

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

協力研究報告書
astA 保有細菌の性状等の解析

研究要旨

集団食中毒事例や散発下痢症等の多様な由来の *astA* 保有大腸菌が保有する *astA* のバリエーションタイプを解析した。その結果、少なくとも 13 タイプの多様なバリエーションタイプを保有していることが明らかとなった。次に、複数の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法を用いて *astA* 保有大腸菌の検出性を検討した。その結果、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法の一部では、大腸菌が保有する *astA* バリエーションの一部のタイプが検出されないことが示された。なお、*astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌についても同様に試験したところ、本研究にて *Klebsiella* 属細菌や *Morganella* 属細菌も検出されることが示された。そのため、既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法は、本研究では特異性が低いと考えられた。今後は、特異性が高く、コンベンショナル PCR 法よりも検出感度が優れる *astA* 特異的リアルタイム PCR 法などが有用と考えられた。また、*astA* 保有大腸菌の選択分離培地について、複数の添加剤を用いて検討したところ、*astA* 保有大腸菌の生育が良好な複数の選択分離培地が選定された。今後、食品中の *astA* 保有大腸菌の検出に本選択分離培地が有効であるかを食品を用いてさらに検討予定である。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、貫洞里美

鹿児島大学

大岡唯祐

国立医薬品食品衛生研究所

大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

食品からの病原微生物の検出を目的とした培養において、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、分離が困難な場合がある。さらに、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、検出が困難である。そのため、対象の食中毒細菌特異的な遺伝子検出法と培養法を組み合わせることによって、効率良く試験を実施することが重要である。そこで本研究では、集団食中毒事例などの多様な由来の *astA* 保有大腸菌等細菌について保有する *astA* の遺伝子多型（バリエーション）タイプを 35 タイプの全バリエーション（詳細略、Personal communication）の中から特定し、既報の *astA* 特異的遺伝子検出法での検出性を調査することを目的とした。また、より効率の良い分離培養法の検討のために、添加剤を加えた選択分離培地の有用性についても検討することを目的とした。

B. 研究方法

〔1〕菌株を分離した地方自治体において、菌種未同定の *astA* 保有細菌の菌種同定

（1）供試菌株

菌株を分離した地方自治体にお

いて、菌種未同定の散発下痢症 24 事例由来株 24 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 50 事例由来株 50 株、無症状保菌者由来株 6 株およびの *Escherichia coli* NBRC3972 の合 81 株を供試した。

（2）Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry（MALDI-TOF MS）による菌種同定

菌株を標準寒天培地に画線後、37℃で 24±2 時間培養した。生育した *E. coli* NBRC3972 コロニーを校正用に供試した。菌種同定のためのマトリックス剤は、トリフルオロ酢酸、アセトニトリル、エタノール、蒸留水を 3 : 33 : 33 : 31 の割合で混合した溶媒に α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸（CHCA、富士フイルム和光純薬株式会社）を 10 mg/mL の割合で溶解し、調製した。選定したコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、分析用のサンプルプレートのウェルに塗布した。コロニーを塗布したウェルにマトリックス剤 1 μ L を滴下し、数回ピペッティングし、クリーンベンチ内で風乾した。校正用の *E. coli* NBRC3972 は、マトリックス剤の量を 0.5 μ L に変更

し、同様に実施した。プレート上の試料が十分に乾燥したことを確認し、MALDI-TOF MS AXIMA®シリーズ Assurance (株式会社島津製作所) と AXIMA®微生物同定システム SARAMIS™ (株式会社島津製作所) を用いて菌種を同定した。

[2] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプの特異性と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例 12 事例由来株 120 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症 39 事例由来株 41 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 32 事例由来株 46 株および無症状保菌者由来株 6 株の合計 213 株を供試した。なお、この 213 株には、[1]

(2) において大腸菌であることが確認された菌株を含む。

(2) DNA 溶液の調製

菌株を tryptone soya broth (TSB) 中で 37℃ にて 18 時間培養した。培養液 0.1 mL から熱抽出法によって DNA を抽出した。

(3) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

シーケンス用プライマー (Yamamoto et al., Infect.

Immun. 1996, 64:4) (表 1) にて PCR 反応による増幅を行った。PCR 反応には、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を使用した。また、プライマーの終濃度を 0.4 μM に調製した。98℃ 10 秒の熱変性ののち、98℃ 10 秒－50℃ 5 秒－72℃ 90 秒を 35 サイクルの増幅反応後、72℃ で 5 分間反応させた。PCR 産物を電気泳動した。ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって PCR 産物を精製した。精製 PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた cycle sequencing に供試した。Cycle sequencing には、上記 PCR 反応と同一のプライマーを用いた。Cycle sequencing 産物は、エタノール沈殿にて精製した。遺伝子配列は、Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた遺伝子シーケンスにて決定した。決定した配列について、*astA* リファレンス配列と比較した。

(4) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

4 つの *astA* 特異的コンベンショ

ナル PCR 法 (Ito らの PCR 法 : Ito et al., Microbiol. Immunol. 2014, 58:8、Muller らの PCR 法 : Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73:10、Yamamoto らの PCR 法 : Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 1996, 64:4 および Yatsuyanagi らの PCR 法 : Yatsuyanagi et al., JCM 2002, 40:1) を参照した *astA* 特異的プライマーセットを用いてコンベンショナル PCR 法を実施した (表 1)。なお、Muller らの PCR 法では、*astA* を含む多様な病原因子を検出対象としていた。コンベンショナル PCR 試薬には、Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) 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、94℃ 2 分間、94℃ 30 秒間－55℃ 30 秒間－68℃ 1 分の 30 サイクル、68℃ 5 分間とした。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 µL 加えた。PCR 産物の有無とその濃さを判定し、Muller らの方法では、検出された各種遺伝子特異的 PCR 産物のバンドサイズから保有する病原遺伝子について判定した。

[3] *astA* 保有大腸菌以外の *astA*

保有細菌種における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 供試菌株

[1] (2) で同定した結果大腸菌ではない *astA* 保有細菌合計 5 株を供試した。その詳細は、散発下痢症 1 事例の患者由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症 4 事例由来株 4 株 (無症状保菌者からの分離株、2016 年に患者から分離された株、2018 年に患者から分離された株 および 2018 年にスワブから分離された株) である。

(2) DNA 溶液の調製

上記 B. 研究方法 [2] (2) と同様に実施した。

(3) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

上記 B. 研究方法 [2] (3) と同様に実施した。

(4) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

上記 B. 研究方法 [2] (4) と同様に実施した。

[4] *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプおよびコンベンショナル PCR プライマーの配列の比較

B. 研究方法 [2] (4) にて *astA*

特異的コンベンショナル PCR 法のバンドが薄かった株について、その株が保有する *astA* バリエーションタイプを B. 研究方法 [2] (3) の結果から抽出した。当該バリエーションについて、各種 PCR 法のプライマー配列と遺伝子配列を比較し、PCR 法での検出性に影響を与える原因を推定した。

[5] *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

(1) 供試菌株

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株の中から異なる事例由来の *astA* 保有大腸菌 16 株を供試した。

(2) 各種選択分離培地の検討

菌株を TSB 中で 37℃ にて 18 時間培養した。この TSB 培養液を、クロモアガー STEC 培地 (クロモアガー社製造、関東化学販売) およびクロモアガー STEC 培地に添付の添加剤は使用しないクロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC)、32 mg/L アンピシリン添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、20 mg/L セフトジディム添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC、0.05 mg セフィキシムおよび 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジンおよび 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、

0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン並びに 1.0 mg/L 薬剤 C 添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC に画線し、37℃ にて 22 時間培養した。

C. 研究結果

[1] 菌株を分離した地方自治体において、菌種未同定の *astA* 保有細菌の菌種同定

供試した散発下痢症由来株 24 株のうち 23 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 50 株のうち 46 株および無症状保菌者由来株 6 株は *E. coli* と同定された。散発下痢症由来株の 1 株は *Morganella morganii*、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 4 株のうち 1 株は *Klebsiella pneumoniae* と同定され、他 3 株は、AXIMA に備え付けられているデータセットとの一致率が低いものの、最も一致率が高い (80~86%) 菌種としては、*Klebsiella oxytoca* であった。

[2] 多様な由来の *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

(1) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

astA 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 120 株において、以下の少なくとも 4 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 5 株、v17 保有株は 21 株、v23 保有株は 10 株、v27 保有株は 2 株および複数のバリエーションタイプを保有する株が 82 株であった。*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 41 株において、以下の少なくとも 5 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 16 株、v6 保有株は 6 株、v12 保有株は 2 株、v27 保有株は 3 株、v31 保有株は 1 株、PCR プライマーにて増幅しなかった株が 4 株、複数のバリエーションタイプを保有する株が 6 株およびこれまでの報告にはない新たなバリエーションタイプが 4 株であった。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株において、以下の少なくとも 11 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 7 株、v6 保有株は 6 株、v7 保有株は 2 株、v8 保有株は 1 株、v12 保有株は 6 株、v14 保有株は 2 株、v23 保有株は 2 株、v27 保有株は 2 株、v29 保有株は 5 株、v34 保有株は 2 株、v35 保有株は 1 株、複数の

バリエーションタイプを保有する株が 3 株およびこれまでの報告にはない新たなバリエーションタイプが 6 株であった。無症状保菌者由来株 6 株において、以下の少なくとも 3 種類の *astA* バリエーションタイプが検出された。prototype 保有株は 4 株、v6 保有株は 1 株、v35 保有株は 1 株であった。

(2) *astA* 保有大腸菌の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

各種コンベンショナル PCR 法の電気泳動像から、バンドの濃さなどの判定し易さを含め結果とした。集団食中毒事例由来株 120 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法いずれも 120 株とも *astA* 陽性であったが、内 1 株は Yamamoto らの PCR 法では、バンドが薄かった(表 2)。散発下痢症由来株 41 株は、試験した 4 種類のコンベンショナル PCR 法のいずれも *astA* 陽性であったが、内 2 株は Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 46 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であったが、Yamamoto らの PCR 法では 2 株はバンドが薄か

った。無症状保菌者由来株 6 株は、いずれも試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であった。

なお、Muller らの PCR 法にて検出される多様な病原因子については、*astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 2 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 2 株は *astA* に加えて *pic* も陽性であった。また、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 2 株は、*astA* に加えて *pic* および *aggR* も陽性であった。その他 206 株については、Muller らの PCR 法に含まれる病原因子のうち *astA* のみ陽性であった。

〔3〕*astA* 保有大腸菌以外の *astA* 保有細菌種における *astA* バリエーションタイプの特定と既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

（1）遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

散発下痢症患者由来の *M. morganii* は、複数のバリエーションタイプを保有していた。*astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症にて無症状保菌者から分離さ

れた *K. pneumoniae* は、PCR プライマーにて増幅されず、2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* の 1 株は、複数のバリエーションタイプを保有し、2016 年に患者から分離された *K. oxytoca* および 2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* の 2 株は、これまでの報告にはない新たなバリエーションを保有していた。

（2）*astA* 保有細菌の既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での検出性

2016 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株は、Ito らの PCR 法、Yamamoto らの PCR 法および Yatsuyanagi らの PCR 法にて *astA* 陽性および Muller らの PCR 法にて陰性であった（表 3）。2018 年に患者から分離された *K. oxytoca* 1 株は、Ito らの PCR 法および Muller らの PCR 法にて *astA* 陽性、Yatsuyanagi らの PCR 法にて陽性もバンドが薄く、Yamamoto らの PCR 法にて陰性であった。2018 年にスワブから分離された *K. oxytoca* 1 株は、4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であったが Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった。*K. pneumoniae* の 1 株は、Ito らの PCR

法にて *astA* 陽性、Yatsuyanagi らの PCR 法にて陽性もバンドが薄く、Muller らの PCR 法および Yamamoto らの PCR 法では陰性であった。*M. morganii* の 1 株は、試験した 4 種類の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法のいずれでも *astA* 陽性であった。

[4] *astA* 保有大腸菌における *astA* バリエーションタイプおよびコンベンショナル PCR プライマーの配列の比較

Yamamoto らの PCR 法にてバンドが薄かった *astA* 保有大腸菌が原因となった集団食中毒事例由来株 1 株、*astA* 保有大腸菌が原因と推定される散発下痢症由来株 2 株および *astA* 保有大腸菌以外の病原体が原因の感染症由来株 2 株は、いずれも v27 を保有しており、その配列と Yamamoto のプライマーとを比較したところ、フォワードプライマーに 2 bp のミスマッチが存在した（表 4）。

[5] *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

クロモアガー STEC 培地に付属の添加剤を加えた培地では、コロニーの発育が抑制された（表 5）。一方、添加剤を加えない CHSTEC では、供試した 16 株中 14 株が藤色のコロニーを形成し、1 株は白色

コロニーを形成し、1 株はやや藤色の白色コロニーを形成した。アンピシリン添加 CHSTEC では、19% の株がコロニーを形成せず、セフトジディム添加 CHSTEC では、75% の株がコロニーを形成しなかった。セフィキシムおよび薬剤 C 添加 CHSTEC、セフスロジンおよび薬剤 C 添加 CHSTEC、セフィキシムおよびセフスロジン並びに薬剤 C 添加 CHSTEC では、いずれの株もコロニーを形成したものの、81% の株は微小なコロニーを形成した。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、いずれの株もコロニーを形成し、CHSTEC と同様のコロニー色を示した。

D. 考察

本研究によって、*astA* 保有大腸菌は少なくとも 13 種類の多様な *astA* バリエーションタイプを保有しており、1 株の中に複数種類のバリエーションタイプを保有する株も存在することが示された。さらに、*astA* 保有大腸菌が保有する *astA* バリエーションには少なくとも 35 タイプあるが、一部の *astA* 保有大腸菌は既存の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では検出されない、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、*astA* 保有大腸菌以外の細菌に着目すると、本研究によって、*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。そのため、*astA* 保有大腸菌を標的とした試験では、分離培地上に形成された大腸菌様コロニーについて、TSI や LIM 培地などを用いて大腸菌の基本的な生化学性状を確認することが必要と考えられた。なお、*Klebsiella* 属細菌と同定または推定された 4 株については、本研究事業の R3 年度分担研究報告書 1 (3)「*astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立に関する研究」にて、CHSTEC 培地上に青色コロニーを形成した 4 株と同一であった。食品中には *Klebsiella* 属細菌も含めた多様な夾雑菌が存在しているものの、過去に食中毒の原因として報告された *astA* 保有細菌は大腸菌のみである。そのため、*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。

また、多様な添加剤を用いて *astA* 保有大腸菌特異的分離培地について検討したところ、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 の 3 種類の分離培地では *astA* 保有大腸菌のコロニーが十分に発育し、発色性も添加剤なしの培地と同様であった。今後、食品検体を用いて、これら分離培地の有用性について検討する必要があると考えられた。

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ため、*astA* 保有大腸菌が保有する *astA* 特異的遺伝子検出法を検討する必要があると考えられた。また、菌株を用いた試験において、*astA* 保有大腸菌の培養に適した選択分離培地が選定された。今後、食品中の *astA* 保有大腸菌の検出に有用かの検討を食品を用いて実施予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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.

(学会等発表)

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

表 1. 本試験にて試験した PCR 法

反応系	標的 遺伝子	プライマー	産物 (bp)	引用
<i>astA</i> 配列のシーケ ンショナルPCR 法	<i>astA</i>	EAST13a: AGAACTGCTGGGTATGTGGCT	281	Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 64(4):1441-1445, 1996
		EAST12b: CTGCTGGCCTGCCTCTTCCGT		
	<i>astA</i>	EASTOSI: GCCATCAACACAGTATATCCG	109	Ito et al., Microbiol. Immunol.58(8):467-473, 2014
		EASTOAS2: CGCGAGTGACGGCTTTGTAG		
		MP-astA-F: TGCCATCAACACAGTATATCCG	102	Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(10):3380-3390, 2007
		MP2-astA-R: ACGGCTTTGTAGTCCCTCCAT		
		EAST11-a: CCATCAACACAGTATATCCGA	111	Yamamoto and Echeverria., Infect. Immun. 64(4):1441-1445, 1996
		EAST11-b: GGTGCGAGTGACGGCTTTGT		
		EAST-1S: GCCATCAACACAGTATATCC	106	Yatsuyanagi et al., JCM 40(1): 294- 297, 2002
		EAST_AS: GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		
各種病原因子特異 的Multiplex PCR 法	<i>escV</i>	MP3-escV-F: ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG	544	Muller et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(10):3380-3390, 2007
		MP3-escV-R: CGTCCCCCTTTTACAACTTCATCGC		
	<i>bfpB</i>	MP3-bfpB-F: GACACCTCATTGCTGAAGTCG	910	
		MP3-bfpB-R: CCAGAACACCTCCGTTATGC		
	<i>stx1</i>	MP4-stx1A-F: CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	244	
		MP4-stx1A-R: AATGCCACGCTTCCAGAATTG		
	<i>stx2</i>	MP3-stx2A-F: GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG	324	
		MP3-stx2A-R: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC		
	<i>elt</i>	MP2-LT-F: GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG	655	
		MP2-LT-R: CTTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC		
	<i>estIa</i>	MP4-STIa-F: CCTCTTTTAGYCAGACARCTGAATCASTTG	157	
		MP4-STIa-R: CAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG		
	<i>estIb</i>	MP2-STI-F: TGTCTTTTTCACCTTTCGCTC	171	
		MP2-STI-R: CGGTACAAGCAGGATTACAACAC		
	<i>invE</i>	MP2-invE-F: CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG	766	
		MP2-invE-R: CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC		
	<i>aggR</i>	MP2-aggR-F: ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	400	
		MP2-aggR-R: AATACAGAATCGTCAGCATCAGC		
	<i>pic</i>	MP2-pic-F: AGCCGTTTCCGACAGAAGCC	1,111	
		MP2-pic-R: AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG		
	<i>uidA</i>	MP2-uidA-F: ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	1,487	
		MP2-uidA-R: AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG		

表 2. 各種 *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

由来	株数	PCR陽性株数 (バンドが薄い株数)			
		Ito	Muller	Yamamoto	Yatsuyanagi
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となった 集団食中毒事例由来株	120	120	120	120 (1)	120
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される 散発下痢症由来株	41	41	41	41 (2)	41
その他の病原体による 集団食中毒事例由来株	46	46	46	46 (2)	46
無症状保菌者	6	6	6	6	6
合計	213	213	213	213 (5)	213

表 3. 各種 *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法での各種 *astA* 保有細菌の検出

細菌種	由来	PCR陽性株数（バンドが薄い株数）			
		Ito	Muller	Yamamoto	Yatsuyanagi
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	2016年に患者から分離	1	0	1	1
	2018年に患者から分離	1	1	0	1 (1)
	2018年にスワブから分離	1	1	1 (1)	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無症状保菌者	1	0	0	1 (1)
<i>Morganella morganii</i>	患者	1	1	1	1

*MALDI-TOF MSでの*K. oxytoca*との一致率が80～86%であった。

表 4. Yamamoto らの PCR 法にて v27 の検出性が低い大腸菌株の理由について

由来	分離	検出が悪い理由
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因となつた集団食中毒事例由来株	2020年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
	2018年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
<i>astA</i> 保有大腸菌が原因と推定される散発事例由来株	2020年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
	2017年に無症状保菌者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
その他の病原体による集団食中毒事例由来株	2018年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり
	2018年に患者から分離	フォワードプライマーに2bpのミスマッチあり

表 5.集団食中毒事例由来の *astA* 保有大腸菌代表株の各種添加剤加選択分離培地での生育

血清型	菌株	クロモアガー STEC		クSTEC 基礎培地		アンピシリン 添加クSTEC		セフィキシム 添加クSTEC		セフトラジディム 添加クSTEC		セフスロジン 添加クSTEC		セフィキシム および 薬剤C 添加クSTEC		セフスロジン および 薬剤C 添加クSTEC		セフィキシム セフスロジン および 薬剤C 添加クSTEC		セフィキシム および セフスロジン 添加クSTEC	
		生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色	生育	色
O166:H15	AST240	—	—	+++	藤	+	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白
O166:H15	AST20	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
O99:H33	AST46	—	—	+++	白	+++	薄藤入り白	+++	白	—	—	+++	白	+++	白	+++	白	+++	白	+++	白
O6:H10	AST198	+	茶灰色	+++	薄藤入り白	++	藤	+++	薄藤入り白	—	—	+++	薄藤入り白	++	白	++	白	++	白	+++	白
O166:H15	AST73	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	++	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
O55:H32	AST81	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+++	藤
OgGp9:H18	AST262	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
O1:H45	AST85	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	++	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
O166:H15	AST208	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+++	藤
O7:H4	AST205	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白
O166:H15	AST204	±	紫灰色	+++	藤	—	—	+++	藤	—	—	+++	藤	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白	++	薄藤入り白	+++	藤
O7:H4	AST19	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
	AST276	—	—	+++	藤	+++	藤	+++	藤	+	藤	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
O169:H45	AST215	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤
OgGp7:H6	ATT216	±	紫灰色	+++	藤	+	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	薄藤入り白	+++	藤
OgGp9:H18	AST217	±	紫灰色	+++	藤	+++	藤	+++	藤	—	—	+++	藤	++	藤	++	藤	++	藤	+++	藤

CHSTEC: クロモアガーSTEC基礎培地、+: 通常のコロニー生育、±: 微小コロニー、-: コロニー生育なし