

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

病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

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

研究要旨

astA 遺伝子（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素をコード）保有大腸菌およびその近縁菌種である *Escherichia albertii* についておよび“病原因子の組み合わせによる重症化リスクの解明”と“効果的な検出法の確立”を目的とした研究を進めた。R7 年度は、R6 年度までに明らかにした *astA* 遺伝子のバリエーションとその遺伝的特性について論文公表するとともに、*astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるバリエーションのうち最も株間で保有数の多い V0 について、IS を介した発現亢進があるかを調べる目的で、検出系の構築と予備実験を実施した。また、新興下痢症起因菌 *E. albertii* の効果的な菌濃縮法について、昨年度実施した *E. albertii* NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いた IgG 結合性因子の解析で同定された約 10kb のゲノム領域に関する詳細な解析を進めた。NIAH_Bird3 株について当該領域の遺伝子破壊株を作製し、菌濃縮能が低下するか確認を試みたが、予想に反して濃縮能の低下が見られなかった。

今後、*astA* 遺伝子に関しては、IS1414 の転移メカニズムとそれに伴う *astA* 遺伝子発現亢進・病原性について評価を行う。また、*E. albertii* に関しては、免疫磁気ビーズを用いた濃縮法の至適化と有用性検討、IgG 結合因子の同定を行う。

A. 研究目的

国内では、多様な病原大腸菌による食中毒が発生しており、社会的と問題となっている。令和 2 年には、学校給食での *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 (小中学生等患者 3,453 人) が発生し、その後も本菌食中毒の発生が続いている。また、令和 2 年には腸管毒素原性大腸菌の大規模食中毒 (患者 2,548 人)、

令和3年には給食の牛乳による主要な病原因子を保有しない病原大腸菌の大規模食中毒（児童等患者1,896人）が発生しており、病原大腸菌食中毒の発生が続いている。さらに、腸管出血性大腸菌による食中毒は、以前よりも減少している傾向は認められず、令和4年以降、高齢者施設や飲食店での事例で死者が発生した事例、馬刺による74人の患者発生の事例、複数県のステーキチェーン店での事例等が報告されている。これまでの食品汚染調査では、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離され、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと考えられ、食中毒由来株との特性の違いの解明が必要とされている。

本研究では、申請者らが同定した各 *astA* 遺伝子バリエーションとその発現制御や協調的に働く（病原）因子を同定し、機能を明らかにする。また、集団感染事例を引き起こす食中毒起因菌として大腸菌の近縁菌種である *E. albertii* の新規病原因子の機能解析と菌濃縮法の開発を行い、感染源同定や食品汚染状況の検査への実用化を最終目標とする。

本年度は、*astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるバリエーションのうち最も株間で保有数の多い V0 バリエーションについて、IS を介した発現亢進があるかを調べる目

的で、検出系の構築と予備実験を実施した。また、*E. albertii* について、昨年度実施した NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーを用いた IgG 結合性因子の解析で同定された約 10kb のゲノム領域に関する詳細な解析を進めた。

B. 研究方法

(1) IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件の検討

astA 遺伝子は IS1414 のトランスポゼース遺伝子内部にコードされている（図1）ため、その発現亢進に IS1414 転移能の関与が示唆される。その可能性を検証するため、構造的に完全な（転移能を持つと考えられる）であり、*astA* 遺伝子バリエーション V0 をコードする IS1414 について図2aのような擬似的 IS1414 を構築した。具体的には IS1414 のトランスポゼース遺伝子をテトラサイクリン耐性遺伝子に置換し、IS1414 挿入部位に形成される 8bp のダイレクトリピート配列を両末端に含む領域をクローニングベクター pUC19 のアンピシリン耐性遺伝子内にクローニングした（図2a）。その際、擬似 IS1414 の脱落によってアンピシリン耐性が再活性化するように（アンピシリン耐性遺伝子のコード領域のフレームがずれないように）考慮し

た（図 3）。また、クローニングベクター pETBK (BDL) のマルチクローニングサイトにプロモーター領域を含むトランスポゼース遺伝子をクローニングした（図 2 b）。これまでに明らかになっている IS 転移能が亢進する環境条件として、①ヒートショック、②栄養飢餓、③抗生物質暴露、④酸化ストレスなどを考慮し、まず、以下の条件①および②を実施した。

- ① ヒートショック: LB 培地 1mL に接種し、30°C, 150rpm で一晩振盪培養した。前培養液 10μL を 1mL の LB 培地 2 本に植え継ぎ、30°C あるいは 42°C の条件で 8 時間振盪培養した。10 μg/mL テトラサイクリンあるいは 50 μg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地に接種し、37°C で一晩静置培養し、各寒天培地上のコロニー数をカウントした。
- ② 栄養飢餓: LB 培地 1mL に接種し、30°C, 150rpm で一晩振盪培養した。前培養液 10μL を 1mL の LB, 1/10 LB, 1/100 LB 培養液に植え継ぎ、30°C, 150 rpm で 8 時間振盪培養した。10 μg/mL テトラサイクリンあるいは 50 μg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地に接種し、37°C で一晩静置培養し、各寒天培地上のコロニー数をカウントした。

(2) *E. albertii* の IgG 結合性因子の同定

昨年度 NIAH_Bird_3 株フォスミドライブラリーを用いて同定した約 10kb のゲノム領域（図 4）に関して、Wanner 変法を用いて NIAH_Bird_3 株の当該領域の遺伝子破壊株を作製した。A 抗体処理有無の条件下で遺伝子破壊株の菌回収効率を検証した。

C. 研究結果

(1) IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーション (V0) の発現亢進条件の検討

① ヒートショック: 本培養の培養温度を 30°C と 42°C で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。

② 栄養飢餓: 本培養の培養液を LB 培養液原液 (1x)、1/10 希釈 LB 培養液、1/100 希釈 LB 培養液で実施したが、擬似 IS1414 が脱落したと考えられるアンピシリン耐性クローンは検出されなかった。

(2) *E. albertii* の IgG 結合性因子の同定

E. albertii NIAH_Bird3 株について作製した IgG 結合因子候補 10kb 領域の遺伝子破壊株と野生株、negative control として大腸菌 K-12 株を用いて菌濃縮能に関する比

較を行った。その結果、野生株と当該領域の遺伝子破壊株との間で濃縮能に差が見られなかった。その一方で、negative controlである大腸菌 K-12 株においても、通常見られない非常に高い菌濃縮が観察された。使用した試薬による実験への影響を確認するため、磁気ビーズの洗浄液および抗体反応液について新たに調整したものを使用した結果に改善は見られなかった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本年度実施した構造的に intact な *astA* 遺伝子バリエーション V0 の病原性発現亢進に関する解析について、挿入配列 IS1414 の転移との連動性を調べる実験系の構築と挿入配列の転移能に関わる環境因子として、ヒートショックおよび栄養飢餓の条件について解析を行った。その結果、IS1414 の脱落の指標となるアンピシリン耐性再活性化クローンを検出することができなかった。このことから、これら 2 条件は転移能 (*astA* 遺伝子の発現亢進) には関与しない可能性が示唆された。しかしながら、IS1414 の転移機構については未だ不明な点が多いことから、次年度はトランスポゼースを過剰発

現させて IS 脱落が起こることを確認した上で、さらに他の条件についての検討を行う。

免疫磁気ビーズによる *E. albertii* の菌濃縮法の開発に関しては、昨年度、NIAH_Bird3 株の Fosmid ライブラリーを用いて同定した IgG 結合関連因子候補と考えられる約 10kb のゲノム領域について、当該領域の遺伝子破壊株を用いた検証を実施した。しかしながら、遺伝子破壊株において菌濃縮能の低下が観察できず、また、これまでに得られていた結果と異なり、negative control である大腸菌 K-12 株においても菌濃縮がみられた。このことから用いている試薬に原因があると考えられたため、ビーズ洗浄液等の溶液関連について、新規作製したもので検証したが、上記と同様の結果となり、磁気ビーズ本体に原因があることが示唆された。

今後は、実験条件の再検討や試薬の再購入を行うことで、これらの問題を解消し、*astA* 遺伝子の発現亢進条件と病原機構の解明を進めるとともに、*E. albertii* の効果的な菌濃縮法の実用化および IgG 結合因子の同定を行う。

E. 結論

astA 遺伝子陽性大腸菌に関して、*astA* 遺伝子が intact なものは V7, V15, V22, V32 を除く 31 種類であ

り、蛋白質としては 23 種類 (EAST-1_1-v23) 存在すること、② *astA* 遺伝子をコードする IS1414 の構造が完全であり、転移能を持つと考えられるものは V0, V30, V31 の 3 種類のみであること (ただし、V30 および V31 は 720 株中でそれぞれ 1 株のみ存在)、③ マルチコピーで保有する株が多く存在する V0 については、コピー数が劇的に増加した大腸菌進化系統が 2 系統存在することを示し、その研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に投稿・掲載された。また、IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子の発現亢進については、トランスポゼース遺伝子のプロモーター領域の活性を検出する実験系を構築して実施したが、期待した結果が得られなかった。次年度は、IS1414 の転移機構において単純な脱落を起こすことを確認した上で、転移能と *astA* 遺伝子発現亢進に関する解析を進める。また、*E. albertii* の解析に関しては、フォスミドライブラリーで同定されていた 10kb 領域の遺伝子破壊株で菌濃縮能の低下がみられなかったが、これまで negative control として使用していた大腸菌 K-12 株においても同様に濃縮が見られたことから、ビーズ試薬等に問題がある可能性も考えられ、次年度は、試薬の確認を行ってから解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ooka T*, Arai S, Lee K, Gotoh Y, Kubomura A, Imuta N, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Hayashi T, Nishi J. Prevalence, sequence diversity, and amplification of an IS-associated enterotoxin gene, *astA*, in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2025 Oct 22;16:1635769. doi: 10.3389/fmicb.2025.1635769.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. IS1414 の遺伝子構造

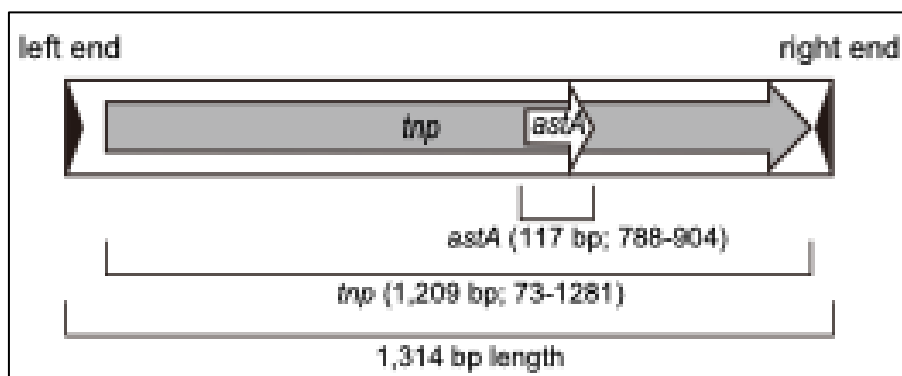


図2. 擬似IS1414の構造 (a) およびIS脱落解析のイメージ (b)

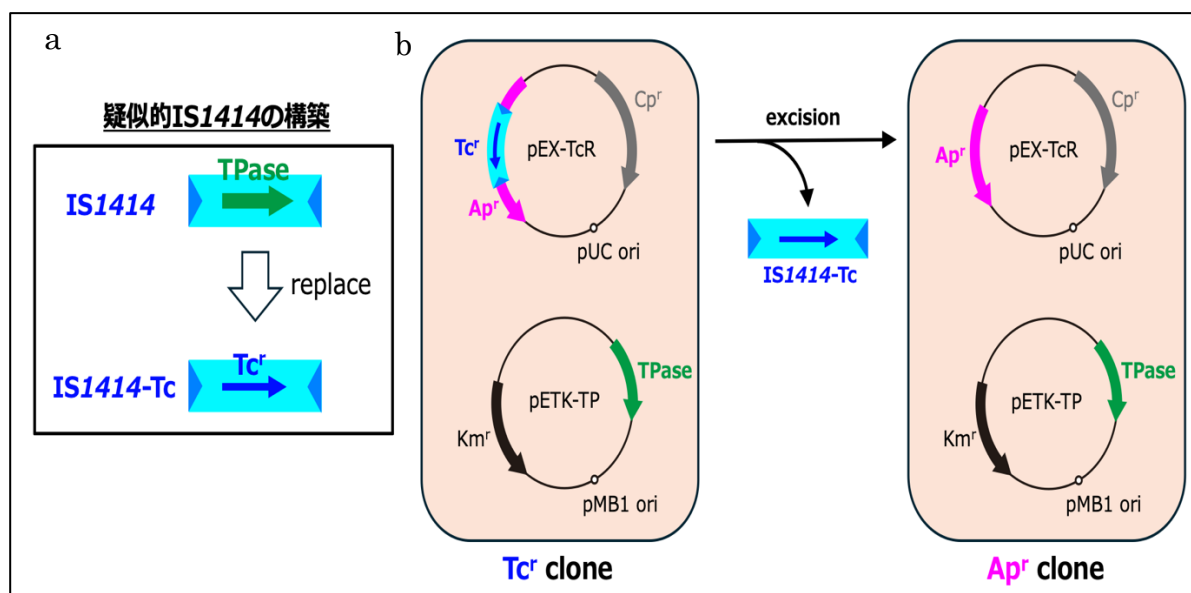


図 3. 擬似 IS1414 の末端構造と IS 脱落解析によるアンピシリン耐性再活性化

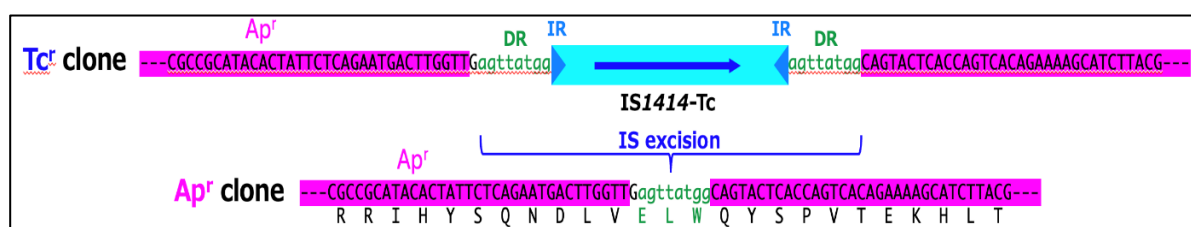


図 4. *E. albertii* NIAH_Bird3 株のフォスミドライブラリーから同定された IgG 結合因子関連領域

