

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

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成 31 (2019) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

I. 総括研究報告書

食品中の食中毒細菌の制御法の
確立のための研究

工藤 由起子

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 株の遺伝子レポーターを同定、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 27、28 日. 大阪

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

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

Escherichia albertii の制御法の確立

工藤 由起子

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) およびノボビオシン加 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（マッコスキー寒天培地、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℃ 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

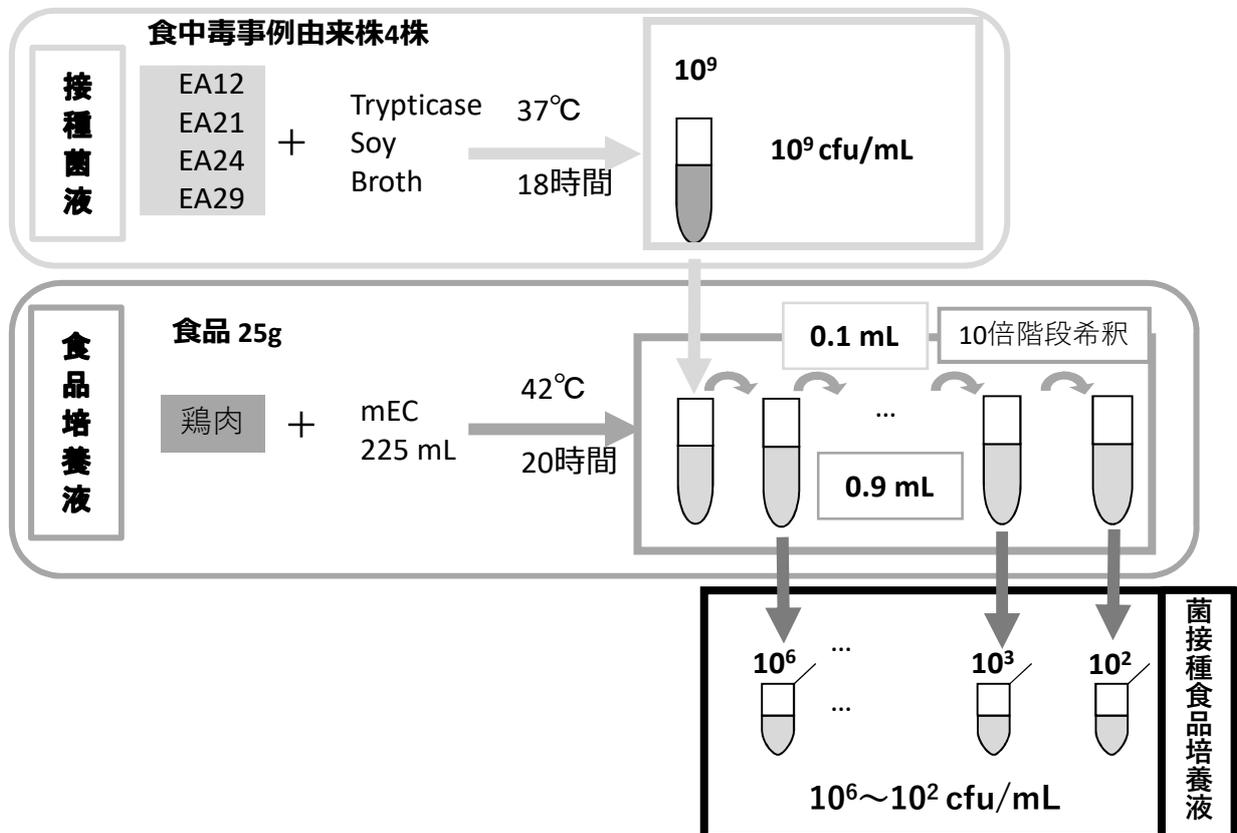
H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

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



*Ookaらのnested PCR法

PCR	プライマー名	プライマー配列 (5' - 3')
1st	E_al_OF	GGTCCATAATGAATCTGACTGA
	E_al_OR	CCATATGACAGGCGTAATTGAT
2nd	E_al_NF	CAGTCGATGGTTTCACCTGA
	E_al_NR	ACACCGTGCGGAAATGGCA

10⁻³~10⁻⁷をアルカリ熱抽出

Nested PCR* (*Ookaらの方法)

