

令和5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、2016年から2021年までの間に国内の食肉処理施設に搬入された牛から分離された腸管出血性大腸菌(EHEC)36株の血清型、MLVA型およびStxサブタイプを解析した。牛糞便由来EHEC株の血清型は、0157:H7が33株、026:H11が2株および0111:HUTが1株であり、MLVA型は、EHEC 0157が18種類、EHEC 026が2種類、EHEC 0111が1種類に分類された。10種類のMLVA型は、本課題で新規に報告された型であった。また、同一MLVA型の株が異なる時期に2回以上分離されたことから、牛個体間での同一MLVA型EHECの汚染が示唆された。多くの牛糞便由来EHEC株は、*stx1a*および*stx2a*を保有しており、食肉処理過程での牛枝肉の糞便汚染が重要な食中毒リスクであると考えられた。広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株に加えて牛糞便由来株等の食品生産現場由来株のゲノムデータも蓄積していくことが有用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

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、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。

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、食肉処理施設に搬入された牛の糞便由来 EHEC 株を収集し、食品関連サンプル由来株として MLVA 型およびゲノムデータを蓄積することで、疫学情報を活用した次世代早期食中毒アラートシステム構築に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) 菌株

2016 年から 2021 年に国内食肉処理施設 A に搬入された牛の糞便から分離された EHEC 36 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 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) *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。

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) 運動性試験

カジトン培地に保存した EHEC 36 株を LIM 培地に接種し、37℃で 24 時間培養し、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℃の 15 分の熱変性ののち、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ピート数を決定した。遺伝子座ごとのリピート数を菌株間で比較した。また、得られたピークデータを基に MLVA 型を決定し、過去

に同一 MLVA 型が報告されているかを確認した。

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)。

C. 研究結果

1) 牛糞便由来 EHEC 株の血清型および MLVA 型

牛糞便由来株 36 株は、すべて *stx* および *eae* 陽性であり、血清型は 0157:H7 が 33 株、026:H11 が 2 株 0111:HUT が 1 株であった (表 4)。MLVA 型は、EHEC 0157 が 18 種類 (13m0154、13m0177、13m0662、13m0694、15m0180、16m0206、16m0516、17m0097、17m0134、17m0320、17m0512、18m0297、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629、20m0450 および 21m0465)、EHEC 026 が 2 種類

(17m2226 および 21m2145)、EHEC 0111 が 1 種類 (16m3038) に分類された。EHEC 0157 の MLVA 型 18 種類のうち、7 種類 (16m0516、17m0512、18m0616、18m0617、19m0628、19m0629 および 21m0465) は本課題で新規に報告された型であり、残りの 11 種類は過去に報告された型と同一であった。EHEC 026 の MLVA 型 2 種類および EHEC 0111 の MLVA 型 1 種類は、本課題で新規に報告された型であった。13m0177、15m0180 および 18m0616 は、異なる月にまたがって 2 回以上分離された。また、EHEC 0157 および EHEC 026 全株は運動性を示したが、EHEC 0111 は運動性を示さなかった。

2) 牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプパターン

保有する Stx サブタイプのパターンは、EHEC 0157 では *stx2a* 単独、*stx2c* 単独、*stx1a* および *stx2c* ならびに *stx1a* および *stx2a* の 4 種類、EHEC 026 では *stx1a* 単独の 1 種類、EHEC 0111 で *stx1a* および *stx2a* の 1 種類であった (表 5)。

D. 考察

牛糞便由来 EHEC 36 株のうち 0157:H7 が 33 株であったことか

ら、牛糞便に含まれる EHEC は、血清型 0157:H7 が多くを占めることが示唆された。また、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。さらに、牛糞便由来 EHEC 株が保有する Stx サブタイプは、強力な下痢原性を有する *stx1a* および *stx2a* が多かったことから、牛糞便由来 EHEC 株の食中毒リスクは高いと考えられる。加えて、牛糞便由来 EHEC にこれまでの食品由来株や食中毒患者分離株等から報告がなかった 10 種類の新規 MLVA 型の株が含まれていたことから、広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株のみならず牛糞便由来株等の食品生産現場での汚染可能性が示唆される株の MLVA 型およびゲノムデータもデータベースに蓄積していくことが有用であると考えられた。

