

## 令和3年度・衛生研究所研究費事業報告

# 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性腸管毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌の 食品からの効果的な検出方法の検討

(計画年度：令和3年度)

研究代表者

食品微生物担当

榊田希\*

共同研究者

食品微生物担当

鹿島かおり 高瀬冴子 山崎悠華 貫洞里美

### 目的

*astA*は、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素をコードする遺伝子であり、「他の下痢原性大腸菌」の主な病原遺伝子の一つに挙げられている。*astA*のみを保有する大腸菌 (*astA* 保有大腸菌) の下痢の発症機序は不明であるが、国内ではこれを原因とする食中毒は各地で報告されている。原因菌の血清型は様々だが判明している中では 0166:H15 によるものが最も多く、当所でも *astA* 保有大腸菌 0166:H15 による患者数 181 名の大規模な事例に遭遇している。

*astA* 保有大腸菌 0166:H15 が原因となった食中毒事例では、食品から本菌が検出されたことにより原因食品が特定されたことはなく、疫学調査による原因食品の推定に留まっている。これは、本菌を食品から検出する適切な方法が確立されていないことが原因の一つであると考えられる。そこで、食品からの検出を向上させることを目的に、分離培養法とリアルタイム PCR を用いたスクリーニング法について検討した。

### 成果概要

#### 1 性状確認

当所で分離した新潟県の事例由来である E1249 のほか、他自治体から分与された 2 株 (E1502, E1512) の *astA* 保有大腸菌 0166:H15 の性状を比較し、共通性状を検索した。

3 株に共通した性状として、mEC 及び FDA/BAM を参照した増菌培地による培養で発育が良好であり、NmEC では増殖力が劣っていた。分離培地に添加する選択剤に対しても選択性に共通性が確認された。

一方、薬剤感受性 (18 薬剤)、PFGE によるパターン解析には共通性が無かった。

#### 2 検出法の検討

3 株に共通の性状が確認されたことから、供試菌株として E1249 を用いて模擬検体にもやしを使って増菌培養条件、

リアルタイム PCR によるスクリーニング及び分離培地の検討を行った。

#### (1) 増菌培養条件

大腸菌の増菌に用いられる mEC 培地による方法、FDA/BAM を参照した増菌方法、及び 2 つの方法を組み合わせた増菌方法の 3 つの条件で実施した。

#### (2) 分離培地

抗生物質 A を添加又は非添加とした 3 種の分離培地を用い、増菌培養液を塗抹して発育したコロニーを 0166 血清による凝集反応で確認し、陽性率を比較した。

#### (3) リアルタイム PCR によるスクリーニング

培養液をアルカリ熱抽出し、プローブ法及びインターカレーター法で *astA* 遺伝子を標的とするリアルタイム PCR を行った。

#### (4) 結果

分離培地の比較では、抗生物質 A 添加培地は非添加培地よりも陽性率が高かった。特に、抗生物質 A を添加した酵素基質培地を用いた場合、いずれの増菌培養条件であっても釣菌したコロニーは全て陽性であった。リアルタイム PCR によるスクリーニング検査では、すべての検体がいずれの方法においても陽性となった。

これらのことから、分離培地には抗生物質 A を添加した培地を用いること、スクリーニング検査で陽性となった検体について、塗抹する枚数を増やす、釣菌するコロニーを増やすなど、集中的に検査を行うことで検出率を高められると考えられた。

### 自己評価

集団事例由来株の共通性状について検索し、一定の知見を得た。また、*astA* 保有大腸菌 0166:H15 の検出法について、培養法とスクリーニング法を組み合わせた一定の方法を提示することができた。今後は、食品全般への適用に向けさらに検討を行う予定である。

\* 現 食品安全課