PCR産物を泳動、判定

図1. 鶏肉培養液中の各種濃度*E. albertii*の検出における nested PCRの感度試験のフローチャート

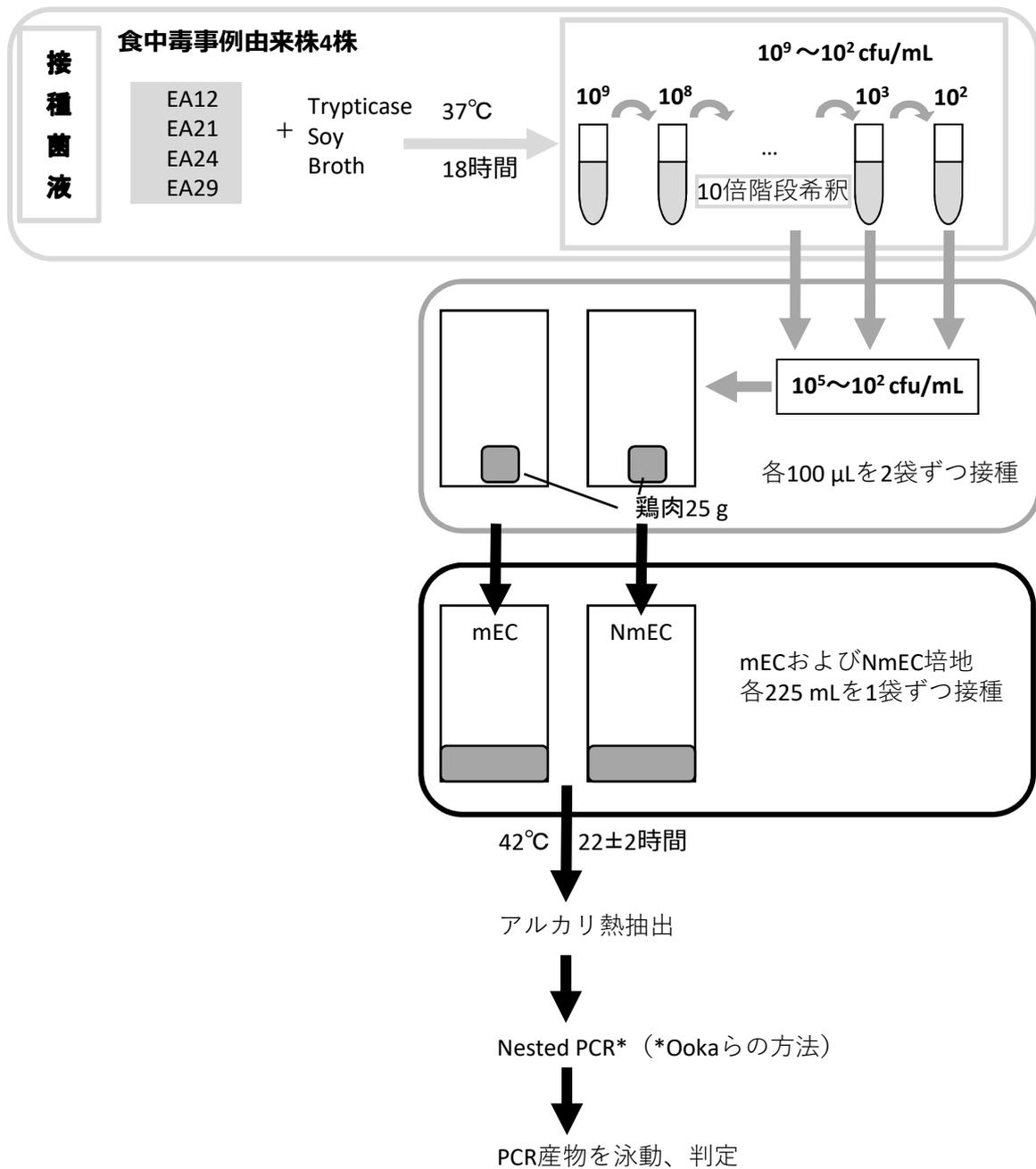


図2. 各種濃度の*E. albertii*接種鶏肉からの検出における nested PCRの感度試験のフローチャート

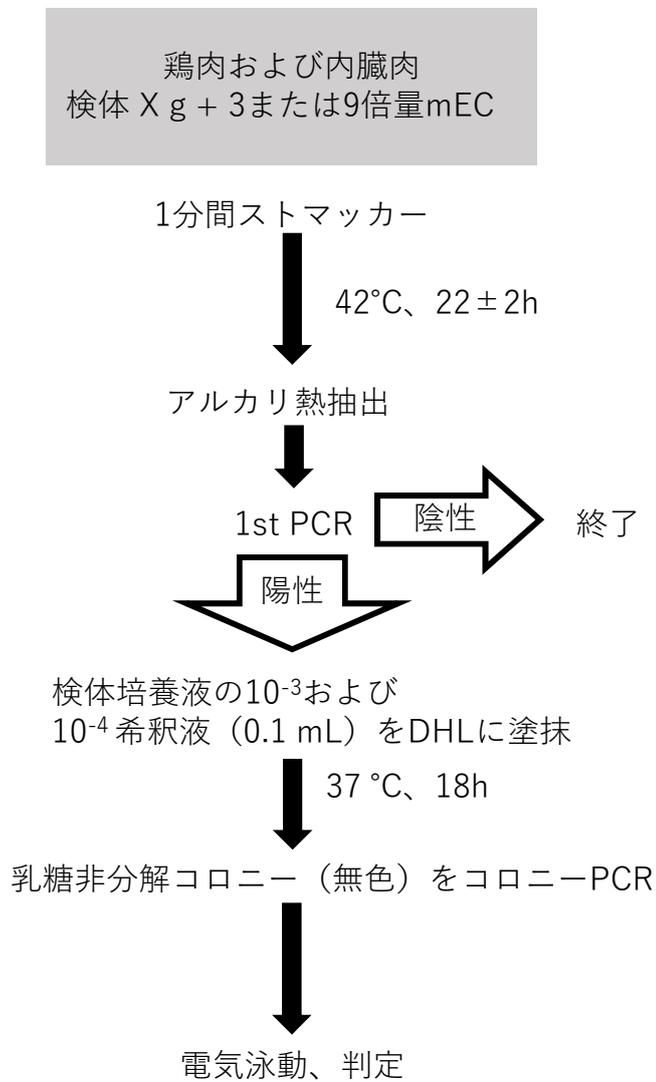


図3.鶏肉（内臓肉も含む）での汚染実態調査のフローチャート

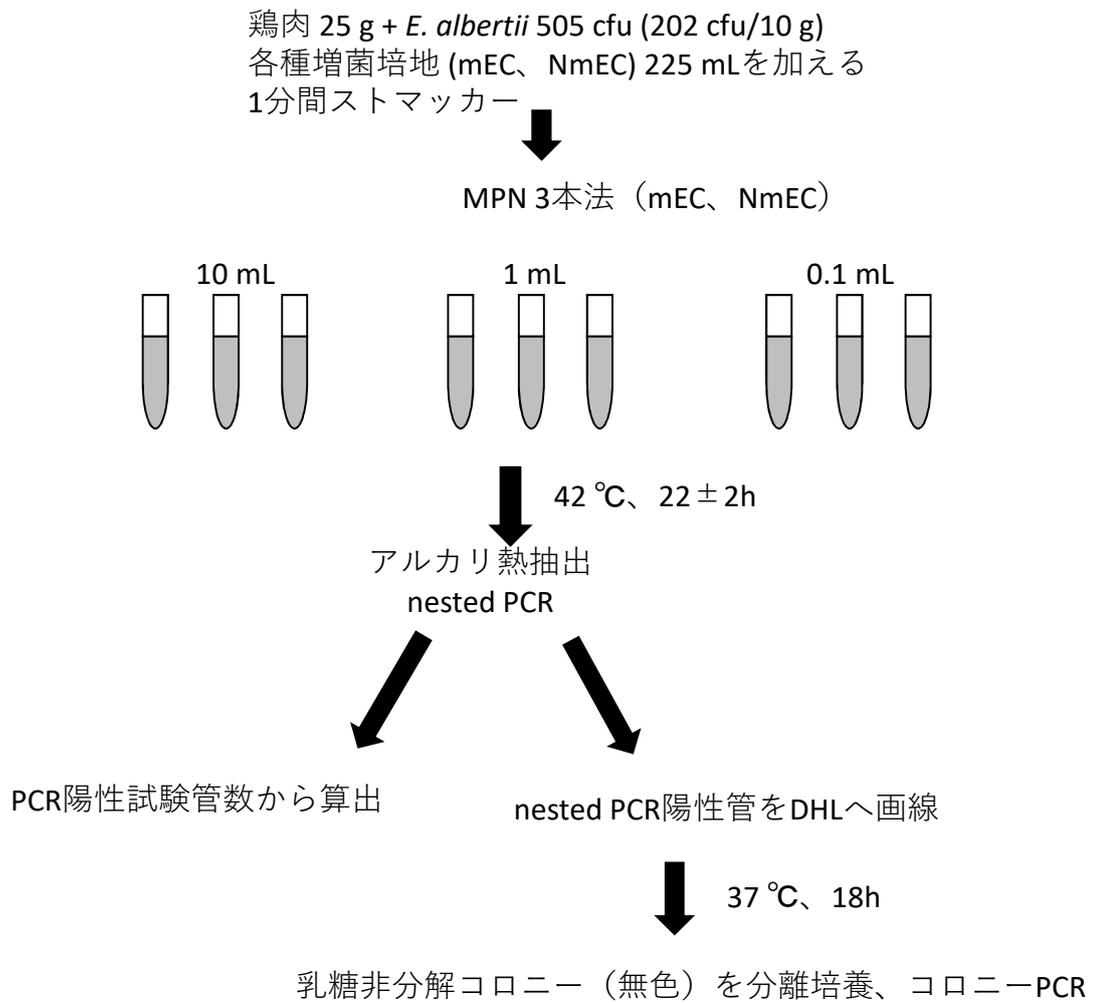


図4. 鶏肉を供試したMPN法検討のフローチャート

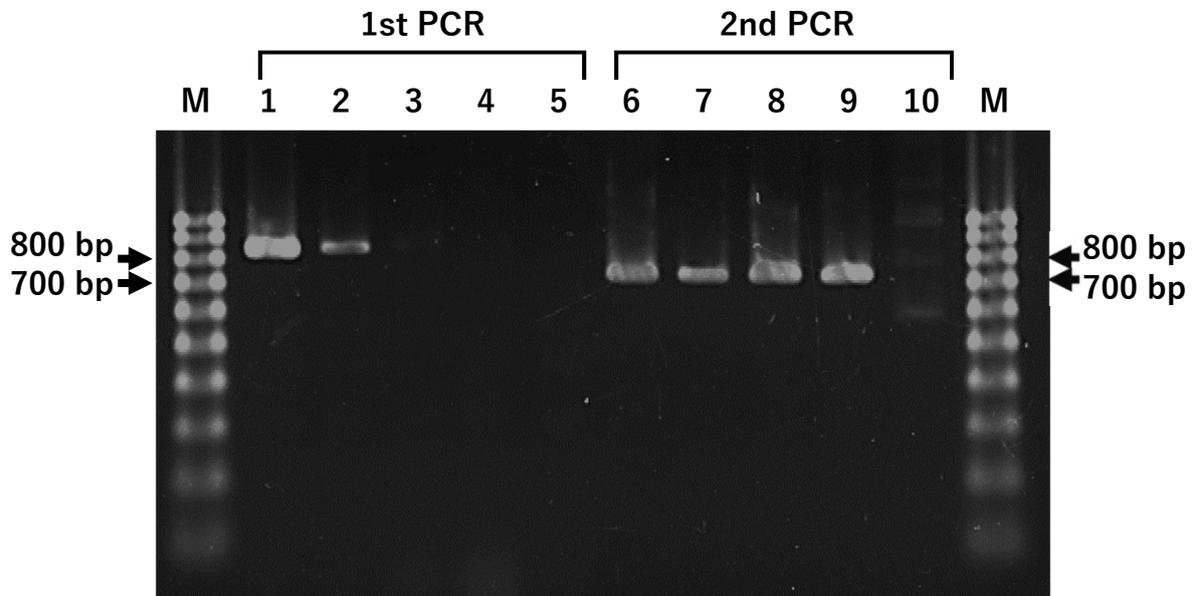
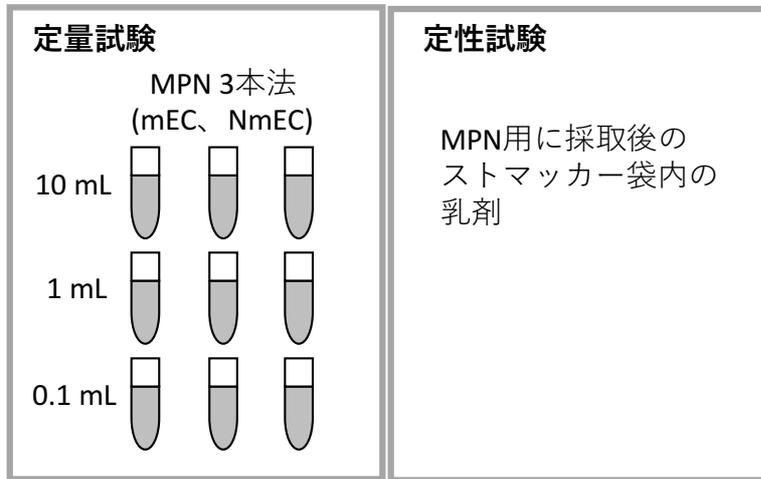


図5. 鶏肉培養液中の各種濃度 *E. albertii* の検出における nested PCR 感度試験の泳動像

M: 100bp Ladder (EZ Load 100bp Molecular Rulers、バイオラッド)、
 1-5: 1st PCR、6-10: 2nd PCR、1と6: 625 cfu/PCR tube、2と7: 62.5
 cfu/PCR tube、3と8: 6.25 cfu/PCR tube、4と9: 0.625 cfu/PCR tube、5と
 10: 0.0625 cfu/PCR tube
 2% NuSieve 3:1 Agarose (ロンザジャパン) ゲル

1日目 食品 X g + 9倍量mEC、NmECを加える、
1分間ストマッカー



42 °C、22 ± 2h

2日目 アルカリ熱抽出、PCR
陽性のみ次へ進む

3日目 DHL各2枚へ画線培養
37 °C、18h

4日目 乳糖非分解コロニー（無色）をDHLへ画線
37 °C、18h

*E. albertii*の生化学的性状と一致する株を

T S I				L I M		
乳・白糖	ブドウ糖	H ₂ S	ガス	リジン	インドール	運動性
-	+	-	d	d*	d	-

1%キシロース加アンドレイドペプトン水へ接種

37 °C、20 ± 2h

5日目 *E. albertii*と性状が一致する株をカジトン培地等に保存、
DNA抽出、PCRにて同定

図6. 食中毒原因食品中の*E. albertii*の菌数測定のプロフローチャート

鶏肉 25 g + 増菌培地 (mEC、NmEC) 225 mL加える
1分間ストマッカー

↓ 42°C、22 ± 2h

スクリーニングPCR

陽性

DHL または 糖DHLに画線

↓ 37°C、18h

乳糖非分解コロニー（無色）を分離培養

↓ 37°C、18h

TSI、LIMへ接種

↓ 37°C、18h

*E. albertii*の生化学的性状と一致する株を

T S I				L I M		
乳・白糖	ブドウ糖	H ₂ S	ガス	リジン	インドール	運動性
-	+	-	d	d*	d	-

*多くは(+)生物型により異なる

1%キシロース加アンドレイドペプトン水へ接種

↓ 37°C、18h

キシロース非分解株を保存、PCRで同定

図7. 鶏肉からの*E. albertii*分離のフローチャート

表1. 供試菌株の増菌培地での増殖

	由来	供試菌株 数	mEC		NmEC	
			36°C	42°C	36°C	42°C
事例1	患者	1	1	1	1	1
事例2	患者	1	1	1	1	1
事例3	患者	1	1	1	1	1
事例4	患者	1	1	1	1	1
事例5	患者	1	1	1	1	1
事例6	患者	4	4	4	4	4
	従事者	1	1	1	1	1
事例7	患者	2	2	2	2	2
事例8	患者	3	3	3	3	3
事例9	患者	1	1	1	1	1
事例10	患者	1	1	1	1	1
事例11	患者	1	1	1	1	1
事例12	患者	1	1	1	1	1
事例13	患者	3	3	3	3	3
	従事者	1	1	1	1	1
	食品	1	1	1	1	1
事例14	従事者	1	1	1	1	1
	食品	1	1	1	1	1
事例15	患者	1	1	1	1	1
	従事者	1	1	1	1	1
事例16	患者	1	1	1	1	1
	食品	1	1	1	1	1
事例17	患者	1	1	1	1	1
事例18	患者	1	1	1	1	1
事例19	患者	6	6	6	6	6
ヒト（無症状保菌者）		2	2	2	2	2
動物	トリ	5	5	5	5	5
	サル	1	1	1	1	1
合計		46	46	46	46	46

