

令和3～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3～令和5(2021～2023)年度

総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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	25
-----------	----

工藤 由起子

II. 総合研究分担研究報告書

1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立	35
---------------------	----

工藤 由起子

2. 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析	47
----------------------------	----

大岡 唯祐

3. 病原大腸菌食中毒事例株の解析	57
-------------------	----

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	69
-------------------------	----

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
---------------------	----

I．総 合 研 究 報 告 書

食中毒原因細菌の検査法の 整備のための研究

工藤 由起子

令和 3 ～ 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

総合研究報告書

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、新興食中毒細菌として位置づけられる大腸菌近縁の *Escherichia albertii* および *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) 保有大腸菌を対象に 4 研究分担者にて実施した。分担研究 (1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立では、*E. albertii* 食品検査法をコロバレイティブ・スタディにて評価し、*astA* 保有大腸菌の食品検査法について、優れた増菌培養法および分離培養法を確立し、食品培養液からの *astA* 検出性に優れるリアルタイム PCR を開発した。食中毒事例における食品からこれら食中毒細菌の効率的な検出が期待される。(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、*astA* 遺伝子の多様性を中心に *astA* 遺伝子の特性を明らかにしたが、機能については今後の検討が必要であり、ゲノム上の他因子との関係が明らかにして新たな疫学マーカーの検出系を構築する必要がある。(3) 病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* 遺伝子の多くは *IS1414* 上に存在しており、様々な系統の株が水平伝播により獲得していること、0166:H15 および 0gGp9:H18 において CH0 および INT407 細胞への付着性が認められること、0166:H15 株において ST2914 が病原性系統であ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、*astA* 保有大腸菌は鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける汚染率が高いこと、オクラの表面で長期間生残できること、10℃以下の保管によって増殖が抑制されることが示された。(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、本菌の保有するプラスミドが病原性に寄与していることが明らかになった。

研究協力者

埼玉県衛生研究所	土井りえ、榊田 希、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
岩手県環境保健研究センター	山中拓哉
宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山口友美、山谷聡子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀

福井県衛生環境研究センター	横山孝治
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
三重県保健環境研究所	小林章人
姫路市環境衛生研究所	新免香織
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
静岡市環境保健研究所	高橋直人
広島市衛生研究所	末永朱美、池田伸代
北九州市保健環境研究所	大羽広宣、藤崎道子、有川衣美
福岡市保健環境研究所	松永典久
熊本市環境総合センター	小畑裕子
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
富山市保健所	瀧波賢治、鈴木富勝、水上克己
富山県衛生研究所	大石和徳、齋藤和輝、木全恵子、 磯部順子、綿引正則
国立感染症研究所	明田幸宏、窪村亜希子、李 謙一
国立医薬品食品衛生研究所	大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉、 西角光平

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている。このため、平成 30 年から令和 2 年にかけて *E. albertii* の食品での検査法の検討、リアルタイム PCR の開発、食中毒事例での原因食品の解析、食品等における汚染実態調査、食品・環境中での挙動等について研究を実施した。その成果から地方自治体での食中毒対応に有用と考えられる食品の検査法を示した。本研究では、その方法を多機関で評価するために、地方自治体の試験研究機関とコラボレイティブ・スタディを令和 3 年に実施することとした。

また、近年、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和 2 年

には、給食センターで調理した学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等 2,958 人の患者をともなう *astA*（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1；EAST1 をコードする遺伝子）保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が 100 人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌（細胞への凝集付着性因子遺伝子 *aggR* に加えて *astA* 保有株も含む）や腸管病原性大腸菌（細胞への局在付着性因子：*eae* 等保有株）による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒では、原因食品が不明であることが多く、喫食状況の解析から特定の日時に提供された食事や弁当などの喫食が原因として判明しても食品・食材が明らかになることはまれである。これらの病

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。

以上の背景のもとに、以下の4つの分担研究を実施することにした：

(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。本研究の対象である *E. albertii* および *astA* 保有大腸菌は、新興食中毒細菌として位置づけられ、特に日本での食中毒発生が特徴的であるため、これらの課題の研究を進めることによって、国内の食中毒予防対策の提案が可能になると考え、3年間の研究を行った。また、科学的な国内対策の取り組みを海外に発信するために成果を国際的に発表することが期待されている。

さらに、令和3年6月に富山市において、市内の小学校や保育所等での給食に提供された牛乳によって1,800人を超える患者を伴う食中毒

が発生し、この原因物質の究明における検査により、主要な病原因子を保有しない大腸菌 OUT (OgGp9):H18 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の解明についての研究を令和3年度から緊急的追加研究として開始し、成果を得た。

B. 研究方法

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

11 試験検査機関が参加し、鶏肉またはモヤシ検体（高菌数接種3検体、低菌数接種3検体、非接種3検体）を供試し、セフィキシムおよび亜テレルル酸加 mEC 培地での増菌培養、RX-DHL、RX-MAC、DHL および MAC での分離培養、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR（IC を含む）にて *E. albertii* の検出性を評価した。試験結果を集計後、検出方法間の有意差検定を行った。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

4 種類（Yamamoto ら、他）の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法（*astA*PCR）について食品における *astA* 保有大腸菌の検出に優れたプライマーおよび酵素を検討した。次に、増菌培地として mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC を、分離培地として薬剤 C を添加した培地等での *astA* 保有大腸菌の生育性を検討した。上記にて選定された各種方法を用いてさらに検討を進めた。具体的には、試験検体の *astA* 確認試験では、39 食品を供試し、検体 25 g 入りストマッカー袋を各 20 袋

(=20 検体)用意し、4 検体は mEC 中にて培養し、抽出 DNA を *astA*PCR (Yamamoto ら、QuickTaq 使用)に供試した。4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、添加回収試験を行ない、1 検体以上が *astA*PCR 陽性の食品は、自然汚染検体での試験を行った。添加回収試験では、*astA* 保有大腸菌を各接種菌数レベル（低菌数接種、中菌数接種、高菌数接種）に調製し、16 検体へ接種した。mEC および NmEC 中で培養し、*astA*PCR を実施した。検体培養液を薬剤 C 添加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (C-SMAC)、クロモアガー基礎培地 (CHSTEC) および薬剤 C 添加 CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、大腸菌様コロニーへ *astA*PCR を実施した。自然汚染試験では、*astA* 保有大腸菌を添加せずに上記の試験を実施した。また、後述の (4) にて開発の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法である Assay 11r を利用して各種食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。さらに、各種食品由来 *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。

(3) *astA* 保有細菌の性状等の解析
菌種未同定の *astA* 保有細菌を Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) にて菌種同定した。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 種類の既報の *astA*PCR での検出性を比較した。また、各種 β ラクタム系薬剤や薬剤 C 添加 CHSTEC にて *astA* 保有大腸菌の生育を検討した。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌株の *astA* の遺伝子多型 (バリエーション) を分担研究者の伊豫田および大岡と共同で特定した。また、*astA* の各種バリエーションリファレンス配列の共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。その際、大岡からバリエーションの一部は *astA* の配列が不完全と予想されるとの情報を得たため、不完全なバリエーションタイプが検出対象から除外される候補を設計した。設計した候補 Assay について、多数の菌株を用いて特異性を試験した。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。

(5) 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。

[2] 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

(1) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

下痢症患者由来の大腸菌約 3,000 株について、PCR による *astA* 遺伝子保有株のスクリーニングを行った。

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

大腸菌のハウスキーピング遺伝子

7 遺伝子 (*adk*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd*) を標的とした系統解析を行った。

(3) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目(2)で作成した系統樹から比較的系統の異なる 31 株を選定し、MiSeq および MinION による全ゲノム配列取得を行った。

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

NCBI データベース上の完全長配列決定大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を解析対象とし *astA* 遺伝子保有株を同定した。

(5) *astA* 遺伝子保有株 (計 749 株) に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

上記(4)で得られたゲノム配列を元に、既知の *astA* 遺伝子バリエーションおよびその局在等の詳細を解析した。

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

計 744 株についてゲノム系統解析を行い、同定された *astA* 遺伝子バリエーションを系統樹上にマップし、系統と分布を解析した。

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

各株からバリエーションが局在するプラスミドの配列を抽出し、GenomeMatcher3.04 の CompareSequences 機能を用いて比較した。

(8) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 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を保有する 395 株について、各バ

リエーションにのみ共通な遺伝子の抽出を試みた。

(9) 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と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。

(10) 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 を用いてクローニングした。

(11) 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 細胞を用い、項目(10)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) による細胞生存性を検討した。

(12) 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、*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) について感染後 24 時間後に生存率を評価した。

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

ドラフトゲノム配列取得済み 31 株について、EAEC に共通するあるいは保存性の高い病原関連遺伝子群の同定を行った。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) ゲノム解析 (WGS) による国内

大腸菌の *astA* 保有状況調査および *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

2007-2021 年に国内で分離され、ゲノム解読を行った大腸菌等 計 3,613 株を対象に WGS 解析により *astA* の検出を行った。また、既知および新規の *astA* 配列を検出可能なプライマー [*astA*-univ-F1 (5' - GYCATCAACRCAGTATATYCG-3'), *astA*-univ-R1 (5' - TCRCGAGTGAC KRCYYTGTA-3')] の設計も行った。本プライマーを用いて合計 32 株の *astA* 保有または非保有株から同遺伝子の検出を行った。

(2) 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 陽性大腸菌 26 株の WGS データを使用して SNP を抽出し、最尤法により系統樹の作製を行った。0166:H15 と 07:H4 株については、公共のデータベース (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) に登録されている同血清型のゲノムデータも用いて国際比較を行った。

(3) 完全長ゲノム配列の解析

astA 保有 0166:H15 4 株および 07:H4 2 株について、ロングリード解析とハイブリッドアセンブリにより完全長ゲノム配列を決定した。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。

(4) EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロッティングによって行った。

(5) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞傷害性お

よび細胞付着性の解析を行った。細胞傷害性については HeLa および Vero 細胞を使用した。細胞付着性は HEp-2, HeLa, CHO および INT407 細胞を使用した。

(6) Tn-seq 解析による細胞付着因子探索

細胞付着因子特定のため、JNE21-003 について Tn-seq 解析を実施した。トランスポゾン挿入により作製したランダムな遺伝子破壊株ライブラリーから抽出した DNA サンプルを input、破壊株ライブラリーを用いた付着性試験の実施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 によるシーケンスデータを取得した。

(7) 薬剤感受性試験および生化学的性状試験

17 株の *astA* 保有大腸菌株を対象に 12 の薬剤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。生化学的性状は、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、および Phnotype microarray (Biolg 社) のプレートにより 192 種類の炭素源利用能の測定を行った。

