

令和4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

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4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5(2023)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

緊急的追加研究(令和3年度からの継続) 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	33
---------------------	----

工藤 由起子

(1) <i>astA</i> 特異的 PCR 法の検討	43
------------------------------	----

(2) <i>astA</i> 保有大腸菌の食品検査法の検討	57
--------------------------------	----

(3) <i>astA</i> 特異的リアルタイム PCR 法の開発	73
------------------------------------	----

2. 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析	87
----------------------------	----

大岡 唯祐

3. 病原大腸菌食中毒事例株の解析	103
-------------------	-----

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	119
-------------------------	-----

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	145
---------------------	-----

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4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を中心に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、*astA*保有大腸菌の食品検査法について、食品培養液からの*astA*検出性に優れる既存のコンベンショナルPCRを明らかにし、それを増菌培養法および分離培養法と組み合わせて多種類の食品にて有用な方法を検討した。また、食品の効率的な検査に貢献するリアルタイムPCRでの対象遺伝子配列を検討し検出系を複数設計した（2）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、35種類の遺伝子バリエーション（V1-V35）について、①保有株数の多い主要なバリエーションの種類、②欠損して機能しないと思われるバリエーション、③各バリエーションの局在や株あたりのコピー数、④大腸菌進化系統における*astA*遺伝子保有株の分布、⑤各バリエーションをコードする挿入配列IS1414の構造などが明らかとなった。（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、EAST1の発現解析として、ウェスタンブロットニングによる検出手法を確立し、有症例由来大腸菌においてEAST1ペプチドの発現を確認した。培養細胞感染試験では、O166:H15およびOgGp9:H18において細胞接着性が認められた。全ゲノム配列解析では、有症事例株間の関連性は見出されず、*astA*陽性大腸菌は系統的に多様であることが判明した。（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食品での汚染実態調査を行った結果、鶏肉、豚内臓肉、輸入オクラ、輸入ベビーコーンで*astA*保有大腸菌の汚染が強く認められ、これらの食品が食中毒予防のための最重要食品になると思われる。また、（5）緊急的追加研究として、令和3年6月に富山市内小学校等給食で提供された牛乳による大規模食中毒の原因物質が「病原大腸菌OUT(OgGp9):H18（疑い）」とされたが、本菌の病原性について引き続き検討を行った。

研究協力者

福井県衛生環境研究センター	横山孝治
姫路市環境衛生研究所	新免香織
宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
埼玉県衛生研究所	土井りえ、貫洞里美
東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魅、齊木 大
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
(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、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。これらの研究について、分担研究（１）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立、（２）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析、（３）病原大腸菌食中毒事例株の解析、（４）食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法にて実施する。

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 (OgGp9):H18 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の究明についての研究を令和３年度に緊急的追加研究として開始し、令和４年度も継続して実施した。

B. 研究方法

（１）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

２種類の食品のノボビオシン加 mEC (NmEC) 増菌培養液から DNA を抽出し、４種類 (Yamamoto ら、他) の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (以下、*astA*PCR) を試験しプライマーを検討した。次に、上記の食品培養液を各種分離培地に画線して得たコロニーから DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら) を Quick Taq 等の３種類の酵素にて試験した。また、分担研究者の大西の試験にて *astA* 特異的バンドが確認された食品検体について、① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループおよび② 分離陽性グループに分け、*astA*PCR (Yamamoto ら、他) に供試した。さらに、*astA* 保有大腸菌を含む細菌 26 種 41 株の *astA*PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) における特異性および食品を用いた感度を試験した。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

試験検体の *astA* 確認試験では、36 食品 144 検体を供試した。検体 25 g 入りストマッカー袋を 20 袋 (=20 検体) 用意し、4 検体は mEC 中にて培養し、抽出 DNA を *astA*PCR (Yamamoto ら、QuickTaq 使用) に供試した。4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、添加回収試験を行ない、1 検

体以上が *astA*PCR 陽性の食品は、自然汚染検体での試験を行った。添加回収試験では、*astA* 保有大腸菌 (2 株) を各接種菌数レベル (低菌数接種 : 10 CFU、中菌数接種 : 50 CFU、高菌数接種 : 100 CFU) に調製し、16 検体へ接種した。各 8 検体を mEC および NmEC 中で培養し、*astA*PCR を実施した。検体培養液を薬剤 C 添加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (C-SMAC)、クロモアガー基礎培地 (CHSTEC) および薬剤 C 添加 CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、C-SMAC では赤色、その他は藤色のコロニーを最大 3 個選択し *astA*PCR を実施した。自然汚染試験では、*astA* 保有大腸菌を添加せずに上記の試験を実施し、各条件につき最大 10 個のコロニーを試験した。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌株の *astA* の遺伝子多型 (バリエーション) を特定した。7 株は分担研究者の伊豫田から配列が提供され、他 7 株は国衛研にて取得した配列を分担研究者の大岡が解析した。また、*astA* の各種バリエーションリファレンス配列の共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。その際、大岡

からバリエーション X は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、バリエーション X が検出対象から除外される候補も設計した。設計した候補について、腸管出血性大腸菌 ESC425 株や *Escherichia albertii* EA40 株を含む 26 菌種、32 株の特異性を試験した。また、シーケンスにより ESC425 および EA40 の *astA* バリエーションを特定した。

(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] 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

昨年度、ドラフトゲノム配列を取得した下痢症患児由来大腸菌株 31 株について、MinION を用いた完全長ゲノム配列の取得を行った。

[2] 同定した *astA* 遺伝子保有株 (鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 744 株) に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

項目 (1) で得られたゲノム配列を元に、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの配列比較を行い、それらのゲノム上での局在・コピー数など詳細な解析を行った。

[3] *astA* 遺伝子保有株の進化系統解析と *astA* 遺伝子バリエーションの分布

計 744 株についてコア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行い、同定された *astA* 遺伝子バリエントを系統樹上にマップし、系統と分布の関連を解析した。

[4] 異なる系統に存在する同一 *astA* 遺伝子バリエント周辺のゲノム構造比較

異なる系統に同一バリエントがあり、その局在がプラスミドであったものについて、プラスミド構造を比較し、同一プラスミドによる水平伝播の可能性を検証した。

[5] 主要 *astA* 遺伝子バリエントの機能解析

主要な *astA* 遺伝子バリエントである prototype, V6, VX, V27 に関する機能解析のため、発現制御可能な発現ベクター pTEBA (BioDynamics Laboratory Inc.) にクローニングした。

[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

[1] EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングによって行った。供試菌株として、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌を主とした、5 血清型 (07:H4, 166:H15, 169:H45, 0gGp7:H6, 0gGp9:H18) 計 7 株を用いた。

[2] 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞侵入性、細胞傷害性および細胞接着性の解析を行った。対象株は上記 1 と同じ *astA* 陽性大腸菌を使用した。

[3] ゲノム解析

過去に発生した食中毒事例株を中心に 11 種類の血清型の *astA* 陽性大腸菌について全ゲノム配列解析を解読した。得られたデータから、系統解析および保有する遺伝子の網羅的な検出を行った。

(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] 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。

[3] 0 遺伝子型別

LB 培地で培養した菌体から、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、井口らの方法 (J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32) に従い、PCR によって 0 遺伝子型別を行った。

(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(0gGp9):H18 の完全長ゲノムの取得および詳細なゲノム解析、患者便メタゲノム解析等を行った。

C. 研究結果

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討
プライマーの検討では、Yamamoto らの PCR 法で陽性または

陰性の判定が容易であった。酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められなかった。① *astA* 保有大腸菌分離陰性のグループでは、Yamamoto らの PCR 法では判定が容易であり、② 分離陽性のグループでは、全検体が全 PCR 法陽性であった。特異性試験では、*astA* 保有大腸菌 11 株のみ *astA*PCR 陽性であった。また、検出限界は 3.0～5.1 log CFU/mL であった。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

試験検体の *astA* 確認試験では、48/144 検体 (33.3%) が *astA* 陽性であった。添加回収試験では、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群 (7-18 CFU/25 g) では mEC で 67.5%、NmEC で 72.5%、中菌数接種群 (30-93 CFU/25 g) および高菌数接種群 (105-307 CFU/25 g) では、mEC および NmEC とともに 100% であった。NmEC 培養の C-SMAC の組み合わせの分離陽性率が他の組み合わせよりも低かった。自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

単一のバリエーションのみ保有する株は 14 株中 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、最も多くの株が prototype (4 株) を保有していた。全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類およびバリエーション X 以外の全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 4 種類を設計した。特異性試験では、EA40 株は設計した全 11 種類のリアルタイム PCR 法で陽性であり、ESC425 は全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットでのみ陽性となった。その他、26 菌種 30 株はいずれの PCR 法でも陰性であった。遺伝子シーケンスでは、EA40 は prototype、ESC425 はバリエーション X と同定された。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

[1] 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

解析した 31 株中 18 株の完全長ゲノム配列を取得することができた。

[2] 同定した *astA* 遺伝子保有株 (鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 744 株) に関する 35 種

類の *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

35 種類の遺伝子バリエーション (V1-V35) について、詳細な配列解析を実施した。その結果、①保有株数の多い主要なバリエーションが 5 種類 (V22、prototype、V6、V27、V12、V7) であること、②V7、V15、V22、V33 は欠損していること、③各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤ほとんどの大腸菌進化系統に *astA* 遺伝子保有株が存在すること、⑥prototype、V2、V7、V31、V32 をコードする挿入配列 IS1414 はだけが intact な構造であることが明らかとなった。

[3] *astA* 遺伝子保有株の進化系統解析と *astA* 遺伝子バリエーションの分布

バリエーションの多くは大腸菌の進化系統 (A, B1, B2, C, D, E) に偏りなく散在していることがわかった。また、5' 末端領域が完全に欠失している *astA* 遺伝子は進化系統 A と E に多くみられた。

[4] 異なる系統に存在する同一 *astA* 遺伝子バリエーション周辺のゲノム構造比較

異なる系統に同一の *astA* 遺伝子バリエーションが検出され、当該バリエーションがプラスミド上にコードされている場合、プラスミドを介した水平伝播が想定されるため、該当株のプラスミド構造を比較した。その結果、系統の近い株ではプラスミド構造が類似していたが、系統の遠い株間ではプラスミド構造の類似性が部分的にのみ同定された。

[5] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析

35種類の *astA* 遺伝子バリエーションがコードするアミノ酸配列を比較した結果、prototype を含む7種類は同じ配列であったが、それ以外は配列多様性を認めた(図7)。このことから、集団感染事例由来株で保有頻度が高い、また、全株の中でも比較的保有頻度の高い prototype, V6, V27 に焦点を当て、その病原性を検討するため、T7 誘導性発現プラスミドである pETBA ベクターにクローニングした。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

[1] EAST1 発現解析

ウェスタンブロットニングの結果、供試した *astA* 陽性大腸菌 11 株と陽性対照の合成 EAST1 ペプチドにおいて、EAST1 の質量約 4.1kDa 付

近でシグナルが確認された。

[2] 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

行った試験条件では、細胞侵入性および細胞傷害性は認められなかった。細胞接着性試験では 0166:H15 または 0gGp9:H18 が CHO および INT407 細胞へ接着することが確認された。07:H4 および 0169:H45 ではいずれの細胞においても細胞接着性は認められなかった。

[3] ゲノム解析

系統解析の結果、9 件の事例から分離された 26 株は 6 種の Phylogenetic group(A, B1, B2, F, D, E) に分類され、いずれも事例間の関連性は低いことが示唆された。また相模原市の食中毒疑い事例で分離された 9 株については 4 種の Phylogenetic group (A, B1, B2, F) に分類された。

(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] 輸入野菜における汚染

調査に用いた生野菜は 24 種類、211 検体、冷凍野菜は、16 種類、41 検体であった。冷凍野菜では全ての検体がスクリーニング陰性となった。

ベビーコーンは 29 検体中、スクリーニングで陽性になったのは

19 検体 (41%) で、4 検体 (14%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*bfpB*、*stx₂* であった。分離株からは *astA* だけが分離された。

オクラは 36 検体中、スクリーニングで陽性になったのは 11 検体で、5 検体 (14%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*estIa* であった。

豚内臓肉は 40 検体中、スクリーニングで陽性になったのは 29 検体 (73%) で、21 検体 (53%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝子は *astA*、*eae*、*stx₂* などであった。*astA* と *eae* が同時に陽性になる検体が多く認められた。しかし、分離された菌株は全て *astA* 単独で保有しているものだけだった。

[2] 分離菌株の 0 遺伝子型別

2021 年度および 2022 年度の汚染実態調査から、牛由来 11 株、鶏肉由来 51 株、豚肉由来 36 株、野菜由来 16 株、魚由来 6 株、計 120 株が分離された。分離された型別は合計 65 種類あった。最も多かったのが、型別不能で 17 株 (14.3%)、次いで、0g8 が 8 株 (6.7%)、0g88 が 7 株 (5.8%)、0gGp9 が 4 株 (3.3%) と多く分離された。

鶏肉からは、51 株が分離された。

最も多かったのが型別不能で 8 株 (15.7%)、次いで 0g88 が 3 株 (5.9%) 分離された。

豚肉からは 36 株が分離された。最も多かったのが型別不能で 5 株 (13.9%) であった。次いで 0g88 および 0g8 がそれぞれ 4 株 (11.1%) で、0gGp15 は 3 株 (8.3%) 分離された。0g15 および 0g71 は 2 株 (5.6%) ずつ分離された。このうち、0gGp15 および 0g71 は本調査では豚肉からのみ分離された。

野菜からは 16 株が分離された (表 16)。最も多かったのが型別不能で 3 株 (18.8%) であった。また、0gGp9 は 2 株分離された。

魚からは 5 株が分離された (表 17)。0gGp12 は 2 株 (33.3%) 分離され、魚からのみ分離された。(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

得られた結果については、別途報告する。

D. 考察

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

ヒトに病原性を示す *astA* 保有大腸菌の解明が求められているところだが、食中毒事例が発生した

際に有用な検査法を示すことが重要と考える。

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

供試するプライマーによって検出結果が異なっていた理由として、供試した食品中の *astA* 遺伝子のバリエーションによって、PCR の検出性が異なる可能性や非特異的反応の可能性が考えられた。判定が容易であった Yamamoto らの PCR 法を用いて酵素を検討したところ、Quick Taq を使用した際に判定が容易であったため、Quick Taq を使用し改めてプライマーを検討したところ、*astA* 保有大腸菌が分離陰性の検体中に Yamamoto らの PCR 法陰性の検体が存在し、この検体の他の PCR 法では結果が陽性であったため、Yamamoto らの PCR 法を用いることでバンドの薄い陽性検体数が減り、判定が容易になると考えられた。また、Yamamoto らの PCR 法の特異性および感度は優れていた。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された。添加回収試験の増菌培地については、中菌数接種群および高菌数接種群では、mEC および NmEC とともに 100%であった

ため、mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であると考えられた。分離培地については、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は C-SMAC よりも CHSTEC および C-CHSTEC で高い傾向であったため、*astA* 保有大腸菌の分離では、CHSTEC および C-CHSTEC が望ましいと考えられる。30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

機能している *astA* を効率よく検出することが、食品から *astA* を検出する上で重要である。*astA* の全バリエーションを検出する案および *astA* として機能していないことが予想されるバリエーション X 以外の全バリエーションを検出する案をそれぞれ複数設計した。今後、さらなる特異性試験、感度試験などの検討を重ねる必要がある。さらに、*astA* は他の細菌種でも検出されるため、大腸菌の同時検出についても考慮したい。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

本年度実施した 35 種類の遺伝子バリエーションの詳細な解析から、①

主要なバリエーションは V22、prototype、V6、V27、V12、V7 であること、②バリエーション V7、V15、V22、V33 は欠損していること、③各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④ prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤ほとんどの大腸菌系統に *astA* 遺伝子保有株が存在することが明らかになった。これらのことから、*astA* 遺伝子を保有する株を特異的に検出する疫学マーカーとなる遺伝子を同定するのは困難であること、現在用いられている PCR 等の検査法では、臨床的に重要なバリエーションを識別出来ないことが示唆された。また、⑥prototype、V2、V7、V31、V32 をコードする挿入配列 IS1414 以外は欠損しており、転移出来ないことが判明した。今後は、構造的に intact なバリエーションの中で高い保有率を示す prototype など主要なバリエーションを中心とした機能解析をすすめ、臨床的に重要なバリエーションを特異的に検出できる検出系の構築を行う必要がある。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 陽性大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。また、培養細胞への感染実験では、0166:H15 と 0gGp9:H18 において、培養細胞への接着性を明らかにした。*astA* 陽性大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例では、健常者や食品からも種々の *astA* 陽性大腸菌が分離されたことから、同菌は広く分布することが示唆された。

(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

輸入野菜の調査から、ベビーコーンとオクラにおける *astA* 陽性率が高いことが明らかになった。特にベビーコーンではスクリーニング検査での陽性率が 40% を超えており、重度の汚染が示唆された。ベビーコーン、オクラの産地は主にタイとフィリピンであったが、産地の衛生状態と関連しているかどうかは明らかにできなかった。また、ベビーコーンやオクラではほとんど分離株を得ることができなかったが、豚内臓肉では 53% の検体から、分離株を得ることができた。このことから、

豚内臓肉を汚染している *astA* 保有株の菌量は、野菜のそれより多いことが示唆された。

これまでの調査から、鶏肉、豚内臓肉、オクラやベビーコーンなどで *astA* 保有株の汚染が強く認められた。しかしながら、これらの食品を原因とする *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はあまり発生していない。今後、*astA* の機能を明らかにし、食中毒発生における *astA* の役割を明らかにしていく必要があると考えられた。

2年間の汚染実態調査で得られた分離株の 0 遺伝子型別を行ったが、非常に多くの型に分かれ、特定の傾向は認められなかった。この結果から、*astA* をはじめとする病原遺伝子の保有状況と特定の 0 遺伝子型との関連性は認められなかった。0g8 や 0g88 は以前から報告されているとおり、豚肉や鶏肉で多く認められた。また、鶏肉、豚肉などでは、それぞれの食品だけから複数分離されてる 0g 型が存在する。これらのことから 0g 型は、特定の病原遺伝子との関連よりも、汚染している食品の種類により依存している可能性が示唆された。

(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

結果と合わせて、別途報告する。

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、Yamamotoらの *astA* 特異的 PCR 法プライマーセットを Quick Taq にて使用するが結果判定が容易であり、特異性および感度に優れることが示された。この方法を用いて食品検査法を検討したところ、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として mEC を優先して選択し、可能であれば NmEC の併用も考慮し、分離培地として CHSTEC および C-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられた。また、開発した *astA* 特異的リアルタイム PCR 法候補については、食品への応用性の検討が必要と考えられた。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、*astA* 遺伝子陽性大腸菌に関して、全ゲノム情報を基に、保存性が高く検出指標に適した病原関連遺伝子の同定を目指して解析を進めた。今年度は、昨年度に同定した 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションに関する特性解明を中心に解析を実施し、その結果、重要なバリエーションを同定した。次年度は

これら *astA* 遺伝子の高発現株を用いて、その病原機構への関与について機能解析を行い、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。分担研究（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、全ゲノム配列解析によって、*astA* 陽性大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。本年度に確立した EAST1 検出手法や培養細胞接着性試験等を用いて、同菌の病原性に関わる因子をより詳細に検討する必要がある。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、2年間の汚染実態調査から *astA* 大腸菌の汚染は、鶏肉、豚内臓肉、輸入オクラ、輸入ベビーコーンで強く認められた。*astA* 保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品は食中毒予防のための最重要食品になると思われる。一方で、*astA* の食中毒への関与には、不明な点が多く残されている。今後、研究が進み *astA* の機能が明らかになることを期待したい。2年間の汚染実態調査から得られた分離株の 0 遺伝子型と特定の病原遺伝子保有状況との間に関連性は認められなかった。0 遺伝子型は汚染している食品の種類により依存している可能性が示唆された。

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が「大腸菌 OUT(0gGp9):H18(疑い)」とされたが、本菌の病原性について引き続き検討を行った。

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 infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 19(10), 704-712, 2022.

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. *Foodborne Pathogens and Disease* 19(12), 823-829, 2022.

廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、

土橋酉紀、砂川富正．富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査．病原微生物検出情報．43(10)，15-16，2022．

(学会等発表)

新井沙倉、土井りえ、小西典子、尾畑浩魅、榊田希、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子．食品からの *Escherichia albertii* 検出のための特異的リアルタイム PCR 法の検討．第 43 回日本食品微生物学会学術総会．令和 4 年 9 月 29-30 日．東京

榊田希、尾畑浩魅、小西典子、土井りえ、新井沙倉、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子．食品を対象とした *Escherichia albertii* 分離培養法の検討．第 43 回日本食品微生物学会学術総会．令和 4 年 9 月 29-30 日．東京

山谷聡子、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、小嶋由香、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子．*Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (1)．第 43 回日本食品微生物学会学術総会．令和 4 年 9 月 29-30 日．東京

柳本恵太、松永典久、小林章人、高橋直人、小嶋由香、床井由紀、山

谷聡子、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子．*Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (2)．第 43 回日本食品微生物学会学術総会．令和 4 年 9 月 29-30 日．東京

廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子．食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析．第 43 回日本食品微生物学会学術総会．令和 4 年 9 月 29-30 日．東京

新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子．野菜における腸管毒素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討．第 118 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 4 年 11 月 10-11 日．長崎

小西典子、榊田希、新井沙倉、尾畑浩魅、土井りえ、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子．食品を対象とした *Escherichia albertii* の効率的な検出法に関する検討．第 118 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 4 年 11 月 10-11 日．長崎

小嶋由香、今野貴之、山中拓哉、床

井由紀、柳本恵太、山谷聡子、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価. 第118回日本食品衛生学会学術講演会. 令和4年11月10-11日. 長崎

土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第118回日本食品衛生学会学術講演会. 令和4年11月10-11日. 長崎

工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平.
新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*. 第96回日本細菌学会総会. 令和5年3月16-18日.
兵庫

廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、工藤由起子. 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発. 第96回日本細菌学会総会. 令和5年3月16-18日. 兵庫

新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬

昌平、工藤由起子. 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価. 第96回日本細菌学会総会. 令和5年3月16-18日. 兵庫

大岡唯祐、後藤恭宏、林哲也、西順一郎. 大腸菌における *astA* 遺伝子バリエーションの同定およびその分布. 第96回日本細菌学会総会. 令和5年3月17日. 兵庫

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

緊急的追加研究（令和3年度からの継続）
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 4 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

緊急的追加研究(令和 3 年度からの継続) 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 1,800 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 (O 抗原遺伝子型 0gGp9) :H18 について、病原性を解明するために令和 3 年度に多角的に解析した。令和 4 年度には、病原因子を解明するために完全長ゲノムの取得と詳細なゲノム解析、複合感染としての可能性を検証するために患者便メタゲノム解析等を行った。

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	大屋賢司、大西貴弘、廣瀬昌平

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。調査の結果、食中毒発生に関与する提供日の牛乳および多く

の患者検体で、血清型 OUT (O 血清型別不能) :H18 であり、O 抗原遺伝子型別で 0gGp9 の大腸菌が分離された。この大腸菌の動物モデル試験、ゲノム解析等の結果から、病因物質は「大腸菌 OUT (0gGp9) :H18 (疑い)」と報告された (廣瀬ら、病原微生物検出情報、2022)。しかし、本大腸菌の病原性についての解明を引き続き行うことが求められており、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。

B. 研究方法

(1) 富山市事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

本事例牛乳由来大腸菌 OUT (OgGp9) :H18 ESC818 株の完全長ゲノムを取得するために、長鎖ゲノム DNA を調製し PromethION (Oxford Nanopore) を用いてロングリード配列を取得し、昨年度取得したショートリード配列と併せてハイブリッドアセンブルを行った。また、DFAST でアノテーションされたプラスミド上の coding sequence (CDS) を BLASTP 解析しキュレーションを行った。

(2) Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

本食中毒事例の原因食品由来株 (TC49)、患者由来株 (TC78)、完全な ETT2 を保有し、その機能解析が報告されている大腸菌 042 (EAEC 044:H18) 株を供試した (鹿児島大学医学部 西 順一郎先生から供与された)。供試菌株の LB 培地培養液から RNA 抽出および cDNA 合成をおこなった。プライマー設計を行い qRT-PCR を確立した。PCR 産物の定量はインターカレーター TBGreen の蛍光強度測定で、PCR 反応の特異性は PCR 産物の融解曲線による確認を行った。各検体について RNA 希釈列 (RNA 40ng, 10 ng, 2.5 ng, 0.625 ng) 相当の cDNA について n=2 で qRT-PCR を行った。qRT-PCR の結果について、レファレ

ンス遺伝子 *rpoA* を用いた $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量を行った。 $\Delta\Delta Ct$ 法は標的遺伝子とレファレンス遺伝子の増幅効率が同等である場合有効である。このため、測定した Ct 値の $\Delta\Delta Ct$ 法での有効性を検証するデータクリーニングを以下のように行った。相対増幅効率 ΔCt (標的遺伝子の Ct 平均値-レファレンス遺伝子 *rpoA* の Ct 平均値) を RNA 希釈列の対数値についてプロットし、回帰式を求めた。これらの ΔCt 値と RNA 希釈列に対する回帰式の傾きが 0.1 未満の場合を、各 RNA 希釈列における相対増幅効率 ΔCt が同等であるとし、標的遺伝子の Ct 平均値を有効とした。外れた場合は各 Ct 測定値について検証した。各遺伝子の mRNA は 042 株の mRNA 量を 1 とする相対定量値で示した。

(3) 細胞傷害性試験

HeLa 細胞を使用し、陽性対照として EHEC 0157:H7 Sakai 株、陰性対照として JM109 株を供試した。被検菌を LB ブロスで一晩振とう培養後、超音波破碎を行い、0.2 μm フィルターでろ過を行い、抽出液とした。この抽出液を培養細胞に 10 μl /well 接種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) による生細胞数の測定、または Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo) による細胞傷害性の測定を行った。生細胞数の測定では、菌液を接種していないウェルの細胞数を 100%として評価を行った。細胞傷害性の測定では菌液を接種していないウェルの細胞に Lysis

