

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 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

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* 検出性に優れるリアルタイム PCR 法を開発した。また、検出に優れる増菌培地と分離培地を検討した。(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、集団感染由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無などは見出せなかったが β -ラクタム系に対する耐性遺伝子を高頻度に保有することを明らかになった。臨床的に重要と考えられるバリエーションに関する病原性解析では、さらなる研究アプローチの必要性が示された。(3) 病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* 保有大腸菌の食中毒由来株にのみ共通する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかったが、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在する可能性が示唆された。(4) 食品中の病原大腸菌の汚染実態および制御法では、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。(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(0gGp9):H18 (疑い)」とされたが、本菌の病原性について付着因子や菌体外分泌機構がコードされたプラスミドなどが本菌の病原性に寄与することが示された。

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
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、齋藤和輝、木全恵子、磯部順子
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	大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉、西角光平

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 O157:H7 が分離され、この大腸菌が原因物質として疑われた。本菌の病原性の解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年度に続き令和５も継続して実施する。

B. 研究方法

〔１〕病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

（１）*astA* 保有細菌の性状等の解析

菌種未同定の *astA* 保有細菌を M

atrix-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、シーケンスにて *astA* 保有細菌の *astA* バリエーションタイプを特定し、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、各種 β ラクタム系薬剤や薬剤 C 添加クロモアガー STEC 培地 (CHSTEC) にて *astA* 保有大腸菌の生育を検討した。

（２）*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

昨年度作製しさらに改変した 4 つの Assay のうち配列上完全な *astA* バリエーションの増幅性に優れ、かつ、より新規性に優れた Assay を選択した。また、*astA* 保有細菌を供試し、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 *astA* 保有大腸菌を用いて菌株のみにて試験した場合と各種食品培養液にて菌株を希釈した場合の検出限界を求めた。

（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 食品の各検体 25 g 入 4

袋について Yamamoto らの *astA* 特異的 PCR 法 (*astA*PCR) を試験した。

② *astA* 保有大腸菌の添加回収試験では、モヤシ 16 検体に集団食中毒事例由来株菌液（中菌数および高菌数）を接種し、mEC または 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、大腸菌様コロニーに *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のモヤシ培養液を各種 β ラクタム系薬剤添加 CHSTEC に画線し培養後の生育コロニーを確認した。

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と各種食品培養液にて菌接種食品培養液を調製し、Assay 11r に供試した。菌数と Ct 値から検量線を作製し、令和 4-5 年度の各種食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。

⑤ 自然汚染検体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* 保有細菌株について菌種同定および各種遺伝子型別等を行った。

（４）腸管出血性大腸菌の食品での検査法

食品での検査法として通知されている方法（通知法）に記載の試薬やメーカー名等について、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。

[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）配列上完全な *astA* 遺伝子保有株に共通する因子の同定

配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションの保有株 395 株について、CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングを行い、共通因子の同定を試みた。

（２）集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染事例由来株について、*astA* 遺伝子バリエーションの共通性および AMRFinderPlus を用いて共通の薬剤耐性遺伝子や病原関連遺伝子の同定を行った。

（３）主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

機能解析および EAST1 蛋白質の機能解析のため、配列上完全なバリエーションについて N 末端に His タグを付加できる pETBA ベクターへのクローニングを行った。

（４）培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞

毒性試験

項目（3）で作成した形質転換体（高発現株）について、HeLa細胞を用いた毒性試験を行った。

（5）カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

カイコを用いて感染実験により項目（3）で作成した形質転換体（高発現株）の病原性解析を実施した。

[3]病原性大腸菌食中毒事例株の解析

（1）全ゲノム配列（WGS）による系統解析および完全長ゲノム配列の解析

15株の *astA* 保有大腸菌 0166:H15 の WGS、および公共のデータベースに登録されている同血清型のシーケンスデータを使用して SNP 抽出による系統樹の作製と Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定を行った。さらに、4株の 0166:H15（非集発由来 1株含む）および 2株の 07:H4 について完全長ゲノム配列の決定を行い、本配列を用いて、保有遺伝子の BLAST による比較、replicon typing、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。

（2）細胞付着因子の特定

食中毒由来 0166:H15 株（JNE21-003）のプラスミドを細胞非付着

性株に導入した株の細胞付着性の解析を行った。さらに、本菌についてトランスポゾンを用いた網羅的な遺伝子破壊株を作製し、当該破壊株による付着性試験前後の菌体から抽出した DNA の Tn-seq データを比較し、付着に関与する遺伝子の特定を試みた。

（3）特徴的な生化学的性状の探索

薬剤感受性試験（12 薬剤）、既存の分離選択培地（8 種類）による発育状況等観察、Phenotype microarray による炭素源利用能の測定（192 種類）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）最確数法による汚染菌量の推定

最確数法による *astA* 保有大腸菌の計数は、検体 25g に mEC 培地（栄研化学）を 225 mL 加え、これを 10 倍乳剤とし、5 本法で行った。42℃、22 時間、培養を行なった培養液から DNA を抽出し PCR を行い、*uidA* と *astA* の両方が検出

された試験管を陽性とした。陽性となった試験管の数から、*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定した。

(3) オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ 1 本につき 1×10^5 cfu のオクラ由来 *astA* 保有大腸菌を接種し、乾燥後、4℃、10℃、25℃に保管した。経時的にオクラを取り出し、菌数を計測した。

[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 の染色体およびプラスミドを、代表的な病原性大腸菌ゲノムと比較し、付着因子など病原性に関連する領域を BLASTN でアライメントを作成し Easyfig で可視化した。また、プラスミド脱落株の病原性をマウス腹腔内接種にて評価した。加えて、本菌の *eilA* 遺伝子発現や細胞付着性について検討した。

C. 研究結果

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) *astA* 保有細菌の性状等の解析

多くの株は、MALDI-TOF MS にて

大腸菌と同定されるも、*M. morgani*、*K. pneumoniae*、および *K. oxytoca* 菌株も含まれた。*astA* 保有大腸菌では、少なくとも 13 タイプの *astA* バリエントが確認された。既報の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法では大腸菌以外の細菌も検出された。選択分離培地の検討では、いずれの選択分離培地でも供試菌株は CHSTEC と同色のコロニーを形成した。

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

配列上完全な *astA* バリエントの検出性および新規性に優れる Assay 11r について、以降の試験を実施した。特異性試験では、配列上完全な *astA* バリエント保有大腸菌のみが Assay 11r にて *astA* および IC の両方が陽性であった。感度試験では、いずれの条件でも検出限界が $< 2.6 \log \text{ CFU/mL}$ 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、*astA* 陽性コロニーの割合は、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夾雑菌のコロニー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、定性試験で *astA* 陽性の培養液のうち、分離陽性培養液および分離陰性培養液でそれぞれ *astA* 保有大腸菌数が約 6 log CFU/mL および約 8 log 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 O 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 O 抗原遺伝子型の株が分離された食品が確認された。特に、鶏肉ミンチ由来株では、集団食中毒事例株と同じ O_gGP9:H_g18 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、少なくとも 8 種類の *astA* バリエーションを保有していた。

(4) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法

通知法に記載の試薬等の一部の販売が終了されており、リアルタイム PCR 機器に後継機が販売されていること等を確認した。

[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) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有株に共通する因子の同定

CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングの結果、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して存在すること、また、各バリエーションの周辺構造にも共通性が見られなかったことから、共通因子を同定することは出来なかった。

(2) 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかったが、薬剤耐性遺伝子に関しては、β-ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことを明らかに出来た。

(3) 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング
機能解析の準備として N 末端に His x6 タグが付加できる pETBA ベクターへのクローニングを行った。

(4) 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

pETBA ベクター単体（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換体（過剰発現株）との比較の結果、HeLa 細胞に対する細

胞毒性に有意差は見られなかった。

(5) カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

項目(3)で作成した形質転換体(高発現株)の感染によるカイコの感染 24 時間後の生存率は 100%であり、非病原大腸菌 K-12 株との差は見られなかった。

[3]病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) 全ゲノム配列(WGS)による系統解析および完全長ゲノム配列の解析

0166:H15 株のうち解析を行った多くの株は ST349 に分類されたが、食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。完全長配列の解析では、0166:H15 と 07:H4 は類似したプラスミドの保有が確認されたが、保有遺伝子比較では食中毒由来株にのみ特異的な領域は認められなかった。

(2) 細胞付着因子の特定

プラスミド導入株の解析により、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在している可能性が示唆された。Tn-seq データは染色体上の 4837 の遺伝子にマッピングすることで各遺伝子のカウント数を取得し、さらに必須性指数の算出も行った。付着性試験後でカウント数が減少していた遺伝子は

1194 種類存在した。

(3) 特徴的な生化学的性状の探索

astA 保有大腸菌 0166:H15 の簡便な分離検出法開発を目的として各項目を実施したが、利用可能な特徴的性状は確認されなかった。

[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) 食品中の *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定

今回は鶏肉、豚内蔵肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーン、それぞれ 35 検体を対象に、最確数法を用いて *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定を行った。

鶏肉は 35 検体中 32 検体(91%)が陽性となった。31 検体は 20~3477 MPN/100g であった。1 検体は定量限界値以上 (1.6×10^4 MPN/100g) であった。陽性検体中、62%の検体の汚染菌量は $10^2 \sim 10^3$ MPN/100g の範囲に分布していた。

豚内蔵肉は 35 検体中 17 検体(49%)が陽性となった。汚染菌量は 20~5422 MPN/100g の範囲であった。陽性検体中、76%の検体の汚染菌量は 10^2 MPN/100g 以下であった。

オクラは 35 検体中 7 検体(20%)が陽性となった。汚染菌量の範囲は 20~3476 MPN/100g であった。

汚染菌量は均一に分布していた。

ヤングコーンは 35 検体中 15 検体 (43%) が陽性となった。汚染菌量の範囲は 20~定量限界値以上であった。陽性検体の 53% は 10^2 MPN/100g 以下の汚染菌量であった。残りの 47% の汚染菌量は 10^3 以上であった。

(2) オクラにおける増殖挙動の解析

オクラ一本あたり 10^5 cfu/mL 接種したが、菌液を乾燥させたのち菌数を測定すると約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL に低下した。

25°C で培養した場合、培養 3 日目まで菌は増殖し、約 10^5 cfu/mL に達した。その後、菌数はやや減少したが $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL を培養 7 日目まで維持した。

10°C で培養した場合、菌数はほとんど変化せず、培養 7 日目でも約 $10^2 \sim 10^3$ cfu/mL を維持した。

4°C で培養した場合、培養開始直後から菌数が減少し、培養 3 日目には、菌は検出されなくなった。

[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

大腸菌 OUT (OgGp9):H18 が分子量約 104 kb の大プラスミドを有しており、付着因子および菌体外分泌機構がコードされていた。また、菌体

外分泌機構は、染色体上にも存在していることが示された。プラスミド脱落株を作製し、マウスに腹腔内接種した結果、50% が死亡し、プラスミド保有株では 100% 死亡であった。加えて、本菌の *eilA* 遺伝子発現や細胞付着性が CFA/III に起因することが示された。

D. 考察

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

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* 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* 保有大腸菌の検出性が低くその他細菌が検出され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

配列上完全な *astA* バリエーション特異的 Assay 11r において、*astA* および IC の両方が増幅される場合が *astA* 保有大腸菌陽性と判定されると考えられた。また、Assay 11r は検出性および定量性に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 または C-CHSTEC の組み合わせが適すると考えられた。リアルタイム PCR では、*astA* 保有大腸菌の分離のためには、増菌培養液中に log 8 CFU/mL 程度の菌数が必要と示唆された。増菌培地ごとに増殖しやすい菌株の存在が示唆されたため、食中毒事例の原因物質調査においては mEC および NmEC を併用することで、より効率に *astA* 保有大腸菌が分離されると考えられた。

(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 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。

[2] 病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する大腸菌株 395 株に関する解析では、各 *astA* 遺伝子バリエーションに共通する疫学マーカーとなる遺伝子の同定が困難であることが明らかとなった。集団感染由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性遺伝子・病原関連遺伝子の検索の結果、集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかったが、β-ラクタム系に対する耐性遺伝子を高頻度に保有することを明らかに出来た。臨床的に重要と考えられるバリエーションに関する病原性解析では、高発現株の培養上清を用いた細胞毒性試験ならびにカイコを用いた感染実験のいずれにおいても、有意な結果は得られず、病原性に関して異なる研究アプローチを検討する必要があることが明らかとなった。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の

解析

0166:H15株のうちST2914が病原性系統である可能性が示唆された。しかし、食中毒由来株にのみ共通する既知の付着関連遺伝子や病原性関連遺伝子は確認されなかった。一方で、付着に関与する遺伝子は染色体上に存在する可能性が示唆された。しかし、染色体上には4837もの遺伝子が存在し、そのうちTn-seqの比較解析においてカウント数が減少した遺伝子は1194種類も存在した。しかし、本解析により各遺伝子のデータ（カウント数や必須性指数）が取得されたことから、付着因子の特定のためにはこれらのデータを活用するなど、引き続き解析を行うことが重要であると考えられる。

[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

食品における*astA*保有大腸菌の汚染菌量を明らかにするために、昨年度の汚染実態調査で汚染率の高かった鶏肉、豚内臓肉、外国産オクラ、外国産ヤングコーンを対象に調査を行った。調査食品全体で見ると汚染菌量はほとんどの検体で $10^2 \sim 10^4$ MPN/100g範囲であった。鶏肉1検体とヤングコーン2検体だけが定量限界値以上

(1.6×10^4 MPN/100g)であった。鶏肉は昨年度までの調査結果と同様に汚染率が高く、また今回の調査で汚染菌量も高いことが明らかになった。これらの結果から、鶏肉は一般的に*astA*保有大腸菌に汚染されているものと考えられた。*astA*保有大腸菌に対策を考える場合、鶏肉は最も優先して対応しなければならない食品であると考えられた。豚肉内臓肉も汚染率は高かったが、汚染検体の76%は 10^2 MPN/100g以下であり、鶏肉と比べると汚染菌量は低かった。しかし、一部の検体では 10^3 MPN/100gを超えているため、注意が必要である。オクラは検体ごとに汚染菌量が分散しており、汚染菌量に特定の傾向は認められなかった。ヤングコーンは汚染検体の53%が 10^2 MPN/100g以下の汚染菌量出会ったが、残りの汚染検体は 10^3 MPN/100gを超えており、2検体は定量限界値を超えていた。この結果から、ヤングコーンは検体によって汚染菌量が大きく異なることが示唆された。検体によって汚染菌量が多い場合があるので、ヤングコーンを調理する場合は、十分に加熱を行う必要があると考えられた。

オクラとヤングコーンのうち、

オクラは生や浅漬けで喫食するため、オクラにおける *astA* 保有大腸菌の増殖について検討を行った。今回の結果から、オクラを 10°C 以下の環境で保管すれば、*astA* 保有大腸菌の増殖を抑制できることが明らかになった。オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推計から、市販されているオクラから最高 3×10^3 MPN/100g の *astA* 保有大腸菌が汚染していると考えられる。オクラ 1 本に換算すると、約 3×10^2 MPN の汚染があると考えられる。一方、増殖挙動の解析から、保管温度が高くと、オクラ 1 本あたり約 10^5 cfu/mL まで増殖できることが示唆される。このことから、市販のオクラも保管温度が高ければ、オクラ上の菌数の増加の可能性があると考えられた。

[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

本菌の染色体ゲノムと他の病原性大腸菌染色体ゲノムの詳細な比較解析により見いだされた領域は、主要ではないものの病原性に関与する領域であり病原性に関与することが考えられた。また、付着因子や菌体外分泌機構をコードする大プラスミドを有しており、この脱落

株を用いたマウス腹腔内接種では、死亡率が半分に減少することから、病原性に強く関与していることが明らかになった。加えて、*eilA* 遺伝子の発現や付着因子 CFA/III の病原性への関与についても知見が得られた。

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、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、配列上完全な *astA* バリエーション特異的リアルタイム PCR 法を新規に開発した。*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も有用と考えられた。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。*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、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。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、検出指標の同定と検査法の開発を進めた。しかしながら、同一バリエーションが大腸菌進化系統に散在しており、共通遺伝子を同定出来なかった。集団感染事例株ではβ-ラクタム系耐性遺伝子を高頻度に保有していた。また、病原性について、EAST1単独での機能は見られなかった。今後は*astA* 遺伝子が他の因子と協調的に働く可能性を検討するとともに、新たな検出指標を追加した検出系を構築する。分担研究[3]病原大腸菌食中毒事例株の解析では、血清型がO166:H15である*astA*陽性大腸菌に着目した解析により、ST2914が病原性系統である可能性が判明した。本菌の病原性究明のためには、引き続き付着因子の特定や病原性関連遺伝子の詳細な解析を行う必要がある。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、鶏肉、豚内蔵肉およびひき肉、オクラ、ベビーコーンの汚染菌量が明らかになった。この結果から、これらの食品は*astA*保有大腸菌の汚染率だけでなく、汚染菌量も高いことが明らかになった。*astA*保有大腸菌対策を行う場合には、これらの食品が最重要食品になると考えら

れた。オクラにおける*astA*保有大腸菌の増殖挙動の解析から、保管温度が適切でなかった場合、オクラの表面でも十分に増殖、生残できることが明らかになった。オクラは海外から輸入されているものが多く、輸入過程の温度管理が適切でないと、食中毒の原因になる可能性があることが示唆された。

[5]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(OgGp9):H18(疑い)」とされたが、本菌の病原性について検討を行い、本菌が保有するプラスミドが病原性に関与していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Hirose, S., Ohya, K., Yoshinari, T., Ohnishi, T., Mizukami, K., Suzuki, T., Takinami, K., Suzuki, T., Lee, K., Iyoda, S., Akeda, Y., Yahata, Y., Tsuchihashi, Y., Sunagawa, T., Hara-Kudo, Y. Atypical diarrheagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak.

- Epidemiology and Infection 11(151), e150, 2023.
- 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.
- Ooka T#, Lee K#, Gotoh Y, Arai S, Hara-Kudo Y, Hayashi T, Iyoda S, and Nishi J. Prevalence and characterization of the *astA* gene variants in *Escherichia coli* lineage. (投稿予定)
- (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
- Ohnishi, T. and Hara-Kudo, Y.

Contamination of *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail foods available in Japan. 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

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 食肉における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 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

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

大西貴弘, 新井沙倉, 廣瀬昌平, 工藤由起子. 野菜における *astA* 保有大腸菌をはじめとする病原大腸菌の汚染状況. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会. 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