事例：食中毒または下痢症の事例

表2. 供試菌株の性状

由来	供試菌株数	糖含有平板培地での発色					TSI (乳糖・白糖・シヨ糖含有)		LIM			
		SMAC (ソルビトール含有) 上で無色*	DHL (乳糖・白糖含有) 上で無色*			斜面部で赤色	高層部で黄色	H ₂ S 産生	リジンデカルボキシラーゼ	インドール	運動性	ガス産生
			無添加	ラムノース・キシロース添加	メリピオース・ラムノース・キシロース添加							
事例1	患者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例2	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例3	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例4	患者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例5	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例6	患者	4	4	4	4	4	4	0	4	4	0	4
	従事者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例7	患者	2	0	2	2	2	2	0	2	2	0	2
事例8	患者	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	3
事例9	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例10	患者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例11	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例12	患者	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
事例13	患者	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	3
	従事者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
	食品	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例14	従事者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
	食品	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例15	患者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
	従事者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例16	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
	食品	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例17	患者	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例18	患者	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
事例19	患者	6	6	6	6	6	6	0	6	6	0	6
ヒト (無症状保菌者)		2	1	2	2	2	2	0	2	2	0	2
動物	トリ	5	4	4	4	4	4	0	5	5	0	5
	サル	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
合計		46	32	45	45	44	45	0	46	46	0	45

*含有する糖を非分解と考えられる

事例：食中毒または下痢症の事例

表3. 鶏肉培養液中の各種濃度の *E. albertii* 検出における nested PCR* に
 供する ExTaq または QuickTaq による感度の比較

接種菌数 (cfu/PCR tube)	ExTaq		QuickTaq	
	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR
675	+	+	+	+
67.5	+	+	+	+
6.8	+	+	+	+
0.7	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-

*Ookaらの nested PCR を使用

表4. 鶏肉培養液中の各種濃度 *E. albertii*の検出におけるnested PCR* の感度

増菌培地	供試菌株	接種菌数 (cfu/PCR tube)	1st PCR	2nd PCR	感度の差 の倍率**
mEC	EA12	625	+	+	100
		62.5	+	+	
		6.3	-	+	
		0.6	-	+	
		0.1	-	-	
	EA21	1525	+	+	100
		152.5	+	+	
		15.3	-	+	
		1.5	-	+	
		0.2	-	-	
	EA24	1150	+	+	10
		115	+	+	
		11.5	+	+	
		1.2	-	+	
		0.1	-	-	
EA29	1220	+	+	100	
	122	+	+		
	12.2	-	+		
	1.2	-	+		
	0.1	-	-		
NmEC	EA12	625	+	+	10
		62.5	+	+	
		6.3	-	+	
		0.6	-	-	
		0.1	-	-	
	EA21	1525	+	+	10
		152.5	+	+	
		15.3	+	+	
		1.5	-	+	
		0.2	-	-	
	EA24	1150	+	+	100
		115	+	+	
		11.5	-	+	
		1.2	-	+	
		0.1	-	-	
EA29	1220	+	+	1000	
	122	+	+		
	12.2	-	+		
	1.2	-	+		
	0.1	-	+		

*Ookaらのnested PCR(ExTaq使用)

**1st PCRの検出感度と2nd PCRの検出感度の差

表5. 各種濃度の *E. albertii* 接種鶏肉からの検出における nested PCR* の感度

増菌培地	供試菌株	接種菌数 (cfu/PCR tube)	1st PCR	2nd PCR	感度改善 の倍率**
mEC	EA12	214	+	+	1
		21.4	+	+	
		2.1	-	-	
		0.2	-	-	
	EA21	687	+	+	1
		68.7	+	+	
		6.9	+	+	
		0.7	+	+	
	EA24	497	+	+	10
		49.7	+	+	
		5	-	+	
		0.5	-	-	
	EA29	543	+	+	1
		54.3	+	+	
		5.4	+	+	
		0.5	-	-	
NmEC	EA12	214	+	+	1
		21.4	+	+	
		2.1	-	-	
		0.2	-	-	
	EA21	687	+	+	1
		68.7	+	+	
		6.9	+	+	
		0.7	+	+	
	EA24	497	+	+	1
		49.7	+	+	
		5	+	+	
		0.5	+	+	
	EA29	543	+	+	1
		54.3	+	+	
		5.4	+	+	
		0.5	+	+	

*Ookaらのnested PCR(ExTaq使用)

**1st PCRの検出感度と2nd PCRの検出感度の差

表6. BPW、mECおよびNmEC中での増菌培養液からの
*E. albertii*分離陽性コロニー数

増菌培地	増菌温度 (°C)	PCR陽性コロニー数*(%)
BPW	37	0/8
	42	0/8
mEC	37	0/8
	42	5/8 (62.5)
NmEC	37	0/8
	42	2/8 (25)

*PCR陽性コロニー数/釣菌コロニー数

表7. mECおよびNmEC中での増菌培養液からのDHLおよび糖添加DHLによる
*E. albertii*分離陽性コロニー数

増菌培地	培養温度 (°C)	分離培地	PCR陽性コロニー数(%)	
mEC	37	DHL	13/96**	(14)
		糖DHL*	27/96	(28)
	42	DHL	53/96	(55)
		糖DHL	48/96	(50)
NmEC	37	DHL	24/96	(25)
		糖DHL	60/96	(63)
	42	DHL	80/96	(83)
		糖DHL	88/96	(92)

*1%ラムノースおよび1%キシロース添加DHL寒天培地

**2機関各2株で検討した合計

表8. 鶏肉（内臓肉を含む）の汚染実態調査結果

部位	検体数	PCR陽性検体数 (%)	分離陽性検体数 (%)	分離株数
鶏肉	118	2 (2)	0	0
内臓肉	165	30 (18)	7 (4)	37
合計	283	32 (11)	7 (2)	37

表9. 食品・環境検体での汚染実態調査

検体	検体数	<i>E. albertii</i> 分離陽性検体数(%)
食品	486	2 (0.4)
環境 (水・土壌)	10	0
合計	496	2 (0.4)

表10. ヒト便検体の汚染実態調査

自治体	検体数	<i>E. albertii</i> 分離陽性検体数 (%)	株数
A	18	0	0
B	1	0	0
C	3	0	0
D	1	0	0
E	2	1 (50)	2
F	4,999	1 (0.02)	1
合計	5,026	2 (0.04)	3

表11. 鶏肉におけるmECおよびNmEC中でのMPN値（3本法）

増菌培地	乳剤接種量	陽性試験管数	MPN値 (MPN/10g)
mEC	10 ml	3	240
	1 ml	3	
	0.1 ml	0	
NmEC	10 ml	3	460
	1 ml	3	
	0.1 ml	1	

分 担 研 究 報 告 書

Escherichia albertii の感染性・病原因子の解明

大岡 唯祐

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 の感染性・病原因子の解明

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・微生物学・講師）

研究要旨

新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* について、“感染性と病原因子の解明” および “診断疫学マーカーの確立” を目的とし、これまでに取得したゲノム情報を用いて種特異的遺伝子群の網羅的な同定を行った。申請者が既已取得している 29 株ならびに NCBI データベース上に登録されている 26 株（計 55 株）のゲノム配列情報を基にして、本菌に特異的な遺伝子群の網羅的抽出を試み、計 55 個の遺伝子を同定した。その中から、病原性関連候補遺伝子（11 遺伝子）、代謝関連候補遺伝子（2 遺伝子）、機能未知であるが保存性の高い遺伝子（7 遺伝子）をまず選定し、機能解析のために遺伝子破壊株の作製を進めた。また、リアルタイム PCR など本菌の検出系構築に使用可能な診断疫学マーカー遺伝子を抽出するため、解析した 55 株において塩基配列保存性が 99%以上を示し、他の近縁菌種には存在しないことを確認した結果、9 個の *E. albertii* 特異的遺伝子を同定することが出来た。現在、この 9 遺伝子について検出プライマーを作成し、食品等の分離株における遺伝子保存性および配列保存性の検討を進めている。

A. 研究目的

E. albertii は 2003 年に新たに命名された新興下痢症起因菌の 1 つである。国内において、近年、国内外で本菌の病原性、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）。*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、加えて、志賀毒素産生株による溶血性尿毒症症候群も発生していることから、さらなる研究が求められている。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜において保菌が報告されている (Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016) が、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。

本研究では、本菌の感染性や病原機構を理解し、より効果的に検出できる検査法を確立することは、効果的な食中毒調査および予防対策につなげることを最終目標とする。平成 30 年度は、申請者が既に取得している *E. albertii* 29 株のゲノム情報、さらにデータベース上に登録されているゲノム情報を基に、代謝系や病原性に関わると考えられる本菌に特異的な遺伝子群を網羅的に抽出し、病原関連候補遺伝子については、次年度以降の機能解析の準備段階として、当該遺伝子の破壊株の作製を進める。また、代謝系関連遺伝子など診断疫学マーカーとして利用できる可能

性のある遺伝子群については、これまでの分離株における保有状況を調べる目的で検出プライマーの作成を行う。

B. 研究方法

(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 (図 1 参照)