E. 結論

牛糞便由来 EHEC 株は血清型 0157:H7 が多くを占め、複数の新規 MLVA 型の株が含まれていた。また、多くの牛糞便由来 EHEC 株は、強力な下痢原性を有する Stx サブ

タイプを保有しており、食中毒リスクは高いと考えられた。広域食中毒発生時の早期探知に寄与するには、食品由来株や食中毒事例患者由来株に加えて牛糞便由来株等の食品生産現場由来株のゲノムデータも蓄積していくことが有用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

・廣瀬昌平，泉谷秀昌，佐々木貴正，明田幸宏，工藤由起子：同一食品検体における腸管出血性大腸菌分離株の MLVA 型多様性・病原因子関連遺伝子・薬剤感受性の解析，第 44 回日本食品微生物学会学術総会，2023（R5）年 9 月 21-22 日，堺市.

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 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	CCCCAGTTCARWGTAGRTCMACDTC	
		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	TGTTCCAGGTGGTAGGATTCTG	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 ミックス	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
Mix1	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTG
	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
Mix2	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGATGTTT	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTTCTTACCTTCAGG

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>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
<i>stx1c</i>	CCTTTCCTGGTACAACAGCGGT	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 GCCTGATGCACAGGTAAGGAC
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 牛糞便由来 EHEC 株の分離年月、血清型および MLVA 型

菌株名	分離年月	血清型	MLVA型
菌株1	2016年6月	O157:H7	13m0154
菌株2	2016年6月	O111:HUT	16m3038*
菌株3	2016年9月	O157:H7	15m0180
菌株4	2016年9月	O157:H7	15m0180
菌株5	2016年11月	O157:H7	13m0694
菌株6	2016年11月	O157:H7	13m0694
菌株7	2016年7月	O157:H7	16m0516*
菌株8	2016年8月	O157:H7	17m0320
菌株9	2016年8月	O157:H7	17m0320
菌株10	2017年5月	O157:H7	17m0134
菌株11	2017年5月	O157:H7	17m0134
菌株12	2017年5月	O157:H7	15m0180
菌株13	2017年7月	O157:H7	17m0097
菌株14	2017年7月	O26:H11	17m2226*
菌株15	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株16	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株17	2017年7月	O157:H7	17m0512*
菌株18	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株19	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株20	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株21	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株22	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株23	2018年5月	O157:H7	13m0177
菌株24	2018年7月	O157:H7	13m0662
菌株25	2018年8月	O157:H7	18m0616*
菌株26	2018年9月	O157:H7	18m0616*
菌株27	2019年7月	O157:H7	19m0628*
菌株28	2019年8月	O157:H7	19m0629*
菌株29	2019年8月	O157:H7	16m0206
菌株30	2018年8月	O157:H7	18m0617*
菌株31	2019年12月	O157:H7	13m0177
菌株32	2020年2月	O157:H7	18m0297
菌株33	2020年2月	O157:H7	18m0297
菌株34	2020年9月	O157:H7	20m0450
菌株35	2021年7月	O26:H11	21m2145*
菌株36	2021年10月	O157:H7	21m0465*

*本課題で新たに報告された MLVA 型

表5. 牛糞便由来 EHEC 株の保有 Stx サブタイプ

菌株名	血清型	保有Stxサブタイプ
菌株1	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株2	O111:HUT	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株3	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株4	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株5	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株6	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株7	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株8	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株9	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株10	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株11	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株12	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株13	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株14	O26:H11	<i>stx1a</i>
菌株15	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株16	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株17	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株18	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株19	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株20	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株21	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株22	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株23	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株24	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株25	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株26	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株27	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株28	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株29	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株30	O157:H7	<i>stx2a</i>
菌株31	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株32	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株33	O157:H7	<i>stx1a, stx2a</i>
菌株34	O157:H7	<i>stx2c</i>
菌株35	O26:H11	<i>stx1a</i>
菌株36	O157:H7	<i>stx1a, stx2c</i>