

令和2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）

分担研究報告書

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

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

MLVA法は広域食中毒を迅速に探知する調査手法として有用であり、PFGEと並行して全国自治体で解析が行われている。しかし、同一食品に由来する菌株において、MLVA型がどの程度一致するかについては、十分な解析がなされていない。本研究では同一食中毒事例由来株および食品由来株におけるMLVA型の多様性を明らかにするため、各検体由来菌株のMLVA解析を行った。その結果、腸管出血性大腸菌食中毒事例A由来の0157菌株26株のうち25株は同一MLVA型 complexであり、1株が異なるMLVA型であった。同一MLVA型 complexの25株は全て非運動性であり *eae* 遺伝子陽性であった。MLVA型の異なる1株は運動性を有しており、*eae* 遺伝子陰性であった。食品Bから分離されたStx陽性大腸菌0128菌株36株のMLVA解析の結果は全て同一であった。食品Cから分離されたStx陽性大腸菌08菌株5株のMLVA解析の結果も全て同一であった。次年度は、自治体および関係機関との協力関係をさらに強化し、食中毒事例株および食品由来株の収集を進め、MLVA型の異なる株の収集および同一食品内におけるMLVA型の一致率の解析を進める予定である。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）の集団感染事例の発生時には、感染源や感染経路の把握のため、また散発的集団発生事例の早期探知のために患者や食品から分離された菌株の解析が求められる。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（Microbiol. Immunol., 2010, 54(10), 569-77）。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 解析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、本研究では食中毒事例から分離された複数の菌株について MLVA 法による比較解析を行い、多様性を解析した。また、食中毒事例発生時に感染源や感染経路を調査・特定する際に必要な情報を蓄積するため、食品由来株を収集し MLVA 解析を行った。

## B. 研究方法

過去の食中毒事例由来の原因食品から分離した保存株について、MLVA 解析を行い患者株との一致率と多様性について検討した。加えて、輸入食品の検査の際に分離された菌株について、同様に MLVA 型の多様性について検討した。

### 1) 菌株

食中毒事例 A 由来の腸管出血性大腸菌 0157 を 26 株、食品 B 由来の Stx 陽性大腸菌 0128 を 36 株、食品 C 由来の Stx 陽性大腸菌 08 を 5 株、合計 67 株を供試した(表 1)。食中毒事例 A は 2019 年 2 月に発生した腸管出血性大腸菌 0157 による広域食中毒である。同一系列の飲食店を利用し、下痢や嘔吐等の症状を

呈する患者が 8 自治体で 17 名認められ、そのうち 15 名の患者便から分離された菌株の MLVA 型と、保管されていた食品材料から分離された菌株の MLVA 型が一致したことから食中毒と断定された。食品 B 由来株は外国産ナチュラルチーズ培養液から国衛研にて分離した。食品 C 由来株は輸入牛肉の培養液から国衛研にて分離した。全ての菌株は志賀毒素産生性大腸菌(STEC)であり、食中毒事例 A 由来株は *stx1* 遺伝子および *stx2* 遺伝子陽性、食品 B 由来株は *stx1* 遺伝子陽性、食品 C 由来株は *stx2d* 遺伝子陽性株である。

### 2) DNA 抽出

凍結保存した菌株(67 株)を Tryptone soya agar (OX01D) に画線し、37℃にて 18 時間培養した。チューブに滅菌蒸留水を 100  $\mu$ l 採り、コロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、わずかに濁る程度の量を懸濁した。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新たなチューブに移し、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

表 2 に示す通り、2 種類のプライマーミックスを調製した。上記にて抽出した DNA を鋳型として供試

し、PTC-200 Peltier Thermal Cycler (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。食中毒事例由来株では決定したリポート数を患者株のものと比較・解析した。食品由来株では各遺伝子座ごとのリポート数を菌株間で比較した。

#### 4) 菌株の生化学性状および遺伝子保有状況解析

食中毒事例 A 由来株について半流動性培地を用いて運動性を解析した。加えて、コンベンショナル PCR により *eae* 遺伝子の保有状況を解析した。上記にて抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ research) を使用した。PCR 反応には EX Taq (TaKaRa) を使用し、Forward プライマー配列は

GACCCGGCACAAGCATAAGC、Reverse プライマー配列は CCACCTGCAGCAACAAGAGG を用いた (EFSA Journal, 2009 7(11)1366)。95°C 60 秒—58°C 60 秒—72°C 60 秒で 40 サイクル増幅反応させた後、PCR 産物の有無をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

#### C. 研究結果

腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来の 0157 菌株 26 株のうち、22 株は MLVA 特定 17 遺伝子座のリポート数が患者分離株と全て同一であり、MLVA 型は 18m0541 であった。患者分離株と 1 遺伝子座 (0157-9) のリポート数のみが異なる株が 3 株 (ESC678、687、688) 確認された。このうち 1 株は 1 遺伝子座において 2 本のピークが認められた。リポート数が 1 遺伝子座において異なる single locus variant (SLV) など関連性が推測される型を complex としてまとめると、これらの 3 株は患者分離株 18m0541 の complex と考えられる。一方で、1 株 (ESC693) は 17 遺伝子座中 11 遺伝子座のリポート数が患者分離株と異なることが確認された (表 3)。食中毒事例 A 由来株の生化学性状を解析したところ、同一 MLVA 型 complex の 25 株は運動性を示さな

かったのに対し、ESC693 は運動性を示すことが明らかになった。また同様に同一 MLVA 型 complex の 25 株は *eae* 遺伝子陽性であるのに対し、ESC693 では *eae* 遺伝子陰性であった。

一方で食品 B 由来の Stx 陽性大腸菌 0128 菌株 36 株はすべての遺伝子座で同一のリポート数を示した (表 4)。食品 C 由来の Stx 陽性大腸菌 08 菌株 5 株も同様に、すべての遺伝子座で同一のリポート数を示した (表 5)。

#### D. 考察

腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来の 0157 菌株 26 株のうち、運動性および *eae* 遺伝子の有無が異なり、MLVA 型が異なる株が 1 株検出されたことから、同一食中毒事例由来株であっても複数の MLVA 型の株が存在する一方で、生化学性状が同一であればその MLVA 型の差異は SLV に収まることが示唆された。また、生化学性状の違いと MLVA 型の相違が相関しており、食中毒事例において正確な MLVA 型の把握のためには、複数のコロニーの生化学性状解析と MLVA 型決定が必要であると推測される。MLVA 型の異なった ESC693 については、今後 DNA シーケンス解析等も進めていく必要

がある。また、食品由来株については、B 食品由来の Stx 陽性大腸菌 0128 菌株および C 食品由来の Stx 陽性大腸菌 08 菌株のそれぞれで全ての株の全遺伝子座リポート数が一致した。食品中で増殖した菌株は現在の MLVA 解析で用いる 17 遺伝子座のリポート数レベルでは均一であることが示された。しかし、食品 C については分離された菌株数が 5 株と少数であることから、異なる MLVA 型の菌株を選択しきれていない可能性も考えられる。次年度以降には、自治体および関係機関との協力関係を強化し、食中毒事例由来株および食品由来株の収集を進め、MLVA 型の異なる株の収集および同一食品内における MLVA 型の一致率の解析を進める予定である。

#### E. 結論

同一食中毒事例株の中に一部異なる MLVA 型を示す菌株が存在することを示した。ただし、生化学性状が一致する株間では、一部 SLV を含むものの全て同一の MLVA 型 complex であった。次年度以降、食中毒事例由来株および食品由来株の収集を進め、同一検体内の MLVA 型一致率の解析を更に進めていく。

#### 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. 菌株リスト

由来	O抗原	志賀毒素遺伝子	菌株数
食中毒事例A	O157	<i>stx1,2</i>	26株
食品B	O128	<i>stx1</i>	36株
食品C	O8	<i>stx2d</i>	5株
合計			67株

表 2. プライマーミックス

プライマー	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTGG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
Mix1	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTT
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT	CGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
Mix2	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTGCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTTCTTACCTTCAGG

表 3. 腸管出血性大腸菌食中毒事例 A 由来 O157 (26 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数															MLVA型	運動性	eae遺伝子		
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19				O157 -36	O157 -37
ESC676	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC677	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC678	1	4	4	5	-2	3	-2	9	<b>8</b>	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC679	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC680	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC681	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC682	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC683	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC684	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC685	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC686	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC687	1	4	4	5	-2	3	-2	9	<b>8,11</b>	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC688	1	4	4	5	-2	3	-2	9	<b>8</b>	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541のSLV	-	+
ESC689	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC690	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC691	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC692	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC693	<b>-2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>-2</b>	<b>-2</b>	<b>2</b>	<b>-2</b>	<b>3</b>	<b>-2</b>	<b>2</b>	<b>-2</b>	<b>-2</b>	<b>-2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>-2</b>	<b>-2</b>	非18m0541	+	-
ESC694	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC695	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC696	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC697	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC698	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC699	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC700	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+
ESC701	1	4	4	5	-2	3	-2	9	11	2	-2	-2	-2	5	6	6	3	18m0541*	-	+

\*患者分離株と一致

表 4. 食品 B 由来 Stx 陽性大腸菌 0128 (36 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
ESC24	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC25	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC26	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC27	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC28	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC29	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC30	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC31	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC32	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC33	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC34	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC35	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC36	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC37	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC38	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC39	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC40	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC41	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC42	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC43	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC44	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC45	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC46	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC47	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC48	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC49	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC50	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC51	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC52	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC53	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC54	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC55	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC56	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC57	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC58	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4
ESC59	-2	2	16	5	10	2	-2	3	-2	2	1	-2	21	-2	1	-2	4

全菌株とも各遺伝子座リピート数が一致していた。

表 5. 食品 C 由来 Stx 陽性大腸菌 08 (5 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
ESC69	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC70	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC71	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC72	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2
ESC73	-2	2	9	-2	-2	2	-2	3	-2	2	1	-2	-2	-2	1	-2	-2

全菌株とも各遺伝子座リピート数が一致していた。