

# I. 総括研究報告書

## 食中毒原因細菌の検査法の 整備のための研究

工藤 由起子



令和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

### 総括研究報告書

研究分担者 大岡唯祐 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究について、特に、*astA*（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1；EAST1をコードする遺伝子）保有大腸菌等の病原大腸菌および大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *Escherichia albertii* を対象に4研究分担者にて実施した。分担研究（1）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立では、*E. albertii* 食品検査法を、[1]食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討および[2]コラボレイティブ・スタディ評価にて、優れた増菌培養法、リアルタイムPCR法および分離培養法が示された。また、*astA* 保有大腸菌については、[3]*astA* 保有大腸菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。（2）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、下痢症患児由来大腸菌（2,730株）の中から *astA* 陽性株を194株同定し、そのうち31株についてドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBIデータベース上の大腸菌株（9,065株）から713株の *astA* 陽性株を同定し、ゲノム比較解析から35種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、国内分離大腸菌等3,613株のゲノムから *astA* 保有株を検索した結果、様々な系統に属する約3%の株で保有が認められた。また、大規模食中毒由来大腸菌の国際ゲノム比較を行った結果、近縁株は見出されなかった。（4）食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、*astA* 遺伝子保有大腸菌を中心とした病原大腸菌の汚染実態調査を開始した。鶏肉での汚染率が高く、鶏肉は全検体で *astA* がスクリーニングPCRで陽性となった。他に牛肉、豚肉、エビ、オクラなどで *astA* が陽性になった。また、（5）緊急的追加研究として、令和3年6月に富山市で小学校等給食で提供された牛乳によって大規模食中毒が発生し、その原因物質として疑われる大腸菌 OUT(OgGp9):H18 の病原性について研究を行った。その結果、本大腸菌が病原性を有する可能性が考えられたことから、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT(OgGp9):H18（疑い）」とすることが妥当と考えられた。

## 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
岩手県環境保健研究センター	山中拓哉
宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
三重県保健環境研究所	小林章人
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
静岡市環境保健研究所	高橋直人
広島市衛生研究所	末永朱美、池田伸代
北九州市保健環境研究所	大羽広宣、藤崎道子、有川衣美
福岡市保健環境研究所	松永典久
熊本市環境総合センター	小畑裕子
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
富山市保健所	瀧波賢治、鈴木富勝、水上克己
富山県衛生研究所	大石和徳、木全恵子、磯部順子、綿引正則
国立感染症研究所	明田幸宏、窪村亜希子、李 謙一
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、新井沙倉、大屋賢司

### A. 研究目的

近年、国内外において大腸菌近縁の *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、既に日本では 2003 年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数 200 人以上の事例も報告され新興食中毒細菌として注目されている。しかし、食中毒事例において原因食品が特定された事例は少ないため、原因食

品特定に対応する *E. albertii* の検査法の確立が求められており、令和 2 年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金事業「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」において、効率的な検出を目的とした遺伝子検出法、増菌培養法および分離培養法を決定した。本研究課題では、2 段階に分けて最終評価を行うこととした。

また、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和2年には、給食センターで調理した学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等2,958人の患者をともなう *astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン1 ; EAST1 をコードする遺伝子) 保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が100人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌(細胞への凝集付着性因子遺伝子 *aggR* に加えて *astA* 保有株も含む) や腸管病原性大腸菌(細胞への局在付着性因子: *eae* 等保有株) による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒では、原因食品が不明であることが多く、喫食状況の解析から特定の日に提供された食事や弁当などの喫食が原因として判明しても食品・食材が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、適切または効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことがいわれており、培養に際して食

品由来微生物の増殖によって食中毒細菌の増殖が抑制され、増菌および分離が困難なことが考えられるため、その食中毒細菌に適した検査法が原因食品究明には重要である。このため、本研究では増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして病原大腸菌に適する効率的かつ特異的な検査法を開発する。特に遺伝子検出法については、これら病原大腸菌の病原性発現について解析を行い、検出指標となる病原因子を既知に加え新規因子を含め検討する。また、これら病原大腸菌の食中毒事例における菌株の病原因子遺伝子等の解析および精査を行う。さらに、これら病原大腸菌の食品等への汚染状況、食品の汚染経路等は明らかになっていない。このため、食品等での汚染実態を明らかにし、制御法を検討する。

さらに、令和3年6月に富山市において、市内の小中学校や保育所等での給食に提供された牛乳によって1,800人を超える患者を伴う食中毒が発生し、この原因物質の究明における検査により、主要な病原因子を保有しない大腸菌 OUt(0gGp9):H18 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の解明についての研究を緊急的追加研究として実施す

ることとした。

## B. 研究方法

### (1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

#### [1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

食中毒事例由来 *E. albertii* 2 株を供試し、8 食品に低菌数として 7 cfu/25 g、中菌数として 14 cfu/25 g、高菌数として 30 cfu/25 g となるように接種した。これらに、modified EC 培地 (mEC)、ノボビオシン加 mEC (NmEC) または薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC) を加え、42℃にて 22 時間培養した。各増菌培養液から DNA を抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL) およびマッコンキー寒天培地 (MAC) を基本としてそれぞれに 1%ラムノースおよび 1%キシロースを添加した培地 (RX-DHL、RX-MAC) を用いた。

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

11 試験検査機関が参加し、鶏肉またはモヤシ検体 (高菌数接種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体) を供試し、添加剤 AB 加

mEC 培地での増菌培養、RX-DHL、RX-MAC、DHL、MAC での分離培養、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR (IC を含む) にて *E. albertii* の検出性を評価した。試験結果を集計後、検出方法間の有意差検定を行った。

#### [3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

*astA* 保有大腸菌 159 株を供試し、mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC での増殖性を検討した。また、供試菌株をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) や薬剤 C を添加した培地での生育性を検討した。*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討では、食品や食中毒事例由来細菌 26 種 35 株について *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 法を試験した。

### (2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

#### [1] 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

下痢症患者由来大腸菌株 2,730 株を対象に *astA* 遺伝子特異的プライマーペアによる PCR スクリーニングを実施し、*astA* 遺伝子保有株の同定を行った。また、同定された株のうち、Random amplified PCR polymorphic DNA (RAPD) 法で

同一株と判明した株は解析対象から排除した。

#### [2] 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目(1)で同定された株について大腸菌のハウスキーピング7遺伝子を対象とした multi-locus sequence analysis (MLSA)解析で系統樹を作成、進化系統の異なる31株について MiSeq (Illumina)によるドラフトゲノム配列解析を行った。

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

NCBI データベース上完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を対象に *astA* 遺伝子保有株を検索した。

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

項目(2)(3)で同定した *astA* 遺伝子保有株計 742 株について、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの相同性や局在、また、そのコピー数について検討した。

#### [5] *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

*astA* 遺伝子保有株 742 株について、コア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行った。

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

以前の研究においてドラフトゲノム解析が完了している 31 株について、既知の EAEC 関連病原因子の遺伝子スクリーニングを実施した。

#### (3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

2007 年から 2021 年に国内で分離された大腸菌等 (*E. albertii* を含む主として腸管出血性大腸菌 [EHEC]) 計 3,613 株を解析対象として、全ゲノム配列から BLAST 検索によって *astA* の検出を行った。ゲノム解析によって得られた配列をもとに、*astA* 検出用プライマーの設計 (*astA*-univ-F1 [5' - GYCATCAACRCAGTATATYCG-3'], *astA*-univ-R1 [5' - TCRCGAGTGACK RCYY TGTA-3']) および妥当性評価を行った。2020 年に 2,958 名の患者が報告された、学校給食を原因とする食中毒事例で分離された大腸菌 07:H4 の由来等を究明するために、公共データベースに存在する近縁株計 199 株との類縁関係を SNP 解析によって究明した。

#### (4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、ストマッカー処理し、42°C、22～24 時間、増菌培養を行なった。培養液から DNA を抽出しスクリーニング PCR を行い、大腸菌の病原因子の検出を行なった。スクリーニング陽性の場合、増菌培養液をクロモアガー-ECC に塗抹し、単離したコロニーの病原因子を PCR で再確認した。さらに病原因子を確認できた菌株が大腸菌であることを確認し、カジトン培地に接種し、保管した。

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

本食中毒で分離された大腸菌 OUT(OgGp9):H18 の牛乳由来株および患者由来株のゲノム解析、培養細胞での感染実験および動物モデル実験を行った。

## C. 研究結果

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

接種菌数レベルおよび増菌培地にかかわらず、ほとんどの検体でリアルタイム PCR 法陽性であった。分離培養法での分離陽性率は、高菌数接種検体で 100%、低菌数接種検体で 0-16.7%であり、増菌培地

および分離培地間の差はほとんど無かった。中菌数接種検体では、mEC 増菌培養液からの RX-DHL および RX-MAC での分離率が約 85%、NmEC および薬剤 AB-mEC 増菌培養液からの RX-DHL および RX-MAC での分離率が約 95%であり、後者の方が分離率が高かった。

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

リアルタイム PCR 法の検出感度は、全条件で 1.0 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、いずれの培地でも約 0.94 以上であり、高菌数接種で全分離培地で 1.0 であった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で約 0.7、DHL および MAC で約 0.55 であり、高菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 0.94 以上であり、DHL および MAC で 0.85 以上であった。また、釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合は RX-DHL で 522/581(89.8%)、RX-MAC で 548/615(89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796(50.8%) であった。モヤシ検体での DHL および MAC の検出感度は、リアルタイム PCR 法よりも有意に低く、MAC は RX-DHL および RX-MAC より



も検出率が有意に低かった。鶏肉検体での DHL および MAC の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出感度が有意に低かった。

[ 3 ] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

供試菌株 159 株のうち、増菌培養法の検討では、mEC、NmEC、薬剤 AB-mEC および薬剤 AB-NmEC 中でそれぞれ 96.9%、79.9%、13.8%、6.3% の増殖が認められた。分離培養法の検討では、薬剤 C を添加した SMAC では、95.6% の株が生育良好であった。*astA* 保有大腸菌は、コンベンショナル PCR 法およびリアルタイム PCR 法ともに陽性であったが、*astA* 保有大腸菌以外の 30 菌株は、コンベンショナル PCR 法陰性であったが、7 株がリアルタイム PCR 法陽性となった。

( 2 ) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

[ 1 ] 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、194 株 ( 7.1% [194/2,970 株] ) において *astA* 遺伝子の保有が確認された。そのうち 5 株については RAPD 解析により同一株と判定し、以降の解析から除外した。

[ 2 ] 進化系統の異なる株のドラ

フトゲノム解析 multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

項目 ( 1 ) で同定した 189 株についての MLSA 解析結果から選定した 31 株についてドラフトゲノム解析を実施した。ゲノムサイズは約 4.7 -5.5 Mb ( 平均 5.1 Mb ) であった。

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

NCBI データベース上に登録されていたゲノム完全長配列大腸菌株 9,065 株のうち、*astA* 遺伝子保有株が 713 株 ( 7.9% ) 同定された。

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

742 株のゲノム配列情報から、既知の 8 種類を含む計 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。また、その局在はプラスミド上、染色体上と多様であった。株あたりのコピー数も 1 コピーから最大 10 コピーまで様々であった。

[ 5 ] *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

Roary による解析からコア遺伝子が 1,600 個同定され、アライメントの結果、informative SNP は 42,536 個同定された。その結果を

基に作成した系統樹から、下痢症患児由来株でドラフトゲノム解析を行った株が幅広い系統にまんべんなく分散し、系統間の偏りがないうことが明らかとなった。

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

EAEC の病原関連遺伝子についてその保有状況を調べた結果、多くは線毛と毒素を少なくとも1つずつ保有していることが分かった。しかしながら、ドラフトゲノム配列情報しかないため、当該遺伝子の局在に関して正確な情報を得ることは出来なかった。また、線毛に関しては、既知のものと同アミノ酸配列相同性が50-70%程度の遺伝子が3種類同定された。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

国内で分離された大腸菌（主としてEHEC）ゲノムを用いて *astA* の保有状況を調べた結果、供試菌株の約3%において同遺伝子の保有が認められた。血清型別にみると、026:H11 および 0115:H10 においてそれぞれ19.0%および34.5%と比較的高率に保有することが明らかとなった。*astA* 配列を解析したところ、新規に11種の変異型を同定し

た。*astA* 陽性株の病原性因子を検索したところ、大部分は志賀毒素遺伝子 (*stx*) を保有していたが、主要な細胞付着因子や他の毒素遺伝子等を保有しない株も多数認められた。*astA* 検出用プライマーを新たに設計し、*astA* 保有および非保有株で検証を行ったところ、それぞれ全て陽性および陰性の結果となった。

公共データベース上に存在する全ての大腸菌 07:H4 のゲノム情報を用いて、系統解析を行った結果、最近縁株は中東由来株であった。検出された SNP は20-23か所であり、直接的な関連性は示唆されなかった。

(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

[1] スクリーニング検査

汚染実態調査に使用した検体は、食肉77検体、野菜99検体、魚介類70検体、乾物5検体であった。この251検体中、何らかの病原遺伝子が陽性となったのは55検体(22%)であった。*astA* は55検体全てで陽性となった。*eae* は251検体中26検体(10%)、*stx2* は2検体(0.8%)、*eIt* は2検体(0.8%)、*estIa* は1検体(0.4%)がそれぞれ陽性となった。他の遺伝子は検出されなかった。

食肉では 77 検体中、43 検体がスクリーニング PCR 陽性となった。鶏肉では、31 検体全てで *astA* が陽性となった。内訳は *astA* 単独陽性が 8 検体、*astA* と *eae* が陽性になった検体が 21 検体、*astA* と *elt* が陽性となったのが 2 検体であった。ムネ肉における *eae* 陽性率は他の部位に比べて低い傾向が見られた。

豚肉では 22 検体中 6 検体が *astA* 陽性であった。この内、1 検体は同時に *eae* も陽性になった。*astA* 陽性 6 検体中 4 検体 (67%) がミンチ肉であった。

牛肉では 24 検体中 6 検体が *astA* 陽性となった。2 検体が *astA* 単独陽性、2 検体が *astA* と *eae* 陽性、1 検体が *astA*、*stx2*、*estIa* 陽性、1 検体が *ast*、*eae*、*stx2* が陽性であった。*astA* 陽性 6 検体中 4 検体は内臓肉、1 検体はタンであった。また、*stx2* が検出された 2 検体は内臓肉であった。

魚介類では 70 検体中 6 検体 (8.6%) が *astA* 陽性であった。エビは 10 検体中 4 検体 (40%)、サバは 2 検体中 1 検体 (50%)、スズキは 1 検体中 1 検体 (100%) が陽性であった。

野菜では 99 検体中 6 検体 (6.1%) が *astA* 陽性であった。この内、1

検体は *eae* も同時に陽性となった。オクラは 5 検体中 3 検体 (60%)、カイワレは 8 検体中 1 検体 (12.5%)、ほうれん草は 14 検体中 2 検体 (14%) が陽性となった。

乾物は 5 検体全てが陰性となった。

## [2] 菌分離

鶏肉からは 36 株が分離された。*astA* 単独保有株が 30 株、*astA*、*eae* 保有株が 2 株、*eae* 単独保有株が 2 株、*astA*、*estIa* 保有株が 1 株、*estIa* 単独保有株が 1 株分離された。また、*astA*、*eae* スクリーニング陽性検体から *astA*、*eae* 保有株と *eae* 単独保有株が同時に分離された。同様に *astA*、*estIa* スクリーニング陽性検体から、*astA*、*estIa* 保有株と *estIa* 単独保有株が同時に分離された。

豚肉ではスクリーニングで 6 検体が陽性であったが、菌株を分離することはできなかった。牛肉からは *astA*、*eae* 保有株を 1 株分離した。スクリーニングで認められた *stx2* 保有株は分離できなかった。魚介類および野菜からは *astA* 単独保有株をそれぞれ 3 株分離した。

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

[1] 大腸菌株のゲノム解析では、牛乳由来株と患者由来株の sequence type が一致し同一株であることが示されたが、既知報告の株には関連性の高い株は見つからなかった。病原遺伝子として、既知の病原大腸菌に特徴的な付着関連遺伝子や毒素遺伝子は検出されなかったが、多数の主要ではない病原遺伝子の保有が確認された。

[2] 培養細胞での感染実験では、細胞への付着性が認められたが、EAEC 特異的な凝集性の付着は認められず、また、侵入性も認められたが、*S. Typhimurium* のような強い細胞侵入性は認められなかった。

[3] 動物モデル試験では、マウス腹腔内投与試験によって、腸管毒素原性大腸菌よりも低い、病原性の知られていない大腸菌よりは高い致死性が認められた。また、コモンマーモセット経口投与では腸管定着性が認められた。

#### D. 考察

##### (1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

低菌数レベル接種 (6.7-7.6 cfu/25 g) の分離培養法では、本菌の分離が難しいことが判明した。

一方、高菌数接種 (> 37 cfu/25 g) であれば *E. albertii* がほぼ確実に分離可能であることが判明した。中菌数接種の条件で3種類の増菌培地を比較すると、分離陽性率が mEC で 82%以上、NmEC と薬剤 AB-mEC で 92%以上と優れていた。また、RX-DHL および RX-MAC において分離成績に大きな差は認められなかった。さらに、分離培養法よりもリアルタイム PCR 法の方が検出率が優れていたため、リアルタイム PCR 法にてスクリーニングし、PCR 陽性検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。これら結果を参照すると、次に検討する多機関でのコラボレイティブ・スタディでは、中菌数接種 (12.3-26.5 cfu/25 g 程度) を検体とし、上記のリアルタイム PCR 法および分離培地を使用することが適当であると判断された。

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

結果から、*E. albertii* が検体あたり 80 CFU 以上であれば食品から高率に検出が可能であることが判明した。約 18CFU でも、リアルタイム PCR 法で高率に検出されること、鶏肉では高率に分離も

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

### [3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通の 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。選択分離培養法の検討では、*astA* 保有大腸菌の多くが CT に感受性であったが、薬剤 C 添加 SMAC では 95.6% の株が生育したことから本菌の分離培養法として適していると考えられた。また、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たことから、新しい *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

が必要であることが、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ため、*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考えられた。今後、本研究課題の他研究分担者の研究結果も参考に、新規の遺伝子検出法について考察する必要がある。

### (2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

分離株およびゲノム配列登録株の解析から、大腸菌の約 7.5% (907/12,035 株) が *astA* 遺伝子を保有すること、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在し、その分布も染色体とプラスミドでバリエーションによる局在に差が見られないこと、コピー数も株により多様であることも明らかとなった。一方で、保有株は大腸菌進化系統の中で偏りがなく、多様な系統に分布していることから、全株に共通の因子を同定するのは困難と思われた。そのため、系統ごとに保存性の高い遺伝子を抽出し、それらの組み合わせを利用した検出系の構築を進める必要がある。EAEC に関しては、既知の病原関連因子と相同性を示す遺伝子を複数同定した。今後、これらの遺伝子

について新規病原関連遺伝子の可能性を含め、機能解析を進める予定である。

### (3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

国内で分離された大腸菌ゲノムの解析では、約3%で *astA* が認められた。同遺伝子は多くの場合、IS上に存在しており、多様な系統へ水平伝播していると考えられた。また、*astA* 配列には多型が認められ、今後これらの発現状況を明らかにする必要がある。

大規模食中毒由来大腸菌 07:H4の国際ゲノム比較では、比較的近縁な菌株が中東で見いだされた。直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

### (4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

今年度調査を行った251検体のうち、55検体で *astA* が検出され、*astA* が多くの大腸菌株で保有されている実態が明らかになった。特に鶏肉における *astA* 汚染率が高く、試験に供した31検体全てから *astA* が検出された。鶏肉も病原大腸菌による食中毒の原因食品になりうる可能性が示唆された。

豚肉では22検体中6検体で *astA* が検出された。このうち、4検体は

ミンチ肉であったことから、これらの汚染はミンチ肉の加工段階での汚染である可能性も示唆された。また牛肉では24検体中6検体がスクリーニング陽性となった。*astA* や *eae* 以外に *stx2*、*estIa* が検出され、今回の調査では最も多種類の病原遺伝子が検出された。6検体中4検体は内臓肉で、*astA*、*eae*、*stx2*、*estIa* が検出された。

魚介類では、エビの *astA* 陽性率が高かった。また、野菜では外国産のオクラの *astA* 陽性率が高かった。これらのことから、エビやオクラも大腸菌食中毒の原因食品となりうる可能性が示唆された。

以上、今回の結果から *astA* 保有大腸菌の汚染は、食肉、特に鶏肉において著しく認められた。また、陽性率は低いものの、野菜や魚介類においても *astA* 保有大腸菌の汚染が認められた。今後さらに調査を継続し、食品における病原大腸菌の汚染実態を明らかにしていきたい。

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

大腸菌株のゲノム解析によって、牛乳由来株および患者由来株は、1) 同一クローンであること、2) 典型的な病原性関連遺伝子は保有しないものの病原性を示唆する遺伝子

群を保有していること、3) 直接的な関連性はないものの EAEC と近縁であることが示された。培養細胞での感染実験によって、細胞接着性や細胞侵入性が観察されたが、明確な病原性を確認できなかった。しかし、動物モデル試験では、マウス腹腔内投与によって致死性が認められたことから、本菌が病原性を有する可能性が考えられた。また、コモンマーモセットでの腸管定着性が認められており、今後、下痢発症メカニズムの解明が必要と思われる。

#### E. 結論

分担研究(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立では、*E. albertii* 食品検査法を2段階に分けて検討したところ、優れた増菌培養法、リアルタイム PCR 法および分離培養法が示された。また、*astA* 保有大腸菌については、*astA* 保有大腸菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。分担研究(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、下痢症患者由来大腸菌の中から *astA* 陽性株を同定し、それらの株の一部についてドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBI データベース上の大腸菌株から *astA* 陽性株を同定し、ゲノム比較解析から 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。

分担研究(3) 病原大腸菌食中毒事例株の解析では、国内分離大腸菌等 3,613 株のゲノムから *astA* 保有株を検索した結果、様々な系統に属する約 3% の株で保有が認められた。また、大規模食中毒由来大腸菌の国際ゲノム比較を行った結果、近縁株は見出されなかった。分担研究(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、鶏肉は全検体で *astA* がスクリーニング PCR で陽性となった。他に牛肉、豚肉、エビ、オクラなどで *astA* が陽性になった。以上のように、*astA* 保有大腸菌および大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *E. albertii* の食品検査法に関して、培養法やリアルタイム PCR 法を検討し、また、リアルタイム PCR での新たな対象遺伝子の検索につながる研究や事例株の解析、食品での汚染状況の解明について各分担研究が連携をしながら実施した。

また、緊急的追加研究として、富山市大規模食中毒の原因物質として疑われる大腸菌 OUT(0gGp9):H18 の病原性に関する研究を行った結果、病原性を有する可能性が考えられた。このため、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT(0gGp9):H18 (疑い)」とすることが妥当と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表  
(誌上発表)

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

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

Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in retail

fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 62(3), 94-99, 2021.

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

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

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

(学会等発表)



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

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

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

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

和 3 年 10 月 26 日-11 月 9 日. オンライン

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況  
なし