

平成30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）

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

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
大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を、新興食中毒細菌、特に *Escherichia albertii* および *Arcobacter* 属菌を対象にして実施した。分担研究（1）*E. albertii* の制御法の確立では、①食品での検査法には、mEC および NmEC 中での 42℃ 増菌培養、DHL 等の分離培地、感度に優れ nested PCR 法が優れること、②鶏肉（内臓肉を含む）での汚染実態、広い食品群での調査の必要性、人からの分離が認められること、③発症菌量推定のために原因食品中の菌数定量法が確立可能なこと、が明らかになった。また、（2）*E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、①全ゲノム情報を基にして *E. albertii* に保存されている遺伝子群を網羅的探索、②機能解析のために遺伝子破壊株の作製、③配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子を計 9 遺伝子同定した。さらに、（3）*A. butzleri* の制御法の確立では、①選択分離培地として 5-フルオロウラシルもしくは CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地が優れること、② *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定するマルチプレックス PCR が高感度であること、③ *Arcobacter* 属菌定量のための最確数法が確立可能なことが明らかになった。

研究協力者

埼玉県衛生研究所
東京都健康安全研究センター

大塚佳代子
小西典子、尾畑浩魅、畠山 薫、
鈴木 淳

岩手県環境保健研究センター	上山 昭、山中拓哉、高橋幸子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宮城県保健環境センター	山谷聡子、佐藤千鶴子
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀、加藤直樹
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、阿部光一郎
富山県衛生研究所	磯部順子、木全恵子
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美
静岡市環境保健研究所	丸山幸男、望月瑞葉
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
奈良県保健研究センター	佐伯美由紀
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
愛媛県立衛生環境研究所	仙波敬子
福岡市環境局保健環境研究所	丸山浩幸
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司、内山浩子、福留智子
沖縄県衛生環境研究所	高良武俊
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
国立医薬品食品衛生研究所	新井沙倉、大屋賢司

A. 研究目的

新たな食中毒細菌（流行株などを含む）が流行し、定着する場合があるが、流行前に対策をとり制御することが重要である。近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている（日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。また、

Arcobacter 属菌は胃腸炎患者の便からしばしば分離されており、食中毒との関連性が示唆されている。特に、*Arcobacter butzleri* は、食中毒原因菌としての可能性が示唆されている。これら 2 菌種に着目し、食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を行うこととした。

研究組織としては、(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立（工藤由起子）、(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明

(大岡唯祐)、(3) *Arcobacter butzleri*の制御法の確立(大西貴弘)の3つの分担研究から構成した。

まず、*E. albertii*についてであるが、本菌は、腸管病原性大腸菌(EPEC)や腸管出血性大腸菌(EHEC)と類似した病原因子を保有するが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、感染性や病原機構などが異なる可能性が示唆されており、さらなる研究が求められている。また、本菌の発症菌量や主要な汚染食品は不明であり、解明が求められている。食中毒の原因食品として、複合調理食品の他に井戸水もあり、動物からの水の汚染が考えられる。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜の保菌が報告されている(Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016)。これらのことから、食肉など食品での汚染実態の解明を行い、汚染が起こりやすい食品群を明らかにする必要がある。加えて、それら食品群での *E. albertii* の挙動を確認する必要がある。しかし、それらに必要な食品の検査法は知られていない。国内外での食品での検査法は大腸菌の検査法に準拠した培地が各試験者によって用いられており、食品培養液に適した遺伝子検出法も系統立てては検討されていない。日本において *E. albertii* 食中毒が発生しているが、原因食品が特定された事

例は少ない。このため、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法を確立することが求められている。さらに、食中毒の基礎的情報でもある *E. albertii* の発症菌量を明らかにすることが必要であるが、これまでに食中毒での原因食品中の菌数が測定された報告はない。これらの課題について研究を進めることによって食中毒の予防対策の提案を行うことが可能になると考え、本研究を実施する。

平成 30(2018)年度には、工藤は、[1]食品での検査法の検討を行い、その結果を踏まえながら[2]食品(主に食肉)等での汚染実態調査および[3]発症菌量推定のためのプロトコル作成を行うこととした。また、大岡は、より効果的な食中毒調査および予防対策の実現に必要な遺伝子検査法の開発につながることを期待し、本菌の感染性や病原機構を理解することによって、より効果的に検出できる指標遺伝子配列を見いだす研究を実施することとした。[1]全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝子群の網羅的探索、[2]病原性・代謝系に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製、[3]配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出、を実施した。

次に、*A. butzleri*についてであ

るが、本菌はグラム陰性のラセン桿菌で鞭毛をもち運動性を有する。このような性質に加え、他の生化学性状や培養条件も *Campylobacter* 属菌と類似しており、特に *C. coli* とは生化学性状的には区別することができない。このようなことから *Arcobacter* 属菌が *Campylobacter* 属菌として誤同定され、*Campylobacter* の事例として処理されている可能性が示唆されている。このことは、*Arcobacter* 属菌が食中毒の原因菌であるかどうかについての結論が出ていない原因の一つとして考えられる。また、もう一つの理由として、*Arcobacter* 属菌に対する検査は通常の検査項目に入っていないため、*Arcobacter* 属菌が関与している事例が発生しても見逃される可能性が高いことが挙げられる。本研究では、*Arcobacter* 属菌の食中毒への関与について検討する。そのために、肉類、野菜、魚介類など様々な食品における汚染実態の調査、地方衛生研究所と協力し、*Campylobacter* 食中毒発生時に患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出、*Arcobacter* 属菌の制御法の検討、以上の三点について研究を行う。平成 30 (2018) 年度には、[1] 継代培地および分離培地の検討、[2] マルチプレックス PCR の検討、[3] 最確数法の確立、[4] *Arcobacter* 属菌分離プロトコ

ルの作成、実施した。

B. 研究方法

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品での検査法の開発

1) 腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法および選択分離培地を計 46 株を供試して検討した。さらに、その他の選択分離培地を検討するために、*E. albertii* の各種生化学性状を試験した。

2) Nested PCR の食品培養液での感度を検討した。Ooka ら (Genome. Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179) が報告した nested PCR (検出対象: *E. albertii* EACBF2103 および EACBF2104 遺伝子) を参照し、酵素および反応条件を変更した系を使用した。鶏肉培養液にて 4 株の菌液を 10 倍階段希釈し、菌接種鶏肉培養液 (想定 $10^6 \sim 10^2$ cfu/mL 鶏肉培養液) を調製した。これをアルカリ熱抽出法に供試し、得た DNA 抽出物を nested PCR に供試し、アガロースゲル電気泳動法にて増幅物の有無を判定し、感度を確認した。また、各種濃度の菌液を接種した鶏肉を mEC および NmEC にて増菌し、その培養液についても同様に nested PCR に供試し、感

度を確認した。

3) 増菌培養および分離培養条件を、*E. albertii*を接種した鶏肉(想定 $10^3\sim 10^2$ cfu/25 g 鶏肉)を供試して検討した。過去に食品から*E. albertii*の分離に成功した検査で使われていた buffered peptone water (BPW)に加え、mEC および NmEC の計 3 種類の増菌培養液を実施し比較した。分離培地には、DHL および 1%ラムノース・1%キシロース添加 DHL (糖 DHL) を使用した。

[2] 食品 (主に鶏肉) 等における汚染実態

1) 鶏肉 (内臓肉を含む) での汚染実態調査を行った。検体に 3 または 9 倍量の mEC を加えて 1 分間 ストマッカー処理し、 42°C にて 22 ± 2 時間培養した。その培養液を前述の nested PCR 供試して対象遺伝子の増幅を判定した。また、DHL にて乳糖非分解コロニーを分離した。

2) 多様な食品・環境検体での汚染実態調査およびヒト由来検体での調査を、地方自治体の協力機関にて、鶏肉を含んだ食品検体 486 検体と水および土壌の環境検体 10 検体の計 496 検体、ヒト便検体 (5,026 検体) を供して行った。

