

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5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* 保有大腸菌の性状等の解析：*astA* のバリエーションの多様性を解析した。また、*astA* 保有であるが大腸菌以外の細菌の同定と既存の PCR 法での検出性を検討した。[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、*astA* のバリエーションのうち完全な配列を有するものを対象としたリアルタイム PCR を開発した。[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、昨年度の補足として一部検体を用いて増菌培養法、分離培養法を総合して評価した。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、これらの3つの研究では食中毒事例が発生した際に有用な検査法につながる重要な成果が得られたと考える。また、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の特定に必要な検査法について [4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法では、既存の通知法記載の試薬や機器の変更の必要性について検討した。

研究協力者

宮城県保健環境センター

山口友美、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
鹿児島大学
国立医薬品食品衛生研究所

小嶋由香、荒木靖也
大岡唯祐
大西貴弘、大屋賢司、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、分離培養法について昨年度まで取り組んできたが、今年度は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* 保有大腸菌の性状等の解析では、*astA* のバリエーションの多様性を解析した。また、*astA* 保有であるが大腸菌以外の細菌の同定と既存の PCR 法での検出性を検討した。[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発では、*astA* のバリエーションのうち完全な配列を有するものを対象としたリアルタイム PCR を開発した。[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立では、昨年度の補足として一部検体を用いて増菌培養法、分離培養法を総合して評価した。

また、腸管出血性大腸菌食中毒の原因食品の特定に必要な検査法について [4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法では、既存の通知法記載の試薬や機器の変更の必要性について検討した。

B. 研究方法

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

菌種未同定の *astA* 保有細菌 80 株を Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) に よって菌種同定した。次に、213 株の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプを特定するため、既報の *astA* のシーケンス用プライマーを活用して配列を決定し、35 種類の *astA* リファレンス配列と比較した。同 *astA* 保有大腸菌について、4 つの既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性を比較した。また、MALDI-TOF MS において大腸菌以外の細菌と同定された菌株についても *astA* バリエーションタイプの特定および既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性を試験した。さらに、*astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討のために、各種 β ラクタム系薬剤や薬剤 C を組み合わせて添加した 10 種類のクロモアガー STEC 培地 (CHSTEC) を調製し、集団食中毒事例由来株コロニー生育を確認した。

[2] *astA* 特異的リアルタイム

PCR 法の開発

昨年度作製した v22 以外の *astA* バリエーション特異的なプライマーおよびプローブセット候補 (Assay 7、Assay 8、Assay 10 および Assay 11) 4 種類を基本として、v7、v15 および v33 の配列を非検出にするためにプローブの配列を修正 (Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r) した。次に、代表 *astA* バリエーションタイプとして 7、v29 および v34 保有大腸菌株における検出性を試験し、4 つの Assay のうち増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を以降の検討に用いた。また、*astA* 保有大腸菌 213 株および *astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌 (*Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella oxytoca*) を供試し、選定された Assay とインターナルコントロール (IC) を組み合わせたリアルタイム PCR 法の特異性を試験した。さらに、感度試験では、集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌 4 株を用いて菌株のみにて試験した場合の検出限界と食品 (豚肉スライス、エビおよびベビーコーン) 培養液にて菌株を希釈した場合の検出限界をそれぞれ求めた。

[3] *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、モヤシ 3 食品の検体 25 g 入りストッカー袋を 20 袋用意した。4 袋について mEC 中にて増菌培養後に Yamamoto らの *astA* 特異的 PCR 法 (*astA*PCR) 陰性を確認した。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、16 検体に中菌数 (約 50 CFU) および高菌数 (約 100 CFU) に希釈した集団食中毒事例由来株菌液を接種した。各 8 袋に mEC および NmEC 225 mL を加え培養し、*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ンキー寒天培地 (C-SMAC)、CHSTEC および薬剤 C 添加 CHSTEC (C-CHSTEC) に画線し、大腸菌様コロニーを最大 3 個選択し *astA*PCR を実施した。

(3) 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、(2) のモヤシ培養液をセフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC、セフィキシムおよびセフスロジン添加 CHSTEC に画線し、培養した。培養後の生育コロニーの色や生育状態を確認し、(2) と同様に *astA* 保有大腸菌を分離した。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、集団食中毒事例由来株 2 株の培養液を *astA* 陰性の各種食品 mEC 培養液にて 10 倍階段希釈し、菌接種食品培養液を調製し、Assay 11r に供試した。各菌接種食品培養液に添加した菌数と得られた Ct 値から検量線を作製した。令和 4-5 年度に抽出した DNA について上記にて作製の検量線を用いて各培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。

(5) 自然汚染検体からの *astA* 保有細菌の分離株の遺伝子性状解析では、令和 4 年度に各種食品から分離された *astA* 保有細菌 165 株について MALDI-TOF MS および O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析を実施し代表株を選定した。次に、代表株の各種病原因子を検出し、保有する *astA* バリエーションを特定した。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法記載の遺伝子検出法、培養法およびその他試薬やメーカー名等について、通知法に記載されている内容が現在も入手可能であるか、また後継品が販売されているかを調査した。

C. 研究結果

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

MALDI-TOF MS 供試菌株のうち 5 株を除く 75 株は大腸菌と同定され、各 1 株は *M. morganii* および *K. pneumoniae*、3 株は最も一致率が高い菌種としては *K. oxytoca* と同定された。*astA* 保有大腸菌では、少なくとも 13 タイプの *astA* バリエーションが確認され、一部の株は、複数のバリエーションタイプ保有株、PCR プライマーにて増幅されない株または新たなバリエーション保有株であった。次に、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での *astA* 保有大腸菌の検出性を比較したところ、いずれも供試した 4 つの PCR 法陽性であったが、Yamamoto らの PCR 法では v27 保有の 5 株はバンドが薄かった。一方、*astA* 保有大腸菌以外の細菌では、*M. morganii* は複数のバリエーションタイプを保有しており、*K. pneumoniae* は PCR プライマーにて増幅されず、*K. oxytoca* は複数のバリエーションタイプ保有株または新たなバリエーション保有株であった。また、*M. morganii* は 4 つ PCR 法のいずれも陽性であったが、他 4 株はいずれかの PCR 法で陰性またはバンドが薄い結果であっ

た。*astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、セフィキシム添加 CHSTEC、セフスロジン添加 CHSTEC およびセフィキシムおよびセフスロジン添加 CHSTEC では、供試菌株のいずれもコロニーを形成し、CHSTEC と同様のコロニー色を示した。薬剤 C 添加培地では、いずれの培地も *astA* 保有大腸菌のコロニー生育が抑制された。

[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

Assay 7r、Assay 8r、Assay 10r および Assay 11r のいずれにおいても、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 保有株は陰性であった。一方、Assay 8r および Assay 11r では、v29 保有株および v34 保有株が同程度の Ct 値を示したが、Assay 7r および Assay 10r では、v29 保有株の Ct 値と v34 保有株の Ct 値とに大きな差が認められたため、Assay 7r および Assay 10r は検出性が劣ると考えられた。Assay 8r および Assay 11r のうち新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。特異性試験に供試した *astA* 保有大腸菌 213 株中 211 株は Assay 11r において *astA* および IC が増幅されたが、v7 保有の 2 株は IC が増幅されるも *astA*

が増幅されなかった。また、その他の *astA* 保有細菌では、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* はいずれも IC が増幅されるも *astA* が増幅されなかった。また、*M. morgani* は、*astA* が増幅されるも IC は増幅されなかった。感度試験では、菌株のみを用いた場合、いずれの菌株でも検出限界が $< 2.2 \log \text{CFU/mL}$ であり、検量線の近似曲線は、 $R^2=0.99$ であった。一方、食品を用いた場合は、いずれの食品でも検出限界が $< 2.6 \log \text{CFU/mL}$ であり、検量線の近似曲線は、 $R^2>0.98$ であった。

[3] *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、全モヤシ検体が *astA* 陰性であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC で同等もしくは mEC で高く、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が低く、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が高かった。

(3) 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討では、供試した 3 種類の選択分離培地は *astA* 保有大腸菌以外の青色コロニ

一の生育を抑制しなかった。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた菌数推定では、*astA* 保有大腸菌の菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映していた。各培養液の平均菌数は、定性試験で *astA* 陽性の培養液のうち、*astA* 保有大腸菌が分離された培養液および分離されなかった培養液でそれぞれ約 $6 \log \text{CFU/mL}$ および約 $8 \log \text{CFU/mL}$ であった。

(5) 自然汚染検体からの *astA* 保有細菌の分離株の遺伝子性状解析では、全て大腸菌と同定された。mEC 由来株と NmEC 由来株で同一の 0 抗原遺伝子型の株が分離された食品と、mEC 由来株と NmEC 由来株で異なる 0 抗原遺伝子型の株が分離された食品が確認された。特に、鶏肉ミンチ由来株は多様な 0 抗原遺伝子型で構成されており、2020 年姫路市食中毒事例株と同じ 0gGP9:Hg18 に該当するものもあった。また、代表株はいずれも *astA* 単独保有株であり、8 種類の *astA* バリエントを単独保有あるいは複数のバリエントを同時保有していた。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

DNA 抽出キットおよびリアルタ

イム PCR 法および Loop-mediated isothermal amplification 法のいずれも通知法に記載のキットが現状でも販売されていることを確認した。また、通知法に記載されているタカラバイオおよび Applied Biosystems のリアルタイム PCR 機器に後継機が販売されていることを確認した。通知法に記載されている Loopamp リアルタイム濁度測定機器のうち現状販売されている機器は LoopampEXIA のみであった。増菌用培地である mEC の販売元として通知法に記載されているメルクは、その後販売を終了しており、通知法記載の XM-EHEC 寒天培地は、名称変更されていた。さらに、一部の製造販売元名や試薬は名称変更されていたことを確認した。

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。昨年度に既存の PCR 法のうち比較的優れる方法が明らかになったが、今年度の検討では特異性など十分ではないことが明らかになり、今年度開発したリアルタ

イム PCR の有用性が高いと考えられた。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。腸管出血性大腸菌の食品での検査法については、今後、見直しが必要であることが判明した。

[1] *astA* 保有細菌の性状等の解析

既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では一部の *astA* 保有大腸菌は検出されない、またはバンドが薄く検出性が低いことが本研究にて示された。一方、*Klebsiella* 属細菌や *Morganella* 属細菌の一部も既報の *astA* 特異的遺伝子検出法のいずれかでは陽性となることが示されたため、*astA* 保有大腸菌特異的な遺伝子検出法の開発が重要と考えられた。

[2] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

本研究にて開発した Assay 11r では、配列上不完全な *astA* バリエーションタイプである v7 および *K. pneumoniae* および *K. oxytoca* が保有する *astA* が増幅されないことが示された。一方、*M. morganii* は、Assay 11r にて *astA* が増幅さ

れるも IC は増幅されなかったため、Assay 11r において *astA* および IC の両方が増幅される場合を *astA* 保有大腸菌陽性と判定することが適していると考えられた。感度試験では、菌株のみを用いた場合と食品を用いた場合の両方で検出限界が $< 2.6 \log \text{CFU/mL}$ であるため検出性に優れることが示され、かつ、検量線の近似曲線は、 $R^2 > 0.98$ と高い直線性を示すことため、定量性にも優れることが示された。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

モヤシからの *astA* 保有大腸菌の検出には、mEC および CHSTEC あるいは C-CHSTEC の組み合わせが適していると考えられた。選択分離培地への選択剤として、セフィキシムおよびセフスロジン添加培地を検討したが、今回試験したモヤシではこれら薬剤の顕著な有用性は認められなかった。リアルタイム PCR での推定菌数は、概ね接種菌数および分離結果を反映した菌数を示し、*astA* 保有大腸菌の分離のためには、増菌培養液中に $\log 8 \text{CFU/mL}$ 程度の菌数が必要と示唆された。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の 0 抗原遺伝子型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、食中毒事例の原因物質調査において *astA* 保有大腸菌を疑う場合は、増菌培地として mEC および NmEC を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

[4] 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手困難となっている現状が明らかとなった。また、通知法では遺伝子検出法の検出限界を $4 \log \text{CFU/mL}$ 以上と示されている。今後は、現状販売されているリアルタイム PCR 法の後継機器を用いて、各種遺伝子検出法の検出限界が定められた値を満たしているかを確認する必要があると思われた。

E. 結論

様々な夾雑菌が存在する食品において *astA* 保有大腸菌を特異的に検出するためには、本研究にて検討した既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では特異性が低いことが示された。そこで、大腸菌が保有する配列上完全な *astA* バリエーションタイプを特異的

に増幅するリアルタイム PCR 法を開発した。*astA* 保有大腸菌を特異的かつ高感度に検出する本リアルタイム PCR 法は、多様な夾雑菌を含む食品での検査において、*astA* 保有大腸菌汚染食品の検知と分離株の *astA* 保有確認への活用には有用と考えられた。

また、*astA* 保有大腸菌の増菌培地として mEC および NmEC が有用であることが示唆された。一部の食品では、NmEC よりも mEC が望ましいが、増菌培地ごとに増殖しやすい菌株の存在が示唆されたことから、*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、mEC および NmEC を併用することで *astA* 保有大腸菌をより効率に分離が可能であると考えられた。

さらに、腸管出血性大腸菌の本研究にて、通知法記載の機器や試薬等の一部がすでに入手できない状況にあるため、食品衛生検査の現場での活用性を向上すべく、現状に即した通知法改定案を作成する必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Konishi, N., Sato, M., Suzumura, K., Obata, H., Otsuka, K., Doi, R., Goto, K., Kai, A., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Growth and survival of *Escherichia albertii* in food and environmental water at various temperature. *Journal of food protection* 87(4), 100249, 2024.

Arai, S., Hirose, S., Yanagimoto, K., Kojima, Y., Yamaya, S., Yamanaka, T., Matsunaga, N., Kobayashi, A., Takahashi, N., Konno, T., Tokoi, Y., Sakakida, N., Konishi, N., and Hara-Kudo, Y. An interlaboratory study on the detection method for *Escherichia albertii* in food using real time PCR assay and selective agars. *International Journal of Food Microbiology* 414, 110616, 2024.

新井沙倉、溝腰朗人、佐伯美由紀、木全恵子、柳本恵太、原田誠也、山谷聡子、床井由紀、福留智子、長岡宏美、山田香織、濱 夏樹、山中拓哉、土屋彰彦、浅野由紀子、中村由紀子、松永典久、高良武俊、今野貴之、小西典子、土井りえ、廣瀬昌平、工藤由起子。食品およ

び環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析. 日本食品微生物学会雑誌 印刷中.

(学会等発表)

工藤由起子. *Escherichia albertii* の汚染状況及び検査法について. シンポジウム III *E. albertii* を含めた病原大腸菌による食中毒の発生と検査体制. 衛生微生物技術協議会第 43 回研究会. 令和 5 年 7 月 6 日. 岐阜

Hara-Kudo, Y., Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T. Emerging foodborne diseases with *Escherichia albertii* and the detection methods. 55th UNITED STATES-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES 令和 5 年 8 月 6-11 日. カリフォルニア

新井沙倉, 廣瀬昌平, 池田伸代, 門口真由美, 有川衣美, 溝腰朗人, 新免香織, 横山孝治, 土井りえ, 齊木大, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品における *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21-22 日. 大阪
廣瀬昌平, 新井沙倉, 山谷聡子, 貫

洞里美, 齊木大, 曾根美紀, 荒木靖也, 土井りえ, 尾畑浩魅, 土屋彰彦, 小嶋由香, 大西貴弘, 工藤由起子. 食品中の *astA* 保有大腸菌の効率的な増菌および分離培養法の検討. 第 166 回日本獣医学会学術集会. 令和 5 年 9 月 5-18 日. 大阪

曾根美紀, 尾畑浩魅, 山谷聡子, 貫洞里美, 荒木靖也, 土屋彰彦, 小西典子, 土井りえ, 小嶋由香, 廣瀬昌平, 新井沙倉, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌自然汚染食品での増菌および分離培養法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21-22 日. 大阪

荒木靖也, 新井沙倉, 小西典子, 土井りえ, 山谷聡子, 土屋彰彦, 小嶋由香, 尾畑浩魅, 貫洞里美, 曾根美紀, 廣瀬昌平, 大西貴弘, 工藤由起子. *astA* 保有大腸菌接種食品での増菌および分離培養法の検討. 第 44 回日本食品微生物学会学術総会. 令和 5 年 9 月 21 日. 大阪

新井沙倉, 溝腰朗人, 佐伯美由紀, 木全恵子, 柳本恵太, 原田誠也, 山谷聡子, 土屋彰彦, 床井由紀, 福留智子, 長岡宏美, 山田香織, 濱夏樹, 山中拓哉, 小西典子, 土井りえ, 廣瀬昌平, 工藤由起子.

食品および環境等における
Escherichia albertii の汚染実
態調査. 第119回日本食品衛生学
会学術講演会. 令和5年10月12
日. 東京

貫洞里美, 尾畑浩魅, 荒木靖也, 曾
根美紀, 山谷聡子, 土井りえ, 小
西典子, 小嶋由香, 土屋彰彦, 新
井沙倉, 廣瀬昌平, 大西貴弘, 工
藤由起子. 食品からの *astA* 保有
大腸菌分離のための培養法の検
討. 第119回日本食品衛生学会学
術講演会. 令和5年10月12日.
東京

山谷聡子, 廣瀬昌平, 小西典子, 土
屋彰彦, 小嶋由香, 土井りえ, 尾
畑浩魅, 曾根美紀, 荒木靖也, 貫
洞里美, 新井沙倉, 大西貴弘, 工
藤由起子. *astA* 保有大腸菌の食
品からの分離方法の検討および
分離株の解析. 第119回日本食品
衛生学会学術講演会. 令和5年
10月12日. 東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし