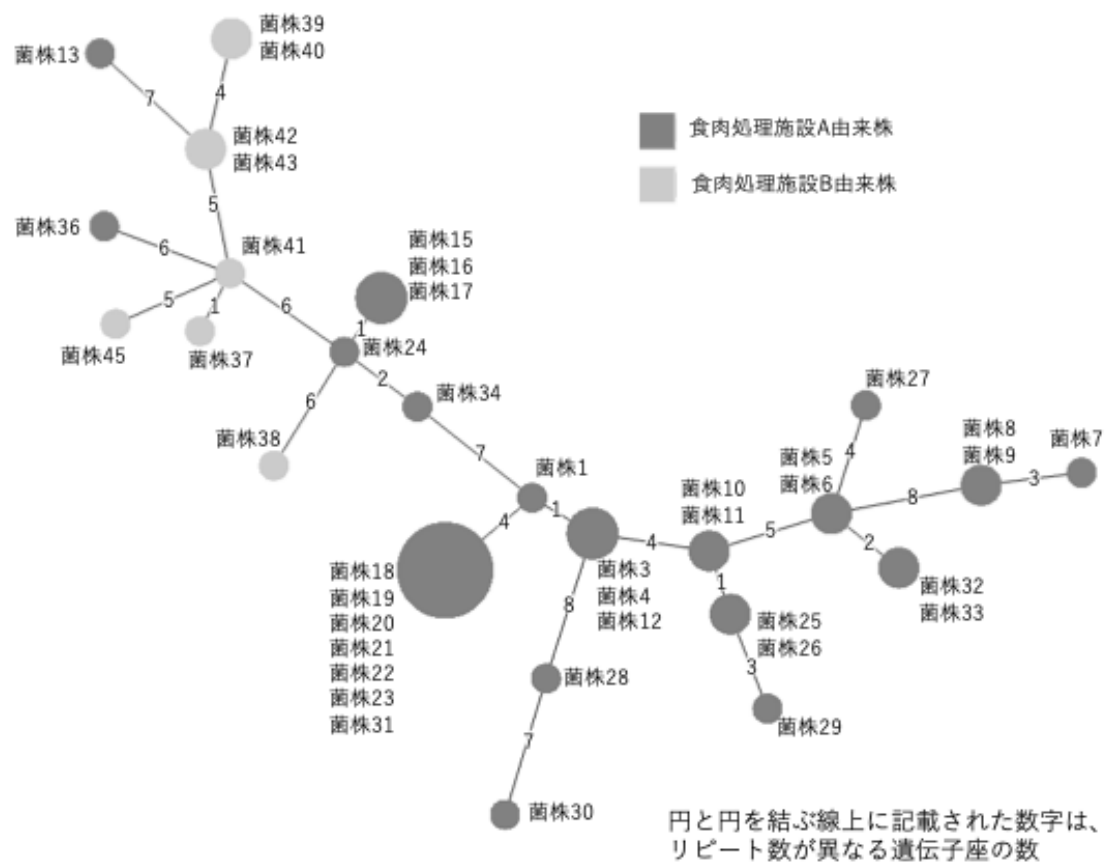


図1. 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と分離施設との関連

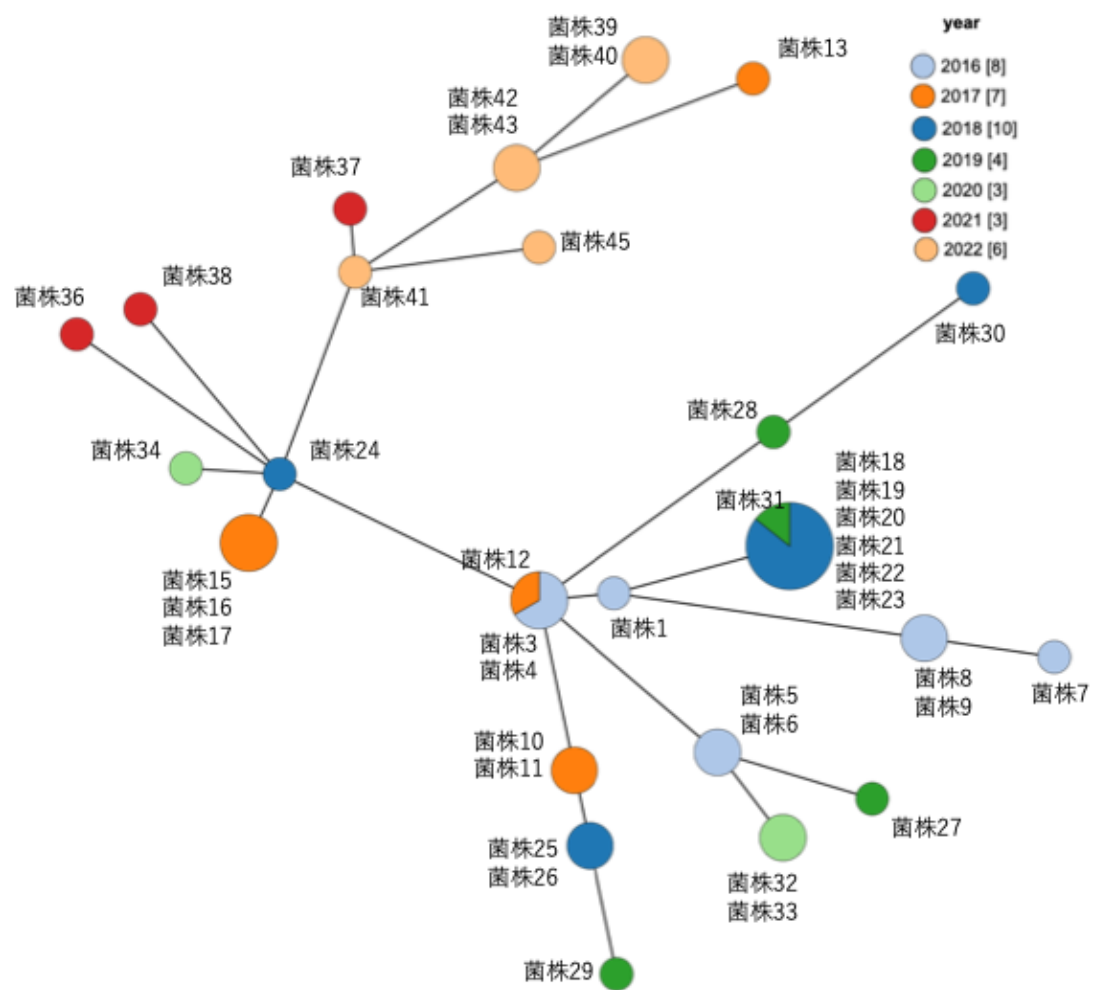


図2 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と分離年との関連

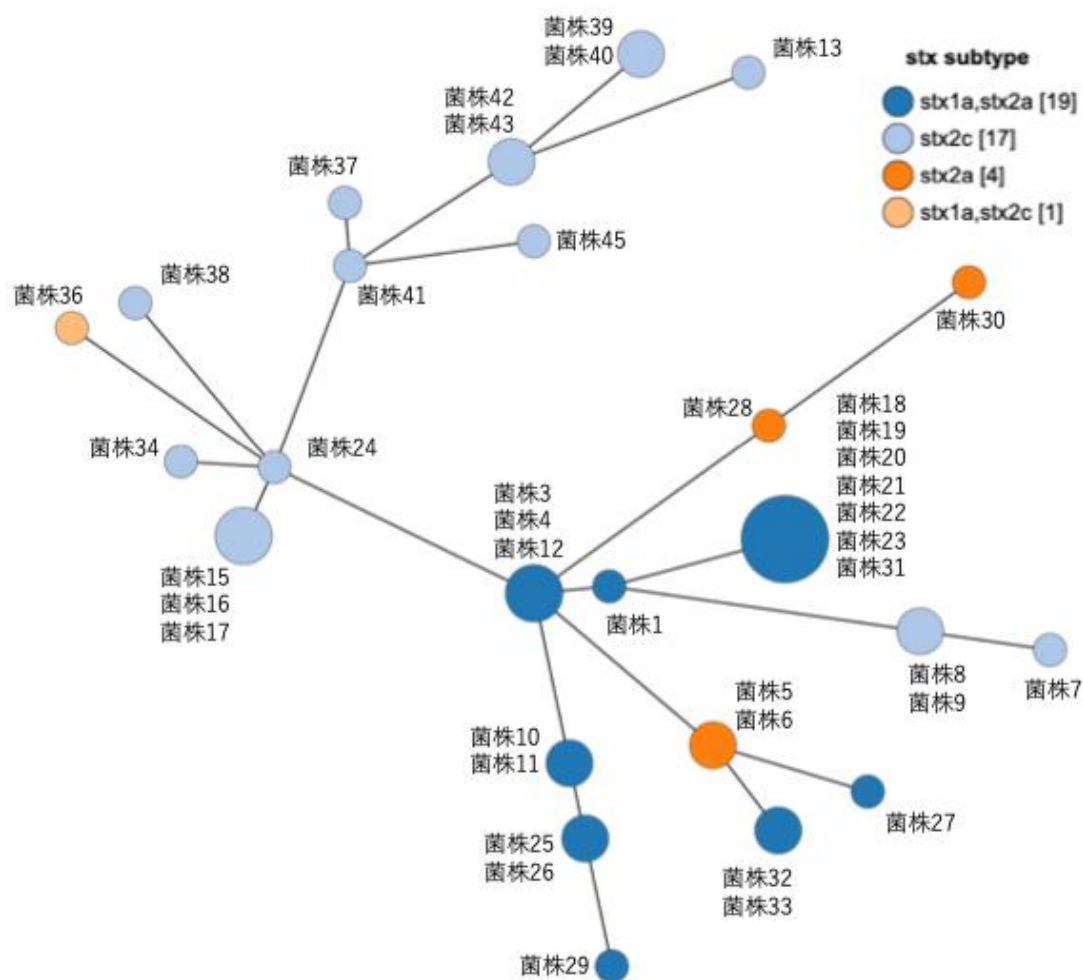


図3 牛由来 EHEC O157 株の MLVA 型に基づく Minimum spanning tree と *stx* subtype 保有パターンとの関連

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	GTATCGTGAAATTAGAAGCGC	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	
	WzxO103	Wzx O103-F	TTGGAGCGTTAACTGGACCT	USDA
		Wzx O103-R	ATATTCGCTATATCTTCTTGCGGC	
		Wzx O103-P	AGGCTTATCTGGCTGTTCTTACTACGGC	
Assay5	WzxO145	Wzx O145-F	AAACTGGGATTGGACGTGG	USDA
		Wzx O145-R	CCCAAACTTCTAGGCCCG	
		Wzx O145-P	TGCTAATTGCAGCCCTTGCACTACGAGGC	
	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 ミックス	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
Mix1	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTGTGTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAAAAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCGCCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
Mix2	EH26-7	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCCTTTCTGGATGTTT	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTACAGCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTCCATTTTCTTTACCTTCAGG

表 3. *stx* subtype 型別用プライマー配列

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

表 4. 牛由来 EHEC 株の情報

菌株名	分離施設	分離年月	血清型	MLVA型	stx subtype
菌株1	A	2016年6月	O157:H7	13m0154	stx1a,stx2a
菌株2	A	2016年6月	O111:HUT	16m3038*	stx1a,stx2a
菌株3	A	2016年9月	O157:H7	15m0180	stx1a,stx2a
菌株4	A	2016年9月	O157:H7	15m0180	stx1a,stx2a
菌株5	A	2016年11月	O157:H7	13m0694	stx2a
菌株6	A	2016年11月	O157:H7	13m0694	stx2a
菌株7	A	2016年7月	O157:H7	16m0516*	stx2c
菌株8	A	2016年8月	O157:H7	17m0320	stx2c
菌株9	A	2016年8月	O157:H7	17m0320	stx2c
菌株10	A	2017年5月	O157:H7	17m0134	stx1a,stx2a
菌株11	A	2017年5月	O157:H7	17m0134	stx1a,stx2a
菌株12	A	2017年5月	O157:H7	15m0180	stx1a,stx2a
菌株13	A	2017年7月	O157:H7	17m0097	stx2c
菌株14	A	2017年7月	O26:H11	17m2226*	stx1a
菌株15	A	2017年7月	O157:H7	17m0512*	stx2c
菌株16	A	2017年7月	O157:H7	17m0512*	stx2c
菌株17	A	2017年7月	O157:H7	17m0512*	stx2c
菌株18	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株19	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株20	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株21	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株22	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株23	A	2018年5月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株24	A	2018年7月	O157:H7	13m0662	stx2c
菌株25	A	2018年8月	O157:H7	18m0616*	stx1a,stx2a
菌株26	A	2018年9月	O157:H7	18m0616*	stx1a,stx2a
菌株27	A	2019年7月	O157:H7	19m0628*	stx1a,stx2a
菌株28	A	2019年8月	O157:H7	19m0629*	stx2a
菌株29	A	2019年8月	O157:H7	16m0206	stx1a,stx2a
菌株30	A	2018年8月	O157:H7	18m0617*	stx2a
菌株31	A	2019年12月	O157:H7	13m0177	stx1a,stx2a
菌株32	A	2020年2月	O157:H7	18m0297	stx1a,stx2a
菌株33	A	2020年2月	O157:H7	18m0297	stx1a,stx2a
菌株34	A	2020年9月	O157:H7	20m0450	stx2c
菌株35	A	2021年7月	O26:H11	21m2145*	stx1a
菌株36	A	2021年10月	O157:H7	21m0465*	stx1a,stx2c
菌株37	B	2021年10月	O157:H7	22m0067	stx2c
菌株38	B	2021年10月	O157:H7	21m0152	stx2c
菌株39	B	2022年6月	O157:H7	22m0603	stx2c
菌株40	B	2022年6月	O157:H7	22m0603	stx2c
菌株41	B	2022年6月	O157:H7	22m0604	stx2c
菌株42	B	2022年9月	O157:H7	24m0510	stx2c
菌株43	B	2022年9月	O157:H7	24m0510	stx2c
菌株44	B	2022年9月	O182:H2	NA	stx1a
菌株45	B	2022年9月	O157:H7	22m0605	stx2c

NA: Not applicable

*本課題で新たに報告されたMLVA型

表 5. 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 6. 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