[3] 発症菌量推定のための検査法の確立と協力体制

[1] にてまとめた鶏肉での *E. albertii* 検査法を MPN 3 本法による定量検査に応用できるか検討した。鶏肉検体に菌を接種 (想定 400 cfu/10 g 鶏肉) し、mEC および NmEC にて乳剤を作製し、MPN 法で培養した各試験管の培養液を nested PCR、DHL での培養に供試し、MPN 値を算出した。また、*E. albertii* 食中毒が発生した場合に原因食品中の菌数測定が迅速に行えるように、乳糖非分解、キシロース非分解等を指標とした *E. albertii* 同定プロトコルおよび必要試薬を地方自治体の研究協力者に配布した。

(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明

[1] 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝子群の網羅的探索

これまでに取得している *E. albertii* 株の全ゲノム情報、NCBI データベースを基に計 55 株の遺伝子レパトリーを同定、また、同定された遺伝子群のうち、他の *Escherichia* 属細菌に存在しない遺伝子群も併せて検索した。

[2] 病原性・代謝系に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製

項目 [1] で同定した種特異的遺伝子のうち、種特異的病原性およ

び代謝関連候補を含む 13 遺伝子および機能未知であるが保存性の高い 7 遺伝子 (計 20 遺伝子) の遺伝子破壊株作製を試みた。遺伝子破壊には、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用し、全ゲノム配列決定株である CB9786 株およびトリ由来株である NIAH_Bird3 株を対象とした。

[3] 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

Escherichia 属細菌および近縁菌種のゲノム塩基配列との比較を行い、*E. albertii* CB9786 株にのみ存在する配列を取得した。次に、*E. albertii* 55 株のゲノム情報に対して、塩基配列保存性が 99%以上であるものを診断疫学マーカー候補遺伝子とした。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 継代培地および分離培地の検討

標準株として、*A. butzleri* (ATCC49618)、*A. cryaerophilus* (ATCC43158)、*A. skirrowii* (ATCC51400) を準備した。それら菌株の継代に用いる培地の検討を 1) ATCC が菌株分与時に推奨しているブルセラ寒天培地、2) *Campylobacter* 属菌の継代に用いられるミューラーヒントン寒天培地、3) トリプトソイ培地

に 5% の馬血液を加えた血液寒天培地、4) アルコバクター基本寒天培地の 4 種類の培地で行った。また、*Arcobacter* 属菌の分離培養に用いる選択培地の検討を行った。文献で報告されている *Arcobacter* 属菌の選択剤のうち 0.005% 5-フルオロウラシル、CAT サプリメント、CCDA サプリメントを検討した。

[2] マルチプレックス PCR の検討

A. butzleri、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR は Houf らの方法 (FEMS Microbiol. Letter, 2000, 193(1), 89-94) を改良して使用した。PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離し、641 bp のバンドを確認できた場合に *A. skirrowii* 陽性、401 bp のバンドを確認できた場合に *A. butzleri* 陽性、257 bp のバンドを確認できた場合に *A. cryaerophilus* 陽性とした。次に本 PCR 法の感度を検討した。0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地 225 mL に *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* が存在しないことがあらかじめわかっている鶏肉 25 g を加え、ストマッカー処理し、乳剤を作製した。この乳剤に既知の菌数の *A. butzleri* も

しくは *A. cryaerophilus* の菌液を加え攪拌後、この乳剤から DNA を抽出し、本 PCR 法を行った。また、*C. jejuni* および *C. coli* から抽出した DNA をテンプレートとして本 PCR の特異性を確認した。

[3] 最確数法の確立

本年度に検討した培地や選択剤を用いて、*Arcobacter* 属菌定量のための最確数法（3 本法）を検討した。増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地を用い、分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用いた。今回確立した *Arcobacter* 属菌に対する最確数法を用いて鶏肉 11 検体（産地の内訳は国産 10 検体、ブラジル産 1 検体）中の *Arcobacter* 属菌の定量を試験的に行った。なお、ブラジル産は冷凍処理されていたが、他の検体の冷凍処理の有無は不明であった。検体の種類はもも肉 6 検体、もも肉（ひき肉）1 検体、むね肉 1 検体、むね肉（ひき肉）1 検体、ササミ 1 検体、不明 1 検体であった。

[4] *Arcobacter* 属菌分離プロトコルの作成

次年度以降、研究協力機関に

Campylobacter 食中毒発生時に患者便から *Arcobacter* 属菌の分離を行っていただくが、そのためのプロトコルを作成した。

C. 研究結果

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品での検査法の開発

1) 供試した全 46 株は、mEC および NmEC 中で 36℃ および 42℃ の両方の温度帯で増殖した。また、分離培地上のコロニーは、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC) 上で株によって赤色または無色であり、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC) 上で特徴的な藤色の発色を示さなかった。DHL、糖 DHL、1%メリビオース・1%ラムノース・1%キシロース添加 DHL 上で、多くの株が無色のコロニーを形成した。45 株は、TSI で斜面部赤色、高層部黄色、硫化水素非産生を示し、それらのうちの 44 株はガス産生であった。また、供試した 46 株はすべて LIM でリジンデカルボキシラーゼ陽性、インドール陽性、運動性陰性であった。

2) Nested PCR 法の感度の検討を行った。各種濃度の菌を接種した鶏肉培養液で実施したところ、2nd PCR では 0.1 ~ 6.3

cfu/PCR tube で遺伝子を検出した。1st PCR は 2nd PCR よりも 10 ～ 1,000 倍感度が低かった。次に、鶏肉に菌を接種し、modified EC 培地 (mEC) およびノボビオシン加 mEC (NmEC) で培養した培養液を供試したところ、接種菌数が 0.5 ～ 21.4 cfu/25 g で遺伝子が検出された。1st PCR と 2nd PCR の間に検出感度の違いはほとんどなかった。

3) 鶏肉での増菌培養および分離培養条件の検討をしたところ、mEC および NmEC では、buffered peptone water (BPW) と比べて乳糖非分解の無色コロニーが少なかった。さらに、mEC および NmEC での増菌培養を比較した結果、42℃の方が後の分離率が高かった。また、NmECの方が分離率が高い傾向であった。DHL および糖 DHL での分離培養を比較した結果、糖 DHLの方が分離率が高い傾向であった。

[2] 食品 (主に鶏肉) 等における汚染実態

1) 鶏肉 (内臓肉を含む) での汚染実態調査を行った結果、鶏肉 118 検体および内臓肉 165 検体計 283 検体を試験したところ、鶏肉 2 検体 (陽性率 2%) および内臓肉 30 検体 (陽性率 18%) で PCR が陽性であった。また、PCR

陽性の内臓肉 7 検体から 37 株の *E. albertii* を分離した。

2) 多様な食品・環境検体計 496 検体のうち食品 2 検体から *E. albertii* を分離した。ヒト便検体 (5,026 検体) を調査し、2 検体 (0.04%) から 3 株の *E. albertii* を分離した。

[3] 発症菌量推定

鶏肉における MPN 法の検討の結果、mEC と NmEC にて増菌した場合の PCR 結果に基づく MPN 値はそれぞれ 240 および 460 (MPN/10 g) となり、接種菌数 (202 cfu/10 g) の 1.0 および 2.3 倍であり、菌数の差は 10 倍 (1 桁) 以内であった。接種菌数をおおよそ反映した MPN 値であった。なお、全ての nested PCR 陽性試験管の培養液から *E. albertii* が分離された。この結果をふまえ、食中毒原因食品中の *E. albertii* の菌数測定フローチャートを作成し、地方自治体との協力体制を構築し、本菌同定プロトコルおよび必要試薬を配布した。

(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明

[1] 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝子群の網羅的探索

E. albertii に保存性される遺伝子が 55 遺伝子同定され、その中には宿主細胞接着への関与が考

えられる繊毛タンパク、蛋白分解酵素、III型分泌装置により宿主細胞へ分泌されるエフェクターのホモログ、細胞膨化致死毒素など既知の病原関連因子の遺伝子ホモログが9個、また、フマル酸代謝や基質輸送に関わる遺伝子群などの遺伝子ホモログが2個、加えて、機能未知の遺伝子も数多く含まれていた。

[2] 病原性・代謝系に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製

CB9786株とNIAH_Bird_3株について、遺伝子破壊株の作製を試みた。しかしながら、本解析で用いた*E. albertii*株は2株ともプラスミドや組換え用PCR産物などのDNA取込効率が低いためか、破壊株の作製に時間を要し、現在のところ、NIAH_Bird3株において病原関連候補因子を中心に6遺伝子の破壊株作製を完了している状況にある。

[3] 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii*に特異的な領域として、まず当研究グループで実施した29株の比較解析から、118領域(計71,280 bp)を抽出しており、本研究ではそこに含まれる34遺伝子を解析対象とした。NCBIデータベースに登録された*E.*

albertii 26株に対して、blastnにより各遺伝子の保有および配列保存性を確認した。その結果、全55株に共通し、99%の配列保存性を示す遺伝子を計9遺伝子同定した。

(3) *Arcobacter butzleri*の制御法の確立

[1] 継代培地および分離培地の検討

ブルセラ寒天培地、血液寒天培地およびアルコバクター基本寒天培地上では*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii*の3菌種ともには良好に発育した。ミューラーヒントン寒天培地では*A. skirrowii*および*A. cryaerophilus*の発育は悪かった。試験の簡便化を考え、アルコバクター基本寒天培地を継代培地として使用することにした。選択分離培地としては、5-フルオロウラシルもしくはCATサプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地上で30℃、2日間、好気培養したところ、3菌種とも発育が良好であった。CCDAサプリメント(培地500 mLに対してCefoperazone 16 mg、Amphotericin B 5 mg)添加では、*A. cryaerophilus*および*A. skirrowii*の発育は不良であった。

[2] マルチプレックスPCRの検討

標準株の DNA を使用し、今回検討したマルチプレックス PCR を行ったところ、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定することができた。本 PCR 法の感度を検討し、乳剤中に 100 から 200 cfu/mL の *Arcobacter* 属菌が存在すれば検出できた。なお、*C. jejuni* および *C. coli* から抽出した DNA をテンプレートとして本 PCR を行っても陽性にならなかった。

[3] 最確数法の確立

Arcobacter 属菌定量のための最確数法（3 本法）には、増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地を用い、分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用い方法を確立した。最確数法の試験管を 30℃、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 mL を取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製し、これをマルチプレックス PCR に供試し、*Arcobacter* 属菌の検出を行う。陽性となった試験管数をもとに *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* それぞれの最確数を算出する。さらに、マルチプレックス PCR で陽性になった試験管の培養液を分離培地に塗抹し、30℃、

48 時間、培養する。単離した集落から DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行う。PCR が陽性の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定する。同定した菌株は冷凍保存する。

この方法にて、鶏肉中の *Arcobacter* 属菌の定量を試験的に行った。11 検体すべてで *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* のいずれか、もしくは両方が検出された。死菌由来の DNA を検出している可能性があるため増菌培養前の乳剤から DNA を抽出しマルチプレックス PCR を行っても検出できなかった。*A. skirrowii* はすべての検体で検出されなかった。菌数は $10^2 - 10^4$ MPN/100 g に集中していた。*A. butzleri* で 10^3 MPN/100 g を超えたのは 1 検体だけであったのに対して、*A. cryaerophilus* では 4 検体が 10^3 MPN/100 g を超えており、*A. butzleri* よりも *A. cryaerophilus* の菌量の方が多い傾向がみられた。鶏肉の部位やひき肉であるかどうかなどで菌数に差は認められなかった。また、冷凍処理が行われていた検体からも *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* が検出された。

[4] *Arcobacter* 属菌分離プロトコルの作成

研究協力機関が *Campylobacter* 食中毒発生時に患者便から *Arcobacter* 属菌の分離を行うためのプロトコルを以下の様に作成した：分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用い、これに患者便を塗抹後、30℃、48 時間、好気培養を行う。培養後、*Campylobacter* 様コロニーを 10 個選択し、アルカリ熱抽出法もしくは熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行う。陽性の菌株は国立医薬品食品衛生研究所に送付してもらいさらに性状を解析する。

D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

食品での検査法の開発では、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考慮し検討した。増菌培養法として、mEC および NmEC 中での 42℃ 培養が *E. albertii* にも適用できることが判明した。しかし、腸管出血性大腸菌の食品での検査法で利用している分離培地である 0.05 mg/L セフィキシム・2.5 mg/L 亜テルル酸加 CHSTEC (CT-CHSTEC) および CT-SMAC は、*E. albertii* の

分離には有用でないことが明らかになった。そこで、適切な分離培地を選定するために、*E. albertii* 分離株の生化学性状を改めて試験し、乳糖、ラムノースおよびキシロース非分解性が *E. albertii* に共通した性状であることが判明し、この生化学性状が分離培地および同定の指標として有用であると考えられた。そこで、食品からの *E. albertii* 分離培地には DHL を使用することにし、乳糖非分解のコロニーを分離し、その株のキシロース分解性をキシロース添加アンドレイドペプトン水にて判定することにした。

食品培養液での *E. albertii* のスクリーニングに供試する nested PCR (Ooka らの方法) を改変し、TaKaRa Ex Taq を用いた系として検出感度を確認したところ、鶏肉培養液を用いた検討では 1st PCR で 11.5~152.5 cfu/PCR tube、2nd PCR で 0.1~6.3 cfu/PCR tube となり、1st PCR でも十分な感度を示し、2nd PCR では感度が 10~1000 倍以上高まることが示された。また、*E. albertii* を接種した鶏肉を mEC および NmEC で培養した場合での検討では、検出感度は 49.7~0.5 cfu/25 g であり、鶏肉 25 g あたりに数十の *E. albertii* が汚染している場合は 1st PCR でも十分に検出可能であり、2nd PCR を必ずしも実施し

なくても検出結果にあまり影響がないことも示された。

菌接種鶏肉を用いて増菌培養および分離培養条件を検討したところ、BPW 中での増菌培養は分離の際に *E. albertii* に似たコロニーが多数生育し *E. albertii* コロニーの判別が難しく、mEC および NmEC 中での増菌培養が優れていることが示された。また、増菌温度は、37℃ よりも 42℃ の方が *E. albertii* 分離陽性率が高かったため、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通である mEC および NmEC 中での 42℃ 培養が適用できることが判明した。しかし、mEC と NmEC の比較では、NmEC がより優れていた。DHL と糖 DHL の比較では、糖 DHL がより優れていたが、糖 DHL を調製するためには 2 種類の糖の溶液を作製し、それらをフィルターろ過滅菌する必要があるため、実際の検査の現場で使用する際には培地調製の手間等も考慮する必要がある。状況によっては、DHL の方が活用しやすいことが考えられた。以上の結果を以下の研究にも応用した。

鶏肉（内臓肉を含む）での汚染実態調査では、鶏肉および内臓肉の両方から PCR によって *E. albertii* が検出された。特に、内臓肉では、複数の検体から *E. albertii* を分離したため、過去の報告（Asoshima

et al., Jpn. J. Infect. Dis., 2015, 68, 248-250; Maeda *et al.*, J. Vet. Med. Sci., 2015, 77(7), 871-873; Wang *et al.*, Epidemiol. Infect., 2016, 144, 45-52) と同様に、鶏の保菌が示唆された。

多様な食品・環境検体での汚染実態調査では、市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されているものも存在することが判明した。広い対象について引き続き汚染実態を調査する必要があると考えられる。ヒト由来株での調査では、陽性検体数は少ないものの、*E. albertii* がヒト便から分離された例もあった。本菌は、従来、Hafnia、ボイド赤痢菌血清型 13、あるいは大腸菌として同定されていた菌株から構成されているため、同定が難しい。そのため、自治体等検査機関で乳糖非分解かつ非運動性の腸内細菌が得られた際には本菌を疑う必要がある。

発症菌量を推定するためには、*E. albertii* 食中毒が発生した際に迅速に対象食品中の菌数を測定する必要がある。本研究によって、鶏肉を対象とした *E. albertii* の菌数測定の方法を確立した。今後、他の食品も対象とする場合には、本試験法を応用することが可能である。*E. albertii* 食中毒事例の報告数は少ないため、本研究の 3 年間通して行

う予定を立てている。今後、さらに地方自治体の協力を得て全国的な協力体制を構築したい。

(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明

本年度実施した *E. albertii* 55 株に対する遺伝子レポーター解析から、本菌特異的な遺伝子群を 55 遺伝子同定することが出来た。今後、これらの遺伝子破壊株を作製し、培養細胞への感染実験を行うことにより、病原性や代謝系など本菌の特性を明らかに出来ると考えられる。なお、遺伝子破壊株の作製に関しては、DNA 取込および組換え効率が低いことから、現在のところトリ由来株である NIAH_Bird3 株に限定されており、ヒト由来株での作製には成功していない。今後はヒトへの病原性解析のため、ゲノム情報を取得しているヒト下痢症由来 *E. albertii* 保有株の中から DNA 取込効率の高い株を選定し、破壊株の作製ならびに機能解析を進める必要がある。

また、診断疫学マーカー候補遺伝子については、*E. albertii* に共通であり、かつ、配列保存性が極めて高い遺伝子を 9 個同定することが出来た。次年度以降、これらの遺伝子について診断疫学マーカーとしての適性を調べるため、食品や動物由来株を対象とした検出プライマ

ーによる PCR 増幅確認と増幅産物の配列決定を実施する。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

本研究の目的は、*Arcobacter* 属菌の食中毒事例への関与を明らかにすることである。本年度は培地や検出法、定量法など今後の研究で用いる基礎的な内容を検討した。検討にあたっては、研究協力機関における省力化を図るために比較的簡便でかつ市販されている試薬を使用した。検討の結果、作業の簡便性を考慮して継代培地はアルコバクター基本培地を使用することとした。この培地はペプトン、イーストエクストラクト、食塩からなる単純な培地であるが、*Arcobacter* 属菌の発育に適したペプトンが使用されている。また、活性炭や血液を使用しないため *Campylobacter* 属菌が発育しにくいという特徴も持つ。

Arcobacter 属菌に対する選択剤に関しても多くのものが報告されているが、基本的な選択剤として利用されている 5-フルオロウラシル、*Campylobacter* 属菌の分離に用いられている CAT サプリメントが優れていた。ただし、CAT サプリメントは高価なため、5-フルオロウラシルを増菌培地で用い、その後の分離培地に CAT サプリメントを使用することにした。鶏肉を検体として

増菌培養を行った場合、これら増菌培地と分離培地の組み合わせで、夾雑菌の発育を効果的に抑えられることが判明した。

食品からの *Arcobacter* 属菌の検出には、マルチプレックス PCR (*A. butzleri*、*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* を対象) での遺伝子検査法で行い、あわせて分離培地を用いて菌分離を行うこととした。マルチプレックス PCR は Houf らの方法をもとに、条件を最適化して使用した。本マルチプレックス PCR は、増菌培養液 1 mL 中に 100~200 cfu の菌が存在すれば検出できるため、増菌培養後の検出には十分な検出感度を有していると思われた。

今回検討した内容をまとめ、*Arcobacter* 属菌に対する最確数法にて試験的に市販の鶏肉における *Arcobacter* 属菌の定量を行った。その結果、すべての検体から *Arcobacter* 属菌が検出され、2 検体を除き *A. butzleri* および *A. cryaerophilus* が同時に検出されたことから、これらはニワトリにおける常在菌であることが示唆された。*A. skirrowii* が鶏肉から検出されることは既に報告されており、今回本菌が検出できなかった原因として、最確数法を試験管 1 本あたり培養液 1 mL で行ったため検出感度が低下した可能性が考えられる。

次年度からの本試験では定法どおり試験管 1 本あたり培養液 10 mL で行い検討する予定である。

今回の鶏肉からの定量では、すべての検体で *Arcobacter* 属菌のマルチプレックス PCR が陽性となった。しかし、陽性になった試験管から分離培養を行っても、すべての検体で菌分離を行えたわけではなかった。このため菌分離ができなかった試験管では、死菌の DNA を PCR が検出している可能性も考えられた。しかし、増菌培養前の乳剤から DNA を抽出してマルチプレックス PCR を行っても陽性とならないことから、その可能性は低いと思われる。現時点では、おそらく培養液中の菌数が少ないのが原因ではないかと考えている。マルチプレックス PCR 陽性の試験管に関しては、培養日数を延ばすことによって菌分離率が上昇するか検討を行う予定である。

