

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

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を中心に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、*astA*保有大腸菌の食品検査法について、食品培養液からの*astA*検出性に優れる既存のコンベンショナルPCRを明らかにし、それを増菌培養法および分離培養法と組み合わせて多種類の食品にて有用な方法を検討した。また、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検出系を複数設計した（2）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、35種類の遺伝子バリエーション（V1-V35）について、①保有株数の多い主要なバリエーションの種類、②欠損して機能しないと思われるバリエーション、③各バリエーションの局在や株あたりのコピー数、④大腸菌進化系統における*astA*遺伝子保有株の分布、⑤各バリエーションをコードする挿入配列IS1414の構造などが明らかとなった。（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、EAST1の発現解析として、ウェスタンブロットティングによる検出手法を確立し、有症例由来大腸菌においてEAST1ペプチドの発現を確認した。培養細胞感染試験では、O166:H15およびOgGp9:H18において細胞接着性が認められた。全ゲノム配列解析では、有症事例株間の関連性は見出されず、*astA*陽性大腸菌は系統的に多様であることが判明した。（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食品での汚染実態調査を行った結果、鶏肉、豚内臓肉、輸入オクラ、輸入ベビーコーンで*astA*保有大腸菌の汚染が強く認められ、これらの食品が食中毒予防のための最重要食品になると思われる。また、（5）緊急的追加研究として、令和3年6月に富山市内小学校等給食で提供された牛乳による大規模食中毒の原因物質が「病原大腸菌OUT(OgGp9):H18（疑い）」とされたが、本菌の病原性について引き続き検討を行った。

研究協力者

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
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
(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、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。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。これらの研究について、分担研究（１）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立、（２）病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析、（３）病原大腸菌食中毒事例株の解析、（４）食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法にて実施する。

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 (OgGp9):H18 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の究明についての研究を令和３年度に緊急的追加研究として開始し、令和４年度も継続して実施した。

B. 研究方法

（１）病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討

２種類の食品のノボビオシン加 mEC (NmEC) 増菌培養液から DNA を抽出し、４種類 (Yamamoto ら、他) の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (以下、*astA*PCR) を試験しプライマーを検討した。次に、上記の食品培養液を各種分離培地に画線して得たコロニーから DNA を抽出し、*astA*PCR (Yamamoto ら) を Quick Taq 等の３種類の酵素にて試験した。また、分担研究者の大西の試験にて *astA* 特異的バンドが確認された食品検体について、① *astA* 保有大腸菌分離陰性グループおよび② 分離陽性グループに分け、*astA*PCR (Yamamoto ら、他) に供試した。さらに、*astA* 保有大腸菌を含む細菌 26 種 41 株の *astA*PCR (Yamamoto ら、Quick Taq 使用) における特異性および食品を用いた感度を試験した。

[2] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

試験検体の *astA* 確認試験では、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 (=20 検体) 用意し、4 検体は mEC 中にて培養し、抽出 DNA を *astA*PCR (Yamamoto ら、QuickTaq 使用) に供試した。4 検体ともに *astA*PCR 陰性の食品は、残りの 16 検体について、添加回収試験を行ない、1 検

体以上が *astA*PCR 陽性の食品は、自然汚染検体での試験を行った。添加回収試験では、*astA* 保有大腸菌（2 株）を各接種菌数レベル（低菌数接種：10 CFU、中菌数接種：50 CFU、高菌数接種：100 CFU）に調製し、16 検体へ接種した。各 8 検体を mEC および NmEC 中で培養し、*astA*PCR を実施した。検体培養液を薬剤 C 添加ソルビトールマッコニキー寒天培地（C-SMAC）、クロモアガー基礎培地（CHSTEC）および薬剤 C 添加 CHSTEC（C-CHSTEC）に画線し、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 *astA*PCR を実施した。自然汚染試験では、*astA* 保有大腸菌を添加せずに上記の試験を実施し、各条件につき最大 10 個のコロニーを試験した。

[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* 保有大腸菌株の *astA* の遺伝子多型（バリエーション）を特定した。7 株は分担研究者の伊豫田から配列が提供され、他 7 株は国衛研にて取得した配列を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の共通配列にプライマーおよびプローブ候補を設計した。その際、大岡

からバリエーション 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。設計した候補について、腸管出血性大腸菌 ESC425 株や *Escherichia albertii* EA40 株を含む 26 菌種、32 株の特異性を試験した。また、シーケンスにより ESC425 および EA40 の *astA* バリエーションを特定した。

(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] 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

昨年度、ドラフトゲノム配列を取得した下痢症患者由来大腸菌株 31 株について、MinION を用いた完全長ゲノム配列の取得を行った。

[2] 同定した *astA* 遺伝子保有株（鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 744 株）に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

項目（1）で得られたゲノム配列を元に、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの配列比較を行い、それらのゲノム上での局在・コピー数など詳細な解析を行った。

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

計 744 株についてコア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行い、同定された *astA* 遺伝子バリエントを系統樹上にマップし、系統と分布の関連を解析した。

[4] 異なる系統に存在する同一 *astA* 遺伝子バリエント周辺のゲノム構造比較

異なる系統に同一バリエントがあり、その局在がプラスミドであったものについて、プラスミド構造を比較し、同一プラスミドによる水平伝播の可能性を検証した。

[5] 主要 *astA* 遺伝子バリエントの機能解析

主要な *astA* 遺伝子バリエントである prototype, V6, VX, V27 に関する機能解析のため、発現制御可能な発現ベクター pTEBA (BioDynamics Laboratory Inc.) にクローニングした。

[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

[1] EAST1 発現解析

EAST1 の発現解析を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングによって行った。供試菌株として、食中毒由来 *astA* 陽性大腸菌を主とした、5 血清型 (07:H4, 166:H15, 169:H45, 0gGp7:H6, 0gGp9:H18) 計 7 株を用いた。

[2] 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

培養細胞を使用して細胞侵入性、細胞傷害性および細胞接着性の解析を行った。対象株は上記 1 と同じ *astA* 陽性大腸菌を使用した。

[3] ゲノム解析

過去に発生した食中毒事例株を中心に 11 種類の血清型の *astA* 陽性大腸菌について全ゲノム配列解析を解読した。得られたデータから、系統解析および保有する遺伝子の網羅的な検出を行った。

(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法に関する研究

[1] 検体

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

[2] 検査手順

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。

[3] 0 遺伝子型別

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

(5) 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

本食中毒で原因食品である牛乳および患者便から分離された大腸菌 OUT(0gGp9):H18 の完全長ゲノムの取得および詳細なゲノム解析、患者便メタゲノム解析等を行った。

C. 研究結果

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

[1] *astA* 特異的 PCR 法の検討
プライマーの検討では、Yamamoto らの PCR 法で陽性または

陰性の判定が容易であった。酵素の検討では、Quick Taq を用いた場合に非特異的反応が認められなかった。① *astA* 保有大腸菌分離陰性のグループでは、Yamamoto らの PCR 法では判定が容易であり、② 分離陽性のグループでは、全検体が全 PCR 法陽性であった。特異性試験では、*astA* 保有大腸菌 11 株のみ *astA*PCR 陽性であった。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

試験検体の *astA* 確認試験では、48/144 検体 (33.3%) が *astA* 陽性であった。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%、中菌数接種群 (30-93 CFU/25 g) および高菌数接種群 (105-307 CFU/25 g) では、mEC および NmEC とともに 100% であった。NmEC 培養の C-SMAC の組み合わせの分離陽性率が他の組み合わせよりも低かった。自然汚染検体での試験では、mEC で 41/48 検体、NmEC で 36/48 検体が *astA* 陽性であった。

[3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

単一のバリエーションのみ保有する株は 14 株中 6 株、2 種類のバリエーションを保有する株は 7 株、3 種類のバリエーションを保有する株は 1 株であり、最も多くの株が prototype (4 株) を保有していた。全 *astA* バリエーションの検出を目的としたプライマーおよびプローブセット 7 種類およびバリエーション 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、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。

(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] 鹿児島大保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

解析した 31 株中 18 株の完全長ゲノム配列を取得することができた。

[2] 同定した *astA* 遺伝子保有株 (鹿児島株 31 株と公共 DB 由来 713 株、計 744 株) に関する 35 種

類の *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

35 種類の遺伝子バリエーション (V1-V35) について、詳細な配列解析を実施した。その結果、①保有株数の多い主要なバリエーションが 5 種類 (V22、prototype、V6、V27、V12、V7) であること、②V7、V15、V22、V33 は欠損していること、③各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤ほとんどの大腸菌進化系統に *astA* 遺伝子保有株が存在すること、⑥prototype、V2、V7、V31、V32 をコードする挿入配列 IS1414 はだけが intact な構造であることが明らかとなった。

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

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

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

異なる系統に同一の *astA* 遺伝子バリエーションが検出され、当該バリエーションがプラスミド上にコードされている場合、プラスミドを介した水平伝播が想定されるため、該当株のプラスミド構造を比較した。その結果、系統の近い株ではプラスミド構造が類似していたが、系統の遠い株間ではプラスミド構造の類似性が部分的にのみ同定された。

[5] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析

35種類の *astA* 遺伝子バリエーションがコードするアミノ酸配列を比較した結果、prototype を含む7種類は同じ配列であったが、それ以外は配列多様性を認めた(図7)。このことから、集団感染事例由来株で保有頻度が高い、また、全株の中でも比較的保有頻度の高い prototype, V6, V27 に焦点を当て、その病原性を検討するため、T7 誘導性発現プラスミドである pETBA ベクターにクローニングした。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

[1] EAST1 発現解析

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

近でシグナルが確認された。

[2] 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

行った試験条件では、細胞侵入性および細胞傷害性は認められなかった。細胞接着性試験では 0166:H15 または 0gGp9:H18 が CHO および INT407 細胞へ接着することが確認された。07:H4 および 0169:H45 ではいずれの細胞においても細胞接着性は認められなかった。

[3] ゲノム解析

系統解析の結果、9 件の事例から分離された 26 株は 6 種の Phylogenetic group(A, B1, B2, F, D, E) に分類され、いずれも事例間の関連性は低いことが示唆された。また相模原市の食中毒疑い事例で分離された 9 株については 4 種の Phylogenetic group (A, B1, B2, F) に分類された。

(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] 輸入野菜における汚染

調査に用いた生野菜は 24 種類、211 検体、冷凍野菜は、16 種類、41 検体であった。冷凍野菜では全ての検体がスクリーニング陰性となった。

ベビーコーンは 29 検体中、スクリーニングで陽性になったのは

19 検体 (41%) で、4 検体 (14%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*bfpB*、*stx₂* であった。分離株からは *astA* だけが分離された。

オクラは 36 検体中、スクリーニングで陽性になったのは 11 検体で、5 検体 (14%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝は *astA*、*estIa* であった。

豚内臓肉は 40 検体中、スクリーニングで陽性になったのは 29 検体 (73%) で、21 検体 (53%) から菌分離を行うことができた。検出された病原遺伝子は *astA*、*eae*、*stx₂* などであった。*astA* と *eae* が同時に陽性になる検体が多く認められた。しかし、分離された菌株は全て *astA* 単独で保有しているものだけだった。

[2] 分離菌株の 0 遺伝子型別

2021 年度および 2022 年度の汚染実態調査から、牛由来 11 株、鶏肉由来 51 株、豚肉由来 36 株、野菜由来 16 株、魚由来 6 株、計 120 株が分離された。分離された型別は合計 65 種類あった。最も多かったのが、型別不能で 17 株 (14.3%)、次いで、0g8 が 8 株 (6.7%)、0g88 が 7 株 (5.8%)、0gGp9 が 4 株 (3.3%) と多く分離された。

鶏肉からは、51 株が分離された。

最も多かったのが型別不能で 8 株 (15.7%)、次いで 0g88 が 3 株 (5.9%) 分離された。

豚肉からは 36 株が分離された。最も多かったのが型別不能で 5 株 (13.9%) であった。次いで 0g88 および 0g8 がそれぞれ 4 株 (11.1%) で、0gGp15 は 3 株 (8.3%) 分離された。0g15 および 0g71 は 2 株 (5.6%) ずつ分離された。このうち、0gGp15 および 0g71 は本調査では豚肉からのみ分離された。

野菜からは 16 株が分離された (表 16)。最も多かったのが型別不能で 3 株 (18.8%) であった。また、0gGp9 は 2 株分離された。

魚からは 5 株が分離された (表 17)。0gGp12 は 2 株 (33.3%) 分離され、魚からのみ分離された。(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

得られた結果については、別途報告する。

D. 考察

(1) 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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、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。

[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っていた理由として、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は優れていた。

[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。添加回収試験の増菌培地については、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

ため、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。分離培地については、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は C-SMAC よりも CHSTEC および C-CHSTEC で高い傾向であったため、*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。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。*astA* の全バリエーションを検出する案および *astA* として機能していないことが予想されるバリエーション 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、さらなる特異性試験、感度試験などの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。

(2) 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

本年度実施した 35 種類の遺伝子バリエーションの詳細な解析から、①

主要なバリエーションは V22、prototype、V6、V27、V12、V7 であること、②バリエーション V7、V15、V22、V33 は欠損していること、③各バリエーションの局在は prototype を除き、プラスミドあるいは染色体のいずれかであること、④ prototype を除いて、1 株あたりにマルチコピー存在するバリエーションはほとんどないこと、⑤ほとんどの大腸菌系統に *astA* 遺伝子保有株が存在することが明らかになった。これらのことから、*astA* 遺伝子を保有する株を特異的に検出する疫学マーカーとなる遺伝子を同定するのは困難であること、現在用いられている PCR 等の検査法では、臨床的に重要なバリエーションを識別出来ないことが示唆された。また、⑥prototype、V2、V7、V31、V32 をコードする挿入配列 IS1414 以外は欠損しており、転移出来ないことが判明した。今後は、構造的に intact なバリエーションの中で高い保有率を示す prototype など主要なバリエーションを中心とした機能解析をすすめ、臨床的に重要なバリエーションを特異的に検出できる検出系の構築を行う必要がある。

(3) 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 陽性大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。また、培養細胞への感染実験では、0166:H15 と 0gGp9:H18 において、培養細胞への接着性を明らかにした。*astA* 陽性大腸菌の系統解析からは、事例間の関連性は低く、様々な系統の菌が有症例に関与していることが示唆された。相模原市の食中毒疑い事例では、健常者や食品からも種々の *astA* 陽性大腸菌が分離されたことから、同菌は広く分布することが示唆された。

(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

輸入野菜の調査から、ベビーコーンとオクラにおける *astA* 陽性率が高いことが明らかになった。特にベビーコーンではスクリーニング検査での陽性率が 40% を超えており、重度の汚染が示唆された。ベビーコーン、オクラの産地は主にタイとフィリピンであったが、産地の衛生状態と関連しているかどうかは明らかにできなかった。また、ベビーコーンやオクラではほとんど分離株を得ることができなかったが、豚内臓肉では 53% の検体から、分離株を得ることができた。このことから、

豚内臓肉を汚染している *astA* 保有株の菌量は、野菜のそれより多いことが示唆された。

これまでの調査から、鶏肉、豚内臓肉、オクラやベビーコーンなどで *astA* 保有株の汚染が強く認められた。しかしながら、これらの食品を原因とする *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はあまり発生していない。今後、*astA* の機能を明らかにし、食中毒発生における *astA* の役割を明らかにしていく必要があると考えられた。

2年間の汚染実態調査で得られた分離株の 0 遺伝子型別を行ったが、非常に多くの型に分かれ、特定の傾向は認められなかった。この結果から、*astA* をはじめとする病原遺伝子の保有状況と特定の 0 遺伝子型との関連性は認められなかった。0g8 や 0g88 は以前から報告されているとおり、豚肉や鶏肉で多く認められた。また、鶏肉、豚肉などでは、それぞれの食品だけから複数分離されてる 0g 型が存在する。これらのことから 0g 型は、特定の病原遺伝子との関連よりも、汚染している食品の種類により依存している可能性が示唆された。

(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

結果と合わせて、別途報告する。

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、Yamamotoらの *astA* 特異的 PCR 法プライマーセットを Quick Taq にて使用するが結果判定が容易であり、特異性および感度に優れることが示された。この方法を用いて食品検査法を検討したところ、*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た。また、開発した *astA* 特異的リアルタイム PCR 法候補については、食品への応用性の検討が必要と考えられた。分担研究(2)病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析では、*astA* 遺伝子陽性大腸菌に関して、全ゲノム情報を基に、保存性が高く検出指標に適した病原関連遺伝子の同定を目指して解析を進めた。今年度は、昨年度に同定した 35 種類の *astA* 遺伝子バリエーションに関する特性解明を中心に解析を実施し、その結果、重要なバリエーションを同定した。次年度は

これら *astA* 遺伝子の高発現株を用いて、その病原機構への関与について機能解析を行い、その研究成果を学会および国際雑誌等で報告することを目指す。分担研究（3）病原大腸菌食中毒事例株の解析では、全ゲノム配列解析によって、*astA* 陽性大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。本年度に確立した EAST1 検出手法や培養細胞接着性試験等を用いて、同菌の病原性に関わる因子をより詳細に検討する必要がある。分担研究（4）食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、2年間の汚染実態調査から *astA* 大腸菌の汚染は、鶏肉、豚内臓肉、輸入オクラ、輸入ベビーコーンで強く認められた。*astA* 保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品は食中毒予防のための最重要食品になると思われる。一方で、*astA* の食中毒への関与には、不明な点が多く残されている。今後、研究が進み *astA* の機能が明らかになることを期待したい。2年間の汚染実態調査から得られた分離株の 0 遺伝子型と特定の病原遺伝子保有状況との間に関連性は認められなかった。0 遺伝子型は汚染している食品の種類により依存している可能性が示唆された。

また、緊急的追加研究として、富

山市大規模食中毒の原因物質が「大腸菌 OUT(0gGp9):H18(疑い)」とされたが、本菌の病原性について引き続き検討を行った。

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.

廣瀬昌平、大屋賢司、吉成知也、大西貴弘、工藤由起子、水上克己、鈴木富勝、瀧波賢治、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏、八幡裕一郎、

土橋酉紀、砂川富正．富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査．病原微生物検出情報．43(10)，15-16，2022．

(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

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし