

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

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究

令和 7 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

星薬科大学薬学部薬学科

令和 8（2026）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

1. 病原大腸菌の特性解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

工藤 由起子

(1) 市販オクラの *astA* 保有大腸菌の汚染実態・・・・・・・・ 25

(2) *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析・・・・・・・・ 37

2. 病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化・・・・・・・・ 48

大岡 唯祐

3. 病原大腸菌の付着性の解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

窪村 亜希子

4. 食品汚染における食品特性の解明・・・・・・・・・・ 71

小嶋 由香

5. 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法・・・・ 87

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・ 95

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究

研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

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
窪村亜希子 国立感染症研究所
小嶋由香 川崎市健康安全研究所
大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究を、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 5 研究分担班にて実施した。分担研究 (1) 病原大腸菌の特性解析では、*astA* 保有大腸菌の食品での検出法や汚染状況の検討、分離株の解析、動物モデルでの食品由来株と患者由来株の差異、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製等を検討した。(2) 病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化では、IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーションの発現亢進条件や *Escherichia albertii* の免疫磁気ビーズ濃縮法を検討し、*astA* 遺伝子バリエーションの多様性等に関する研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に発表した。(3) 病原大腸菌の付着性の解析では、集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出され、さらなる解析によって病原性解明の可能性が期待された。(4) 食品汚染における食品特性の解明では、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒防止には温度管理が重要であることが示され、乳酸菌による本菌生残性への検討が必要と考えられた。(5) 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法では、腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案を作成した。

研究協力者

国立感染症研究所

李 謙一、伊豫田 淳

地方衛生研究所等

川崎市健康安全研究所

浅井威一郎、淀谷雄亮、佐藤英子

横浜市衛生研究所

国立医薬品食品衛生研究所

星薬科大学

松本裕子

新井沙倉、廣瀬昌平、大西貴弘

荒木靖也、伊藤彩花、佐伯英莉衣、

佐藤菜々美、森谷悠衣、天野壮俊、

大塚佳代子、奥 輝明、築地 信

A. 研究目的

日本では多様な病原大腸菌による食中毒が発生しており、社会的に問題となっている。令和 2 年には、学校給食での *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 (小中学生等患者 3,453 人) が発生し、その後も本菌食中毒の発生が続いている。また、令和 2 年には腸管毒素原性大腸菌の大規模食中毒 (患者 2,548 人)、令和 3 年には給食の牛乳による主要な病原因子を保有しない病原大腸菌の大規模食中毒 (児童等患者 1,896 人) が発生しており、病原大腸菌食中毒の発生が続いている。さらに、腸管出血性大腸菌による食中毒は、減少傾向は認められず、令和 4 年以降、馬刺による食中毒、複数県のスTEEキチェーン店での事例等が報告されている。

これまでの調査で、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離され、食中毒発生の頻度には見合わないことから、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと考えられ、食中毒由

来株と食品汚染株の特性の違いの解明によって、病原性を担う因子を明らかにすることが必要とされている。また、これら病原大腸菌の食品汚染状況や食品での生残性は汚染の制御を確立するために重要である。さらに、食中毒での食品試験法の重要性は一層高く、現状の腸管出血性大腸菌食品試験法を現代に合うように見直しが必要であり、他の病原大腸菌についても食中毒対応が速やかに行われるように食品試験法が示される必要がある。

このため、本研究班では、分担研究 (1) 病原大腸菌の特性解析、(2) 病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化、(3) 病原大腸菌の付着性の解析、(4) 食品汚染における食品特性の解明、(5) 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法、にて実施する。

これらから得られた成果を日本での食中毒防止に役立てるとともに、成果や対策を海外に発信していくことによって、海外での食中毒発生時に日本が貢献することにつながることを期待される。

B. 研究方法

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、11 食品について *astA* 陽性か検討し、陽性の 2 食品について、食品ごとに mEC および NmEC 培地を検体 8 袋ずつに加え $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 20~22 時間培養し、培養液を *astA* 特異的 PCR 法に供試した。また、培養液を分離培地に画線培養し、上記 PCR 法にて *astA* 保有コロニーを選別した。また、それらを生化学性状および MALDI-TOF MS に供して大腸菌の同定を行った。大腸菌株の O 抗原・H 抗原遺伝子型および *astA* バリエーションを特定した。

astA 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。各種菌株の菌液、菌液上清、加熱菌液等を BALB/c マウスに腹腔内投与後、生死を観察し、生存マウスについては体重を測定した。また、死亡マウスの心臓血を採取し、菌培養した。

EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製では、pGEX-5X-1 および pET-28b を改変して作製した pET-PelB ベクターに *astA* を組み込んだ。GST 融合タンパク質および His-tag 融合タンパク質を精製し、抗原として用いた。BALB/c マウスに対し、腹腔内投与による免疫を 1 週間間隔で計 7 回

実施した。マウスより脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞株 PAI を融合させ、培養上清中の抗体を測定した。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件として、擬似的 IS1414 を構築し、IS 転移能が亢進する環境条件として知られているヒートショックと栄養飢餓の条件について検討を行った。

Escherichia albertii の IgG 結合性因子の同定に関して、昨年度 NIAH_Bird_3 株フォスミドライブラリーを用いて同定した約 10kb のゲノム領域に関して、Wanner 変法を用いて NIAH_Bird_3 株の当該領域の遺伝子破壊株を作製し、A 抗体処理有無の条件下で遺伝子破壊株の菌回収効率を検証した。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

19 株の大腸菌 0166:H15 (5 件の集発事例由来 *astA* 保有株を含む) について whole genome sequencing を実施し、系統解析および MLST の特定を行った。さらに、4 つの血清型を含む 9 件の集発事例由来の *astA* 保有株およびその他由来の大腸菌 0166:H15 7 株 (合計 16 株) が保有するプラスミドの完全長ゲノム配

列決定を行い、Inctype の特定、病原性関連遺伝子の検出およびclinkerによる比較解析を行った。

CHO 細胞に感染させた細胞付着性および非付着性の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌 0166:H15 について、蛍光二重染色法により細胞付着および侵入菌体の検出を行った。細胞外細菌は Alexa Fluor 405 (緑)、細胞内細菌は Alexa Fluor 488 (青)、CHO 細胞は CellMask Deep Red Actin Tracking Stain により染色した。

5 件の集発事例由来大腸菌 0166:H15 株のうち細胞付着性株に共通する遺伝子を特定するため *kps* クラスター比較、さらに K 抗原データベースを用いて K 抗原特定も行った。細胞付着性への関与が示唆された遺伝子について blastx 解析および代表的な K 抗原 (K1, K4, K5) との比較により類似する遺伝子の特定も行った。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

(1) 白菜の走査型電子顕微鏡観察

白菜の白い軸部分と葉部分について、走査型電子顕微鏡 (HITACHI Su3800) にて撮影した。また、非病原性である大腸菌 (HB101) を直接塗抹した直後の白菜及び 10 mL の TSB 培地に大腸菌を培養した培養液に 4 日間浸漬させた白菜を安全キャビ

ネット内で乾燥させ、白菜表面、内部についても走査型電子顕微鏡観察を実施した。

(2) 白菜の洗浄方法の検討

次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分、200 ppm 10 分) または過酢酸製剤 (75 ppm 5 分、225 ppm 5 分) についての消毒効果の検討を行った。流水洗浄前、流水洗浄後、次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸製剤浸漬流水後、それぞれの工程ごとに 25 g を採取し希釈系列を作製し、細菌数を測定した。

また、腸管出血性大腸菌株を 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g になるよう添加し、過酢酸製剤 (75 ppm 5 分) または次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分) で消毒を行い、腸管出血性大腸菌 0157 菌数を測定した。

(3) 白菜キムチ細菌叢の解析

市販キムチ 10 検体を対象に、フルレンジ 16S rRNA 遺伝子を用いた Nanopore sequence 解析により、キムチの細菌叢の解析を行った。併せて細菌数、大腸菌群、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌、乳酸菌数、pH、水分活性及び塩分濃度についても測定を行った。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

(1) 腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) の分離同定法は、既報 (大塚ら、LWT、2019 および工藤ら、Int. J. Food Microbiol.、2020) をもとに作成した。

さらに市販のリアルタイム PCR 装置が通知法案に記載した遺伝子検査法に使用できるかどうか、その性能を評価した。通知法案に記載した遺伝子検査法は、ST と LT 遺伝子検出法 (スクリーニング) および ST と LT 遺伝子型別法であり、それぞれについて自家調製のリアルタイム PCR 法と市販キットを用いた方法を検討した。今回は自治体で広く利用されていると考えられる Thermal Cycler Dice Real Time System III および IV (タカラバイオ)、QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific)、LightCycler 96 および PRO (ロシュ・ダイアグノスティックス) を評価した。

C. 研究結果

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、オクラ 11 食品のうち、3 食品 (27.3%) が *astA* 陽性であった。そのうちの 2 食品では、mEC 培養の 16 検体 (袋) 中 8 検体から、NmEC 培養の 16 検体中 9 検

体から、*astA* 陽性菌がいずれかの分離培地で分離された。*astA* 陽性コロニーの割合は、NmEC 培養と A-CHSTEC の組み合わせが最も高く 60.0%、次いで CHSTEC が 44.7% と高かった。また、分離株は大腸菌と同定された。分離株の遺伝子的多様性の解析をしたところ、*astA* 保有大腸菌 84 分離株のうち 46 株が 0gGP12:Hg10 であった。食品ごとに異なる遺伝子型も分離され、NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型が分離された。

astA 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系の検討をしたところ、マウスの致死数は、患者由来株よりも食品由来株で多い傾向が認められた。菌培養液の上清および加熱菌液では致死は認められなかった。また、生残したマウスの体重変化は、複数株で比較すると食品株に比べて患者株ではいずれも投与後体重が大きく減少し、一部の患者由来株は観察が終了する 4 日まで回復しなかった。さらに、菌株投与後に死亡したマウスの血液から大腸菌と鑑別される赤色コロニーが多数生育した。

EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製を検討したところ、GST-EAST1 に対しては、3 回目の免疫以降で高い抗体価が確認された。一方、

EAST1-His に対しては 5 回目付近で抗体価の上昇が頭打ちとなる傾向が認められた。細胞融合後に得られた 1,504 個のクローンのうち継代 5 回目以降においても安定した増殖性と高い抗体価を維持していた 3 クローン (A9B5、A9C4、B36B5) を選抜した。GST および GST-EAST1 に対する反応性を評価した結果、各クローンが GST タグではなく EAST1 領域を認識していることが示唆された。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

(1) IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件の検討

ヒートショックに関して、本培養の培養温度を 30℃ と 42℃ で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。また、栄養飢餓に関しても、本培養の培養液を LB 培養液原液 (1x)、1/10 希釈 LB 培養液、1/100 希釈 LB 培養液で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。

(2) *E. albertii* の IgG 結合性因子の同定

E. albertii NIAH_Bird3 株について作製した IgG 結合因子候補 10kb 領域の遺伝子破壊株と野生株、

negative control として大腸菌 K-12 株を用いて菌濃縮能に関する比較を行った。その結果、野生株と当該領域の遺伝子破壊株との間で濃縮能に差が見られなかった。その一方で、negative control である大腸菌 K-12 株においても、通常見られない非常に高い菌濃縮が観察された。使用した試薬による実験への影響を確認するため、磁気ビーズの洗浄液および抗体反応液について新たに調製したものを使用したが結果に改善は見られなかった。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

(1) 大腸菌 0166:H15 株の MLST および系統解析

19 株の大腸菌 0166:H15 のうち、5 件の集発事例由来の 10 株はいずれも ST2914 に分類された。動物由来の 1 株も ST2914 に分類されたが、他の動物由来株および EHEC は ST349 に分類された。

(2) *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

16 株のうち 14 株から 1 から 6 のプラスミドが検出され、そのうち 16 の主要なプラスミドを解析した結果、9 件の集発由来株と 1 件の散発由来株は共通して *astA* と *aap* が検出される IncFII のプラスミドを保有していた。比較解析では 6 型分泌装置 (T6SS) や 4 型線毛遺伝子クラ

スター等の共通遺伝子も検出された。一方で、EHEC や動物由来大腸菌 0166:H15 が保有するプラスミドは *astA* 事例株から共通で検出されたプラスミドとは異なっていた。

(3) 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 0166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

蛍光二重染色法により染色した蛍光観察画像の重ね合わせ (Merge) により、細胞付着性を示す JNE21-003 株では細胞外菌体 (緑) と細胞内菌体 (青) が検出されたのに対し、JNE22-005 株では主に細胞内菌体 (青) のみが検出された。

(4) 集発事例由来大腸菌 0166:H15 株の *kps* クラスタ比較および K 抗原の特定

比較解析により細胞付着性株に共通する 5 遺伝子が特定された。また、細胞付着性を示す 4 株は K131 であると特定された。

(5) 集発事例由来大腸菌の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

JNE21-003 株を用いて (4) により特定した 5 遺伝子 (*galE*, LOCUS_07640 (L764), L765, *ugd*, L767) の破壊株作製と解析を行った結果、L765 破壊株 (Δ L765) および Δ L767 において細胞付着性が消失し、各相補株 (Δ L767 /pMW119-L765, Δ L767 /pMW119-L767) はいずれも細

胞付着性を示した。blastx 解析および代表的な K 抗原との比較により、L765 および L767 は糖転移酵素遺伝子であり、それぞれ K4 の *kfoC* および *kfoG* と高い相同性を示した。

[4] 食品汚染における食品特性の解明

(1) 白菜の走査型電子顕微鏡観察

購入した白菜について細菌数、大腸菌・大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数、セレウス菌数の測定を行った。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であり、部位による偏りは認められなかった。白菜から検出された細菌数の菌種のうち多くは白菜の根の周囲に生息する *Chryseobacterium* 属であった。

白菜に大腸菌を直接塗抹後、撮影した画像からは、大腸菌は確認できなかったが、増菌培養液に 4 日間浸漬させた白菜からは、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された。

(2) 白菜の洗浄方法の検討

次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分または過酢酸製剤 75 ppm 5 分浸漬させた結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g、流水洗浄後 10^4 CFU/g、消毒液浸漬後 10^3 CFU/g であった。次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm 10 分または過酢酸製剤 225 ppm 5 分に消毒液の濃度を増加し浸漬させた

結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g、流水洗浄後 10^5 CFU/g、消毒液浸漬後 10^3 CFU/g であった。

また、腸管出血性大腸菌 0157 株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g を 4 cm にカットした白菜に添加し、過酢酸製剤 (75 ppm 5 分) または次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分) で洗浄した結果、次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で洗浄を行っても 10^1 CFU/g～ 10^2 CFU/g の減少が認められた程度であった。

(3) 白菜キムチ細菌叢の解析

白菜キムチの細菌数は、 10^4 CFU/g～ 10^7 CFU/g、乳酸菌数は 10^4 CFU/g～ 10^8 CFU/g であった。

小売店で購入したものが、細菌数、乳酸菌数ともにスーパーマーケットおよびデパートで購入したものより高い傾向にあった。大腸菌群が 4 検体から、セレウス菌が 1 検体から検出された。

塩分濃度は 2.8～3.6%、pH は 5.0～6.1、水分活性は 0.95～0.97 であった。

フルレングス 16Sr RNA 遺伝子についての Nanopore sequence 解析結果、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% を占めた。他に *Yersiniaceae* 科、

Rahnella 属 *Serratia* 属、*Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属も検出された。

[5] 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

(1) 腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

現在市販されているリアルタイム PCR 装置を用いて通知法案記載の ST と LT 遺伝子検出法および ST と LT 遺伝子型別法を検討したところ、キットを用いたリアルタイム PCR 法および自家調製のリアルタイム PCR 法のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL または 4 log CFU/mL であった。

D. 考察

[1] 病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、オクラの汚染率は 27.3% であり、過去の調査においても陽性率 20% であったことから取り扱いに注意を要すると考えられた。また、菌分離のためには NmEC 培地による増菌培養が適していると示された。さらに、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合から見ると、NmEC 培養と A-CHSTEC および CHSTE の組み合わせによる検査法が優れていた。なお、SMAC 上では大腸菌群と *astA* 保有大腸菌が類似した赤色コロニーを形成し、

判別が困難であることが分離率低下の原因であると推察された。また、mEC 培養と NmEC 培養で菌株の遺伝子型の構成が異なっており、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。

astA 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系の検討をしたところ、患者由来株よりも食品由来株でマウスの致死性が高い傾向が見られ、想定した結果とは異なっていた。しかし、食品および患者由来の両株で致死が認められ、NBRC 株では致死に至っていないことを考えると *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。一方、生残したマウスでの体重回復は、患者由来株で弱い傾向が認められたため、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、体重回復が弱いモデルの作出の可能性が示された。

EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製については、マウスへの免疫によって十分な抗体応答が誘導された一方で、EAST1 に対する抗体だけでなく、融合タグである GST に対する抗体も含まれている可能性が示唆された。そのため、GST を含まない EAST1-His を用いた解析が有用であると考えられた。また、EAST1 は低分子ペプチドであり抗原性が比

較的低い可能性がある。さらに、培養上清を用いた GST および GST-EAST1 に対する反応性評価の結果から、GST-EAST1 の分解産物あるいは部分的に切断されたタンパク質断片を認識している可能性が考えられた。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

構造的に intact な *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の病原性発現亢進に関する解析について、挿入配列 IS1414 の転移との連動性を調べる実験系の構築と挿入配列の転移能に関わる環境因子として、ヒートショックおよび栄養飢餓の条件について解析を行ったが、IS1414 の脱落はみられなかった。このことから、これら 2 条件は転移能 (*astA* 遺伝子の発現亢進) には関与しない可能性が示唆された。しかしながら、IS1414 の転移機構については未だ不明な点が多いことから、次年度はトランスポゼースを過剰発現させて IS 脱落が起こることを確認した上で、さらに他の条件についての検討を行う。

免疫磁気ビーズによる *E. albertii* の菌濃縮法の開発については、昨年度、NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いて同定した IgG 結合関連因子候補と考えら

れる約 10kb のゲノム領域について、当該領域の遺伝子破壊株を用いた検証を実施したが、遺伝子破壊株において菌濃縮能の低下が観察できなかった。また、これまでに得られていた結果と異なり、negative control である大腸菌 K-12 株においても菌濃縮がみられたことから用いている試薬に原因があると考えられた。ビーズ洗浄液等の溶液関連について、新規作製して検証した結果、磁気ビーズ本体に原因がある可能性が示唆された。

今後は、実験条件の再検討や試薬の再購入を行うことで、これらの問題を解消し、*astA* 遺伝子の発現亢進条件と病原機構の解明を進めるとともに、*E. albertii* の効果的な菌濃縮法の実用化および IgG 結合因子の同定を行う。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

4 つの血清型を含む 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 保有大腸菌は共通して IncFII の類似したプラスミドを保有していた。さらに同様のプラスミドは、0166:H15 株のうち EHEC ではない (non-EHEC) 散発下痢症患者由来株からも検出されたが、EHEC および動物由来株からは検出されなかった。そのため、当該プラスミドは 0166:H15 など特定の複数の血清型のうち、ヒトへの病

原性を有する non-EHEC から検出されるプラスミドである可能性が示唆された。さらに、当該プラスミド上には *astA* 以外にも *aap*、T6SS および 4 型線毛遺伝子クラスターなど複数の遺伝子が共通して存在していた。これらの遺伝子が機能しているかは不明であるが、プラスミド上の共通遺伝子に着目した解析を行うことは、本菌の病原性機序解明に繋がる可能性があると考えられる。

集発事例由来大腸菌 0166:H15 JNE21-003 株の細胞付着性は、*kps* クラスター領域 2 に含まれる 2 つの糖転移酵素遺伝子が関与していることが明らかになった。しかし、当該 2 遺伝子が 4 件の集発事例由来 0166:H15 株の細胞付着性に寄与する共通因子 (遺伝子) であることを示すためには、他の事例由来株を用いて同様の検証を行うことも重要であると考えられる。さらに、細胞付着性株の K 抗原型は K131 であり、細胞付着性に関与していた 2 遺伝子が K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* と高いアミノ酸相同性を示すことも明らかとなった。K131 以外の K 抗原型においてもこれら 2 遺伝子を含む抗原型が存在するか調査を行うことや、該当する抗原型 (K4 を含む) の大腸菌株について解析を行っていくことは、細胞付着性に関与する *kps* クラ

スターを有する大腸菌の検出系開発および *kps* クラスターによる細胞付着性の機序解明のために重要であると考えられる。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

白菜を走査型電子顕微鏡で観察した結果、埃等と思われる物質が確認されたが、中心部からは認められなかった。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 検出されていることから、*Chryseobacterium* 属が白菜内部にまで侵入していることが考えられた。

大腸菌を塗抹した白菜の走査型電子顕微鏡画像では、増菌培養液に4日間浸漬させた白菜から、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された。

また、白菜を次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分または過酢酸製剤 75 ppm 5 分浸漬させた結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄後では、 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g、消毒後では、 10^1 CFU/g 程度の菌数の減少が認められた。前述の走査型電子顕微鏡観察の結果から、白菜内部に菌の定着が認められたことより、大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき実施した消毒方法では、 10^3 CFU/g 未満の菌数の減少は難しいことが示唆された。

腸管出血性大腸菌 0157 株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g を添加し過酢酸製剤（75 ppm 5 分）または次亜塩素酸ナトリウム（100 ppm 10 分）で洗浄した結果、菌の減少は 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g 程度であった。今回の実験で使用した消毒液の濃度では、腸管出血性大腸菌 0157 を完全に除去することは難しいことが示唆された。

これらのことより、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒を防止するためには、菌を増殖させないための温度管理が重要であることが示唆された。

白菜キムチにおける細菌数、乳酸菌数は、 10^4 CFU/g $\sim$ 10^8 CFU/g であった。また、白菜キムチの Nanopore sequence 解析による細菌叢の検討結果では、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属の乳酸菌が 90% 以上を占めていた。また、今回購入したキムチの pH は全て 5.0 以上であった。白菜キムチの発酵が進み乳酸菌の増殖が促進されると pH の低下が起こる。乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告もあることから、来年度は、白菜キムチの乳酸菌の発育増殖と pH の関係性及びこれに伴う腸管出血性大腸菌 0157 の生残性についての検討を Nanopore sequence 解析を用いて行う予定で

ある。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

（1）腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

今回検討したすべてのリアルタイム PCR 装置が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。これらのリアルタイム PCR 装置の性能評価を踏まえ、ETEC 通知法案の作成を行った。

E. 結論

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として NmEC 培地を優先して選択し、可能であれば mEC 培地の併用が推奨される。また、分離培地として CHSTEC および A-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられた。*astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討し、マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。また、EAST1 特異的

モノクローナル抗体の作製を試み、EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種解析系への適用性を評価し、研究に応用する。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

astA 遺伝子陽性大腸菌に関して、*astA* 遺伝子バリエーションの多様性や機能有無の可能性などを明らかにし、その研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に投稿して掲載された。IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子の発現亢進については、トランスポゼース遺伝子のプロモータ活性を検出する実験系を構築したが、期待した結果を得られなかった。*E. albertii* の解析に関しては、フォスミドライブラリーで同定されていた 10kb 領域の遺伝子破壊株で菌濃縮能の低下がみられなかったが、実験系に問題があることが明らかとなり、次年度は試薬の再購入など確認を行ったのち解析を進める予定である。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

9 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出されたことから、当該プラスミドに着目した解析を行うことにより、集団下痢症を引き

起こす *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性がある。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

白菜に大腸菌を付着させ、走査型電子顕微鏡で観察したところ、葉脈様部位および白菜内部に大腸菌が確認された。また、白菜を大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で消毒を行った結果、細菌数の減少を認めたが、 10^3 CFU/g 未満に低下させることはできなかった。白菜内部に存在する細菌の洗浄を今回の実験法では行うことが難しかったためと考えられる。このことより、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒を防止するためには、菌を増殖させないための温度管理が重要であることが示唆された。

また、白菜キムチにおける Nanopore sequence 解析の結果、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% 以上を占めていた。

乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告もあることから、乳酸菌の発育増殖と腸管出血性大腸菌 0157 の生残性について検討を行うことを考えている。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大

防止のための検査法

ETEC の分離同定法に関する通知法案を作成した。作成した通知法案については厚生労働省と協議を行い、発出を進めていきたいと考える。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

（誌上発表）

Ooka T, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, *astA*, in *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2025 Oct 22;16:1635769.

Arai, S., Ikeda, N., Kadoguchi, M., Arikawa, E., Mizokoshi, A., Shimmen, K., Yokoyama, K., Doi, R., Saiki, D., Yatsuyanagi, J., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Evaluation of PCR assays for detecting *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene encoding the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 in various food matrices. Food Safety. 13(4):70-77, 2025.

工藤由起子、大屋賢司．富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質検査．日本食品微生物学会雑誌．43(1)，20-24，2026.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

(学会等発表)

新井沙倉、野本竜平、伊豆一郎、大野祐太、山谷聡子、土屋彰彦、小嶋由香、小西典子、千葉雄介、大西貴弘、工藤由起子．市販食品および河川水における腸管毒素原性大腸菌の汚染実態調査．第98回日本細菌学会総会．令和7年5月29-31日．石川県金沢市

伊豆一郎、新井沙倉、野本竜平、千葉雄介、土屋彰彦、山谷聡子、小西典子、大野祐太、小嶋由香、廣瀬昌平、大西貴弘、工藤由起子．食品等での腸管毒素原性大腸菌の汚染実態について．第46回日本食品微生物学会学術総会．令和7年9月18-19日．川崎市

Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Development of detection methods of *Escherichia albertii*, an emerging zoonotic enteropathogen in food. 11th One Health Aotearoa Symposium. 2-3 Dec., 2025. Wellington, New Zealand.

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究
研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書
病原大腸菌の特性解析
研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

研究要旨

近年、日本では、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST1) をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。食中毒の原因食品究明には、適した培養法の選択が重要であるため、食品の汚染状況を調べるとともに効率的な培養法を検討した。市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、本菌食中毒事例対応の際は、増菌培地として NmEC 培地を優先して選択し、可能であれば mEC 培地も併用し、分離培地として CHSTEC および A-CHSTEC を選択することが推奨されることが示された。加えて、分離株の多様な遺伝子型についても示された。*astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体を作製した。EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種解析系への適用性をさらに評価し、研究に応用する。

研究協力者

星薬科大学

荒木靖也、伊藤彩花、佐伯英莉衣、
佐藤菜々美、森谷悠衣、天野壮俊、
大塚佳代子、奥輝明、築地信

国立医薬品食品衛生研究所

新井沙倉、廣瀬昌平、大西貴弘

A. 研究目的

近年、日本では、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST1) をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。食中毒細菌の食品検査では、培養法によっては食品由来細菌が優勢に増殖し、対象となる食中毒細菌の分離が困難な場合がある。そのため、食中毒の原因食品究明には、対象となる食中毒細菌に適した培養法の選択が重要である。そこで本研究では、市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態を明らかにするとともに、増菌培地および分離培地を比較することを目的とした。また、分離株について、O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型別、*astA* バリエーション解析を行い、遺伝子的多様性について解析した。

また、これまでの調査で、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離されることが明らかになり、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと推察された。このため、食中毒由来株と食品汚染株の特性の違いの解明によって、病原性を担う因子を明らかにすることが可能になると考えられた。本研究では、まず、食品由来株と患者由来株で異なる点を明らかにする。研究で明らかになった差異をもとに、食中毒発

生に関連する可能性の高い因子を明らかにする。

今年度は、動物での病原性評価モデルの検討のため、富山市食中毒事例株で大腸菌株の病原性モデルとして採用されたマウスへの腹腔内投与での生死による評価を参照し、本研究でも実施し、病原性の評価モデルを検討した。また、腸管凝集付着性大腸菌の病原性（毒性）の発現と *astA* 遺伝子の関連について解析をするため、*astA* 翻訳産物である EAST1 の発現に注目し EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

[1] 市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

(1) *astA* スクリーニング試験

オクラ国内産 5 食品および外国産 6 食品の計 11 食品を供試した。それぞれ 25 g を量り取ったストマッカー袋を 20 袋用意し、うち 4 袋へ mEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を行った後、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 20~22 時間培養した。検体培養液各 0.1 mL をアルカリ熱抽出法に供し、得られた DNA 抽出液をテンプレート DNA として、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (Yamamoto ら) を実施した。4 袋のうち 2 袋以上が陽性となった 2 食品を次の試

験に供試した。冷蔵保管していた残りのストマッカー16袋のうち8袋に mEC 培地を、8袋に NmEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を行った後、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 20～22 時間培養した。各増菌培養液 0.1 mL から抽出したテンプレート DNA を上記 PCR に供した。分離培地には、ソルビトールマッコニー寒天培地 (SMAC) に薬剤 A を添加した A-SMAC、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC) および CHSTEC に薬剤 A を添加した A-CHSTEC を用いた。培養液を画線塗抹し、 37°C にて 20 時間培養し生育したコロニーを観察し、A-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および A-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 10 個選択し、CHSTEC に単離し、 37°C にて 18 時間培養した。単離した CHSTEC 上の藤色コロニーの *astA* 保有を上記 PCR 法にて確認した。*astA* 保有コロニーについては、TSI および LIM にて大腸菌の生化学性状と一致するか確認した。また、MALDI-TOF MS による大腸菌の同定も実施した。

(2) 分離株の遺伝子的多様性の解析

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有大腸菌株 84 株を O 抗原遺伝子型 (井口らの方法) および H 抗原遺伝子型 (Banjo らの方法) 解析に供

した。また、生産国、増菌培地、分離培地、O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型を元に代表菌株 29 株を選定し、遺伝子シーケンス解析によって *astA* 配列を決定し、*astA* リファレンス配列と比較し、*astA* バリエントを特定した。

[2] *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

(1) 動物モデルでの病原性評価系の検討

astA 保有大腸菌の食品由来 9 株 (食 1～食 9) および食中毒事例等患者由来 5 (患 1～患 5)、並びに *astA* 非保有大腸菌株である NBRC3972 株を供試した。試験菌液の調製は次の 4 つのように行った。

- 1) 培養液を PBS にて 1/2 または 1/10 に希釈した菌液を作製した。
- 2) 培養液を 3,500 rpm で 20 分間遠心し、その上清を濾過滅菌し滅菌上清を作製した。
- 3) 2) で残った沈殿をさらに 5,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去し、2) で使用した培養液量と同量の PBS で沈殿を再浮遊して菌浮遊液を作製した。
- 4) 3) で作製した再浮遊液を 100°C で 1 分間加熱し加熱菌液を作製した。BALB/c マウス (5～6 週齢、雄) に各試料 0.2 mL を腹腔内投与した。投与後、経時的に生死を観察し、生存マウスについて体重測定した。死亡マウスの心臓血を採取

し、菌培養した。

(2) EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

前年度に作製した pQE-EAST1 を鋳型として、EAST1 遺伝子 (*astA*) を PCR 法により増幅し、pGEX-5X-1 および pET-28b を改変して作製した pET-PelB ベクターに組み込んだ。pET-PelB は、N 末端にペリプラズム移行シグナル配列、C 末端に His-tag 配列を付加できる発現ベクターである。作製した各発現プラスミドは、発現宿主として大腸菌 BL21[DE3]株に導入した。GST 融合タンパク質および His-tag 融合タンパク質を精製し、GST-EAST1 と Aluminum hydroxide hydrate gel suspension (LSL) を等量混合し、懸濁したものを抗原として用いた。BALB/c マウス (5 週齢、雄) に対し、腹腔内投与による免疫を 1 週間間隔で計 7 回実施した。最終免疫 2 日後、マウスより脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞株 PAI を、Polyethylene glycol 4000 for gas chromatography を用いて融合させた。GST-EAST1 または EAST1-His をプレートに固相化し、一次抗体として PBS で倍希釈したマウス血清、またはハイブリドーマ培養上清を用いた。検出には HRP 標識 Goat anti-Mouse IgG 抗体を使用し、基質として SureBlue TMB

1-Component Microwell Peroxidase Substrate を用いて発色させた後、450 nm における吸光度を測定した。

遺伝子組換え生物等の使用は、星薬科大学組換え DNA 実験安全及びバイオセーフティ委員会の承認、動物実験は星薬科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

[1] 市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

(1) *astA* スクリーニング試験

11 食品 44 検体 (袋) のうち、3 食品 (27.3%) が *astA* 陽性であった。そのうちのオクラ 2 食品では、mEC 培養の 16 検体中 15 検体 (93.8%) が *astA* 陽性であり、NmEC 培養の 16 検体中 9 検体 (56.3%) が *astA* 陽性であった。mEC 培養で陽性の 15 検体中 8 検体が、いずれかの分離培地で菌分離でき、NmEC 培養で陽性の 9 検体中全て、いずれかの分離培地で菌分離できた。釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC 培養で 4.3%、NmEC 培養で 49.0% であり、NmEC 培養の A-CHSTEC が最も高く 60.0%、次いで CHSTEC が 44.7% と高かった。供試菌株 84 株は全て *E. coli* と同定された。

(2) 分離株の遺伝子的多様性の

解析

供試菌株 84 株のうち 46 株が 0gGP12:Hg10 であった。フィリピン産とタイ産では、異なる遺伝子型も分離された。NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型を分離できた。フィリピン産では、v6、v12 のバリエーションが検出され、タイ産では v12、v13 のバリエーションが検出された。

〔2〕 *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

（1）動物モデルでの病原性評価系の検討

マウスの致死数は、患者由来株よりも食品由来株で多い傾向が認められた。投与量については 1/2 希釈が 1/10 希釈よりも致死数が多かった。培養上清および加熱菌液では致死は認められなかった。また、生残したマウスの体重変化は、複数株で比較すると生残した食品由来 1 株では投与後体重が減少し、2 日目以降体重が回復傾向であったが、患者株ではいずれも投与後体重が食品株に比べて大きく減少し、患者由来 2 株は 3 日目以降体重が回復傾向であった。しかし、他の患者由来 2 株は観察が終了する 4 日まで回復しなかった。菌株投与後に死亡したマウスの血液から大腸菌と鑑別される赤色コロニーが多数生育した。

（2）EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

GST-EAST1 に対しては、3 回目の免疫以降で高い抗体価が確認された。一方、EAST1-His に対しては 5 回目付近で抗体価の上昇が頭打ちとなる傾向が認められた。細胞融合後に得られた 1,504 個のコロニーのうち継代 5 回目以降においても安定した増殖性と高い抗体価を維持していた 3 コロニー（A9B5、A9C4、B36B5）を選抜した。GST および GST-EAST1 に対する反応性を評価した結果、各コロニーが GST タグではなく EAST1 領域を認識していることが示唆された。

D. 考察

〔1〕市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

オクラ汚染率は 27.3% で、過去に実施した調査においてもオクラは陽性率 20% であったことから取り扱いに注意を要すると考えられた。

astA 保有大腸菌の分離試験結果から、菌分離のためには NmEC 培地による増菌培養が適していることが示された。

釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合から見ると、NmEC 培地と A-CHSTEC および CHSTEC の組み合わせによる検査法が優れて

いた。なお、SMAC 上では大腸菌群と *astA* 保有大腸菌と類似した赤色コロニーが形成されるため判別が困難であることが、分離率低下の原因であると推察された。また、mEC 培養と NmEC 培養で菌株の遺伝子型の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。

〔2〕 *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

動物モデルでの病原性評価系の検討では、食品由来および患者由来の *astA* 保有大腸菌をマウスに腹腔内投与した。食品由来株は病原性を保有しないものが多く、患者由来株は病原性を保有するものと考えていたが、患者由来株よりも食品由来株でマウスの致死性が高い傾向が見られ、想定した結果とは異なっていた。しかし、食品および患者由来株の両株で致死が認められたこと、NBRC 株では致死に至っていないこと、を考えると由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。一方、生存したマウスでの体重の変化においては、食品由来株では体重の回復が認められるが、患者由来株では体重の回復が弱い傾向が認められたため、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、患者由来株の方が食品由来株より

も体重回復が弱いモデルの作出が可能かもしれない。

また、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製については、マウスへの免疫によって十分な抗体応答が誘導された一方で、EAST1 に対する抗体だけでなく、融合タグである GST に対する抗体も含まれている可能性が示唆された。そのため、GST を含まない EAST1-His を用いた解析が有用であると考えられた。また、EAST1 は低分子ペプチドであり抗原性が比較的低い可能性がある。さらに、培養上清を用いた GST および GST-EAST1 に対する反応性評価の結果から、GST-EAST1 の分解産物、あるいは部分的に切断されたタンパク質断片を認識している可能性が考えられた。

E. 結論

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、本研究での分離率の差および分離株の多様性を考慮すると、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として NmEC 培地を優先して選択し、可能であれば mEC 培地も併用する。また、分離培地としては CHSTEC および A-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられた。加えて、分離株の多様な遺伝子型についても示され

た。*astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体を作製した。EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種解析系への適用性をさらに評価し、研究に応用する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ikeda, N., Kadoguchi, M., Arikawa, E., Mizokoshi, A., Shimmen, K., Yokoyama, K., Doi, R., Saiki, D., Yatsuyanagi, J., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Evaluation of PCR assays for detecting *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene encoding the enteroaggregative *E. coli* heat-stable

enterotoxin 1 in various food matrices. Food Safety. 13(4):70-77, 2025.

工藤由起子、大屋賢司. 富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質検査. 日本食品微生物学会雑誌. 43(1), 20-24, 2026.

(学会等発表)

Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Development of detection methods of *Escherichia albertii*, an emerging zoonotic enteropathogen in food. 11th One Health Aotearoa Symposium. 2-3 Dec., 2025. Wellington, New Zealand.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

なし

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究
研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書
病原大腸菌の特性解析
研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

協力研究報告書
市販オクラの *astA* 保有大腸菌の汚染実態

研究要旨

近年、日本では、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST1) をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。しかし、*astA* 保有大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、本菌による食中毒事例では、原因食品が不明であることが多い。原因食品特定に対応するためには、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が必要である。そこで、市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態を明らかにするとともに、増菌培地および分離培地を比較した。また、分離株について O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型別、*astA* バリエーション解析を行い、遺伝子的多様性について解析した。分離株の 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り、mEC 培養と NmEC 培養で遺伝子型の構成が異なっていた。以上のことから、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、増菌培地として mEC 培地および NmEC 培地を併用することで *astA* 保有大腸菌をより広範囲に検出することが可能であると考えられた。

研究協力者

星薬科大学

荒木靖也、伊藤彩花、佐伯英莉衣、
佐藤菜々美、森谷悠衣、天野壮俊、
大塚佳代子、奥輝明、築地信

国立医薬品食品衛生研究所

新井沙倉、廣瀬昌平、大西貴弘

A. 研究目的

近年、日本では、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (EAST1) をコードする遺伝子である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。食中毒細菌の食品検査では、培養法によっては食品由来細菌が優勢に増殖し、対象となる食中毒細菌の分離が困難な場合がある。そのため、食中毒の原因食品究明には、対象となる食中毒細菌に適した培養法の選択が重要である。そこで本研究では、市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態を明らかにするとともに、増菌培地および分離培地を比較することを目的とした。また、分離株について、O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型別、*astA* バリエーション解析を行い、遺伝子的多様性について解析した。

なお、*astA* 保有大腸菌の増菌培養の温度条件については事前に検討し、37℃より 42℃が優れていることを確認して本研究に採用した。また、分離培地であるソルビトールマッコンキー寒天培地およびクロモアガー STEC 培地への薬剤 A 添加濃度は、令和 3 年度の検討結果等をふまえて決定した。

B. 研究方法

[1] 市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

(1) *astA* スクリーニング試験

1) 食品検体

スーパーマーケットや青果店にて購入したオクラ国内産 5 食品および外国産 6 食品の計 11 食品を供試した。

食品 (550 g 以上) を滅菌トレーなどの上で細切した後に均一化し、食品 10 g を量り取ったストマッカー袋を 1 袋と食品 25 g を量り取ったストマッカー袋を 20 袋用意した。各食品の一般生菌数および大腸菌群数を計測するために、10 g を秤量したストマッカー袋に、滅菌リン酸緩衝液 (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 倍段階希釈して $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 希釈液を調製した。 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 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。

また、XM-G 寒天培地の赤 (ピンク ~ 赤紫) コロニー数を計測し、食品 1 g あたりの大腸菌群数を算出した。

2) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

食品を秤量した 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 は $10,000\times g$ 10 分間遠心して上清を除き、50 mM NaOH を 100 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 16 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（アルカリ熱抽出）、*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 1 検体につき 2 反応実施した（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（図 1）。

（2）*astA* 保有大腸菌の分離試験
（1）の 2）で 4 袋のうち 2 袋以上が陽性となった 2 食品を供試した。

各食品を 2 種類の増菌培地中で培養し、その培養液を *astA* 特異的 PCR 法および分離培養法を行った（図 2）。

1）*astA* 特異的 PCR 法

冷蔵保管していたストマッカー 16 袋のうち 8 袋に mEC 培地を、8 袋に NmEC 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。

各増菌培養液 0.1 mL から（1）の 2）と同様のアルカリ熱抽出によってテンプレート DNA を 16 検体作製し、*astA* 特異的 PCR 法に供試した（n2）。

2）分離培養

分離培地は、ソルビトールマッコンキー寒天培地（SMAC、OXOID）に薬剤 A を添加した A-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 CHSTEC に薬剤 A を添加した A-CHSTEC を用いた。16 検体の増菌培養液を各 2 枚の A-SMAC、CHSTEC および A-CHSTEC に画線塗抹し、 37°C 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、A-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および A-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 10 個選択し、CHSTEC に単離し、 37°C にて 18 時間培養した。

3) コロニーの *astA* 保有確認

2) で単離した CHSTEC 上の藤色コロニーを DW100 μ L に懸濁し、100℃ 10 分間加熱した。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 $\times$ g 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとし、(1) の 2) と同様の条件で *astA* 特異的 PCR 法を実施した (n1)。

4) 生化学的性状の確認

3) の *astA* 特異的 PCR 法で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て大腸菌の生化学性状と一致することを確認した。

5) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による大腸菌の同定

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有菌株 84 株を供試した。 *E. coli* ATCC8739 (NBRC3972, ESC703) 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

所) を 10 mg/mL の割合で溶解し、調製した。供試株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。菌体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* ATCC8739 (NBRC3972, ESC703) 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] 分離株の遺伝子的多様性の解析

(1) O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有大腸菌株 84 株を供試した。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。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、バンドを確認した。

(2) *astA* バリエーションの特定

1) 供試菌株

生産国、増菌培地、分離培地、O抗原遺伝子型およびH抗原遺伝子型を元に代表菌株 29 株を選定した。

2) 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)) 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 10 μ M に調製した。98°C 10 秒の熱変性のうち、98°C 10 秒－55°C 5 秒－72°C 30 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。この際、目的のバンドが確認されなかった菌株については、異なるプライマー(論文投稿中)を用いて同様の操作を行った。ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシュサイエンティフィック) によって PCR 産物を精製した。その後のシーケンス解析は FASMAC((株)ファスマック) に委託した。決定した配列について、35 種類の *astA* リファレンス配列と比較した。

C. 研究結果

[1] 試験検体の *astA* スクリーニング試験

(1) *astA* スクリーニング試験

本研究にて供試したオクラ 11 食品において、生菌数は $1.1 \times 10^6 \sim 3.21 \times 10^7$ CFU/g であり、大腸菌群数は $5.0 \times 10^5 \sim 1.84 \times 10^7$ CFU/g であった(表 1)。

また、11 食品 44 検体(袋)のうち、3 食品(27.3%)が *astA* 陽性であった。検体が *astA* 陽性であることと一般生菌数、大腸菌群数に関連性は認められなかった。

(2) *astA* 陽性大腸菌の分離試験

オクラ 2 食品の増菌培養液からの *astA* 検出は、mEC 培養の 16 検体中 15 検体(93.8%)が *astA* 陽性であり、NmEC 培養の 16 検体中 9 検体(56.3%)が *astA* 陽性であった(表 2)。

mEC 培養で陽性の 15 検体中 8 検体が、いずれかの分離培地で菌分離でき、NmEC 培養で陽性の 9 検体中全て、いずれかの分離培地で菌分離できた(表 3)。

釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を増菌培地別に比較すると、mEC 培養で 4.3%、NmEC 培養で 49.0%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせで比較すると、mEC 培養の A-SMAC および NmEC 培養の A-SMAC で菌分離できなかった。一方、NmEC 培養の A-CHSTEC が最も高く 60.0%の割合で分離でき、

次いで CHSTEC が 44.7% と高かった（表 4）。

また、生化学的性状および MALDI-TOF MS により供試菌株 84 株は全て *E. coli* と同定された。

〔2〕分離株の遺伝子的多様性の解析

（1）O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

供試菌株 84 株のうち 46 株が OgGP12:Hg10 であり高頻度に分離される遺伝子型であり、8 株は OgUT:HgUT であった。また、フィリピン産とタイ産では、異なる遺伝子型も分離された。

mEC 培養と NmEC 培養では、OgGP12:Hg10 が重複する遺伝子型であり、NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型を分離できた（表 5）。

（2）*astA* バリエーションの特定

フィリピン産では、v6、v12 のバリエーションが検出され、タイ産では v13、v12、v53 のバリエーションが検出された（表 6）。

D. 考察

〔1〕市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

astA スクリーニング試験に供試した 11 食品のうち 3 食品（27.3%）が *astA* 陽性であった。過去に実施した調査においてもオクラは陽性

率 20% であったことから取り扱いに注意を要すると考えられた。

astA 保有大腸菌の分離試験において、*astA* 遺伝子の検出率は mEC 培養で 93.8%、NmEC 培養で 56.3% であったが、菌分離では mEC 培養で 53.3% に対し NmEC 培養で 100% と高かった。そのため、菌分離のためには NmEC 培地による増菌培養が適していると示された。

一方、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合から見ると、NmEC 培地と A-CHSTEC および CHSTEC の組み合わせによる検査法が優れていた。なお、SMAC 上では大腸菌群と *astA* 保有大腸菌と類似した赤色コロニーが形成されるため判別が困難であることが、分離率低下の原因であると推察された。

〔2〕分離株の遺伝子的多様性の解析

オクラから分離された *astA* 保有大腸菌株の O 抗原遺伝子型、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。mEC 培養と NmEC 培養で菌株の遺伝子型の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、増菌培地として mEC 培地および NmEC 培地を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより広範囲に検出すること

が可能であると考えられた。

E. 結論

本研究での分離率の差および分離株の多様性を考慮すると、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地として NmEC 培地を優先して選択し、可能であれば mEC 培地も併用する。また、分離培地としては CHSTEC および A-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ikeda, N., Kadoguchi, M., Arikawa, E., Mizokoshi, A., Shimmen, K., Yokoyama, K., Doi, R., Saiki, D., Yatsuyanagi, J., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Evaluation of PCR assays for detecting *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene encoding the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 in various food matrices. Food Safety. 13(4):70-77, 2025.

(学会等発表)

Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Development of detection methods of *Escherichia albertii*, an emerging zoonotic enteropathogen in food. 11th One Health Aotearoa Symposium. 2-3 Dec., 2025. Wellington, New Zealand.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

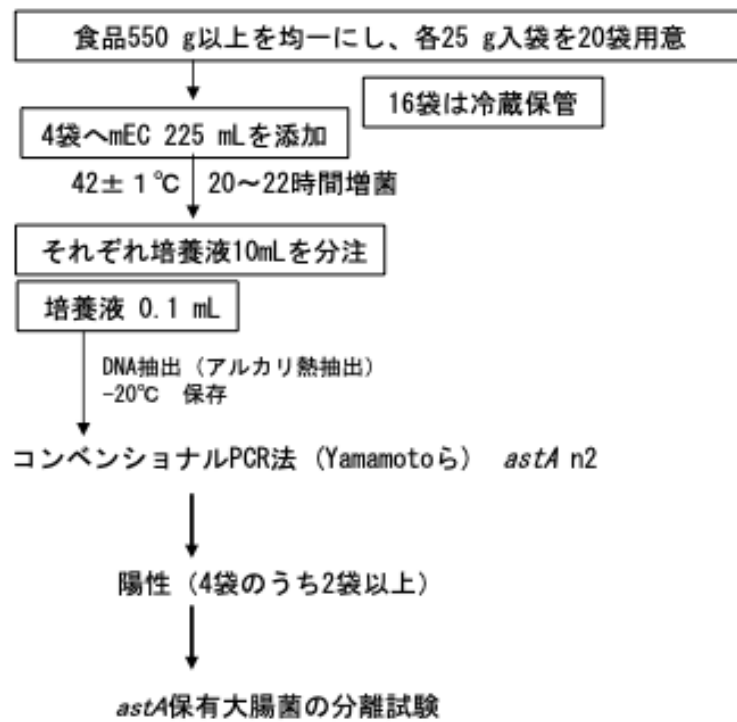


図 1. 試験検体の *astA* スクリーニング試験

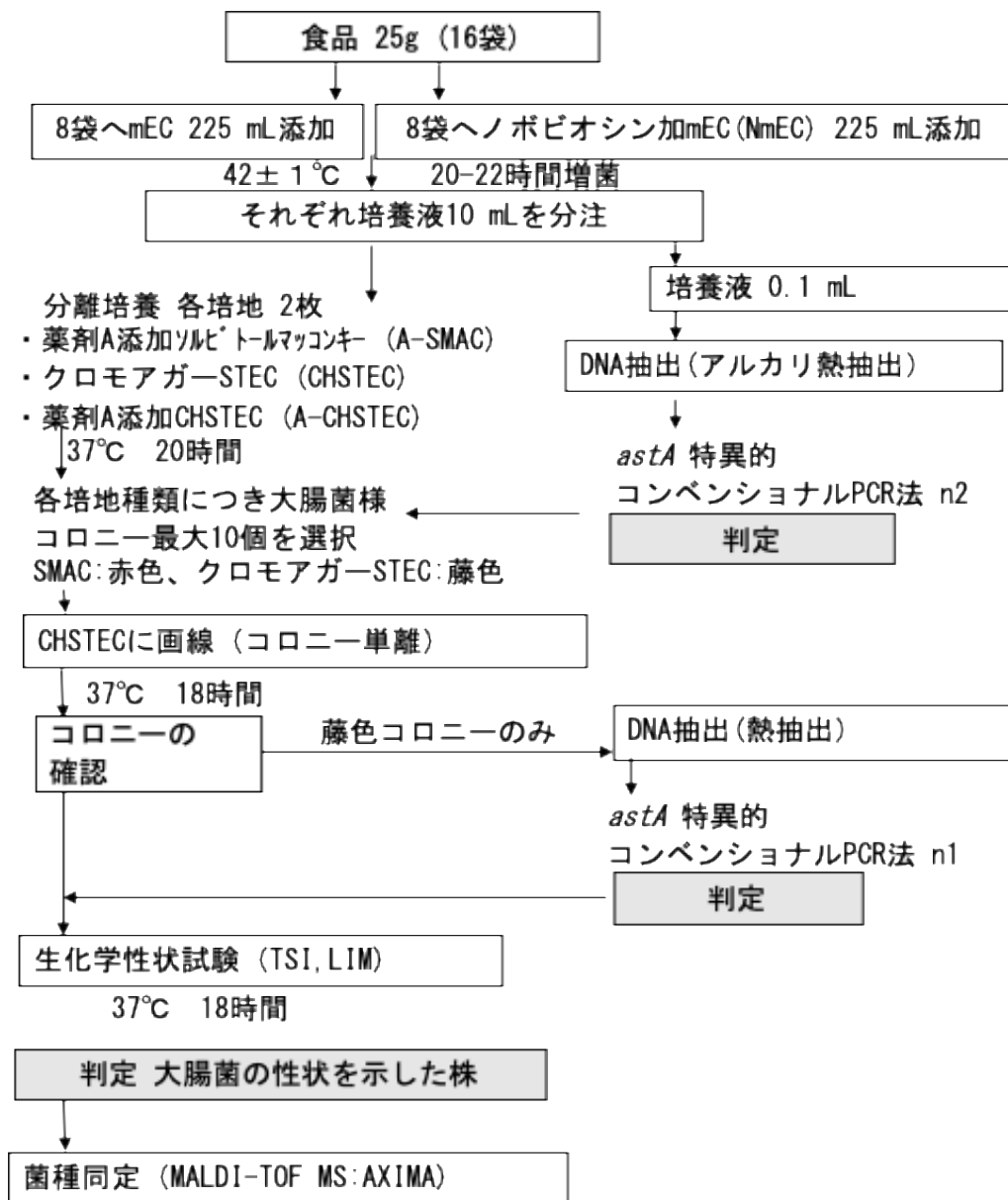


図 2. *astA* 保有大腸菌分離試験

表 1. 試験検体の生菌数および大腸菌群数

産地	生菌数 CFU/g	大腸菌群数 CFU/g
国産	1.1×10^6	5.0×10^5
国産	1.03×10^7	6.3×10^6
国産	3.21×10^7	1.84×10^7
国産	1.70×10^7	9.0×10^5
国産	3.9×10^6	2.0×10^6
フィリピン	1.39×10^7	1.9×10^6
フィリピン	2.14×10^7	3.2×10^6
タイ	2.78×10^7	6.6×10^6
フィリピン	2.84×10^7	1.24×10^7
タイ	5.95×10^6	5.5×10^5
タイ	1.07×10^7	1.8×10^6

表 2. 各増菌培地における *astA* 特異的 PCR 陽性検体

検体	mEC	NmEC
フィリピン	8/8 ^{*1}	7/8
	(100) ^{*2}	(87.5)
タイ	7/8	2/8
	(87.5)	(25.0)
合計	15/16	9/16
	(93.8)	(56.3)

*1 PCR陽性検体数/供試検体数

*2 陽性率(%)

表 3. 増菌培地および分離培地別の *astA* 保有大腸菌分離検体

検体	mEC				NmEC			
	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地
フィリピン	0/8* ¹ (0)* ²	2/8 (25.0)	4/8 (50.0)	6/8 (75.0)	0/7 (0)	4/7 (57.1)	7/7 (100)	7/7 (100)
タイ	0/7 (0)	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)	0/2 (0)	1/2 (50.0)	2/2 (100)	2/2 (100)
合計	0/15 (0)	3/15 (20.0)	6/15 (40.0)	8/15 (53.3)	0/9 (0)	5/9 (55.6)	9/9 (100)	9/9 (100)

*1 *astA* 保有大腸菌が分離された検体 (袋) / *astA* 特異的PCR陽性検体 (袋)

*2 陽性率 (%)

表 4. 増菌培地および分離培地別の *astA* 保有大腸菌の検出

検体	mEC				NmEC			
	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地
フィリピン	0/21* ¹ (0)* ²	3/40 (7.5)	8/80 (10.0)	11/141 (7.8)	0/8 (0)	14/27 (51.9)	45/70 (64.3)	59/105 (56.2)
タイ	0/23 (0)	1/70 (1.4)	1/70 (1.4)	2/163 (1.2)	0/8 (0)	3/11 (27.3)	9/20 (45.0)	12/40 (30.0)
合計	0/44 (0)	4/110 (3.6)	9/150 (6.0)	13/304 (4.3)	0/16 (0)	17/38 (44.7)	54/90 (60.0)	71/145 (49.0)

*1 *astA* 特異的PCR陽性コロニー数/釣菌コロニー数

*2 陽性率 (%)

表 5. *astA* 保有大腸菌株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型

検体	mEC		NmEC		合計
	Og型 : Hg型	株数	Og型 : Hg型	株数	
フィリピン	Og174:Hg38	2	Og9:Hg4	3	70
	OgGP12:Hg10	9	Og139:Hg5	8	
			Og139:HgUT	5	
			Og61:Hg34	1	
			OgGP12:Hg10	36	
			OgGP12:Hg4	1	
			OgUT:HgUT	5	
	小計	11	小計	59	
タイ	OgUT:HgUT	2	OgGP12:Hg10	1	14
			Og85:Hg10	10	
			OgUT:HgUT	1	
			小計	12	
合計		13		71	84

表 6. *astA* 保有大腸菌株の *astA* バリエント

検体	mEC			NmEC			合計
	バリエント	Og型 : Hg型	株数	バリエント	Og型 : Hg型	株数	
フィリピン	v6	Og174:Hg38	1	v6	Og9:Hg4	2	23
					Og61:Hg34	1	
					Og139:Hg5	3	
					Og139:HgUT	1	
					OgUT:HgUT	2	
	v12	OgGP12:Hg10	5	v12	OgGP12:Hg10	8	
	小計		6	小計		17	
	v13	OgUT:HgUT	2	v12	OgGP12:Hg10	1	6
タイ				v53	Og85:Hg10	2	
					OgUT:HgUT	1	
				小計		4	
合計			8			21	29

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究

研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書

病原大腸菌の特性解析

研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

協力研究報告書

astA 保有大腸菌の特性および病原性の解析

研究要旨

これまでの研究成果から、全ての *astA* 保有大腸菌が食中毒を引き起こすのではない可能性が考えられ、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと推察されており、本研究では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。加えて、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、患者由来株の方が食品由来株よりも体重回復が弱いモデルの作出の可能性が示された。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製では、腸管凝集付着性大腸菌が産生する EAST1 を検出するモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体の特異性や感度、各種解析系への適用性をさらに評価し、*astA* 保有大腸菌における EAST1 の発現および分泌性（菌体内・培養上清中）の解析に応用する。

研究協力者

星薬科大学

奥 輝明、大塚佳代子、築地 信

A. 研究目的

日本では多様な病原大腸菌による食中毒が発生しており、社会的に問題となっている。令和 2 年には、学校給食での *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（小中学生等患者 3,453 人）が発生し、その後も本菌食中毒の発生

が続いている。しかし、海外での食中毒発生報告は知られておらず、本菌の性質や病原性などの詳細はあまり解明されていない。これまでの調査で、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離されることが明らかになった。その頻度は比較的高く、一方で食中毒発生の頻度は低いことを考えると全ての *astA* 保有大腸菌が食中毒を引き起こすのではない可能性が考えられ、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと推察された。このため、食中毒由来株と食品汚染株の特性の違いの解明によって、病原性を担う因子を明らかにすることが可能になると考えられた。本研究では、まず、食品由来株と患者由来株で異なる点を明らかにする。研究で明らかになった差異をもとに、食中毒発生に関連する可能性の高い因子を明らかにする。

今年度は、動物での病原性評価モデルの検討のため、富山市食中毒事例株で大腸菌株の病原性モデルとして採用されたマウスへの腹腔内投与での生死による評価を参照し、本研究でも実施し、病原性の評価モデルを検討した。

また、腸管凝集付着性大腸菌の病原性（毒性）の発現と *astA* 遺伝子の関連について解析をするため、*astA* 翻訳産物である EAST1 の発現

に注目し解析を行っている。唯一の市販品抗 EAST1 抗体（Biorbyt、ウサギポリクローナル抗体）を用いて、菌培養上清の Peptide-PAGE および Western blot を行ったところ、TSB 培地の成分（約 29 kDa）を認識していることを前年度に報告した。今年度は、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製を試みた。

本研究では、以上のように *astA* 保有大腸菌の由来による差異と病原性の関係について検討を行う。

B. 研究方法

〔1〕動物モデルでの病原性評価系の検討

（1）供試菌株と培養

astA 保有大腸菌の食品由来 9 株（食 1 ～ 食 9）および食中毒事例等患者由来 5（患 1 ～ 患 5）、並びに *astA* 非保有大腸菌株である NBRC3972 株を供試した。

カジトン培地に保管された菌株を Tryptone Soya Broth (TSB; 0X0ID) に接種し、37℃ で 18 時間培養した。培養液から（2）の試料を作製した。また、試料調製ごとに培養液の菌数測定を行った。培養液を滅菌リン酸食塩水 (PBS) にて 10 段階希釈し、 10^{-5} から 10^{-7} 希釈液の 0.1 mL を各 2 枚の Tryptic soy agar (TSA、0X0ID) 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) 試験菌液の調製

以下の操作によって4種類の試料を作製した。1)培養液をPBSにて1/2または1/10に希釈した菌液を作製した。2)培養液を3,500 rpmで20分間遠心し、その上清をポアサイズ0.22 μm の滅菌フィルターを通して濾過滅菌し滅菌上清を作製した。3)2)で残った沈殿をさらに5,000 rpmで10分間遠心し、上清を除去し、(2)で使用した培養液量と同量のPBSで沈殿を再浮遊して菌浮遊液を作製した。4)3)で作製した再浮遊液を100℃で1分間加熱し加熱菌液を作製した。

(3) マウスへの投与

BALB/c マウス(5～6週齢、雄)を供試し、各試料につき3または5匹を1群として、0.2 mLを腹腔内投与した。投与後、経時的に生死を観察し、生存マウスについて体重測定した。動物実験は星薬科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(4) 死亡マウス血液の菌培養

一部死亡マウスにおいては無菌的に心臓を摘出し、マイクロチューブに入れ、滅菌エーゼで軽く押して得られた血液をDHL培地に画線した。37℃18時間培養後、生育したコロニーの形態を観察し鑑別した。なお、陰性コントロールとし

て、菌を投与していないマウスの心臓を供試した。

[2] EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

(1) 組換え体 EAST1 の作製

前年度に作製したpQE-EAST1を鋳型として、EAST1遺伝子(astA)をPCR法により増幅した。得られたPCR産物を、pGEX-5X-1(Cytiva)およびpET-28b(Sigma-Aldrich)を改変して作製したpET-PelBベクターに組み込んだ。pET-PelBは、N末端にペリプラズム移行シグナル配列、C末端にHis-tag配列を付加できるように設計した発現ベクターである。作製した各発現プラスミドは、発現宿主として大腸菌BL21[DE3]株に導入した。GST融合タンパク質はPierce Glutathione agarose (Thermo Fisher Scientific)、His-tag融合タンパク質はcOmplete His-tag purification resin (Sigma-aldrich)を用いて精製した。遺伝子組換え生物等の使用は、星薬科大学組換えDNA実験安全及びバイオセーフティ委員会の承認を得て行った。

(2) 抗原の調製および免疫

GST-EAST1(10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)とAluminum hydroxide hydrate gel suspension (LSL)を等量混合し、ボルテックスにより懸濁したもの

を抗原として用いた。BALB/c マウス（5 週齢、雄）に対し、腹腔内投与による免疫を 1 週間間隔で計 7 回実施した。各免疫後 2 日目に尾静脈より採血を行い、血清を調製した。最終免疫 2 日後、マウスより脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞株 PAI（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank）を、Polyethylene glycol 4000 for gas chromatography（MERCK）を用いて融合させた。融合細胞の選択および維持には、HAT 培地および HT 培地を用いた。動物実験は星薬科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

（3）Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）

GST-EAST1 または EAST1-His（1 $\mu\text{g/mL}$ ）をプレートに固相化し、5% BSA/PBS を用いてブロッキングを行った。一次抗体として、PBS で 1000 倍希釈したマウス血清、またはハイブリドーマ培養上清を用いた。検出には HRP 標識 Goat anti-Mouse IgG 抗体を使用し、基質として SureBlue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate（SeraCare）を用いて発色させた後、450 nm における吸光度を測定した。

C. 研究結果

〔1〕動物モデルでの病原性評価系の検討

（1）培養液の 1/2 または 1/10 希釈菌液

致死数は、1/2 希釈菌液で食品株の投与 1 日目で投与した全数である 5 匹、患者株では 2 日目に 1 匹であった（表 1）。また、1/10 希釈菌液で食品株では 2 日目に 1 匹であり、患者株では観察が終了する 8 日まで 0 匹であった。なお、培養に供した培地である TSB および大腸菌 NBRC3972 株では 8 日まで致死は認められなかった。

生残マウスの体重変化は、TSB と患 2 株 1/10 希釈菌液では大きな変化はなかった（図 1 a）。患者 2 株 1/2 希釈菌液および食 3 株 1/10 希釈菌液では、投与後体重が減少し、5 日目以降体重が回復傾向であった。NBRC 株では、同様に一旦減少したが、3 日目以降回復傾向となった。

（2）複数株の 1/2 希釈菌液

致死数は、食品株では食 3 株および食 9 株で投与 1 日目に投与した全数である 3 匹、食 7 株で 2 日目に 1 匹であった（表 2）。患者株では患 1 株で 2 日目に 2 匹、患 5 株で 1 日目に 1 匹であった。

生残マウスの体重変化は、食品株では食 1 株および食 2 株では大

きな変化はなかった(図1b)。食7株では投与後体重が減少し、2日目以降体重が回復傾向であった。患者株ではいずれも投与後体重が食7株に比べて大きく減少したが、患1株および患4株は3日目以降体重が回復傾向であった。しかし、患2株および患5株は観察が終了する4日まで回復しなかった。

(3) 培養液の上清、菌浮遊液およびその加熱菌液

致死数は、上清では供試した3株とも観察が終了する3日まで0匹であった(表3)。また、菌浮遊液では投与1日目で投与した全数である3匹が致死した。その加熱菌液では観察が終了する3日まで致死は認められなかった。さらに、食4株、食5株、食6株および食8株の1/2希釈菌液では投与1日目で投与した全数である3匹が致死した。

生残マウスの体重変化は、上清および加熱菌液とも投与後体重が減少し、2日目以降体重が回復傾向であった(図1c)。

(4) 死亡マウス血液の菌培養

食3株および患2株投与後1日目に死亡したマウス1匹ずつの血液を供試したところ、DHL培地に形態から大腸菌と鑑別される赤色コロニーが多数生育した。なお、陰性コントロールのマウスでは、コロ

ニーの生育は認められなかった。

[2] EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

マウス血清中の抗 EAST1 抗体価について、GST-EAST1 および EAST1-His に対する結合性を ELISA 法により評価した。GST-EAST1 に対しては、3 回目の免疫以降で高い抗体価が確認された(図2)。一方、EAST1-His に対しては 5 回目付近で抗体価の上昇が頭打ちとなる傾向が認められた。

(1) 培養上清を用いた GST および GST-EAST1 に対する反応性評価

細胞融合後に得られた 1,504 個のクローンの培養上清について、EAST1-His を抗原とした ELISA を実施し、抗 EAST1 抗体産生クローンのスクリーニングを行った。その後、継代 5 回目以降においても安定した増殖性と高い抗体価を維持していた 3 クローン(A9B5、A9C4、B36B5)を選抜し、各培養上清を用いて GST および GST-EAST1 に対する反応性をウエスタンブロット法により評価した。その結果、3 クローンはいずれも GST-EAST1 に対して明瞭な反応を示した一方で、GST に対する反応は認められなかった(図3)。これらの結果から、各クローンが GST タグではなく EAST1 領域を認識していることが示唆された。一方で、A9B5 および B36B5 で

は、GST-EAST1 試料中に含まれる GST と同程度の分子量位置にもバンドが検出された。

D. 考察

動物モデルでの病原性評価系の検討では、食品由来および患者由来の *astA* 保有大腸菌をマウスに腹腔内投与した。本研究では、*astA* 保有大腸菌が多く食品で比較的頻度高く分離されることに対して、食中毒など下痢症の患者の発生頻度は高くないことを考え、食品由来株は病原性を保有しないものが多く、患者由来株は病原性を保有するものと考えており、それを反映した動物モデルの検討を行っている。しかし、得られた結果では、患者由来株よりも食品由来株でマウスの致死性が高い傾向が見られた。ただし、生存したマウスでの体重の変化においては、食品由来株では体重の回復が認められるが、患者由来株では体重の回復が弱い傾向が認められた。投与菌数はマウス 1 匹あたり約 $8 \log$ CFU であったが、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、患者由来株の方が食品由来株よりも体重回復が弱いモデルの作出の可能性が示された。

DHL 寒天培地で大腸菌と鑑別される菌が、死亡マウスの血液から

多数検出されたことから、腹腔内投与後に投与菌が組織に浸潤し敗血症に至ったことが推定された。食品および患者由来株の両株で認められたこと、NBRC 株では致死に至っていないことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。ただし、*astA* 保有大腸菌が多く食品で比較的頻度高く分離されることに対して、食中毒など下痢症の患者の発生頻度は高くないことを考えると、やはり患者由来株は食品由来株が保有しない病原性を保有するものと思われる。

また、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製については、マウスへの免疫と血清抗体価の結果から、免疫によって十分な抗体応答が誘導された一方で、GST-EAST1 に対する反応には EAST1 に対する抗体だけでなく、融合タグである GST に対する抗体も含まれている可能性が示唆された。そのため、EAST1 特異的抗体の評価には、GST を含まない EAST1-His を用いた解析が有用であると考えられた。また、EAST1 は低分子ペプチドであり抗原性が比較的低い可能性がある。さらに、培養上清を用いた GST および GST-EAST1 に対する反応性評価の結果から、GST-EAST1 の分解産物、あるいは部分的に切断されたタンパク

質断片を認識している可能性が考えられた。

E. 結論

これまでの研究成果から、全ての *astA* 保有大腸菌が食中毒を引き起こすのではない可能性が考えられ、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと推察されており、本研究では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。加えて、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、患者由来株の方が食品由来株よりも体重回復が弱いモデルの作出の可能性が示された。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製では、腸管凝集付着性大腸菌が産生する EAST1 を検出する抗体は市販品が限られており、既存抗体では非特異的反応が認められたことから、本研究では EAST1 に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。その結果、EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種

解析系への適用性をさらに評価するとともに、*astA* 保有大腸菌における EAST1 の発現および分泌性(菌体内・培養上清中)の解析に利用する予定である。また、組換え体 EAST1 タンパク質の精製系を確立できたことから、腸上皮細胞などを用いた EAST1 刺激による細胞内 cGMP 変動解析についても検討を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

工藤由起子、大屋賢司. 富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質検査. 日本食品微生物学会雑誌. 43(1), 20-24, 2026.

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

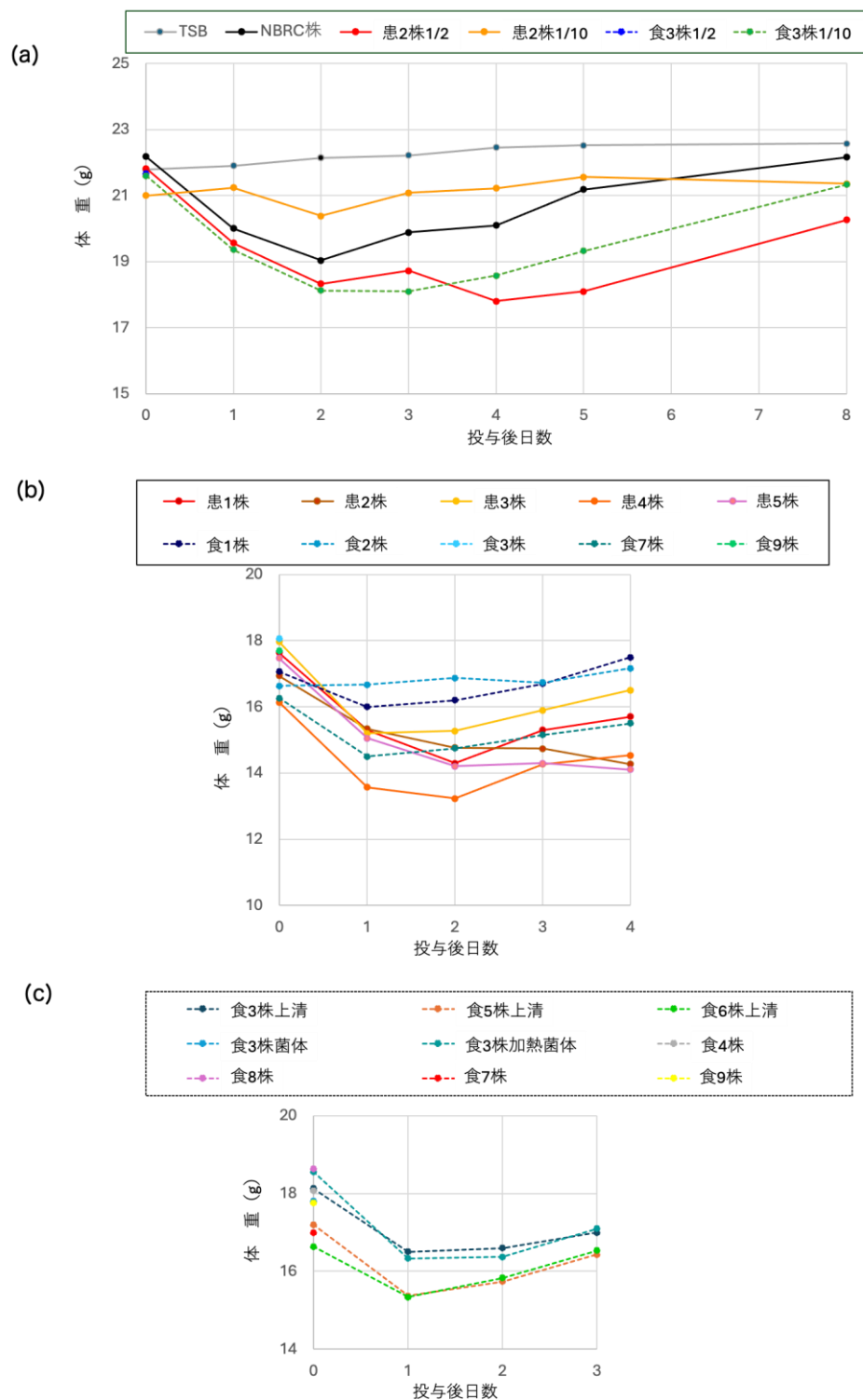


図 1 動物モデルでの病原性評価系の検討

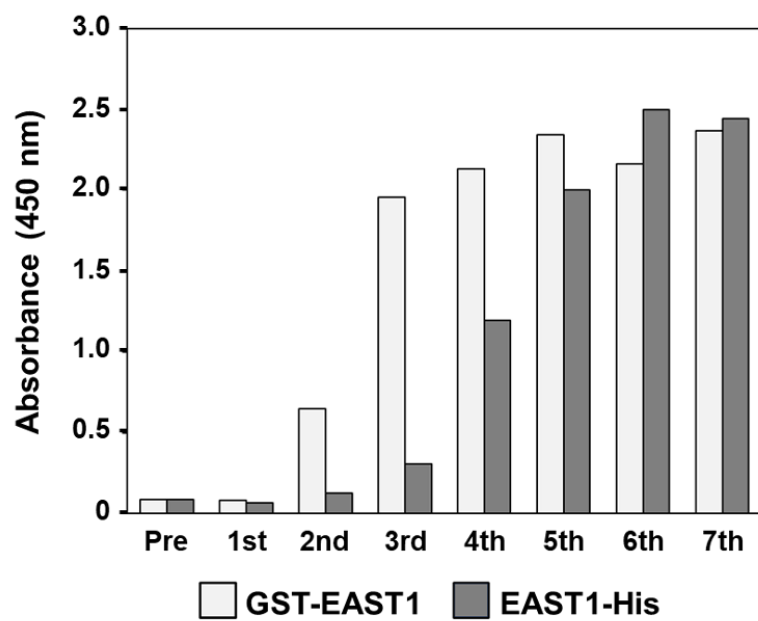


図2 マウス血清における抗 EAST1 抗体価

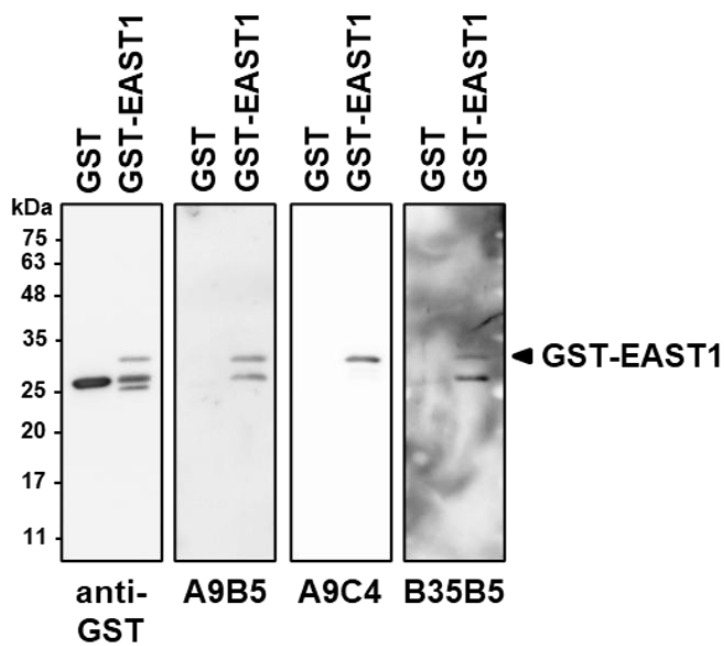


図3 ハイブリドーマ培養上清を用いたウエスタンブロット

表 1 食品由来株および患者由来株の菌液 2 濃度のマウス腹腔内投与での生残数

試料	接種菌量 (Log CFU/匹)	投与						
		0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	8日目
TSB	—	5	5	5	5	5	5	5
NBRC株1/2希釈	7.8	5	5	5	5	5	5	5
食3株1/2希釈	7.9	5	0	0	0	0	0	0
食3株1/10希釈	7.2	5	5	4	4	4	4	4
患2株1/2希釈	7.9	5	5	4	4	4	4	4
患2株1/10希釈	7.2	5	5	5	5	5	5	5

表 2 食品由来株および患者由来株の複数株菌液のマウス腹腔内投与での生残数

菌株	接種菌量 (Log CFU/匹)	投与				
		0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
食1株	8.0	3	1	1	1	1
食2株	7.9	3	3	3	3	3
食3株	8.0	3	0	0	0	0
食7株	8.0	3	3	2	2	2
食9株	8.0	3	0	0	0	0
患者1株	8.1	3	3	1	1	1
患者2株	7.8	3	3	3	3	3
患者3株	7.0	3	3	3	3	3
患者4株	8.1	3	3	3	3	3
患者5株	8.0	3	2	2	2	2

表 3 食品由来株の培養液上清、菌体、加熱菌体ならびに複数株菌液のマウス腹腔内投与での生残数

投与後	接種菌量 (Log CFU/匹)	投与			
		0日目	1日目	2日目	3日目
食3株上清	8.2	3	3	3	3
食7株上清	8.3	3	3	3	3
食9株上清	8.3	3	3	3	3
食3株菌体のみ	8.2	3	0	0	0
食3株加熱菌体	8.2	3	3	3	3
食4株	8.3	3	0	0	0
食5株	7.9	3	0	0	0
食6株	8.4	3	0	0	0
食8株	8.4	3	0	0	0

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究

研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書

病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

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）保有大腸菌およびその近縁菌種である *Escherichia albertii* についておよび“病原因子の組み合わせによる重症化リスクの解明”と“効果的な検出法の確立”を目的とした研究を進めた。R7 年度は、R6 年度までに明らかにした *astA* 遺伝子のバリエーションとその遺伝的特性について論文公表するとともに、*astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるバリエーションのうち最も株間で保有数の多い V0 について、IS を介した発現亢進があるかを調べる目的で、検出系の構築と予備実験を実施した。また、新興下痢症起因菌 *E. albertii* の効果的な菌濃縮法について、昨年度実施した *E. albertii* NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いた IgG 結合性因子の解析で同定された約 10kb のゲノム領域に関する詳細な解析を進めた。NIAH_Bird3 株について当該領域の遺伝子破壊株を作製し、菌濃縮能が低下するか確認を試みたが、予想に反して濃縮能の低下が見られなかった。

今後、*astA* 遺伝子に関しては、IS1414 の転移メカニズムとそれに伴う *astA* 遺伝子発現亢進・病原性について評価を行う。また、*E. albertii* に関しては、免疫磁気ビーズを用いた濃縮法の至適化と有用性検討、IgG 結合因子の同定を行う。

A. 研究目的

国内では、多様な病原大腸菌による食中毒が発生しており、社会的と問題となっている。令和 2 年には、学校給食での *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 (小中学生等患者 3,453 人) が発生し、その後も本菌食中毒の発生が続いている。また、令和 2 年には腸管毒素原性大腸菌の大規模食中毒 (患者 2,548 人)、

令和3年には給食の牛乳による主要な病原因子を保有しない病原大腸菌の大規模食中毒（児童等患者1,896人）が発生しており、病原大腸菌食中毒の発生が続いている。さらに、腸管出血性大腸菌による食中毒は、以前よりも減少している傾向は認められず、令和4年以降、高齢者施設や飲食店での事例で死者が発生した事例、馬刺による74人の患者発生の事例、複数県のステーキチェーン店での事例等が報告されている。これまでの食品汚染調査では、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離され、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと考えられ、食中毒由来株との特性の違いの解明が必要とされている。

本研究では、申請者らが同定した各 *astA* 遺伝子バリエーションとその発現制御や協調的に働く（病原）因子を同定し、機能を明らかにする。また、集団感染事例を引き起こす食中毒起因菌として大腸菌の近縁菌種である *E. albertii* の新規病原因子の機能解析と菌濃縮法の開発を行い、感染源同定や食品汚染状況の検査への実用化を最終目標とする。

本年度は、*astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるバリエーションのうち最も株間で保有数の多い V0 バリエーションについて、IS を介した発現亢進があるかを調べる目

的で、検出系の構築と予備実験を実施した。また、*E. albertii* について、昨年度実施した NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いた IgG 結合性因子の解析で同定された約 10kb のゲノム領域に関する詳細な解析を進めた。

B. 研究方法

(1) IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件の検討

astA 遺伝子は IS1414 のトランスポゼース遺伝子内部にコードされている（図1）ため、その発現亢進に IS1414 転移能の関与が示唆される。その可能性を検証するため、構造的に完全な（転移能を持つと考えられる）であり、*astA* 遺伝子バリエーション V0 をコードする IS1414 について図2aのような擬似的 IS1414 を構築した。具体的には IS1414 のトランスポゼース遺伝子をテトラサイクリン耐性遺伝子に置換し、IS1414 挿入部位に形成される 8bp のダイレクトリピート配列を両末端に含む領域をクローニングベクター pUC19 のアンピシリン耐性遺伝子内にクローニングした（図2a）。その際、擬似 IS1414 の脱落によってアンピシリン耐性が再活性化するように（アンピシリン耐性遺伝子のコード領域のフレームがずれないように）考慮し

た（図 3）。また、クローニングベクター pETBK (BDL) のマルチクローニングサイトにプロモーター領域を含むトランスポゼース遺伝子をクローニングした（図 2 b）。これまでに明らかになっている IS 転移能が亢進する環境条件として、①ヒートショック、②栄養飢餓、③抗生物質暴露、④酸化ストレスなどを考慮し、まず、以下の条件①および②を実施した。

- ① ヒートショック: LB 培地 1mL に接種し、30°C, 150rpm で一晩振盪培養した。前培養液 10μL を 1mL の LB 培地 2 本に植え継ぎ、30°C あるいは 42°C の条件で 8 時間振盪培養した。10 μg/mL テトラサイクリンあるいは 50 μg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地に接種し、37°C で一晩静置培養し、各寒天培地上のコロニー数をカウントした。
- ② 栄養飢餓: LB 培地 1mL に接種し、30°C, 150rpm で一晩振盪培養した。前培養液 10μL を 1mL の LB, 1/10 LB, 1/100 LB 培養液に植え継ぎ、30°C, 150 rpm で 8 時間振盪培養した。10 μg/mL テトラサイクリンあるいは 50 μg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地に接種し、37°C で一晩静置培養し、各寒天培地上のコロニー数をカウントした。

(2) *E. albertii* の IgG 結合性因子の同定

昨年度 NIAH_Bird_3 株フォスミドライブラリーを用いて同定した約 10kb のゲノム領域（図 4）に関して、Wanner 変法を用いて NIAH_Bird_3 株の当該領域の遺伝子破壊株を作製した。A 抗体処理有無の条件下で遺伝子破壊株の菌回収効率を検証した。

C. 研究結果

(1) IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件の検討

① ヒートショック: 本培養の培養温度を 30°C と 42°C で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。

② 栄養飢餓: 本培養の培養液を LB 培養液原液 (1x)、1/10 希釈 LB 培養液、1/100 希釈 LB 培養液で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。

(2) *E. albertii* の IgG 結合性因子の同定

E. albertii NIAH_Bird3 株について作製した IgG 結合因子候補 10kb 領域の遺伝子破壊株と野生株、negative control として大腸菌 K-12 株を用いて菌濃縮能に関する比

較を行った。その結果、野生株と当該領域の遺伝子破壊株との間で濃縮能に差が見られなかった。その一方で、negative controlである大腸菌 K-12 株においても、通常見られない非常に高い菌濃縮が観察された。使用した試薬による実験への影響を確認するため、磁気ビーズの洗浄液および抗体反応液について新たに調整したものを使用した結果に改善は見られなかった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本年度実施した構造的に intact な *astA* 遺伝子バリエーション V0 の病原性発現亢進に関する解析について、挿入配列 IS1414 の転移との連動性を調べる実験系の構築と挿入配列の転移能に関わる環境因子として、ヒートショックおよび栄養飢餓の条件について解析を行った。その結果、IS1414 の脱落の指標となるアンピシリン耐性再活性化クローンを検出することができなかった。このことから、これら 2 条件は転移能 (*astA* 遺伝子の発現亢進) には関与しない可能性が示唆された。しかしながら、IS1414 の転移機構については未だ不明な点が多いことから、次年度はトランスポゼースを過剰発

現させて IS 脱落が起こることを確認した上で、さらに他の条件についての検討を行う。

免疫磁気ビーズによる *E. albertii* の菌濃縮法の開発に関しては、昨年度、NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いて同定した IgG 結合関連因子候補と考えられる約 10kb のゲノム領域について、当該領域の遺伝子破壊株を用いた検証を実施した。しかしながら、遺伝子破壊株において菌濃縮能の低下が観察できず、また、これまでに得られていた結果と異なり、negative control である大腸菌 K-12 株においても菌濃縮がみられた。このことから用いている試薬に原因があると考えられたため、ビーズ洗浄液等の溶液関連について、新規作製したもので検証したが、上記と同様の結果となり、磁気ビーズ本体に原因があることが示唆された。

今後は、実験条件の再検討や試薬の再購入を行うことで、これらの問題を解消し、*astA* 遺伝子の発現亢進条件と病原機構の解明を進めるとともに、*E. albertii* の効果的な菌濃縮法の実用化および IgG 結合因子の同定を行う。

E. 結論

astA 遺伝子陽性大腸菌に関して、*astA* 遺伝子が intact なものは V7, V15, V22, V32 を除く 31 種類であ

り、蛋白質としては 23 種類 (EAST-1_1-v23) 存在すること、② *astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるものは V0, V30, V31 の 3 種類のみであること (ただし、V30 および V31 は 720 株中でそれぞれ 1 株のみ存在)、③ マルチコピーで保有する株が多く存在する V0 については、コピー数が劇的に増加した大腸菌進化系統が 2 系統存在することを示し、その研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に投稿・掲載された。また、IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子の発現亢進については、トランスポゼース遺伝子のプロモーター領域の活性を検出する実験系を構築して実施したが、期待した結果が得られなかった。次年度は、IS1414 の転移機構において単純な脱落を起こすことを確認した上で、転移能と *astA* 遺伝子発現亢進に関する解析を進める。また、*E. albertii* の解析に関しては、フォスミドライブラリーで同定されていた 10kb 領域の遺伝子破壊株で菌濃縮能の低下がみられなかったが、これまで negative control として使用していた大腸菌 K-12 株においても同様に濃縮が見られたことから、ビーズ試薬等に問題がある可能性も考えられ、次年度は、試薬の確認を行ってから解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ooka T*, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, *astA*, in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2025 Oct 22;16:1635769. doi: 10.3389/fmicb.2025.1635769.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. IS1414 の遺伝子構造

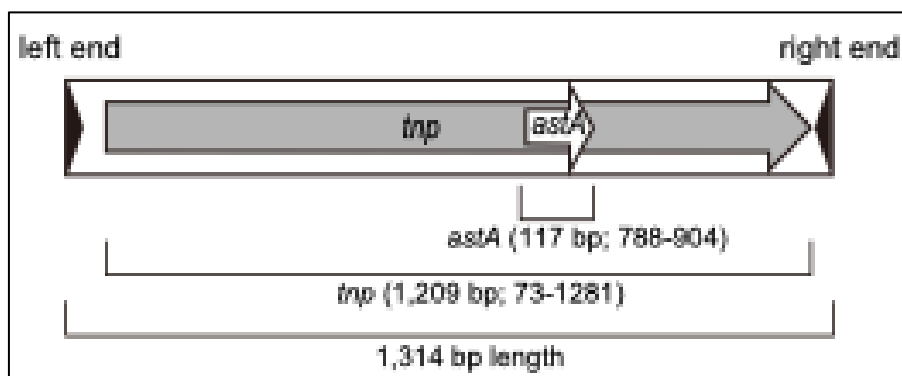


図 2. 擬似 IS1414 の構造 (a) および IS 脱落解析のイメージ (b)

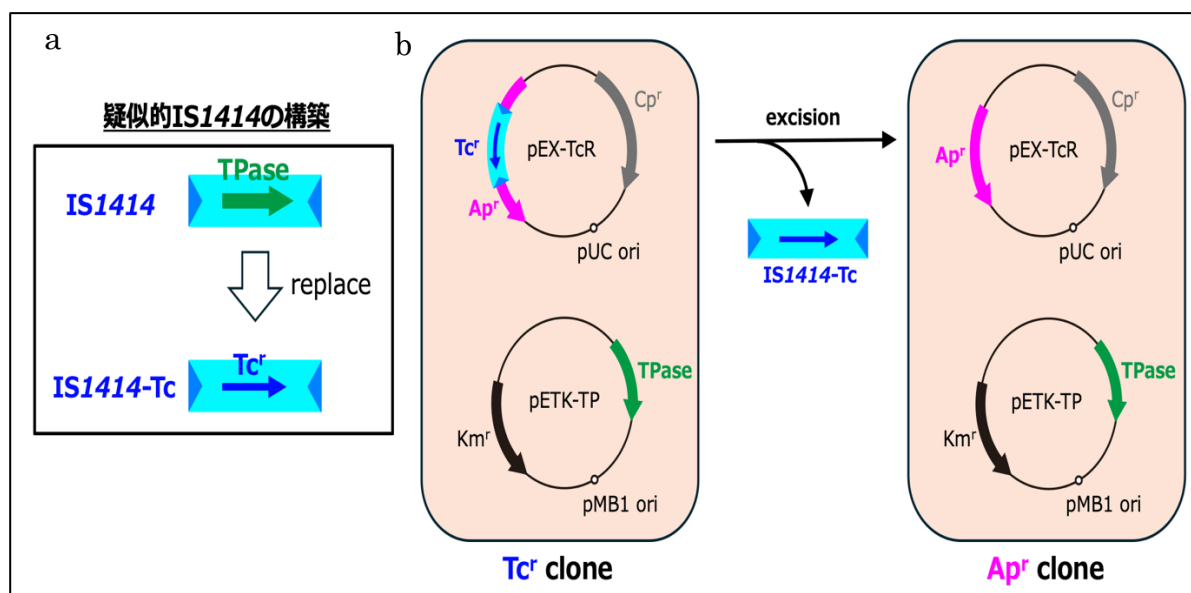


図 3. 擬似 IS1414 の末端構造と IS 脱落解析によるアンピシリン耐性再活性化

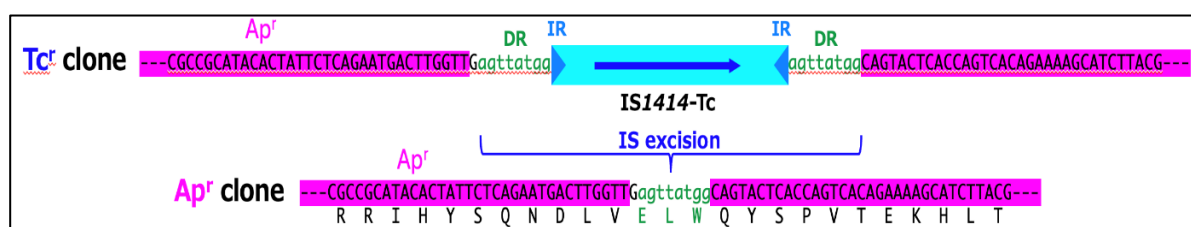
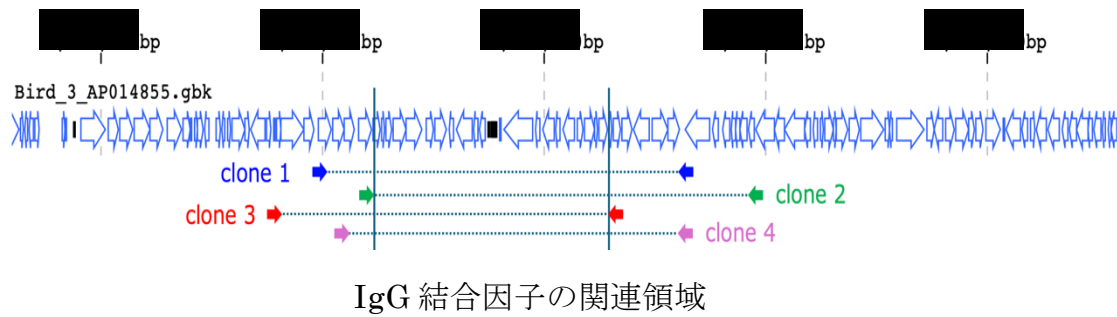


図 4. *E. albertii* NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーから同定された IgG 結合因子関連領域



厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
「食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究」

研究分担報告書

分担研究課題

「病原大腸菌の付着性の解析」

研究分担者 窪村亜希子（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 李 謙一、伊豫田淳

（国立感染症研究所 細菌第一部）

地方衛生研究所等

研究要旨

astA 保有大腸菌の病原性解明のため 9 件の食中毒等集団下痢症事例由来株を含む 16 株を対象に保有するプラスミドの比較解析、および O166:H15 株が示す細胞付着性の付着因子特定のための莢膜遺伝子（*kps*）クラスターに着目した解析を行った。*kps* クラスターの解析結果から、*kps* クラスター領域 2 に含まれ、*kfoC* および *kfoG* と高い相同性を示す 2 つの糖転移酵素遺伝子が細胞付着性に関与していることが明らかとなった。プラスミドの解析では 16 株のうち 14 株からプラスミドが検出されたが、そのうち *astA* 事例由来株からのみ IncFII の類似したプラスミドが検出された。当該プラスミドに着目した解析を行っていくことは、集団下痢症の起因菌となる *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性があると考えられる。

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。既存の下痢原性大腸菌分類には属さないが、集団下痢症事例の起因菌として分離されることなどから病原性が示唆される大腸菌も存在し、その 1 つとして EAEC heat stable

toxin をコードする遺伝子（*astA*）を保有する *astA* 保有大腸菌が知られている。食中毒等下痢症集団発生（集発）事例の起因菌として分離される *astA* 保有大腸菌には特定の複数の血清型が知られており、そのうち O166:H15 は最も多く報告されている。一方で、健康者からは多様な血清型の *astA* 保有大腸菌が分離されることも知られており、*astA* の病原性は未だ不明瞭である。

我々のこれまでの研究により、異なる 2 つの血清型（O7:H4 および O166:H15）の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌が類似の

プラスミドを保有していることを明らかにした。さらに、O166:H15に着目した解析により4件の集発事例由来大腸菌 O166:H15 が培養細胞に付着性を示し、その細胞付着性には莢膜遺伝子 (*kps*) クラスターが関与していることも明らかにした。本研究では、対象株数を増やしてプラスミドの解析を行うとともに、O166:H15 株の細胞付着性に寄与する遺伝子特定に向けた解析も行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌 O166:H15 株の MLST および系統解析

5 件の集発事例から分離された 10 株の *astA* 保有株に加え、5 株のその他ヒト由来株および 4 株の動物由来の大腸菌 O166:H15 (合計 19 株) について whole genome sequencing (WGS) によりゲノム配列の取得を行った。取得したゲノム配列を使用して、コアゲノムから抽出した SNP により系統樹を作製した。さらに Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>) の MLST によりシーケンスタイプ (ST) の特定も行った。

2. *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

9 件 (9 株) の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌 (O166:H15, O7:H4, O169:H45, OgGp9:H18)、4 株のその他ヒト由来および 3 株の動物由来大腸菌 O166:H15 (合計 16 株) のうち完全長ゲノム配列が未決定である 11 株についてロングリードシーケンス解析を行い、WGS とのハイブ

リッドアッセムブリによりプラスミドゲノム配列決定を行った。検出されたプラスミドのうち各株の主要なプラスミドを解析対象とし、CGE の PlasmidFinder および VirulenceFinder により Inctype の特定と病原性関連遺伝子の検出を行った。さらにプラスミドゲノムから DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) により作製したアノテーションファイルを用いて clinker によるアミノ酸配列比較解析も行った。

3. 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

集発由来 *astA* 保有大腸菌 O166:H15 のうち細胞付着性株 (JNE21-003) および細胞非付着性株 (JNE22-005) を CHO 細胞に感染させたサンプルについて、異なる蛍光色素により細胞外および細胞内菌体を染色することで、CHO 細胞への付着および侵入菌体の検出を行った。CHO 細胞を 24 ウェルプレートで一晩培養した後、各供試菌株をウェルに接種した。37°C で 3 時間感染させた後、PBS で洗浄、10 分間固した。細胞外細菌を可視化するため PBS で 100 倍希釈した大腸菌 O166 免疫血清を細胞に添加した。細胞を室温で 30 分間インキュベート後、PBS で洗浄し、400 倍希釈した Alexa Fluor 405 ヤギ抗ウサギ IgG (緑) で染色した。細胞内細菌を可視化するため、0.1% Triton X-100 溶液により 10 分間の細胞の透過処理を行った。前述と同じ免疫血清で細胞をインキュベートし、400 倍希釈した Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG (青) で染色した。CHO 細胞は、

CellMask Deep Red Actin Tracking Stain を用いて染色した後、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss LSM 900）で観察を行った。

4. 集発事例由来大腸菌 O166:H15 株の *kps* クラスター比較および K 抗原の特定

5 件（5 株）の集発事例由来大腸菌 O166:H15 の *kps* クラスターについて DFAST でアノテーションを行ったファイルを用いて *clinker* による比較解析を行った。さらに、大腸菌の *kps* グループ 2 の K 抗原データベース

（<https://github.com/rgladstone/EC-K-typing>）の各 K 抗原型と比較することで K 抗原の特定も行った。

5. 集発事例由来大腸菌 JNE21-003 株の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

kps クラスターの比較により特定された細胞付着性株に共通する遺伝子は、JNE21-003 株を用いて λ Red-recombination システムにより破壊株を作製した。作製された遺伝子破壊株は CHO 細胞を用いて付着性の解析を行った。細胞付着性が消失した破壊株について pMW119 を用いた相補株の作製と細胞付着性の解析を行った。さらに、これらの解析により細胞付着性への関与が示唆された遺伝子については *blastx* 解析および *kps* グループ 2 の代表的な K 抗原である K1, K4, K5 抗原の *kps* クラスターの遺伝子と比較を行うことで類似する遺伝子の特定も行った。

C. 研究結果

1. 大腸菌 O166:H15 株の MLST および系統解析

19 株の大腸菌 O166:H15 について ST の特定（表 1）および系統解析を行った（図 1）。5 件の集発事例から分離された 10 株はいずれも ST2914 に分類された。集発事例以外では動物由来 1 株が ST2914 に分類されたが、他の動物由来株および EHEC はいずれも ST349 に分類された。

2. *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

16 株の *astA* 事例等由来株が保有するプラスミドゲノムの配列決定を行った（表 2）。動物由来の 2 株を除いた 14 株から 1 から 6 のプラスミドが検出された。14 株がそれぞれ保有する最大サイズのプラスミドを含む 16 の主要なプラスミドを解析対象とした（表 3）。9 株の集発事例由来株と 1 株の散発事例由来株（JNE22-027）の 10 株から検出された 10 のプラスミドについて解析を行った結果、いずれも *inc type* は IncFII であり、*astA* と *aap* が共通して検出された。さらに *clinker* による比較解析では 10 株のプラスミドから多くの共通する遺伝子が検出され、*blastx* 解析および DFAST によるアノテーションなどにより 6 型分泌装置（T6SS）や 4 型線毛遺伝子クラスター等も共通因子として検出された（図 2）。一方で、EHEC または動物由来大腸菌 O166:H15 の 4 株から検出された 6 つのプラスミドの *inc type* と病原性遺伝子保有状況の検出および *clinker* による比較解析結果では、これらのプラスミドはいずれ

も *astA* 事例株から検出されたプラスミドとは異なることが示された（図 3）。

3. 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

異なる蛍光色素により細胞外および細胞内菌体を染色した蛍光観察画像の重ね合わせ（Merge）により（図 4）、細胞付着性を示す JNE21-003 株では細胞外菌体（緑）と細胞内菌体（青）が検出されたのに対し、JNE22-005 株では主に細胞内菌体（青）のみが検出された。

4. 集発事例由来大腸菌 O166:H15 株の *kps* クラスター比較および K 抗原の特定

5 株の集発事例由来大腸菌 O166:H15 の *kps* クラスターを比較した結果、細胞付着性を示す 4 株の *kps* クラスター領域 2 において共通する 5 遺伝子が検出された（図 5）。さらに大腸菌の K 抗原データベースとの比較により、細胞付着性を示す 4 株と K131 抗原の大腸菌

（SAMEA3322059 株）の *kps* クラスターが一致したことから、これらの集発事例由来 O166:H15 の K 抗原は K131 であると特定された。

5. 集発事例由来大腸菌 JNE21-003 株の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

4 により特定された細胞付着性株に共通する 5 遺伝子は、JNE21-003 株においては *galE*, LOCUS_07640 (L764), L765, *ugd*, L767 としてアノテーションにより示された。これら 5 遺伝子の破壊株作製および細胞付着性の解析を行った結果、

L765 破壊株 (Δ L765)および Δ L767 において細胞付着性が消失した（図 6A）。

Δ L765 と Δ L767 について相補株

（ Δ L767/pMW119-L765, Δ L767/pMW119-L767）を作製し、細胞付着性の解析を行った結果では、いずれの相補株も細胞付着性を示した（図 6B）。さらに blastx 解析および代表的な K 抗原（K1, K4, K5）の *kps* クラスターの遺伝子との比較により、JNE21-003 の L765 および L767 はいずれも糖転移酵素遺伝子であり、それぞれ K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* とアミノ酸配列が 72% および 96% 一致した。

D. 考察

astA 保有大腸菌は健康者からも分離されることから、その病原性は未だ不明瞭であるが、本研究では 9 件の集発事例の起因菌として分離された *astA* 保有大腸菌株を対象に解析を行ったことで、集発事例株に共通する病原性関連遺伝子が *astA* 以外にも複数存在していることが明らかとなった。さらに O166:H15 株に着目した解析により 5 件の集発事例由来株がいずれも ST2914 に分類されることが明らかになったが、蛍光二重染色法による染色性の違いから細胞付着性が異なる病原型が含まれていることも示された。

4 つの血清型を含む 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 保有大腸菌株は共通して IncFII の類似したプラスミドを保有していた。さらに同様のプラスミドは、O166:H15 株のうち EHEC ではない（non-EHEC）散発下痢症患者由来株からも検出されたが、EHEC および動物由来株からは検出されなかった。そのた

め、当該プラスミドは O166:H15 など特定の複数の血清型のうち、ヒトに病原性を有する non-EHEC から検出されるプラスミドである可能性が示唆された。さらに、当該プラスミド上には *astA* 以外にも *aap*、T6SS および 4 型線毛遺伝子クラスターなど複数の遺伝子が共通して存在していた。これらの遺伝子が機能しているかは不明であるが、プラスミド上の共通遺伝子に着目した解析を行うことは、本菌の病原性機序解明に繋がる可能性があると考えられる。

集発事例由来大腸菌 O166:H15 JNE21-003 株の細胞付着性は、*kps* クラスター領域 2 に含まれる 2 つの糖転移酵素遺伝子が関与していることが明らかになった。しかし、当該 2 遺伝子が 4 件の O166:H15 株による集発事例由来株の細胞付着性に寄与する共通因子（遺伝子）であることを示すためには、他の事例由来株を用いて同様の検証を行うことも重要であると考ええる。さらに、細胞付着性株の K 抗原型は K131 であり、細胞付着性に関与していた 2 遺伝子が K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* と高いアミノ酸相同性を示すことも明らかとなった。K131 以外の K 抗原型においてもこれら 2 遺伝子を含む抗原型が存在するか調査を行うことや、該当する抗原型（K4 を含む）の大腸菌株について解析を行っていくことは、細胞付着性に関与する K 抗原（*kps* クラスター）を有する大腸菌の検出系開発、および *kps* クラスターによる細胞付着性の機序解明のために重要であると考えられる。

E. 結論

9 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出されたことから、当該プラスミドに着目した解析を行うことにより、集団下痢症を引き起こす *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

Kubomura A, Lee K, Iyoda S, Akeda Y. 2025. Complete genome sequence of three atypical diarrheagenic *Escherichia coli* O166: H15 strains from foodborne outbreaks. *Microbiology Resource Announcements*, 14(11), e00746-25.

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1. 系統解析を行った19株の大腸菌O166:H15の由来およびシーケンスタイプ (ST)

由来	自治体等	株名	ST (MLST)	astA	CHO細胞 付着性
集団下痢症由来株 (5事例、10株)	熊本県	JNE070796	2914	+	+
		JNE070801	2914	+	+
	埼玉県	JNE21-003	2914	+	+
		JNE21-005	2914	+	+
		JNE21-007	2914	+	+
	姫路市	JNE21-009	2914	+	+
	大分県	JNE12-001	2914	+	+
		JNE12-002	2914	+	+
		JNE12-003	2914	+	+
	東京都	JNE22-005	2914	+	-
その他ヒト由来 (5株)	散発下痢症患者	JNE22-027	349	+	-
		JNE181928 (EHEC)	349	+	-
		JNE162304 (EHEC)	349	+	-
		JNE101305 (EHEC)	349	-	-
	健康者	JNE192777 (EHEC)	349	+	-
動物由来 (4株)	ウシ	23Y35	2914	-	-
		23M24	349	+	-
		24K024	349	-	-
	キョン	C123	349	+	-

表2. 集団下痢症事例由来*astA* 大腸菌およびその他由来大腸菌O166:H15のプラスミド保有状況

由来	血清型	株名	保有するプラスミドのサイズ (bp)
集団下痢症 (9事例)	O166:H15 (5事例)	JNE21-003	139k, 84k, 3k, 2k
		JNE21-009	188k, 163k, 2k
		JNE070796	138k, 91k, 5k
		JNE22-005	158k, 111k, 97k, 31k, 6k, 2k
		JNE12-001	175k, 3k, 2k
	O7:H4 (2事例)	JNE20-002	140k
		JNE22-001	116k, 2k
	O169:H45	JNE21-010	154k, 47k, 33k
	OgGp9:H18	JNE21-012	185k, 96k
散発下痢症	O166:H15	JNE22-027	134k, 7k
		JNE162304 (EHEC)	140k, 112k, 59k
		JNE181928 (EHEC)	140k, 107k
		JNE101305 (EHEC)	173k, 28k
健康者 動物	O166:H15	23Y35	107k
	O166:H15	23M24	なし
		C123	なし
			なし

表3. 集団下痢症等由来大腸菌14株から検出された16のプラスミドのInctypeおよび検出された病原性関連遺伝子

由来	血清型	株名	プラスミドサイズ (bp)	Inctype (Plasmid Finder)	病原性関連遺伝子 (Virulence Finder)
集団下痢症 (9事例, 9株)	O166:H15 (5事例)	JNE21-003	139k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE21-009	188k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE070796	138k	FII	<i>astA, aap, eatA</i>
		JNE22-005	158k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
		JNE12-001	175k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
	O7:H4 (2事例)	JNE20-002	140k	FII	<i>astA, aap</i>
		JNE22-001	116k	FII	<i>astA, aap</i>
	O169:H45	JNE21-010	154k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
	OgGp9:H18	JNE21-012	185k	FII	<i>astA, aap, traJ, traT</i>
散発下痢症 (3株)	O166:H15	JNE22-027	134k	FII	<i>astA, aap, traJ</i>
		JNE162304 (EHEC)	140k	B/O/K/Z	<i>astA, cdt, traT</i>
			112k	FIB, FII	<i>astA, eltI, estb, traJ, traT</i>
		JNE181928 (EHEC)	140k	B/O/K/Z	<i>astA, cdt, traT</i>
			107k	FIB, FII	<i>astA, eltI, estb, traJ, traT</i>
健康者 動物	O166:H15	JNE101305 (EHEC)	173k	B/O/K/Z, FIB	<i>cia, cvaC, ehxA, epeA, espP, iha, subA, traT</i>
	O166:H15	23Y35	107k	FII, FIB	<i>ompT, traT</i>

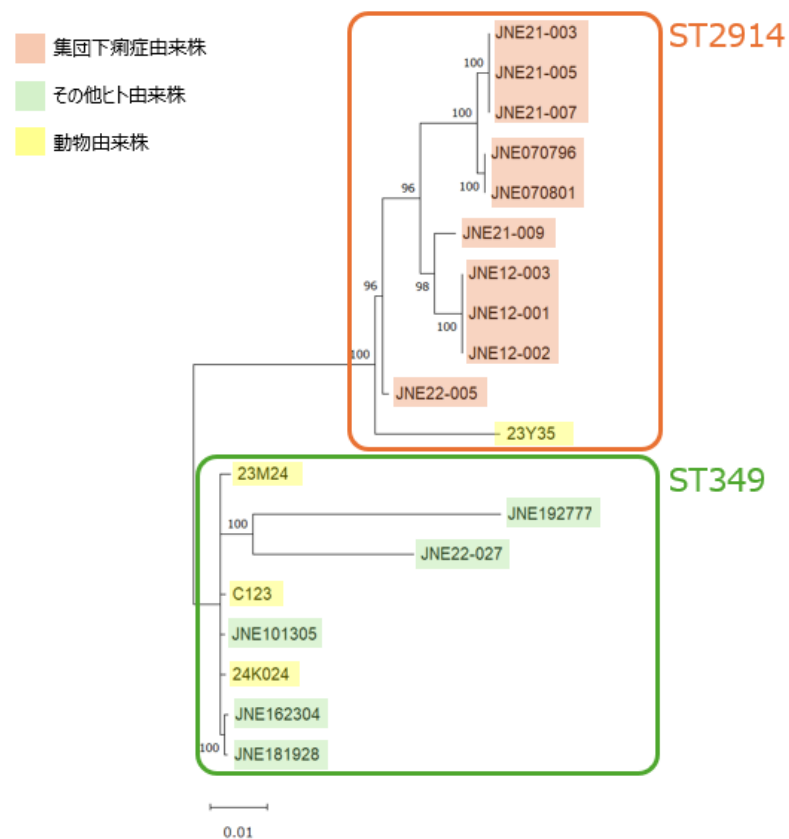


図 1. 19 株の大腸菌 O166:H15 (5 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有株、その他ヒト由来株、動物由来株) を用いた系統解析および MLST によるシーケンスタイプ (ST)

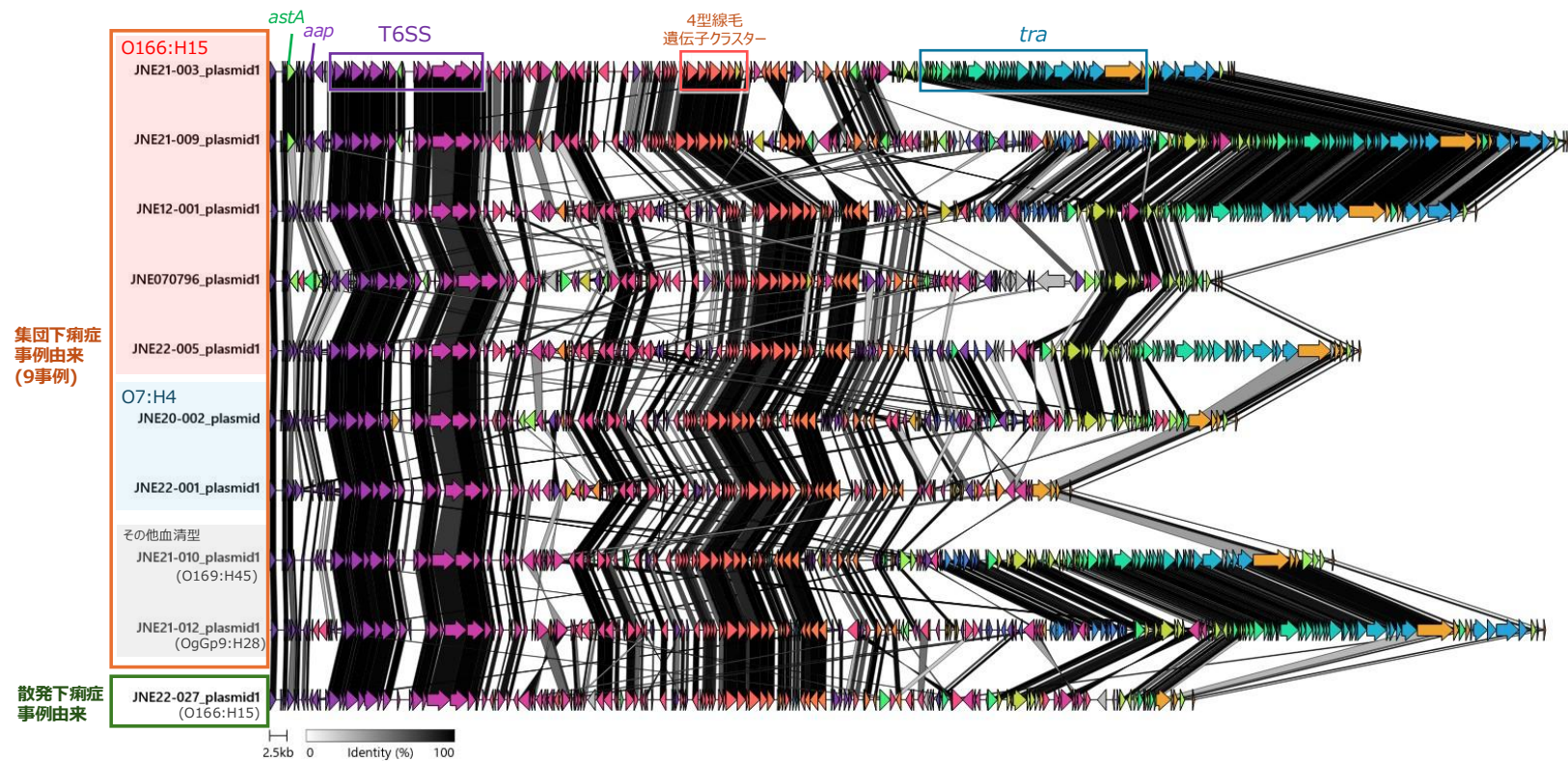


図2. 9件の集団下痢症事例および1件の散発下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌から検出された IncFII プラスミドの clinker による比較解析結果

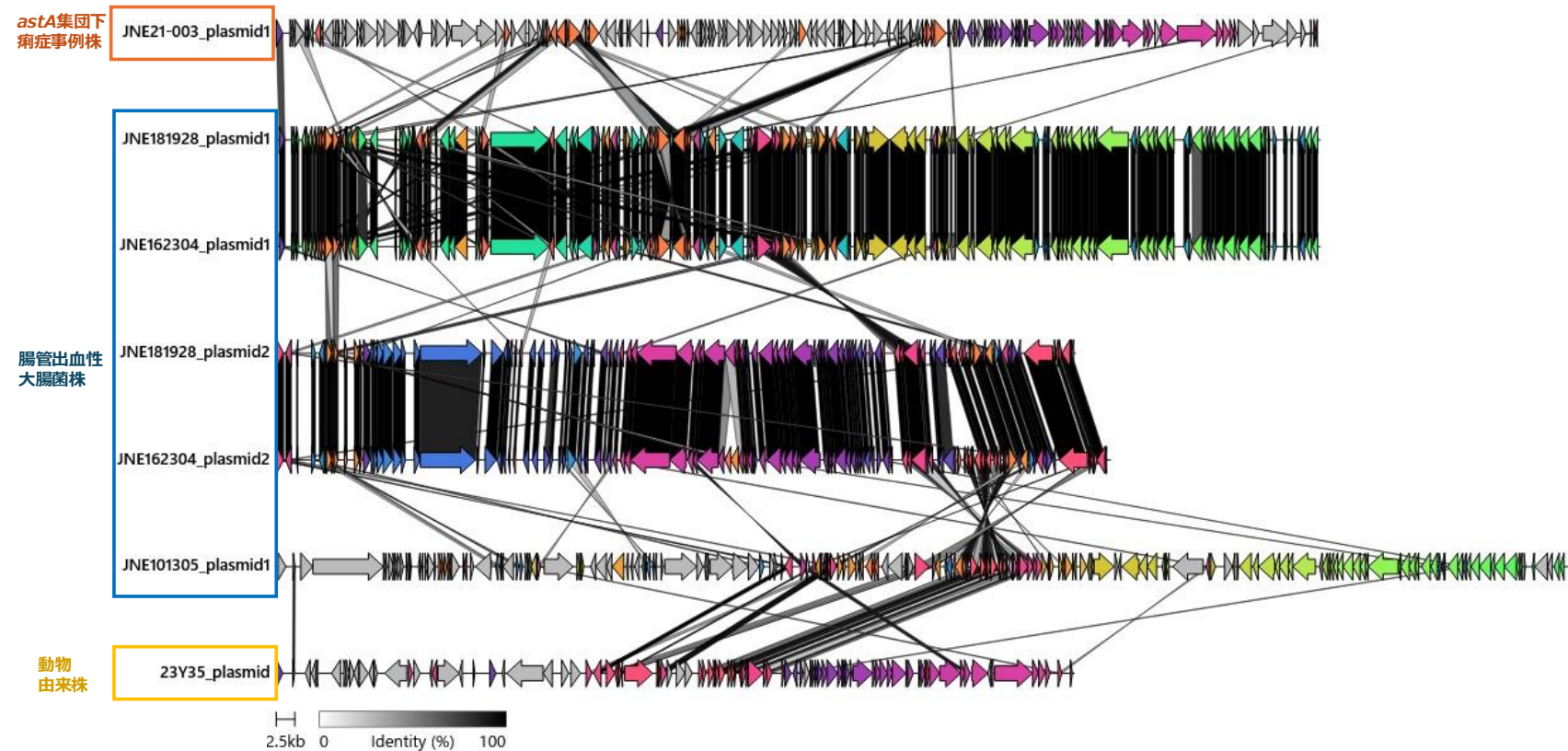


図 3. 集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌（JNE21-003）、腸管出血性大腸菌 および動物由来大腸菌 O166:H15 株から検出されたプラスミドの clinker による比較解析結果

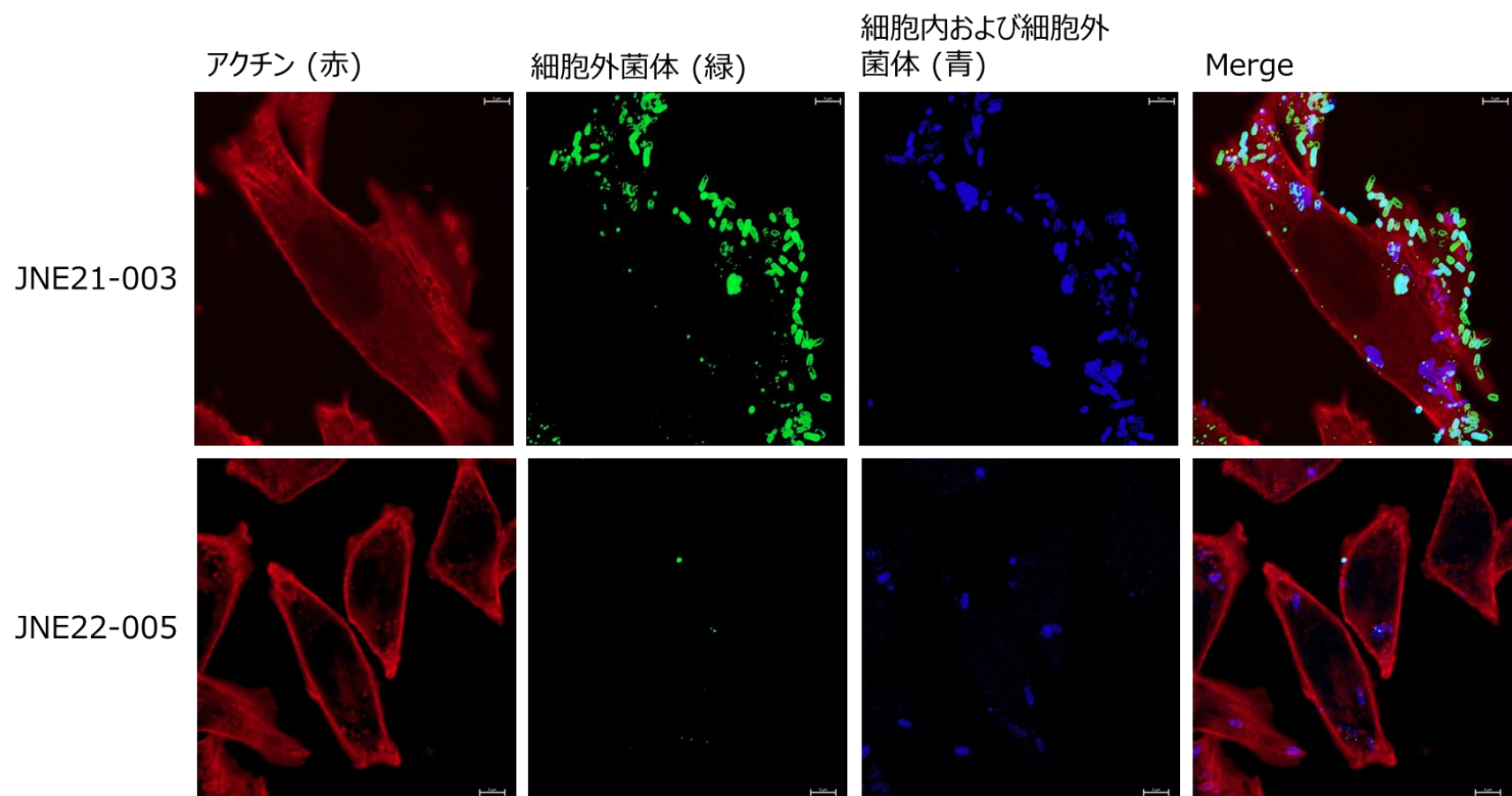


図 4. 集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 の細胞付着性株 (JNE21-003) および細胞非付着性株 (JNE22-005) を感染させた CHO 細胞について蛍光二重染色を行った後の共焦点顕微鏡による蛍光観察像

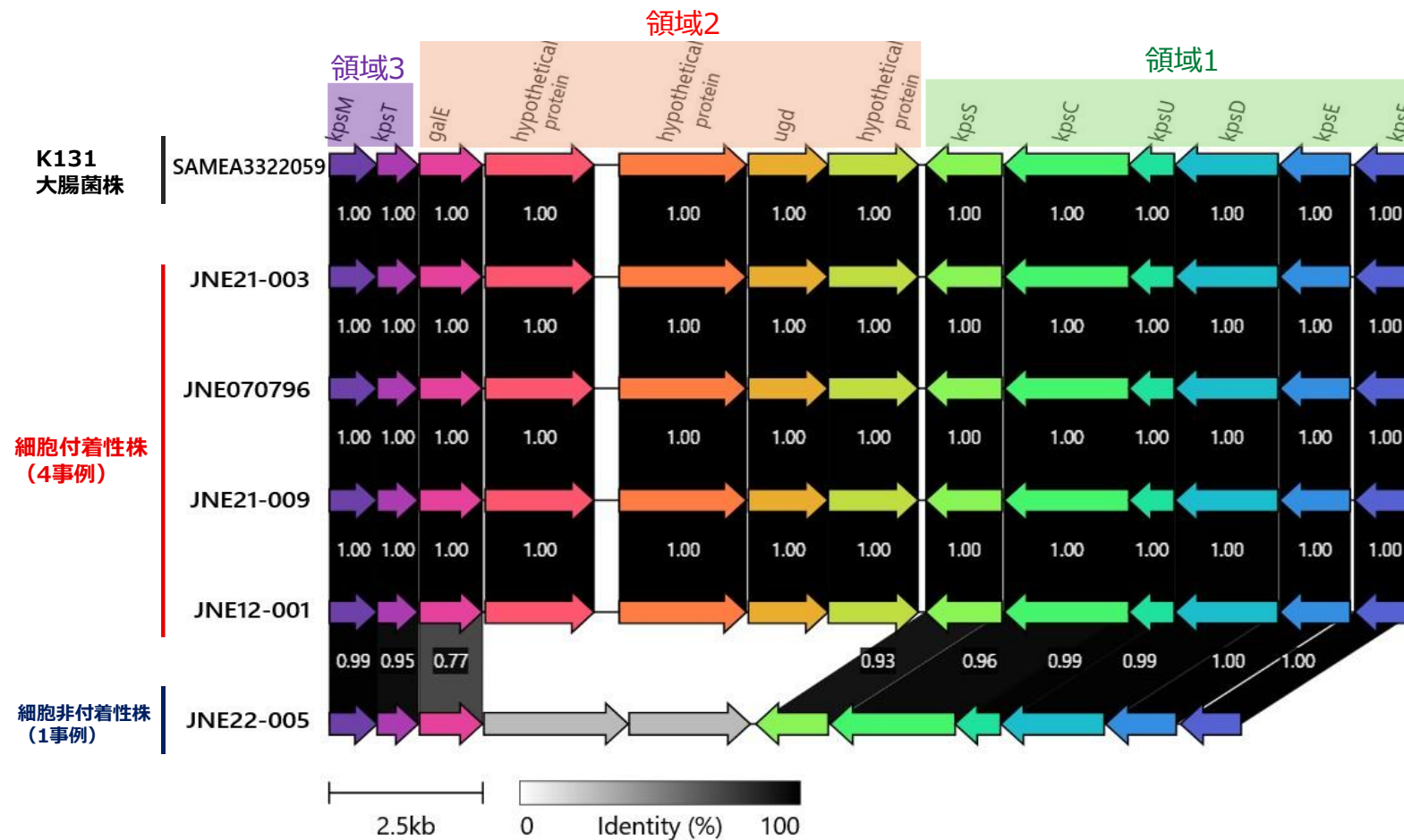


図 5. 5 件の集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 および大腸菌 K131(SAMEA3322059 株)の莢膜遺伝子クラスターの clinker による比較解析結果
表示されている数値は各遺伝子間のアミノ酸配列の同一性を示す

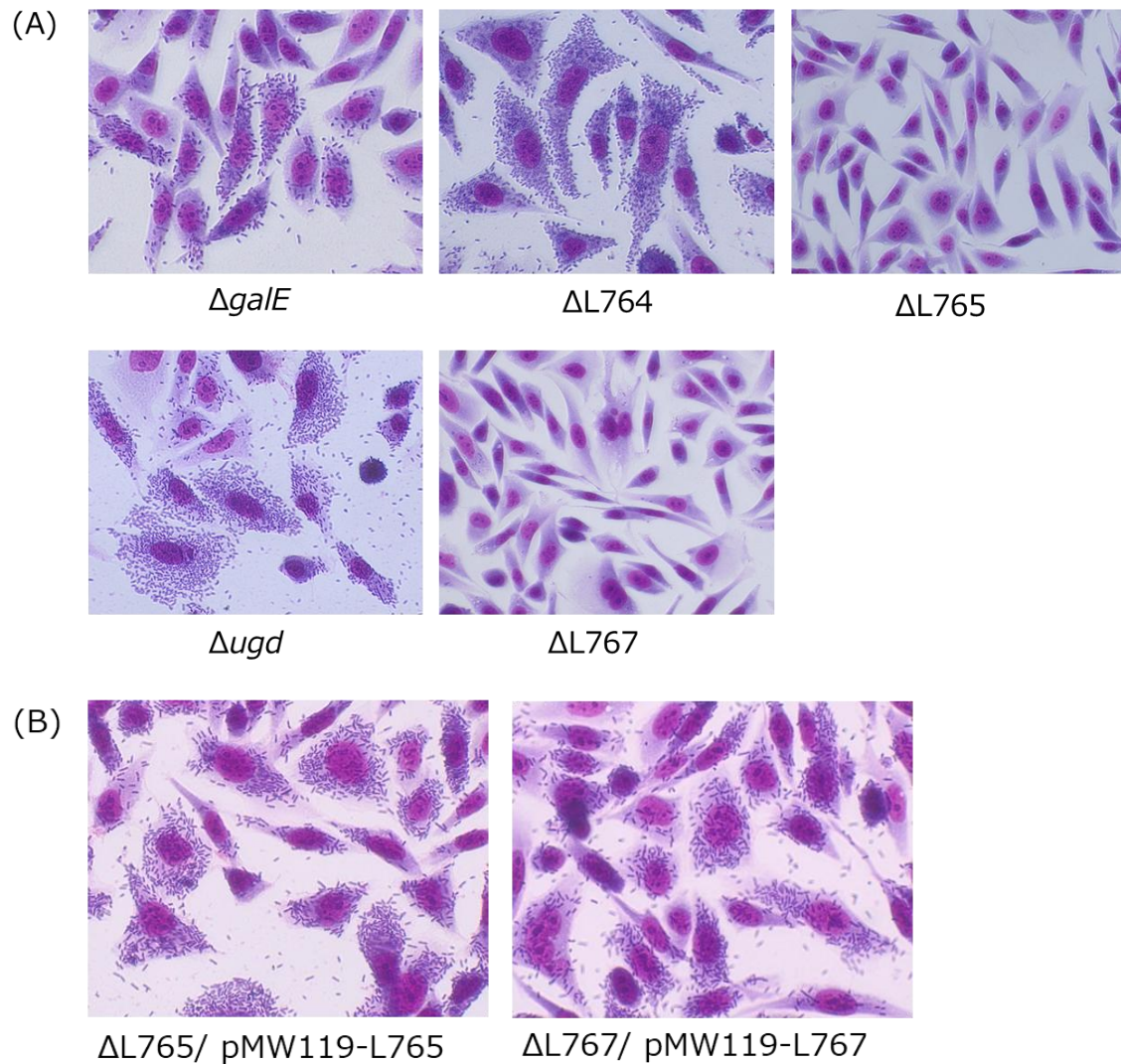


図 6. 集団下痢症事例由来大腸菌 O166:H15 JNE21-003 株の莢膜遺伝子クラスター領域 2 を構成する 5 つの遺伝子の各遺伝子破壊株を用いた CHO 細胞付着性の解析結果 (A)、および細胞非付着性を示した $\Delta L765$ および $\Delta L767$ の相補株の CHO 細胞付着性解析結果 (B)

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究
研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書
食品汚染における食品特性の解明
研究分担者 小嶋由香 川崎市健康安全研究所

研究要旨

病原大腸菌による食中毒は、ヒトを含めた動物のふん便等で汚染された食品(食肉、野菜、水等)や、二次汚染が原因となる。また自然界に広く分布しており、そのため汚染経路を明確にすることは困難であり、原因不明となることが多い。近年、これら病原大腸菌による大規模食中毒が多発し、社会問題となっている。

そこで、本研究は、国内外で発生した病原大腸菌による食中毒事例について、文献を検索し、病原大腸菌食中毒の原因となりうる食品について形状や成分などの特性や、原因食品が判明している食中毒事例を参考に、実際に食品に菌を接種し、生残しやすい条件についての検討を行い、食品が保有する特性が食中毒原因菌の生残性に与える影響を解明する事を目的とする。

令和 6 年度、7 年度は共に白菜、白菜キムチの表面構造や、細菌叢等の特性を検討し、腸管出血性大腸菌 0157 食中毒発生予防対策の一助となる目的で検討を行っている。