供試した鶏肉のうち、ブラジル産の 1 検体が冷凍処理済みであったが、この検体からも *A. butzleri* および *A. cryaerophilus* が検出された。このことから *Arcobacter* 属菌は冷凍条件でも長期間生存できる可能性が示唆された。食品中における *Arcobacter* 属菌の増殖挙動や、生存性などは次年度以降さらに検討する予定である。

次年度以降、研究協力機関に

Campylobacter 食中毒発生時に患者便から *Arcobacter* 属菌の分離を行っていただくために分離手順プロトコルを作成した。今回のプロトコルでは CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地で分離を行うこととした。しかし CAT サプリメントの選択性は良いが、夾雑菌の発育を完全に抑えることはできない。そのため本プロトコルでは *Campylobacter* 様集落を 10 個選択して PCR で鑑別することにした。今後、*Arcobacter* 属菌の代謝性状などがさらに解析されれば、それらをもとに鑑別の容易な培地を作製できるかもしれない。

E. 結論

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を、新興食中毒細菌、特に *E. albertii* および *Arcobacter* 属菌を対象にして実施した。分担研究(1) *E. albertii* の制御法の確立では、①食品での検査法には、mEC および NmEC 中での 42℃ 増菌培養、DHL 等の分離培地、感度に優れる nested PCR 法が優れること、②鶏肉(内臓肉を含む)での汚染実態、広い食品群での調査の必要性、人からの分離が認められること、③発症菌量推定のために原因食品中の菌数定量法が確立可能なこと、が明らかになった。また、分担研究(2)

E. albertii の感染性・病原因子の解明では、①全ゲノム情報を基にして *E. albertii* に保存されている遺伝子群を網羅的探索、②機能解析のために遺伝子破壊株の作製、③配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子を計 9 遺伝子同定した。さらに、分担研究(3) *A. butzleri* の制御法の確立では、①選択分離培地として 5-フルオロウラシルもしくは CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地が優れること、② *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定するマルチプレックス PCR が高感度であること、③ *Arcobacter* 属菌定量のための最確数法が確立可能なことが明らかになった。本研究では、*E. albertii* および *A. butzleri* の制御のために必要な食品での検査法確立を行い、重要な汚染食品群の解明、食品中での制御法確立、食中毒発生時の原因食品探索および感染菌量の解明につなげる研究を進めていきたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Konishi, N., Obata, H., Kai, A.,
Ohtsuka, K., Nishikawa, Y.,

Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Major vehicles and O-serogroups in foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli* outbreaks in Japan, and effective detection methods of the pathogen in food associated with an outbreak. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 59(4): 161-166, 2018.

2. 学会発表

岩渕香織、土屋 彰彦、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、和田裕久、木全恵子、永井佑樹、吉田孝子、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子. 腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (1). 第39回日本食品微生物学会学術総会. 平成30年9月27、28日. 大阪

吉田孝子、白石祥吾、稲垣俊一、森 哲也、平塚貴大、永井佑樹、磯部順子、和田裕久、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、土屋 彰彦、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子. 腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価 (2). 第39回日本食品微生物学会学術総会. 平成30年9月

物学会学術総会. 平成30年9月27、28日. 大阪

尾畑浩魅、小西典子、大塚佳代子、鈴木 淳、貞升健志、甲斐明美、工藤由起子. 食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法と有用性の検討. 第39回日本食品微生物学会学術総会. 平成30年9月27、28日. 大阪

工藤由起子. 病原大腸菌による食中毒と食品の検査法について. 平成30年度短期研修 食品衛生危機管理研修. 国立保健医療科学院. 平成30年10月24日. 和光市

門脇奈津子、大塚佳代子、大阪美紗、小西典子、工藤由起子. 腸管毒素原性大腸菌のリアルタイムPCR法における各種検出機器及びクエンチャーでの検出感度の比較. 第114回日本食品衛生学会学術講演会. 平成30年11月15、16日. 広島

小西典子、大塚佳代子、山崎匠子、和田裕久、磯部順子、永井佑樹、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、土屋彰彦、吉田孝子、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子. 食品を対象とした腸管毒素原性大腸菌検出法確立のためのコラボレイティブスタディによる評価. 第114回日本

食品衛生学会学術講演会・平成
30年11月15、16日・広島

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし