

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

分担研究報告書

Escherichia albertii の制御法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

日本では、*Escherichia albertii*による食中毒の発生が多数報告されている。このため、*E. albertii*原因食品特定に対応する食品での検査法を確立すること、食肉など食品での汚染実態の解明を行い、汚染が起りやすい食品群を明らかにすること、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を目標に研究を行った。その結果、[1] 食品での検査法の検討：腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC および NmEC を用いた 42℃培養）が有用であり、乳糖・ラムノース・キシロース非分解性の性質を利用し DHL およびラムノース・キシロース添加 DHL が有用であることが明らかになった。また、[2] 食品（主に食肉）等での汚染実態調査：鶏肉（内臓肉等を含む）から *E. albertii*が検出され、鶏が保菌する可能性が示され、他の食品についてもさらに調査が必要と考えられた。ヒトから分離されたことから、不顕性感染など潜在的に保菌しているヒトがいる可能性が示された。さらに、[3] 発症菌量推定：*E. albertii*食中毒発生時に原因食品を特定し、食品中の本菌の菌数を測定するプロトコル、試薬を協力機関に配布した。これら成果を踏まえて、次年度にはさらに各項目の研究を発展させ、地方自治体との連携も広げる。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子

東京都健康安全研究センター

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、阿部光一朗
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
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

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）（参照 1、参照 2）。*E. albertii* 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.*, 2016, 144 45-52）。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。また、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、[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調査を行う事とした。まず、[1] 食品での検査法の検討では、腸管出血性大腸菌の検査法と共通の条件（増菌培地・温度条件や選択分離培地など）を優先して検討することにした。また、食品培養液からのスクリーニングを設定することを考え、PCR 法を取り入れ

ることとした。*E. albertii* 同定用プライマーには *clpX*, *lysP*, *mdh* を標的とした Hyma らのマルチプレックス PCR (J. Bacteriol, 2005, 187(2), 619-628) が広く用いられているが、食品（野菜）を対象とした試験で、本プライマーが非特異反応を示すことが Maeda らにより発表された (Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67, 503-505)。このため、本研究事業の別の分担研究を実施する大岡唯祐研究分担者の報告した EACBF2103 および EACBF2104 遺伝子を検出対象とした nested PCR 法 (Ooka *et al.*, Genome. Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179) について、本研究の目的に沿った使用が可能であることを菌株での特異性や食品での検出感度を確認し応用することとした。[2] 食品（主に食肉）等での汚染実態調査では、[1] の研究の進捗状況を参考にして、暫定的な検査法を決めて、食品・環境検体等を対象に *E. albertii* を検出した。[3] 発症菌量推定のための調査では、[1] の研究の進捗状況を参考にして、食中毒発生時の原因食品中の *E. albertii* の定量を目指して、最確数 (MPN) 法を基本とする食品の増菌培養、PCR によるスクリーニング、分離培養、菌株の同定など一連の試験法としてまとめ、そ

れについて本菌の食品での添加回収実験を行って検証し、暫定的な試験法を確立することにした。食中毒発生時に喫食量が推定されることによって発症菌量が考察可能と考えられる。

B. 研究方法

[1] 食品での検査法の開発

(1) 増菌培養法および選択分離培地の検討

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。

1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株 38 株、無症状保菌者由来株 2 株、動物（トリおよびサル）由来株 6 株の計 46 株を供試した（表 1）。

2) *E. albertii* の増菌培養条件の検討

カジトン培地に保存している菌株(46株)1エーゼ分(10 µL)を modified EC 培地 (mEC、日水製薬) およびノボピオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 10 mL に接種し、36°C および 42°C にて 18

時間培養の増殖を試験した。

3) 選択分離培地の検討

カジトン培地に保存している菌株(46株)1エーゼ分(10 µL)を mEC 10 mL に接種し、36°C にて 18 時間培養した。この菌液を、クロモアガー STEC 基礎培地 (CHSTEC、クロモアガー社製造、関東化学販売)、0.05 mg/L セフィキシム・2.5 mg/L 亜テルル酸加 CHSTEC (CT-CHSTEC)、ソルビトールマッコンキー寒天培地 (SMAC、オキシソイド)、DHL 寒天培地 (DHL、日水製薬) に画線した。さらに、*E. albertii* がラムノース、キシロースおよびメリビオース非分解である報告 (Hinenoya *et al.*, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2017, 307 (8), 564-571) を参考にして、1%ラムノース・1%キシロース添加 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 にも画線し、上記の他の分離培地とともに 37°C にて 22±2 時間培養した。