令和 6 年度は「川崎市の焼肉店で発生した腸管出血性大腸菌 0157 食中毒事例について」に関連した文献検索を行い、原因食品の可能性も考えられた野菜について、走査型電子顕微鏡を用い表面構造の特性を観察した。また野菜及びその加工食品に腸管出血性大腸菌 0157 を接種しその生残性について検討した。

令和 7 年度は、大腸菌を直接白菜に塗抹し、走査型電子顕微鏡を用い、菌が付着する部位の確認を行った。また白菜の洗浄法の検討及びゲノム解析法を用いて白菜キムチの細菌叢の検討、水分活性、塩分濃度、pH の確認も併せて行った。

研究協力者

川崎市健康安全研究所
横浜市衛生研究所

浅井威一郎 淀谷雄亮 佐藤英子
松本裕子

A. 研究目的

病原大腸菌による食中毒は、ヒトを含めた動物のふん便等で汚染された食品(食肉、野菜、水等)や、二次汚染が原因となる。また自然界に広く分布しており、そのため汚染経路を明確にすることは困難であり、原因不明となることが多い。

近年、これら病原大腸菌による大規模食中毒が多発し、社会問題となっている。令和 2 年には、学校給食での海藻サラダを原因とする *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(小中学生等患者 3,453 人)が発生し、その後も仕出し弁当を原因とする毒素原性大腸菌による食中毒(患者 2,548 人)の発生、令和 3 年には給食の牛乳による主要な病原因子を保有しない病原大腸菌の大規模食中毒(児童等患者 1,896 人)が発生している。病原大腸菌食中毒発生件数としては、腸管出血性大腸菌によるものが一番多くなっている。また、令和 2 年は細菌性食中毒患者数の 65%が、令和 3 年は 40%が病原大腸菌患者数となっている。

本研究は、国内外で発生した病原大腸菌による食中毒事例について、文献を検索し、病原大腸菌食中毒の原因となりうる食品について形状や成分などの特性や、原因食品が判明している食中毒事例を参考に、実際に食品に菌を接種し、生残しやすい条件についての検討を行い、食品が保有する特性が食中毒原因菌の生残性に与える影響を解

明する事を目的とする。

本研究から得られた成果は、原因食品が不明となる事の多い病原大腸菌食中毒の原因食品の究明、また、食品の保存法の見直し、洗浄法の確立の一助となり、食中毒予防対策に大いに役立つと考える。

令和 6 年度は、腸管出血性大腸菌 0157 食中毒発生予防対策の一助となることを目的とし、「川崎市の焼肉店で発生した腸管出血性大腸菌 0157 による食中毒事例」についての事例検討を行い、原因食品と疑われる白菜キムチの特性について文献から考察を行った。

また、走査型電子顕微鏡による野菜の表面構造の観察及び野菜、白菜キムチに腸管出血性大腸菌 0157 を接種しその生残性について検討した。

令和 7 年度は、大腸菌を直接白菜に塗抹し、走査型電子顕微鏡を用い、菌が付着する部位の確認を行った。また白菜の洗浄法の検討、ゲノム解析法を用いて白菜キムチの細菌叢の検討、及び水分活性、塩分濃度、pH の確認も併せて行い、白菜及び白菜キムチの特性について検討を行った。

B. 研究方法

[1] 走査型電子顕微鏡を用いての大腸菌塗抹部位の確認

①白菜部位別細菌数、pH、塩分濃度、水分活性の検討

外葉(基本的に一番外側を使用)

内葉（緑）（葉が緑色の部分）

内葉（黄）（葉が黄色の部分）

中心部（1 番中心部）について

細菌数（標準寒天培地）、大腸菌・大腸菌群数（XM-G 寒天培地）、黄色ブドウ球菌数（マンニット食塩寒天培地）、セレウス菌数（NGKG 寒天培地）の測定を行った（図 1）。

該当部位の葉について、白い軸部分から上の葉部分まで数枚を細切し、25g を採取して材料とした（一部分は走査型電子顕微鏡観察を実施）。希釈水は PB を使用し、10 倍乳剤から希釈系列を作成し測定した。一般細菌、大腸菌群においては、MALDI-TOF MS（ブルカー・ジャパン）を用い、菌種の同定を行った。

②白菜の走査型電子顕微鏡観察

外葉等を含むため、汚れている部分があればそのあたりを中心に、白い軸部分と上の葉部分について、走査型電子顕微鏡（HITACHI Su3800）にて撮影し、検討した。

また、白菜の軸部分と葉部分に非病原性である大腸菌（HB101）を直接塗抹した直後の白菜及び 10 ml の TSB 培地に大腸菌を 37℃24 時間培養し、その培養液に 4 日間浸漬させた白菜を安全キャビネット内で乾燥させ、白菜表面、内部についても走査型電子顕微鏡観察を実施した。

[2]白菜の洗浄方法の検討

厚生労働省の「HACCP」関連ページにも掲載されている全日本漬物協同組合

連合会が作成した、「小規模事業者向け漬物製造の衛生管理の手引き書」には、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌もしくは同等の方法による殺菌について記載されている。

また、同手引書内の衛生管理計画上でも「洗浄・殺菌」は CCP（重要管理点）と定められている。

今年度は、食品添加物として販売されている次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤について白菜の消毒効果の検討を行った。

洗浄方法は、大量調理施設衛生管理マニュアル¹⁾を参照した（図 2）。

4cm にカットした白菜について、流水にて 3 回洗浄後、次亜塩素酸ナトリウム（100 ppm 10 分）過酢酸製剤（75 ppm 5 分）に浸漬後、流水にて 3 回洗浄を行った。次亜塩素酸ナトリウムにおいては（200 ppm 10 分）、過酢酸製剤では（225 ppm 5 分）と、消毒液の濃度を増加した検討も併せて行った。

白菜キムチの製造方法として外葉、内葉、中心部をカットせず発酵させる方法もあることから、葉 1 枚の状態で剥がした白菜についても、カットした白菜同様に、流水にて 3 回洗浄し過酢酸製剤（75 ppm 5 分）、次亜塩素酸ナトリウム（100 ppm 10 分）浸漬後流水で 3 回洗浄し洗浄効果の検討を行った。

上記の検体において、流水洗浄前、流水洗浄後、次亜塩素酸ナトリウム及

び過酢酸製剤浸漬流水後、それぞれの工程ごとに 25 g を採取し希釈系列を作成し、細菌数を測定した。

また、腸管出血性大腸菌株（今回の食中毒事例分離株）を 4cm にカットした白菜に 10^3 CFU/g、 10^7 CFU

/g になるよう添加し、過酢酸製剤（75 ppm 5 分）次亜塩素酸ナトリウム（100 ppm 10 分）で消毒を行った。その後 10 g を採取し、希釈系列を作成し、ソルビットマッコンキー寒天培地に塗抹し、腸管出血性大腸菌 0157 菌数を測定した。感染管理上困難であったため、流水洗浄は行っていない。

[3] 白菜キムチ細菌叢の解析

市販キムチ 10 検体を対象に、フルレングス 16S rRNA 遺伝子を用いた Nanopore sequence 解析により、キムチの細菌叢の解析を行った。各検体 25 g を 225 mL の PB に懸濁し、そのうち 1.8 mL を用いて DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) により DNA を抽出した。抽出した DNA は Rapid Sequencing DNA - 16S Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies) を用いてライブラリー調製を行い、MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) によりシーケンスを実施した。得られたシーケンスデータについて、EPI2ME 16S workflow (wf-16s) を用いて菌種の同定および相対存在量の算出を行った。併せて細菌数、

大腸菌群、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌、乳酸菌数（BCP プレートカウントアガール）、pH、水分活性及び塩分濃度についても測定を行い、白菜キムチが腸管出血性大腸菌 0157 に汚染された場合の発育環境についての検討を行った。

C. 結果

[1] 走査型電子顕微鏡を用いての大腸菌塗抹部位の確認

①白菜の細菌数、大腸菌群、大腸菌、pH、塩分濃度、水分活性の検討

表 1 に示すとおり、白菜の細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であり、部位による偏りは認められなかった。また、pH は 6.2~6.7 であり、中心部が高い傾向にあった。外葉からはセレウス菌が 1.0×10^2 CFU/g、大腸菌群が 1.0×10^2 CFU/g 検出された。白菜の細菌種は MALDI-TOF MS にて同定した結果、多くが *Chryseobacterium* 属であり、大腸菌群の菌種は *Lelliottia* 属、*Enterobacter cloacae* complex であった。

②白菜の走査型電子顕微鏡観察

白菜の外葉、内葉からは埃等と思われる物質が確認されたが、中心部からは認められなかった（図 3）。

③大腸菌を塗抹した白菜の走査型電子顕微鏡画像

試料台に乗せた段階では大腸菌は確認されたが、白菜に塗抹した後撮影した画像からは、大腸菌は確認できなかった（図 4）。

増菌培養液に4日間浸漬させた白菜からは、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された(図5)。

[2] 白菜の洗浄方法の検討

4cmにカットした白菜を大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき流水にて3回洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム100ppm 10分 過酢酸製剤75ppm 5分浸漬させた結果は、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g、流水洗浄後 10^4 CFU/g 消毒液浸漬後 10^3 CFU/gであった。次亜塩素酸ナトリウム200ppm 10分 過酢酸製剤225ppm 5分に消毒液の濃度を増加し浸漬させた結果は、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g 流水洗浄後 10^5 cfu/g 消毒液浸漬後 10^3 CFU/gであった(表2)。外葉、内葉、中心部別に葉1枚を3回流水後次亜塩素酸ナトリウム100ppm 10分 過酢酸製剤75ppmを5分浸漬させた結果においては、流水洗浄後 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/gの菌数の減少が認められた。次亜塩素酸ナトリウム100ppm 10分、過酢酸製剤75ppmを5分浸漬後流水した結果は、内葉の過酢酸製剤消毒後で 10^2 CFU/gの減少が認められた他は、 10^1 CFU/gまたは 10^1 CFU/g未満の減少が確認された程度であった(表3)。

また、腸管出血性大腸菌0157株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/gを4cmにカットした

白菜に添加し、過酢酸製剤(75ppm 5分)次亜塩素酸ナトリウム100ppm 10分)で洗浄した結果(表4)は、次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で洗浄を行っても 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/gの減少が認められた程度であった。流水洗浄は感染管理上困難であったため行っていない。

[3] 白菜キムチ細菌叢の解析

市販キムチ10検体を購入し、遺伝子を抽出し、フルレンジ16S rRNA遺伝子についてNanopore sequence解析を行い、キムチ細菌叢の全ゲノム解析を行った。併せて細菌数、大腸菌群、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌、乳酸菌数、pH、水分活性及び塩分濃度についても測定を行った。

購入した検体は、小売店で購入したものが5検体、スーパーマーケットで購入した検体が4検体、デパートで購入した検体が1検体であった。

細菌数は、 10^4 CFU/g $\sim$ 10^7 CFU/g、乳酸菌数は 10^4 CFU/g $\sim$ 10^8 CFU/gであった。

小売店で購入したものが、細菌数、乳酸菌数ともにNo.3が 10^4 CFU/gであった以外は、 10^7 CFU/g $\sim$ 10^8 CFU/gとスーパーマーケット、デパートで購入したもの(10^5 CFU/g $\sim$ 10^7 CFU/g)より高い傾向にあった。大腸菌群が4検体から、セレウス菌が1検体から検出された。

塩分濃度は 2.8～3.6%、pH は 5.0～6.1、水分活性は 0.95～0.97 であった (表 5)。

フルレングス 16Sr RNA 遺伝子についての Nanopore sequence 解析結果を図 6, 7, 8 に示す。白菜キムチ 3, 6, 8 は抽出した遺伝子量が少なく測定することができなかった。その他の検体は *Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% を占めた。他に *Yersiniaceae* 科、*Rahnella* 属 *Serratia* 属、*Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属も検出された。

D. 考察

大腸菌を直接白菜に塗抹し、走査型電子顕微鏡を用い、菌が付着する部位の確認を行った。

外葉 (基本的に一番外側を使用)

内葉 (緑) (葉が緑色の部分)

内葉 (黄) (葉が黄色の部分)

中心部 (1 番中心部) について細菌数の測定を行った。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であり、部位による偏りは認められなかった。白菜から検出された細菌数の菌種のうち多くは白菜の根の周囲に生息する

Chryseobacterium 属であった。

白菜を走査型電子顕微鏡で観察した結果、外葉、内葉からは埃等と思われる物質が確認されたが、中心部からは認められなかった (図 3)。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 検出されていることから、前述の

Chryseobacterium 属が白菜内部にまで侵入していることが考えられた。

大腸菌を塗抹した白菜の走査型電子顕微鏡画像では、塗抹直後の画像からは、大腸菌は確認できなかった (図 4) が、増菌培養液に 4 日間浸漬させた白菜からは、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された (図 5)。菌の付着の定着には時間を要することが示唆された。

また、4cm にカットした白菜を 3 回流水にて洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分 過酢酸製剤 75 ppm 5 分浸漬させた結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄後では、 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g、消毒後では、 10^1 CFU/g/程度の菌数の減少が認められた。消毒液の濃度を次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm 10 分 過酢酸製剤 225 ppm 5 分に増加させた結果も同様の結果であった (表 2)。前述の走査型電子顕微鏡観察の結果から、白菜内部に菌の定着が示唆されることより、大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき実施した消毒方法では、 10^3 CFU/g 未満の菌数の減少は難しいことが示唆された。

また、4cm にカットした白菜に腸管出血性大腸菌 O157 株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g を添加し過酢酸製剤 (75 ppm 5 分)、次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分) で洗浄した結果 (表 4) では、菌の減少は 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g 程度

であった。今回の実験で使用した濃度では、腸管出血性大腸菌 0157 を完全に除去することは難しいことが示唆された。

これらのことより、白菜キムチの製造工程には加熱工程がないことから様々な工程において、腸管出血性大腸菌を増殖させない温度管理が重要であると思われた。

白菜キムチにおける細菌数、乳酸菌数の結果は、表 5 に示すとおり、 10^4 CFU/g $\sim 10^8$ CFU/g であり、スーパーマーケット、デパートで販売されている白菜キムチの細菌数、乳酸菌数が小売店で販売されている白菜キムチと比較して低い菌数であった。スーパーマーケット等で販売されているキムチでは、賞味期限内に過度な増殖のないよう菌数管理がされていることが考えられる。

白菜キムチの Nanopore sequence 解析による細菌叢の検討結果では、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属 *Leuconostoc* 属、*Weissella* 属の乳酸菌が 90% 以上を占めていた。また、今回購入したキムチの pH は全て 5.0 以上であった。白菜キムチの発酵が進み乳酸菌の増殖が促進されると pH の低下が起こる。乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告²⁾もあることから、来年度は、白菜キムチの乳酸菌の発育増殖と pH の関係性及びこれに伴う腸管出血性大腸菌

0157 の生残性についての検討を Nanopore sequence 解析を用いて行う予定である。

E. 結論

白菜に大腸菌を付着させ、走査型電子顕微鏡で観察したところ、葉脈様部位および白菜内部に大腸菌が確認された。また、白菜を大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で消毒を行った結果、細菌数の減少を認めたが、 10^3 CFU/g 未満に低下させることはできなかった。白菜内部に存在する細菌の洗浄を今回の実験法では行うことが難しかったためと考えられる。このことより、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒を防止するためには、菌を増殖させないための温度管理が重要であることが示唆された。

また、白菜キムチにおける Nanopore sequence 解析の結果からは、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% 以上を占めていた。乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告もあることから、乳酸菌の発育増殖と腸管出血性大腸菌 0157 の生残性について検討を行うことを考えている。

F. 健康危険情報

なし

G．研究発表

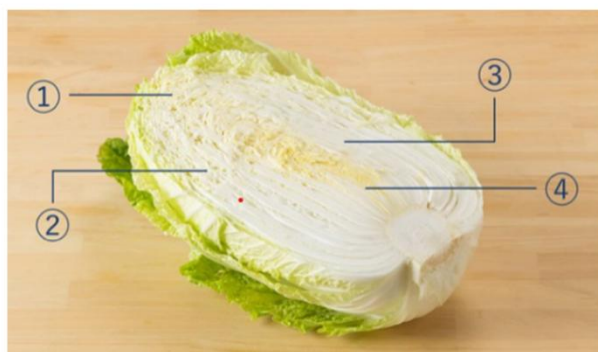
なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

【参考文献】

- 1) 大量調理施設衛生管理マニュアル
(平成9年3月24付け衛食第85号別添)
(最終改正：平成28年10月6日付け生食
発1006第1号)
- 2) 松田敏生、乳酸菌による食品有害微生物
の制御. Japanese Journal of Lactic
Acid Bacteria, Vol. 8 , No. 2



【部位】

- ① 外葉(基本的に一番外側を使用)
- ② 内葉(緑)(葉が緑色の部分)
- ③ 内葉(黄)(葉が黄色の部分)
- ④ 中心部(1番中心部)

図1 購入した白菜の観察部位

1. 白菜に付着している細菌の洗浄効果の検討

項目：一般生菌数、大腸菌群、大腸菌（酵素 基質培地）
白菜全体、外葉、内葉、中心に分けて洗浄効果の検討を行った。

2. 腸管出血性大腸菌O157を添加した白菜の洗浄効果の検討を行った。

• 白菜の洗浄方法

（大量調理施設衛生管理マニュアル参照）

水洗 流水にて3回洗浄

↓

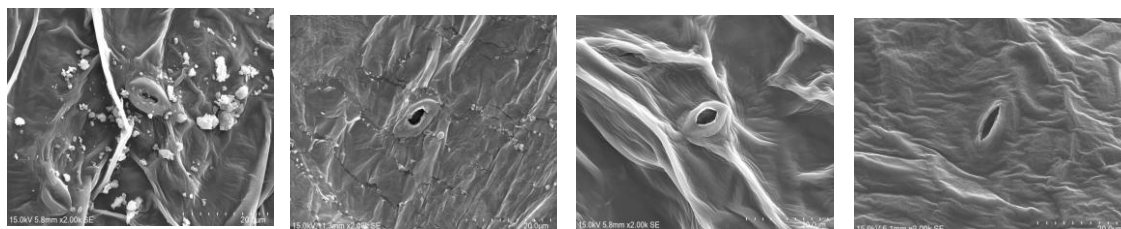
過酢酸製剤（75 ppm 5分間）又は
次亜塩素酸水(100 ppm 10分間)

↓

水洗 流水にて3回洗浄

洗浄液の濃度を増加させた方法についても検討した。

図2 次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤の消毒効果についての検討



外葉×2000

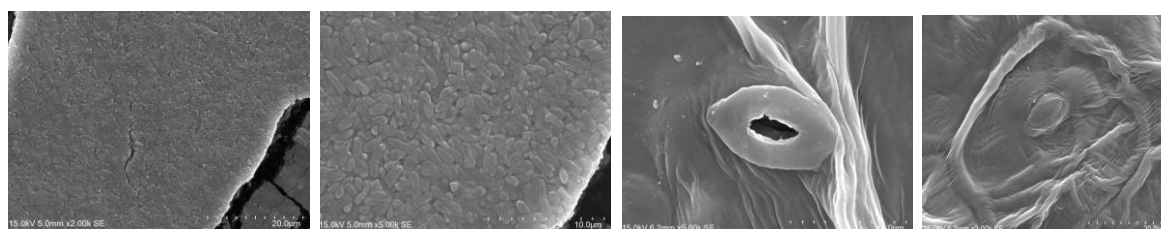
内葉×2000

内葉×2000

中心部×2000

外葉、内葉には埃等と考えられる物質が確認された。中心部には認められなかった。

図3 白菜の走査型電子顕微鏡画像



試料台に大腸菌を塗布
×2000

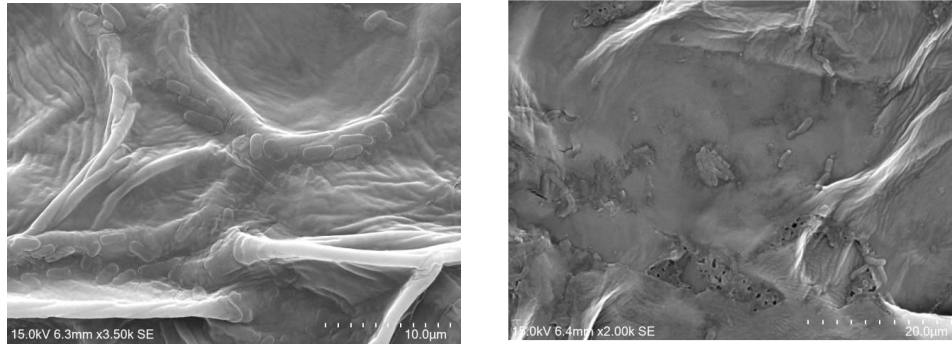
試料台に大腸菌を塗布
×5000

白菜に大腸菌を塗布
×5000

白菜に大腸菌を塗布
×5000

白菜表面上には大腸菌は確認されなかった。

図4 大腸菌を塗布した白菜の走査型電子顕微鏡画像



葉の膨らんだ部分に付着していた
×3500

葉の内部
×2000

図5 4日間大腸菌培養液に白菜を浸漬させた後撮影した画像

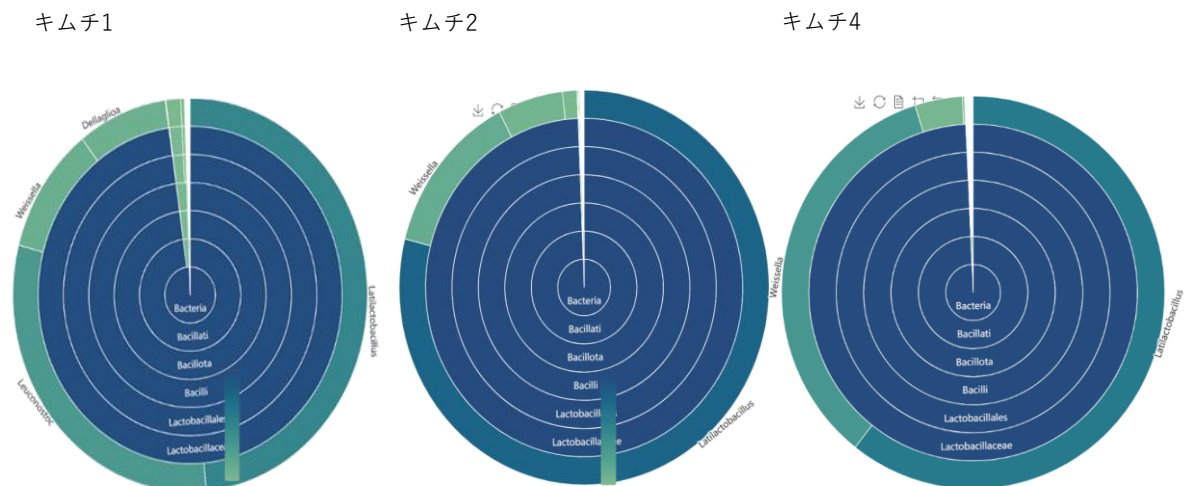


図6 キムチのゲノム解析結果
(フルレンジス16SrRNA遺伝子についてNanopore sequence解析にて行った)

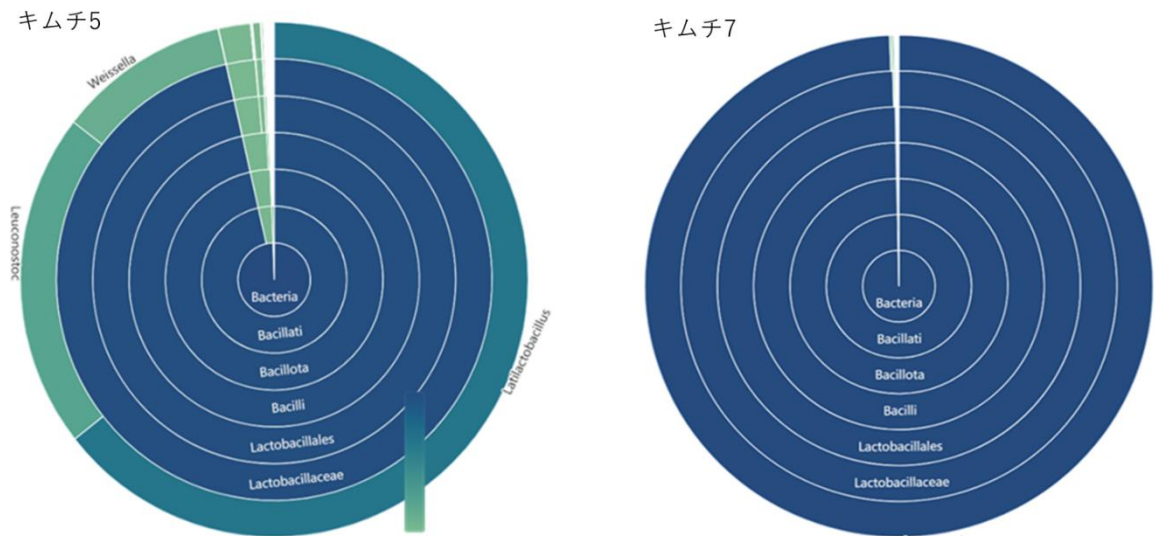
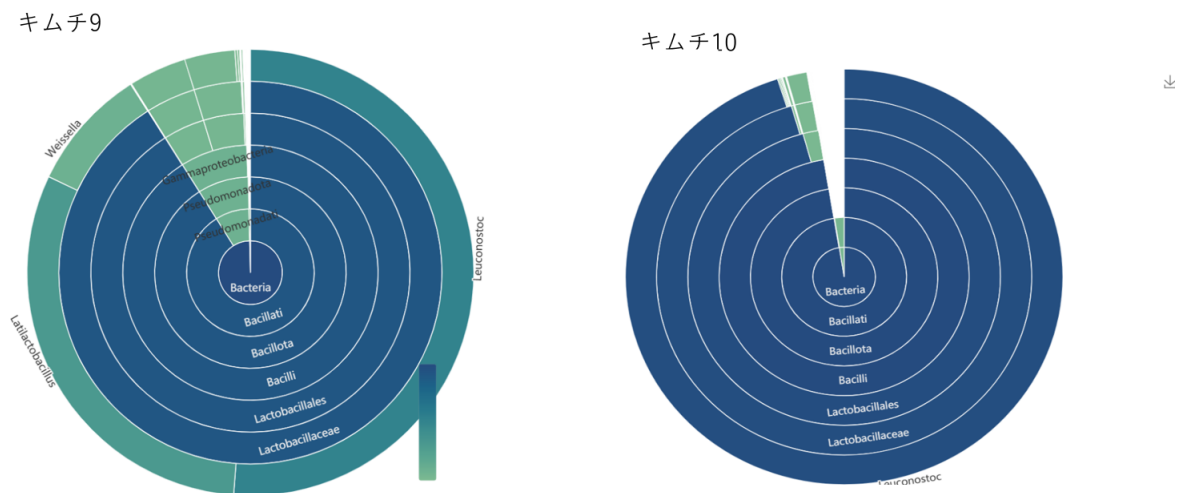


図7 キムチのゲノム解析結果



*Lactobacillaceae*科 *Latilactobacillus*属 *Leuconostoc*属 *Weissella*属が90%以上を占めていた。
*Yersiniaceae*科 *Rahnella*属 *Pseudomonas*属 *Serratia*属 *Vibrio*属も検出された。

図8 キムチのゲノム解析結果

表1 白菜の細菌数 pH 塩分濃度 水分活性等

白菜-1	茨城県産	枚数	pH	塩分濃度(%)	水分活性	細菌数	大腸菌	大腸菌群	黄色ブドウ球菌	セレウス菌
	①外葉	4	6.2	0.3	0.984	2.1×10^6	陰性	2.0×10^2	陰性	1.0×10^2
	②内葉 緑	5	6.2	0.3	0.986	3.0×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性
	③内葉 黄	45	6.4	0.2	0.985	2.9×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性
	④中心部	-	6.7	0.3	0.984	1.9×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性
白菜-2	⑤外葉	4	6.3	0.3	0.986	7.3×10^5	陰性	陰性	陰性	1.0×10^2
	⑥内葉 緑	9	6.3	0.3	0.986	5.3×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性
	⑦内葉 黄	23	6.4	0.3	0.986	4.8×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性
	⑧中心部	-	6.7	0.3	0.986	5.3×10^5	陰性	陰性	陰性	陰性

単位:CFU/g

①、⑤の外葉は*Bacillus* sp. や真菌の発育が多い
それ以外の内葉は生菌数のコロニーは、*Chryseobacterium* sp.、大腸菌群のコロニーは*Lelliottia* sp.、*Enterobacter cloacae* complexであった。

表2 白菜（4 c m程度にカット）の洗浄結果

大量調理施設衛生管理マニュアルに基づいた洗浄法

次亜塩素酸ナトリウム(100 ppm 10分)での消毒実験結果

洗浄前の細菌数	3.1×10^6
水洗後の細菌数	3.6×10^4
次亜塩素酸で消毒後の細菌数	6.0×10^3

過酢酸製剤(75 ppm 5分)での消毒実験結果

洗浄前の細菌数	2.7×10^6
水洗後の細菌数	6.9×10^4
過酢酸製剤で消毒後の細菌数	1.8×10^3

単位:CFU/g

消毒液の濃度を増加した洗浄法

次亜塩素酸ナトリウム(200 ppm 10分)での消毒実験結果

洗浄前の細菌数	1.2×10^6
水洗後の細菌数	2.3×10^5
次亜塩素酸(200ppm)で消毒後の細菌数	6.0×10^3

過酢酸製剤(225 ppm 5分)での消毒実験結果

洗浄前の細菌数	1.2×10^6
水洗後の細菌数	2.3×10^5
過酢酸製剤(240ppm)で消毒後の細菌数	1.2×10^3

単位:CFU/g

水洗で 10^6 CFU/gが 10^4 CFU/gの濃度に、その後の消毒薬洗浄によって 10^3 CFU/gまでの細菌数の減少が認められた。

消毒液の濃度を増加させても消毒効果の変化は認められなかった。

表3 白菜外葉、内葉、中心別洗浄結果
(葉1枚を洗浄)

	流水前	流水後	次亜塩素酸ナトリウム 100ppm 10分	過酢酸製剤 75ppm 5分
外葉	2.2×10^5	1.2×10^3	7.0×10^2	3.2×10^2
内葉	1.4×10^6	9.6×10^4	1.2×10^3	2.1×10^2
中心	8.7×10^4	3.7×10^3	1.7×10^3	1.8×10^3

単位：CFU/g

表4 腸管出血性大腸菌O157添加後の洗浄効果の検討結果
(白菜を4 c m程度にカット)

検体のO157菌数	2.3×10^3	検体のO157菌数	2.3×10^7
次亜塩素酸で消毒後のO157菌数	2.0×10^2	次亜塩素酸で消毒後のO157菌数	1.7×10^6
過酢酸製剤で消毒後のO157菌数	8.0×10^2	過酢酸製剤で消毒後のO157菌数	3.8×10^5

単位：CFU/g

単位：CFU/g

添加したO157数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で洗浄を行っても 10^1 CFU/g～ 10^2 CFU/gの減少が認められた程度であった。流水洗浄は行っていない。

表5 白菜キムチの細菌数 pH 塩分濃度 水分活性 乳酸菌数

検体	水分活性	塩分濃度(%)	pH	細菌数	大腸菌群	大腸菌	ブドウ球菌	セレウス菌	乳酸菌数 (推定)
キムチ1 (小売店)	0.95	3.0	5.6	3.1×10^7	1.0×10^2	陰性	陰性	陰性	2.1×10^7
キムチ2 (小売店)	0.95	2.9	5.6	1.3×10^8	陰性	陰性	陰性	陰性	2.4×10^7
キムチ3 (小売店)	0.96	2.8	5.4	2.2×10^4	陰性	陰性	陰性	陰性	3.8×10^4
キムチ4 (小売店)	0.95	3.6	6.1	1.6×10^7	1.1×10^2	陰性	陰性	陰性	3.8×10^7
キムチ5 (小売店)	0.97	3.6	6.0	4.8×10^7	陰性	陰性	陰性	1.0×10^2	6.0×10^8
キムチ6 (スーパー)	0.96	3.4	5.0	1.2×10^5	70	陰性	陰性	陰性	1.2×10^5
キムチ7 (スーパー)	0.97	2.8	5.6	7.0×10^5	陰性	陰性	陰性	陰性	4.0×10^5
キムチ8 (スーパー)	0.97	3.1	5.8	8.0×10^5	60	陰性	陰性	陰性	6.8×10^5
キムチ9 (スーパー)	—	—	—	6.8×10^6	陰性	陰性	陰性	陰性	1.3×10^7
キムチ10 (デパート)	0.96	3.4	5.3	1.2×10^5	陰性	陰性	陰性	陰性	1.2×10^5

単位：CFU/g

令和 7 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）
食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための
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

食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法に関する研究

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

これまでに公表されている腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC）検査法をもとに、通知法案を作成した。自治体の衛生研究所で汎用されているリアルタイム PCR 装置 5 機種を用いて、通知法案に収載した遺伝子検査法を実施したところ、すべての機種が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。今回作成した通知法案は厚生労働省と協議を行い、通知法案の発出を進めていきたいと考える。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所
国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬 昌平
新井 紗倉

A. 研究目的

腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC）は、易熱性エンテロトキシン（LT）、耐熱性エンテロトキシン（ST）の両方、もしくはいずれか一方を産生し下痢を引き起こす。症状は水溶性の下痢を伴うことが多く、ひどい場合には便が米のとぎ汁様になり脱水症状を起こすこともある。野菜や水を介して伝搬することが知られている。腸管毒素原性大腸菌 06、025、027、0148、0153、0159 及び 0169 による事例が多く報告されている。我が国では、

令和 2 年に腸管毒素原性大腸菌による大規模食中毒（患者 1,896 人）が発生しており、その後、減少傾向は認められていない。

本研究では、ETEC を検出または型別するための各種遺伝子検出法についてまとめ、通知法案の作成を目的とした。ETEC の分離同定法については、厚生労働科学研究費による研究事業で検討が行われている¹⁾。この分離同定法は、13 自治体との共同研究の中でその有効性が確認されている²⁾。今回は、この分離同定法を基に PCR 装

置の性能を評価し、これらを盛り込んだ通知法案の作成を行った。

B. 研究方法

[1] 供試リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice Real Time System III 及び IV (タカラバイオ)、QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific)、LightCycler 96 及び PRO (ロシュ・ダイアグノスティックス) を供試した。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子検出法 (スクリーニング) の検討

(1) 供試菌株

患者由来の ESC633 (O159:H34, STh) および ESC673 (O148:H28, STp, LT) の 2 株を供試した。

(2) 食品検体

市販の国産キュウリを供試した。

(3) DNA 溶液の調製

-80℃ に保存された各種菌株を TSB 5 mL に接種し、37℃ にて 18 時間培養した。食品検体を 25 g 採取し、mEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃ にて 22±2 時間培養した。この食品培養液にて各 2 株の供試菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種キュウリ培養液 (想定 5~3 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種キュウリ培養液各 100 µL を上記の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。抽出

DNA を下記リアルタイム PCR 法のテンプレートとした。

(4) キットを用いたリアルタイム PCR 法

ESC633 および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA をそれぞれ単独で使用了。Dice III および Dice IV を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC100A、タカラバイオ) を供試し、QS5 を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC110A、タカラバイオ) を供試した。いずれもオート解析にて判定した。

(5) 自家調整リアルタイム PCR 法

ESC633 および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA をそれぞれ単独で使用了。LT 遺伝子については West らの方法 (Vet. Microbiol. 122:323-331、2007)、STh 遺伝子については Konishi らの方法 (食品衛生学雑誌. 59:161-166、2018)、STp 遺伝子については Frydendahl らの方法 (Mol. Cell. Probes 15:151-160、2001)、内因性コントロールとしての 16SrRNA 遺伝子については米国農務省 (USDA、MLG 5B Appendix 1.01) のリアルタイム PCR 法を参照した。いずれもオート解析にて判定した。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子型別法の検討

(1) 供試菌株

患者由来の ESC633 (0159:H34, STh) および ESC673 (0148:H28, STp, LT) の 2 株を供試した。

(2) 食品検体

市販の国産キュウリを供試した。

(3) DNA 溶液の調製

-80℃ に保存された各種菌株を TSB 5 mL に接種し、37℃ にて 18 時間培養した。培養液 100 µL を滅菌 PBS 900 µL で 10 倍希釈し 10^{-1} ~ 10^{-7} 希釈液を調製した。残りの菌培養液は -80℃ にて冷凍保存した。 10^{-6} および 10^{-7} 希釈液各 100 µL を 5 枚の TSA に塗抹し、37℃ にて 18 時間培養し、コロニー数をカウントした。また、食品検体を 25 g 採取し、mEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃ にて 22 ± 2 時間培養した。この食品培養液にて各 2 株の供試菌株の増菌培養液を適宜希釈し、 10^8 CFU/mL 希釈食品培養液を調製した。さらに、食品培養液 400 µL にて 100 µL の 10^8 CFU/mL 希釈食品培養液を 5 倍希釈し、 2×10^7 CFU/mL 希釈食品培養液を調製した。食品培養液にてさらに 10 倍階段希釈し、菌接種キュウリ培養液 (想定 2×10^6 ~ 2×10^3 CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種食品培養液各 100 µL を上述のアルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA のうち、想定 2×10^5

CFU/mL、 2×10^4 CFU/mL および 2×10^3 CFU/mL の 3 濃度の食品培養液について、それぞれ ESC633 および ESC673 の DNA を等量混合し (各株想定 5 ~ 3 log CFU/mL)、下記リアルタイム PCR 法のテンプレートとした。

(4) キットを用いたリアルタイム PCR 法

LT および STh を型別する組み合わせでは、ESC633 のキュウリ培養液希釈 DNA および ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA の混合 DNA を用いた。STp を型別する方法では、ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。DiceⅢ および DiceⅣ を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Typing Kit (RC101A、タカラバイオ) を供試し、QS5 を用いる場合は、ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (RC111A、タカラバイオ) を供試した。いずれもオート解析にて判定した。

(5) 自家調整リアルタイム PCR 法

LT および STp の型別法では、ESC673 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。STh の型別法では、ESC633 のキュウリ培養液希釈 DNA を単独で使用した。リアルタイム PCR 法は、LT 遺伝子については West らの方法、STh 遺伝子については Konishi らの方法、STp 遺伝子

については Frydendahl らの方法、内因性コントロールとしての 16SrRNA 遺伝子については米国農務省 (USDA、MLG 5B Appendix 1.01) のリアルタイム PCR 法を参照した (表 1)。いずれもオート解析にて判定した。

C. 研究結果

[1] ETEC の ST および LT 遺伝子検出法の検討

(1) キットを用いたリアルタイム PCR 法

STh、STp および LT 遺伝子は、Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler 96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

(2) 自家調整リアルタイム PCR 法

STh、STp および LT 遺伝子は、Dice III および Dice IV では検出限界が 4 log CFU/mL であり、QS5、LightCycler 96 及び PRO では検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

[2] ETEC の ST および LT 遺伝子型別法の検討

(1) キットを用いたリアルタイム PCR 法

Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler

96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

(2) 自家調整リアルタイム PCR 法

Dice Real Time System III、IV、QuantStudio 5、LightCycler 96、PRO のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL であった (表 2)。

D. 考察

ETEC の ST および LT 遺伝子検出法、ST および LT 遺伝子型別法では、キットを用いたリアルタイム PCR 法および自家調整のリアルタイム PCR 法のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL または 4 log CFU/mL であり、今回検討したすべての機種が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。

これらのリアルタイム PCR 装置の性能評価を踏まえ、ETEC 通知法案の作成を行った。

E. 結論

食品培養液を用いて ETEC の ST および LT 遺伝子検出法並びに ST および LT 遺伝子型別法の検出限界を比較した。今回対象とした PCR 装置は多くの自治体で使用されているものである。今回の通知法案の中で採用されている ETEC 検査法は、これらのいずれの装置でも使用することができた。今回作成した通知法案は厚生労働省に提出す

る予定である。今後、厚生労働省と協議を行い、通知法案の発出を進めていきたいと考える。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

I．参考文献

- 1) Ohtsuka K *et al.*: Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. LWT, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108409>
- 2) Hara-Kudo Y *et al.*: An interlaboratory study on the detection methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables using enterotoxin gene screening and selective agars for ETEC-specific isolation. Int J Food Microbiol, 2020, doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108832](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108832).

表1 自家調整リアルタイム PCR 法で使⽤したプライマー

STh	STh-F	AAAGTGGTCCTGAAAGCATGAATAG	Konishi ら, 食 品衛⽣学雑誌. 59:161-166, 2018
	STh-R	CACCCGGTACAAGCAGGATT	
	STh-P	FAM-AGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTT-BHQ1	
STp	STp-F	GCAAAATCCGTTTAACTAATCTCAA	Frydendahl et al., Mol. Cell. Probes 15:151-160, 2001
	STp-R	ACAGAAATAAAAATTGCCAACATTAGC	
	STp-P	FAM-TTACCTCCCGTCATGTTGTTTCACGGAT-BHQ1	
LT	LT-F	CCGGCAGAGGATGGTTACAG	West et al., Vet. Microbiol. 122:323-331, 2007
	LT-R	GAATCCAGGGTTCTTCTCTCAA	
	LT-P	FAM-TAGCAGGTTTCCCACCGGATCACC-BHQ1	
16S rRNA	16SrRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA, MLG 5B Appendix 1.01
	16SrRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
	16SrRNA-P	HEX-GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC-BHQ1	

表2 リアルタイム PCR 装置の性能評価

方法	目的	DNA抽出法	標的遺伝子	検出限界 (log CFU/mL)				
				DiceⅢ	DiceⅣ	QS5	96	PRO
キット使用	ST、LT遺伝子検出 (スクリーニング)	アルカリ熱抽出	STh、STp、LT	3	3	3	3	3
	ST、LT遺伝子型別	アルカリ熱抽出	STh	3	3	3	3	3
			STp	3	3	3	3	3
			LT	3	3	3	3	3
自家調整	ST、LT遺伝子検出 (スクリーニング)	アルカリ熱抽出	STh、STp、LT	4	4	3	3	3
	ST、LT遺伝子の型別	アルカリ熱抽出	STh	3	3	3	3	3
			STp	3	3	3	3	3
			LT	3	3	3	3	3

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
Ooka T, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J.	Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, <i>astA</i> , in <i>Escherichia coli</i> .	Front Microbiol	16	1635-769	2025
Arai, S., Ikeda, N., Kadoguchi, M., Arikawa, E., Mizokoshi, A., Shimmen, K., Yokoyama, K., Doi, R., Saiki, D., Yatsuyanagi, J., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y.	Evaluation of PCR assays for detecting <i>Escherichia coli</i> strains harboring the <i>astA</i> gene encoding the enteroaggregative <i>E. coli</i> heat-stable enterotoxin 1 in various food matrices.	Food Safety	13 (4)	70-77	2025
工藤由起子、大屋賢司	富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質検査	日本食品微生物学会雑誌	43 (1)	20-24	2026

厚生労働大臣 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和7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 食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究 (24KA1002)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 星薬科大学 薬学部薬学科 教授
(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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：星薬科大学動物実験規定)	☒	☐	☒	星薬科大学動物実験委員会	☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

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

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年4月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 井戸 章雄

次の職員の令和7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

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名)

大学院歯科学総合研究科・准教授

(氏名・フリガナ)

大岡 唯祐・オオオカ タダスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

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

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和8年4月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立健康危機管理研究機構

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 国土 典宏

次の職員の令和7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 食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 国立感染症研究所 細菌第一部・研究員
(氏名・フリガナ) 窪村 亜希子・クボムラ アキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況

受講 ☒ 未受講 ☐

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項)

・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和8年4月24日

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

機関名 川崎市健康安全研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 三崎貴子

次の職員の令和7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 食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品担当 技術職員
(氏名・フリガナ) 小嶋由香 (コジマユカ)

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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

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

令和8年3月18日

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

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 食中毒原因病原体大腸菌の検査法の整備及び食中毒対策推進のための研究

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) 大西 貴弘 (オオニシ タカヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。