

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* 保有大腸菌の食品検査法の確立

#### 研究要旨

近年、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による大規模食中毒が日本各地で発生しているが、食品等での検査法は国内外で確立されていない。*astA* 保有大腸菌による食中毒の早期の原因究明には、適切な検査法の開発が必要不可欠である。そこで、昨年度に引き続き、食品中の *astA* 保有大腸菌を効率的に分離するための培養法の確立を目的に増菌培地および選択分離培地の有用性を比較した。その結果、増菌培地として mEC と NmEC はどちらも *astA* 保有大腸菌の分離に有用であるが、一部食品では mEC の方がより適することが明らかとなった。また、選択分離培地に添加する選択剤として、セフィキシムおよびセフスロジンの有用性を *astA* 保有大腸菌を添加した食品を用いて検討したが、これら薬剤の顕著な有用性は認められなかった。さらに、*astA* 保有大腸菌による自然汚染食品から分離された *astA* 保有大腸菌株について、各種遺伝子解析を実施したところ、分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型が多様であった。なお、一部の食品由来株は、mEC 由来株と NmEC 由来株とで菌株の O 抗原遺伝子型の構成が異なっていたため、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。以上から、*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。

## 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	小嶋由香、荒木靖也
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、新井沙倉

### A. 研究目的

近年、腸管管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による大規模食中毒が日本各地で発生している。*astA* 保有大腸菌による食中毒は原因食品が不明であることが多く、また、食品等での検査法は国内外で確立されていない。そのため、*astA* 保有大腸菌による食中毒の早期の原因究明には、適切な検査法の開発が必要不可欠である。本研究では、昨年度に引き続き、*astA* 保有大腸菌の食品での検査法に有用な増菌培養法や分離培養法の検討および食品中の *astA* 保有大腸菌の各種遺伝子解析の実施を目的とした。

### B. 研究方法

#### [1] *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験

令和4年度に実施した *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験を実施した。

##### (1) 試験検体の *astA* 確認試験

#### 1) 食品検体

モヤシ3食品を供試した。検体 (550 g 以上) を滅菌トレイの上で細切した後均一化し、検体 10 g を量り取ったストマッカー袋を1袋と検体 25 g を量り取ったストマッカー袋を20袋 (検体 1~20) 用意した。各食品の一般生菌数、大腸菌数および大腸菌群数を計測するために、各食品 10 g をストマッカー袋に秤量し、滅菌リン酸緩衝食塩水 (滅菌 PBS) 90 mL を加え1分間ストマッカー処理した乳剤 ( $10^{-1}$  希釈液) を PBS 9 mL で10倍希釈して  $10^{-2}$ ~ $10^{-6}$  希釈液を調製した。各希釈液 0.1 mL を標準寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、48時間培養した。同時に各希釈液 0.1 mL を XM-G 寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18~22時間培養した。培養後の XM-G 寒天培地の青 (青~青紫) および赤 (ピンク~赤紫) コロニー数を計測し、それぞれの食

品 1 g あたりの大腸菌数および大腸菌群数を算出した。また、標準寒天培地のコロニー数を計測し、食品 1 g あたりの生菌数を算出した。

## 2) 培養および *astA* 特異的 PCR 法

上記の 20 袋のうち 4 袋へ室温に戻した mEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 20~22 時間培養した。残りの 16 袋は冷蔵にて保管した。検体培養液各 0.1 mL から  $10,000 \times g$  10 分間遠心して上清を除き、50 mM NaOH を 85  $\mu\text{L}$  添加して再浮遊させた。 $100^\circ\text{C}$  で 10 分間加熱し、冷却後、1M Tris-HCl (pH 7.0) を 15  $\mu\text{L}$  添加して中和した。 $10,000 \times g$  10 分間遠心し、得られた上清約 100  $\mu\text{L}$  をテンプレート DNA とし、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (Yamamoto ら、以下 *astA* 特異的 PCR 法) を実施した (n2)。PCR 試薬には、QuickTaq (東洋紡) を用いた。Forward プライマーとして 5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3' を、Reverse プライマーとして 5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3' を終濃度 0.2  $\mu\text{M}$  となるよう調製して用いた。反応条件は  $94^\circ\text{C}$  2

分の熱変性ののち、 $94^\circ\text{C}$  30 秒 -  $55^\circ\text{C}$  30 秒 -  $68^\circ\text{C}$  1 分を 30 サイクル繰り返し増幅反応させ、最後に  $68^\circ\text{C}$  5 分とした。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドを確認した。

## (2) *astA* 保有大腸菌の添加回収試験

1) 菌株および接種菌液の調製  
集団食中毒事例由来株である *astA* 保有大腸菌 07:H4 (AST19) および 0166:H15 (AST204) の 2 株を供試した。

*astA* 保有大腸菌菌株保存のカジトン培地から 1 エーゼ (10  $\mu\text{L}$ ) を Tryptone soya broth (TSB、OXOID) 10 mL に接種し、 $37^\circ\text{C}$  にて 18 時間培養した。増菌培養液を滅菌 PBS にて  $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  まで 10 倍階段希釈し、 $10^{-7}$  希釈液 0.1 mL を 10 枚の Tryptic soy agar (TSA、OXOID) に塗抹し、 $37^\circ\text{C}$  にて 18~24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。この作業を繰り返し実施し、TSB 中にて 18 時間培養した場合の菌数を計算し、中菌数接種として 50 CFU/25 g、高菌数接種として 100 CFU/25 g となるように希釈倍率を決定した。なお、接種菌数測定のために、各接種菌

液 0.1 mL を 10 枚の TSA に塗抹し、37℃にて 18～24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。

#### 2) 食品検体への *astA* 保有大腸菌接種および培養

検体 25 g を量り取ったストマッカー袋 16 袋に各接種菌数レベル用希釈菌液 0.1 mL を接種した。菌を接種した後、ストマッカー袋の外側から手でなじませ、8 袋に modified EC 培地 (mEC、日水製薬) および別の 8 袋にノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42℃にて 20～22 時間培養した。

#### 3) 培養液からの DNA 抽出および *astA* 検出

2) の各増菌培養液 0.1 mL から [1] (1) 2) と同様の条件で DNA を抽出し、*astA* 特異的 PCR 法に供した。1 検体につき 2 反応実施した。

#### 4) 分離培養

分離培養法では、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC、OXIOD) に薬剤 C を添加した SMAC (C-SMAC)、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC、クロモアガー社製造、関東化学販売) および薬剤 C を添加した CHSTEC (C-

CHSTEC) を用いた。2) の検体培養液を各 2 枚の C-SMAC、CHSTEC および C-CHSTEC に画線し、37℃にて 20 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、C-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および C-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 3 個選択し、CHSTEC に単離して、37℃にて 20 時間培養した。培養後にコロニーの色を判定し、藤色を呈したコロニーについて以下の *astA* 保有確認を行った。

継代培養後に CHSTEC 上で藤色を呈したコロニーを TE (pH 8.0) 100  $\mu$ L に懸濁し、100℃ 10 分間加熱した。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 $\times$ g 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとし、[1] (1) 2) と同様の条件で *astA* 特異的 PCR 法を 1 検体につき 1 反応実施した。

#### 5) 生化学的性状の確認

4) で *astA* 陽性となったコロニーを TSI 寒天培地 (TSI、日水製薬) および LIM 培地 (LIM、日水製薬) に接種し、37℃にて 18 時間培養した。培養後にブドウ糖分解能、乳糖白糖分解能、L-リジン脱炭酸能、インドール産

生性および運動性を判定し、生化学的性状が接種菌株と同一であることを確認した。

## [2] 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

### (1) 供試菌株

集団食中毒事例由来株である *astA* 保有大腸菌 0166:H15 (AST204) を供試した。

### (2) モヤシ培養液中での各種選択分離培地の検討

[1] (2) 2) で得られた培養液を、0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、10 mg/L セフロジン添加 CHSTEC、0.05 mg/L セフィキシムおよび 10 mg/L セフロジン添加 CHSTEC に画線し、37°C にて 22 時間培養した。培養後の生育コロニーの色や生育状態を確認し、その後、[1] (2) 2) から 5) と同様に *astA* 保有大腸菌を分離した。

## [3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた *astA* 保有大腸菌添加食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数推定および菌数比較

### (1) 食品培養液での *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検量線作成

#### 1) 供試菌株、食品培養液検体および DNA 溶液の調製

集団食中毒事例由来株である

*astA* 保有大腸菌 07:H4 (AST19) および 0166:H15 (AST204) の 2 株を供試した。

令和 4 年度に実施した *astA* 保有大腸菌の添加回収試験で *astA* 陰性となった各種食品 (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) の mEC 培養液を供試した。

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ (10 μL) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。各種食品の mEC 培養液にて *astA* 保有大腸菌株の増菌培養液をそれぞれ 10 倍階段希釈し、菌接種食品培養液 (想定 8~1 log CFU/mL 食品培養液) を調製した。菌接種食品培養液各 100 μL を上記アルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA を下記 PCR 法のテンプレートとした。

### 2) リアルタイム PCR

本報告書の 1. 病原大腸菌食中毒の食品検査法の確立 (3)

「*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発」にて設計した *astA* 特異的リアルタイム PCR Assay 11r 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。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental

Master Mix 2.0 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調製した希釈 DNA 溶液を 5  $\mu$ L 加えた。1 つの DNA 溶液につき 2 反応実施した。機器は QuantStudio 3 または QuantStudio 5 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を使用した。50°C 2 分および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 40 サイクル増幅反応させた。各菌接種食品培養液に添加した菌数と得られた Ct 値から検量線を作成した。

#### (2) 添加回収試験での食品培養液中の菌数の推定

令和 4 年度に実施した *astA* 保有大腸菌 (AST19 および AST204) 添加回収試験の検体培養液 (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) から抽出し保存していた DNA について [3] (1) 2) と同様に Assay11r 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。[3] (1) で得られた検量線を用いて各培養液中の菌数を算出した。

#### [4] 自然汚染検体分離株の遺伝子性状解析

##### (1) 分離株の菌種同定

##### 1) 供試菌株

令和 4 年度に豚肉ミンチ、鶏肉ミンチおよびオクラから分離された *astA* 保有細菌 165 株および *Escherichia coli* NBRC3972 を供試した。

##### 2) 菌株同定試験

菌株を標準寒天培地に画線後、37°C で 24 $\pm$ 2 時間培養した。マススペクトル校正用の *E. coli* NBRC3972 はカジトン培地からニードルを用いて接種し、標準寒天培地に画線後、37°C で 24 $\pm$ 2 時間培養した。培養後、生育したコロニーを校正用に供試した。菌種同定試験で使用したマトリックス剤は、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  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (CHCA、富士フィルム和光純薬株式会社) を 10 mg/mL の割合になるように溶解させ、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  $\mu$ l を滴下し、数回ピペッティングをし、クリーンベンチ内で風乾させた。校正用の *E. coli* NBRC3972

はマトリックス剤の量を 0.5  $\mu$ l に変更し、同様の作業を実施した。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)分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

#### 1) 供試菌株

(4) 1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株 165 株を供試した。

#### 2) O 遺伝子型別および H 遺伝子型別

供試菌株を TSA に培養し、生育したコロニーを TE (pH 8.0) 100  $\mu$ L に懸濁し、100°C 10 分間加熱した。加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000 $\times$ g 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとし、井口らの方法 (J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32) に従い、PCR によって O 抗原遺伝子型別を行った。また、Banjo らの方法 (J Clin Microbiol., 2018, 56, e00190-18) に従い、PCR によって H 抗原遺伝子型別を行った。(3)分離株の病原性因子関連遺

### 伝子の解析

#### 1) 供試菌株

(1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株のうち、各食品由来の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型代表株 54 株を供試した。

#### 2) 病原性因子関連遺伝子の検出

[4] (2) で抽出した DNA テンプレートを用いて、病原性因子関連遺伝子を実施した。大腸菌の病原因子の検出は、Müller らの方法 (Appl. Environ. Microbiol, 2007, 73, 3380-3390) を改良したマルチプレックス PCR 法で行った。このマルチプレックス PCR では、*escV*、*bfpB*、*stx1*、*stx2*、*elt*、*est1a*、*est1b*、*invE*、*astA*、*aggR* および *pic* を対象とした。マルチプレックス PCR は、200  $\mu$  L の反応チューブで行った。反応液は、Quick Taq HS Dye Mix 12.5  $\mu$  L、それぞれのプライマーを 0.2  $\mu$ M ずつ、DNA テンプレート 2  $\mu$ L から成り、PCR グレードの精製水で最終容量を 25  $\mu$ L に調整した。反応は、94°C、2 分の後、94°C、30 秒、63°C、30 秒、68°C、1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す、最後に 68°C、5 分の反

応を行った。反応終了後、PCR 産物 10  $\mu$ L を 2 % のアガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、特異的なバンドを確認し、遺伝子の有無を調べた。

(4) 分離株が保有する *astA* バリエーションの解析

1) 供試菌株および DNA 溶液の調製

[4] (1) の菌種同定試験で大腸菌と同定された菌株のうち、各食品由来の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型代表株 54 株を供試した。

供試菌株を TSB 中で 37°C 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。

2) 遺伝子シーケンスによる *astA* 配列決定

[4] (4) 2) にて抽出した各 DNA を鋳型として供試し、シーケンス用プライマー (Yamamoto et al., Infect. Immun. 1996, 64:4) 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  $\mu$ M に調製した。98°C 10 秒の熱変性ののち、98°C 10 秒 - 50°C 5 秒 - 72°C 90 秒を 35 サイクルの増幅

反応後、72°C 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 (サーモフィッシュ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 (サーモフィッシュ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 (サーモフィッシュ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。

## C. 研究結果

[1] *astA* 保有大腸菌添加回収試験の追加試験

(1) 試験検体の *astA* 確認試験

1) 食品中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数

本研究にて供試したモヤシ 3 食品において、生菌数、大腸菌

群数および大腸菌数はそれぞれ 6.4-7.7 Log CFU/g、6.6-7.5 Log CFU/g および検出限界 (2 Log CFU/g) 以下であった。

## 2) *astA* 陽性検体数

モヤシ 3 食品は全て *astA* 陰性であった。

## (2) 接種菌数

添加回収試験でモヤシに接種した *astA* 保有大腸菌菌数は、中菌数接種群で 45 CFU/25 g、高菌数接種群で 102 および 269 CFU/25 g であった。

## (3) *astA* 保有大腸菌接種の食品培養液からの *astA* 検出

本研究に供試した中菌数接種群のモヤシ 1 食品および高菌数接種群のモヤシ 2 食品は、全ての増菌培地で *astA* 陽性であった。

## (4) *astA* 保有大腸菌の分離

中菌数接種のモヤシ 1 食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC とともに 30%程度であった(表 1)。増菌培地と分離培地の組み合わせでは、釣菌コロニーに対する PCR 陽性コロニーの割合が NmEC 培養の C-SMAC が最も低く、mEC 培養の CHSTEC が最も高く 50%程度であった。また、中菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、

増菌培地別では mEC で 60%程度、NmEC で 50%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 0%、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 50%程度であった。

高菌数接種のモヤシ 2 食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC で 70%以上、NmEC で 20%未満であった(表 1)。増菌培地と分離培地の組み合わせでは、釣菌コロニーに対する PCR 陽性コロニーの割合が 2 食品とも NmEC 培養の C-SMAC が最も低く、mEC 培養および NmEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。また、高菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、2 食品とも増菌培地別では mEC で 100%、NmEC では 30%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が 2 食品とも最も低く、mEC 培養および NmEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。加えて、1 食品では、mEC 培養の C-SMAC も高かった。

令和 4 年度の結果と合計すると、中菌数接種の食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロ

ニーの割合は、mEC と NmEC でともに 80%程度であり（表 2）、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 50%程度、NmEC 培養の CHSTEC が最も高く 90%程度であった。また、中菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、増菌培地別では mEC と NmEC でともに 90%程度であり、増菌培地と分離培地の組み合わせでは、NmEC 培養の C-SMAC が最も低く 50%程度、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高く 90%程度であった。また、高菌数接種の食品では、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC と NmEC でともに 70%以上であり、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、mEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC が最も高かった。また、高菌数接種検体のうち、*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、増菌培地別では mEC と NmEC とともに 70%以上であり、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、mEC 培養の CHSTEC および NmEC 培養の C-CHSTEC が最も高かった。

## [2] 食品中での *astA* 保有大腸菌の選択分離培地の検討

*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、mEC 培養の 0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC、10 mg/L セフスロジン添加 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 で全て 100%であり、NmEC 培養の 0.05 mg/L セフィキシム添加 CHSTEC で 25%、10 mg/L セフスロジン添加 CHSTEC および 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 で 10%程度であった。供試した 3 種類の選択分離培地では、*astA* 保有大腸菌以外の青色コロニーの生育が抑制されず、培地上の生育コロニーの様子は [1] (4) の CHSTEC と概ね同様であった。

## [3] *astA* 特異的リアルタイム PCR 法を用いた *astA* 保有大腸菌添加食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数推定および菌数比較

*astA* 特異的リアルタイム PCR 法で算出された Ct 値と菌数の検量線は、各食品培養液中で直線性を示した（図 1）。検量線を用いて算出した *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（図 2-4）。各培養液の平均菌数は、*astA* 保有大腸菌

が分離された培養液で約 6 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液で約 8 log CFU/mL であった。培地別の培養液の平均菌数は、*astA* 保有大腸菌が分離された mEC 培養液と NmEC 培養液でともに約 8 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった mEC 培養液と NmEC 培養液でともに約 6 log CFU/mL であった。食品別の *astA* 保有大腸菌が分離された培養液の平均菌数は、豚肉スライス、牛肉スライスおよびエビで約 9 log CFU/mL、オクラおよびキュウリでは約 8 log CFU/mL、モヤシでは約 7 log CFU/mL であり、*astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液の平均菌数は、オクラおよびモヤシで約 6 log CFU/mL であった(図 2-4)。また、モヤシでの接種菌数別の *astA* 保有大腸菌が分離されなかった培養液の平均菌数は、低菌数接種群および中菌数接種群で約 7 log CFU/mL、高菌数接種群で約 5 log CFU/mL であった。

#### [4] 自然汚染検体分離株の遺伝子性状解析

##### (1) 分離株の菌種同定

供試した *astA* 保有菌 165 株は、全て *E. coli* と同定された。

##### (2) 分離株の O 抗原遺伝子型お

##### よび H 抗原遺伝子型解析

オクラ由来株では、mEC と NmEC で株の O 抗原遺伝子型構成が同一であった。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の O 抗原遺伝子型構成が異なり、検体間でも O 抗原遺伝子型が異なっていた(表 3)。鶏肉ミンチ由来株では、mEC と NmEC で一部重複する O 抗原遺伝子型も存在し、多様な O 抗原遺伝子型で構成されており、検体間で 0g21 と 0gGP9 のみ共通であった。また、鶏肉ミンチ 1 由来の 0gGP9 株 14 株のうち 12 株は、2020 年姫路市食中毒事例株と同じ 0gGP9:Hg18 であり、残りの 2 株および鶏肉ミンチ 2 由来の 1 株は、Hg18 とは異なる H 抗原遺伝子型の株であった。鶏肉ミンチ 1 由来の 0g7 株は、2020 年埼玉県食中毒事例株の血清型 (07:H4) とは異なる H 抗原遺伝子型であった。鶏肉ミンチ 2 由来の 0g157 株は、腸管毒素原性大腸菌で高頻度に分離される Hg7 ではなく Hg23 であった。

##### (3) 分離株の病原性因子関連遺伝子の解析

供試した 54 株は、本研究にて供試した PCR 法にて試験した病原性因子の中ではいずれも *astA* のみを単独で保有する株であっ

た（表4）。

（4）分離株が保有する *astA* バリエーションの解析

供試した 54 株は、8 種類のバリエーション（prototype、v6、v12、v14、v27、v29、newtype5、newtype6）を単独で保有あるいは複数のバリエーションを同時に保有していた（表5）。

#### D. 考察

モヤシでの *astA* 保有大腸菌添加回収試験において、増菌培地については、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を比較すると、中菌数接種群では mEC と NmEC が同等であったが、高菌数接種群では、NmEC よりも mEC が高い傾向であった。分離培地の組み合わせによっては、NmEC 培養の C-SMAC で *astA* 陽性コロニーが全く検出されなかったが、mEC 培養の CHSTEC および C-CHSTEC では 100%の割合で検出されたことから、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。令和4年度の結果と合わせた全食品の合計では、増菌培地については、添加回収試験の釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を比較すると、mEC と NmEC が同等か NmEC

よりも mEC がやや高い傾向であった。また、*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り、中菌数接種群および高菌数接種群では、NmEC よりも mEC がやや高い傾向であった。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が、モヤシのように NmEC が適さない食品では、mEC を選択する必要があると考えられた。

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。*astA* 陽性コロニーが分離された検体の割合は、セフィキシムおよびセフスロジン添加培地と薬剤の添加がない CHSTEC で同等であったことから、これら薬剤の顕著な有用性は今回試験したモヤシで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* 保有大腸菌の分離に一定の菌数が必要であることが示唆された。一方で、モヤシ培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数を比較すると、低および中菌数接種群よりも高菌数接種群で菌数が低い傾向が認められた。モヤシの生菌数および大腸菌群数は、それぞれ

6.4 から 7.7 Log CFU/g、6.6 から 7.5 Log CFU/g と高かったことから、食品中の夾雑菌が *astA* 保有大腸菌の増殖に影響する可能性が考えられた。

食品から分離された *astA* 保有大腸菌の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型および保有する *astA* バリエーションは多様であった。豚肉ミンチ由来株は、mEC と NmEC で株の O 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。

#### E. 結論

*astA* 保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例調査の際は、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、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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会等発表)

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

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

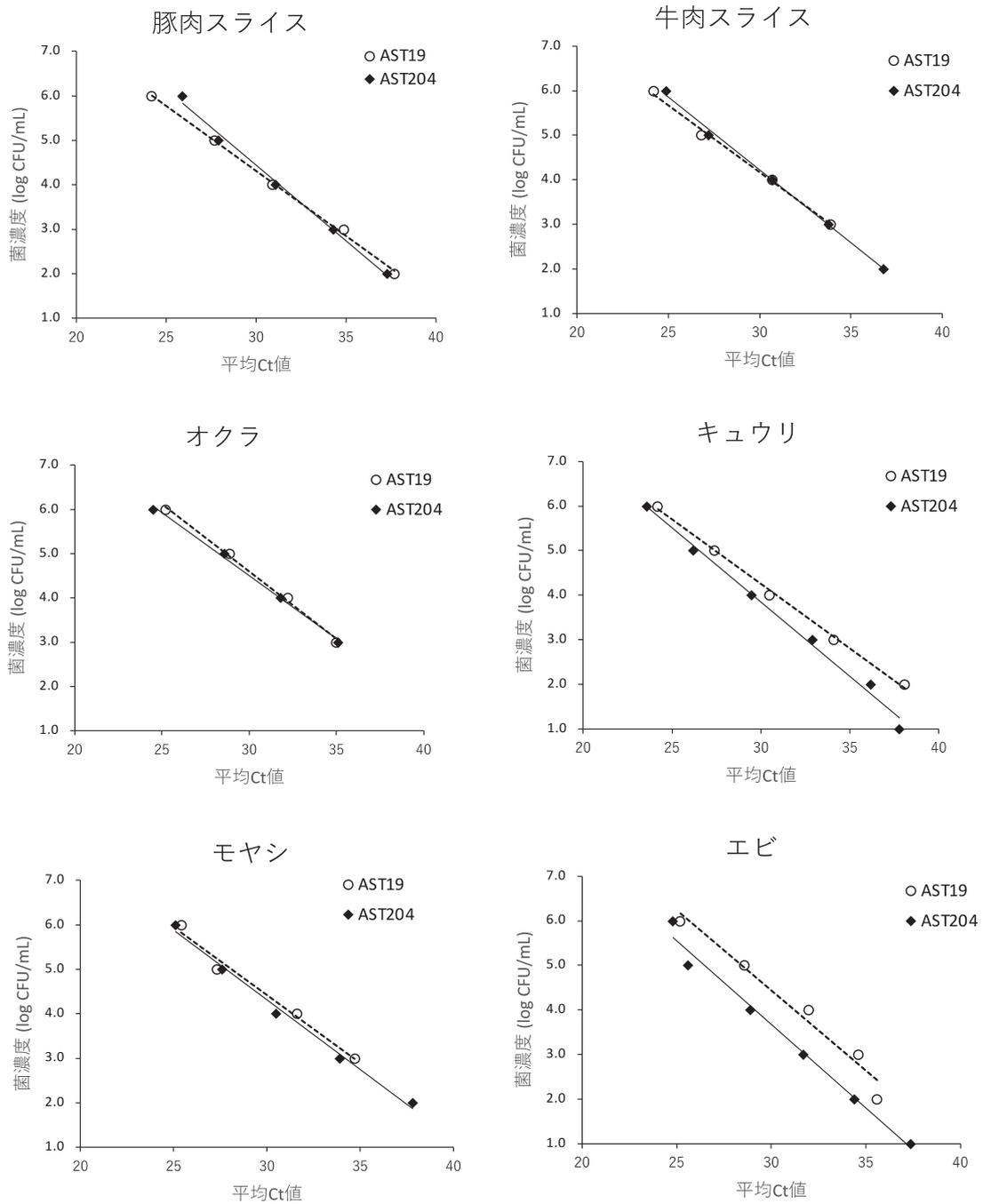


図 1. *astA* 保有大腸菌添加回収試験食品における *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検量線

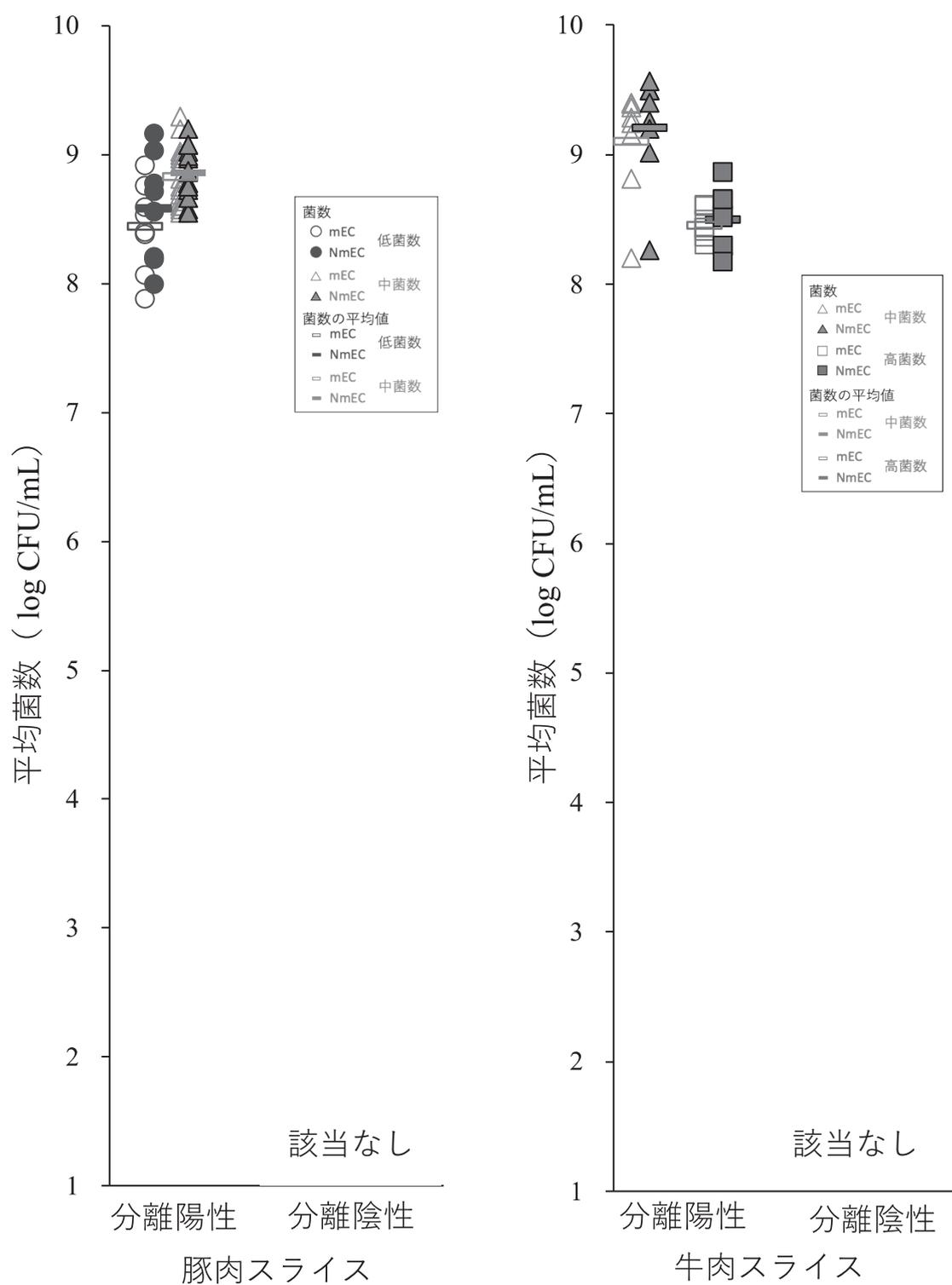


図 2. *astA* 保有大腸菌添加回収試験豚肉スライスおよび牛肉スライス培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数の推定

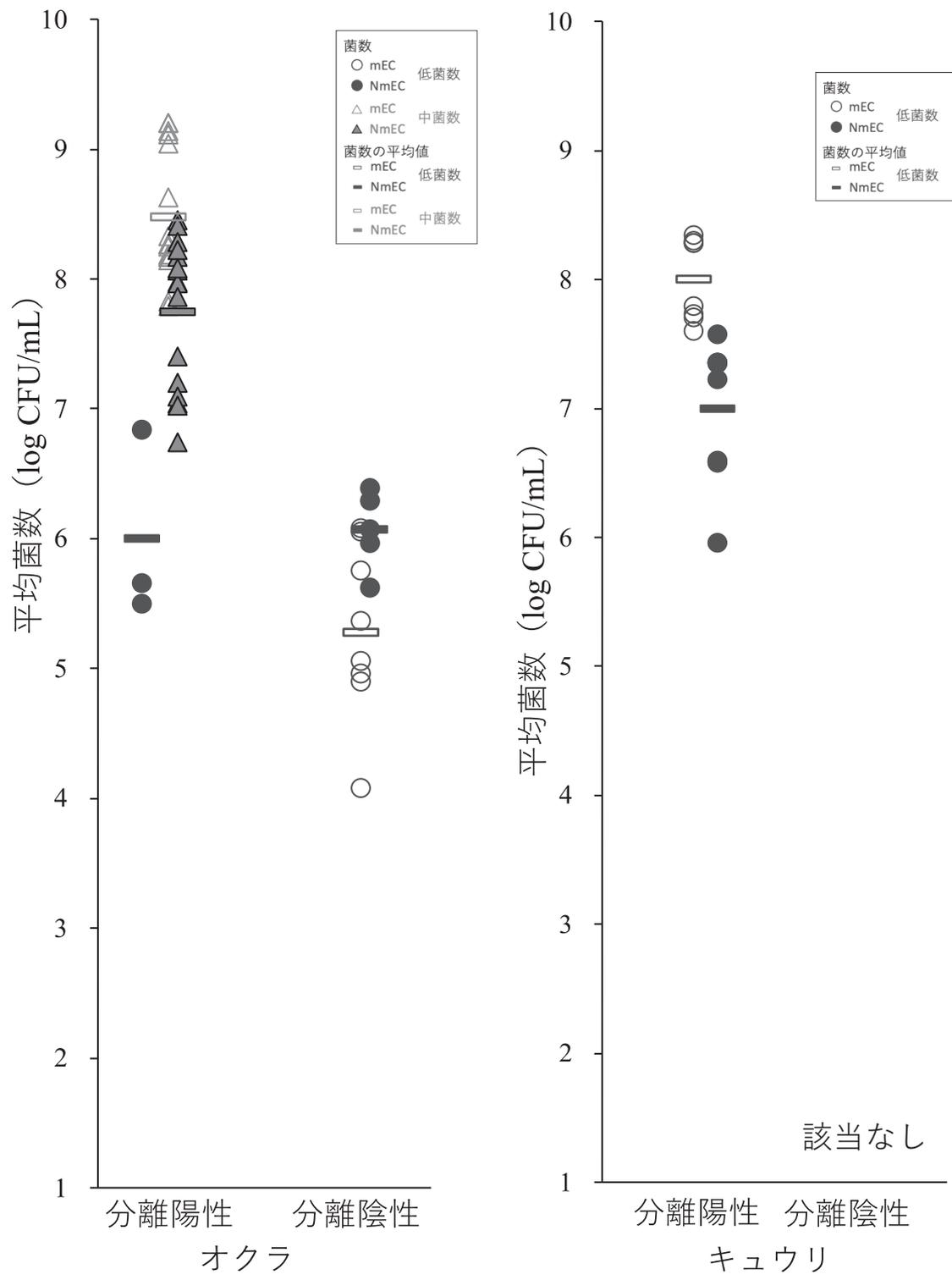


図3. *astA* 保有大腸菌添加回収試験オクラおよびキュウリ培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数の推定

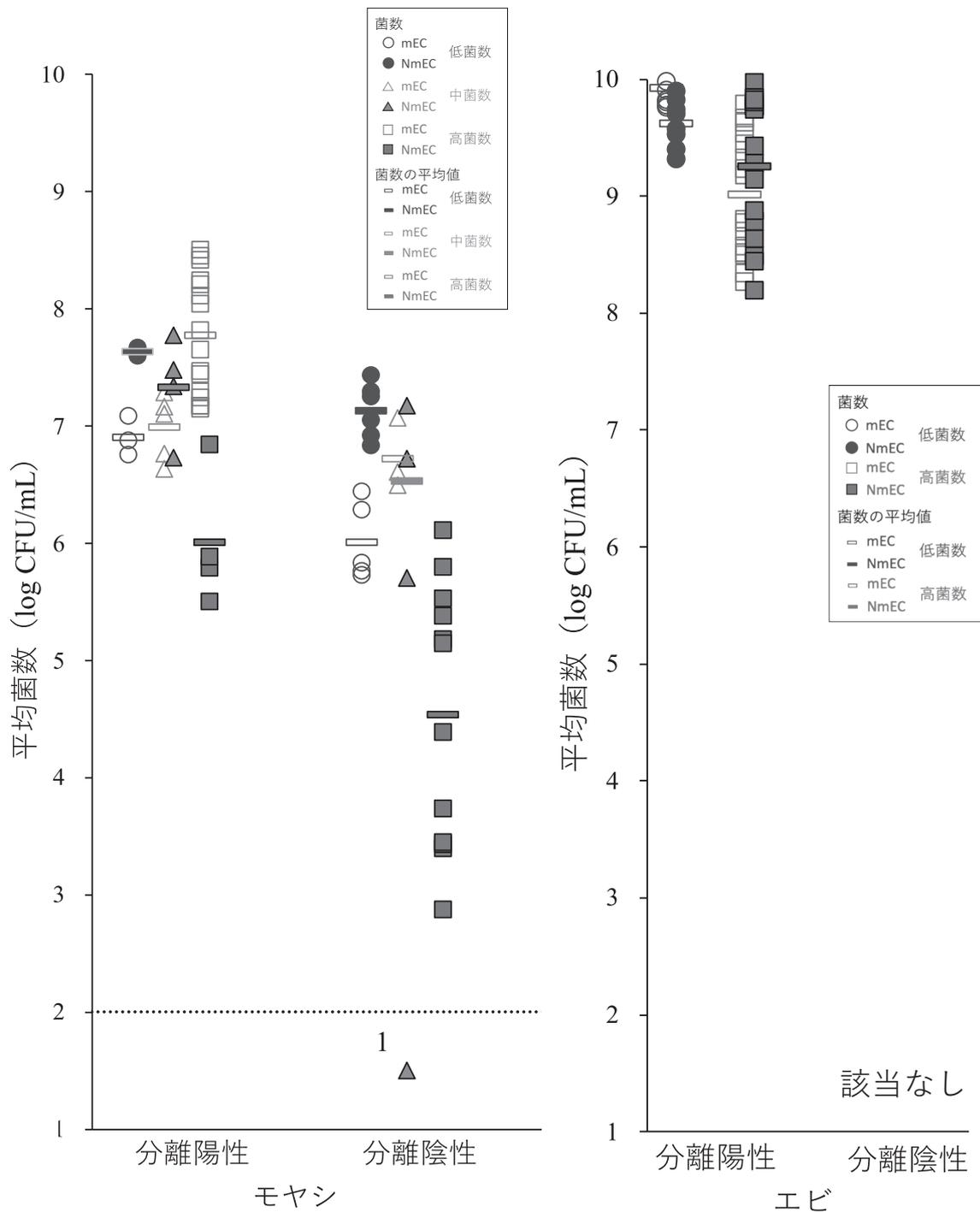


図4. *astA*保有大腸菌添加回収試験モヤシおよびエビ培養液中の *astA* 保有大腸菌菌数の推定

表 1. *astA* 保有大腸菌添加回収試験のモヤシにおける追試結果

菌数 レベル	食品	増菌 培地	PCR陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				PCR陽性コロニーが分離された 検体数/供試検体数(%)			
			C- SMAC	CHSTEC	C- CHSTEC	合計	C- SMAC	CHSTEC	C- CHSTEC	合計
中	モヤシ	mEC	<p>論文投稿前のため、 詳細な結果は 伏せさせていただきます。</p>							
		NmEC								
高	モヤシ 1	mEC								
		NmEC								
高	モヤシ 2	mEC								
		NmEC								

表 2. 令和 4 年度および令和 5 年度の *astA* 保有大腸菌添加回収試験の総合結果

菌数 レベル	食品	増菌 培地	PCR陽性コロニー数 /釣菌コロニー数(%)				PCR陽性コロニーが分離された 検体数/供試検体数(%)			
			C- SMAC	CHSTEC	C- CHSTEC	合計	C- SMAC	CHSTE C	C- CHSTEC	合計
低	5 食品 *	mEC	<p>論文投稿前のため、 詳細な結果は 伏せさせていただきます。</p>							
		NmEC								
中	4 食品 **	mEC								
		NmEC								
高	3 食品 ***	mEC								
		NmEC								

菌数レベル：低は7-18 CFU/25 g、中は30-93 CFU/25 g、高は105-307 CFU/25 g

\*5食品(5試験)：豚肉スライス、エビ、オクラ、キュウリ、モヤシ

\*\*4食品 (5試験)：豚肉スライス (2試験)、牛肉スライス、オクラ (2試験)、モヤシ

\*\*\*3食品(4試験)：牛肉スライス、エビ (2試験)、モヤシ (2試験)

表 3. *astA* 保有大腸菌食品分離株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型

検体	No.	増菌 培地	Og型別	Hg型別	株数	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	27	
		NmEC	Og8	未試験	2	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	11	
		NmEC	Og8	未試験	4	
	2	mEC	OgGp10	未試験	2	
		NmEC	Og113	未試験	17	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	1	
			Og21	未試験	2	
			Og45	未試験	1	
			Og86	未試験	11	
			OgGP9	Hg18	7	
			OgUT	未試験	10	
			NmEC	Og7	Hg4以外	4
				Og159	未試験	5
				OgGP9	Hg18	5
				OgGP9	Hg18以外	2
	OgUT	未試験		7		
	2	mEC		Og8	未試験	1
				Og21	未試験	4
				Og86	未試験	1
				Og125	未試験	1
				Og183	未試験	1
			OgGP7	未試験	6	
			OgGP9	Hg18以外	1	
			OgGP12	未試験	1	
			OgUT	未試験	1	
NmEC			Og9	未試験	2	
	Og15	未試験	2			
	Og33	未試験	1			
	Og157	Hg23	9			
	Og183	未試験	5			
	OgGP12	未試験	4			
	OgUT	未試験	7			

表 4. *astA* 保有大腸菌食品分離株が保有する病原因子関連遺伝子

検体	No.	増菌 培地	Og型別	Hg型別	病原 因子	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
	2	mEC	OgGp10	未試験	<i>astA</i>	
		NmEC	Og113	未試験	<i>astA</i>	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	<i>astA</i>	
			Og21	未試験	<i>astA</i>	
			Og45	未試験	<i>astA</i>	
			Og86	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP9	Hg18	<i>astA</i>	
			OgUT	未試験	<i>astA</i>	
			NmEC	Og7	Hg4以外	<i>astA</i>
				Og159	未試験	<i>astA</i>
				OgGP9	Hg18	<i>astA</i>
				OgGP9	Hg18以外	<i>astA</i>
	OgUT	未試験		<i>astA</i>		
	2	mEC	Og8	未試験	<i>astA</i>	
			Og21	未試験	<i>astA</i>	
			Og86	未試験	<i>astA</i>	
			Og125	未試験	<i>astA</i>	
			Og183	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP7	未試験	<i>astA</i>	
			OgGP9	Hg18以外	<i>astA</i>	
			OgGP12	未試験	<i>astA</i>	
			OgUT	未試験	<i>astA</i>	
NmEC			Og9	未試験	<i>astA</i>	
	Og15	未試験	<i>astA</i>			
	Og33	未試験	<i>astA</i>			
	Og157	Hg23	<i>astA</i>			
	Og183	未試験	<i>astA</i>			
OgGP12	未試験	<i>astA</i>				
OgUT	未試験	<i>astA</i>				

表 5. *astA* 保有大腸菌食品分離株が保有する *astA* バリエント

検体	No.	増菌 培地	Og 型別	Hg 型別	バリエント	
オクラ	1	mEC	Og8	未試験	増幅せず	
		NmEC	Og8	未試験	newtype6	
豚肉ミンチ	1	mEC	Og69	未試験	prototype	
		NmEC	Og8	未試験	v27	
	2	mEC	OgGp10	未試験	v6	
		NmEC	Og113	未試験	prototype	
鶏肉ミンチ	1	mEC	Og7	Hg4以外	prototype	
			Og21	未試験	v6	
			Og45	未試験	mix	
			Og86	未試験	mix	
			OgGP9	Hg18	mix	
			OgUT	未試験	1株: v6 他9株: v12	
			NmEC	Og7	Hg4以外	prototype
				Og159	未試験	v6
				OgGP9	Hg18	mix
				OgGP9	Hg18以外	mix
	OgUT	未試験		v12		
	2	mEC	Og8	未試験	v6	
			Og21	未試験	prototype	
			Og86	未試験	v29	
			Og125	未試験	v14	
			Og183	未試験	mix	
			OgGP7	未試験	prototype	
			OgGP9	Hg18以外	prototype	
			OgGP12	未試験	newtype5	
			OgUT	未試験	v12	
NmEC			Og9	未試験	v12	
	Og15	未試験	prototype			
	Og33	未試験	prototype			
	Og157	Hg23	newtype5			
	Og183	未試験	mix			
	OgGP12	未試験	newtype5			
	OgUT	未試験	1株: v6 他6株: v12			