

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

### 協力研究報告書

食品での *Escherichia albertii* 分離培地の検討

#### 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* 食中毒事例における原因食品特定に対応する食品での検査法の確立を目標に研究を行った。その結果、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。これら成果を踏まえて、次年度には遺伝子検出法と組み合わせ、食品での検査法を検討したい。

#### 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

(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（大岡、日本食品微生物学

会雑誌 34:151-157, 2017)。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。ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜の保菌が報告されており (Wang et al., Epidemiol. Infect., 2016, 144, 45-52)、食品では、鶏の肝臓 (Asoshima et al., Jpn. J. Infect. Dis., 2015, 68, 248-250; Maeda et al., J. Vet. Med. Sci., 2015, 77, 871-873)、レタス (Fiedler et al., Genome Announc., 2018, 6)、Danietta cheese (Saad et al., J. Am. Sci., 2012, 8, 333-341) に加え、鶏肉、豚肉、マトン、アヒル肉からも *E. albertii* が分離された (Wang et al., Epidemiol. Infect., 2016, 144, 45-52)。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。

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31、令和元(2019)年度には、昨年度に引き続き[1]食品での検査法の検討を行う事とした。昨年度検討した条件の中で優れていた増菌培養条件を組み合わせ、昨年度とは異なる既存の選択分離培地について検討し、昨年度の成績と比較解析した。特に、過去の報告で *E. albertii* は特定の糖を分解しないことが報告されていることから (Hinenoya et al., Int. J. Med. Microbiol., 2017, 307(8), 564-571)、この性状を指標とすることで、分離成功率が向上するかを検討した。

## B. 研究方法

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既存の選択分離培地を検討した。

### 1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来の *E. albertii* EA7、EA12、EA21、EA24、EA29、および EA100 の計 6 株を供試した。

### 2) *E. albertii* の増菌培養および分離培養条件の検討

カジトン培地に保存している 6 株 1 エーゼ分 (10  $\mu$  L) を TSB 10 mL に接種し、37°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  $10^4 \sim 10^3$  cfu/mL) し、鶏肉 25g に接種し (想定  $10^3 \sim 10^2$  cfu/25g 鶏肉)、腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養培地の modified EC 培地 (mEC、日水製薬) およびノボビオシン加 mEC 培地 (NmEC、栄研化学) 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、 $42^\circ\text{C}$  にて  $22 \pm 2$  時間培養した。この培養液  $10 \mu\text{L}$  を、マッコンキー寒天培地 (MAC、日本 BD) に画線した。さらに、*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) にも画線し、上記の MAC とともに  $37^\circ\text{C}$  にて 18 時間培養した (表 1)。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., Genome Biol. Evol., 2015, 7(12), 3170-3179) 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、反応させることによって行った。また、昨年度実施した DHL 寒天培地 (DHL、日水製薬) および 1%ラムノース・1%キシロース添加 DHL (糖 DHL) を分離培地として供試した場合の分離成績と今年度の成績を比較解析した。

### C. 研究結果

鶏肉を mEC 中にて  $42^\circ\text{C}$  で増菌培養し、MAC および糖 MAC にて分離培養した場合は、供試した 6 株中 5 株において *E. albertii* が分離された (表 1)。NmEC 中にて  $42^\circ\text{C}$  で増菌培養し、MAC および糖 MAC にて分離培養した場合は、供試した 6 株中 6 株において *E. albertii* が分離された (表 1)。

また、*E. albertii* が分離された株における平均 *E. albertii* 分離陽性率は、mEC 中にて  $42^\circ\text{C}$  で増菌培養し、MAC にて分離培養した場合は 65.3%、糖 MAC にて分離培養した場合は 83.3% となった。一方、NmEC 中にて  $42^\circ\text{C}$  で増菌培養し、MAC にて分離培養した場合は 92.4%、糖 MAC にて分離培養した場合は 100% となった。

また、昨年度実施した mEC および NmEC 中にて  $42^\circ\text{C}$  で増菌培養した条件下で DHL および糖 DHL を分離培地として供試した場合の分離成績

と比較解析したところ（表 2）、供試した 6 株における *E. albertii* が分離された株数は、mEC 中にて 42°C で増菌培養した場合に、DHL を基礎とした培地の方が MAC を基礎とした培地よりも 1 株多かった（表 2）。しかし、*E. albertii* が分離された株における平均 *E. albertii* 分離陽性率は、MAC を基礎とした培地の方が DHL を基礎とした培地よりも、糖添加のない場合に約 12%、糖添加のある場合に約 8% 高かった。NmEC 中にて 42°C で増菌培養した場合には、試験した条件全てにおいて 6 株中 6 株から *E. albertii* が分離されたため、DHL を基礎とした培地と MAC を基礎とした培地で同等であった。しかし、*E. albertii* が分離された株における平均 *E. albertii* 分離陽性率は、MAC を基礎とした培地の方が DHL を基礎とした培地よりも糖添加のない場合に約 22%、糖添加のある場合に約 15% 高かった。

#### D. 考察

*E. albertii* 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、mEC 中にて 42°C で増菌培養した場合には、MAC と糖 MAC のどちらで分離した場合でも、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°C で増菌培養した場合には、いずれの分離培地を用いた場合でも 6 株全てにおいて *E. albertii* が分離されたため、鶏肉を対象とした場合には、NmEC 中にて 42°C で増菌培養する条件が mEC を用いた場合よりも優れていることが示された（表 1）。しかし、mEC を用いた場合においても、平均 *E. albertii* 分離陽性率が 65% を超えているため、著しく分離効率が低いとは評価しがたい。そのため、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。分離培地は、昨年度の成績と比較解析したところ、DHL を基礎とした培地と MAC を基礎とした培地の両方で、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、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も存在する (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。

また、本試験ではヒト由来の *E. albertii* 株 6 株を供試したが、特に mEC 中にて 42°C で増菌培養した場合に、株ごとの結果にばらつきが生じた (表 1)。この理由として、鶏肉に含まれる夾雑菌の量や種類、菌株ごとの増殖能力の差が影響している可能性がある。しかし、いずれの菌株を用いた場合でも、共通して分離成績の良好な増菌培養条件 (NmEC 中にて 42°C 培養) および選択分離培養条件 (糖 MAC) が存在したことから、この条件を利用することで、より菌分離が容易になることが予測される。

以上の結果から、昨年度の結果も考慮し、鶏肉からの *E. albertii* 分離方法をまとめた (図 1)。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。

#### E. 結論

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°C 培養) が有用であり、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。これらの成果を踏まえて、来年度にはさらに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。

#### 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.

(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

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

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況  
なし