

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

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

令和4(2022)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

| | |
|----------------------|---|
| 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究 | 3 |
|----------------------|---|

工藤 由起子

令和3年度緊急的追加研究報告書

| | |
|--|----|
| 富山市の学校給食を原因とした集団食中毒由来大腸菌の 病原性に関する研究 | 21 |
|--|----|

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

| | |
|---------------------|----|
| 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立 | 49 |
|---------------------|----|

工藤 由起子

| | |
|---|----|
| (1) 食品での <i>Escherichia albertii</i> 検査法の基礎検討 | 59 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| (2) 食品での <i>E. albertii</i> 検査法のコラボレイティブ・スタディ による評価 | 71 |
|--|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| (3) <i>astA</i> 保有大腸菌の食品検査法の確立 | 97 |
|--------------------------------|----|

| | |
|----------------------------|-----|
| 2. 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析 | 111 |
|----------------------------|-----|

大岡 唯祐

| | |
|-------------------|-----|
| 3. 病原大腸菌食中毒事例株の解析 | 125 |
|-------------------|-----|

伊豫田 淳

| | |
|-------------------------|-----|
| 4. 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法 | 135 |
|-------------------------|-----|

大西 貴弘

| | |
|---------------------|-----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 155 |
|---------------------|-----|

I. 総括研究報告書

食中毒原因細菌の検査法の 整備のための研究

工藤 由起子

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

研究分担者 大岡唯祐 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究について、特に、*astA*（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1；EAST1をコードする遺伝子）保有大腸菌等の病原大腸菌および大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *Escherichia albertii* を対象に4研究分担者にて実施した。分担研究（1）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立では、*E. albertii* 食品検査法を、[1]食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討および[2]コラボレイティブ・スタディ評価にて、優れた増菌培養法、リアルタイムPCR法および分離培養法が示された。また、*astA* 保有大腸菌については、[3]*astA* 保有大腸菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。（2）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、下痢症患児由来大腸菌（2,730株）の中から *astA* 陽性株を194株同定し、そのうち31株についてドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBIデータベース上の大腸菌株（9,065株）から713株の *astA* 陽性株を同定し、ゲノム比較解析から35種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、国内分離大腸菌等3,613株のゲノムから *astA* 保有株を検索した結果、様々な系統に属する約3%の株で保有が認められた。また、大規模食中毒由来大腸菌の国際ゲノム比較を行った結果、近縁株は見出されなかった。（4）食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、*astA* 遺伝子保有大腸菌を中心とした病原大腸菌の汚染実態調査を開始した。鶏肉での汚染率が高く、鶏肉は全検体で *astA* がスクリーニングPCRで陽性となった。他に牛肉、豚肉、エビ、オクラなどで *astA* が陽性になった。また、（5）緊急的追加研究として、令和3年6月に富山市で小学校等給食で提供された牛乳によって大規模食中毒が発生し、その原因物質として疑われる大腸菌 OUT(OgGp9):H18 の病原性について研究を行った。その結果、本大腸菌が病原性を有する可能性が考えられたことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT(OgGp9):H18（疑い）」とすることが妥当と考えられた。

研究協力者

| | |
|---------------|---------------------|
| 埼玉県衛生研究所 | 土井りえ、榊田 希 |
| 東京都健康安全研究センター | 小西典子、尾畑浩魅、齊木 大 |
| 岩手県環境保健研究センター | 山中拓哉 |
| 宮城県保健環境センター | 佐藤千鶴子、山谷聡子 |
| 秋田県健康環境センター | 今野貴之 |
| 宇都宮市衛生環境試験所 | 床井由紀 |
| 山梨県衛生環境研究所 | 柳本恵太 |
| 三重県保健環境研究所 | 小林章人 |
| 大分県衛生環境研究センター | 成松浩志、溝腰朗人 |
| 川崎市健康安全研究所 | 小嶋由香 |
| 静岡市環境保健研究所 | 高橋直人 |
| 広島市衛生研究所 | 末永朱美、池田伸代 |
| 北九州市保健環境研究所 | 大羽広宣、藤崎道子、有川衣美 |
| 福岡市保健環境研究所 | 松永典久 |
| 熊本市環境総合センター | 小畑裕子 |
| (公社)日本食品衛生協会 | 甲斐明美 |
| 富山市保健所 | 瀧波賢治、鈴木富勝、水上克己 |
| 富山県衛生研究所 | 大石和徳、木全恵子、磯部順子、綿引正則 |
| 国立感染症研究所 | 明田幸宏、窪村亜希子、李 謙一 |
| 国立医薬品食品衛生研究所 | 廣瀬昌平、新井沙倉、大屋賢司 |

A. 研究目的

近年、国内外において大腸菌近縁の *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、既に日本では 2003 年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数 200 人以上の事例も報告され新興食中毒細菌として注目されている。しかし、食中毒事例において原因食品が特定された事例は少ないため、原因食

品特定に対応する *E. albertii* の検査法の確立が求められており、令和 2 年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金事業「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」において、効率的な検出を目的とした遺伝子検出法、増菌培養法および分離培養法を決定した。本研究課題では、2 段階に分けて最終評価を行うこととした。

また、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和2年には、給食センターで調理した学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等2,958人の患者をともなう *astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1 ; EAST1 をコードする遺伝子) 保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が100人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌(細胞への凝集付着性因子遺伝子 *aggR* に加えて *astA* 保有株も含む) や腸管病原性大腸菌(細胞への局在付着性因子: *eae* 等保有株) による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒では、原因食品が不明であることが多く、喫食状況の解析から特定の日に提供された食事や弁当などの喫食が原因として判明しても食品・食材が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、適切または効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことがいわれており、培養に際して食

品由来微生物の増殖によって食中毒細菌の増殖が抑制され、増菌および分離が困難なことが考えられるため、その食中毒細菌に適した検査法が原因食品究明には重要である。このため、本研究では増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして病原大腸菌に適する効率的かつ特異的な検査法を開発する。特に遺伝子検出法については、これら病原大腸菌の病原性発現について解析を行い、検出指標となる病原因子を既知に加え新規因子を含め検討する。また、これら病原大腸菌の食中毒事例における菌株の病原因子遺伝子等の解析および精査を行う。さらに、これら病原大腸菌の食品等への汚染状況、食品の汚染経路等は明らかになっていない。このため、食品等での汚染実態を明らかにし、制御法を検討する。

さらに、令和3年6月に富山市において、市内の小中学校や保育所等での給食に提供された牛乳によって1,800人を超える患者を伴う食中毒が発生し、この原因物質の究明における検査により、主要な病原因子を保有しない大腸菌 OUt(0gGp9):H18 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の解明についての研究を緊急的追加研究として実施す

ることとした。

B. 研究方法

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

食中毒事例由来 *E. albertii* 2 株を供試し、8 食品に低菌数として 7 cfu/25 g、中菌数として 14 cfu/25 g、高菌数として 30 cfu/25 g となるように接種した。これらに、modified EC 培地 (mEC)、ノボビオシン加 mEC (NmEC) または薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC) を加え、42℃にて 22 時間培養した。各増菌培養液から DNA を抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL) およびマッコンキー寒天培地 (MAC) を基本としてそれぞれに 1%ラムノースおよび 1%キシロースを添加した培地 (RX-DHL、RX-MAC) を用いた。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

11 試験検査機関が参加し、鶏肉またはモヤシ検体 (高菌数接種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体) を供試し、添加剤 AB 加

mEC 培地での増菌培養、RX-DHL、RX-MAC、DHL、MAC での分離培養、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR (IC を含む) にて *E. albertii* の検出性を評価した。試験結果を集計後、検出方法間の有意差検定を行った。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

astA 保有大腸菌 159 株を供試し、mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC での増殖性を検討した。また、供試菌株をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) や薬剤 C を添加した培地での生育性を検討した。*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討では、食品や食中毒事例由来細菌 26 種 35 株について *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法および *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を試験した。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

[1] 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

下痢症患者由来大腸菌株 2,730 株を対象に *astA* 遺伝子特異的プライマーペアによる PCR スクリーニングを実施し、*astA* 遺伝子保有株の同定を行った。また、同定された株のうち、Random amplified PCR polymorphic DNA (RAPD) 法で

同一株と判明した株は解析対象から排除した。

[2] 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目(1)で同定された株について大腸菌のハウスキーピング7遺伝子を対象とした multi-locus sequence analysis (MLSA)解析で系統樹を作成、進化系統の異なる31株について MiSeq (Illumina)によるドラフトゲノム配列解析を行った。

[3] 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

NCBI データベース上完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を対象に *astA* 遺伝子保有株を検索した。

[4] 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

項目(2)(3)で同定した *astA* 遺伝子保有株計 742 株について、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの相同性や局在、また、そのコピー数について検討した。

[5] *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

astA 遺伝子保有株 742 株について、コア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行った。

[6] *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

以前の研究においてドラフトゲノム解析が完了している 31 株について、既知の EAEC 関連病原因子の遺伝子スクリーニングを実施した。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

2007 年から 2021 年に国内で分離された大腸菌等 (*E. albertii* を含む主として腸管出血性大腸菌 [EHEC]) 計 3,613 株を解析対象として、全ゲノム配列から BLAST 検索によって *astA* の検出を行った。ゲノム解析によって得られた配列をもとに、*astA* 検出用プライマーの設計 (*astA*-univ-F1 [5' - GYCATCAACRCAGTATATYCG-3'], *astA*-univ-R1 [5' - TCRCGAGTGACK RCYY TGTA-3']) および妥当性評価を行った。2020 年に 2,958 名の患者が報告された、学校給食を原因とする食中毒事例で分離された大腸菌 07:H4 の由来等を究明するために、公共データベースに存在する近縁株計 199 株との類縁関係を SNP 解析によって究明した。

(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、ストマッカー処理し、42°C、22～24 時間、増菌培養を行なった。培養液から DNA を抽出しスクリーニング PCR を行い、大腸菌の病原因子の検出を行なった。スクリーニング陽性の場合、増菌培養液をクロモアガー-ECC に塗抹し、単離したコロニーの病原因子を PCR で再確認した。さらに病原因子を確認できた菌株が大腸菌であることを確認し、カジトン培地に接種し、保管した。

(5) 富山市の学校給食を原因として集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

本食中毒で分離された大腸菌 OUT(OgGp9):H18 の牛乳由来株および患者由来株のゲノム解析、培養細胞での感染実験および動物モデル実験を行った。

C. 研究結果

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

接種菌数レベルおよび増菌培地にかかわらず、ほとんどの検体でリアルタイム PCR 法陽性であった。分離培養法での分離陽性率は、高菌数接種検体で 100%、低菌数接種検体で 0-16.7%であり、増菌培地

および分離培地間の差はほとんど無かった。中菌数接種検体では、mEC 増菌培養液からの RX-DHL および RX-MAC での分離率が約 85%、NmEC および薬剤 AB-mEC 増菌培養液からの RX-DHL および RX-MAC での分離率が約 95%であり、後者の方が分離率が高かった。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

リアルタイム PCR 法の検出感度は、全条件で 1.0 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、いずれの培地でも約 0.94 以上であり、高菌数接種で全分離培地で 1.0 であった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で約 0.7、DHL および MAC で約 0.55 であり、高菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 0.94 以上であり、DHL および MAC で 0.85 以上であった。また、釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合は RX-DHL で 522/581(89.8%)、RX-MAC で 548/615(89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796(50.8%) であった。モヤシ検体での DHL および MAC の検出感度は、リアルタイム PCR 法よりも有意に低く、MAC は RX-DHL および RX-MAC より

も検出率が有意に低かった。鶏肉検体での DHL および MAC の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出感度が有意に低かった。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

供試菌株 159 株のうち、増菌培養法の検討では、mEC、NmEC、薬剤 AB-mEC および薬剤 AB-NmEC 中でそれぞれ 96.9%、79.9%、13.8%、6.3% の増殖が認められた。分離培養法の検討では、薬剤 C を添加した SMAC では、95.6% の株が生育良好であった。*astA* 保有大腸菌は、コンベンショナル PCR 法およびリアルタイム PCR 法ともに陽性であったが、*astA* 保有大腸菌以外の 30 菌株は、コンベンショナル PCR 法陰性であったが、7 株がリアルタイム PCR 法陽性となった。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

[1] 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、194 株 (7.1% [194/2,970 株]) において *astA* 遺伝子の保有が確認された。そのうち 5 株については RAPD 解析により同一株と判定し、以降の解析から除外した。

[2] 進化系統の異なる株のドラ

フトゲノム解析 multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

項目 (1) で同定した 189 株についての MLSA 解析結果から選定した 31 株についてドラフトゲノム解析を実施した。ゲノムサイズは約 4.7 -5.5 Mb (平均 5.1 Mb) であった。

[3] 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

NCBI データベース上に登録されていたゲノム完全長配列大腸菌株 9,065 株のうち、*astA* 遺伝子保有株が 713 株 (7.9%) 同定された。

[4] 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

742 株のゲノム配列情報から、既知の 8 種類を含む計 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。また、その局在はプラスミド上、染色体上と多様であった。株あたりのコピー数も 1 コピーから最大 10 コピーまで様々であった。

[5] *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

Roary による解析からコア遺伝子が 1,600 個同定され、アライメントの結果、informative SNP は 42,536 個同定された。その結果を

基に作成した系統樹から、下痢症患児由来株でドラフトゲノム解析を行った株が幅広い系統にまんべんなく分散し、系統間の偏りがないうことが明らかとなった。

[6] *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

EAEC の病原関連遺伝子についてその保有状況を調べた結果、多くは線毛と毒素を少なくとも1つずつ保有していることが分かった。しかしながら、ドラフトゲノム配列情報しかないため、当該遺伝子の局在に関して正確な情報を得ることは出来なかった。また、線毛に関しては、既知のものと同アミノ酸配列相同性が50-70%程度の遺伝子が3種類同定された。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

国内で分離された大腸菌（主としてEHEC）ゲノムを用いて *astA* の保有状況を調べた結果、供試菌株の約3%において同遺伝子の保有が認められた。血清型別にみると、O26:H11 および O115:H10 においてそれぞれ19.0%および34.5%と比較的高率に保有することが明らかとなった。*astA* 配列を解析したところ、新規に11種の変異型を同定し

た。*astA* 陽性株の病原性因子を検索したところ、大部分は志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有していたが、主要な細胞付着因子や他の毒素遺伝子等を保有しない株も多数認められた。*astA* 検出用プライマーを新たに設計し、*astA* 保有および非保有株で検証を行ったところ、それぞれ全て陽性および陰性の結果となった。

公共データベース上に存在する全ての大腸菌 O7:H4 のゲノム情報を用いて、系統解析を行った結果、最近縁株は中東由来株であった。検出された SNP は20-23か所であり、直接的な関連性は示唆されなかった。

(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

[1] スクリーニング検査

汚染実態調査に使用した検体は、食肉77検体、野菜99検体、魚介類70検体、乾物5検体であった。この251検体中、何らかの病原遺伝子が陽性となったのは55検体(22%)であった。*astA* は55検体全てで陽性となった。*eae* は251検体中26検体(10%)、*stx2* は2検体(0.8%)、*eIt* は2検体(0.8%)、*estIa* は1検体(0.4%)がそれぞれ陽性となった。他の遺伝子は検出されなかった。

食肉では 77 検体中、43 検体がスクリーニング PCR 陽性となった。鶏肉では、31 検体全てで *astA* が陽性となった。内訳は *astA* 単独陽性が 8 検体、*astA* と *eae* が陽性になった検体が 21 検体、*astA* と *elt* が陽性となったのが 2 検体であった。ムネ肉における *eae* 陽性率は他の部位に比べて低い傾向が見られた。

豚肉では 22 検体中 6 検体が *astA* 陽性であった。この内、1 検体は同時に *eae* も陽性になった。*astA* 陽性 6 検体中 4 検体 (67%) がミンチ肉であった。

牛肉では 24 検体中 6 検体が *astA* 陽性となった。2 検体が *astA* 単独陽性、2 検体が *astA* と *eae* 陽性、1 検体が *astA*、*stx2*、*estIa* 陽性、1 検体が *ast*、*eae*、*stx2* が陽性であった。*astA* 陽性 6 検体中 4 検体は内臓肉、1 検体はタンであった。また、*stx2* が検出された 2 検体は内臓肉であった。

魚介類では 70 検体中 6 検体 (8.6%) が *astA* 陽性であった。エビは 10 検体中 4 検体 (40%)、サバは 2 検体中 1 検体 (50%)、スズキは 1 検体中 1 検体 (100%) が陽性であった。

野菜では 99 検体中 6 検体 (6.1%) が *astA* 陽性であった。この内、1

検体は *eae* も同時に陽性となった。オクラは 5 検体中 3 検体 (60%)、カイワレは 8 検体中 1 検体 (12.5%)、ほうれん草は 14 検体中 2 検体 (14%) が陽性となった。

乾物は 5 検体全てが陰性となった。

[2] 菌分離

鶏肉からは 36 株が分離された。*astA* 単独保有株が 30 株、*astA*、*eae* 保有株が 2 株、*eae* 単独保有株が 2 株、*astA*、*estIa* 保有株が 1 株、*estIa* 単独保有株が 1 株分離された。また、*astA*、*eae* スクリーニング陽性検体から *astA*、*eae* 保有株と *eae* 単独保有株が同時に分離された。同様に *astA*、*estIa* スクリーニング陽性検体から、*astA*、*estIa* 保有株と *estIa* 単独保有株が同時に分離された。

豚肉ではスクリーニングで 6 検体が陽性であったが、菌株を分離することはできなかった。牛肉からは *astA*、*eae* 保有株を 1 株分離した。スクリーニングで認められた *stx2* 保有株は分離できなかった。魚介類および野菜からは *astA* 単独保有株をそれぞれ 3 株分離した。

(5) 富山市の学校給食を原因として集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

[1] 大腸菌株のゲノム解析では、牛乳由来株と患者由来株の sequence type が一致し同一株であることが示されたが、既知報告の株には関連性の高い株は見つからなかった。病原遺伝子として、既知の病原大腸菌に特徴的な付着関連遺伝子や毒素遺伝子は検出されなかったが、多数の主要ではない病原遺伝子の保有が確認された。

[2] 培養細胞での感染実験では、細胞への付着性が認められたが、EAEC 特異的な凝集性の付着は認められず、また、侵入性も認められたが、*S. Typhimurium* のような強い細胞侵入性は認められなかった。

[3] 動物モデル試験では、マウス腹腔内投与試験によって、腸管毒素原性大腸菌よりも低い、病原性の知られていない大腸菌よりは高い致死性が認められた。また、コモンマーモセット経口投与では腸管定着性が認められた。

D. 考察

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

低菌数レベル接種 (6.7-7.6 cfu/25 g) の分離培養法では、本菌の分離が難しいことが判明した。

一方、高菌数接種 (> 37 cfu/25 g) であれば *E. albertii* がほぼ確実に分離可能であることが判明した。中菌数接種の条件で3種類の増菌培地を比較すると、分離陽性率が mEC で 82%以上、NmEC と薬剤 AB-mEC で 92%以上と優れていた。また、RX-DHL および RX-MAC において分離成績に大きな差は認められなかった。さらに、分離培養法よりもリアルタイム PCR 法の方が検出率が優れていたため、リアルタイム PCR 法にてスクリーニングし、PCR 陽性検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。これら結果を参照すると、次に検討する多機関でのコラボレイティブ・スタディでは、中菌数接種 (12.3-26.5 cfu/25 g 程度) を検体とし、上記のリアルタイム PCR 法および分離培地を使用することが適当であると判断された。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

結果から、*E. albertii* が検体あたり 80 CFU 以上であれば食品から高率に検出が可能であることが判明した。約 18CFU でも、リアルタイム PCR 法で高率に検出されること、鶏肉では高率に分離も

可能であることが示された。しかし、モヤシでは、分離培養法で分離されない検体もあった。リアルタイム PCR 法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示されたことから、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通の mEC 中での 42°C 培養が *astA* 保有大腸菌に適していることが判明した。選択分離培養法の検討では、*astA* 保有大腸菌の多くが CT に感受性であったが、薬剤 C 添加 SMAC では 95.6% の株が生育したことから本菌の分離培養法として適していると考えられた。また、既存の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法では、非特異的反応が生じたことから、新しい *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

が必要であることが、また、過去には *astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されることが報告されているため、*astA* 保有大腸菌が共通して保有するその他の遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法の開発も必要であることが考えられた。今後、本研究課題の他研究分担者の研究結果も参考に、新規の遺伝子検出法について考察する必要がある。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

分離株およびゲノム配列登録株の解析から、大腸菌の約 7.5% (907/12,035 株) が *astA* 遺伝子を保有すること、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在し、その分布も染色体とプラスミドでバリエーションによる局在に差が見られないこと、コピー数も株により多様であることも明らかとなった。一方で、保有株は大腸菌進化系統の中で偏りがなく、多様な系統に分布していることから、全株に共通の因子を同定するのは困難と思われた。そのため、系統ごとに保存性の高い遺伝子を抽出し、それらの組み合わせを利用した検出系の構築を進める必要がある。EAEC に関しては、既知の病原関連因子と相同性を示す遺伝子を複数同定した。今後、これらの遺伝子

について新規病原関連遺伝子の可能性を含め、機能解析を進める予定である。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

国内で分離された大腸菌ゲノムの解析では、約3%で *astA* が認められた。同遺伝子は多くの場合、IS上に存在しており、多様な系統へ水平伝播していると考えられた。また、*astA* 配列には多型が認められ、今後これらの発現状況を明らかにする必要がある。

大規模食中毒由来大腸菌 07:H4の国際ゲノム比較では、比較的近縁な菌株が中東で見いだされた。直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

今年度調査を行った251検体のうち、55検体で *astA* が検出され、*astA* が多くの大腸菌株で保有されている実態が明らかになった。特に鶏肉における *astA* 汚染率が高く、試験に供した31検体全てから *astA* が検出された。鶏肉も病原大腸菌による食中毒の原因食品になりうる可能性が示唆された。

豚肉では22検体中6検体で *astA* が検出された。このうち、4検体は

ミンチ肉であったことから、これらの汚染はミンチ肉の加工段階での汚染である可能性も示唆された。また牛肉では24検体中6検体がスクリーニング陽性となった。*astA* や *eae* 以外に *stx2*、*estIa* が検出され、今回の調査では最も多種類の病原遺伝子が検出された。6検体中4検体は内臓肉で、*astA*、*eae*、*stx2*、*estIa* が検出された。

魚介類では、エビの *astA* 陽性率が高かった。また、野菜では外国産のオクラの *astA* 陽性率が高かった。これらのことから、エビやオクラも大腸菌食中毒の原因食品となりうる可能性が示唆された。

以上、今回の結果から *astA* 保有大腸菌の汚染は、食肉、特に鶏肉において著しく認められた。また、陽性率は低いものの、野菜や魚介類においても *astA* 保有大腸菌の汚染が認められた。今後さらに調査を継続し、食品における病原大腸菌の汚染実態を明らかにしていきたい。

(5) 富山市の学校給食を原因として集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

大腸菌株のゲノム解析によって、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子

群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの EAEC と近縁であることが示された。培養細胞での感染実験によって、細胞接着性や細胞侵入性が観察されたが、明確な病原性を確認できなかった。しかし、動物モデル試験では、マウス腹腔内投与によって致死性が認められたことから、本菌が病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットでの腸管定着性が認められており、今後、下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

E. 結論

分担研究(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立では、*E. albertii* 食品検査法を2段階に分けて検討したところ、優れた増菌培養法、リアルタイム PCR 法および分離培養法が示された。また、*astA* 保有大腸菌については、*astA* 保有大腸菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。分担研究(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、下痢症患者由来大腸菌の中から *astA* 陽性株を同定し、それらの株の一部についてドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBI データベース上の大腸菌株から *astA* 陽性株を同定し、ゲノム比較解析から 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。

分担研究(3) 病原大腸菌食中毒事例株の解析では、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムから *astA* 保有株を検索した結果、様々な系統に属する約 3% の株で保有が認められた。また、大規模食中毒由来大腸菌の国際ゲノム比較を行った結果、近縁株は見出されなかった。分担研究(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、鶏肉は全検体で *astA* がスクリーニング PCR で陽性となった。他に牛肉、豚肉、エビ、オクラなどで *astA* が陽性になった。以上のように、*astA* 保有大腸菌および大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *E. albertii* の食品検査法に関して、培養法やリアルタイム PCR 法を検討し、また、リアルタイム PCR での新たな対象遺伝子の検索につながる研究や事例株の解析、食品での汚染状況の解明について各分担研究が連携をしながら実施した。

また、緊急的追加研究として、富山市大規模食中毒の原因物質として疑われる大腸菌 OUT(0gGp9):H18 の病原性に関する研究を行った結果、病原性を有する可能性が考えられた。このため、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT(0gGp9):H18 (疑い)」とすることが妥当と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表
(誌上発表)

Kashima K, Sato M, Osaka Y, Sakakida N, Kando S, Ohtsuka K, Doi R, Chiba Y, Takase S, Fujiwara A, Shimada S, Ishii R, Mizokoshi A, Takano M, Lee K, Iyoda S, Honda A. An outbreak of food poisoning due to *Escherichia coli* serotype 07:H4 carrying *astA* for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin1 (EAST1). *Epidemiol Infect* 149:e244, 2021.

Nguyen, T.K., Bui, H.T., Truong, T.A., Lam, D.N., Ikeuchi, S., Ly, L.K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*. Mar 2;341, 109049, 2021.

Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in retail

fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 62(3), 94-99, 2021.

Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. *Journal of food protection* 85(1), 173-179, 2022.

Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. (投稿中)

Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. (投稿中)

(学会等発表)

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii* 特異的リアルタイム PCR 法の開発と鶏の保菌状況調査. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 令和 3 年 9 月 7-13 日. オンデマンド

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子. *Escherichia albertii* 特異的リアルタイム PCR 法の開発と市販鶏肉の汚染実態調査. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 3 年 9 月 21 日-10 月 20 日. オンデマンド

廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、小椋容子、工藤由起子. *Escherichia albertii* に適する選択増菌培地の開発. 第 117 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 3 年 10 月 26 日-11 月 9 日. オンライン

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第 117 回日本食品衛生学会学術講演会. 令

和 3 年 10 月 26 日-11 月 9 日. オンライン

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子. 市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第 94 回日本細菌学会総会. 令和 3 年 3 月 29-31 日. オンデマンド

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

令和3年度緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒
由来大腸菌の病原性に関する研究

工藤 由起子

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

令和3年度緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

研究要旨

令和3年6月に富山市で発生した学校給食を原因とした患者数1800人以上の大規模食中毒において、原因食品である牛乳および患者便から分離された大腸菌OUT(0抗原遺伝子型0gGp9):H18について、病原性を解明するために多角的に解析した。菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、1)同一クローンであること、2)典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3)直接的な関連性はないものの腸管凝集性大腸菌(EAEC)と近縁であることが示された。また、培養細胞への感染実験の結果、牛乳由来株および患者由来株は、細胞付着性および細胞侵入性を示したが、EAECの示すような凝集性の付着や細胞侵入によって病原性を示す*Salmonella* Typhimuriumの示すような強い侵入性は観察されなかった。さらに、動物モデル実験の結果では、牛乳由来株および患者由来株は、マウスへの腹腔内投与によって腸管毒素原性大腸菌よりは低い、微生物試験に使用されている大腸菌株よりも高い致死性を示し、病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットへの経口投与によって、下痢の発症は観察されなかったが、腸管での定着性が認められた。

以上のことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌OUT(0gGp9):H18(疑い)」とすることが妥当と考えられた。今後さらに、遺伝子解析や動物モデル実験による下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

研究協力者

富山市保健所

瀧波賢治、鈴木富勝、水上克己

国立感染症研究所

明田幸宏、伊豫田 淳、李 謙一、窪村亜希子

富山県衛生研究所

大石和徳、木全恵子、磯部順子、綿引正則

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平、大屋賢司、大西貴弘

A. 研究目的

令和3年6月に富山市で学校給食を原因とした患者数1,800人以上の大規模食中毒が発生した。富山市保健所の調査から原因食品として牛乳が特定されたが、牛乳から主な食中毒細菌やウイルスは検出されなかったため、当該保健所から国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に原因物質調査が依頼された。毒素型食中毒の原因物質であるブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌エンテロトキシン、ウエルシュ菌エンテロトキシンおよびセレウス菌嘔吐毒(セレウリド)は検出されず、また、感染型食中毒の原因物質のうち下痢を主徴とするものについて調査したが、サルモネラ属菌、リステリア属菌、*Escherichia albertii* および既知の病原大腸菌は検出されなかった。しかし、食中毒発生に關与する提供日の牛乳では、病原大腸菌用選択分離培地上に特徴のある大腸菌コロニーが多数生育し、それらの血清型はOUT(0血清型別不能):H18であり、0抗原遺伝子型別0-genotypingでは0gGp9であることが判明した。さらに、富山市保健所での調査時の患者検便検体の大腸菌分離培地上のコロニーを調査した結果、多くの患者検体でOUT(0gGp9):H18が優勢大腸菌として分離され、病因物質が大腸菌OUT(0gGp9):H18である可能性が考えられた。

このため、本大腸菌の病原性について

の早急な解明を目的に、厚生労働省食品監視安全課と調整し、当研究事業において研究を実施することにした。富山市保健所、国立感染症研究所細菌第一部(感染研)、富山県衛生研究所(富山衛研)、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部(国衛研)にて多角的に解析を行なった成果を報告する。

B. 研究方法

(1) 菌株ゲノムの解析

1) 菌株

国衛研および感染研では、富山市食中毒事例牛乳由来株No.5および患者由来株No.14を解析に用いた。富山衛研では、富山市食中毒事例牛乳由来株TC49および患者由来株TC78株を解析に用いた。その他、参照株のゲノム配列データを公的データベースから取得し解析に用いた。

2) ゲノム配列の取得

国衛研では、牛乳由来株No.5および患者由来株No.14の菌体から抽出したゲノムDNAからMGIEasy FS DNA Library Prep Setを用いてライブラリーを作製し、DNBSEQ-G400(MGI Tech)シーケンサーで200 bpペアエンドのシーケンシングを行った。得られたリードについてcutadapt ver1.9.1を用いてアダプタートリミングを行った後、sickle ver1.33を用いてクオリティスコアが20未満の塩基と40塩基に満たないリードを

除去した。トリミング後のリードに spades ver 3.13.2 を用いてアセンブルを行いドラフト配列とし、DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) でアノテーションを行った。

富山衛研では、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 株ゲノム配列を Miseq を用いて取得した。

3) ゲノムの遺伝子型別

感染研では牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の全ゲノム配列を用いて、富山衛研では牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の全ゲノム配列を用いて、ゲノム解析パイプラインである GenEpid-J によって MLST (multi locus sequence typing) および血清型予測等の遺伝子型別を行った。また、SNP 解析については、感染研では BactSNP v1.1.0 を用い、富山衛研では cgMLST を用いた。さらに、富山衛研では、TC49 および TC78 に関してゲノム解析に先立ち、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別を標準化プロトコールに基づいて行った。

3) ゲノムの系統解析

感染研では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の系統解析を以下の通り行った。公共データベース (Enterobase:<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) から MLST 解析で近縁となる ST 株ゲノム配列データをダウンロードし、国内外の株と

の系統関係を解析した。本食中毒事例分離株ではゲノム配列からの血清型予測が困難であったため、MLST で同一 (ST1380) または 1 アリール異なる株 (single locus variants)、計 346 株を用いた比較を行った。

4) ゲノム上の病原性関連遺伝子の検索

感染研および富山衛研で行った病原性関連遺伝子の検索は、上述した GenEpid-J を用いて行った。

国衛研では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 と他の大腸菌参照株ゲノム上に存在する病原性関連遺伝子の検索を以下の通り行った。始めに、国衛研で選抜された病原大腸菌マーカー 43 遺伝子をクエリとして blastn ver 2.11.0 で各大腸菌株ゲノムを検索した。次に、the virulence factor database (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) で公開されている細菌の病原性関連遺伝子セット A (3583 遺伝子) をクエリとして blastn ver 2.11.0 で牛乳由来株 No. 5 ゲノムを検索した。この検索でヒットした 90 遺伝子のリストをクエリとして blastn ver 2.11.0 で牛乳由来株 No. 5 以外の大腸菌株ゲノムを検索した。

(2) 培養細胞への感染実験

1) 菌株

国衛研では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 の他、対照菌株として腸管凝集性大腸菌 (EAEC) 株 EAEC65、腸管

侵入性大腸菌 (EIEC) 株 EIEC66、遺伝子組み換え実験で汎用され病原性の知られていない大腸菌である実験室株 K12、牛肉由来大腸菌 (O 血清群型別不能) を用いた。感染研では、牛乳由来株 TC49、患者由来株 TC78 の他、対照菌株として EAEC 株 (*aggR*⁺)、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 株 SL1344 および腸管出血性大腸菌 (EHEC) 株 O157:H7 Sakai を用いた。

2) 細胞

Hep-2 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。Hep-2 細胞は 10%FBS、Non-Essential Amino Acids (NEAA)、Antibiotic-Antimycotic (AntiAnti) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

CACO-2 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。CACO-2 細胞は 20% FBS、NEAA、AntiAnti を添加した DMEM を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養した。CACO-2 細胞の分化には BioCoat 腸管上皮細胞分化エンバイロメントキットを使用した。

3) 細胞付着性試験

国衛研は大腸菌の細胞への付着を定量した。まず、Hep-2 細胞を 24 well プレートに撒種し、37°C、18 時間培養した。培養後、PBS で細胞を 3 回洗浄後、2% FBS および 1% D-マンノースを添加した DMEM を各 well に加えた。その後、18

時間培養した大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、Triton X を添加した PBS を加え、細胞を可溶化した。37°C、1 時間培養後、PBS 中の菌数を計数した。対照として EAEC および食品由来株を用いた。また、大腸菌の付着状況を顕微鏡的に観察するために、国衛研では上記と同様に Hep-2 細胞に大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した後、PBS で洗浄し、ギムザ染色を行った。感染研では大腸菌液を接種後、1 時間培養を行い、培養後、PBS にて 3 回洗浄後、新たな 1% D-マンノース加 DMEM 培地を加え、さらに 3 時間培養を行ったのちにギムザ染色をおこなった。

4) 細胞侵入性試験

国衛研と感染研は細胞内に侵入した大腸菌の定量をおこなった。Hep-2 細胞を 24 well プレートに撒種し、37°C、18 時間培養した。培養後、PBS で細胞を 3 回洗浄後、2% FBS および 1% D-マンノースを添加した DMEM を各 well に加えた。その後、18 時間培養した大腸菌液を加え、37°C、2 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、ゲンタマイシンを添加した PBS を加え、37°C、1 時間培養した。その後、Triton X を添加した PBS を加え、37°C、1 時間培養後、PBS 中の菌数を計数した。対照として、国衛研では EAEC65 および牛肉由来大腸菌を用い、感染研では *S. Typhimurium* 株 SL1344 と EHEC 株 O157:H7 Sakai を用いた。

5) 細胞膜透過性試験

国衛研は細胞膜透過性試験を行なった。BioCoat 腸管上皮細胞分化エンバイロメントキットの説明書に従い、24 well プレート中のセルインサート上で分化させた CACO-2 細胞に 18 時間培養した大腸菌の培養液 5 μ L を加えた。その後、Millicell-ERS を用いて 1 時間ごとに経上皮電気抵抗 (TEER) を測定した。対照として EIEC66 および K12 を用いた。

(3) 動物モデル実験

動物モデル実験は国衛研にて実施した。

1) 菌株

本実験では、富山市食中毒事例株として牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 を、病原性を有する大腸菌株として腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 株 ETEC609 および ETEC627、EAEC 株 EAEC65 および腸管病原性大腸菌 (EPEC) 株 EPEC67 を、病原性の知られていない株として、K12 および微生物試験に用いられている大腸菌株 NBRC3972 を供試した。

2) ウサギ腸管結紮ループ試験

試験菌株として、K12、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 および EPEC67 を供試した。9 週齢のウサギ (S1c:JW/CSK) の腸管に結紮ループ作製し約 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液を 0.5 mL ずつ各ループに投与した。陰性対照として、PBS、トリプティック・ソイ・ブロスあるいは K12 の試験

菌液を、陽性対照として、EPEC67 を投与した。菌液の投与から 20 から 24 時間経過後に各結紮ループの腫脹を確認した後、ループ内容物を滅菌ガーゼに染み込ませて貯留量を計量し、また、ループの長さを計測した。

3) 抗生物質投与マウスへの経口投与

試験菌株として、K12、NBRC3972、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、ETEC609、ETEC627、EAEC65 および EPEC67 を供試した。3 週齢のマウス (C57BL/6j) に四種類の抗生物質 (ゲンタマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾールおよびコリスチン) を混合した飲用水を前投与し、約 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液菌液 0.1 mL を胃内投与した。投与後 5 日目まで経時的に体重測定と行動および糞性状の観察を行った。

4) マウスへの腹腔内投与試験

試験菌株として、K12、NBRC3972、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、ETEC609、EPEC67 を用いた。4 週齢のマウス (C57BL/6j) に 10^8 あるいは 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の一晚培養液 0.1 mL を腹腔内投与した。投与後 1 から 3 日目まで経時的に生死判定を行い、経過日数ごとの各菌株投与群の致死率を算出した。また、3 週齢のマウス (C57BL/6j) に 10^8 あるいは 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株の培養液 0.1 mL を腹腔内投与し、投与後 7 日目まで経時的

に症状の推移を観察した。症状は 1. 正常、2. 低活動、3. 衰弱、4. 瀕死、5. 死亡の 5 段階に分類し記録した。

5) コモンマーモセットへの経口投与試験

コモンマーモセット若齢個体 1 (9 ヶ月齢) へ 10^9 CFU/mL の濃度に調製した患者由来株 No. 14 の一晚培養液 0.1 ml を経口投与した。また、別の若齢個体 2 (9 ヶ月齢) へ 6×10^{10} CFU/mL に調製した牛乳由来株 No. 5 の一晚培養液 0.5 mL を経口投与した。さらに、老齢個体 (127 ヶ月齢) へ 10^9 CFU/mL に調製した牛乳由来株 No. 5 の一晚培養菌液 0.1 mL を経口投与した。投与後経時的に各個体の糞便を採取し、糞便性状を観察した。また、採取した糞便を懸濁・希釈して選択培地に塗抹し、37°C で一晚培養後、コロニー数をカウントして糞便中に排出される菌数を解析した。

C. 研究結果

(1) 菌株ゲノムの解析

1) ゲノムの概要

国衛研で配列を取得した、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 ゲノムおよび代表的な大腸菌株ゲノムの概要を表 1 に示す。牛乳由来株 No. 5 のゲノムサイズは 4,971,560 bp、GC 含量は 50.4%、蛋白質コード配列 (CDS) 数は 4,591、患者由来株 No. 14 のゲノムサイズは 4,971,787 bp、GC 含量は 50.4%、CDS 数は 4,575 で

あり、両菌株間でほぼ等しい値を示した。本事例株のゲノムサイズは、K12 および NBRC3972 よりも大きく、EPEC 株 E2348/69 および ETEC 株 E24377A とほぼ等しく、ゲノムサイズが 5 メガベースを超える EHEC、EAEC および新生児髄膜炎起因大腸菌 (NMEC) より小さい値を示した。生物種でほぼ固有の値を示す GC 含量について、本事例株では表 1 に示す株の中では最も低い 50.4%であったが、大腸菌として特に逸脱していない値であると判断された。CDS 数はゲノムサイズとほぼ同様の傾向を示していた。

富山衛研で配列を取得した牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ゲノムの概要を (表 2) に示す。ゲノムサイズおよび CDS 数いずれも、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 とほぼ等しい値であった。

2) ゲノムの遺伝子型別

感染研で行った SNP 解析の結果、牛乳由来株 No. 5 と患者由来株 No. 14 は 1 か所の SNP のみ異なっており、同一クローンであると考えられた。ドラフトゲノムの解析をしたところ、*in silico* の血清型予測では O17/O77:H18、MLST では ST1380、phylogenetic group では D と型別された。

富山衛研で、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の PFGE を行ったところ、両株の PFGE パターンが一致した。続いて行ったゲノム配列の解析では、

SNP は検出されず、両株の MLST による遺伝子型は ST1380 であった (表 3)。両株の血清型は遺伝子配列から、O17:H18 と推定されたが、感染研にて行った O 血清群抗血清による血清型別では、O 血清群を確定することはできなかった。

3) ゲノムの系統解析

感染研にて牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 の系統解析を行った。公共データベース上の近縁株を解析した結果、本事例株と同じ ST1380 では多くの株で EAEC の指標である *aggR* が検出された (図 1)。これら *aggR* 保有株はいずれも凝集接着性線毛 (aggregative adherence fimbria: AAF) を保有していたが、本事例株では検出されなかった。本事例株と最も近縁な株は由来不明の 2 株およびアメリカ合衆国の海牛由来 2 株であった。いずれも本事例株と比較して 100 か所以上の SNP が認められたため、直接的な関連性は低いと考えられた。また、解析に用いた由来不明株で易熱性エンテロトキシン遺伝子 (*eltAB*) が検出されたが、本事例株と同様に *aggR* や AAF 遺伝子等の他の主要な病原性関連遺伝子を保有していなかった。

4) ゲノム上の病原性関連遺伝子の検索

感染研で行った牛乳由来株 No. 5 と患者由来株 No. 14 の病原性関連遺伝子解析では、*air*, *eila*, *kps*, *chuA*, *lpfA* が検出されたが、病原大腸菌に特徴的な付着関連遺伝子 (*cae*, *bfpA*, *aggR* 等) や

毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *est*, *elt* 等)、薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。

富山衛研で行った牛乳由来株 TC49 と患者由来株 TC78 の病原性関連遺伝子解析では、下痢原性大腸菌のカテゴリーの病原性関連遺伝子は検出されなかった。ST1380 の大腸菌として、EAEC E42 (O17:H18) が報告されていたことから、E42 のゲノム配列を用いて、EAEC E42、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の病原性関連遺伝子を比較した (表 2)。その結果、①EAEC E42 は EAEC の *aggR* 等の典型的な病原性関連遺伝子を有するプラスミドが存在するが、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 はこのプラスミドを保有していないこと、②EAEC E42、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 はゲノム上に同じ病原性関連遺伝子群を保有することが判明した。

国衛研では、富山市食中毒事例株と他の大腸菌株参照株ゲノム上に存在する病原性関連遺伝子の比較を行った (表 4)。病原大腸菌のマーカー遺伝子として用いられている 43 遺伝子およびデータベースとして公開されている細菌の病原性関連遺伝子 3583 遺伝子が牛乳由来株 No. 5 ゲノム上に存在するか検索したところ、マーカー遺伝子のリストから 5 遺伝子およびデータベースから 90 遺伝子が検出され、ゲノム上に合計 95 遺伝子の存在が確認された。牛乳由来株 No. 5 ゲノム上に存在した 95 遺伝子は、全て

患者由来株 No. 14 ゲノム上にも存在していた。感染研での解析と同様に、本事例株ゲノム上には、*stx*、*eae*、*elt*、*aggR* など病原大腸菌の主要な病原性関連遺伝子は存在しなかったものの、付着に関連する *air*、type I fimbriae クラスター、Ecp クラスター、細胞侵入に関連する *ibeB*、*ompA*、*asIA*、病原因子のレギュレーターである *eilA*、鉄取り込みに関連する Chu クラスター、Enterobactin クラスター、Shu クラスター、莢膜合成に関連する K1 capsule クラスター、III 型分泌系 (T3SS) エフェクターである *espL* 群、*espR* 群、*espX* 群、*espY* 群、II 型分泌系 (T2SS) である Gsp クラスター等病原性への関与が示唆される遺伝子群が存在していた (表 4 および表 5)。これら病原性関連遺伝子群は、他の病原大腸菌ゲノム上にも存在しているものが多く、*ibeB*、*ompA*、*asIA*、Enterobactin クラスターは JIS 規格株ゲノム上にも存在していた。EAEC 042 株ゲノムと本事例株ゲノム間では、*air*、*eilA* および K1 capsule クラスターが共通して存在し、これら遺伝子群は K1 capsule クラスターが NMEC ゲノム上に存在する以外は、他の病原大腸菌ゲノム上には存在しなかった (表 2)。

(2) 培養細胞への感染実験

1) 細胞付着性試験

国衛研で顕微鏡観察を行ったところ、陽性対照の EAEC65 では特異的な凝集性

の付着が認められたが、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 ではその様な付着は認められなかった (図 2)。

感染研でも同様に、陽性対照の EAEC では特異的な凝集性の付着が認められたが、牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ではその様な付着は認められなかった (図 2)。

国衛研で行った細胞への付着性の定量試験では、EAEC65、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 とも強い付着性が認められた (図 3)。4 株間で付着菌数に差は認められなかった (図 3)。

2) 細胞侵入性試験

国衛研の結果では、EAEC65、牛肉由来大腸菌、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 それぞれ、 4.1×10^3 cfu/well、 1.2×10^2 cfu/well、 2.0×10^3 cfu/well、 1.1×10^3 cfu/well が回収された (図 3)。

感染研の結果では、牛乳由来株 TC49、患者由来株 TC78 とも細胞侵入率は 0.001% 未満であったのに対して、*S. Typhimurium* は 2% 以上の細胞侵入率を示した (表 6)。

3) 細胞透過性試験

国衛研で細胞透過性試験を行ったところ、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、EIEC66、K12 を CACO-2 細胞に接種し、接種後 8 時間までの TEER の変化を経時的に測定した。EIEC66 を接種する

と、TEER が緩やかに減少を始め、接種後 6 時間で接種前の 74%まで TEER が減少した (図 4)。しかし、8 時間後には接種前の 86%まで回復した (図 4)。一方、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、K12 では、接種後 6 時間で、それぞれ接種前の 104%、91%、91%の TEER を示した (図 4)。接種後 8 時間では、牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14、K12 はそれぞれ接種前の 97%、101%、102%となった (図 3)。

(3) 動物モデル実験

1) ウサギ腸管結紮ループ試験

陽性対照である EPEC67 を投与したループは、ループ部位の腫脹および液体貯留が認められた。牛乳由来株 No. 5、患者由来株 No. 14 および陰性対照を投与したループでは、腫脹および液体貯留は認められなかった。

2) 抗生物質投与マウスへの経口投与試験

牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 投与群を含め、投与後 5 日目まで全ての投与群で下痢、著しい体重減少および行動異常は認められなかった。

3) マウスへの腹腔内投与試験

各試験菌株腹腔内投与後の致死率を解析した結果 (図 5)、陽性対照の ETEC609 を投与したマウスは投与後 1 日目までに 15 匹中 12 匹 (80%) が、投与後 2 日目までに 14 匹 (93%) が死亡した。牛乳由来株 No. 5 を投与したマウスは、

投与後 1 日目までに 15 匹中 7 匹 (47%) が、投与 2 日目までに 13 匹 (87%) が死亡した。患者由来株 No. 14 を投与したマウスは、投与後 1 日目までに 10 匹中 2 匹 (20%) が、投与 2 日目までに 7 匹 (70%) が死亡した。EPEC67 を投与したマウスは投与後 1 日目まで死亡しなかった (0%)。陰性対照とした K12 投与マウスは、投与後 3 日まで一匹も死亡しなかった (0%)。NBRC3972 を投与したマウスは投与後 1 日目に 15 匹中 1 匹 (7%) が、投与後 2 日目までに 7 匹 (47%) が死亡した。

各試験菌株腹腔内投与後の経時的な症状の推移を解析した結果、陽性対照の ETEC609 を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは投与後 9 時間で 5 匹中 1 匹が、投与後 1 日目までに 3 匹が、投与後 2 日目までに 5 匹全てが死亡した (図 6A)。ETEC609 を 10^7 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 1 日目までに 5 匹中 2 匹が、投与後 2 日目までに 4 匹が死亡した (図 6B)。瀕死になってから回復した個体はいなかった。牛乳由来株 No. 5 を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 2 日目までに 5 匹中 4 匹が死亡し、投与 3 日目までに 5 匹全てが死亡した (図 6A)。瀕死になってから回復した個体はいなかった。牛乳由来株 No. 5 を 10^7 CFU/匹で投与したマウスは、投与後 1 日目までに 5 匹中 1 匹が衰弱したがその後回復し、投与 7 日目まで死亡した個体はいなかった (図 6B)。NBRC3972 を 10^8 CFU/匹で投与したマウス

は、投与後2日で5匹中2匹が死亡し、投与後3日目には3匹が死亡した(図6A)。また、投与後3日目に2匹が瀕死であったが、その後投与7日目には正常まで回復した。NBRC3972を 10^7 CFU投与したマウスは投与後9時間で5匹中5匹が低活動となったが、投与後1日目には全個体が正常に回復した(図6B)。陰性対照のK12を 10^8 CFU/匹で投与したマウスは、一部低活動がみとめられたが、投与後7日まで6匹中1匹も死亡しなかった(図6A)。

4) コモンマーモセットへの経口投与試験

患者由来株 No. 14 を 10^8 CFU/匹で経口投与した若齢個体 1、牛乳由来株 No. 5 を 3×10^{10} CFU/匹で経口投与した若齢個体 2 および牛乳由来株 No. 5 を 10^8 CFU/匹で経口投与した老齢個体は、下痢を示さなかった。しかし、若齢個体 1 では投与後 11 日目まで $10^{4.9}$ から $10^{9.2}$ CFU/g の範囲で、若齢個体 2 では投与後 15 日目まで $10^{3.5}$ から $10^{9.5}$ CFU/g の範囲で、老齢個体では投与後 28 日目まで $10^{5.2}$ から $10^{8.7}$ CFU/g の範囲で便中に菌の排出が認められた。

D. 考察

(1) 菌株ゲノムの解析

国衛研で決定した、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 ゲノムのゲノムサイズおよび CDS 数は、K12 およ

び NBRC3972 と、主要な病原大腸菌である EHEC および EAEC の中間の値を示した。富山衛研で決定した牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 ゲノムのゲノムサイズおよび CDS 数も、同様の数値であった。一般的に、細菌はゲノムサイズが大きく、コードする遺伝子数が多いほど環境への適応度が高く病原性が強い傾向にあることから、本事例株は一定の病原性を示す可能性が示唆された。

感染研の解析では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 は、SNP 解析から同一クローンであると考えられ、遺伝子型は ST1380 であった。富山衛研が行った解析でも、牛乳由来株 TC49 と患者由来株 TC78 の間において SNP は検出されず、両株の遺伝子型も ST1380 で一致し、これらの株は同一クローンであると考えられた。

感染研で行った系統解析の結果、データベース上から牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 と直接的な関連性を示唆する近縁株は見出されなかった。データベース上に存在し、由来情報のある ST1380 はいずれも海外由来株であり、国内での同一 ST の分布は不明であった。しかし、本事例株と同じ ST1380 には EAEC の株が多く、本事例株は EAEC と近縁であることが示唆された。

感染研および国衛研の解析では、牛乳由来株 No. 5 および患者由来株 No. 14 ゲノム上には、病原大腸菌の主要な病原

性関連遺伝子は存在しないものの、病原性への関与が示唆される遺伝子群が存在していた。富山衛研が行った牛乳由来株 TC49 および患者由来株 TC78 の解析においては、本事例株は EAEC の典型的な病原性関連遺伝子を保有するプラスミドは検出されないが、ゲノム上に EAEC と類似した病原性関連遺伝子群を保有していた。また、本事例株と同じ血清型の非定型 EAEC が牛から分離され、Hep-2 細胞で凝集付着性を示したことが報告されている。さらに、国衛研で、本事例株ゲノム上に存在する遺伝子群が他の大腸菌参照株ゲノム上に存在するか検討したところ、これらの遺伝子群は他の大腸菌参照株に比べて EAEC ゲノム上に共通して存在するものが多く、本事例株は EAEC と近縁である可能性が示唆された。

以上のゲノム解析により、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの EAEC と近縁であることが示された。

(2) 培養細胞への感染実験

培養細胞への付着試験では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 とともに強い細胞付着性が認められた (図 3)。しかし、その付着性は EAEC65 で見られる凝集性の付着ではなく (図 2)、また、牛

肉由来大腸菌との差は認められなかった (図 3)。一方、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 共に EAEC65 と同程度の弱い細胞侵入性を示した (図 3)。しかし、EAEC はその侵入性によって病原性を示しているわけではない。また、細胞侵入によって病原性を示す *S. Typhimurium* は、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 よりも強い細胞侵入性を示した (表 6)。このため、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 が示す侵入性と病原性との関連性は、今回の試験では明らかにできなかった。さらに、これらの株は CACO-2 細胞の TEER を低下させなかった (図 4)。以上の結果から、今回行った培養細胞に対する感染実験では、患者由来株 No. 14、牛乳由来株 No. 5 の病原性を確認できなかった。

(3) 動物モデル実験

富山市食中毒事例では原因食品を喫食した施設職員等の成人に比べて児童の発症率が高く、富山市食中毒事例株は免疫や腸内細菌叢が未発達な腸管でのみ病原性を発揮することが推察されていた。そのため主に若齢動物を用いて、動物モデル実験を行った。富山市食中毒事例株は、マウスへの腹腔内投与で致死性が認められた。本食中毒事例株の致死性は、ETEC609 より低く、病原性の知られていない大腸菌株 (NBRC3972 および K12) より高い結果であった。また、牛乳由来株 No. 5 投与群の腹腔内投与後の

症状の増悪は、ETEC609 投与群より緩やかで、NBRC3972 投与群よりは早かった。また、NBRC3972 投与群では、瀕死から回復した個体が観察されたが、牛乳由来株 No. 5 投与群では、瀕死となった個体は全て死亡した。以上より、富山市食中毒事例株は ETEC ほど高くないものの病原性を有する可能性が考えられた。一方で、ウサギ腸管結紮ループ試験および抗生物質投与マウスへの経口投与試験を行ったが、供試した富山牛乳由来株 No. 5 と富山患者由来株 No. 14 の下痢原性は認められなかった。また、コモンマーモセットへの経口投与試験においても下痢原性が認められず、動物モデル実験でのヒトの下痢症の再現性の検討が更に必要であると考えられた。しかし、コモンマーモセットへの経口投与後、糞中への菌の排出が一定期間観察されたことから、本食中毒事例株はコモンマーモセットの腸管に定着性を有することが認められた。

E. 結論

原因食品として特定された牛乳および患者便から分離された大腸菌 OUT (0 抗原遺伝子型 0gGp9) :H18 について、病原性を解明するために多角的に解析した。

(1) 菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病

原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの腸管凝集性大腸菌 (EAEC) と近縁であることが示された。

(2) 培養細胞への感染実験の結果、牛乳由来株および患者由来株は、細胞付着性および細胞侵入性を示したが、EAEC の示すような凝集性の付着や細胞侵入によって病原性を示す *Salmonella* Typhimurium の示すような強い侵入性は観察されなかった。

(3) 動物モデル実験の結果では、牛乳由来株および患者由来株は、マウスへの腹腔内投与によって腸管毒素原性大腸菌よりは低いが、微生物試験に使用されている大腸菌株よりも高い致死性を示し、病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットへの経口投与によって、下痢の発症は観察されなかったが、腸管での定着性が認められた。

以上のことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT (0gGp9) :H18 (疑い)」とすることが妥当と考えられた。今後さらに、遺伝子解析や動物モデル実験による下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

(投稿予定)

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

I. 謝辞

本研究の動物モデル実験に際して、
ご協力およびご指導いただきました以
下の先生方に感謝いたします。

公益財団法人実験動物中央研究所
佐々木えりか先生、井上貴史先生

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 北
嶋聡先生、栗形麻樹子先生

国立医薬品食品衛生研究所 動物管理
室 高橋祐次先生

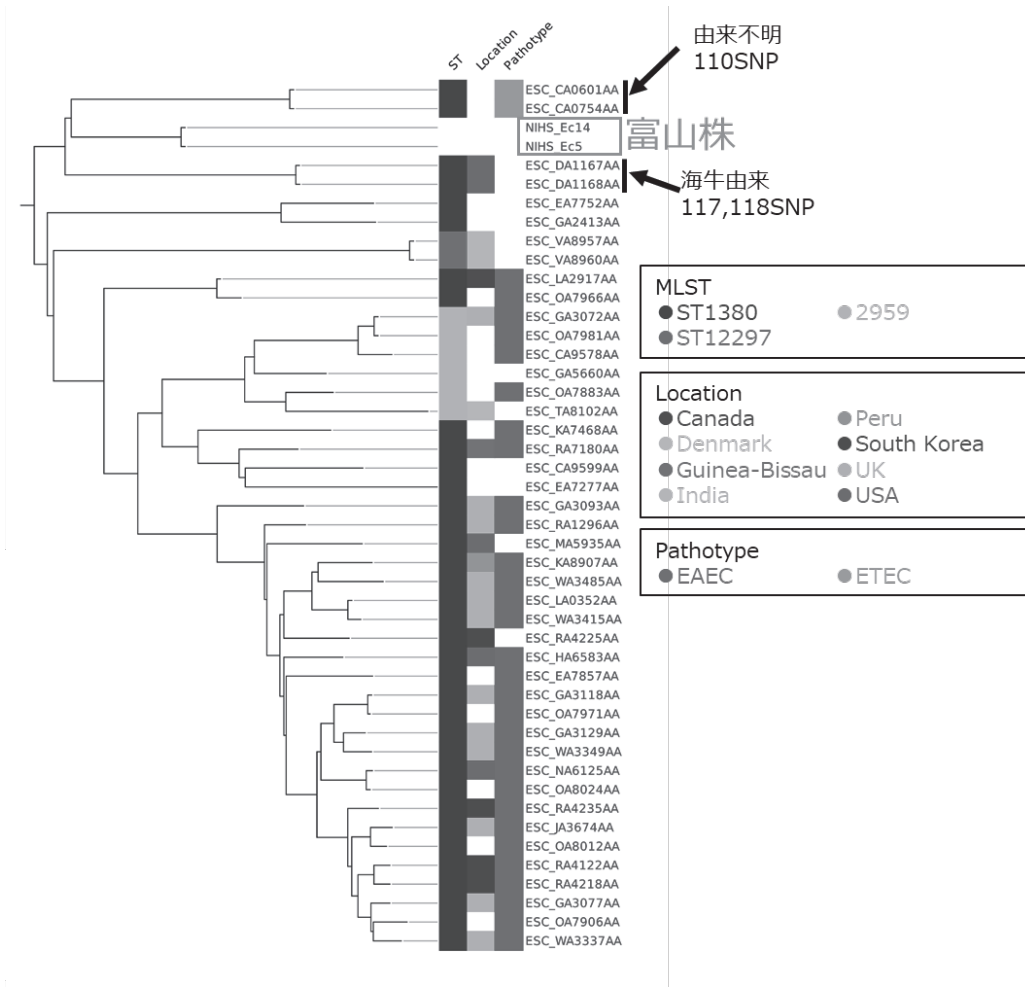
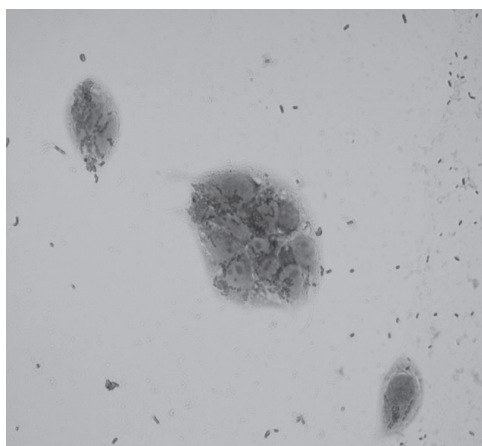
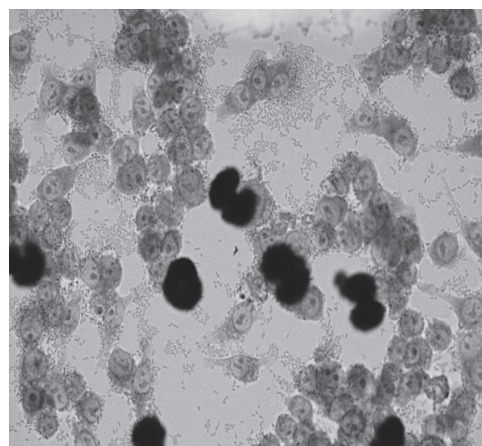


図1 大腸菌 ST1380 および近縁株における SNP を用いた最尤法系統樹
 食中毒由来株と近縁な 46 株の系統樹。右側のカラムは MLST、分離国、
 pathotype を示す。Pathotype については、EAEC は *aggR*、ETEC は *e1tAB* 保有
 を示す。

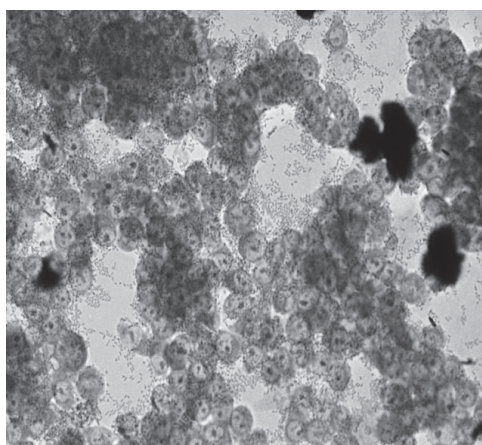
(a) 国衛研



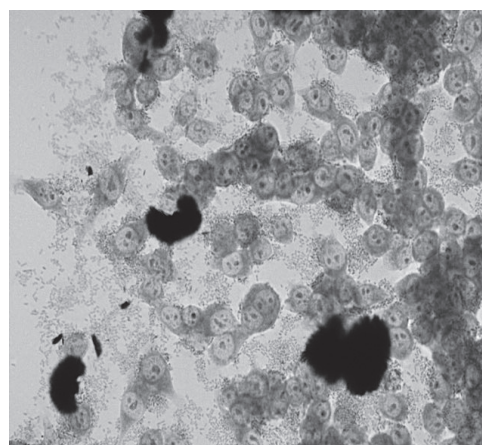
EAEC65



牛肉由来大腸菌

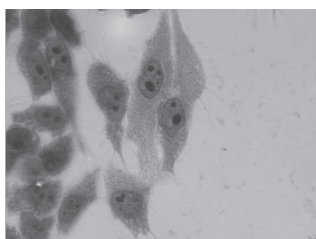


牛乳由来株 No. 5

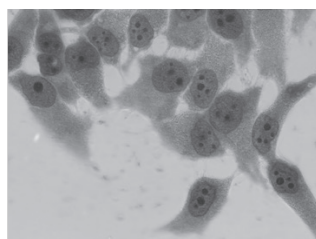


患者由来株 No. 14

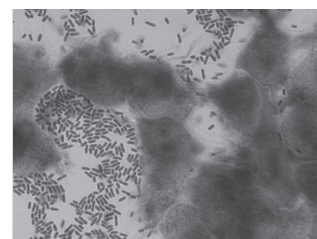
(b) 感染研



TC49 (牛乳由来)



TC78 (患者由来)



陽性対照(*aggR*+ EAEC)

図 2 細胞付着性試験

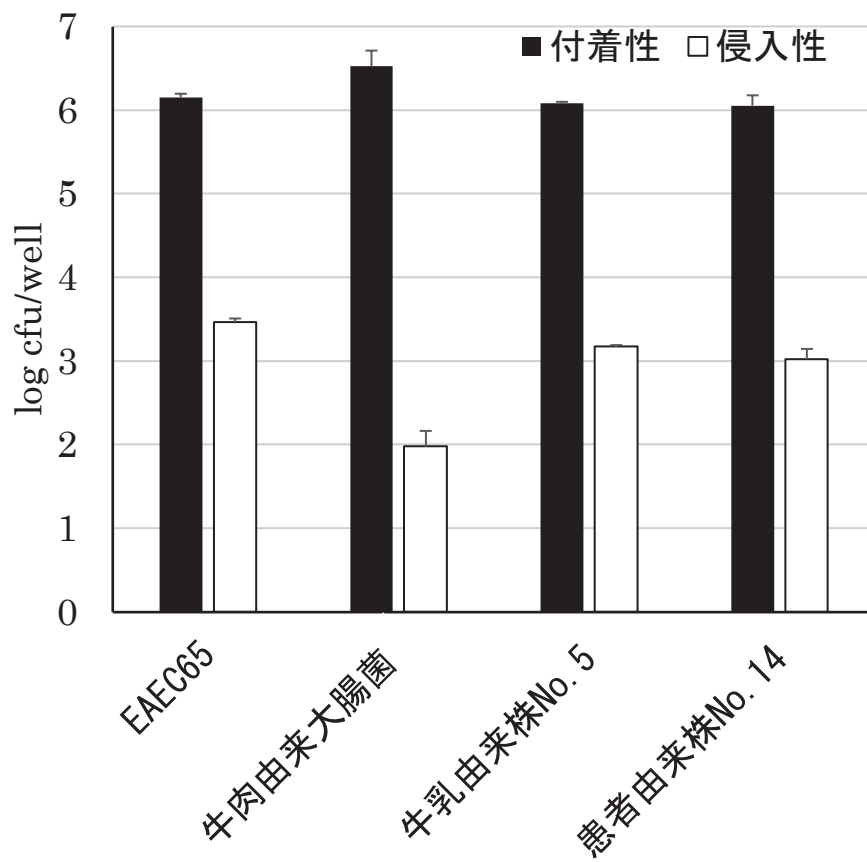


図3 細胞侵入性・付着性試験（国衛研）

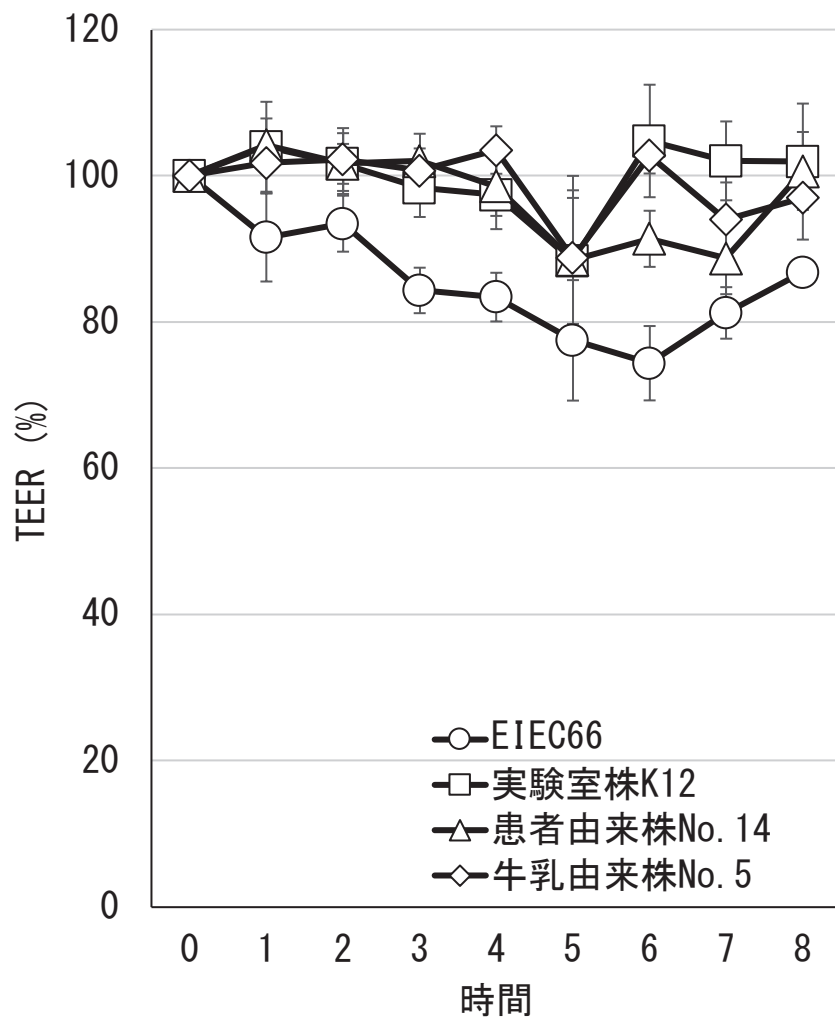


図4 細胞膜透過性試験 (国衛研)

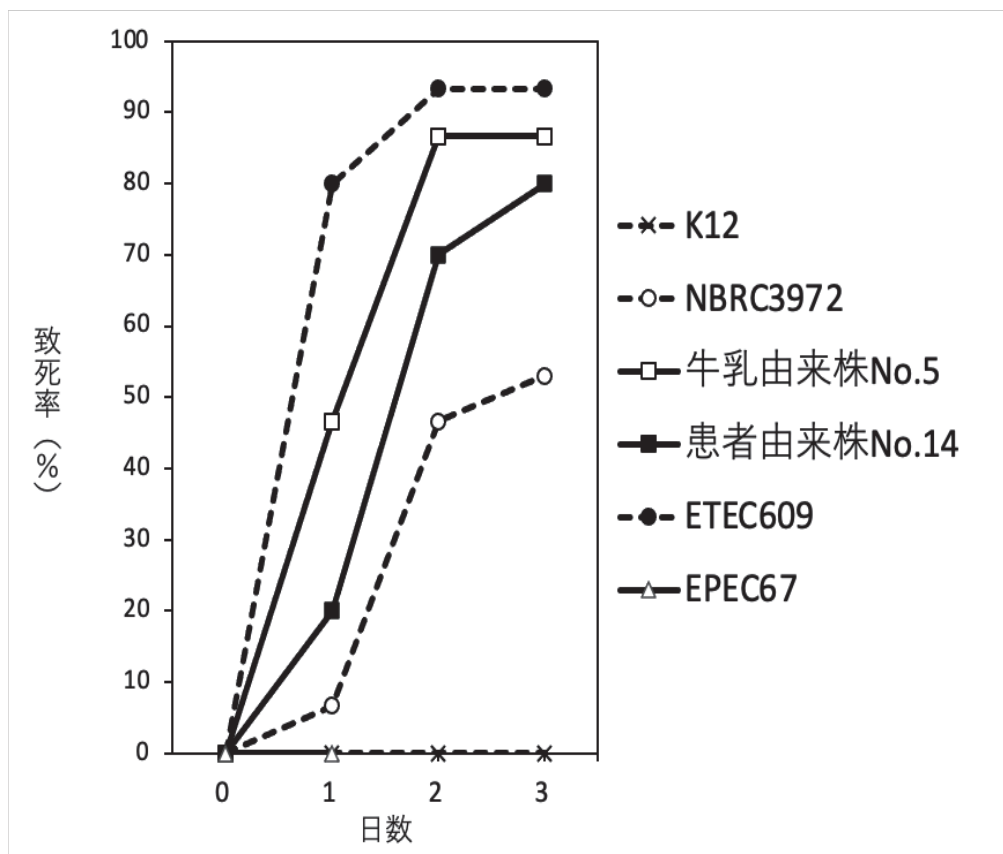
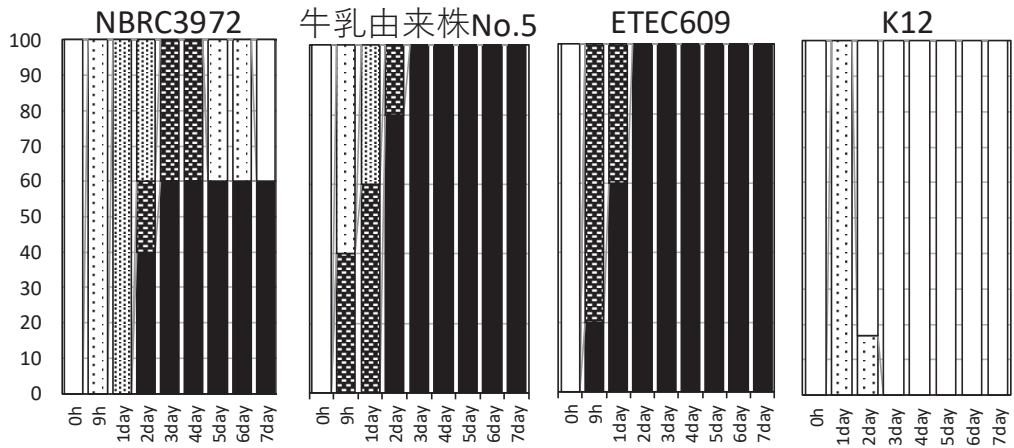


図5 腹腔内投与後の致死率（マウス）

A



B

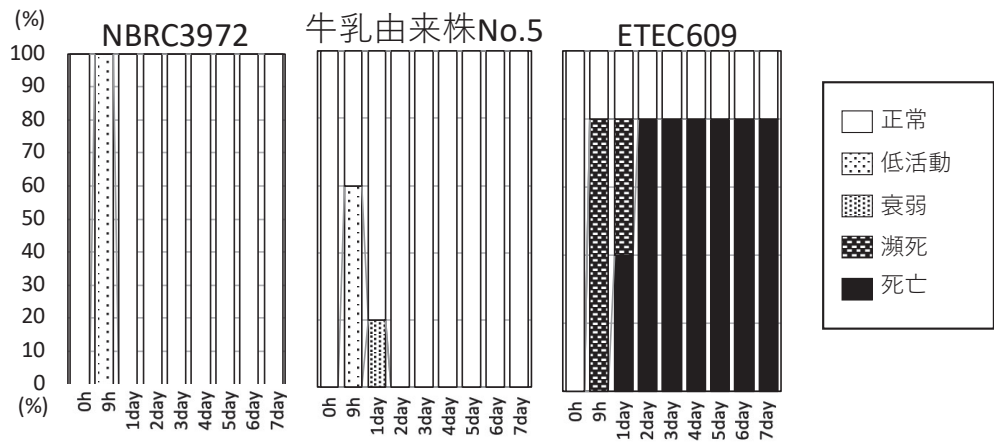


図6 腹腔内投与後の症状の推移 (マウス)

表 1 富山市食中毒事例株および代表的な病原大腸菌株ゲノムの概要

| 株名 | 病原大腸菌 | 全長 (bp) | GC含量 (%) |
|--|-------|-----------|----------|
| 牛乳由来株 No.5 | | 4,971,560 | 50.4 |
| 患者由来株 No.14 | | 4,971,787 | 50.4 |
| <i>E. coli</i> K12 | | 4,641,652 | 50.8 |
| <i>E. coli</i> NBRC3972 | | 4,746,218 | 50.9 |
| <i>E. coli</i> O157:H7 Sakai | EHEC | 5,498,578 | 50.5 |
| <i>E. coli</i> O103:H2 str. 12009 | EHEC | 5,449,314 | 50.7 |
| <i>E. coli</i> O127:H6 str. E2348/69 | EPEC | 4,965,553 | 50.6 |
| <i>E. coli</i> O55:H7 str. CB9615 | EPEC | 5,386,352 | 50.5 |
| <i>E. coli</i> O139:H28 E24377A | ETEC | 4,979,619 | 50.5 |
| <i>E. coli</i> O78:H11:K80 str. H10407 | ETEC | 5,153,435 | 50.7 |
| <i>E. coli</i> 55989 | EAEC | 5,154,862 | 50.7 |
| <i>E. coli</i> O44:H18 042 | EAEC | 5,241,977 | 50.6 |
| <i>E. coli</i> O18:K1:H7 IHE3034 | NMEC | 5,108,383 | 50.7 |

病原大腸菌のカテゴリー

- EHEC：腸管出血性大腸菌
- EPEC：腸管病原性大腸菌
- ETEC：腸管毒素原性大腸菌
- EAEC：腸管凝集性大腸菌
- NMEC：新生児髄膜炎起因大腸菌

表 2 Genepid-JによるEAEC E42、TC 49およびTC 78のゲノム解析のまとめ

| | EAEC E42 ^{a)} | TC 49 / TC 78 |
|---------------------------|--|--|
| Genome サイズ (bp) | 5,288,527 | 4,979,836 / 4,980,977 |
| contigs数 | 149 | 49 / 53 |
| 遺伝子数 (CDS数) | 5,025 | 4,638 / 4,647 |
| MLST 遺伝子型 | ST1380 | ST1380 |
| 血清型 | O 17/O 77 O 17/O 44 H18 | O 17/O 77 O 17/O 44 H18 |
| プラスミド レプリコン | hncF B hncF II hncII-I(α) | hncF B |
| 薬剤耐性遺伝子 | <i>bb_{EC-8}</i> <i>mdfA</i> <i>bb_{C_{TX-M-15}}</i> <i>bb_{TEM-1}</i> | <i>bb_{EC-8}</i> <i>mdfA</i> |
| 病原因子遺伝子 ^{b), c)} | (E42のみ検出された病原因子遺伝子 15遺伝子) <i>orf3, orf4, aaC, aap, aap/aspU, aatA, agg4A, agg4C, agg4D, aggR, capU, sepA, iss, set1A, set1B</i> | (TC 49およびTC 78のみ検出された病原因子遺伝子 1遺伝子) <i>gtrA</i> |
| | (E42, TC 49およびTC 78で共通な病原因子遺伝子 72遺伝子) | |
| | <i>ar, asA, chuA, chuS, chuU, chuV, chuW, chuY, eia, entB, entC, entD, entE, entF, entS, espL1, espL4, espR1, espX1, espX4, espX5, espY1, espY3, espY4, fdeC, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, gad, gspC, gspD, gspE, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, kpsC, kpsD, kpsE, kpsF, kpsM, kpsM II, kpsS, kpsU, bfa, ompA, shuA, shuT, shuX, terC, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, ykgK/ecpR</i> | <i>ar, asA, chuA, chuS, chuU, chuV, chuW, chuY, eia, entB, entC, entD, entE, entF, entS, espL1, espL4, espR1, espX1, espX4, espX5, espY1, espY3, espY4, fdeC, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes, fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI, gad, gspC, gspD, gspE, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, kpsC, kpsD, kpsE, kpsF, kpsM, kpsM II, kpsS, kpsU, bfa, ompA, shuA, shuT, shuX, terC, yagV/ecpE, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, ykgK/ecpR</i> |

Genepid-Jを用いてE42, TC 49およびTC 78の塩基配列を解析した

^{a)} accession number: JACFEW 000000000

^{b)} 太字: プラスミド由来 (EAEC 042 プラスミドpAA2等、公的データベースのプラスミド塩基配列上にコードされている遺伝子) Virulence 12:57-74,2020、Mol Microbiol 111:534-55,2019

なお *iss* はゲノム上にコードされるタイプと、プラスミド上に存在するタイプがあるが、今回は型別していない。

^{c)} 下線: EAECの典型的レギュレーター-AggRによる発現制御を受ける (Virulence 12:57-74,2020)

表 3 本食中毒事例の解析対象株および参照株の詳細

| 菌株名 | 由来 | 血清型 | ST | 病原因子 | 凝集付着性 | 分類 |
|---------|---------|-------------------------------------|------|-------------------------|-------|------------|
| 解析対象株 | | | | | | |
| TC 49 | 牛乳由来 | O 17/O 77 (wzx) O 17/O 44 (wzy) H18 | 1380 | なし | 検討中 | - |
| TC 78 * | 患者由来 | O 17/O 77 (wzx) O 17/O 44 (wzy) H18 | 1380 | なし | 検討中 | - |
| TC 76 | 患者由来 | O 75 H5 | 1193 | <i>pap, iuc</i> 遺伝子群保有 | 未実施 | - |
| 参照株 | | | | | | |
| E42 | 論文報告a | O 17 H18 | 1380 | <i>aggR</i> 等保有 | あり | EAEC |
| 牛由来株 | 論文報告b | O 17 H18 | - | なし | あり | 非典型EAEC |
| UT由来株 | 論文報告c,d | O 75 H5 | 1193 | <i>papA, usp, vat</i> 等 | 不明 | UPEC/ExPEC |

*PFGEパターンがTC 49と一致

a) Virulence 12:57-74,2020

b) FEMS Microbiol Lett 256:251-7,2006

c) Sci Rep. doi:10.1038/srep44866, 2017

d) Front Microbiol 12: article 746995, 2021

UTI: urinary tract infection, EAEC: Enteroaggregative *E. coli*, UPEC: Uropathogenic *E. coli*, ExPEC: Extraintestinal pathogenic *E. coli*

表 4 富山市食中毒事例株が保有する病原性関連遺伝子と他の大腸菌での保有状況

| 検索法 | カテゴリー | 遺伝子 | 機能 | 由来菌種 | 牛乳由来株 (No.5) | 患者由来株 (No.14) | 他の大腸菌での保有状況 | | | | | | NBER3972 (ATCC3739) JIS株株 NC_010468.1 |
|-----------------------------------|---------------------------|---|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|----------------------------------|---|---------------------------------------|------------------------------------|--|-----|---|
| | | | | | | | EPEC O44:H18 042 NC_017626 | ETEC O78:H11:K80 H10407 NC_017633 | EPEC O127:H6 E2348/69 NC_011601 | EHEC O157:H7 Sakai NC_002695 | NMEC O18:K1:H7 IHE3034 NC_017628 | | |
| 病原性大腸菌 マーカ-遺伝子 のリストから 検索 | Autotransporter adhesin | <i>air</i> | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| | Major fimbrial subunit | <i>fliA</i> | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| | Ibcs | <i>ibcs</i> | 細胞侵入 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Transcriptional regulator | <i>eiaA</i> | 転写生薬 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| | Inner membrane protein | <i>b121</i> | その他 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Type 1 fimbriae | <i>fimA-H</i> の9遺伝子 | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| | Adhesive fimbriae | <i>cafA</i> | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| | Ecp | <i>ecpA-E, R</i> の6遺伝子 | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Adhesion | <i>fdeC</i> | 付着因子 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Outer membrane protein | <i>ompA</i> | 細胞侵入 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Arylsulfatase | <i>asaA</i> | 細胞侵入 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Chu | <i>chuA, S-7</i> の8遺伝子 | 細胞取り込み | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Enterobactin | <i>fepA-D, G, entB-F, S;</i> <i>fes</i> の12遺伝子 | 鉄取り込み | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | K1 capsule | <i>KpsC-F, M, S-U</i> の8遺伝子 | 荚膜合成 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| | T3SS effector | <i>espA, I, 4; espR1, 3, 4;</i> <i>espX1, 4-6; espY1-4</i> の13遺伝子 | その他 | <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | + | + | + | +/- | |
| | VFDBのリスト から検索 | Curlin | <i>csgB</i> | 付着因子 | <i>Salmonella Typhimurium</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | Curlin | <i>csgG</i> | 付着因子 | <i>Salmonella Typhimurium</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | Capsule | <i>gnd</i> | 荚膜合成 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | RcsAB | <i>rcaB</i> | 荚膜合成 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | T2SS | <i>exsG</i> | 菌体外分泌系 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| T2SS | | <i>gspC-M</i> の11遺伝子 | 菌体外分泌系 | <i>Shigella dysenteriae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| T6SS | | <i>cjpl/bsrH</i> | 菌体外分泌系 | <i>Shigella sonnei</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Shu | | <i>shuA, S-V, X, Y</i> の7遺伝子 | 鉄取り込み | <i>Shigella dysenteriae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Allantoin utilization | | <i>ailB</i> | その他 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Acriflavine resistance protein | | <i>acrA</i> | その他 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Acriflavine resistance protein | | <i>acrB</i> | その他 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| LPS | | <i>gtrA</i> | その他 | <i>Shigella flexneri</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Flagella | <i>fliA</i> | その他 | <i>Vibrio cholera</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Flagella | <i>fliB</i> | その他 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | | |

*VFDB: virulence factor data base; <http://www.mgc.ac.cn/VFs>

±: identity < 80%

+/-: クラスター内の複数の遺伝子が存在しない

表5 富山市食中毒事例株が保有する病原性関連遺伝子（群）

| 遺伝子（群）名 | 機能 | 病原性への関与 |
|---|--------|--|
| <i>air</i> | 付着因子 | Enteragggregative immunoglobulin repeat protein. EAECの付着に関与 |
| <i>lpfA</i> | 付着因子 | 宿主細胞への付着に関与（線毛アドヘジン） |
| Type 1 fimbriae クラスター | 付着因子 | 1型線毛。宿主細胞への付着に関与 |
| <i>cofA</i> | 付着因子 | CFA/III線毛の構成成分。宿主細胞への付着に関与。 |
| Ecpクラスター | 付着因子 | <i>E. coli</i> common pilus。宿主細胞への付着に関与。EHEC O157では主要な病原因子 |
| <i>fdeC</i> | 付着因子 | 非線毛性のアドヘジン。宿主細胞への付着、腎臓・膀胱への定着に関与 |
| <i>Agf</i> | 付着因子 | <i>Salmonella</i> 属の凝集性線毛のホモログ |
| <i>ibeB</i> | 細胞侵入 | 大腸菌K1株（新生児髄膜炎の原因）の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与 鶏病原性大腸菌（APEC）の線維芽細胞への侵入と病原性に関与 |
| <i>ompA</i> | 細胞侵入 | 大腸菌K1株の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与 |
| <i>aslA</i> | 細胞侵入 | 大腸菌K1株の脳毛細血管内皮細胞への侵入に関与 |
| <i>eilA</i> | 転写制御 | EAECのT3SSレギュレーター。Airの発現を制御 |
| K1 capsule クラスター | 莢膜合成 | 大腸菌K1株の莢膜合成遺伝子群（ <i>kps</i> 群のみで、 <i>neu</i> 群は存在しない） 宿主細胞内への侵入に関与（細胞内での生存能を増強） |
| RcsAB | 莢膜合成 | <i>Klebsiella</i> 属の莢膜合成レギュレーターのホモログ |
| III型分泌エフェクター（ <i>espL</i> 群、 <i>espR</i> 群、 <i>espX</i> 群、 <i>espY</i> 群） | その他 | EspLは <i>Citrobacter rodentium</i> のマウス腸管への定着に関与。 |
| II型分泌系（Gspクラスター） | 菌体外分泌系 | <i>Shigella</i> 属のII型分泌系（T2SS）のホモログ |
| | | ETECのGSPクラスターは、易熱性毒素（LT）の分泌に関与 コレラ菌のGSPクラスターは、コレラ毒素の分泌に関与 |
| Chuクラスター | 鉄取り込み | ヘム鉄の取り込みに関与 |
| Enterobactinクラスター | 鉄取り込み | 遊離鉄をキレートし、鉄取り込みに関与 |
| Shuクラスター | 鉄取り込み | <i>Shigella</i> 属のヘム鉄の取り込みに関与する系のホモログ |

表6 細胞侵入性試験結果（感染研）

| 試験菌株 | 細胞侵入率(%) |
|------------------------------|----------|
| TC49 (本食中毒事例分離株、牛乳由来) | <0.001 |
| TC78 (本食中毒事例分離株、患者由来) | <0.001 |
| EHEC O157 Sakai | <0.001 |
| <i>S. Typhimurium</i> SL1344 | >2.0 |

培養細胞無しの条件における細胞侵入率はいずれの試験菌株においても<0.001%

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

工藤 由起子

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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

病原大腸菌の食品での検査法確立のために、大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *Escherichia albertii* および *astA* 保有大腸菌を対象に研究を実施した。*E. albertii* についてはこれまでの研究で明らかになっていた増菌培養法、分離培養法、リアルタイム PCR 法等の評価を2段階に分けて最終評価を行った。〔1〕食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討：複数の自治体と多種食品を供試して評価し、mEC、NmEC または薬剤 AB を添加した mEC にて増菌培養後に RX-DHL または RX-MAC にて分離培養することで、8割以上の検体から *E. albertii* が分離された。

〔2〕食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価：11試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施し、汚染レベル約 18 CFU/25 g では鶏肉検体で9割以上、モヤシ検体で5から7割、80 CFU 以上の汚染レベルではほとんどの検体から分離されることが示された。また、*E. albertii* 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) は、スクリーニング法として優れていることが示された。また、*astA* 保有大腸菌については、〔3〕*astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立：*astA* 保有大腸菌に対応する食品での検査法の確立を目的に本研究を行った。その結果、本菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

岩手県環境保健研究センター

山中拓哉

宮城県保健環境センター

佐藤千鶴子、山谷聡子

| | |
|---------------|----------------|
| 秋田県健康環境センター | 今野貴之 |
| 宇都宮市衛生環境試験所 | 床井由紀 |
| 山梨県衛生環境研究所 | 柳本恵太 |
| 三重県保健環境研究所 | 小林章人 |
| 大分県衛生環境研究センター | 成松浩志、溝腰朗人 |
| 川崎市健康安全研究所 | 小嶋由香 |
| 静岡市環境保健研究所 | 高橋直人 |
| 広島市衛生研究所 | 末永朱美、池田伸代 |
| 北九州市保健環境研究所 | 大羽広宣、藤崎道子、有川衣美 |
| 福岡市保健環境研究所 | 松永典久 |
| 熊本市環境総合センター | 小畑裕子 |
| (公社)日本食品衛生協会 | 甲斐明美 |
| 国立医薬品食品衛生研究所 | 廣瀬昌平、新井沙倉 |

A. 研究目的

近年、国内外において大腸菌近縁の *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されている。既に日本では 2003 年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数 200 人以上の事例も報告され新興食中毒細菌として注目されている。しかし、食中毒事例において原因食品が特定された事例は少ないため（大岡，2017）、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法の確立が求められており、令和 2 年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金事業「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」において、効率的な検出を

目的とした遺伝子検出法、増菌培養法および分離培養法を決定した。本研究課題では、2 段階に分けて最終評価を行うこととした。[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討では、複数の自治体と多種食品を供試し、増菌培養法および分離培養法を評価した。[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価では、上記[1]で検討した各種方法の結果を踏まえて、優れた方法を組み合わせて 11 試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施した。

また、近年、*astA*（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 ; EAST1 をコードする遺伝子）保

有大腸菌による集団食中毒事例が発生している。本菌に特異的な検査法は国内外で確立されておらず、原因食品が不明であることが多い。そこで、[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立として、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして本菌に適する効率的かつ特異的な検査法の開発を行うこととした。

B. 研究方法

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

食中毒事例由来株である *E. albertii* EA12 および EA21 の 2 株を供試した。鶏肉、豚肉、キュウリ、モヤシ、キャベツ、カキ、ワカメ、トウフの 8 食品を供試した。低菌数接種として 7 cfu/25 g、中菌数接種として 14 cfu/25 g、高菌数接種として 30 cfu/25 g となるように *E. albertii* の希釈菌液を調製した。食品検体 25 g をストマッカー袋に入れ、各接種菌数レベル用希釈菌液 0.1 mL を接種した。食品検体への接種は、各接種菌数レベルごとに 1 食品につき 3 袋 (=3 検体) 用意した。菌を接種後、modified EC 培地 (mEC)、ノボビオシン加 mEC (NmEC) または薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC)

225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 22 時間培養した。それぞれの試験において、各増菌培養液につき 1 検体の菌非接種の検体も同時に培養した。各増菌培養液 0.1 mL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL) およびマッコンキー寒天培地 (MAC) を基本としてそれぞれに 1%ラムノースおよび 1%キシロースを添加した培地 (RX-DHL、RX-MAC) を用いた。食品培養液を各 2 枚の RX-DHL および RX-MAC に画線し、37°C にて 22~24 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、各培地あたり陽性と疑われるコロニー 3 個を RX-DHL に単離し、37°C にて 22~24 時間培養した。生育したコロニーの色に関わらず、コロニーから DNA を熱抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

本コラボレイティブ・スタディには、11 試験検査機関が参加した。鶏肉またはモヤシ検体 (高菌数接

種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体)に添加剤 AB 加 mEC 培地 225 mL を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 42 ± 1 °C、 22 ± 2 時間培養した。培養液 10 μ L ずつを各分離培地 (RX-DHL、RX-MAC、DHL、MAC) に接種し画線し、 37 ± 1 °C にて 22~24 時間培養した。また、培養液からアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出し、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR (IC を含む) に供試した。培養後の各平板から各平板種類ごとに疑われるコロニー最大 5 個を釣菌し、RX-DHL に継代し、 37 ± 1 °C にて 22~24 時間培養した。*E. albertii* と思われる無色透明コロニーについてのみ、熱抽出法にて DNA を抽出し、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法に供試した。結果表に記入した試験結果に基づき、国立衛研にて試験結果を集計後、Outlier 機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。いずれの検定においても、一元配置分散分析を行い、事後解析として、多重比較である Tukey-Kramer 法で解析を行った。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

培養法の検討では、合計 159 株の *astA* 保有大腸菌を供試した。

増菌培養法の検討では、供試菌株を mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC に接種し、 42 °C にて 18 時間培養後に増殖を観察した。分離培養法の検討では、供試菌株をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) や薬剤 C を添加した培地に画線し、 37 °C にて 22 時間培養後にコロニーを観察した。*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討では、食品や食中毒事例由来細菌 26 種 35 株について *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (Ratchtrachenchai et al., 2012) および *astA* 特異的リアルタイム PCR 法 (Hidaka et al., 2009) を試験した。

C. 研究結果

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

E. albertii を接種した条件では、中菌数接種のキャベツ 2 検体を除いた全検体がリアルタイム PCR 法陽性であった。同 2 検体の IC の Ct 値は 39-41 であった。また、*E. albertii* を非接種の条件では、トウフ 2 検体およびモヤシ 3 検体を除く全検体がリアルタイム PCR 法陰性であった。低菌数接種では、分離陽性率が 0-16.7% であった。高菌数接種では、いずれも分離陽性率 100% であった。接種

菌数が中菌数の場合は、分離陽性率が mEC 培地の RX-DHL で 87.2%、RX-MAC で 82.1%、NmEC 培地の RX-DHL で 92.3%、RX-MAC で 94.9%、薬剤 AB-mEC の RX-DHL で 94.9%、RX-MAC で 92.3%であった。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

E. albertii の検出結果は鶏肉検体においては、低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。モヤシ検体においても、鶏肉検体と同様に低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。各分離培地で釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合(全機関合計)は RX-DHL で 522/581(89.8%)、RX-MAC で 548/615 (89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796(50.8%) であった。リアルタイム PCR 法の検出感度は、鶏肉およびモヤシの両検体の低菌数接種および高菌数接種の両条件で 1.000 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 1.000、DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。鶏肉検体の高菌数接種の検出感度は、分離に用いた 4 種類の全分離培地で

1.000 であった。モヤシ検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.667、RX-MAC で 0.727、DHL で 0.576、MAC で 0.515 であった。モヤシ検体の高菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.970、RX-MAC で 0.939、DHL で 0.879、MAC で 0.848 であった。

統計解析を行った結果、鶏肉検体では方法間に有意な差は認められなかった。一方、モヤシ検体では、分離培養法の DHL および MAC は、リアルタイム PCR 法よりも検出率が有意に低かった。4 種類の培地による分離培養法間を比較した結果、鶏肉検体では、DHL および MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。一方、モヤシ検体では、MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

増菌培養法の検討では、供試した 159 株のうち、mEC、NmEC、薬剤 AB-mEC および薬剤 AB-NmEC 中でそれぞれ 154 株 (96.9%)、127 株 (79.9%)、22 株 (13.8%)、10 株 (6.3%) の増殖が認められた。分離培養法の検討では、CT を添加した培地では、生育良好の株数が少なかった。一方、薬剤 C を添加し

た SMAC では、159 株中 152 株 (95.6%) が生育良好であった。*astA* 保有大腸菌は、コンベンショナル PCR 法およびリアルタイム PCR 法ともに陽性であった。その他の 30 菌株は、コンベンショナル PCR 法陰性であったが、7 株がリアルタイム PCR 法陽性となった。

D. 考察

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

低菌数レベル接種 (6.7-7.6 cfu/25 g) の分離培養法では、36 検体中 4 検体のみが陽性となったため、本菌の分離が難しいことが判明した。一方、高菌数接種 (> 37 cfu/25 g) であれば *E. albertii* が 100% の検体から分離されたため、ほぼ確実に分離可能であることが示された。試験的に様々な条件を検討する場合には、中菌数の接種 (12.3-26.5 cfu/25 g 程度) が適当であることが示された。中菌数接種の条件で 3 種類の増菌培地を比較すると、分離陽性率が mEC で 82% 以上、NmEC と薬剤 AB-mEC で 92% 以上と優れていた。また、RX-DHL および RX-MAC において分離成績に大きな差は認められなかった。RX-MAC には RX-DHL の組成にある白糖が含まれない。

一部の *E. albertii* は白糖分解という報告もあるため、RX-DHL 上で無色コロニーが観察されない場合は、RX-MAC の活用が重要と考えられた。また、検出率は分離培養法よりもリアルタイム PCR 法の方が優れていたため、リアルタイム PCR 法にてスクリーニングし、PCR 陽性検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

キャベツ 9 検体中 2 検体がリアルタイム PCR 法陰性であり、IC の Ct 値も 39-41 と高かったため、供試したキャベツに阻害物質が含まれていた可能性が考えられた。Ct 値が約 40 以上と高い場合や増幅曲線に乱れがある場合は、抽出操作から再度行うことが推奨される。自然汚染の *E. albertii* を検出した可能性は否定できないが、リアルタイム PCR など感度の高い検出系を実施する場合には、試験操作に一層の注意を払う必要がある。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

本コラボレイティブ・スタディの結果、高菌数接種 (88.5 CFU/25g) では、全ての検体および手法で検出感度が高かったことから、80 CFU 以上であれば高率に

*E. albertii*が検出されることが判明した。低菌数接種（17.7 CFU/25g）では、鶏肉検体でリアルタイムPCR法および分離培養法のRX-DHLとRX-MACで1.000であり、分離培養法のDHLで0.970、MACで0.939であった。モヤシ検体ではリアルタイムPCR法で1.000であり、分離培養法では0.515-0.727であった。これらの結果から、約18CFUの菌数レベルであっても鶏肉検体からは高率に検出され、モヤシ検体でも過半数からは検出されることが判明した。リアルタイムPCR法で検出されたが、分離培養法で*E. albertii*が検出されない検体があり、リアルタイムPCR法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示された。リアルタイムPCR法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。また、本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されることが考えられた。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査

法の確立

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通のmEC中での42℃培養が*astA* 保有大腸菌に適していることが判明した。選択分離培養法の検討では、*astA* 保有大腸菌の多くがCTに感受性であった。一方、薬剤Cを添加したSMACでは、159株中152株(95.6%)においては、通常の赤色コロニーを示していたため、本菌の分離培養法として適していると考えられた。

astA 特異的リアルタイムPCR法の検討では、既存のHidakaらによる方法では、非特異的反応が生じることが示された。*astA*の配列には多数の遺伝子多型（バリエーション）が報告されているため（Silva et al., 2014）、これらバリエーションを網羅する新しい*astA* 特異的リアルタイムPCR法の開発が求められている。また、過去には*astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されることが報告されている（濱崎ら，平成20年度）。このため、*astA* 保有大腸菌が共通して保有するその他の遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法の開発も必要であることが予想される。今後、本研究課題の他研究分担者の研究結果も参考に、新規の遺伝子検出法について考察する必要がある

ある。

E. 結論

*E. albertii*について、食品での検査法の基礎検討を行った結果、接種菌数および増菌培地の種類に関わらず、*E. albertii*特異的リアルタイム PCR 法ではほぼ全ての *E. albertii* 接種検体が検出され、本リアルタイム PCR が優れることが示された。ただし、一部で PCR 陰性が認められたことから、食品による阻害についてはさらに検討する必要性が考えられた。汚染レベル 12.3 cfu/25 g 以上では、mEC、NmEC、または薬剤 AB-mEC 培地にて増菌培養し、RX-DHL または RX-MAC にて分離培養する条件では、8 割以上の検体で *E. albertii* が分離されたことから、これらの優れた培地から選定して、多試験研究機関によるコラボレイティブ・スタディが実施された。その結果、リアルタイム PCR 法は、分離培養法と同等またはそれよりも優れており、分離培養法のなかではラムノースおよびキシロースを添加した分離培地が添加しないものよりも優れていた。本コラボレイティブ・スタディで実施したこれらの手法は、食品での *E. albertii* 検査法として優れた方法であると考えられる。また、

astA 保有大腸菌の食品検査法の確立については、腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC を用いた 42℃ 培養）および薬剤 C 添加 SMAC での分離培養が有用であることが明らかになった。また、既存の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法では非特異的反応が生じることから、*astA* のバリエーションも考慮した方法を新規に開発する必要と考えられた。また、*astA* 以外の遺伝子を標的とした遺伝子検出法についても検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（誌上発表）

Nguyen, T.K., Bui, H.T., Truong, T.A., Lam, D.N., Ikeuchi, S., Ly, L.K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*. Mar 2;341, 109049, 2021.

Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in

- retail fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 62(3), 94-99, 2021.
- Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. *Journal of food protection* 85(1), 173-179, 2022.
- Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. (投稿中)
- Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. (投稿中)
- (学会等発表)
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii*特異的リアルタイムPCR法の開発と鶏の保菌状況調査. 第164回日本獣医学会学術集会. 令和3年9月7-13日. オンデマンド
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子. *Escherichia albertii* 特異的リアルタイムPCR法の開発と市販鶏肉の汚染実態調査. 第42回日本食品微生物学会学術総会. 令和3年9月21日-10月20日. オンデマンド
- 廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、小椋容子、工藤由起子. *Escherichia albertii* に適する選択増菌培地の開発. 第117回日本食品衛生学会学術講演会. 令和3年10月26日-11月9日. オンライン
- 新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第117回日本食品衛生学会学術講演会. 令和3年10月26日-11月9日. オンライン
- 新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子. 市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第94回日本細菌学会総

会．令和 3 年 3 月 29-31 日．オン
デマンド

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品での *Escherichia albertii* 検査法の基礎検討

研究要旨

日本では、*Escherichia albertii*による集団食中毒事例の発生が多数報告されているが、原因食品が特定された事例はわずかしか報告されていない。このため、原因食品特定に対応する食品中の *E. albertii*を迅速かつ高感度に検出する遺伝子検査法および *E. albertii*を効率的に分離するための培養法の確立を目的に、多種類の食品を用いて検討した。その結果、接種菌数に関わらず、リアルタイム PCR 法ではほぼ全ての *E. albertii*接種検体が PCR 陽性であった。また、12.3 cfu 以上を 25 g の食品に接種し、mEC、NmEC、または薬剤 AB を添加した mEC にて増菌培養後に RX-DHL または RX-MAC にて分離培養する条件では、8 割以上の検体で *E. albertii*が分離された。本研究にて実施した一連の試験法について、今後の食中毒事例検査や汚染実態調査などでの利用が期待される。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

(公社) 日本食品衛生協会

甲斐明美

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

日本において大腸菌近縁の

*Escherichia albertii*による食中

毒が発生しているが、原因食品が

特定された事例は少ない（大岡，日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。このため、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法を確立することが求められている。

平成 30 年度から令和 2 年度に実施した厚生労働科学研究費補助金による研究「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」の分担研究「*E. albertii* の制御法の確立」において、*E. albertii* を食品から効率よく検出することを目的とした遺伝子検出法、増菌培養法および分離培養法を決定した。その際に条件検討に使用していた食品は、過去に *E. albertii* 汚染が報告されていた鶏肉が主であり、接種菌数などの条件も限定的であった。そこで、開発した方法について多様な食品への応用性を評価するために、3 試験機関にて各種試験条件を設定し検討した。

B. 研究方法

本試験では、8 種類の食品を対象に *E. albertii* の 3 種類の接種菌数レベルを設定した。菌を接種した食品を 3 種類の増菌培地中で培養し、その培養液をリアルタイム PCR 法および 2 種類の分離培地を用いた分離培養法に供試し、*E.*

albertii の検出性を検討した（図 1）。

（1）菌株

食中毒事例由来株である *E. albertii* EA12 および EA21 の 2 株を供試した。

（2）食品検体

食肉として鶏肉および豚肉、野菜としてキュウリ、モヤシ、キャベツ、海産物としてカキ、ワカメ、その他食品としてトウフを供試した。食品検体の一般生菌数、大腸菌数および大腸菌群数を計測するために、食品検体 10 g をストマッカー袋に秤量し、滅菌リン酸緩衝食塩水（滅菌 PBS）90 mL を加え 1 分間ストマッカー処理した乳剤（ 10^{-1} 希釈液）を PBS 9 mL で 10 倍希釈して 10^{-2} ～ 10^{-6} 希釈液を調製した。各希釈液 0.1 mL を標準寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、48 時間培養した。同時に各希釈液 0.1 mL を XM-G 寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～22 時間培養した。培養後の XM-G 寒天培地の青（青～青紫）および赤（ピンク～赤紫）コロニー数を計測し、それぞれ検体 1 g あたりの大腸菌数および大腸菌群数を算出した。また、標準寒天培地のコロニー数を計測し、検体 1 g あたりの生菌数を算出した。

（3）接種菌液の調製

まず、各試験研究機関において接種菌数の再現性を確認した。カジトン培地に保存された *E. albertii* 菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。増菌培養液を滅菌 PBS にて 10^{-1} から 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、 10^{-7} 希釈液 0.1 mL を 10 枚の Tryptic soy agar (TSA) に塗抹し、37°C にて 18~24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。この作業を繰り返し実施し、TSB 中にて 18 時間培養した場合の cfu を計算し、接種菌液調製のための希釈倍率を試験機関ごとに決定した。

添加回収試験では、カジトン培地に保存された *E. albertii* 菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。低菌数接種として 7 cfu/25 g、中菌数接種として 14 cfu/25 g、高菌数接種として 30 cfu/25 g となるように希釈菌液を調製した。接種菌数測定のために、各接種菌液 0.1 mL を 10 枚の TSA に塗抹し、37°C にて 18~24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。

(4) 食品への *E. albertii* 接種

食品検体 25 g をストマッカー袋に入れ、各接種菌数レベル用希釈

菌液 0.1 mL を接種した。食品検体への接種は、各接種菌数レベルごとに 1 食品につき 3 袋 (=3 検体) 用意した。

菌を接種した後、ストマッカー袋の外側から手でなじませ、modified EC 培地 (mEC、日水製薬)、ノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) または薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC) 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 22 時間培養した。それぞれの試験において、各増菌培養液につき 1 検体の菌非接種の検体も同時に培養した。培養液は、試験終了まで冷蔵保管した。

(5) 培養液の DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法

各増菌培養液 0.1 mL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。

この培養液から抽出した DNA に対して *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。*E. albertii* を標的としたプローブは FAM-BHQ、インターナルコントロール (IC) の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプローブは HEX-BHQ で標識した。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて

調製した DNA 溶液を 5 μ L 加えた。培養液のリアルタイム PCR 法では、1 検体につき 2 反応実施した。機器はサーモフィッシャーサイエンティフィックの Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム、QuantStudio 3 リアルタイム PCR システムまたは QuantStudio 5 リアルタイム PCR システムを使用した。50 $^{\circ}$ C 2 分および 95 $^{\circ}$ C 10 分の熱変性ののち、95 $^{\circ}$ C 15 秒 - 60 $^{\circ}$ C 1 分を 45 サイクル繰り返し増幅反応させた。

(6) 分離培養

分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL、日水製薬) およびマッコンキー寒天培地 (MAC、Difco) を基本としてそれぞれに 1%ラムノースおよび 1%キシロースを添加した培地 (RX-DHL、RX-MAC) を用いた。(4) の検体培養液を各 2 枚の RX-DHL および RX-MAC に画線し、37 $^{\circ}$ C にて 22~24 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、各培地あたり陽性と疑われるコロニー 3 個を RX-DHL に単離し、37 $^{\circ}$ C にて 22~24 時間培養した。生育したコロニーの色に関わらず、コロニーから DNA を熱抽出した。疑われるコロニーが 3 個得られなかった場合には、冷蔵保管している増菌培養液を使用して再度 RX-DHL への画線を行い、

同様にコロニーからの DNA 抽出までの作業を行った。なお、一部の検体は分離培養法の検討には供試しなかった。

(7) コロニーのリアルタイム PCR 法

(5) と同様に実施した。なお、1 コロニーにつき 1 反応とした。

C. 研究結果

(1) 食品中の菌数および接種菌数

本試験にて供試した 8 種類の食品において、生菌数はモヤシで最も高く 7.3 log cfu/g であった (表 1)。鶏肉、キュウリ、カキ、キャベツおよび豚肉の生菌数は、4.0 log cfu/g 以上であった。また、トウフおよびワカメでは生菌数が検出限界以下であった (< 2 log cfu/g)。

大腸菌群数はモヤシで最も高く 7.3 log cfu/g であった。鶏肉、豚肉、一部のキュウリ、2 回目のトウフでも大腸菌群数が検出された。また、カキ、キャベツ、トウフ 1 回目およびワカメでは大腸菌群数が検出現界以下であった。大腸菌は、鶏肉およびキュウリ検体の一部でのみ検出された。

食品に接種した *E. albertii* 菌数は、低菌数接種で 6.7-7.6

cfu/25 g、中菌数接種で 12.3-26.5 cfu/25 g、高菌数接種で 37.0-76.3 cfu/25 g であった（表 2）。

（2）培養液のリアルタイム PCR 法

E. albertii を接種した条件では、低菌数接種の鶏肉 36 検体、中菌数接種の鶏肉 27 検体、キュウリ 27 検体、カキ 18 検体、トウモロコシ 18 検体、モヤシ 9 検体、豚肉 9 検体、ワカメ 18 検体および高菌数接種の鶏肉 27 検体、キュウリ 9 検体は全て *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陽性であった（表 2）。一方、中菌数接種のキャベツは 11 検体中 2 検体がリアルタイム PCR 法陰性であった。同 2 検体の IC の Ct 値は 39-41 であった。また、*E. albertii* を非接種の条件では、鶏肉 12 検体、キュウリ 9 検体、カキ 3 検体、キャベツ 3 検体、豚肉 3 検体、ワカメ 3 検体が全て *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陰性であった。一方、*E. albertii* を非接種のトウモロコシ 6 検体中 2 検体およびモヤシ 3 検体中 3 検体が本リアルタイム PCR 法陽性であった。なお、同時に測定した IC は、本試験に供試した全 251 検体で増幅（Ct 値：13-41）が認められた。

（3）分離培養法

鶏肉でのみ試験された低菌数接種では、分離陽性率が 3 種類の増

菌培地で 0-16.7% であり、いずれも低かった（表 3）。接種菌数が高菌数の場合はいずれも分離陽性率 100% であり、増菌培地または分離培地による差は認められなかった。接種菌数が中菌数の場合は、mEC 培地の RX-DHL で 87.2%、RX-MAC で 82.1%、NmEC 培地の RX-DHL で 92.3%、RX-MAC で 94.9%、薬剤 AB-mEC の RX-DHL で 94.9%、RX-MAC で 92.3% であった（表 3）。

D. 考察

食品別に結果を比較した場合、中菌数接種したキャベツ 9 検体中 2 検体が *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陰性であった（表 2）。この 2 検体に関しては、IC の Ct 値も 39-41 と高かったため、供試したキャベツに PCR 阻害物質が含まれていた可能性および供試したキャベツに細菌の増殖を抑制する成分が含まれていた可能性の 2 つの可能性が考えられた。食中毒事例の検査現場においても、阻害物質が含まれる食品を扱う可能性が考えられるが、どの食品に阻害物質が含まれるのかを事前に把握することは難しいため、IC の Ct 値が高く PCR が阻害されている可能性が考えられる場合には、複数の DNA 抽出法を試すことが有効な方

法と考えられた。

低菌数接種の分離培養法では、3種類の増菌培地を総合しても36検体中4検体のみが陽性となった(表3)。そのため、本試験で利用した一連試験法では、*E. albertii* 6.7-7.6 cfu/25 g程度の接種菌数では本菌の分離が難しいことが判明した。一方、高菌数接種であれば *E. albertii* が100%の検体から分離されたことから、37 cfu/25 g以上の接種菌数では本試験で利用した一連試験法でほぼ確実に分離可能であることが示された。試験的に様々な条件を検討する場合には、低菌数接種や高菌数接種では結果に差がないため、中菌数の接種(12.3-26.5 cfu/25 g程度)が適当であることが示された。

増菌培地については、中菌数接種の条件において試験した3種類の増菌培地の結果を比較すると、mECにて増菌培養した条件で分離陽性率が82%以上と優れていたが、NmECと薬剤AB-mECでは92%以上とさらに優れていた(表3)。NmECと薬剤AB-mECの間には分離陽性率に大きな差は認められなかった。分離培地はラムノースとキシロースを添加したRX-DHLおよびRX-MACを利用したが、2種類の培地において分離成績に大きな差は認められ

なかった。この2種類の分離培地の違いとしては、RX-DHLには乳糖および白糖が含まれる一方でRX-MACには乳糖のみ含まれる。*E. albertii*はその多くが乳糖および白糖の両方が非分解であるが、一部白糖分解の株も報告されている。そのため、RX-DHLを用いて試験した場合に無色コロニーが全く観察されない際には、RX-MACも用いて検査することが重要と考えられた。

E. albertii 特異的リアルタイムPCR法と分離培養法を比較すると、リアルタイムPCR法の方が検出率が優れており、分離陰性であった検体であってもリアルタイムPCR法は全て陽性であった。特に、鶏肉のみ試験した低菌数接種であっても、全検体がリアルタイムPCR法で陽性であった。そのため、リアルタイムPCR法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

培養液由来の夾雑物によるリアルタイムPCRの増幅効率への影響もあるため、Ct値が約40以上など大きい値の場合や増幅曲線に乱れがある場合は、抽出操作から再度行うことが推奨される。自然汚染の*E. albertii*を検出した可能性は否定できないが、リアルタイム

PCR など感度の高い検出系を実施する場合には、試験操作に一層の注意を払う必要がある。

E. 結論

接種菌数に関わらず、リアルタイム PCR 法ではほぼ全ての *E. albertii* 接種検体が検出された。ただし、今回供試した 8 食品の 1 つであるキャベツでは、中菌数接種検体の一部で PCR 陰性が認められたことから、食品による阻害についてはさらに検討する必要がある。

本試験にて検討した 12.3 cfu/25 g 以上を食品に接種し、mEC、NmEC、または薬剤 AB-mEC 培地にて増菌培養し、RX-DHL または RX-MAC にて分離培養する条件では、8 割以上の検体で *E. albertii* が分離された。本試験にて検討した各種条件については、さらに多機関にて検討を重ね、食品における *E. albertii* 検出法として今後提案したい。また、一連の試験法について、今後の食中毒事例検査や汚染実態調査などでの利用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Nguyen, T.K., Bui, H.T., Truong, T.A., Lam, D.N., Ikeuchi, S., Ly, L.K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*. Mar 2;341, 109049, 2021.

Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. (投稿中)

(学会等発表)

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii* 特異的リアルタイム PCR 法の開発と鶏の保菌状況調査. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 令和 3 年 9 月 7-13 日. オンデマンド

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 市販カキにおける *Escherichia*

albertii 汚染実態調査. 第 117 回
日本食品衛生学会学術講演会. 令
和 3 年 10 月 26 日-11 月 9 日. オ
ンライン

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

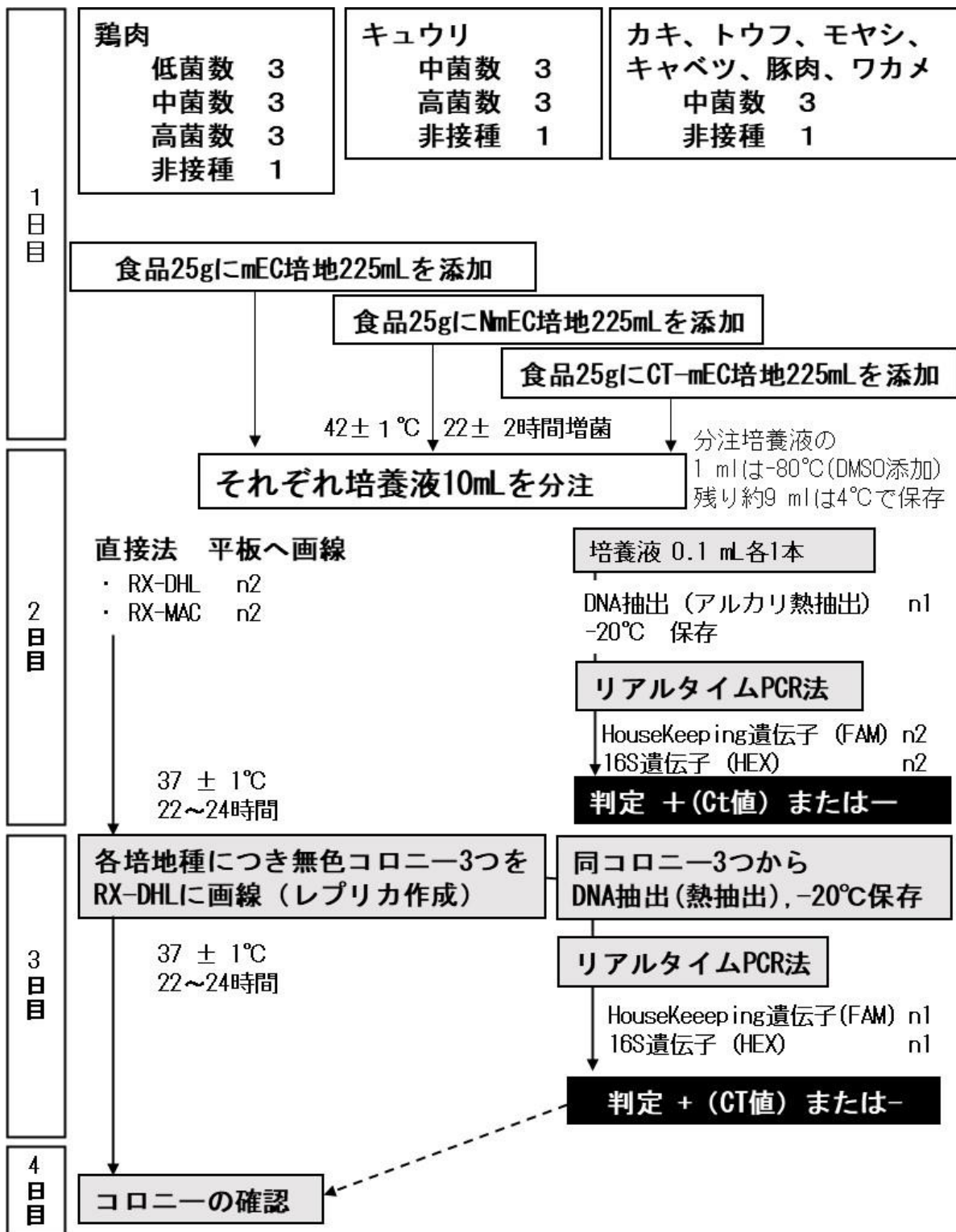


図1. *Escherichia albertii* 添加回収試験のフロー図

表 1. 供試食品における菌数

| グループ | 食品 | 菌数 (log cfu/g) | | |
|------|------|----------------|---------|---------|
| | | 生菌 | 大腸菌群 | 大腸菌 |
| 食肉 | 鶏肉 | 4.7-6.3 | 3.9-5.0 | 1.7-3.8 |
| | 豚肉 | 4.1 | 4.0 | < 1.7 |
| 野菜 | キュウリ | 5.8-6.2 | < 2-3.8 | <2-2.2 |
| | モヤシ | 7.3 | 7.3 | < 2 |
| | キャベツ | 4.2 | < 1.7 | < 1.7 |
| 海産物 | カキ | 5.3 | < 2 | < 2 |
| | ワカメ | < 2 | < 2 | < 2 |
| その他 | トウフ | <2, 4.6 | <2, 3.0 | <2 |

表 2. 各種食品の各種接種菌数におけるリアルタイム PCR 法と分離培養法の結果

| 食品 | 接種菌数 (cfu/25 g) | リアルタイム PCR 法* | | | |
|--------|-----------------|--------------------|-------|-------|-------|
| | | <i>E. albertii</i> | | IC | |
| | | 判定** | Ct 値 | 判定 | Ct 値 |
| 鶏肉 | 低菌数 (6.7-7.6) | 36/36 | 22-34 | 36/36 | 16-19 |
| | 中菌数 (12.5-26.5) | 27/27 | 19-30 | 27/27 | 15-16 |
| | 高菌数 (37.0-76.3) | 27/27 | 20-29 | 27/27 | 14-17 |
| | 接種：小計 | 90/90 | | 90/90 | |
| | 非接種 | 0/12 | | 12/12 | 15-17 |
| キュウリ | 中菌数 (10.7-20.0) | 27/27 | 19-38 | 27/27 | 15-24 |
| | 高菌数 (76.3) | 9/9 | 20-21 | 9/9 | 15-18 |
| | 接種：小計 | 36/36 | | 36/36 | |
| | 非接種 | 0/9 | | 9/9 | 15-19 |
| カキ | 中菌数 (11.7-13.8) | 18/18 | 20-24 | 18/18 | 16-20 |
| | 非接種 | 0/3 | | 3/3 | 16-34 |
| トウモロコシ | 中菌数 (15.6-22.3) | 18/18 | 18-21 | 18/18 | 13-19 |
| | 非接種 | 2/6 | | 6/6 | 13-36 |
| モヤシ | 中菌数 (22.3) | 9/9 | 20-26 | 9/9 | 16-17 |
| | 非接種 | 3/3 | | 3/3 | 16-17 |
| キャベツ | 中菌数 (10.7-12.7) | 9/11 | 16-33 | 11/11 | 14-41 |
| | 非接種 | 0/3 | | 3/3 | 39-40 |
| 豚肉 | 中菌数 (26.5) | 9/9 | 18 | 9/9 | 15-16 |
| | 非接種 | 0/3 | | 3/3 | 15-17 |
| ワカメ | 中菌数 (12.3-18.0) | 18/18 | 16-18 | 18/18 | 14-17 |
| | 非接種 | 0/3 | | 3/3 | 37-40 |
| 接種：合計 | | 207/209 | | | |
| 非接種：合計 | | 5/42 | | | |

* 2 株 (EA12、EA21) および 3 種類の増菌培地 (mEC、NmEC、CT-mEC) の合計

** 陽性検体数/供試検体数

| 増菌培地 | 接種菌数レベル* | 食品 | リアルタイムPCR陽性率** (%) | 分離率*** (%) | |
|----------|----------|---------------------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| | | | | RX-DHL | RX-MAC |
| mEC | 低 | 鶏肉 | 12/12 (100) | 0/6 (0) | 0/6 (0) |
| | 中 | 鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ | 45/45 (100) | 34/39 (87.2) | 32/39 (82.1) |
| | 高 | 鶏肉, キュウリ | 12/12 (100) | 6/6 (100) | 6/6 (100) |
| NmEC | 低 | 鶏肉 | 12/12 (100) | 1/6 (16.7) | 1/6 (16.7) |
| | 中 | 鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ | 45/45 (100) | 36/39 (92.3) | 37/39 (94.9) |
| | 高 | 鶏肉, キュウリ | 12/12 (100) | 6/6 (100) | 6/6 (100) |
| | 低 | 鶏肉 | 12/12 (100) | 1/6 (16.7) | 1/6 (16.7) |
| 薬剤AB-mEC | 中 | 鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ | 45/47 (95.7) | 37/39 (94.9) | 36/39 (92.3) |
| | 高 | 鶏肉, キュウリ | 12/12 (100) | 6/6 (100) | 6/6 (100) |

*低は約7 cfu/25 g、中は約11-27 cfu/25 g、高は約37-76 cfu/25 g

**リアルタイムPCR陽性検体数/供試検体数

***分離陽性検体数/供試検体数

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品での *Escherichia albertii* 検査法のコロボレイティブ・スタディによる評価

研究要旨

Escherichia albertii の食品での検査法を確立するために、11 試験研究機関の参加のもとコロボレイティブ・スタディを実施した。*E. albertii* 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) では、鶏肉およびモヤシ検体にかかわらず、また高菌数接種 (88.5 CFU/25g) および低菌数接種 (17.7 CFU/25g) にかかわらず菌接種検体の全てが陽性であった。分離培養法では、高菌数接種の鶏肉検体においては、いずれの分離培地でも全検体から接種菌が分離され、モヤシ検体においても 8 割を超える検体から接種菌が分離された。低菌数接種の鶏肉検体においては、RX-DHL および RX-MAC では全検体から、その他の培地では 9 割以上の検体から接種菌が分離され、モヤシ検体においては、5-7 割の検体から接種菌が分離された。これらのことから、菌数が 1 検体当たり約 18 CFU の汚染レベルでは鶏肉検体で 9 割以上、モヤシ検体で 5 から 7 割、80 CFU 以上の汚染レベルではほとんどの検体から分離されることが示された。また、*E. albertii* 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) では、分離培養法よりも概ね検出率が高い結果が得られ、スクリーニング法として優れていることが示された。さらに、実検体で遺伝子検出で陽性になった場合には、分離平板培地から釣菌するコロニー数を増やすことによって検出率を向上させることが重要であると考えられる。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

| | |
|---------------|------------|
| 岩手県環境保健研究センター | 山中拓哉 |
| 宮城県保健環境センター | 佐藤千鶴子、山谷聡子 |
| 秋田県健康環境センター | 今野貴之 |
| 宇都宮市衛生環境試験所 | 床井由紀 |
| 山梨県衛生環境研究所 | 柳本恵太 |
| 三重県保健環境研究所 | 小林章人 |
| 川崎市健康安全研究所 | 小嶋由香 |
| 静岡市環境保健研究所 | 高橋直人 |
| 福岡市保健環境研究所 | 松永典久 |
| (公社)日本食品衛生協会 | 甲斐明美 |
| 国立医薬品食品衛生研究所 | 新井沙倉、廣瀬昌平 |

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生病リスクが懸念されている。既に日本では2003年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数200人以上の事例も報告されている。しかし、本菌の主要な汚染食品や汚染環境、また、本菌の発症菌量の一部を除いて不明であり解明が求められている。このため、汚染食品の調査や汚染制御を行う必要があるが、*E. albertii* の食品での検査法は日本および米国やEUなど諸外国でも策定されていない。病原大腸菌の一種で最も重篤化する腸管出血性大腸菌では、日本および諸外国において検査法が設定されてお

り、腸管出血性大腸菌の重要な病原因子である Vero toxin (VT) 遺伝子 (または志賀毒素遺伝子、*stx*) の有無を食品培養液から検出することによって腸管出血性大腸菌の汚染の有無のスクリーニングが行われている。これらの方法を参考にし、*E. albertii* の食品での検査法を確立するために各種方法の検討を行い、優れた方法を組み合わせ多機関によるコラボレイティブ・スタディを実施し評価することとした。*E. albertii* の主要な O 血清型に関するデータが少ないため、本コラボレイティブ・スタディ参加の複数機関と先行研究を実施し、ヒト由来 *E. albertii* 株2株を用いて添加剤 AB 加 mEC 培地中で 42℃ にて良好に増殖することを確

認した。また、食肉や海産物などの複数の食品についても検討し、本コラボレイティブ・スタディでは、*E. albertii* による汚染が報告されている鶏肉を選定した。また、野菜が原因と推定される集団食中毒事例の報告があることから、より夾雑菌が多く *E. albertii* の分離が難しいと推定されるモヤシを選定した。

B. 研究方法

(1) コラボレイティブ・スタディの概要

1. 参加機関数：11 試験検査機関

岩手県環境保健研究センター、秋田県健康環境センター、宮城県保健環境センター、宇都宮市衛生環境試験所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、山梨県衛生環境研究所、三重県保健環境研究所、川崎市健康安全研究所、静岡市環境保健研究所、福岡市環境保健環境研究所

2. 実施回数：1回

令和3年12月6日月曜日検体着

3. 試験食品検体：鶏肉、モヤシ

1 機関につき、鶏肉 9 検体（高菌数接種 3 検体、低菌数接

種 3 検体、非接種 3 検体）、モヤシ 9 検体（高菌数接種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体）、鶏肉の陽性 1 検体の計 19 検体とした。

4. 機器、試薬および事前準備等

1) 機器

- ・恒温器 (42±1℃、37±1℃)
- ・ABI リアルタイム PCR (機種 ABI PRISM 7500、7500fast、QuantStudio 3 または QuantStudio 5)

機器設定：*E. albertii* を標的とした FAM-BHQ ラベルについては「FAM-none」、インターナルコントロール (IC) の 16S rRNA 遺伝子を標的とした HEX-BHQ ラベルについては「VIC-none」に設定した。7500fast を使用時は standard chemistry に設定した。なお、Ct 値はオート設定で解析した。

2) 試薬

Modified EC 培地 (mEC; 日水製薬)、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 培地 (DHL; 日水製薬)、MacConkey 培地 (MAC; Difco)、mEC 用添加剤 AB 水溶液、キシロース (富士フィルム和光純薬)、ラムノース (富士フィルム和光純薬)、

アルカリ熱抽出用試薬、リアルタイム PCR 用試薬、熱抽出用試薬

3) 陽性用検体の準備

陽性用検体には、コラボレイティブ・スタディに使用する *E. albertii* 株を試験用接種検体よりも高い菌数レベルに設定して接種した(約 2.5×10^3 CFU/25 g)。

(2) コラボレイティブ・スタディ用検体の作製

1. 検体

国立衛研にて市販の鶏もも肉(国産)およびモヤシ(国産)を購入し、事前に *E. albertii* 陰性であることを確認し、検体として使用した。

食品を冷蔵保存し、検体が試験に使用される日に標準寒天培地にて一般生菌数を、XM-G 培地にて大腸菌群数、大腸菌数を測定した。1 食品あたり、高菌数接種用検体 33 検体、低菌数接種用検体 33 検体、非接種用検体 33 検体(計 99 検体)、すなわち 2 食品あたり計 198 検体、加えて、陽性用検体 11 検体(鶏肉のみ設定)を準備(計 209 検体)した。

2. 接種菌液の調製

室温下でカジトン培地に保

存した菌株を TSB 10 mL に 1 白金耳植菌し、37°C で 18 時間培養した。培養液に 9 倍量の PBS を加えて 1 分間混和した。同様に 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、これを接種菌液とした。

3. 検体の調製

ストマッカー袋に検体を 25 g 量り採り、菌非接種の検体については空気を抜いてストマッカー袋上部をヒートシールした。低菌数検体(約 15-20 CFU/25 g 予定)には接種菌液を 0.1 mL、高菌数検体(約 75-100 CFU/25 g 予定)には同菌液を 0.5 mL、陽性用検体には 10^{-5} 希釈液 0.145 mL を接種し(2.5×10^3 CFU/25 g)、空気を抜いて上部をヒートシールした。接種菌数を確認するために、接種菌液を Tryptic soy 寒天培地(TSA) 72 枚に 0.1 mL ずつ塗抹し、37°C で 24 時間培養した。

4. 検体の送付

検体 19 袋の間に小型温度記録計(サーモマネジャー)を挟んでバイオセーフティー対応 2 次容器(バイオセーフティーバッグ)に入れ、2 次容器と 3 次容器の間に保冷剤を 3 個入れた。また、保冷剤が検体に直接触れないように梱包剤を入れた。こ

れらをジュラルミンケースに入れてゆうパック（冷蔵）にて送付した。

（3）コラボレイティブ・スタディの試験実施手順（図1）

1日目

検体を添付の小型温度記録計とともに取り扱い、発送から増菌培養終了まで検体の置かれた環境温度を記録した。

検体入りのストマッカー袋にあらかじめ室温（20℃位）以上に温めた添加剤 AB 加 mEC 培地 225 mL を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、42±1℃、22±2 時間培養した。

2日目

一部の培養液をリアルタイム PCR 法および分離培養法用に測り取った。残りは冷蔵保管し、当日使用の予備とした。小型温度記録計はこの段階で室温に置き、容器返送時に返送した。

1. 分離培養法

培養液 10 μL ずつを各分離培地（1%ラムノースおよび 1%キシロース添加 DHL;RX-DHL、1%ラムノースおよび 1%キシロース添加 MAC;RX-MAC、DHL、MAC）2 枚に接種し画線した。この際、コロニーが多く出現するように画線した。その後、37±1℃

にて 22～24 時間培養した。

2. DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法（*E. albertii* および IC を検出）

培養液 0.1 mL をマイクロチューブに移し、アルカリ熱抽出法にて DNA を抽出した。リアルタイム PCR に使用後、残ったアルカリ熱抽出物を -20℃にて保存した。

[*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）]

反応試薬組成は以下の計 25 μL とし、DNA 抽出液 5 μL を加えた。

・ 2 × Master Mix (Environmental Mastermix) 12.5 μL

・ プライマー EA_rtF2 (10 μM)、EA_rtR2 (10 μM) 各 0.9 μL

16SRna-F (9.6 μM)、16SRna-R (9.6 μM) 各 0.5 μL

・ プローブ EA_rtP2 (5 μM) FAM-BHQ1 ラベルを 0.9 μL

16SrRNA-P (5 μM) HEX-BHQ1 ラベル 0.6 μL

・ D.W. 5.7 μl

反応条件: 50℃ 2 分、95℃ 10 分とし、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 45 サイクル

判定：リアルタイム PCR の解析を行い、Ct 値が得られている場合を陽性とした。

1 検体につき 2 反応を行った。反応時にはアルカリ熱抽出物の代わりに滅菌蒸留水などを用いて陰性コントロールを設定した。Positive control は、ポジコン DNA 抽出物 (*E. albertii* EA21 由来) を使用した。

3 日目

1. 分離菌の確認

平板を観察し、各平板種類 (2 枚) ごとに疑われるコロニー最大 5 個を釣菌した。

E. albertii は、DHL、RX-DHL、MAC および RX-MAC 上で無色透明のコロニーを形成し、コロニー周辺の培地の色が透明になる場合が多いが、コロニー中心が赤や茶に発色するものは *E. albertii* ではない場合が多いため注意を払った。

室温または冷蔵保管中にコロニーが赤色化して判別しにくくなるため、培養終了後、速やかにコロニーを確認し、釣菌するコロニーに印をつけた。それらコロニーを RX-DHL に継代 (隣接するコロニーと混ぜられている場合は画線し単離

する) し、 37 ± 1 °C にて 22 ~ 24 時間培養した。

4 日目

1. 分離菌の確認

継代したコロニーの色を 22 ~ 24 時間培養後速やかに確認した。無色透明コロニーとそれ以外の色のコロニーについて数を結果記入表に記入した *E. albertii* と思われるコロニーについてのみ、熱抽出法にて DNA を抽出した。

2. リアルタイム PCR (*E. albertii* および IC を検出)

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) は、「2. DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法 (*E. albertii* および IC を検出)」に従って実施した。ただし、1 検体につき 1 反応を行った。

3. 試験結果報告と解析

結果表に記入した試験結果およびリアルタイム PCR (スクリーニングのみ) のランファイル (sds 形式または eds 形式) を、事務連絡担当者にメールにて返送した。また、検体に添付された小型温度記録計および検体送付容器 (梱包付属品も含む) を試験終了後、返送した。

国立衛研にて試験結果を集計後、Outlier 機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。いずれの検定においても、一元配置分散分析を行い、事後解析として、多重比較である Tukey-Kramer 法で解析を行った。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。

C. 研究結果

(1) 検体

供試した検体の一般生菌数は、鶏肉で 1.8×10^4 CFU/g、モヤシでは 6.9×10^7 CFU/g であった。大腸菌群数は、鶏肉で 3.4×10^3 CFU/g、モヤシでは 1.2×10^7 CFU/g であった。大腸菌は、鶏肉 3.0×10^2 CFU/g、モヤシでは検出されなかった (< 100 CFU/g)。

検体への接種菌液の菌数測定のために低菌数用菌液を TSA に塗抹した結果、低菌数接種では 17.7 (6-73) CFU/25 g であった。この 5 倍量を高菌数用菌液としたことから、高菌数接種では 88.5 CFU/25 g であった。

(2) 検体の輸送および増菌培養での温度

全機関について梱包後に温度は速やかに 10°C 程度に下がり、その後徐々に低下し、輸送時の温度は

ほぼ -2.5°C から 1.5°C に保たれて各機関に配送された。到着後、梱包されたまま試験開始まで保管され、梱包から約 32 時間後までに開梱し増菌培養に供された。増菌温度は全機関でおよそ 41°C から 44°C であった。

(3) 陽性用検体への菌の接種

陽性用検体(鶏肉)の接種菌数は検体あたり 2.6×10^3 CFU/25 g であった。いずれの機関においても、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)と分離培養法のいずれの培地においても陽性であった。

(4) *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)での検出結果

E. albertii の検出結果は(表 1)、鶏肉検体においては、低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。それらの Ct 値は、低菌数接種で約 17~25、高菌数接種で 16~21 であった。菌非接種では、2 機関で 3 検体中 1 検体が陽性 (Ct 値は約 20~40)、その他の機関では全検体が陰性であった。また、全機関とも陽性用検体は陽性であり、Ct 値は約 16~17 であった。モヤシ検体においても、鶏肉検体と同様に低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。

それらの Ct 値は、低菌数接種で約 19～34、高菌数接種で 18～30 であった。菌非接種では、1 機関で 3 検体中 2 検体が陽性 (Ct 値は約 40～41)、その他の機関では全検体が陰性であった。なお、同時に測定した IC は、全機関で全検体とも陽性であった。

(5) 各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニーの分離

4 種類の分離培地 (ラムノースおよびキシロース添加 DHL ; RX-DHL、ラムノースおよびキシロース添加 MAC ; RX-MAC、DHL、MAC) 上のコロニーを観察し、各培地につき最大 5 コロニーの *E. albertii* 様無色コロニーを釣菌した。

各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニーが分離された検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種および高菌数接種のいずれでも 11 機関の 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニーが認められた検体数は 0 から 3 までばらつきが認められた。モヤシ検体の低菌数接種では、5 機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であり、その他 6 機関はいずれかの分

離培地で陰性が認められた。モヤシ検体の高菌数接種では、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となったのは 9 機関あり、その他 2 機関はいずれかの分離培地で陰性が認められた。モヤシ検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニーが認められた検体数は 0 から 3 までばらつきが認められた。

各分離培地での *E. albertii* 様無色コロニー数 (3 検体合計) を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 9 機関が 4 種類の全分離培地のいずれにおいても合計 15 コロニー、2 機関では分離培地の一部で 10 から 15 コロニーであった。鶏肉検体の高菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 8 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、3 機関では分離培地の一部で 12 から 14 コロニーであった。鶏肉検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニー数の合計が 0 から 15 までばらつきが認められた。モヤシ検体の低菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 5 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、6 機関で

は分離培地の一部で 0 から 15 コロニーであった。特に、RX-DHL および RX-MAC で各 1 機関で *E. albertii* 様無色コロニーが生育していなかった。モヤシ検体の高菌数接種では、*E. albertii* 様無色コロニーの集計数は 7 機関が 4 種類の全分離培地で合計 15 コロニー、4 機関では分離培地の一部で 2 から 15 コロニーであった。モヤシ検体の非接種では、各機関や分離培地によって *E. albertii* 様無色コロニー数の合計が 0 から 15 までばらつきが認められた。

(6) 分離培地から RX-DHL に継代したコロニーの色による判定

(5) で釣菌した分離培地上の *E. albertii* 様無色コロニー (最大 5 コロニー) を RX-DHL へ継代し培養した際の生育コロニーの色を判定した。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーが *E. albertii* 様無色コロニーであった検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、11 機関中 10 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体、1 機関の DHL では 3 検体中 2 検体、MAC では 3 検体中 1 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の高菌数接種では、全機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検

体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性であった。鶏肉検体の非接種では、全ての *E. albertii* 様無色コロニーが継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーではなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、3 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体で *E. albertii* 様無色コロニー陽性であり、その他の機関はいずれかの条件かで陰性が認められた。特に、RX-DHL は 1 機関、RX-MAC は 1 機関、DHL は 2 機関、MAC は 3 機関が 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陰性となった。モヤシ検体の高菌数接種では、7 機関が 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となり、その他の機関はいずれかの条件で陰性が認められた。特に、DHL と MAC での分離においては 1 機関が 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陰性となった。モヤシ検体の非接種では、RX-DHL で 1 機関、RX-MAC で 2 機関でそれぞれ 1 検体が *E. albertii* 様無色コロニー陽性となったが、それらを除いた全検体が継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニー陰性であった。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーのうちの *E. albertii* 様

無色コロニーの割合(3検体の合計)を集計した。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で各 1 機関、DHL で 2 機関、MAC で 3 機関、モヤシ検体の高菌数接種では、DHL および MAC で各 1 機関では継代した 2 から 15 個のコロニー全てが RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。

分離培地から RX-DHL に継代したコロニーのうちの *E. albertii* 様無色コロニーの割合(全機関合計)を集計した(表 2)。鶏肉検体の低菌数接種では、RX-DHL で 0.942、RX-MAC で 0.957 と高い割合で釣菌したコロニーが RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーであった一方で、DHL と MAC ではそれぞれ 0.761 と 0.744 と割合が低かった。高菌数接種では、いずれの培地でも継代したコロニーの RX-DHL 上での *E. albertii* 様無色コロニーの割合が 0.840 以上と高かった。非接種では、RX-DHL で 18 コロニー、RX-MAC で 25 コロニー、DHL で 94 コロニー、MAC で 138 コロニーを釣菌し継代したが、全て継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL で 0.825、RX-MAC で 0.847 と高い割合で継代したコロニーが RX-DHL 培地

上で *E. albertii* 様無色コロニーであった一方で、DHL と MAC でそれぞれ 0.537 と 0.323 と割合が低かった。モヤシ検体の高菌数接種では、RX-DHL、RX-MAC、DHL で 0.945 以上と高い割合で継代したコロニーが RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーであった。MAC では、0.588 と約半数のコロニーは継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。モヤシ検体の非接種では、RX-DHL で 5 コロニー継代したうちの 1 コロニー、RX-MAC で 9 コロニー継代したうちの 3 コロニーが RX-DHL 上で *E. albertii* 様無色コロニーであったが、DHL の 40 コロニー、MAC の 130 コロニーを含むその他全てのコロニーは、継代した RX-DHL 上では *E. albertii* 様無色コロニーを形成しなかった。

(7) 継代 RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色であったコロニーの PCR による確認

(6) で継代 RX-DHL 培地上で *E. albertii* 様無色コロニーを形成したコロニーについて、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR にて *E. albertii* であるか確認した。

継代で *E. albertii* 様無色であったコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定された検体

の割合を集計した。その結果、鶏肉検体の低菌数接種では、11 機関中 10 機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定され、1 機関で DHL の 2 検体中 2 検体、MAC の 1 検体中 1 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。鶏肉検体の高菌数接種では、全機関で 4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。鶏肉検体の非接種では、全機関の全分離培地で検出されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、11 機関中 3 機関において、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。特に、RX-DHL および RX-MAC では 2 機関、DHL は 4 機関、MAC は 3 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性と判定された。モヤシ検体の高菌数接種では、11 機関中 7 機関において、4 種類の全分離培地で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性と判定された。その他 4 機関については、RX-DHL では 1 機関で 2 検体中 2 検体、RX-MAC では 1 機関で 1 検体中 1 検体、DHL では 1 機関で 2 検体中 2 検体、MAC では 2 機関で 2 検体中 2 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。特に、DHL および MAC では各 1 機関で 3 検体中 3 検体が

E. albertii 分離陰性と判定された。モヤシ検体の非接種では、全機関で *E. albertii* 分離陰性であった。

継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合（3 検体の合計）を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、RX-DHL で供試した 6 から 15 コロニー、RX-MAC で 9 から 15 コロニー、DHL で 7 から 15 コロニー、MAC で 2 から 15 コロニーの全てが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の高菌数接種では、RX-DHL で供試した 12 から 15 コロニー、RX-MAC で 14 から 15 コロニー、DHL で 10 から 15 コロニー、MAC で 7 から 15 コロニーの全てが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の非接種では、全機関の全分離培地で *E. albertii* が分離されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で 1 機関、DHL で 2 機関、MAC で 3 機関において、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色コロニーが存在しなかった。また、RX-DHL で 1 機関の 1 コロニー、RX-MAC で 1 機関の 3 コロニー、DHL で 2 機関の各 1 コロニーが全て *E. albertii* でないと確定された。上記以外のモヤシ検体の低菌

数接種は、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色であった各 1 から 15 コロニー全てが *E. albertii* であると確定された。モヤシ検体の高菌数接種では、1 機関の DHL および MAC において、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色コロニーが存在しなかった。上記以外のモヤシ検体の低菌数は、継代した RX-DHL 培地で *E. albertii* 様無色であった各 2 から 15 コロニー全てが *E. albertii* であると確定された。

また、継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうち PCR で *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合（全機関合計）を集計した（表 3）。鶏肉検体の低菌数接種および高菌数接種では、PCR に供試した全コロニーが *E. albertii* 陽性であった。また、非接種では、継代した RX-DHL で *E. albertii* 様無色のコロニーが無かったため、PCR に供試したコロニーは無かった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL、RX-MAC、DHL でそれぞれ 1、3、2 個の *E. albertii* 陰性コロニーが存在した。高菌数接種では、PCR に供試した全てのコロニーが *E. albertii* 陽性であった。非接種では RX-DHL および RX-MAC でそれぞれ 1、3 コロニーは *E. albertii* 陰

性であった。鶏肉検体およびモヤシ検体を合計したコロニー数で比較すると、*E. albertii* 陽性コロニー数は RX-MAC で最も多く（548 コロニー）、次いで RX-DHL（522 コロニー）、DHL（435 コロニー）、MAC（404 コロニー）となった。

（8）各分離培地での *E. albertii* 分離の結果

各分離培地での *E. albertii* が分離された検体の割合を集計した。鶏肉検体の低菌数接種では、1 機関の DHL（3 検体中 2 検体陽性）および MAC（3 検体中 1 検体陽性）を除く全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。また、鶏肉検体の高菌数接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となり、非接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL と RX-MAC において 6 機関、DHL において 5 機関、MAC において 3 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。モヤシ検体の低菌数接種において 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となったのは、RX-DHL で 2 機関、RX-MAC で 2 機関、DHL で 4 機関、MAC で 3 機関あった。モヤシ検体の高菌数接種では、RX-DHL と RX-MAC

において 10 機関、DHL において 9 機関、MAC において 8 機関で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陽性となった。モヤシ検体の高菌数接種において 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となったのは、機関 5 の DHL および MAC のみであった。鶏肉検体の非接種では、全ての条件で 3 検体中 3 検体が *E. albertii* 分離陰性となった。

各分離培地での釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合（3 検体の合計）を集計した。鶏肉検体の低菌数接種で、RX-DHL は釣菌した 10 から 15 コロニーのうちの 6 から 15 コロニー、RX-MAC は釣菌した 11 から 15 コロニーのうちの 9 から 15 コロニー、DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 7 から 15 コロニー、MAC は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 2 から 15 コロニーが *E. albertii* であると確定された。鶏肉検体の高菌数接種では、RX-DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 12 から 15 コロニー、RX-MAC は釣菌した 15 コロニーのうちの 14 から 15 コロニー、DHL は釣菌した 12 から 15 コロニーのうちの 10 から 15 コロニー、MAC は釣菌した 13 から 15 コロニーのうちの 7 から 15 コロニーが *E. albertii* であると

確定された。鶏肉検体の非接種では、条件によって釣菌コロニーがなかったものから最大 15 コロニーであったが、全機関の全分離培地で *E. albertii* は分離されなかった。モヤシ検体の低菌数接種では、釣菌したコロニー数は分離培地の種類や機関によってはなかったものから最大 15 コロニーであり、それら釣菌したコロニーの全てが *E. albertii* でなかった分離培地が複数の機関で認められた。モヤシ検体の高菌数接種でも、釣菌したコロニー数は分離培地の種類や機関によっては 2 から最大 15 コロニーであり、それら釣菌したコロニーの全てが *E. albertii* でなかった分離培地が 1 機関で認められた。モヤシ検体の非接種では、全機関の各分離培地で釣菌したコロニー数は 0 から 15 コロニーであったが、いずれも *E. albertii* ではなかった。

また、各分離培地での釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合（全機関合計）を集計した（表 4）。RX-DHL で 522/581（89.8%）、RX-MAC で 548/615（89.1%）、DHL で 435/684（63.6%）、MAC で 404/796（50.8%）が *E. albertii* であった。

（9）感度と特異性

各分離結果について、検出方法別に感度及び特異性を算出した(表5)。*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の検出感度は、鶏肉およびモヤシの両検体の低菌数接種および高菌数接種の両条件で 1.000 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 1.000、DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。鶏肉検体の高菌数接種の検出感度は、分離に用いた4種類の全分離培地で 1.000 であった。モヤシ検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.667、RX-MAC で 0.727、DHL で 0.576、MAC で 0.515 であった。モヤシ検体の高菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.970、RX-MAC で 0.939、DHL で 0.879、MAC で 0.848 であった。

特異性は、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)において、鶏肉検体およびモヤシ検体で、*E. albertii* 検出は 0.939 であった。なお、IC は、いずれの検体でも 1.000 であった。分離培養法において、鶏肉検体およびモヤシ検体で、4種類の全分離培地で特異性は 1.000 であった。

統計解析を行った結果、Outlierの機関はなかったため、全機関のデータを用いて検出方法間の有意

差検定を行った。ただし、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)の IC 検出については、*E. albertii* が陰性の場合に IC が陽性であれば反応系としては正しく実施されたことがわかり、真の陰性(偽陰性ではない)であることを確認するために設定しているため、統計解析には含めなかった。リアルタイム PCR 法および4種類の培地による分離培養法の計5種類の方法を比較した結果、鶏肉検体では方法間に有意な差は認められなかった。一方、モヤシ検体では、分離培養法の DHL および MAC は、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法(ICを含む)よりも検出率が有意に低かった。次に、4種類の培地による分離培養法間を比較した結果、鶏肉検体では、DHL および MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。一方、モヤシ検体では、MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。

D. 考察

E. albertii を対象とした食品での検査法の確立のために、11試験検査機関によるコラボレイティブ・スタディを行った。*E. albertii* と同じく食中毒原因細菌の一種で

ある腸管出血性大腸菌を参照し、既に確立され通知されている食品での腸管出血性大腸菌の検査法の通知（「食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法」平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号）を参考にして同様の増菌培養法および分離培養法を利用し、また、遺伝子スクリーニングの考え方も取り入れて、効果的かつ効率的な検査法とすることとした。本コラボレイティブ・スタディでの試験法は、添加剤 AB 加 mEC 培地中での 42°C での増菌培養法と遺伝子検出法および各選択分離培地の組み合わせによる分離培養法で構成された。食品検体には、*E. albertii* の鶏肉汚染が報告されていることから鶏肉を選定し、また、野菜が原因と推定される集団食中毒事例の報告があったことから、より夾雑菌が多いモヤシを選定した。また、本コラボレイティブ・スタディ参加の複数機関と実施した先行研究にて、本コラボレイティブ・スタディに供試しなかった *E. albertii* 1 株についても野菜や海産物などの多種の食品に菌を接種して各種検出法を比較検討した。それらの結果を鑑みて、優れていると考えられる検査法を採用してコラボレイテ

ィブ・スタディの試験を構成した。

本コラボレイティブ・スタディの結果、検出感度は、高菌数接種（88.5 CFU/25g）では、鶏肉検体で全ての検出方法で 1.000 であり、モヤシ検体では *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）で 1.000 であり、分離培養法では 0.848-0.970 であった（表 5）。80 CFU 以上であれば高率に *E. albertii* が検出されることが判明した。低菌数接種（17.7 CFU/25g）では、鶏肉検体で *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）および分離培養法の RX-DHL と RX-MAC で 1.000 であり、分離培養法の DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。モヤシ検体では *E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法（IC を含む）で 1.000 であり、分離培養法では 0.515-0.727 であった。これらの結果から、約 18CFU の菌数レベルであっても鶏肉検体からは高率に検出され、モヤシ検体でも過半数からは検出されることが判明した。モヤシ検体の分離培養法で検出率が低下した理由として、モヤシ検体に含まれる夾雑菌が影響している可能性が考えられた。本コラボレイティブ・スタディで使用した鶏肉検体の一般生菌数は 1.8×10^4 CFU/g であるのに対し、モヤシ検体

は 6.9×10^7 CFU/g と約 1,000 倍ほど高く、また、大腸菌群数も鶏肉検体の約 10,000 倍高かった。そのため、接種した *E. albertii* が増菌培養液中にて十分に増殖できていなかった可能性が考えられた。*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) において、低菌数接種の鶏肉検体で Ct 値約 17-25、モヤシ検体で Ct 値約 19-34 であり、さらに高菌数接種の鶏肉検体で Ct 値約 16-21、モヤシ検体で Ct 値約 18-30 と、いずれの接種菌数でもモヤシ検体の方が Ct 値が高く、増菌培養液中の *E. albertii* 菌数が鶏肉検体よりも低いことが示された。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で検出されたが、分離培養法で *E. albertii* が検出されない検体は、鶏肉検体の低菌数接種において 1 機関で DHL での 3 検体中 1 検体および MAC での 3 検体中 2 検体の合計 3 検体が存在した。同様に、モヤシ検体の低菌数接種において 8 機関で RX-DHL の 11 検体、RX-MAC の 9 検体、DHL の 14 検体、MAC の 16 検体の合計 50 検体が分離培養法で *E. albertii* が検出されなかった。モヤシ検体の高菌数接種において 4 機関で RX-DHL の 1 検体、RX-MAC の 2 検体、DHL の 4 検体、MAC の 5 検体の合計 12 検

体が分離培養法で *E. albertii* が検出されなかった。これらの結果から、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示され、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) で検出され、分離培養法で検出されない検体では、増菌培地中で *E. albertii* は増殖しているにもかかわらず分離されないということから、本コラボレイティブ・スタディで設定した釣菌するコロニー数 (5 コロニー) 以上に釣菌することによって分離培養法の検出感度が向上する可能性が考えられた。試験の際には、釣菌するコロニー数も重要であると考えられる。

本コラボレイティブ・スタディでは、4 種類の分離培地を使用した。ラムノースとキシロースを添加した培地、すなわち RX-DHL および RX-MAC のほうが感度が高い結果であった (表 5)。また、釣菌したコロニー数はラムノースとキシロースを添加しない培地、すなわち DHL および MAC のほうが多いにも

かかわらず、コロニーが *E. albertii* であった割合は低い結果であった（表 4）。ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが鑑別性が高くなることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。また、本コラボレイティブ・スタディでは、各種分離培地上のコロニーを RX-DHL に継代し、*E. albertii* の特徴である無色コロニーのみを PCR に供試した。これは、*E. albertii* の特異的な選択剤が未開発であるため糖の分解を指標にコロニーを選別する必要があり、隣接するコロニーの影響を大きく受ける可能性を考慮したためである。本試験結果においても、各種選択培地上に生育した *E. albertii* と疑われるコロニーを RX-DHL 上に単離した際に、*E. albertii* とは異なる発色を示すコロニーが生育した例が多数認められた。分離培地として RX-DHL を選択した場合でも、釣菌した 581 コロニーのうち 57 コロニー（約 1 割）は *E. albertii* 以外の細菌種であったため、分離培地から疑われるコロニーを RX-DHL に継代してコロニーの発色を確かめることは有効な手法と考えられる。

E. albertii 検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) の特異性につい

ては、非接種で偽陽性を示した鶏肉検体およびモヤシ検体が各 2 検体（合計 4 検体）（表 1、表 5）認められた。これら 4 検体全て、2 反応のうちの 1 反応のみ Ct 値が得られており、1 検体を除き Ct 値が約 40 以上と高かった。1 検体は Ct 値が 20 と低かったが、増幅曲線を確認したところ、波打つように乱れていたために正確な Ct 値が得られなかったと考えられた（詳細略）。これら 4 検体について、後日冷蔵保管していた食品培養液から改めて DNA を抽出し直し、リアルタイム PCR を実施したところ、全て陰性となった。培養液由来の夾雑物によるリアルタイム PCR の増幅効率への影響もあるため、Ct 値が約 40 以上など大きい値の場合や増幅曲線に乱れがある場合は、抽出操作から再度行うことが推奨される。また、検体作製前に食品が *E. albertii* に自然汚染されていないことを確認したが、食品での自然汚染には偏りが考えられるため検体採取部の違いによる結果の違いはあり得ると考える。このため、自然汚染の対象菌を検出した可能性は否定できないが、試験操作における微量の交差汚染や検体の取り違いも発生した可能性も考えられる。

以上のように、本コロボレイティブ・スタディで使用された添加剤 AB 加 mEC 培地 (42°C) での増菌培養法、遺伝子検出法および各種分離培地を用いた分離培養法によって *E. albertii* の比較的高率な検出が認められた。また、本コロボレイティブ・スタディでは、釣菌するコロニー数に限度を設けていたが、実際の試験では遺伝子検出陽性になった検体では、分離平板培地から釣菌するコロニー数を多くすることによって検出率を向上させる必要があると考えられる。さらに、本コロボレイティブ・スタディの結果にかかわらず、各機関での試験室内や試験手順等の確認などを改めて行う機会として有用であると思われる。