[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

食品からの病原性大腸菌の分離は次の手順で行なった。検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、ストマッカー処理し、42℃、22~24 時間、増菌培養を行なった。培養液から DNA を抽出し、Müller らの方法 (Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73, 3380-3390) でスクリーニング PCR を行い、大腸菌の病原因子の検出を行

なった。スクリーニング陽性の場合、増菌培養液をクロモアガーECCに塗抹し、単離したコロニーの病原因子をPCRで再確認した。分離菌株は大腸菌であることを確認し、カジトン培地に接種し、保管した。分離菌株のO遺伝子型別は、井口らの方法(J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32)に従い、PCRによって行なった。食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定には最確数法を用い、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、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。

オクラにおける増殖挙動の解析には、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。

C. 研究結果

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

リアルタイムPCR法の検出感度は、全条件で1.0であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、いずれの培地でも約0.94以上であり、高菌数接種で全分離培地で1.0であった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で約0.7、DHL および MAC で約0.55であり、高菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で0.94以上であり、DHL および MAC で0.85以上であった。また、釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割

合は RX-DHL で 522/581 (89.8%)、RX-MAC で 548/615 (89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796 (50.8%) であった。モヤシ検体での DHL および MAC の検出感度は、リアルタイムPCR法よりも有意に低く、MAC は RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。鶏肉検体での DHL および MAC の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出感度が有意に低かった。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

プライマーの検討では、YamamotoらのPCR法で陽性または陰性の判定が容易であった。酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められなかった。増菌培養法の検討では、薬剤 AB 添加培地での増殖が抑制されることが示された。分離培地の検討では、薬剤 C を添加した分離培地での生育良好であったためこれら培地を以降の試験に用いた。試験検体の *astA* 確認試験では、48/156 検体 (30.8%) が *astA* 陽性であった。添加回収試験では、C-SMAC を用いた場合は分離陽性率が他の条件よりも低かった。自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。また、*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。さらに、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 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、鶏肉ミンチ由来株では、集団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、少なくとも 8 種類の *astA* バリエーションを保有していた。

(3) *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、*Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae*、および *Klebsiella 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*PCR 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。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

単一のバリエーションのみ保有する株は 14 株中 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、バリエーションの種類としては、prototype が最も多くの株で保有されていた。全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類および不完全なバリエーション以外の全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 4 種類を設計した。特異性試験では、設計された候補が目的のバリエーション特異的に増幅することを確認した。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。IC も加えた特異性試験では、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。

(5) 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) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、検証した 194/2970 株 (7.1%) が *astA* 遺伝子陽性であった。

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

MLSA 解析の結果、*astA* 遺伝子保有株は大腸菌進化系統の中で幅広い系統に存在していることが明らかとなった。

(3) 進化系統の異なる鹿児島県保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

MiSeq と MinION によるハイブリッドアセンブルした結果、18 株の完全長ゲノム配列を取得することが出来たが、残り 13 株は完全長配列を取得できなかった (表 1)。

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

713/9,065 株が既知の *astA* 遺伝子バリエーションもしくはそのホモログを保有していた。

(5) 抽出した *astA* 遺伝子保有株

に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

astA 遺伝子バリエーションを計 35 種類同定し、各バリエーションの遺伝子構造、各バリエーションの保有株数とその局在、株あたりの各バリエーションのコピー数、各バリエーションが存在する挿入配列 IS1414 の構造などの特徴を明らかにした。

(6) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

astA 遺伝子バリエーションの多くは大腸菌の進化系統に偏りなく散在していることがわかった。また、5' 末端が欠失している *astA* 遺伝子は進化系統 A と E に多くみられた。

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

異なる系統に同一の *astA* 遺伝子バリエーション存在する株について株間のプラスミド構造を比較した。一例として、バリエーション V24 は異なる系統に属する 7 株では、①のグループに属する 5 株のプラスミドは非常に類似性が高いが、①②③のグループ間では部分的な類似性しか検出されなかった。

(8) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

各バリエーションを詳細に比較したが、共通因子を同定することは出来なかった。

(9) 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と病原関連遺伝子の同定

07:H4 株ではプラスミド上、0166:H15 株では、染色体上に *astA* 遺伝子が見られたが、バリエーションタイプもプラスミド構造も異なっていた。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。共通の特徴として、 β -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有率が高かった。

(10) 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

35 種類の *astA* バリエーションのアミノ酸配列比較の結果、prototype を含む 7 種類は同じ配列であったが、それ以外は配列多様性を認めた。集団感染事例由来株で保有頻度が高い、また、全株の中でも比較的保有頻度の高い prototype, V6, V27 に焦点を当て、発現ベクターへのクローニングを行った。

(11) 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

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)の間で細胞毒性に有意差は見られなかった。

(13) 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)

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%であった。

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

EAEC では、線毛と毒素を少なくとも 1 つずつ保有することが分かった。また、線毛は、既知のものとアミノ酸配列相同性が 50-70% 程度の遺伝子が 3 種類同定された。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査および *astA* 検

出用 PCR プライマーの改善

astA は供試菌株の約 3% で保有が認められ、8 割以上の株は IS1414 トランスポゼース配列中に存在した。*astA* 配列の解析から新たに 11 種の変異型を同定した。026:H11 と 0115:H10 は比較的高率に *astA* を保有しており、026:H11 は *astA* 保有株のうち 45 株 (86.5%) が同一の系統に属していたが、本系統株の *astA* は IS1414 上に存在していないため、同遺伝子を獲得した祖先株から垂直伝播している可能性が示唆された。0115:H10 は ST10 と ST101 の異なる系統に分けられるが、*astA* 保有株はいずれも ST10 に属していた。新たに設計したプライマーを用いて *astA* 保有および非保有大腸菌 32 株を対象に検証を行った結果、*astA* 保有株にのみ陽性が検出された。

(2) 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の事例から分離された 26 株の系統解析では、いずれも食中毒等事例間の関連性は低いことが示唆された。公共データベース上のゲノムデータを用いた系統解析のうち、07:H4 株についてはカタル由来株 (20-21 SNP) が最も近縁であり、次いでレバノン、タンザニアおよび中国由来株が確認された。一方、0166:H15 株については 4 種類の MLST が検出されたが、食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。ST2914 の系統は日本以外でも複数の国から分離された株が含まれていた。

(3) EAST1 発現解析

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

グナルが確認され、陰性対照の JM109 株ではシグナルが見られなかった。

(4) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

細胞傷害性試験では非病原性株または pGEM-*astA* 導入株との比較を行ったが、大きな差は認められなかった。細胞付着性試験のうち HEp-2 および HeLa 細胞を使用した試験ではいずれも細胞付着性は認められなかったが、CHO および INT407 細胞を使用した試験では、0166:H15 または 0gGp9:H18 である 5 株が細胞への付着性を示し、07:H4 および 0169:H45 の 4 株においては細胞に非付着性であった。

(5) 完全長配列の解析

染色体のサイズは 0166:H15 は 4.8-5.1 Mb、07:H74 は 4.7 Mb、保有プラスミドは 1 から 4 までであった。*astA* は染色体または 100kb 以上の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、07:H4 では染色体上に薬剤耐性遺伝子が存在した。プラスミドの CDS の比較から、食中毒由来 0166:H15 および 07:H4 は類似したプラスミドを有することが明らかとなった。

(6) Tn-seq 解析による細胞付着因子探索

Tn-seq により取得したシークエンスデータを用いて Tn-seq Explorer による解析を行うことでカウント数と必須性指数の算出を行った。染色体上の 4837 の遺伝子ごとのカウント数から output/input の値を算出したところ、0.9 以下となる遺伝子は 1194 種類存在し、必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1078 種類存在

した。

(7) 薬剤感受性試験および生化学的性状試験

薬剤感受性試験の結果、0166:H15株では3事例のうち2事例は同一耐性パターンを示した。また食中毒8事例のうち5事例由来株はアンピシリン耐性を示した。生化学的性状試験のうち、培地へ画線塗抹を行った結果から、大腸菌 0166:H15 は CT 添加培地に発育しないことが確認され、発育が可能であった培地では特徴的なコロニーや性状は認められなかった。Phenotype microarray の結果から、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に有用となる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。

[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

食品における病原性大腸菌の汚染実態調査を行った。肉、野菜、魚介類、乾物を PCR でスクリーニングした。鶏肉の陽性率が高く、31 検体全てがスクリーニング PCR 陽性(100%)となり、*astA* は全ての検体から検出された。鶏肉からの分離株 36 株のうち 33 株(92%)は *astA* を保有していた。豚肉、特に内臓肉も陽性率が高く 40 検体中 29 検体(73%)がスクリーニング陽性となり、21 検体(53%)から菌分離を行うことができた。豚内臓肉からの分離株全てが *astA* を保有していた。魚介類では、エビの *astA* 陽性率が高く、10 検体中 3 検体(30%)がスクリーニング PCR で *astA* 陽性となった。

外国産生鮮野菜のうち、ヤングコーンとオクラで強い汚染が認められた。ヤングコーンは 29 検体中 19 検体(41%)がスクリーニング PCR

で *astA* 陽性となり、4 検体から菌分離を行うことができた。オクラは 36 検体中 11 検体(30%)で *astA* 陽性となり、5 検体(14%)から菌分離を行うことができた。他にパプリカ、レモングラス、アスパラガス、アボガド、スナップエンドウからスクリーニング PCR で *astA* が検出された。また、国産スプラウト 30 検体中 1 検体(3%)からスクリーニング PCR で *astA* が検出された。*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定したところ、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、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンの平均菌数はそれぞれ 1,313,559,380,742 MPN/100g 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。

今回の汚染実態調査から計 120 株が分離された。0 遺伝子型別を行ったところ、分離された型別は合計 65 種類あった。最も多かったのが、型別不能で 17 株(14.3%)、次いで、0g8 が 8 株(6.7%)、0g88 が 7 株(5.8%)、0gGp9 が 4 株(3.3%)と多く分離された。

オクラにおける *astA* 遺伝子保有大腸菌の増殖挙動を調べたところ、4℃および 10℃では接種後、菌数の増加は認められなかった。しかし、25℃では接種 2 日後まで菌数が増加したのち平衡状態になり、1 週間後まで維持された。

D. 考察

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

E. albertii が検体あたり 80 CFU

以上であれば食品から高率に検出が可能であることが判明した。約 18 CFU でも、リアルタイム PCR 法で高率に検出されること、鶏肉では高率に分離も可能であることが示された。しかし、モヤシでは、分離培養法で分離されない検体もあった。リアルタイム PCR 法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示されたことから、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された。添加回収試験では、30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。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 を併用し CHSTEC または C-CHSTEC で分離培養することで、より効率に *astA* 保有大腸菌が分離されると考えられた。