4) 生化学性状の確認

カジトン培地に保存している菌株(46株)1エーゼ分(10 µL)を mEC 10 mL に接種し、36°C にて 18 時間培養した。この菌液を Triple Sugar Iron 培地 (TSI、

関東化学) および LIM 培地 (日本製薬) に穿刺し、37℃にて 22 ±2 時間培養した。また、グルコースの分解によるガス産生を確認するために、カジトン培地に保存している菌株 (46 株) 1 エーゼ分 (10 µL) をダーラム管入りの Trypticase Soy Broth (TSB、オキシソイド) 10 mL に接種し、37℃にて 24 時間培養した。

(2) Nested PCR の食品培養液での感度の検討

E. albertii は野鳥からの分離報告が多く、過去に鶏肉からも分離されているため (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)、鶏肉培養液を利用し感度を検討することとした。

1) 各種濃度の菌を接種した鶏肉培養液での検討

食中毒事例由来株である EA12、EA21、EA24、EA29 の 4 株を供試した。カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ分 (10 µL) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37℃にて 18 時間培養した。鶏肉検体を 25 g 採取し、mEC および NmEC 225 mL を加えて 1 分間ス

トマッカー処理し、42℃にて 22 ±2 時間培養した。この鶏肉培養液にて 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。菌接種鶏肉培養液を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。菌接種鶏肉培養液 100 µL を 10,000×g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 µL 加え混和後、100℃にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 µL 加え、10,000×g にて 10 分間遠心し、その上清を nested PCR の 1 段目 (1st PCR) のテンプレート (想定 $10^3 \sim 10^{-1}$ cfu/µL) とした。

Nested PCR は、Ooka らが報告した方法 (Genome. Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179) を参照したが、報告の中で使用されている Kapa-taq extra よりも汎用性のある PCR 酵素を検討することとし、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) および Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) を選定した。また、プライマー終濃度が 0.3 µM となるよう調製した (図 1)。機器は MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) を使用した。

TaKaRa Ex Taq での反応条件は、94℃ 2 分間、94℃ 30 秒間－54℃ 30 秒間－68℃ 1 分間の 30 サイクル、68℃ 2 分間とした。Quick Taq HS DyeMix での反応条件は、98℃ 10 秒間、98℃ 10 秒間－54℃ 30 秒間－72℃ 1 分間の 30 サイクル、72℃ 2 分間とした。1st PCR 後にその産物を ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって精製し、それを用いて nested PCR の 2 段目 (2nd PCR) を実施した。1st PCR および 2nd PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供試し、結果を判定した (図 1)。

2) 菌を接種した鶏肉での検討
前述と同様に 4 株の 1 エーゼ分 (10 µL) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37℃にて 18 時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 10 倍階段希釈 (想定 $10^5 \sim 10^2$ cfu/mL) し、鶏肉 25 g に接種 (想定 $10^4 \sim 10^1$ cfu/25 g 鶏肉) し、mEC および NmEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42℃にて 22 ± 2 時間培養した。培養液 100 µL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。抽出した DNA を前述の nested PCR に

供試した (図 2)。

(3) 鶏肉での増菌培養および分離培養条件の検討

鶏肉に *E. albertii* を接種し、増菌培養および分離培養条件を検討した。過去に食品から *E. albertii* の分離に成功した検査 (Lindsey *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2015, 81(5), 1727-1734; Maeda *et al.*, J. Vet. Med. Sci., 2015, 77(7), 871-873; 高良ら, IASR, 2016, 37(12), 14-15; 石岡ら, IASR, 2017, 38(8), 25-26) で使われていた buffered peptone water (BPW、日水製薬) に加え、上記 mEC および NmEC の計 3 種類の増菌培養液を供試し、比較した。前述と同様に 4 株の 1 エーゼ分 (10 µL) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37℃にて 18 時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 10 倍階段希釈 (想定 $10^4 \sim 10^3$ cfu/mL) し、鶏肉 25 g に接種し (想定 $10^3 \sim 10^2$ cfu/25 g 鶏肉)、mEC、NmEC および BPW 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、37℃および 42℃にて 22 ± 2 時間培養した。この培養液 10 µL を、上述で *E. albertii* の選択分離培地としての有用性を示した DHL および糖 DHL に画線し、

37℃にて 18 時間培養した。生育したコロニーのうち、1 条件につき 8 または 24 コロニーの乳糖非分解コロニーを nested PCR の 1st PCR を基本としたコロニー PCR に供試した。コロニー PCR は、あらかじめ PCR チューブに必要試薬を分注し、そこに対象となるコロニーを爪楊枝の先で少量採取し、PCR チューブの底にこすりつけたものをサーマルサイクラーに入れ、反応させることよって行った。

[2] 食品（主に鶏肉）等における汚染実態

（ 1 ）鶏肉（内臓肉も含む）での汚染実態調査

[1] で確立した鶏肉における *E. albertii* 検査法を応用した（図 3）。地方自治体 9 機関とともに鶏肉および内臓肉における *E. albertii* 汚染実態調査を行った。検体の重量を測定し、その 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℃にて 22±2 時間培養した。培養液 100 μL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出し、前述の nested PCR（1st PCR および一部は 2nd PCR）に供試した。PCR 陽性の場合には、検体培養液の 10⁻³ および 10⁻⁴ 希釈液 100 μL を DHL へ塗抹

し、37℃にて 18 時間培養した。DHL 上の乳糖非分解コロニーを上述のコロニー PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。

（ 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

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 検体を試験した。また、計 5,026 のヒト便検体を試験した。食品検体および環境検体は、BPW または mEC 等で増菌し、その培養液を通常の試験法で使用する培地（マッコンキー寒天培地、ドリガルスキー寒天培地、DHL 等）で培養し、乳糖非分解の菌株を *E. albertii* であるか確認を行った。非選択培地（普通寒天、TSA 等）に単離し、ここから TSI および LIM に接種し、乳糖および白糖非分解、ブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性の性状を示す株を選択した。それらの株を 1% キシロース添加アンドレイドペプトン水（オキシイド）に接種し、キシロース非分解の株を nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。なお、一部の自治体では、増菌培養液の遺伝子スクリーニング（PCR）

を行い、結果が陰性であった場合は、試験を中止した。

ヒト便検体については、前述の分離培地に直接塗抹して、以降の試験を実施した。

[3] 発症菌量推定のための検査法の確立と協力体制

(1) 鶏肉における MPN 法の検討

[1] にてまとめた鶏肉での *E. albertii* 検査法を MPN3 本法による定量検査に応用することを検討した (図 4) 。すなわち、カジトン培地に保存している株 (EA12) 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 10 mL に接種し、37 $^{\circ}$ C にて 18 時間培養した。この菌液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて 10 倍階段希釈 (想定 10³ cfu/mL) し、鶏肉検体 25 g へ希釈した菌液 (想定 400 cfu/10 g 鶏肉) を接種し、mEC および NmEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理した。ストマッカー処理後の試料を空の中試験管 3 本へ 10 mL ずつ接種、また、10 mL の増菌培地入り中試験管 3 本へ 1 mL ずつ接種し、さらに 10 mL の増菌培地入り中試験管 3 本へ 0.1 mL ずつ接種し、42 $^{\circ}$ C にて 22 \pm 2 時間培養した。試験管培養液 100 μ L からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。抽

出した DNA を前述の nested PCR に供試した。PCR 陽性管のパターンから、MPN 値 (食品衛生検査指針微生物編 2004 参照) を求めた。また、nested PCR 陽性試験管の培養液から *E. albertii* を分離できるか確認するため、全ての nested PCR 陽性試験管の培養液を DHL に画線し、37 $^{\circ}$ C にて 18 時間培養した。DHL 上の乳糖非分解のコロニーを前述のコロニー PCR に供試した。

(2) 地方自治体との協力体制の構築

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。

C. 研究結果

[1] 食品での検査法の開発

(1) 増菌培養法および選択分離培地の検討

1) *E. albertii* の増菌培養法の検討

供試した全 46 株は、mEC および NmEC 中で 36 $^{\circ}$ C および 42 $^{\circ}$ C の両方の温度で増殖した (表 1) 。

2) 選択分離培地の検討

SMACでは、供試した全46株は、生育したものの、ソルビトール分解（赤色）の菌株と非分解（無色）の菌株がそれぞれ72%（33株）と18%（13株）の比率であった（表2）。

供試した全46株は、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に生育した（表2）。DHLおよび糖DHLでは、供試した46株のうちトリ由来株1株が赤色コロニーであったが、その他の株は無色コロニーを形成した。1%メリビオース・1%ラムノース・1%キシロース添加DHLでは、上記のトリ由来株に加えて事例12由来の1株も赤色コロニーを形成した。

供試した全46株は、CHSTECに生育し、そのコロニーは事例12由来株1株が藤色を呈し、その他の株は白色コロニーであった（表2）。CT-CHSTECでは、供試した全46株がCT感受性を示し、培地上にコロニーが生育しないもしくは直径1mm以下の微小コロニーであった。

3) その他の生化学性状

供試した46株のうち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た（表2）。

また、上述のDHL、糖DHLおよび1%メリビオース・1%ラムノース・1%キシロース添加DHL上で赤色コロニーを形成したトリ由来株は、斜面部黄色、高層部黄色、硫化水素非産生を示した。

また、供試した全46株は、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。供試した46株のうち45株は、ダーラム管入りのTSBでガス産生であったが、事例12由来株はガス非産生であった。

(2) Nested PCR法の食品培養液での感度の検討

1) 各種濃度の菌を接種した鶏肉培養液での検討

E. albertii EACBF2103およびEACBF2104遺伝子の検出限界は、2種類のPCR酵素（TaKaRa Ex TaqおよびQuick Taq HS DyeMix）ともに、6.75 cfu/PCR tubeであった（表3）。また、1st PCRおよび2nd PCRともに検出限界に差はなかった。そのため、以降、TaKaRa Ex Taqを用いて感度の検討を行った。

鶏肉培養液にて4菌株を希釈し、*E. albertii* 検出感度を算出した場合、0.1~6.3 cfu/PCR tubeで遺伝子を検出した（表4）。

このときは、2nd PCRの方が1st PCRよりも10~1,000倍感度が高かった(図5)。

2) 菌を接種した鶏肉での検討
4菌株を鶏肉に接種し、mECおよびNmECの2つの増菌培地で培養後*E. albertii*検出感度を算出した場合、0.5~21.4 cfu/25g鶏肉以上の菌数接種で遺伝子が検出された(表5)。また、mECでの1株で2nd PCRの方が1st PCRよりも10倍感度が高かったが、他の条件では1st PCRと2nd PCRの間に検出感度の違いはなかった。

(3) 鶏肉での増菌培養および分離培養条件の検討

BPWでの培養では、両温度ともにmECおよびNmECと比べDHL上の無色コロニー数が多く、*E. albertii*を見分けるのが困難であった。mECおよびNmECでは、BPWと比べて乳糖非分解の無色コロニーが少なかった。しかし、37℃では、*E. albertii*様の無色コロニーが42℃と同程度生育するものの、それらはPCRの結果から*E. albertii*ではなかった(表6)。

以上の結果から、mECおよびNmECでの増菌培養をさらに比較した。また、分離培地についても

DHLおよび糖DHLを比較した。その結果、37℃と42℃を比較すると、42℃の方が分離率が高かった(表7)。また、mECとNmECを比較すると、NmECの方が分離率が高かった。さらに、DHLと糖DHLを比較すると、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(内臓肉も含む)での汚染実態調査

鶏肉118検体および内臓肉165検体の計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(表8)。また、PCR陽性の内臓肉7検体から37株の*E. albertii*が分離された。

(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

1) 食品・環境検体での汚染実態調査

食品・環境検体の計496検体のうち食品2検体から*E. albertii*を分離した(表9)。

2) ヒト由来株での調査

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(表10)。

[3] 発症菌量推定

(1) 鶏肉における MPN 法の検討

mEC と NmEC を供試した場合の 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 (表 11)。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た (図 6)。

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。現在までのところ、*E. albertii* 食中毒発生の報告はない。

D. 考察

[1] 食品での検査法の開発

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の検討では、mEC および NmEC 中での 42°C 培養が *E. albertii* にも適用できることが判明した。次に行った、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選択分離培養法の検討では、*E. albertii* コロニーは CHSTEC 上で

特徴的な藤色の発色を示さず、また、SMAC 上のコロニーの発色は株によって赤色または無色となり、特徴的な色調を示さなかった。さらに、*E. albertii* は CT (腸管出血性大腸菌の検査法で使用されている濃度) に感受性であった。これらのことから、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 (CT-CHSTEC、CT-SMAC) は、*E. albertii* の分離には有用では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、食中毒事例、下痢症事例等由来の *E. albertii* 分離株について生化学性状を改めて試験した。事例 12 由来株は、糖 DHL では無色コロニーを形成したものの、1%メリビオース・1%ラムノース・1%キシロース添加 DHL では赤色コロニーを形成したことから、この株はメリビオースを分解することが判明した。そのため、以降の分離培地の検討ではメリビオースを除いた糖 (1%ラムノース・1%キシロース) 添加 DHL を供試した。また、トリ由来の 1 株が DHL 上で赤コロニーを示したが、事例由来株を含むその他のすべての株は DHL および糖 DHL 上で無色コロニーを形成したため、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。

本研究で供試する Ooka らの nested PCR の PCR 酵素をより汎用性のあるものに変更するために、TaKaRa Ex Taq と Quick Taq HS DyeMix を用いて検討した。両酵素で感度に差がなかったため(表 3)、この後の試験では TaKaRa Ex Taq を用いることにした。この nested PCR の感度を鶏肉培養液を用いて検討したところ、感度が 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すこと、また、2nd PCR では感度が 10~1000 倍以上高まることが示された(表 4)。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、増菌培地による検出感度の差はほとんど認められなかった。次に、鶏肉に *E. albertii* を接種した検体で検討したところ、49.7~0.5 cfu/25 g であった(表 5)。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 は必ずしも実施しなくても結果にあまり影響がないことも示された。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、mEC よりも NmEC の方が nested PCR の感度が高い傾向があったことから、*E. albertii* の増菌培養には NmEC の方が mEC よりも優れている可能性が示唆された。

続いて、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 中での増菌培養では、mEC および NmEC と比べ、DHL 上に *E. albertii* 以外の無色コロニーの生育が多数認められ、*E. albertii* コロニーの判別が難しかった(表 6)。そのため、過去には BPW を供試して食品から *E. albertii* を分離した報告が多数あるものの(Lindsey *et al.*, Appl Environ Microbiol, 2015, 81(5), 1727-1734; Maeda *et al.*, J Vet Med Sci, 2015, 77(7), 871-873; 高良ら, IASR, 2016, 37(12), 14-15; 石岡ら, IASR, 2017, 38(8), 25-26)、鶏肉を対象とした場合には、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°C 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 がより優れており、また、DHL と糖 DHL の比較では、糖 DHL がより優れていた。ただし、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。

以上の結果から、鶏肉からの *E. albertii* 分離方法をまとめた (図 7)。次年度には、引き続き優れた遺伝子検出法および分離培養法を検討したい。

[2] 食品 (主に鶏肉) 等における汚染実態

鶏肉 (内臓肉も含む) 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。また、過去の *E. albertii* 食中毒事例で汚染食品が特定されたものには、野菜サラダとニガナの白和えがあり、汚染源として推定されているものには井戸水がある。そこで、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。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経緯があり、性状が似ていることから同定には注意が必要である。そのため、検査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。

[3] 発症菌量推定

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* の菌数測定を MPN 法を基本として検討し、接種菌数をおおよそ反映した MPN 値が確認される方法を確立した。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。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。

E. 結論

今年度に取り組んだ 3 項目について以下の様な結論を得た。[1] 食品での検査法の検討：腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC および NmEC を用いた 42℃ 培養）が有用であり、乳糖・ラムノース・キシロース非分解性の性質を利用し DHL およびラムノース・キシロース添加 DHL が有用であることが明らかになった。また、[2] 食品（主に食肉）等での汚染実態調査：鶏肉（内臓肉等を含む）から *E. albertii* が検出され、鶏が保菌する可能性が示され、他の食品についてもさらに調査が必要と考えられた。ヒトから分離されたことから、不顕性感染など潜在的に保菌しているヒトがいる可能性が示された。さらに、[3] 発症菌量推定：*E. albertii* 食中毒発生時に原因食品を特定し、

食品中の本菌の菌数を測定するプロトコル、試薬を協力機関に配布した。これら成果を踏まえて、次年度にはさらに各項目の研究を進展させ、地方自治体との連携も広げる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（誌上発表）

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.

（学会等発表）

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. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

参照 1 過去の *E. albertii* 食中毒事件

年	自治体	原因食品
2017	宇都宮市	食事（未特定）
2016	静岡県	食事（未特定）
2016	沖縄県	ニガナ白和えの原材料
2015	広島県	不明
2013	熊本県	生野菜
2011	熊本県	井戸水（推定）
2008	福岡県	焼き鳥店での飲食物と推定
2005	福岡市・ 大分県	キャンプの井戸水（推定）
2003	福岡市	弁当（推定）

参照 2 過去の *E. albertii* 分離例（遡り調査を含む）

自治体	分離された <i>E. albertii</i>
宮崎県	EPEC と同定の 4 株，環境水由来 3 株
東京都	集団下痢症 1 事例，散発 6 事例
愛媛県	食中毒疑い 1 事例（6 株）
秋田県	感染症疑いの 1 株