これまでに取得している 29 株の *E. albertii* 株の全ゲノム情報 (完全長配列 3 株、ドラフト配列 26 株)、加えて、NCBI データベースに登録されている 26 株 (計 55 株) について、国立遺伝学研究所が提供している DFAST により遺伝子アノテーションを行い、各株の遺伝子レパートリーを同定した。ドイツの患者由来株である CB9786 株を参照株とし、遺伝子長が 60%以上でありアミノ酸配列相同性が 90%以上の保存性を示す遺伝子を網羅的に抽出した。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、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。遺伝子破壊には、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用した。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、組換え酵素 λ Red recombinase を発現する pKD46 プラスミド（アンピシリン耐性遺伝子による選択）を各株に形質転換した。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。具体的には、相同組換えにより遺伝子置換が可能となるように、標的遺伝子の両末端約 50 bp の配列を付加したプライマーペアを設計した。PCR 増幅産物を pKD46 プラスミド形質転換株に導入し、標的部位への相同組換えによりクロラムフェニコール耐性を獲得したクローンを取得した。取得したクローンについては、標的部位に正しく *cat* 遺伝子が挿入されていることを標的周辺部に作成したプライマーペアを用いた PCR により

確認した。

（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（図 2 参照）

前出の *E. albertii* CB9786 株の全ゲノム塩基配列に関して、*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、塩基配列相同性 80%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を除去し、*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、塩基配列相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定した。最終的に、抽出された領域に存在する遺伝子を検出し、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。

C. 研究結果

（1）全ゲノム情報を基にした種特異的遺伝子群の網羅的探索
解析の結果、*E. albertii* に保存性される遺伝子が 55 遺伝子同定された。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、項目 (1) で同定した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。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。他の *E. albertii* 株での DNA 取込や組換え効率を検討する実験も並行して実施しており、現在までに、29 株の *E. albertii* 株のうち、DNA 取込効率の高い株を 5 株 (うち 2 株はヒト由来株) 同定して

いる。

(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 株の比較解析および近縁菌種とのゲノム比較解析から、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% の塩基配列保存性を示す遺伝子を計 9 個、診断疫学マーカー候補遺伝子として同定した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本年度実施した *E. albertii* 55 株に対する遺伝子レパートリー解析から、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 取込効率および組換え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。作製した遺伝子破壊株については、HeLa 細胞や Caco2 細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞死誘導などへの当該遺伝子の作用の有無を検討する。菌株の生死の判定には、遺伝子破壊株へ GFP 発現プラスミドを導入した株を用いることを検討しており、実際に野生株で生死の判定に利用できることを確認済みである。また、野生株と遺伝子破壊株との間で違いが見られた場合には、当該遺伝子について相補実験を行うとともに、既に機能が分かっている遺伝子との機能重複などが見られた場合には、必要に応じて複数遺伝子の遺伝子破壊株を作製して、それらの遺伝子の機能相関についてさらに解析を実施する。代謝系関連遺伝子については、基質

同定が非常に困難と考えられるものの、種々の基質を添加した培地を用いて野生株との増殖効率の差を調べる等を行い、選択培地開発のための準備実験を進める予定である。

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、検出プライマーを設計し、食品や動物由来株を対象とした PCR 増幅確認と増幅産物の配列決定を実施して候補の絞り込みを進める予定である。

E. 結論

E. albertii の特性を解明するにあたり、病原性および代謝系関連遺伝子などゲノム解析株に共通する遺伝子群の抽出が完了し、各遺伝子の機能解析を行う段階にある。しかしながら、機能解析に必須である遺伝子破壊株の作製法について、DNA 取込効率や組換え効率など、菌株側の性質による問題が生じた。これをうけ、次年度は効率の高い株を選定する、あるいは、効率の高い遺伝子破壊法

を模索するなど、方法についての条件検討を行う必要がある。また、診断疫学マーカー候補の選定については、その候補遺伝子の抽出が完了しており、新たに分離された食品および動物由来株についての検討を実施することで、最終的にどの遺伝子を使用するか決定できると考えられる。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

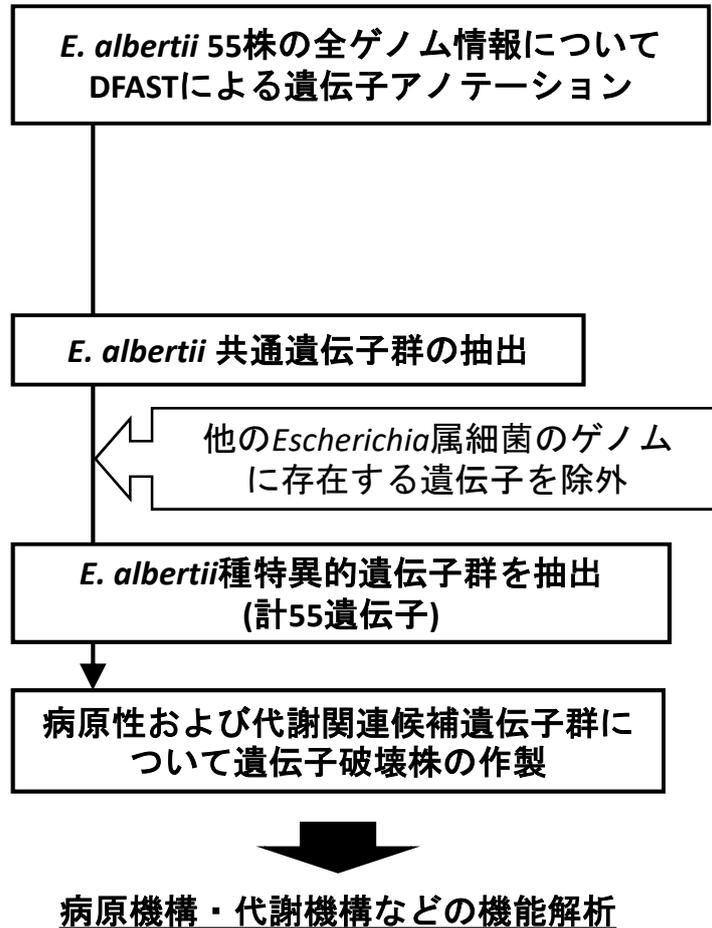


図 1 : 機能解析にかかるワークフロー

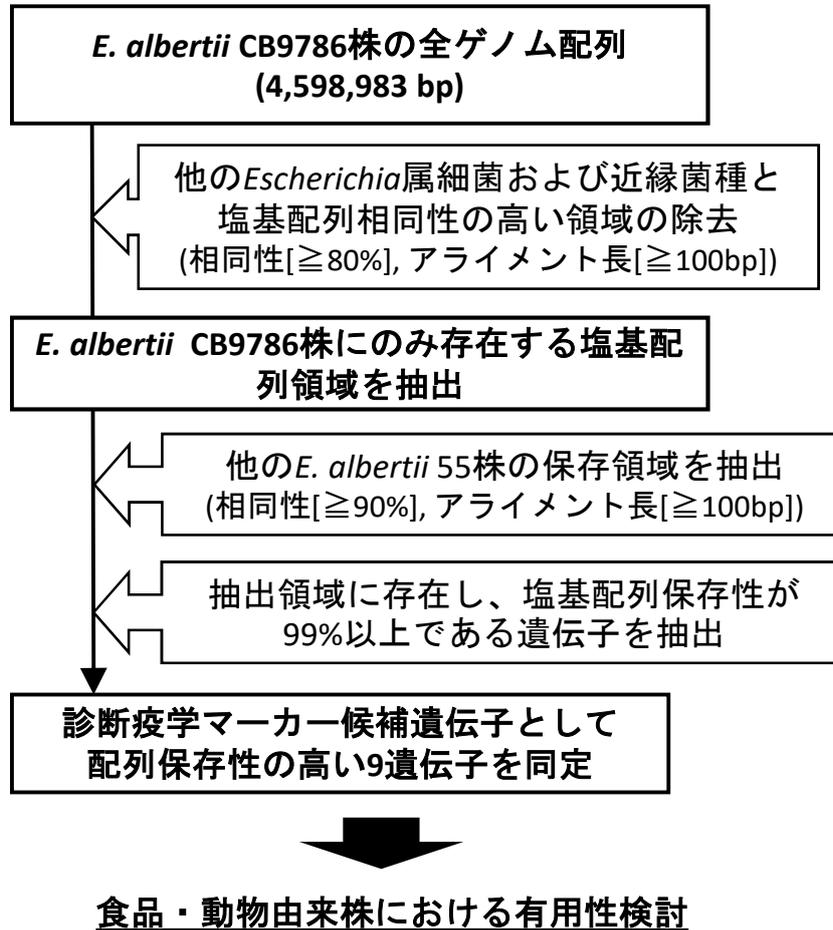


図2：疫学マーカー検出のためのワークフロー

分 担 研 究 報 告 書

Arcobacter butzleri の制御法の確立

大西 貴弘

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

Arcobacter butzleri の制御法の確立

研究分担者 大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本研究は *Arcobacter* 属菌による食中毒発生の可能性を検討することである。本年度は次年度以降に使用する基礎的な内容について検討を行った。まず、*Arcobacter* 属菌の培養、分離条件を検討した。その結果、継代にはアルコバクター基本培地、増菌培養には 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、分離培地には 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を用いると良好な結果が得られた。検出方法としては *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を使用した。さらにこれらをまとめて *Arcobacter* 属菌の定量に用いる最確数法を確立した。また、次年度以降、研究協力機関で *Campylobacter* 食中毒発生時に患者便から *Arcobacter* 属菌の分離を行う際に用いる分離手順プロトコルを作製した。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

上山 昭、山中拓哉、

高橋幸子

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

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

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

望月瑞葉

富山県衛生研究所

磯部順子

三重県保健環境研究所	赤地重宏
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
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
沖縄県衛生環境研究所	高良武俊

A. 研究目的

Arcobacter 属菌 (*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii*) 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。以前は *Campylobacter* 属菌に属していたが、その後、再分類され、現在では *Arcobacter* 属として独立している。*Arcobacter* 属菌は食肉、魚介類、野菜など幅広い食品をはじめ、水などの環境中からもしばしば検出される。*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。例えば 2008 年の米国ウィスコンシン州での結婚式の事例では参加した 280 人中少なくとも 51 人が下痢、腹痛、嘔吐などを発症した。調査の結果、原因食としてフライドチキンが強く示唆されたが、フライドチキンから、または患者便からもウイルスを含む既知の食中毒微生物は検出されなかった。その後の調査の結果、フライドチキンおよび患

者便から *A. butzleri* が PCR で検出された。しかし、事例発生から日数が経過していたためか、菌分離は行えなかった。このため、最終的に *A. butzleri* を原因菌として同定出来なかった。また、1983 年にイタリア、フラッタ州の小学校で 10 名の学生が発症した。患者便からは *Campylobacter* 様の菌が分離された。その後、この菌は *A. butzleri* と同定された。この事例では食品からの菌分離は行われてはおらず、最終的な原因菌の同定はなされていない。また別の報告では、下痢症患者 6,744 名の便から菌分離を行ったところ、89 名 (1.3%) から *Arcobacter* 属菌が分離された (表 1)。さらにアメリカからメキシコ、グアテマラ、インドへの旅行者で下痢を発症した患者の 8%、また、タイの下痢症児童の便の 2.4% からそれぞれ *Arcobacter* 属菌が分離されている。この他にも多くの原因物質不明の事例で患者便から

Arcobacter 属菌が分離されている。

Arcobacter 属菌の病原性に関しては *A. butzleri* が詳しく調べられている (表 2)。それらによると *A. butzleri* は Cytolethal distending toxin、Cytotoxic enterotoxin、Cytotoxic enterotoxin などの毒素を産生し、腸管上皮細胞へ接着、侵入し、タイトジャンクションのバリア機能を低下させることが報告されている。これらの特徴は *C. jejuni* の病原性と非常に類似している。また、動物実験では新生仔豚やラットに下痢を惹起することが報告されている。

このように *Arcobacter* 属菌と食中毒発症との間に関連性が示唆されているが、*Arcobacter* 属菌が食中毒の原因菌であるかどうかについては結論が出ていない。その原因の一つとして *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。また、もう一つの理由として、*Arcobacter* 属菌が *Campylobacter* 属菌と非常に類似した性状を持っていることが挙げられる (表 3)。*Campylobacter* 属菌を分離するときには 42℃での発育や微好気条件下での発育が大きな

指標となるが、*A. butzleri* は 20℃～42℃で発育でき、好気条件下、微好気条件下の何れでも発育できる。また、他の生化学性状も *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 (表 3)。形態学的にも *Campylobacter* 属菌と同じグラム陰性のラセン桿菌である。また、*Arcobacter* 属菌は灰白色～クリーム色で表面に光沢のある隆起した微小集落を形成する (図 1-1)。また培地の表面が湿っていた場合、その運動性のため扁平なコロニーを形成する (図 1-2)。これらの特徴は *Campylobacter* 属菌と類似しており (図 2-1, 図 2-2)、集落の色調、形態でも区別することが難しい。さらに *Arcobacter* 属菌は *Campylobacter* 属菌を分離するときに用いられる多くの選択培地上で発育できることが報告されている。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 (図 3)。*Campylobacter* 属菌による事例の分離株 2, 855 株を再調査したところ、1%が *A. butzleri* が *Campylobacter* 属菌として誤同定

されたものであったとの報告もある。また、*Arcobacter* 属菌にも病原性があり、*Campylobacter* 属菌が単独ではなく *Arcobacter* 属菌とともに発症に関与していたとしても、前述のとおり *Arcobacter* 属菌に対する検査は通常行われていないため、表面上は *Campylobacter* 属菌単独の事例となってしまう（図 4）。例えば南アフリカの調査では患者便 322 検体のうち 35 検体から *Arcobacter* 属菌を検出したが、そのうち 27 検体から *C. jejuni/coli* も同時に検出され、最終的に *C. jejuni/coli* の事例として処理されている。以上のような要因から、*Arcobacter* 属菌の食中毒への関与は明らかになっていない。

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、1) 肉類、野菜、魚介類など様々な食品における汚染実態を調査する、2) 地方衛生研究所に協力をお願いし、*Campylobacter* 食中毒発生時に患者便から *Arcobacter* 属菌の検出を試みる、3) *Arcobacter* 属菌の制御法の検討、以上の三点について研究を行う。本年度は次年度以降に用いる *Arcobacter* 属菌の検出法・定量法の作成を中心に検討した。

B. 研究方法

[1] 標準菌株

American Type Culture Collection (ATCC) より *A. butzleri* (ATCC49618)、*A. cryaerophilus* (ATCC43158)、*A. skirrowii* (ATCC51400) を購入し標準株として使用した。

[2] 試薬・培地

ブルセラ培地、ミューラーヒントン培地、アルコバクター基本培地、CAT サプリメントおよび CCDA サプリメントは Oxoid 社より購入した。トリプトソイ培地は (株) 栄研化学より購入した。馬脱繊維血は (株) 日本バイオテストより購入した。5-フルオロウラシルは (株) ナカライテスクより購入した。ブルセラ培地、ミューラーヒントン培地、アルコバクター基本培地には 1.5% の寒天を加え寒天培地としても使用した。各寒天培地は製造者推奨の方法で調整した後、121°C、15 分間、オートクレーブ処理後、滅菌シャーレに 15~20 ml ずつ分注し、使用した。選択剤もしくは馬脱繊維血を添加する場合は、オートクレーブ後の培地を 55°C まで冷却した後、無菌的に添加した。

[3] 検体

鶏肉は神奈川県内のスーパーマ

ーケットより購入した。購入後、検体は 4℃で保管し、24 時間以内に試験に供した。

[4] 継代培地の検討

ブルセラ寒天培地で 30℃、2 日間、好気培養した *Arcobacter* 属菌を供試培地に塗抹した。各培地は 30℃、好気培養を行い、4 日間、集落の発育を観察した。

[5] 選択剤の検討

アルコバクター基本寒天培地で 30℃、2 日間、好気培養した *Arcobacter* 属菌を供試選択剤を添加したアルコバクター基本寒天培地に塗抹した。各培地は 30℃、好気培養を行い、4 日間、集落の発育を観察した。

[6] マルチプレックス PCR

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, p. 89-94, 2000) を改良して使用した。プライマーおよび PCR の条件を図 5 に示す。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 *A. skirrowii* 陽性、401 bp のバンドを確認できた場合 *A. butzleri* 陽性、257 bp のバンドを確認できた場合 *A. cryaerophilus* 陽性とした(図 6)。

サンプルからの DNA 抽出はアルカリ熱抽出法で行った。具体的には増菌培養液 100 μ l を滅菌微量遠心チューブに移し、12,000 rpm、10 分間の遠心処理後、上清を捨て、50 mM NaOH を 85 μ l 加えた。100℃、10 分間加熱後、1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ l 加え、12,000 rpm、10 分間の遠心処理後、上清をテンプレートとして使用した。陽性コントロールは標準株から抽出した DNA をテンプレートとしてマルチプレックス PCR を行い、アガロースゲル電気泳動上の陽性バンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (キアゲン社製) を用いて DNA を抽出したものを使用した。

[7] 菌株の保存

分離した菌株は 7.5% DMSO を含むニュートリエントブロスに浮遊させ、-20℃で保存した。

C. 研究結果

[1] 培地の検討

Arcobacter 属菌の培養に用いる培地の検討を行った。検討は文献的に *Arcobacter* の発育が報告されている 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(表4)の4種類の培地で行った。その結果、ブルセラ寒天培地はATCCの推奨培地でもあるため *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. butzleri* は良好に発育したが、*A. skirrowii* の発育は悪く、また、*A. cryaerophilus* は4日間培養を継続しても発育は見られなかった。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3菌種とも非常に良好な発育を示した。3菌種が最もよく発育したのは血液寒天培地とアルコバクター基本寒天培地であったが、試験の簡便化を考え、アルコバクター基本寒天培地を基本培地として使用することにした。

[2] 選択剤の検討

Arcobacter 属菌の分離培養に用いる選択剤の検討を行った。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(表5)。5-フルオロウラシルはウラシルの代謝拮抗薬であり、*A.*

butzleri の分離にしばしば用いられている。CAT サプリメントは *Campylobacter* 属菌の分離に用いられ、組成は培地500 ml に対して Cefoperazone 4 mg、Teicoplanin 2 mg、Amphotericin B 5 mg からなる。CCDA サプリメントも *Campylobacter* 属菌の分離に用いられ、組成は培地500 ml に対して Cefoperazone 16 mg、Amphotericin B 5 mg である。これらの選択剤を添加したアルコバクター基本寒天培地上で *Arcobacter* 属菌を30℃、2日間、好気培養したところ(表5)、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は3菌種とも発育が良好であった。しかし、CCDA を添加したアルコバクター基本寒天培地上では *A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* の発育は不良であった。

[3] マルチプレックスPCR法

標準株から抽出したDNAをテンプレートとして使用し、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(図6)。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* 菌液を加え攪拌後、この乳剤から DNA を抽出し、本マルチプレックス PCR を行った。その結果、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 (図 7)。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 を行っても陽性にならなかった (図 8)。

[4]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* 属菌定量的のための最確数法を作製した。以下にその手順を示す (図 9)。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。増菌培地 225 ml に検体 25 g を加え、2 分間ストマッキング処理を行う。これを 10 倍乳剤とする。10 倍乳剤を増菌培地でさらに

希釈し、100 倍乳剤を作製する。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 0.1 ml、100 倍乳剤 0.1 ml および 0.01 ml に増菌培地を加えて最終 1ml にする。各濃度につき試験管 3 本ずつ用意した。30℃、48 時間、好気培養後、各試験管から培養液を 0.1 ml を取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製する。作成したテンプレートを用いてマルチプレックス PCR を行い、*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。

[5]鶏肉中の *Arcobacter* 属菌の定量

今回確立した *Arcobacter* 属菌に対する最確数法を用いて鶏肉中の *Arcobacter* 属菌の定量を試験的に行った (表 6)。使用した検体

は鶏肉 11 検体で、産地の内訳は国産 10 検体、ブラジル産 1 検体であった。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。最確数法により定量の結果、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（表 6 および図 10）。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（図 11）。*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。

[6] *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製した（図 12）。分離手順は以下のとおりである。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] 培地および選択剤の検討

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なるべく簡便でかつ市販されているものを使用することとした。検討

の結果、基本培地としては血液寒天培地とアルコバクター基本培地上で *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* の3菌種が同程度に良好な発育を示した。このうちアルコバクター基本培地は市販されており、血液を添加する必要もないため、作業の簡便性を考慮して基本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、ここでも調整が簡単なものもしくは市販されているものから検討した。5-フルオロウラシルはもともとレプトスピラの分離に用いられてきたものであり、単体で多くの細菌の発育を阻止することができるため、*Arcobacter* 属菌を分離する際の基本的な選択剤として利用されている。他に *Arcobacter* 属菌の分離に利用できる選択剤を調査

したところ、*Campylobacter* 属菌の分離に用いられている CAT サプリメントと CCDA サプリメントが市販されていた。そこでこれらのサプリメントを添加したアルコバクター基本培地での発育を検討したところ、CAT サプリメントは3菌種とも良好に発育したが、CCDA サプリメントは *A. butzleri* 以外の2菌種の発育が悪かった。このため CAT サプリメントを使用することにした。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ることができた。

[2] マルチプレックス PCR 法の検討

A. butzleri、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* は性状が非常に似ており、形態学的にも区別できないため、食品からの *Arcobacter* 属菌の検出はマルチプレックス PCR を用いた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、使用する PCR 試薬、プライマー濃度、アニーリング温度など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 1ml に対して 100~200 cfu の菌濃度で検出できるため、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。また、増菌培養は好気条件で行うため *Campylobacter* 属菌が発育してくる可能性は少ないと思われるが、本マルチプレックス PCR 法は *C. jejuni* および *C. coli* と交差しないことを確認している。

[3] 最確数法の確立

今回検討した内容をまとめ、*Arcobacter* 属菌に対する最確数法を作製し、試験的に鶏肉における *Arcobacter* 属菌の定量を行った。その結果、すべての検体から *Arcobacter* 属菌が検出された。今回検討した検体では 2 検体を除き *A. butzleri* と *A. cryaerophilus* が同時に検出された。また *A. butzleri* よりも *A. cryaerophilus* の菌数の方が高くなる傾向はみられたが、 10^2 - 10^4 MPN/100 g 範囲で収まっていた。これらのことから *A. butzleri* と *A. cryaerophilus* はニワトリにおける常在菌であることが示唆された。一方、今回の検討では *A.*

skirrowii は検出できなかった。*A. skirrowii* は鶏肉から検出されることは既に報告されており、今回検出できなかった原因は明らかできなかった。ひとつの可能性として、最確数法は通常、試験管 1 本あたり培養液 10 ml で行うが、今回検討した最確数法は試験の簡略化を考え、試験管 1 本あたり培養液 1 ml で行った。このため検出感度が低下した可能性がある。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 で行う予定である。

今回の鶏肉からの定量ではすべての検体で *Arcobacter* 属菌がマルチプレックス PCR 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ってみたい。

今回検討した 11 検体のうち 7 検体はもも肉(うち 1 検体はひき肉)であった。すべてのもも肉からは *A. butzleri* および *A. cryaerophilus* が同時に検出された。一方、むね肉 2 検体(うち 1 検体はひき肉)のうち 1 検体は *A. cryaerophilus* のみが検出された。ささみ 1 検体では *A. butzleri* だけが検出された。不明 1 検体では *A. cryaerophilus* だけが検出された。今回は検体数が 11 検体と少なく、7 検体はもも肉であったため、今回の結果だけで鶏肉の部位によって分離される菌種が異なるのかどうかについては結論できない。今後さらに検体数を増やして検討したい。

今回検討した鶏肉のうち、ブラジル産の 1 検体が冷凍処理済みであった。しかし、この検体からも *A. butzleri* と *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。

[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ために分離手順プロトコルを作製した。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。効率の上ではあまり良い方法ではないが、よい鑑別培地がない現時点ではやむを得ないと思われる。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

本年度は *Arcobacter* 属菌の培養法、検出法など次年度以降に使用する基礎的な項目の検討を行った。さらに *Arcobacter* 属菌の定量を行うための最確数法を作製した。*Arcobacter* 属菌は食肉からだけでなく野菜や魚介類、飲料水など様々な食品から検出されているが、本法

を用いることによって食品中の *Arcobacter* 属菌の定量を行うことができると思われる。さらに、*Arcobacter* 属菌の分離プロトコルを作製した。本年度作成した最確数法および分離プロトコルを用いて、次年度はわが国の食品における *Arcobacter* 属菌の汚染実態調査を行うとともに、研究協力機関では *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予定である。さらに汚染実態調査の結果をもとに *Arcobacter* 属菌の汚染が重篤な食品を選び、その食品中における *Arcobacter* 属菌の増殖挙動、生存性について検討を行う予定である。

本研究では *Arcobacter* 属菌が *Campylobacter* 属菌と性状が類似していることから、*Arcobacter* 属菌と *Campylobacter* 食中毒との関連性を中心に検討を行っている。しかし、*Arcobacter* 属菌は *Campylobacter* 食中毒事例以外の原因微生物が不明の事例からも多く分離されている。これらの事例では *Arcobacter* 属菌以外に問題となるような微生物は分離されていないことから *Arcobacter* 属菌が原因微生物である可能性がある。今後はこれらの原因微生物が不明の事例に関しても *Arcobacter* 属菌の分離

を行い、検討する必要があると思われる。また、*Arcobacter* 属菌の病原性についても分子生物学的、生化学的研究を進め、*Arcobacter* 属菌が下痢を引き起こすことができるのか結論を出す必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図 1-1 *A. butzleri* の集落



図 1-2 *A. butzleri* の集落

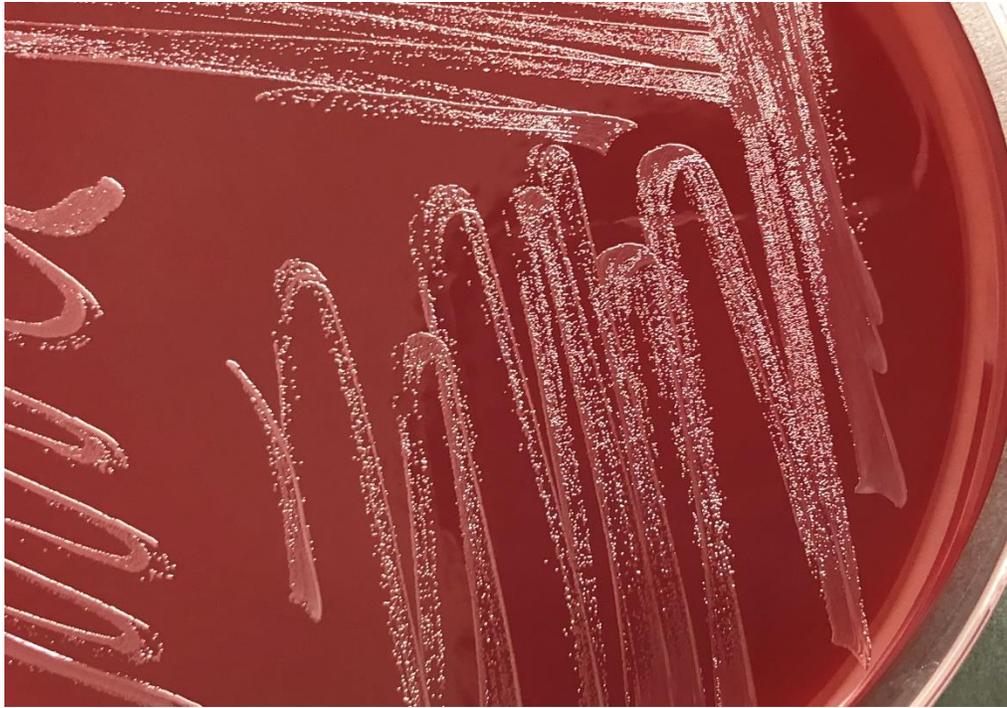


図 2-1 *C. jejuni* の集落



図 2-2 *C. jejuni* の集落

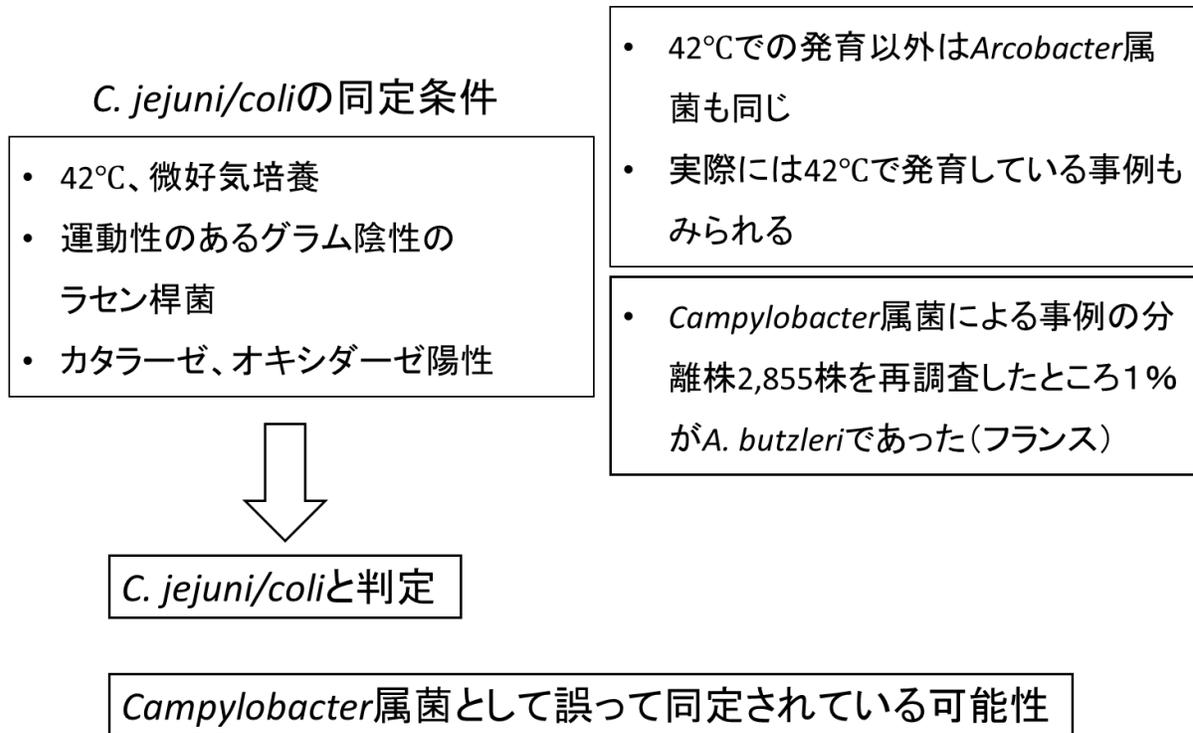


図3 *Arcobacter*属菌の同定に関する問題点

- *Arcobacter*属菌はルーチンの検査項目に入っていない
- *Arcobacter*属菌もニワトリから高頻度に分離される

- 南アフリカの調査では患者便322検体のうち35検体(11%)から*Arcobacter*属菌を検出
- そのうち27検体(77%)で*C. jejuni/coli*も同時に検出
- *C. jejuni/coli*の事例として処理されている



*Campylobacter*に隠れてしまって実態がよくわからない

図4 *Arcobacter*属菌の同定に関する問題点

プライマー

ARCO: CGTATTCACCGTAGCATAGC
BUTZ: CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA
SKIR: GGCGATTTACTGGAACACA
CRY1: TGCTGGAGCGGATAGAAGTA
CRY2: AACAACTACGTCCTTCGAC

反応液の組成

Quick Taq HS DyeMix	12.5 μ l
ARCO (50 μ M)	0.1 μ l
BUTZ (50 μ M)	0.1 μ l
SKIR (50 μ M)	0.1 μ l
CRY1 (50 μ M)	0.1 μ l
CRY2 (50 μ M)	0.1 μ l
Template DNA	0.1 μ l
滅菌精製水	0.1 μ l

PCR 反応条件

94°C	2 min
94°C	30 sec
62°C	30 sec
68°C	40 sec \times 30
68°C	5 min

図 5 マルチプレックス PCR 反応条件

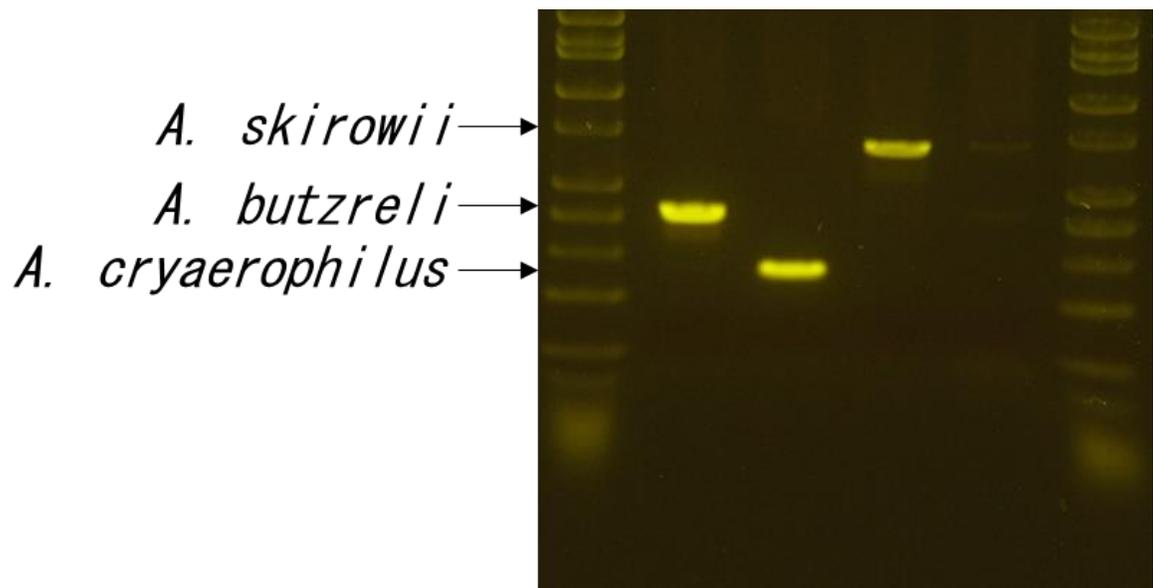
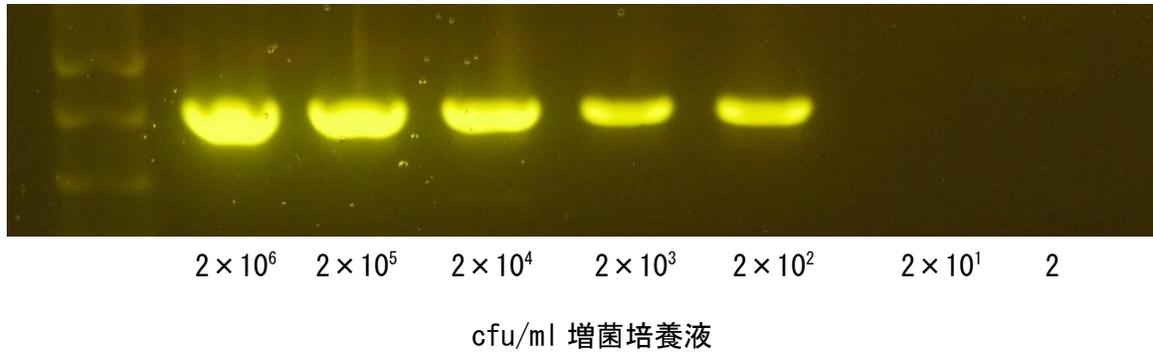


図 6 マルチプレックス PCR の電気泳動像

A. butzleri



A. cryaerophilus

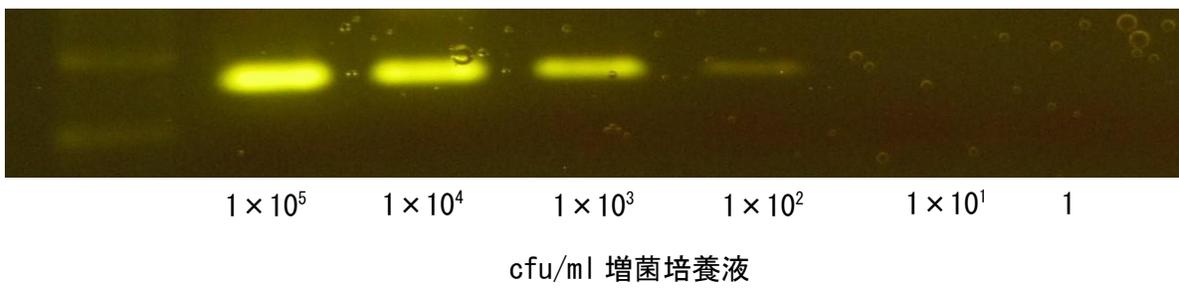
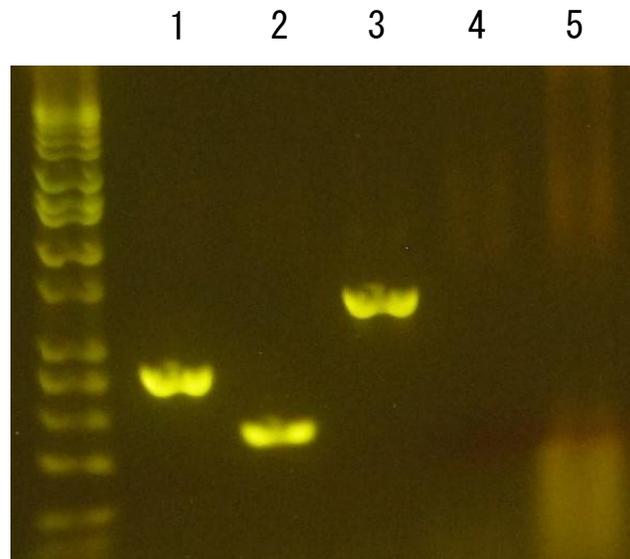


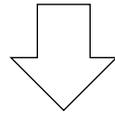
図7 マルチプレックス PCR の感度



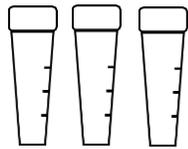
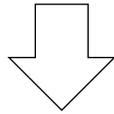
1. *A. butzleri*
2. *A. cryaerophilus*
3. *A. skirrowii*
4. *C. jejuni*
5. *C. coli*

図 8 マルチプレックス PCR の特異性

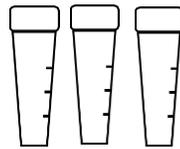
検体 25 g + ABM(5-FU)* 225 ml



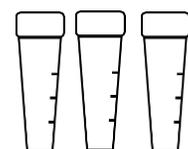
ストマッキング 2 分間 (10 倍乳剤)



10 倍乳剤 0.1 ml
+
ABM(5-FU) 0.9 ml

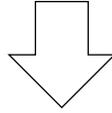


100 倍乳剤 0.1 ml
+
ABM(5-FU) 0.9 ml

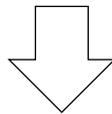


100 倍乳剤 0.01 ml
+
ABM(5-FU) 0.99 ml

各 3 本を 30°C、48 時間、好気培養



マルチプレックス PCR



最確数を算出

PCR 陽性の培養液を分離培地に塗抹
菌分離を試みる

*ABM(5-FU) : 0.005% 5-フルオロウラシル加アルコバクター基本培地

図 9 最確数法による *Arcobacter* 属菌の定量

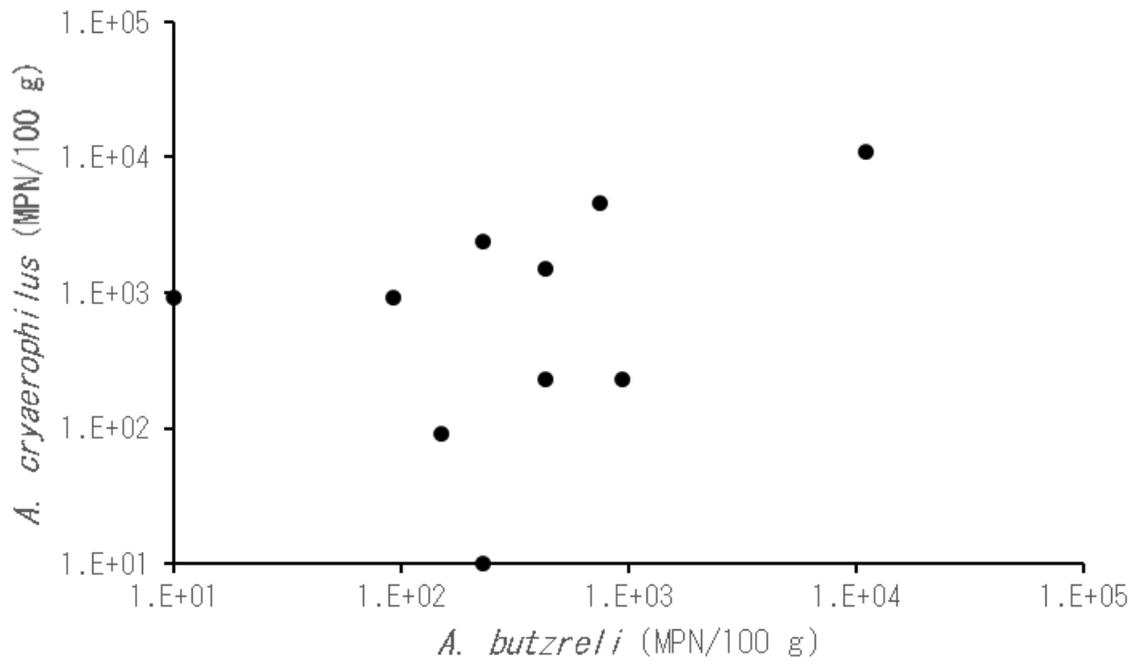


図 10 鶏肉における *A. butzleri* と *A. cryaerophilus* の菌数の比較

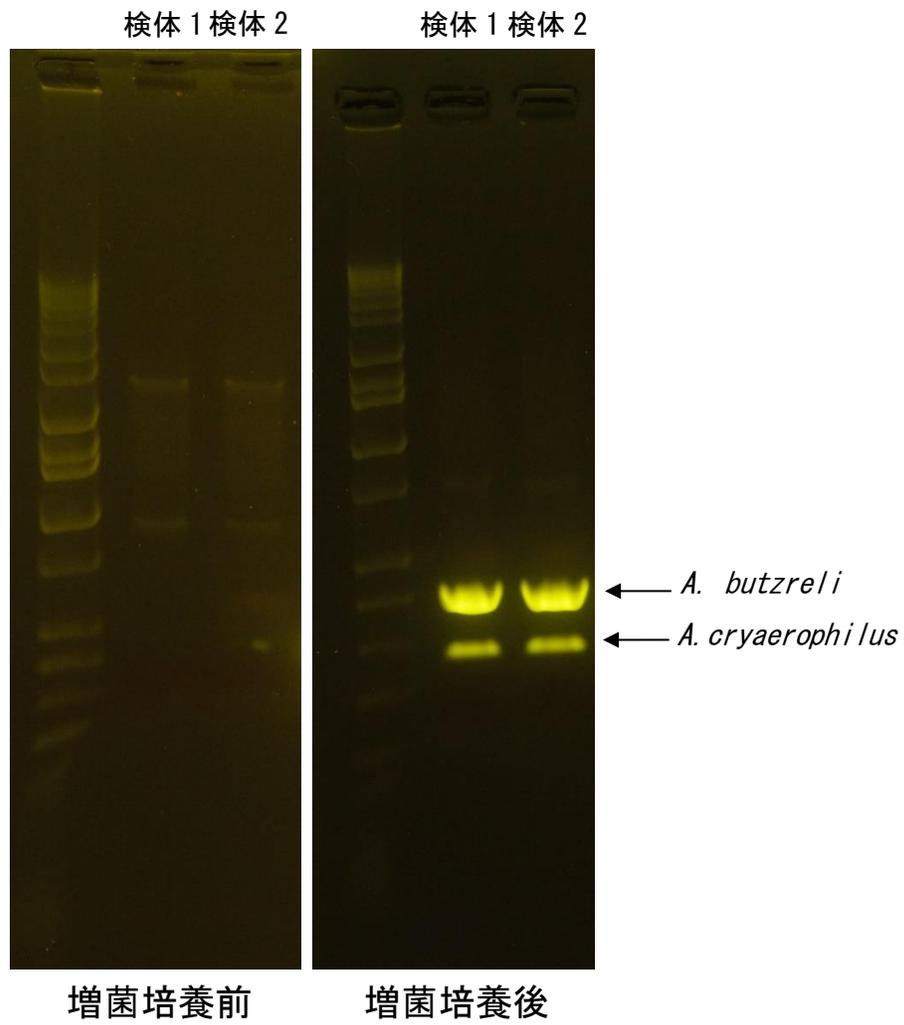


図 11 増菌培養前後での PCR の比較

Arcobacter 属菌の検査法

Campylobacter 食中毒発生時に便検体からカンピロバクター様コロニーを分離していただき、マルチプレックス PCR によって *Arcobacter* 属菌の検出、同定を行う。

1. 対象

Campylobacter 食中毒および *Campylobacter* 食中毒が疑われる患者便

2. 方法

- 1) *Arcobacter* 選択培地を作成する。

組成：Arcobacter broth base	12 g
Bacto agar	7.5 g
蒸留水	500 ml

121°C、15分滅菌後、50°Cに冷却し、CAT supplement を無菌的に1バイアル加えた後、シャーレに分注し、使用する。

- 2) 便を塗抹し、30°C、48時間、好気培養を行う。
- 3) *Campylobacter* 様コロニーを10個選択する。



Arcobacter 属菌のコロニー

- 4) アルカリ熱抽出法もしくは熱抽出法でDNAを抽出し、これをテンプレートとする。
- 5) マルチプレックス PCR (Houf *et al.*、FEMS Microbio. Letter 2000) によって *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を検出する。

① プライマー

ARCO: CGTATTCACCGTAGCATAGC
BUTZ: CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA
SKIR: GGCGATTTACTGGAACACA
CRY1: TGCTGGAGCGGATAGAAGTA
CRY2: AACAACTACGTCCTTCGAC

図 12 研究協力機関へ送付予定の *Arcobacter* 属菌
分離プロトコル (1 ページ目)

② 反応液の組成

Quick Taq HS DyeMix	12.5 µl
ARCO (50 µM)	0.1 µl
BUTZ (50 µM)	0.1 µl
SKIR (50 µM)	0.1 µl
CRY1 (50 µM)	0.1 µl
CRY2 (50 µM)	0.1 µl
Template DNA	1 µl
滅菌精製水	11 µl

A. skirrowii、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus* それぞれの DNA を送付するので、1 µl を反応液に加え陽性コントロールとする。

③ PCR 反応条件

<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
62°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>40 sec</u> × 30
68°C	5 min

④ 判定

アガロースゲル電気泳動を行い、以下のバンドが検出された場合、陽性とする。

641 bp	<i>A. skirrowii</i>
401 bp	<i>A. butzleri</i>
257 bp	<i>A. cryaerophilus</i>

6) 国立衛研への報告

PCR 陽性の結果が得られた際には通常検査での *Campylobacter* 属菌の検出結果とともに個人情報を除いた疫学情報を暗号化したメールにて連絡し、また後日、菌株を送付する。PCR 陰性の結果が得られた際には通常検査での *Campylobacter* 属菌の検出結果をメールにて連絡する。

3. 国立医薬品食品衛生研究所から提供する試薬等

- ・ Arcobacter broth base
- ・ CAT supplement
- ・ Bacto agar
- ・ Quick Taq HS DyeMix
- ・ 陽性コントロール用 DNA (*A. skirrowii*、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus* の計 3 本)
- ・ プライマー (各 50 µM)

* 注意事項 *

本研究に使用した各機関のお手持ちの消耗品に関しては、相当額の消耗品について年度末にご請求を依頼する予定です。

図 12 研究協力機関へ送付予定の *Arcobacter* 属菌
分離プロトコル (2 ページ目)

表 1 下痢症患者 6,744 名の便からの菌の分離

菌名	分離件数
<i>Campylobacter</i> spp.	380
<i>Salmonella</i> spp.	138
<i>Clostridium difficile</i>	109
<i>Arcobacter</i> spp.	89
<i>Aeromonas</i> spp.	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13
<i>Shigella</i> spp.	9
<i>Plesiomonas</i> spp.	3

表 2 *A. butzleri* の病原性

対象	病原性
培養細胞	Cytolethal distending toxin 産生 Cytotoxic enterotoxin 産生 Cytotonic enterotoxin 産生 腸管細胞への接着、侵入 タイトジャンクションのバリア機能の低下
動物	新生仔豚、ラットに下痢を惹起

表 3 *Campylobacter* 属菌との類似点

	<i>A. butzleri</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
42°Cでの発育	+ or -	+	+
微好気条件下での発育	+	+	+
好気条件下での発育	+	-	-
カタラーゼ	+	+	+
オキシダーゼ	+	+	+
馬尿酸加水分解	-	+	-

表 4 各基本培地上での *Arcobacter* 属菌発育の比較

	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
ブルセラ寒天培地	++	++	++
ミューラーヒントン寒天培地	++	-	+
5%馬血液加トリプトソイ寒天培地	+++	+++	+++
アルコバクター基本寒天培地	+++	+++	+++

表 5 各選択剤存在下での *Arcobacter* 属菌発育の比較

	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
0.005% 5-フルオロウラシル	+++	+++	+++
CAT	+++	+++	+++
CCDA	+++	+	+

表 6 鶏肉における *Arcobacter* 属菌の定量結果

産地	部位	冷凍処理	MPN/100 g		
			<i>A. butzreli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
国産	もも	不明	430	230	<30
国産	もも	不明	750	4600	<30
国産	不明	不明	<30	930	<30
国産	もも	不明	92	930	<30
国産	もも	不明	11000	11000	<30
国産	もも	不明	230	2400	<30
国産	むね (ひき肉)	不明	930	230	<30
ブラジル産	もも	あり	150	92	<30
国産	ささみ	不明	230	<30	<30
国産	むね	不明	<30	930	<30
国産	もも (ひき肉)	不明	430	1500	<30

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y.	Major vehicles and O-serogroups in foodborne enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> 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

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部 部長

(氏名・フリガナ) 工藤 由起子 (クドウ ユキコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部 第四室長

(氏名・フリガナ) 大西 貴弘 (オオニシ タカヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人鹿児島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 佐野 翔

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利用については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品中の食中毒細菌の制御法の確率のための研究 (H30-食品-一般001)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯学総合研究科・講師

(氏名・フリガナ) 大岡 唯祐・オオオカ タダスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。