(3) *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。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

配列上完全な *astA* を効率よく検出することが食品から *astA* を検出する上で重要である。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 について詳細に検討したところ、*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。

(5) 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

astA 遺伝子保有頻度の解析から、約 7.5% (907/12,035 株) が当該遺伝子を保有していること、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在することを明らかにした。また、35 種類の遺伝子バリエーションの詳細な解析から、①保有株数の多い主要なバリエーションは V22、prototype、V6、V27、V12、V7 であること、②バリエーション V7、V15、V22、V33 は欠損しており、不完全であると考えられること、③

各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤5' 末端が完全に欠損している *astA* 遺伝子を保有する株を含めるとほとんどの大腸菌進化系統に偏りなく散在していることがわかった。加えて、⑥株間のプラスミド比較から、同一バリエーションをコードしているプラスミド構造にも共通性が低いこと、⑦prototype, V2, V7, V31, V32 をコードする挿入配列 IS1414 は intact な構造であるがそれ以外は欠損していた。これらのことから、*astA* 遺伝子を保有する株を特異的に検出する疫学マーカーとなる遺伝子を同定するのは困難であること、今後は、実際に病原性に寄与しているバリエーションのみを識別出来る検査法が必要であることが示唆された。また、臨床的・疫学的に重要なバリエーションとそうでないものを識別する必要性もあることが明らかとなった（今年度中に論文投稿予定）。

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を解析した結果、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、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。

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。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、今後、異なる研究アプローチを検討する必要があると考えられた。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

astA 保有大腸菌の病原性解析のため過去 15 年分の大腸菌から取得したゲノムデータ、および食中毒事例由来株を複数用いて解析を行ったことで、*astA* は大腸菌の約 3% から検出されること、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であること、さらに一部の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などを明らかにした。しかし、生化学的性状等試験では 0166:H15 株の分離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により有用なデータを取得することができた。

astA 保有大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることや、同菌は広く分布していることも示唆された。大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較では、比較的近縁な株が中東、アフリカおよび中国で見いだされた。しかし、これらの株についての疫学情報は入手できなかったため、直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

ウェスタンブロットィングの解析結果からいずれの *astA* 保有大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。しかし、細胞傷害性試験では、検討した条件では EAST1 による傷害性を示す結果を得ることができなかった。一方で、細胞付着

性試験では、食中毒事例由来 0166:H15 株と 0gGp9:H18 株が CHO および INT407 細胞への付着性を示し、細胞への付着性は本菌の病原性に関与している可能性も考えられる。

0166:H15 株に着目した系統解析から、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。細胞付着性の解析においても食中毒事例由来株 (ST2914) 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疫学情報から、ST2914 に分類される株は国外にも分布している可能性が示唆された。しかし、ゲノム解析からは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。一方で、付着因子特定のため実施した Tn-seq 解析では、output/input の値が 1 より少ない遺伝子は 1194 種類存在した。これらの遺伝子から、より可能性が高い遺伝子のみを抽出することで、付着因子が特定される可能性があると考えられる。今後、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。

[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

鶏肉は *astA* 保有大腸菌の汚染率および汚染菌量が高かったことから、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。豚肉内臓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、注意が必要であると考えられた。

輸入野菜では、ベビーコーンとオクラにおける *astA* 陽性率が高く、重度の汚染が示唆された。ヤングコーンは汚染検体の 53% が 10^2 MPN/100g 以下であったが、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。

汚染実態調査で得られた分離株の 0 遺伝子型別を行ったが、非常に多くの型に分かれ、特定の傾向は認められなかった。この結果から、*astA* をはじめとする病原遺伝子の保有状況と特定の 0 遺伝子型との関連性は認められなかった。

オクラを 10°C 以下の環境で保管すると、*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、オクラ 1 本あたり約 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、オクラ上の菌数の増加の可能性があると考えられた。

鶏肉、豚内臓肉、オクラやベビーコーンなどで *astA* 保有大腸菌の汚染が強く認められた。しかしながら、これらの食品を原因とする *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はあま

り発生していないと考えられる。今後、*astA* の機能を明らかにし、病原因子としての *astA* の役割を解明していく必要があると考えられた。

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、食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディを実施し、優れた方法を示した。また、*astA* 保有大腸菌の食品検査法を検討し、優れた増菌培地や分離培地を明らかにした。さらに、食品からの *astA* 遺伝子検出に優れるリアルタイム PCR 法を開発した。加えて、腸管出血性大腸菌の食品での検査法について、現在の通知法の試薬や機器について現状に即した変更が必要であることが考えられた。

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* 遺伝子の多様性と大腸菌進化系統における分布など、*astA* 遺伝子の特性を知ることが出来た。しかしながら EAST1 の病原性について、少なくとも単独で機能するという知見を得ることは出来なかった。今後は *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必要がある。

分担研究(3)病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* は国内分離大腸菌にも広く分布し、さらに *astA* 保有大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。血清型が O166:H15 である *astA* 陽性大腸菌については、細胞付着性を示すことが明らかとなり、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、輸入野菜など多くの食品で *astA* 保有大腸菌が高率に分離された。しかし、これらの食品が原因と考えられる *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はほとんどないと思われる。このため *astA* 自体は病原性に参与していない、あるいは病原性を発現するためには *astA* に加えて他の因子が必要である可能性が示唆された。以上の結果から、*astA* は食中毒原因菌のマーカーとして、適切でないと考えられた。

また、緊急的追加研究として、富山市大規模食中毒の原因物質が「大腸菌 OUT(0gGp9):H18(疑い)」とされたが、本菌の保有するプラスミドが病原性に寄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)

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

Ohnishi T., Hara-Kudo Y.: Presence and quantification of pathogenic *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail meats available in Japan.

- Letters in Applied Microbiology 73, 81-87, 2021.
- Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in retail fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 62(3), 94-99, 2021.
- Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. Journal of food protection 85(1), 173-179, 2022.
- Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. Foodborne Pathogens and Disease 19(10):704-712, 2022.
- Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. Foodborne Pathogens and Disease 19(12):823-829, 2022.
- 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)

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子．市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第94回日本細菌学会総会．令和3年3月29-31日．オンデマンド
新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii* 特異的リアルタイムPCR法の開発と鶏の保菌状況調査．第164回日本獣医学会学術集会．令和3年9月7-13日．オンデマンド

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

廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、小椋容子、工藤由起子．*Escherichia albertii* に適する選択増菌培地の開発．第117回日本食品衛生学会

学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子．市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第117回日本食品衛生学会学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

大西貴弘、工藤由起子．市販食肉中におけるアルコバクター属菌とカンピロバクター属菌の定量．第117回日本食品衛生学会学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

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

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

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

- 齊木大、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (2). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子. 野菜における腸管毒素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小西典子、榊田希、新井沙倉、尾畑浩魅、土井りえ、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* の効率的な検出法に関する検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小嶋由香、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、山谷聡子、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平. 新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
- 廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、工藤由起子. 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
- 新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
- 大岡唯祐、後藤恭宏、林哲也、西順一郎. 大腸菌における *astA* 遺伝子バリエーションの同定およびその分布. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 17 日. 兵庫
- 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

緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒 由来大腸菌の病原性に関する研究

工藤 由起子

令和 3 ～ 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

緊急的追加研究報告書

富山市の学校給食を原因とした集団食中毒由来大腸菌の病原性に関する研究

研究要旨

令和 3 年 6 月に富山市で発生した学校給食を原因とした患者数 1,800 人以上の大規模食中毒において、原因食品である牛乳および患者便から分離された大腸菌 OUT (O 抗原遺伝子型 0gGp9) :H18 について、病原性を解明するために多角的に解析した。菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、同一クローンであることが明らかになり、本事例の便検体をメタゲノム解析した結果、事例株が優占して存在することが示された。また、本事例株は動物モデル実験によってマウス致死性を示すことが明らかになった。さらに、詳細なゲノム解析の結果、本菌株は典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドを保有していること、染色体上の他因子についても知見が得られた。加えて、本プラスミド脱落株ではマウス致死性が半減することから本プラスミド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、綿引正則
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。毒素型食中毒の原因物質であるブドウ球菌エン

テロトキシン、セレウス菌エンテロトキシン、ウエルシュ菌エンテロトキシンおよびセレウス菌嘔吐毒（セレウリド）は検出されず、また、感染型食中毒の原因物質のうち下痢を主徴とするものについて調査したが、サルモネラ属菌、リステリア属菌、*Escherichia albertii* および既知の病原大腸菌は検出されなかった。しかし、食中毒発生に関与する提供日の牛乳では、病原大腸菌用選択分離

培地上に特徴のある大腸菌コロニーが多数生育し、それらの血清型は OUT (O 血清型別不能) :H18 であり、O 抗原遺伝子型別 O-genotyping では OgGp9 であることが判明した。さらに、富山市保健所での調査時の患者検便検体の大腸菌分離用培地上のコロニーを調査した結果、多くの患者検体で OUT (OgGp9) :H18 が優勢大腸菌として分離され、病因物質が大腸菌 OUT (OgGp9) :H18 である可能性が考えられた。

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

B. 研究方法

[1] 菌株ゲノムの解析

(1) ゲノムの遺伝子型別

感染研では本事例牛乳および患者由来株の全ゲノム配列を用いて、MLST (multi locus sequence typing)、血清型予測等の遺伝子型別および SNP 解析を実施した。

(2) ゲノムおよびプラスミドの解析

感染研、富山衛研、国衛研で本事例由来株のゲノム上の病原性関連遺伝子の検索を各機関の方法で行った。また、本事例株の完全長ゲノムを取得するために、長鎖ゲノム DNA を用いてロングリード配列を取得し、ショートリード配列と併せてハイブリッドアセンブルを行った。また、アノテーションされたプラスミド上の coding sequence (CDS) を

BLASTP 解析しキュレーションを行った。

(3) 大腸菌の Type III 分泌系遺伝子群 ETT2 発現の確認

富山衛研では、本食中毒由来株の ETT2 に含まれる *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量の定量的ためのプライマーおよびプローブを設計した。[2] 有症者由来便のメタゲノム解析

食 k 品工場従事者 (*E. coli* OgGp9 分離なし) および有症者 (*E. coli* OgGp9 分離あり) の便検体を材料として、ショットガンメタゲノム解析を行った。便サンプル中大腸菌における、事例株 (*E. coli* OgGp9) の頻度を推定するために、事例株ゲノムを非病原性株 (*E. coli* MG1655) と共通する領域および共通しない領域に分け、前者を大腸菌に共通する領域、後者を事例株特異的領域とした。実験は、国立医薬品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号 355)。

[3] 培養細胞への感染実験

本事例患者由来株、対照菌株として腸管凝集性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、病原性の知られていない大腸菌である実験室株 K12 等を供試した。Hep-2 細胞、CAC0-2 細胞、HeLa 細胞などを試験ごとに供試した。細胞付着性試験、細胞侵入性試験、細胞膜透過性試験、細胞傷害性試験を定法にしたがって実施した。また、付着に関与する可能性のある遺伝子について破壊株を作製し付着性の解析などを行った。

[4] 動物モデル実験

富山市食中毒事例牛乳由来株および患者由来株、病原性株として腸管毒素原性大腸菌など、病原性の知られていない株として K12 および微生

物試験に用いられている大腸菌株 NBRC3972 を供試した。ウサギ腸管結紮ループ試験および抗生物質投与マウスへの経口投与では、定法にしたがって実施した。マウスへの腹腔内投与試験では、4 週齢のマウス (C57BL/6j) に 10^8 あるいは 10^9 CFU/mL に調製した試験菌株浮遊液 0.1 mL を腹腔内投与した。投与後 1 から 3 日目まで経時的に生死判定を行った。コモンマーモセットへの経口投与試験では、コモンマーモセット 3 頭へ 10^9 CFU/mL の濃度に調製した患者由来株または牛乳由来株浮遊液 0.5 mL を経口投与した。投与後経時的に各個体を観察し、採取した糞便中の投与菌の測定を実施した。すべての実験は国立医薬品食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：846 (ウサギ)、910 (マウス)、945 (コモンマーモセット)]。

C. 研究結果

[1] 菌株ゲノムの解析

(1) ゲノムの遺伝子型別

感染研で行った SNP 解析の結果、牛乳由来株と患者由来株は 1 か所の SNP のみ異なっており、同一クローンであると考えられた。ドラフトゲノムの解析をしたところ、*in silico* の血清型予測では O17:H7、MLST では ST1380、phylogenetic group では D と型別された。

(2) ゲノムおよびプラスミドの解析

本事例大腸菌株 ESC818 株の病原性関連遺伝子を探索した結果、*air*, *eilA*, *kps*, *chuA*, *lpfA* が検出されたが、病原大腸菌に特徴的な付着関連遺伝子 (*eae*, *bfpA*, *aggR* 等) や

毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *est*, *elt* 等) は、感染研、富山衛研、国衛研のいずれでの解析によっても検出されなかった。また、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、*air*、*eilA* および莢膜合成遺伝子群 *kps* クラスターなど腸管凝集付着性大腸菌 (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複数カ所見いだされた。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。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。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。

(3) 大腸菌の Type III 分泌系遺伝子群 ETT2 発現の確認

ETT2 遺伝子群 *eicA*、*air*、*eprH*、*eilA*、*eivA* について qRT-PCR による検出系を確立した。特に、プローブを用いた絶対定量系によって *eivA* および *eilA* 遺伝子の mRNA がそれぞれ検出された。

[2] 有症者由来便のメタゲノム解析

メタゲノム解析の結果、有症者では *Escherichia* 属菌の割合が 3.6%、*Campylobacter* 属菌が 0.06% の割合で検出された。その他の病原体 (細菌、ウイルス、寄生虫) 特異的な配列は検出されなかった。大腸菌共通配列に類似したリードの割合は約 80%、事例株特異配列に類似したリードの割合は約 20% であった。この割合は、事例株ゲノムの割合と類似していたことから、大腸菌の大部分

は事例株であることが示唆された。

[3] 培養細胞への感染実験

本事例由来株では、陽性対照と比べて明確な特異的な凝集性の付着、細胞侵入性および細胞透過性は認められなかった。しかし、細胞付着が認められ、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。

[4] 動物モデル実験

ウサギ腸管結紮ループ試験および抗生物質投与マウスへの経口投与試験では、明らかな陽性反応は認められなかった。しかし、マウスへの腹腔内投与試験では、本事例由来株投与後 2 日目までに約 70-90% が死亡し、陽性対照の ETEC の投与では 90% 以上が死亡し、陰性対照の K12 株では死亡しなかった。また、微生物試験に使用される NBRC3972 を投与したマウスは投与後 2 日目までに約 50% が死亡した。コモンマーモセットへの経口投与試験では、3 頭ともに下痢を発症しなかったが、うち 1 頭で投与後 11 日目まで $10^{4.9}$ から $10^{9.2}$ CFU/g、別の 1 頭で投与後 15 日目まで $10^{3.5}$ から $10^{9.5}$ CFU/g、さらに別の 1 頭で投与後 28 日目まで $10^{5.2}$ から $10^{8.7}$ CFU/g で便中に菌の排出が認められた。

また、本事例株のプラスミド脱落株をマウスに腹腔内接種した結果、マウスの死亡率は 50% であり、プラスミド保有株では接種後マウスは全数死亡した。

D. 考察

[1] 菌株ゲノムの解析

感染研の解析では、牛乳由来株および患者由来株は、SNP 解析から同一クローンであると考えられた。感染研および国衛研の解析では、両株

のゲノム上には、病原大腸菌の主要な病原性関連遺伝子は存在しないものの、病原性への関与が示唆される遺伝子群が存在していた。本事例株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 ETEC や腸管出血性大腸菌 (EHEC) には存在しなかった。また、本事例株は、付着因子や菌体外分泌機構をコードする特徴的なプラスミドを有することが明らかとなった。このため、プラスミド脱落株を作製し、本事例株の示す動物モデル実験での病原性への関与を検証することとした。さらに、Type III 分泌系の病原因子遺伝子群 ETT2 発現の確認のために、特に *eivA* および *eilA* 遺伝子発現量を定量するための絶対定量系を確立した。測定の結果、*eilA* 遺伝子における mRNA が検出され、遺伝子として機能していることが考えられた。

[2] 有症者由来便のメタゲノム解析

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

取した食品工場従事者も事例株を保有していたことが示唆された。

[3] 培養細胞への感染実験

培養細胞への付着試験では、凝集性の付着ではない細胞付着性が認められた。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。

[4] 動物モデル実験

富山市食中毒事例では原因食品を喫食した施設職員等の成人に比べて児童の発症率が高く、富山市食中毒事例株は免疫や腸内細菌叢が未発達な腸管でのみ病原性を発揮することが推察されていた。そのため主に若齢動物を用いて、動物モデル実験を行った。富山市食中毒事例株は、マウスへの腹腔内投与で致死性が認められた。本食中毒事例株の致死性は、ETEC より低く、病原性の知られていない大腸菌株 (NBRC3972 および K12) より高い結果であった。富山市食中毒事例株は ETEC ほど高くないものの病原性を有することが示された。一方で、ウサギ腸管結紮ループ試験および抗生物質投与マウスへの経口投与試験を行ったが、下痢原性は認められなかった。また、コモンマーモセットへの経口投与試験においても下痢原性が認められず、動物モデル実験でのヒトの下痢症の再現性の検討が更に必要であると考えられた。しかし、コモンマーモセットへの経口投与後、糞中への菌の排出が一定期間観察されたことから、本食中毒事例株はコモンマーモセットの腸管に定着性を有することが認められた。

また、マウスへの腹腔内投与試験では、本菌が保有するプラスミドを脱落させた株を投与したところ、死亡率は約半分に減少し、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。

E. 結論

令和 3 年 6 月に富山市で発生した学校給食を原因とした患者数 1,800 人以上の大規模食中毒において、原因食品である牛乳および患者便から分離された大腸菌 OUT (O 抗原遺伝子型 0gGp9) :H18 について、病原性を解明するために多角的に解析した。1) 菌株のゲノム解析の結果、牛乳由来株および患者由来株は、同一クローンであることが明らかになった。2) 本事例の便検体をメタゲノム解析した結果、事例株が優占して存在することが示唆された。3) 培養細胞への感染実験の結果、侵入性は観察されなかったが、付着性については CFA/III が関与することが示唆された。4) 動物モデル実験の結果、マウス致死性を示すことが明らかになった。5) ゲノムおよびプラスミドの解析の結果、本菌株は典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドを保有していること、*eilA* 遺伝子発現についても知見が得られた。6) 本プラスミド脱落株の動物モデル試験の結果、マウス致死性が半減することから本プラスミドが本菌の病原性に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)

廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴

木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正．富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査．病原微生物検出情報．43(10), 15-16, 2022.

水上克己、黒崎薫、楠秀子、江戸岳夫、横田夏生、桐溪茜、柴野真由美、鈴木富勝、瀧波賢治、屋賢司、廣瀬昌平、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正．富山市の学校給食における牛乳を原因とする食中毒事例疫学調査解析．病原微生物検出情報．43(10), 16-18, 2022.

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

I. 謝辞

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

公益財団法人実験動物中央研究所：佐々木えりか博士、井上貴史博士
国立医薬品食品衛生研究所 毒性部：北嶋聡博士、栞形麻樹子博士、動物管理室：高橋祐次博士

Ⅱ． 総 合 研 究 分 担 研 究 報 告 書

総 合 研 究 分 担 研 究
報 告 書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

工藤 由起子

令和 3 ～ 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

本研究では、[1] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディを実施し、セフィキシムおよび亜テルル酸加 mEC での選択増菌培養 (42℃)、ラムノース・キシロース添加 DHL 寒天培地等の選択分離培養および開発した特異的リアルタイム PCR が優れることが示された。[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法を検討し、増菌培地として mEC および NmEC が有用であることが示された。[3] *astA* 保有細菌の性状等を解析し、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では *astA* 保有大腸菌の検出としては特異性が低いことが示された。このため、[4] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発に取り組み、特異的かつ高感度に検出するリアルタイム PCR 法を開発した。多様な夾雑菌を含む食品での検査において優れた検出性を示した。[5] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法について、現在の通知法の試薬や機器について現状に即した変更が必要であると考えられた。

研究協力者

埼玉県衛生研究所
東京都健康安全研究センター
岩手県環境保健研究センター
宮城県保健環境センター
秋田県健康環境センター
宇都宮市衛生環境試験所
福井県衛生環境研究センター
山梨県衛生環境研究所
三重県保健環境研究所
姫路市環境衛生研究所
大分県衛生環境研究センター
さいたま市健康科学研究センター
川崎市健康安全研究所
静岡市環境保健研究所

土井りえ、榊田 希、貫洞里美
小西典子、尾畑浩魅、齊木 大
山中拓哉
佐藤千鶴子、山口友美、山谷聡子
今野貴之
床井由紀
横山孝治
柳本恵太
小林章人
新免香織
成松浩志、溝腰朗人
土屋彰彦、曾根美紀
小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
高橋直人

広島市衛生研究所
北九州市保健環境研究所
福岡市保健環境研究所
熊本市環境総合センター
(公社)日本食品衛生協会
鹿児島大学
国立感染症研究所
国立医薬品食品衛生研究所

末永朱美、池田伸代
有川衣美
松永典久
小畑裕子
甲斐明美
大岡唯祐
伊豫田 淳、李 謙一
大西貴弘、大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている。このため、平成 30 年から令和 2 年にかけて *E. albertii* の食品での検査法の検討、リアルタイム PCR の開発、食中毒事例での原因食品の解析、食品等における汚染実態調査、食品・環境中での挙動等について研究を実施した。その成果から見出された地方自治体での食中毒対応に有用と考えられる食品の検査法を示した。本研究では、その方法を多機関で評価するために、地方自治体の試験研究機関とコラボレイティブ・スタディを実施することとした。

また、近年、病原大腸菌を原因とする食中毒も多発しており、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日本では近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 *astA* 保有大腸菌の食品からの検出に必要な増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして効率的かつ特異的な検査法の開発を目的とした。

さらに、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、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。

これらのことから、以下の研究を実施した：[1] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価、[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討、[3] *astA* 保有細菌の性状等の解析、[4] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発、[5] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法。

本研究の対象である *E. albertii* および *astA* 保有大腸菌は、新興食中毒細菌として位置づけられ、特に日本での食中毒発生が特徴的であるため、これらの課題の研究を進めることによって、国内の食中毒予防対策の提案が可能になると考え、3年間の研究を行った。また、科学的な国内対策の取り組みを海外に発信するために成果を国際的に発表することが期待されている。

B. 研究方法

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

11 試験検査機関が参加し、鶏肉またはモヤシ検体（高菌数接種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体）を供試し、セフィキシムおよび亜テールル酸加 mEC 培地での増菌培養、RX-DHL、RX-MAC、DHL および MAC での分離培養、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR（IC を含む）にて *E. albertii* の検出性を評価した。試験結果を集計後、検出方法間の有意差検定を行った。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

4 種類（Yamamoto ら、他）の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法（*astA*PCR）について食品における *astA* 保有大腸菌の検出に優れたプライマーおよび酵素を検討した。次に、増菌培地として mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC を、分離培地として薬剤 C を添加した培地等での *astA* 保有大腸菌の生育性を検討した。上記にて選定された各種方法を用いてさらに検討を進めた。具体的には、試験検体の *astA* 確認試験では、39 食品を供試し、検体 25

g 入りストマッカー袋を各 20 袋（=20 検体）用意し、4 検体は mEC 中にて培養し、抽出 DNA を *astA*PCR（Yamamoto ら、QuickTaq 使用）に供試した。4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、添加回収試験を行ない、1 検体以上が *astA*PCR 陽性の食品は、自然汚染検体での試験を行った。添加回収試験では、*astA* 保有大腸菌を各接種菌数レベル（低菌数接種、中菌数接種、高菌数接種）に調製し、16 検体へ接種した。mEC および NmEC 中で培養し、*astA*PCR を実施した。検体培養液を薬剤 C 添加ソルビトールマッコンキー寒天培地（C-SMAC）、クロモアガー基礎培地（CHSTEC）および薬剤 C 添加 CHSTEC（C-CHSTEC）に画線し、大腸菌様コロニーへ *astA*PCR を実施した。自然汚染試験では、*astA* 保有大腸菌を添加せずに上記の試験を実施した。また、後述の [4] にて開発の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法である Assay 11r を利用して各種食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。さらに、各種食品由来 *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。

[3] *astA* 保有細菌の性状等の解析
菌種未同定の *astA* 保有細菌を Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry（MALDI-TOF MS）にて菌種同定した。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 種類の既報の *astA*PCR での検出性を比較した。また、各種 β ラクタム系薬剤や薬剤 C 添加 CHSTEC にて *astA* 保有大腸菌の生育を検討した。

[4] *astA* 特異的リアルタイム PCR

法の開発

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌株の *astA* の遺伝子多型（バリエーション）を分担研究者の伊豫田および大岡と共同で特定した。また、*astA* の各種バリエーションリファレンス配列の共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。その際、大岡からバリエーションの一部は *astA* の配列が不完全と予想されるとの情報を得たため、不完全なバリエーションタイプが検出対象から除外される候補を設計した。設計した候補 Assay について、多数の菌株を用いて特異性を試験した。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。

〔5〕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〕食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

リアルタイム PCR 法の検出感度は、全条件で 1.0 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、いずれの培地でも約 0.94 以上であり、高菌数接種で全分離培地

で 1.0 であった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で約 0.7、DHL および MAC で約 0.55 であり、高菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 0.94 以上であり、DHL および MAC で 0.85 以上であった。また、釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合は RX-DHL で 522/581 (89.8%)、RX-MAC で 548/615 (89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796 (50.8%) であった。モヤシ検体での DHL および MAC の検出感度は、リアルタイム PCR 法よりも有意に低く、MAC は RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。鶏肉検体での DHL および MAC の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出感度が有意に低かった。

〔2〕*astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

プライマーの検討では、Yamamoto らの PCR 法で陽性または陰性の判定が容易であった。酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められなかった。増菌培養法の検討では、薬剤 AB 添加培地での増殖が抑制されることが示された。分離培地の検討では、薬剤 C を添加した分離培地での生育良好であったためこれら培地を以降の試験に用いた。試験検体の *astA* 確認試験では、48/156 検体 (30.8%) が *astA* 陽性であった。添加回収試験では、C-SMAC を用いた場合は分離陽性率が他の条件よりも低かった。自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。また、*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。さらに、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。

〔3〕*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、*Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae*、および *Klebsiella 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* PCR 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。

〔4〕*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

単一のバリエーションのみ保有する株は 14 株中 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、バリエーションの種類としては、prototype が最も多くの株で保有されていた。全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類および不完全なバリエーション以外の全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマ

ーおよびプローブセット 4 種類を設計した。特異性試験では、設計された候補が目的のバリエーション特異的に増幅することを確認した。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。IC も加えた特異性試験では、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 CFU/mL であり、検量線の近似曲線は、 $R^2 > 0.98$ であった。

〔5〕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。

D. 考察

〔1〕食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

E. albertii が検体あたり 80 CFU 以上であれば食品から高率に検出が可能であることが判明した。約 18 CFU でも、リアルタイム PCR 法で高率に検出されること、鶏肉では高率に分離も可能であることが示された。しかし、モヤシでは、分離培養法で分離されない検体もあった。リアルタイム PCR 法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示されたことから、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地の

ほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。

〔2〕*astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された。添加回収試験では、30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。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 を併用し CHSTEC または C-CHSTEC で分離培養することで、より効率に *astA* 保有大腸菌が分離されると考えられた。

〔3〕*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。

〔4〕*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

配列上完全な *astA* を効率よく検出することが食品から *astA* を検出する上で重要である。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 について詳細に検討したところ、*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。

〔5〕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る。

E. 結論

E. albertii に関する本研究では、食品検査法を2段階に分けて検討したところ、優れた増菌培養法、リアルタイム PCR 法および分離培養法が示された。コラボレイティブスタディでも優れていることが確認された。

また、*astA* 保有大腸菌に関する本研究では、*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。また、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ため *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 法を新規に開発した。本リアルタイム PCR 法は特異性および感度に優れるため、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有用と考えられた。

さらに、腸管出血性大腸菌の食品

での検査法について、現在の通知法の試薬や機器について現状に即した変更が必要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)

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

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

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

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

19(10):704-712, 2022.

Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. Foodborne Pathogens and Disease 19(12):823-829, 2022.

Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne infection. Foodborne Pathogens and Disease 19(10), 704-712, 2022.

Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. Foodborne Pathogens and Disease 19(12), 823-829, 2022.

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)

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

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

ンド

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

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子．市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第117回日本食品衛生学会学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子．市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第94回日本細菌学会総会．令和3年3月29-31日．オンデマンド
新井沙倉、土井りえ、小西典子、尾畑浩魅、榊田希、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子．食品からの *Escherichia albertii* 検出のための特異的リアルタイムPCR法の検討．第43回日本食品微生物学会学術総会．令和4年9月29-30日．東京
榊田希、尾畑浩魅、小西典子、土井りえ、新井沙倉、甲斐明美、廣瀬昌平、工藤由起子．食品を対象とした *Escherichia albertii* 分離培養法の検討．第43回日本食品微生物学会学術総会．令和4年9月29-30日．東京

山谷聡子、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、小嶋由香、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子．*Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価(1)．第

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

一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平. 新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、工藤由起子. 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬昌平、工藤由起子. 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価. 第 96 回日本細菌学会総会. 令和 5 年 3 月 16-18 日. 兵庫
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

総 合 研 究 分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

大岡 唯祐

令和 3 ～ 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。これまで収集した下痢症患者由来大腸菌 (2,730 株) の中から *astA* 遺伝子陽性株を 194 株同定し、multi-locus sequence analysis (MLSA) による系統解析の結果から、系統の異なる 31 株を選定して完全長ゲノム配列取得を行った。また、公共データベース上の完全長配列決定大腸菌株 (約 9,000 株) の中から、713 株の *astA* 遺伝子陽性株を抽出し、計 35 種類の *astA* 遺伝子バリエント (V1-V35) を同定した。保有株数の多い主要な *astA* 遺伝子バリエントは V22、prototype、V6、V27、V12、V7 であること、また、それらとは別に *astA* 遺伝子の断片を持つ株が 349 株存在することを明らかにした。各バリエントの intactness についての解析から、V7、V15、V22、V33 は premature stop codon などにより不完全であると考えられ、多数の株が保有し配列上完全なバリエントは prototype、V6、V27 の 3 種類と推定された。これら 3 種類のバリエントについて、*astA* 遺伝子高発現株を用いて HeLa 細胞への細胞障害性の解析、カイコへの病原性評価を実施したがいずれも有意な結果は得られなかった。prototype、V2、V7、V31、V32 がコードされた挿入配列 IS1414 は構造的に intact であることが判明し、これらのバリエントが今後、ゲノム上でのコピー数増加に関わる可能性が示唆された。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、共通する病原因子の同定を試みたが、同一バリエント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、共通する遺伝子バリエントや病原関連遺伝子等の同定を行った結果、*astA* 遺伝子バリエントに共通するものの、blaTEM-1B や blaCTX-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。

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最終目標とする。

B. 研究方法

[1] 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

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

[2] Random amplified PCR polymorphic DNA 法 (RAPD) を用いた

株多様性の検討

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

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

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

[4] 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目 (2) で作成した系統樹から比較的系統の異なる 31 株を選定し、MiSeq (Illumina) および MinION (Nanopore) による完全長ゲノム配列取得を行った。具体的には DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を精製し、250-300 bp のショットガンフラグメントライブラリー-Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina) を用いて作製し、MiSeq により解析した。また、長鎖ゲノム DNA は NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) を用いて精製し、短鎖 DNA を除去したのち、MinION で解析した。得られたロングリード配列を MiSeq リード配列とともに unicycler-v0.4.8 でハイブリッドアセンブルした。

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

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

〔6〕同定した *astA* 遺伝子保有株（鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 749 株）に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

項目〔4〕で得られたゲノム配列を元に、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの配列比較を行い、それらのゲノム上での局在・コピー数について検討した。また、*astA* 遺伝子はトランスポゾン的一种である挿入配列 IS1414 の内部にコードされているため、IS1414 の構造的特徴をもとに転移能の有無を検討した。

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

計 744 株についてコア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行った。進化系統解析は、各ゲノム配列を DFAST でアノテーションした後、Roary（アミノ酸配列相同性 80%以上）によりコア遺伝子の抽出、アライメントし、iqtree を用いて系統解析した。系統樹は iTOL (<https://itol.embl.de>) を用いて作成した。同定された *astA* 遺伝子バリエーションを系統樹上にマップし、系統と分布の関連を解析した。

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

744 株のコア遺伝子ゲノム系統解析結果において、異なる系統に同一

バリエーションがあり、その局在がプラスミドであったものについて、プラスミド構造を比較し、同一プラスミドによる水平伝播の可能性を検証した。具体的には各株からバリエーションが局在するプラスミドの配列を抽出し、GenomeMatcher3.04 の CompareSequences 機能を用いて比較した。

〔9〕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* 遺伝子バリエーションを保有する 395 株について、CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングを行い、各バリエーションにのみ共通な遺伝子の抽出を試みた。

〔10〕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と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。

〔11〕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'-GGGGGAA [redacted])

██████████-3') [for prototype],
astA_P_V6-BamH_F/astA_v6-R (5'-
GGGGGAA ██████████
██████████
██████████-3') [for
V6], astA_P_V27-BamH_F (5'-
GGCCGGA ██████████
██████████
██████████-3') /astA_v27-R (5'-
GGGGGAA ██████████
██████████-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 Laboratory
Inc.) 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。

[12] 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。

[13] 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。

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

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

C. 研究結果

[1] 下痢症患者由来大腸菌株から
の *astA* 遺伝子保有株の同定

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

[2] RAPD 法を用いた株多様性の検
討

同一株の可能性が疑われる 47 組に
ついて検証した結果、5 組が同一パタ
ーンを示したこと。その結果をうけ、
それら 5 組からそれぞれ 1 株 (計 5

株)を以降の解析から除外した。

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

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

[4] 進化系統の異なる鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

MiSeq と MinION の各リード配列をハイブリッドアセンブルした結果、18 株の完全長ゲノム配列を取得することが出来た。その他の株については、類似したファージなどの挿入があったためか、染色体を環状にすることが出来なかった。ゲノムサイズは約 4.72 -5.65 Mb (平均 5.12 Mb) であった。

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

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

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

astA 遺伝子バリエーションは既知の 8 種類を含め、計 35 種類存在することが明らかとなった。

各バリエーションの遺伝子構造：V7, V15, V22, V33 は premature stop codon などにより不完全であると考えられたが、それ以外は配列上完全

な構造であった。また、5' 末端領域が完全に欠失している *astA* 遺伝子も見られた。

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

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

株あたりの各バリエーションのコピー数：prototype 保有株では、複数コピー保有する株が 145 株中 41 株 (28%) 存在し、1 株で最高 11 コピー保有する株が見られたが、他のバリエーションでは、最高でも 2 コピー保有する株が 1 株あるいは 2 株存在するのみであった。

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

[7] *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

Roary による解析からコア遺伝子が 1,600 個同定され、アライメントの結果、informative SNP は 42,536 個同定された。その結果を基に作成した系統樹に *astA* 遺伝子バリエーション

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

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

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

[9] 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。

[10] 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。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。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。

[11] 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

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

[12] 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。

[13] 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。

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

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

D. 考察

本研究では、*astA* 遺伝子保有株を中心に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し、新規因子に関しては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網羅的に抽出することで、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行うことを目的として研究を進めた。

申請者の研究グループがこれまでに当大学病院小児科および鹿児島県内の小児科から収集した下痢症患者由来大腸菌（2,970 株）および NCBI データベース上の大腸菌株ゲノム（9,065 株）における *astA* 遺伝子保有頻度の解析から、約 7.5% (907 株)

が当該遺伝子を保有していること、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在することを明らかにした。また、計 744 株の *astA* 遺伝子保有大腸菌株に関して、35 種類の遺伝子バリエーションの詳細な解析を行った結果、①保有株数の多い主要なバリエーションは V22 (218 株)、prototype (145 株)、V6 (68 株)、V27 (46 株)、V12 (36 株)、V7 (12 株) であること、②バリエーション V7, V15, V22, V33 は欠損しており、不完全であると考えられること、③各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤5' 末端が完全に欠損している *astA* 遺伝子を保有する株を含めるとほとんどの大腸菌進化系統 (phylogroup A, B1, B2, C, D, E) に偏りなく散在していることがわかった。加えて、⑥株間のプラスミド比較から、同一バリエーションをコードしているプラスミド構造にも共通性が低いこと、⑦prototype, V2, V7, V31, V32 の 5 種類のバリエーションをコードする挿入配列 IS1414 は intact な構造であるがそれ以外は欠損しており、転移能を持たないと考えられることも明らかとなった。これらのことから、*astA* 遺伝子を保有する株を特異的に検出する疫学マーカーとなる遺伝子を同定するのは困難であること、また、単に全ての *astA* 遺伝子バリエーションを同定する現在用いられている PCR 等の検査法では、不完全なバリエーションも検出してしまうため、実際に病原性に寄与しているバリエーションのみを識別出来る検査法が必要であることが示唆された。また、臨床的・疫学的に重要なバリエーションとそうでな

いものを識別する必要性もあることが明らかとなった（今年度中に論文投稿予定）。

配列上完全な *astA* 遺伝子バリエントを保有する大腸菌株 395 株に限定して解析を進めたが、各 *astA* 遺伝子バリエントに共通する疫学マーカーとなる遺伝子の同定は困難であった。そのため、集団感染由来株にさらに特化して *astA* 遺伝子バリエント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ところ、集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエント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が明らかとなった。

コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエント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と考えられた。

E. 結論

本研究により、*astA* 遺伝子の多様性と大腸菌進化系統における分布など、これまで機能を含め不明な点が多かった *astA* 遺伝子の特性を知ることが出来た。しかしながら、機能解析

では *astA* 遺伝子にコードされる EAST1 の病原性について、少なくとも単独で機能するという知見を得ることは出来なかった。*astA* 遺伝子が IS1414 の転移と連動して発現する可能性も考えられることから、今後は 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とともに、*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必要がある。他の病原型も含め、多様性解析以降の病原性に関するデータをまとめて学会発表を行うとともに、国際科学雑誌での論文化を進めていく。

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, 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）

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

総 合 研 究 分 担 研 究
報 告 書

病原大腸菌食中毒事例株の解析

伊豫田 淳

令和 3 ～ 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 保有大腸菌に特徴的な系統や病原性因子等を明らかにするために、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムを用いた *astA* 保有株の検索、*astA* がコードする EAST1 の発現解析、培養細胞感染試験、および有症事例株を対象にした全ゲノム配列解析を行った。さらに血清型が O166:H15 である *astA* 保有大腸菌の病原性究明を行うためゲノム解析と細胞付着因子の特定、および分離検出法開発のため特徴的な性状の探索を試みた。*astA* 保有株の探索では、約 3% で同遺伝子の保有が認められ、O26:H11 および O115:H10 で比較的高い保有率が認められた。さらに同遺伝子の多くは *IS*1414 上に存在しており、様々な系統の株が水平伝播により獲得していることが示唆された。EAST1 の発現解析では、ウェスタンブロッティングによる検出手法を確立し、有症例由来大腸菌 O7:H4 および O166:H15 において EAST1 ペプチドの発現を確認した。培養細胞感染試験では、O166:H15 および OgGp9:H18 において CHO および INT407 細胞への付着性が認められた。2020 年の大規模食中毒から分離された大腸菌 O7:H4 について、公共データベースから近縁株のゲノムを抽出して系統解析を行ったが、直接的な関連性が疑われる近縁株は見出されなかった。一方で、複数の血清型の有症事例由来 *astA* 保有大腸菌を用いた系統解析においても株間の関連性は見出されなかったことから、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であることが判明した。大腸菌 O166:H15 に着目した解析では、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。さらに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 O166: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が分類の指標となる。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。一方で、*astA* 保有大腸菌は健康者からも検出されることが知られているが、食中毒由来株との特徴的な違いや病原性について明らかとなっていない。本研究では、ゲノム解析による *astA* の分布調査や周辺領域の解析、食中毒事例由来株を用いた系統解析、完全長ゲノム配列による病原性関連遺伝子の保有状況比較、ウェスタンブロッティングによる EAST1 の定性的な発現解析と培養細胞への感染実験による表現型確認を行った。さらに *astA* 保有大腸菌のうち食中毒起因菌として最も多く報告される血清型である O166:H15 の株について、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を試みた。

B. 研究方法

[1] ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

2007 年から 2021 年に国内で分離され国立感染症研究所・細菌第一部でゲノム解読を行った大腸菌等 (*E. albertii* を含む) 計 3,613 株を解析対象とした。一部の株については、以下の方法で新たに WGS 情報を解読した: ゲノム DNA 抽出を行い、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) を用

いてライブラリー調製を行った。作製したライブラリーを用いて、HiSeqX (illumina) によってペアエンドシーケンシング (150-mer×2) を行った。得られたショートリードは、SPAdes によるアセンブリを行いドラフトゲノムを得た。ドラフトゲノムを対象にして、BLAST 検索によって *astA* の検出を行った。*astA* の検出は次の基準で行った: VirulenceFinder

