

令和元年度 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について、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鶏肉を含む複数の食品や、環境水を含む複数の環境検体から *E. albertii* が分離され、環境を介して食品が汚染される可能性が示された。②ラムノース・キシロース添加 MAC およびラムノース・キシロース添加 DHL が鶏肉中の *E. albertii* 分離には有用であることが明らかになった。③ *E. albertii* に特異性が高いリアルタイム PCR のプライマーおよびプローブセット 1 組が選定された。④ *E. albertii* 食中毒発生時に原因食品中の本菌の菌数測定のプロトコル、試薬を新規の協力機関に配布した。また、(2) *E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、①病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法を確立した。②培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析を行った。③ *E. albertii* の O 抗原多様性を解析した。④ EA0-genotyping PCR の開発および実用性を検討した。⑤大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノムの特性を解明した。(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、①鶏肉、豚肉、牛肉で *Arcobacter* 属菌が検出されたが、特に鶏肉での *A. butzleri* 汚染率は 100%であった。② *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌が PCR で検出された。

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	山中拓哉、太田美香子、高橋幸子、 佐藤徳行
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
富山県衛生研究所	磯部順子、木全恵子
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
滋賀県衛生科学センター	梅原成子、長谷川嘉子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、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
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
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	宮平勝人、柿田徹也、大山み乃り
仙台市衛生研究所	山田香織
さいたま市健康科学研究所センター	土屋彰彦、曾根美紀、加藤直樹
静岡市環境保健研究所	高橋直人
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸
(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、定着する可能性があるが、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つの分担研究とした。

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。令和元年(2019)年度には、工藤は、平成30年度の結果を踏まえ、[1]食品等における *E. albertii* 汚染実態調査、[2]食品での *E. albertii* 分離培地の検討、[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検

討、[4] 発症菌量推定のための調査を行うこととした。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、平成 30 年度の成果を発展させて、[1] 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立、[2] 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析、[3] *E. albertii* の 0 抗原多様性解析、[4] EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討、[5] 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明を実施した。

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。令和元年（2019）年度には、大西は、平成 30 年度の結果を踏まえ、[1] 食肉における汚染実態調査、[2] *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出、実施した。

B. 研究方法

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

地方自治体の協力機関と協力し、

食品 723 検体と環境 159 検体の計 882 検体、ヒトおよびウシ便の計 40 検体を試験した。食品および環境検体は、BPW または modified EC 培地 (mEC) 等で増菌し、マッコンキー寒天培地 (MAC)、DHL 寒天培地 (DHL) 等で培養し、乳糖非分解のコロニーについてブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性、キシロース非分解を確認し、nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。便検体については、増菌培養せずに同様に実施した。

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

E. albertii 6 株を鶏肉 25g に接種 (想定 $10^3 \sim 10^2$ cfu/25g 鶏肉) し、mEC およびノボビオシン加 mEC 培地 (NmEC) 225 mL を加えて 42°C にて 22 ± 2 時間培養した。この培養液を、MAC、1%ラムノース・1%キシロース添加 MAC (糖 MAC)、DHL および 1%ラムノース・1%キシロース添加 DHL (糖 DHL) に画線し、37°C にて 18 時間培養した。乳糖非分解コロニーを nested PCR (Ooka et al., 2015) の 1st PCR にて *E. albertii* であるか確認した。

[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

大岡唯祐研究分担者が同定した

E. albertii 特異的遺伝子 (遺伝子 A ~ I) を設計対象遺伝子とした。保存株 38 株 および National Center for Biotechnology Information (NCBI) 登録 *E. albertii* 75 株の合計 113 株について SNP の少ない遺伝子配列領域を選定し、プライマーおよびプローブセット候補 2 組 (EA_rt1 および EA_rt2) を設計し、これらのオリゴを合成した。プローブの蛍光標識には FAM を選択した。プライマーおよびプローブの至適濃度を、*E. albertii* 株の DNA 抽出液 (2×10^6 copy/ μ L) およびその希釈液をテンプレートとし、各濃度のプライマーおよびプローブを組み合わせ、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 を用い、50°C 2 分 および 95°C 10 分の熱変性ののち、95°C 15 秒 - 60°C 1 分を 45 サイクル増幅反応させ、Ct 値や蛍光強度を指標にして決定した。リアルタイム PCR の特異性は、食中毒等の事例由来株および他由来株の合計 42 株の *E. albertii* に加え、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii* など合計 24 菌種、27 株について、リアルタイム PCR を実施した。3 反応のうち 1 反応でも蛍光が検出された場合は陽性と判定した。

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

[1] 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

昨年度の本研究で同定した種特異的遺伝子のうち、病原性および代謝系への関与が考えられる遺伝子群について、遺伝子破壊株の作製を行った。遺伝子破壊では、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には、標的遺伝子をクロラムフェニコール遺伝子 (*cat*) と置換するため、各標的遺伝子の前後の配列を含むプライマーを用いて pKD3 プラスミド上に存在する *cat* 遺伝子を PCR 増幅した。

[2] 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

上記で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

[3] *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、O 抗原合成遺伝子領域 (O-AGC) を同定し、既知の *Escherichia/Shigella* 属及び

近縁菌種の O 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、一部の株は *Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した。

[4] EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

上記で同定した各 O-AGC に共通保存されている *wzx* 遺伝子について、配列多様性を利用し、PCR による O 抗原遺伝子型タイピングツール (EA0-genotyping PCR) の開発を行った。また、*E. albertii* の同定も同時に行うことのできる検出系とした。分離株 92 株を用いて EA0-genotyping PCR を行い、さらに 186 株のゲノム情報に対して *in silico* EA0-genotyping を実施し、本ツールの検出感度を検討した。

[5] 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E. albertii* 主要病原因子の保有状況を調べた。進化系統解析は、Prokka でアノテーションした後、Roary によりコア遺伝子の抽出し、Maximum-likelihood tree を作成することにより行った。主要病原因子の検索は、*eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子、*stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺

伝子、*paa* 遺伝子についてゲノム配列に対する相同性解析を行い、保存性を確認した。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

神奈川県内で購入した鶏肉、豚肉、牛肉を検体とした。最確数法による *Arcobacter* 属菌の計数は昨年度確立した方法で行った。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 225 ml に検体 25 g を加え、2 分間ストマッキング処理を行った。これを 10 倍乳剤とし、最確数法は 3 本法で行った。30°C、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製した。作成したテンプレートを用いて *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を行い、*Arcobacter* 属菌の検出を行った。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した。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、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に塗抹し、30°C、48 時間、培養した。

単離した集落がマルチプレックス PCR で陽性の場合、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した。

最確数法による *Campylobacter* 属菌の計数は、増菌培養を微好気、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を使用して、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* それぞれの最確数を算出した。

[2] *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出

Campylobacter 食中毒もしくは *Campylobacter* が原因菌として疑われる事例が発生した場合、研究協力機関において患者便から *Arcobacter* 属菌の分離を行った。患者便を CAT サプリメント添加アルコバクター基本寒天培地に塗抹後、30°C、48 時間、好気培養を行った。培養後、*Campylobacter* 様コロニーについてマルチプレックス PCR を行った。陽性の菌株は国立医薬品食品衛生研究所において性状を解析した。研究協力機関の東京都健康安全研究センターでは、さらに糞便から直接 DNA を抽出し *Arcobacter* 属菌を検出し、フィルター法による菌分離を行った。

C. 研究結果

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

食品検体 723 検体のうち鶏肉を含む 7 検体から *E. albertii* の遺伝子が検出され、そのうち 6 検体から *E. albertii* が分離された。また、環境検体 159 検体のうち 9 検体から *E. albertii* の遺伝子が検出され、そのうち 2 検体から *E. albertii* が分離された。ヒト便検体 35 検体およびウシ便検体 5 検体の合計 40 検体を調査し、ヒト便検体 4 検体から 5 株の *E. albertii* が分離された。

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

MAC および糖 MAC での *E. albertii* 分離を検討したところ、本菌を接種した鶏肉の mEC 中での 42°C 増菌培養液からは供試した本菌 6 株中 5 株、NmEC 中での培養液からは全 6 株について分離が認められた。また、分離陽性であった菌株における平均分離陽性率は、mEC 増菌培養では MAC で 65.3%、糖 MAC で 83.3%、NmEC 増菌培養では MAC で 92.4%、糖 MAC で 100%であった。

[3] *E. albertii* 特異的リアルタ

イム PCR 開発の検討

E. albertii 全 38 株において遺伝子配列の約全長が得られた遺伝子は、遺伝子 A のみであった。NCBI に登録されている合計 75 株の遺伝子 A の登録配列を得て、合計 113 株の遺伝子配列を解析し、比較的 SNP の少ない遺伝子配列領域を対象に産物長が 150 bp および 97 bp の 2 組のプライマーおよびプローブセット候補 (EA_rt1 および EA_rt2) が得られた。検出感度が高く、かつ蛍光強度が十分得られたリアルタイム PCR 条件は、プライマーの終濃度が EA_rt1 および EA_rt2 で共に 0.3 μ M、プローブの終濃度が EA_rt1 では 0.1 μ M、EA_rt2 では 0.15 μ M であった。決定したプライマーおよびプローブ濃度から、EA_rt1 および EA_rt2 の反応溶液組成を確定した。リアルタイム PCR の特異性を試験したところ、供試した全 *E. albertii* 株は、EA_rt1 および EA_rt2 共に陽性となった。しかし、その他の細菌種は、EA_rt2 で全て陰性となったが、EA_rt1 では、*Enterobacter aerogenes* など 5 菌種が陽性となった。

[4] 発症菌量推定のための調査令和元年度から新規に参加する地方自治体の研究協力者に本菌同定プロトコルおよび必要試薬を配布

した。また、地方自治体（秋田県）で発生した 1 事例について、試験可能な食品が残っていなかったため、測定はできなかった。

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

〔1〕病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

遺伝子破壊株作成法を改良した結果、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、3 株すべてで破壊株を作製することができた。

〔2〕培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目〔1〕で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株を用いて検討した結果、付着および細胞内生存能に関連すると考えられる遺伝子を同定した。

〔3〕*E. albertii* の O 抗原多様性解析

E. albertii 株間の比較から、O-AGC は 40 種類に分かれることが明らかとなった。また、40 種類中 25 種類が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝子セットを保有しており、特に 7 種類は塩基レベルで 98%以上の相同性を示し、全ゲノムレベルでの塩基配列相同性が 90%程度であることから、これらの菌種間で O-AGC が頻繁に水平伝播していると考えられた。さらに、

E. coli や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似し、配列相同性の高い O-AGC を保有する *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことが示された。

〔4〕EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目〔3〕で同定した 40 種類の O-AGC に保存される *wzx* 遺伝子と近縁菌種の *wzx* 遺伝子との系統解析を行った結果、O 抗原型間で *wzx* 遺伝子に塩基配列多様性が認められた。そこで、40 種類 EA0 型を識別できるプライマーセット（3 セット）を構築し、3 プライマーセットそれぞれに *E. albertii* 特異的遺伝子領域を検出可能なプライマーセットを加え、O 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした。国内および海外分離株（計 278 株）について、実際の PCR およびプライマー配列の相同性検索を実施した結果、229 株（82.4%）の EA0 型を同定した。

〔5〕大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

全ゲノム高精度系統解析と主要病原因子の分布の解析を行った結果、*E. albertii* は大きく 2 つのクレードに分かれ、分離地や分離源と系統関係には相関がないことが明らかとなった。主要病原因子の

分布についての解析からは、*eae* 遺伝子 (LEE 領域) と *cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* 遺伝子がほとんどの株で保存されていた。ETT2 領域についても、ほとんどの株でその領域が欠失している *E. coli* とは異なり、保存性が高いことも明らかとなった。また、一部の株で保有が示されている *stx2* 遺伝子が異なる系統に属する *E. albertii* 株において検出されること、その保有と *cdtB*-I サブタイプとの分布にお相関が見られることも明らかとなった。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

今回の汚染実態調査では鶏肉、豚肉、牛肉を対象にそれぞれ 20 検体ずつ調査を行った。鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90%の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が 10^2 MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。豚肉では、*A. butzleri* は 20 検体中 11 検体から検出された。*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。100g あたりの MPN が 10^2 以上の検体は、*A. butzleri* は 0 検体、*A.*

cryaerophilus が 3 検体であった。牛肉では 2 検体から *A. cryaerophilus* が検出された。鶏肉においては *A. butzleri* と *C. jejuni* の汚染菌量の傾向は似ていたが、*A. cryaerophilus* の汚染菌量の傾向は *A. butzleri* や *C. jejuni* と異なっていた。豚肉では 20 検体中 15 検体は *A. butzleri* もしくは *A. cryaerophilus* いずれかの単独汚染であった。

[2] *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出

カンピロバクター食中毒 (疑いも含む) 発生時に研究協力機関にて便からアルコバクター属菌のコロニーを分離していただき、マルチプレックス PCR でアルコバクター属菌の検出を行なった。今回は 2018 年から 2019 年の間に発生した 129 事例に関して調査を行なった。その結果、患者便からアルコバクター属菌を分離できなかった。アルコバクター属菌のコロニーは特徴が少なく、また今回使用した選択培地上での夾雑菌の発育が予想より早かったため、もしアルコバクター属菌が発育していたとしても分離が困難と思われるケースが多く認められた。しかし、2019 年 5 月から 8 月にかけて搬入された 75 検体に関して、東京都健康安全研究センターで便から DNA を直接抽出し

PCR によって検出を行なったところ、1 検体から *A. skirrowii* が検出された。そこでフィルター法を用いて *A. skirrowii* の分離を行なったが、便から菌は分離できなかった。*A. skirrowii* が検出された事例は 6 名で鶏料理を喫食後、6 名が発症した事例で、*A. skirrowii* が検出された患者からは他に *C. jejuni*、腸管出血性大腸菌 0157 が検出されており、また、同じグループの人から *Salmonella* 04 群が検出されたため、原因食品不明の有症事例ととして処理されている。

D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

多様な食品・環境検体での汚染実態調査では、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し、環境検体からも *E. albertii* が分離されたため、環境・食品が汚染される可能性もある。今後、分離株の病原性解析などによって、ヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。ヒト便の調査では *E. albertii* が分離された例もあったことから、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。

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

E. albertii 接種鶏肉を用いて分離培地を検討したところ、DHL および MAC の両方で、キシロースおよびラムノースを添加した方がより分離成績に優れていた。特に、NmEC 中にて 42°C で増菌培養し、糖 MAC にて分離培養した場合は、供試した 6 株の全て、釣菌した合計 144 コロニーの全てが *E. albertii* であったため、鶏肉を対象とした場合には、最も優れた増菌および分離培養法の組み合わせであると考えられた。DHL の組成には、乳糖の他に白糖も含まれるため、白糖分解の性状を示す *E. albertii* を食品から分離するためにも、白糖を含まない糖 MAC は有用であると考えられた。なお、増菌培養については、NmEC が優れていることが示されたが、mEC でも著しく分離率が低いとは評価し難く、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性も考えて、mEC および NmEC 中の両方が適用可能と考えられた。

[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

特異性試験の結果から、EA_rt2 のプライマーおよびプローブセットでは、非特異的反応が認められ

ず、特異性の高いため暫定的な *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 候補とした。EA_rt1 は、特異性が低いと考えられた。今後、インターナルコントロールとして細菌共通の 16S rRNA 遺伝子の増幅試薬も加えて、リアルタイム PCR の系の構築が必要である。また、食品培養液中の *E. albertii* 検出を想定した試験によって検出感度の確認が必要である。最終的には、*E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養して、そこから検出し、実試験での応用性も確認したい。

[4] 発症菌量推定のための調査

食中毒事例での検体の確保が困難なこともあるため、さらに、多くの地方自治体と協力していくことが重要であると考ええる。

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

昨年度は、*E. albertii* の DNA 取り込み効率や組換え効率の低さから、遺伝子破壊株の作製が進まなかったが、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、効率の良い遺伝子破壊株の作製法を確立することが出来た。また、培養細胞に対する野生株と遺伝子破壊株の感染実験により、病原性に関連すると思われる遺伝子を複数同定することが出来た。

今後、そのメカニズムの詳細を明らかにするため、当該タンパク質の抗体を作製し、機能阻害実験やタンパク質局在についての解析を進める。また、これらのタンパク質が作用する宿主側因子についても同定を進める必要がある。

また、*E. albertii* の O 抗原型の多様性が明らかとなり、診断疫学マーカー候補遺伝子として *wzx* 遺伝子を用いたマルチプレックス PCR 反応系による疫学ツールを構築することが出来た。しかしながら、EA0-genotyping PCR により O 抗原型が同定出来ない株が約 20% 程度存在したことから、次年度以降、これらの株についてゲノム情報を取得し、*E. albertii* の O 抗原の全容を明らかにする予定である。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

今回の調査結果から *Arcobacter* 属菌の汚染状況は鶏肉、豚肉、牛肉の順に深刻で、食中毒対策を考える上で特に鶏肉と豚肉に対して注目する必要があると考えられた。鶏肉において *A. butzleri* は検出率、菌数ともに *C. jejuni* を大きく上回っていた。このことから *A. butzleri* の鶏の腸管および鶏肉に汚染後の増殖性、生存性が *C. jejuni* よりも強い可能性が示唆さ

れた。一方で、*A. butzreli*の検出率、汚染菌数が *C. jejuni* を上回っていたことを考えると、*A. butzreli*が *Campylobacter* 食中毒に関与していたとしても、その程度は低い可能性が示唆された。また、汚染菌数を比較すると、鶏肉、豚肉において *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* で汚染傾向が異なっていたことから、*A. butzreli* と *A. cryaerophilus* は汚染源が異なる可能性が示唆された。*Arcobacter* 属菌はこれまでの報告で食肉だけでなく環境や水などから広く検出されている。このような環境からの汚染に関しても、今後、検討していく必要があると思われた。

[2] *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出

今回の調査ではカンピロバクター食中毒の患者便から *Arcobacter* 属菌を分離できなかった。ひとつの原因として CAT supplement の選択性が弱く夾雑菌が発育してしまうため分離が困難になることが挙げられた。しかし、2019年5月から8月の間に搬入された75の患者便から直接 DNA を抽出し、PCR で *Arcobacter* 属菌の検出を行なったところ、1事例から *A. skirrowii* が検出された。この事例では *A. skirrowii* 以外に *C. jejuni* やサル

モネラ、腸管出血性大腸菌 0157 が検出されているため、*A. skirrowii* が原因菌であるかどうかは判定できず、最終的に有症事例扱いとなっている。しかしながら、本事例は日本国内で下痢症患者から *Arcobacter* 属菌が検出された貴重な事例である。ベルギーでの報告では胃腸炎患者の1%から *Arcobacter* 属菌が分離されている。今回の検出率はそれに近いものである。今後、さらに例数を増やし、*Arcobacter* 属菌の食中毒への関与を検討していく必要があると思われた。また、今回は *Campylobacter* 食中毒に限定し調査を行なったが、海外の報告では *Campylobacter* 食中毒以外の下痢症患者便からも分離されている。今後は *Campylobacter* 食中毒以外、例えば原因物質不明の有症事例の患者便などからも *Arcobacter* 属菌の分離を行うことによって、我が国における *Arcobacter* 属菌による健康被害の実態が明らかになるものと思われる。

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について、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鶏肉を含む複数の食品や、環境水を含む複数の環境検体から *E. albertii* が分離され、環境を介して食品が汚染される可能性が示された。②ラムノース・キシロース添加 MAC およびラムノース・キシロース添加 DHL が鶏肉中の *E. albertii* 分離には有用であることが明らかになった。③ *E. albertii* に特異性が高いリアルタイム PCR のプライマーおよびプローブセット 1 組が選定され、系の確立をさらに進める。④ *E. albertii* 食中毒発生時に原因食品中の本菌の菌数測定のプロトコル、試薬を新規の協力機関に配布した。また、(2) *E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、①病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法を確立した。②培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析を行った。③ *E. albertii* の O 抗原多様性を解析した。④ EA0-genotyping PCR の開発および実用性を検討した。⑤大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノムの特性を解明した。(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、①鶏肉、豚肉、牛肉で *Arcobacter* 属菌が検出されたが、特に鶏肉での *A. butzleri* 汚染率は 100%であった。

② *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌が PCR で検出された。これら成果を踏まえて、令和 2 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)

Ohtsuka, K., Hoshino, K., Kadowaki, N., Ohsaka, M., Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. LWT, 114, 108409, 2019.

Mori, T., Nagao, S., Kishino, K., Namba, T., Hara-Kudo, Y. DNA extraction for sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food by real-time PCR assays. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 60(6), 183-186, 2019.

Parvej, Md., Nakamura, H., Wang, L., Zhang, S., Emura, K., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Host range-associated clustering based on multi-locus

- variable-number tandem-repeat analysis, phylotypes, and virulence genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(6). pii: e02796-18, 2019.
- T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. *Microb. Genom*, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.
- (学会等発表)
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、長岡宏美、大屋賢司、工藤由起子。鶏肉からの *Escherichia albertii* 分離法の開発。第 92 回日本細菌学会総会。平成 31 年 4 月 23、24、25 日。札幌
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、土屋彰彦、小嶋由香、長岡宏美、大屋賢司、甲斐明美、工藤由起子。鶏肉からの *Escherichia albertii* 検出のための nested PCR の検討。第 115 回日本食品衛生学会学術講演会。令和元年 10 月 3、4 日。東京
- 小西典子、尾畑浩魅、大塚佳代子、新井沙倉、仙波敬子、丸山浩幸、原田誠也、福留智子、高良武俊、工藤由起子。食品を対象とした *Escherichia albertii* 検出のための基礎的検討。第 115 回日本食品衛生学会学術講演会。令和元年 10 月 3、4 日。東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、望月瑞葉、永井祐樹、原田誠也、大屋賢司、甲斐明美、工藤由起子。鶏肉での *Escherichia albertii* 検出法の検討および汚染実態。第 40 回日本食品微生物学会学術総会。令和元年 11 月 28、29 日。東京
- 佐藤実佳、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、新井沙倉、今野貴之、床井由紀、長岡宏美、佐伯美由紀、工藤由起子。鶏肉における *Escherichia albertii* 分離培養法の検討。第 40 回日本食品微生物学会学術総会。令和元年 11 月 28、29 日。東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大屋賢司、工藤由起子。鶏肉における *Escherichia albertii* 検出のための PCR 法の検討。第 93 回日本細菌学会総会。令和 2 年 2 月

19、20、21日．名古屋

大岡唯祐，勢戸和子，小椋義俊，井口純，中村佳司，後藤恭宏，藺牟田直子，本田己喜子，池田徹也，杉谷和加奈，今野貴之，河野喜美子，工藤由起子，村上光一，林哲也，西順一郎：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発．第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会（一般演題），松山，2019．

大岡唯祐：ゲノムから見えてきた新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特性とその応用．第 93 回日本細菌学会総会（ワークショップ），名古屋，2020．

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし