

令和 7 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)

食中毒原因病原大腸菌の検査法の整備及び
食中毒対策推進のための研究
研究代表者 工藤由起子 星薬科大学

分担研究報告書
病原大腸菌の特性解析
研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

協力研究報告書
市販オクラの *astA* 保有大腸菌の汚染実態

研究要旨

近年、日本では、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である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。しかし、*astA* 保有大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、本菌による食中毒事例では、原因食品が不明であることが多い。原因食品特定に対応するためには、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が必要である。そこで、市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態を明らかにするとともに、増菌培地および分離培地を比較した。また、分離株について O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型別、*astA* バリエーション解析を行い、遺伝子的多様性について解析した。分離株の 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り、mEC 培養と NmEC 培養で遺伝子型の構成が異なっていた。以上のことから、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、増菌培地として mEC 培地および NmEC 培地を併用することで *astA* 保有大腸菌をより広範囲に検出することが可能であると考えられた。

研究協力者

星薬科大学

荒木靖也、伊藤彩花、佐伯英莉衣、
佐藤菜々美、森谷悠衣、天野壮俊、
大塚佳代子、奥輝明、築地信

国立医薬品食品衛生研究所

新井沙倉、廣瀬昌平、大西貴弘

A. 研究目的

近年、日本では、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である *astA* を保有する大腸菌による大規模食中毒が発生している。食中毒細菌の食品検査では、培養法によっては食品由来細菌が優勢に増殖し、対象となる食中毒細菌の分離が困難な場合がある。そのため、食中毒の原因食品究明には、対象となる食中毒細菌に適した培養法の選択が重要である。そこで本研究では、市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態を明らかにするとともに、増菌培地および分離培地を比較することを目的とした。また、分離株について、O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型別、*astA* バリエーション解析を行い、遺伝子的多様性について解析した。

なお、*astA* 保有大腸菌の増菌培養の温度条件については事前に検討し、37℃より 42℃が優れていることを確認して本研究に採用した。また、分離培地であるソルビトールマッコンキー寒天培地およびクロモアガー STEC 培地への薬剤 A 添加濃度は、令和 3 年度の検討結果等をふまえて決定した。

B. 研究方法

[1] 市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

(1) *astA* スクリーニング試験

1) 食品検体

スーパーマーケットや青果店にて購入したオクラ国内産 5 食品および外国産 6 食品の計 11 食品を供試した。

食品 (550 g 以上) を滅菌トレーなどの上で細切した後に均一化し、食品 10 g を量り取ったストマッカー袋を 1 袋と食品 25 g を量り取ったストマッカー袋を 20 袋用意した。各食品の一般生菌数および大腸菌群数を計測するために、10 g を秤量したストマッカー袋に、滅菌リン酸緩衝液 (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 倍段階希釈して $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 希釈液を調製した。 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 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。

また、XM-G 寒天培地の赤 (ピンク ~ 赤紫) コロニー数を計測し、食品 1 g あたりの大腸菌群数を算出した。

2) *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法

食品を秤量した 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 は $10,000\times g$ 10 分間遠心して上清を除き、50 mM NaOH を 100 μL 添加して再浮遊させた。 100°C で 10 分間加熱し、冷却後、1M Tris-HCl (pH 7.0) を 16 μL 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 μL をテンプレート DNA とし（アルカリ熱抽出）、*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 1 検体につき 2 反応実施した（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 μM となるよう調製して用いた。反応条件は 94°C 2 分の熱変性ののち、 94°C 30 秒－ 55°C 30 秒－ 68°C 1 分を 30 サイクル繰り返し増幅反応させ、最後に 68°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（図 1）。

（2）*astA* 保有大腸菌の分離試験
（1）の 2）で 4 袋のうち 2 袋以上が陽性となった 2 食品を供試した。

各食品を 2 種類の増菌培地中で培養し、その培養液を *astA* 特異的 PCR 法および分離培養法を行った（図 2）。

1）*astA* 特異的 PCR 法

冷蔵保管していたストマッカー 16 袋のうち 8 袋に mEC 培地を、8 袋に NmEC 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。

各増菌培養液 0.1 mL から（1）の 2）と同様のアルカリ熱抽出によってテンプレート DNA を 16 検体作製し、*astA* 特異的 PCR 法に供試した（n2）。

2）分離培養

分離培地は、ソルビトールマッコンキー寒天培地（SMAC、OXOID）に薬剤 A を添加した A-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 CHSTEC に薬剤 A を添加した A-CHSTEC を用いた。16 検体の増菌培養液を各 2 枚の A-SMAC、CHSTEC および A-CHSTEC に画線塗抹し、 37°C 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、A-SMAC では赤色のコロニー、CHSTEC および A-CHSTEC では藤色のコロニーを各培地あたり最大 10 個選択し、CHSTEC に単離し、 37°C にて 18 時間培養した。

3) コロニーの *astA* 保有確認

2) で単離した CHSTEC 上の藤色コロニーを DW100 μ 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) の 2) と同様の条件で *astA* 特異的 PCR 法を実施した (n1)。

4) 生化学的性状の確認

3) の *astA* 特異的 PCR 法で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て大腸菌の生化学性状と一致することを確認した。

5) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による大腸菌の同定

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有菌株 84 株を供試した。 *E. coli* ATCC8739 (NBRC3972, ESC703) 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

所) を 10 mg/mL の割合で溶解し、調製した。供試株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。菌体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* ATCC8739 (NBRC3972, ESC703) 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] 分離株の遺伝子的多様性の解析

(1) O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有大腸菌株 84 株を供試した。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。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、バンドを確認した。

(2) *astA* バリエーションの特定

1) 供試菌株

生産国、増菌培地、分離培地、O抗原遺伝子型およびH抗原遺伝子型を元に代表菌株 29 株を選定した。

2) 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)) 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 10 μ M に調製した。98°C 10 秒の熱変性のうち、98°C 10 秒－55°C 5 秒－72°C 30 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。この際、目的のバンドが確認されなかった菌株については、異なるプライマー(論文投稿中)を用いて同様の操作を行った。ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシュサイエンティフィック) によって PCR 産物を精製した。その後のシーケンス解析は FASMAC((株)ファスマック) に委託した。決定した配列について、35 種類の *astA* リファレンス配列と比較した。

C. 研究結果

[1] 試験検体の *astA* スクリーニング試験

(1) *astA* スクリーニング試験

本研究にて供試したオクラ 11 食品において、生菌数は $1.1 \times 10^6 \sim 3.21 \times 10^7$ CFU/g であり、大腸菌群数は $5.0 \times 10^5 \sim 1.84 \times 10^7$ CFU/g であった(表 1)。

また、11 食品 44 検体(袋)のうち、3 食品(27.3%)が *astA* 陽性であった。検体が *astA* 陽性であることと一般生菌数、大腸菌群数に関連性は認められなかった。

(2) *astA* 陽性大腸菌の分離試験

オクラ 2 食品の増菌培養液からの *astA* 検出は、mEC 培養の 16 検体中 15 検体(93.8%)が *astA* 陽性であり、NmEC 培養の 16 検体中 9 検体(56.3%)が *astA* 陽性であった(表 2)。

mEC 培養で陽性の 15 検体中 8 検体が、いずれかの分離培地で菌分離でき、NmEC 培養で陽性の 9 検体中全て、いずれかの分離培地で菌分離できた(表 3)。

釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合を増菌培地別に比較すると、mEC 培養で 4.3%、NmEC 培養で 49.0%であった。増菌培地と分離培地の組み合わせで比較すると、mEC 培養の A-SMAC および NmEC 培養の A-SMAC で菌分離できなかった。一方、NmEC 培養の A-CHSTEC が最も高く 60.0%の割合で分離でき、

次いで CHSTEC が 44.7% と高かった（表 4）。

また、生化学的性状および MALDI-TOF MS により供試菌株 84 株は全て *E. coli* と同定された。

〔2〕分離株の遺伝子的多様性の解析

（1）O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型解析

供試菌株 84 株のうち 46 株が OgGP12:Hg10 であり高頻度に分離される遺伝子型であり、8 株は OgUT:HgUT であった。また、フィリピン産とタイ産では、異なる遺伝子型も分離された。

mEC 培養と NmEC 培養では、OgGP12:Hg10 が重複する遺伝子型であり、NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型を分離できた（表 5）。

（2）*astA* バリエーションの特定

フィリピン産では、v6、v12 のバリエーションが検出され、タイ産では v13、v12、v53 のバリエーションが検出された（表 6）。

D. 考察

〔1〕市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

astA スクリーニング試験に供試した 11 食品のうち 3 食品（27.3%）が *astA* 陽性であった。過去に実施した調査においてもオクラは陽性

率 20% であったことから取り扱いに注意を要すると考えられた。

astA 保有大腸菌の分離試験において、*astA* 遺伝子の検出率は mEC 培養で 93.8%、NmEC 培養で 56.3% であったが、菌分離では mEC 培養で 53.3% に対し NmEC 培養で 100% と高かった。そのため、菌分離のためには NmEC 培地による増菌培養が適していると示された。

一方、釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合から見ると、NmEC 培地と A-CHSTEC および CHSTEC の組み合わせによる検査法が優れていた。なお、SMAC 上では大腸菌群と *astA* 保有大腸菌と類似した赤色コロニーが形成されるため判別が困難であることが、分離率低下の原因であると推察された。

〔2〕分離株の遺伝子的多様性の解析

オクラから分離された *astA* 保有大腸菌株の O 抗原遺伝子型、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。mEC 培養と NmEC 培養で菌株の遺伝子型の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、増菌培地として mEC 培地および NmEC 培地を併用することで、*astA* 保有大腸菌をより広範囲に検出すること

が可能であると考えられた。

E. 結論

本研究での分離率の差および分離株の多様性を考慮すると、*astA*保有大腸菌が原因と疑われる食中毒事例対応の際は、増菌培地としてNmEC培地を優先して選択し、可能であればmEC培地も併用する。また、分離培地としてはCHSTECおよびA-CHSTECを選択することで分離効率が向上すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ikeda, N., Kadoguchi, M., Arikawa, E., Mizokoshi, A., Shimmen, K., Yokoyama, K., Doi, R., Saiki, D., Yatsuyanagi, J., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Evaluation of PCR assays for detecting *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene encoding the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 in various food matrices. Food Safety. 13(4):70-77, 2025.

(学会等発表)

Arai, S., Hirose, S., Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Development of detection methods of *Escherichia albertii*, an emerging zoonotic enteropathogen in food. 11th One Health Aotearoa Symposium. 2-3 Dec., 2025. Wellington, New Zealand.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

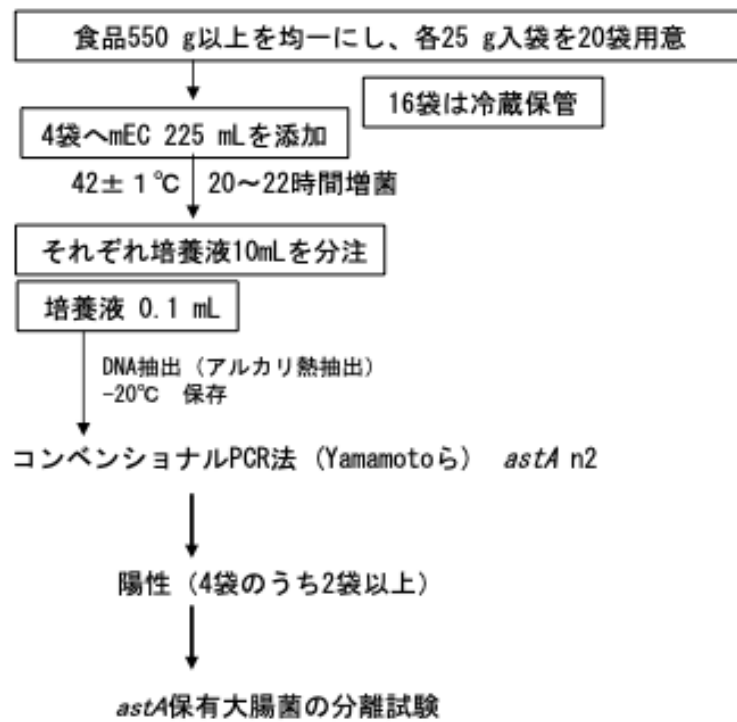


図 1. 試験検体の *astA* スクリーニング試験

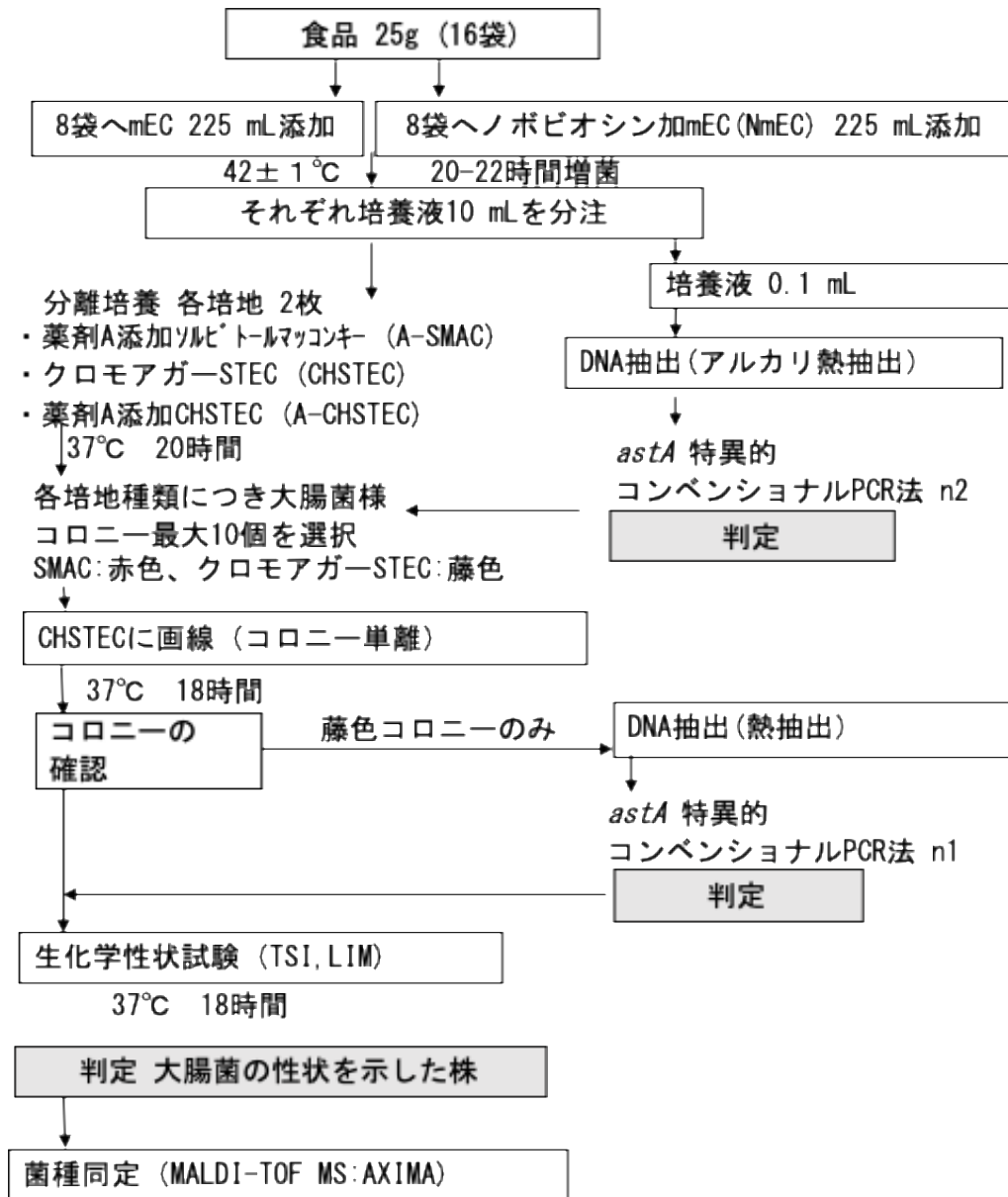


図 2. *astA* 保有大腸菌分離試験

表 1. 試験検体の生菌数および大腸菌群数

産地	生菌数 CFU/g	大腸菌群数 CFU/g
国産	1.1×10^6	5.0×10^5
国産	1.03×10^7	6.3×10^6
国産	3.21×10^7	1.84×10^7
国産	1.70×10^7	9.0×10^5
国産	3.9×10^6	2.0×10^6
フィリピン	1.39×10^7	1.9×10^6
フィリピン	2.14×10^7	3.2×10^6
タイ	2.78×10^7	6.6×10^6
フィリピン	2.84×10^7	1.24×10^7
タイ	5.95×10^6	5.5×10^5
タイ	1.07×10^7	1.8×10^6

表 2. 各増菌培地における *astA* 特異的 PCR 陽性検体

検体	mEC	NmEC
フィリピン	8/8 ^{*1}	7/8
	(100) ^{*2}	(87.5)
タイ	7/8	2/8
	(87.5)	(25.0)
合計	15/16	9/16
	(93.8)	(56.3)

*1 PCR陽性検体数/供試検体数

*2 陽性率(%)

表 3. 増菌培地および分離培地別の *astA* 保有大腸菌分離検体

検体	mEC				NmEC			
	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地
フィリピン	0/8* ¹ (0)* ²	2/8 (25.0)	4/8 (50.0)	6/8 (75.0)	0/7 (0)	4/7 (57.1)	7/7 (100)	7/7 (100)
タイ	0/7 (0)	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)	0/2 (0)	1/2 (50.0)	2/2 (100)	2/2 (100)
合計	0/15 (0)	3/15 (20.0)	6/15 (40.0)	8/15 (53.3)	0/9 (0)	5/9 (55.6)	9/9 (100)	9/9 (100)

*1 *astA* 保有大腸菌が分離された検体 (袋) / *astA* 特異的PCR陽性検体 (袋)

*2 陽性率 (%)

表 4. 増菌培地および分離培地別の *astA* 保有大腸菌の検出

検体	mEC				NmEC			
	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地	A-SMAC	CHSTEC	A-CHSTEC	3種 分離培地
フィリピン	0/21* ¹ (0)* ²	3/40 (7.5)	8/80 (10.0)	11/141 (7.8)	0/8 (0)	14/27 (51.9)	45/70 (64.3)	59/105 (56.2)
タイ	0/23 (0)	1/70 (1.4)	1/70 (1.4)	2/163 (1.2)	0/8 (0)	3/11 (27.3)	9/20 (45.0)	12/40 (30.0)
合計	0/44 (0)	4/110 (3.6)	9/150 (6.0)	13/304 (4.3)	0/16 (0)	17/38 (44.7)	54/90 (60.0)	71/145 (49.0)

*1 *astA* 特異的PCR陽性コロニー数/釣菌コロニー数

*2 陽性率 (%)

表 5. *astA* 保有大腸菌株の O 抗原遺伝子型および H 抗原遺伝子型

検体	mEC		NmEC		合計
	Og型 : Hg型	株数	Og型 : Hg型	株数	
フィリピン	Og174:Hg38	2	Og9:Hg4	3	70
	OgGP12:Hg10	9	Og139:Hg5	8	
			Og139:HgUT	5	
			Og61:Hg34	1	
			OgGP12:Hg10	36	
			OgGP12:Hg4	1	
			OgUT:HgUT	5	
	小計	11	小計	59	
タイ	OgUT:HgUT	2	OgGP12:Hg10	1	14
			Og85:Hg10	10	
			OgUT:HgUT	1	
			小計	12	
合計		13		71	84

表 6. *astA* 保有大腸菌株の *astA* バリエント

検体	mEC			NmEC			合計
	バリエント	Og型 : Hg型	株数	バリエント	Og型 : Hg型	株数	
フィリピン	v6	Og174:Hg38	1	v6	Og9:Hg4	2	23
					Og61:Hg34	1	
					Og139:Hg5	3	
					Og139:HgUT	1	
					OgUT:HgUT	2	
	v12	OgGP12:Hg10	5	v12	OgGP12:Hg10	8	
	小計		6	小計		17	
タイ	v13	OgUT:HgUT	2	v12	OgGP12:Hg10	1	6
				v53	Og85:Hg10	2	
					OgUT:HgUT	1	
				小計		4	
合計			8			21	29