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

[2] *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

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

[3] 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の集団下痢症事例株で 11 種類の血清型を含む 26 株の *astA* 陽性大腸菌、および O166:H15 株に着目した解析を行うため 5 株の非集発由来 EHEC 株についても WGS データを使用して BactSNP および snippy などを用いた解析パイプラインにて SNP を抽出し、最尤法により系統樹の作製、および WGS デー

タの解析により保有する遺伝子の網羅的な検出や Phylogenetic group の確認も行った。さらに、2020 年に 2,958 名の患者が報告された、海藻を原因食品とする食中毒事例から分離された大腸菌 07:H4、および 3 事例の食中毒事例から分離された株を含む 15 株の大腸菌 0166:H15 については、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ゲノムデータを用いて国際比較を行った。系統解析は上記の解析パイプラインを用いて行い、さらに Multilocus sequence typing (MLST) による ST の検出も行った。

[4] 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。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ズ解読を 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、

replicon typing
(<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)、薬剤耐性遺伝子の検索
([inder\)を行った。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。](http://genepi.food.dtu.dk/resf</p></div><div data-bbox=)

[5] EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロッティングによって行った。供試菌株として、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌を主とした、5 血清型 (07:H4、166:H15、169:H45、0gGp7:H6、0gGp9:H18) 計 7 株を用いた。加えて、JNE21-003 (0166:H15) および JNE22-001 (07:H4) について、*astA* 配列およびプロモーター領域を pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) を使用してクローニングし、同プラスミド (pGEM-*astA*) を親株に導入した。これらの株についても本解析に供試した。なお、JNE21-003 は、染色体上とプラスミド上に異なる配列の *astA* が存在したため、それぞれを pGEM-*astA1* および pGEM-*astA2* としてクローニングを行った。各菌株から作製した SDS-PAGE サンプルを Peptide-PAGE mini (TEFCO) に添加し、Tris/Tricine/SDS Buffer (Bio-Rad) を使用して泳動を行った。その後、Immun-Blot PVDF 0.2 μm メンブレン (Bio-Rad) に転写し、Anti-EAST1 Rabbit Polyclonal Antibody (Avantor-VWR) で標識を行った。ウェスタンブロッティングの陽性対照としては合成した EAST1 ペプチド、陰性対照としては大腸菌実験室 (非病原性) 株である JM109 株を使用した。

[6] 培養細胞を使用した *astA* 陽性

大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞侵入性、細胞傷害性および細胞付着性の解析を行った。対象株は上記 1 と同じ *astA* 陽性大腸菌を使用した。細胞侵入性は HEP-2 細胞に約 1.0×10^7 の菌を接種、1 時間培養後に PBS で 3 回洗浄し、50 $\mu\text{g/mL}$ ゲンタマイシン加 DMEM 培地を加え 1 時間培養することで細胞外の菌を殺菌した。その後、PBS で 3 回洗浄し、1% Triton X を加え細胞溶解後、LB 寒天平板に塗抹し、細菌数を計数した。侵入性試験の陽性対照としては *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 株および 14028s 株を、陰性対照としては EHEC 0157:H7 Sakai 株を用いた。細胞傷害性については HeLa 及び Vero 細胞を使用した。対象は各血清型の食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌に加え、1 で作製した pGEM-*astA* 導入株、対照として EHEC 0157:H7 Sakai 株および JM109 株とした。各細胞に各菌株抽出液を接種し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) で生細胞数の測定を行い、菌液を接種していないウェルの細胞数を 100% として評価を行った。細胞付着性は HEP-2、HeLa、CHO および INT407 細胞を使用した。対象株は各血清型の *astA* 陽性大腸菌に加え、CHO 細胞を使用した試験のみ血清型 0166:H15 の EHEC 4 株 (JNE181928、JNE162304、JNE192196、JNE192777) も供試した。試験方法は一晚培養菌液を約 100 MOI となるよう各細胞に接種し 1% マンノースを加えた各細胞培養液で 3 時間培養を行った。その後、PBS にて 3 回洗浄し、メタノール固定とギムザ染色を行った後、顕微鏡観察を行った。

[7] プラスミド導入株の作製と細胞付着性の解析

JNE21-003 (食中毒由来 *astA* 保有大腸菌 0166:H15 株) 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 細胞による細胞付着性の解析を行うことで付着に参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。

[8] Tn-seq 解析と遺伝子破壊株の作製

上記 6 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。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 解析を実施しシークエ

ンスデータを取得した。取得した各サンプルのシークエンスデータを JNE21-003 の染色上から検出された 4,837 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。

〔 9 〕 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。

〔 10 〕 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 (Bilolig 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 〕 ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査

国内大腸菌ゲノムを用いて *astA* の保有状況を調べた結果、供試菌株の約 3% において同遺伝子の保有が認められた。血清型別にみると、026:H11 および 0115:H10 においてそれぞれ 19.0% および 34.5% と比較的高率に保有することが明らかとなった。*astA* 配列を解析したところ、新規に 11 種の変異型を同定し、暫定的な型名 (X01-11) を付与した。また、8 割以上の株において、*astA* は IS1414 のトランスポゼース配列中に含まれていた。*astA* 陽性株の病原性因子を検索したところ、大部分は志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有していた。*stx* 保有株の大部分は III 型分泌装置をコードする遺伝子群 (locus of enterocyte effacement: LEE) を保有していた。しかし、0115:H10 や 07:H4 等では主要な LEE などの細胞付着因子や他の毒素遺伝子等を保有しない株も多数認められた。比較的高率に *astA* を保有していた 026:H11 および 0115:H10 について、保有状況と系統との関係を調べた。026:H11 では、*astA* 保有株の内 45 株 (86.5%) が同一の系統に属していた。本系統では、*astA* は IS1414 上に存在せず、祖先株が同遺伝子を獲得して垂直伝播している可能性が示唆された。0115:H10 は、系統の大きく異なる ST10 および ST101 に分けられる。*astA* 保有株はいずれも ST10 に属しており、同 ST の菌株はいずれも *astA* を保有していた。

〔 2 〕 *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

既知および新規の *astA* 配列と既存の *astA* 検出用プライマー (EAST0S1 および EAST0AS2) 配列を比較したところ、*astA* 08 および 11 において 3' 末端領域に単一塩基置換が認められ

た。このため、主に 3' 領域に混合塩基を加えた *astA*-univ-F1 および *astA*-univ-R1 を設計した。*astA* 保有および非保有株で検証を行ったところ、それぞれ全て陽性および陰性の結果となった。

〔3〕集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される *astA* 陽性大腸菌の系統解析においては、9 件の事例から分離された 26 株は 6 つの Phylogenetic group (A、B1、B2、F、D、E) に分類され、いずれも事例間の関連性は低いことが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例で分離された 9 株については 4 種の Phylogenetic group (A、B1、B2、F) に分類された。0166:H15 の系統解析結果では、3 件の食中毒事例株は最小で 130 か所の SNP が認められ、関連性が低いことが見出された。また、WGS データ解析により網羅的に遺伝子を検出した結果では、CHO 細胞への付着が認められた血清型 (0166:H15、OgGp9:H18) の株にのみ保有が認められる付着因子は検出されなかった。公共データベースに登録されているゲノムデータを用いた解析のうち、血清型が 07:H4 の株については、2020 年の食中毒由来株と近縁であった 49 株を用いて系統樹を作製した結果、食中毒由来株と最も近縁であったのは、カタール由来株で 20-21 か所の SNP が認められた。次にレバノン由来株が 22-23 か所の SNP が認められた。さらに、タンザニアおよび中国由来株との間には約 60 か所の SNP が認められた。中国株は下痢症からの分離との情報があったが、その他の株では臨床情報は得られなかった。血清型が 0166:H15 の株については、作製した系統樹、MLST および各遺伝子保

有状況の結果では、0166:H15 株は 4 種類の MLST に分類され、解析を行った多くの株は ST349 に分類されたが、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。

〔4〕EAST1 発現解析

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

〔5〕培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

細胞侵入性試験では、供試した *astA* 陽性大腸菌 11 株においては陰性対照である Sakai 株に比べて顕著な侵入性は認められなかった。細胞傷害性試験では、HeLa 細胞を使用した試験で非病原性株である JM109 株との間に大きな差は認められなかった。また、Vero 細胞を使用した試験では野生株と pGEM-*astA* 導入株との比較を行ったが、大きな差は認められなかった。細胞付着性試験では OgGp7:H6 の血清型の株 (JNE21-011) について HEp-2, HeLa および CHO 細胞を使用して試験を行ったところ、細胞剥離が確認された。残りの 4 つ血清型の 9 株については、HEp-2 および HeLa 細胞を使用した試験ではいずれの株も検討した条件では細胞付着性は認められなかった。CHO および INT407 細胞を使用した試験では血清型が 0166:H15 または OgGp9:H18 である 5 株が細胞への付着性を示したが、

残りの 2 つの血清型（07:H4, 0169:H45）に属する 4 株は検討した条件ではいずれにおいても細胞付着性は認められなかった。EHEC 0166:H15 4 株についても CHO 細胞を使用して同条件で試験を行ったが、細胞付着性は認められなかった。[6] 完全長配列の解析

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。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。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。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。

[7] 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。そのため、付着に關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。

[8] 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。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。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 1194 種類、そのうち必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1078 種類存在した。

[9] 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。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。

[10] 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

astA 保有大腸菌の病原性については未だ不明瞭な部分が多く存在するが、本研究では所内に保管される過去 15 年分の大腸菌から取得したゲノムデータ、および過去の食中毒事例から実際に分離された菌株を複数用いて解析を行ったことで、*astA* は大腸菌の約 3% から検出されること、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であること、さらに一部の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などを明らかにした。さらに 0166:H15 の血清型については、*astA* 保有大腸菌による食中毒事例において最も多く報告されることなどから、本菌について分離検出法の開発を試みたが、簡便な分離検出法に利用可能な性状等は検出されなかった。しかし、病原性究明を目的としたゲノム解析や表現型の解析により有用なデータを取得することができた。

astA 保有大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例では、健常者や食品からも種々の *astA* 保有大腸菌が分離されたことから、同菌は広く分布することが示唆された。0166:H15 株に着目した解析では、供試した EHEC と non-EHEC の株はいずれも Phylogenetic group E に属したが、3 件の食中毒事例由来株は同一の系統であった。大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較では、比較的近縁な菌株が中東、ア

フリカおよび中国で見いだされた。これらの株についての疫学情報は入手できなかったため、直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 保有大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。しかし、細胞傷害性試験では、検討した条件では EAST1 による傷害性を示す結果を得ることができなかった。EAST1 の病原性への寄与については、今後別の手法で検証する必要がある。0gGp7:H6 株 (JNE21-011) については培養細胞への感染実験において細胞剥離が確認された。同株は、細胞剥離に関与するとされる溶血素遺伝子 (*hlyA*) を保有していた。*hlyA* の病原性への関与は不明であるが、今後検証する必要がある。一方で、細胞付着性試験においては、食中毒事例由来 0166:H15 株と 0gGp9:H18 株が CHO および INT407 細胞への付着性を示した。細胞への付着性は同血清型の病原性に関与している可能性があると考えられる。

0166:H15 株に着目した系統解析から、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。さらに、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をして解析を続ける必要がある。

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。output/input値についても指標となる有用なデータを取得していく必要があるため、取得したデータについて追加の解析を行っていく必要がある。今後、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

*astA*は国内分離大腸菌にも広く分布し、さらに*astA*保有大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。血清型が0166:H15である*astA*陽性大腸菌については、細胞付着性を示すことが明らかとなり、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がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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

(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. 知的財産権の出願・登録状況

なし

総 合 研 究 分 担 研 究
報 告 書

食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法

大西 貴弘

令和 3 ～ 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に関する研究
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

本研究の目的は *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を調査することによって、汚染食品を明らかにし、効果的な食中毒予防法を確立することである。汚染調査の結果、鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける *astA* 保有大腸菌の汚染が深刻であることが明らかになった。汚染菌量は食品の種類に関わらず、約 10^5 MPN/100g 以下であった。オクラを用いた *astA* 保有大腸菌の接種実験を行ったところ、オクラの表面で長期間生残できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖を抑制するためには 10°C 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

近年、既存の分類に属さない下痢原性大腸菌による食中毒事例が多発している。特に *astA* (EAST1: 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1) 保有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。効果的な予防対策を確立するためには、汚染食品、汚染経路を明らかにする必要があるが、多くの *astA* 保有大腸菌による事例で、原因食品が不明となっている。また、*astA* 保有大腸菌による事例だけでなく、腸管凝集付着性大腸菌、腸管病原性大腸菌による事例でも同様に、原因食品が明らかになっていないものが多い。これまでに、食品における *astA* 保有大腸菌の汚染調査が行われているが、調査食品のカテゴリーが偏っていたり、

検体数が不足していたりするものが多く、結果として *astA* 保有大腸菌の汚染食品、汚染経路について不明な点が多く残されたままとなっている。本研究では、*astA* 保有大腸菌を中心とした下痢原性大腸菌の汚染食品や汚染経路を明らかにするために、食品における汚染大腸菌の汚染率および汚染菌量の調査を行った。調査を行うにあたっては、調査食品のカテゴリーに偏りが出ないように注意を払った。また、汚染が重度に見られた食品に対しては、接種実験を行い、菌の増殖挙動を観察し、菌が増殖しない条件を検討した。

B. 研究方法

[1] 検体

調査に使用した検体は、神奈川県

内のスーパーマーケットおよび小売店で購入した。検体は購入後、4℃で保管し、24 時間以内に試験に供した。

〔 2 〕 食品における下痢原生大腸菌の汚染実態調査

検体 25 g に mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、42℃、22～24 時間、増菌培養を行なった。培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、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 法でスクリーニングを行い、大腸菌の病原因子の検出を行なった。何らかの病原因子が検出された場合、クロモアガーECC を用いてコロニーの分離を試みた。分離コロニーは、コロニー-PCR によって病原因子を再確認した上で、生化学性状試験を行い、大腸菌であることを確認した。

〔 3 〕 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。検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、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 本法で行った。42℃、22 時間、培養後、培養液からアルカリ熱抽出法で DNA を抽出し、PCR で *uidA* と *astA* の検出し、*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。

〔 4 〕 0 遺伝子型別

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

〔 5 〕 オクラにおける増殖挙動の解

析

TSB 培地 10mL に 1 エーゼの菌を接種し、37℃、72 時間培養した。培養菌液 1 mL を PBS 100mL に加え、よく攪拌した（ 1×10^7 cfu/mL）。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、4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にストマッカー袋を取り出し、オクラに静山している菌数を測定した。

C. 研究結果

〔 1 〕 食品における下痢原性大腸菌の汚染実態調査

スクリーニングの結果、鶏肉は陽性率が高く、31 検体全てで *astA* が陽性となった。*astA* 単独陽性が 8 検体、*astA* と *eae* が陽性になった検体が 21 検体、*astA* と *elt* が陽性となった検体が 2 検体であった。これらの検体から 36 株が分離された。*astA* 単独保有株が 30 株、*astA*、*eae* 保有株が 2 株、*eae* 単独保有株が 2 株、*astA*、*estIa* 保有株が 1 株、*estIa* 単独保有株が 1 株分離された。鶏肉分離株における *astA* 保有率が非常に高いことが明らかになった。

豚肉はスクリーニングで 22 検体中 6 検体が *astA* 陽性であったが、菌株を分離できなかった。しかし、スクリーニングでひき肉と内臓肉の陽性率が高かった。そこで、ひき肉と内臓肉をさらに調査したところ、40 検体中 29 検体がスクリーニング陽性となり、21 検体から *astA* 保有大腸菌が分離された。

牛肉では 24 検体中 6 検体がスクリーニングで *astA* 陽性となった。2 検体が *astA* 単独陽性、2 検体が *astA* と *eae* 陽性、1 検体が *astA*、*stx2*、*estIa* 陽性、1 検体が *astA*、*eae*、*stx2* が陽

性であった。牛肉からは *astA*、*eae* 保有株を 1 株分離した。

魚介類では 70 検体中 6 検体がスクリーニングで *astA* 陽性であった。エビは 10 検体中 4 検体、サバは 2 検体中 1 検体、スズキは 1 検体中 1 検体が陽性であった。*astA* 単独保有株を 3 株分離した。

野菜では 99 検体中 6 検体が *astA* 陽性であった。*astA* 単独保有株を 3 株分離した。海外産オクラと海外産ヤングコーンの陽性率が高かったため、さらに調査を行ったところ、オクラ 36 検体中 11 検体がスクリーニング陽性となり、5 検体から *astA* 保有株を分離した。ヤングコーンは、29 検体中 19 検体がスクリーニングで陽性となり、*astA* 単独保有株 3 株、*bfpB* 単独保有株 1 株が分離された。

[2] 分離菌株の 0 遺伝子型別

2021 年度および 2022 年度の汚染実態調査から、牛由来 11 株、鶏肉由来 51 株、豚肉由来 36 株、野菜由来 16 株、魚由来 6 株、計 120 株が分離された。分離された型別は合計 65 種類あった。最も多かったのが、型別不能で 17 株 (14.3%)、次いで、0g8 が 8 株 (6.7%)、0g88 が 7 株 (5.8%)、0gGp9 が 4 株 (3.3%) と多く分離された。しかし、食品ごとに特定の傾向は認められなかった。[3] 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

汚染が強く認められた鶏肉、豚内臓肉、海外産オクラ、海外産ヤングコーン、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%) が陽性となり、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。豚内臓肉は 35 検体中 17 検体

(49%) が陽性となり、汚染菌量は 20~5,422 MPN/100 g の範囲であった。オクラは 35 検体中 7 検体 (20%) が陽性となり、汚染菌量の範囲は 20~3,476 MPN/100 g であった。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 102 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。

[4] オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ由来の *astA* 保有大腸菌をオクラに接種し、4℃、10℃、25℃で培養し、7 日までの菌数を測定した。

25℃で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖したが、約 10^5 cfu/mL で平衡状態に達し、培養 7 日目まで菌数を維持した。

10℃で培養した場合、菌数はほとんど変化せず、培養 7 日目でも接種菌数を維持した。

4℃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。

D. 考察

汚染実態調査の結果から、鶏肉、豚内臓肉、海外産オクラ、海外産ヤングコーンが *astA* 保有大腸菌に重度に汚染されていることが明らかになった。鶏肉やオクラは生食する可能性があるため、特に注意が必要であると考えられる。また、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖性を検討したところ、オクラの表面でも、25℃で保管した場合、菌が増殖し、オクラ 1 本当たり最大 10^5 cfu まで増殖することが確認できた。また、10℃では、菌の増殖は認められなかったが、7 日後でも接種菌数を維持したまま生残し

ていた。菌を増殖させないためには、少なくとも 10℃以下での保管が必要であることが、今回の結果から明らかになった。現在、我が国では海外からの輸入オクラが非常に多く流通している。輸送時の温度管理が適切に行われなかった場合、*astA* 保有大腸菌が増殖し、食中毒の原因になる可能性が示唆された。

一方で、*astA* 保有大腸菌の病原性については不明な点が非常に多い。また、今回の調査では、鶏肉から *astA* 保有大腸菌が高率に分離された。しかし、*astA* 保有大腸菌が原因と考えられる食中毒事例は非常に少ない。このため *astA* 自体は病原性に関与していない、あるいは病原性を発現するためには *astA* に加えて他の因子が必要である可能性が示唆された。以上の結果から、*astA* は食中毒原因菌のマーカーとしては適切ではないと考えられた。

E. 結論

本研究では、食品における *astA* 保有大腸菌の汚染状況について調査した。結論として、*astA* を食中毒原因菌のマーカーとして使用するのには適切でないと考えられた。しかし、食中毒事例が発生していることから、未知の病原因子を保有している可能性がある。室温で放置すると、食品中で増殖するため、野菜をはじめとする食品の衛生管理には注意を払う必要性が認められた。

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)

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. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
Ohnishi T., Hara-Kudo Y.	Presence and quantification of pathogenic <i>Arcobacter</i> and <i>Campylobacter</i> species in retail meats available in Japan.	Letters in Applied Microbiology	73	81-87	2021
Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y.	Detection of <i>Escherichia albertii</i> in retail oysters.	Journal of food protection	85 (1)	173-179	2022
Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y.	Development of a selective enrichment medium for the detection of <i>Escherichia albertii</i> in foods and the analysis of a foodborne infection.	Foodborne Pathogens and Disease	19 (10)	704-712	2022
Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y.	Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect <i>Escherichia albertii</i> in chicken meat.	Foodborne Pathogens and Disease	19 (12)	823-829	2022

廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正.	富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査.	病原微生物 検出情報	43 (10)	15-16	2022
水上克己、黒崎薫、楠秀子、江戸岳夫、横田夏生、桐溪茜、榮野真由美、鈴木富勝、瀧波賢治、大屋賢司、廣瀬昌平、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、八幡裕一郎、土橋酉紀、砂川富正.	富山市の学校給食における牛乳を原因とする食中毒事例疫学調査解析.	病原微生物 検出情報	43 (10)	16-18	2022
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)	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 <i>Escherichia albertii</i> 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 <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