

I．総 合 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 3 ～ 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

総合研究報告書

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、新興食中毒細菌として位置づけられる大腸菌近縁の *Escherichia albertii* および *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) 保有大腸菌を対象に 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、*E. albertii* 食品検査法をコロバレイティブ・スタディにて評価し、*astA* 保有大腸菌の食品検査法について、優れた増菌培養法および分離培養法を確立し、食品培養液からの *astA* 検出性に優れるリアルタイム PCR を開発した。食中毒事例における食品からこれら食中毒細菌の効率的な検出が期待される。(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* 遺伝子の多様性を中心に *astA* 遺伝子の特性を明らかにしたが、機能については今後の検討が必要であり、ゲノム上の他因子との関係が明らかにして新たな疫学マーカーの検出系を構築する必要がある。(3) 病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* 遺伝子の多くは *IS1414* 上に存在しており、様々な系統の株が水平伝播により獲得していること、0166:H15 および 0gGp9:H18 において CH0 および INT407 細胞への付着性が認められること、0166:H15 株において ST2914 が病原性系統であ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、*astA* 保有大腸菌は鶏肉、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンにおける汚染率が高いこと、オクラの表面で長期間生残できること、10℃以下の保管によって増殖が抑制されることが示された。(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、本菌の保有するプラスミドが病原性に寄与していることが明らかになった。

研究協力者

埼玉県衛生研究所	土井りえ、榊田 希、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
岩手県環境保健研究センター	山中拓哉
宮城県保健環境センター	佐藤千鶴子、山口友美、山谷聡子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀

福井県衛生環境研究センター	横山孝治
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
三重県保健環境研究所	小林章人
姫路市環境衛生研究所	新免香織
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
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
静岡市環境保健研究所	高橋直人
広島市衛生研究所	末永朱美、池田伸代
北九州市保健環境研究所	大羽広宣、藤崎道子、有川衣美
福岡市保健環境研究所	松永典久
熊本市環境総合センター	小畑裕子
(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、齋藤和輝、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	大屋賢司、廣瀬昌平、新井沙倉、 西角光平

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている。このため、平成 30 年から令和 2 年にかけて *E. albertii* の食品での検査法の検討、リアルタイム PCR の開発、食中毒事例での原因食品の解析、食品等における汚染実態調査、食品・環境中での挙動等について研究を実施した。その成果から地方自治体での食中毒対応に有用と考えられる食品の検査法を示した。本研究では、その方法を多機関で評価するために、地方自治体の試験研究機関とコラボレイティブ・スタディを令和 3 年に実施することとした。

また、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 人の患者をとまなう *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時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

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。

以上の背景のもとに、以下の4つの分担研究を実施することにした：

(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。本研究の対象である *E. albertii* および *astA* 保有大腸菌は、新興食中毒細菌として位置づけられ、特に日本での食中毒発生が特徴的であるため、これらの課題の研究を進めることによって、国内の食中毒予防対策の提案が可能になると考え、3年間の研究を行った。また、科学的な国内対策の取り組みを海外に発信するために成果を国際的に発表することが期待されている。

さらに、令和3年6月に富山市において、市内の小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。本菌の病原性の解明についての研究を令和3年度から緊急的追加研究として開始し、成果を得た。

B. 研究方法

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

11 試験検査機関が参加し、鶏肉またはモヤシ検体（高菌数接種3検体、低菌数接種3検体、非接種3検体）を供試し、セフィキシムおよび亜テレルル酸加 mEC 培地での増菌培養、RX-DHL、RX-MAC、DHL および MAC での分離培養、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR (IC を含む) にて *E. albertii* の検出性を評価した。試験結果を集計後、検出方法間の有意差検定を行った。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

4 種類 (Yamamoto ら、他) の *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (*astA*PCR) について食品における *astA* 保有大腸菌の検出に優れたプライマーおよび酵素を検討した。次に、増菌培地として mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC を、分離培地として薬剤 C を添加した培地等での *astA* 保有大腸菌の生育性を検討した。上記にて選定された各種方法を用いてさらに検討を進めた。具体的には、試験検体の *astA* 確認試験では、39 食品を供試し、検体 25 g 入りストマッカー袋を各 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* 保有大腸菌を各接種菌数レベル（低菌数接種、中菌数接種、高菌数接種）に調製し、16 検体へ接種した。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ンキー寒天培地 (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、大腸菌様コロニーへ *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た。また、後述の (4) にて開発の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法である Assay 11r を利用して各種食品培養液中の *astA* 保有大腸菌数を算出した。さらに、各種食品由来 *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。

(3) *astA* 保有細菌の性状等の解析
菌種未同定の *astA* 保有細菌を Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) にて菌種同定した。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 種類の既報の *astA*PCR 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 CHSTEC にて *astA* 保有大腸菌の生育を検討した。

(4) *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）を分担研究者の伊豫田および大岡と共同で特定した。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の一部は *astA* の配列が不完全と予想されるとの情報を得たため、不完全なバリエーションタイプが検出対象から除外される候補を設計した。設計した候補 Assay について、多数の菌株を用いて特異性を試験した。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。

(5) 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。

[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) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

下痢症患者由来の大腸菌約 3,000 株について、PCR による *astA* 遺伝子保有株のスクリーニングを行った。

(2) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

大腸菌のハウスキーピング遺伝子

7 遺伝子 (*adk*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd*) を標的とした系統解析を行った。

(3) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目(2)で作成した系統樹から比較的系統の異なる 31 株を選定し、MiSeq および MinION による全ゲノム配列取得を行った。

(4) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

NCBI データベース上の完全長配列決定大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を解析対象とし *astA* 遺伝子保有株を同定した。

(5) *astA* 遺伝子保有株 (計 749 株) に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

上記(4)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およびその局在等の詳細を解析した。

(6) *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 株についてゲノム系統解析を行い、同定された *astA* 遺伝子バリエーションを系統樹上にマップし、系統と分布を解析した。

(7) 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

各株からバリエーションが局在するプラスミドの配列を抽出し、GenomeMatcher3.04 の CompareSequences 機能を用いて比較した。

(8) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 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を保有する 395 株について、各バ

リエーションにのみ共通な遺伝子の抽出を試みた。

(9) 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と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共通の薬剤耐性遺伝子や病原関連遺伝子の同定を試みた。

(10) 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

昨年度同定した主要な *astA* 遺伝子バリエーションの機能を明らかにするため、T7 プロモーターで制御可能な発現ベクター pTEBA を用いてクローニングした。

(11) 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

HeLa 細胞を用い、項目(10)で作成した形質転換体と pETBA ベクターのみを入れた形質転換体 (陰性コントロール) による細胞生存性を検討した。

(12) 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、*astA* 遺伝子バリエーションの形質転換株と大腸菌 K-12 非病原株 (陰性コントロール) について感染後 24 時間後に生存率を評価した。

(13) *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌 (EAEC) に特異的な病原関連遺伝子の検索

ドラフトゲノム配列取得済み 31 株について、EAEC に共通するあるいは保存性の高い病原関連遺伝子群の同定を行った。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) ゲノム解析 (WGS) による国内

大腸菌の *astA* 保有状況調査および *astA* 検出用 PCR プライマーの改善

2007-2021 年に国内で分離され、ゲノム解読を行った大腸菌等 計 3,613 株を対象に WGS 解析により *astA* の検出を行った。また、既知および新規の *astA* 配列を検出可能なプライマー [*astA*-univ-F1 (5' - GYCATCAACRCAGTATATYCG-3'), *astA*-univ-R1 (5' - TCRCGAGTGAC KRCYYTGTA-3')] の設計も行った。本プライマーを用いて合計 32 株の *astA* 保有または非保有株から同遺伝子の検出を行った。

(2) 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 陽性大腸菌 26 株の WGS データを使用して SNP を抽出し、最尤法により系統樹の作製を行った。0166:H15 と 07:H4 株については、公共のデータベース (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) に登録されている同血清型のゲノムデータも用いて国際比較を行った。

(3) 完全長ゲノム配列の解析

astA 保有 0166:H15 4 株および 07:H4 2 株について、ロングリード解析とハイブリッドアセンブリにより完全長ゲノム配列を決定した。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。

(4) 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) とウェスタンブロッティングによって行った。

(5) 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傷害性お

よび細胞付着性の解析を行った。細胞傷害性については HeLa および Vero 細胞を使用した。細胞付着性は HEp-2, HeLa, CHO および INT407 細胞を使用した。

(6) Tn-seq 解析による細胞付着因子探索

細胞付着因子特定のため、JNE21-003 について Tn-seq 解析を実施した。トランスポゾン挿入により作製したランダムな遺伝子破壊株ライブラリーから抽出した DNA サンプルを input、破壊株ライブラリーを用いた付着性試験の実施後に回収した菌体から抽出した DNA サンプルを output として各サンプルについて Tn-seq によるシーケンスデータを取得した。

(7) 薬剤感受性試験および生化学的性状試験

17 株の *astA* 保有大腸菌株を対象に 12 の薬剤についてディスク拡散法にて薬剤感受性試験を実施した。生化学的性状は、XM-G, SS, DHL, SMAC, RX-026, クロモアガー STEC, Vi-EHEC, XM-EHEC の各培地に画線塗抹を行い、発育状況やコロニーの色調等観察、および Phnotype microarray (Biolg 社) のプレートにより 192 種類の炭素源利用能の測定を行った。

[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

食品からの病原性大腸菌の分離は次の手順で行なった。検体 25 g に mEC 培地を 225 mL 加え、ストマッカー処理し、42℃、22~24 時間、増菌培養を行なった。培養液から DNA を抽出し、Müller らの方法 (Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73, 3380-3390) でスクリーニング 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。分離菌株は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。分離菌株のO遺伝子型別は、井口らの方法(J. Clin. Microbiol., 2015, 53, 2427-32)に従い、PCRによって行なった。食品における *astA* 保有大腸菌の汚染菌量の推定には最確数法を用い、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、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。

オクラにおける増殖挙動の解析には、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。

C. 研究結果

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

リアルタイムPCR法の検出感度は、全条件で1.0であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、いずれの培地でも約0.94以上であり、高菌数接種で全分離培地で1.0であった。モヤシ検体の低菌数接種では、RX-DHL および RX-MAC で約0.7、DHL および MAC で約0.55であり、高菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で0.94以上であり、DHL および MAC で0.85以上であった。また、釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割

合は RX-DHL で 522/581 (89.8%)、RX-MAC で 548/615 (89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796 (50.8%) であった。モヤシ検体での DHL および MAC の検出感度は、リアルタイムPCR法よりも有意に低く、MAC は RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。鶏肉検体での DHL および MAC の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出感度が有意に低かった。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

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。増菌培養法の検討では、薬剤 AB 添加培地での増殖が抑制されることが示された。分離培地の検討では、薬剤 C を添加した分離培地での生育良好であったためこれら培地を以降の試験に用いた。試験検体の *astA* 確認試験では、48/156 検体 (30.8%) が *astA* 陽性であった。添加回収試験では、C-SMAC を用いた場合は分離陽性率が他の条件よりも低かった。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。また、*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。さらに、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 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、鶏肉ミンチ由来株では、集団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、少なくとも 8 種類の *astA* バリエーションを保有していた。

(3) *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、*Morganella morganii*、*Klebsiella pneumoniae*、および *Klebsiella 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* バリエーションが確認された。既報の *astA* PCR 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。

(4) *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、バリエーションの種類としては、prototype が最も多くの株で保有されていた。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 種類および不完全なバリエーション以外の全 *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、設計された候補が目的のバリエーション特異的に増幅することを確認した。配列上完全な *astA* バリエーション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。IC も加えた特異性試験では、配列上完全

な *astA* バリエーション保有大腸菌のみが 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。

(5) 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) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、検証した 194/2970 株 (7.1%) が *astA* 遺伝子陽性であった。

(2) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

MLSA 解析の結果、*astA* 遺伝子保有株は大腸菌進化系統の中で幅広い系統に存在していることが明らかとなった。

(3) 進化系統の異なる鹿児島県保有 *astA* 遺伝子保有 31 株の完全長ゲノム配列解析

MiSeq と MinION によるハイブリッドアセンブルした結果、18 株の完全長ゲノム配列を取得することが出来たが、残り 13 株は完全長配列を取得できなかった (表 1)。

(4) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

713/9,065 株が既知の *astA* 遺伝子バリエーションもしくはそのホモログを保有していた。

(5) 抽出した *astA* 遺伝子保有株

に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

astA 遺伝子バリエーションを計 35 種類同定し、各バリエーションの遺伝子構造、各バリエーションの保有株数とその局在、株あたりの各バリエーションのコピー数、各バリエーションが存在する挿入配列 IS1414 の構造などの特徴を明らかにした。

(6) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

astA 遺伝子バリエーションの多くは大腸菌の進化系統に偏りなく散在していることがわかった。また、5' 末端が欠失している *astA* 遺伝子は進化系統 A と E に多くみられた。

(7) 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存在する株について株間のプラスミド構造を比較した。一例として、バリエーション V24 は異なる系統に属する 7 株では、①のグループに属する 5 株のプラスミドは非常に類似性が高いが、①②③のグループ間では部分的な類似性しか検出されなかった。

(8) 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

各バリエーションを詳細に比較したが、共通因子を同定することは出来なかった。

(9) 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と病原関連遺伝子の同定

07:H4 株ではプラスミド上、0166:H15 株では、染色体上に *astA* 遺伝子が見られたが、バリエーションタイプもプラスミド構造も異なっていた。それ以外の血清型については、*astA* 遺伝子バリエーションの種類も多

様であり、共通性はみられなかった。共通の特徴として、 β -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有率が高かった。

(10) 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

35 種類の *astA* バリエーションのアミノ酸配列比較の結果、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。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、発現ベクターへのクローニングを行った。

(11) 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

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)の間で細胞毒性に有意差は見られなかった。

(13) カイコへの感染実験による病原性解析法の確立(予備的な解析)

非病原株(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株(高発現株)はいずれも生存率が 100%であった。

(14) *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

EAEC では、線毛と毒素を少なくとも 1 つずつ保有することが分かった。また、線毛は、既知のものとアミノ酸配列相同性が 50-70% 程度の遺伝子が 3 種類同定された。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

(1) ゲノム解析による国内大腸菌の *astA* 保有状況調査および *astA* 検

出用 PCR プライマーの改善

astA は供試菌株の約 3% で保有が認められ、8 割以上の株は IS1414 トランスポゼース配列中に存在した。*astA* 配列の解析から新たに 11 種の変異型を同定した。026:H11 と 0115:H10 は比較的高率に *astA* を保有しており、026:H11 は *astA* 保有株のうち 45 株 (86.5%) が同一の系統に属していたが、本系統株の *astA* は IS1414 上に存在していないため、同遺伝子を獲得した祖先株から垂直伝播している可能性が示唆された。0115:H10 は ST10 と ST101 の異なる系統に分けられるが、*astA* 保有株はいずれも ST10 に属していた。新たに設計したプライマーを用いて *astA* 保有および非保有大腸菌 32 株を対象に検証を行った結果、*astA* 保有株にのみ陽性が検出された。

(2) 集団下痢症事例由来大腸菌の系統解析

所内に保管される 9 件の事例から分離された 26 株の系統解析では、いずれも食中毒等事例間の関連性は低いことが示唆された。公共データベース上のゲノムデータを用いた系統解析のうち、07:H4 株についてはカタル由来株 (20-21 SNP) が最も近縁であり、次いでレバノン、タンザニアおよび中国由来株が確認された。一方、0166:H15 株については 4 種類の MLST が検出されたが、食中毒由来株はいずれも ST2914 に分類された。ST2914 の系統は日本以外でも複数の国から分離された株が含まれていた。

(3) EAST1 発現解析

ウェスタンブロッティングの結果、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、陰性対照の JM109 株ではシグナルが見られなかった。

(4) 培養細胞を使用した *astA* 陽性大腸菌の表現型の解析

細胞傷害性試験では非病原性株または pGEM-*astA* 導入株との比較を行ったが、大きな差は認められなかった。細胞付着性試験のうち HEp-2 および HeLa 細胞を使用した試験ではいずれも細胞付着性は認められなかったが、CHO および INT407 細胞を使用した試験では、0166:H15 または 0gGp9:H18 である 5 株が細胞への付着性を示し、07:H4 および 0169:H45 の 4 株においては細胞に非付着性であった。

(5) 完全長配列の解析

染色体のサイズは 0166:H15 は 4.8-5.1 Mb、07:H74 は 4.7 Mb、保有プラスミドは 1 から 4 までであった。*astA* は染色体または 100kb 以上の巨大プラスミド上に 1 から 3 コピー認められた。0166:H15 では *astA* 保有プラスミド上に多数の薬剤耐性遺伝子が認められ、07:H4 では染色体上に薬剤耐性遺伝子が存在した。プラスミドの CDS の比較から、食中毒由来 0166:H15 および 07:H4 は類似したプラスミドを有することが明らかとなった。

(6) Tn-seq 解析による細胞付着因子探索

Tn-seq により取得したシークエンスデータを用いて Tn-seq Explorer による解析を行うことでカウント数と必須性指数の算出を行った。染色体上の 4837 の遺伝子ごとのカウント数から output/input の値を算出したところ、0.9 以下となる遺伝子は 1194 種類存在し、必須性指数が 8 以上の遺伝子は 1078 種類存在

した。

(7) 薬剤感受性試験および生化学的性状試験

薬剤感受性試験の結果、0166:H15株では3事例のうち2事例は同一耐性パターンを示した。また食中毒8事例のうち5事例由来株はアンピシリン耐性を示した。生化学的性状試験のうち、培地へ画線塗抹を行った結果から、大腸菌 0166:H15 は CT 添加培地に発育しないことが確認され、発育が可能であった培地では特徴的なコロニーや性状は認められなかった。Phenotype microarray の結果から、MacConkey 基礎培地等への添加により容易に作成可能な分離培地の開発に有用となる糖に着目して評価を行ったが、条件に合うもの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

食品における病原性大腸菌の汚染実態調査を行った。肉、野菜、魚介類、乾物を PCR でスクリーニングした。鶏肉の陽性率が高く、31 検体全てがスクリーニング PCR 陽性 (100%) となり、*astA* は全ての検体から検出された。鶏肉からの分離株 36 株のうち 33 株 (92%) は *astA* を保有していた。豚肉、特に内臓肉も陽性率が高く 40 検体中 29 検体 (73%) がスクリーニング陽性となり、21 検体 (53%) から菌分離を行うことができた。豚内臓肉からの分離株全てが *astA* を保有していた。魚介類では、エビの *astA* 陽性率が高く、10 検体中 3 検体 (30%) がスクリーニング PCR で *astA* 陽性となった。

外国産生鮮野菜のうち、ヤングコーンとオクラで強い汚染が認められた。ヤングコーンは 29 検体中 19 検体 (41%) がスクリーニング PCR

で *astA* 陽性となり、4 検体から菌分離を行うことができた。オクラは 36 検体中 11 検体 (30%) で *astA* 陽性となり、5 検体 (14%) から菌分離を行うことができた。他にパプリカ、レモングラス、アスパラガス、アボガド、スナップエンドウからスクリーニング PCR で *astA* が検出された。また、国産スプラウト 30 検体中 1 検体 (3%) からスクリーニング PCR で *astA* が検出された。*astA* 保有大腸菌の汚染菌量を推定したところ、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、豚内臓肉、オクラ、ヤングコーンの平均菌数はそれぞれ 1,313,559,380,742 MPN/100g 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。

今回の汚染実態調査から計 120 株が分離された。0 遺伝子型別を行ったところ、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。

オクラにおける *astA* 遺伝子保有大腸菌の増殖挙動を調べたところ、4℃および 10℃では接種後、菌数の増加は認められなかった。しかし、25℃では接種 2 日後まで菌数が増加したのち平衡状態になり、1 週間後まで維持された。

D. 考察

[1] 病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

(1) 食品での *Escherichia albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

E. albertii が検体あたり 80 CFU

以上であれば食品から高率に検出が可能であることが判明した。約 18 CFU でも、リアルタイム PCR 法で高率に検出されること、鶏肉では高率に分離も可能であることが示された。しかし、モヤシでは、分離培養法で分離されない検体もあった。リアルタイム PCR 法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示されたことから、リアルタイム PCR 法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されると考えられた。

(2) *astA* 保有大腸菌の食品検査法の検討

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。添加回収試験では、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。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 を併用し CHSTEC または C-CHSTEC で分離培養することで、より効率に *astA* 保有大腸菌が分離されると考えられた。

(3) *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。

(4) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発

配列上完全な *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。配列上完全な *astA* バリエーションの検出性および新規性に優れる Assay 11r について詳細に検討したところ、*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。

(5) 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

astA 遺伝子保有頻度の解析から、約 7.5% (907/12,035 株) が当該遺伝子を保有していること、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在することを明らかにした。また、35 種類の遺伝子バリエーションの詳細な解析から、①保有株数の多い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 は欠損しており、不完全であると考えられること、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 5' 末端が完全に欠損している *astA* 遺伝子を保有する株を含めるとほとんどの大腸菌進化系統に偏りなく散在していることがわかった。加えて、⑥ 株間のプラスミド比較から、同一バリエーションをコードしているプラスミド構造にも共通性が低いこと、⑦ prototype, V2, V7, V31, V32 をコードする挿入配列 IS1414 は intact な構造であるがそれ以外は欠損していた。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、今後は、実際に病原性に寄与しているバリエーションのみを識別出来る検査法が必要であることが示唆された。また、臨床的・疫学的に重要なバリエーションとそうでないものを識別する必要性もあることが明らかとなった（今年度中に論文投稿予定）。

集団感染由来株に特化して *astA* 遺伝子バリエーションの共通性を解析した結果、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、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が明らかとなった。

コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエーションについての病原性に関する解析では、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なかった。ゲノム上の他の因子

と協調的に働く可能性も否定できないことから、今後、異なる研究アプローチを検討する必要があると考えられた。

[3] 病原性大腸菌食中毒事例株の解析

astA 保有大腸菌の病原性解析のため過去 15 年分の大腸菌から取得したゲノムデータ、および食中毒事例由来株を複数用いて解析を行ったことで、*astA* は大腸菌の約 3% から検出されること、*astA* 保有大腸菌は系統的に多様であること、さらに一部の血清型の食中毒事例由来株が培養細胞に付着性を示すことなどを明らかにした。しかし、生化学的性状等試験では 0166:H15 株の分離検出法に利用可能な性状等は検出されなかった。一方で、病原性究明を目的としたゲノム解析や表現型の解析により有用なデータを取得することができた。

astA 保有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や、同菌は広く分布していることも示唆された。大規模食中毒由来大腸菌 07:H4 の国際ゲノム比較では、比較的近縁な株が中東、アフリカおよび中国で見いだされた。しかし、これらの株についての疫学情報は入手できなかったため、直接的な関連性は不明であるが、遺伝的に近縁な株が国際的に分布している可能性がある。

ウェスタンブロッティングの解析結果からいずれの *astA* 保有大腸菌株も EAST1 を産生している可能性が示唆された。しかし、細胞傷害性試験では、検討した条件では EAST1 による傷害性を示す結果を得ることができなかった。一方で、細胞付着

性試験では、食中毒事例由来 0166:H15 株と 0gGp9:H18 株が CHO および INT407 細胞への付着性を示し、細胞への付着性は本菌の病原性に関与している可能性も考えられる。

0166:H15 株に着目した系統解析から、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。細胞付着性の解析においても食中毒事例由来株 (ST2914) が細胞付着性を示したことも病原性系統を示唆する裏付けとなっている。また、公共データベース上の疫学情報から、ST2914 に分類される株は国外にも分布している可能性が示唆された。しかし、ゲノム解析からは食中毒事例由来株のみが共通して保有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、付着因子特定のため実施した Tn-seq 解析では、output/input の値が 1 より少ない遺伝子は 1194 種類存在した。これらの遺伝子から、より可能性が高い遺伝子のみを抽出することで、付着因子が特定される可能性があると考えられる。今後、本菌の付着因子が特定されれば、各検査機関で利用可能となる簡便な検出系の確立が可能となることから、引き続き解析を行うことが重要である。

[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

鶏肉は *astA* 保有大腸菌の汚染率および汚染菌量が高かったことから、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、注意が必要であると考えられた。

輸入野菜では、ベビーコーンとオクラにおける *astA* 陽性率が高く、重度の汚染が示唆された。ヤングコーンは汚染検体の 53% が 10^2 MPN/100g 以下であったが、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。

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。

オクラを 10°C 以下の環境で保管すると、*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、オクラ 1 本あたり約 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、保管温度が高いと、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た。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。

鶏肉、豚内臓肉、オクラやベビーコーンなどで *astA* 保有大腸菌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

り発生していないと考えられる。今後、*astA* の機能を明らかにし、病原因子としての *astA* の役割を解明していく必要があると考えられた。

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、食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディを実施し、優れた方法を示した。また、*astA* 保有大腸菌の食品検査法を検討し、優れた増菌培地や分離培地を明らかにした。さらに、食品からの *astA* 遺伝子検出に優れるリアルタイム PCR 法を開発した。加えて、腸管出血性大腸菌の食品での検査法について、現在の通知法の試薬や機器について現状に即した変更が必要であることが考えられた。

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* 遺伝子の多様性と大腸菌進化系統における分布など、*astA* 遺伝子の特性を知ることが出来た。しかしながら EAST1 の病原性について、少なくとも単独で機能するという知見を得ることは出来なかった。今後は *astA* 遺伝子がゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性についても検討し、同定された場合には新たに疫学マーカーとして追加した検出系を構築する必要がある。

分担研究(3)病原大腸菌食中毒事例株の解析では、*astA* は国内分離大腸菌にも広く分布し、さらに *astA* 保有大腸菌は系統的に多様であることが明らかとなった。血清型が O166:H15 である *astA* 陽性大腸菌については、細胞付着性を示すことが明らかとなり、ST2914 が病原性系統である可能性が示唆された。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、輸入野菜など多くの食品で *astA* 保有大腸菌が高率に分離された。しかし、これらの食品が原因と考えられる *astA* 保有大腸菌による食中毒事例はほとんどないと思われる。このため *astA* 自体は病原性に参与していない、あるいは病原性を発現するためには *astA* に加えて他の因子が必要である可能性が示唆された。以上の結果から、*astA* は食中毒原因菌のマーカーとして、適切でないと考えられた。

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、本菌の保有するプラスミドが病原性に寄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)

Nguyen, T.K., Bui, H.T., Truong, T.A., Lam, D.N., Ikeuchi, S., Ly, L.K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. International Journal of Food Microbiology. Mar 2;341, 109049, 2021.

Ohnishi T., Hara-Kudo Y.: Presence and quantification of pathogenic *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail meats available in Japan.

- Letters in Applied Microbiology 73, 81-87, 2021.
- Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in retail fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 62(3), 94-99, 2021.
- Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. Journal of food protection 85(1), 173-179, 2022.
- 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 outbreak. 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.
- 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)

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子．市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第94回日本細菌学会総会．令和3年3月29-31日．オンデマンド
新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii* 特異的リアルタイムPCR法の開発と鶏の保菌状況調査．第164回日本獣医学会学術集会．令和3年9月7-13日．オンデマンド

新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子．*Escherichia albertii* 特異的リアルタイムPCR法の開発と市販鶏肉の汚染実態調査．第42回日本食品微生物学会学術総会．令和3年9月21日-10月20日．オンデマンド

廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、小椋容子、工藤由起子．*Escherichia albertii* に適する選択増菌培地の開発．第117回日本食品衛生学会

学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子．市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査．第117回日本食品衛生学会学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

大西貴弘、工藤由起子．市販食肉中におけるアルコバクター属菌とカンピロバクター属菌の定量．第117回日本食品衛生学会学術講演会．令和3年10月26日-11月9日．オンライン

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
- 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