Buffer を添加することで放出される LDH の値を 100%として評価した。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

食品工場従事者 (サンプル番号 F5、*E. coli* 0gGp9 分離なし) および有症者 (F54、*E. coli* 0gGp9 分離あり) の便検体を材料として、ショットガンメタゲノム解析を行った。便サンプル 250 mg から、QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出 DNA を用いて QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) にてライブラリー調製を行った。ライブラリーについて、HiSeqX (Illumina) を用いて 150 bp×2 のシーケンス解析を行った。得られたリードをトリミング後、Kraken2 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/>) を用いて、属レベルでの存在比を明らかにした。

また、メタゲノム解析結果の確認として、以下のプライマーペアを用いて PCR を行った：大腸菌特異的 (gyrB-F, AGTGATCATGACCGTTCTGCA; gyrB-R, TTTGTTTTGTCCATGTAGGCGTTCA)、*Campylobacter* 属菌特異的 (MD16S1Upper, ATCTAATGGCTTAACCATTAAC; MD16S2Lower, GGACGGTAACTAGTTTAGTATT)、および *C. jejuni* および *C. coli* 特異的 (C412F, GGATGACACTTTTCGGAGC; C1228R, CATTGTAGCACGTGTGTC)。

さらに、便サンプル中大腸菌における、事例株 (*E. coli* 0gGp9) の頻度を推定するために、事例株ゲノムを非病原性株 (*E.*

coli MG1655) と共通する領域および共通しない領域に分け、前者を大腸菌に共通する領域、後者を事例株特異的領域とした。すなわち、事例株 (Ec5) ショートリードを MG1655 配列にマッピング後、マッピングされた領域のアセンブリ後に得られた配列大腸菌共通領域 (4.2 Mb)、マッピングされなかった領域のアセンブリ後に得られた配列を事例株特異領域 (0.9 Mb) とした。次に、メタゲノム解析から得られたリードから、BLAST を用いて上記の配列と類似したリード (120 bp 以上のアラインメント、95%以上の類似性) を抽出しカウントした。

C. 研究結果

(1) 本事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

ESC818 株の環状化した完全長ゲノムを取得し、本株ゲノムは 4,971,560 bp の染色体と 103,988 bp のプラスミド一本からなることが明らかとなった (表 1)。昨年度実施した本株ドラフトゲノムの系統比較に用いた代表的な大腸菌株のゲノムと比較すると、本株染色体ゲノムの CDS は 4,498、rRNA は比較対照とした他の大腸菌株と同じ 22、tRNA は腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC) 042 株と同じ 93 であった。本株プラスミドの CDS は 106 であった (表 1)。

また、プラスミドを解析した結果、複製起点は IncFIB 及び Col の 2 種が検出さ

れ、薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。病原因子のクラスターが 2 種類コードされていることが明らかとなった。

(2) Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

TC49 は、*glyU*、*selC* に、EAEC 042 のこれらの Type III 分泌系の遺伝子クラスターとそれぞれ 98%、95% の高い相同性を示す塩基配列を保有していた (図 1)。

ETT2 遺伝子群 *eicA*、*air*、*eprH*、*eilA*、*eivA* について qRT-PCR による検出系を確立した。mRNA 発現量の定量については、*eicA*、*air*、*eprH* の RNA40ng 当量における ΔCt 値 (平均値) は 9.8–12.5 であり、 ΔCt 値のほとんどは有効であった (図 2)。一方、*eilA*、*eivA* の mRNA 40ng 当量における ΔCt 値は 14.5–15.3 であり、mRNA 量が、*eicA*、*air*、*eprH* の 1/4~1/8 以下と少なく、 ΔCt 値の多くは採用できなかった。また、LB 培地、0.2% グルコース加 LB-DMEM (1:1) 双方において TC49・TC78 の *air*、*eprH* の mRNA 相対発現が 042 株に比べて軽度 (13%~47%) 減少した (図 2)。しかし、*eicA* については TC49、TC78 の mRNA 相対発現量は 042 株に比べて大きく (83%~96%) 減少した。また、0.2% グルコース加 LB-DMEM (1:1) での *eilA* の mRNA 量の増加は検出されなかった。

(3) 細胞傷害性試験

非病原性株である JM109 株の抽出液と比較した際に、事例株の抽出液では生細胞数および細胞傷害性いずれにおいても顕

著な差は認められなかった (図 3)。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析の結果、サンプル F5 では *Bifidobacterium* 属菌が、F54 では *Phocaeicola* 属菌が最も高い頻度で検出された (図 4)。*Escherichia* 属菌の割合は、F5 では 0.02%、F54 では 3.6% であった。また *Campylobacter* 属菌が F5 では 0.03%、F54 では 0.06% の割合で検出された。その他の病原体 (細菌、ウイルス、寄生虫) 特異的な配列は検出されなかった。本結果を確認するために、*E. coli*、*Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的プライマーを用いて PCR を行った。その結果、いずれのサンプルからも *E. coli* 特異的産物は検出されたが、*Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的産物は検出されなかった。メタゲノムリードから大腸菌特異的な配列を抽出した結果、いずれのサンプルにおいても、大腸菌共通配列に類似したリードの割合は約 80%、事例株特異配列に類似したリードの割合は約 20% であった。この割合は、事例株ゲノムの割合と類似していたことから、両サンプル中に存在する大腸菌の大部分は事例株であることが示唆された。

D. 考察

(1) 本事例大腸菌株の完全長ゲノム取得および保有プラスミドの解析

今年度は、牛乳由来 ESC818 株の完全長ゲノムを取得した。昨年度取得したドラフト配列では同定された rRNA 数は 3 であったが、完全長ゲノムでは他の大腸菌株と同じ 22 であることが示され、より正確なゲノム解析を実施できる環境が整った。さらに、ESC818 株は病原因子のクラスターを 2 種類コードする特徴的なプラスミドを保有することが明らかとなった。現在、特にプラスミドに注目し *in vitro* 及び *in vivo* の系で大腸菌 OUT (OgGp9):H18 の病原性について解析を進めている。

(2) Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認

本研究で解析した領域にコードされる複数の遺伝子は mRNA が検出され、遺伝子として機能していることが示された。しかしながら *eilA*、*eivA* の mRNA 発現を定量できなかった。この原因として *eilA*、*eivA* は mRNA 発現量が少なく、qRT-PCR の定量性を確保できるダイナミックレンジ内に入らなかったためと考えられた。また、0.2% グルコース加 LB-DMEM(1:1) での *eilA* の発現上昇が検出できなかった。*eilA* は mRNA 量が少なく qRT-PCR で安定した定量性が得られなかった。Fox らはこの原因として *eilA* の mRNA の不安定さ等をあげている。本研究において mRNA の相対定量が可能であった *eicA*、*air*、*eprH* の 3 つの遺伝子は他の T3SS 病原因子との比較から、それぞれ chaperone、adhesin、type III 分泌装置の inner membrane ring

の構成タンパク質の機能を有すると推測されている。042 株と比べて食中毒由来株 (TC49・TC78) の *air*、*eprH* の mRNA 発現は軽度減少し、*eicA* は 10 分の 1 と大きく低下していることが判明した。

(3) 細胞傷害性試験

事例株における培養細胞への傷害性試験では、実施した条件では顕著な傷害性は認められなかった。今後、他種の細胞を用いるなどして、本菌の病原性を明らかにする必要がある。

(4) 食品工場従事者および有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析では、大腸菌および *Campylobacter* 以外の既知の病原体の情報は得られなかった。*Campylobacter* については、PCR で特異配列が増幅されなかったため、メタゲノム解析結果では非特異的な配列を検出したと考えられる。このため、大腸菌以外が食中毒の原因である証拠は得られなかった。一方、F54 のメタゲノム解析でより高い頻度で大腸菌が検出されたことは、分離培養の結果 (F5 で大腸菌非分離、F54 で分離) と一致した。また F5 のサンプルでは、頻度が低いながらも事例株特異的配列が認められたことから、サンプルを採取した食品工場従事者も事例株を保有していたことが示唆された。

E. 結論

大腸菌 OUT (OgGp9):H18 の病原性を解明

するために、今年度は、本菌の完全長ゲノムを取得し、病原因子のクラスターを2種類コードする特徴的なプラスミドを保有することが判明した。今後、*in vitro* および *in vivo* の系で本菌の病原性について解析を進める予定である。また、ETT2 Type III分泌系が機能しているか否かの解析の必要性が明らかになった。さらに、本菌の病原性に関わる特徴を明らかにするために培養細胞への傷害性の有無を測定したが、顕著な傷害性は見出されなかった。加えて、本事例無症者および有症者の便検体をショットガンメタゲノム解析した結果、大腸菌以外の既知の病原体は検出されず、メタゲノムリード中の大腸菌特異的配列を抽出し解析した結果、

いずれのサンプルにおいても事例株が優占して存在することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

廣瀬ら. 富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査. 病原微生物検出情報. 43(10), 15-16, 2022.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

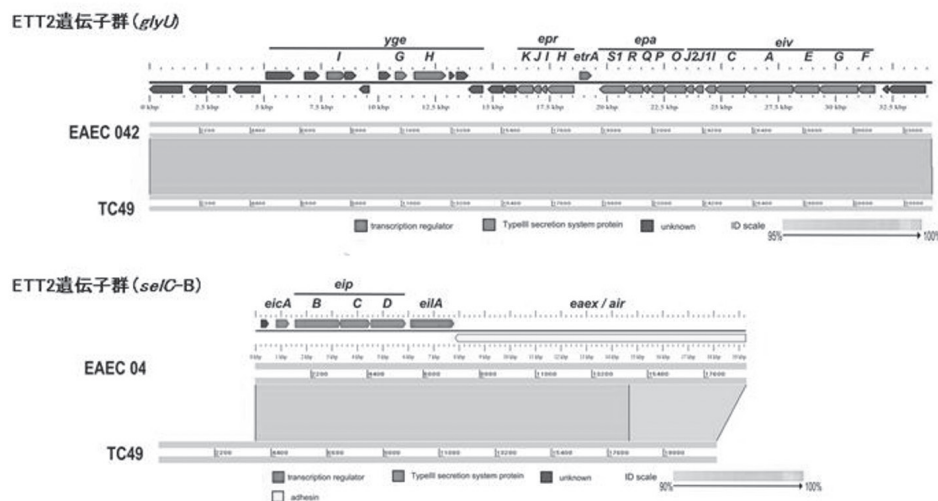
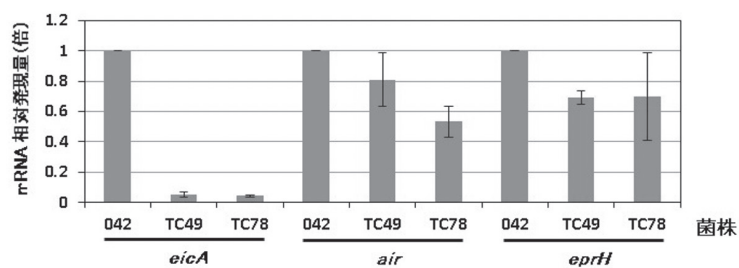


図1 食中毒由来株 TC49 と 042 の ETT2 遺伝子群の塩基配列の相同性

(A) LB培地



(B) 0.2%グルコース加 LB-DMEM (1:1)培地

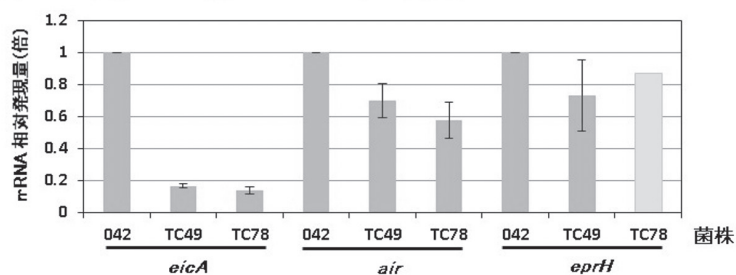


図2 ETT2 遺伝子 RNA 発現量の菌株巻の比較

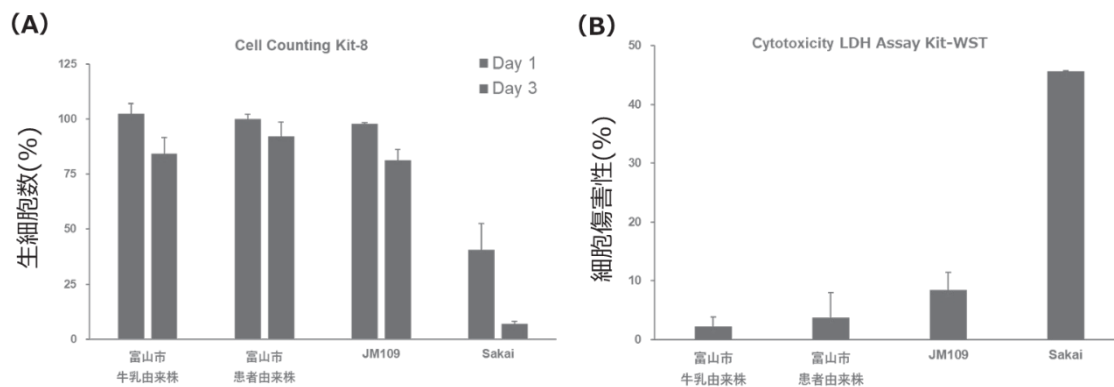


図3 HeLa 細胞を使用した細胞傷害性試験結果

(A) Cell Counting Kit-8 による生細胞数測定、(B) Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST による細胞傷害性測定

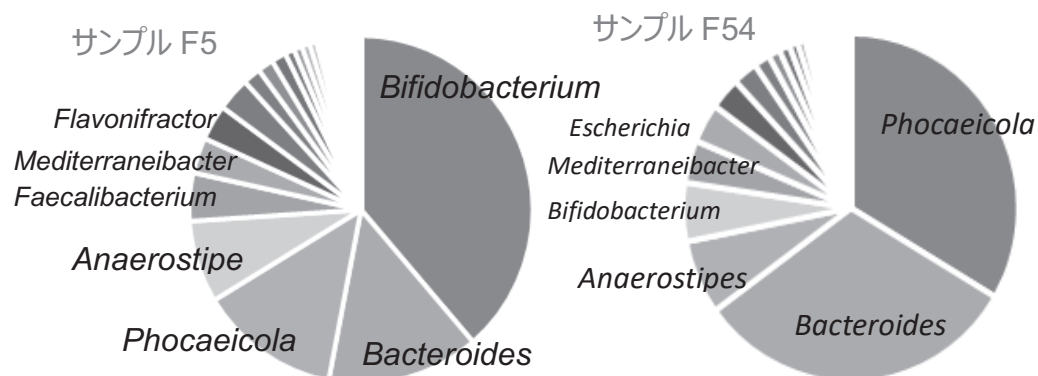


図4 ショットガンメタゲノム解析による菌属別の存在比

表1 ESC818 株及び他の大腸菌株ゲノムの概要

	牛乳由来株 ESC818 ドラフト	牛乳由来株 ESC818 (OgGp9:H18) 染色体	牛乳由来株 プラスミド	K-12 MG1655 染色体	EAEC 042 (O44:H18) 染色体	UPEC UMN026 (O17:H18) 染色体	EHEC Sakai (O157:H7) 染色体
Total Sequence Length (bp):	4,971,560	4,911,390	103,988	4,641,652	5,241,977	5,202,090	5,498,578
GCcontent (%):	50.4	50.6	41.4	50.8	50.6	50.7	50.5
Number of CDSs:	4,591	4,498	106	4,298	4,798	4,802	5,067
Number of rRNAs:	3	22	0	22	22	22	22
Number of tRNAs:	87	93	0	86	93	90	103

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4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、大規模食中毒の発生している *astA* 保有大腸菌を対象に研究を実施した。[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討：既存のコンベンショナル PCR について食品培養液からの *astA* 検出性を検討し、Yamamoto らのプライマーセットと Quick Taq の組み合わせの系が判定が容易で、特異性および感度が優れることが示された。[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立：増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を組み合わせる本菌に適する効率的な検査法を検討し、mEC または NmEC での増菌培養、選択剤添加分離培地での分離培養によって *astA* 保有大腸菌接種食品（30 CFU 以上）全検体から本菌が分離されることが示された。[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発：食品の効率的な検査に貢献するリアルタイム PCR での対象遺伝子配列を検討し、プライマーセット、プローブを複数設計した。今後、特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。3つの研究によって以上の研究結果を得た。ヒトに病原性を示す *astA* 保有大腸菌の解明が求められているところだが、本研究では食中毒事例が発生した際に有用な検査法を示すことが重要と考える。

研究協力者

宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
埼玉県衛生研究所	土井りえ、貫洞里美
東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魅、齊木 大
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
福井県衛生環境研究センター	横山孝治
姫路市環境衛生研究所	新免香織

(公社) 日本食品衛生協会
鹿児島大学
国立感染症研究所
国立医薬品食品衛生研究所

甲斐明美
大岡唯祐
伊豫田 淳、李 謙一
大西貴弘、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 3,453 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。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、喫食状況から特定の日時の食事など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での検査法は国内外で確立されておらず、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は低いとされており、培養時に食品由来微生物の増殖が食中毒細菌の増殖を抑制し、検出が困難なこと

が考えられるため、適切な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の効率的かつ特異的な検査法を開発することを目的として、以下の 3 つの研究を実施した。[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討では、既存のコンベンショナル PCR について食品培養液からの *astA* 検出性を検討することとした。[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を組み合わせ本菌に適する効率的な検査法を検討することとした。[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、食品の効率的な検査に貢献するリアルタイム PCR での対象遺伝子配列を検討することとした。

B. 研究方法

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討
プライマーの検討では、ベビーコーンおよびオクラ各 25 g をノボビオシン加 mEC (NmEC) 中にて

42℃で培養した。各食品増菌培養液 0.1 mL から DNA を抽出し、4 種類 (Ito ら、Hidaka ら、Muller ら および Yamamoto ら) の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (以下、*astA*PCR) を試験した。

酵素の検討では、上記にて調製したオクラ培養液を Tryptic soy agar (TSA) およびクロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC) に画線し培養した。コロニー密集部から DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら) を AmpliTaq、Ex Taq および Quick Taq にて試験した。

次に、分担研究者の大西が昨年度報告したスクリーニング PCR 法にて *astA* 特異的バンドが確認された検体について、① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループおよび② *astA* 保有大腸菌分離陽性グループに分けた。食品培養液の抽出 DNA を *astA*PCR (Ito ら、Muller ら および Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。

特異性の検討では、*astA* 保有大腸菌を含む細菌 26 種 41 株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。感度の検討では、*astA* 保有大腸菌 4 株を TSB 中で培養した。食品 (豚肉、エビおよびベビーコーン) 検体 25 g を

modified EC 培地 (mEC) 225 mL 中で培養した。この食品培養液にて *astA* 保有大腸菌の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、DNA を抽出し、*astA* PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

(1) 試験検体の *astA* 確認試験では、鶏肉ミンチ、豚肉スライス、豚肉ミンチ、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシの合計 36 食品 144 検体を供試した。検体 25 g 入りストマッカー袋を 20 袋 (検体 1~20) 用意した。4 袋は mEC 225 mL 中にて培養し、培養液各 0.1 mL から DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら、QuickTaq 使用) を実施した。

供試した 4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験を行なった。集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌 2 株および豚肉スライス、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシを供試した。菌株を TSB 中にて培養し、 10^{-7} 希釈液 0.1 mL を TSA に塗抹し、接種菌数を算出した。冷蔵保管していた検体 25 g 入りストマッカー袋 16 袋に各接種菌数レベル (低菌数接種 : 10

CFU、中菌数接種：50 CFU、高菌数接種：100 CFU)用希釈菌液 0.1 mL を接種した。各 8 袋に mEC および NmEC225 mL を加え培養した。DNA 抽出および *ast*PCR は (1) と同様に実施した。検体培養液を各 2 枚の薬剤 C を添加したソルビトールマッコンキー寒天培地 (C-SMAC)、CHSTEC および薬剤 C を添加した CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、培養した。C-SMAC では赤色、その他は藤色のコロニーを最大 3 個選択し、CHSTEC に単離し藤色を呈したコロニーは熱抽出法にて DNA を抽出し、*ast*PCR を実施した。PCR 陽性コロニーを TSI 寒天培地 (TSI) および LIM 培地 (LIM) に接種、培養した。

(1) にて 4 検体のうち 1 検体以上が *ast*PCR 陽性の食品は、(3) *astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験を行った。鶏肉ミンチ、豚肉ミンチ、牛肉スライスおよびオクラを供試した。食品の増菌培養以降は (2) と同様に実施した。ただし、最大 10 個のコロニーを選択した。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌株 (14 株) のバリエーションの特定では、7 株は分担研究者の伊

豫田から配列が提供され、他 7 株は、国衛研にて試験した。菌株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、ライブラリーを調整し、MiniSeq にて配列取得した。分担研究者の大岡が解析した。また、*astA* の各種バリエーションリファレンス配列について、*astA* 遺伝子上流から下流までの領域を抜き出し、アライメントし、共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。また、大岡からバリエーション X は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、バリエーション X が検出対象から除外される候補も設計した。特異性試験では、各種食中毒細菌などの 26 菌種、32 株を供試した。これらは、腸管出血性大腸菌 ESC425 株や *Escherichia albertii* EA40 株が含まれた。菌株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、*ast*PCR (Yamamoto ら) を実施した。また、設計した Assay 1~11 のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR を実施した。さらに、ESC425 および EA40 の 2 株は遺伝子シーケンスにて配列決定しバリエーションを特定した。

C. 研究結果

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

プライマーの検討では、Yamamoto らの PCR 法は濃いバンドの検体または陰性検体のみであり、他の PCR 法は PCR 陽性検体の中に薄いバンドの検体も存在した。

酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められず、陽性コントロールの濃いバンドが確認されたが、他の酵素では非特異的反応や陽性コントロールのバンドが薄い場合が観察された。

① *astA* 保有大腸菌分離陰性のグループでは、Muller らと Ito らの PCR 法では薄いバンドの検体も存在したが、これらの検体は Yamamoto らの PCR 法ではバンドが確認されなかった。一方、② *astA* 保有大腸菌分離陽性のグループでは、全検体が全 PCR 法陽性となった。

特異性試験では、*astA* 保有大腸菌 11 株は *astA*PCR 陽性であり、その他の菌株は全て PCR 陰性であった。また、検出限界は 3.0~5.1 log CFU/mL であった。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

(1) 試験検体の *astA* 確認試験では、144 検体中 48 検体 (33.3%) が *astA* 陽性であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群 (7-18 CFU/25 g) では mEC で 67.5%、NmEC で 72.5% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く (50%)、mEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった (65%)。中菌数接種群 (30-93 CFU/25 g) では、mEC および NmEC とともに 100% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く (67.5%)、その他の組み合わせは約 100% であった。高菌数接種群 (105-307 CFU/25 g) では、いずれの増菌培地と分離培地の組み合わせも 100% であった。

(3) *astA* 陽性大腸菌自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、mEC で 52.1%、NmEC で 41.7% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-CHSTEC が最も低く (27.1%)、mEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった (45.8%)。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

バリエーションの特定に供試した 14 株のうち、単一のバリエーションのみ

保有する株は 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、最も多くの株が prototype(4 株)を保有していた。バリエーション間でミスマッチが少ない *astA* 遺伝子の上流から下流までの領域に全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類およびバリエーション X 以外の全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 4 種類を設計した。特異性試験では、Yamamoto らのコンベンショナル PCR 法では、EA40 株のみ陽性であり、その他の株は全て陰性であった。一方、EA40 株は、設計した全 11 種類のリアルタイム PCR 法で陽性であり、ESC425 は全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットでのみ陽性となった。その他、26 菌種 30 株はいずれの PCR 法でも陰性であった。遺伝子シーケンスでは、EA40 は prototype、ESC425 はバリエーション X と同定された。

D. 考察

astA 保有大腸菌のヒトに病原性を示す株と示さない株があることが考えられるが、本研究では食

中毒事例が発生した際に有用な検査法を示すことが重要と考える。また、他分担研究者による *astA* 保有大腸菌および関連の大腸菌の解析によって解明につながる知見が得られることが期待される。

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

供試するプライマーによって検出結果が異なることが判明した。その理由として、供試した食品中の *astA* 遺伝子のバリエーションによって、PCR の検出性が異なる可能性や非特異的反応の可能性が考えられた。判定が容易であった Yamamoto らの PCR 法を用いて酵素を検討したところ、Quick Taq を使用した際に判定が容易であったため、Quick Taq を使用し改めてプライマーを検討したところ、*astA* 保有大腸菌が分離陰性の検体の中に Yamamoto らの PCR 法陰性の検体が存在し、この検体の他の PCR 法では結果が陽性であったため、Yamamoto らの PCR 法を用いることでバンドの薄い陽性検体数が減り、判定が容易になると考えられた。また、Yamamoto らの PCR 法の特異性および感度が優れることが示された。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された。増菌培地については、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群では mEC より NmEC がやや高い傾向であった。なお、中菌数接種群および高菌数接種群では、mEC および NmEC とともに 100%であった。以上から、mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であると考えられた。一方で、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験では、NmEC での増菌培養と C-SMAC での分離培養の組み合わせは、食品によっては、その他の組み合わせと比較してやや劣る結果が認められたことから、分離培地によっては *astA* 保有大腸菌の分離に適さない選択剤の組み合わせがあることが推測された。分離培地については、供試検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は C-SMAC よりも CHSTEC および C-CHSTEC で高い傾向であった。また、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験でも、概ね同様の傾向であった。以上から、*astA* 保有大腸菌の分離では、CHSTEC および C-CHSTEC が望ましいと考えられる。中菌数接種群および高菌数接種群では、*astA* 陽性

コロニーが分離された検体の割合は 100%であったため、30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

機能している *astA* を効率よく検出することが、食品から *astA* を検出する上で重要である。分担研究者の大岡からバリエーション X は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、*astA* の全バリエーションを検出する案およびバリエーション X 以外の全バリエーションを検出する案をそれぞれ複数設計した。今後、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の特異性を精査するためには、個々のバリエーションの代表株をシーケンスにより選出する必要がある。また、感度試験や食品への応用性についても検討を重ねる必要がある。さらに、*astA* は他の細菌種でも検出されるため、大腸菌の同時検出についても考慮したい。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において、Yamamoto らのプライマーセットを Quick Taq にて使用する

PCR 法が、PCR 産物の電気泳動による判定において陽性または陰性の判定が容易であり、特異性および感度に優れることが示されたため、その方法を用いて複数の自治体と食品検査法を検討したところ、*astA* 保有大腸菌を 30 CFU 以上を食品 25 g に接種し、mEC または NmEC にて増菌培養し、C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC にて分離培養する条件では、供試した全ての検体で *astA* 保有大腸菌が分離された。本研究での分離率の差を考慮すると、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として mEC を優先して選択し、可能であれば NmEC の併用も考慮し、分離培地として CHSTEC および C-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられる。今後さらに多機関にて検討を重ね、食品における *astA* 保有大腸菌検出法として今後提案したい。また、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の候補を複数設計したため、今後特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。

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 infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 19(10), 704-712, 2022.

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. *Foodborne Pathogens and Disease* 19(12), 823-829, 2022.

(学会等発表)

新井沙倉、土井りえ、小西典子、尾畑浩魅、榊田希、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品からの *Escherichia albertii* 検出のための特異的リアルタイム PCR 法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

榊田希、尾畑浩魅、小西典子、土井りえ、新井沙倉、甲斐明美、廣瀬

- 昌平、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* 分離培養法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 山谷聡子、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、小嶋由香、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (1). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 柳本恵太、松永典久、小林章人、高橋直人、小嶋由香、床井由紀、山谷聡子、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (2). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子. 野菜における腸管毒素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小西典子、榊田希、新井沙倉、尾畑浩魅、土井りえ、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* の効率的な検出法に関する検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小嶋由香、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、山谷聡子、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会

学術講演会． 令和 4 年 11 月 10-11 日． 長崎

工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平．
新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、
工藤由起子． 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬昌平、工藤由起子． 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

令和4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 特異的 PCR 法の検討

研究要旨

astA 保有大腸菌の検出への既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の応用を検討した。その結果、Yamamoto らの PCR 法におけるプライマーを用いた場合、電気泳動での目的の PCR 産物のバンドの判定が容易であった。また、反応酵素として、Quick Taq を用いた場合に、非特異的反応由来のバンドが認められず、目的の PCR 産物のバンドが明瞭であった。この条件にて、食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌、*astA* 保有大腸菌以外の食中毒由来細菌および食品由来細菌を供試した特異性試験では、*astA* 保有大腸菌のみ陽性となり、*astA* 非保有大腸菌を含むその他の細菌では全て陰性であった。食品を用いた感度試験では、食品培養液 1 mL 当たりの *astA* 保有大腸菌数が概ね 5.0 log CFU 未満において検出されたため、食品中の病原細菌を検出する目的での使用に相当であると考えられた。以上より、食品を対象とした *astA* 遺伝子の検出では、Yamamoto らの PCR 法におけるプライマーおよび Quick Taq を酵素として用いることで効率的な試験が実施可能と推測された。但し、本方法はコンベンショナル PCR 法であるため、迅速性を改善するためにはリアルタイム PCR 法が必要であると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 大西貴弘、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

食品における培養法では、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、分離が困難な場合がある。さらに、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。そのため、対象の食中毒細菌特異的な遺伝子検出法と培養法を組み合わせることによって、効率良く試験を実施することが重要である。そこで本研究では、既存の *astA* 特異的遺伝子検出法について調査した。特に多数の報告があるコンベンショナル PCR 法に着目し、*astA* 保有大腸菌を食品から検出するために適した条件について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 既存の *astA* 特異的 PCR 法のプライマーの検討

既存の *astA* 特異的 PCR 法が複数存在するため、それらの食品での応用性について検討した。

1) *astA* 特異的 PCR 法の文献調査

既存の *astA* 特異的 PCR 法に関する文献を調査した。また、各自治体に業務にて使用している方法を問い合わせ、7 自治体から寄せられた回答とあわせ、情報収

集を行なった。

2) 食品検体

市販の国産ベビーコーン 1 検体 (ベビーコーン 1) および国産オクラ 2 検体 (オクラ 1 およびオクラ 2) を供試した。

3) 食品の増菌培養

各食品について、25 g をそれぞれ 3 枚のストマッカー袋に量りとった (n3)。ノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 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。

4) DNA 溶液の調製およびコンベンショナル PCR 法

各食品増菌培養液 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 4 つの文献 (Ito らの方法、Hidaka らの方法、Muller らの方法および Yamamoto らの方法) を参照したプライマー 4 セットを用いて *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した (表 1)。なお、Hidaka らの方法はプローブも含めたリアルタイム PCR 法として報告されているが、本試験ではプライマーのみを用いて検討した。また、カジトン培地に保存している *astA* 保有大腸菌株 1 エー

ゼを TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。培養液 0.1 mL から熱抽出法によって DNA を抽出し、陽性コントロールとして供試した。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。TaKaRa Ex Taq での反応条件は、98°C 10 秒間、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。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 µL 加えた。

(2) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の酵素の検討

1) 食品培養液

(1) での 3) で調製したオクラ 2 の培養液 1 および 3 を供試した。

2) 分離培養法

オクラ 2 の培養液 1 を Tryptic soy agar (TSA、BD) およびクロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC、クロモアガー社製造、関東化学販売) に、オクラ 2 の培養液 3 を TSA に画線し、37°C にて 22 時間培養した。

3) DNA 溶液の調製およびコンベンショナル PCR 法

分離培地のコロニー密集部を Sweep し、熱抽出により DNA を抽出、Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した (表 1)。陽性コントロールとして、上記 (1) 4) にて調製した DNA を供試した。PCR 酵素を検討するため、AmpliTaq Gold (サーモフィッシャーサイエンティフィック)、TaKaRa Ex Taq および Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) の 3 種類の酵素を供試した。また、プライマー終濃度が 0.2 µM となるよう調製した。機器および Ex Taq での反応条件は、上記の通り実施した。Quick Taq での反応条件は、94°C 2 分間、94°C 30 秒間 - 55°C 30 秒間 - 68°C 1 分の 30 サイクル、68°C 5 分間とした。AmpliTaq での反応条件は、95°C 10 分間、95°C 30 秒間 - 55°C 30 秒間 - 72°C 1 分の 30 サイクル、72°C 2 分間とした。

(3) Quick Taq を使用した *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のプライマーの検討

(2) にて検討し決定した Quick Taq を用い、(1) にて検討した Ito らの方法、Muller らの方法および Yamamoto らの方法のプライマーについて改めて検討した。

1) 供試 DNA

分担研究者の大西が昨年度に報告した食品における *astA* 保有大腸菌の汚染実態調査にて供試した食品培養液の抽出 DNA を使用した。汚染実態調査のスクリーニング PCR 法 (Muller らの Multiplex PCR 法) にて *astA* 特異的バンドが確認された検体について、① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループ：釣菌した 20 コロニーのうち *astA* 保有大腸菌が分離されなかった検体および② *astA* 保有大腸菌分離陽性グループ：*astA* 保有大腸菌が分離された検体、の 2 グループに分けた。両グループともに多様な食品を選択し、その DNA を下記の PCR 法へ供試した。

2) コンベンショナル PCR 法

(1) での 4) にて記載の Ito ら、Muller らおよび Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した。酵素は、(2) での 3) にて記載の Quick Taq を用いた。陽性コントロールとして、上記 (1) 4) にて調製した DNA を供試した。

(4) Quick Taq を使用した Yamamoto らの PCR 法における特異性の検討

(1) ~ (3) にて検討した結果優れていた PCR 法の条件について

特異性を検討した。

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 41 株を供試した (表 2)。

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 Quantus (プロメガ) 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* 特異的コンベンショナル PCR 法の特異性試験

(1) での 4) にて記載の Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した。酵素は、(2) での 3) にて記載の Quick Taq を用いた。陽性コントロールとして、上記 (1) 4) にて調製した DNA を供試した。

(5) Quick Taq を使用した Yamamoto らの PCR 法における感度の検討

(1) ~ (3) にて検討した結果優れていた PCR 法の条件にて感度

を検討した。*astA* 保有大腸菌は幅広い食品から分離されているため、複数種の食品からの培養液を利用した。

1) 菌株

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌 4 株 (AST19、AST46、AST73 および AST205) を供試した。

2) 食品検体

市販の国産豚肉、輸入エビおよび国産ベビーコーン (ベビーコーン 3) を供試した。

3) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ (10 μ L) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。各食品検体を 25 g 採取し、modified EC 培地 (mEC、日水製薬) 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42°C にて 22 \pm 2 時間培養した。この食品培養液にて *astA* 保有大腸菌 4 菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種鶏肉培養液 (想定 8 \sim 3 log cfu/mL 食品培養液) を調製した。菌接種食品培養液各 100 μ L を上記アルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA を下記 PCR 法のテンプレートとした。

4) コンベンショナル PCR 法

(1) での 4) にて記載の Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した。酵素は、(2) での 3) にて記載の Quick Taq を用いた。各 3 反応実施した。陽性コントロールとして、上記 (1) 4) にて調製した DNA を供試した。

C. 研究結果

(1) 既存の *astA* 特異的 PCR 法のプライマーの検討

各種 PCR 法の電気泳動像から、バンドの濃さなどの判定し易さを含め結果とした (表 3)。ベビーコーン 1 の培養液 1 および 2 では、4 種類の PCR 法いずれも陽性であり、そのバンドの濃さは陽性コントロールと同等であった。Ito らの PCR 法はオクラ 1 の培養液 3 以外全て PCR 陽性となった。Hidaka らの PCR 法では、オクラ 1 およびオクラ 2 の培養液 2 以外が PCR 陽性となり、Muller らの PCR 法はオクラ 1 の培養液 1、3 およびオクラ 2 の培養液 2 以外が PCR 陽性となった。Yamamoto らの PCR 法はベビーコーン 1 の培養液 1 および 2 以外全て PCR 陰性となった。

(2) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の酵素の検討

各種 PCR法の電気泳動像から、バンドの濃さの程度を判定した（表4）。AmpliTaqを用いた場合、3種類のいずれのDNAでも非特異的反応は認められなかったが、陽性コントロールでのバンドは他の2つの酵素よりも薄かった。ExTaqを用いた場合、3種類のいずれのDNAでも非特異的反応が強く認められ、陽性コントロールでは濃いバンドが確認された。Quick Taqを用いた場合、3種類のいずれのDNAでも非特異的反応は認められず、陽性コントロールでは濃いバンドが確認された。

(3) Quick Taqを使用した *astA* 特異的コンベンショナルPCR法のプライマーの検討

① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループでは8食品、② *astA* 保有大腸菌分離陽性グループでは5食品を対象とした（表5）。各種PCR法の電気泳動像から、バンドの濃さの程度を判定した。① *astA* 保有大腸菌分離陰性のグループでは、豚レバー検体はMullerらのPCR法陽性の一方、ItoらのPCR法では薄いバンドが確認され、YamamotoらのPCR法ではバンドが確認されなかった。また、オクラ3の検体では

ItoらのPCR法陽性の一方、MullerらのPCR法では薄いバンドが確認され、YamamotoらのPCR法ではバンドが確認されなかった。一方、② *astA* 保有大腸菌分離陽性のグループに含まれる5つの抽出DNAは、いずれも供試した3種類のPCR法陽性となった。

(4) Quick Taqを使用した Yamamoto らの PCR 法における特異性の検討

astA 保有大腸菌11株は、*astA* 特異的コンベンショナルPCR法陽性であった（表2）。その他の菌株では、供試した30株全てPCR陰性であった。

(5) Quick Taq を使用した Yamamoto らの PCR 法における感度の検討

3反応中3反応陽性の場合に陽性と判定し、最も希釈された陽性となった最大希釈段を検出限界とした。供試した4菌株の結果を総合すると、検出限界は豚肉とエビでは5.3～5.90 CFU/PCR tube (=3.0～5.1 log CFU/mL)、ベビーコーンでは29～490 CFU/PCR tube (=3.8～5.0 log CFU/mL)であった（表6）。AST205ではいずれの食品でも検出限界がおおむね5.0 log

CFU/mL であった。AST19、AST46 および AST73 の 3 株では、検出限界は豚肉とエビでは 5.3~17 CFU/PCR tube (=3.0~3.1 log CFU/mL)、ベビーコーンでは 29~45 CFU/PCR tube (=3.8~4.0 log CFU/mL) であった。

D. 考察

文献調査では、既存の *astA* 特異的 PCR 法が多数存在することが判明した。その中で、4 種類のプライマーセットを用いたコンベンショナル PCR 法について食品培養液由来の DNA を用いて増幅性を確認したところ、PCR 法によって検出結果が異なることが判明した (表 3)。その理由として、*astA* 遺伝子には多数のバリエーションが報告されている。そのため、供試した食品中の *astA* 保有大腸菌の *astA* 遺伝子のバリエーション型によっては、PCR の検出性が異なる可能性が考えられた。また、食品は多様な細菌種が含まれているため、それらの細菌が保有している遺伝子配列と PCR 法のプライマー配列が似ていた場合に非特異的反応が生じた可能性も考えられた。コンベンショナル PCR 法では、電気泳動のバンドが薄いと判定が困難となる。そこで、PCR 陽性と PCR 陰性の判定が容易であっ

た Yamamoto らの PCR 法のプライマーについて、さらに検討を進めることとした。

Yamamoto らの PCR 法が陰性の食品培養液を分離培地へ画線し、生育したコロニーをかき取って抽出した DNA について 3 種類の酵素を用いて Yamamoto らの PCR 法を検討したところ、Quick Taq では陽性コントロールのバンドが濃くかつ非特異的反応が確認されなかった (表 4)。一方、その他の 2 種類の酵素では、非特異的反応が観察されたもしくは陽性コントロールのバンドが他の酵素よりも薄かった。そのため、Yamamoto らの PCR 法のプライマーを Quick Taq にて反応させる条件が食品の PCR 法として比較的優れると考えられた。

Quick Taq を使用した 3 種類のプライマーセットでの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討では、*astA* 保有大腸菌が分離陽性の検体からは 3 種類の PCR 法のいずれも陽性であったが、*astA* 保有大腸菌が分離陰性の検体のうち 2 検体はその他の PCR 法では陽性またはバンドが薄く見える程度であったが Yamamoto らの PCR 法は陰性であった。食品を対象とした病原細菌の試験では、PCR 法が陽性にもかかわらず分離培養法が陰性の場合、

その PCR 法の結果が偽陽性ではないかと疑われる場合がある。本試験の結果から、Yamamoto らの PCR 法を用いることでバンドの薄い陽性検体が観察される数が減り、結果として判定が容易であることが予想された。

Yamamoto らの PCR 法について食品から分離される複数の菌株を用いて試験したところ、*astA* 保有大腸菌のみ陽性となり、特異性に優れることが判明した(表 2)。また、食品を用いた感度では、3 種類の食品とも検出限界が約 5 log CFU/mL 未満となり、コンベンショナル PCR としては比較的優れると考えられた。AST205 を除く 3 株の試験結果では、約 10 倍感度が向上した。AST205 は、いずれの食品でも検出限界値が他の株よりも高かったため、DNA 抽出効率が他よりも低いなどの原因が考えられた。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において、Yamamoto らのプライマーセットを Quick Taq にて使用する PCR 法が、PCR 産物の電気泳動による判定において陽性または陰性の判定が容易であり、特異性および感度に優れることが示された。そのため、今後食品を対象に *astA* 遺

伝子を検出する場合にはコンベンショナル PCR 法ではこの方法が効率的な試験に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会等発表)

山谷聡子、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、小嶋由香、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (1). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

柳本恵太、松永典久、小林章人、高橋直人、小嶋由香、床井由紀、山谷聡子、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (2). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

小嶋由香、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、山谷聡子、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16 -18 日. 兵庫

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

表1. 既存の *astA* 特異的PCR法

Assay	プライマー	産物 (bp)	引用	本試験 での検討
コンベンショナル PCR法	EASTOSI: GCCATCAACACAGTATATCCG	109	Ito et al., Microbiol. Immunol.58(8):467-473, 2014	有
	EASTOAS2: CGCGAGTGACGGCTTTGTAG			
	EAST-1S : GCCATCAACACAGTATATCC*	88	Kawase et al., Jpn. J. Infect. Dis. 71: 79-84, 2018	—
	astA-150R: TTCCATGACACGAAGCGCAG			
	MP-astA-F: TGCCATCAACACAGTATATCCG	102	Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(10):3380-3390, 2007	有
	MP2-astA-R: ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT			
	F: GCCATCACAGTATATCCG	108	Ruttler et al., BIOCELL 30(2):301-308, 2006	—
	R: GCGAGTGACGGCTTTGTAGT			
	EAST11-a: CCATCAACACAGTATATCCGA	111	Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 64(4):1441-1445, 1996	有
	EAST11-b: GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT			
リアルタイム PCR法	EAST-1S: GCCATCAACACAGTATATCC	106	Yatsuyanagi et al., JCM 40(1): 294- 297, 2002	—
	EAST_AS: GAGTGACGGCTTTGTAGTCC			
	astA-61f: ATGCCATCAACACAGTATATCCG	111	Hidaka et al., J. Appl. Microbiol. 106: 410-420, 2009	有**
	astA-171r: CGCGAGTGACGGCTTTGTA			
	astA-pro: (VIC) CATCCAGTTATGCATCGTG (MGB)			
	astAkReal_s: RCATCCAGTTATGCATCGTG	88	H21年度細菌研修（初級者対象）遺伝 子検査法	—
	astAkReal_a: TCAGGTCGCGAGTGACG			
	astAk_TET/BHQp: (Cy3) TGCCTTCGTGTCATGGAAGGACTA (BHQ2)			

*Yatsuyanagiらのプライマー

**コンベンショナルPCRの条件にて、astA-61fおよびastA-171rのみ供試し検討

表2. 食品由来細菌および食中毒細菌における *astA* 特異的PCR法による検出結果

菌種	供試菌 株数	コンベンショナル PCR法陽性株数*
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0
<i>Campylobacter coli</i>	1	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Escherichia albertii</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>		
Type strain	1	0
<i>astA</i> 保有大腸菌	11	11
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	1	0
<i>Shigella boydii</i>	4	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0
合計	41	11

*Yamamotoらの *astA* 特異的コンベンショナルPCR法をQuickTaqを用いて試験した

表 3. 食品培養液の各種 *astA* 特異的 PCR 法の結果

食品	培養液番号	コンベンショナルPCR法			
		Ito	Hidaka	Muller	Yamamoto
ベビーコーン	1	+++**	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++	+++
	3	+	+	+	-
オクラ1	1	±	-	-	-
	2	±	-	±	-
	3	-	-	-	-
オクラ2	1	++	+	±	-
	2	+	-	-	-
	3	++	+	+	-

*ポジコンと同等のバンドを+++とした

**薄いバンドを±とした

表 4. 各種酵素を用いた *astA* 特異的 PCR 法の結果

検体	培養液 番号	分離 培地	コンベンショナルPCR法の酵素*					
			AmpliTaq		ExTaq		Quick Taq	
			特異的 バンド	非特異的 バンド	特異的 バンド	非特異的 バンド	特異的 バンド	非特異的 バンド
オクラ2	1	TSA**	-	-	-	+++	-	-
	1	CHSTEC***	-	-	-	+++	-	-
	3	TSA	-	-	-	+++	-	-
陽性コントロール			++	-	+++	-	+++	-

*Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を試験した

**Tryptic soy agar 上のコロニーを Sweep し、PCR を実施した

***クロモアガーSTEC 基礎培地上のコロニーを Sweep し、PCR を実施した

表 5. 汚染実態調査の *astA* スクリーニング試験陽性食品検体における各種コンベンショナル PCR 法の結果

グループ	食品（産地や状態）	コンベンショナルPCR法*		
		Ito	Muller	Yamamoto
① <i>astA</i> 保有大腸菌 分離陰性	若鶏もも肉（国産）	+**	+	+
	豚レバー（国産）	±***	+	-
	牛シマチョウ（北海道、解凍）	+	+	+
	バナメイエビ（解凍）	+	+	+
	生真さば2枚おろし（北海道）	+	+	+
	オクラ3（フィリピン）	+	±	-
	オクラ4（フィリピン）	+	+	+
	ベビーコーン2（タイ）	+	+	+
② <i>astA</i> 保有大腸菌 分離陽性	若鶏もも肉(国産、皮なし)	+	+	+
	豚レバー（国産）	+	+	+
	和牛せんまい（国産）	+	+	+
	すずき切り身	+	+	+
	オクラ5（タイ）	+	+	+

* 酵素は QuickTaq を使用した

** 電気泳動での PCR 産物のバンドが濃い場合を+とした

*** 電気泳動での PCR 産物のバンドが薄い場合を±とした

表 6. 食品を用いた *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法*の検出限界

<i>astA</i> 保有大腸菌株	検出感度 (log CFU/mL)		
	豚肉	エビ	ヤングコーン
AST19	3.0	3.0	3.9
AST46	3.1	3.1	3.8
AST73	3.5	3.5	4.0
AST205	5.1	5.1	5.0

*Yamamoto らの *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を QuickTaq を用いて試験した

令和4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

近年、日本では、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。しかし、*astA* 保有大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、本菌による食中毒事例では、原因食品が不明であることが多い。そこで、原因食品特定に対応するため、食品中の *astA* 保有大腸菌を効率的に分離するための培養法の確立を目的に、多種類の食品に本菌を接種して検討した結果、本菌が 30 CFU/25 g 以上の汚染であれば、クロモアガー-STEC 培地および薬剤C添加クロモアガー-STEC 培地での分離培養によって、供試した全ての検体で本菌が分離されることが明らかになった。

研究協力者

宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
埼玉県衛生研究所	土井りえ、貫洞里美
東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魅、齊木 大
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
(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	大西貴弘、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、日本では、腸管凝集付着性

大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。食中毒細菌の食品検査では、培養法によっては食品由来細菌が優勢に増殖し、対象となる食中毒細菌の分離が困難な場合がある。そのため、食中毒の原因食品究明には、対象となる食中毒細菌に適した培養法の選択が重要である。そこで、本研究では、増菌培養法、分離培養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について多様な食品への応用性を評価するために、5 試験機関にて各種試験条件を設定し検討した。なお、*astA* 保有大腸菌の増菌培養の温度条件については事前に検討し、37℃より 42℃が優れていること確認して本研究に採用した。また、分離培地であるソルビトールマッコンキー寒天培地およびクロモアガーSTEC 培地への薬剤 C 添加濃度は、昨年度の検討結果等をふまえて決定した。

B. 研究方法

本研究では、8 種類 36 食品を対象に試験検体の *astA* 保有を PCR で確認した (図 1)、*astA* 陰性であれば *astA* 保有大腸菌の添加回収試験を (図 2)、*astA* 保有検体陽性であ

れば自然汚染検体での試験を行った。(図 3)。

(1) 試験検体の *astA* 確認試験

1) 食品検体

食肉として鶏肉ミンチ 2 食品、豚肉スライス 10 食品、豚肉ミンチ 4 食品および牛肉スライス 4 食品、海産物としてエビ 7 食品、野菜としてオクラ 6 食品、キュウリ 2 食品およびモヤシ 1 食品を供試した。

検体 (550 g 以上) を滅菌トレーなどの上で細切した後に均一化し、検体 10 g を量り取ったストマッカー袋を 1 袋と検体 25 g を量り取ったストマッカー袋を 20 袋 (検体 1~20) 用意した。各食品の一般生菌数、大腸菌数および大腸菌群数を計測するために、各食品 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、それぞれの食品 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、食品 1 g あたりの生菌数を算出した。

2) 培養および *astA* 特異的 PCR 法

上記の 20 袋のうち 4 袋へ室温に戻した mEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ にて 20～22 時間培養した。残りの 16 袋は冷蔵にて保管した。検体培養液各 0.1 mL から $10,000 \times g$ 10 分間遠心して上清を除き、50 mM NaOH を 85 μl 添加して再浮遊させた。 100°C で 10 分間加熱し、冷却後、1M Tris-HCl (pH 7.0) を 15 μl 添加して中和した。 $10,000 \times g$ 10 分間遠心し、得られた上清約 100 μl をテンプレート DNA とし、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

(Yamamoto ら、以下 *astA* 特異的 PCR 法) を実施した (n2)。PCR 試薬には、QuickTaq (東洋紡) を用いた。Forward プライマーとして 5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3' を、Reverse プライマーとして 5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3' を終濃度 0.2 μM となるよう調製して用いた。反応条件は 94°C 2 分

の熱変性ののち、 94°C 30 秒 - 55°C 30 秒 - 68°C 1 分を 30 サイクル繰り返し増幅反応させ、最後に 68°C 5 分とした。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドを確認した。

供試した 4 検体ともに *astA* 特異的 PCR 法で *astA* 陰性の食品は、残りの 16 検体について、(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験、を行った。なお、複数食品について同時に *astA* 確認試験を行い、4 検体全て陰性の食品が複数あった場合、それらの食品から選択し、(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験、を行った。

また、4 検体のうち 1 検体以上が *astA* 特異的 PCR 法で *astA* 陽性の食品は、(3) *astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験、を行った。なお、4 検体のうち 1 検体以上陽性の食品が複数あった場合は、陽性検体数が最も多い食品を選択し、(3) *astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験、を行った。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

高菌数接種群 (100 CFU/25 g) として 2 種類 3 食品、中菌数接種群 (50 CFU/25 g) として 3 種類 5 食品および低菌数接種群 (10 CFU/25

g) として 5 種類 5 食品を供試した。菌を接種した各食品を 2 種類の増菌培地中で培養し、その培養液を PCR 法および 3 種類の分離培地を用いた分離培養法に供試した。

