

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

工藤 由起子

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

病原大腸菌の食品での検査法確立のために、大規模食中毒の発生している *astA* 保有大腸菌を対象に研究を実施した。[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討：既存のコンベンショナル PCR について食品培養液からの *astA* 検出性を検討し、Yamamoto らのプライマーセットと Quick Taq の組み合わせの系が判定が容易で、特異性および感度が優れることが示された。[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立：増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を組み合わせる本菌に適する効率的な検査法を検討し、mEC または NmEC での増菌培養、選択剤添加分離培地での分離培養によって *astA* 保有大腸菌接種食品（30 CFU 以上）全検体から本菌が分離されることが示された。[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発：食品の効率的な検査に貢献するリアルタイム PCR での対象遺伝子配列を検討し、プライマーセット、プローブを複数設計した。今後、特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。3つの研究によって以上の研究結果を得た。ヒトに病原性を示す *astA* 保有大腸菌の解明が求められているところだが、本研究では食中毒事例が発生した際に有用な検査法を示すことが重要と考える。

研究協力者

宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山谷聡子
埼玉県衛生研究所	土井りえ、貫洞里美
東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魅、齊木 大
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、湯澤栄子、荒木靖也
福井県衛生環境研究センター	横山孝治
姫路市環境衛生研究所	新免香織

(公社) 日本食品衛生協会
鹿児島大学
国立感染症研究所
国立医薬品食品衛生研究所

甲斐明美
大岡唯祐
伊豫田 淳、李 謙一
大西貴弘、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和 2 年には、給食センターで調理した学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等 3,453 人の患者をともなう *astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 ; EAST1 をコードする遺伝子) 保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が 100 人を超える事例も多く、食中毒予防対策が必要とされている。病原大腸菌による食中毒では、原因食品が不明であることが多く、喫食状況から特定の日時の食事などが原因として判明しても食品・食材が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等での検査法は国内外で確立されておらず、適切または効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数は低いとされており、培養時に食品由来微生物の増殖が食中毒細菌の増殖を抑制し、検出が困難なこと

が考えられるため、適切な検査法が原因食品究明には重要である。このため、本研究では増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして病原大腸菌の効率的かつ特異的な検査法を開発することを目的として、以下の 3 つの研究を実施した。[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討では、既存のコンベンショナル PCR について食品培養液からの *astA* 検出性を検討することとした。[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を組み合わせ本菌に適する効率的な検査法を検討することとした。[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、食品の効率的な検査に貢献するリアルタイム PCR での対象遺伝子配列を検討することとした。

B. 研究方法

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討
プライマーの検討では、ベビーコーンおよびオクラ各 25 g をノボビオシン加 mEC (NmEC) 中にて

42℃で培養した。各食品増菌培養液 0.1 mL から DNA を抽出し、4 種類 (Ito ら、Hidaka ら、Muller ら および Yamamoto ら) の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (以下、*astA*PCR) を試験した。

酵素の検討では、上記にて調製したオクラ培養液を Tryptic soy agar (TSA) およびクロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC) に画線し培養した。コロニー密集部から DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら) を AmpliTaq、Ex Taq および Quick Taq にて試験した。

次に、分担研究者の大西が昨年度報告したスクリーニング PCR 法にて *astA* 特異的バンドが確認された検体について、① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループおよび② *astA* 保有大腸菌分離陽性グループに分けた。食品培養液の抽出 DNA を *astA*PCR (Ito ら、Muller ら および Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。

特異性の検討では、*astA* 保有大腸菌を含む細菌 26 種 41 株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。感度の検討では、*astA* 保有大腸菌 4 株を TSB 中で培養した。食品 (豚肉、エビおよびベビーコーン) 検体 25 g を

modified EC 培地 (mEC) 225 mL 中で培養した。この食品培養液にて *astA* 保有大腸菌の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、DNA を抽出し、*astA* PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) に供試した。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

(1) 試験検体の *astA* 確認試験では、鶏肉ミンチ、豚肉スライス、豚肉ミンチ、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシの合計 36 食品 144 検体を供試した。検体 25 g 入りストマッカー袋を 20 袋 (検体 1~20) 用意した。4 袋は mEC 225 mL 中にて培養し、培養液各 0.1 mL から DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら、QuickTaq 使用) を実施した。

供試した 4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験を行なった。集団食中毒事例由来 *astA* 保有大腸菌 2 株および豚肉スライス、牛肉スライス、エビ、オクラ、キュウリおよびモヤシを供試した。菌株を TSB 中にて培養し、 10^{-7} 希釈液 0.1 mL を TSA に塗抹し、接種菌数を算出した。冷蔵保管していた検体 25 g 入りストマッカー袋 16 袋に各接種菌数レベル (低菌数接種 : 10

CFU、中菌数接種：50 CFU、高菌数接種：100 CFU)用希釈菌液 0.1 mL を接種した。各 8 袋に mEC および NmEC225 mL を加え培養した。DNA 抽出および *ast*PCR は (1) と同様に実施した。検体培養液を各 2 枚の薬剤 C を添加したソルビトールマッコニー寒天培地 (C-SMAC)、CHSTEC および薬剤 C を添加した CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、培養した。C-SMAC では赤色、その他は藤色のコロニーを最大 3 個選択し、CHSTEC に単離し藤色を呈したコロニーは熱抽出法にて DNA を抽出し、*ast*PCR を実施した。PCR 陽性コロニーを TSI 寒天培地 (TSI) および LIM 培地 (LIM) に接種、培養した。

(1) にて 4 検体のうち 1 検体以上が *ast*PCR 陽性の食品は、(3) *astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験を行った。鶏肉ミンチ、豚肉ミンチ、牛肉スライスおよびオクラを供試した。食品の増菌培養以降は (2) と同様に実施した。ただし、最大 10 個のコロニーを選択した。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌株 (14 株) のバリエーションの特定では、7 株は分担研究者の伊

豫田から配列が提供され、他 7 株は、国衛研にて試験した。菌株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、ライブラリーを調整し、MiniSeq にて配列取得した。分担研究者の大岡が解析した。また、*astA* の各種バリエーションリファレンス配列について、*astA* 遺伝子上流から下流までの領域を抜き出し、アライメントし、共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。また、大岡からバリエーション X は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、バリエーション X が検出対象から除外される候補も設計した。特異性試験では、各種食中毒細菌などの 26 菌種、32 株を供試した。これらは、腸管出血性大腸菌 ESC425 株や *Escherichia albertii* EA40 株が含まれた。菌株を TSB 中で培養し、DNA を抽出し、*ast*PCR (Yamamoto ら) を実施した。また、設計した Assay 1~11 のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR を実施した。さらに、ESC425 および EA40 の 2 株は遺伝子シーケンスにて配列決定しバリエーションを特定した。

C. 研究結果

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

プライマーの検討では、Yamamoto らの PCR 法は濃いバンドの検体または陰性検体のみであり、他の PCR 法は PCR 陽性検体の中に薄いバンドの検体も存在した。

酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められず、陽性コントロールの濃いバンドが確認されたが、他の酵素では非特異的反応や陽性コントロールのバンドが薄い場合が観察された。

① *astA* 保有大腸菌分離陰性のグループでは、Muller らと Ito らの PCR 法では薄いバンドの検体も存在したが、これらの検体は Yamamoto らの PCR 法ではバンドが確認されなかった。一方、② *astA* 保有大腸菌分離陽性のグループでは、全検体が全 PCR 法陽性となった。

特異性試験では、*astA* 保有大腸菌 11 株は *astA*PCR 陽性であり、その他の菌株は全て PCR 陰性であった。また、検出限界は 3.0~5.1 log CFU/mL であった。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

(1) 試験検体の *astA* 確認試験では、144 検体中 48 検体 (33.3%) が *astA* 陽性であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群 (7-18 CFU/ 25 g) では mEC で 67.5%、NmEC で 72.5% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く (50%)、mEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった (65%)。中菌数接種群 (30-93 CFU/25 g) では、mEC および NmEC とともに 100% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く (67.5%)、その他の組み合わせは約 100% であった。高菌数接種群 (105-307 CFU/25 g) では、いずれの増菌培地と分離培地の組み合わせも 100% であった。

(3) *astA* 陽性大腸菌自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、mEC で 52.1%、NmEC で 41.7% であった。増菌培地と分離培地の組み合わせは、NmEC 培養の C-CHSTEC が最も低く (27.1%)、mEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった (45.8%)。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

バリエーションの特定に供試した 14 株のうち、単一のバリエーションのみ

保有する株は 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、最も多くの株が prototype(4 株)を保有していた。バリエーション間でミスマッチが少ない *astA* 遺伝子の上流から下流までの領域に全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類およびバリエーション X 以外の全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 4 種類を設計した。特異性試験では、Yamamoto らのコンベンショナル PCR 法では、EA40 株のみ陽性であり、その他の株は全て陰性であった。一方、EA40 株は、設計した全 11 種類のリアルタイム PCR 法で陽性であり、ESC425 は全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセットでのみ陽性となった。その他、26 菌種 30 株はいずれの PCR 法でも陰性であった。遺伝子シーケンスでは、EA40 は prototype、ESC425 はバリエーション X と同定された。

D. 考察

astA 保有大腸菌のヒトに病原性を示す株と示さない株があることが考えられるが、本研究では食

中毒事例が発生した際に有用な検査法を示すことが重要と考える。また、他分担研究者による *astA* 保有大腸菌および関連の大腸菌の解析によって解明につながる知見が得られることが期待される。

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討
供試するプライマーによって検出結果が異なることが判明した。その理由として、供試した食品中の *astA* 遺伝子のバリエーションによって、PCR の検出性が異なる可能性や非特異的反応の可能性が考えられた。判定が容易であった Yamamoto らの PCR 法を用いて酵素を検討したところ、Quick Taq を使用した際に判定が容易であったため、Quick Taq を使用し改めてプライマーを検討したところ、*astA* 保有大腸菌が分離陰性の検体の中に Yamamoto らの PCR 法陰性の検体が存在し、この検体の他の PCR 法では結果が陽性であったため、Yamamoto らの PCR 法を用いることでバンドの薄い陽性検体数が減り、判定が容易になると考えられた。また、Yamamoto らの PCR 法の特異性および感度が優れることが示された。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

市販食品が *astA* 保有大腸菌に比較的高頻度に汚染されている可能性が示された。増菌培地については、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、低菌数接種群では mEC より NmEC がやや高い傾向であった。なお、中菌数接種群および高菌数接種群では、mEC および NmEC とともに 100%であった。以上から、mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であると考えられた。一方で、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験では、NmEC での増菌培養と C-SMAC での分離培養の組み合わせは、食品によっては、その他の組み合わせと比較してやや劣る結果が認められたことから、分離培地によっては *astA* 保有大腸菌の分離に適さない選択剤の組み合わせがあることが推測された。分離培地については、供試検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は C-SMAC よりも CHSTEC および C-CHSTEC で高い傾向であった。また、*astA* 保有大腸菌自然汚染検体での試験でも、概ね同様の傾向であった。以上から、*astA* 保有大腸菌の分離では、CHSTEC および C-CHSTEC が望ましいと考えられる。中菌数接種群および高菌数接種群では、*astA* 陽性

コロニーが分離された検体の割合は 100%であったため、30 CFU/25 g 以上の接種菌数であれば、本研究の一連試験法でほぼ確実に *astA* 保有大腸菌の分離が期待できることが示された。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

機能している *astA* を効率よく検出することが、食品から *astA* を検出する上で重要である。分担研究者の大岡からバリエーション X は *astA* として機能していないことが予想されるとの情報を得たため、*astA* の全バリエーションを検出する案およびバリエーション X 以外の全バリエーションを検出する案をそれぞれ複数設計した。今後、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の特異性を精査するためには、個々のバリエーションの代表株をシーケンスにより選出する必要がある。また、感度試験や食品への応用性についても検討を重ねる必要がある。さらに、*astA* は他の細菌種でも検出されるため、大腸菌の同時検出についても考慮したい。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において、Yamamoto らのプライマーセットを Quick Taq にて使用する

PCR 法が、PCR 産物の電気泳動による判定において陽性または陰性の判定が容易であり、特異性および感度に優れることが示されたため、その方法を用いて複数の自治体と食品検査法を検討したところ、*astA* 保有大腸菌を 30 CFU 以上を食品 25 g に接種し、mEC または NmEC にて増菌培養し、C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC にて分離培養する条件では、供試した全ての検体で *astA* 保有大腸菌が分離された。本研究での分離率の差を考慮すると、*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 mEC を優先して選択し、可能であれば NmEC の併用も考慮し、分離培地として CHSTEC および C-CHSTEC を選択することで分離効率が向上すると考えられる。今後さらに多機関にて検討を重ね、食品における *astA* 保有大腸菌検出法として今後提案したい。また、*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の候補を複数設計したため、今後特異性および感度を検討し、最も優れたものについて食品への応用性を評価する必要性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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

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

(学会等発表)

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

榊田希、尾畑浩魅、小西典子、土井りえ、新井沙倉、甲斐明美、廣瀬

- 昌平、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* 分離培養法の検討. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 山谷聡子、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、小嶋由香、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (1). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 柳本恵太、松永典久、小林章人、高橋直人、小嶋由香、床井由紀、山谷聡子、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価 (2). 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 廣瀬昌平、小西典子、佐藤実佳、鈴木恭平、尾畑浩魅、大塚佳代子、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 43 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 4 年 9 月 29-30 日. 東京
- 新井沙倉、小西典子、尾畑浩魅、工藤由起子. 野菜における腸管毒素原性大腸菌の検出と型別を目的としたリアルタイム PCR 法の検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小西典子、榊田希、新井沙倉、尾畑浩魅、土井りえ、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* の効率的な検出法に関する検討. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 小嶋由香、今野貴之、山中拓哉、床井由紀、柳本恵太、山谷聡子、高橋直人、小林章人、松永典久、齊木大、土井りえ、新井沙倉、廣瀬昌平、工藤由起子. *Escherichia albertii* の食品での試験法のコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会. 令和 4 年 11 月 10-11 日. 長崎
- 土井りえ、廣瀬昌平、小西典子、鈴木恭平、尾畑浩魅、佐藤実佳、後藤慶一、甲斐明美、新井沙倉、工藤由起子. 食品・環境検体中での *Escherichia albertii* の挙動解析. 第 118 回日本食品衛生学会

学術講演会． 令和 4 年 11 月 10-11 日． 長崎

工藤由起子、新井沙倉、廣瀬昌平．
新興食中毒細菌 *Escherichia albertii*． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

廣瀬昌平、中村由紀子、新井沙倉、
工藤由起子． 食品中の *Escherichia albertii* を検出するための選択増菌培地の開発． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

新井沙倉、高橋直人、床井由紀、小林章人、松永典久、山中拓哉、今野貴之、土井りえ、齊木大、山谷聡子、小嶋由香、柳本恵太、廣瀬昌平、工藤由起子． 食品における *Escherichia albertii* 検出法のコラボレイティブスタディによる評価． 第 96 回日本細菌学会総会． 令和 5 年 3 月 16-18 日． 兵庫

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし