

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

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

Escherichia albertii による食中毒の制御のために、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こと、*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。〔1〕食品等における *E. albertii* 汚染実態調査：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本菌が分離され、環境を介して食品が汚染される可能性が示された。ヒトからも本菌が分離され、潜在的に保菌しているヒトがいる可能性が示された。〔2〕食品での *E. albertii* 分離培地の検討：乳糖、白糖、ラムノースおよびキシロース非分解性の性質を利用し、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* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討：*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〕発症菌量推定のための調査：*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測定のプロトコル、試薬を新規の協力機関に配布した。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	山中拓哉、太田美香子

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
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
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センター	土屋彰彦、曾根美紀、加藤直樹
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
鹿児島大学	大岡唯祐
国立医薬品食品衛生研究所	新井沙倉、大屋賢司、大西貴弘

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)。しかし、本菌の主要な汚染食品や汚染環境、また、本菌の発症菌量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は、複合調理食品や井戸水があり、動物からの水の汚染が考えられる。家畜としては、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなどの保菌が報告されており (Epidemiol. Infect., 2016, 144 45-52)、食肉からの分離として、鶏肝臓 (Asoshima et al., Jpn. J. Infect. Dis., 2015, 68, 248-250; Maeda et al., J. Vet. Med. Sci., 2015, 77, 871-873)、鶏肉、豚肉、マトン、アヒル肉 (Wang et al.,

Epidemiol. Infect., 2016, 144, 45-52) が報告されている。平成 30 年度の本研究事業では、鶏肉および鶏内臓肉から本菌特異的遺伝子が検出され、また、その一部検体からは本菌が分離されている。食肉以外の食品として、レタス (Fiedler et al., Genome Announc., 2018, 6) やダミエッタ・チーズ (Saad et al., J. Am. Sci., 2012, 8, 333-341) からの本菌分離の報告もある。平成 30 年度の本研究事業では、多様な食品を検体としたところ、一部の食品から本菌が分離された。これらのことから、食肉を含む多様な食品や水での汚染実態の調査を行い、汚染に関連する食品群や水の重要性を明らかにする必要がある。

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、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* による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く、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、また、平成 30 年度 (2018) 年度の研究成果を発展させて、令和元年 (平成 31、2018) 年度には、[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、を行った。

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査では、平成 30 年度と同様に地方自治体と協力し、同様の方法にて多様な食品・環境検体・ヒトおよび牛の便検体から本菌の分離を行った。[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討では、平成 30 年度の本研究事業では、優れた増菌培養法 (mEC および NmEC を用いた 42°C 培養) と合わせて、乳糖・ラムノース・キシロース非分解性の性質を利用したラムノース・キシロース添加 DHL (乳糖・白糖含有) が有用であることが明らかになったが、さらに、白糖分解性の *E. albertii* が少なからず存在することも明らかになったため、DHL と同様に腸内細菌系の病原細菌に汎

用されるマッコンキー寒天培地(乳糖含有・白糖不含)についても、ラムノース・キシロースを加えた応用が可能であるか検討した。[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討では、平成 30 年度の本研究事業において、本研究事業の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が確認された。また、これを使用して食品(主に食肉)等での汚染実態調査を実施し、食品での検出に有用であることが判明している。しかし、電気泳動法を要しないために結果を得るまでの時間が短縮されるリアルタイム PCR 法が食品検査でも近年使用されており、nested PCR 法と同等以上の特異性と感度を有する系の開発を試みた。[4] 発症菌量推定のための調査では、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なることを期待して、平成 30 年度と同様の手法を協力地方自治体に示した。なお、調査結果については、協力研究報告書には示さず本分担研究報告書に

示した。

B. 研究方法

[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、食肉を含んだ食品検体 723 検体と環境検体 159 検体の計 882 検体を収集、試験した。また、計 40 検体のヒトおよびウシ便検体を試験した。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、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。ブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性、キシロース非分解の株を 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 株の菌液を 10 倍階段希釈(想定 $10^4 \sim 10^3$ cfu/mL)し、鶏肉 25g に接種(想定 $10^3 \sim 10^2$ cfu/25g 鶏肉)した。次いで、modified EC 培地(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、マッコン

キー寒天培地 (MAC)、*E. albertii* がラムノースおよび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 MAC (糖 MAC)、DHL 寒天培地 (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。生育したコロニーのうち、1 条件につき 24 コロニーの乳糖非分解コロニーを nested PCR (Ooka et al., 2015) の 1st PCR を基本としたコロニー 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 9 個の *E. albertii* 特異的遺伝子 (遺伝子 A ~ 遺伝子 I) を設計対象遺伝子とした。研究室に保存している食中毒等事例由来株 21 株、他由来株 17 株の合計 38 株および National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている *E. albertii* 75 株と合わせ、合計 113 株について比較的 SNP の少ない遺伝子配列領域 (392 bp) 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。

次に、プライマーおよびプローブのリアルタイム PCR 反応溶液中の至適濃度を検討した。*E. albertii* の type strain (NBRC 107761) の DNA を抽出し、 2×10^6 copy/ μ L の濃度の DNA 抽出液およびその希釈液 ($2 \times 10^4 \sim 0.2$ copy/ μ L) をテンプレートとし、プライマーの終濃度を 0.1μ M ~ 0.9μ M、プローブの終濃度を 0.05μ M ~ 0.25μ M で組み合わせて、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 値を蛍光強度を指標にして、プライマーおよびプローブの至適濃度を決定した。

さらに、リアルタイム PCR の特異性について検討した。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*、*Hafnia alvei*、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella sonnei* など合計 24 菌種、27 株について、前述の検討で得られた優れた条件

にてリアルタイム 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。

[4] 発症菌量推定のための調査

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準備した。

C. 研究結果

[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℃ 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

供試した *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 (392 bp 中に 19 か所の SNP) を対象にプライマーおよびプローブ候補の設計が可能であった。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*、*Escherichia hermannii*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei*、*Yersinia enterocolitica* の 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。

D. 考察

[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、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、過去の食中毒事例で野菜サラダとニガナの白和えが原因食品と特定

され、井戸水も汚染源として推定されている。今回試験した環境検体からも *E. albertii* が分離されたため、環境を介して食品が汚染される可能性も考慮する必要がある。今後、分離株の病原性解析などにより、ヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。また、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。また、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、本菌が、従来、*Hafnia alvei*、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おり同定が難しいことも考えると、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、mEC 中にて 42℃ で増菌培養した場合には、MAC と糖 MAC のどちらの分離培地でも、供試した 6 株中 1 株で *E. albertii* が分離されなかった。一方、NmEC 中にて 42℃ で増菌培養した場合には、いずれの分離培地でも 6 株全てが分離され、MAC と糖 MAC に差は認められなかった。

平成30年度のDHLを基礎とした培地での成績と比較解析したところ、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℃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。過去に分離された*E. albertii*の中には、白糖分解性の性状を示す株が報告されており(Hinenoya et al., Int. J. Med. Microbiol., 2017, 307(8), 564-571)、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でも平均*E. albertii*分離陽性率が65%を超えているため、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。

以上の結果から、鶏肉からの*E.*

*albertii*分離方法をまとめ、次年度には、遺伝子検出法と組み合わせて、食品での検査法を検討したい。

[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_rt1において*E. albertii*以外の菌株DNAも増幅されたため、特異性が低いと考えられた。一方、非特異的反応が認められず、特異性の高いEA_rt2のプライマーおよびプローブセットを暫定的な*E. albertii*特異的リアルタイムPCR候補とした。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られる。

E. 結論

鶏肉を含む食品から *E. albertii* が検出され、鶏が保菌する可能性が示された。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、集団食中毒事例以外にも、散発性食中毒事例や、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。また、食品での *E. albertii* 分離培地として、乳糖、ラムノースおよびキシロース非分解性の性質を利用し、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。来年度には、有用な増菌培養法（mEC および NmEC を用いた 42℃ 培養）および遺伝子検出法と組み合わせ、食品からの *E. albertii* の検出と分離について検討する。特に、本研究で開発された *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR を応用し、食品での試験法を確立する。また、汚染の考えられる食品群での *E. albertii* の挙動を確認する必要がある。今後、食品を用いた検討等を重ね、新たな *E. albertii* 特異的遺伝子検出法の確立を目指したい。それら成果を踏まえて、培養法および遺伝子検出法を含む 1 連の試験として、*E. albertii* の食品での試験法を提案したい。発症菌

量推定については、今後も多くの地方自治体と協力する。

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.

(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 検出法の
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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし