

令和5年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食中毒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5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6(2024)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> 保有細菌の性状等の解析	45
(2) <i>astA</i> 特異的リアルタイム PCR 法の開発	59
(3) <i>astA</i> 保有大腸菌の食品検査法の確立	75
(4) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法	97
2. 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析	103
大岡 唯祐	
3. 病原大腸菌食中毒事例株の解析	115
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	133
大西 貴弘	

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

I. 総括研究報告書

食中毒原因細菌の検査法の 整備のための研究

工藤 由起子

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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* 検出性に優れるリアルタイムPCR法を開発した。また、検出に優れる増菌培地と分離培地を検討した。(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、集団感染由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無などは見出せなかったがβ-ラクタム系に対する耐性遺伝子を高頻度に保有することを明らかになった。臨床的に重要と考えられるバリエーションに関する病原性解析では、さらなる研究アプローチの必要性が示された。(3)病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* 保有大腸菌の食中毒由来株にのみ共通する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかったが、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在する可能性が示唆された。(4)食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。(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(0gGp9):H18 (疑い)」とされたが、本菌の病原性について付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドなどが本菌の病原性に寄与することが示された。

研究協力者

宮城県保健環境センター	山口友美、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、荒木靖也
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、齋藤和輝、木全恵子、磯部順子
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	大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉、西角光平

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 O157:H7 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の解明についての研究を令和３年度に緊急的追加研究として開始し、令和４年度に続き令和５も継続して実施する。

B. 研究方法

〔１〕病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

（１）*astA* 保有細菌の性状等の解析

菌種未同定の *astA* 保有細菌を M

atrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) によって菌種同定した。次に、シーケンスにて *astA* 保有細菌の *astA* バリエーションタイプを特定し、４つの既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性を比較した。また、各種 β ラクター系薬剤や薬剤 C 添加クロモアガー STEC 培地 (CHSTEC) にて *astA* 保有大腸菌の生育を検討した。

（２）*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

昨年度作製しさらに改変した 4 つの Assay のうち配列上完全な *astA* バリエーションの増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を選択した。また、*astA* 保有細菌を供試し、選定された Assay とインターナルコントロール (IC) を組み合わせたリアルタイム PCR 法の特異性を試験した。さらに、感度試験では、集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌を用いて菌株のみにて試験した場合と各種食品培養液にて菌株を希釈した場合の検出限界を求めた。

（３）*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、モヤシ 3 食品の各検体 25 g 入 4

袋について Yamamoto らの *astA* 特異的 PCR 法 (*astA*PCR) を試験した。

② *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、モヤシ 16 検体に集団食中毒事例由来株菌液（中菌数および高菌数）を接種し、mEC または 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ニー寒天培地（C-SMAC）、CHSTEC および薬剤 C 添加 CHSTEC（C-CHSTEC）に画線し、大腸菌様コロニーに *astA*PCR を実施した。

③ 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、②のモヤシ培養液を各種 β ラクタム系薬剤添加 CHSTEC に画線し培養後の生育コロニーを確認した。

④ *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、集団食中毒事例由来株と各種食品培養液にて菌接種食品培養液を調製し、Assay 11r に供試した。菌数と Ct 値から検量線を作製し、令和 4-5 年度の各種食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。

⑤ 自然汚染検体分離株の遺伝子性状解析では、令和 4 年度に各種食品から分離された *astA* 保有細菌株について菌種同定および各種遺伝子型別等を行った。

（４）腸管出血性大腸菌の食品での検査法

食品での検査法として通知されている方法（通知法）に記載の試薬やメーカー名等について、現在も入手可能であるか、また後継品が販売されているかを調査した。

[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）配列上完全な *astA* 遺伝子保有株に共通する因子の同定

配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションの保有株 395 株について、CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングを行い、共通因子の同定を試みた。

（２）集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染事例由来株について、*astA* 遺伝子バリエーションの共通性および AMRFinderPlus を用いて共通の薬剤耐性遺伝子や病原関連遺伝子の同定を行った。

（３）主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

機能解析および EAST1 蛋白質の機能解析のため、配列上完全なバリエーションについて N 末端に His タグを付加できる pETBA ベクターへのクローニングを行った。

（４）培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞

毒性試験

項目（3）で作成した形質転換体（高発現株）について、HeLa細胞を用いた毒性試験を行った。

（5）カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

カイコを用いて感染実験により項目（3）で作成した形質転換体（高発現株）の病原性解析を実施した。

[3]病原性大腸菌食中毒事例株の解析

（1）全ゲノム配列（WGS）による系統解析および完全長ゲノム配列の解析

15株の *astA* 保有大腸菌 0166:H15 の WGS、および公共のデータベースに登録されている同血清型のシーケンスデータを使用して SNP 抽出による系統樹の作製と Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定を行った。さらに、4株の 0166:H15（非集発由来 1株含む）および 2株の 07:H4 について完全長ゲノム配列の決定を行い、本配列を用いて、保有遺伝子の BLAST による比較、replicon typing、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。

（2）細胞付着因子の特定

食中毒由来 0166:H15 株（JNE21-003）のプラスミドを細胞非付着

性株に導入した株の細胞付着性の解析を行った。さらに、本菌についてトランスポゾンを用いた網羅的な遺伝子破壊株を作製し、当該破壊株による付着性試験前後の菌体から抽出した DNA の Tn-seq データを比較し、付着に関与する遺伝子の特定を試みた。

（3）特徴的な生化学的性状の探索

薬剤感受性試験（12 薬剤）、既存の分離選択培地（8 種類）による発育状況等観察、Phenotype microarray による炭素源利用能の測定（192 種類）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）最確数法による汚染菌量の推定

最確数法による *astA* 保有大腸菌の計数は、検体 25g に mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、これを 10 倍乳剤とし、5 本法で行った。42℃、22 時間、培養を行なった培養液から DNA を抽出し PCR を行い、*uidA* と *astA* の両方が検出

された試験管を陽性とした。陽性となった試験管の数から、*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定した。

(3) オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ 1 本につき 1×10^5 cfu のオクラ由来 *astA* 保有大腸菌を接種し、乾燥後、4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にオクラを取り出し、菌数を計測した。

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

本食中毒で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 の染色体およびプラスミドを、代表的な病原性大腸菌ゲノムと比較し、付着因子など病原性に関連する領域を BLASTN でアライメントを作成し Easyfig で可視化した。また、プラスミド脱落株の病原性をマウス腹腔内接種にて評価した。加えて、本菌の *eilA* 遺伝子発現や細胞付着性について検討した。

C. 研究結果

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) *astA* 保有細菌の性状等の解析

多くの株は、MALDI-TOF MS にて

大腸菌と同定されるも、*M. morgani*、*K. pneumoniae*、および *K. oxytoca* 菌株も含まれた。*astA* 保有大腸菌では、少なくとも 13 タイプの *astA* バリエーションが確認された。既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では大腸菌以外の細菌も検出された。選択分離培地の検討では、いずれの選択分離培地でも供試菌株は CHSTEC と同色のコロニーを形成した。

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

配列上完全な *astA* バリエーションの検出性および新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。特異性試験では、配列上完全な *astA* バリエーション保有大腸菌のみが Assay 11r にて *astA* および IC の両方が陽性であった。感度試験では、いずれの条件でも検出限界が $< 2.6 \log \text{CFU/mL}$ であり、検量線の近似曲線は、 $R^2 > 0.98$ であった。

(3) *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、全モヤシ検体が *astA* 陰性であった。② *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、*astA* 陽性コロニーの割合は、NmEC 培養の C-SMAC が低く、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培

養の C-CHSTEC が高かった。③食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、供試した 3 種類の選択分離培地は夾雑菌のコロニー生育を抑制しなかった。④ *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、定性試験で *astA* 陽性の培養液のうち、分離陽性培養液および分離陰性培養液でそれぞれ *astA* 保有大腸菌数が約 6 log CFU/mL および約 8 log CFU/mL であった。⑤ 自然汚染検体からの *astA* 保有細菌の分離株の遺伝子性状解析では、全て大腸菌と同定された。mEC 由来株と NmEC 由来株で同一の O 抗原遺伝子型の株が分離された食品と、mEC 由来株と NmEC 由来株で異なる O 抗原遺伝子型の株が分離された食品が確認された。特に、鶏肉ミンチ由来株では、集団食中毒事例株と同じ O_gGP9:H_g18 に該当するものもあった。また、代表株はいずれも *astA* 単独保有株であり、少なくとも 8 種類の *astA* バリエーションを保有していた。

(4) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法に記載の試薬等の一部の販売が終了されており、リアルタイム PCR 機器に後継機が販売されていること等を確認した。

[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) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有株に共通する因子の同定

CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングの結果、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して存在すること、また、各バリエーションの周辺構造にも共通性が見られなかったことから、共通因子を同定することは出来なかった。

(2) 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかったが、薬剤耐性遺伝子に関しては、β-ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことを明らかに出来た。

(3) 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング
機能解析の準備として N 末端に His x6 タグが付加できる pETBA ベクターへのクローニングを行った。

(4) 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

pETBA ベクター単体（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換体（過剰発現株）との比較の結果、HeLa 細胞に対する細

胞毒性に有意差は見られなかった。

(5) カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

項目(3)で作成した形質転換体(高発現株)の感染によるカイコの感染 24 時間後の生存率は 100% であり、非病原大腸菌 K-12 株との差は見られなかった。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) 全ゲノム配列(WGS)による系統解析および完全長ゲノム配列の解析

0166:H15 株のうち解析を行った多くの株は ST349 に分類されたが、食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。完全長配列の解析では、0166:H15 と 07:H4 は類似したプラスミドの保有が確認されたが、保有遺伝子比較では食中毒由来株にのみ特異的な領域は認められなかった。

(2) 細胞付着因子の特定

プラスミド導入株の解析により、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在している可能性が示唆された。Tn-seq データは染色体上の 4837 の遺伝子にマッピングすることで各遺伝子のカウント数を取得し、さらに必須性指数の算出も行った。付着性試験後でカウント数が減少していた遺伝子は

1194 種類存在した。

(3) 特徴的な生化学的性状の探索

astA 保有大腸菌 0166:H15 の簡便な分離検出法開発を目的として各項目を実施したが、利用可能な特徴的性状は確認されなかった。

[4] 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

(1) 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

今回は鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーン、それぞれ 35 検体を対象に、最確数法を用いて *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定を行った。

鶏肉は 35 検体中 32 検体(91%) が陽性となった。31 検体は 20~3477 MPN/100g であった。1 検体は定量限界値以上 (1.6×10^4 MPN/100g) であった。陽性検体中、62%の検体の汚染菌量は $10^2 \sim 10^3$ MPN/100g の範囲に分布していた。

豚内蔵肉は 35 検体中 17 検体(49%) が陽性となった。汚染菌量は 20~5422 MPN/100g の範囲であった。陽性検体中、76%の検体の汚染菌量は 10^2 MPN/100g 以下であった。

オクラは 35 検体中 7 検体(20%) が陽性となった。汚染菌量の範囲は 20~3476 MPN/100g であった。

汚染菌量は均一に分布していた。

ヤングコーンは 35 検体中 15 検体 (43%) が陽性となった。汚染菌量の範囲は 20~定量限界値以上であった。陽性検体の 53% は 10^2 MPN/100g 以下の汚染菌量であった。残りの 47% の汚染菌量は 10^3 以上であった。

(2) オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ一本あたり 10^5 cfu/mL 接種したが、菌液を乾燥させたのち菌数を測定すると約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に低下した。

25°C で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖し、約 10^5 cfu/mL に達した。その後、菌数はやや減少したが $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL を培養 7 日目まで維持した。

10°C で培養した場合、菌数はほとんど変化せず、培養 7 日目でも約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL を維持した。

4°C で培養した場合、培養開始直後から菌数が減少し、培養 3 日目には、菌は検出されなくなった。

[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

大腸菌 OUT(OgGp9):H18 が分子量約 104 kb の大プラスミドを有しており、付着因子および菌体外分泌機構がコードされていた。また、菌体

外分泌機構は、染色体上にも存在していることが示された。プラスミド脱落株を作製し、マウスに腹腔内接種した結果、50% が死亡し、プラスミド保有株では 100% 死亡であった。加えて、本菌の *eilA* 遺伝子発現や細胞付着性が CFA/III に起因することが示された。

D. 考察

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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* 保有細菌の性状等の解析

既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では一部の *astA* 保有大腸菌の検出性が低くその他細菌が検出されることが示されたため、*astA* 保有大腸菌特異的な遺伝子検出法の開発が重要と考えられた。

(2) *astA* 特異的リアルタイム

PCR法の開発

配列上完全な *astA* バリエーション特異的 Assay 11r において、*astA* および IC の両方が増幅される場合が *astA* 保有大腸菌陽性と判定されると考えられた。また、Assay 11r は検出性および定量性に優れることが示された。

(3) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

モヤシからの *astA* 保有大腸菌の検出には、mEC および CHSTEC または C-CHSTEC の組み合わせが適すると考えられた。リアルタイム PCR では、*astA* 保有大腸菌の分離のためには、増菌培養液中に log 8 CFU/mL 程度の菌数が必要と示唆された。増菌培地ごとに増殖しやすい菌株の存在が示唆されたため、食中毒事例の原因物質調査においては mEC および NmEC を併用することで、より効率に *astA* 保有大腸菌が分離されると考えられた。

(4) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手困難となっている現状が明らかとなった。また、通知法では遺伝子検出法の検出限界を 4 log CFU/mL 以上と示されている。今後は、現状販売され

ているリアルタイム PCR 法の後継機器を用いて、各種遺伝子検出法の検出限界が定められた値を満たしているかを確認する必要があると思われた。

[2] 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する大腸菌株 395 株に関する解析では、各 *astA* 遺伝子バリエーションに共通する疫学マーカーとなる遺伝子の同定が困難であることが明らかとなった。集団感染由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性遺伝子・病原関連遺伝子の検索の結果、集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかったが、β-ラクタム系に対する耐性遺伝子を高頻度に保有することを明らかに出来た。臨床的に重要と考えられるバリエーションに関する病原性解析では、高発現株の培養上清を用いた細胞毒性試験ならびにカイコを用いた感染実験のいずれにおいても、有意な結果は得られず、病原性に関して異なる研究アプローチを検討する必要があることが明らかとなった。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の

解析

0166:H15株のうちST2914が病原性系統である可能性が示唆された。しかし、食中毒由来株にのみ共通する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかった。一方で、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在する可能性が示唆された。しかし、染色体上には4837もの遺伝子が存在し、そのうちTn-seqの比較解析においてカウント数が減少した遺伝子は1194種類も存在した。しかし、本解析により各遺伝子のデータ（カウント数や必須性指数）が取得されたことから、付着因子の特定のためにはこれらのデータを活用するなど、引き続き解析を行うことが重要であると考えられる。

[4]食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

食品における*astA*保有大腸菌の汚染菌量を明らかにするために、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。調査食品全体で見ると汚染菌量はほとんどの検体で $10^2 \sim 10^4$ MPN/100g範囲であった。鶏肉1検体とヤングコーン2検体だけが定量限界値以上

(1.6×10^4 MPN/100g)であった。鶏肉は昨年度までの調査結果と同様に汚染率が高く、また今回の調査で汚染菌量も高いことが明らかになった。これらの結果から、鶏肉は一般的に*astA*保有大腸菌に汚染されているものと考えられた。*astA*保有大腸菌に対策を考える場合、鶏肉は最も優先して対応しなければならない食品であると考えられた。豚肉内蔵肉も汚染率は高かったが、汚染検体の76%は 10^2 MPN/100g以下であり、鶏肉と比べると汚染菌量は低かった。しかし、一部の検体では 10^3 MPN/100gを超えているため、注意が必要である。オクラは検体ごとに汚染菌量が分散しており、汚染菌量に特定の傾向は認められなかった。ヤングコーンは汚染検体の53%が 10^2 MPN/100g以下の汚染菌量出会ったが、残りの汚染検体は 10^3 MPN/100gを超えており、2検体は定量限界値を超えていた。この結果から、ヤングコーンは検体によって汚染菌量が大きく異なることが示唆された。検体によって汚染菌量が多い場合があるので、ヤングコーンを調理する場合は、十分に加熱を行う必要があると考えられた。

オクラとヤングコーンのうち、

オクラは生や浅漬けで喫食するため、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖について検討を行った。今回の結果から、オクラを 10℃ 以下の環境で保管すれば、*astA* 保有大腸菌の増殖を抑制できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推計から、市販されているオクラから最高 3×10^3 MPN/100g の *astA* 保有大腸菌が汚染していると考えられる。オクラ 1 本に換算すると、約 3×10^2 MPN の汚染があると考えられる。一方、増殖挙動の解析から、保管温度が高くと、オクラ 1 本あたり約 10^5 cfu/mL まで増殖できることが示唆される。このことから、市販のオクラも保管温度が高ければ、オクラ上の菌数の増加の可能性があると考えられた。

[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

本菌の染色体ゲノムと他の病原性大腸菌染色体ゲノムの詳細な比較解析により見いだされた領域は、主要ではないものの病原性に関与する領域であり病原性に関与することが考えられた。また、付着因子や菌体外分泌機構をコードする大プラスミドを有しており、この脱落

株を用いたマウス腹腔内接種では、死亡率が半分に減少することから、病原性に強く関与していることが明らかになった。加えて、*eilA* 遺伝子の発現や付着因子 CFA/III の病原性への関与についても知見が得られた。

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、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では特異性が低いことが示された。そこで、配列上完全な *astA* バリエーション特異的リアルタイム PCR 法を新規に開発した。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用にも有用と考えられた。また、*astA* 保有大腸菌の増菌培地として mEC および NmEC が有用であることが示唆された。*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、mEC および NmEC を併用することで *astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。さらに、腸管出血性大腸菌の本研究にて、現状に即した通知法改定案を作成する必要性が考えられた。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、検出指標の同定と検査法の開発を進めた。しかしながら、同一バリエーションが大腸菌進化系統に散在しており、共通遺伝子を同定出来なかった。集団感染事例株ではβ-ラクタム系耐性遺伝子を高頻度に保有していた。また、病原性について、EAST1単独での機能は見られなかった。今後は*astA* 遺伝子が他の因子と協調的に働く可能性を検討するとともに、新たな検出指標を追加した検出系を構築する。分担研究[3]病原大腸菌食中毒事例株の解析では、血清型がO166:H15である*astA*陽性大腸菌に着目した解析により、ST2914が病原性系統である可能性が判明した。本菌の病原性究明のためには、引き続き付着因子の特定や病原性関連遺伝子の詳細な解析を行う必要がある。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、鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、オクラ、ベビーコーンの汚染菌量が明らかになった。この結果から、これらの食品は*astA*保有大腸菌の汚染率だけでなく、汚染菌量も高いことが明らかになった。*astA*保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品が最重要食品になると考えら

れた。オクラにおける*astA*保有大腸菌の増殖挙動の解析から、保管温度が適切でなかった場合、オクラの表面でも十分に増殖、生残できることが明らかになった。オクラは海外から輸入されているものが多く、輸入過程の温度管理が適切でないと、食中毒の原因になる可能性があることが示唆された。

[5]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(OgGp9):H18(疑い)」とされたが、本菌の病原性について検討を行い、本菌が保有するプラスミドが病原性に関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Ohya, K., Yoshinari, T., Ohnishi, T., Mizukami, K., Suzuki, T., Takinami, K., Suzuki, T., Lee, K., Iyoda, S., Akeda, Y., Yahata, Y., Tsuchihashi, Y., Sunagawa, T., Hara-Kudo, Y. Atypical diarrheagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak.

- Epidemiology and Infection 11(151), e150, 2023.
- Hirose, S., Konishi, N., Sato, M., Suzumura, K., Obata, H., Otsuka, K., Doi, R., Goto, K., Kai, A., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Growth and survival of *Escherichia albertii* in food and environmental water at various temperature. Journal of food protection 87(4), 100249, 2024.
- Arai, S., Hirose, S., Yanagimoto, K., Kojima, Y., Yamaya, S., Yamanaka, T., Matsunaga, N., Kobayashi, A., Takahashi, N., Konno, T., Tokoi, Y., Sakakida, N., Konishi, N., and Hara-Kudo, Y. An interlaboratory study on the detection method for *Escherichia albertii* in food using real time PCR assay and selective agars. International Journal of Food Microbiology 414, 110616, 2024.
- 新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品および環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析. 日本食品微生物学会雑誌 印刷中.
- Ooka T#, Lee K#, Gotoh Y, Arai S, Hara-Kudo Y, Hayashi T, Iyoda S, and Nishi J. Prevalence and characterization of the *astA* gene variants in *Escherichia coli* lineage. (投稿予定)
- (学会等発表)
- 工藤由起子. *Escherichia albertii* の汚染状況及び検査法について. シンポジウム III *E. albertii* を含めた病原大腸菌による食中毒の発生と検査体制. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 令和 5 年 7 月 6 日. 岐阜
- Hara-Kudo, Y., Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T. Emerging foodborne diseases with *Escherichia albertii* and the detection methods. 55th UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES 令和 5 年 8 月 6-11 日. カリフォルニア
- Ohnishi, T. and Hara-Kudo, Y.

Contamination of *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail foods available in Japan. 55th UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES 令和5年8月6-11日. カリフォルニア

新井沙倉, 廣瀬昌平, 池田伸代, 門口真由美, 有川衣美, 溝腰朗人, 新免香織, 横山孝治, 土井りえ, 齊木大, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品における *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 令和5年9月21-22日. 大阪

廣瀬昌平, 新井沙倉, 山谷聡子, 貫洞里美, 齊木大, 曾根美紀, 荒木靖也, 土井りえ, 尾畑浩魅, 土屋彰彦, 小嶋由香, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品中の *astA* 保有大腸菌の効率的な増菌および分離培養法の検討. 第166回日本獣医学会学術集会. 令和5年9月5-18日. 大阪

曾根美紀, 尾畑浩魅, 山谷聡子, 貫洞里美, 荒木靖也, 土屋彰彦, 小西典子, 土井りえ, 小嶋由香, 廣瀬昌平, 新井沙倉, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌自然汚染食品での増菌および分離培養法の検討. 第44回日本食品微

生物学会学術総会. 令和5年9月21-22日. 大阪

荒木靖也, 新井沙倉, 小西典子, 土井りえ, 山谷聡子, 土屋彰彦, 小嶋由香, 尾畑浩魅, 貫洞里美, 曾根美紀, 廣瀬昌平, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌接種食品での増菌および分離培養法の検討. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 令和5年9月21日. 大阪

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 食肉における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 令和5年9月21-22日. 大阪

新井沙倉, 溝腰朗人, 佐伯美由紀, 木全恵子, 柳本恵太, 原田誠也, 山谷聡子, 土屋彰彦, 床井由紀, 福留智子, 長岡宏美, 山田香織, 濱夏樹, 山中拓哉, 小西典子, 土井りえ, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 食品および環境等における *Escherichia albertii* の汚染実態調査. 第119回日本食品衛生学会学術講演会. 令和5年10月12日. 東京

貫洞里美, 尾畑浩魅, 荒木靖也, 曾根美紀, 山谷聡子, 土井りえ, 小西典子, 小嶋由香, 土屋彰彦, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 大西貴弘, 工

藤由起子. 食品からの *astA* 保有大腸菌分離のための培養法の検討. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 5 年 10 月 12 日. 東京

山谷聡子, 廣瀬昌平, 小西典子, 土屋彰彦, 小嶋由香, 土井りえ, 尾畑浩魅, 曾根美紀, 荒木靖也, 貫洞里美, 新井沙倉, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌の食品からの分離方法の検討および分離株の解析. 第 119 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 5 年 10 月 12 日. 東京

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 野菜における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会. 令和 5 年 10 月 12 日. 東京

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 5 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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(0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・4年度に多角的な解析を行い、完全長ゲノムの取得と詳細なゲノム解析、患者便メタゲノム解析等を行った。令和5年度には、付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミド等が本菌の病原性に寄与することが明らかになった。

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、齋藤和輝、木全恵子、磯部順子
国立医薬品食品衛生研究所	大屋賢司、西角光平、廣瀬昌平、大西貴弘

A. 研究目的

令和3年6月に富山市で学校給食を原因とした患者数1,800人以上の大規模食中毒が発生した。富山市保健所の調査から原因食品として牛乳が特定されたが、牛乳から主な食中毒細菌やウイルスは検出されなかったため、当該保健所から国立

医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に原因物質調査が依頼された。調査の結果、食中毒発生に關与する提供日の牛乳および多くの患者検体で、血清型 OUT(0血清型別不能):H18 であり、0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ゲノムおよびプラスミドの解析

本事例牛乳由来大腸菌 OUT (0gGp9):H18 (ESC818 株) の染色体およびプラスミドを、代表的な病原性大腸菌ゲノムと比較した。染色体およびプラスミド上の付着因子など病原性に関連する領域を、Artemis を用いて各株ゲノムから抽出し、BLASTN でアライメントを作成し Easyfig で可視化した。また、増菌培地での継代によってプラスミド脱落株を作製した。プラスミド脱落株と元株についてゲノム配列間の単一塩基多型 (SNP) 解析を CSI Phylogeny にて行った。ESC818 株、プラスミド脱落株、非病原性大腸菌 K-12 (NBRC3301) を Balb/c マウスに腹腔内接種し、7 日間生死を観察し生存率を求めた。実験は、国立医

薬品衛生研究所動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 910)。

[2] プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

本食中毒原因食品由来株 (TC49)、患者由来株 (TC78)、完全な ETT2 を保有し、機能解析が実際に行われている腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC) 042 を供試した。LB 液体培地を用いた各供試菌株の培養液から RNA 抽出および cDNA 合成を行った。プライマーおよびプローブはウェブサーバ上の Edesign にて設計した。検量線作成には、標的遺伝子全長を PCR にて合成し、段階希釈した DNA を用いた。各 PCR 産物における *eivA* および *eilA* コピー数は、検量線を用いて算出した。

[3] 細胞傷害性試験

富山市食中毒事例から分離された大腸菌 0gGp9:H18 の病原性解析のため、付着因子の特定および保有する百日咳様毒素 (P1t) の解析を行った。食中毒由来株の付着因子特定のため、プラスミドの各領域の破壊株作製と細胞付着性の解析を行い、その結果から確認された付着に関与する可能性のある遺伝子について破壊株と相補

株を作製し再度付着性の解析を行った。さらに、保有する百日咳様毒素遺伝子 *plt* の破壊株を作製し、本菌株感染時の CHO 細胞の形態的变化の確認、および CHO 細胞から抽出した RNA を用いて C3(補体) mRNA 発現量を測定し野生株と比較を行った。

C. 研究結果

[1] 富山市事例大腸菌株のゲノムおよびプラスミドの解析

ESC818 株染色体ゲノム環状地図を他の病原性大腸菌株染色体ゲノムと比較したところ、EAEC や尿路原性大腸菌 (UPEC) と共通して保存されている領域が数カ所見いだされた (図 1)。また、ESC818 株は分子量約 104 kb の大プラスミド pESC818 を有しており、付着因子および菌体外分泌機構がコードされていた (図 2)。プラスミド上の付着因子および菌体外分泌機構コード領域の構造は、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の保有するプラスミド上の構造と類似していた。(図 3 および 4)。また、菌体外分泌機構は、染色体上にも存在していることが示された (図 4)。SNP 解析の結果、ESC818 株とプラスミド脱落株ゲノム間の SNP は 2 であり、継代によって染色体

ゲノムに変異が入っていないことが確認された (データ示さず)。非病原性大腸菌 K-12、ESC818 株、プラスミド脱落株をマウスに腹腔内接種した結果、K-12 株接種マウスは全数生存し、ESC818 株接種マウスは全数死亡した。また、プラスミド脱落株接種マウスの死亡率は 50%であった。

[2] プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

各株において、*eivA* および *eilA* 遺伝子の mRNA がそれぞれ検出された。cDNA 1 ng あたりのコピー数は、各株間で同等であった (図 5)。

[3] 細胞傷害性試験

プラスミド上に存在する *cof* オペロンを含む領域を破壊した株が細胞非付着性を示した。そのため *cofA* 破壊株と相補株を作製し、各株の付着性解析から相補株のみが付着性を示した。野生株で認められた CHO 細胞の形態的变化は *plt* 破壊株では認められなかった。さらに、C3 発現量は野生株にのみ有意な上昇が認められた。(図 6)。

D. 考察

[1] 富山市事例大腸菌株のゲノムおよびプラスミドの解析

令和 4 年度までの成果で、ESC818 株は病原性大腸菌の主要な病原因子はもたないものの、系統的には EAEC や UPEC と近縁であることが示されている。ESC818 株染色体ゲノムと他の病原性大腸菌染色体ゲノムの詳細な比較解析により見いだされた領域は、主要ではないものの病原性に関与する領域であり、ETEC や腸管出血性大腸菌 (EHEC) には存在しなかった。また、ESC818 株は、付着因子や菌体外分泌機構をコードする大プラスミドを有することも明らかとなった。ESC818 株をマウスに腹腔内接種すると接種マウスは 100%死亡し、ESC818 株が病原性を有することが示された。プラスミド脱落株の接種では、死亡率は 50%であった。プラスミド脱落株と ESC818 株間の SNP 解析の結果、プラスミド脱落株の染色体には変異が入っていないことが確認されたことから、プラスミド pESC818 は、ESC818 株の病原性に強く関与していることが明らかになった。

[2] プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量

これまで、qRT-PCR の相対定量系では *eivA* および *eilA* 遺伝子の

mRNA 発現量が定量できなかった。*eilA* 遺伝子については、Sheikh らも同様に、ETT2 遺伝子領域を保有する大腸菌において、相対定量系では *eilA* 遺伝子の mRNA が定量できないことを報告している。この理由として、*eilA* 遺伝子の発現量が極めて低いことや、mRNA が不安定であること等が考えられる。本解析において、絶対定量系によって *eilA* 遺伝子における mRNA が検出された。このことから、遺伝子として機能していることが考えられたため、今後は ETT2 遺伝子群の本菌の病原性への関与について解析する。

[3] 細胞傷害性試験

本菌の細胞付着性は *cof* オペロンがコードする付着因子 CFA/III に起因すると考えられた。また、P1t は CHO 細胞の形態的変化や炎症誘発に寄与している可能性が示唆された。

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、本菌の染色体ゲノムを詳細に解析し、主要ではないものの病原性に関与する領域を有することが明らかになった。また、付着因子や菌体外分泌機構をコードする

大プラスミドを有することも明らかとなった。この株はマウスに腹腔内接種すると接種マウスは100%死亡し、病原性を有することが示されたが、プラスミド脱落株では死亡率が半分になり、このプラスミドが病原性に強く関与していることが明らかになった。

また、*eilA* 遺伝子発現量の定量を絶対定量系によって検出可能であることが示され、遺伝子として機能していることが示唆された。さらに、本菌の細胞付着性は *cof* オペロンがコードする付着因子 CFA/III に起因すると考えられ、Plt が CHO 細胞の形態的变化や炎症誘発に寄与している可能性が示唆された。

以上のように、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付着因子や菌体外分泌機構をコードするプラスミド等が寄与することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose S, Ohya K, Yoshinari T,
Ohnishi T, Mizukami K, Suzuki

T, Lee K, Iyoda S, Akeda Y, Yahata Y, Tsuchihashi Y, Sunagawa T, Hara-Kudo Y. Atypical diarrhoeagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak. *Epidemiol Infect.* 2023;151:e150.

Ohya K, Hirose S, Nishikaku K, Ohnishi T, Lee K, Iyoda S, Kubomura A, Akeda Y, Mizukami K, Suzuki T, Takinami K, Taquahashi Y, Kuwagata M, Kitajima S, Inoue T, Hara-Kudo Y. Genomic features and pathogenicity of atypical diarrheagenic *Escherichia coli* from a large foodborne outbreak. (投稿中)

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

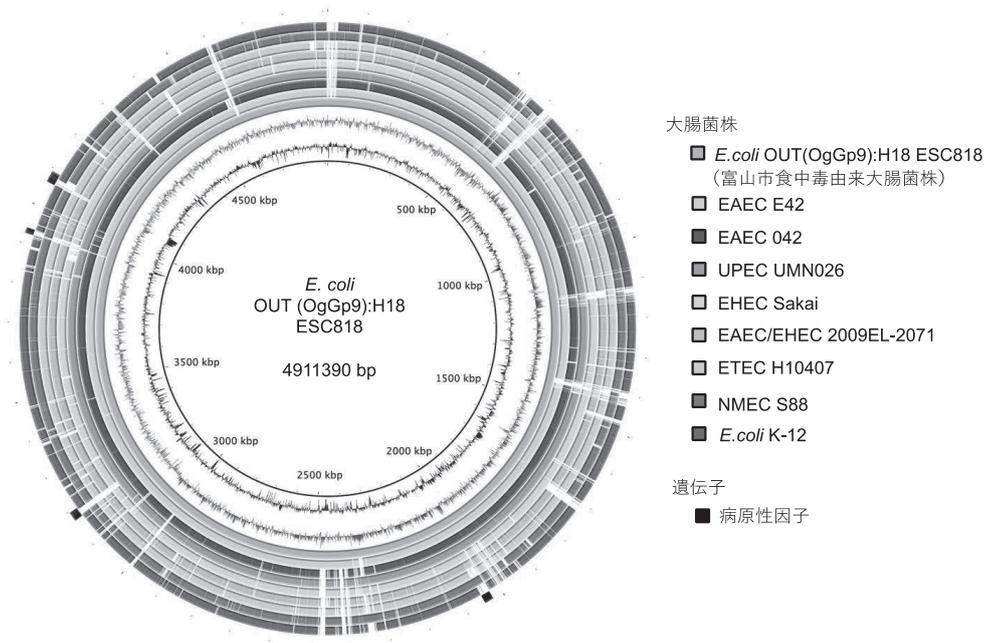


図1 富山市食中毒由来大腸菌株と関連株の染色体比較

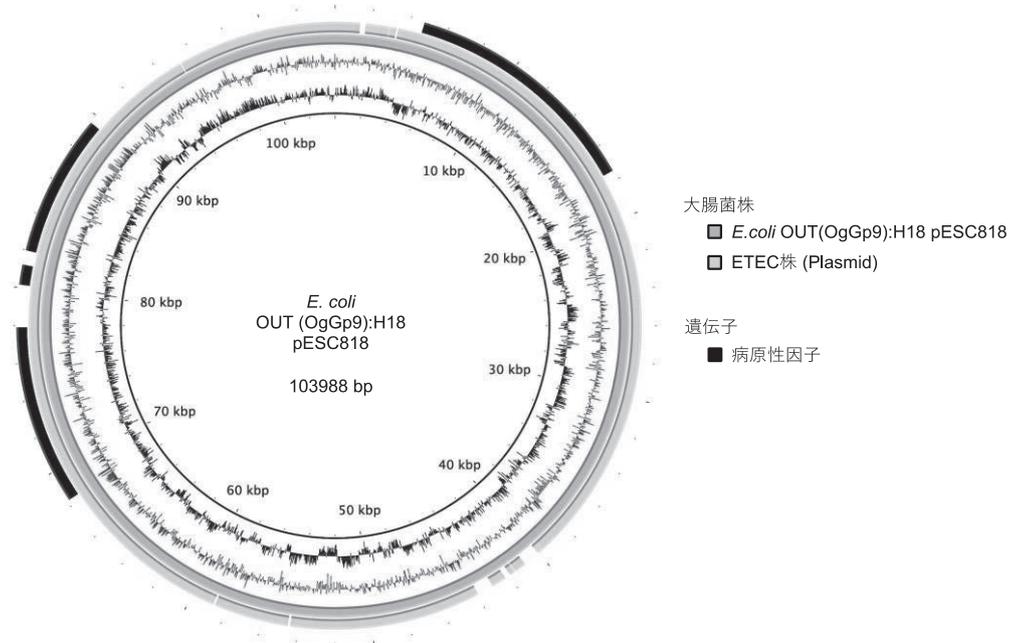


図2 富山市食中毒由来大腸菌株と関連株のプラスミド比較

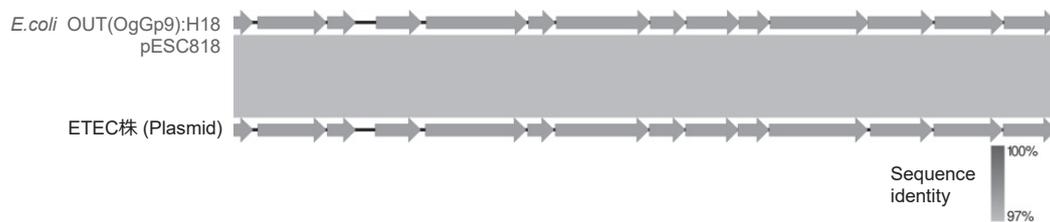


図3 プラスミド上の付着因子コード領域のゲノム比較

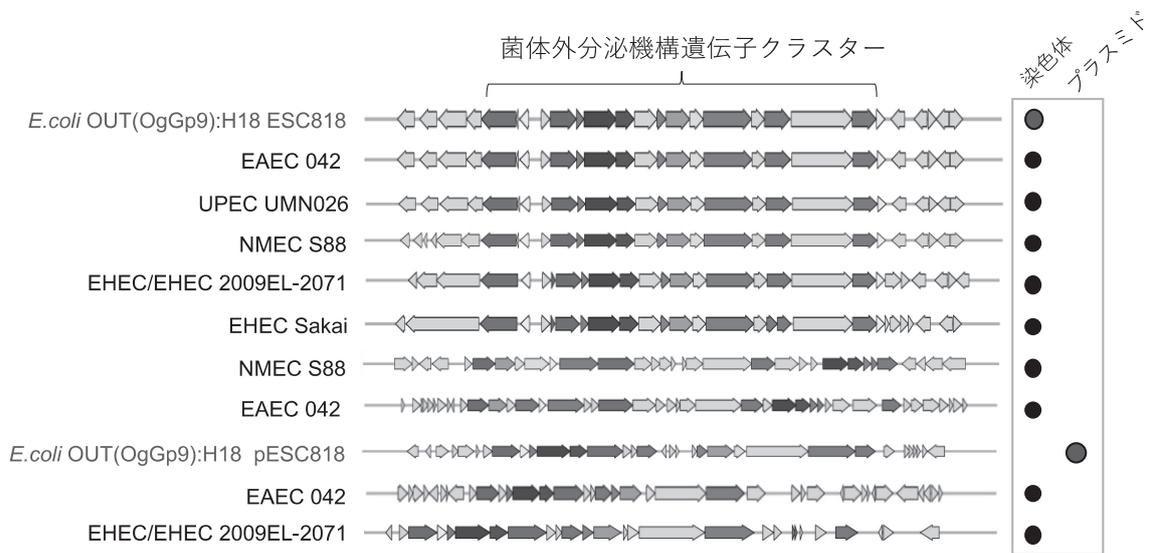


図4 菌体外分泌機構コード領域のゲノム比較

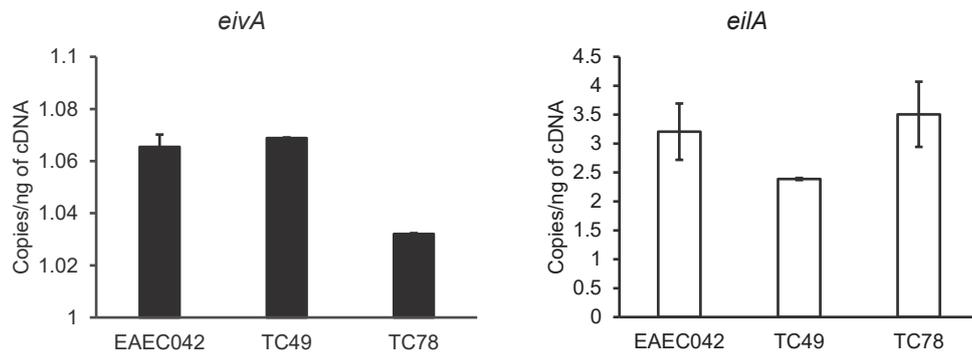
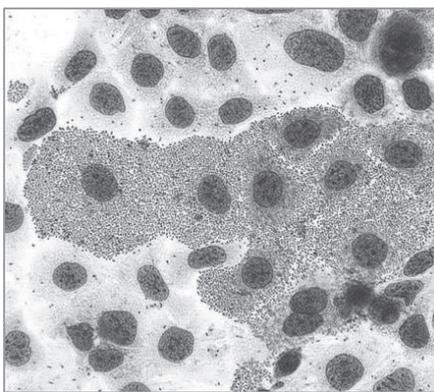
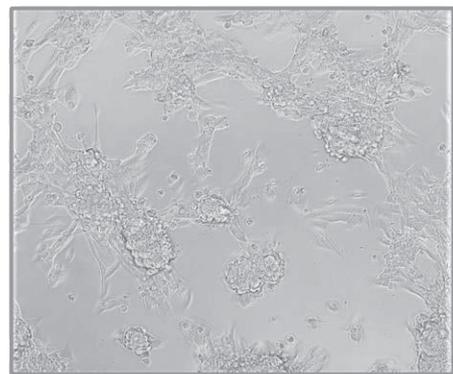


図5 プローブを用いた絶対定量系による *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量 (2連で行った実験より得られた測定値から平均値±標準偏差を算出した。3回の独立した実験を行い、その代表的なデータを示す。)



(a) 富山株の Caco-2 細胞付着像



(b) 富山株の菌液を接種した CHO 細胞



(c) 富山株の *plfA* 破壊株の菌液を接種した CHO 細胞

図6 CHO 細胞での菌の付着性および形態的变化

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5年度 厚生労働科学研究費補助金

(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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* 保有大腸菌の性状等の解析：*astA* のバリエーションの多様性を解析した。また、*astA* 保有であるが大腸菌以外の細菌の同定と既存の PCR 法での検出性を検討した。[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、*astA* のバリエーションのうち完全な配列を有するものを対象としたリアルタイム PCR を開発した。[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、昨年度の補足として一部検体を用いて増菌培養法、分離培養法を総合して評価した。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、これらの3つの研究では食中毒事例が発生した際に有用な検査法につながる重要な成果が得られたと考える。また、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の特定に必要な検査法について [4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法では、既存の通知法記載の試薬や機器の変更の必要性について検討した。

研究協力者

宮城県保健環境センター

山口友美、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

鹿児島大学

国立医薬品食品衛生研究所

小嶋由香、荒木靖也

大岡唯祐

大西貴弘、大屋賢司、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、分離培養法について昨年度まで取り組んできたが、今年度は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* 保有大腸菌の性状等の解析では、*astA* のバリエーションの多様性を解析した。また、*astA* 保有であるが大腸菌以外の細菌の同定と既存の PCR 法での検出性を検討した。[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、*astA* のバリエーションのうち完全な配列を有するものを対象としたリアルタイム PCR を開発した。[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、昨年度の補足として一部検体を用いて増菌培養法、分離培養法を総合して評価した。

また、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の特定に必要な検査法について [4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法では、既存の通知法記載の試薬や機器の変更の必要性について検討した。

B. 研究方法

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

菌種未同定の *astA* 保有細菌 80 株を Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) に よって菌種同定した。次に、213 株の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプを特定するため、既報の *astA* のシーケンス用プライマーを活用して配列を決定し、35 種類の *astA* リファレンス配列と比較した。同 *astA* 保有大腸菌について、4 つの既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性を比較した。また、MALDI-TOF MS において大腸菌以外の細菌と同定された菌株についても *astA* バリエーションタイプの特定および既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性を試験した。さらに、*astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討のために、各種 β ラクタム系薬剤や薬剤 C を組み合わせて添加した 10 種類のクロモアガー STEC 培地 (CHSTEC) を調製し、集団食中毒事例由来株コロニー生育を確認した。

[2] *astA* 特異的リアルタイム

PCR 法の開発

昨年度作製した v22 以外の *astA* バリエーション特異的なプライマーおよびプローブセット候補 (Assay 7、Assay 8、Assay 10 および Assay 11) 4 種類を基本として、v7、v15 および v33 の配列を非検出にするためにプローブの配列を修正 (Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r) した。次に、代表 *astA* バリエーションタイプとして 7、v29 および v34 保有大腸菌株における検出性を試験し、4 つの Assay のうち増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を以降の検討に用いた。また、*astA* 保有大腸菌 213 株および *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌 (*Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella oxytoca*) を供試し、選定された Assay とインターナルコントロール (IC) を組み合わせたリアルタイム PCR 法の特異性を試験した。さらに、感度試験では、集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌 4 株を用いて菌株のみにて試験した場合の検出限界と食品 (豚肉スライス、エビおよびベビーコーン) 培養液にて菌株を希釈した場合の検出限界をそれぞれ求めた。

[3] *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、モヤシ 3 食品の検体 25 g 入りストッカー袋を 20 袋用意した。4 袋について mEC 中にて増菌培養後に Yamamoto らの *astA* 特異的 PCR 法 (*astA*PCR) 陰性を確認した。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、16 検体に中菌数 (約 50 CFU) および高菌数 (約 100 CFU) に希釈した集団食中毒事例由来株菌液を接種した。各 8 袋に mEC および NmEC 225 mL を加え培養し、*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)、CHSTEC および薬剤 C 添加 CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、大腸菌様コロニーを最大 3 個選択し *astA*PCR を実施した。

(3) 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、(2) のモヤシ培養液をセフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC、セフィキシムおよびセフスロジン添加 CHSTEC に画線し、培養した。培養後の生育コロニーの色や生育状態を確認し、(2) と同様に *astA* 保有大腸菌を分離した。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、集団食中毒事例由来株 2 株の培養液を *astA* 陰性の各種食品 mEC 培養液にて 10 倍階段希釈し、菌接種食品培養液を調製し、Assay 11r に供試した。各菌接種食品培養液に添加した菌数と得られた Ct 値から検量線を作製した。令和 4-5 年度に抽出した DNA について上記にて作製の検量線を用いて各培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。

(5) 自然汚染検体からの *astA* 保有細菌の分離株の遺伝子性状解析では、令和 4 年度に各種食品から分離された *astA* 保有細菌 16 5 株について MALDI-TOF MS および O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析を実施し代表株を選定した。次に、代表株の各種病原因子を検出し、保有する *astA* バリエーションを特定した。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法記載の遺伝子検出法、培養法およびその他試薬やメーカー名等について、通知法に記載されている内容が現在も入手可能であるか、また後継品が販売されているかを調査した。

C. 研究結果

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

MALDI-TOF MS 供試菌株のうち 5 株を除く 75 株は大腸菌と同定され、各 1 株は *M. morganii* および *K. pneumoniae*、3 株は最も一致率が高い菌種としては *K. oxytoca* と同定された。*astA* 保有大腸菌では、少なくとも 13 タイプの *astA* バリエーションが確認され、一部の株は、複数のバリエーションタイプ保有株、PCR プライマーにて増幅されない株または新たなバリエーション保有株であった。次に、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での *astA* 保有大腸菌の検出性を比較したところ、いずれも供試した 4 つの PCR 法陽性であったが、Yamamoto らの PCR 法では v27 保有の 5 株はバンドが薄かった。一方、*astA* 保有大腸菌以外の細菌では、*M. morganii* は複数のバリエーションタイプを保有しており、*K. pneumoniae* は PCR プライマーにて増幅されず、*K. oxytoca* は複数のバリエーションタイプ保有株または新たなバリエーション保有株であった。また、*M. morganii* は 4 つ PCR 法のいずれも陽性であったが、他 4 株はいずれかの PCR 法で陰性またはバンドが薄い結果であっ

た。*astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、セフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC およびセフィキシムおよびセフスロジン添加 CHSTEC では、供試菌株のいずれもコロニーを形成し、CHSTEC と同様のコロニー色を示した。薬剤 C 添加培地では、いずれの培地も *astA* 保有大腸菌のコロニー生育が抑制された。

[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r のいずれにおいても、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 保有株は陰性であった。一方、Assay 8r および Assay 11r では、v29 保有株および v34 保有株が同程度の Ct 値を示したが、Assay 7r および Assay 10r では、v29 保有株の Ct 値と v34 保有株の Ct 値とに大きな差が認められたため、Assay 7r および Assay 10r は検出性が劣ると考えられた。Assay 8r および Assay 11r のうち新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。特異性試験に供試した *astA* 保有大腸菌 213 株中 211 株は Assay 11r において *astA* および IC が増幅されたが、v7 保有の 2 株は IC が増幅されるも *astA*

が増幅されなかった。また、その他の *astA* 保有細菌では、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* はいずれも IC が増幅されるも *astA* が増幅されなかった。また、*M. morgani* は、*astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった。感度試験では、菌株のみを用いた場合、いずれの菌株でも検出限界が $< 2.2 \log \text{CFU/mL}$ であり、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.99$ であった。一方、食品を用いた場合は、いずれの食品でも検出限界が $< 2.6 \log \text{CFU/mL}$ であり、検量線の近似曲線は、 $R^2>0.98$ であった。

[3] *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、全モヤシ検体が *astA* 陰性であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC で同等もしくは mEC で高く、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が低く、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が高かった。

(3) 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、供試した 3 種類の選択分離培地は *astA* 保有大腸菌以外の青色コロニ

一の生育を抑制しなかった。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、*astA* 保有大腸菌の菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映していた。各培養液の平均菌数は、定性試験で *astA* 陽性の培養液のうち、*astA* 保有大腸菌が分離された培養液および分離されなかった培養液でそれぞれ約 $6 \log \text{CFU/mL}$ および約 $8 \log \text{CFU/mL}$ であった。

(5) 自然汚染検体からの *astA* 保有細菌の分離株の遺伝子性状解析では、全て大腸菌と同定された。mEC 由来株と NmEC 由来株で同一の 0 抗原遺伝子型の株が分離された食品と、mEC 由来株と NmEC 由来株で異なる 0 抗原遺伝子型の株が分離された食品が確認された。特に、鶏肉ミンチ由来株は多様な 0 抗原遺伝子型で構成されており、2020 年姫路市食中毒事例株と同じ 0gGP9:Hg18 に該当するものもあった。また、代表株はいずれも *astA* 単独保有株であり、8 種類の *astA* バリエントを単独保有あるいは複数のバリエントを同時保有していた。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

DNA 抽出キットおよびリアルタ

イム PCR 法および Loop-mediated isothermal amplification 法のいずれも通知法に記載のキットが現状でも販売されていることを確認した。また、通知法に記載されているタカラバイオおよび Applied Biosystems のリアルタイム PCR 機器に後継機が販売されていることを確認した。通知法に記載されている Loopamp リアルタイム濁度測定機器のうち現状販売されている機器は LoopampEXIA のみであった。増菌用培地である mEC の販売元として通知法に記載されているメルクは、その後販売を終了しており、通知法記載の XM-EHEC 寒天培地は、名称変更されていた。さらに、一部の製造販売元名や試薬は名称変更されていたことを確認した。

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。昨年度に既存の PCR 法のうち比較的優れる方法が明らかになったが、今年度の検討では特異性など十分ではないことが明らかになり、今年度開発したリアルタ

イム PCR の有用性が高いと考えられた。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。腸管出血性大腸菌の食品での検査法については、今後、見直しが必要であることが判明した。

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では一部の *astA* 保有大腸菌は検出されない、またはバンドが薄く検出性が低いことが本研究にて示された。一方、*Klebsiella* 属細菌や *Morganella* 属細菌の一部も既報の *astA* 特異的遺伝子検出法のいずれかでは陽性となることが示されたため、*astA* 保有大腸菌特異的な遺伝子検出法の開発が重要と考えられた。

[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

本研究にて開発した Assay 11r では、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 および *K. pneumoniae* および *K. oxytoca* が保有する *astA* が増幅されないことが示された。一方、*M. morganii* は、Assay 11r にて *astA* が増幅さ

れるも IC は増幅されなかったため、Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅される場合を *astA* 保有大腸菌陽性と判定することが適していると考えられた。感度試験では、菌株のみを用いた場合と食品を用いた場合の両方で検出限界が $< 2.6 \log \text{CFU/mL}$ であるため検出性に優れることが示され、かつ、検量線の近似曲線は、 $R^2 > 0.98$ と高い直線性を示すことため、定量性にも優れることが示された。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

モヤシからの *astA* 保有大腸菌の検出には、mEC および CHSTEC あるいは C-CHSTEC の組み合わせが適していると考えられた。選択分離培地への選択剤として、セフィキシムおよびセフスロジン添加培地を検討したが、今回試験したモヤシではこれら薬剤の顕著な有用性は認められなかった。リアルタイム PCR での推定菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映した菌数を示し、*astA* 保有大腸菌の分離のためには、増菌培養液中に $\log 8 \text{CFU/mL}$ 程度の菌数が必要と示唆された。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の 0 抗原遺伝子型構成が異なっていたこと

から、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株が存在することが示唆された。そのため、食中毒事例の原因物質調査において *astA* 保有大腸菌を疑う場合は、増菌培地として mEC および NmEC を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手困難となっている現状が明らかとなった。また、通知法では遺伝子検出法の検出限界を $4 \log \text{CFU/mL}$ 以上と示されている。今後は、現状販売されているリアルタイム PCR 法の後継機器を用いて、各種遺伝子検出法の検出限界が定められた値を満たしているかを確認する必要があると思われた。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において *astA* 保有大腸菌を特異的に検出するためには、本研究にて検討した既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では特異性が低いことが示された。そこで、大腸菌が保有する配列上完全な *astA* バリエーションタイプを特異的

に増幅するリアルタイム PCR 法を開発した。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用には有用と考えられた。

また、*astA* 保有大腸菌の増菌培地として mEC および NmEC が有用であることが示唆された。一部の食品では、NmEC よりも mEC が望ましいが、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株の存在が示唆されたことから、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、mEC および NmEC を併用することで *astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

さらに、腸管出血性大腸菌の本研究にて、通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手できない状況にあるため、食品衛生検査の現場での活用性を向上すべく、現状に即した通知法改定案を作成する必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Konishi, N., Sato, M., Suzumura, K., Obata, H., Otsuka, K., Doi, R., Goto, K., Kai, A., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Growth and survival of *Escherichia albertii* in food and environmental water at various temperature. *Journal of food protection* 87(4), 100249, 2024.

Arai, S., Hirose, S., Yanagimoto, K., Kojima, Y., Yamaya, S., Yamanaka, T., Matsunaga, N., Kobayashi, A., Takahashi, N., Konno, T., Tokoi, Y., Sakakida, N., Konishi, N., and Hara-Kudo, Y. An interlaboratory study on the detection method for *Escherichia albertii* in food using real time PCR assay and selective agars. *International Journal of Food Microbiology* 414, 110616, 2024.

新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子。食品およ

び環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析. 日本食品微生物学会雑誌 印刷中.

(学会等発表)

工藤由起子. *Escherichia albertii* の汚染状況及び検査法について. シンポジウム III *E. albertii* を含めた病原大腸菌による食中毒の発生と検査体制. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 令和 5 年 7 月 6 日. 岐阜

Hara-Kudo, Y., Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T. Emerging foodborne diseases with *Escherichia albertii* and the detection methods. 55th UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES 令和 5 年 8 月 6-11 日. カリフォルニア

新井沙倉, 廣瀬昌平, 池田伸代, 門口真由美, 有川衣美, 溝腰朗人, 新免香織, 横山孝治, 土井りえ, 齊木大, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品における *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21-22 日. 大阪
廣瀬昌平, 新井沙倉, 山谷聡子, 貫

洞里美, 齊木大, 曾根美紀, 荒木靖也, 土井りえ, 尾畑浩魅, 土屋彰彦, 小嶋由香, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品中の *astA* 保有大腸菌の効率的な増菌および分離培養法の検討. 第 166 回日本獣医学会学術集会. 令和 5 年 9 月 5-18 日. 大阪

曾根美紀, 尾畑浩魅, 山谷聡子, 貫洞里美, 荒木靖也, 土屋彰彦, 小西典子, 土井りえ, 小嶋由香, 廣瀬昌平, 新井沙倉, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌自然汚染食品での増菌および分離培養法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21-22 日. 大阪

荒木靖也, 新井沙倉, 小西典子, 土井りえ, 山谷聡子, 土屋彰彦, 小嶋由香, 尾畑浩魅, 貫洞里美, 曾根美紀, 廣瀬昌平, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌接種食品での増菌および分離培養法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21 日. 大阪

新井沙倉, 溝腰朗人, 佐伯美由紀, 木全恵子, 柳本恵太, 原田誠也, 山谷聡子, 土屋彰彦, 床井由紀, 福留智子, 長岡宏美, 山田香織, 濱夏樹, 山中拓哉, 小西典子, 土井りえ, 廣瀬昌平, 工藤由起子.

食品および環境等における
Escherichia albertii の汚染実
態調査．第119回日本食品衛生学
会学術講演会．令和5年10月12
日．東京

貫洞里美，尾畑浩魅，荒木靖也，曾
根美紀，山谷聡子，土井りえ，小
西典子，小嶋由香，土屋彰彦，新
井沙倉，廣瀬昌平，大西貴弘，工
藤由起子．食品からの *astA* 保有
大腸菌分離のための培養法の検
討．第119回日本食品衛生学会学
術講演会．令和5年10月12日．
東京

山谷聡子，廣瀬昌平，小西典子，土
屋彰彦，小嶋由香，土井りえ，尾
畑浩魅，曾根美紀，荒木靖也，貫
洞里美，新井沙倉，大西貴弘，工
藤由起子．*astA* 保有大腸菌の食
品からの分離方法の検討および
分離株の解析．第119回日本食品
衛生学会学術講演会．令和5年
10月12日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

令和 5 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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 保有細菌の性状等の解析

研究要旨

集団食中毒事例や散発下痢症等の多様な由来の *astA* 保有大腸菌が保有する *astA* のバリエーションタイプを解析した。その結果、少なくとも 13 タイプの多様なバリエーションタイプを保有していることが明らかとなった。次に、複数の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を用いて *astA* 保有大腸菌の検出性を検討した。その結果、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の一部では、大腸菌が保有する *astA* バリエーションの一部のタイプが検出されないことが示された。なお、*astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌についても同様に試験したところ、本研究にて *Klebsiella* 属細菌や *Morganella* 属細菌も検出されることが示された。そのため、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法は、本研究では特異性が低いと考えられた。今後は、特異性が高く、コンベンショナル PCR 法よりも検出感度が優れる *astA* 特異的リアルタイム PCR 法などが有用と考えられた。また、*astA* 保有大腸菌の選択分離培地について、複数の添加剤を用いて検討したところ、*astA* 保有大腸菌の生育が良好な複数の選択分離培地が選定された。今後、食品中の *astA* 保有大腸菌の検出に本選択分離培地が有効であるかを食品を用いてさらに検討予定である。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、貫洞里美

鹿児島大学

大岡唯祐

国立医薬品食品衛生研究所

大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

食品からの病原微生物の検出を目的とした培養において、食品由来微生物の増殖によって食中毒細菌の増殖が抑制され、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ため、検出が困難である。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、集団食中毒事例などの多様な由来の *astA* 保有大腸菌等細菌について保有する *astA* の遺伝子多型（バリエーション）タイプを 35 タイプの全バリエーション（詳細略、Personal communication）の中から特定し、既報の *astA* 特異的遺伝子検出法での検出性を調査することを目的とした。また、より効率の良い分離培養法の検討のために、添加剤を加えた選択分離培地の有用性についても検討することを目的とした。

B. 研究方法

[1] 菌株を分離した地方自治体において、菌種未同定の *astA* 保有細菌の菌種同定

(1) 供試菌株

菌株を分離した地方自治体にお

いて、菌種未同定の散発下痢症 24 事例由来株 24 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 50 事例由来株 50 株、無症状保菌者由来株 6 株およびの *Escherichia coli* NBRC3972 の合 81 株を供試した。

(2) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による菌種同定

菌株を標準寒天培地に画線後、37°C で 24±2 時間培養した。生育した *E. coli* NBRC3972 コロニーを校正用に供試した。菌種同定のためのマトリックス剤は、トリフルオロ酢酸、アセトニトリル、エタノール、蒸留水を 3 : 33 : 33 : 31 の割合で混合した溶媒に α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (CHCA、富士フィルム和光純薬株式会社) を 10 mg/mL の割合で溶解し、調製した。選定したコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、分析用のサンプルプレートのウェルに塗布した。コロニーを塗布したウェルにマトリックス剤 1 μ L を滴下し、数回ピペッティングし、クリーンベンチ内で風乾した。校正用の *E. coli* NBRC3972 は、マトリックス剤の量を 0.5 μ L に変更

し、同様に実施した。プレート上の試料が十分に乾燥したことを確認し、MALDI-TOF MS AXIMA®シリーズ Assurance (株式会社島津製作所) と AXIMA®微生物同定システム SARAMIS™ (株式会社島津製作所) を用いて菌種を同定した。

[2] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプの特異性と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例 12 事例由来株 120 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症 39 事例由来株 41 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 32 事例由来株 46 株および無症状保菌者由来株 6 株の合計 213 株を供試した。なお、この 213 株には、[1]

(2) において大腸菌であることが確認された菌株を含む。

(2) DNA 溶液の調製

菌株を tryptone soya broth (TSB) 中で 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 を抽出した。

(3) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

シーケンス用プライマー (Yamamoto et al., Infect.

Immun. 1996, 64:4) (表 1) にて PCR 反応による増幅を行った。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 μM 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。

(4) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

4 つの *astA* 特異的コンベンシヨ

ナル PCR 法 (Ito らの PCR 法 : Ito et al., Microbiol. Immunol. 2014, 58:8、Muller らの PCR 法 : Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73:10、Yamamoto らの PCR 法 : Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 1996, 64:4 および Yatsuyanagi らの PCR 法 : Yatsuyanagi et al., JCM 2002, 40:1) を参照した *astA* 特異的プライマーセットを用いてコンベンショナル PCR 法を実施した (表 1)。なお、Muller らの PCR 法では、*astA* を含む多様な病原因子を検出対象としていた。コンベンショナル PCR 試薬には、Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) を用いた。機器は ProFlex PCR System (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。反応条件は、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。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。PCR 産物の有無とその濃さを判定し、Muller らの方法では、検出された各種遺伝子特異的 PCR 産物のバンドサイズから保有する病原遺伝子について判定した。

[3] *astA* 保有大腸菌以外の *astA*

保有細菌種における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 供試菌株

[1] (2) で同定した結果大腸菌ではない *astA* 保有細菌合計 5 株を供試した。その詳細は、散発下痢症 1 事例の患者由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 4 事例由来株 4 株 (無症状保菌者からの分離株、2016 年に患者から分離された株、2018 年に患者から分離された株 および 2018 年にスワブから分離された株) である。

(2) DNA 溶液の調製

上記 B. 研究方法 [2] (2) と同様に実施した。

(3) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

上記 B. 研究方法 [2] (3) と同様に実施した。

(4) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

上記 B. 研究方法 [2] (4) と同様に実施した。

[4] *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプおよびコンベンショナル PCR プライマーの配列の比較

B. 研究方法 [2] (4) にて *astA*

特異的コンベンショナル PCR 法のバンドが薄かった株について、その株が保有する *astA* バリエーションタイプを B. 研究方法 [2] (3) の結果から抽出した。当該バリエーションについて、各種 PCR 法のプライマー配列と遺伝子配列を比較し、PCR 法での検出性に影響を与える原因を推定した。

[5] *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株の中から異なる事例由来の *astA* 保有大腸菌 16 株を供試した。

(2) 各種選択分離培地の検討

菌株を TSB 中で 37°C にて 18 時間培養した。この TSB 培養液を、クロモアガー STEC 培地 (クロモアガー社製造、関東化学販売) およびクロモアガー STEC 培地に添付の添加剤は使用しないクロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC)、32 mg/L アンピシリン添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、20 mg/L セフトジディム添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC、0.05 mg セフィキシムおよび 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジンおよび 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、

0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン並びに 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC に画線し、37°C にて 22 時間培養した。

C. 研究結果

[1] 菌株を分離した地方自治体において、菌種未同定の *astA* 保有細菌の菌種同定

供試した散発下痢症由来株 24 株のうち 23 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 50 株のうち 46 株および無症状保菌者由来株 6 株は *E. coli* と同定された。散発下痢症由来株の 1 株は *Morganella morganii*、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 4 株のうち 1 株は *Klebsiella pneumoniae* と同定され、他 3 株は、AXIMA に備え付けられているデータセットとの一致率が低いものの、最も一致率が高い (80~86%) 菌種としては、*Klebsiella oxytoca* であった。

[2] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 120 株において、以下の少なくとも 4 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 5 株、v17 保有株は 21 株、v23 保有株は 10 株、v27 保有株は 2 株および複数のバリエーションタイプを保有する株が 82 株であった。*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 41 株において、以下の少なくとも 5 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 16 株、v6 保有株は 6 株、v12 保有株は 2 株、v27 保有株は 3 株、v31 保有株は 1 株、PCR プライマーにて増幅しなかった株が 4 株、複数のバリエーションタイプを保有する株が 6 株およびこれまでの報告にはない新たなバリエーションタイプが 4 株であった。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株において、以下の少なくとも 11 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 7 株、v6 保有株は 6 株、v7 保有株は 2 株、v8 保有株は 1 株、v12 保有株は 6 株、v14 保有株は 2 株、v23 保有株は 2 株、v27 保有株は 2 株、v29 保有株は 5 株、v34 保有株は 2 株、v35 保有株は 1 株、複数の

バリエーションタイプを保有する株が 3 株およびこれまでの報告にはない新たなバリエーションタイプが 6 株であった。無症状保菌者由来株 6 株において、以下の少なくとも 3 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 4 株、v6 保有株は 1 株、v35 保有株は 1 株であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

各種コンベンショナル 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。集団食中毒事例由来株 120 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法いずれも 120 株とも *astA* 陽性であったが、内 1 株は Yamamoto らの PCR 法では、バンドが薄かった(表 2)。散発下痢症由来株 41 株は、試験した 4 種類のコンベンショナル PCR 法のいずれも *astA* 陽性であったが、内 2 株は Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であったが、Yamamoto らの PCR 法では 2 株はバンドが薄か

った。無症状保菌者由来株 6 株は、いずれも試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であった。

なお、Muller らの PCR 法にて検出される多様な病原因子については、*astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 2 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 2 株は *astA* に加えて *pic* も陽性であった。また、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 2 株は、*astA* に加えて *pic* および *aggR* も陽性であった。その他 206 株については、Muller らの PCR 法に含まれる病原因子のうち *astA* のみ陽性であった。

[3] *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

散発下痢症患者由来の *M. morganii* は、複数のバリエーションタイプを保有していた。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症にて無症状保菌者から分離さ

れた *K. pneumoniae* は、PCR プライマーにて増幅されず、2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* の 1 株は、複数のバリエーションタイプを保有し、2016 年に患者から分離された *K. oxytoca* および 2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* の 2 株は、これまでの報告にはない新たなバリエーションタイプを保有していた。

(2) *astA* 保有細菌の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

2016 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株は、Ito らの PCR 法、Yamamoto らの PCR 法および Yatsuyanagi らの PCR 法にて *astA* 陽性および Muller らの PCR 法にて陰性であった (表 3)。2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株は、Ito らの PCR 法および Muller らの PCR 法にて *astA* 陽性、Yatsuyanagi らの PCR 法にて陽性もバンドが薄く、Yamamoto らの PCR 法にて陰性であった。2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* 1 株は、4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であったが Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった。*K. pneumoniae* の 1 株は、Ito らの PCR

法にて *astA* 陽性、Yatsuyanagi らの PCR 法にて陽性もバンドが薄く、Muller らの PCR 法および Yamamoto らの PCR 法では陰性であった。*M. morganii* の 1 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であった。

[4] *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプおよびコンベンショナル PCR プライマーの配列の比較

Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 2 株および *astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 2 株は、いずれも v27 を保有しており、その配列と Yamamoto のプライマーとを比較したところ、フォワードプライマーに 2 bp のミスマッチが存在した (表 4)。

[5] *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

クロモアガー STEC 培地に付属の添加剤を加えた培地では、コロニーの発育が抑制された (表 5)。一方、添加剤を加えない CHSTEC では、供試した 16 株中 14 株が藤色のコロニーを形成し、1 株は白色

コロニーを形成し、1 株はやや藤色の白色コロニーを形成した。アンピシリン添加 CHSTEC では、19% の株がコロニーを形成せず、セフトジディム添加 CHSTEC では、75% の株がコロニーを形成しなかった。セフィキシムおよび薬剤 C 添加 CHSTEC、セフスロジンおよび薬剤 C 添加 CHSTEC、セフィキシムおよびセフスロジン並びに薬剤 C 添加 CHSTEC では、いずれの株もコロニーを形成したものの、81% の株は微小なコロニーを形成した。セフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC およびセフィキシムおよびセフスロジン添加 CHSTEC では、いずれの株もコロニーを形成し、CHSTEC と同様のコロニー色を示した。

D. 考察

本研究によって、*astA* 保有大腸菌は少なくとも 13 種類の多様な *astA* バリエーションタイプを保有しており、1 株の中に複数種類のバリエーションタイプを保有する株も存在することが示された。さらに、*astA* 保有大腸菌が保有する *astA* バリエーションには少なくとも 35 タイプあるが、一部の *astA* 保有大腸菌は既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では検出されない、またはバン

ドが薄く検出性が低いことが本研究にて示された。一方、*astA* 保有大腸菌以外の細菌に着目すると、本研究によって、*Klebsiella* 属細菌や *Morganella* 属細菌の一部も既報の *astA* 特異的遺伝子検出法のいずれかでは陽性となることが示された。そのため、*astA* 保有大腸菌を標的とした試験では、分離培地上に形成された大腸菌様コロニーについて、TSI や LIM 培地などを用いて大腸菌の基本的な生化学性状を確認することが必要と考えられた。なお、*Klebsiella* 属細菌と同定または推定された 4 株については、本研究事業の R3 年度分担研究報告書 1 (3)「*astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立に関する研究」にて、CHSTEC 培地上に青色コロニーを形成した 4 株と同一であった。食品中には *Klebsiella* 属細菌も含めた多様な夾雑菌が存在しているものの、過去に食中毒の原因として報告された *astA* 保有細菌は大腸菌のみである。そのため、*astA* 保有大腸菌特異的な遺伝子検出法の開発が重要と考えられた。

また、多様な添加剤を用いて *astA* 保有大腸菌特異的分離培地について検討したところ、セフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC およびセフィキシムおよ

びセフスロジン添加 CHSTEC の 3 種類の分離培地では *astA* 保有大腸菌のコロニーが十分に発育し、発色性も添加剤なしの培地と同様であった。今後、食品検体を用いて、これら分離培地の有用性について検討する必要があると考えられた。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において *astA* 保有大腸菌を特異的に検出するためには、本研究にて検討した既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では特異性が低いため、*astA* 保有大腸菌が保有する *astA* 特異的遺伝子検出法を検討する必要があると考えられた。また、菌株を用いた試験において、*astA* 保有大腸菌の培養に適した選択分離培地が選定された。今後、食品中の *astA* 保有大腸菌の検出に有用かの検討を食品を用いて実施予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Hirose, S.,
Yanagimoto, K., Kojima, Y.,
Yamaya, S., Yamanaka, T.,

Matsunaga, N., Kobayashi, A., Takahashi, N., Konno, T., Tokoi, Y., Sakakida, N., Konishi, N., and Hara-Kudo, Y. An interlaboratory study on the detection method for *Escherichia albertii* in food using real time PCR assay and selective agars. International Journal of Food Microbiology 414, 110616, 2024.

(学会等発表)

Hara-Kudo, Y., Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T. Emerging foodborne diseases with *Escherichia albertii* and the detection methods. 55th UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES 令和 5 年 8 月 6-11 日.
カリフォルニア

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

表1. 本試験にて試験した PCR 法

反応系	標的 遺伝子	プライマー	産物 (bp)	引用
<i>astA</i> 配列のシーケ	<i>astA</i>	EAST13a: AGAACTGCTGGGTATGTGGCT	281	Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 64(4):1441-1445, 1996
		EAST12b: CTGCTGGCCTGCCTCTTCCGT		
<i>astA</i> 特異的コン ベンショナルPCR 法	<i>astA</i>	EASTOSI: GCCATCAACACAGTATATCCG	109	Ito et al., Microbiol. Immunol.58(8):467-473, 2014
		EASTOAS2: CGCGAGTGACGGCTTTGTAG	102	Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(10):3380-3390, 2007
		MP2-astA-F: TGCCATCAACACAGTATATCCG		
		MP2-astA-R: ACGGCTTTGTAGTCTTCCAT	111	Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 64(4):1441-1445, 1996
		EAST11-a: CCATCAACACAGTATATCCGA		
		EAST11-b: GGTGCGAGTGACGGCTTTGT		
		EAST-1S: GCCATCAACACAGTATATCC	106	Yatsuyanagi et al., JCM 40(1): 294-297, 2002
EAST_AS: GAGTGACGGCTTTGTAGTCC				
各種病原因子特異 的Multiplex PCR 法	<i>escV</i>	MP3-escV-F: ATTCTGGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG	544	Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(10):3380-3390, 2007
		MP3-escV-R: CGTCCCCTTTTACAACATTCATCGC		
	<i>bfpB</i>	MP3-bfpB-F: GACACCTCATTGCTGAAGTCG	910	
	MP3-bfpB-R: CCAGAACACCTCCGTTATGC			
	<i>stx1</i>	MP4-stx1A-F: CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	244	
	MP4-stx1A-R: AATGCCACGCTTCCCAGAATTG			
	<i>stx2</i>	MP3-stx2A-F: GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG	324	
	MP3-stx2A-R: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC			
	<i>elt</i>	MP2-LT-F: GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG	655	
	MP2-LT-R: CTTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC			
	<i>estIa</i>	MP4-STIa-F: CCTCTTTTAGYCACARCTGAATCASTTG	157	
	MP4-STIa-R: CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG			
	<i>estIb</i>	MP2-STI-F: TGTCTTTTTCACCTTTCGCTC	171	
	MP2-STI-R: CGGTACAAGCAGGATTACAACAC			
	<i>invE</i>	MP2-invE-F: CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG	766	
	MP2-invE-R: CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC			
	<i>aggR</i>	MP2-aggR-F: ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	400	
MP2-aggR-R: AATACAGAATCGTCAGCATCAGC				
<i>pic</i>	MP2-pic-F: AGCCGTTTCCGCGAGAAGCC	1,111		
MP2-pic-R: AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG				
<i>uidA</i>	MP2-uidA-F: ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1,487		
MP2-uidA-R: AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG				

表2. 各種 *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での *astA* 保有大腸菌の検出

由来	株数	PCR陽性株数 (バンドが薄い株数)			
		Ito	Muller	Yamamoto	Yatsuyanagi
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となった 集団食中毒事例由来株	120	120	120	120 ■ (1)	120
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される 散発下痢症由来株	41	41	41	41 ■ (2)	41
その他の病原体による 集団食中毒事例由来株	46	46	46	46 (2)	46
無症状保菌者	6	6	6	6	6
合計	213	213	213	213 (5)	213

表 3. 各種 *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での各種 *astA* 保有細菌の検出

細菌種	由来	PCR陽性株数（バンドが薄い株数）			
		Ito	Muller	Yamamoto	Yatsuyanagi
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	2016年に患者から分離	1	0	1	1
	2018年に患者から分離	1	1	0	1 (1)
	2018年にスワブから分離	1	1	1 (1)	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無症状保菌者	1	0	0	1 (1)
<i>Morganella morganii</i>	患者	1	1	1	1

*MALDI-TOF MSでの*K. oxytoca*との一致率が80~86%であった。

表 4. Yamamoto らの PCR 法にて v27 の検出性が低い大腸菌株の理由について

由来	分離	検出が悪い理由
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となつた集団食中毒事例由来株	2020年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
	<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される散発事例由来株	2018年に患者から分離
		2020年に患者から分離
その他の病原体による集団食中毒事例由来株	2017年に無症状保菌者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
	2018年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり

表 5. 集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌代表株の各種添加剤加選択分離培地での生育

血清型	菌株	クロモアガー	クSTEC	アンピシリン	セフィキシム	セフトラジディム	セフトロジン	セフィキシム	セフトロジン	セフィキシム	セフィキシム										
		STEC	基礎培地	添加クSTEC	添加クSTEC	添加クSTEC	添加クSTEC	および 薬剤C	および 薬剤C	および 薬剤C	および セフトロジン 添加クSTEC										
		生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色										
O166:H15	AST240	—	—	+++	藤	+	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白
O166:H15	AST20	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
O99:H33	AST46	—	—	+++	白	+++	薄藤入り白	+++	白	—	—	+++	白								
O6:H10	AST198	+	茶灰色	+++	薄藤入り白	++	藤	+++	薄藤入り白	—	—	+++	薄藤入り白	++	白	++	白	++	白	++	白
O166:H15	AST73	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	++	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
O55:H32	AST81	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤								
OgGp9:H18	AST262	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
O1:H45	AST85	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	++	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
O166:H15	AST208	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤								
O7:H4	AST205	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白
O166:H15	AST204	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白	++	藤
O7:H4	AST19	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
	AST276	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
O169:H45	AST215	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤
OgGp7:H6	ATT216	±	紫灰色	+++	藤	+	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	++	藤
OgGp9:H18	AST217	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	++	藤

CHSTEC: クロモアガー-STEC基礎培地、+: 通常のコロニー生育、±: 微小コロニー、-: コロニー生育なし

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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

これまでに示されている *astA* の 35 の遺伝子多型 (バリエント) の中でも、配列上完全な *astA* 遺伝子のバリエントタイプを特異的に増幅するリアルタイム PCR 法の開発を検討した。複数設計したプライマーおよびプローブ候補の中からより検出性に優れる候補を選定し、特異性を試験した。その結果、開発したリアルタイム PCR 法は、配列上不完全な *astA* バリエントタイプ保有大腸菌株や大腸菌以外の細菌種は増幅しないことが示された。また、複数の *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株を用いて検討した感度試験では、菌株のみ供試した場合と食品培養液も併せて供試した場合の両試験において、検出感度が優れることが示された。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に増幅する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌による汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用が有用と考えられた。そのため、今後の食中毒事例発生時における本リアルタイム PCR 法の活用が期待されると考えられた。

研究協力者

鹿児島大学

大岡唯祐

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 (バリエント) タイプが報告されている (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、今回対象とした 35 タイプの全バリエントの中には開始コドンの変異や *astA* 配列中への終始コドンの挿入などによって配列上不完全な *astA* バリエントも存在することが示されている (詳細略、Personal communication)。また、昨年度までの本研究において、日本の集団食中毒事例由来株は多様なバリエントタイプを保有していることが示された。さらに、昨年度の報告では、配列上不完全な *astA* バリエントタイプとして v22 のみが報告されていたが、その後、v7、v15 および v33 についても同様に配列上不完全であることが予想されると分担研究者の大岡から指摘

された。そこで本研究では、v7、v15、v22 および v33 以外の配列上完全な *astA* バリエントタイプを特異的に検出するリアルタイム PCR 法を開発することを目的とした。なお、本研究では、予備試験にて各種 Assay の検出性に差が認められることが予想された配列上完全な *astA* バリエントタイプである v29 および v34 を保有する *astA* 保有大腸菌株を活用した。

B. 研究方法

[1] プローブ候補の設計

昨年度作製した v22 以外の *astA* バリエント特異的なプライマーおよびプローブセット候補 (Assay 7、Assay 8、Assay 10 および Assay 11) 4 種類を基本として、v7、v15 および v33 の配列を非検出にするためにプローブの配列を修正した。なお、新しいプローブを用いた配列上完全な *astA* バリエントタイプを検出対象するリアルタイム PCR 法候補を以下 Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r とした。

[2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立 (1) 「*astA* 保

有大腸菌の性状等の解析」において、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 を保有すると特定された *astA* 保有大腸菌および予備試験にて各種 Assay の検出性に差が認められることが予想された配列上完全な *astA* バリエーションタイプである v29 および v34 を保有すると特定された *astA* 保有大腸菌の合計 7 株を供試した。

(2) リアルタイム PCR 法

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r について、それぞれに特異的なプライマーおよびプローブを用いて以下の分量にて反応試薬を調製した。2×TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 15 μL、10 μM フォワードプライマー 0.9 μL、10 μM リバープライマー 0.9 μL、菌株の熱抽出 DNA 溶液 5 μL、滅菌蒸留水 7.3 μL の合計 30 μL とした。機器は QuantStudio 3 または QuantStudio 5 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。50°C 2 分および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 40 サイクル増幅反応させた。検討した 4 つの Assay のうち増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を以降の検討に用

いた。

[3] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における Assay 11r での検出

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立「*astA* 保有大腸菌の性状等の解析」において、大腸菌と同定され、保有する *astA* バリエーションが特定された *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例 12 事例由来株 120 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症 39 事例由来株 41 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 32 事例由来株 46 株および無症状保菌者由来株 6 株の合計 213 株を供試した。

(2) リアルタイム PCR 法

菌株の熱抽出 DNA を B. 研究方法 [2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定にて検討し決定した Assay 11r に供試した。前述の B. 研究方法 [2] (2) と同様の試薬組成に加え、既存の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーおよびプローブ (Fratamico et al., Foodborne Pathog. Dis. 2011, 8) をインターナルコントロール (IC) として加えた Duplex の方法にて試験した。なお、[2] (2) と同様の機器および反応温度条件

にて試験した。Ct 値が得られた場合を陽性と判定した。また、陰性の結果が得られた場合には、その株の保有する *astA* バリエーションタイプを考察した。

[4] *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における Assay 11r の検出

(1) 供試菌株

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立「*astA* 保有大腸菌の性状等の解析」において、大腸菌以外の細菌種と同定された *astA* 保有細菌合計 5 株を供試した。その詳細は、散発下痢症 1 事例の患者由来 *Morganella morganii* 1 株、無症状保菌者由来 *Klebsiella pneumoniae* 1 株、2016 年に患者から分離された *Klebsiella oxytoca* 1 株、2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株および 2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* 1 株である。

(2) リアルタイム PCR 法

上記 B. 研究方法 [3] (2) と同様に実施した。

[5] *astA* 保有大腸菌の菌液を用いた Assay 11r の感度試験

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌集団食中毒事例由来の本菌 4 株 (AST19、AST46、

AST73 および AST198) を供試した。なお、昨年度の本研究の遺伝子解析によって、*astA* バリエーション保有コピー数は AST19 および AST46 では 2 コピー、AST73 では 5 コピー および AST198 では 1 コピーであることが明らかになっている。

(2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存された菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を tryptone soya broth (TSB) 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。この菌培養液 1 mL を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌リン酸緩衝食塩水 (滅菌 PBS) 1 mL を加え、混和した溶液を原液とした。それを滅菌 PBS にて 10^{-1} から 10^{-8} まで 10 倍階段希釈し、 10^{-1} から 10^{-8} の希釈溶液 (想定 8~0 log CFU/mL) の各 100 μ L を以下に示すアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100 μ L を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、10,000 \times g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。抽出 DNA を下記 PCR 法のテンプレートとした。

(3) リアルタイム PCR

前述の B. 研究方法 [3] (2) と

同様に Assay 11r を実施した。各 DNA につき 3 反応実施し、3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子が増幅された最も菌数が少ない段階を検出限界とした。

[6] 食品培養液を用いた Assay 11r の感度試験

(1) 供試菌株

前述の B. 研究方法 [4] (1) と同様に *astA* 保有大腸菌 AST19、AST46、AST73 および AST198 の 4 株を供試した。

(2) 食品検体

各 1 検体の市販の国産豚肉スライス、輸入冷凍むきエビおよび国産ベビーコーンを供試した。

(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 $^{\circ}$ C にて 18 時間培養した。また、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 $^{\circ}$ 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、菌接種食品培養液 (想定 8 \sim 1 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。この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) リアルタイム PCR

前述の B. 研究方法 [3] (2) と同様に Assay 11r を実施した。各 DNA につき 3 反応実施し、3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子が増幅された最も菌数が少ない段階を検出限界とした。

C. 研究結果

[1] プローブ候補の設計

V7、v15、v22 および v33 以外の *astA* バリエーションタイプに共通する遺伝子配列を確認し検討したところ、一部の配列を混合塩基とするプローブを設計した。(表 1)。

[2] v7、v29 および v34 保有株における特異性試験と Assay の選定

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r のいずれにおいても、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 保有株は陰性であった。一方、Assay 8r および Assay 11r では、供試した株のうち v29 保有株および v34 保有株の 6 株では、同程度の Ct 値 (17.4-20.6) を示したが、Assay 7r および Assay 10r では、v29 保有株の Ct 値 (28.1-30.7) と v34 保有株の Ct 値 (16.4-17.1) とに大きな差が認められた (図 1) ため、Assay 7r および Assay 10r に

における配列上完全な *astA* バリエーションタイプの検出性が劣ると考えられた。Assay 8r はフォワードプライマーおよびプローブを新規に設計したが、リバースプライマーには過去に報告がある既存の配列を活用していたものである。一方、Assay 11r は、フォワードプライマー、リバースプライマーおよびプローブのいずれも新規に設計したものであったため、新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。

[3] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における Assay 11r での検出

集団食中毒事例由来株 120 株、散発下痢症由来株 41 株、および無症状保菌者由来株 6 株のいずれも Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅された(表 2)。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株のうち 44 株は *astA* および IC の両方が増幅され、他 2 株は IC が増幅されるも *astA* が増幅されなかった。これら 2 株の保有する *astA* バリエーションタイプは v7 であった。

[4] *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における Assay 11r での検出

K. pneumoniae 1 株および *K. oxytoca* 3 株はいずれも IC が増

幅されるも *astA* が増幅されなかった(表 3)。また、*M. morgani* は、*astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった。

[5] *astA* 保有大腸菌の菌液を用いた Assay 11r の感度試験

astA を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.9 \log$ CFU/mL (=0.4 CFU/PCR tube) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9994$ を示した(図 2)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $2.2 \log$ CFU/mL (=0.7 CFU/PCR tube) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9972$ を示した(図 2)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.4 \log$ CFU/mL (=0.1 CFU/PCR tube) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9915$ を示した(図 2)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、最も菌濃度が低い希釈段である $1.6 \log$ CFU/mL (=0.2 CFU/PCR tube) にお

いて 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 4)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9975$ を示した(図 2)。

[6] 食品培養液を用いた Assay 11r の感度試験

豚肉の培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.9 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.4 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9956$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.1 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9853$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.5 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.2 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9975$ を示した(図 3)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株

AST198 を供試した場合、豚肉培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{CFU/mL}$ ($=1.9 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9981$ を示した(図 3)。

エビの培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.0 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9952$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.1 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.1 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9891$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.5 \log \text{CFU/mL}$ ($=0.2 \text{CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9906$ を示した(図 3)。さら

に、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、エビ培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{ CFU/mL}$ ($=1.9 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9861$ を示した(図 3)。

ベビーコーンの培養液を用いて検討したところ、*astA* を 2 コピー保有する菌株 AST19 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $0.9 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.04 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9902$ を示した(図 3)。同じく *astA* を 2 コピー保有する菌株 AST46 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.8 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.3 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9944$ を示した(図 3)。また、*astA* を 5 コピー保有する菌株 AST73 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $1.0 \log \text{ CFU/mL}$ ($=0.05 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の

近似曲線は、 $R^2=0.9905$ を示した(図 3)。さらに、*astA* を 1 コピー保有する菌株 AST198 を供試した場合、ベビーコーン培養液中で最も菌濃度が低い希釈段である $2.6 \log \text{ CFU/mL}$ ($=1.9 \text{ CFU/PCR tube}$) において 3 反応中 3 反応で *astA* 遺伝子を増幅し(表 5)、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.9865$ を示した(図 3)。

D. 考察

本研究にて開発した Assay 11r では、配列上不完全な *astA* バリエントタイプである v7 を保有する大腸菌株は増幅されないことが示された。また、大腸菌以外の *astA* 保有細菌のうち、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* についても、Assay 11r において *astA* は増幅されないことが示された。一方、*M. morgani* は、Assay 11r の *astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった結果であったが、IC として採用した 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーおよびプローブは、大腸菌を検出する目的で開発されていた。そのため、Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅される場合を *astA* 保有大腸菌陽性と判定することが適していると考えられた。本研究にて開発したリアルタイム

PCR 法は、*astA* のうち大腸菌保有の配列上完全な *astA* バリエーション特異的な増幅が可能であることが示唆された。今後、本研究の供試菌株が保有しなかった種類の *astA* バリエーションタイプについて、その配列を合成し、特異性試験によって検出性を検討する必要があると考えられた。

また、保有する *astA* バリエーションタイプの種類やコピー数が異なる 4 株の *astA* 保有大腸菌を用いた感度試験では、検出限界が 2.2 log CFU/mL 以下といずれの株でも検出性に優れることが示された。また、増幅曲線の近似式がいずれも $R^2=0.99$ を示しており、高い直線性を示すことから、定量性にも優れることが示された。*astA* 保有大腸菌 4 菌株および 3 種類の食品の増菌培養液を用いて感度を検討したところ、いずれの食品および菌株でも検出限界が 2.6 log CFU/mL 以下であり検出性に優れることが示された。また、増幅曲線の近似式がいずれも R^2 が 0.98 以上を示しており、高い直線性を示すことから、食品培養液を用いた場合でも定量性にも優れることが示された。そのため、開発した *astA* 特異的リアルタイム PCR 法は、食品培養液中の *astA* 保有大腸菌を優れた感度で

増幅することが示された。

E. 結論

大腸菌が保有する配列上完全な *astA* バリエーションタイプを特異的に増幅するリアルタイム PCR 法を開発した。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用にも有用と考えられた。そのため、今後の食中毒事例発生時における本リアルタイム PCR 法の活用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品および環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析. 日本食品微生物学

会雑誌 印刷中

(学会等発表)

新井沙倉，廣瀬昌平，池田伸代，門口真由美，有川衣美，溝腰朗人，新免香織，横山孝治，土井りえ，齊木大，大西貴弘，工藤由起子．食品における *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討．第 44 回日本食品微生物学会学術総会．令和 5 年 9 月 21-22 日．大阪

新井沙倉，溝腰朗人，佐伯美由紀，木全恵子，柳本恵太，原田誠也，山谷聡子，土屋彰彦，床井由紀，福留智子，長岡宏美，山田香織，濱夏樹，山中拓哉，小西典子，土井りえ，廣瀬昌平，工藤由起子．食品および環境等における *Escherichia albertii* の汚染実態調査．第 119 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 5 年 10 月 12 日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

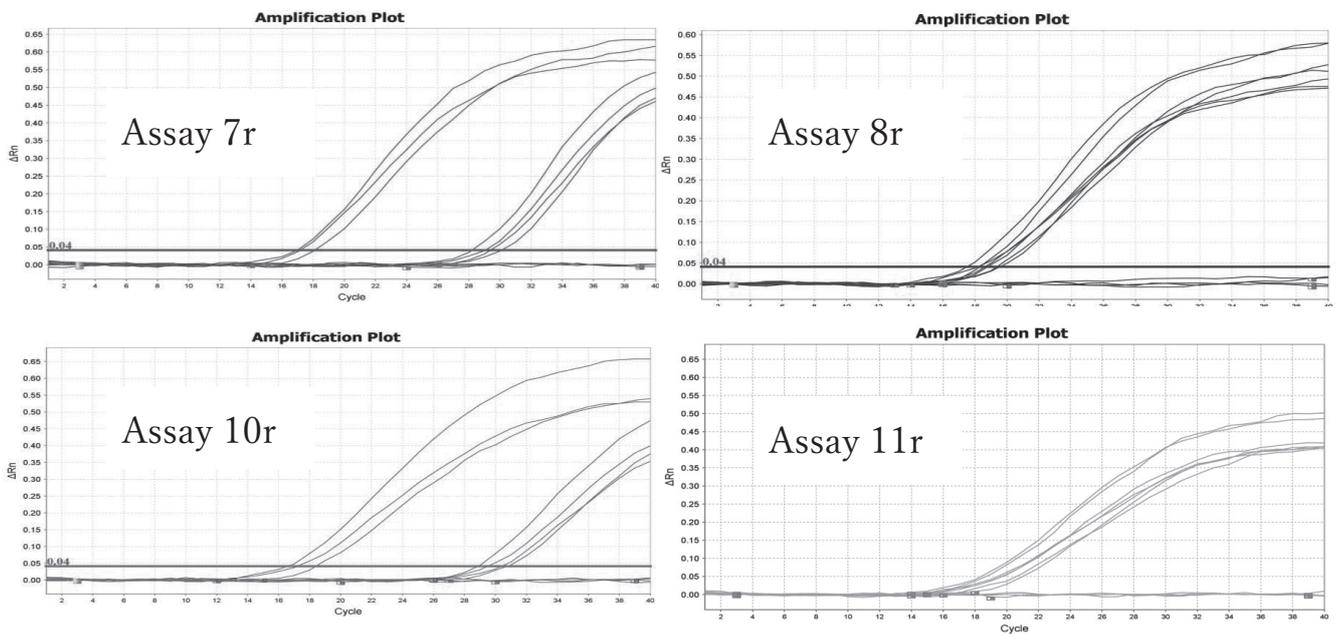


図 1. 機能しないバリエントを含む一部のバリエント保有株の各種 Assay における蛍光プロット像

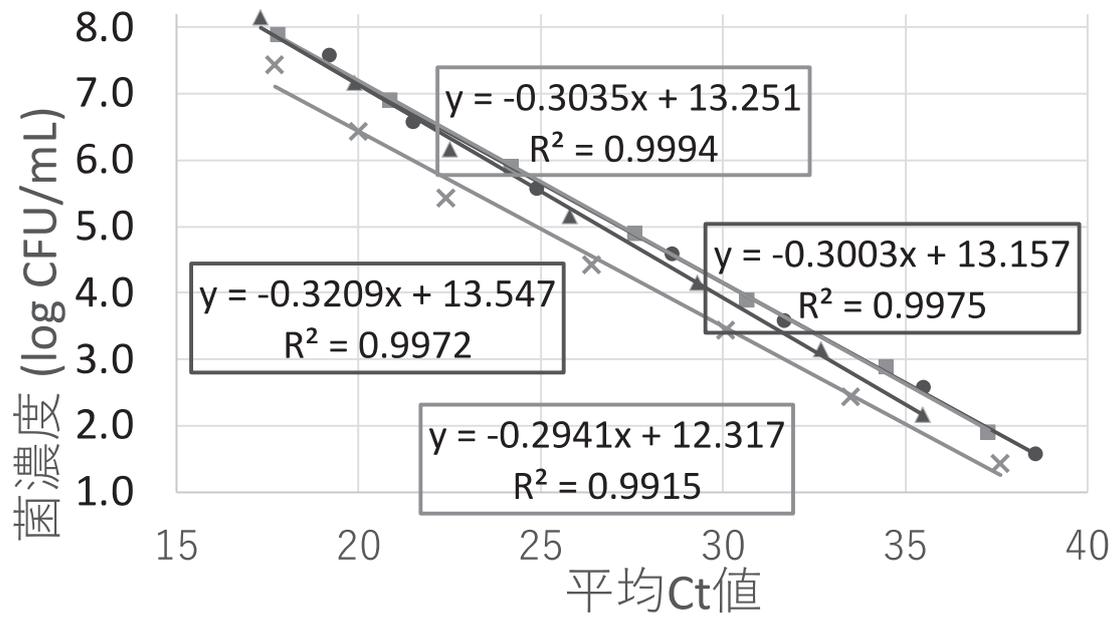


図2. 各種 *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検量線

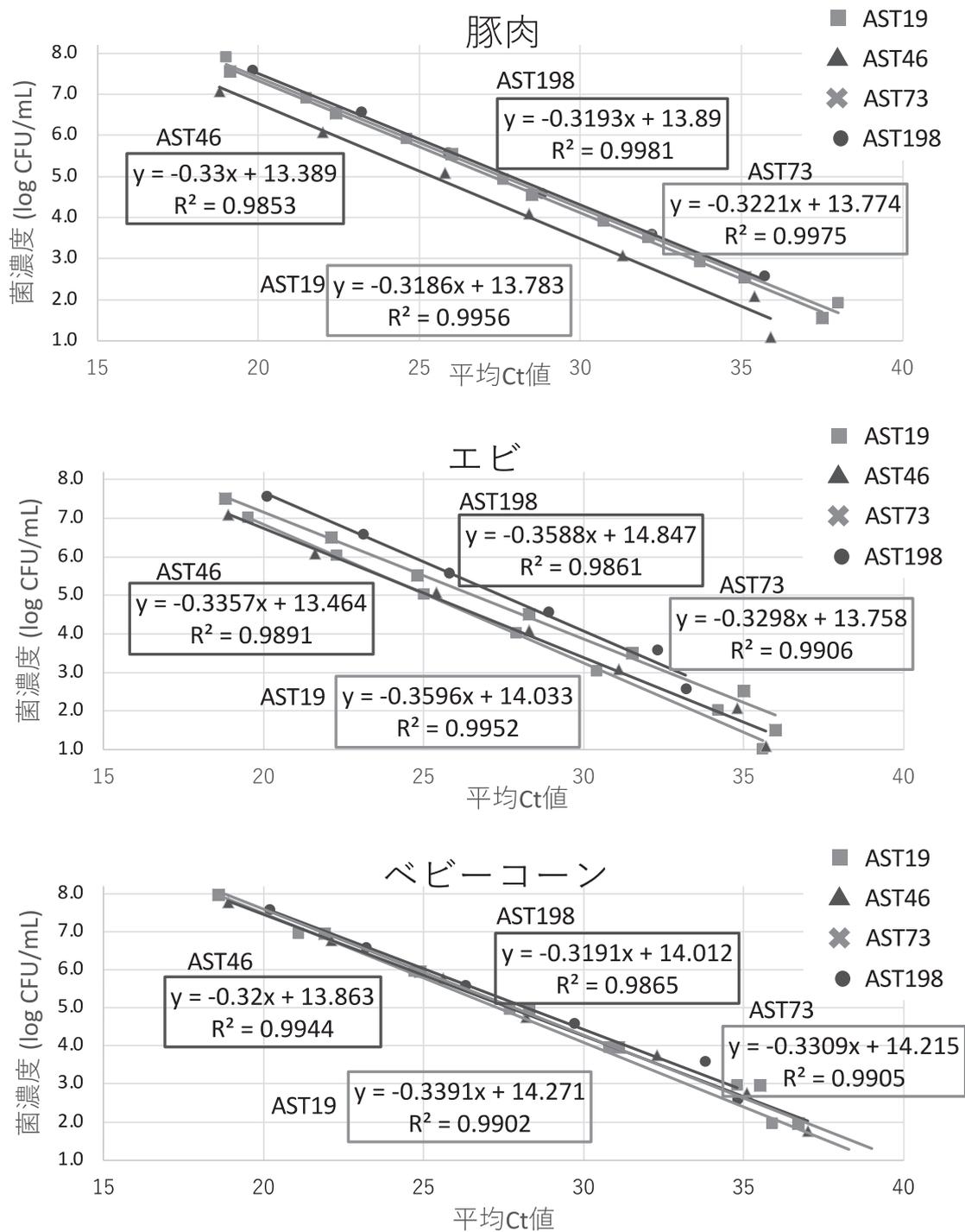


図 3. 各種食品培養液と各種 *astA* 保有大腸菌培養液の希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検量線

表 1. 供試した *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配列 (蛍光およびクエンチャー標識)	産物 (bp)
Assay 7	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 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	111
Assay 8	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		115
Assay 10	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		122
Assay 11	バリエーション7, 15, 22, 33以外の 全 <i>astA</i> バリエーションの検出		126

表 2. 多様な *astA* 保有大腸菌の Assay 11r での検出性

由来	事例数	株数	Assay 11r陽性株数	
			<i>astA</i>	IC*
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となった 集団食中毒事例由来株	12	120	120	120
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される 散発下痢症由来株	39	41	41	41
その他病原体による集団食中毒事例由来株	32	46	44	46
無症状保菌者	-	6	6	6

-: 該当なし, IC: インターナルコントロール

表 3. 各種 *astA* 保有細菌の Assay 11r での検出性

細菌種	由来	Assay 11r陽性株数	
		<i>astA</i>	IC
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	2016年に患者から分離	0	1
	2018年に患者から分離	0	1
	2018年にスワブから分離	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無症状保菌者	0	1
<i>Morganella morganii</i>	患者	1	0

*MALDI-TOF MSでの*K. oxytoca*との一致率が80~86%であった。

表 4. *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検出限界

<i>astA</i> 保有 大腸菌株	<i>astA</i> バリエーション	<i>astA</i> コピー数	検出限界*
			(log CFU/mL)
AST19	論文投稿の都合により、内容は 控えさせていただきます	2	1.9
AST46		2	2.2
AST73		5	1.4
AST198		1	1.6

*3反応中3反応で陽性となった最も菌数が少ない段階を検出限界と設定

表 5. 各種食品培養液と *astA* 保有大腸菌の培養液希釈段を用いた際の Assay 11r の *astA* の検出限界

<i>astA</i> 保有 大腸菌株	<i>astA</i> バリエーション	<i>astA</i> コピー数	検出限界 (log CFU/mL)*		
			豚肉	エビ	ベビーコーン
AST19	論文投稿の都合により、 内容は控えさせていた できます	2	1.9	1.0	0.9
AST46		2	1.1	1.1	1.8
AST73		5	1.5	1.5	1.0
AST198		1	2.6	2.6	2.6

*3反応中3反応で陽性となった最も菌数が少ない段階を検出限界と設定

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による大規模食中毒が日本各地で発生しているが、食品等での検査法は国内外で確立されていない。*astA* 保有大腸菌による食中毒の早期の原因究明には、適切な検査法の開発が必要不可欠である。そこで、昨年度に引き続き、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増菌培地および選択分離培地の有用性を比較した。その結果、増菌培地として mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であるが、一部食品では mEC の方がより適することが明らかとなった。また、選択分離培地に添加する選択剤として、セフィキシムおよびセフスロジンの有用性を *astA* 保有大腸菌を添加した食品を用いて検討したが、これら薬剤の顕著な有用性は認められなかった。さらに、*astA* 保有大腸菌による自然汚染食品から分離された *astA* 保有大腸菌株について、各種遺伝子解析を実施したところ、分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型が多様であった。なお、一部の食品由来株は、mEC 由来株と NmEC 由来株とで菌株の O 抗原遺伝子型の構成が異なっていたため、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株が存在することが示唆された。以上から、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、mEC および NmEC を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

研究協力者

宮城県保健環境センター	山口友美、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、荒木靖也
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、腸管管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による大規模食中毒が日本各地で発生している。*astA* 保有大腸菌による食中毒は原因食品が不明であることが多く、また、食品等での検査法は国内外で確立されていない。そのため、*astA* 保有大腸菌による食中毒の早期の原因究明には、適切な検査法の開発が必要不可欠である。本研究では、昨年度に引き続き、*astA* 保有大腸菌の食品での検査法に有用な増菌培養法や分離培養法の検討および食品中の *astA* 保有大腸菌の各種遺伝子解析の実施を目的とした。

B. 研究方法

[1] *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験

令和4年度に実施した *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験を実施した。

(1) 試験検体の *astA* 確認試験

1) 食品検体

モヤシ3食品を供試した。検体 (550 g 以上) を滅菌トレイ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。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

1) 菌株および接種菌液の調製
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。

astA 保有大腸菌菌株保存のカジトン培地から 1 エーゼ (10 μL) 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。この作業を繰り返し実施し、TSB 中にて 18 時間培養した場合の菌数を計算し、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℃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。

2) 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℃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) の各増菌培養液 0.1 mL から [1] (1) 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。

4) 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。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 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以下の *astA* 保有確認を行った。

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 μL 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×g 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとし、[1] (1) 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。

5) 生化学的性状の確認

4) 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。

[2] 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

(1) 供試菌株

集団食中毒事例由来株である *astA* 保有大腸菌 0166:H15 (AST204) を供試した。

(2) モヤシ培養液中での各種選択分離培地の検討

[1](2)2) で得られた培養液を、0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、10 mg/L セフロジン添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフロジン添加 CHSTEC に画線し、37℃にて 22 時間培養した。培養後の生育コロニーの色や生育状態を確認し、その後、[1](2)2) から 5) と同様に *astA* 保有大腸菌を分離した。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた *astA* 保有大腸菌添加食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数推定および菌数比較

(1) 食品培養液での *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検量線作成

1) 供試菌株、食品培養液検体および DNA 溶液の調製

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。

令和 4 年度に実施した *astA* 保有大腸菌の添加回収試験で *astA* 陰性となった各種食品(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 mEC 培養液を供試した。

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ (10 μL) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37℃にて 18 時間培養した。各種食品の mEC 培養液にて *astA* 保有大腸菌株の増菌培養液をそれぞれ 10 倍階段希釈し、菌接種食品培養液 (想定 8~1 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種食品培養液各 100 μL 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。

2) リアルタイム PCR

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法の確立 (3)

「*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発」にて設計した *astA* 特異的リアルタイム PCR Assay 11r 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。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。各菌接種食品培養液に添加した菌数と得られた Ct 値から検量線を作成した。

(2) 添加回収試験での食品培養液中の菌数の推定

令和 4 年度に実施した *astA* 保有大腸菌 (AST19 および AST204) 添加回収試験の検体培養液 (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) から抽出し保存していた DNA について [3] (1) 2) と同様に Assay11r 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。[3] (1) で得られた検量線を用いて各培養液中の菌数を算出した。

[4] 自然汚染検体分離株の遺伝子性状解析

(1) 分離株の菌種同定

1) 供試菌株

令和 4 年度に豚肉ミンチ、鶏肉ミンチおよびオクラから分離された *astA* 保有細菌 165 株および *Escherichia coli* NBRC3972 を供試した。

2) 菌株同定試験

菌株を標準寒天培地に画線後、37°C で 24 \pm 2 時間培養した。マススペクトル校正用の *E. coli* NBRC3972 はカジトン培地からニードルを用いて接種し、標準寒天培地に画線後、37°C で 24 \pm 2 時間培養した。培養後、生育したコロニーを校正用に供試した。菌種同定試験で使用したマトリックス剤は、トリフルオロ酢酸、アセトニトリル、エタノール、蒸留水を 3 : 33 : 33 : 31 の割合で混合した溶媒に α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (CHCA、富士フィルム和光純薬株式会社) を 10 mg/mL の割合になるように溶解させ、調製した。選定したコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、分析用のサンプルプレートのウェルに塗布した。コロニーを塗布したウェルにマトリックス剤 1 μ l を滴下し、数回ピペッティングをし、クリーンベンチ内で風乾させた。校正用の *E. coli* NBRC3972

はマトリックス剤の量を 0.5 μ l に変更し、同様の作業を実施した。プレート上の試料が十分に乾燥したことを確認し、MALDI-TOF MS AXIMA®シリーズ Assurance (株式会社島津製作所) と AXIMA®微生物同定システム SARAMIS™ (株式会社島津製作所) を用いて菌種を同定した。(2)分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

1) 供試菌株

(4) 1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株 165 株を供試した。

2) O 遺伝子型別および H 遺伝子型別

供試菌株を TSA に培養し、生育したコロニーを TE (pH 8.0) 100 μ L に懸濁し、100°C 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、井口らの方法 (J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32) に従い、PCR によって O 抗原遺伝子型別を行った。また、Banjo らの方法 (J Clin Microbiol., 2018, 56, e00190-18) に従い、PCR によって H 抗原遺伝子型別を行った。(3)分離株の病原性因子関連遺

伝子の解析

1) 供試菌株

(1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株のうち、各食品由来の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型代表株 54 株を供試した。

2) 病原性因子関連遺伝子の検出

[4] (2) で抽出した DNA テンプレートを用いて、病原性因子関連遺伝子を実施した。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 では、*escV*、*bfpB*、*stx1*、*stx2*、*elt*、*est1a*、*est1b*、*invE*、*astA*、*aggR* および *pic* を対象とした。マルチプレックス PCR は、200 μ L の反応チューブで行った。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5 μ L、それぞれのプライマーを 0.2 μ M ずつ、DNA テンプレート 2 μ L から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25 μ L に調整した。反応は、94°C、2 分の後、94°C、30 秒、63°C、30 秒、68°C、1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68°C、5 分の反

応を行った。反応終了後、PCR 産物 10 μ L を 2 % のアガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、特異的なバンドを確認し、遺伝子の有無を調べた。

(4) 分離株が保有する *astA* バリエーションの解析

1) 供試菌株および DNA 溶液の調製

[4] (1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株のうち、各食品由来の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型代表株 54 株を供試した。

供試菌株を TSB 中で 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 を抽出した。

2) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

[4] (4) 2) にて抽出した各 DNA を鋳型として供試し、シーケンス用プライマー (Yamamoto et al., Infect. Immun. 1996, 64:4) にて PCR 反応による増幅を行った。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] *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験

(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モヤシ 3 食品において、生菌数、大腸菌

群数および大腸菌数はそれぞれ 6.4-7.7 Log CFU/g、6.6-7.5 Log CFU/g および検出限界 (2 Log CFU/g) 以下であった。

2) *astA* 陽性検体数

モヤシ 3 食品は全て *astA* 陰性であった。

(2) 接種菌数

添加回収試験でモヤシに接種した *astA* 保有大腸菌菌数は、中菌数接種群で 45 CFU/25 g、高菌数接種群で 102 および 269 CFU/25 g であった。

(3) *astA* 保有大腸菌接種の食品培養液からの *astA* 検出

本研究に供試した中菌数接種群のモヤシ 1 食品および高菌数接種群のモヤシ 2 食品は、全ての増菌培地で *astA* 陽性であった。

(4) *astA* 保有大腸菌の分離

中菌数接種のモヤシ 1 食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC とともに 30%程度であった(表 1)。増菌培地と分離培地の組み合わせでは、釣菌コロニーに対する PCR 陽性コロニーの割合が NmEC 培養の C-SMAC が最も低く、mEC 培養の CHSTEC が最も高く 50%程度であった。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、

増菌培地別では mEC で 60%程度、NmEC で 50%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 0%、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 50%程度であった。

高菌数接種のモヤシ 2 食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC で 70%以上、NmEC で 20%未満であった(表 1)。増菌培地と分離培地の組み合わせでは、釣菌コロニーに対する PCR 陽性コロニーの割合が 2 食品とも NmEC 培養の C-SMAC が最も低く、mEC 培養および NmEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。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は、2 食品とも増菌培地別では mEC で 100%、NmEC では 30%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が 2 食品とも最も低く、mEC 培養および NmEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。加えて、1 食品では、mEC 培養の C-SMAC も高かった。

令和 4 年度の結果と合計すると、中菌数接種の食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロ

ニーの割合は、mEC と NmEC でともに 80%程度であり（表 2）、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 50%程度、NmEC 培養の CHSTEC が最も高く 90%程度であった。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、増菌培地別では mEC と NmEC でともに 90%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 50%程度、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 90%程度であった。また、高菌数接種の食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC でともに 70%以上であり、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、mEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。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は、増菌培地別では mEC と NmEC とともに 70%以上であり、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、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった。

[2] 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

astA 陽性コロニーが分離された検体の割合は、mEC 培養の 0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC で全て 100%であり、NmEC 培養の 0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC で 25%、10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC および 0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC で 10%程度であった。供試した 3 種類の選択分離培地では、*astA* 保有大腸菌以外の青色コロニーの生育が抑制されず、培地上の生育コロニーの様子は [1] (4) の CHSTEC と概ね同様であった。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた *astA* 保有大腸菌添加食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数推定および菌数比較

astA 特異的リアルタイム PCR 法で算出された Ct 値と菌数の検量線は、各食品培養液中で直線性を示した（図 1）。検量線を用いて算出した *astA* 保有大腸菌の菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映していた（図 2-4）。各培養液の平均菌数は、*astA* 保有大腸菌

が分離された培養液で約 6 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液で約 8 log CFU/mL であった。培地別の培養液の平均菌数は、*astA* 保有大腸菌が分離された mEC 培養液と NmEC 培養液でともに約 8 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった mEC 培養液と NmEC 培養液でともに約 6 log CFU/mL であった。食品別の *astA* 保有大腸菌が分離された培養液の平均菌数は、豚肉スライス、牛肉スライスおよびエビで約 9 log CFU/mL、オクラおよびキュウリでは約 8 log CFU/mL、モヤシでは約 7 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液の平均菌数は、オクラおよびモヤシで約 6 log CFU/mL であった(図 2-4)。また、モヤシでの接種菌数別の *astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液の平均菌数は、低菌数接種群および中菌数接種群で約 7 log CFU/mL、高菌数接種群で約 5 log CFU/mL であった。

[4] 自然汚染検体分離株の遺伝子性状解析

(1) 分離株の菌種同定

供試した *astA* 保有菌 165 株は、全て *E. coli* と同定された。

(2) 分離株の O 抗原遺伝子型お

よび H 抗原遺伝子型解析

オクラ由来株では、mEC と NmEC で株の O 抗原遺伝子型構成が同一であった。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の O 抗原遺伝子型構成が異なり、検体間でも O 抗原遺伝子型が異なっていた(表 3)。鶏肉ミンチ由来株では、mEC と NmEC で一部重複する O 抗原遺伝子型も存在し、多様な O 抗原遺伝子型で構成されており、検体間で 0g21 と 0gGP9 のみ共通であった。また、鶏肉ミンチ 1 由来の 0gGP9 株 14 株のうち 12 株は、2020 年姫路市食中毒事例株と同じ 0gGP9:Hg18 であり、残りの 2 株および鶏肉ミンチ 2 由来の 1 株は、Hg18 とは異なる H 抗原遺伝子型の株であった。鶏肉ミンチ 1 由来の 0g7 株は、2020 年埼玉県食中毒事例株の血清型 (07:H4) とは異なる H 抗原遺伝子型であった。鶏肉ミンチ 2 由来の 0g157 株は、腸管毒素原性大腸菌で高頻度に分離される Hg7 ではなく Hg23 であった。

(3) 分離株の病原性因子関連遺伝子の解析

供試した 54 株は、本研究にて供試した PCR 法にて試験した病原性因子の中ではいずれも *astA* のみを単独で保有する株であっ

た（表4）。

（4）分離株が保有する *astA* バリエーションの解析

供試した 54 株は、8 種類のバリエーション（prototype、v6、v12、v14、v27、v29、newtype5、newtype6）を単独で保有あるいは複数のバリエーションを同時に保有していた（表5）。

D. 考察

モヤシでの *astA* 保有大腸菌添加回収試験において、増菌培地については、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、中菌数接種群では mEC と NmEC が同等であったが、高菌数接種群では、NmEC よりも mEC が高い傾向であった。分離培地の組み合わせによっては、NmEC 培養の C-SMAC で *astA* 陽性コロニーが全く検出されなかったが、mEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC では 100%の割合で検出されたことから、モヤシからの *astA* 保有大腸菌の検出には、mEC および CHSTEC あるいは C-CHSTEC の組み合わせが適していると考えられた。令和4年度の結果と合わせた全食品の合計では、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、mEC と NmEC が同等か NmEC

よりも mEC がやや高い傾向であった。また、*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り、中菌数接種群および高菌数接種群では、NmEC よりも mEC がやや高い傾向であった。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が、モヤシのように NmEC が適さない食品では、mEC を選択する必要があると考えられた。

選択分離培地への選択剤として、セフィキシムおよびセフスロジン添加培地を検討した。*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、セフィキシムおよびセフスロジン添加培地と薬剤の添加がない CHSTEC で同等であったことから、これら薬剤の顕著な有用性は今回試験したモヤシでは認められなかった。

リアルタイム PCR での推定菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映した菌数を示し、*astA* 保有大腸菌の分離に一定の菌数が必要であることが示唆された。一方で、モヤシ培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数を比較すると、低および中菌数接種群よりも高菌数接種群で菌数が低い傾向が認められた。モヤシの生菌数および大腸菌群数は、それぞれ

6.4 から 7.7 Log CFU/g、6.6 から 7.5 Log CFU/g と高かったことから、食品中の夾雑菌が *astA* 保有大腸菌の増殖に影響する可能性が考えられた。

食品から分離された *astA* 保有大腸菌の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型および保有する *astA* バリエーションは多様であった。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の O 抗原遺伝子型構成が異なっていたことから、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株が存在することが示唆された。そのため、食中毒事例の原因物質調査において *astA* 保有大腸菌を疑う場合は、増菌培地として mEC および NmEC を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

E. 結論

astA 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、増菌培地として mEC および NmEC が有用であることが示唆された。一部の食品では、NmEC よりも mEC が望ましいが、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株の存在が示唆されたことから、mEC および NmEC を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

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)

廣瀬昌平，新井沙倉，山谷聡子，貫洞里美，齊木大，曾根美紀，荒木靖也，土井りえ，尾畑浩魅，土屋彰彦，小嶋由香，大西貴弘，工藤由起子．食品中の *astA* 保有大腸菌の効率的な増菌および分離培養法の検討．第 166 回日本獣医学会学術集会．令和 5 年 9 月 5-18 日．大阪

曾根美紀，尾畑浩魅，山谷聡子，貫洞里美，荒木靖也，土屋彰彦，小西典子，土井りえ，小嶋由香，廣瀬昌平，新井沙倉，大西貴弘，工藤由起子．*astA* 保有大腸菌自然汚染食品での増菌および分離培養法の検討．第 44 回日本食品微生物学会学術総会．令和 5 年 9 月 21-22 日．大阪
荒木靖也，新井沙倉，小西典子，土井りえ，山谷聡子，土屋彰彦，小嶋由香，尾畑浩魅，貫洞里美，曾根美紀，廣瀬昌平，大西貴弘，工藤由起子．*astA* 保有大腸菌接種食品での増菌および

分離培養法の検討．第 44 回日本食品微生物学会学術総会．令和 5 年 9 月 21 日．大阪

貫洞里美，尾畑浩魅，荒木靖也，曾根美紀，山谷聡子，土井りえ，小西典子，小嶋由香，土屋彰彦，新井沙倉，廣瀬昌平，大西貴弘，工藤由起子．食品からの *astA* 保有大腸菌分離のための培養法の検討．第 119 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 5 年 10 月 12 日．東京

山谷聡子，廣瀬昌平，小西典子，土屋彰彦，小嶋由香，土井りえ，尾畑浩魅，曾根美紀，荒木靖也，貫洞里美，新井沙倉，大西貴弘，工藤由起子．*astA* 保有大腸菌の食品からの分離方法の検討および分離株の解析．第 119 回日本食品衛生学会学術講演会．令和 5 年 10 月 12 日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

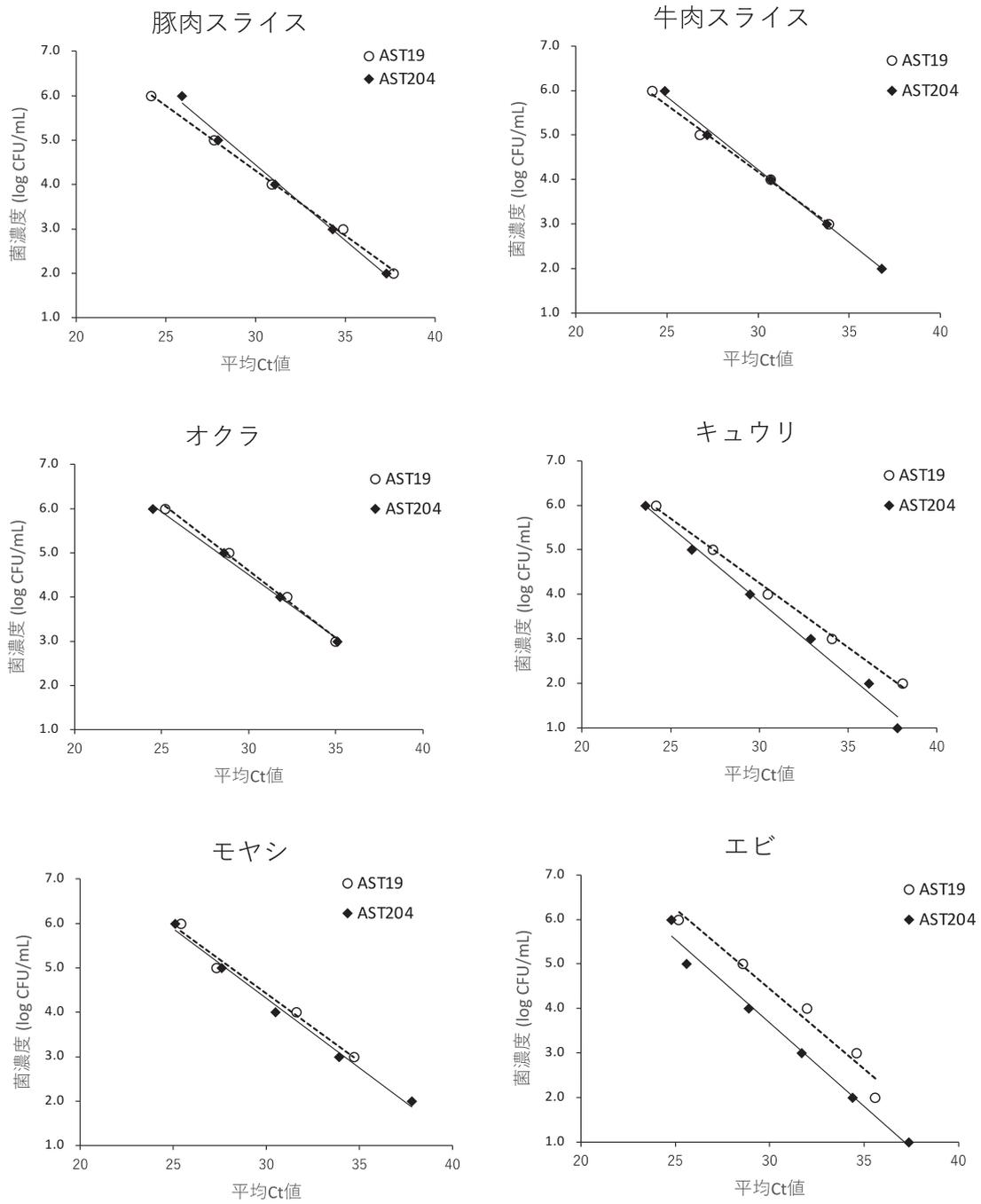


図 1. *astA* 保有大腸菌添加回収試験食品における *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検量線

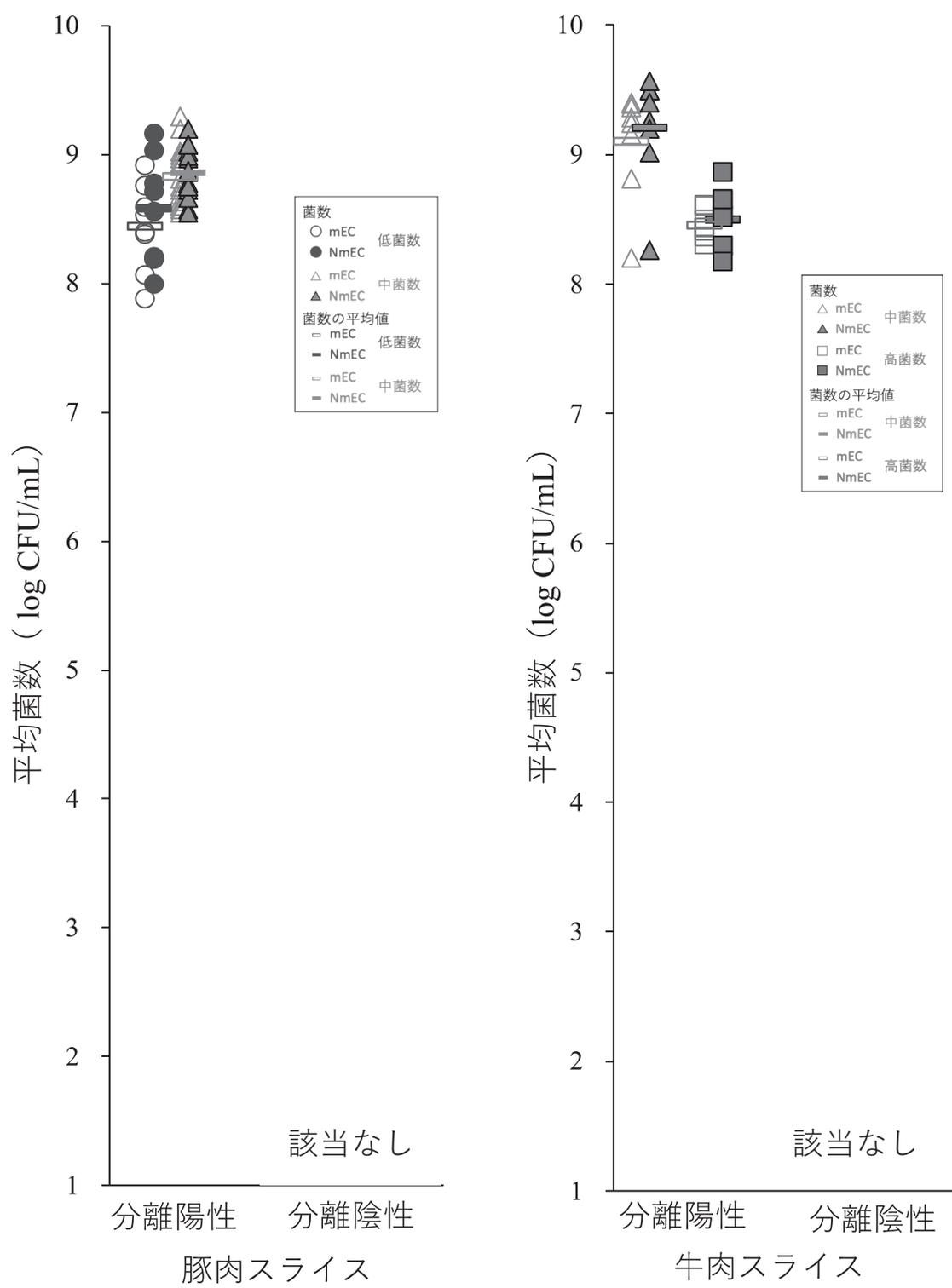


図 2. *astA* 保有大腸菌添加回収試験豚肉スライスおよび牛肉スライス培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数の推定

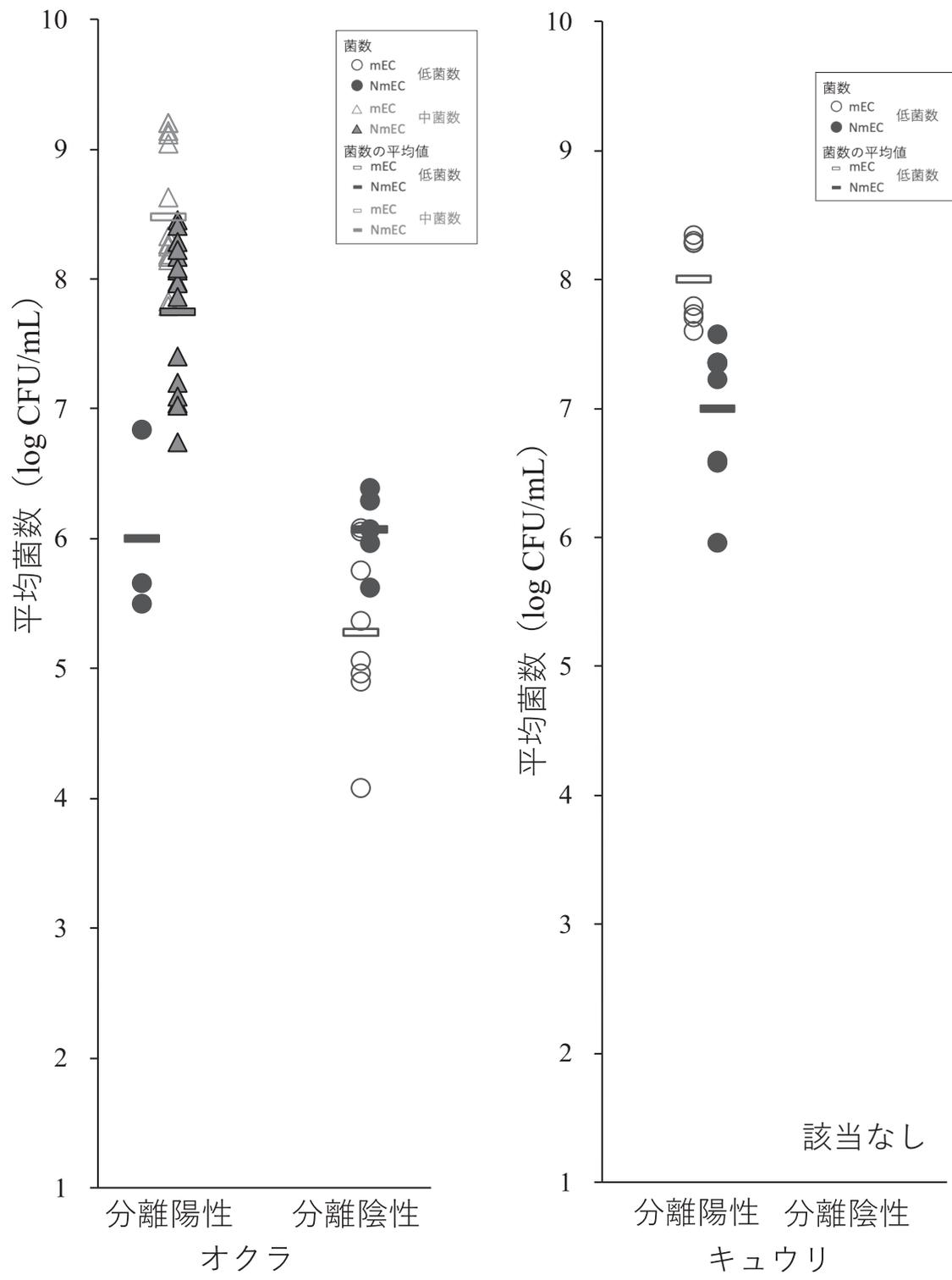


図3. *asta* 保有大腸菌添加回収試験オクラおよびキュウリ培養液中の *asta* 保有大腸菌菌数の推定

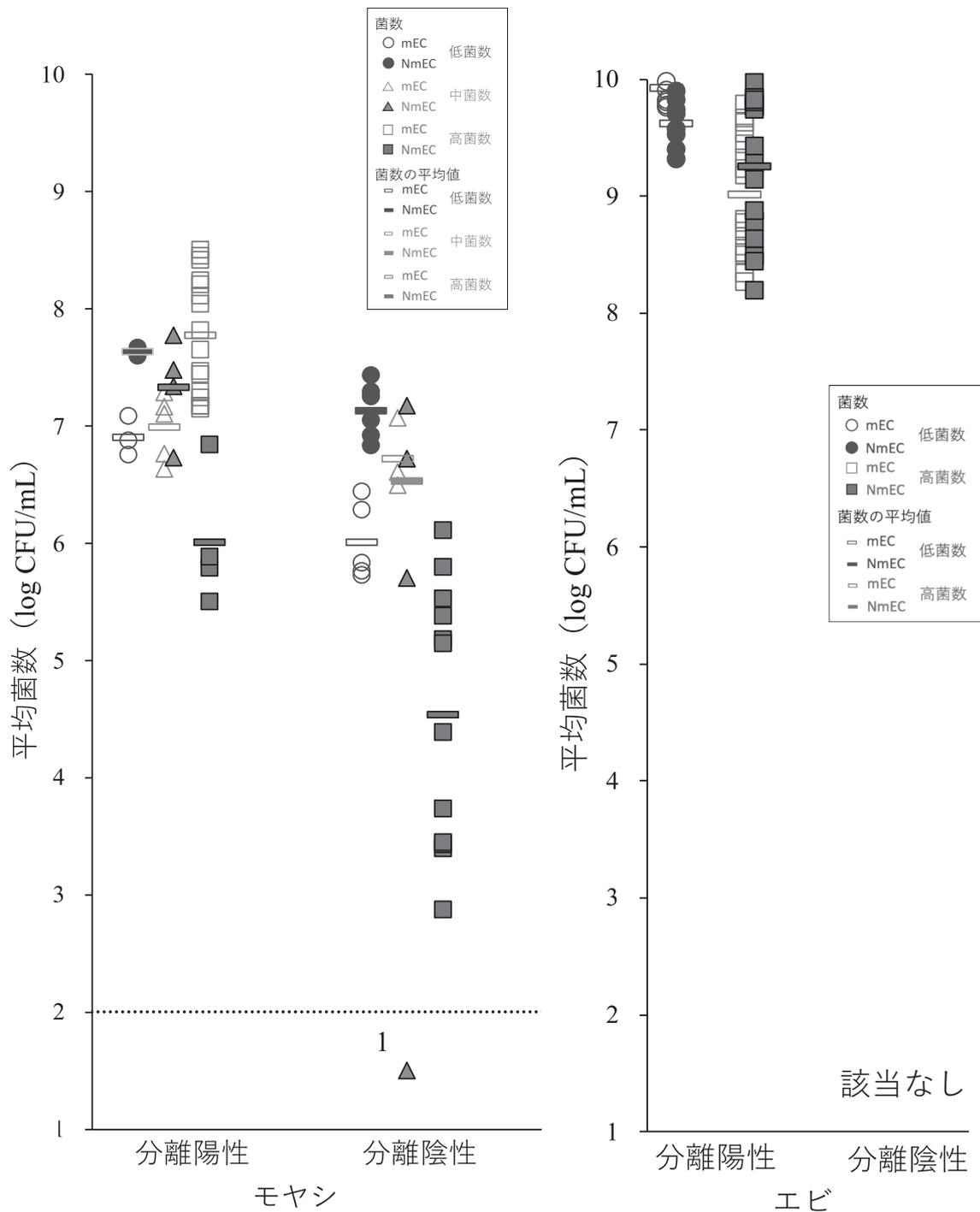


図4. *astA*保有大腸菌添加回収試験モヤシおよびエビ培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数の推定

表 1. *astA* 保有大腸菌添加回収試験のモヤシにおける追試結果

菌数 レベル	食品	増菌 培地	PCR陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				PCR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
中	モヤシ	mEC	<p>論文投稿前のため、 詳細な結果は 伏せさせていただきます。</p>							
		NmEC								
高	モヤシ 1	mEC								
		NmEC								
高	モヤシ 2	mEC								
		NmEC								

表 2. 令和 4 年度および令和 5 年度の *astA* 保有大腸菌添加回収試験の総合結果

菌数 レベル	食品	増菌 培地	PCR陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				PCR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	CHSTE C	C- CHSTEC	合計
低	5 食品 *	mEC	<p>論文投稿前のため、 詳細な結果は 伏せさせていただきます。</p>							
		NmEC								
中	4 食品 **	mEC								
		NmEC								
高	3 食品 ***	mEC								
		NmEC								

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

*5食品(5試験)：豚肉スライス、エビ、オクラ、キュウリ、モヤシ

**4食品 (5試験)：豚肉スライス (2試験)、牛肉スライス、オクラ (2試験)、モヤシ

***3食品(4試験)：牛肉スライス、エビ (2試験)、モヤシ (2試験)

表 3. *astA* 保有大腸菌食品分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型

検体	No.	増菌 培地	Og型別	Hg型別	株数	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	27	
		NmEC	Og8	未試験	2	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	11	
		NmEC	Og8	未試験	4	
	2	mEC	OgGp10	未試験	2	
		NmEC	Og113	未試験	17	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	1	
			Og21	未試験	2	
			Og45	未試験	1	
			Og86	未試験	11	
			OgGP9	Hg18	7	
			OgUT	未試験	10	
			NmEC	Og7	Hg4以外	4
				Og159	未試験	5
				OgGP9	Hg18	5
				OgGP9	Hg18以外	2
	OgUT	未試験		7		
	2	mEC		Og8	未試験	1
				Og21	未試験	4
				Og86	未試験	1
				Og125	未試験	1
				Og183	未試験	1
			OgGP7	未試験	6	
			OgGP9	Hg18以外	1	
			OgGP12	未試験	1	
			OgUT	未試験	1	
NmEC			Og9	未試験	2	
	Og15	未試験	2			
	Og33	未試験	1			
	Og157	Hg23	9			
	Og183	未試験	5			
	OgGP12	未試験	4			
	OgUT	未試験	7			

表 4. *astA* 保有大腸菌食品分離株が保有する病原因子関連遺伝子

検体	No.	増菌 培地	Og型別	Hg型別	病原 因子	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
	2	mEC	OgGp10	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og113	未試験	<i>astA</i>	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	<i>astA</i>	
			Og21	未試験	<i>astA</i>	
			Og45	未試験	<i>astA</i>	
			Og86	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP9	Hg18	<i>astA</i>	
			OgUT	未試験	<i>astA</i>	
			NmEC	Og7	Hg4以外	<i>astA</i>
				Og159	未試験	<i>astA</i>
				OgGP9	Hg18	<i>astA</i>
				OgGP9	Hg18以外	<i>astA</i>
	OgUT	未試験		<i>astA</i>		
	2	mEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
			Og21	未試験	<i>astA</i>	
			Og86	未試験	<i>astA</i>	
			Og125	未試験	<i>astA</i>	
			Og183	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP7	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP9	Hg18以外	<i>astA</i>	
			OgGP12	未試験	<i>astA</i>	
			OgUT	未試験	<i>astA</i>	
NmEC			Og9	未試験	<i>astA</i>	
	Og15	未試験	<i>astA</i>			
	Og33	未試験	<i>astA</i>			
	Og157	Hg23	<i>astA</i>			
	Og183	未試験	<i>astA</i>			
OgGP12	未試験	<i>astA</i>				
OgUT	未試験	<i>astA</i>				

表 5. *astA* 保有大腸菌食品分離株が保有する *astA* バリエント

検体	No.	増菌 培地	Og 型別	Hg 型別	バリエント	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	増幅せず	
		NmEC	Og8	未試験	newtype6	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	prototype	
		NmEC	Og8	未試験	v27	
	2	mEC	OgGp10	未試験	v6	
		NmEC	Og113	未試験	prototype	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	prototype	
			Og21	未試験	v6	
			Og45	未試験	mix	
			Og86	未試験	mix	
			OgGP9	Hg18	mix	
			OgUT	未試験	1株: v6 他9株: v12	
			NmEC	Og7	Hg4以外	prototype
				Og159	未試験	v6
				OgGP9	Hg18	mix
				OgGP9	Hg18以外	mix
	OgUT	未試験		v12		
	2	mEC		Og8	未試験	v6
				Og21	未試験	prototype
				Og86	未試験	v29
				Og125	未試験	v14
				Og183	未試験	mix
			OgGP7	未試験	prototype	
			OgGP9	Hg18以外	prototype	
			OgGP12	未試験	newtype5	
			OgUT	未試験	v12	
NmEC			Og9	未試験	v12	
	Og15	未試験	prototype			
	Og33	未試験	prototype			
	Og157	Hg23	newtype5			
	Og183	未試験	mix			
	OgGP12	未試験	newtype5			
		OgUT	未試験	1株: v6 他6株: v12		

令和 5 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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

腸管出血性大腸菌の食品での検査法

研究要旨

腸管出血性大腸菌の食品での検査法は、平成 27 年に通知されているが、年月の経過とともに、記載されている機器や試薬の入手が困難になっているものも見られる。このため、現状に即した機器や試薬を調査することが必要とされている。本研究で調査した結果、いくつかの販売中止品や終売になる機器があることが判明した。

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

腸管出血性大腸菌は、病原大腸菌の中で最も病原性が高く、食中毒の発生が注視されている原因物質であり、食品での検査法は、「食品からの腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法」(食安監発 1120 第 1 号、事務連絡平成 27 年 3 月 24 日、以下通知法)に通知されている。腸管出血性大腸菌食中毒の発生は、毎

年報告があり、報告数の大きな減少も認められていない。このため、食品での検査の機会が多く、その方法は重要とされている。前述の通知法に記載されている機器や試薬が年月の経過とともに入手が困難になっているものも見られるため、本研究では、現在販売されている機器や試薬を調査した。

B. 研究方法

[1] 遺伝子検出法について

通知法記載の遺伝子検出法について、機器や試薬などが現在も入手可能であるか、また後継のものが販売されているかを調査した。

[2] 培養法について

通知法記載の培養法について、培地などが現在も入手可能であるか、また後継のものが販売されているかを調査した。

[3] その他の試薬等について

遺伝子検出法や培養法以外に使用する試薬やメーカー名等について、通知法に記載されている内容が現在も入手可能であるか、また後継のものが販売されているかを調査した。

C. 研究結果

[1] 遺伝子検出法について

(1) DNA 抽出法

DNA 抽出キットに関しては、通知法に記載のキットが現状でも販売されていることを確認した。

(2) ペロ毒素遺伝子および 0 抗原遺伝子を検出するキット

リアルタイム PCR 法および Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法のいずれも通知法に記載のキットが現状でも販売されていることを確

認した。

(3) リアルタイム PCR 法の機器

通知法に記載されている Thermal Cyclers Dice Real Time System II : Dice II の販売は終了されており、後継機として Thermal Cyclers Dice Real Time System III および Thermal Cyclers Dice Real Time System IV が販売されていることを確認した。なお、通知法記載の Dice II は、2024 年にサポートが終了される。また、Applied Biosystems のリアルタイム PCR 機器についても、後継機として QuantStudio リアルタイム PCR システムシリーズが販売されていることを確認した。なお、Applied Biosystems 7000、7300 および 7700 の各種機器はいずれも販売およびサポートが終了していた。

(4) LAMP 法の機器

通知法に記載されている Loopamp リアルタイム濁度測定機器 LA-320C および RT-160C (栄研化学) は販売およびサポートが終了しており、現状販売されている機器としては通知法記載の Loopamp EXIA (栄研化学) のみであった。

[2] 培養法について

増菌用培地である mEC の販売元として通知法に記載されているメルクは、その後販売を終了していた。また、通知法記載の XM-EHEC 寒天培地は、アキュレート™ XM-EHEC 寒天培地へ名称変更されていた。

[3] その他の試薬等について

(1) 製造販売元名

和光純薬株式会社は富士フィルム和光純薬株式会社へ、日水製薬株式会社は島津ダイアグノスティクス株式会社へ、デンカ生研株式会社はデンカ株式会社へそれぞれ名称変更されていた。

(2) 試薬

血清型別試薬である大腸菌 0157 検出試薬「UNI」は、大腸菌 0157 検出キット「UNI」へ名称を変更していた。さらに、VT 確認試験にて記載の RIDA スクリーン ベロトキシンは、販売が終了していた。

D. 考察

通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手困難となっている現状が明らかとなった。また、通知法では遺伝子検出法の検出限界を $4 \log \text{CFU/mL}$ 以上と示されている。今後は、現状販売されているリアルタイム PCR 法の後継機器を用い

て、各種遺伝子検出法の検出限界が定められた値を満たしているかを確認する必要があると思われた。

E. 結論

本研究にて、通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手できない状況にあるため、食品衛生検査の現場での活用性を向上すべく、現状に即した通知法改定案を作成する必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Konishi, N., Sato, M., Suzumura, K., Obata, H., Otsuka, K., Doi, R., Goto, K., Kai, A., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Growth and survival of *Escherichia albertii* in food and environmental water at various temperature. *Journal of food protection* 87(4), 100249, 2024.

(学会等発表)

工藤由起子. *Escherichia albertii* の汚染状況及び検査法について. シンポジウム III *E. albertii* を

含めた病原大腸菌による食中毒
の発生と検査体制. 衛生微生物技
術協議会第 43 回研究会. 令和 5
年 7 月 6 日. 岐阜

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

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 5 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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。R5 年度は、昨年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する 395 株について、各バリエーション保有株に共通する病原因子の同定を試みた。しかしながら、同一バリエーションが大腸菌進化系統に分散して存在することが判明し、共通因子の同定が困難であることが明らかになった。そのため、特に集団感染事例由来株について、共通して保有する遺伝子バリエーションや病原関連遺伝子等の同定を行い、*astA* 遺伝子バリエーションに共通性はないものの、*bla*TEM-1B や *bla*CTX-M-15 など β -ラクタム系に対する耐性遺伝子を保有頻度が高いことを明らかにした。また、コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエーション 3 種類（prototype, V6, V27）について、*astA* 遺伝子のみの高発現株を用いて HeLa 細胞への細胞障害性の解析を行ったが、有意な病原性は検出出来なかった。また、試験的に実施したカイコへの感染実験による病原性評価においても有意な結果は得られなかった。ここで、*astA* 遺伝子は挿入配列である IS1414 の transposase (TPase) 遺伝子の内部にコードされていることから、IS1414 が転移する際に TPase の発現と連動して発現する可能性もあり、今後は IS1414 の転移条件やそのメカニズム挙動と併せて病原性を評価する必要がある。また、*astA* 遺伝子がゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性についても併せて今後検討する必要がある。

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 人の患者をとまなう *astA* 遺伝子保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 遺伝子保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が 100 人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌 [EAEC] (凝集付着性因子: *aggR* 遺伝子等の保有株) や腸管病原性大腸菌 [EPEC] (細胞への局在付着性因子: *eae* 遺伝子等の保有株) による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒においては、原因食品が不明であることが多く、感染源 (食材や食品) が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことがいわれており、その食中毒細菌に適した検査法が原因食品究明には重要である。

本研究では、ゲノム情報を基に

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

本年度は、R4 年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエントを保有する 395 株について、各バリエント保有株に共通する病原因子を同定し、臨床的に重要と考えられる *astA* 遺伝子バリエントについて機能解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

[1] 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

昨年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエントを保有する 395 株について、CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングを行い、各バリエントにのみ共通な遺伝子の抽出を試みた。

[2] 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエントおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染事例由来株について、*astA* 遺伝子バリエーションの共通性および共通の薬剤耐性遺伝子や病原関連遺伝子の同定を試みた。薬剤耐性遺伝子の同定には AMRFinderPlus を用いた。

[3] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

昨年度同定した主要な *astA* 遺伝子バリエーションの機能を明らかにするため、T7 プロモーターで制御可能な発現ベクター pTEBA

(BioDynamics Laboratory Inc.) を用い、N 末端に His x6 タグが付加されるようクローニングした。具体的には prototype、V6、V27 をそれぞれ *astA_P_V6*-BamH_F (5'-GGCCGGA

[redacted]-3') /*astA_P*-R (5'-GGGGGA

[redacted]-3') [for prototype]、*astA_P_V6*-BamH_F/*astA_v6*-R (5'-GGGGGA

[redacted]-3') [for V6]、*astA_P_V27*-BamH_F (5'-GGCCGGA

[redacted]

[redacted]-3') /
astA_v27-R (5'-GGGGGA [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 BamHI で処理し、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) でライゲーションした後、コンピテントセル大腸菌 DH5 α へ形質転換した。得られた形質転換体について、ベクター挿入部位の配列確認を行った後、各 *astA* 遺伝子バリエーションがクローニングされたベクターを QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて精製し、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ発現用 *E. coli* Zip BL21 (DE3) (BioDynamics La) へ再度形質転換して、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。

[4] 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

HeLa 細胞を MEM 培地、5% CO₂、37°C 条件下で confluent まで培

養した。項目(3)で作成した形質転換体と pETBA ベクターのみを入れた形質転換体(陰性コントロール)を LB 培地で培養し、IPTG で蛋白質発現誘導した後、その遠心上清 50 μ L を HeLa 細胞へ添加して 24 時間反応させた。その後、0.02% Trypsin-EDTA で細胞剥離した後、PBS で洗浄、トリパンブルー染色を行って血球計算盤により生細胞数をカウントした。また、比較対象として、LB 培地 50 μ L のみを HeLa 細胞へ添加し、上記と同様の処理を行った。

[5] カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

カイコ (*Bombyx mori*)、F85 系統を人工飼料である Silkmate PS5 (日本農産工)を用い、25°C 条件下で 5 齢 2 日あるいは 3 日まで飼育した。*astA* 遺伝子バリエーションの形質転換株と大腸菌 K-12 非病原株(陰性コントロール)について生理食塩水を用いて 6×10^7 cells/50 μ L の菌液を作成し、27G シリンジで 50 μ L ずつ体液内投与し、24 時間後に生死を判定した。

C. 研究結果

[1] 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

各バリエーションの共通因子の同定

を進めたが、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して存在すること、また、各バリエーションの周辺構造にも共通性が見られなかったことから、共通因子を同定することは出来なかった。

[2] 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

07:H4 株ではプラスミド上に *astA* 遺伝子バリエーションが同定されたが、株によりタイプが異なっていた。0166:H15 株では、染色体上に V31 を複数コピー保有するものが多かったが、プラスミド上のもものはタイプが異なり、プラスミド構造も異なるものであった(表 1)。それ以外の血清型については、*astA* 遺伝子バリエーションの種類も多様であり、共通性はみられなかった(表 2)。また、それらをコードするプラスミドの種類も異なっていた。また、耐性関連遺伝子については、全ての株ではなく、その局在も *astA* プラスミドとは異なるものの、 β -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有率が高かった。

[3] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

astA 遺伝子バリエーション由来蛋白

質の精製・機能解析を行うため、N末端に His x6 タグが付加されるように pETBA ベクターへのクローニングを行った。

[4] 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

MEM 培地に 50 μ L の LB 培地を添加したものを 100%として生存率を算定した結果、pETBA ベクター単体（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換体（過剰発現株）はいずれも 80%前後の生存率を示し、細胞毒性に有意差は見られなかった（図 1）。

[5] カイコへの感染実験による病原性解析法の確立（予備的な解析）

大腸菌 K-12 非病原株（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換株（高発現株）はいずれも生存率が 100%であり、 6×10^7 個の菌数では *astA* 遺伝子バリエーションによる致死活性は見られなかった（表 3）。

D. 考察

本年度実施した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する大腸菌株 395 株に関する解析から、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して分布すること、

また、同じバリエーションでもその周辺構造に共通性がないことも多いことが判明し、各 *astA* 遺伝子バリエーションに共通する疫学マーカーとなる遺伝子の同定が困難であることが明らかとなった。集団感染由来株に特化して *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性遺伝子・病原関連遺伝子の検索も実施したが、集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかった。また、薬剤耐性遺伝子に関しては、 β -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことが明らかとなったが、全てに共通するものは見られなかった。

コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエーションについての病原性に関する解析では、高発現株の培養上清を用いた細胞毒性試験ならびにカイコを用いた感染実験のいずれにおいても、有意な結果は得られなかった。しかしながら、*astA* 遺伝子は挿入配列である IS1414 の transposase (TPase) 遺伝子の内部にコードされており、IS1414 が転移する際に TPase の発現と連動して発現する可能性もあること、また、ゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性も否定できないことから異なる研究アプロー

チを検討する必要がある。

今後は、*astA* 遺伝子が IS1414 の内部にコードされており、IS1414 の転移と連動して発現する可能性もあるため、IS1414 を含めた領域をクローニングし、転移条件やそのメカニズム挙動と併せて病原性を評価する。また、*astA* 遺伝子がゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性についても併せて検討し、同定された場合には新たに疫学マーカーとして追加した検出系を構築する。

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、配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションの保有株に共通する疫学マーカーとなりうる遺伝子の同定を試みた。しかしながら、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して分布すること、また、同じバリエーションでもその周辺構造に共通性がないことも多く、共通遺伝子を同定することが出来なかった。集団感染事例由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性

遺伝子の解析からも共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかった。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、また、薬剤耐性遺伝子に関しては、 β -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことを明らかに出来た。臨床的に重要と考えられる *astA* 遺伝子バリエーションに関して、培養細胞およびカイコを用いた病原性に関する解析では、明確な病原性を検出することが出来なかった。*astA* 遺伝子のバリエーション多様性と大腸菌進化系統における分布の特徴に関しては、今年度中に研究成果を国際雑誌等で報告する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Ooka T^{#*}, Lee K[#], Gotoh Y, Arai S, Kudo Y, Hayashi T, Iyoda S, and Nishi J. Prevalence and characterization of the *astA* gene variants in *Escherichia coli* lineage. (投稿予定)

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

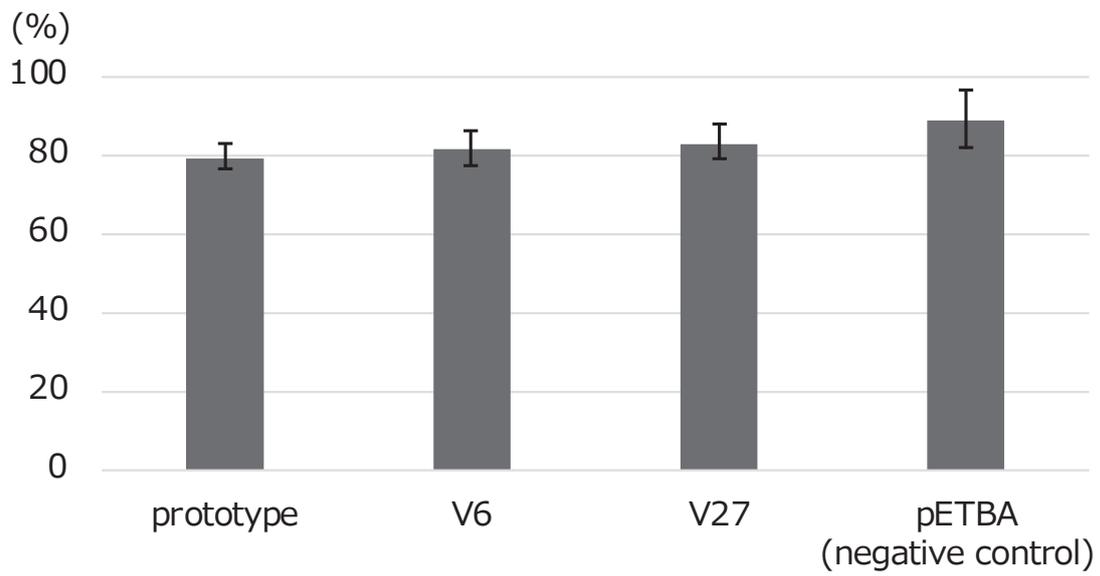


図1 HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験結果

表1 血清型 O166 および O7 株関連の *astA* および薬剤耐性遺伝子分布

serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
					chromosome	plasmid	
O7:H4	AST19 (JNE20-002)	<i>astA</i> 集団	2020	埼玉県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O7:H4	AST205 (JNE22-001)	<i>astA</i> 集団	2017	東京都			
serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
O166:H15	AST240	<i>astA</i> 集団	1997	福井県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O166:H15	AST20	<i>astA</i> 集団	1998	広島県			
O166:H15	AST73_NIID_complete (JNE070796)	<i>astA</i> 集団	2006	熊本市			
O166:H15	AST208 (JNE21-009)	<i>astA</i> 集団	2016	姫路市			
O166:Hg15	AST111	<i>astA</i> 散发	2018	秋田県			
O166:H15	AST204 (JNE21-003)	<i>astA</i> 集団	2019	新潟県 / 埼玉県			

表2 それ以外の血清型株の *astA* および薬剤耐性遺伝子分布

serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
					chromosome	plasmid	
OUT:H33	AST46	<i>astA</i> 集団	2002	広島県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O55:H32	AST81	<i>astA</i> 集団	2006	熊本市			
O1:Hg45	AST85	<i>astA</i> 集団	2014	北九州市			
O166:Hg19	AST106	<i>astA</i> 散发	2018	秋田県			
O6:H10	AST198	<i>astA</i> 集団	2003	大分県			
O169:Hg45	AST215 (JNE21-010)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp7:Hg6	AST216 (JNE21-011)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp9:Hg18	AST217 (JNE21-012)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp9:Hg18	AST262	<i>astA</i> 集団	2009	埼玉県			

表3 カイコ感染実験による病原性解析結果

株名	-	<i>Ecdi</i>			
		非病原株	<i>astA</i> 過剰発現株		
			プロトタイプ	V6	V27
生	10	10	10	10	10
死	0	0	0	0	0
合計	10	10	10	10	10
致死率	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

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5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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 0166:H15 の病原性究明と分離検出法開発のためゲノム解析と細胞付着因子の特定、および特徴的な性状の探索を試みた。性状の探索のため薬剤感受性試験、既存選択培地における発育状況等観察、および Phenotype microarray による網羅的な炭素源分解能の測定を行ったが分離検出に有用な性状は確認されなかった。付着因子特定のためプラスミド導入株の作製と付着性の解析を行った結果、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在している可能性が示唆された。完全長配列を用いた解析では食中毒事例株にのみ共通する病原性関連遺伝子は検出されなかったが、系統解析においては、食中毒事例株が共通して ST2914 に分類されることが明らかとなり、ST2914 が 0166:H15 株における病原性系統である可能性が示唆された。

研究協力者

国立感染症研究所
地方衛生研究所等

窪村亜希子、李 謙一

A. 研究目的

人に下痢等の消化器症状を引き起こす下痢原性大腸菌は、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)、腸管毒

素原性大腸菌 (*enterotoxigenic E. coli*: ETEC)、腸管凝集性大腸菌 (*enteroaggregative E. coli*: EAEC) 等に分類される。EHEC や ETEC では特定の毒素遺伝子、EAEC では凝集性線毛のレギュレーター遺伝

子等分類の指標となる。しかし、既存の下痢原性大腸菌分類には属さないものの、集団下痢症事例の起因菌として分離されることから病原性が示唆される大腸菌も存在する。そのうち、EAEC heat stable toxin (EAST1) をコードする遺伝子 (*astA*) を保有する大腸菌は、複数の血清型で食中毒起因菌として報告されている。*astA* 保有大腸菌については多様な血清型の大腸菌から検出されることが知られているが、前年度までの研究によりこれらが系統的に多様であることが判明している。一方で、*astA* 保有大腸菌の血清型のうち 0166:H15 については、食中毒起因菌として最も多く報告される血清型であり、さらに我々のこれまでの研究により同血清型の食中毒事例由来株が培養細胞に付着性を示すことが明らかとなった。そのため、本研究では *astA* 保有大腸菌のうち血清型 0166:H15 の株に着目し、完全長配列を使用したゲノム解析および細胞付着因子の特定による病原性の究明を行った。さらに、有用な分離検出法の開発のため特徴的な生化学的性状の探索も試みた。

B. 研究方法

[1] 食中毒由来大腸菌 0166:H15

株の系統解析

3 事例の食中毒事例由来株を含む 15 株の *astA* 保有大腸菌 0166:H15 (表 1) の WGS データ、および公共のデータベース (Enterobase、<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) に登録されている同血清型のシーケンスデータを使用してコアゲノムから抽出した SNP による系統樹を作製した。さらに、ゲノム解析により *astA* および各下痢原性大腸菌に関連する遺伝子 (*stx*, *elt*, *est*, *aggR*) の検出、Multilocus sequence typing (MLST) による ST の検出も行った。

[2] 完全長ゲノム配列の解析

astA 遺伝子の局在場所の同定や、特徴的なゲノム構造を明らかにするために、0166:H15 4 株および 07:H4 2 株の完全長ゲノム配列を決定した (表 2)。ロングリード解析のための DNA は、BPW 一晚培養液から、MagMAXDNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit を用いて抽出した。抽出 DNA を用いて Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore) にてライブラリー調整を行った。得られたライブラリーのシーケンス解読を R9.4.1 フローセルおよび MinION (Oxford Nanopore) にて行った。得られたロングリードおよび、過去に解読したショー

トリードを用いて、Trycycler および Unicycler を用いたハイブリッドアセンブリを行い、完全長ゲノム配列を決定した。決定した完全長ゲノム配列を用いて、保有遺伝子の BLAST による比較、replication typing (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)、薬剤耐性遺伝子の検索 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) をおこなった。染色体 CDS の BLAST 比較は GView Server (<https://server.gview.ca/>)、*astA* が存在する巨大プラスミド CDS の BLAST 比較は、GenomeMatcher (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>) によって行った。

[3] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 の完全長配列の解析により確認された 140 kbp のプラスミド (pJNE21-003-1)、および 84 kbp のプラスミド (pJNE21-003-2) について、 λ red-recombination システムにより各プラスミドにカナマイシン (Km) 耐性遺伝子を付与した後、プラスミドの抽出を行った。抽出したプラスミドをエレクトロポレーション法により細胞非付着性の株 (DH10B) へ導入し、Km 添加 LB 培地に塗抹するこ

とでプラスミド導入株のセレクションを行った。作製したプラスミド導入株 (DH10B / pJNE21-003-1、DH10B / pJNE21-003-2) について CHO 細胞での細胞付着性の解析を行うことで付着に關与する遺伝子がプラスミド上に存在する可能性について評価を行った。

[4] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

上記 3 の解析によって、染色体上に付着関連遺伝子が存在する可能性が示唆されたため、Tn-seq 解析を実施した (図 3)。まず、JNE21-003 についてトランスポゾン (Tn5) 挿入によるランダムな遺伝子破壊株ライブラリーを作製した。作製されたライブラリーを LB に懸濁した菌液をサンプルとして CHO 細胞による付着性試験を実施した。3 時間の感染を行った後、非付着株を除去するため PBS で 3 回洗浄、0.2% Triton-X100 添加により取得した細胞溶解液を Km 添加 LB 培地にて 37°C で 18 時間培養後、取得した菌体から DNA の抽出を行った。CHO 細胞接種前のランダム破壊株から抽出した DNA サンプルを input、付着性試験後に回収した菌体から抽出した DNA サンプルを output として各サンプルについて Tn-seq 解析

を実施しシーケンスデータを取得した。取得した各サンプルのシーケンスデータを JNE21-003 の染色上から検出された 4837 の遺伝子へマッピングを行い、さらに Tn-seq Explorer を用いた解析によりマッピングデータの各遺伝子のカウント数について、遺伝子サイズの違いにより生じる誤差の修正、および値が 0 に近いほど必須遺伝子である可能性を示す必須性指数の算出を行った。input および output サンプルのカウント数から各遺伝子の output/input の値を算出し、必須性指数についてはグラフ化することで必須遺伝子と非必須遺伝子の境界値の推定を行った。

[5] 薬剤感受性試験

17 株の *astA* 保有大腸菌株を対象に 12 の薬剤 (表 3) についてディスク拡散法にて薬剤感受性試験を実施した。CTX 耐性が確認された株については、WGS 解析により ESBL 産生遺伝子の検出状況の確認も行った。

[6] 生化学的性状試験

0166:H15 株 (集発由来株および非集発由来株)、Sakai 株、EHEC 026:H11 株、K12 (MG1655) について XM-G、SS、DHL、SMAC、RX-026、クロモアガーSTEC、Vi-EHEC、XM-

EHEC の各培地に画線塗抹を行い、発育状況やコロニーの色調等観察を行った。さらに、Phnotype microarray (Biolg 社) の PM1、PM2 プレートにより 192 種類の炭素源利用能の測定を行った。方法は取扱説明書に準拠し、結果の判定はプレートリーダーによる各ウェルの吸光度の測定および目視による色調変化の確認により行った。

C. 研究結果

[1] 食中毒由来大腸菌 0166:H15 株の系統解析

SNP の抽出結果から最尤法により作製した系統樹、および MLST と各遺伝子保有状況について図 4 に示した。0166:H15 株は 4 種類の MLST に分類されたが、解析を行った多くの株は ST349 に分類され、一方で 3 事例の食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。ST2914 の系統には日本以外にも複数の国から分離された株が含まれていた。*astA* および下痢原性大腸菌 (EHEC、ETEC、EAEC) に関連する遺伝子は ST349 と ST2914 の両方の系統の株から検出された。

[2] 完全長ゲノム配列の解析

染色体のサイズは、0166:H15 で

は 4.8 Mb から 5.1 Mb、07:H74 では 4.7 Mb であった (表 2)。保有プラスミドは 1 から 4 種であり、全ての菌株において 100 kb 以上の巨大プラスミドの保有が認められた。*astA* 遺伝子は染色体または巨大プラスミド上に 1 から 3 コピー認められた。0166:H15 では *astA* 保有プラスミド上に多数の薬剤耐性遺伝子が認められた。07:H4 では染色体上に薬剤耐性遺伝子が存在した。CDS の比較を行ったところ、染色体上に食中毒株特異的な領域は認められなかった (図 1)。病原遺伝子島の検索からは、莢膜関連遺伝子 (*kps* 等) および VI 型分泌装置関連遺伝子群が外来遺伝子として検出された。*astA* を保有するプラスミドの比較を行った結果、食中毒由来 0166:H15 および 07:H4 では類似したプラスミドを有することが明らかとなった (図 2)。一方、散発下痢症由来で *stx* を有する株 (JNE162304) では、類似したプラスミドは認められなかった。同プラスミドに共通する特徴は、VI 型分泌装置関連遺伝子群 (染色体上に存在する遺伝子とは異なる) および *bfp* オペロンの存在であった。

[3] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 の各プラスミド導入株 (DH10B pJNE21-003-1、DH10B pJNE21-003-2) の CHO 細胞への付着性試験についてはいずれも非付着性であった (図 5)。そのため、付着に関与する遺伝子は染色体ゲノム上に存在する可能性が示唆された。

[4] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

Tn-seq により取得したシーケンスデータについて染色体ゲノム上へマッピングと Tn-seq Explorer による解析を行った。output/input の値と遺伝子数のグラフ化により、output と input で差が認められないことから 1 を示す遺伝子が最も多く (1016 種類) 検出された (図 6A)。さらに必須性指数と遺伝子数のグラフ化により、必須及び非必須遺伝子により示される二峰性のグラフからその最低値の 8 以上が非必須遺伝子である可能性が示唆された (図 6B)。染色体上の 4,837 の遺伝子のうち output/input の値が 0.9 以下となる遺伝子は 1,194 種類、そのうち必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1,078 種類存在した (図 6C)。

[5] 薬剤感受性試験

astA 保有株 17 株を対象に 12 薬

剤に対する感受性試験を実施した結果、0166:H15については3事例のうち2事例で同一耐性パターンを示した(表4)。さらに8事例の食中毒由来株のうち5事例はアンピシリン耐性を示し、CTX耐性であった3株からは *bla_{CTX-M}* が検出された。

[6] 生化学的性状試験

大腸菌 0166:H15 の各事例株等について8種類の培地へ画線塗抹を行い発育状況やコロニーの色調について観察を行った結果、大腸菌 0166:H15 は CT 添加培地に発育しないことが確認され、発育が確認された培地のコロニーについて特徴的な性状は認められなかった。また、Phenotype microarray による炭素源利用能の測定結果では、MacConkey 基礎培地等への添加により容易に作成可能な分離培地の開発を目的としているため、炭素源のうち糖に着目して評価を行ったが、条件に合うものは確認されなかった。

D. 考察

本研究では *astA* 保有大腸菌のうち食中毒起因菌として複数回報告されている血清型である 0166:H15 の株に着目し解析を行った。分離検出法開発を目的とした特徴的な

性状等探索では、簡便な検出法に利用可能な性状等は検出されなかった。一方で、病原性究明を目的としたゲノム解析や表現型の解析では有用なデータを取得することができた。

0166:H15 株が示す MLST 結果のうち ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。さらに、昨年度から実施している細胞付着性の解析においても、3事例の食中毒事例由来株(ST2914)のみが細胞付着性を示したことも病原性系統を示唆する裏付けとなっている。また、公共データベース上の ST2914 の株には、日本以外の複数の国における分離株が含まれていたことから、集団下痢症の起因菌となる 0166:H15 株は国外においても分布している可能性が示唆された。しかし、完全長配列によるプラスミドや染色体の比較では、3事例の食中毒事例由来株のみが共通して保有する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかった。そのため、病原性解明や付着因子特定のためには、検出された既知の病原性遺伝子の詳細な解析、あるいは未特定の病原因子にも着目して解析を続ける必要がある。

astA 保有大腸菌 0166:H15 の付着に関与する遺伝子は染色体上に

存在する可能性が示唆された。しかし、JNE21-003 の染色体上には 4,837 種類の遺伝子が確認され、そのうち output/input の値が 1 より少ない値となる遺伝子は 1,194 種類存在した。付着因子特定を行うには、今後、抽出した各遺伝子の破壊株等作製など追加の解析が必要となってくることから、より可能性が高い遺伝子を抽出するための条件設定が重要となる。必須性指数については、今回の解析により値が 8 以上の遺伝子が非必須遺伝子である可能性が高いことが確認されたが、output/input 値については指標となる数値が現時点で存在しない。しかし、本研究により JNE21-003 が保有する 140 kbp と 84 kbp のプラスミドは CHO 細胞への付着性には関与していないことが示唆されたことから、Tn-seq データをこれらプラスミド上の遺伝子にマッピングし、同様の解析を行うことで、抽出条件設定に有用なデータが取得される可能性がある。今後、遺伝子破壊株の作製とその解析等により、本菌の付着因子が特定されれば、各検査機関で利用可能となる簡便な検出系の確立が可能となることから、引き続き解析を行うことが重要であると考えられる。

E. 結論

血清型が O166:H15 である *astA* 陽性大腸菌に着目した解析により、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。本菌の病原性究明のためには、引き続き付着因子の特定や病原性関連遺伝子の詳細な解析を行う必要性がある。

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)

李 謙一. EHEC における WGS 解析. 令和 5 年度 北海道・東北・新潟ブロック腸管出血性大腸菌検査担当者研修会. 令和 6 年 1 月 18 日. 岩手

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

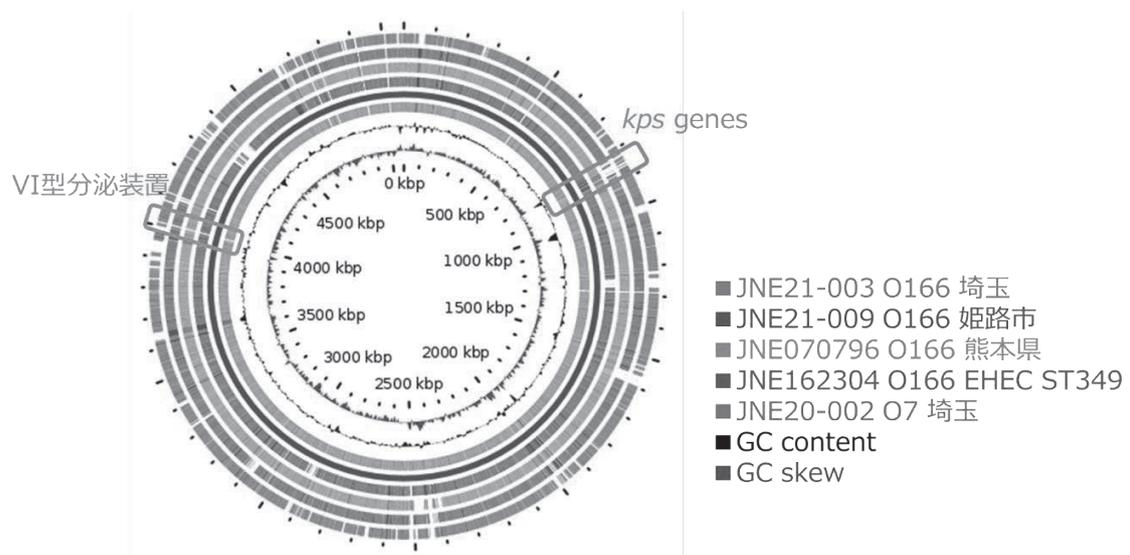


図 1 BLAST atlas による O166:H15 および O7:H4 完全長ゲノム配列の比較

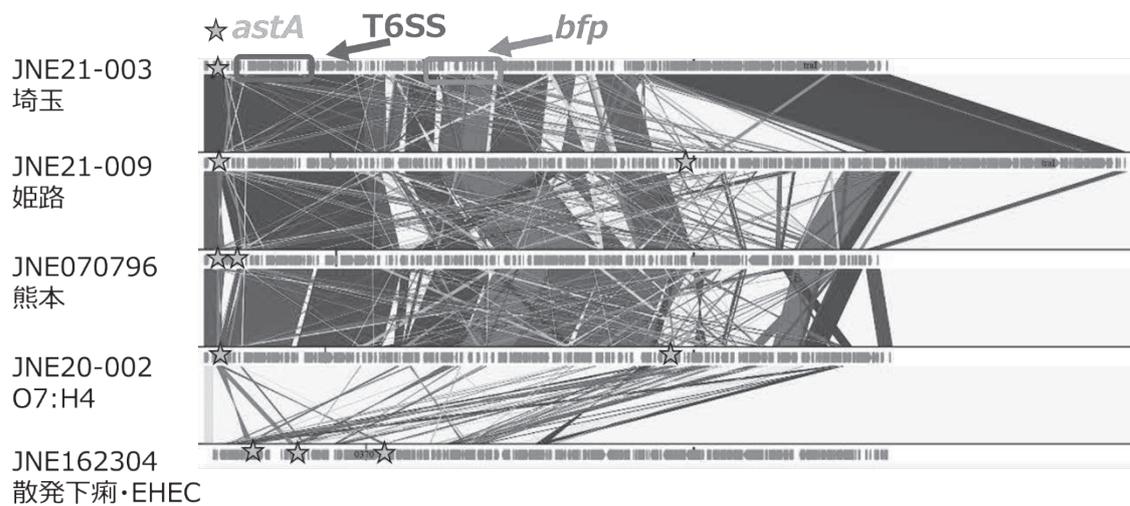


図 2. *astA* 保有プラスミドの完全長配列比較

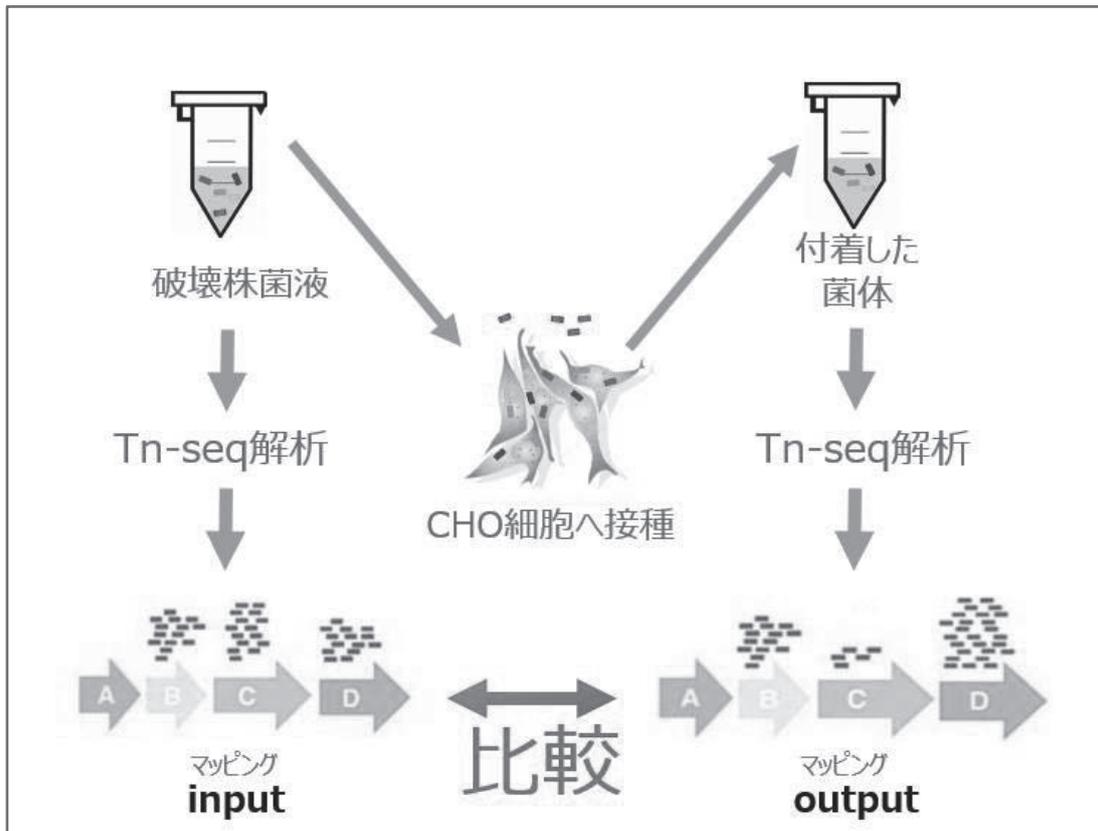


図 3. Tn-seq 解析法を用いた細胞付着因子特定の概要

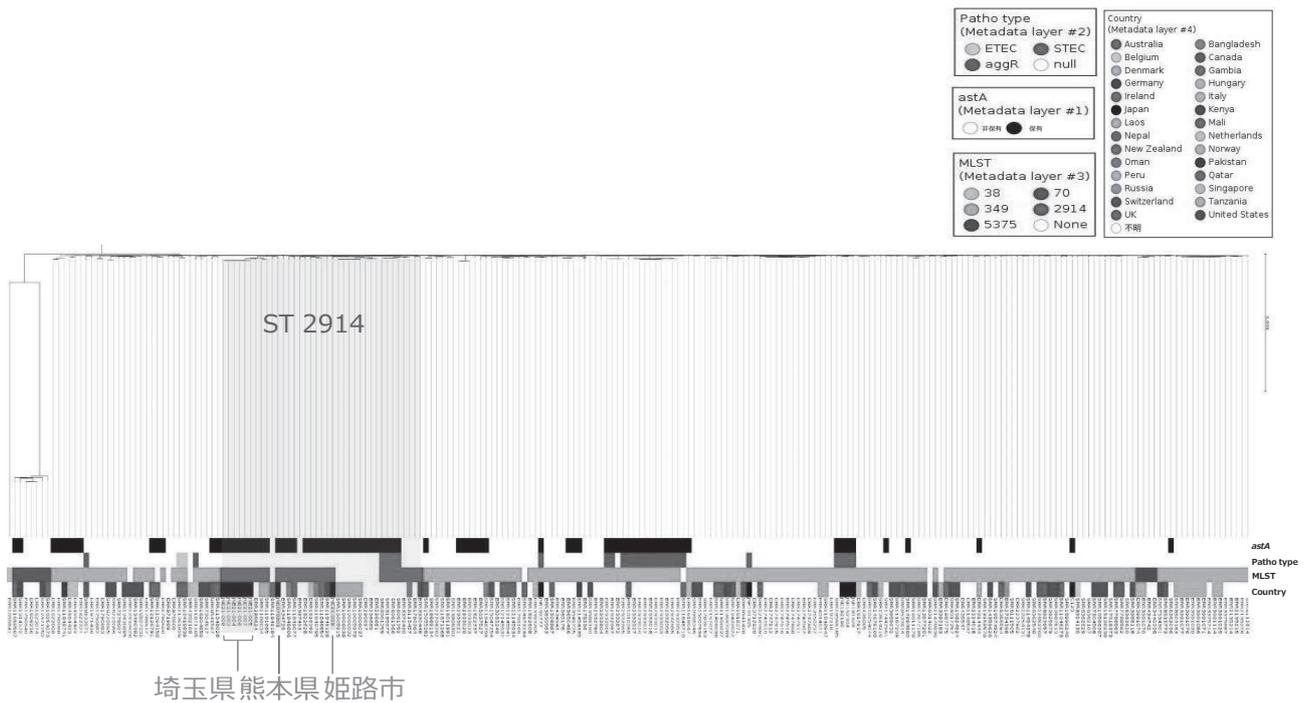


図 4. *astA* 保有大腸菌 O166:H15 の系統解析と各食中毒事例株の系統

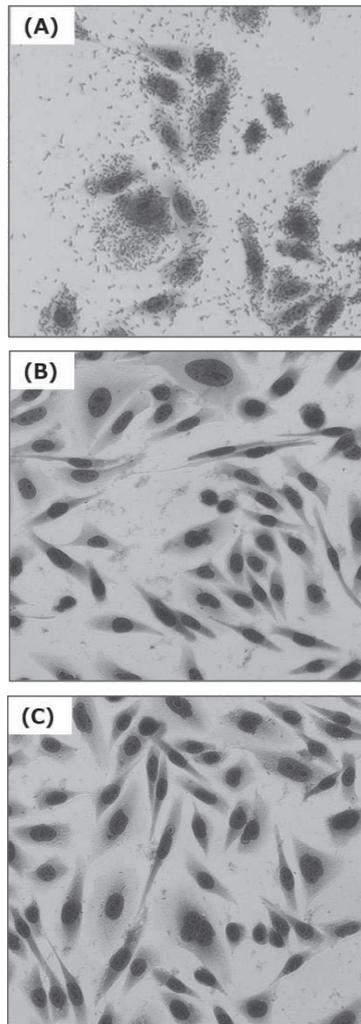
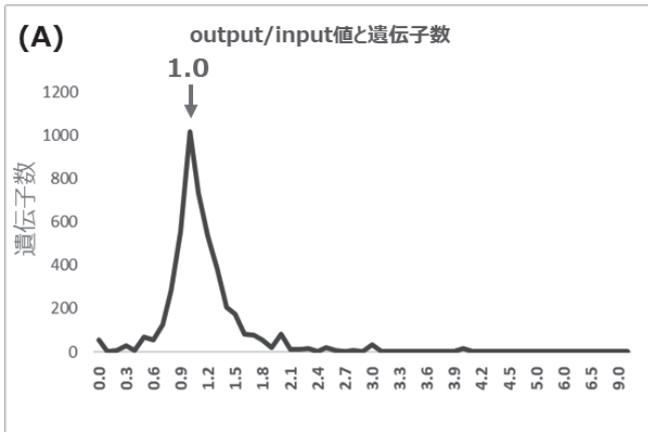


図 5. JNE21-003 (A) および DH10B に JNE21-003 のプラスミドを導入した DH10B/pJNE21-003-1 (B) と DH10B/pJNE21-003-2 (C) の CHO 細胞における付着性試験結果



(C)

output/input	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	合計
遺伝子数	57	2	8	29	8	67	57	128	284	554	1194
EI*8以上の遺伝子数	38	2	7	13	7	44	50	104	268	545	1078

*EI, 必須性指数

図 6 . Tn-seq データを JNE21-003 染色体上の遺伝子にマッピング後の各 output/input 値の遺伝子数 (A)、各必須性指数の遺伝子数 (B) および output/input が 0.9 以下の遺伝子数と合計

表1. 系統解析に使用した株

分類 (株数)	ID	血清型	由来
non-EHEC (10)	JNE070796	O166:H15	食中毒事例 (熊本県)
	JNE070801	O166:H15	食中毒事例 (熊本県)
	JNE21-003	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-004	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-005	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-006	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-007	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-008	O166:H15	食中毒事例 (埼玉県)
	JNE21-009	O166:H15	食中毒事例 (姫路市)
	C123	O166:H15	動物由来
EHEC (5)	JNE181928	O166:H15	散発下痢症 (宮城県)
	JNE162304	O166:H15	散発下痢症 (大阪府)
	JNE101305	O166:H15	散発下痢症 (愛知県)
	JNE192196	O166:H15	健康者 (香川県)
	JNE192777	O166:H15	健康者 (山梨県)

表2. 完全長ゲノム配列の特徴

ID	Serotype	Source	Replicon	size (bp)	Replicon typing ^a	astA	Antimicrobial resistance gene
JNE21-003	O166:H15	埼玉県 食中毒	chromosome	5,070,559	- ^b	v31×3	-
			p140k ^c	139,944	IncFII	X12	-
			p85k	84,721	IncI1-I(Alpha)	-	-
			p33k	3,345	-	-	-
			p2k	1,945	-	-	-
JNE21-009	O166:H15	姫路市 食中毒	chromosome	5,144,898	-	-	-
			p189k	188,563	IncFII	X11, v17	-
			p163k	163,241	IncFII(pHN7A8)	-	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA5</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>mph(A)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i>
			p2k	2,012	-	-	-
JNE070796	O166:H15	熊本県 食中毒	chromosome	5,050,164	-	v31×3	-
			p138k	138,061	IncFII(pHN7A8)	prot, v17v ^d	-
			p92k	91,511	IncFII	-	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA5</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>mph(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i>
			p58k	5,831	-	-	-
			chromosome	4,830,611	-	-	-
JNE162304	O166:H15	散発下痢 大阪府	p140k	140,281	-	protv×3 ^c	-
			p112k	112,125	IncFIB(AP001918),IncFII(pHN7A8)	V25	-
			p59k	59,430	IncI2(Delta)	-	-
			chromosome	4,724,187	-	-	<i>blaCTX-M-15</i> , <i>qnrS1</i>
JNE20-002	O7:H4	埼玉県 食中毒	p141k	140,595	IncFIC(FII)	X08, X13	-
			chromosome	4,724,738	-	-	<i>blaCTX-M-15</i> , <i>qnrS1</i>
JNE20-005	O7:H4		p142k	140,755	IncFIC(FII)	X08, X13	-

^aInc type identified by PlasmidFinder

^b-, not detected

^cp, plasmid

^dv17v, single nucleotide variant of v17; protv, single nucleotide variant of prot

表3. 薬剤感受性試験に使用した薬剤

略記	薬剤名
AM	Ampicillin
ST	Sulfamethoxazole and trimethoprim
TC	Tetracycline
NA	Nalidixic acid
SM	Streptomycin
CP	Chloramphenicol
GM	Gentamicin
CTX	Cefotaxime
CFX	Cefoxitin
KM	Kanamycin
CPFX	Ciprofloxacin
FOM	Fosfomycin

表4. 各供試株の薬剤感受性パターンとESBL産生遺伝子

血清型	non-EHEC /EHEC	自治体	株数	耐性パターン	ESBL産生遺伝子
O166:H15	non-EHEC	埼玉県	2		
	non-EHEC	熊本県	2	AM-ST-TC-NA-SM-GM	
	non-EHEC	姫路市	1	AM-ST-TC-NA-SM-GM	
	EHEC	宮城県他	4		
	EHEC	山梨県	1	AM-ST-TC-NA-SM-CP-CPFX	
O7:H4	non-EHEC	埼玉県	2	AM-CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}
	non-EHEC	東京都	1	TC	
	EHEC	鹿児島県	1	AM-ST-TC-NA-SM-CP	
O169 :H45	non-EHEC	姫路市	1	AM	
OgGp9:H18	non-EHEC	姫路市	1		
OgGp7 :H6	non-EHEC	姫路市	1	AM-CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}

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5年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食中毒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 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てきた。今年度は、昨年度の調査で特徴的な汚染が認められた鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける汚染菌量を最確数法で推計するとともに、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動について検討した。その結果、食品の種類によって汚染率は様々であったが、汚染菌量は食品の種類に関わらず、概ね約 10^5 MPN/100g 以下であった。オクラに *astA* 保有大腸菌を接種したところ、25℃培養では菌数の一時的な増加が見られた。10℃培養ではオクラ上の菌数の増加は認められなかったが、培養開始時の菌数を長期間維持した。4℃培養では培養3日後には菌は検出されなくなった。以上の結果から、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖を抑制するためには10℃以下の環境に保管する必要があることが明らかになった。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌はその発症メカニズムや保有する病原因子によって、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素原生大

腸菌 (ETEC)、腸管凝集付着性大腸菌 (EAggEC) などに大きく分けられる。しかし、これらの分類に属さない下痢原性大腸菌による食中毒事例が多発している。特に *astA* (EAST1: 腸管凝集付着性大腸菌耐

熱性エンテロトキシン 1) 大腸菌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* 保有大腸菌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。昨年度までの研究で、鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、ベビーコーンで *astA* 保有大腸菌が高率に検出されることを明らかにした。今年度は、これらの食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の測定を行った。また、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動を解析し、*astA* 保有大腸菌の増殖を阻害できるオクラの保管温度について考察した。

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（表1～5）。

[2] 最確数法による汚染菌量の推定

最確数法による *astA* 保有大腸菌の計数を以下の手順で行った（図

1）。検体 25 g を無菌的にストマッカー袋に採取した。これに mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、1 分間、ストマッカー処理した。これを 10 倍乳剤とした。10 倍乳剤を増菌培地でさらに希釈し、100 倍乳剤を作製した。最確数法は 5 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 mL、100 倍乳剤 1 mL および 0.1 mL に増菌培地を加えて最終 10 mL にした。各濃度につき試験管 5 本ずつ用意した。42℃、24 時間、培養を行ない、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、大腸菌の指標としての *uidA* と *astA* の検出を行った（図 2）。*uidA* と *astA* の両方が検出された試験管を陽性とし、陽性となった試験管の数から、*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定した。

[3] オクラにおける増殖挙動の解析

TSB 培地 10 mL に 1 エーゼの菌を接種し、37℃、72 時間培養した。菌液をよく攪拌し、1 mL を PBS 100 mL に加え、よく攪拌した（ 1×10^7 cfu/mL）。滅菌したトレイにオクラを並べ、オクラ 1 本につき菌液 10 μ L（ 1×10^5 cfu）を接種

し、乾燥した。オクラをストマッカー袋に入れ、ヒートシールした後、ストマッカー袋を4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にストマッカー袋を取り出し、10倍量のmEC培地を加えた。2分間、ストマッカー処理し、乳剤1 mLとPBS 9 mLを混合した。以下、同様に段階希釈を行った。各希釈段階0.1 mLをそれぞれ2枚のクロモアガーECCに接種した。35℃、24時間培養後、コロニーを計数した。

C. 研究結果

[1] 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

今回は鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーン、それぞれ35検体、また、その他野菜19検体を対象に（表1～5）、最確数法を用いて *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定を行った（図3～図5）。

鶏肉は35検体中33検体(94%)が陽性となった(表6)。31検体は20～3,477 MPN/100 gであった。1検体は定量限界値以上(1.6×10^4 MPN/100 g)であった(図3)。陽性検体中、62%の検体の汚染菌量は $10^2 \sim 10^3$ MPN/100 gの範囲に分布していた。全検体で

の汚染菌量の平均は1,313 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は1,407 MPN/100 gであった(表6)。

豚内蔵肉およびひき肉は35検体中17検体(49%)が陽性となった(表6)。汚染菌量は20～5,422 MPN/100 gの範囲であった(図3)。陽性検体中、76%の検体の汚染菌量は 10^2 MPN/100 g以下であった(図3)。全検体での汚染菌量の平均は559 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は724 MPN/100 gであった(表6)。

オクラは35検体中7検体(20%)が陽性となった(表6)。汚染菌量の範囲は20～3,476 MPN/100 gであった(図4)。汚染菌量は均一に分布していた。全検体での汚染菌量の平均は380 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は732 MPN/100 gであった(表6)。

ヤングコーンは35検体中15検体(43%)が陽性となった(表6)。汚染菌量の範囲は20～定量限界値以上であった(図4)。陽性検体の53%は 10^2 MPN/100 g以下の汚染菌量であった。残りの47%の汚染菌量は 10^3 以上であった。全検体での汚染菌量の平均は742 MPN/100 g、陽性検体における汚染菌量の平均は3,830 MPN/100 g

であった（表 6）。

鶏肉、豚肉、オクラ、ヤングコーンについては、食品ごとに陽性率に変化が見られたが、汚染菌量は概ね $10^2 \sim 10^4$ MPN/100 g 範囲であった（図 5）。また、冷凍処理の有無と汚染菌量との間に関連性は認められなかった。

オクラ、ヤングコーン以外の野菜として、アスパラガス、アボガド、いんげん、かぼちゃ、ごぼう、スナップエンドウ、トレビス、ニンニクの芽、パプリカ、ホワイトアスパラガス、芽キャベツを計 19 検体調査したが、全検体で定量限界値未満であった。

[2] オクラにおける増殖挙動の解析

オクラにオクラ由来の *astA* 保有大腸菌を接種し、 4°C 、 10°C 、 25°C で培養し、7 日までの菌数を測定した。各温度で 3 回繰り返し実験を行った。オクラ 1 本あたり 10^5 cfu/mL 接種したが、菌液を乾燥させたのち菌数を測定すると約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に低下した。

25°C で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖し、約 10^5 cfu/mL に達した。その後、菌数はやや減少したが $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL を培養 7 日目まで維持した（図 6）。

10°C で培養した場合、菌数はほ

とんど変化せず、培養 7 日目でも約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL を維持した（図 7）。

4°C で培養した場合、培養開始直後から菌数が減少し、培養 3 日目には、菌は検出されなくなった（図 8）。

D. 考察

食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量を明らかにするために、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。調査食品全体でみると汚染菌量はほとんどの検体で $10^2 \sim 10^4$ MPN/100 g 範囲であった。鶏肉 1 検体とヤングコーン 2 検体だけが定量限界値以上 (1.6×10^4 MPN/100 g) であった。鶏肉は昨年度までの調査結果と同様に汚染率が高く、また今回の調査で汚染菌量も高いことが明らかになった。この結果から、鶏肉は一般的に *astA* 保有大腸菌に汚染されているものと考えられた。*astA* 保有大腸菌対策を考える場合、鶏肉は最も優先して対応しなければならない食品であると考えられた。豚肉も汚染率は高かったが、汚染検体の 76% は 10^2 MPN/100 g 以下であり、鶏肉と比べると汚染菌

量は低かった。しかし、一部の検体では 10^3 MPN/100 g を超えているため、注意が必要である。オクラは検体ごとに汚染菌量が分散しており、汚染菌量に特定の傾向は認められなかった。ヤングコーンは汚染検体の 53% が 10^2 MPN/100 g 以下の汚染菌量であったが、残りの汚染検体は 10^3 MPN/100 g を超えており、2 検体は定量限界値を超えていた。この結果から、ヤングコーンは検体によって汚染菌量が大きく異なることが示唆された。しかし、陽性検体だけの平均汚染菌量をみると、鶏肉と同様、非常に高い結果となった。陽性率は鶏肉と比べると低いですが、検体によって汚染菌量が多い場合があるので、ヤングコーンを調理する場合は、十分に加熱を行う必要があると考えられた。また、ヤングコーンに見られる汚染菌量のばらつきの原因がどのようなものであるか、明らかにすることができれば、ヤングコーンをはじめその他の野菜における下痢原性大腸菌の自然汚染の予防等に有用であると考えられた。

オクラとヤングコーンのうち、オクラは生や浅漬けで喫食するため、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖性について検討を行った。今回の結果から、オクラを 10°C 以

下の環境で保管すれば、*astA* 保有大腸菌の増殖を抑制できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推計結果から、市販されているオクラには最高 3×10^3 MPN/100 g の *astA* 保有大腸菌が汚染していると考えられた。オクラ 1 本に換算すると、約 3×10^2 MPN の汚染があると推計された。一方、増殖挙動の解析から、保管温度が高いと、オクラ 1 本あたり約 10^5 cfu/mL まで増殖できることが示唆された。このことから、市販のオクラも保管温度が高ければ、オクラ表面で菌が増殖する可能性があると考えられた。また、今回の研究では、オクラ 1 本につき 1×10^5 cfu の *astA* 保有大腸菌を接種したが、乾燥後、すぐに菌数を測定した結果、 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に菌数が低下していた。乾燥に伴い、死滅した可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果から、鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、オクラ、ベビーコーンの汚染菌量が明らかになった。この結果から、これらの食品は *astA* 保有大腸菌の汚染率だけでなく、汚染菌量も高いことが明らかになった。*astA* 保有大腸菌対策を

行う場合には、これらの食品が最重要食品になると考えられた。

オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖挙動の解析から、保管温度が適切でなかった場合、オクラの表面でも十分に増殖、生残できることが明らかになった。オクラは海外から輸入されているものが多く、輸入過程の温度管理が適切でないと、食中毒の原因になる可能性があ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)

なし

(学会等発表)

Ohnishi, T. and Hara-Kudo, Y.
Contamination of *Arcobacter*
and *Campylobacter* species in
retail foods available in
Japan. 55th UNITED STATES-
JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON
DEVELOPMENT & UTILIZATION OF
NATURAL RESOURCES 令和5年8月
6-11日. カリフォルニア

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 食肉における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大

腸菌の汚染状況. 第44回日本食品微生物学会学術総会. 令和5年9月21-22日. 大阪

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 野菜における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 日本食品衛生学会第119回学術講演会. 令和5年10月12日. 東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

最確数法による*astA*保有大腸菌数の推定

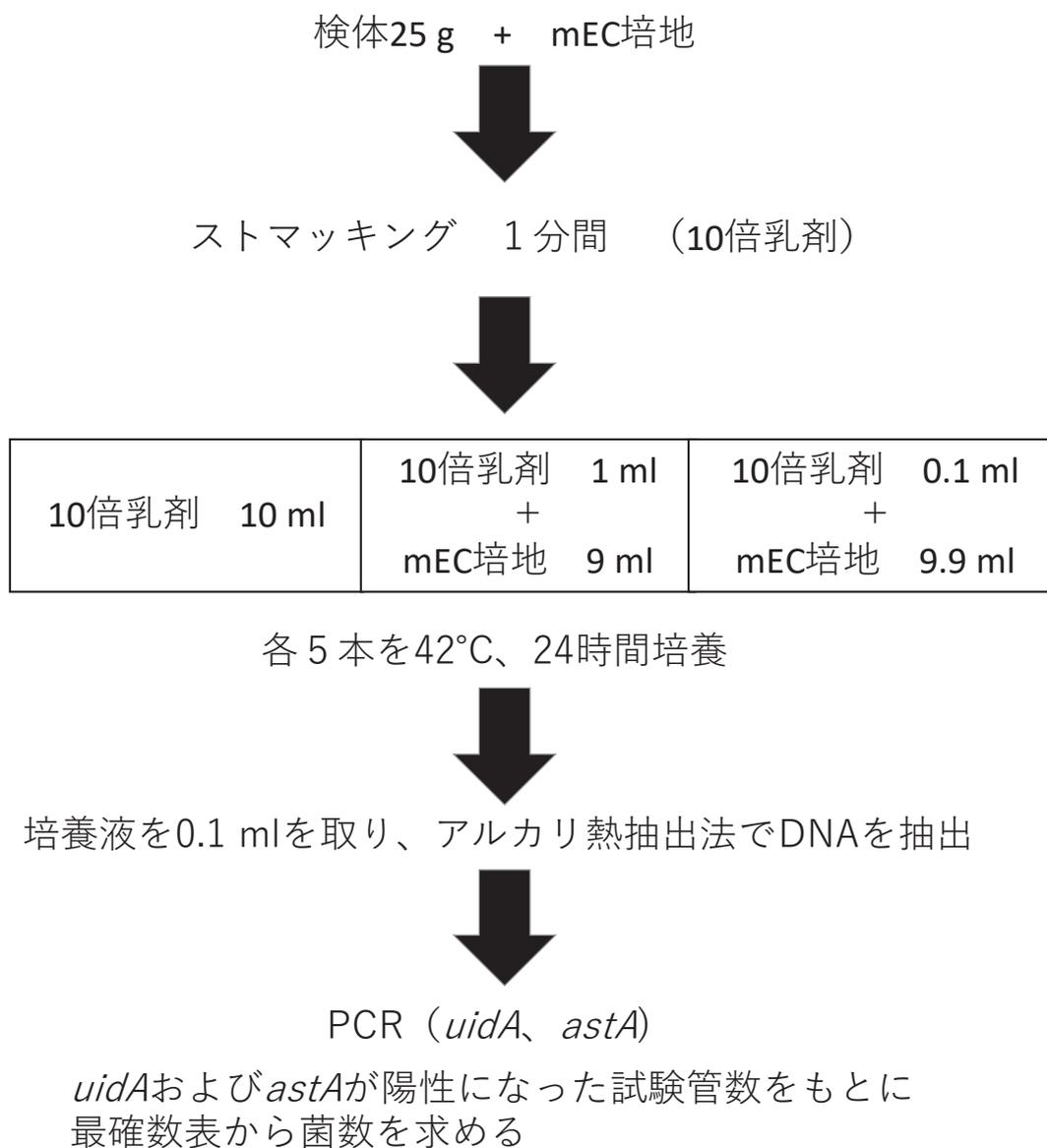


図1 最確数による汚染菌数の推定

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)
astA	TGCCATCAACACAGTATATCCG	102	0.2
	ACGGCTTTGTAGTCCTCCAT		
uidA	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1487	0.2
	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG		

PCR反応液組成

Quick Taq	12.5 μ l
astA -F (50 μ M)	0.1 μ l
astA -R (50 μ M)	0.1 μ l
Uid-F (50 μ M)	0.1 μ l
Uid-R (50 μ M)	0.1 μ l
DNA抽出液	1.0 μ l
PCR用水	11.1 μ l
合計	25.0 μ l

PCR反応条件

<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
63°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>1.5 m</u> × 35
68°C	5 min

図2 *astA* および *uidA* 検出のための PCR 法

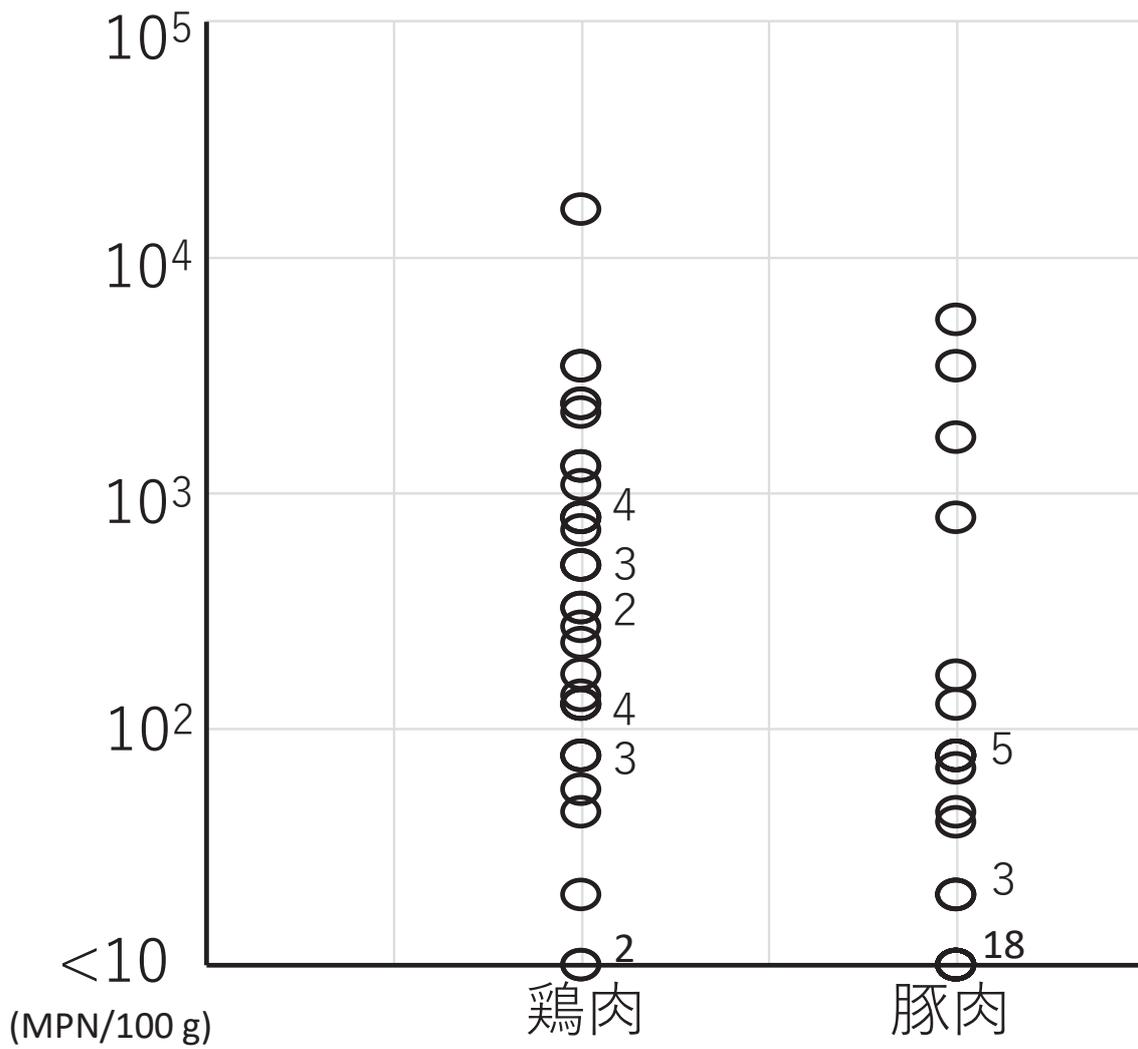


図3 鶏肉および豚肉における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量

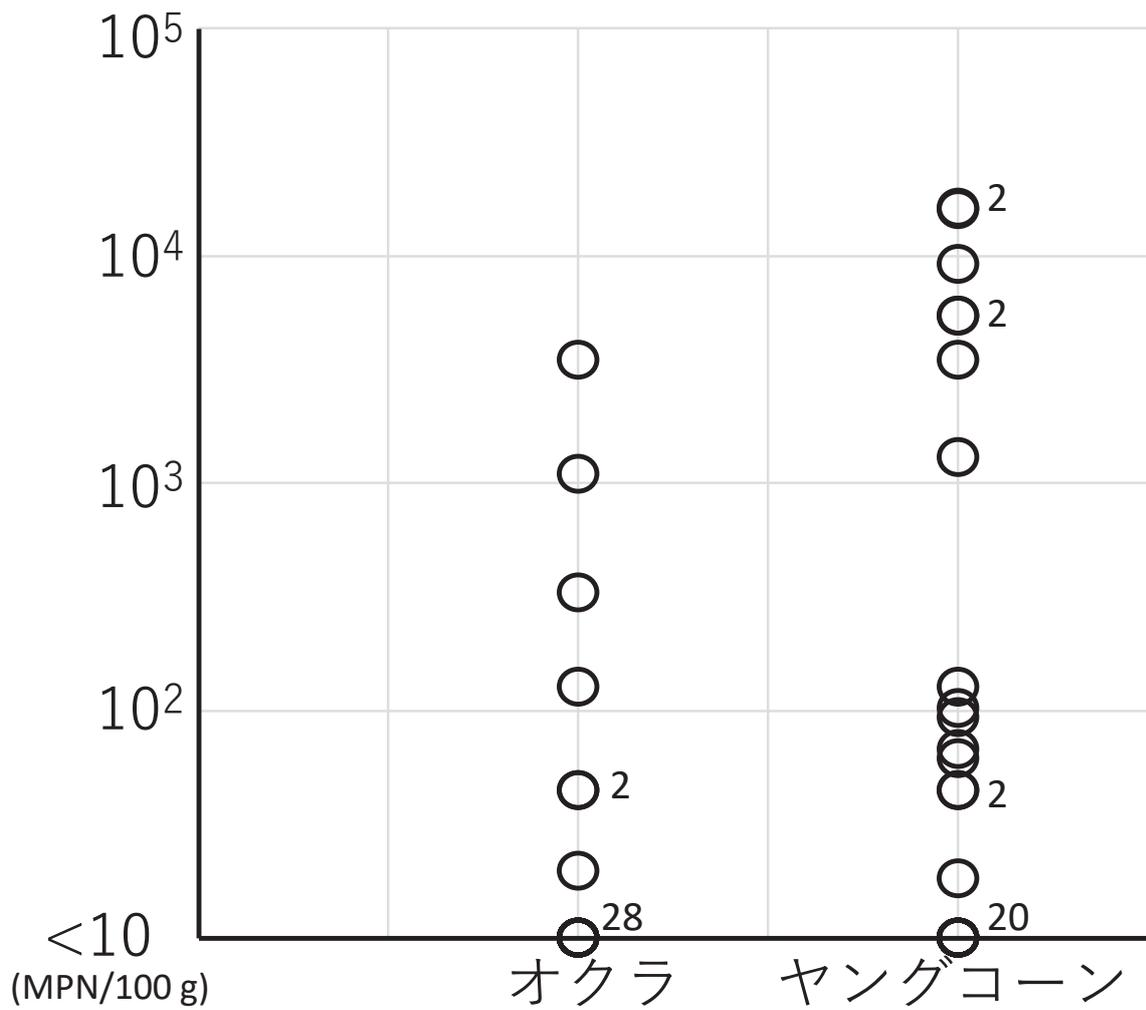


図4 オクラおよびヤングコーンにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量

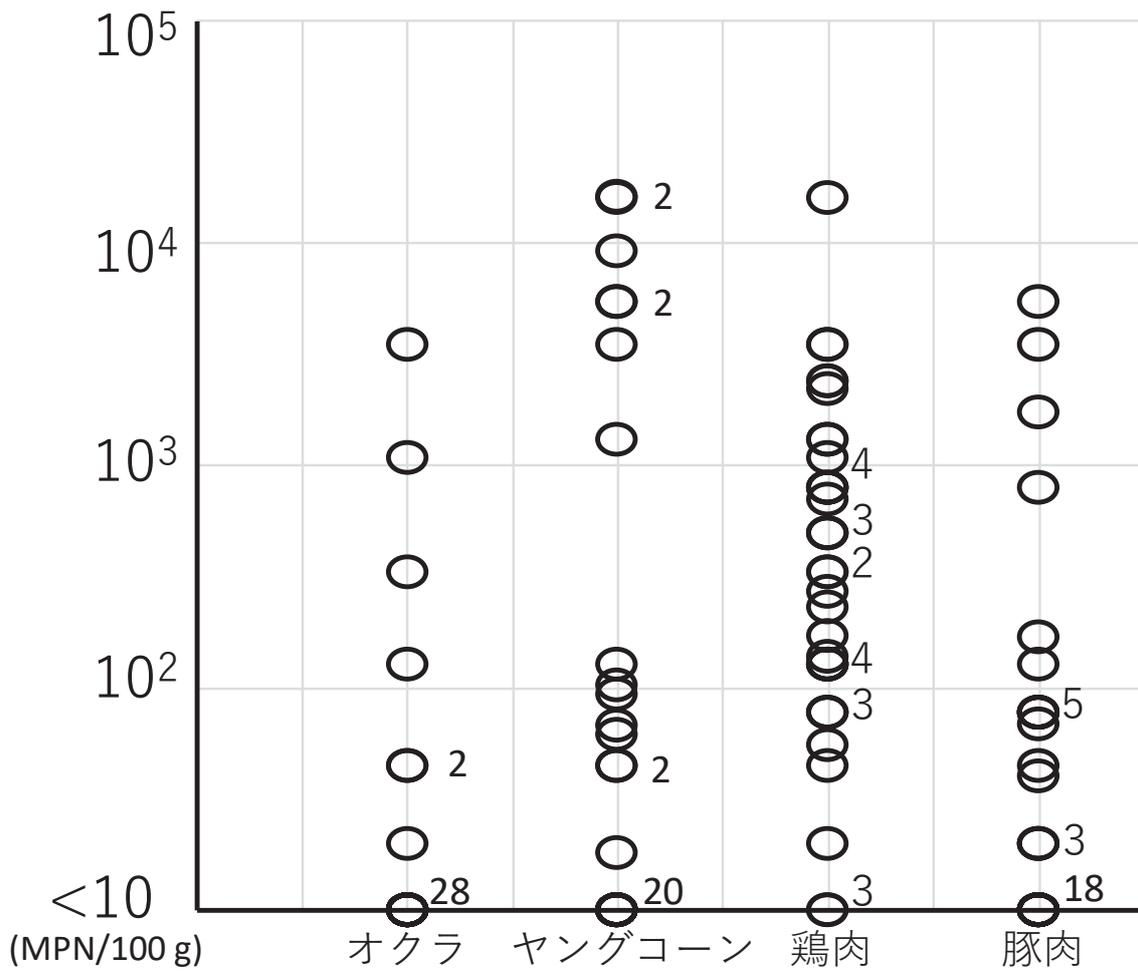


図5 *astA* 保有大腸菌の汚染菌量 (まとめ)

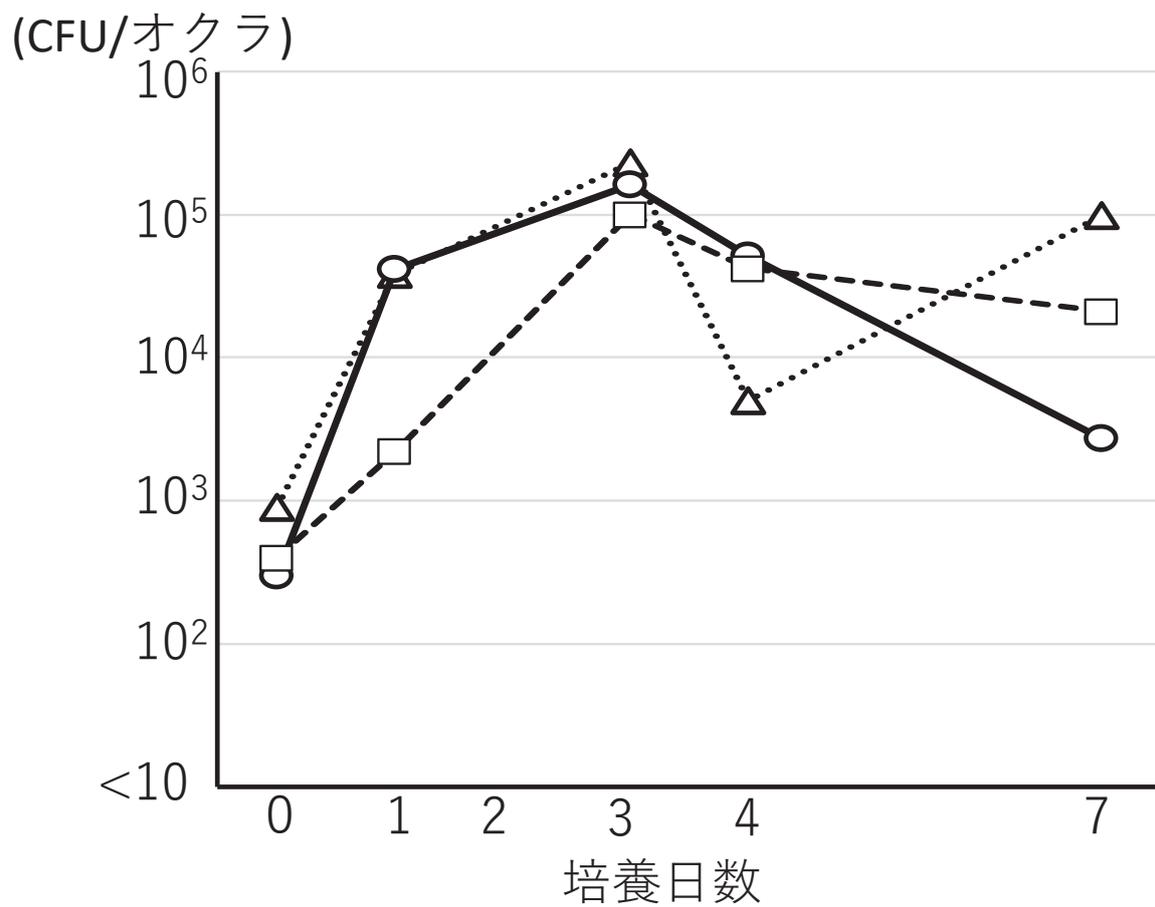


図6 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (25°C)

(○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

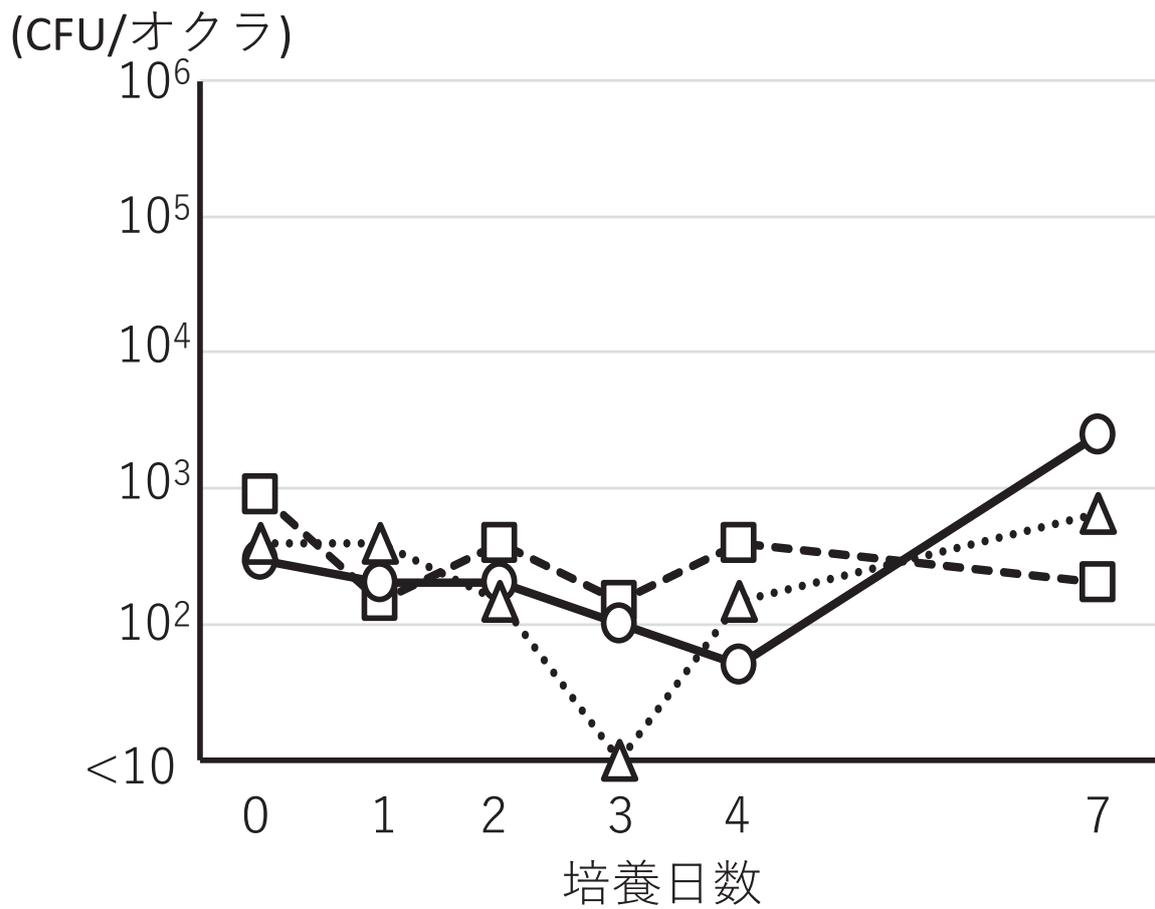


図7 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (10°C)

(○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

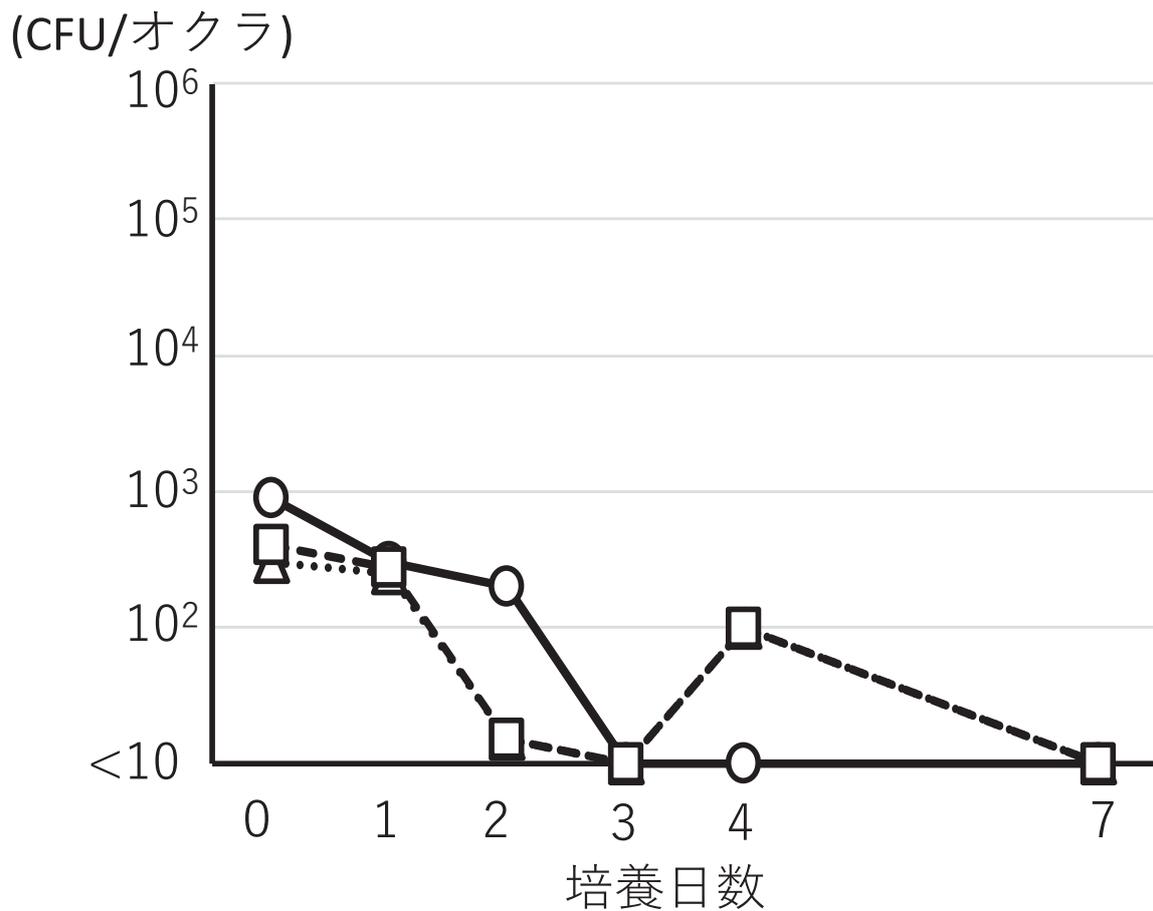


図8 オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖 (4°C)
 (○ : 1回目、□ : 2回目、△ : 3回目)

表1 astA保有大腸菌汚染菌量推定に用いた鶏肉検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
若鶏もも肉	国産	不明	2023/1/19
若鶏ムネこま切	国産	不明	2023/1/30
鶏モモ親子并用	国産	不明	2023/2/2
若鶏手羽小間肉(ムネ)	国産	不明	2023/2/6
鶏むね小間切れ	国産	不明	2023/2/9
鶏むねひき肉	国産	不明	2023/3/16
若鶏肝	タイ	冷凍	2023/4/17
鶏バックリブ	国産	不明	2023/4/17
若鶏小間切れ	国産	不明	2023/4/20
鶏レバー	国産	不明	2023/4/27
鶏ムネ小間切れ	国産	不明	2023/4/27
若鶏レバー	国産	不明	2023/5/15
若鶏もも角切り	ブラジル	冷凍	2023/5/15
鶏レバー	国産	冷凍	2023/5/18
若鶏手羽先	国産	不明	2023/5/18
親鶏ムネモモ角切り	国産	不明	2023/5/18
若鶏砂肝	国産	不明	2023/5/22
若鶏ささみ	国産	冷凍	2023/5/22
若鶏はらみ	国産	不明	2023/5/22
若鶏やげん軟骨	国産	不明	2023/5/25
鶏むねカレー用	国産	不明	2023/5/25
鶏もも角切り	国産	冷凍	2023/5/25
鶏砂肝	国産	不明	2023/5/30
鶏ささみ	国産	不明	2023/5/30
鶏むねひき肉	国産	冷凍	2023/5/30
若鶏手羽中	国産	不明	2023/5/31
若鶏もも	国産	不明	2023/5/31
鶏ヤゲン軟骨	ブラジル	冷凍	2023/5/31
鶏モモ	国産	不明	2023/6/5
鶏むね	国産	不明	2023/6/5
鶏肝(肝臓、心臓)	国産	不明	2023/6/5
若鶏手羽中ハーフ	国産	不明	2023/6/8
若鶏ヒザ軟骨	国産	冷凍	2023/6/8
鶏モモ	タイ	冷凍	2023/6/8
若鶏ムネミンチ	国産	不明	2023/6/8

表2 astA保有大腸菌汚染菌量推定に用いた豚肉検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
豚レバー	国産	不明	2023/1/26
豚赤身ひき肉	国産	不明	2023/1/30
豚ハツスライス	国産	不明	2023/2/2
豚ひき肉	国産	冷凍	2023/2/6
豚レバー	国産	不明	2023/2/6
豚小間切れ	国産	不明	2023/2/13
豚レバー	国産	不明	2023/2/16
豚タン	国産	不明	2023/2/20
豚こま切れ	国産	不明	2023/3/1
豚ひき肉	国産、メキシコ	冷凍	2023/3/9
豚肩うす切り	国産	不明	2023/3/16
豚レバー	国産	不明	2023/4/10
豚切り落とし	国産	不明	2023/4/10
豚ハツスライス	国産	不明	2023/5/15
豚ミンチ	国産、メキシコ	冷凍	2023/5/15
豚小間切れ	国産	不明	2023/5/18
豚赤身ひき肉	国産	冷凍	2023/5/18
豚レバー	国産	不明	2023/5/18
豚モモ一口カツ用	国産	不明	2023/5/22
豚肩切り落とし	カナダ	不明	2023/5/22
豚レバー	国産	不明	2023/5/22
豚レバー	国産	不明	2023/5/25
豚あらびき肉	国産	不明	2023/5/25
豚モモ極うす切り	青森	不明	2023/5/25
豚ロースうす切り	国産	不明	2023/5/30
豚タン	国産	不明	2023/5/30
豚ハラミ	国産	不明	2023/5/30
豚こま切れ	国産	不明	2023/5/31
豚レバー	国産	不明	2023/5/31
豚ひき肉	国産	冷凍	2023/5/31
豚ロース切り身	アメリカ	不明	2023/6/5
豚ハツ	国産	不明	2023/6/5
豚バラ焼肉用	デンマーク	冷凍	2023/6/5
豚小間切れ	カナダ	不明	2023/6/8
豚粗挽きミンチ	国産	不明	2023/6/8

表3 *astA* 保有大腸菌汚染菌量推定に用いたオクラ検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/1/19
オクラ	タイ	非冷凍	2023/1/26
オクラ	タイ	非冷凍	2023/1/30
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/2
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/6
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/9
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/13
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/16
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/20
オクラ	タイ	非冷凍	2023/2/21
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/2/28
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/1
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/1
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/6
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/13
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/13
オクラ	タイ	非冷凍	2023/3/16
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/3/16
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/10
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/20
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/20
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/20
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/24
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/24
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/27
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/27
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/4/27
オクラ	タイ	非冷凍	2023/4/27
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9
オクラ	フィリピン	非冷凍	2023/5/9

表5 *astA* 保有大腸菌汚染菌量推定に用いたその他野菜検体

品名	産地	冷凍状況	購入日
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/2/9
ホワイトアスパラガス	ペルー	非冷凍	2023/2/16
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/2/16
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/2/20
スナップエンドウ	グアテマラ	非冷凍	2023/2/21
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/2/21
パプリカ	ニュージーランド*	非冷凍	2023/2/28
アボカド	メキシコ	非冷凍	2023/2/28
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/1
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/3/1
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/6
芽キャベツ	メキシコ	非冷凍	2023/3/6
アボカド	メキシコ	非冷凍	2023/3/9
いんげん	オマーン	非冷凍	2023/3/9
アスパラガス	メキシコ	非冷凍	2023/3/9
ゴボウ	中国	非冷凍	2023/3/9
トレビス	アメリカ	非冷凍	2023/3/13
にんにくの芽	中国	非冷凍	2023/3/16
かぼちゃスライス	ニュージーランド*	非冷凍	2023/3/16

表 6 *astA* 保有大腸菌の汚染状況

	陽性率 (%)	平均* ¹ (MPN/100g)	陽性検体平均* ¹ (MPN/100g)
鶏肉	94	1,313	1,407
豚肉	49	559	724
オクラ	20	380	732
ヤングコーン	43	742	3,830

*1 定量下限値未満の検体の汚染菌量を 0 cfu/100 g、定量上限値以上の検体の汚染菌量を 16,000 cfu/100 g として計算した

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., Ohya, K., Yoshinari, T., Ohnishi, T., Mizukami, K., Suzuki, T., Takinami, K., Suzuki, T., Lee, K., Iyoda, S., Akeda, Y., Yahata, Y., Tsuchihashi, Y., Sunagawa, T., Hara-Kudo, Y.	Atypical diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> in milk related to a large foodborne outbreak.	Epidemiology and Infection	11(151)	e150	2023
Hirose, S., Konishi, N., Sato, M., Suzumura, K., Obata, H., Otsuka, K., Doi, R., Goto, K., Kai, A., Arai, S., and Hara-Kudo, Y.	Growth and survival of <i>Escherichia albertii</i> in food and environmental water at various temperature.	Journal of food protection	87(4)	1002-49	2024
Arai, S., Hirose, S., Yanagimoto, K., Kojima, Y., Yamaya, S., Yamanaka, T., Matsunaga, N., Kobayashi, A., Takahashi, N., Konno, T., Tokoi, Y., Sakakida, N., Konishi, N., and Hara-Kudo, Y.	An interlaboratory study on the detection method for <i>Escherichia albertii</i> in food using real time PCR assay and selective agars.	International Journal of Food Microbiology	414	1106-16	2024
新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子。	食品および環境水からの <i>Escherichia albertii</i> 分離法の検討および分離株の解析	日本食品微生物学会雑誌	印刷中	印刷中	2024

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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部 ・ 部長

(氏名・フリガナ) 工藤 由起子 ・ クドウ ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<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。