

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

astA 保有大腸菌の食品検査法の確立

研究要旨

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

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

秋田県健康環境センター

今野貴之

大分県衛生環境研究センター

成松浩志、溝腰朗人

川崎市健康安全研究所

小嶋由香

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

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

A. 研究目的

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

ことが危惧されている。

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

B. 研究方法

(1) 選択増菌培養法および選択分離培養法の検討

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

また、選択分離培養法については、腸管出血性大腸菌の食品での検

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

1) 菌株

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

2) *astA* 保有大腸菌の増菌培養条件の検討

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

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

3) *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

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

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

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討

1) 菌株

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

2) DNA 溶液の調製

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

3) *astA* 特異的 PCR 法の特異性試験

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

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

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

C. 研究結果

(1) 選択増菌培養法および選択分離培養法の検討

1) *astA* 保有大腸菌の増菌培養条件の検討

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

2) *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

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

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

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討

1) *astA* 特異的 PCR 法の特異性試験

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

D. 考察

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

ことが判明した。

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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

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

(学会等発表)

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

表1. *astA* 保有大腸菌の供試菌株

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

* *astA* 保有大腸菌およびその他の病原体による散発下痢症事例

表2. 各種増菌培養液での *astA* 保有大腸菌の増殖結果

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

* 合計159株を試験

表3. *astA*保有大腸菌株の各種選択分離培地上のコロニー性状

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

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

SMAC: ソルビトールマッコンキー寒天培地

高: 高濃度, 中: 中濃度, 低: 低濃度, C: 薬剤C

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

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

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

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

表5. *astA* 特異的PCR法のプライマーおよびプローブ

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