

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

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。食中毒の原因食品究明には、適した培養法の選択が重要であるため、食品の汚染状況を調べるとともに効率的な培養法を検討した。市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、本菌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 培地も併用し、分離培地として CHSTEC および A-CHSTEC を選択することが推奨されることが示された。加えて、分離株の多様な遺伝子型についても示された。*astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体を作製した。EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種解析系への適用性をさらに評価し、研究に応用する。

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。

また、これまでの調査で、*astA* 保有大腸菌は多種食品から分離されることが明らかになり、食品汚染株の一部の株が食中毒を引き起こすと推察された。このため、食中毒由来株と食品汚染株の特性の違いの解明によって、病原性を担う因子を明らかにすることが可能になると考えられた。本研究では、まず、食品由来株と患者由来株で異なる点を明らかにする。研究で明らかになった差異をもとに、食中毒発

生に関連する可能性の高い因子を明らかにする。

今年度は、動物での病原性評価モデルの検討のため、富山市食中毒事例株で大腸菌株の病原性モデルとして採用されたマウスへの腹腔内投与での生死による評価を参照し、本研究でも実施し、病原性の評価モデルを検討した。また、腸管凝集付着性大腸菌の病原性（毒性）の発現と *astA* 遺伝子の関連について解析をするため、*astA* 翻訳産物である EAST1 の発現に注目し EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製を試みた。

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

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。それぞれ 25 g を量り取ったストマッカー袋を 20 袋用意し、うち 4 袋へ mEC 培地 225 mL を加え、ストマッカー処理を行った後、 $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ にて 20~22 時間培養した。検体培養液各 0.1 mL をアルカリ熱抽出法に供し、得られた DNA 抽出液をテンプレート DNA として、*astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (Yamamoto ら) を実施した。4 袋のうち 2 袋以上が陽性となった 2 食品を次の試

験に供試した。冷蔵保管していた残りのストマッカー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 から抽出したテンプレート DNA を上記 PCR に供した。分離培地には、ソルビトールマッコニー寒天培地 (SMAC) に薬剤 A を添加した A-SMAC、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC) および CHSTEC に薬剤 A を添加した A-CHSTEC を用いた。培養液を画線塗抹し、 37°C にて 20 時間培養し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。単離した CHSTEC 上の藤色コロニーの *astA* 保有を上記 PCR 法にて確認した。*astA* 保有コロニーについては、TSI および LIM にて大腸菌の生化学性状と一致するか確認した。また、MALDI-TOF MS による大腸菌の同定も実施した。

(2) 分離株の遺伝子的多様性の解析

オクラ 2 食品に由来する *astA* 保有大腸菌株 84 株を O 抗原遺伝子型 (井口らの方法) および H 抗原遺伝子型 (Banjo らの方法) 解析に供

した。また、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、遺伝子シーケンス解析によって *astA* 配列を決定し、*astA* リファレンス配列と比較し、*astA* バリエントを特定した。

[2] *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

(1) 動物モデルでの病原性評価系の検討

astA 保有大腸菌の食品由来 9 株 (食 1～食 9) および食中毒事例等患者由来 5 (患 1～患 5)、並びに *astA* 非保有大腸菌株である NBRC3972 株を供試した。試験菌液の調製は次の 4 つのように行った。

- 1) 培養液を PBS にて 1/2 または 1/10 に希釈した菌液を作製した。
- 2) 培養液を 3,500 rpm で 20 分間遠心し、その上清を濾過滅菌し滅菌上清を作製した。
- 3) 2) で残った沈殿をさらに 5,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去し、2) で使用した培養液量と同量の PBS で沈殿を再浮遊して菌浮遊液を作製した。
- 4) 3) で作製した再浮遊液を 100°C で 1 分間加熱し加熱菌液を作製した。BALB/c マウス (5～6 週齢、雄) に各試料 0.2 mL を腹腔内投与した。投与後、経時的に生死を観察し、生存マウスについて体重測定した。死亡マウスの心臓血を採取

し、菌培養した。

(2) EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

前年度に作製した pQE-EAST1 を鋳型として、EAST1 遺伝子 (*astA*) を PCR 法により増幅し、pGEX-5X-1 および pET-28b を改変して作製した pET-PelB ベクターに組み込んだ。pET-PelB は、N 末端にペリプラズム移行シグナル配列、C 末端に His-tag 配列を付加できる発現ベクターである。作製した各発現プラスミドは、発現宿主として大腸菌 BL21[DE3]株に導入した。GST 融合タンパク質および His-tag 融合タンパク質を精製し、GST-EAST1 と Aluminum hydroxide hydrate gel suspension (LSL) を等量混合し、懸濁したものを抗原として用いた。BALB/c マウス (5 週齢、雄) に対し、腹腔内投与による免疫を 1 週間間隔で計 7 回実施した。最終免疫 2 日後、マウスより脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞株 PAI を、Polyethylene glycol 4000 for gas chromatography を用いて融合させた。GST-EAST1 または EAST1-His をプレートに固相化し、一次抗体として PBS で倍希釈したマウス血清、またはハイブリドーマ培養上清を用いた。検出には HRP 標識 Goat anti-Mouse IgG 抗体を使用し、基質として SureBlue TMB

1-Component Microwell Peroxidase Substrate を用いて発色させた後、450 nm における吸光度を測定した。

遺伝子組換え生物等の使用は、星薬科大学組換え DNA 実験安全及びバイオセーフティ委員会の承認、動物実験は星薬科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

[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

11 食品 44 検体 (袋) のうち、3 食品 (27.3%) が *astA* 陽性であった。そのうちのオクラ 2 食品では、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。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。釣菌コロニーに対する *astA* 陽性コロニーの割合は、mEC 培養で 4.3%、NmEC 培養で 49.0% であり、NmEC 培養の A-CHSTEC が最も高く 60.0%、次いで CHSTEC が 44.7% と高かった。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

供試菌株 84 株のうち 46 株が 0gGP12:Hg10 であった。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。NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型を分離できた。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 v12、v13 のバリエーションが検出された。

〔2〕 *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

（1）動物モデルでの病原性評価系の検討

マウスの致死数は、患者由来株よりも食品由来株で多い傾向が認められた。投与量については 1/2 希釈が 1/10 希釈よりも致死数が多かった。培養上清および加熱菌液では致死は認められなかった。また、生残したマウスの体重変化は、複数株で比較すると生残した食品由来 1 株では投与後体重が減少し、2 日目以降体重が回復傾向であったが、患者株ではいずれも投与後体重が食品株に比べて大きく減少し、患者由来 2 株は 3 日目以降体重が回復傾向であった。しかし、他の患者由来 2 株は観察が終了する 4 日まで回復しなかった。菌株投与後に死亡したマウスの血液から大腸菌と鑑別される赤色コロニーが多数生育した。

（2）EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製

GST-EAST1 に対しては、3 回目の免疫以降で高い抗体価が確認された。一方、EAST1-His に対しては 5 回目付近で抗体価の上昇が頭打ちとなる傾向が認められた。細胞融合後に得られた 1,504 個のクローンのうち継代 5 回目以降においても安定した増殖性と高い抗体価を維持していた 3 クローン（A9B5、A9C4、B36B5）を選抜した。GST および GST-EAST1 に対する反応性を評価した結果、各クローンが GST タグではなく EAST1 領域を認識していることが示唆された。

D. 考察

〔1〕市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態

オクラ汚染率は 27.3% で、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結果から、菌分離のためには NmEC 培地による増菌培養が適していることが示された。

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。また、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。

〔2〕 *astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析

動物モデルでの病原性評価系の検討では、食品由来および患者由来の *astA* 保有大腸菌をマウスに腹腔内投与した。食品由来株は病原性を保有しないものが多く、患者由来株は病原性を保有するものと考えていたが、患者由来株よりも食品由来株でマウスの致死性が高い傾向が見られ、想定した結果とは異なっていた。しかし、食品および患者由来株の両株で致死が認められたこと、NBRC 株では致死に至っていないこと、を考えると由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。一方、生存したマウスでの体重の変化においては、食品由来株では体重の回復が認められるが、患者由来株では体重の回復が弱い傾向が認められたため、致死に至らない程度の投与菌数を投与することで、患者由来株の方が食品由来株より

も体重回復が弱いモデルの作出が可能かもしれない。

また、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製については、マウスへの免疫によって十分な抗体応答が誘導された一方で、EAST1 に対する抗体だけでなく、融合タグである GST に対する抗体も含まれている可能性が示唆された。そのため、GST を含まない EAST1-His を用いた解析が有用であると考えられた。また、EAST1 は低分子ペプチドであり抗原性が比較的低い可能性がある。さらに、培養上清を用いた GST および GST-EAST1 に対する反応性評価の結果から、GST-EAST1 の分解産物、あるいは部分的に切断されたタンパク質断片を認識している可能性が考えられた。

E. 結論

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、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。加えて、分離株の多様な遺伝子型についても示され

た。*astA* 保有大腸菌の特性および病原性の解析では、動物モデルでの病原性評価系を検討した。マウス腹腔内投与では食品由来株で致死性が高かったが、食品および患者由来の両株で致死性が認められ、敗血症に至ったことを考えると、由来に関係なく *astA* 保有大腸菌には一定の病原性の保有が考えられた。また、EAST1 特異的モノクローナル抗体を作製した。EAST1 に特異的反応性を示す 3 種の候補ハイブリドーマクローンを取得した。今後は、得られた抗体について特異性や感度、各種解析系への適用性をさらに評価し、研究に応用する。

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.

工藤由起子、大屋賢司. 富山市の学校給食を原因とする大規模食中毒事例の病因物質検査. 日本食品微生物学会雑誌. 43(1), 20-24, 2026.

(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

なし