E. 結論

本コロボレイティブ・スタディでは、*E. albertii* の食品での検査法を確立するために、11 試験研究機関の参加のもとに本菌接種食品検体 (低菌数レベル: 17.7 CFU/25g、高菌数レベル: 88.5 CFU/25g) を用いて検討した。その結果、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法は、分離培養法と同等またはそれよりも優れており、分離培養法のなかではラムノースおよびキシ

ロースを添加した分離培地が添加しないものよりも優れていた。それらの感度は、総じて比較的高いことが確認され、本コロボレイティブ・スタディの前に取り組んだ先行研究結果を鑑みると他食品への応用においても良好な結果が得られることが期待される。本コロボレイティブ・スタディで使用したような方法を用いて、選択増菌培養を行い、その増菌培養液を供試して *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法によるスクリーニングを行い、陽性検体については増菌培養液を選択分離培地にて分離培養することが、食品での *E. albertii* 検査法として優れた方法であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. (投稿中)

(学会等発表)

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、
床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、
前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、
柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、
大西貴弘、工藤由起子。
Escherichia albertii 特異的リ
アルタイムPCR法の開発と市販鶏
肉の汚染実態調査。第42回日本食
品微生物学会学術総会。令和3年
9月21日-10月20日。オンデマ
ンド

廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、
小椋容子、工藤由起子。
Escherichia albertii に適する
選択増菌培地の開発。第117回
日本食品衛生学会学術講演会。令
和3年10月26日-11月9日。オ
ンライン

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

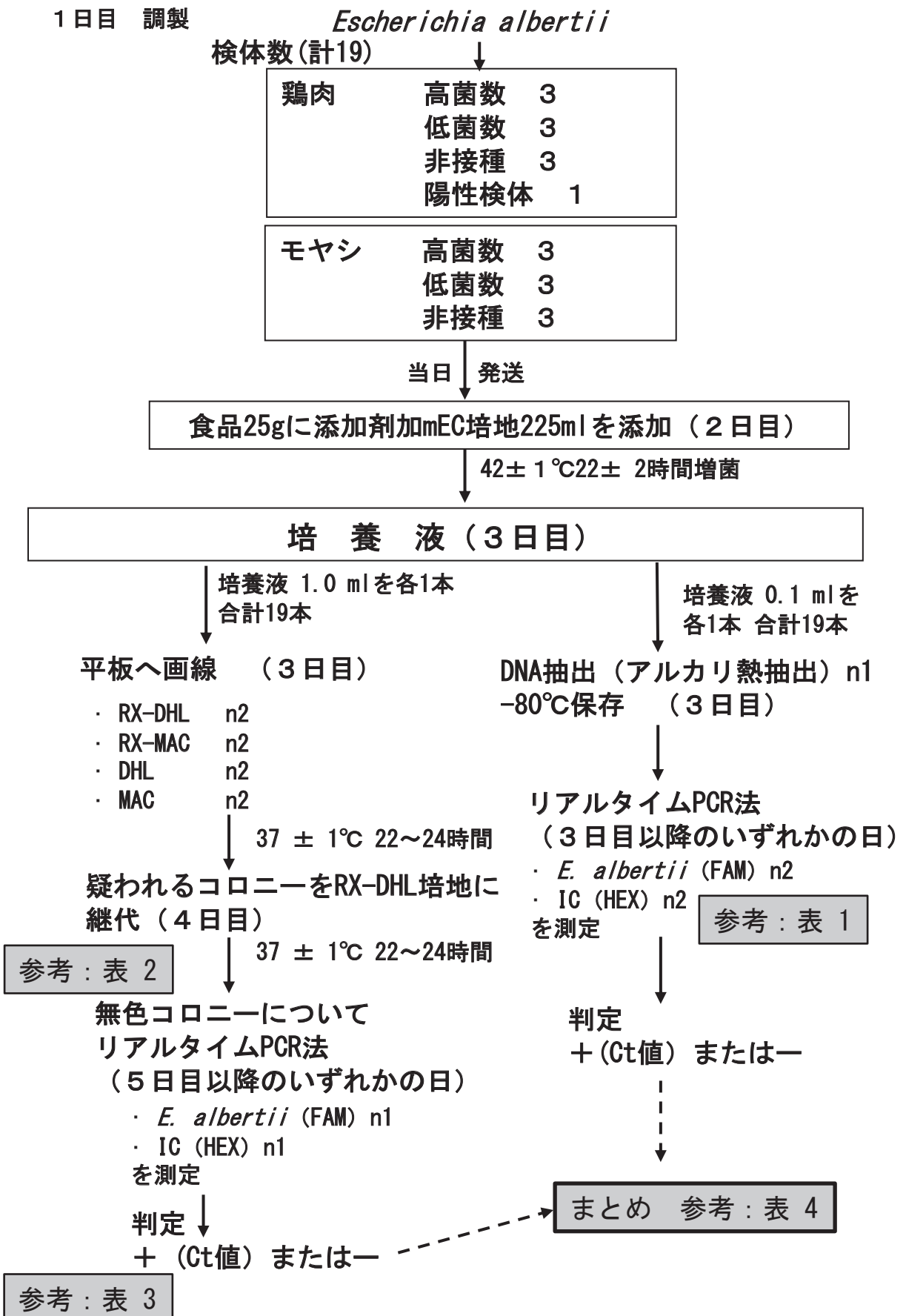


図1 *Escherichia albertii*の検査法のコラボレイティブ・スタディ

表 1. リアルタイムPCR法での*E. albertii*検出率

| 機関番号 | | 1 | | 2 | | 3 | |
|------|--------|------------------|-----------|-----|-----------|-----|-----------|
| | | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 |
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 3/3 ^a | 18.9-20.8 | 3/3 | 20.1-21.5 | 3/3 | 17.9-18.5 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 17.2-19.1 | 3/3 | 16.8-17.5 | 3/3 | 15.9-16.2 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - | 1/3 | 20.2 |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 3/3 | 20.7-23.3 | 3/3 | 23.0-26.0 | 3/3 | 20.2-21.7 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 20.0-20.8 | 3/3 | 20.7-21.2 | 3/3 | 19.6-20.7 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - | 0/3 | - |

| 機関番号 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|------|--------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|
| | | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 |
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 3/3 | 17.3-17.9 | 3/3 | 19.2-24.9 | 3/3 | 17.9-19.1 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 16.8-19.4 | 3/3 | 18.9-21.0 | 3/3 | 17.1-17.8 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - | 0/3 | - |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 3/3 | 18.7-19.0 | 3/3 | 30.3-33.5 | 3/3 | 22.8-25.9 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 18.6-19.1 | 3/3 | 26.4-29.8 | 3/3 | 21.3-21.6 |
| | 非接種 | 2/3 | 40.1-41.0 | 0/3 | - | 0/3 | - |

| 機関番号 | | 7 | | 8 | | 9 | |
|------|--------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|
| | | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 |
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 3/3 | 18.3-19.4 | 3/3 | 18.0-21.7 | 3/3 | 18.2-20.6 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 16.8-17.1 | 3/3 | 16.5-20.2 | 3/3 | 17.8-18.3 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - | 1/3 | 39.7 |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 3/3 | 24.3-26.6 | 3/3 | 20.7-24.7 | 3/3 | 24.2-24.7 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 22.0-24.0 | 3/3 | 19.6-21.9 | 3/3 | 20.4-21.4 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - | 0/3 | - |

| 機関番号 | | 10 | | 11 | |
|------|--------|-----|-----------|-----|-----------|
| | | 判定 | Ct値 | 判定 | Ct値 |
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 3/3 | 19.8-21.3 | 3/3 | 16.5-17.9 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 18.0-18.5 | 3/3 | 16.0-17.4 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 3/3 | 23.5-23.8 | 3/3 | 21.3-22.7 |
| | ：高菌数 | 3/3 | 20.8-21.4 | 3/3 | 18.3-20.2 |
| | 非接種 | 0/3 | - | 0/3 | - |

^a判定：陽性検体数／総検体数

Ct値：検出サイクル数

2反応のうち片方でも+の検体を陽性（+）としてカウント

表 2. 分離培地からRX-DHLに継代したコロニーのうちの*E. albertii*様無色コロニーの割合 (全機関合計)

| | | RX-DHL | RX-MAC | DHL | MAC |
|-----|--------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 146/155 ^a (0.942) | 154/161 (0.957) | 121/159 (0.761) | 122/164 (0.744) |
| | ：高菌数 | 160/161 (0.994) | 164/165 (0.994) | 147/160 (0.919) | 137/163 (0.840) |
| | 非接種 | 0/18 (0.000) | 0/25 (0.000) | 0/94 (0.000) | 0/138 (0.000) |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 80/97 (0.825) | 100/118 (0.847) | 65/121 (0.537) | 51/158 (0.323) |
| | ：高菌数 | 137/145 (0.945) | 133/137 (0.971) | 104/110 (0.945) | 94/160 (0.588) |
| | 非接種 | 1/5 (0.200) | 3/9 (0.333) | 0/40 (0.000) | 0/130 (0.000) |
| 合計 | | 524/581 (0.902) | 554/615 (0.901) | 437/684 (0.639) | 404/796 (0.508) |

^a継代したRX-DHL培地上的*E. albertii*様無色コロニー数／各培地上的*E. albertii*様無色コロニー数

表 3. 継代で *E. albertii* 様無色のコロニーのうちPCRで *E. albertii* であると確定されたコロニーの割合 (全機関合計)

| | | RX-DHL | RX-MAC | DHL | MAC |
|-----|--------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 146/146 ^a (1.000) | 154/154 (1.000) | 121/121 (1.000) | 122/122 (1.000) |
| | ：高菌数 | 160/160 (1.000) | 164/164 (1.000) | 147/147 (1.000) | 137/137 (1.000) |
| | 非接種 | 0/0 (0.000) | 0/0 (0.000) | 0/0 (0.000) | 0/0 (0.000) |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 79/80 (0.988) | 97/100 (0.970) | 63/65 (0.969) | 51/51 (1.000) |
| | ：高菌数 | 137/137 (1.000) | 133/133 (1.000) | 104/104 (1.000) | 94/94 (1.000) |
| | 非接種 | 0/1 (0.000) | 0/3 (0.000) | 0/0 (0.000) | 0/0 (0.000) |
| 合計 | | 522/524 (0.996) | 548/554 (0.989) | 435/437 (0.995) | 404/404 (1.000) |

^aPCRで *E. albertii* であると確定されたコロニー数 / 継代したRX-DHL培地で *E. albertii* 様無色であったコロニー数

表 4. 各分離培地での釣菌したコロニーのうち*E. albertii*コロニーの割合（全機関合計）

| | | RX-DHL | RX-MAC | DHL | MAC |
|-----|--------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 鶏肉 | 接種：低菌数 | 146/155 ^a (0.942) | 154/161 (0.957) | 121/159 (0.761) | 122/164 (0.744) |
| | ：高菌数 | 160/161 (0.994) | 164/165 (0.994) | 147/160 (0.919) | 137/163 (0.840) |
| | 非接種 | 0/18 (0.000) | 0/25 (0.000) | 0/94 (0.000) | 0/138 (0.000) |
| モヤシ | 接種：低菌数 | 79/97 (0.814) | 97/118 (0.822) | 63/121 (0.521) | 51/158 (0.323) |
| | ：高菌数 | 137/145 (0.945) | 133/137 (0.971) | 104/110 (0.945) | 94/160 (0.588) |
| | 非接種 | 0/5 (0.000) | 0/9 (0.000) | 0/40 (0.000) | 0/130 (0.000) |
| 合計 | | 522/581 (0.898) | 548/615 (0.891) | 435/684 (0.636) | 404/796 (0.508) |

^aPCRで*E. albertii*であると確定されたと確定されたコロニー数/各分離培地で*E. albertii*様無色であったコロニー数

表 5. 検出方法の感度と特異性

| 方法 | 感度 | | | | 特異性 | |
|-----------------------|----------------------------|------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | 鶏肉 | | モヤシ | | 鶏肉 | モヤシ |
| | 低菌数 ^a | 高菌数 ^a | 低菌数 | 高菌数 | | |
| Real-time PCR | | | | | | |
| <i>E. albertii</i> 検出 | 1.000 (33/33) ^b | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 0.939 (31/33) ^c | 0.939 (31/33) |
| IC検出 | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) |
| 分離培養法 | | | | | | |
| RX-DHL | 1.000 (33/33) ^d | 1.000 (33/33) | 0.667 (22/33) | 0.970 (32/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) |
| RX-MAC | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) | 0.727 (24/33) | 0.939 (31/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) |
| DHL | 0.970 (32/33) | 1.000 (33/33) | 0.576 (19/33) | 0.879 (29/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) |
| MAC | 0.939 (31/33) | 1.000 (33/33) | 0.515 (17/33) | 0.848 (28/33) | 1.000 (33/33) | 1.000 (33/33) |

a 低菌数：17.7 cfu/25 g、高菌数：88.5 cfu/25 g

b 陽性検体数／総接種検体数

c 陰性検体数／総非接種検体数（ただし、IC検出では陽性検体数／総検体数）

d PCR陽性検体数／総検体数

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

astA 保有大腸菌の食品検査法の確立

研究要旨

日本では、*astA* 保有大腸菌による食中毒が毎年発生しており、患者が100人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。このため、集団食中毒事例が発生した際の *astA* 保有大腸菌に対応する食品での検査法を確立することを目的に本研究を行った。その結果、(1) 選択増菌培養法および選択分離培養法の検討：腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC を用いた 42℃ 培養）が有用であり、分離培養法としては薬剤 C を添加した SMAC 培地を用いた 37℃ 培養が有用であることが明らかになった。また、(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討：既存の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法では非特異的反応が生じることから、*astA* のバリエーションも考慮した遺伝子検出法の新規開発が必要と考えられた。また、*astA* 以外の遺伝子を標的とした遺伝子検出法についても検討が必要と考えられた。これら成果を踏まえて、次年度にはさらに各項目の研究を発展させ、地方自治体との連携も広げる。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

秋田県健康環境センター

今野貴之

大分県衛生環境研究センター

成松浩志、溝腰朗人

川崎市健康安全研究所

小嶋由香

広島市衛生研究所
北九州市保健環境研究所
熊本市環境総合センター
国立医薬品食品衛生研究所

末永朱美、池田伸代
大羽広宣、藤崎道子、有川衣美
小畑裕子
廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和2年には、給食センターで調理した学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等2,958人の患者をともなう *astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1; EAST1をコードする遺伝子)保有大腸菌による大規模食中毒が発生した(Epidemiol. Infect., 2021, 149, e244, 1-3)。*astA* 保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が100人を超える事例も多く(広島市衛生研究所年報第20号, 2001)、食中毒予防対策が必要とされている。これらの病原大腸菌による食中毒では、原因食品が不明であることが多く、喫食状況の解析から特定の日時に提供された食事や弁当などの喫食が原因として判明しても食品・食材が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、適切または効率的な検査法が実施されていない

ことが危惧されている。

食品検査において、食品の培養では、食品由来微生物の増殖によって食中毒細菌の増殖が抑制され、分離が困難なことが考えられる。また、食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことが予想されるため、原因食品究明には対象となる食中毒細菌に適した検査法が重要である。そこで本研究では、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして病原大腸菌に適する効率的かつ特異的な検査法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 選択増菌培養法および選択分離培養法の検討

選択増菌培養法については、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法を検討した。さらに、*E. albertii* のコラボレイティブスタディで使用した薬剤 AB を添加した増菌培養法についても検討した。

また、選択分離培養法については、腸管出血性大腸菌の食品での検

査法との共通性を考慮した分離培養法を検討した。また、その他の病原体の検出に用いられる薬剤 C を添加した分離培養法についても検討した。さらに、その他の選択分離培地を検討するために、大腸菌の試験に通常用いられる薬剤を添加していない分離培地についても試験した。

1) 菌株

astA 保有大腸菌による集団食中毒事例由来株、その他病原体による集団食中毒事例由来株、散発下痢症由来株、およびその他由来株の合計 159 株の *astA* 保有大腸菌を供試した (表 1)。

2) *astA* 保有大腸菌の増菌培養条件の検討

カジトン培地に保存している菌株 (159 株) 1 エーゼ分 (1 μ L) を Trypticase soy broth (TSB、オキシソイド) 500 μ L に接種し、37°C にて 18 時間培養した。この TSB 培養液を滅菌リン酸緩衝生理食塩水にて 100 倍階段希釈し、 10^{-6} 希釈液 10-20 μ L (想定 10-20 cfu) を modified EC 培地 (mEC、日水製薬)、ノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学)、薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC)、薬剤 AB 加 NmEC (薬剤 AB-NmEC) 各 800 μ L に接種し、42°C にて 18 時間培養し

た (表 2)。濁度の上昇が認められなかった培養液については、培養液 100 μ L を Tryptic soy agar (TSA、BD) に塗抹し、37°C にて 18 時間培養した。コロニー数をカウントし、接種菌数から 10 倍以上に増殖していた場合には増殖が認められたと判定した。mEC および NmEC については、この一連の試験を 3 回実施し、そのうち 1 回でも陰性が認められた場合には増殖が認められなかったと判定した。薬剤 AB-mEC および薬剤 AB-NmEC は、一連の試験を 1 回実施した。

3) *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

カジトン培地に保存している菌株 (159 株) 1 エーゼ分 (1 μ L) を TSB 500 μ L に接種し、37°C にて 18 時間培養した。この TSB 培養液を、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC、クロモアガー社製造、関東化学販売)、0.05 mg/L セフィキシム・2.5 mg/L 亜テルル酸 (CT) 加 CHSTEC (CT-CHSTEC)、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC、オキシソイド)、CT 加 SMAC (CT-SMAC)、DHL 寒天培地 (DHL、日水製薬)、高濃度薬剤 C 添加 CHSTEC (高 C-CHSTEC)、中濃度薬剤 C 添加 CHSTEC (中 C-

CHSTEC)、低濃度薬剤 C 添加 CHSTEC (低 C-CHSTEC)、中濃度薬剤 C 添加 SMAC (中 C-SMAC)、に画線し、37°Cにて 22 時間培養した (表 3)。

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討

1) 菌株

食品由来細菌および食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌を含む細菌 26 種 35 株を供試した (表 4)。

2) DNA 溶液の調製

-80°C に冷凍保管されている菌株 1 エーゼ分を TSB 5 mL に接種し、37°Cにて 18 時間培養した。菌培養液を NucleoSpin Tissue キット (タカラバイオ) を用いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を NanoDrop 2000 によって測定した。抽出 DNA 溶液を滅菌 DW にて 2 ng/ μ L の濃度に希釈した。この希釈 DNA 溶液をテンプレートとした。

3) *astA* 特異的 PCR 法の特異性試験

astA 特異的コンベンショナル PCR 法 (Ratchtrachenchai et al., Bull. Rept. Med. Sci., 2012, 39(4), 211-220) および *astA* 特異的リアルタイム PCR 法 (Hidaka et al., J. Appl. Microbiol.,

2009, 106, 410-420) (表 5) について特異性を試験した。コンベンショナル PCR 試薬には、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。機器は ProFlex PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。反応条件は、98°C 10 秒、98°C 10 秒間 - 55°C 30 秒間 - 72°C 1 分間の 30 サイクル、72°C 1 分間とした。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。機器は QuantStudio 3 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。50°C 2 分および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 45 サイクル増幅反応させた。

上記にて調製した希釈 DNA 溶液をコンベンショナル PCR 法では 2.5 μ L、リアルタイム PCR 法では 5 μ L 加えた。リアルタイム PCR 法は、全ての希釈 DNA 溶液について 2 反応実施した。2 反応のうち 1 反応でも蛍光が検出された場合は陽性と判定した。

C. 研究結果

(1) 選択増菌培養法および選択分離培養法の検討

1) *astA* 保有大腸菌の増菌培養条件の検討

供試した 159 株のうち、mEC 中では 154 株 (96.9%)、NmEC 中では 127 株 (79.9%) において増殖が認められた (表 2)。これらの培地に薬剤 AB を添加した増菌培養液では、薬剤 AB-mEC 中では 22 株 (13.8%) および薬剤 AB-NmEC 中では 10 株 (6.3%) において増殖が認められた。

2) *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

CHSTEC、SMAC、DHL では、全ての株が生育良好であった (表 3)。一方、薬剤を添加した培地では、生育が弱いまたは非生育の株が認められた。CT-CHSTEC では供試した 159 株のうち、9 株 (5.7%) が生育良好であったが、103 株 (64.8%) は生育が弱く、47 株 (29.6%) は非生育であった。CT-SMAC では 95 株 (59.7%) が生育良好であったが、62 株 (39.0%) は生育が弱く、2 株 (1.3%) は非生育であった。高 C-CHSTEC では 40 株 (25.2%) が生育良好であったが、119 株 (74.8%) は生育が弱かった。中 C-CHSTEC では 24 株 (14.9%) が生育良好であったが、135 株 (83.9%) は生育が弱かった。低 C-CHSTEC では、116 株

(73.0%) が生育良好であったが、43 株 (27.0%) は生育が弱かった。中 C-SMAC では、152 株 (95.6%) が生育良好であったが、その他 7 株 (4.4%) は生育が弱かった。

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討

1) *astA* 特異的 PCR 法の特異性試験

astA 保有大腸菌では、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法および *astA* 特異的リアルタイム PCR 法ともに陽性であった。その他の菌株では、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では、供試した 30 株全て陰性であった。一方、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法では、30 株中 7 株 (*Arcobacter cryaerophilus*、*Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serover Typhimurium、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei*、*Vibrio parahaemolyticus*) が陽性となった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法の検討では、mEC 中での 42℃ 培養が *astA* 保有大腸菌に適している

ことが判明した。

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した選択分離培養法の検討では、*astA* 保有大腸菌の多くが CT（腸管出血性大腸菌の検査法で使用されている濃度と同じ濃度）に感受性であった。CT による影響は、CT-SMAC（159 株中感受性株 64 株：40.3%）よりも CT-CHSTEC（159 株中感受性株 150 株：94.3%）の方が顕著に *astA* 保有大腸菌のコロニーの生育を抑制した。次に、その他の病原体と共通した分離培養法の検討では、薬剤 C を低濃度から高濃度にて添加した CHSTEC 培地では、*astA* 保有大腸菌の多く（27.0%-85.1%）が生育が弱いか非生育となり、コロニーの生育を抑制されることが示された。一方、薬剤の添加がない SMAC 上で無色コロニーを形成していた 159 株中 7 株（4.4%）は、薬剤 C を中濃度にて添加した中 C-SMAC では、コロニーの生育に抑制が認められた。しかしながら、159 株中 152 株（95.6%）においては、通常の赤色コロニーを示していたため、本菌の分離培養法として適していると考えられた。

astA 特異的リアルタイム PCR 法の検討では、既存の Hidaka らによる方法では、非特異的反応が生じることが示された。*astA* の配列には

多数の遺伝子多型（バリエント）が報告されているため（Silva et al., BMC. Microbiol., 2014, 14:135）、これらバリエントを網羅する新しい *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発が求められている。また、過去には *astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されることが報告されている（濱崎ら、腸管病原性大腸菌の検出方法に関する研究、平成 20 年度福岡県保健環境研究所年報）。このため、*astA* を標的としたリアルタイム PCR 法の開発に加え、*astA* 保有大腸菌が共通して保有するその他の遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法の開発も必要であることが予想される。今後、本研究課題の他研究分担者の研究結果も参考に、新規の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発およびその他の標的遺伝子について考察する必要がある。

E. 結論

今年度に取り組んだ 2 項目について以下の様な結論を得た。（1）選択増菌培養法および選択分離培養法の検討：腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC を用いた 42℃培養）およびその他の病原体と共通の分離培養法（中濃度薬剤 C 添加 SMAC 培地を用いた 37℃培養）が有用であることが明らかになっ

た。また、(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討：既存の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法では非特異的反応が生じることから、*astA* のバリエーションも考慮した方法を新規に開発する必要と考えられた。また、*astA* 以外の遺伝子を標的とした遺伝子検出法についても検討が必要と考えられた。これら成果を踏まえて、次年度にはさらに各項目の研究を進展させ、地方自治体との連携も広げる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in retail fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 62(3), 94-99, 2021.

Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. *Journal of food protection* 85(1), 173-179, 2022.

(学会等発表)

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子. 市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第 94 回日本細菌学会総会. 令和 3 年 3 月 29-31 日. オンライン

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

表1. *astA* 保有大腸菌の供試菌株

| 事例 (件数) | 分離由来 (菌株数) |
|-------------------------------|------------|
| <i>astA</i> 保有大腸菌による集団食中毒 (7) | 患者 (55) |
| | 従事者 (8) |
| | 拭き取り (2) |
| その他の病原体による集団食中毒 (36) | 患者 (31) |
| | 従事者 (14) |
| | 健康保菌者 (1) |
| | 食品 (1) |
| | 拭き取り (1) |
| | 不明 (3) |
| 散発下痢症* (37) | 患者 (38) |
| その他 (5) | 健康保菌者 (5) |

* *astA* 保有大腸菌およびその他の病原体による散発下痢症事例

表2. 各種増菌培養液での *astA* 保有大腸菌の増殖結果

| 増菌培地 | 増殖 (%) * | |
|-----------|------------|------------|
| | + | - |
| mEC | 154 (96.9) | 5 (3.1) |
| NmEC | 127 (79.9) | 32 (20.1) |
| 薬剤AB-mEC | 22 (13.8) | 137 (86.2) |
| 薬剤AB-NmEC | 10 (6.3) | 149 (93.7) |

* 合計159株を試験

表3. *astA*保有大腸菌株の各種選択分離培地上のコロニー性状

| 供試菌株 (株数) | 薬剤 添加 | 分離培地 | コロニーの 生育の状態 | コロニーの色 (株数) | 合計株数 | (%) |
|----------------------------|----------|-----------|----------------|---|------|--------|
| <i>astA</i> 保有大腸菌 (159) | なし | CHSTEC | 生育良好 | 藤 (141), 白 (13), 青 (4), 無色 (1) | 159 | (100) |
| | | DHL | 生育良好 | 赤 (145), 無色 (11), 無色と桃 (2), 桃と赤 (1) | 159 | (100) |
| | | SMAC | 生育良好 | 赤 (142), 無色 (7), 桃 (7), 桃と無色 | 159 | (100) |
| | CT | CT-CHSTEC | 生育良好 | 暗藤 (9) | 9 | (5.7) |
| | | | 生育弱 | 暗藤 (96), 紫 (5), 青 (1), 灰 (1) | 103 | (64.8) |
| | | | 非生育 | - | 47 | (29.6) |
| | | CT-SMAC | 生育良好 | 赤 (94), 無色 (1) | 95 | (59.7) |
| | | | 生育弱 | 赤 (58), 無色 (4) | 62 | (39.0) |
| | | | 非生育 | - | 2 | (1.3) |
| | C | 高C-CHSTEC | 生育良好 | 藤 (29), 白 (11) | 40 | (25.2) |
| | | | 生育弱 | 藤 (105), 白 (6), 青 (4), 灰 (3), 藤と白 (1) | 119 | (74.8) |
| | | 中C-CHSTEC | 生育良好 | 藤 (14), 白 (10) | 24 | (14.9) |
| | | | 生育弱 | 藤 (124), 白 (4), 藤と白 (2), 青 (3), 灰と白 (1), 藤と青 (1) | 135 | (83.9) |
| | | 低C-CHSTEC | 生育良好 | 藤 (99), 白 (12), 青 (3), 藤と青 (2) | 116 | (73.0) |
| | | | 生育弱 | 藤 (42), 白 (1) | 43 | (27.0) |
| | | 中C-SMAC | 生育良好 | 赤 (151), 無色 (1) | 152 | (95.6) |
| | | | 生育弱 | 無色 (7) | 7 | (4.4) |

CHSTEC: クロモアガーSTEC基礎培地, CT: 0.05 mg/Lセフィキシム・2.5 mg/L亜テルル酸,

SMAC: ソルビトールマッコンキー寒天培地

高: 高濃度, 中: 中濃度, 低: 低濃度, C: 薬剤C

表4. 食品由来細菌および食中毒細菌における *astA* 特異的PCRによる検出結果

| 菌種 | 供試菌 株数 | PCR陽性株数 | |
|--|-----------|-----------------|---------------|
| | | コンベンショナル PCR | リアルタイム PCR |
| <i>Arcobacter butzleri</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Arcobacter cryaerophilus</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Arcobacter skirrowii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Campylobacter coli</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia albertii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> type strain | 1 | 0 | 1 |
| <i>astA</i> 保有大腸菌 | 5 | 5 | 5 |
| <i>Escherichia fergusonii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia hermannii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium | 1 | 0 | 1 |
| <i>Shigella boydii</i> | 4 | 0 | 1 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 2 | 0 | 0 |
| <i>Shigella flexneri</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Shigella sonnei</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 1 | 0 | 0 |
| 合計 | 35 | 5 | 12 |

コンベンショナルPCR: Ratchtrachenchai et al., Bull. Rept. Med. Sci., 2012, 39(4), 211-220

リアルタイムPCR: Hidaka et al., J. Appl. Microbiol., 2009, 106, 410-420

表5. *astA* 特異的PCR法のプライマーおよびプローブ

| 名称 | プライマーおよびプローブ (蛍光およびクエンチャー標識) | 産物 | 引用 |
|-------------|---|--------|--|
| コンベンショナルPCR | EASTOS1: GCCATCAACACAGTATATCCG EASTOAS2: CGCGAGTGACGGCTTTGTAG | 109 bp | Ratchtrachenchai et al., Bull. Rept. Med. Sci., 2012, 39(4), 211-220 |
| リアルタイムPCR | astA-61f: ATGCCATCAACACAGTATATCCG astA-171r: CGCGAGTGACGGCTTTGTA astA-pro: (FAM)CATCCAGTTATGCATCGTG(BHQ1) | 111 bp | Hidaka et al., J. Appl. Microbiol., 2009, 106, 410-420 |

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

大岡 唯祐

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

研究分担者 大岡唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・准教授）

研究要旨

astA 遺伝子（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素をコード）保有大腸菌を中心とした種々の病原性大腸菌について“効果的な検出法の確立”および“病原因子の組み合わせによる重症化リスクの解明”を目的として研究を進めた。R3年度は、これまでに収集した下痢症患者由来大腸菌（2,730株）の中から *astA* 遺伝子陽性株を194株同定し、multi-locus sequence analysis (MLSA) による系統解析の結果から、系統の異なる31株を選定してMiSeqによりドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBI等公共データベースに登録された完全長配列決定大腸菌株（約9,000株）の中から、713株の *astA* 遺伝子陽性株を同定した。これら、計 *astA* 遺伝子保有株、前述の31株と併せた解析により、35種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。現在、これら *astA* 遺伝子バリエーションについて発現およびその機能の違いを含めた病原機構の詳細解明を進めている。腸管凝集性大腸菌（EAEC）については、以前の研究において、下痢症患者由来大腸菌の中から同定していた *aggR* 遺伝子保有・非保有の腸管凝集性大腸菌の中から MLSA 解析により選定した系統の異なる31株を選定し、MiSeqによるドラフトゲノム解析を実施していた。そのデータの中から、付着因子である線毛について、既知のものとの遺伝子ホモログを3種類同定した。今後、この3種について、その機能解析を進める。

A. 研究目的

近年、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和2年には、学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等2,958人の患者をとも

なう *astA* 遺伝子保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 遺伝子保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が100人を超える事例も多く、食中毒予防対策

が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌[EAEC](凝集付着性因子：*aggR* 遺伝子等の保有株)や腸管病原性大腸菌[EPEC](細胞への局在付着性因子：*eae* 遺伝子等の保有株)による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒においては、原因食品が不明であることが多く、感染源(食材や食品)が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことがいわれており、その食中毒細菌に適した検査法が原因食品究明には重要である。

本研究では、ゲノム情報を基に各病原型に保存性の高い病原関連遺伝子を同定する。その際、既知の病原因子だけでなく、新規因子の同定も試みる。病原因子の発現解析および機能解析をおこない、検出指標に適した病原関連遺伝子を既知・新規因子を含め検討する。以上のような研究を進めることにより、遺伝子検出法を主とした病原性大腸菌の効果的検査法の開発を目指す。

本年度は、申請者らが既に収集済みの下痢症患者由来大腸菌(約3,000株)を対象に、*astA* 遺伝子の

PCRスクリーニングを実施し、*astA*, *eae*, *aggR* 遺伝子陽性株を網羅的に同定する。*astA* 遺伝子陽性株については、Multi-locus sequence analysis (MLSA)による系統解析を行い、作成した系統樹を基にゲノム解析に使用する株を30株程度選定、MiSeqによりドラフトゲノム配列を取得する。また、NCBIなど公開データベース上に存在する大腸菌ゲノム配列情報から *astA*, *eae*, *aggR* 遺伝子保有株のゲノム配列を網羅的に取得する。前述の株と併せて大規模ゲノム比較解析を行い、各病原型で保存性の高い病原関連候補遺伝子群を網羅的に抽出し、各病原型の疫学マーカーとなりうる遺伝子を選定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

申請者の研究グループでは当大学病院小児科および鹿児島県内の小児科から、下痢症患者由来の大腸菌株の収集を進めており、現在までに約3,000株を収集している。これらの株を対象に *astA* 遺伝子特異的プライマーペア (EAST1-F: 5' -GCCATCAACACAGTATATCC -3' ; EAST1-R: 5' -GAGTGACGGCTTTGTA GTCC-3')によるPCRスクリーニングを実施し、

astA 遺伝子の保有頻度の検討および保有株の同定を行った。

(2) Random amplified PCR polymorphic DNA 法 (RAPD) を用いた株多様性の検討

項目 (1) で同定した 194 株のうち、同一株の可能性が疑われる株 (同一日、同一病院からの分離株) について、P1254 (5' - CCGCAGCCAA-3'), P1290 (5' - GTGGATGCGA-3'), P1252 (5' - GCGGAAATAG-3') の 3 プライマーを用いた RAPD により検証した。

(3) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

大腸菌のハウスキーピング遺伝子 7 遺伝子 (*adh*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd*; <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) の内部配列を PCR により増幅して配列決定した後、各配列を連結 (計 3,423 bp) して clustalW によりマルチプルアライメントを実施した。その結果を、MEGA6 を用いて系統解析を行い、Neighbour-joining 法により系統樹を作成した。

(4) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目 (2) で作成した系統樹から比較的系統の異なる 31 株を選定し、MiSeq (Illumina) によるドラフトゲノム配列取得を行った。具体的には

DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を精製し、250-300 bp のショットガンフラグメントライブラリー Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina) を用いて作製し、MiSeq により解析した。得られたリード配列は platanus_b_v1.3.1 を用いてアセンブルした。

(5) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

astA 遺伝子の局在を正確に把握するため、NCBI データベース上に登録された完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を解析対象とした。既知の *astA* 遺伝子バリエーション 9 種類を query とした blastn 解析を行い、遺伝子保有株を同定した。

(6) 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

申請者が新たに決定したゲノム解析株 31 株および NCBI データベースから抽出した 713 株について、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの相同性や局在、また、そのコピー数について検討した。

(7) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

ドラフトゲノム解析を行った 31 株と NCBI データベースから抽出

した 713 株について、コア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行った。進化系統解析は、各ゲノム配列を DFAST でアノテーションした後、Roary (アミノ酸配列相同性 80%以上) によりコア遺伝子の抽出、アライメントし、iqtree を用いて系統解析した。系統樹は iTOL (<https://itol.embl.de>) を用いて作成した。

(8) *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

以前の研究において MiSeq によるドラフトゲノム解析が完了している 31 株について、既知の EAEC 関連病原因子について tblastx 検索を実施し、EAEC に共通するあるいは保存性の高い病原関連遺伝子群の同定を行った。

C. 研究結果

(1) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、検証した 2,970 株のうち 194 株 (7.1%) において *astA* 遺伝子の保有が確認された。

(2) RAPD 法を用いた株多様性の検討

同一株の可能性が疑われる 47 組について検証した結果、5 組が同一パターンを示した。その結

果をうけ、それら 5 組からそれぞれ 1 株 (計 5 株) を以降の解析から除外した。

(3) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

項目 (1), (2) で選定した 189 株および参照株として大腸菌 phylogroup の各代表株に関して、MLSA 解析を実施した。その結果、*astA* 遺伝子保有株は大腸菌進化系統の中で幅広い系統に存在していることが明らかとなった (図 1)。

(4) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

ドラフトゲノム解析の結果概要を表 1 に示した。300 bp 以上の scaffold を総計したゲノムサイズは約 4.72 -5.51 Mb (平均 5.12 Mb) であった。

(5) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

2021 年 12 月現在、NCBI データベース上に登録されていたゲノム完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株のうち、既知の *astA* 遺伝子バリエーションもしくはそのホモログを保有する株が 713 株同定された。

(6) 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

申請者が新たに決定したゲノム解析株 31 株について、*astA* 遺伝子バリエーションの局在等の詳細を調べた結果、プラスミド由来配列上に存在するものと染色体由来配列上に存在するものが検出され、それ以外に contig が短すぎるために局在未同定のものも複数みられた。この局在未同定のものについては、ゲノム上に同型のバリエーションが複数存在するためと考えられた。NCBI データベースから抽出した 713 株では、染色体上、プラスミド上に *astA* 遺伝子バリエーションが局在していたが、バリエーションごとに染色体とプラスミドの分布が異なるといった共通性は見られなかった。また、コピー数は 1 コピーの株から最大 10 コピー保有する株まで様々であった。ドラフトゲノム配列のみ取得した株については、コピー数の同定には至らなかった。解析の結果、*astA* 遺伝子バリエーションは既知の 8 種類を含め、計 35 種類（図 2）存在することが明らかとなった。

(7) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

Roary による解析からコア遺伝子が 1,600 個同定され、アライメントの結果、informative SNP は 42,536 個同定された。その結果を基に作成した系統樹から、下痢症患者由来株

でドラフトゲノム解析を行った株が幅広い系統にまんべんなく分散し、系統間の偏りがなかったことが明らかとなった（図 3, 4）。

(8) *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

EAEC の病原因子として知られている凝集接着関連プラスミド (pAA プラスミド) や線毛、各種毒素などについて、その保有状況を調べた結果、多くは線毛と毒素を少なくとも 1 つずつ保有していることが分かった。しかしながら、ドラフトゲノム配列情報しかないため、当該遺伝子の局在（例えば、同じプラスミド上に複数の病原因子が存在するなど）に関する情報を得ることは出来なかった。また、線毛に関しては、既知のものとのアミノ酸配列相同性が 50-70% 程度の遺伝子が 3 種類同定された。

（倫理面への配慮）

該当しない。

D. 考察

本年度実施した下痢症患者由来大腸菌 (2,970 株) および NCBI データベース上の大腸菌株ゲノム (9,065 株) における *astA* 遺伝子保有頻度の解析から、約 7.5% (907 株) が当該遺伝子を保有していること、さらに保有株は大腸菌進化系統

の中で偏りが無いことが明らかとなった。加えて、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在し、その分布も染色体とプラスミドでバリエーションによる局在に差が見られないこと、コピー数も株により多様であることも明らかとなった。これら *astA* 遺伝子バリエーションの機能について、実際の分離株を用いた実験を実施予定であるが、今回行った 31 株のドラフトゲノム配列では、*astA* 遺伝子のコピー数や局在の詳細まで把握することが出来なかった。そのため、現在、MinION (Nanopore) を用いて全ゲノム配列決定にむけた解析を進めており、各株における *astA* 遺伝子に関する詳細を明らかにし、機能解析へ繋げる予定である。ゲノム情報を利用した疫学マーカーとなりうる病原関連遺伝子の同定については、本年度の解析により、*astA* 遺伝子保有株が多様な系統に分布していることが判明したため、全株に共通の因子を同定するのは困難と思われた。そのため、系統ごとに保存性の高い遺伝子を抽出し、それらの組み合わせを利用した検出系の構築を進める。それらが新規因子の場合は、分離株を用いて当該遺伝子の破壊株などを作製し、機能解析を行う。

また、EAEC に関しては、既知の病原関連因子と相同性を示す遺伝

子を複数同定した。今後、これらの遺伝子について新規病原関連遺伝子の可能性を含め、今後、その病原機構への関与を明らかにするため、培養細胞に対する野生株と遺伝子破壊株の感染実験やタンパク質局在についての解析を進める。

E. 結論

E. albertii の病原性大腸菌の各病原型について、ゲノム情報を基に、保存性が高く検出指標に適した病原関連遺伝子の同定とそれを利用した効果的検査法の開発を目指して解析を進めた。今年度は、臨床分離株、保菌株における各病原型株（主に *astA* 遺伝子保有株と EAEC）の分布と既知の病原因子レポーターの特性解明を中心に解析を実施した。特に *astA* 遺伝子保有株の解析では、その多様性や分布、株間でのコピー数の違いなど、機能を明らかにする上で検討すべき事項が数多く同定された。次年度は、MinION による全ゲノム配列情報の取得を進め、より詳細な情報を基盤として *astA* 遺伝子を含む病原関連因子の機能解析を行うとともに、疫学マーカーとなりうる遺伝子群の同定を進め、その研究成果を学会および国際雑誌等で報告することを目指す。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報
に該当するものはない。

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

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

各phylogroupの参照株

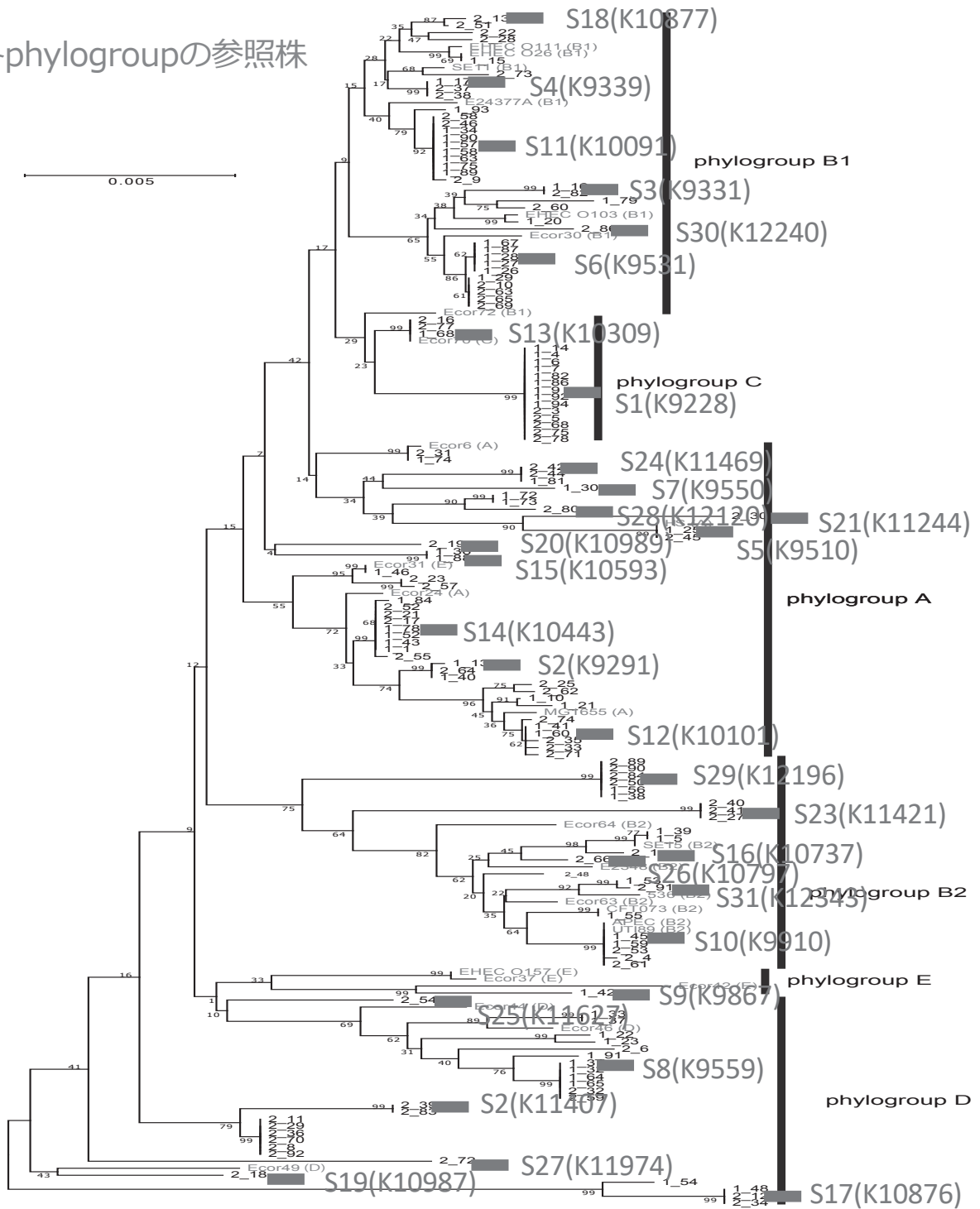


図1. MLSAによる *astA* 遺伝子保有大腸菌株の系統解析

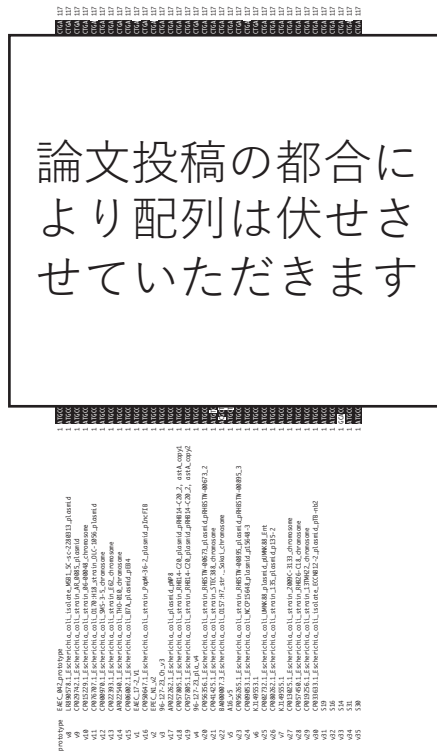


図2. 同定された35種類の*astA*遺伝子バリエーションのマルチプルアライメント

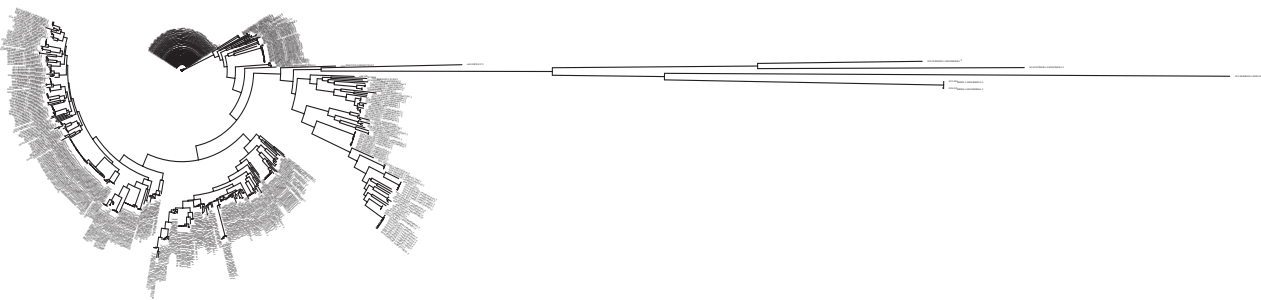


図3. コア遺伝子を用いた*astA*遺伝子保有株（907株）の進化系統樹



図4. コア遺伝子を用いた*astA*遺伝子保有株（907株）の進化系統樹（拡大図）

青字は大腸菌進化系統のphylogroupを示している。

表1. MiSeqを用いた*astA*遺伝子保有大腸菌31株の
ドラフトゲノム解析結果の概要

| strain name | No. of pair reads | sequence coverage | No. of scaffolds (>300 bp) | total length (bp) (>300 bp) |
|-------------|-------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| K9228 | 711,916 | 64 | 464 | 5,512,493 |
| K9291 | 748,626 | 72 | 238 | 5,036,673 |
| K9331 | 726,842 | 63 | 69 | 4,838,693 |
| K9339 | 677,580 | 56 | 102 | 5,131,569 |
| K9510 | 863,364 | 78 | 202 | 4,722,680 |
| K9531 | 653,133 | 56 | 189 | 5,229,048 |
| K9550 | 836,644 | 72 | 182 | 5,219,273 |
| K9559 | 821,188 | 70 | 102 | 5,266,830 |
| K9867 | 726,685 | 60 | 75 | 5,254,186 |
| K9910 | 650,356 | 53 | 122 | 5,378,142 |
| K10091 | 430,407 | 38 | 198 | 5,120,336 |
| K10101 | 961,440 | 90 | 144 | 4,959,481 |
| K10309 | 800,943 | 62 | 139 | 5,179,214 |
| K10443 | 861,337 | 68 | 282 | 5,486,044 |
| K10593 | 796,607 | 62 | 176 | 5,412,244 |
| K10737 | 763,669 | 66 | 67 | 5,163,106 |
| K10876 | 935,021 | 68 | 299 | 6,059,351 |
| K10877 | 786,642 | 61 | 156 | 5,234,515 |
| K10987 | 800,648 | 65 | 107 | 5,075,336 |
| K10989 | 693,342 | 62 | 64 | 5,008,825 |
| K11244 | 702,871 | 61 | 106 | 5,115,318 |
| K11407 | 611,343 | 51 | 130 | 5,369,318 |
| K11421 | 414,786 | 39 | 77 | 4,929,648 |
| K11469 | 1,034,279 | 96 | 116 | 4,936,622 |
| K11627 | 758,454 | 64 | 192 | 5,064,133 |
| K11797 | 732,321 | 61 | 62 | 5,160,203 |
| K11974 | 619,202 | 53 | 85 | 5,142,029 |
| K12120 | 741,686 | 65 | 584 | 5,378,463 |
| K12196 | 802,784 | 67 | 99 | 5,081,272 |
| K12240 | 788,968 | 66 | 108 | 5,087,851 |
| K12343 | 841,346 | 73 | 26 | 4,790,472 |

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

伊豫田 淳

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

研究分担者 伊豫田 淳 国立感染症研究所

研究要旨

astA 保有大腸菌に特徴的な系統や病原性因子を明らかにするために、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムを用いて、同遺伝子保有株を検索した。その結果、約 3% で同遺伝子の保有が認められた。このうち、026:H11 および 0115:H10 では比較的高い保有率が認められた。同遺伝子の多くは IS1414 上に存在しており、様々な系統の株が水平伝播により獲得していることが示唆された。また、2020 年に大規模な食中毒から分離された大腸菌について、近縁株ゲノムを公共データベースから抽出し、系統解析等を行った。その結果、直接的な関連性が疑われる近縁株は見出されなかった。

研究協力者

国立感染症研究所
地方衛生研究所等

窪村亜希子、李 謙一

A. 研究目的

人に下痢等の消化器症状を引き起こす下痢原性大腸菌には、保有する病原性因子等によって腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）、腸管凝集性大腸菌（enteroaggregative *E. coli*: EAEC）等に分類される。EHEC では志賀毒素やその遺伝子の保有、EAEC では凝集性線毛のレギュレー

ター遺伝子（*aggR*）等が分類の指標となるが、既知のいずれの病原型にも属さない大腸菌が下痢症患者から分離されることがある。このうち、EAEC heat stable toxin (EAST1) をコードする遺伝子（*astA*）は既知の病原性遺伝子を保有しないが下痢症を起こしたと推定される大腸菌や、一部の EHEC から検出されることが分かっている。しかし、ゲ

ノム情報を利用した体系的な *astA* の分布調査は行われていない。そこで、国立感染症研究所・細菌第一部でゲノム解読を行った国内分離大腸菌を対象に、*astA* の分布や周辺領域の解析を行った。また、*astA* 保有大腸菌が原因と考えられる食中毒事例由来株の国際比較を行った。

B. 研究方法

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

2007 年から 2021 年に国内で分離された大腸菌等 (*E. albertii* を含む主として腸管出血性大腸菌 [EHEC]) 計 3,613 株を解析対象とした。一部の株については、以下の方法で新たに WGS 情報を解読した：ゲノム DNA 抽出を行い、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを用いて、HiSeqX (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes によるアセンブリを行いドラフトゲノムを得た。ドラフトゲノムを対象にして、BLAST 検索によって *astA* の検出を行った。*astA* の検出は次の基準で行った：VirulenceFinder

(<https://cge.food.dtu.dk/servi>

[ces/VirulenceFinder/](https://cge.food.dtu.dk/servi)) に登録されている既知の 12 種の配列と 98%以上の相同性、全長 (117 bp) が検出、およびストップコドンが配列中に存在しない。上記 12 種と異なる配列については新規型とした。

(2) *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

既存の *astA* 検出用プライマー (EASTOS1 および EASTOAS2) と、既知および新規の *astA* 配列を比較し、全ての型を検出可能なプライマーを設計した：*astA*-univ-F1 (5' - GYCATCAACRCAGTATATYCG-3')
astA-univ-R1 (5' - TCRCGAGTGACKRCYYTGTA-3')。設計したプライマーを用いて、*astA* 保有株および非保有株のそれぞれ 32 株を用いて同遺伝子の検出を行った。

(3) 大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較

2020 年に 2,958 名の患者が報告された、学校給食を原因とする食中毒事例で分離された大腸菌 07:H4 の由来等を究明するために、公共データベースに存在する近縁株との類縁関係を解析した。Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) へ登録されている大腸菌 07:H4 計 199 株のゲノムデータをダウンロードし、上記食中毒由来株

と共に BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインにて SNP を抽出し、系統解析を行った。

C. 研究結果

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

国内で分離された大腸菌（主として EHEC）ゲノムを用いて *astA* の保有状況を調べた結果、供試菌株の約 3%において同遺伝子の保有が認められた（表 1）。血清型別にみると、026:H11 および 0115:H10 においてそれぞれ 19.0%および 34.5%と比較的高率に保有することが明らかとなった。*astA* 配列を解析したところ、新規に 11 種の変異型を同定し、暫定的な型名（X01-11）を付与した。また、8 割以上の株において、*astA* は IS1414 のトランスポゼース配列中に含まれていた。

astA 陽性株の病原性因子を検索したところ、大部分は志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有していた。*stx* 保有株の大部分は III 型分泌装置をコードする遺伝子群（locus of enterocyte effacement: LEE）を保有していた。しかし、0115:H10 や 07:H4 等では主要な LEE などの細胞附着因子や他の毒素遺伝子等を保有しない株も多数認められた（表 1）。

比較的高率に *astA* を保有していた 026:H11 および 0115:H10 について、保有状況と系統との関係を調べた。026:H11 では、*astA* 保有株の内 45 株（86.5%）が同一の系統に属していた。本系統では、*astA* は ISIS1414 上に存在せず、祖先株が同遺伝子を獲得して垂直伝播している可能性が示唆された。0115:H10 は、系統の大きく異なる ST10 および ST101 に分けられる。*astA* 保有株はいずれも ST10 に属しており、同 ST の菌株はいずれも *astA* を保有していた。

(2) *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

既知および新規の *astA* 配列と既存の *astA* 検出用プライマー（EASTOS1 および EASTOAS2）配列を比較したところ、*astA* 08 および 11 において 3' 末端領域に単一塩基置換が認められた。このため、主に 3' 領域に混合塩基を加えた *astA*-univ-F1 および *astA*-univ-R1 を設計した。*astA* 保有および非保有株で検証を行ったところ、それぞれ全て陽性および陰性の結果となった。

(3) 大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較

公共データベース上に存在する全ての大腸菌 07:H4 のゲノム情報を用いて、系統解析を行った。食中

毒由来株の近縁株計 49 株からなる系統樹を図 1 に示す。食中毒由来株と最も近縁となったのは、カタール由来株で 20-21 か所の SNP が認められた。次にレバノン由来株が 22-23 か所の SNP が認められた。さらに、タンザニアおよび中国由来株との間には約 60 か所の SNP が認められた。中国株は下痢症からの分離との情報があったが、その他の株では臨床情報は得られなかった (表 2)。

D. 考察

国内で分離された大腸菌ゲノムの解析では、約 3% で *astA* が認められた。ただし、今回の解析対象の 90% 以上は *stx* を有する EHEC であり、他の病原性大腸菌や非病原性大腸菌では分布が異なる可能性がある。同遺伝子は多くの場合、IS 上に存在しており、多様な系統へ水平伝播していると考えられた。一方、O26:H11 の一部の系統や O115:H10 ST10 のように、垂直伝播によって同遺伝子が保持されている例も見られた。また、*astA* 配列には多型が認められ、今後これらの発現状況を明らかにする必要がある。

大規模食中毒由来大腸菌 O7:H4 の国際ゲノム比較では、比較的近縁な菌株が中東、アフリカおよび中国で見いだされた。これらの株につい

ての疫学情報は入手できなかったため、直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

E. 結論

astA は国内分離大腸菌にも広く分離していることが明らかとなった。同遺伝子や周辺領域の配列には多型が認められたことから、発現状況や病原性への関与についてより詳細に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Kashima K, Sato M, Osaka Y, Sakakida N, Kando S, Ohtsuka K, Doi R, Chiba Y, Takase S, Fujiwara A, Shimada S, Ishii R, Mizokoshi A, Takano M, Lee K, Iyoda S, Honda A. 2021. An outbreak of food poisoning due to *Escherichia coli* serotype O7:H4 carrying *astA* for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin1 (EAST1). *Epidemiol Infect* 149:e244.

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

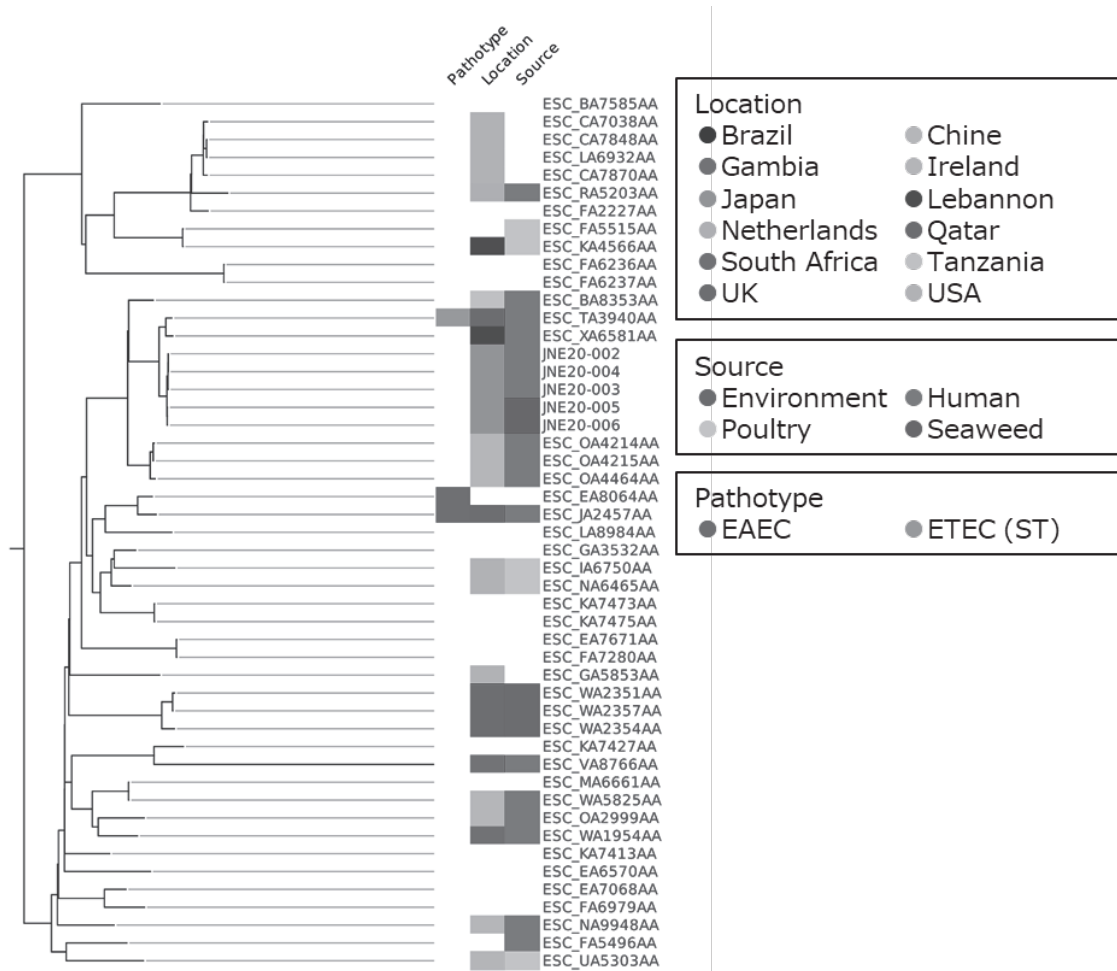


図 1. 大腸菌 O7:H4 の SNP による最尤法系統樹
 食中毒由来株と近縁な 49 株の系統樹。右側のカラムは分離国、分離株の由来、
 pathotype を示す。

表 1. 国内大腸菌における *astA* 保有状況

| 血清型 | 菌株数 | <i>astA</i> 保有株数(%) | Phylogenetic group | MLST | 主な病原性因子 | <i>stx</i> subtype | <i>astA</i> subtype |
|-----------|-------|---------------------|--------------------|------|-----------|--------------------|---------------------|
| O26:H11 | 274 | 52 (19.0) | B1 | 21 | LEE | 1a,2a,1a2a | 4,5,X01,X07,X09 |
| O115:H10 | 29 | 10 (34.5) | A | 10 | | 1a | X05 |
| O109:H21 | 9 | 9 (100) | B1 | 40 | LEE | 2f | X06 |
| O63:H6 | 9 | 8 (88.9) | B2_UT | 583 | LEE | 2f | 4 |
| O157:H7 | 1,368 | 3 (0.2) | E | 11 | LEE | 1a2a | 4,X03 |
| O7:H4 | 3 | 3 (100) | A | 484 | | stx(-) | X08 |
| O103:H25 | 41 | 2 (4.9) | B1 | 343 | LEE | 1a,2a | 4,X01 |
| O121:H10 | 2 | 2 (100) | B1 | 641 | F18 | 2e | 4 |
| O121:H19 | 153 | 2 (1.3) | B1 | 655 | LEE | 2a | 4 |
| O133:H39 | 2 | 2 (100) | B2_IV | UT | | stx(-) | X04 |
| O156:H1 | 2 | 2 (100) | B2_UT | 941 | LEE | stx(-) | X10 |
| O103:H2 | 176 | 1 (0.6) | B1 | 17 | LEE | 1a | X03 |
| O111:H8 | 1,020 | 1 (0.1) | B1 | 1792 | LEE | 1a | 4 |
| O115:HUT* | 1 | 1 (100) | - | 2819 | LEE | 2f | 4,5 |
| O123:H36 | 5 | 1 (20.0) | A | 10 | LEE | 1a | 5 |
| O15:H16 | 1 | 1 (100) | A | 325 | ST | 2g | 4 |
| O159:H16 | 1 | 1 (100) | A | 3630 | ST | 2e | X02 |
| O183:H18 | 5 | 1 (20.0) | UT | 657 | eibG, sub | 2a | 1 |
| O8:H9 | 1 | 1 (100) | C | 23 | | 2e | 4 |
| OUT:H11 | 9 | 1 (11.1) | B1 | 21 | LEE | 1a2a | X01 |
| OX18:H28 | 1 | 1 (100) | B1 | 1056 | | 1d | X03 |
| 計 | 3,613 | 105 (2.9) | | | | | |

**E. albertii*

表 2. 2020 年食中毒由来 O7:H4 株と最も近縁な株の情報

| Accession no. | SNP* | 由来 | 分離年 | 分離国 | 症状 |
|---------------|-------|-------|-----------|----------|------|
| ESC_TA3940AA | 20-21 | Human | 2018 | Qatar | NA † |
| ESC_XA6581AA | 22-23 | Human | 2018-2019 | Lebanon | NA |
| ESC_BA8353AA | 59-60 | Human | 2009 | Tanzania | NA |
| ESC_OA4215AA | 63-64 | Human | 2017 | China | 下痢 |
| ESC_OA4214AA | 64-65 | Human | 2017 | China | 下痢 |
| ESC_OA4464AA | 65-66 | Human | 2017 | China | NA |

*2020年食中毒由来O7:H4株とのSNP距離

† NA, not available

分 担 研 究 報 告 書

食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法

大西 貴弘

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法

研究分担者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

astA 遺伝子保有大腸菌を中心とした病原大腸菌の食品への汚染状況および汚染経路等には不明な点が多く残されている。これらを明らかにするために食品における病原大腸菌の汚染実態調査を開始した。今年度は鶏肉 31 検体、豚肉 22 検体、牛肉 24 検体、野菜 99 検体、魚介類 70 検体、乾物 5 検体を調査した。鶏肉での汚染率が高く、鶏肉は 31 検体全てで *astA* がスクリーニング PCR で陽性となった。その内、21 検体が同時に *eae* も陽性となった。部位別では、もも肉で 100% (6/6)、ササミで 80% (4/5)、むね肉で 53% (8/15) の検体が *astA* と *eae* が同時にスクリーニング陽性となり、もも肉、ササミはむね肉に比べて、*eae* 陽性率が高かった。魚介類では 8.6% (6/70) で *astA* がスクリーニング陽性となった。特に、40% (4/10) のエビで *astA* がスクリーニング陽性となった。野菜では、5% (5/99) で *astA* 単独、1% (1/99) で *astA* と *eae* がスクリーニング陽性となった。その内、60% (3/5) のオクラが *astA* 陽性となった。今回の結果から、牛肉以外にも鶏肉、豚肉、エビ、オクラも大腸菌食中毒の原因食品となりうることが示唆された。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌はその発症メカニズムや保有する病原因子によって、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素原生大腸菌 (ETEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) などに大きく分けられる。しかし、これらの分類に属さない下

痢原性大腸菌による食中毒事例が多発している。特に *astA* (EAST1: 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1) 保有株による事例の増加が著しく、対策が求められている。しかし、多くの *astA* 保有株による事例で、原因食品が不明となっているため、予防対策の確立が困難となっている。また、*astA* 保有株

による事例だけでなく、腸管凝集付着性大腸菌、腸管病原性大腸菌による事例でも同様に、原因食品が明らかになっていないものが多い。効果的な予防対策を確立するためには、汚染食品、汚染経路を明らかにする必要がある。これまでに、食品における *astA* 保有大腸菌の汚染調査が行われている。しかし、調査食品のカテゴリーが偏っていたり、検体数が不足していたりするものが多く、結果として *astA* 保有大腸菌の汚染食品、汚染経路について不明な点が多く残されたままとなっている。本研究では、*astA* 保有大腸菌を中心とした下痢病原性大腸菌の汚染食品や汚染経路を明らかにするために、食品における汚染大腸菌の病原遺伝子保有状況の調査を行い、合わせて菌分離を行った。調査を行うにあたっては、調査食品のカテゴリーに偏りが出ないように注意を払った。また、調査終了後に統計学的な解析を行い、カテゴリー間の汚染状況を比較するのに十分な検体数を調査することを目標とした。

B. 研究方法

[1] 検体

調査に使用した検体は、神奈川県内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した。検体は購入後、4℃

で保管し、24時間以内に試験に供した。

[2] 検査手順

検査手順を図1に示す。検体 25 g を無菌的にストマッカー袋に採取した。mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、2 分間、ストマッカー処理した。その後、ストマッカー袋ごと 42℃、22～24 時間、増菌培養を行った。培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして、スクリーニング PCR を行い、大腸菌の病原因子の検出を行なった。何らかの病原因子が検出された場合、クロモアガーECC（CHROMagar）3 枚に増菌培養液を塗抹し、37℃、24 時間培養した。スクリーニング PCR で、病原因子が検出されなかった場合、試験はここで終了した。培養が終わったクロモアガーECC から、大腸菌を示す青いコロニーを TSA 寒天培地に塗抹し、コロニーPCR によって病原因子を再度確認した。コロニーを塗抹した TSA 寒天培地は 37℃、24 時間培養後、4℃で保管した。コロニーPCR によって病原因子を確認できた菌株は、TSI 培地（栄研化学）、API（ビオメリュー）、AXIMA 微生物同定システム（島津製作所）などで大腸菌であることを確認し、カジットン培地に接種し、保管した。

[3]スクリーニング PCR

大腸菌の病原因子の検出は、Müllerらの方法 (Appl. Environ. Microbiol, 2007, 73, 3380-3390) を改良したマルチプレックス PCR 法で行った。このマルチプレックス PCR で対象とした遺伝子を表 1 に示す。マルチプレックス PCR は、200 μ L の反応チューブで行った。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5 μ L、それぞれのプライマー (表 2) を 0.2 μ M ずつ、DNA テンプレート 2 μ L から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μ L に調整した。反応は、94 $^{\circ}$ C、2 分の後、94 $^{\circ}$ C、30 秒、63 $^{\circ}$ C、30 秒、68 $^{\circ}$ C、1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68 $^{\circ}$ C、5 分の反応を行った。反応終了後、PCR 産物 10 μ L を 2% のアガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。ゲルを SYBR safe gel staining (ThermoFisher Scientific) で染色後、特異的なバンド (図 2、表 2) を確認し、遺伝子の有無を調べた。*escV* (LEE 領域のマーカー) が陽性となった場合、*eae* 特異的 PCR を行い、*eae* の保有を確認した。プライマー (Hidaka *et al.*; J. Applied. Microbiol., 2009, 106, 410-420) は *eae*-F (5' - CCGATTCCCTCTGGTGACGA-3') と *eae*-

R (5' -CCACGGTTTATCAAACCTGATAACG-3') を用いた。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5 μ L、プライマー (*eae*-F および *eae*-R) それぞれを 0.2 μ M ずつ、DNA テンプレート 2 μ L から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μ L に調整した。反応は、94 $^{\circ}$ C、2 分の後、94 $^{\circ}$ C、30 秒、55 $^{\circ}$ C、30 秒、68 $^{\circ}$ C、1 分のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68 $^{\circ}$ C、5 分の反応を行った。反応後、PCR 産物 10 μ L を 2% のアガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。ゲルを SYBR safe gel staining (ThermoFisher Scientific) で染色後、591 bp のバンドを確認できた場合 *eae* 陽性と判断した。

C. 研究結果

[1]スクリーニング検査

汚染実態調査に使用した検体は、食肉 77 検体、野菜 99 検体、魚介類 70 検体、乾物 5 検体であった。食肉の内訳は鶏肉 31 検体、豚肉 22 検体、牛肉 24 検体、計 251 検体であった。野菜の内訳は表 3 に示したとおりで、今回はスプラウト、ほうれん草、小松菜が多かった。魚介類の内訳は、魚 39 検体、エビ 17 検体、貝 12 検体、イカ 2 検体であった。

本研究では、検体を mEC 培地中で増菌培養を行い、培養液から抽出した DNA をテンプレートとしたマルチプレックス PCR によって、大腸菌の病原遺伝子のスクリーニングを行った。マルチプレックス PCR は、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を含む 11 遺伝子を対象とした (表 1、図 2)。

スクリーニング PCR の結果を表 4 に示す。251 検体中、何らかの病原遺伝子が陽性となったのは 55 検体 (22%) であった。*astA* は 55 検体全てで陽性となった。*eae* は 251 検体中 26 検体 (10%)、*stx2* は 2 検体 (0.8%)、*elt* は 2 検体 (0.8%)、*estIa* は 1 検体 (0.4%) がそれぞれ陽性となった。他の遺伝子は検出されなかった。

食肉では 77 検体中、43 検体がスクリーニング PCR 陽性となった (表 4)。鶏肉では、31 検体全てで *astA* が陽性となった。*astA* 単独陽性が 8 検体、*astA* と *eae* が陽性になった検体が 21 検体、*astA* と *elt* が陽性となったのが 2 検体であった。鶏肉の産地や冷凍状況と特定遺伝子の陽性との間に傾向は認められなかった (表 5)。しかし、*eae* 陽性と鶏肉の部位との関連性を見てもみると、モモは 6 検体中 6 検体が *eae* 陽性 (100%)、ササミは 5 検

体中 4 検体が陽性 (80%) であるのに対して、ムネは 15 検体中 8 検体陽性 (53%) と、ムネにおける *eae* 陽性率が低かった (表 6)。

豚肉では 22 検体中 6 検体が *astA* 陽性であった (表 7)。この内、1 検体は同時に *eae* も陽性になった。産地や冷凍状況と陽性との間に関連性は認められなかった。しかし、*astA* 陽性 6 検体中 4 検体 (67%) がミンチ肉であった。

牛肉では 24 検体中 6 検体が *astA* 陽性となった (表 8)。2 検体が *astA* 単独陽性、2 検体が *astA* と *eae* 陽性、1 検体が *astA*、*stx2*、*estIa* 陽性、1 検体が *ast*、*eae*、*stx2* が陽性であった。産地や冷凍状況と特定遺伝子陽性との関連性は認められなかった。しかし、*astA* 陽性 6 検体中 4 検体は内臓肉、1 検体はタンであった。また、*stx2* が検出された 2 検体は内臓肉であった。

魚介類では 70 検体中 6 検体 (8.6%) が *astA* 陽性であった。エビは 10 検体中 4 検体 (40%)、サバは 2 検体中 1 検体 (50%)、スズキは 1 検体中 1 検体 (100%) が陽性であった。

野菜では 99 検体中 6 検体 (6.1%) が *astA* 陽性であった。この内、1 検体は *eae* も同時に陽性となった。

オクラは 5 検体中 3 検体 (60%)、カイワレは 8 検体中 1 検体 (12.5%)、ほうれん草は 14 検体中 2 検体 (14%) が陽性となった。

乾物は 5 検体全てが陰性となった。

[2] 菌分離

スクリーニング PCR で陽性になった増菌培養液をクロモアガー ECC に塗抹し、40 個のコロニーを分離し、遺伝子保有状況をマルチプレックス PCR で確認した。菌分離結果を表 9 に示す。鶏肉からは 36 株が分離された。*astA* 単独保有株が 30 株、*astA*、*eae* 保有株が 2 株、*eae* 単独保有株が 2 株、*astA*、*estIa* 保有株が 1 株、*estIa* 単独保有株が 1 株分離された。また、*astA*、*eae* スクリーニング陽性検体から *astA*、*eae* 保有株と *eae* 単独保有株が同時に分離された。同様に *astA*、*estIa* スクリーニング陽性検体から、*astA*、*estIa* 保有株と *estIa* 単独保有株が同時に分離された。

豚肉ではスクリーニングで 6 検体が陽性であったが、菌株を分離することはできなかった。牛肉からは *astA*、*eae* 保有株を 1 株分離した。スクリーニングで認められた *stx2* 保有株は分離できなかった。魚介類および野菜からは *astA*

単独保有株をそれぞれ 3 株分離した。

D. 考察

今年度調査を行った 251 検体の内、55 検体で *astA* が検出され、*astA* が多くの大腸菌株で保有されている実態が明らかになった。特に鶏肉における *astA* 汚染率が高く、試験に供した 31 検体全てから *astA* が検出された。また、スクリーニングだけでなく、鶏肉からは多くの *astA* 保有株が分離された。一方で、牛肉からは 24 検体中 6 検体で *astA* が陽性となっただけである。以上の結果から、鶏肉も病原大腸菌による食中毒の原因食品になりうることを示唆された。しかし、今回の結果から、鶏肉における *astA* の検出率は 100% である。*astA* の病原性については不明な点が多いが、*astA* 保有株による食中毒事例が多く報告されるようになってきている。もし病原因子として *astA* だけを保有している大腸菌株が食中毒原因菌となりうるのであれば、鶏肉を原因食とする *astA* 単独保有株による食中毒事例がもう少し報告されても良いと思われる。*astA* 以外にも未知の病原因子が関与しているのかもしれない。今後、さらに調査が必要と考えられた。

今回の結果で、*astA*の次に多く検出されたのは *eae* であり、31 検体中 21 検体から検出された。鶏肉の部位別陽性率を見てみると、ムネにおける *eae* 陽性率は、他の部位に比べて低かった。このような部位によって *eae* 陽性率に差が出た原因は今回の調査では明らかにできなかった。また、検体数も少ないため、今後さらに検体数を増やし検討を行なっていきたい。

豚肉では 22 検体中 6 検体で *astA* が検出された。この内、4 検体はミンチ肉であったことから、これらの汚染はミンチ肉の加工段階での汚染である可能性も示唆された。また牛肉では 24 検体中 6 検体がスクリーニング陽性となった。*astA* や *eae* 以外に *stx2*、*estIa* が検出され、今回の調査では最も多種類の病原遺伝子が検出された。6 検体中 4 検体は内蔵肉で、*astA*、*eae*、*stx2*、*estIa* が検出された。腸管などの内臓から検出されたため、おそらく、それぞれの牛個体が保菌していた大腸菌がこれらの遺伝子を保有していたものと考えられた。

魚介類では、エビの *astA* 陽性率が高かった。また、野菜ではオクラの *astA* 陽性率が高かった。これらのことから、エビやオクラも大腸菌食中毒の原因食品となりうる可能

性が示唆された。これまでの報告で、エビからは大腸菌以外の多くの病原細菌が分離されていることから、エビ養殖の衛生状態は必ずしも良くないのではないかと考えられる。

今回調査したオクラ 5 検体中 1 検体が国産で、残りは外国産であった。今回陽性となったオクラは全て外国産であった。今回の調査は秋から春にかけて行ったため、国産のオクラはまだほとんど流通していなかった。今後さらに検体数を増やし、国産と外国産の汚染率を比較したい。

検体のスクリーニング以外に、増菌培養液から菌分離を行ったが、*astA* 以外の遺伝子を保有している菌株の分離率は低かった。なるべく多種の菌株を分離できるように、増菌培養、分離培養方法をさらに検討する必要があると思われた。

E. 結論

本年度から *astA* 保有大腸菌を中心とした病原大腸菌の汚染実態調査を開始した。*astA* 保有大腸菌の汚染は、食肉、特に鶏肉において著しく認められた。また、陽性率は低いものの、野菜や魚介類においても *astA* 保有大腸菌の汚染が認められた。今後さらに調査を継続し、食品における病原大腸菌の汚染実態を

明らかにしていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi T., Hara-Kudo Y.

Presence and quantification of
pathogenic *Arcobacter* and
Campylobacter species in retail
meats available in Japan. Lett.
Appl. Microbiol. 2021. 73:81-87

2. 学会発表

市販食肉中におけるアルコバク
ター属菌とカンピロバクター属菌の
定量. 大西貴弘、工藤由起子. 第
117回日本食品衛生学会学術講演会
(2021.10.26)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

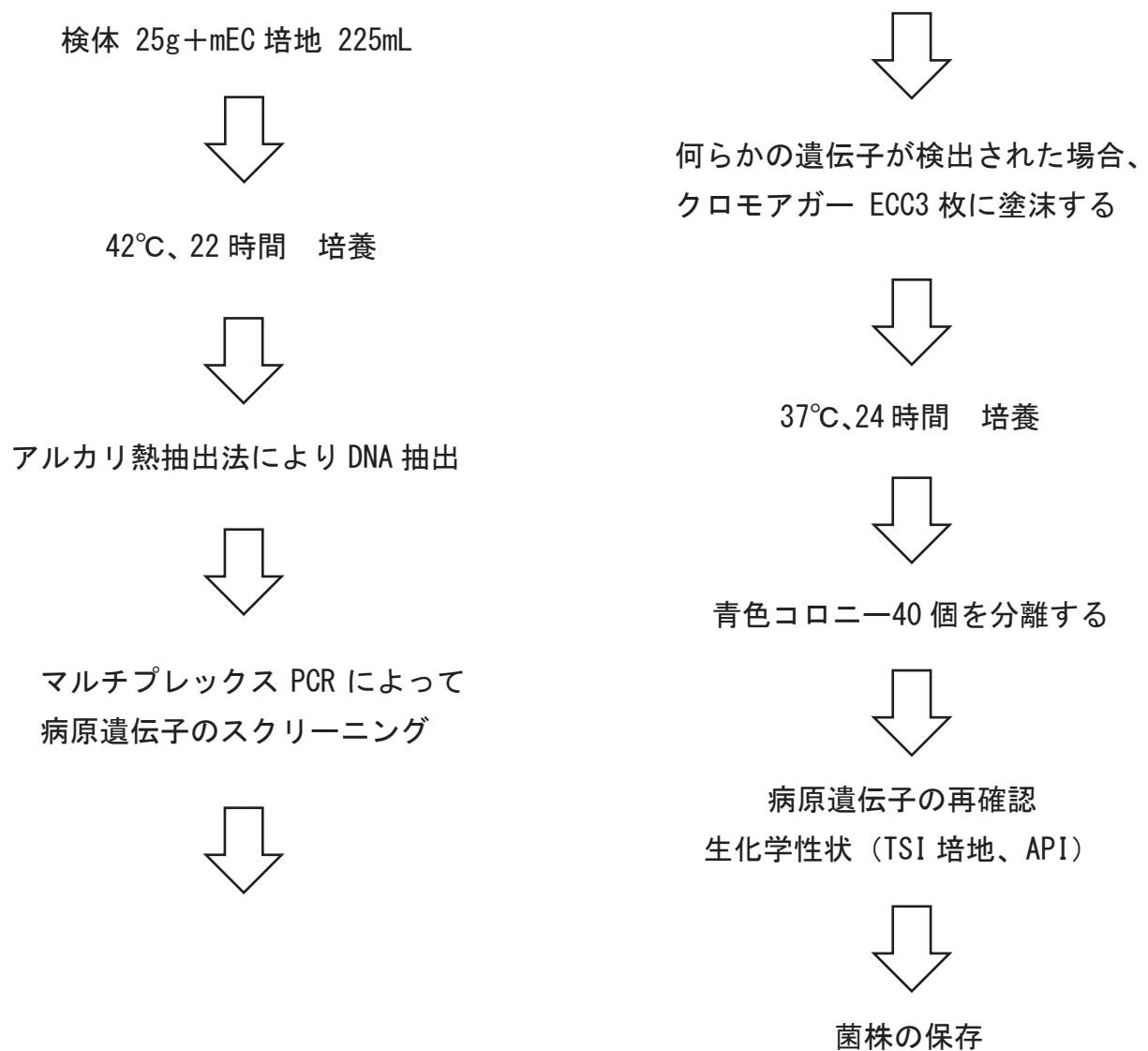
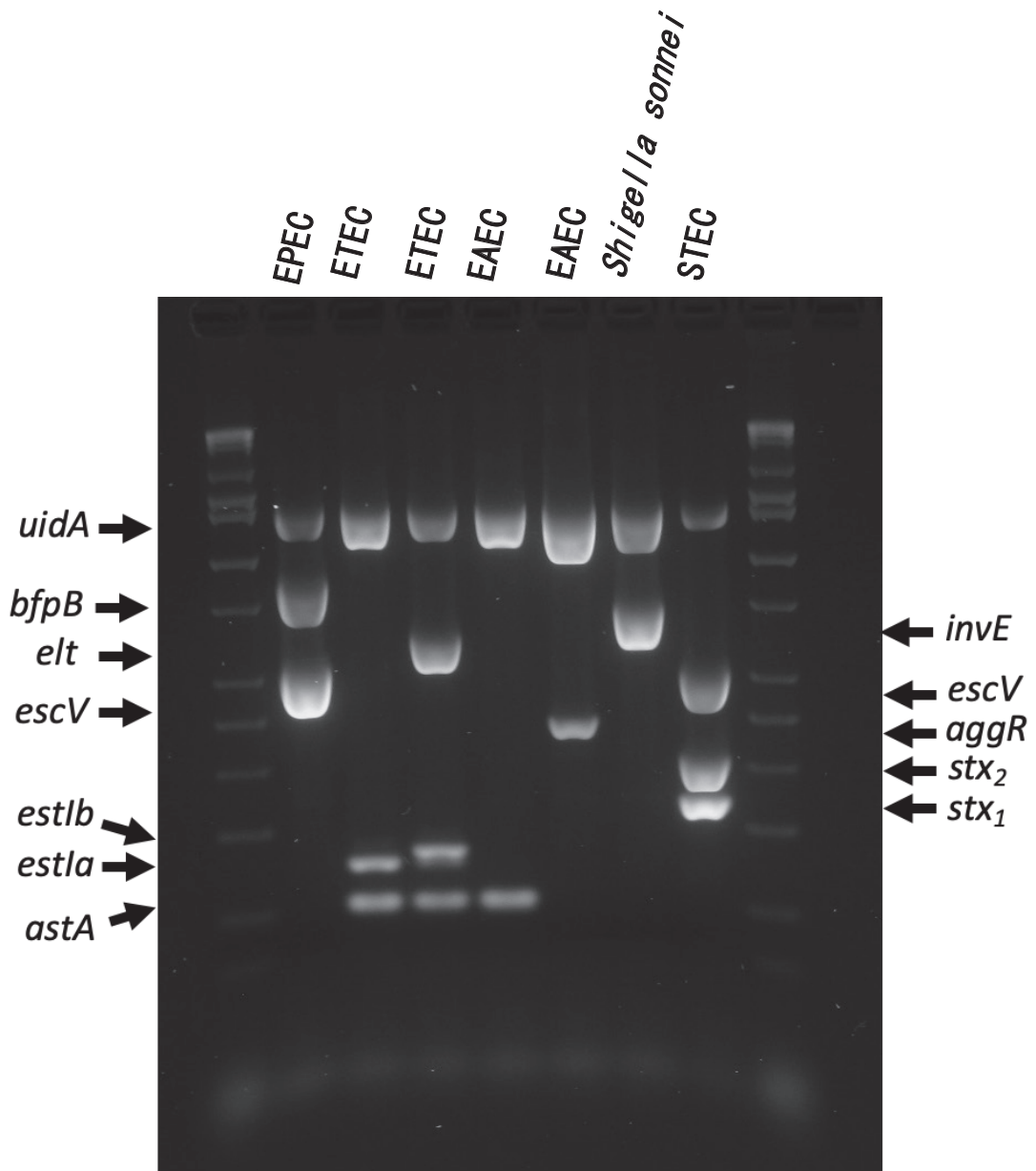


図1 検査手順



Mueller *et al.* Appl Environ Microbiol. 2007, 73, 3380-3390

図2 スクリーニング

表1 スクリーニング対象遺伝子

| | |
|------------------------|-----------------------|
| <i>uidA</i> | β-グルクロニダーゼ |
| <i>eae</i> | 局在付着因子 |
| <i>escV</i> | LEEのマーカ |
| <i>bfpB</i> | 集束形成線毛 |
| <i>stx₁</i> | 志賀毒素 |
| <i>stx₂</i> | 志賀毒素 |
| <i>elt</i> | 易熱性エンテロトキシン |
| <i>estIa</i> | 耐熱性エンテロトキシン |
| <i>estIb</i> | 耐熱性エンテロトキシン |
| <i>invE</i> | 組織侵入性因子 |
| <i>aggR</i> | 凝集付着性因子 |
| <i>astA</i> | 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン |

表2 スクリーニング PCR 用プライマー

| 標的遺伝子 | 配列 (5' →3') | 増幅産物 サイズ (bp) | 濃度 (μ M) |
|--------------|---|---------------------|------------------|
| <i>escV</i> | ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC | 544 | 0.2 |
| <i>bfpB</i> | GACACCTCATTGCTGAAGTCG CCAGAACACCTCCGTTATGC | 910 | 0.2 |
| <i>stx1</i> | GATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC AATGCCACGCTTCCCAGAATTG | 244 | 0.2 |
| <i>stx2</i> | GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC | 324 | 0.2 |
| <i>elt</i> | GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG CTTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC | 655 | 0.2 |
| <i>estIa</i> | CCTCTTTTAGYCAGACARCTGAATCASTTG CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG | 157 | 0.2 |
| <i>estIb</i> | TGTCTTTTTCACCTTTCGCTC CGGTACAAGCAGGATTACAACAC | 171 | 0.2 |
| <i>invE</i> | CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC | 766 | 0.2 |
| <i>astA</i> | TGCCATCAACACAGTATATCCG ACGGCTTTGTAGTCCTTCAT | 102 | 0.2 |
| <i>aggR</i> | ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG AATACAGAATCGTCAGCATCAGC | 400 | 0.2 |
| <i>uidA</i> | ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG | 1487 | 0.2 |

表3 野菜検体の内訳

| 種類 | 検体数 |
|--------------|-----|
| スプラウト | 22 |
| ほうれん草・小松菜 | 19 |
| キノコ | 9 |
| レタス | 7 |
| 根野菜 | 6 |
| アスパラ | 5 |
| オクラ | 5 |
| トマト | 5 |
| マメ | 5 |
| キュウリ | 4 |
| ブロッコリ・カリフラワー | 3 |
| キャベツ | 2 |
| ネギ・ニラ | 2 |
| その他 | 5 |

表4 スクリーニング PCR 陽性検体

| | 検体 | | | | | | |
|------------------------------|-------|------|------|------|------|-----|--------|
| | 鶏肉 | 豚肉 | 牛肉 | 魚介類 | 野菜 | 乾物 | 計 |
| astA | 8/31 | 5/22 | 2/24 | 6/70 | 5/99 | 0/5 | 26/251 |
| astA+eae | 21/31 | 1/22 | 2/24 | 0/70 | 1/99 | 0/5 | 25/251 |
| astA+elt | 2/31 | 0/22 | 0/24 | 0/70 | 0/99 | 0/5 | 2/251 |
| astA+stx ₂ +estIa | 0/31 | 0/22 | 1/24 | 0/70 | 0/99 | 0/5 | 1/251 |
| astA+eae+stx ₂ | 0/31 | 0/22 | 1/24 | 0/70 | 0/99 | 0/5 | 1/251 |
| 計 | 31/31 | 6/22 | 6/24 | 6/70 | 6/99 | 0/5 | 55/251 |

表5 鶏肉におけるスクリーニング PCR の結果

| 部位 | 産地 | 冷凍状況 | 遺伝子 | | | | | | | | | |
|-----|------|------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | <i>eae</i> | <i>bfpB</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>elt</i> | <i>estIa</i> | <i>estIb</i> | <i>invE</i> | <i>astA</i> | <i>aggR</i> |
| モモ | 国産 | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 国産 | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 宮崎県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 宮崎県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | 岩手県 | 冷凍 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| ムネ | 岩手県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ムネ | ブラジル | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | 岩手県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 手羽 | 国産 | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 手羽 | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| セセリ | 北海道 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ササミ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ササミ | 国産 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ササミ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| ササミ | 宮崎県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ササミ | 岩手県 | 不明 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |

表6 鶏肉の部位別 *eae* 陽性検体数

| 部位 | 陽性数/検体数(陽性率) |
|-----|--------------|
| モモ | 6/6 (100%) |
| ムネ | 8/15 (53%) |
| ササミ | 4/5 (80%) |
| 手羽 | 2/2 (100%) |
| セセリ | 1/1 (100%) |
| 内蔵 | 1/2 (50%) |

表7 豚肉におけるスクリーニング PCR の結果

| 部位 | 産地 | 冷凍 状況 | 遺伝子 | | | | | | | | | | |
|-----|---------|----------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|---|
| | | | <i>eae</i> | <i>bfpB</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>elt</i> | <i>estIa</i> | <i>estIb</i> | <i>invE</i> | <i>astA</i> | <i>aggR</i> | |
| ロース | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | 鹿児島 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | 宮崎県 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | 鹿児島 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | カナダ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ロース | イタリア | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| モモ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| モモ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ミンチ | 国産 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ミンチ | 国産、メキシコ | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| その他 | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | メキシコ | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

表8 牛肉におけるスクリーニング PCR の結果

| 部位 | 産地 | 冷凍 状況 | 遺伝子 | | | | | | | | | | |
|-----|--------------|----------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|---|
| | | | <i>eae</i> | <i>bfpB</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>elt</i> | <i>estIa</i> | <i>estIb</i> | <i>invE</i> | <i>astA</i> | <i>aggR</i> | |
| ロース | アメリカ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| モモ | オーストラリア | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| モモ | 北海道 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| モモ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| カルビ | 北海道 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| タン | アメリカ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | アメリカ | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | 国産 | 冷凍 | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | 国産 | 不明 | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| 内蔵 | 北海道 | 冷凍 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| ミンチ | オーストラリア | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ミンチ | オーストラリア | 冷凍 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | 北海道 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | 北海道 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| その他 | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | アメリカ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | オーストラリア | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | オーストラリア | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | アメリカ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | オーストラリア、アメリカ | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| その他 | 国産 | 不明 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

表9 分離菌株数

| | 検体 | | | | | | 計 |
|------------|----|----|----|-----|----|----|----|
| | 鶏肉 | 豚肉 | 牛肉 | 魚介類 | 野菜 | 乾物 | |
| astA | 30 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 36 |
| eae | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| astA+eae | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| estla | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| astA+estla | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 計 | 36 | 0 | 1 | 3 | 3 | 0 | 43 |

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|----------------------------|-------|---------|------|
| Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. | Detection of <i>Escherichia albertii</i> in retail oysters. | Journal of food protection | 85(1) | 173-179 | 2022 |

令和4年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部・部長

(氏名・フリガナ) 工藤 由起子・クドウ ユキコ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 研究倫理審査委員会 | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年4月27日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)—殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 佐野 輝

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究 (21KA1006)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医歯学総合研究科・准教授

(氏名・フリガナ) 大岡 唯祐・オオオカ タダスケ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 有 無 | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------|--------|--------------------------|
| | | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部第二室・室長
(氏名・フリガナ) 大西 貴弘・オオニシ タカヒロ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 研究倫理審査委員会 | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | 国立医薬品食品衛生研究所 動物実験委員会 | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 細菌第一部・第一室長
(氏名・フリガナ) 伊豫田 淳・イヨダ スナオ

4. 倫理審査の状況

| | 該当性の有無 | | 左記で該当がある場合のみ記入 (※1) | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|
| | 有 | 無 | 審査済み | 審査した機関 | 未審査 (※2) |
| 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 遺伝子治療等臨床研究に関する指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |
| その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:) | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> |

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

| | |
|-------------|---|
| 研究倫理教育の受講状況 | 受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/> |
|-------------|---|

6. 利益相反の管理

| | |
|--------------------------|---|
| 当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究機関におけるCOI委員会設置の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:) |
| 当研究に係るCOIについての報告・審査の有無 | 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:) |
| 当研究に係るCOIについての指導・管理の有無 | 有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:) |

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。