1) 菌株

集団食中毒事例由来株である *astA* 保有大腸菌 07:H4 (AST19) および 0166:H15 (AST204) の 2 株を供試した。

2) 食品検体

豚肉スライス 3 食品 48 検体、牛肉スライス 2 食品 32 検体、エビ 3 食品 48 検体、オクラ 3 食品 48 検体、キュウリ 1 食品 16 検体およびモヤシ 1 食品 16 検体の計 208 検体を供試した。

3) 接種菌液の調製

各試験研究機関において、*astA* 保有大腸菌菌株保存のカジトン培地から 1 エーゼ (10 μ L) を Tryptone soya broth (TSB、OXOID) 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、OXOID) 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

返し実施し、TSB 中にて 18 時間培養した場合の菌数を計算し、低菌数接種として 10 CFU/25 g、中菌数接種として 50 CFU/25 g、高菌数接種として 100 CFU/25 g となるように希釈倍率を試験機関ごとに決定した。なお、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) 食品検体への *astA* 保有大腸菌接種および培養

検体 25 g を量り取ったストマッカー袋 16 袋に各接種菌数レベル用希釈菌液 0.1 mL を接種した。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、8 袋に modified EC 培地 (mEC、日水製薬) および別の 8 袋にノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 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 20~22 時間培養した。

5) 培養液からの DNA 抽出および *astA* 検出

4) の各増菌培養液 0.1 mL から (1) の 2) と同様の条件で DNA を抽出し、*astA* 特異的 PCR 法に供した。1 検体につき 2 反応実施した。

6) 分離培養

分離培養法では、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC、OXIOD) に薬剤 C を添加した SMAC (C-SMAC)、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) および薬剤 C を添加した CHSTEC (C-CHSTEC) を用いた。4) の検体培養液を各 2 枚の C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC に画線し、37℃にて 20 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、C-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および C-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 3 個選択し、CHSTEC に単離して、37℃にて 20 時間培養した。培養後にコロニーの色を判定し、藤色を呈したコロニーについて 7) コロニーの *astA* 保有確認を行った。

7) コロニーの *astA* 保有確認

6) で継代培養後に CHSTEC 上で藤色を呈したコロニーを TE (pH 8.0) 100 μ l に懸濁し、100℃10 分間加熱した。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 \times g 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとし、(1) の 2) と同様の条件で *astA* 特異的 PCR 法を 1 検体につき 1 反応実施した。

8) 生化学的性状の確認

(2) の 7) で *astA* 陽性となったコロニーを TSI 寒天培地 (TSI、日水製薬) および LIM 培地 (LIM、日水製薬) に接種し、37℃にて 18 時間培養した。培養後にブドウ糖分解能、乳糖白糖分解能、L-リジン脱炭酸能、インドール産生性および運動性を判定し、生化学的性状が接種菌株と同一であることを確認した。

(3) *astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験

astA 陽性の 4 種類 6 食品を供試した。各食品を 2 種類の増菌培地中で培養し、その培養液を PCR 法および 3 種類の分離培地を用いた分離培養法に供試した (図 3)。

1) 食品検体

鶏肉ミンチ 2 食品 32 検体、豚肉ミンチ 2 食品 32 検体、牛肉スライス 1 食品 16 検体およびオクラ 1 食品 16 検体の計 96 検体を供試した。

2) 食品検体の培養

検体 25 g を量り取ったストマッカー袋 16 袋のうち 8 袋に mEC を、および別の 8 袋に NmEC 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42℃にて 20~22 時間培養した。

3) 培養液からの DNA 抽出およ

び *astA* 検出

(2) の 5) と同様に実施した。

4) 分離培養

2) の検体培養液を各 2 枚の C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC に画線し、37℃にて 20 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、C-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および C-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 10 個選択し、CHSTEC に単離し、37℃にて 20 時間培養した。培養後に藤色を呈したコロニーから DNA を熱抽出した。

5) コロニーの *astA* 保有確認

(2) の 7) と同様に実施した。

6) 生化学的性状の確認

(3) の 4) で単離したコロニーのうち、*astA* 特異的 PCR 法で陽性となったコロニーを TSI 寒天培地および LIM 培地に接種し、37℃にて 18 時間培養した。培養後にブドウ糖分解能、乳糖白糖分解能、L-リジン脱炭酸能、インドール産生性および運動性を判定して大腸菌の生化学性状と一致することを確認した。

C. 研究結果

(1) 試験検体の *astA* 確認試験

1) 食品中の生菌数、大腸菌群数、

大腸菌数

本研究にて供試した 8 種類の食品において、生菌数は豚肉ミンチで最も高く 7.1 から 8.1 Log CFU/g であった (表 1)。鶏肉ミンチ、豚肉スライス、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシの生菌数は、3.0 Log CFU/g 以上であった。

大腸菌群数は豚肉ミンチで最も高く 3.5 から 7.7 Log CFU/g であった (表 1)。鶏肉ミンチ、豚肉スライス、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシでも大腸菌群数が検出された。大腸菌は、豚肉スライス、豚肉ミンチ、オクラ、キュウリ検体の一部でのみ検出され、その他の食品では検出限界 (2 Log CFU/g) 以下であった (表 1)。

2) *astA* 陽性検体数

供試した 36 食品 144 検体のうち、48 検体 (33.3%) が *astA* 陽性であった。*astA* 陽性検体は、鶏肉ミンチ 2 食品 8 検体、豚肉スライス 4 食品 12 検体、豚肉ミンチ 4 食品 14 検体、牛肉スライス 2 食品 7 検体、オクラ 3 食品 7 検体であった。検体が *astA* 陽性であることと生菌数、大腸菌群数および大腸菌数に関連性は認められなかった (表 1)。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

1) 接種菌数

添加回収試験で食品に接種した *astA* 保有大腸菌菌数は、低菌数接種群で 7-18 CFU/25 g、中菌数接種群で 30-93 CFU/25 g、高菌数接種群で 105-307 CFU/25 g であった。

2) *astA* 保有大腸菌接種の食品培養液からの *astA* 検出

本研究に供試した低菌数接種群の 5 種類 5 食品（豚肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシ：各 1 食品）、中菌数接種群の 3 種類 5 食品（豚肉スライス：2 食品、牛肉スライス：1 食品、オクラ：2 食品）および高菌数接種群の 2 種類 3 食品（牛肉スライス：1 食品、エビ：2 食品）は、全ての増菌培地で *astA* 陽性であった（表 2）。

3) *astA* 保有大腸菌の分離

低菌数接種群では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、増菌培地での合計は mEC で 70%、NmEC で 65%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 46.7%であり、NmEC 培養の CHSTEC が最も高く 91.9%であり、C-SMAC よりも CHSTEC および C-

CHSTEC で比較的高い傾向であった（表 2）。また、低菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、増菌培地では mEC で 67.5%、NmEC で 72.5%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 50%であり、mEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 65%であった。

中菌数接種群では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、増菌培地での合計は mEC で 92.5%、NmEC で 84.7%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 60.8%であり、mEC 培養の CHSTEC が最も高く 100%であった（表 2）。また、中菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、増菌培地では mEC および NmEC とともに 100%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 67.5%であり、その他の組み合わせは約 100%であった。

高菌数接種群では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、いずれの増菌培地と分離培地の組み合わせも 100%であった（表 2）。また、高菌数接

種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合も全ての組み合わせで約 100%であった。

(3) *astA* 陽性大腸菌自然汚染検体での試験

1) 増菌培養液からの *astA* 検出
供試した検体は、mEC で 48 検体中 41 検体が *astA* 陽性であり、NmEC で 48 検体中 36 検体が *astA* 陽性であった (表 3)。

2) *astA* 保有大腸菌の分離

釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、増菌培地での合計は mEC で 25.6%、NmEC で 8.7%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-CHSTEC が最も低く 8.2%であり、mEC 培養の CHSTEC が最も高く 29.8%であり、mEC が比較的高い傾向であった (表 3)。また、供試検体のうち *astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、増菌培地では mEC で 52.1%、NmEC で 41.7%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-CHSTEC が最も低く 27.1%であり、mEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 45.8%であった。

D. 考察

astA 確認試験に供試した食品検

体の 33.3%が *astA* 陽性であったことから、市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された (表 1)。また、各食品検体の生菌数、大腸菌群数および大腸菌数と *astA* 保有大腸菌汚染に関連性は確認されなかった (表 1)。

増菌培地については、添加回収試験の釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を比較すると、低菌数群および中菌数接種群では mEC と NmEC が同等か NmEC よりも mEC がやや高い傾向であった。一方で、供試検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群では mEC より NmEC がやや高い傾向であった。なお、中菌数接種群および高菌数接種群では、mEC および NmEC とともに 100%であった。以上から、mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であると考えられた。一方で、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合が mEC で 25.6%、NmEC で 8.7%であったことから、供試食品中の *astA* 保有大腸菌と夾雑菌の組み合わせによっては、NmEC での増菌が分離に適さない場合があることが示された。NmEC に選択剤として添加されているノボピオ

シンが *astA* 保有大腸菌の増殖を抑制、あるいは夾雑菌の増殖を促進する可能性が推測された。また、NmECでの増菌培養と C-SMAC での分離培養の組み合わせは、食品によっては、その他の組み合わせと比較してやや劣る結果が認められたことから（詳細略）、分離培地によっては *astA* 保有大腸菌の分離に適さない選択剤の組み合わせがあることが推測された。以上の結果から、原因として *astA* 保有大腸菌が疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として mEC を優先して選択し、可能であれば NmEC の併用も考慮することが望ましいと考えられる。

分離培地については、添加回収試験の釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を比較すると、C-SMAC よりも CHSTEC および C-CHSTEC で高い傾向であった（表 2）。供試検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合の比較でも同様の傾向であった。また、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験でも、概ね同様の傾向であった（表 3）。以上の結果から、*astA* 保有大腸菌の分離では、CHSTEC および C-CHSTEC が望ましいと考えられる。なお、SMAC 上では大腸菌群と *astA* 保有大腸菌が類似した赤色コロニーを形成するため判別が困難

であることが、分離率低下の原因であると推察された。その他の分離培地についても今後検討していく必要がある。

中菌数接種群および高菌数接種群では、供試検体のうち *astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は 100%であった。このことから、30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。

E. 結論

astA 保有大腸菌を 30 CFU/25 g 以上を食品に接種し、mEC または NmEC にて増菌培養し、C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC にて分離培養する条件では、供試した全ての検体で *astA* 保有大腸菌が分離された。

本研究での分離率の差を考慮すると、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として mEC を優先して選択し、可能であれば NmEC の併用も考慮し、分離培地として CHSTEC および C-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられる。本研究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 *astA* 保有大腸菌検出法として今後提案したい。

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 infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 19(10), 704-712, 2022.

(学会等発表)

榊田希、尾畑浩魅、小西典子、土井りえ、新井沙倉、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* 分離培養法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

小西典子、榊田希、新井沙倉、尾畑浩魅、土井りえ、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* の効率的な検出法に関する検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平.

新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫

廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、工藤由起子. 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

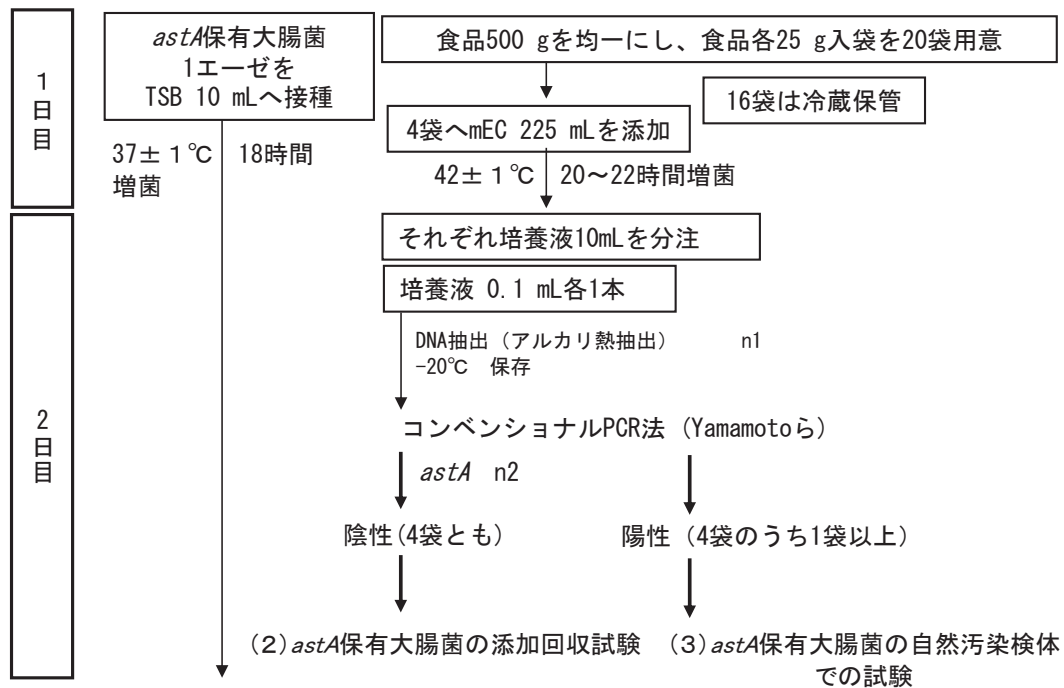


図1 試験検体の *astA* 確認試験

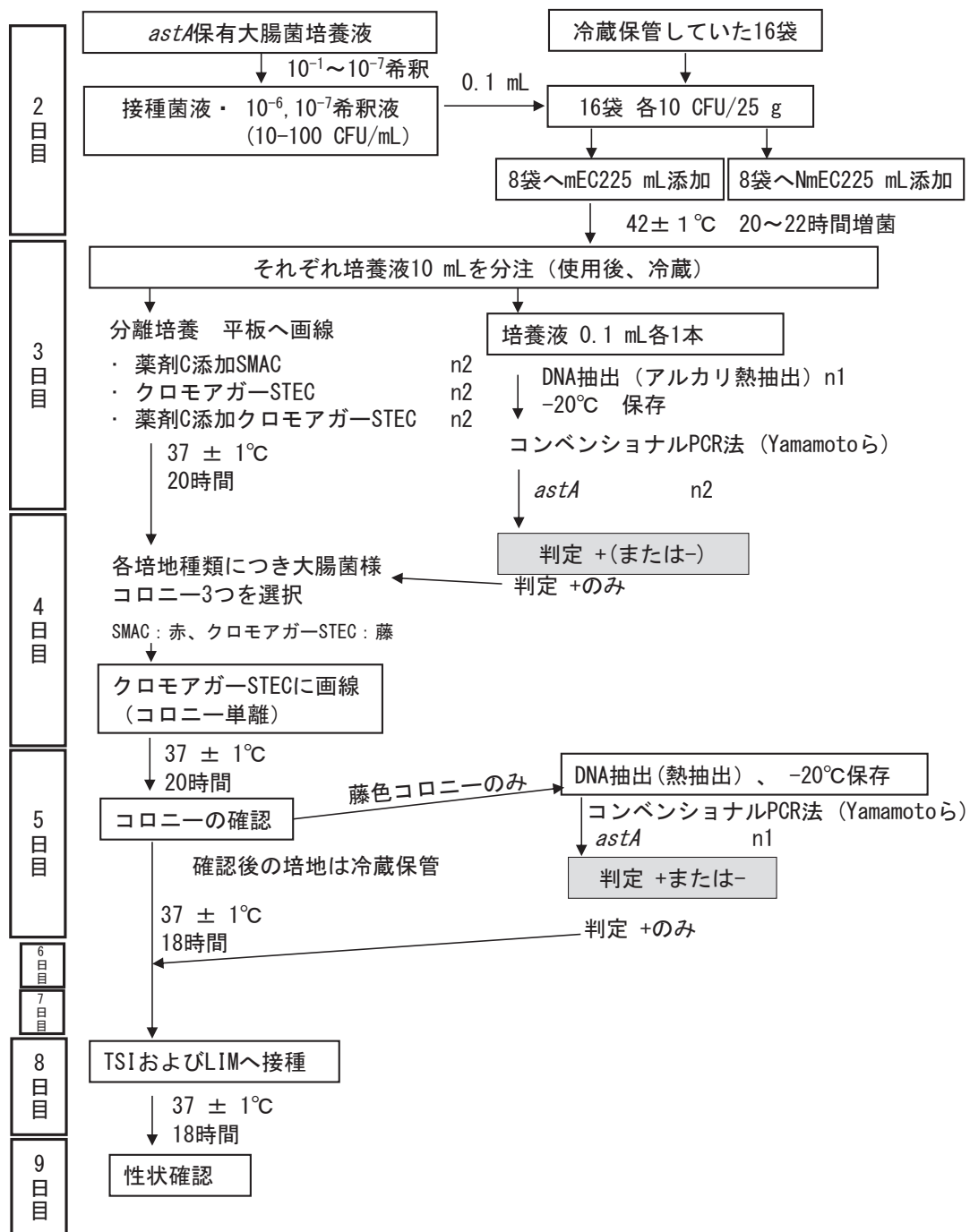


図 2 *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

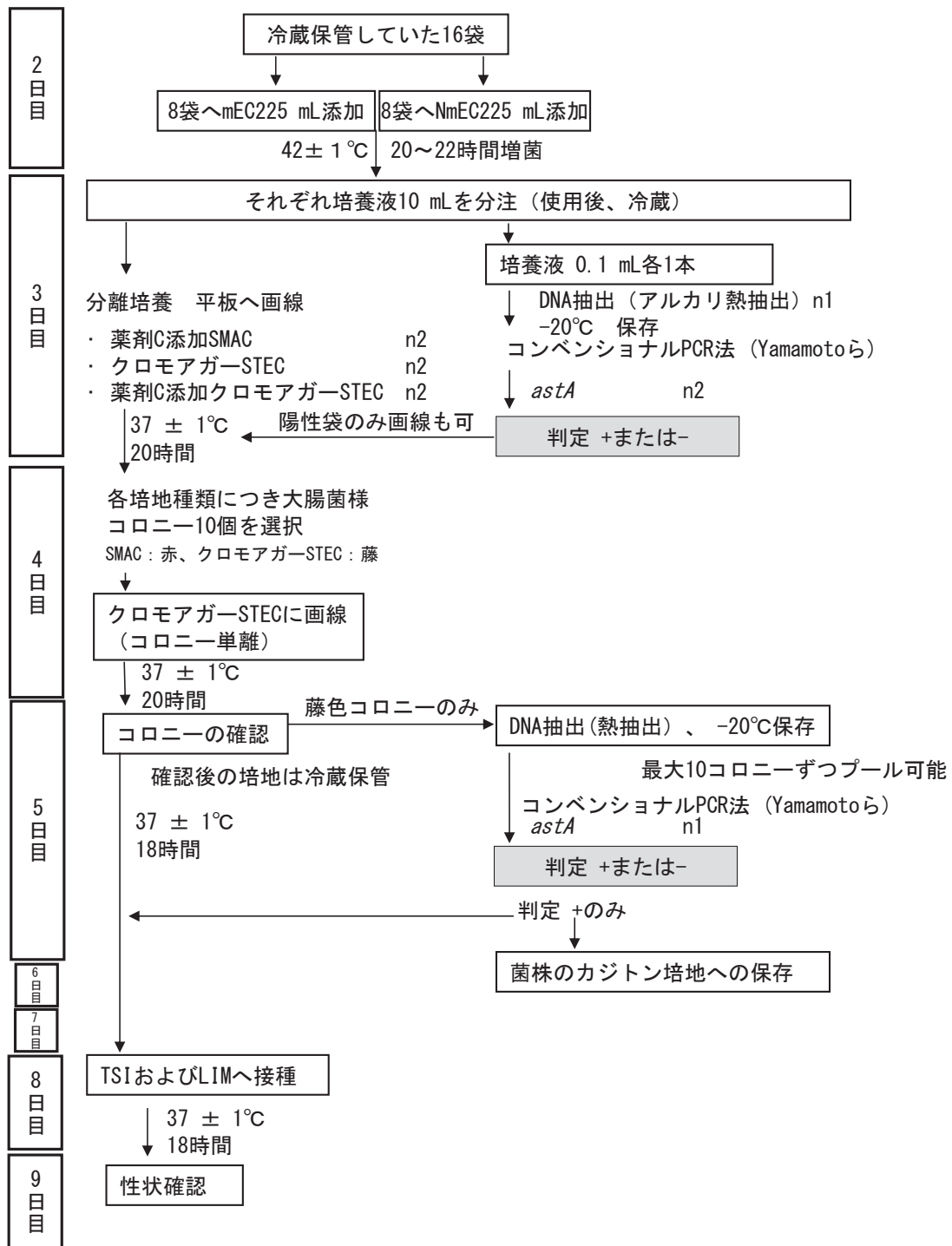


図3 *astA* 保有大腸菌の自然汚染検体での試験

表1 食品検体の *astA* 陽性数、生菌数、大腸菌群数および大腸菌数

食品の種類	<i>astA</i> 陽性 検体数 /4検体(%)	食品数	菌数 (Log CFU/g)		
			生菌数	大腸菌群	大腸菌
鶏肉ミンチ	4/4	2	4.5-4.8	2.0-3.1	<2
豚肉スライス	0/4	6	3.0-4.8	<2-3.8	<2-2.7
	1/4-4/4	4	4.1-4.9	2.3-3.5	<2
豚肉ミンチ	2/4-4/4	4	7.1-8.1	3.5-7.7	<2-6.5
牛肉スライス	0/4	2	4.9-5.4	<2	<2
	3/4-4/4	2	5.6-7.3	<2-6.9	<2
エビ	0/4	7	3.0-6.4	<2-3.1	<2
オクラ	0/4	3	5.9-7.1	5.5-7.0	<2
	1/4-4/4	3	5.1-6.4	3.4-5.9	<2-3.3
キュウリ	0/4	2	6.0-6.3	3.1-4.3	<2-2.5
モヤシ	0/4	1	7.4	7.2	<2
合計	48/144 (33.3)	36	3.0-8.1	<2-7.7	<2-6.5

* 2 検体は生菌数、大腸菌群数および大腸菌数試験を未実施

表2 *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

接種菌数 レベル	食品	増菌 培地	陽性検体 数/供試検 体数	<i>astA</i> 陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				<i>astA</i> 陽性コロニーが分離された検体数 /供試検体数(%)			
				TM- SMAC	CHSTEC	TM- CHSTEC	合計	TM- SMAC	CHSTEC	TM- CHSTEC	合計
低	5種類 5食品*	mEC	40/40 (100)	72/118 (61.0)	68/83 (81.9)	75/106 (70.8)	215/307 (70.0)	24/40 (60.0)	25/40 (62.5)	26/40 (65.0)	27/40 (67.5)
		NmEC	40/40 (100)	56/120 (46.7)	68/74 (91.9)	71/106 (67.0)	195/300 (65.0)	20/40 (50.0)	25/40 (62.5)	26/40 (65.0)	29/40 (72.5)
中	3種類 5食品**	mEC	40/40 (100)	97/120 (80.8)	120/120 (100)	116/120 (96.7)	333/360 (92.5)	39/40 (97.5)	40/40 (100)	40/40 (100)	40/40 (100)
		NmEC	40/40 (100)	73/120 (60.8)	114/120 (95.0)	118/120 (98.3)	305/360 (84.7)	27/40 (67.5)	39/40 (97.5)	40/40 (100)	40/40 (100)
高	2種類 3食品 ***	mEC	24/24 (100)	72/72 (100)	72/72 (100)	72/72 (100)	216/216 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)
		NmEC	24/24 (100)	72/72 (100)	72/72 (100)	72/72 (100)	216/216 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)	24/24 (100)

菌数レベル：低は7-18 CFU/25 g、中は30-93 CFU/25 g、高は105-307 CFU/25 g

*豚肉スライス、エビ、オクラ、キュウリ、モヤシ

**豚肉スライス (2食品)、牛肉スライス、オクラ (2食品)

***牛肉スライス、エビ (2食品)

表3 *astA* 保有大腸菌の自然汚染検体での試験

食品	増菌 培地	陽性検体数 /供試検体 数	<i>astA</i> 陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				<i>astA</i> 陽性コロニーが分離された検体数 /供試検体数(%)			
			C- SMAC	CHSTEC	C- CHSTEC	合計	C- SMAC	CHSTEC	C- CHSTEC	合計
4種類 6食品 *	mEC	41/48 (85.4)	79/410 (19.3)	122/410 (29.8)	114/410 (27.8)	315/1,230 (25.6)	19/48 (39.6)	21/48 (43.8)	22/48 (45.8)	25/48 (52.1)
		NmEC	36/48 (75.0)	33/350 (9.4)	26/318 (8.2)	27/326 (8.3)	86/994 (8.7)	14/48 (29.2)	16/48 (33.3)	13/48 (27.1)

*豚肉ミンチ (2食品)、鶏肉ミンチ (2食品)、オクラ、牛肉スライス

令和4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 特異的リアルタイム PCR 法の開発

研究要旨

astA 保有大腸菌の食品での検査法として、リアルタイム PCR 法の開発が期待されている。また、近年 *astA* の遺伝子多型（バリエーション）が明らかになっているため、本研究では、*astA* のバリエーションに着目して、リアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブ候補を新規に設計した。その結果、*astA* の現在判明している全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案と *astA* として機能していないことが予想されるバリエーション X (大岡らの解析) 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。それらは、*astA* 陰性の各種食中毒細菌や食品由来細菌を増幅しなかったことから特異性が高いことが示された。今後は、各バリエーションの増幅性を確認し、感度についても評価を進めたい。

研究協力者

福井県衛生環境研究センター

横山孝治

姫路市環境衛生研究所

新免香織

鹿児島大学

大岡唯祐

国立感染症研究所

伊豫田 淳、李 謙一

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

astA 保有大腸菌の食品での検査法として、*astA* 遺伝子特異的な遺

伝子検出法が有用であると考えられ、コンベンショナル PCR 法やリアルタイム PCR 法が既に複数報告さ

れている。特に、様々な細菌が混在する食品から *astA* 保有大腸菌を検出するためには、特異性が高く迅速な判定が可能なリアルタイム PCR 法のプローブ法の活用が適していると考えられる。

一方で、*astA* 遺伝子には、その遺伝子配列の違いから複数の遺伝子多型（バリエーション）が報告されている（Silva et al., BMC Microbiol. 2014, 14:135; Maluta et al, FEMS Microbiol. Lett. 2017, 364:6）。分担研究者の大岡の解析では、全バリエーションの中には *astA* として機能していないことが予想されるバリエーションも存在することが示されている（詳細略、Personal communication）。そこで本研究では、日本の集団食中毒事例由来株の *astA* バリエーションを同定し、それらのバリエーションを包括的に検出可能なリアルタイム PCR 法を新規に開発することを目的とした。

B. 研究方法

（1）集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌のバリエーションの特定

1）菌株

astA 保有大腸菌による集団食中毒事例由来株 14 株を供試した（表 1）。

2）*astA* 配列取得

14 株のうち 7 株については、分担研究者の伊豫田から MiSeq（イルミナ）にて取得した配列が提供された。その他 7 株については、国衛研にて以下の方法にて配列取得した。菌株を Tryptone soya broth (TSB、オキシイド) 中で 37°C にて 18 時間培養した。この菌培養液を NucleoSpin Tissue キット（タカラバイオ）を用いて DNA を抽出し、抽出 DNA の濃度を Quantus（プロメガ）によって測定した。Nextera XT DNA Library Prep キット（イルミナ）または Illumina DNA prep キット（イルミナ）を用いてライブラリーを調整した。ライブラリーのサイズは TapeStation（アジレント・テクノロジー）を用いて確認し、MiniSeq にて配列取得した。

3）バリエーションの特定

得られた配列は、分担研究者の大岡が *astA* の各種バリエーションリファレンス配列と照合、バリエーションを特定した。

（2）プライマーおよびプローブ設計領域の選定

astA の各種バリエーションリファレンス配列について、*astA* 遺伝子上流および下流を含めた領域を抜き出し、アライメントした。

各種バリエントで共通した配列について、プライマーおよびプローブを設計可能な領域とした。

(3) プライマーおよびプローブ候補の設計

プライマー等設計支援ソフトウェアである Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)にてプライマーおよびプローブ候補を設計した。設計されたプライマーおよびプローブ候補を *astA* リファレンス配列と比較し、設計したプライマーおよびプローブ候補配列の末端に1塩基多型が存在しない候補を選定した。また、分担研究者の大岡から、*astA* を保有する腸管出血性大腸菌の多くがバリエント X の *astA* を保有することおよびバリエント X の配列は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、バリエント X が検出対象から除外されるプライマーおよびプローブ候補も設計した。選定されたプライマーおよびプローブ候補のオリゴを合成した。なお、プローブは、FAM の蛍光標識を選択した。

(4) 特異性試験

1) 菌株

各種食中毒細菌や食品由来細菌の合計 26 菌種、32 株を供試し

た(表1)。これらは、腸管病原性大腸菌(EPEC)および腸管出血性大腸菌(EHEC)の各1株、大腸菌と近縁の *Escherichia albertii* の標準株(JCM 17328^T)および散発下痢症患者由来株(EA40)が含まれた(表1)。

2) DNA 溶液の調製

菌株を TSB 中で 37°C にて 18 時間培養した。この菌培養液を NucleoSpin Tissue キットを用いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を Quantus によって測定した。抽出 DNA 溶液を滅菌蒸留水(DW)にて 2 ng/ μ L の濃度に希釈した。この希釈 DNA 溶液をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

3) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

Yamamoto らの方法のプライマーを用いて *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を実施した(表2)。陽性コントロールとして、*astA* 保有大腸菌の培養液から熱抽出した DNA を供試した。コンベンショナル PCR 試薬には、Quick Taq HS DyeMix (東洋紡)を用いた。反応条件は、94°C 2 分間、94°C 30 秒間 - 55°C 30 秒間 - 68°C 1 分の 30 サイクル、68°C 5 分間とした。

4) リアルタイム PCR 法

設計した Assay 1~11 (表 2) のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR をそれぞれ行った。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調製した希釈 DNA 溶液を 5 μ l 加えた。1 つの DNA 溶液につき 2 反応実施した。機器は QuantStudio 3 または QuantStudio 5 (サーモフィッシュ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 40 サイクル増幅反応させた。2 反応中 2 反応陽性の場合に陽性と判定した。

(5) 遺伝子シーケンスによる配列決定

供試した 28 株のうち、*E. coli* ESC425 および *E. albertii* EA40 の 2 株について、上記にて抽出した各 DNA を鋳型として供試し、Silva らのシーケンス用プライマー (Silva et al., BMC Microbiol. 2014, 14:135) にて PCR 反応による増幅を行った (表 2)。PCR 反応には、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を使用した。また、プライマーの終濃度を 0.4

μ M に調製した。98°C 10 秒の熱変性ののち、98°C 10 秒 - 50°C 5 秒 - 72°C 90 秒を 35 サイクルの増幅反応後、72°C で 5 分間反応させた。PCR 産物を電気泳動した。ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) によって PCR 産物を精製した。精製 PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いた cycle sequencing に供試した。Cycle sequencing には、上記 PCR 反応と同一のプライマーを用いた。Cycle sequencing 産物は、エタノール沈殿にて精製した。遺伝子配列は、Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いた遺伝子シーケンスにて決定した。決定した配列について、*astA* リファレンス配列と比較した。

C. 研究結果

(1) 集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌のバリエーションの特定

1) バリエーションの特定

供試した 14 株のうち、単一のバリエーションのみ保有する株は 6

株あり、2種類のバリエントを保有する株は7株、3種類のバリエントを保有する株は1株であった(表1)。最も多くの株が保有するのは、prototype(4株)であった。

(2) プライマーおよびプローブ設計領域の選定

バリエント間でミスマッチが少ない *astA* 遺伝子上流および下流までの範囲をプライマーおよびプローブ設計可能範囲と選定した(図1)。

(3) プライマーおよびプローブ候補の設計

全 *astA* バリエントの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットを7種類(Assay 1、Assay 2、Assay 3、Assay 4、Assay 5、Assay 6およびAssay 9)およびバリエントX以外の全 *astA* バリエントの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットを4種類(Assay 7、Assay 8、Assay 10およびAssay 11)設計した(表2)。

(4) 特異性試験

YamamotoらのコンベンショナルPCR法では、*E. albertii* EA40株のみ陽性であり、その他26菌種31株は全て陰性であった(表1)。

供試した *E. albertii* EA40株は、設計した全11種類のリアルタイムPCR法で陽性となった(Ct値:15.6~19.0)。また、Assay 1~Assay 6およびAssay 9において、*E. coli* ESC425株は陽性となった(Ct値:20.6~32.6)。特に、Assay 6では、ESC425株のCt値が20.6と最も低かった。その他、26菌種30株はいずれのPCR法でも陰性であった。

(5) 遺伝子シーケンスによる配列決定

E. albertii EA40は、*astA* リファレンス配列の中のPrototypeと100%配列が一致したため、prototypeと同定された(図2)。また、*E. coli* ESC425は、バリエントXと100%配列が一致したため、バリエントXと同定された。

D. 考察

astA については、その病原性が現時点で明確になっておらず、過去には *astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されたと報告されている(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)。そのため、機能している *astA* を効率よく検出することが、食品や患者から

astA を検出する上で重要である。本研究の過程で、分担研究者の大岡から *astA* 保有の腸管出血性大腸菌の多くがバリエーション X の *astA* を保有すること、さらに、バリエーション X の配列からこのバリエーションは *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得た。その情報を参考に、*astA* の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案とバリエーション X 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。

本研究にて、集団食中毒事例由来株の *astA* のバリエーションを同定したが、種類の異なる複数のバリエーションを複合的に保有する株が半数以上を占めていた。今後、開発している *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の特異性を精査するためには、個々のバリエーションの代表株を選出し、その株を用いた特異性試験を実施する必要がある。そのためには、1 種類の *astA* バリエーションを保有する各バリエーションの代表株を決めるためにシーケンス反応による *astA* の配列決定が必要である。次に、十分な特異性を示したプライマーおよびプローブセット案について、食品を用いた感度試験を実施する必要がある。ゲノム上に複数の *astA* をコ

ードする株や *astA* をコードするプラスミドを複数個保有する株も存在するため、供試する菌株の選定には注意を要することが予想される。さらに、実際の食品への応用性についても、培養法の利用と併せて検討を重ねる必要がある。

また、本研究では *astA* 保有大腸菌の食品での検査法の確立を最終目的としているが、本試験で *E. albertii* が *astA* を保有していたように、*astA* は他の細菌種でも検出される可能性がある。*astA* 保有大腸菌が原因と予想される食中毒事例の検査の際には、*astA* の検出に加えて大腸菌も同時に検出することが求められる可能性がある。

E. 結論

astA の現在判明している全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案とバリエーション X 以外の全バリエーションを検出するプライマーおよびプローブセット案をそれぞれ複数設計した。今後、これらの特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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. Foodborne Pathogens and Disease 19(12), 823-829, 2022.

(学会等発表)

新井沙倉、土井りえ、小西典子、尾畑浩魅、榊田希、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品からの *Escherichia albertii* 検出のための特異的リアルタイム PCR 法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京

新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子. 野菜における腸管毒

素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

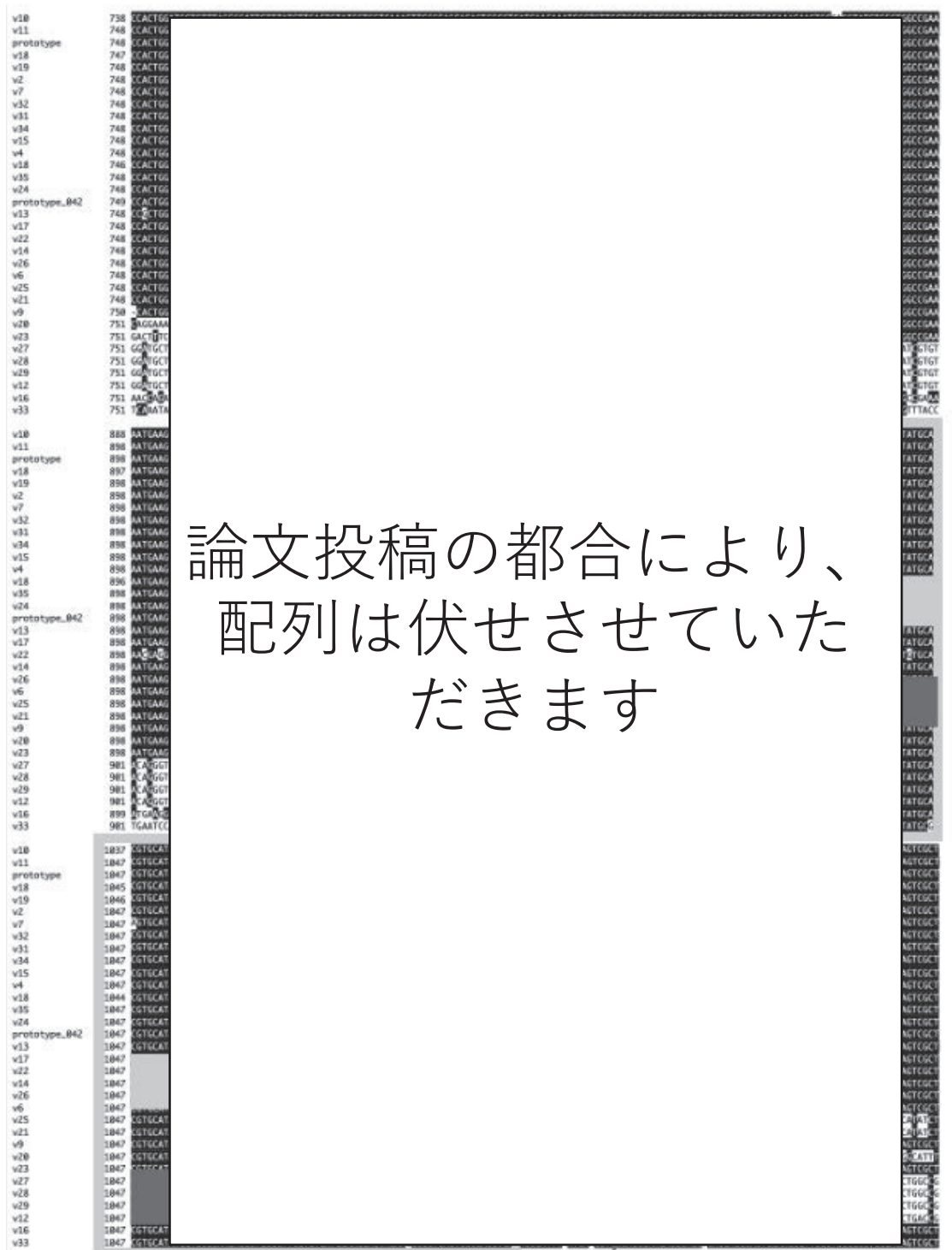


図1. *astA*特異的リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ設計可能領域

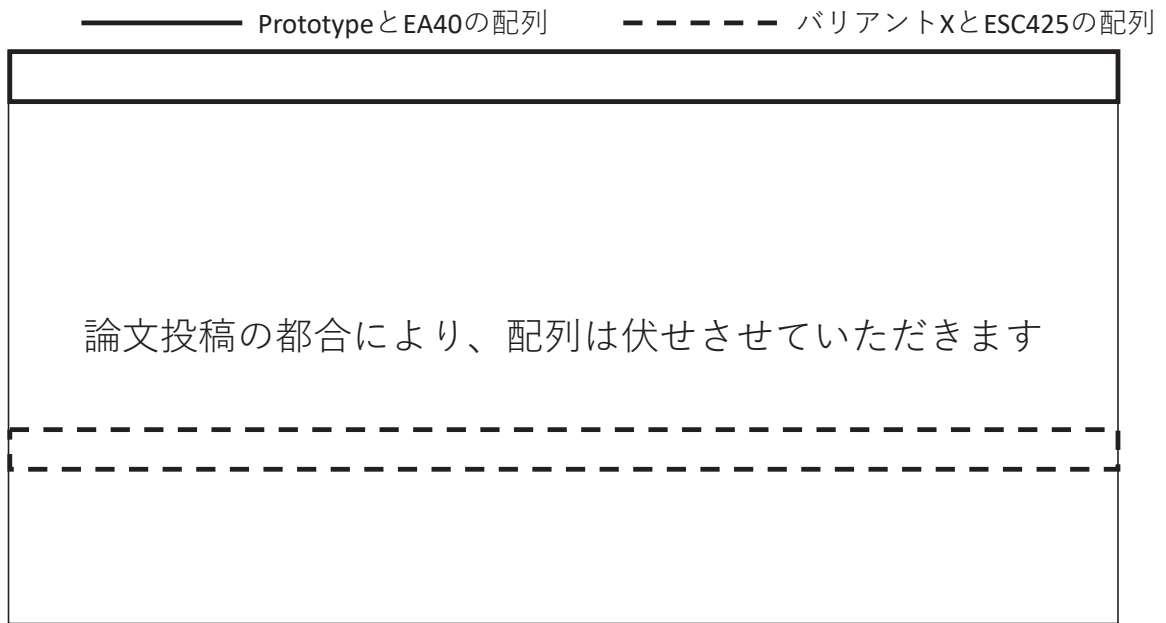


図2. *astA* リファレンス配列とESC425およびEA40の*astA*配列の比較

表1. 開発したリアルタイムPCRの特異性試験へ供試した菌種と結果

菌種	供試株数	コンベンショナルPCR陽性数*	リアルタイムPCR陽性数 (Ct値**)											
			Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4	Assay 5	Assay 6	Assay 7	Assay 8	Assay 9	Assay 10	Assay 11	
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter coli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia albertii</i>														
EA1 ^T	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EA40	1	1	1 (18.0)	1 (15.7)	1 (18.3)	1 (17.6)	1 (16.2)	1 (17.7)	1 (15.6)	1 (18.0)	1 (19.0)	1 (17.7)	1 (18.7)	
<i>Escherichia coli</i>														
ESC67 (EPEC)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESC425 (EHEC)	1	0	1 (29.8)	1 (29.7)	1 (32.6)	1 (32.6)	1 (29.5)	1 (20.6)	0	0	1 (28.4)	0	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella boydii</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* YamamotoらのPCR法をQuickTaqにて試験した

**Duplicateしたwellの平均Ct値

表2. 供試した *astA* 特異的PCR法のプライマーおよび *astA* 特異的リアルタイムPCR法のプライマーおよびプローブ候補

名称	目的	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 (bp)
Yamamotoらの コンベンショナルPCR法	<i>astA</i> の検出	EAST11-a: CCATCAACACAGTATATCCGA EAST11-b: GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111
Assay 1	全 <i>astA</i> バリエーションの検出	論文投稿の都合により、 配列等は伏せさせていただきます	
Assay 2	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 3	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 4	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 5	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 6	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 7	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 8	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 9	全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 10	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Assay 11	バリエーションX以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		
Silvaらのシーケンス反応	<i>astA</i> のシーケンス反応	EAST13a: AGAACTGCTGGGTATGTGGCT EAST12b: CTGCTGGCCTGCCTCTTCCGT	281

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4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

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。R4年度は、昨年度にドラフトゲノム配列を取得した *astA* 遺伝子陽性 31 株について、*astA* 遺伝子のゲノム局在を明らかにするため、完全長ゲノム配列の取得を試みた。また、NCBI 等公共データベース登録株から同定したされた完全長ゲノム配列決定大腸菌株（約 9,000 株）の中から同定した 713 株の *astA* 遺伝子陽性株について、本解析で同定した 31 株と併せて解析し、35 種類の *astA* 遺伝子バリエントを同定した。これら 35 種類のバリエント（V1-V35）について詳細な配列解析を実施した結果、保有株数の多い主要な *astA* 遺伝子バリエントは V22 (218 株)、prototype (145 株)、V6 (68 株)、V27 (46 株)、V12 (36 株)、V7 (12 株) であった。また、それらとは別に *astA* 遺伝子の断片を持つ株が 349 株存在した。各バリエントの intactness についての解析から、V7, V15, V22, V33 は premature stop codon などにより機能しない可能性が示唆された。これらの結果、機能する可能性があり、多数の株に保有されるバリエントは prototype、V6、V27 の 3 種類と考えられた。これとは別に、*astA* 遺伝子がコードされている挿入配列 IS1414 の intactness に関する解析から、prototype, V2, V7, V31, V32 がコードされた IS1414 は構造的に intact であることが判明し、これらのバリエントが今後、ゲノム上でのコピー数増加に関わる可能性が示唆された。これらのことから、今後、注意すべき *astA* 遺伝子バリエントは prototype、V6、V27 と考えられた。今後はこれらのバリエントについて、機能解析を実施し、検査現場における重要性を確認する予定である。

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2,529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[EPEC] (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、R3年度ドラフトゲノム配列を取得した31株および公開データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有完全長ゲノム配列決定株713株について、*astA* 遺伝子の特徴など大規模ゲノム比較解析を行い、検出系構築のための疫学マーカーとなりうる遺伝子選定と病原機構を解析することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有31株の完全長ゲノム配列解析

昨年度ドラフトゲノム配列を取得した31株について、ドラフトゲノム配列では *astA* 遺伝子の局在など詳細な解析を行えないことが判明したため、MinION (Nanopore) を用いた完全長ゲノム配列の取得を試みた。具体的には、NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) を用いて長鎖ゲノム DNA を精製し、短鎖 DNA を除去したのち、MinION で解析した。得られたロングリード配列を MiSeq リード配列とともに unicycler-v0.4.8 でハ

[for V6], astA_v27-F(5'-
 GGGGCA[redacted]
 [redacted]-3')/
 astA_v27-R(5'-
 GGGGGAA[redacted]
 [redacted]-3')[for
 V27]のプライマーペアを用いて
 KOD -Multi & Epi (Toyobo) で PCR
 増幅した。pTEBA ベクターおよび
 上記の PCR 産物を制限酵素 EcoRI
 と NdeI で処理し、DNA Ligation
 Kit Ver. 2.1 (Takara) でライゲ
 ーションした後、*E. coli* Zip
 BL21 (DE3) (BioDynamics
 Laboratory Inc.) へ形質転換し、
 目的タンパクの発現および機能
 解析のための形質転換体を作製
 した。

C. 研究結果

(1) 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

MiSeq と MinION の各リード配列
 をハイブリッドアセンブルした
 結果、18 株の完全長ゲノム配列を
 取得することが出来た。その他の
 株については、類似したファージ
 などの挿入があったためか、染色
 体を環状にすることが出来な

った (表 1)。

(2) 同定した *astA* 遺伝子保有株 (鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 744 株) に関する 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

各バリエーションの遺伝子構造：V7,
 V15, V22, V33 は premature stop
 codon などにより機能しないと考
 えられたが、それ以外は intact な
 構造であった。また、5' 末端領域
 が完全に欠失している *astA* 遺伝
 子も見られた (図 1)。

各バリエーションの保有株数：保有
 株数の多い主要なバリエーションは
 V22(218 株)、prototype(145 株)、
 V6 (68 株)、V27 (46 株)、V12 (36
 株)、V7 (12 株) であり、それ以外
 は 10 株未満であった (表 2)。ま
 た、5' 末端領域が完全に欠失した
astA 遺伝子は 349 株で検出され
 た。

各バリエーションのゲノム局在：
 prototype は染色体 (76 株) およ
 びプラスミド (76 株) のどちらに
 も多く局在していたが、それ以外
 の主要バリエーションも含めた他の
 バリエーションのほとんどが染色体
 かプラスミドのどちらかへの局
 在を示した (表 2)。

株あたりの各バリエーションのコピ
 ー数：prototype 保有株では、複
 数コピー保有する株が 145 株中 41

株 (28%) 存在し、1 株で最高 11 コピー保有する株が見られたが、他のバリエーションでは、最高でも 2 コピー保有する株が 1 株あるいは 2 株存在するのみであった (表 2)。

各バリエーションが存在する挿入配列 IS1414 の構造: prototype, V2, V7, V31, V32 の 5 種類のバリエーションをコードする IS1414 は intact な構造であった。それ以外の 30 種類は IS の転移酵素をコードする遺伝子が欠損しているため機能しない、あるいは IS の 5' 末端や 3' 末端が欠失していた (図 2)。

(3) *astA* 遺伝子保有株の進化系統解析と *astA* 遺伝子バリエーションの分布

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に *astA* 遺伝子バリエーションの分布をマップした。その結果、バリエーションの多くは大腸菌の進化系統 (A, B1, B2, C, D, E) に偏りなく散在していることがわかった (図 3)。また、5' 末端領域が完全に欠失している *astA* 遺伝子は進化系統 A と E に多くみられた (図 4)。

(4) 異なる系統に存在する同一 *astA* 遺伝子バリエーション周辺のゲノム構造比較

異なる系統に同一の *astA* 遺伝子バリエーションが検出され、当該バリエーションがプラスミド上にコードされている場合、プラスミドを介した水平伝播が想定されるため、その可能性を確認する目的で該当株のプラスミド構造を比較した。一例として、バリエーション V24 は異なる系統に属する 7 株 (図 5) が保有し、全てプラスミド上にコードされていることが判明している。そのため、これら 7 株において *astA* 遺伝子をコードしているプラスミドの構造比較を行った (図 6)。その結果、①のグループに属する 5 株のプラスミドは非常に類似性が高いことが判明したが、①②③のグループ間では部分的な類似性しか検出されなかった。

(5) 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析

35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションがコードするアミノ酸配列を比較した結果、prototype を含む 7 種類は同じ配列であったが、それ以外は配列多様性を認めた (図 7)。このことから、集団感染事例由来株で保有頻度が高い、また、全株の中でも比較的保有頻度の高い prototype, V6, V27 に焦点を当て、その病原性を検討することとした。本年度は、高発現させ

た状態で細胞障害性や細胞侵入性など病原性の有無を調べるため、これらバリエントを T7 誘導性発現プラスミドである pETBA ベクターにクローニングし、そのタンパク質発現を確認した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本年度実施した 744 株の *astA* 遺伝子保有大腸菌株に関する 35 種類の遺伝子バリエントの詳細な解析から、①保有株数の多い主要なバリエントは V22 (218 株)、prototype (145 株)、V6 (68 株)、V27 (46 株)、V12 (36 株)、V7 (12 株) であること、②バリエント V7, V15, V22, V33 は欠損しており、機能しないと考えられること、③各バリエントの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④ prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエントはほとんどないこと、⑤5' 末端が完全に欠損している *astA* 遺伝子を保有する株を含めるとほとんどの大腸菌系統に *astA* 遺伝子保有株が存在することが明らかになった。これらのことから、*astA* 遺伝子を保有する株を特異的に検出する疫学マーカーとな

る遺伝子を同定するのは困難であること、また、単に全ての *astA* 遺伝子バリエントを同定する現在用いられている PCR 等の検査法では、機能しないバリエントも検出してしまうため、実際に病原性に寄与しているバリエントのみを識別出来る検査法が必要であると考えられる。加えて、⑥ prototype, V2, V7, V31, V32 の 5 種類のバリエントをコードする挿入配列 IS1414 は intact な構造であるがそれ以外は欠損しているため転移能を持たないと考えられることが判明した。このことから、今後、転移等により菌株間で伝播していく可能性が高いバリエントは限定されることも明らかとなった。

今後は、構造的に intact なバリエントの中で高い保有率を示す prototype など主要なバリエントを中心として、病原性への関与メカニズムについて機能解析を進め、どのバリエントが臨床的に重要であるかを明らかにし、それらのバリエントを特異的に検出できる検出系の構築に繋げる必要がある。

E. 結論

astA 遺伝子陽性大腸菌に関して、全ゲノム情報を基に、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、昨年度に同定した 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションについて、その分布やコピー数、ゲノム局在、転移能などの特性解明を中心に解析を実施し、その結果、重要なバリエーションとそうでないものを識別する必要があることを明らかにした。また、*astA* 遺伝子が大腸菌進化系統のほぼ全てに分布していることが明らかとなったことから、*astA* 遺伝子保有株を検出する疫学マーカーとなる遺伝子の同定は困難であることが示唆された。本年度、重要と思われるバリエーションについては、遺伝子クローニングを行うまでしか進まなかったため、次年度はこれら *astA* 遺伝子の高発現株を用いて、その病原機構への関与について機能解析を行い、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

(誌上発表)

なし

(学会等発表)

大岡唯祐、後藤恭宏、林哲也、西順一郎. 大腸菌における *astA* 遺伝子バリエーションの同定およびその分布. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 17 日. 兵庫

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

図1 *astA* 遺伝子バリエントの intactness

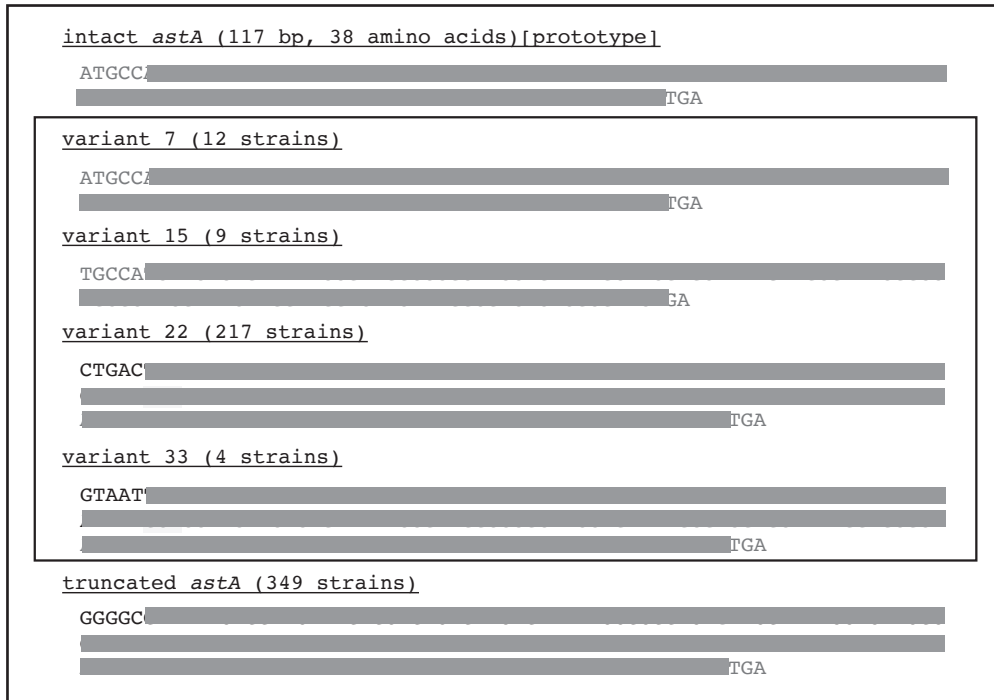


図2 *astA* 遺伝子バリエントをコードする挿入配列 IS1414 の構造比較

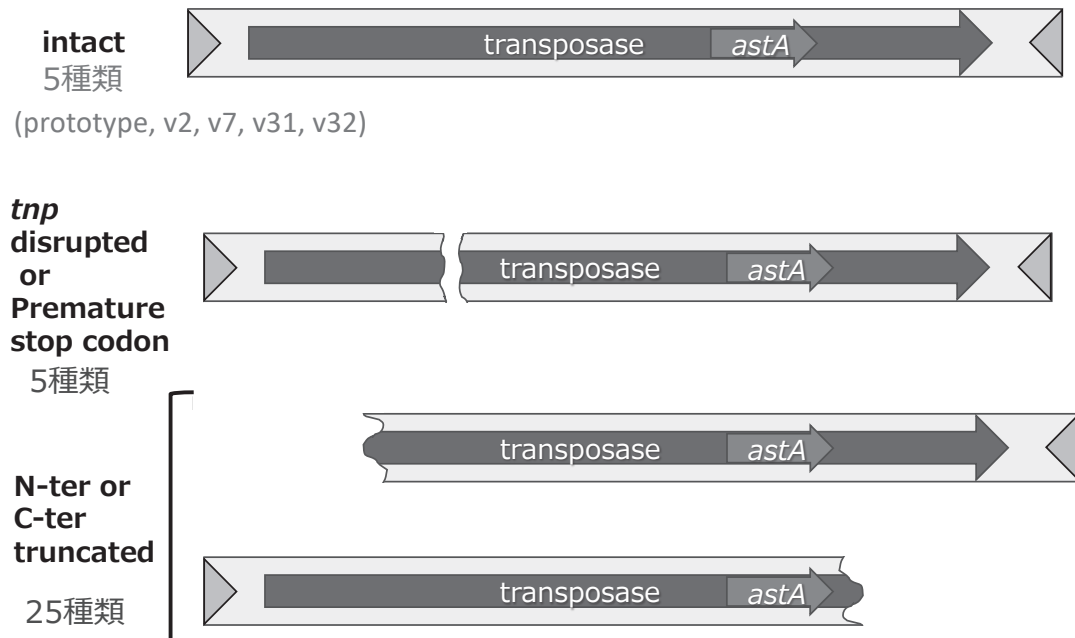


図3 大腸菌進化系統における *astA* 遺伝子バリエントの分布

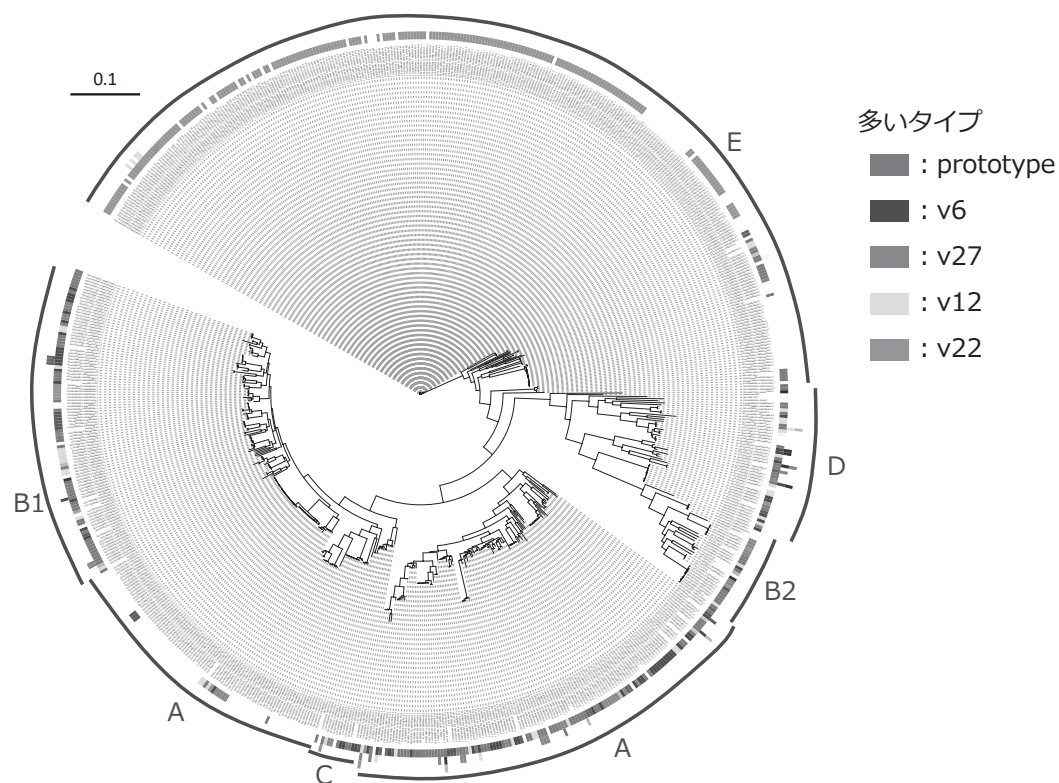


図4 大腸菌進化系統における 5'末端が完全に欠失している *astA* 遺伝子の分布

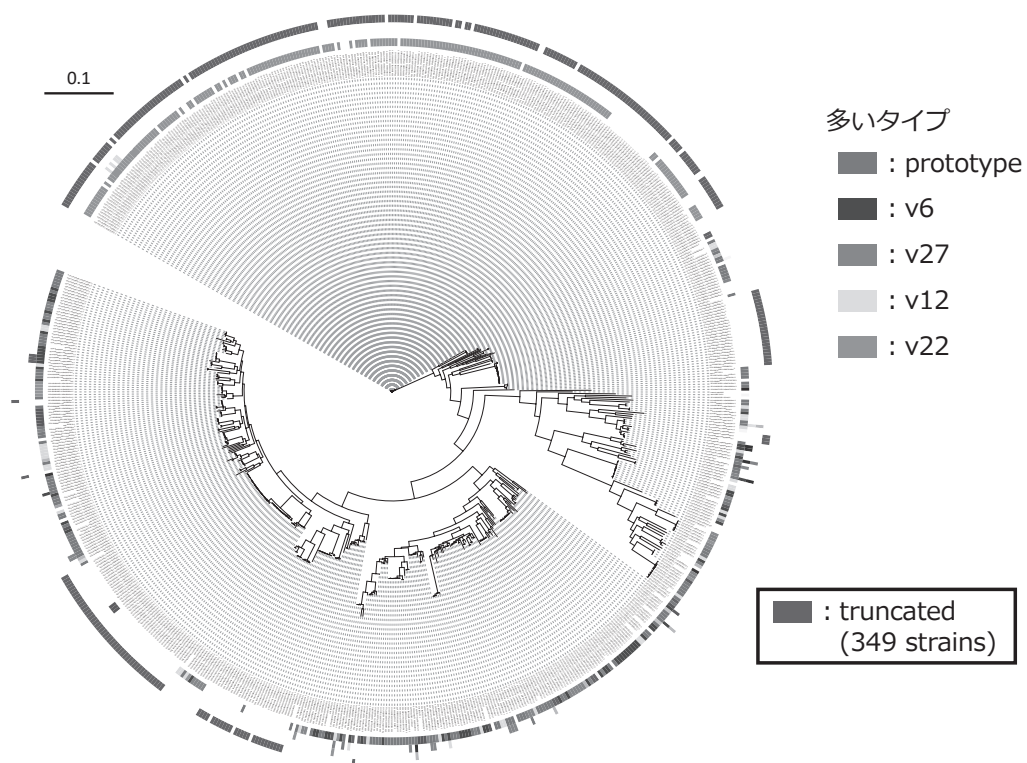


図5 大腸菌進化系統におけるバリエント V24 (7株) の分布

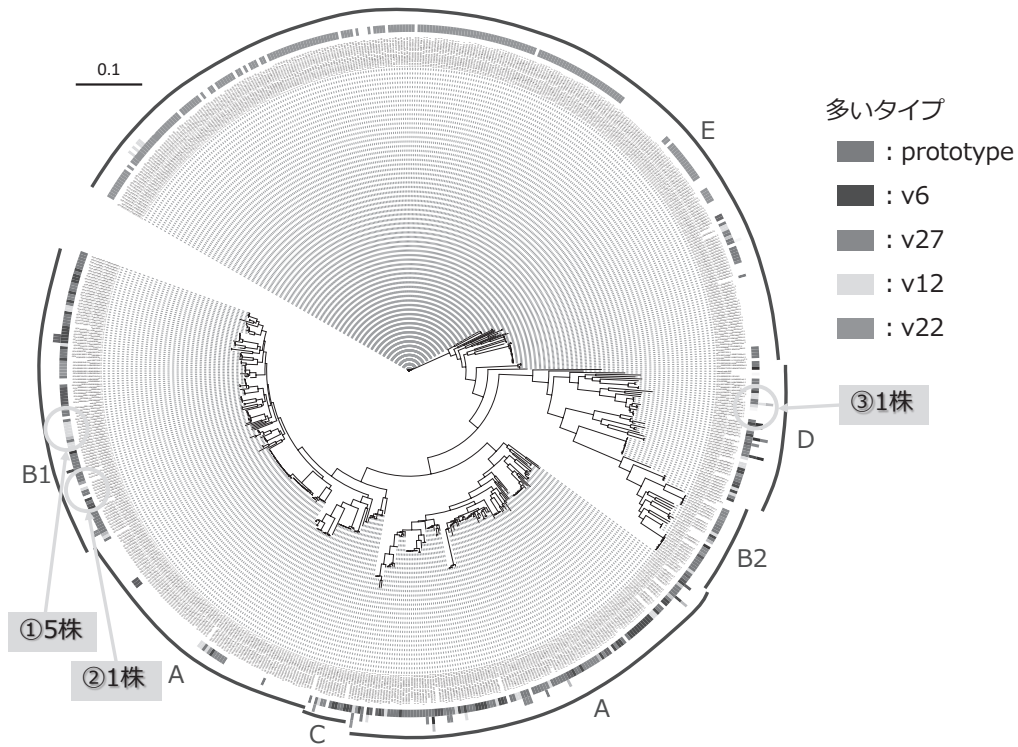


図6 バリエント V24 保有株 (7株) の astA 遺伝子をコードするプラスミドの比較

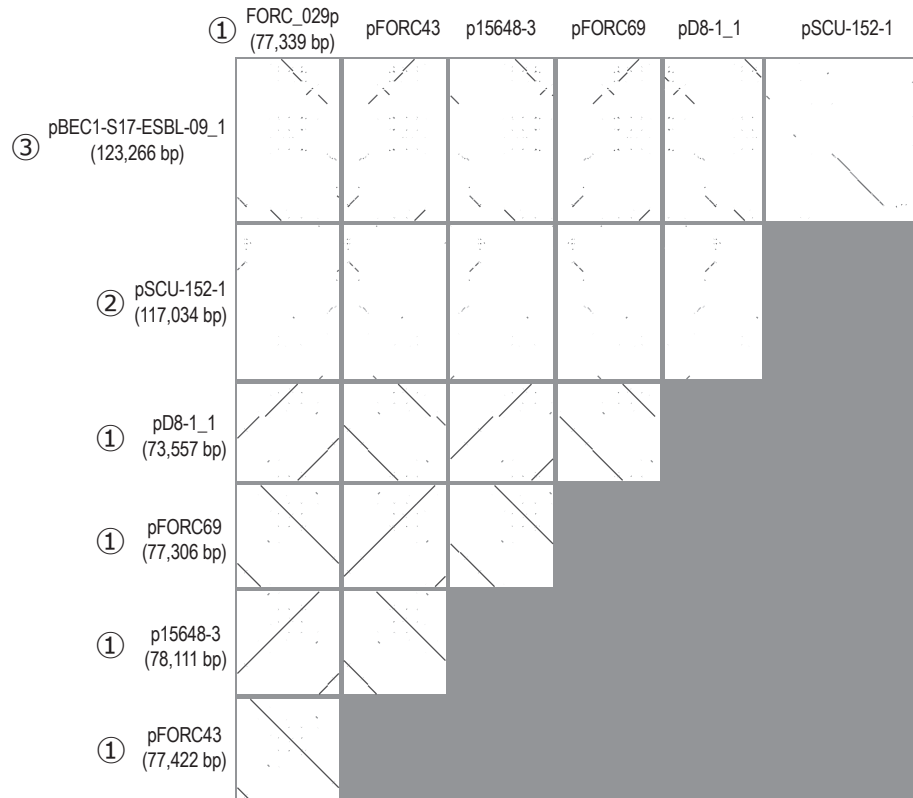


図7 35種類の *astA* 遺伝子バリエントのアミノ酸配列比較

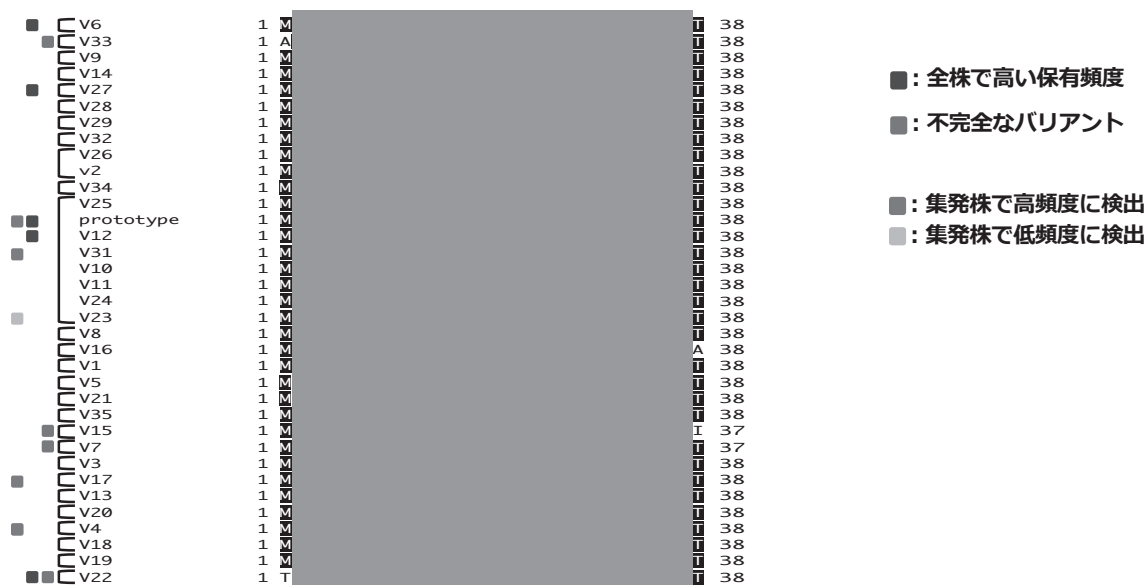


表 1 鹿兒島大保有 *astA* 遺伝子陽性 31 株のゲノム解析

strain name	No. of pair reads	sequence coverage	No. of scaffolds (>300 bp)	total length (bp) (>300 bp)	MinION summary	segments(plasmid)	chromosome	plasmid
K9228	711,916	64	464	5,512,493	incomplete	114(2)	(5,411,025)	P1(7,110), P2(1,552), P3(1,542)
K9291	748,626	72	238	5,036,673	incomplete	40(3)	(4,857,237)	P1(82,496), P2(57,930), P3(6,991)
K9331	726,842	63	69	4,838,693	incomplete	5(1)	(4,753,093)	90,597
K9339	677,580	56	102	5,131,569	complete	3(2)	(4,969,156)	P1(157,892), P2(4,237)
K9510	863,364	78	202	4,722,680	complete	4(3)	4,633,118	P1(73,912), P2(12,323), P3(4,286), P4(1,506)
K9531	653,133	56	189	5,229,048	ND			
K9550	836,644	72	182	5,219,273	complete	4(3)	5,073,586	P1(84,605), P2(80,948), P3(1,563)
K9559	821,188	70	102	5,266,830	complete	6(5)	5,007,961	P1(162,983), P2(81,415), P3(3,257), P4(2,873), P5(1,622)
K9867	726,685	60	75	5,254,186	complete	2(1)	5,140,777	P1(118,404)
K9910	650,356	53	122	5,378,142	incomplete	36(1,1[34])	5,098,104	P1(114,332), P2(145,344)
K10091	430,407	38	198	5,120,336	ND			
K10101	961,440	90	144	4,959,481	complete	4(3)	4,704,007	P1(136,087), P2(113,511), P3(4,072)
K10309	800,943	62	139	5,179,214	complete	3(2)	4,973,135	P1(194,881), P2(8,598)
K10443	861,337	68	282	5,486,044	incomplete	33 (?)	(5,041,144)	8 plasmids
K10593	796,607	62	176	5,412,244	complete	4(3)	5,281,511	P1(122,613), P2(8,4739), P3(1,551)
K10737	763,669	66	67	5,163,106	incomplete	20	(5,189,509)	-
K10876	935,021	68	299	6,059,351	complete	11(10)	5,651,975	P1(123,757), P2(92,955), P3(82,373), P4(74,020), P5(8,910), P6(6,773), P6(5,588), P7(2,312), P8(2,096), P9(1,552)
K10877	786,642	61	156	5,234,515	incomplete	14(3)	(5,070,516)	P1(143,174), P2(6,880), P3(4,051)
K10987	800,648	65	107	5,075,336	complete	4(3)	4,935,575	P1(134,342), P2(7,175), P3(2,750)
K10989	693,342	62	64	5,008,825	complete	4(3)	4,911,639	P1(61,597), P2(31,764), P3(3,373)
K11244	702,871	61	106	5,115,318	complete	3(2)	4,856,975	P1(204,139), P2(73,876)
K11407	611,343	51	130	5,369,318	incomplete	17(2)	(5,085,938)	P1(169,559), P2(90,876)
K11421	414,786	39	77	4,929,648	complete	3(2)	4,812,164	P1(108,823), P2(64,402)
K11469	1,034,279	96	116	4,936,622	complete	2(1)	4,803,443	P1(145,610)
K11627	758,454	64	192	5,064,133	complete	2(1)	4,872,138	P2(145,092)
K11797	732,321	61	62	5,160,203	incomplete	17	(5,167,532)	-
K11974	619,202	53	85	5,142,029	complete	4(3)	4,944,009	P1(151,495), P2(47,686), P3(2,257)
K12120	741,686	65	584	5,378,463	incomplete	58(?)	4,801,605	12 plasmids
K12196	802,784	67	99	5,081,272	complete	4(3)	4,884,269	P1(113,228), P2(84,629), P3(5,687)
K12240	788,968	66	108	5,087,851	complete	4(3)	4,765,535	P2(155,152), P2(117,468), P3(48,425)
K12343	841,346	73	26	4,790,472	incomplete	13(1)	(4,802,616)	P1(3,597)

表2 744株における *astA* 遺伝子バリエントの保有株数・局在・コピー数

	number of strains	localization			not identified	number of strains with multicopies	maximum copies
		chromosome	plasmid	(both)			
● prototype	145	76	76	11	4	41	11
1	0	0	0	0	0	0	0
● 2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0
6	68	67	1	1	1	1	3
● 7	12	12	0	0	0	0	1
8	1	1	0	0	0	0	1
9	5	0	5	0	0	0	1
10	1	1	0	0	0	0	1
11	2	0	2	0	0	0	1
12	36	36	0	0	0	0	1
13	2	2	0	0	0	0	1
14	9	9	0	0	0	0	1
● 15	9	0	9	0	0	1	2
16	2	1	1	0	0	0	1
17	2	0	2	0	0	0	1
18	3	0	3	0	0	2	2
19	2	0	2	0	0	0	1
20	1	0	1	0	0	0	1
21	4	1	3	0	0	1	2
● 22	218	216	2	0	0	1	2
23	2	0	2	0	0	2	2
24	7	0	7	0	0	0	1
25	4	0	4	0	0	0	1
26	1	0	1	0	0	0	1
27	46	45	1	0	0	0	1
28	2	2	0	0	0	0	1
29	9	9	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	0	0	0
● 31	1	1	0	0	0	0	0
● 32	1	1	0	0	0	0	0
● 33	5	5	0	0	0	0	1
34	1	0	0	0	1	0	0
35	1	0	1	0	0	0	0

● : 不完全な*astA*遺伝子バリエント □ : 保有株が多い*astA*遺伝子バリエント ● : IS1414がintact (転移可)

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4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

病原性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 保有大腸菌の病原性等の特徴を明らかにするために、*astA* がコードする EAST1 の発現解析、培養細胞感染試験、および有症事例株を対象にした全ゲノム配列解析を行った。EAST1 の発現解析では、ウェスタンブロットティングによる検出手法を確立し、有症例由来大腸菌 07:H4 および 0166:H15 において EAST1 ペプチドの発現を確認した。培養細胞感染試験では、0166:H15 および 0gGp9:H18 において CHO および INT407 細胞への接着性が認められた。全ゲノム配列解析では、有症事例株間の関連性は見出されず、*astA* 陽性大腸菌は系統的に多様であることが判明した。今後、これら多様な系統の *astA* 陽性大腸菌の EAST1 発現や共通する病原性因子等について究明する必要がある。

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 では志賀毒素遺伝子、EAEC で

は凝集性線毛のレギュレーター遺伝子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 からも検出されることが分かっている。前年度の研究で、EHEC に広く *astA* が分布することが明らかとなったが、定性および定量的な発現解析の知見はごく限られている。そこで、ウェスタンブロッティングによる EAST1 検出系の確立を試みた。

また、*astA* 陽性大腸菌の病原性およびゲノムの特徴を明らかにするために、主に国内集団感染事例関連株を用いて培養細胞への感染実験およびゲノム系統解析を行った。

B. 研究方法

(1) EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロッティングによって行った。供試菌株として、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌を主とした、5 血清型 (07:H4, 166:H15, 169:H45, 0gGp7:H6, 0gGp9:H18) 計 7 株を用いた (表 1)。加えて、JNE21-003 (0166:H15) および JNE22-001 (07:H4) について、*astA* 配列およびプロモーター領域を pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を使用してクローニングし、同プラスミド (pGEM-*astA*) を親株に導入した。これらの株に

についても本解析に供試した。なお、JNE21-003 は、染色体上とプラスミド上に異なる配列の *astA* が存在したため、それぞれを pGEM-*astA1* および pGEM-*astA2* としてクローニングを行った。各菌株から作製した SDS-PAGE サンプルを Peptide-PAGE mini (TEFCO) に添加し、Tris/Tricine/SDS Buffer (Bio-Rad) を使用して泳動を行った。その後、Immun-Blot PVDF 0.2 μ m メンブレン (Bio-Rad) に転写し、Anti-EAST1 Rabbit Polyclonal Antibody (Avantor-VWR) で標識を行った。ウェスタンブロッティングの陽性対照としては合成した EAST1 ペプチド、陰性対照としては大腸菌実験室 (非病原性) 株である JM109 株を使用した。

(2) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞侵入性、細胞傷害性および細胞接着性の解析を行った。対象株は上記 1 と同じ *astA* 陽性大腸菌を使用した。細胞侵入性は HEp-2 細胞に約 1.0×10^7 の菌を接種、1 時間培養後に PBS で 3 回洗浄し、50 μ g/ml ゲンタマイシン加 DMEM 培地を加え 1 時間培養することで細胞外の菌を殺菌した。その後、PBS で 3 回

洗浄し、1% Triton Xを加え細胞溶解後、LB寒天平板に塗抹し、細菌数を計数した。侵入性試験の陽性対照としては *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344株および14028s株を、陰性対照としては EHEC 0157:H7 Sakai株を用いた。細胞傷害性については HeLa 及び Vero 細胞を使用した。対象は各血清型の食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌に加え、1で作製した pGEM-*astA* 導入株、対照として EHEC 0157:H7 Sakai株および JM109株とした。各細胞に各菌株抽出液を接種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) で生細胞数の測定を行い、菌液を接種していないウェルの細胞数を100%として評価を行った。細胞接着性は HEp-2, HeLa, CHO および INT407 細胞を使用した。対象株は各血清型の *astA* 陽性大腸菌に加え、CHO 細胞を使用した試験のみ血清型 0166:H15 の EHEC 4株 (JNE181928, JNE162304, JNE192196, JNE192777) も供試した。試験方法は一晚培養菌液を約 100 MOI となるよう各細胞に接種し 1% マンノースを加えた各細胞培養液で3時間培養を行った。その後、PBSにて3回洗浄し、メタノール固定とギムザ染色を行った後、顕微鏡観

察を行った。

(3) ゲノム解析

過去に発生した食中毒事例株を中心に、11種類の血清型の *astA* 陽性大腸菌を全ゲノム配列解析に供試した(表2)。これらの菌株について、全ゲノム配列を解読し、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。さらに食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌株については WGS データの解析により保有する遺伝子の網羅的な検出を行った。

C. 研究結果

(1) EAST1 発現解析

ウェスタンブロッティングの結果、供試した *astA* 陽性大腸菌 11株と陽性対照の合成 EAST1 ペプチドにおいて、EAST1 の質量約 4.1kDa 付近でシグナルが確認され、陰性対照の JM109 株ではシグナルが見られなかった(図1)。

(2) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

細胞侵入性試験では、供試した *astA* 陽性大腸菌 11株においては陰性対照である Sakai 株に比べて顕著な侵入性は認められなかった。細胞傷害性試験では、HeLa 細胞を使用した試験で非病原性株

である JM109 株との間に大きな差は認められなかった (図 2A)。また、Vero 細胞を使用した試験では野生株と pGEM-*astA* 導入株との比較を行ったが、大きな差は認められなかった (図 2B)。細胞接着性試験では 0gGp7:H6 の血清型の株 (JNE21-011) について HEP-2, HeLa および CHO 細胞を使用して試験を行ったところ、細胞剥離が確認された。残りの 4 つ血清型の 9 株については、HEP-2 および HeLa 細胞を使用した試験ではいずれの株も検討した条件では細胞接着性は認められなかった (表 3)。CHO および INT407 細胞を使用した試験では血清型が 0166:H15 または 0gGp9:H18 である 5 株が細胞への接着性を示したが、残りの 2 つの血清型 (07:H4, 0169:H45) に属する 4 株は検討した条件ではいずれにおいても細胞接着性は認められなかった。EHEC 0166:H15 4 株についても CHO 細胞を使用して同条件で試験を行ったが、細胞接着性は認められなかった。

(3) ゲノム解析

系統解析により 9 件の事例から分離された 26 株は 6 つの Phylogenetic group (A, B1, B2, F, D, E) に分類され、いずれも事例間の関連性は低いことが示唆

された (図 4)。また相模原市の食中毒疑い事例で分離された 9 株については 4 種の Phylogenetic group (A, B1, B2, F) に分類された。0166:H15 の系統解析結果では、3 件の食中毒事例株は最小で 130 か所の SNP が認められ、関連性が低いことが見出された (図 5)。また、0166:H15 の EHEC 5 株のうち 4 株は *astA* 陽性であり、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌 9 株とは隣接した系統であった。また、WGS データ解析により網羅的に遺伝子を検出した結果では、CHO 細胞への接着が認められた血清型 (0166:H15, 0gGp9:H18) の株にのみ保有が認められる接着因子は検出されなかった。

D. 考察

astA 陽性大腸菌の病原性については未だ不明瞭な部分が多く存在するが、本研究では食中毒由来株を研究対象とすることで、病原性究明を試みた。ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 陽性大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。しかし、細胞傷害性試験では、検討した条件では EAST1 による傷害性を示す結果を得ることができなかった。EAST1 の病原性への寄与については、今後

別の手法で検証する必要がある。

細胞接着性試験では、0166:H15と0gGp9:H18はCHOおよびINT407細胞への接着性を示した。0166:H15はこれまで、複数の事例で食中毒の起因菌として報告されている。細胞への接着性は同血清型の病原性に関与している可能性があると考えられるが、本研究では接着因子の特定には至らなかった。接着因子を同定し、検出するための系が確立されれば、地方衛生研究所等に有用な情報を還元することが可能となることから、今後、接着因子を明らかにすることは重要であると考えられる。供試菌株のうち、0gGp7:H6（JNE21-011）は、感染実験で細胞剥離が確認された。同株は、細胞剥離に関与するとされる溶血素遺伝子（*hlyA*）を保有していた。*hlyA*の病原性への関与は不明であるが、今後検証する必要がある。

*astA*陽性大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例では、健常者や食品からも種々の*astA*陽性大腸菌が分離されたことから、同菌は広く分布することが示唆された。0166:H15株に着目した解析では、供試したEHECとnon-EHECの株はいずれも

Phylogenetic group Eに属したが、3件の食中毒事例由来株は同一の系統であった。食中毒事例株とEHECでは、CHO細胞への接着性は異なることから、これらの違いに着目することで食中毒等の集団感染を起こす*astA*陽性大腸菌の病原性について解析できる可能性が示唆された。

E. 結論

全ゲノム配列解析によって、*astA*陽性大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。本年度に確立したEAST1検出手法や培養細胞接着性試験等を用いて、同菌の病原性に関わる因子を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）

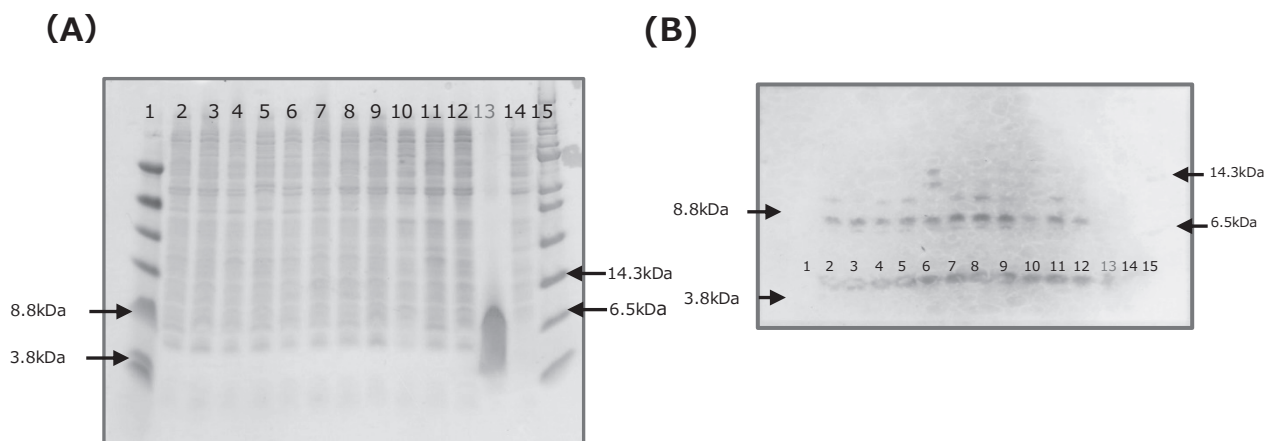
なし

（学会等発表）

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

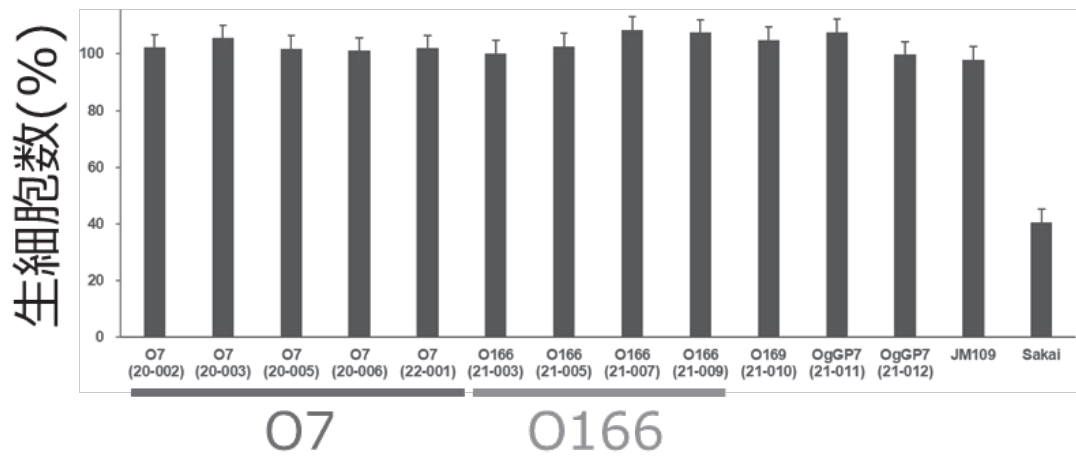


(C)

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sample name	Ladder 1	20-002 (O7)	21-003 (O166)	21-009 (O166)	21-010 (O169)	21-011 (OgGP7)	21-012 (OgGP9)	22-001 (O7)	21-003 pGEM-astA1	21-003 pGEM-astA2	22-001 pGEM-astA	21-003 pGEM-NC	合成 EAST1 ペプチド	JM109	Ladder 2

図 1. SDS-PAGE ゲル染色像 (A) とウェスタンブロットティング (B) の結果および各レーンの添加サンプル (C)

(A)



(B)

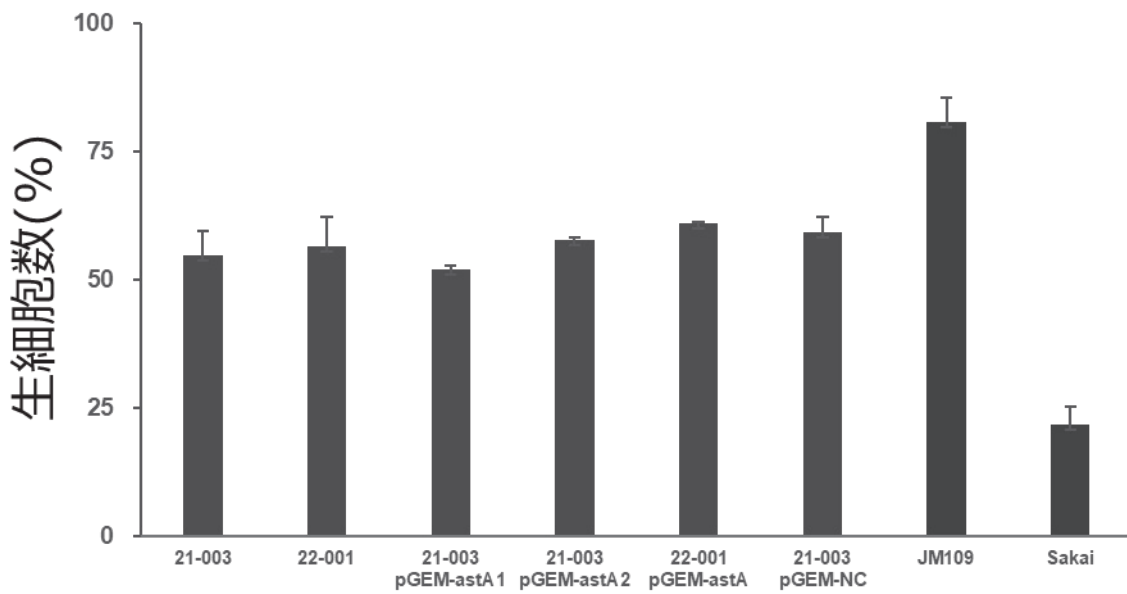
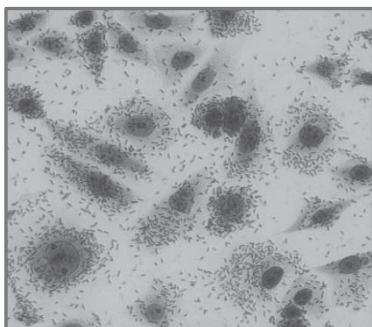
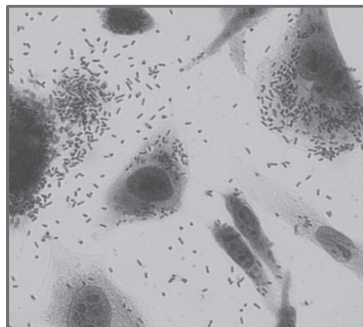


図 2. HeLa (A) および Vero (B) 細胞における細胞傷害性試験結果

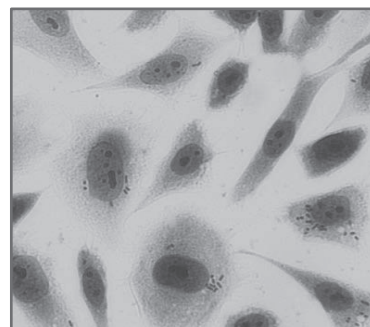
(A)



JNE21-003 (O166:H15)

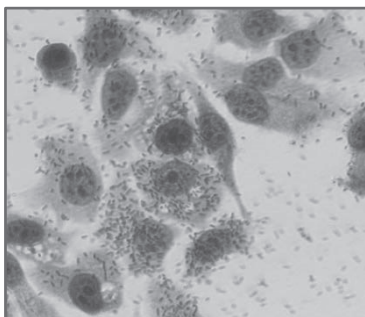


JNE21-012 (OgGP9:H18)

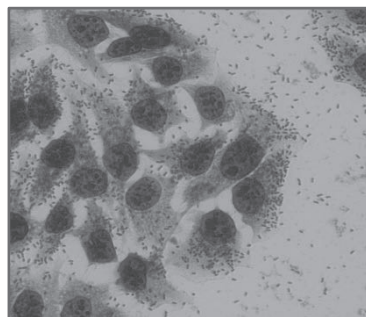


JNE20-002 (O7:H4)

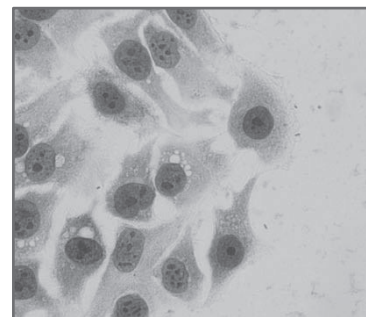
(B)



JNE21-003 (O166:H15)



JNE21-012 (OgGP9:H18)



JNE20-002 (O7:H4)

図 3. CHO 細胞 (A) および INT407 細胞 (B) への細胞接着性試験結果

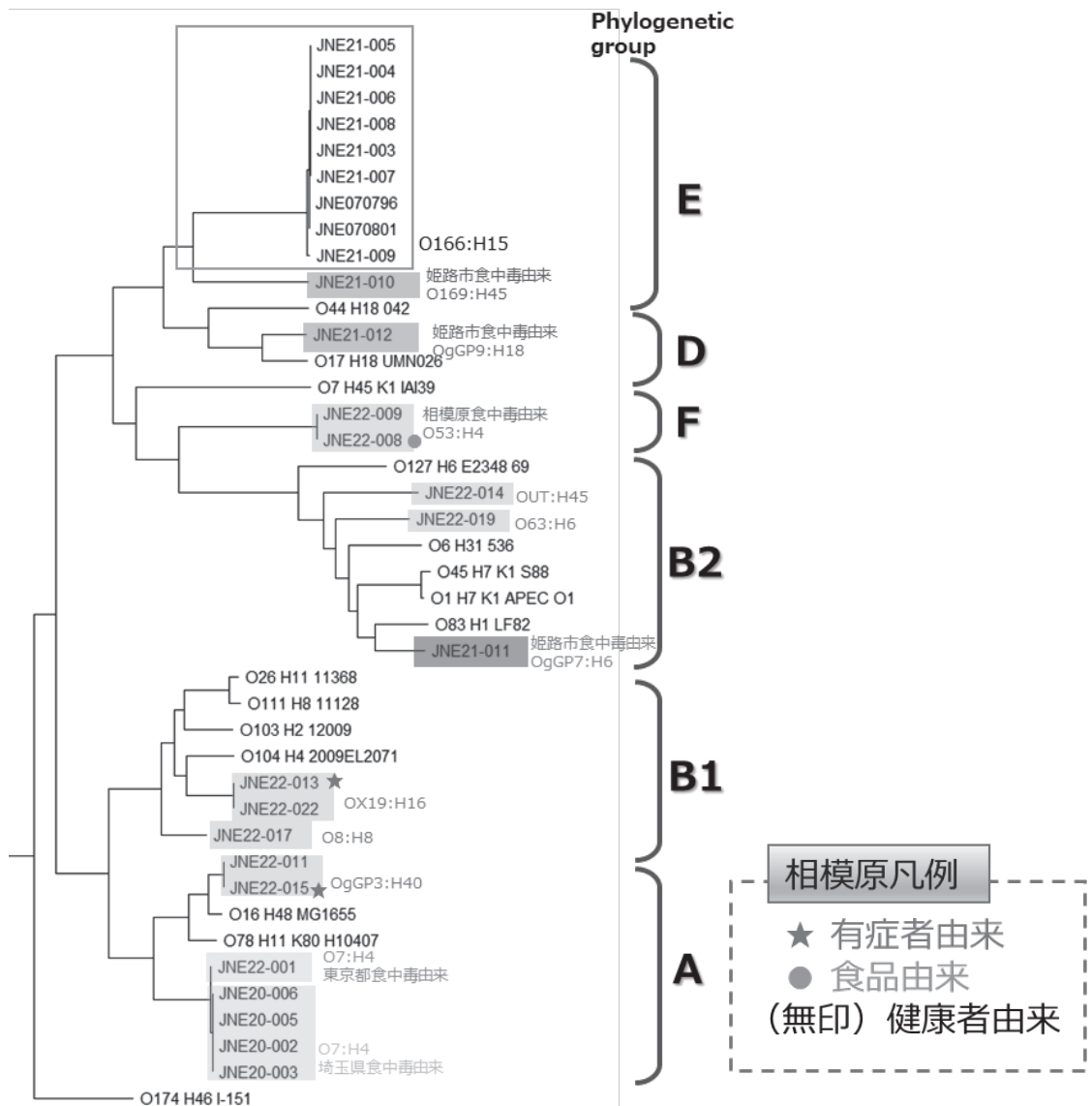


図 4. *astA* 陽性大腸菌におけるコアゲノム SNP を用いた最尤法系統樹

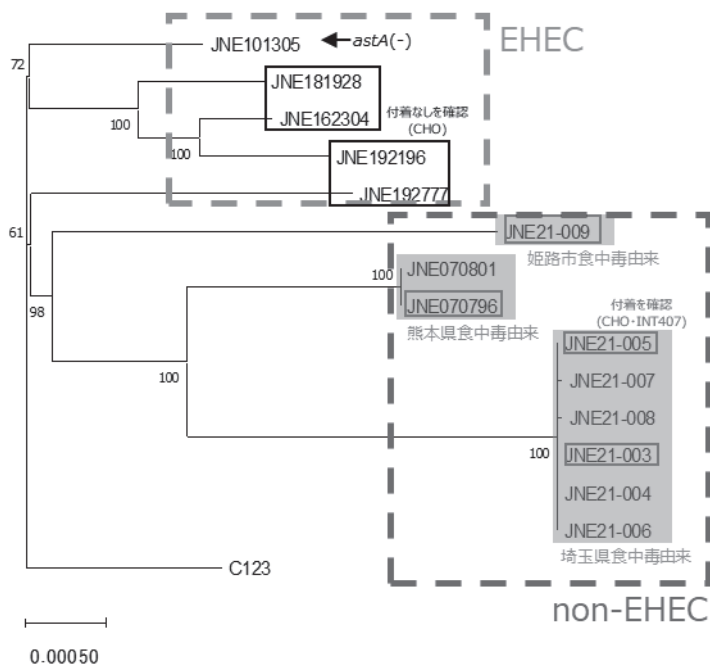


図 5. O166:H15 におけるコアゲノム SNP を用いた最尤法系統樹

表1. EAST1発現解析に用いた菌株

ID	血清型	由来	プラスミド
JNE20-002	O7:H4	埼玉県	
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	
JNE21-009	O166:H15	姫路市	
JNE21-010	O169:H45	姫路市	
JNE21-011	OgGp7:H6	姫路市	
JNE21-012	OgGp9:H18	姫路市	
JNE22-001	O7:H4	東京都	
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM-astA1
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM-astA2
JNE22-001	O7:H4	東京都	pGEM-astA
JNE21-003	O166:H15	埼玉県	pGEM

表2. ゲノム解析に用いた菌株

血清型	ID	由来
O7:H4	JNE20-002	埼玉県
	JNE20-003	埼玉県
	JNE20-005	埼玉県
	JNE20-006	埼玉県
	JNE22-001	東京都
O8:H8	JNE22-017	相模原市
O53:H4	JNE22-008	相模原市
	JNE22-009	相模原市
O63:H6	JNE22-019	相模原市
O166:H15	JNE070796	熊本県
	JNE070801	熊本県
	JNE101305	愛知県
	JNE162304	大阪府
	JNE181928	宮城県
	JNE192196	香川県
	JNE192777	山梨県
	JNE21-003	埼玉県
	JNE21-004	埼玉県
	JNE21-005	埼玉県
	JNE21-006	埼玉県
	JNE21-007	埼玉県
	JNE21-008	埼玉県
	JNE21-009	姫路市
O169 :H45	JNE21-010	姫路市
OgGp3(O118/O151):H40	JNE22-011	相模原市
	JNE22-015	相模原市
OgGp7 :H6	JNE21-012	姫路市
OgGp9:H18	JNE21-011	姫路市
OX19:H16	JNE22-013	相模原市
	JNE22-022	相模原市
OUT:H45	JNE22-014	相模原市

表3. 細胞接着性試験結果

株名	血清型	細胞種ごとの付着性			
		HEp-2	HeLa	CHO	INT407
JNE070796	O166:H15	—*	NT	+	+
JNE21-003	O166:H15	—	—	+	+
JNE21-005	O166:H15	—	NT	+	+
JNE21-007	O166:H15	—	NT	NT	NT
JNE21-009	O166:H15	—	—	+	+
JNE21-012	OgGp9:H18	—	NT	+	+
JNE20-002	O7:H4	—	—	—	—
JNE20-003	O7:H4	—	NT	NT	NT
JNE20-005	O7:H4	—	NT	—	—
JNE20-006	O7:H4	—	NT	NT	NT
JNE22-001	O7:H4	—	NT	—	—
JNE21-010	O169:H45	—	—	—	—
JNE21-011	OgGp7:H6	CD	CD	CD	NT

*+, 付着あり; —, 付着なし; NT, not tested; CD, cell detaching

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4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行った。今年度は、昨年度の調査で特徴的な汚染が認められた輸入野菜、豚内臓肉を中心に調査を行った。その結果、輸入野菜の内、ベビーコーン、オクラのスクリーニング PCR で *astA* が高率に検出された。また、豚内臓肉でも高率に *astA* が陽性になった。豚内臓肉では、*eae*、*stx₂* などの *astA* 以外の病原遺伝子も高率に検出された。豚内臓肉からは高率に菌株が分離され、汚染菌量が他の食品に比べて多いことが示唆された。分離株の O 遺伝子型別の結果、最も多かったのが型別不能であった。次いで、Og8、Og88 が多く分離された。しかし、保有病原遺伝子と O 遺伝子型別との間には関連性は認められず、むしろ汚染食品との間に関連性が認められた。2年間の汚染実態調査の結果から、鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ベビーコーンで *astA* 保有大腸菌の汚染が強く認められた。*astA* 保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品が食中毒予防のための最重要食品になると思われる。

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 (EAaggEC) 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。しかしながら、*astA* 保有株をはじめ多くの下痢原性大腸菌の

汚染食品が明らかになっていない。このため、効果的な食中毒予防対策の確立が困難になっている。効果的な予防法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 *astA* 保有大腸菌の汚染調査が行われているが、検体数が少なかったり、対象食品に偏りがあつたりするものが多く、未だに *astA* 保有大腸菌の汚染経路については不明な点が多く残されている。そこで、昨年度は *astA* 保有大腸菌をはじめとする下痢原性大腸菌の大規模な汚染実態調査を行なった。その結果、鶏肉から *astA* 保有大腸菌が高率に分離されることが明らかになった。さらに、豚肉、特に豚肉の内臓肉で *astA* 保有大腸菌の汚染が高率に認められる傾向があつた。さらに、オクラやベビーコーンをはじめとする輸入野菜でも *astA* 保有大腸菌の汚染が認められる傾向にあつた。しかしながら、昨年度の調査では、豚肉内臓肉、輸入野菜に関して、十分な検体数の調査を行うことができなかった。そこで、今年度は豚肉内臓肉、輸入野菜に焦点を絞り、下痢原生大腸菌の汚染実態調査を継続すると共に、昨年度からの調査で食品から分離した大腸菌株の O 遺伝子型別を行い、型別の傾向を解析した。

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

昨年度と同様の手順で検査を行った(図1)。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、増菌培養を行なった。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（バイオメリュー）、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 μL の反応チューブで行った。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5 μL、それぞれのプライマー（表2）を 0.2 μM ずつ、DNA テンプレート 2 μL から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μL に調整した。反応は、94℃、2 分の後、94℃、30 秒、63℃、30 秒、68℃、1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68℃、5 分の反応を行った。反応終了後、PCR 産物 10 μL 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（表2）を確認

し、遺伝子の有無を調べた。

escV（LEE 領域のマーカ）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' - CCGATTCCTCTGGTGACGA-3'）と *eae*-R（5' -CCACGGTTTATCAAAGTATAACG-3'）を用いた。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5 μL、プライマー（*eae*-F および *eae*-R）それぞれを 0.2 μM ずつ、DNA テンプレート 2 μL から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μL に調整した。反応は、94℃、2 分の後、94℃、30 秒、55℃、30 秒、68℃、1 分のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68℃、5 分の反応を行った。反応後、PCR 産物 10 μL 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。

[4]O 遺伝子型別

LB 培地で培養した菌体から、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、井口らの方法（J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32）に従い、PCR によって O 遺

伝子型別を行った。

C. 研究結果

[1] 輸入野菜における汚染

今回の調査では、輸入生野菜と輸入冷凍野菜に関して調査を行った。調査に用いた生野菜は24種類(表3)、211検体、冷凍野菜は、16種類、41検体(表4)であった。生野菜では、アボガド、オクラ、パプリカ、ベビーコーン(ヤングコーン)、レモングラスで何らかの病原遺伝子がスクリーニング陽性となった。冷凍野菜では全ての検体がスクリーニング陰性となった。

ベビーコーンは29検体調査した(表5)。主な産地はタイ、フィリピンであった。29検体中、スクリーニングで陽性になったのは19検体(41%)で、4検体(14%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*bfpB*、*stx₂* であった。分離株からは *astA* だけが分離された。

オクラは36検体調査した(表6)。主な産地はタイ、フィリピンであった。36検体中、スクリーニングで陽性になったのは11検体(30%)で、5検体(14%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*estIa* であった。陽性率や保有病原遺伝子に関する産

地による特定の傾向は認められなかった。

パプリカは20検体調査した(表7)。主な産地は韓国であった。パプリカでは20検体中、スクリーニングで陽性になったのは1検体(5%)で、1検体(5%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA* のみであった。

アボガドは18検体調査した(表8)。主な産地はペルーなどの南米の国々であった。アボガドでは18検体中、スクリーニングで陽性になったのは1検体(6%)で、1検体(6%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA* のみであった。

豚内臓肉は40検体調査した(表9)。主な産地は2検体を除いて国産であった。40検体中、スクリーニングで陽性になったのは29検体(73%)で、21検体(53%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*eae*、*stx₂* などであった。*astA* と *eae* が同時に陽性になる検体が多く認められた。しかし、分離された菌株は全て *astA* 単独で保有しているものだけだった。

スプラウトは30検体調査した(表10)。1検体を除いて国産であった。30検体中、スクリーニング

で陽性になったのは2検体(7%)で、1検体(3%)から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA* であった。

[2]分離菌株のO遺伝子型別

2021年度および2022年度の汚染実態調査から、牛由来11株、鶏肉由来51株、豚肉由来36株、野菜由来16株、魚由来6株、計120株が分離された(表11、12)。分離された型別は合計65種類あった。最も多かったのが、型別不能で17株(14.3%)、次いで、Og8が8株(6.7%)、Og88が7株(5.8%)、OgGp9が4株(3.3%)と多く分離された。品目別に見てみると、牛肉からは11株分離された(表13)。分離された型別は11種類で、すべて1株のみの分離であった。本調査で牛肉からのみ分離された型別は5種類あった。

鶏肉からは、51株が分離された(表14)。最も多かったのが型別不能で8株(15.7%)、次いでOg88が3株(5.9%)分離された。Og108、Og11、Og21、Og29、Og8、Og86、Og8+Og76は2株(3.9%)ずつ分離された。Og108、Og11、Og21、Og29、Og8+Og76は鶏肉からのみ分離された。

豚肉からは36株が分離された(表15)。最も多かったのが型別不

能で5株(13.9%)であった。次いでOg88およびOg8がそれぞれ4株(11.1%)ずつ、OgGp15は3株(8.3%)分離された。Og15およびOg71は2株(5.6%)ずつ分離された。このうち、OgGp15およびOg71は本調査では豚肉からのみ分離された。

野菜からは16株が分離された(表16)。最も多かったのが型別不能で3株(18.8%)であった。また、OgGp9は2株分離された。

魚からは5株が分離された(表17)。OgGp12は2株(33.3%)分離され、魚からのみ分離された。

D. 考察

輸入野菜の調査から、ベビーコーンとオクラにおける陽性率が高いことが明らかになった。特にベビーコーンではスクリーニング検査での陽性率が40%を超えており、重度の汚染が示唆された。ベビーコーン、オクラの産地は主にタイとフィリピンであったが、今回検出された汚染が、産地の衛生状態と関連しているかどうかは明らかにできなかった。また、*astA*保有株が環境中に存在しているのか、オクラやベビーコーンの収穫の過程で、ヒトなどを介して汚染が発生しているのか、汚染防止のために今後調査を行う必要

性があると考えられた。一方、輸入冷凍野菜からは、冷凍オクラを含め、病原遺伝子を検出できなかった。冷凍野菜は製造過程で、洗浄や加熱等の処理が行われているため、検出率が低下したものと考えられた。また、今回の調査では、ベビーコーン、オクラ以外に、豚内臓肉で *astA* 保有株の汚染が強く認められた。また、野菜とは異なり *eae* や *stx₂* などの遺伝子も同時に検出された。また、ベビーコーンやオクラではほとんど分離株を得ることができなかったが、豚内臓肉では 53% の検体から、分離株を得ることができた。このことから、豚内臓肉を汚染している *astA* 保有株の菌量は、野菜のそれより多いことが示唆された。

スクリーニング検査では、*astA* 以外の複数の遺伝子が陽性になっている検体が存在しているが、分離される菌株はほぼ *astA* を単独で保有している株ばかりであった。これは昨年度の調査でも認められた現象である。菌分離の過程で、*astA* 以外の病原遺伝子が脱落するためなのか、それとも、増菌培養液中に複数の菌株が混在していたためなのかは不明である。今後さらなる調査が必要であると思われる。

昨年度、今年度の調査から、鶏肉や豚内臓肉、オクラやベビーコーン

などで *astA* 保有株の汚染が強く認められた。しかしながら、これらの食品を原因とする *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はあまり発生していない。今後、*astA* の機能を明らかにし、食中毒発生における *astA* の役割を明らかにしていく必要があると思われる。

2 年間の汚染実態調査で得られた分離株の 0 遺伝子型別を行った。今回の調査では、増菌培養液のスクリーニングで *astA* 以外の病原遺伝子が検出されたが、分離株では *astA* 以外の病原遺伝子はほとんど認められなかった。このため、分離株は *astA* 単独保有株ばかりとなった。これら分離株の 0 遺伝子型別を行ったが、非常に多くの型に分かれ、特定の傾向は認められなかった。この結果から、*astA* をはじめとする病原遺伝子の保有状況と特定の 0 遺伝子型との関連性は認められなかった。0g8 や 0g88 は以前から報告されているとおりに、豚肉や鶏肉で多く認められた。また、0g8 や 0g88 は正肉からよりも、内臓肉の様なやや衛生的でない食肉から分離される傾向が認められた。また、鶏肉、豚肉などでは、それぞれの食品だけから複数分離されてる 0g 型が存在する。これらのことから 0g 型は、特定の病原遺伝子との関連よりも、汚染し

ている食品の種類により依存している可能性が示唆された。

E. 結論

2年間の汚染実態調査から *astA* 大腸菌の汚染は、鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ベビーコーンで強く認められた。*astA* 保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品は食中毒予防のための最重要食品になると思われる。一方で、*astA* の食中毒への関与には、不明な点が多く残されている。今後、研究が進み *astA* の機能が明らかになることを期待したい。

2年間の汚染実態調査から得られた分離株の 0 遺伝子型と特定の病原遺伝子保有状況との間に関連性は認められなかった。0 遺伝子型は汚染している食品の種類により依存している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

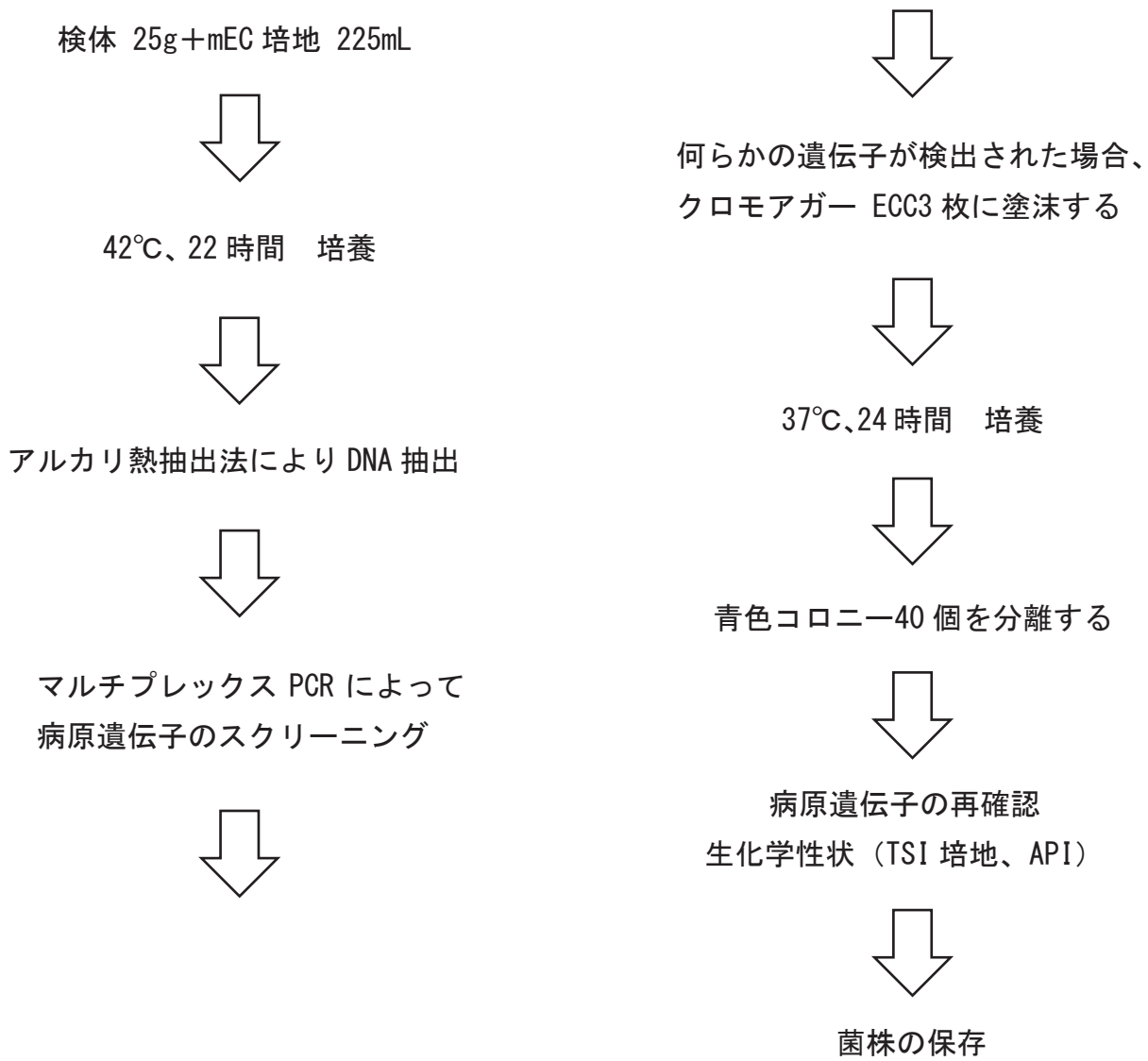


図1 検査手順

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>estla</i>	耐熱性エンテロトキシン
<i>estlb</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 CGTCCCCTTTTACAACTTCATCGC	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 CTTTCATGGCTTTTTTTGGGAGTC	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 汚染実態調査に使用した生野菜

品名	
アカワケギ	にんにくの芽
アスパラガス	パプリカ
アボカド	ブラウンマッシュルーム
オクラ	ベビーキャロット
かぼちゃ	ベビーきゅうり
サヤエンドウ	ベビーコーン
シーアスパラガス	ライム
しょうが	レモン
スナップエンドウ	レモングラス
チコリ	玉ねぎ
トレビス	人参
にんにく	青とうがらし

表4 汚染実態調査に使用した冷凍野菜

品名	
冷凍アスパラガス	冷凍スナップエンドウ
冷凍いんげん	冷凍タマネギ
冷凍えだまめ	冷凍ねぎ
冷凍オクラ	冷凍ピーマン
冷凍からし菜	冷凍ブロッコリー
冷凍カリフラワー	冷凍ほうれん草
冷凍グリーンピース	冷凍れんこん
冷凍コーン	
冷凍さといも	

表5 ベビーコーン（ヤングコーン）の汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+/-	検出遺伝子	+/-	検出遺伝子
147	ヤングコーン	タイ	+	<i>bfpB</i>	+	<i>bfpB</i>
158	ベビーコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
167	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
183	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
194	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
209	ベビーコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
247	ベビーコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
268	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
277	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
284	ベビーコーン	タイ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
309	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
317	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
322	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
345	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
358	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
400	ベビーコーン	タイ	+	<i>stx₂+ astA</i>	-	
408	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
414	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
443	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
449	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
456	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
463	ヤングコーン	タイ	+	<i>astA</i>	-	
466	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
473	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
476	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
483	ヤングコーン	タイ	-		N.D.	
497	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	
498	ベビーコーン	インド	-		N.D.	
502	ベビーコーン	タイ	-		N.D.	

表6 オクラの汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+/-	検出遺伝子	+/-	検出遺伝子
60	オクラ	フィリピン	+	<i>astA</i>	-	
80	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
87	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
98	オクラ	フィリピン	+	<i>astA</i>	-	
104	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
110	オクラ	タイ	-		N.D.	
116	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	-	
125	オクラ	タイ	+	<i>estIa+astA</i>	+	<i>estIa+astA</i>
130	オクラ	タイ	-		N.D.	
135	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	-	
144	オクラ	タイ	-		N.D.	
159	オクラ	タイ	-		N.D.	
164	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
169	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
200	オクラ	タイ	-		N.D.	
210	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
218	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	-	
222	オクラ	タイ	-		N.D.	
241	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
251	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
257	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
275	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
298	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
303	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
442	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
462	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
468	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
471	オクラ	タイ	+	<i>astA</i>	-	
475	オクラ	タイ	-		N.D.	
484	オクラ	タイ	-		N.D.	
490	オクラ	フィリピン	-		-	
491	オクラ	タイ	-		N.D.	
496	オクラ	タイ	-		N.D.	
500	オクラ	フィリピン	-		N.D.	
501	オクラ	フィリピン	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
503	オクラ	フィリピン	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>

表7 パプリカの汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+/-	検出遺伝子	+/-	検出遺伝子
11	パプリカ	韓国	-		N.D.	
19	パプリカ	韓国	-		N.D.	
40	パプリカ	韓国	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
52	パプリカ	韓国	-		N.D.	
56	パプリカ	韓国	-		N.D.	
64	パプリカ	韓国	-		N.D.	
71	パプリカ	韓国	-		N.D.	
82	パプリカ	韓国	-		N.D.	
90	パプリカ	韓国	-		N.D.	
93	パプリカ	韓国	-		N.D.	
103	パプリカ	オランダ	-		N.D.	
122	パプリカ	韓国	-		N.D.	
129	パプリカ	韓国	-		N.D.	
149	パプリカ	オランダ	-		N.D.	
155	パプリカ	韓国	-		N.D.	
162	パプリカ	韓国	-		N.D.	
170	パプリカ	韓国	-		N.D.	
177	パプリカ	韓国	-		N.D.	
185	パプリカ	オランダ	-		N.D.	
202	パプリカ	韓国	-		N.D.	

表8 アボガドの汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+ / 検出遺伝子 -	+/-	検出遺伝子	
14	アボカド	メキシコ	-		N.D.	
20	アボカド	ペルー	-		N.D.	
32	アボカド	ペルー	-		N.D.	
41	アボカド	ペルー	-		N.D.	
53	アボカド	ペルー	-		N.D.	
75	アボカド	ペルー	-		N.D.	
91	アボカド	ペルー	-		N.D.	
94	アボカド	ペルー	-		N.D.	
102	アボカド	メキシコ	-		N.D.	
128	アボカド	ペルー	-		N.D.	
130	アボカド	メキシコ	-		N.D.	
144	アボカド	コロンビア	-		N.D.	
145	アボカド	ペルー	-		N.D.	
150	アボカド	メキシコ	-		N.D.	
156	アボカド	ペルー	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
176	アボカド	ペルー	-		N.D.	
184	アボカド	メキシコ	-		N.D.	
213	アボカド	ペルー	-		N.D.	

表9 豚内臓肉の汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+/-	検出遺伝子	+/-	検出遺伝子
119	豚ひき肉	鹿児島	-		N.D.	
126	豚レバー	国産	-		N.D.	
129	豚ひき肉	国産	-		N.D.	
132	豚焼肉用タン	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
138	豚肉ネック	国産	-		N.D.	
150	豚ミンチ	国産・メキシコ	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
154	豚モツ	国産	-		N.D.	
163	豚モモ・肩ひき肉	国産	+	<i>astA</i>	-	
164	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
165	豚ホルモン(大腸)	国産	+	<i>eae+stx2+astA</i>	+	<i>eae+astA</i>
166	豚ひき肉	メキシコ	-		N.D.	
167	豚ホルモン(大腸)	国産	+	<i>eae+astA</i>	+	2株 (<i>eae, astA</i>)
168	豚ハツ	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
169	豚赤身ひき肉	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
170	豚タン	国産	+	<i>eae+astA</i>	+	<i>astA</i>
171	豚レバーライス	国産	+	<i>eae+astA</i>	+	<i>astA</i>
172	豚ひき肉	国産	+	<i>astA</i>	-	
173	豚ハツ	国産	+	<i>stx2+astA</i>	-	
174	豚カシラ	国産	+	<i>eae+stx2+astA</i>	-	
175	豚ハラミ	国産	+	<i>eae+stx2+astA</i>	+	<i>astA</i>
176	豚ひき肉	神奈川	+	<i>eae+astA</i>	+	<i>astA</i>
177	豚ハツ	国産	+	<i>stx1+astA</i>	-	
178	豚ホルモン(大腸)	国産	-		N.D.	
179	豚レバー	国産	-		N.D.	
180	豚あらひき肉	国産	-		N.D.	
181	豚ハラミ	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
182	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
183	豚タン	国産	+	<i>eae+astA</i>	+	<i>astA</i>
184	豚レバー	国産	+	<i>eae+astA</i>	-	
185	豚レバー	国産	-		N.D.	
186	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
187	豚レバー	国産	-		N.D.	
188	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
189	豚タン	国産	+	<i>eae+astA</i>	+	<i>astA</i>
190	豚ハツ	国産	+	<i>eae+stx2+astA</i>	+	<i>astA</i>
191	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
192	豚レバー	国産	+	<i>stx2+estla+astA</i>	-	
193	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
194	豚レバー	国産	+	<i>astA</i>	-	
195	豚白もつ	国産	+	<i>eae+stx2+astA</i>	+	<i>astA</i>

表 10 スプラウトの汚染状況

検体番号	品名	産地	スクリーニングPCR		菌分離	
			+/-	検出遺伝子	+/-	検出遺伝子
203	かいわれ大根	千葉県	+	<i>astA</i>	+	<i>astA</i>
206	ブロッコリーの新芽	静岡	-		N.D.	
252	ブロッコリー-スプラウト	千葉	-		N.D.	
253	かいわれ大根	埼玉	-		N.D.	
291	アカワケギ	タイ	-		N.D.	
341	かいわれ大根	岐阜	+	<i>astA</i>	-	
342	赤ラディッシュ新芽	岐阜	-		N.D.	
351	かいわれ大根	埼玉	-		N.D.	
353	アルファルファ	山梨	-		N.D.	
373	ブロッコリーの新芽	静岡	-		N.D.	
374	かいわれ大根	静岡	-		N.D.	
383	クレス	千葉	-		N.D.	
385	オクラの新芽	岐阜	-		N.D.	
388	かいわれ(ビタミンB12)	千葉	-		N.D.	
389	ブロッコリー-スプラウト	神奈川	-		N.D.	
402	かいわれ	埼玉	-		N.D.	
403	かいわれ(ベニーナ)	埼玉	-		N.D.	
410	ブロッコリー-スーパー-スプラウト	山梨	-		N.D.	
411	かいわれ大根	千葉	-		N.D.	
412	かいわれ	埼玉	-		N.D.	
413	アルファルファ	山梨	-		N.D.	
421	かいわれ	岐阜	-		N.D.	
422	ブロッコリー-スプラウト	岐阜	-		N.D.	
436	かいわれ	神奈川	-		N.D.	
437	赤ラディッシュ新芽	岐阜	-		N.D.	
438	かいわれ	埼玉	-		N.D.	
439	かいわれ(ベニーナ)	埼玉	-		N.D.	
440	クレス	神奈川	-		N.D.	
446	かいわれ	静岡	-		N.D.	
447	ブロッコリーの新芽	静岡	-		N.D.	

表 11 分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合
OgUT	17	14.2%
Og 8	8	6.7%
Og 88	7	5.8%
Og Gp9	4	3.3%
Og 103	3	2.5%
Og 15	3	2.5%
Og 7	3	2.5%
Og 81	3	2.5%
Og 86	3	2.5%
Og Gp15	3	2.5%
Og 108	2	1.7%
Og 11	2	1.7%
Og 128	2	1.7%
Og 149	2	1.7%
Og 21	2	1.7%
Og 29	2	1.7%
Og 45	2	1.7%
Og 71	2	1.7%
Og 9	2	1.7%
Og Gp12	2	1.7%
Og8 + Og76	2	1.7%
Og8 + Og120	1	0.8%
OgGp15 + Og180	1	0.8%
Og84 + Og104	1	0.8%
Og100 + Og154	1	0.8%
Og109 + Og171	1	0.8%

表 12 分離株の O 遺伝子型別 (1 株のみ分離)

O 遺伝子型		
Og 1	Og 183	Og 74
Og 119	Og 23	Og 78
Og 126	Og 25	Og 82
Og 130	Og 28ab	Og 84
Og 132	Og 33	Og 91
Og 142	Og 35	Og 93
Og 145	Og 36	Og Gp10
Og 150	Og 4	Og Gp14
Og 159	Og 40	Og Gp7
Og 160	Og 49	
Og 166	Og 51	
Og 170	Og 52	
Og 171	Og 53	
Og 177	Og 54	
Og 180	Og 6	

表 13 牛肉分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合	牛肉のみ
Og1	1	9.1%	*
Og128	1	9.1%	
Og149	1	9.1%	
Og150	1	9.1%	*
Og23	1	9.1%	*
Og35	1	9.1%	*
Og8	1	9.1%	
Og81	1	9.1%	
Og86	1	9.1%	
OgGp14	1	9.1%	*
OgGp9	1	9.1%	

*：今回の調査で牛肉だけから分離された O 遺伝子型

表 14 鶏肉分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合	鶏肉のみ
OgUT	8	15.7%	
Og88	3	5.9%	
Og108	2	9.1%	*
Og11	2	9.1%	*
Og21	2	9.1%	*
Og29	2	9.1%	*
Og8	2	9.1%	
Og86	2	9.1%	*
Og8+Og76	2	9.1%	
Og84 + Og104	1	2.0%	*
Og109 + Og171	1	2.0%	*
Og103	1	2.0%	
Og126	1	2.0%	*
Og132	1	2.0%	*
Og142	1	2.0%	*
Og149	1	2.0%	
Og159	1	2.0%	*
Og160	1	2.0%	*
Og171	1	2.0%	*
Og177	1	2.0%	*
Og183	1	2.0%	*
Og25	1	2.0%	*
Og33	1	2.0%	*
Og36	1	2.0%	*
Og40	1	2.0%	*
Og45	1	2.0%	
Og53	1	2.0%	*
Og54	1	2.0%	*
Og6	1	2.0%	*
Og7	1	2.0%	
Og78	1	2.0%	*
Og84	1	2.0%	*
Og9	1	2.0%	
Og91	1	2.0%	*
OgGp9	1	2.0%	

* : 今回の調査で鶏肉だけから分離された O 遺伝子型

表 15 豚肉分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合	豚肉のみ
OgUT	5	13.9%	
Og88	4	11.1%	
Og8	4	11.1%	
OgGp15	3	8.3%	*
Og15	2	5.6%	
Og71	2	5.6%	*
OgGp15 + Og180	1	2.8%	*
Og100 + Og154	1	2.8%	*
Og103	1	2.8%	
Og119	1	2.8%	*
Og130	1	2.8%	*
Og145	1	2.8%	*
Og180	1	2.8%	*
Og28ab	1	2.8%	*
Og4	1	2.8%	*
Og45	1	2.8%	
Og49	1	2.8%	*
Og51	1	2.8%	*
Og52	1	2.8%	*
Og7	1	2.8%	
Og81	1	2.8%	
Og9	1	2.8%	

*：今回の調査で豚肉だけから分離された O 遺伝子型

表 16 野菜分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合	野菜のみ
OgUT	3	18.8%	
OgGp9	2	12.5%	
Og8 + Og120	1	6.3%	*
Og103	1	6.3%	
Og128	1	6.3%	
Og15	1	6.3%	
Og166	1	6.3%	*
Og170	1	6.3%	*
Og7	1	6.3%	
Og81	1	6.3%	
Og82	1	6.3%	*
OgGp10	1	6.3%	*
OgGp7	1	6.3%	*

* : 今回の調査で野菜だけから分離された O 遺伝子型

表 17 魚分離株の O 遺伝子型別

型別	株数	割合	魚のみ
OgGp12	2	33.3%	*
OgUT	1	16.7%	
Og74	1	16.7%	*
Og8	1	16.7%	
Og93	1	16.7%	*

*：今回の調査で魚だけから分離された O 遺伝子型

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
Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y.	Development of a selective enrichment medium for the detection of <i>Escherichia albertii</i> in foods and the analysis of a foodborne infection.	Foodborne Pathogens and Disease	19 (10)	704- 712	2022
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 <i>Escherichia albertii</i> in chicken meat.	Foodborne Pathogens and Disease	19 (12)	823- 829	2022
廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正。	富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査。	病原微生物検出情報	43 (10)	15- 16	2022

令和5年3月30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4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・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"/>		<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"/>		<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5年4月28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4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 (21KA1006)
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院歯科学総合研究科・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		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5年3月30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4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・第二室長

(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 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。

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4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。