

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

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
窪村亜希子 国立感染症研究所
小嶋由香 川崎市健康安全研究所
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を、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 5 研究分担班にて実施した。分担研究 (1) 病原大腸菌の特性解析では、*astA* 保有大腸菌の食品での検出法や汚染状況の検討、分離株の解析、動物モデルでの食品由来株と患者由来株の差異、EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製等を検討した。(2) 病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化では、IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエーションの発現亢進条件や *Escherichia albertii* の免疫磁気ビーズ濃縮法を検討し、*astA* 遺伝子バリエーションの多様性等に関する研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に発表した。(3) 病原大腸菌の付着性の解析では、集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出され、さらなる解析によって病原性解明の可能性が期待された。(4) 食品汚染における食品特性の解明では、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒防止には温度管理が重要であることが示され、乳酸菌による本菌生残性への検討が必要と考えられた。(5) 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法では、腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案を作成した。

研究協力者

国立感染症研究所

李 謙一、伊豫田 淳

地方衛生研究所等

川崎市健康安全研究所

浅井威一郎、淀谷雄亮、佐藤英子

横浜市衛生研究所

国立医薬品食品衛生研究所

星薬科大学

松本裕子

新井沙倉、廣瀬昌平、大西貴弘

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

A. 研究目的

日本では多様な病原大腸菌による食中毒が発生しており、社会的に問題となっている。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、減少傾向は認められず、令和 4 年以降、馬刺による食中毒、複数県のスTEEキチェーン店での事例等が報告されている。

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、食中毒発生頻度には見合わないことから、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必要とされている。また、これら病原大腸菌の食品汚染状況や食品での生残性は汚染の制御を確立するために重要である。さらに、食中毒での食品試験法の重要性は一層高く、現状の腸管出血性大腸菌食品試験法を現代に合うように見直しが必要であり、他の病原大腸菌についても食中毒対応が速やかに行われるように食品試験法が示される必要がある。

このため、本研究班では、分担研究 (1) 病原大腸菌の特性解析、(2) 病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化、(3) 病原大腸菌の付着性の解析、(4) 食品汚染における食品特性の解明、(5) 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法、にて実施する。

これらから得られた成果を日本での食中毒防止に役立てるとともに、成果や対策を海外に発信していくことによって、海外での食中毒発生時に日本が貢献することにつながることを期待される。

B. 研究方法

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、11 食品について *astA* 陽性か検討し、陽性の 2 食品について、食品ごとに mEC および NmEC 培地を検体 8 袋ずつに加え $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 20~22 時間培養し、培養液を *astA* 特異的 PCR 法に供試した。また、培養液を分離培地に画線培養し、上記 PCR 法にて *astA* 保有コロニーを選別した。また、それらを生化学性状および MALDI-TOF MS に供して大腸菌の同定を行った。大腸菌株の O 抗原・H 抗原遺伝子型および *astA* バリエントを特定した。

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。各種菌株の菌液、菌液上清、加熱菌液等を BALB/c マウスに腹腔内投与後、生死を観察し、生存マウスについては体重を測定した。また、死亡マウスの心臓血を採取し、菌培養した。

EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製では、pGEX-5X-1 および pET-28b を改変して作製した pET-PelB ベクターに *astA* を組み込んだ。GST 融合タンパク質および His-tag 融合タンパク質を精製し、抗原として用いた。BALB/c マウスに対し、腹腔内投与による免疫を 1 週間間隔で計 7 回

実施した。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 を融合させ、培養上清中の抗体を測定した。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

IS1414 の転移を介した *astA* 遺伝子バリエント (V0) の発現亢進条件として、擬似的 IS1414 を構築し、IS 転移能が亢進する環境条件として知られているヒートショックと栄養飢餓の条件について検討を行った。

Escherichia albertii の IgG 結合性因子の同定に関して、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、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。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

19 株の大腸菌 0166:H15 (5 件の集発事例由来 *astA* 保有株を含む) について whole genome sequencing を実施し、系統解析および MLST の特定を行った。さらに、4 つの血清型を含む 9 件の集発事例由来の *astA* 保有株およびその他由来の大腸菌 0166:H15 7 株 (合計 16 株) が保有するプラスミドの完全長ゲノム配

列決定を行い、Inctype の特定、病原性関連遺伝子の検出およびclinkerによる比較解析を行った。

CHO 細胞に感染させた細胞付着性および非付着性の集発事例由来 *astA* 保有大腸菌 0166:H15 について、蛍光二重染色法により細胞付着および侵入菌体の検出を行った。細胞外細菌は Alexa Fluor 405 (緑)、細胞内細菌は Alexa Fluor 488 (青)、CHO 細胞は CellMask Deep Red Actin Tracking Stain により染色した。

5 件の集発事例由来大腸菌 0166:H15 株のうち細胞付着性株に共通する遺伝子を特定するため *kps* クラスター比較、さらに K 抗原データベースを用いて K 抗原特定も行った。細胞付着性への関与が示唆された遺伝子について blastx 解析および代表的な K 抗原 (K1, K4, K5) との比較により類似する遺伝子の特定も行った。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

(1) 白菜の走査型電子顕微鏡観察

白菜の白い軸部分と葉部分について、走査型電子顕微鏡 (HITACHI Su3800) にて撮影した。また、非病原性である大腸菌 (HB101) を直接塗抹した直後の白菜及び 10 mL の TSB 培地に大腸菌を培養した培養液に 4 日間浸漬させた白菜を安全キャビ

ネット内で乾燥させ、白菜表面、内部についても走査型電子顕微鏡観察を実施した。

(2) 白菜の洗浄方法の検討

次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分、200 ppm 10 分) または過酢酸製剤 (75 ppm 5 分、225 ppm 5 分) についての消毒効果の検討を行った。流水洗浄前、流水洗浄後、次亜塩素酸ナトリウムおよび過酢酸製剤浸漬流水後、それぞれの工程ごとに 25 g を採取し希釈系列を作製し、細菌数を測定した。

また、腸管出血性大腸菌株を 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g になるよう添加し、過酢酸製剤 (75 ppm 5 分) または次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分) で消毒を行い、腸管出血性大腸菌 0157 菌数を測定した。

(3) 白菜キムチ細菌叢の解析

市販キムチ 10 検体を対象に、フルレンジ 16S rRNA 遺伝子を用いた Nanopore sequence 解析により、キムチの細菌叢の解析を行った。併せて細菌数、大腸菌群、大腸菌、ブドウ球菌、セレウス菌、乳酸菌数、pH、水分活性及び塩分濃度についても測定を行った。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

(1) 腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) の分離同定法は、既報 (大塚ら、LWT、2019 および工藤ら、Int. J. Food Microbiol.、2020) をもとに作成した。

さらに市販のリアルタイム PCR 装置が通知法案に記載した遺伝子検査法に使用できるかどうか、その性能を評価した。通知法案に記載した遺伝子検査法は、ST と LT 遺伝子検出法 (スクリーニング) および ST と LT 遺伝子型別法であり、それぞれについて自家調製のリアルタイム PCR 法と市販キットを用いた方法を検討した。今回は自治体で広く利用されていると考えられる Thermal Cycler Dice Real Time System III および IV (タカラバイオ)、QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific)、LightCycler 96 および PRO (ロシュ・ダイアグノスティックス) を評価した。

C. 研究結果

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、オクラ 11 食品のうち、3 食品 (27.3%) が *astA* 陽性であった。そのうちの 2 食品では、mEC 培養の 16 検体 (袋) 中 8 検体から、NmEC 培養の 16 検体中 9 検

体から、*astA* 陽性菌がいずれかの分離培地で分離された。*astA* 陽性コロニーの割合は、NmEC 培養と A-CHSTEC の組み合わせが最も高く 60.0%、次いで CHSTEC が 44.7% と高かった。また、分離株は大腸菌と同定された。分離株の遺伝子的多様性の解析をしたところ、*astA* 保有大腸菌 84 分離株のうち 46 株が 0gGP12:Hg10 であった。食品ごとに異なる遺伝子型も分離され、NmEC 培養の方がより多様な遺伝子型が分離された。

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の検討をしたところ、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。菌培養液の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食品株に比べて患者株ではいずれも投与後体重が大きく減少し、一部の患者由来株は観察が終了する 4 日まで回復しなかった。さらに、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。

EAST1 特異的モノクローナル抗体の作製を検討したところ、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、各クローンは 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。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

（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

ヒートショックに関して、本培養の培養温度を 30℃ と 42℃ 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。また、栄養飢餓に関しても、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製したものを使用したが結果に改善は見られなかった。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

（1）大腸菌 0166:H15 株の MLST および系統解析

19 株の大腸菌 0166:H15 のうち、5 件の集発事例由来の 10 株はいずれも ST2914 に分類された。動物由来の 1 株も ST2914 に分類されたが、他の動物由来株および EHEC は ST349 に分類された。

（2）*astA* 事例等由来株が保有するプラスミドの比較解析

16 株のうち 14 株から 1 から 6 のプラスミドが検出され、そのうち 16 の主要なプラスミドを解析した結果、9 件の集発由来株と 1 件の散発由来株は共通して *astA* と *aap* が検出される IncFII のプラスミドを保有していた。比較解析では 6 型分泌装置 (T6SS) や 4 型線毛遺伝子クラ

スター等の共通遺伝子も検出された。一方で、EHEC や動物由来大腸菌 0166:H15 が保有するプラスミドは *astA* 事例株から共通で検出されたプラスミドとは異なっていた。

(3) 蛍光二重染色法による集発由来大腸菌 0166:H15 の細胞付着および侵入菌体の検出

蛍光二重染色法により染色した蛍光観察画像の重ね合わせ (Merge) により、細胞付着性を示す JNE21-003 株では細胞外菌体 (緑) と細胞内菌体 (青) が検出されたのに対し、JNE22-005 株では主に細胞内菌体 (青) のみが検出された。

(4) 集発事例由来大腸菌 0166:H15 株の *kps* クラスタ比較および K 抗原の特定

比較解析により細胞付着性株に共通する 5 遺伝子が特定された。また、細胞付着性を示す 4 株は K131 であると特定された。

(5) 集発事例由来大腸菌の細胞付着性に関与する遺伝子の特定

JNE21-003 株を用いて (4) により特定した 5 遺伝子 (*galE*, LOCUS_07640 (L764), L765, *ugd*, L767) の破壊株作製と解析を行った結果、L765 破壊株 (Δ L765) および Δ L767 において細胞付着性が消失し、各相補株 (Δ L767 /pMW119-L765, Δ L767 /pMW119-L767) はいずれも細

胞付着性を示した。blastx 解析および代表的な K 抗原との比較により、L765 および L767 は糖転移酵素遺伝子であり、それぞれ K4 の *kfoC* および *kfoG* と高い相同性を示した。

[4] 食品汚染における食品特性の解明

(1) 白菜の走査型電子顕微鏡観察

購入した白菜について細菌数、大腸菌・大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数、セレウス菌数の測定を行った。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g であり、部位による偏りは認められなかった。白菜から検出された細菌数の菌種のうち多くは白菜の根の周囲に生息する *Chryseobacterium* 属であった。

白菜に大腸菌を直接塗抹後、撮影した画像からは、大腸菌は確認できなかったが、増菌培養液に 4 日間浸漬させた白菜からは、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された。

(2) 白菜の洗浄方法の検討

次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分または過酢酸製剤 75 ppm 5 分浸漬させた結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g、流水洗浄後 10^4 CFU/g、消毒液浸漬後 10^3 CFU/g であった。次亜塩素酸ナトリウム 200 ppm 10 分または過酢酸製剤 225 ppm 5 分に消毒液の濃度を増加し浸漬させた

結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄前 10^6 CFU/g、流水洗浄後 10^5 CFU/g、消毒液浸漬後 10^3 CFU/g であった。

また、腸管出血性大腸菌 0157 株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g を 4 cm にカットした白菜に添加し、過酢酸製剤 (75 ppm 5 分) または次亜塩素酸ナトリウム (100 ppm 10 分) で洗浄した結果、次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で洗浄を行っても 10^1 CFU/g $\sim 10^2$ CFU/g の減少が認められた程度であった。

(3) 白菜キムチ細菌叢の解析

白菜キムチの細菌数は、 10^4 CFU/g $\sim 10^7$ CFU/g、乳酸菌数は 10^4 CFU/g $\sim 10^8$ CFU/g であった。

小売店で購入したものが、細菌数、乳酸菌数ともにスーパーマーケットおよびデパートで購入したものより高い傾向にあった。大腸菌群が 4 検体から、セレウス菌が 1 検体から検出された。

塩分濃度は 2.8 $\sim$ 3.6%、pH は 5.0 $\sim$ 6.1、水分活性は 0.95 $\sim$ 0.97 であった。

フルレングス 16Sr RNA 遺伝子についての Nanopore sequence 解析結果、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% を占めた。他に *Yersiniaceae* 科、

Rahnella 属 *Serratia* 属、*Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属も検出された。

[5] 食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

(1) 腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

現在市販されているリアルタイム PCR 装置を用いて通知法案記載の ST と LT 遺伝子検出法および ST と LT 遺伝子型別法を検討したところ、キットを用いたリアルタイム PCR 法および自家調製のリアルタイム PCR 法のいずれも検出限界が 3 log CFU/mL または 4 log CFU/mL であった。

D. 考察

[1] 病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、オクラの汚染率は 27.3% であり、過去の調査においても陽性率 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。また、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。さらに、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 培養と A-CHSTEC および CHSTE 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* 保有大腸菌が類似した赤色コロニーを形成し、

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おり、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。

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の検討をしたところ、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の両株で致死が認められ、NBRC 株では致死に至っていないことを考えると *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、生残したマウスでの体重回復は、患者由来株で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、体重回復が弱いモデルの作出の可能性が示された。

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。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

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が、IS1414 の脱落はみられなかった。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ついては、昨年度、NIAH_Bird3 株のフォスミド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が、遺伝子破壊株において菌濃縮能の低下が観察できなかった。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とから用いている試薬に原因があると考えられた。ビーズ洗浄液等の溶液関連について、新規作製して検証した結果、磁気ビーズ本体に原因がある可能性が示唆された。

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。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

4 つの血清型を含む 9 件の集団下痢症事例から分離された *astA* 保有大腸菌は共通して IncFII の類似したプラスミドを保有していた。さらに同様のプラスミドは、0166:H15 株のうち EHEC ではない (non-EHEC) 散発下痢症患者由来株からも検出されたが、EHEC および動物由来株からは検出されなかった。そのため、当該プラスミドは 0166:H15 など特定の複数の血清型のうち、ヒトへの病

原性を有する non-EHEC から検出されるプラスミドである可能性が示唆された。さらに、当該プラスミド上には *astA* 以外にも *aap*、T6SS および 4 型線毛遺伝子クラスターなど複数の遺伝子が共通して存在していた。これらの遺伝子が機能しているかは不明であるが、プラスミド上の共通遺伝子に着目した解析を行うことは、本菌の病原性機序解明に繋がる可能性があると考えられる。

集発事例由来大腸菌 0166:H15 JNE21-003 株の細胞付着性は、*kps* クラスター領域 2 に含まれる 2 つの糖転移酵素遺伝子が関与していることが明らかになった。しかし、当該 2 遺伝子が 4 件の集発事例由来 0166:H15 株の細胞付着性に寄与する共通因子 (遺伝子) であることを示すためには、他の事例由来株を用いて同様の検証を行うことも重要であると考えられる。さらに、細胞付着性株の K 抗原型は K131 であり、細胞付着性に関与していた 2 遺伝子が K4 抗原の *kfoC* および *kfoG* と高いアミノ酸相同性を示すことも明らかとなった。K131 以外の K 抗原型においてもこれら 2 遺伝子を含む抗原型が存在するか調査を行うことや、該当する抗原型 (K4 を含む) の大腸菌株について解析を行っていくことは、細胞付着性に関与する *kps* クラ

スターを有する大腸菌の検出系開発および *kps* クラスターによる細胞付着性の機序解明のために重要であると考えられる。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

白菜を走査型電子顕微鏡で観察した結果、埃等と思われる物質が確認されたが、中心部からは認められなかった。細菌数は $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 検出されていることから、*Chryseobacterium* 属が白菜内部にまで侵入していることが考えられた。

大腸菌を塗抹した白菜の走査型電子顕微鏡画像では、増菌培養液に4日間浸漬させた白菜から、葉脈の部分、葉の間部分に大腸菌が確認された。

また、白菜を次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm 10 分または過酢酸製剤 75 ppm 5 分浸漬させた結果、細菌数は次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤とも流水洗浄後では、 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g、消毒後では、 10^1 CFU/g 程度の菌数の減少が認められた。前述の走査型電子顕微鏡観察の結果から、白菜内部に菌の定着が認められたことより、大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき実施した消毒方法では、 10^3 CFU/g 未満の菌数の減少は難しいことが示唆された。

腸管出血性大腸菌 0157 株 10^3 CFU/g、 10^7 CFU/g を添加し過酢酸製剤（75 ppm 5 分）または次亜塩素酸ナトリウム（100 ppm 10 分）で洗浄した結果、菌の減少は 10^1 CFU/g $\sim$ 10^2 CFU/g 程度であった。今回の実験で使用した消毒液の濃度では、腸管出血性大腸菌 0157 を完全に除去することは難しいことが示唆された。

これらのことより、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒を防止するためには、菌を増殖させないための温度管理が重要であることが示唆された。

白菜キムチにおける細菌数、乳酸菌数は、 10^4 CFU/g $\sim$ 10^8 CFU/g であった。また、白菜キムチの Nanopore sequence 解析による細菌叢の検討結果では、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属の乳酸菌が 90% 以上を占めていた。また、今回購入したキムチの pH は全て 5.0 以上であった。白菜キムチの発酵が進み乳酸菌の増殖が促進されると pH の低下が起こる。乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告もあることから、来年度は、白菜キムチの乳酸菌の発育増殖と pH の関係性及びこれに伴う腸管出血性大腸菌 0157 の生残性についての検討を Nanopore sequence 解析を用いて行う予定で

ある。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大防止のための検査法

（1）腸管毒素原性大腸菌の分離同定に関する通知法案の作成

今回検討したすべてのリアルタイム PCR 装置が EHEC 通知法を参考にした場合の検出感度を満たすことが示された。これらのリアルタイム PCR 装置の性能評価を踏まえ、ETEC 通知法案の作成を行った。

E. 結論

〔1〕病原大腸菌の特性解析

市販オクラにおける *astA* 保有大腸菌の汚染実態では、*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 培地の併用が推奨される。また、分離培地として 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。*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、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の作製を試み、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評価し、研究に応用する。

〔2〕病原大腸菌の病原因子解析と検出効率化

astA 遺伝子陽性大腸菌に関して、*astA* 遺伝子バリエーションの多様性や機能有無の可能性などを明らかにし、その研究結果を国際学術雑誌 *Frontiers in Microbiology* に投稿して掲載された。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活性を検出する実験系を構築したが、期待した結果を得られなかった。*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、実験系に問題があることが明らかとなり、次年度は試薬の再購入など確認を行ったのち解析を進める予定である。

〔3〕病原大腸菌の付着性の解析

9 件の集団下痢症事例由来 *astA* 保有大腸菌株から共通して類似のプラスミドが検出されたことから、当該プラスミドに着目した解析を行うことにより、集団下痢症を引き

起こす *astA* 保有大腸菌の病原性解明に繋がる可能性がある。

〔4〕食品汚染における食品特性の解明

白菜に大腸菌を付着させ、走査型電子顕微鏡で観察したところ、葉脈様部位および白菜内部に大腸菌が確認された。また、白菜を大量調理施設衛生管理マニュアルに基づき次亜塩素酸ナトリウム、過酢酸製剤で消毒を行った結果、細菌数の減少を認めたが、 10^3 CFU/g 未満に低下させることはできなかった。白菜内部に存在する細菌の洗浄を今回の実験法では行うことが難しかったためと考えられる。このことより、白菜キムチによる腸管出血性大腸菌 0157 食中毒を防止するためには、菌を増殖させないための温度管理が重要であることが示唆された。

また、白菜キムチにおける Nanopore sequence 解析の結果、*Lactobacillaceae* 科、*Latilactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属が 90% 以上を占めていた。

乳酸菌の増殖が他菌の発育を抑制するとの報告もあることから、乳酸菌の発育増殖と腸管出血性大腸菌 0157 の生残性について検討を行うことを考えている。

〔5〕食中毒の原因食品解明と拡大

防止のための検査法

ETEC の分離同定法に関する通知法案を作成した。作成した通知法案については厚生労働省と協議を行い、発出を進めていきたいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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.

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.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

(学会等発表)

新井沙倉、野本竜平、伊豆一郎、大野祐太、山谷聡子、土屋彰彦、小嶋由香、小西典子、千葉雄介、大西貴弘、工藤由起子．市販食品および河川水における腸管毒素原性大腸菌の汚染実態調査．第98回日本細菌学会総会．令和7年5月29-31日．石川県金沢市

伊豆一郎、新井沙倉、野本竜平、千葉雄介、土屋彰彦、山谷聡子、小西典子、大野祐太、小嶋由香、廣瀬昌平、大西貴弘、工藤由起子．食品等での腸管毒素原性大腸菌の汚染実態について．第46回日本食品微生物学会学術総会．令和7年9月18-19日．川崎市

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.