

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

令和元年度（平成 31 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

令和 2（2020）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	3
------------------------	---

工藤 由起子

II. 分担研究報告書

1. <i>Escherichia albertii</i> の制御法の確立	23
--	----

工藤 由起子

(1) 食品等における <i>Escherichia albertii</i> 汚染実態調査	33
--	----

(2) 食品での <i>Escherichia albertii</i> 分離培地の検討	39
--	----

(3) <i>Escherichia albertii</i> 特異的リアルタイム PCR 開発の検討	49
---	----

2. <i>Escherichia albertii</i> の感染性・病原因子の解明	67
---	----

大岡 唯祐

3. <i>Arcobacter butzleri</i> の制御法の確立	85
---------------------------------------	----

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	119
---------------------	-----

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

総括研究報告書

研究分担者 大岡唯祐 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科

大西貴弘 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

研究協力者

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、畠山 薫、

鈴木 淳

岩手県環境保健研究センター	山中拓哉、太田美香子、高橋幸子、 佐藤徳行
秋田県健康環境センター	今野貴之
宮城県保健環境センター	山谷聡子、佐藤千鶴子
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
富山県衛生研究所	磯部順子、木全恵子
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
滋賀県衛生科学センター	梅原成子、長谷川嘉子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、佐伯美由紀
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司、内山浩子、福留智子
沖縄県衛生環境研究所	宮平勝人、柿田徹也、大山み乃り
仙台市衛生研究所	山田香織
さいたま市健康科学研究所センター	土屋彰彦、曾根美紀、加藤直樹
静岡市環境保健研究所	高橋直人
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
国立医薬品食品衛生研究所	新井沙倉、大屋賢司

A. 研究目的

新たな食中毒細菌（流行株などを含む）が流行し、定着する可能性があるが、流行前に対策をとり制御することが重要である。近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念

されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている（日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。また、*Arcobacter* 属菌は胃腸炎患者の便からしばしば分離されており、食中毒との関連性が示唆されている。

特に、*Arcobacter butzleri*は、食中毒原因菌としての可能性が示唆されている。これら2菌種に着目し、食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を行うこととした。

研究組織としては、(1) *Escherichia albertii*の制御法の確立(工藤由起子)、(2) *Escherichia albertii*の感染性・病原因子の解明(大岡唯祐)、(3) *Arcobacter butzleri*の制御法の確立(大西貴弘)の3つの分担研究とした。

まず、*E. albertii*についてであるが、本菌は、腸管病原性大腸菌(EPEC)や腸管出血性大腸菌(EHEC)と類似した病原因子を保有するが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、感染性や病原機構などが異なる可能性が示唆されており、さらなる研究が求められている。また、本菌の発症菌量や主要な汚染食品は不明であり、解明が求められている。食中毒の原因食品として、複合調理食品の他に井戸水もあり、動物からの水の汚染が考えられる。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜の保菌が報告されている(Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016)。これらのことから、食肉な

ど食品での汚染実態の解明を行い、汚染が起こりやすい食品群を明らかにする必要がある。加えて、それら食品群での *E. albertii* の挙動を確認する必要がある。しかし、それらに必要な食品の検査法は知られていない。国内外での食品での検査法は大腸菌の検査法に準拠した培地が各試験者によって用いられており、食品培養液に適した遺伝子検出法も系統立てては検討されていない。日本において *E. albertii* 食中毒が発生しているが、原因食品が特定された事例は少ない。このため、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法を確立することが求められている。さらに、食中毒の基礎的情報でもある *E. albertii* の発症菌量を明らかにすることが必要であるが、これまでに食中毒での原因食品中の菌数が測定された報告はない。これらの課題について研究を進めることによって食中毒の予防対策の提案を行うことが可能になると考え、本研究を実施する。令和元年(2019)年度には、工藤は、平成30年度の結果を踏まえ、[1]食品等における *E. albertii* 汚染実態調査、[2]食品での *E. albertii* 分離培地の検討、[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検

討、[4] 発症菌量推定のための調査を行うこととした。また、大岡は、より効果的な食中毒調査および予防対策の実現に必要な遺伝子検査法の開発につながることを期待し、本菌の感染性や病原機構を理解することによって、より効果的に検出できる指標遺伝子配列を見いだす研究を実施することとし、平成 30 年度の成果を発展させて、[1] 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立、[2] 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析、[3] *E. albertii* の 0 抗原多様性解析、[4] EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討、[5] 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明を実施した。

次に、*A. butzleri* についてであるが、本菌はグラム陰性のラセン桿菌で鞭毛をもち運動性を有する。このような性質に加え、他の生化学性状や培養条件も *Campylobacter* 属菌と類似しており、特に *C. coli* とは生化学性状的には区別することができない。このようなことから *Arcobacter* 属菌が *Campylobacter* 属菌として誤同定され、*Campylobacter* の事例として処理されている可能性が示唆

されている。このことは、*Arcobacter* 属菌が食中毒の原因菌であるかどうかについての結論が出ていない原因の一つとして考えられる。また、もう一つの理由として、*Arcobacter* 属菌に対する検査は通常の検査項目に入っていないため、*Arcobacter* 属菌が関与している事例が発生しても見逃される可能性が高いことが挙げられる。本研究では、*Arcobacter* 属菌の食中毒への関与について検討する。そのために、肉類、野菜、魚介類など様々な食品における汚染実態の調査、地方衛生研究所と協力し、*Campylobacter* 食中毒発生時に患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出、*Arcobacter* 属菌の制御法の検討、以上の三点について研究を行う。令和元年（2019）年度には、大西は、平成 30 年度の結果を踏まえ、[1] 食肉における汚染実態調査、[2] *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌の検出、実施した。

B. 研究方法

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

地方自治体の協力機関と協力し、

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

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

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

[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

大岡唯祐研究分担者が同定した

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

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

[1] 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

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

[2] 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

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

[3] *E. albertii* の O 抗原多様性解析

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

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

[4] EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

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

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

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

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

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

神奈川県内で購入した鶏肉、豚肉、牛肉を検体とした。最確数法による *Arcobacter* 属菌の計数は昨年度確立した方法で行った。増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地 225 ml に検体 25 g を加え、2 分間ストマッキング処理を行った。これを 10 倍乳剤とし、最確数法は 3 本法で行った。30°C、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製した。作成したテンプレートを用いて *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を行い、*Arcobacter* 属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* それぞれの最確数を算出した。さらに、マルチプレックス PCR で陽性になった試験管の培養液を、CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地に塗抹し、30°C、48 時間、培養した。

単離した集落がマルチプレックス PCR で陽性の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定した。

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

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

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

C. 研究結果

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

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

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

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

[3] *E. albertii* 特異的リアルタ

イム PCR 開発の検討

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

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

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

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

〔1〕病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

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

〔2〕培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

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

〔3〕*E. albertii* の O 抗原多様性解析

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

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

〔4〕EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

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

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

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

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

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

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

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

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

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

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

D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

多様な食品・環境検体での汚染実態調査では、汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されているものも存在し、環境検体からも *E. albertii* が分離されたため、環境・食品が汚染される可能性もある。今後、分離株の病原性解析などによって、ヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。ヒト便の調査では *E. albertii* が分離された例もあったことから、自治体等検査機関で乳糖非分解かつ非運動性の腸内細菌

が得られた際には本菌を疑う必要がある。

[2] 食品での *E. albertii* 分離培地の検討

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

[3] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

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

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

[4] 発症菌量推定のための調査

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

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

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

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

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

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] 食肉における汚染実態調査

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

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

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

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

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

E. 結論

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究について、新興食中毒細菌、特に *Escherichia albertii* および *Arcobacter* 属菌を対象にして実施した。分担研究

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

② *Campylobacter* 食中毒患者便からの *Arcobacter* 属菌が PCR で検出された。これら成果を踏まえて、令和 2 年度にはさらに各項目の研究を進展させ、地方自治体との連携も広げる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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

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

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

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

19、20、21日．名古屋

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

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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

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°C で増菌培養し、糖 MAC にて分離培養した場合は、供試した 6 株の全て、釣菌した合計 144 コロニーの全てが *E. albertii* であったため、鶏肉を対象とした場合には、最も優れた増菌および分離培養法の組み合わせであると考えられた。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

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

食品等における *Escherichia albertii* 汚染実態調査

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、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を目標に研究を行った。その結果、鶏肉を含む複数の食品や、複数の環境検体から *E. albertii* が分離された。そのため、環境を介して食品が汚染される可能性が示され、他の食品および環境についてもさらに調査が必要と考えられた。また、ヒトから *E. albertii* が分離されたため、集団食中毒事例以外にも、散发性食中毒事例や、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。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。

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
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）。また、本菌の主要な汚染食品や汚染環境は不明であり、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おり（Wang et al., Epidemiol. Infect., 2016, 144 45-52）、動物からの水の汚染が考えられる。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、汚染が起りやすい食品群を明らかにする必要がある。

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 30 (2018) 年度には、食品での検査法の検討および食品（主に食肉）等での汚染実態調査を行った。その結果を踏まえながら、令和元 (2019) 年度は、昨年度に引き続き、これまでの試験結果を反映した暫定的な検査法を決めて、食品・環境検体等を対象に *E. albertii* を検出する食品等における汚染実態調査を行うこととした。

B. 研究方法

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（表 1）。また、計 40 検体のヒトおよびウシ便検体を試験した（表 2）。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、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、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。

便検体については、上記の分離培地に直接塗抹して、以降の試験を実施した。

C. 研究結果

1) 食品・環境検体での汚染実態調査

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（表 1）。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（表 1）。

2) ヒトおよびウシ由来株での調査

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（表 2）。

D. 考察

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できたものには、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。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。

ヒトおよびウシ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 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。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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, phlotypes, 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、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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

表1. 食品・環境検体での汚染実態調査

検体	種類	検体数	<i>E. albertii</i> 分離 陽性検体数	<i>E. albertii</i> 特 異的PCR供 試検体数	<i>E. albertii</i> 特 異的PCR陽 性検体数
食品	鶏肉	58	1	44	1
	豚肉	16	0	16	0
	牛肉	20	0	20	0
	その他食肉	36	0	5	0
	その他食品	593	5	217	6
小計		723	6	302	7
環境		159	2	159	9
合計		882	8	461	16

表2. 便検体の汚染実態調査

種類	自治体	検体数	<i>E. albertii</i> 分離 陽性検体数	株数
ヒト便	A	27	1	2
	B	5	0	0
	C	1	1	1
	D	2	2	2
小計		35	4	5
ウシ便	E	5	0	0
小計		5	0	0
合計		40	4	5

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 μ 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°C にて 22 ± 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°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°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°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°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°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°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

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

糖MAC 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1. 鶏肉からの*E. albertii*分離のフローチャート

表1. *E. albertii*接種鶏肉におけるmECおよびNmEC中での増菌培養液からのMACおよび糖MACによる*E. albertii*分離

増菌培地	培養温度 (°C)	分離培地	供試菌株	鶏肉	接種菌数 (cfu/25 g)	24無色コロニー中 の <i>E. albertii</i> コロニー数	<i>E. albertii</i> 分離陽性 検体*	平均 <i>E. albertii</i> 分離陽性率**		
mEC	42	MAC	EA7	A	112	22	5/6	65.3		
			EA12	A	115	0				
			EA21	B	166	24				
			EA24	C	200	1				
			EA29	C	190	24				
			EA100	B	181	23				
			糖MAC***	EA7	A	112			24	5/6
		EA12	A	115	24					
		EA21	B	166	24					
		EA24	C	200	0					
		EA29	C	190	24					
		EA100	B	181	24					
		NmEC	42	MAC	EA7	A	112	24	6/6	92.4
					EA12	A	115	24		
EA21	B				166	22				
EA24	C				200	18				
EA29	C				190	23				
EA100	B				181	22				
糖MAC	EA7				A	112	24	6/6		
EA12	A			115	24					
EA21	B			166	24					
EA24	C			200	24					
EA29	C			190	24					
EA100	B			181	24					

*供試した6株中の*E. albertii*が分離された株数

***E. albertii*が分離された株における平均*E. albertii*分離陽性率

***1%ラムノースおよび1%キシロース添加マツコンキー寒天培地

表2. *E. albertii*接種鶏肉におけるmECおよびNmEC中での増菌培養液からのDHL、糖添加DHL、MACおよび糖添加MACによる*E. albertii*分離

増菌培地	培養温度 (°C)	分離培地	<i>E. albertii</i> 分離陽性検体*	平均 <i>E. albertii</i> 分離陽性率**
mEC	42	DHL	6/6	53.5
		糖DHL***	5/6	75
		MAC	5/6	65.3
		糖MAC****	5/6	83.3
NmEC	42	DHL	6/6	70.1
		糖DHL	6/6	85.4
		MAC	6/6	92.4
		糖MAC	6/6	100

*供試した6株中の*E. albertii*が分離された株数

***E. albertii*が分離された株における平均*E. albertii*分離陽性率

***1%ラムノースおよび1%キシロース添加DHL寒天培地

****1%ラムノースおよび1%キシロース添加マッコンキー寒天培地

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

Escherichia albertii 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

研究要旨

日本では、*Escherichia albertii* による集団食中毒事例の発生が多数報告されているが、原因食品が特定された事例はわずかし報告されていない。このため、*E. albertii* 原因食品特定に対応する食品中の *E. albertii* を迅速かつ高感度に検出する遺伝子検査法を確立することを目標に研究を行った。その結果、*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 1 組が選定された。次年度には、食品を用いた検討等を重ねることにより、さらに研究を発展させ、新たな *E. albertii* 特異的遺伝子検出法の確立を目指す。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 新井沙倉、大屋賢司、大西貴弘
鹿児島大学 大岡唯祐

A. 研究目的

日本において *Escherichia albertii* の検査法を確立することが求められている。
原因食品が特定された事例は少ない（大岡，日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。このため、原因食品特定に対応する *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的反応を示すことが Maeda らによって発表された(Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67, 503-505)。また、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)は、PCR 反応を 2 回繰り返すため煩雑であり、判定までに時間を要する。そこで、判定までの時間を短縮し、感度が高く、食品検査分野でも広く使用されている遺伝子検出系としてリアルタイム PCR に着目した。今年度は、その中でも特に特異性の高いプローブ法の開発を検討することとした。

B. 研究方法

(1) プライマーおよびプローブ候補の設計

E. albertii 特異的リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブを設計する遺伝子を検討し、プライマーおよびプローブ候補を設計した。

1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株 21 株、無症状保菌者由来株

2 株、動物(トリおよびサル)由来株 13 株、食品由来株 2 株の合計 38 株を供試した(表 1)。

2) DNA 抽出

カジトン培地に保存している菌株(38 株)1 エーゼ分(10 μ L)を Trypticase Soy Broth (TSB、オキシソイド)10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を以下の方法で熱抽出法に供試した。菌培養液 100 μ L を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌蒸留水(滅菌 DW)を 100 μ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、10,000 \times g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。

3) 遺伝子シーケンスによる配列決定

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が昨年度同定した 9 個の *E. albertii* 特異的遺伝子(遺伝子 A ~ 遺伝子 I)を試験対象とした。各遺伝子の 3' 端および 5' 端に遺伝子シーケンス用のプライマーを設計した。

上記にて抽出した各 *E. albertii* 菌株 DNA を鋳型として供試し、設計した遺伝子シーケンス用プライマーにて PCR 反応による増幅を行った。PCR 反応に

は、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を使用した。また、プライマーの終濃度を $0.4 \mu\text{M}$ に調製した。機器は MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) を使用した。98°C 10 秒の熱変性のうち、98°C 10 秒 - 50°C 5 秒 - 72°C 90 秒を 35 サイクルの増幅反応後、72°C で 5 分間反応させた。PCR 産物を TE バッファーにて 10 倍希釈した後、DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置の MultiNA (島津製作所) によって電気泳動した。

非特異的反応が認められず、目的のサイズの産物のみを増幅した場合に、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 PCR 産物を精製した。精製 PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた cycle sequencing に供試した。Cycle sequencing には、上記 PCR 反応と同一のプライマーを用いた。Cycle sequencing 産物は、エタノール沈殿にて精製した。遺伝子配列は、Applied Biosystems SeqStudio Genetic

Analyzer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた遺伝子シーケンスにて決定した。

4) 遺伝子配列の解析

遺伝子シーケンスによって得られた配列データを遺伝子シーケンス解析用ソフトウェアである CLC Genomics Workbench (シーエルシーバイオ) に取り込み、配列のクオリティが低い領域をトリミングによって除いた。取得した合計 38 株の遺伝子配列をアライメントにより整列させ、一塩基多型 (SNP) の存在を確認した。

次に、既に遺伝子配列が登録されている *E. albertii* 株の遺伝子配列情報も併せて解析するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Nucleotide BLAST を利用して、登録されている *E. albertii* 株の対象遺伝子配列を検索した。検索結果として表示された合計 75 株の *E. albertii* 株の遺伝子配列情報を抜き出し、上記にて解析した国立医薬品食品衛生研究所の衛生微生物部保有 *E. albertii* 38 株の CLC Genomics Workbench 中のアライメントデータへ追加し、合計 113 株のアライメントデータを取得した。その配列中の SNP を確認し、比較的

SNP の少ない遺伝子配列領域を選定した。

5) プライマーおよびプローブ候補の設計

比較的 SNP の少ない遺伝子配列領域 (392 bp) を選択し、Primer3 にてプライマーおよびプローブ候補を設計した。設計されたフォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブ候補を 4) にて解析した合計 113 株のアライメントデータへ追加し、設計したプライマーおよびプローブ候補配列中に SNP が当たらない候補を選定した (表 2)。選定されたプライマーおよびプローブ候補のオリゴを合成した。なお、プローブは、FAM の蛍光標識を選択した。

(2) プライマーおよびプローブの至適濃度の検討

設計したプライマー候補のリアルタイム PCR 反応溶液中の至適濃度を検討した。その後、プローブ候補のリアルタイム PCR 反応溶液中の至適濃度を検討した。

1) 菌株

E. albertii の type strain である JCM17328T (=NBRC 107761) を供試した。

2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している

菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を NucleoSpin Tissue キット (タカラバイオ) を用いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を超微量紫外可視分光光度計である Nanodrop 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) にて測定した。*E. albertii* NBRC 107761 の全ゲノム配列長を NCBI 上で検索し、Accession No. NZ_BBMY00000000 に記載されている全ゲノム配列長 4,422,416 bp から、抽出 DNA 中の DNA コピー数を算出した (Ritalahti et al., Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72 2765-2774)。抽出 DNA 溶液を滅菌 DW にて 2×10^6 copy/ μ L の濃度に希釈した。この DNA を原液とし、滅菌 DW にて 10^{-1} から 10^{-7} まで 10 倍階段希釈した。このうち 10^{-2} から 10^{-7} の希釈 DNA 溶液 (2×10^4 ~ 0.2 copy/ μ L) をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

3) プライマーおよびプローブの濃度設定

まず、プライマーの至適濃度を検討した。その際に、プローブの終濃度が 0.25 μ M となるよう調製した。プライマーの終濃度は、0.1 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、

0.6 μ M、0.9 μ M となるよう調製した（表 3）。次に、プローブの至適濃度を検討した。プライマーの濃度は上記にて検討した結果、最も適した濃度（EA_rt1 および EA_rt2 で共に終濃度 0.3 μ M）となるよう調製した。プローブの終濃度は、0.05 μ M、0.1 μ M、0.15 μ M、0.25 μ M、となるよう調製した（表 4）。

4) リアルタイム PCR

設計した EA_rt1 と EA_rt2(表 2) のプライマーおよびプローブにてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて調整した希釈 DNA 溶液を 5 μ l 加えた。少なくとも 10^{-5} から 10^{-7} の希釈 DNA 溶液を供試する際には、1 濃度につき 3 反応実施した。機器は Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。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た。検出された蛍光から求められる Ct 値を蛍光強度のプロットした図を参考に、検出感度や蛍

光強度を求め、プライマーおよびプローブの至適濃度を決定した。

(3) 特異性試験

1) 菌株

食中毒および下痢症の事例由来株、無症状保菌者由来株、動物由来株、食品由来株の合計 42 株の *E. albertii* を供試した(表 6)。また、その他の細菌種として、*E. albertii* の遺伝的近縁種である *Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Hafnia alvei*、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella sonnei* (Lukjancenko et al., Microb. Ecol., 2010, 60(4), 708-720; Oh et al., J. Microbiol., 2011, 49(5), 747-752; Na et al., J. Microbiol., 2018, 56(4), 280-285) に加え、各種食中毒細菌や食品由来細菌の合計 24 菌種、27 株を供試した(表 6)。

2) DNA 溶液の調製

E. albertii 株は、カジトン培地に保存している菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。その他の菌株は、-80°C に冷凍保管されている菌株 1 エーゼ分 (10 μ L) を TSB 5 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を NucleoSpin Tissue キットを用

いた DNA 抽出に供試した。抽出 DNA の濃度を Nanodrop 2000 によって測定した。抽出 DNA 溶液を滅菌 DW にて $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の濃度に希釈した。この希釈 DNA 溶液をリアルタイム PCR のテンプレートとした。

3) リアルタイム PCR

前述の (2) 4) と同様に実施した。但し、全ての希釈 DNA 溶液を 3 反応実施した。また、リアルタイム PCR のサイクル数は 40 サイクルとし、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。

C. 研究結果

(1) プライマーおよびプローブ候補の設計

1) 遺伝子シーケンスによる配列決定

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。遺伝子 A の配列を NCBI の Nucleotide BLAST にて検索したところ、合計 75 株の登録配列を得た。この配列も合わせた合計 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

ーブ候補を設計し、選定したところ、産物長が 150 bp および 97 bp の 2 ペアのプライマーおよびプローブ候補が得られた (表 2)。(2) プライマーおよびプローブの至適濃度の検討

プライマーの濃度を検討したところ、感度が高く、かつ蛍光強度が十分得られた条件は EA_rt1 および EA_rt2 で共にプライマーの終濃度が $0.3 \mu\text{M}$ の場合であった (図 1、図 2)。プローブの濃度を検討したところ、EA_rt1 ではプローブの終濃度が $0.1 \mu\text{M}$ の条件、EA_rt2 ではプローブの終濃度が $0.15 \mu\text{M}$ の条件が最も適していた (図 3、図 4)。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 (表 5)。

(3) 特異性試験

EA_rt1 および EA_rt2 共に供試した全 *E. albertii* 株が陽性となった (表 6)。その他の細菌種では、EA_rt2 では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 株が陽性となった (表 6)。

D. 考察

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。そこで、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。

E. albertii 特異的リアルタイム PCR として確立するためには、さらに複数の項目について検討する必要がある。まず、本リアルタイム PCR は、食品中の *E. albertii* を検出することを目的としているため、細菌全般の遺伝子を検出する 16S rRNA 遺伝子を同時に検出することで、食品中の PCR 阻害物質の影響を考慮する必要がある。そのため、Duplex リアルタイム PCR の検出系として今回開発した EA_rt2 が利用できるか評価する必要がある。

次に、*E. albertii* 菌株のみ、および食品培養液と *E. albertii* 菌株を併せて試験した場合のリアルタイム PCR の検出感度を評価する必要がある。さらに、実際の食品検体を検査する際には、まず増菌培養を行うため、試験的に *E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養し、その培養液から抽出した

DNA をリアルタイム PCR に供試し、検出されるかを評価する必要がある。これらの検討において良好な成績が得られた際に、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR として提唱することが可能となる。さらに、実際の食品検体中の *E. albertii* を検出することで、実検体の応用性も示せると考えられる。

E. 結論

E. albertii 特異的リアルタイム PCR の候補として、EA_rt2 と名付けたプライマーおよびプローブ 1 組を選定した。次年度にはさらに感度試験や食品を用いた検討を重ね、食品からの *E. albertii* 検出に有用なリアルタイム PCR を確立する。また、本リアルタイム PCR 法と培養法を組み合わせ、食品からの *E. albertii* 検出分離法について総合的に検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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.

(学会等発表)

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

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

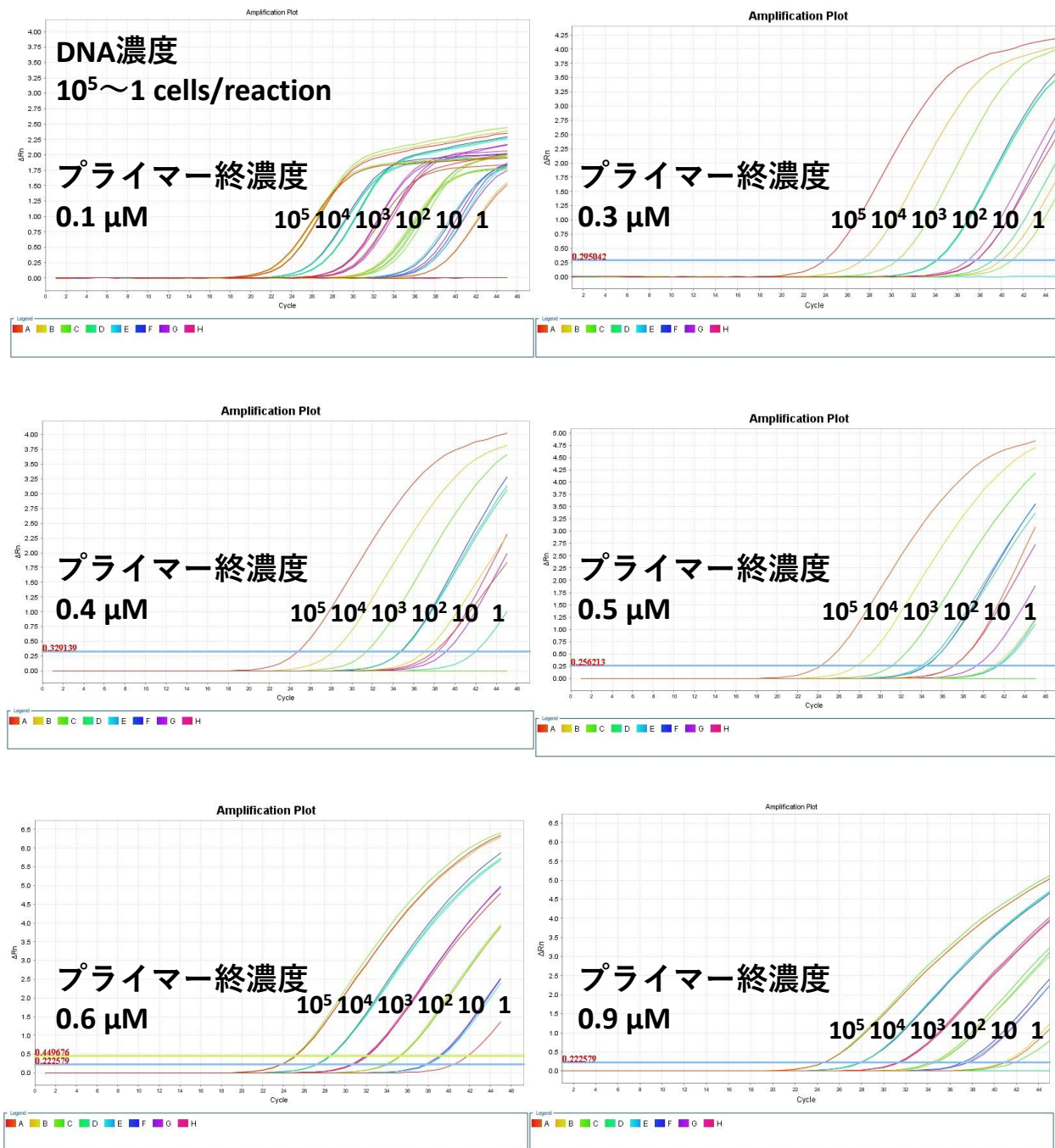


図1. EA_rt1におけるプライマーの至適濃度検討におけるLinear蛍光プロット像

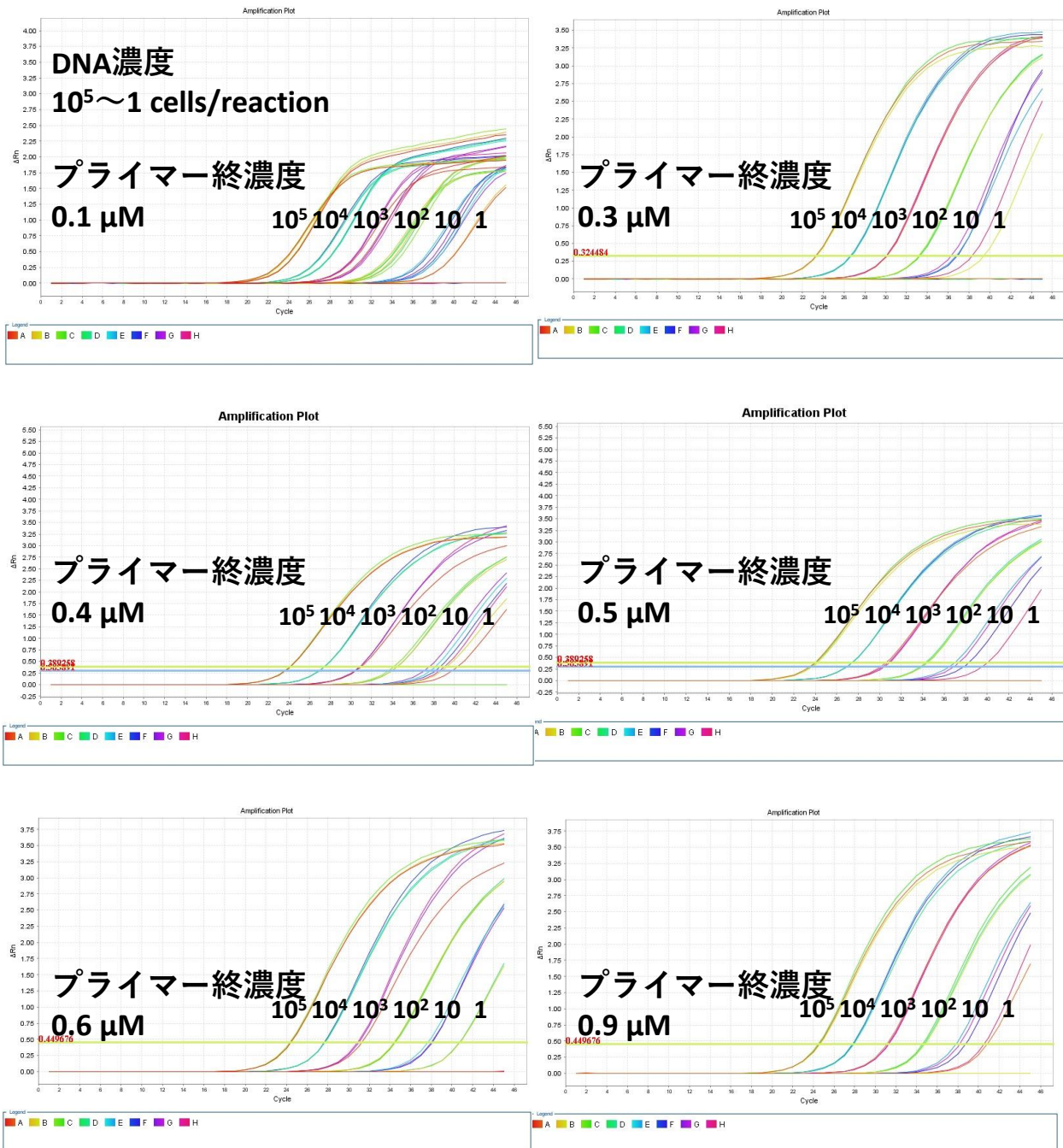


図2. EA_rt2におけるプライマーの至適濃度検討Linear蛍光プロット像

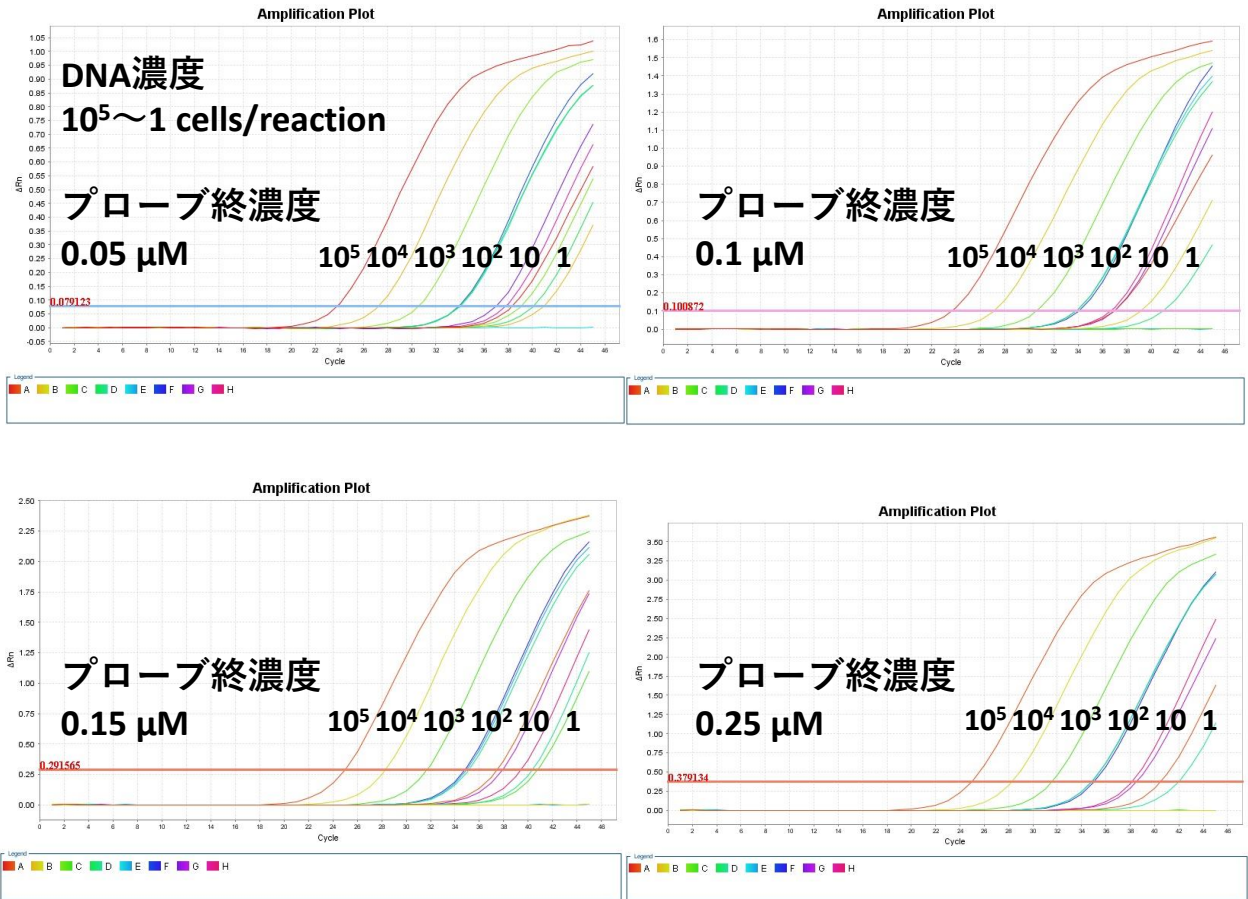


図3. EA_rt1におけるプローブの至適濃度検討Linear蛍光プロット像

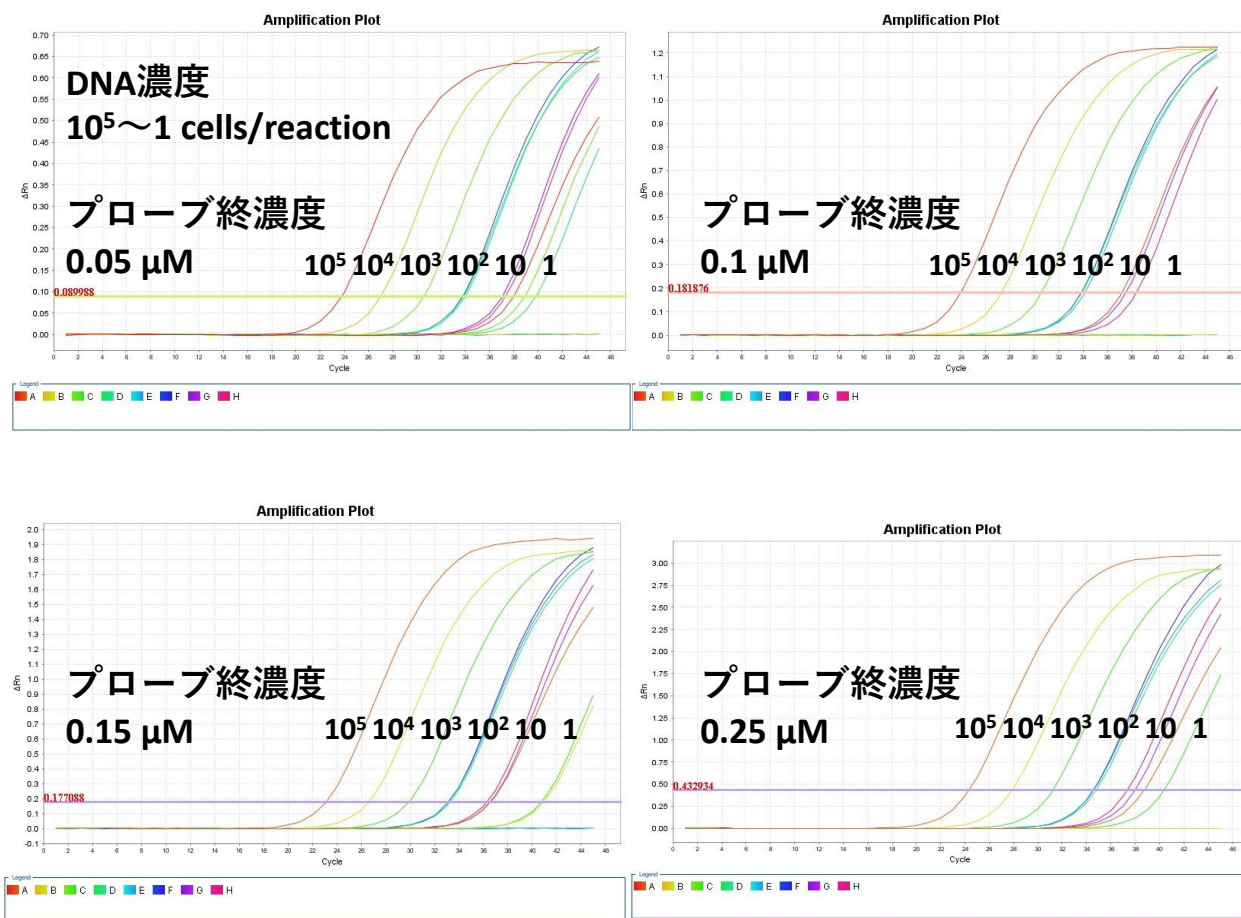


図4. EA_rt2におけるプローブの至適濃度検討Linear蛍光プロット像

表1. 遺伝子シーケンスの供試菌株

	由来	株数
事例1	患者	1
事例2	患者	1
事例3	患者	1
事例4	患者	1
事例5	患者	1
事例6	患者	1
事例7	患者	1
事例8	患者	1
事例9	患者	1
事例10	患者	1
事例11	患者	1
事例12	患者	1
事例13	患者	1
事例14	食品	1
事例15	患者	1
事例16	患者	1
事例17	患者	1
事例18	患者	1
事例19	患者	1
事例20	患者	1
事例21	患者	1
ヒト（無症状保菌者）		2
動物	トリ	12
	サル	1
食品		2
	合計	38

事例：事例または下痢症の事例

表2. *E. albertii* 特異的リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブ候補

名称	プライマーおよびプローブ (蛍光およびクエンチャー標識)	産物
EA_rt1	フォワードプライマー : EA_rt1F リバープライマー : EA_rt1R プローブ : EA_rt1P (FAM/ZEN/IBFQ)	150 bp
EA_rt2	フォワードプライマー : EA_rt2F リバープライマー : EA_rt2R プローブ : EA_rt2P (FAM/ZEN/IBFQ)	97 bp

表3. プライマーの至適濃度の検討時の1 wellあたりの反応溶液組成

試薬	プライマー終濃度					
	0.1 μ M	0.3 μ M	0.4 μ M	0.5 μ M	0.6 μ M	0.9 μ M
Taqman Environmental Master Mix	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l
20 μ M EA_rt1F/EA_rt2F	0.15 μ l	0.45 μ l	0.6 μ l	0.75 μ l	0.9 μ l	1.35 μ l
20 μ M EA_rt1R/EA_rt2R	0.15 μ l	0.45 μ l	0.6 μ l	0.75 μ l	0.9 μ l	1.35 μ l
10 μ M EA_rt1P/EA_rt2P	0.75 μ l	0.75 μ l	0.75 μ l	0.75 μ l	0.75 μ l	0.75 μ l
滅菌蒸留水	8.95 μ l	8.35 μ l	8.05 μ l	7.75 μ l	7.45 μ l	6.55 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
合計	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

表4. プローブの至適濃度の検討時の1 wellあたりの反応溶液組成

試薬	プローブ終濃度			
	0.05 μ M	0.1 μ M	0.15 μ M	0.25 μ M
Taqman Environmental Master Mix	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l
20 μ M EA_rt1F/EA_rt2F	0.45 μ l	0.45 μ l	0.45 μ l	0.45 μ l
20 μ M EA_rt1R/EA_rt2R	0.45 μ l	0.45 μ l	0.45 μ l	0.45 μ l
10 μ M EA_rt1P/EA_rt2P	0.15 μ l	0.3 μ l	0.45 μ l	0.75 μ l
滅菌蒸留水	8.95 μ l	8.8 μ l	8.65 μ l	8.35 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
合計	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

表5. 1 wellあたりの反応溶液組成

試薬	EA_rt1	EA_rt2
Taqman Environmental Master Mix	15 μ l	15 μ l
20 μ M EA_rt1F/EA_rt2F	0.45 μ l	0.45 μ l
20 μ M EA_rt1R/EA_rt2R	0.45 μ l	0.45 μ l
10 μ M EA_rt1P/EA_rt2P	0.3 μ l	0.45 μ l
滅菌蒸留水	8.95 μ l	8.05 μ l
DNA	5 μ l	5 μ l
合計	30 μ l	30 μ l

表6. 開発したリアルタイムPCRの特異性試験へ供試した菌種と結果

菌種	供試株数	リアルタイムPCR陽性株数	
		EA_rt1	EA_rt2
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	1	0	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0
<i>Campylobacter coli</i>	1	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	0
<i>Escherichia albertii</i>	42	42	42
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	1	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> seroverTyphimurium	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	4	1	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0

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）

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。同定された病原関連候補遺伝子のうち 12 遺伝子については、トリ由来株およびヒト臨床分離株について遺伝子破壊株の作製と培養細胞を用いた感染実験による機能解析を進めた。その結果、病原性に関わると考えられる遺伝子を複数同定した。また、ゲノム解析株 57 株について O 抗原合成系遺伝子群コード領域（O-AGC）の詳細な解析を行い、*E. albertii* に O 抗原型が少なくとも 40 種類（EA0g1-EA0g40）存在することを明らかにした。さらに、O-AGC に高度に保存されている *wzx* 遺伝子の配列多様性を利用して PCR による O 抗原型タイピングツール（EA0-genotyping PCR）を開発し、保有している *E. albertii* 株などでのタイピングを実施した。その結果、278 株中 229 株（82.4%）について O 抗原型を同定することが出来た。現在、病原性に関わることが明らかになった遺伝子について、宿主側の作用因子同定を含めた病原機構の詳細解明と O 抗原型未同定の 49 株について、新規 O 抗原型の解析を進めている。

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。令和元年度は、前年度に申請者が実施した *E. albertii* 57 株のゲノム情報を基に抽出した本菌特異的な病原関連候補遺伝子群について、当該遺伝子の破壊株の作製と培養細胞への感染実験による病原機構の機能解析を行う。また、誤同定される可能性が高い大腸菌との診断疫学マーカーとして利用できる可能性のあるゲノム特性として O 抗原に着目し、その合成遺伝子群の多様性検討と疫学診断ツールの開発を目指す。

B. 研究方法

(1) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

昨年度の本研究で同定した種特異的遺伝子のうち、病原性および代謝系への関与が考えられる遺伝子群について、遺伝子破壊株の作製を行った。遺伝子破壊には、当初、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用したが、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 取込効率が低かったため、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には全ゲノム配列決定株であるヒト臨床分離株 HIPH08472 株および EC06-170 株、トリ由来株である NIAH_Bird3 株の計 3 株を対象とし、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 増幅産物を組換え酵素を発現するプラスミドを形質転換した株に導入し、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。

(2) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析
項目(1)で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

1) 付着効率の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 2 時間でメタノール固定・ギムザ染色を行い、コロニー数をカウントした。

2) 細胞内生存能の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 24 時間した。その後、終濃度

200 μ g/ml の gentamicin で 15 分処理することにより細胞外に存在する菌を殺菌した。PBS で洗浄後、1% Triton X-100 in PBS で処理することにより培養細胞を壊して細胞内に存在する菌を放出させ、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に希釈液をまいて、37 $^{\circ}$ C で 16 時間培養、コロニー数(培養細胞内の生存菌数)をカウントした。

(3) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、O 抗原合成遺伝子領域(O-AGC)の前後に存在することが分かっている *wcaM* 遺伝子と *hisI* 遺伝子を検索し、O-AGC を同定した。IMC-GE (インシリコバイオロジー) ソフトウェアを用いて遺伝子アノテーションを行った。既知の *Escherichia/Shigella* 属及び近縁菌種の O 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、*Escherichia/Shigella* 属の O 血清群と類似した O-AGC を保有する株については、該当する *Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した(図 1)。

(4) EA0-genotyping PCR の開発 および実用性の検討

項目(3)で同定した *E. albertii* の各 O-AGC に共通して保存されている O-antigen flippase をコードする *wzx* 遺伝子について *E. albertii* 内 および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で見られる配列多様性を利用し、PCR による O 抗原遺伝子型タイピングツール (EA0-genotyping PCR) の開発を行った。また、そのプライマーセットの中に *E. albertii* を特異的に検出可能なプライマーペアを加えることで、*E. albertii* の同定も同時に行うことのできる検出系とした。構築した検出系の検討として、日本国内でトリおよびヒトから分離された *E. albertii* 92 株を用いて EA0-genotyping PCR を行い、さらにデータベース上に登録されている 186 株のゲノム情報に対してプライマー配列を用いた *in silico* EA0-genotyping を実施することにより、本ツールの検出感度を検討した。

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

既に解析に使用している 57 株に加え、Enterobase website v1.1.2. (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) に登録されている 186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E. albertii* 主要病原因子の保有状況を調べた。進化系統解析は Prokka でアノテーションした後、Roary によりコア遺伝子の抽出し、コア遺伝子全体で配列が同一の株を除いて Maximum-likelihood tree を作成することにより行った。主要病原因子の検索は、*eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子を、それぞれ EPEC や EHEC の主要病原因子である III 型分泌系をコードする locus of enterocyte effacement (LEE) 領域と第 2 の III 型分泌系をコードするとされる ETT2 領域のマーカージェンとして、加えて、これまでに *E. albertii* の病原因子として同定されている *stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*paa* 遺伝子についてゲノム配列に対する相同性解析を行い、保存性を確認した。

C. 研究結果

(1) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

昨年度、DNA 取り込み効率の悪か

ったヒト臨床由来株 CB9786 株を EC06-170 株と HIPH08472 株に変更し、加えて、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、遺伝子破壊株を効率良く取得できるようになった。それにより、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、NIAH_Bird 3 株を含む 3 株すべてで破壊株を作製することができた。現在、他の病原関連候補遺伝子および代謝系関連遺伝子についても破壊株の作製を進めている。

(2) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析
項目(1)で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株を用いて、培養細胞に対する感染実験の実施を試みた結果、付着および細胞内生存能に関連すると考えられる遺伝子を複数同定した(未公表データのため詳細略)。

(3) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が決定したゲノム解析株計 57 株について、O-AGC を同定、アノテーションを行った結果、*E. albertii* 株間の比較から、O-AGC

は 40 種類 (EA0g1-40) に分かれることが明らかとなった(図 2)。また、同定された O-AGC を *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と比較した結果、25 種類 (EA0g3, EA0g6, EA0g8, EA0g9-30) が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝子セットを保有していた。中でも、特に 7 種類 (EA0g9-15) は塩基レベルで 98%以上の相同性を示し、*E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の全ゲノムレベルでの塩基配列相同性が 90%程度であることから、これらの菌種間で O-AGC が頻繁に水平伝播していることが考えられた。また、*E. coli* や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似し、配列相同性の高い O-AGC を保有する *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことも明らかとなった(図 3)。

(4) EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目(3)で同定した 40 種類の O-AGC に保存される *wzx* 遺伝子の配列を抽出し、近縁菌種の *wzx* 遺伝子との系統解析を行った。その結果、O 抗原型間で *wzx* 遺伝子に塩基配列多様性があることが明らかとなった(図 4)。そこで、こ

の配列多様性を利用し、40種類 EAO型を識別できるプライマーセット(3セット)を構築した。また、その中には *E. coli* や *Shigella* の *wzx* 遺伝子との識別が出来ないものも存在したことから、3プライマーセットそれぞれに *E. albertii* 特異的遺伝子領域を検出可能なプライマーセットを1組ずつ加え、0抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした(図5, 6)。このシステムの有効性を検討するため、国内および海外分離株(計278株)について、実際のPCRおよびプライマー配列の相同性検索による *in silico* EAO-genotyping を実施した結果、229株(82.4%)のEAO型を同定することが出来た(図7)。

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

O-AGCの解析に用いた57株およびタイピングの検討に用いた EnteroBase 登録株186株のゲノム情報を基に、全ゲノム高精度系統解析と主要病原因子の分布の解析を行った。系統解析の結果、*E. albertii* は大きく2つのクレードに分かれること、分離地や分離源と系統関係には相関がないこと

も明らかとなった。主要病原因子の分布についての解析からは、*eae* 遺伝子(LEE領域)と *cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* 遺伝子がほとんどの株で保存されており、過去の分離株を用いた報告と一致していた。第2のIII型分泌系をコードするETT2領域についても、ほとんどの株でその領域が欠失している *E. coli* とは異なり、保存性が高いことも明らかとなった。また、過去の報告において、一部の株で保有が示されている *stx2* 遺伝子が異なる系統に属する *E. albertii* 株において検出されること、その保有と *cdtB*-I サブタイプとの分布に相関が見られることも明らかとなった(図8)。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

昨年度は、*E. albertii* のDNA取り込み効率や組換え効率の低さから、遺伝子破壊株の作製が進まなかったが、形質転換したPCR産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、効率の良い遺伝子破壊株の作製法を確立することが出来た。また、培

養細胞に対する野生株と遺伝子破壊株の感染実験により、病原性に関連すると思われる遺伝子を複数同定することが出来た。今後、そのメカニズムの詳細を明らかにするため、当該タンパク質の抗体を作製し、機能阻害実験やタンパク質局在についての解析を進める。また、これらのタンパク質が作用する宿主側因子についても同定を進める必要がある。

また、*E. albertii*の0抗原型の多様性が明らかとなり、診断疫学マーカー候補遺伝子として *wzx* 遺伝子を用いたマルチプレックス PCR 反応系による疫学ツールを構築することが出来た。しかしながら、EA0-genotyping PCR により0抗原型が同定出来ない株が約20%程度存在したことから、次年度以降、これらの株についてゲノム情報を取得し、*E. albertii*の0抗原の全容を明らかにする予定である。

E. 結論

*E. albertii*の特性を解明するにあたり、昨年度、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、今年度は、手法を改良することで、効率の高い遺伝子破壊

法を確立することが出来た。また、遺伝子破壊株と野生株の表現型の比較から、病原機構に関わる遺伝子を複数同定することに成功した。診断疫学ツールの開発に関しては、*E. albertii*の0抗原型の多様性と種特異的検出系を組み合わせることにより、本菌を効果的に検出し、かつ、0抗原型も同定可能な疫学ツールを開発することが出来た。最終年度となる次年度では、病原機構に関わることが明らかとなった遺伝子群について、宿主側の作用因子の同定など詳細な解析を進め、*E. albertii*の病原機構の全容解明を行うとともに、未同定の0抗原型を保有する株について、ゲノム解析を進め、*E. albertii*のEA0型の全容を明らかにする。

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

- ・ T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T.

Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. **Microb. Genom**, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.

2. 学会発表

- ・大岡唯祐, 勢戸和子, 小椋義俊, 井口純, 中村佳司, 後藤恭宏, 藺牟田直子, 本田己喜子, 池田徹也, 杉谷和加奈, 今野貴之, 河野喜美子, 工藤由起子, 村上光一, 林哲也, 西順一郎: 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発. 第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (一般演題), 松山, 2019.
- ・大岡唯祐: ゲノムから見えてきた新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特性とその応用. 第 93 回日本細菌学会総会 (ワークショップ), 名古屋, 2020.

H. 知的財産権の出願・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

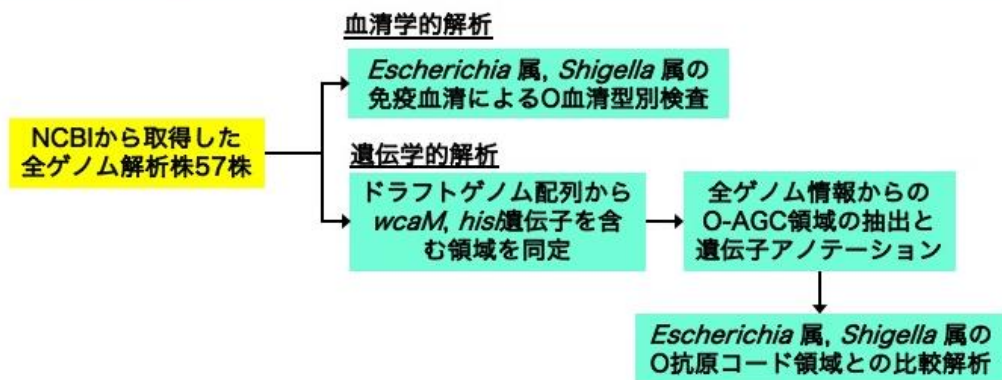
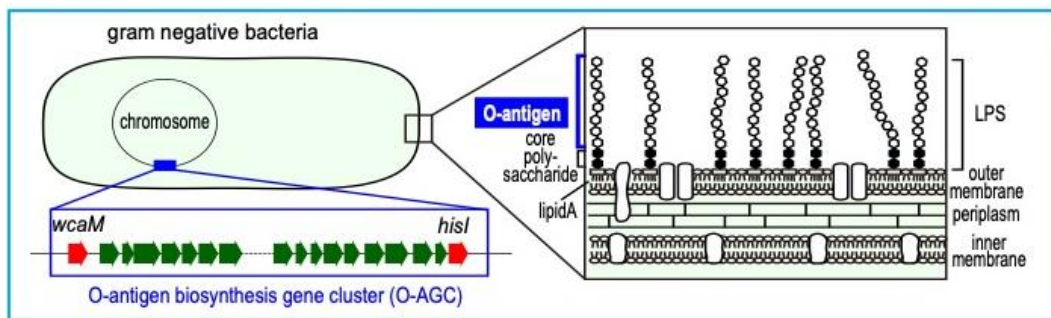


図1 O 抗原コード領域解析のフローチャート

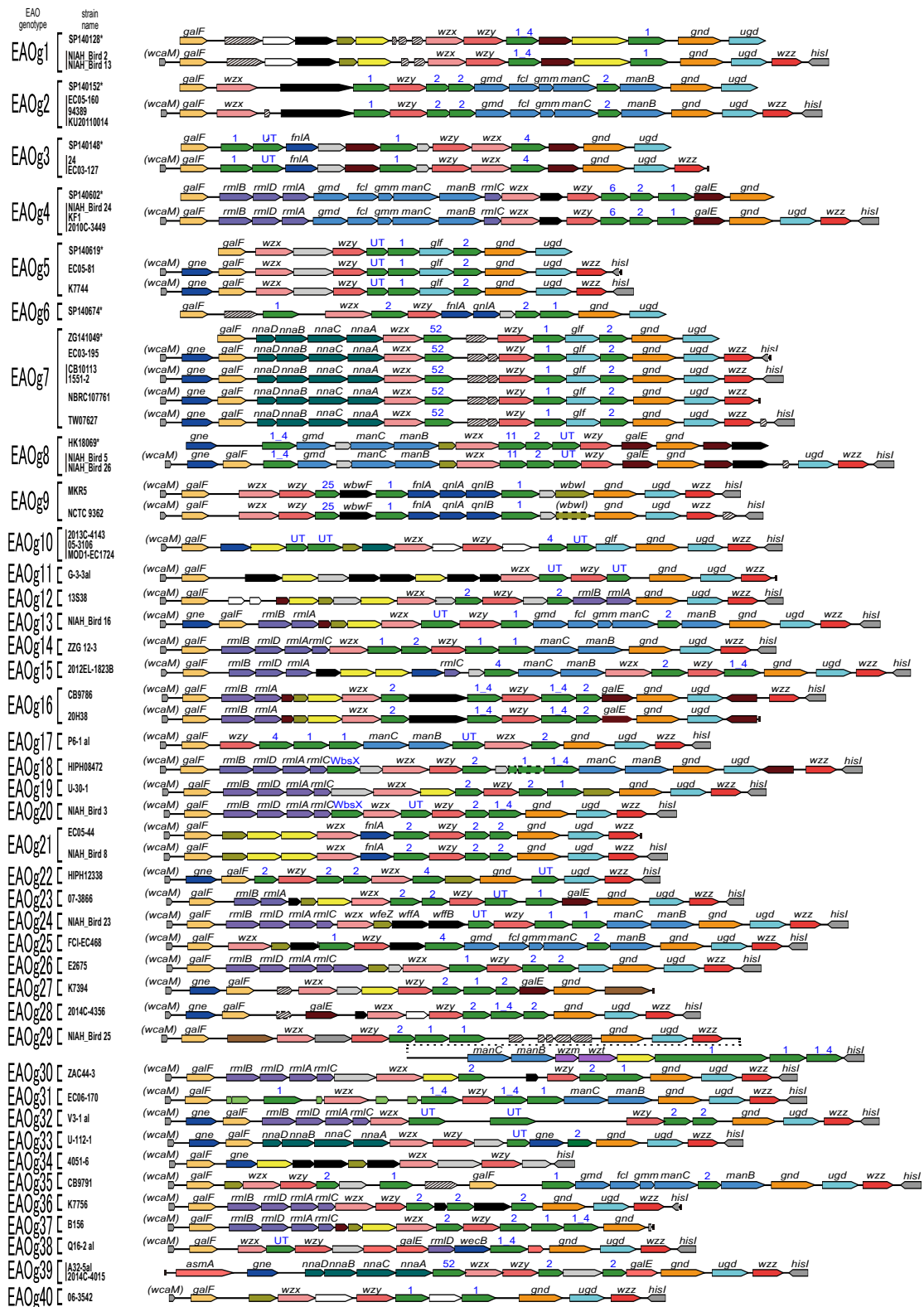


図2 全ゲノム配列解析 57 株の解析から同定された *E. albertii* の O 抗原型 (EAOg1-40) (Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 1 を改変)

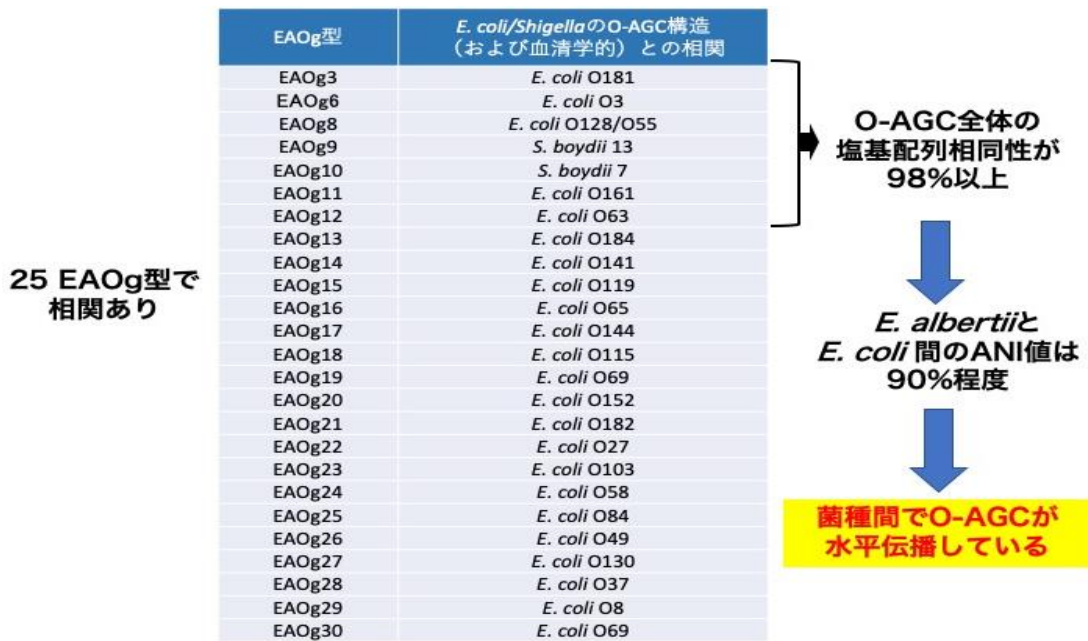


図3 *E. albertii*のO抗原型(EAOG)と*Escherichia/Shigella*属のO抗原型との比較

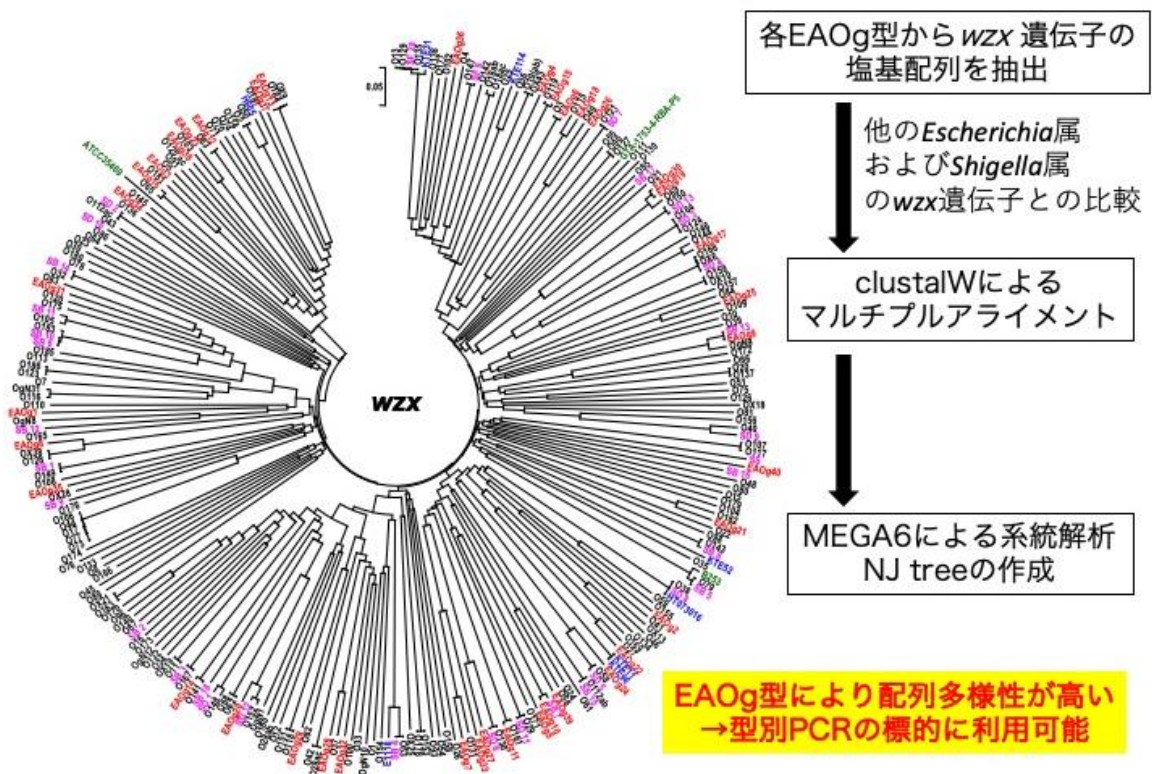


図4 *E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の *wzx* 遺伝子の系統解析

(Ooka T. , et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 3 を改変)

EAQ type	Set and forward primer name	Sequence (5'-3')	Set and reverse primer name	Sequence (5'-3')	Expected amplicon size (bp)	Reference strain	
1st set	1st set forward		1st set reverse				
	EAQg16	1_wzx_F_EAQg16	CTATTCTACTTTTATTGGTCGG	1_wzx_R_EAQg16	ATCACATCTCCCACTAGTTCG	949	CB9786
		E_al_1_OF	GGTCCATAMTGAATCTGACTGA	E_al_1_OF	CCATATGACAGGGCTAATTGAT	946	common
	EAQg29	1_wzx_F_EAQg29	GCTTATCATTACTTCAGTTACGG	1_wzx_R_EAQg29	TTAACAAATCAGCACCATAAGCA	777	NIJH_Bird_25
	EAQg26	1_wzx_F_EAQg26	AGTAGCATATCGAACGCCACG	1_wzx_R_EAQg26	ACCTTCTCTGCGATACAAGACC	761	E2675
	EAQg27	1_wzx_F_EAQg27	ATAGCATGGAGCTTTACAAACA	1_wzx_R_EAQg27	GGCACAAATGCGATGACACC	620	K7394
	EAQg20	1_wzx_F_EAQg20	ACTAGTATTGATGAAGAAATGCC	1_wzx_R_EAQg20	GTGACGACGAGATAAATACC	557	NIJH_Bird_3
	EAQg2	1_wzx_F_EAQg2	GCATTTATTCCSTTGCATTAG	1_wzx_R_EAQg2	CTTTCCTTTTATTAGTATACGTG	492	EC05-190
	EAQg18	1_wzx_F_EAQg18	CATTCTTAATATTGCTGATAAG	1_wzx_R_EAQg18	ACACTCAATATTGCCATGTAT	434	HIPH08472
	EAQg23	1_wzx_F_EAQg23	TACTCTGCGAGAACCAAGATA	1_wzx_R_EAQg23	ATGATAGTAATAGCCAAAGCC	389	07-3869*
2nd set	2nd set forward		2nd set reverse				
	EAQg21	2_wzx_F_EAQg21	ATAATTTTCTTTCATCGTCCCTC	2_wzx_R_EAQg21	ACCATATCGAATATACACACATTA	953	EC05-44
	EAQg34	2_wzx_F2_EAQg34	ACCTGATGAAGACATGGGAATG	2_wzx_R2_EAQg34	GGTGAATAATACACTGTTGATACTC	901	4051-6
	EAQg4	2_wzx_F_EAQg4	ACTCGTATAGCAATATTGAACTG	2_wzx_R_EAQg4	TAGGAGGCTCAGTTACTCCAG	840	NIJH_Bird_24
	EAQg5	2_wzx_F_EAQg5	TCCTGAGAGATATGTCAGTTG	2_wzx_R_EAQg5	GATGGGATTAAAGGATATGACAG	774	EC05-81
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTTCACTGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCGAAATGGCA	731	common
	EAQg35	2_wzx_F_EAQg35	GCATGGTTGATACAATGGSAG	2_wzx_R_EAQg35	ATGACTCTCCAAAGGATTTCG	656	CB9791
	EAQg8	2_wzx_F_EAQg8	GCTCTGCAGATTCTCATAAGC	2_wzx_R_EAQg8	AGATTTAGAAATTGATTCCTGCT	579	NIJH_Bird_5
	EAQg37	2_wzx_F_EAQg37	ATGAGAAAACGTTAAACGGTTAC	2_wzx_R_EAQg37	TGCTAATCATGATTAAGTAGCG	502	B16*
	EAQg24	2_wzx_F_EAQg24	GTCTCTCATTAACFAAGAAAC	2_wzx_R_EAQg24	TGATAGAGTAATGTTTCTCT	458	NIJH_Bird_23
3rd set	3rd set forward		3rd set reverse				
	EAQg32	3_wzx_F_EAQg32	TGATTGCTATGCAATATGCTCC	3_wzx_R_EAQg32	TACCTATTGATGCAAAAGCTGG	915	V3-1al
	EAQg11	3_wzx_F_EAQg11	GACATTGTCAATAAAGCAATCC	3_wzx_R_EAQg11	TGTTATGCASATATTCACCAC	851	G-3-3al
	EAQg39	3_wzx_F_EAQg39	GTCTCGATGGTTGGTGTCTTC	3_wzx_R_EAQg39	AGATCTTGATATATATTGTCCGAC	782	A32-5al
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTTCACTGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCGAAATGGCA	731	common
	EAQg6	3_wzx_F_EAQg6	GTGCTGATCATGTTAATTTGCTG	3_wzx_R_EAQg6	AGCAATGATATATTCCTCTGTTG	676	SP140674*
	EAQg17	3_wzx_F_EAQg17	TTTAGCAACAGCAGGCCATCG	3_wzx_R_EAQg17	TGGAAATATTCAGATCTGAAG	630	FB-1 al
	EAQg19	3_wzx_F_EAQg19	ATGCTTACAGGCCAAGCATTCG	3_wzx_R_EAQg19	GAATTTTCATTGATTAGATCTGC	585	U-30-1
	EAQg38	3_wzx_F_EAQg38	TCACATAGATGGTCTTTGATTG	3_wzx_R_EAQg38	CATAATGAATCACTTACACGAG	496	Q16-2 al
	EAQg22	3_wzx_F_EAQg22	TTCTTACATCATATTACTCGAG	3_wzx_R_EAQg22	TGCAACTTGAAATATGCTTCT	439	HIPH1238
EAQg33	3_wzx_F_EAQg33	TGCGTAGAGGTGTCTGCTG	3_wzx_R_EAQg33	ACTGCTACATGTAAATGCCAC	405	U-112-1	
EAQg9	3_wzx_F_EAQg9	AGCTACTGACTCCTGAAGAG	3_wzx_R_EAQg9	CATTTAATGCAACTCATATGATG	355	NK95	
EAQg14	3_wzx_F_EAQg14	TGTAGGGCTATTGTAATACG	3_wzx_R_EAQg14	TGCAACGTGGAGATAACTACTG	307	Z2C 12-3	
EAQg30	3_wzx_F_EAQg30	AGGTACGCAATACGTGCAGC	3_wzx_R_EAQg30	TGTAATATGATTAATACTCTCC	288	ZAC44-3	
EAQg12	3_wzx_F_EAQg12	CGATGGCTGTATTCTGCAG	3_wzx_R_EAQg12	AGGCTGTGCTGTATTACAGC	209	13538	
EAQg25	3_wzx_F_EAQg25	ACGACGGCTTTACTGTATTGC	3_wzx_R_EAQg25	TGCACAACCTGAAATAACACATCAAC	188	FCI-EC468	

図5 EAO-genotyping PCRのプライマー情報(3プライマーセット)
 E_al_1_OF/OR および E_al_1_NF/NR : *E. albertii* 検出プライマー2セット

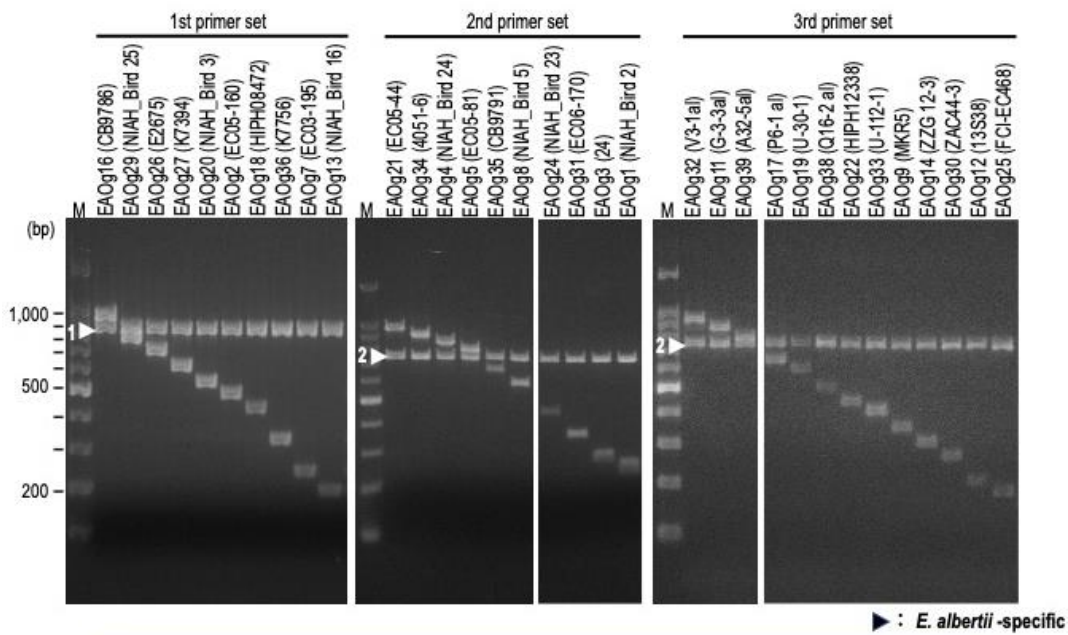


図6 EAO-genotyping PCRによる各EAOg型参照株のPCR・泳動結果
(Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 4 を改変)
△1, △2 : *E. albertii*検出プライマーによるバンド

EAOGタイプ	<i>E.coli/Shigella</i> との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]	EAOGタイプ	<i>E.coli/Shigella</i> との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]
EAOG1	-	4	13	EAOG22	O27	1	0
EAOG2	-	1	4	EAOG23	O103	2	0
EAOG3	O181	5	5	EAOG24	O58	2	0
EAOG4	-	1	37	EAOG25	O84	1	0
EAOG5	-	6	4	EAOG26	O49	2	1
EAOG6	-	0	3	EAOG27	O130	1	5
EAOG7	-	6	7	EAOG28	O37	0	0
EAOG8	O128/O55	1	5	EAOG29	O8	4	3
EAOG9	SB13	0	26	EAOG30	O69	17	2
EAOG10	SB7	0	11	EAOG31	-	0	0
EAOG11	O161	1	0	EAOG32	-	0	2
EAOG12	O63	3	3	EAOG33	-	1	0
EAOG13	O184	1	1	EAOG34	-	1	0
EAOG14	O141	0	0	EAOG35	-	4	2
EAOG15	O119	0	3	EAOG36	-	1	0
EAOG16	O65	2	1	EAOG37	-	0	0
EAOG17	O144	0	0	EAOG38	-	1	2
EAOG18	O115	2	7	EAOG39	-	0	4
EAOG19	O69	1	0	EAOG40	-	2	1
EAOG20	O152	1	0	未同定	-	16 (17.4%)	33 (17.7%)
EAOG21	O182	1	1	計		92	186

図7 EAO-genotyping PCR系を用いた278株のEAO型の同定結果



図8 225株の *E. albertii* 全ゲノム高精度進化系統樹および主要病原因子の分布

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

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

本研究の目的はアルコバクター属菌による食中毒発生の可能性を検討することである。本年度はアルコバクター属菌の汚染実態調査およびカンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離を行った。アルコバクター属菌の汚染傾向を詳細に検討するために合わせてカンロバクター属菌の汚染状況も調査した。鶏肉、豚肉、牛肉それぞれ 20 検体からアルコバクター属菌の検出を行ったところ、鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90% の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が 10^2 MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。しかし、*A. butzleri* と *A. cryaerophilus* の汚染傾向が異なることから、感染源が異なる可能性が示唆された。また、カンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離を行ったところ 1 事例で *A. skirrowii* が検出された。本事例は国内の下痢症患者便からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。

研究協力者

岩手県環境保健研究センター

山中拓哉、太田美香子、高橋幸子、
佐藤德行

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

高橋直人

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	柿田徹也

A. 研究目的

アルコバクター属菌 (*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。以前はカンピロバクター属菌に属していたが、その後、再分類され、現在ではアルコバクター属として独立している。アルコバクター属菌は食肉、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。アルコバクター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。これまでの報告では 2008 年に米国ウィスコンシン州での結婚式の際に参加した 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。しかし、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。残念ながら事例発生から日数が経過していたためか、菌分離は行ええず、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 名の学生が発症するという事例が発生している。この事例の患者便からはカンピロバクター様の菌が分離された。最終的にこの菌は *A. butzleri* と同定された。この事例でも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。また別の調査では、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%) からアルコバクター属菌が分離されたという報告がある。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% からそれぞれアルコバクター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アルコバクター属菌が分離されている。

アルコバクター属菌の病原性に

関しては *A. butzleri* が詳しく調べられている。それらによると *A. butzleri* は Cytolethal distending toxin、Cytotoxic enterotoxin、Cytotoxic enterotoxin などの *C. jejuni* 様の毒素を産生することが明らかになっている。また、*ciaB*、*cadF*、*cj1349*、*hecA*、*hecB* などの細胞侵入因子、接着因子を発現しており、これらを利用して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。これらのことから *A. butzleri* も *C. jejuni* と同様に病原性を示すのではないかと考えられている。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。

このようにアルコバクター属菌と食中毒発症との間に関連性が示唆されているが、アルコバクター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アルコバクター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、アルコバクター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、アルコバクター属菌がカンピロバクター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 1)。カンピロバクター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、他の生化学性状もカンピロバクター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。形態学的にもカンピロバクター属菌と同じグラム陰性のラセン桿菌である。また、アルコバクター属菌は灰白色～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。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。これらの特徴はカンピロバクター属菌と類似しており、集落の色調、形態でも区別することが難しい (図 1、2)。さらにアルコバクター属菌はカンピロバクター属菌を分離するとき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アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤同定され、カンピロバクターの事例として処理されている可能性が示唆されている。これまでの調査ではカンピロバクター属菌による事例の分離株 2855 株を再調査したとこ

る、1%が *A. butzleri* がカンピロバクター属菌として誤同定されたものであったとの報告がある。また、アルコバクター属菌にも病原性があり、カンピロバクター属菌が単独ではなくアルコバクター属菌とともに発症に関与していたとしても、前述のとおりアルコバクター属菌に対する検査は通常行われていないため、表面上はカンピロバクター属菌単独の事例となってしまう可能性が示唆されている。例えば南アフリカの調査では患者便 322 検体のうち 35 検体からアルコバクター属菌を検出したが、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、アルコバクター属菌の食中毒への関与は明らかになっていない。

本研究ではアルコバクター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、カンピロバクター食中毒発生時に患者便からアルコバクター属菌の検出を試みる、3) アルコバクター属菌の制御法の検討、以上の三点について研究を行う。本年度は食肉における汚染

実態調査とカンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出を行った。

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

アルコバクター基本培地、CATサプリメントは Oxoid 社より購入した。5-フルオロウラシルは(株)ナカライテスクより購入した。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。寒天培地は、121℃、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℃まで冷却した後、無菌的に添加した。

[3] 検体

鶏肉、豚肉、牛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] 最確数法 (アルコバクター属

菌)

最確数法によるアルコバクター属菌の計数は昨年度確立した方法で行った。増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地を用い、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った。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 倍乳剤を作製した。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 ml、100 倍乳剤 1 ml および 0.1 ml に増菌培地を加えて最終 10 ml にした。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、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、アルカリ熱抽出法でテンプレートを作製した。作成したテンプレートを用いてマルチプレックス PCR を行い、アルコバクター属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* それぞれの最確数を算出した。さらに、マルチプレックス PCR で陽性になった試験管の培養液を CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地に塗抹し、

30℃、48 時間、培養した。単離した集落から DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行った。PCR が陽性的の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11000 MPN/100 g である。

[5]最確数法(カンピロバクター属菌)

最確数法によるカンピロバクター属菌の計数は以下の手順で行った(図 3)。増菌培地として 5% 馬血液を加えたプレストン培地(以下 増菌培地)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った。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 倍乳剤を作製した。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 ml、100 倍乳剤 1 ml および 0.1 ml に増菌培地を加えて最終 10 ml にした。各濃度につき試験管 3 本ずつ用意した。37℃、48 時間、微好気培養後、各試験官から培養液 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た。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、

カンピロバクター属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* それぞれの最確数を算出した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11000 MPN/100 g である。

[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 は昨年確立した方法を用いた (図 4)。*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* を同時に検出できるマルチプレックス PCR は Asakura et al. の PCR プライマーを参考にし構築した (FEMS Immunol. Med. Micro Biol., 260-266, 2008)。PCR 条件を図 5 に示す。このマルチプレックス PCR 法の検出限界は増菌培養液 1ml あたり 10^2 cfu であった (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°C、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。

[7] カンピロバクター食中毒患者

便からのアルコバクター属菌の分離

カンピロバクター食中毒もしくはカンピロバクターが原因菌として疑われる事例が発生した場合、研究協力機関において患者便からアルコバクター属菌の分離を行っていただいた。分離手順は以下のとおりである (図 7)。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°C、48 時間、好気培養を行った。培養後、カンピロバクター様コロニーを 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 を行った。陽性の菌株は国立医薬品食品衛生研究所において性状を解析した。

研究協力機関の東京都健康安全研究センターではさらに糞便から直接 DNA を抽出しアルコバクター属菌を検出していただくとともにフィルター法による菌分離を行っていただいた。糞便からの DNA 抽出は以下の手順で行った (図 9)。糞便 200 μ l をサンプリングし滅菌生食 800 μ l 加え懸濁した後、12,000rpm 10 分間遠心分離、上清を取り除いた。沈査に滅菌生食 1ml 加え懸濁後、再度遠心分離し上清を除いた。25mM NaOH を 50 μ l 加

え 100°C 10 分間加熱後、1/25mM Tris-HCl を 50 μ l 加え中和した。遠心上清をテンプレートとして用い、マルチプレックス PCR でアルコバクター属菌を検出した。フィルター法によって糞便からアルコバクター属菌を分離する場合は以下の手順で行った。まず、平板にフィルター (0.45 μ m、0.22 μ m、0.65 μ m) をのせ、糞便 50 μ l を滴下した。さらに 50 μ l の滅菌生理食塩水をフィルターにのせ 30 分間~1 時間、室温に放置した。その後フィルターを取り除き培養を行った。

C. 研究結果

[1] 食肉における汚染実態調査概要

今回の汚染実態調査では鶏肉、豚肉、牛肉を対象にそれぞれ 20 検体ずつ調査を行った。検体の内訳を表 3~表 5 に示す。鶏肉はもも肉 10、胸肉 7、手羽先 1、ささみ 1、不明 1 ですべて国産であった。冷凍処理の有無は不明であった。豚肉はもも肉 3、ロース肉 11、不明 6 で、産地は国産 13、海外産は 7 であった。冷凍処理の有無は不明であった。牛肉検体はもも肉 4、肩ロース 3、サーロイン 1、不明 12 であった。産地は国産が 11、海

外産が 9 で、冷凍処理の有無は不明であった。

鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出された(表 2、3)。*A. cryaerophilus* は 12 検体 (60%) から検出された (表 2、3)。*C. jejuni* は 20 検体中 11 検体から検出された (55%) が、*A. skirrowii*、*C. coli*、*C. fetus* は検出されなかった (表 2、3)。100 g あたりの MPN が 10^2 以上の検体は、*A. butzleri* が 18 検体 (90%)、*A. cryaerophilus* が 3 検体 (15%)、*C. jejuni* が 6 検体 (30%) であった (表 3、6)。

豚肉では *A. butzleri* は 20 検体中 11 検体から検出された (55%) (表 2、4)。*A. cryaerophilus* は 12 検体 (60%) から検出された (表 2、4)。*A. skirrowii* およびカンピロバクター属菌は検出されなかった (表 2、4)。100g あたりの MPN が 10^2 以上の検体は、*A. butzleri* は 0 検体、*A. cryaerophilus* が 3 検体 (15%) であった (表 4)。

牛肉では 2 検体から *A. cryaerophilus* が検出されたが、他の菌は検出されなかった(表 2、5)。

以上のように鶏肉においては *A. butzleri* の菌数が非常に多い傾向が見られた (表 3、6)。鶏肉にお

ける *A. cryaerophilus* と *C. jejuni* はほぼ同じような菌数の分布となった (表 3、6)。豚肉においては *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* では大きな差は見られなかったが、*A. cryaerophilus* の方に菌数の高い検体が 8 検体存在していた (表 4)。部位や産地によって菌の分布に差は見られなかった (表 3、4、5)。

[2] 鶏肉における汚染状況

鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の最確数を比較したところ (図 9)、*C. jejuni* が検出限界未満であるにもかかわらず *A. butzreli* の菌数が 10^3 MPN/100 g を超えている検体が 6 検体あった。しかしそれ以外の検体に関しては *A. butzreli* も *C. jejuni* も高い菌数を示しており、*A. butzreli* の菌数が上昇するにつれて *C. jejuni* の菌数も増加する傾向が認められた。(図 9)。*A. butzreli*、*C. jejuni* とともに最も菌数の多い検体では検出上限値 11000 MPN/100g を超えていた。*A. butzreli* が検出限界未満で、*C. jejuni* だけが検出された検体はなかった。

A. cryaerophilus と *C. jejuni* の菌数の比較を行った (図 10)。*A. cryaerophilus*、*C. jejuni* と

ともに検出された検体は 8 検体あった。5 検体で *A. cryaerophilus*、*C. jejuni* とともに検出されなかった。*A. cryaerophilus* だけが検出され *C. jejuni* が検出されなかったのは 4 検体あった。また、*C. jejuni* だけ検出され *A. cryaerophilus* が検出されなかったのは 3 検体あった。*A. cryaerophilus* で最も菌数が多かった検体は 360 MPN/100g であった。*C. jejuni* で菌数が最も多かった検体では検出上限値 11000 MPN/100g を超えていた。*A. cryaerophilus* が検出された検体では菌数は 10^2 MPN/100g 前後に集中しており、*C. jejuni* の菌数とは相関が見られなかった。

A. butzreli と *A. cryaerophilus* の菌数を比較した (図 11)。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* がともに検出された検体は 12 検体存在した。*A. butzreli* だけが検出され *A. cryaerophilus* が検出されなかった検体は 8 検体あった。一方で、*A. cryaerophilus* だけが検出され *A. butzreli* が検出されなかった検体、また *A. butzreli*、*A. cryaerophilus* とともに検出されなかった検体はなかった。*A. butzreli* の菌数で最も高かったの

は検出上限値の 11000 MPN/100g を超えていた。*A. cryaerophilus* で菌数が最も高かったのは 360 MPN/100g であった。*A. cryaerophilus* が検出された検体では菌数が 30-360 MPN/100g に集中しており、*A. butzreli* の菌数との相関は見られなかった。

以上の結果から、*A. butzreli* と *C. jejuni* は菌数に共通の傾向がみられたが、*A. butzreli* と *A. cryaerophilus*、*A. cryaerophilus* と *C. jejuni* との間には相関は認められなかった。

[3] 豚肉における汚染状況

豚肉からはカンピロバクター属菌は検出されなかった。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* の菌数を比較したところ、*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* がともに検出された検体は 3 検体存在した (図 12)。*A. butzreli* だけ検出され、*A. cryaerophilus* が検出限界値未満の検体は 7 検体存在した。一方、*A. cryaerophilus* が検出されたのにもかかわらず *A. butzreli* が検出限界値未満の検体は 8 検体存在した。以上のように豚肉では 15 検体で *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* いずれかの単独汚染であった。*A. butzreli* で最も菌数が高かった検体は 93

MPN/100g で、*A. cryaerophilus* で最も菌数が高かった検体は 11000 MPN/100g を超えていた。豚肉における *A. butzreli* の菌数は鶏肉のそれよりかなり低かった。*A. cryaerophilus* の菌数は 11000 MPN/100g を超えている 1 検体を除くと 30~426 MPN/100g の範囲で鶏における菌数と大きな差は見られなかった。産地や部位の違いによる菌数の分布に差は見られなかった。

[3] 牛肉における汚染状況

牛肉では *A. butzreli*、*A. skirrowii*、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* は検出されなかった。*A. cryaerophilus* も 2 検体でのみ検出され、その菌数は 92、4600 MPN/100g であった (表 5)。

[4] カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出

カンピロバクター食中毒 (疑いも含む) 発生時に研究協力機関にて便からコロニーを分離していただき、マルチプレックス PCR でアルコバクター属菌の検出を行なった。今回は 2018 年から 2019 年の間に発生した 129 事例に関して検出を行なった。その結果、患者便からアルコバクター属菌は検出できなかった。アルコバクター属菌

の集落は特徴が無いいため、判別が難しかったのと、今回使用した選択剤の選択性が低いため多くの菌が発育しことが原因として考えられた。しかし、2019年5月から8月にかけて搬入された75検体に関して、東京都健康安全研究センターで便からDNAを直接抽出しPCRによって検出を行なったところ1検体から*A. skirrowii*が検出された。そこでフィルター法を用いて*A. skirrowii*の分離を行なったが、便から菌は分離できなかった。*A. skirrowii*が検出された事例は6名で鶏料理を喫食後、6名が発症した事例で、*A. skirrowii*が検出された患者からは他に*C. jejuni*、腸管出血性大腸菌0157が検出されており、また、同じグループの人からサルモネラ04群が検出され、原因食品不明の有症事例となっている。しかし、本事例は下痢症患者からアルコバクター属菌が分離された国内では大変貴重な事例である。

D. 考察

[1]食肉における汚染実態調査

これまでに食肉でアルコバクター属菌の汚染実態は調査されてきたが、具体的な菌数を調査したものは少ない。そこで国内での食肉

の汚染状況を最確数法を用いて調査した。今回はアルコバクター汚染の特徴を把握するためにカンピロバクターの汚染状況も併せて調査を行い比較した。今回調査の対象としたのは鶏肉、豚肉、牛肉である。鶏肉はこれまでの多くの研究でアルコバクター属菌が分離されており、アルコバクター属菌の保菌動物の一つではないかと考えられている。鶏肉の調査の結果、これまでの報告と同様にアルコバクター属菌が検出された。特に*A. butzreli*はすべての検体から検出された。今回の調査では*C. jejuni*より検出率が高かった。菌数も大変高く、*C. jejuni*よりも高かった。このように*A. butzreli*は鶏肉において汚染率、菌数ともに*C. jejuni*より高かった。現在の食中毒の発生状況、これまでに報告されている菌の検出状況を考えあわせると、カンピロバクター食中毒に関与していたとしても*C. jejuni*より病原性が弱い可能性が示唆された。

*A. cryaerophilus*も60%の検体から検出されており、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染の広がりを見ることができた。しかし、菌数は*A. butzreli*に比べると低く、*C. jejuni*と近い値となった。一

方、これまでに鶏肉からしばしば分離されてきた *A. skirrowii* は今回検出できなかった。*A. skirrowii* もアルコバクター属菌による食中毒や胃腸炎などの健康被害に関与していると考えられている。今回は 20 検体しか調査を行っていないため、今後さらに調査を進め *A. skirrowii* の汚染率をあきらかにしていきたい。

豚肉における汚染状況を見てみるとこれまでの報告にあったようにアルコバクター属菌の汚染が確認された。*A. butzreli*、*A. cryaerophilus* の汚染率は 50% を超えており、豚肉においてもアルコバクター属菌の汚染率が高いことが明らかになった。*A. butzreli* は鶏肉においては汚染率は 100% で、且つとても高い菌数で汚染していたが、豚肉における汚染率は 50% で菌数も低く *A. cryaerophilus* に近い値となっていた。一方、牛肉におけるアルコバクター属菌の汚染は低く、*A. cryaerophilus* が 2 検体で陽性となっただけである。これらの結果から、アルコバクター属菌の汚染状況は鶏肉、豚肉、牛肉の順で深刻で、食中毒対策を考える上で特に鶏肉と豚肉に対して注目する必要があると思われた。また、鶏肉

における *A. butzreli* の菌数は *C. jejuni* のそれを超えていたことから、*A. butzreli* の鶏の腸管および鶏肉に汚染後の増殖性、生存性が *C. jejuni* よりも強い可能性がある。今後さらに検討が必要であると思われる。

今回調査した菌種間で菌数の比較を行った。鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の菌数を比較すると、*C. jejuni* が検出限界値以下であるのにも関わらず、*A. butzreli* の菌数が 10^3 MPN/100g 以上の高い値を示した検体が 6 検体認められた。しかし、それ以外の検体に関しては *A. butzreli*、*C. jejuni* ともに高い菌数を示しており、*A. butzreli* の菌数が上昇するにつれて *C. jejuni* の菌数も増加する傾向が認められた。カンピロバクター属菌は鶏の腸管に生息しており、食鳥処理時に鶏肉を汚染すると考えられている。*A. butzreli* も鶏の糞便から分離される報告があることから、おそらく鶏の腸管に生息していると思われる。今回の結果から *C. jejuni* の菌数と *A. butzreli* の菌数には同様の傾向が認められることから、*A. butzreli* も鶏の腸管に生息しており、*C. jejuni* 同様、鶏の解体時に処理場内で汚染が発生して

いるのではないかと考えられた。しかし、*A. butzreli* に対して *A. cryaerophilus* は *A. butzreli* と *C. jejuni* とともに菌数の傾向が一致しない。*A. butzreli* や *C. jejuni* の菌数にかかわらず 10～430 MPN/100g の範囲に *A. cryaerophilus* の菌数が集中している。今回のデータだけで確定的なことは言えないが、鶏肉における *A. cryaerophilus* の汚染は *A. butzreli* や *C. jejuni* と異なる汚染源、例えば環境や別の保菌動物からの二次汚染の可能性も考えられた。一方、豚肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の菌数を比較したところ、両方が検出されたのが 3 検体、両方とも検出されなかったのが 2 検体であった。残りの 15 検体は *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* のいずれかしか検出されなかった。このような現象が見られた原因として 1) *A. butzreli* もしくは *A. cryaerophilus* のいずれかしか保菌していない豚が多い、2) *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の両方、もしくはいずれかが豚以外に汚染源を持っている可能性が考えられた。鶏肉における汚染状況からも示唆されるように *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* は

汚染源が異なる可能性がある。アルコバクター属菌はこれまでの報告で食肉だけでなく環境や水などから広く検出されている。このような環境からの汚染に関しても今後検討していく必要があると思われる。

今回は PCR による検出だけでなく、PCR で陽性になった試験管から菌液を取り選択培地に塗抹し菌分離を試みたが、分離できい検体が多くあった。培地に添加した CAT supplement はアルコバクター属菌の分離に用いられているが、今回の鶏肉からの分離では他の菌の発育が見られた。また、アルコバクター属菌の集落は特徴が少ないため判別が難しかったのも原因の一つとして考えられた。今後は選択培地の改良を行なっていく必要があると思われる。

[2] カンピロバクター食中毒患者便からアルコバクター属菌の分離

アルコバクター属菌とカンピロバクター属菌は性状が非常に似ているため、アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤判定された事例が海外で報告されている。また、カンピロバクター属菌に対する検査はルーチンの検査項目に入っているが、アルコバク

ター属菌に対する検査は通常行われないため、アルコバクター属菌が食中毒に関与していたとしても、カンピロバクター食中毒として処理されてしまっている可能性が報告されている。そこで本研究では日本国内におけるこれらの可能性を検討するために研究協力機関である地方衛生研究所で、カンピロバクター食中毒発生時に患者便からアルコバクター属菌の分離を行なっていただいた。その結果、患者便からアルコバクター属菌は分離できなかった。原因として CAT supplement の選択性が弱く他の菌が発育してしまうため分離が困難になることが挙げられた。一方で、海外の研究では糞便からのアルコバクター属菌の検出はしばしば PCR によって行われている。PCR による検出は菌の状態に関わらず検出を行えるため、生菌の分離よりも検出感度が上昇する可能性がある。そこで、2019 年 5 月から 8 月の間に搬入された 75 の患者便から直接 DNA を抽出し、PCR でアルコバクター属菌の検出を東京都健康安全研究センターで行なったところ、1 事例から *A. skirrowii* が検出された。この事例では *A. skirrowii* 以外に *C. jejuni* やサルモネラ、腸管出血性大腸菌 0157

が検出されているため、*A. skirrowii* が原因菌であるかどうかは判定できず、最終的に有症事例扱いとなっている。しかしながら、本事例は日本国内で下痢症患者からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。ベルギーの報告では胃腸炎患者の 1% からアルコバクター属菌が分離されている。今回の検出率はそれに近いものである。もちろん我が国におけるアルコバクター属菌の食中毒への関与を結論づけるためには今回の検体数、検出頻度は不足していると思われる。さらに選択性の高いアルコバクター属菌の選択培地を検討するとともに、PCR による検出も併せて行う必要があると思われる。今後、さらに例数を増やし、アルコバクター属菌の食中毒への関与を検討していく必要があると思われた。また、今回はカンピロバクター食中毒に限定し、調査を行なったが、海外の報告ではカンピロバクター食中毒以外の下痢症患者便からも分離されている。今後はカンピロバクター食中毒以外、例えば原因物質不明の有症事例の患者便からもアルコバクター属菌の分離を行うことによって、我が国におけるアルコバクター属菌における健康被害の実態が

明らかになるものと思われる。

E. 結論

本年度は昨年度確立した検査法を用いて食肉におけるアルコバクター属菌の汚染実態調査およびカンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出を行った。その結果、鶏肉や豚肉でアルコバクター属菌の重度の汚染が認められた。特に鶏における *A. butzreli* の汚染率、汚染菌数は *C. jejuni* のそれを超えていた。このことから現在の食中毒の発生状況、これまでに報告されている菌の検出状況を考えあわせると、*A. butzreli* がカンピロバクター食中毒に関与していたとしても、*C. jejuni* より病原性が弱い可能性が示唆された。一方で、*A. butzreli* の菌数が *C. jejuni* のそれよりも高いため、鶏肉に汚染後の増殖性、生存性が *C. jejuni* に比べて強い可能性が示唆された。アルコバクター属菌の増殖性、生存性の検討を行い、アルコバクター属菌の増殖、生存を抑えられるような条件を見つけ出すことが食中毒予防に重要であると考えられる。次年度はアルコバクター属菌の増殖性、生存性試験を行う予定である。

汚染菌数の比較の結果から *A.*

butzreli と *A. cryaerophilus* とでは汚染源が異なる可能性が示唆された。汚染源を明らかにし、食品への汚染を防ぐことは食中毒発生を予防する上で基礎的なことである。今後さらに研究を進め、汚染源を明らかにしていく必要があると思われる。

今回、カンピロバクター食中毒の患者便から *A. skirrowii* を検出した。これは我が国で下痢症患者便からアルコバクター属菌が検出された貴重な事例である。もちろんこの事例だけでアルコバクター属菌の食中毒への関与を結論づけることはできない。今後継続的な調査を行い、事例数を増やすことによって、我が国におけるアルコバクター属菌と食中毒の関係が明らかになるとと思われる。

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

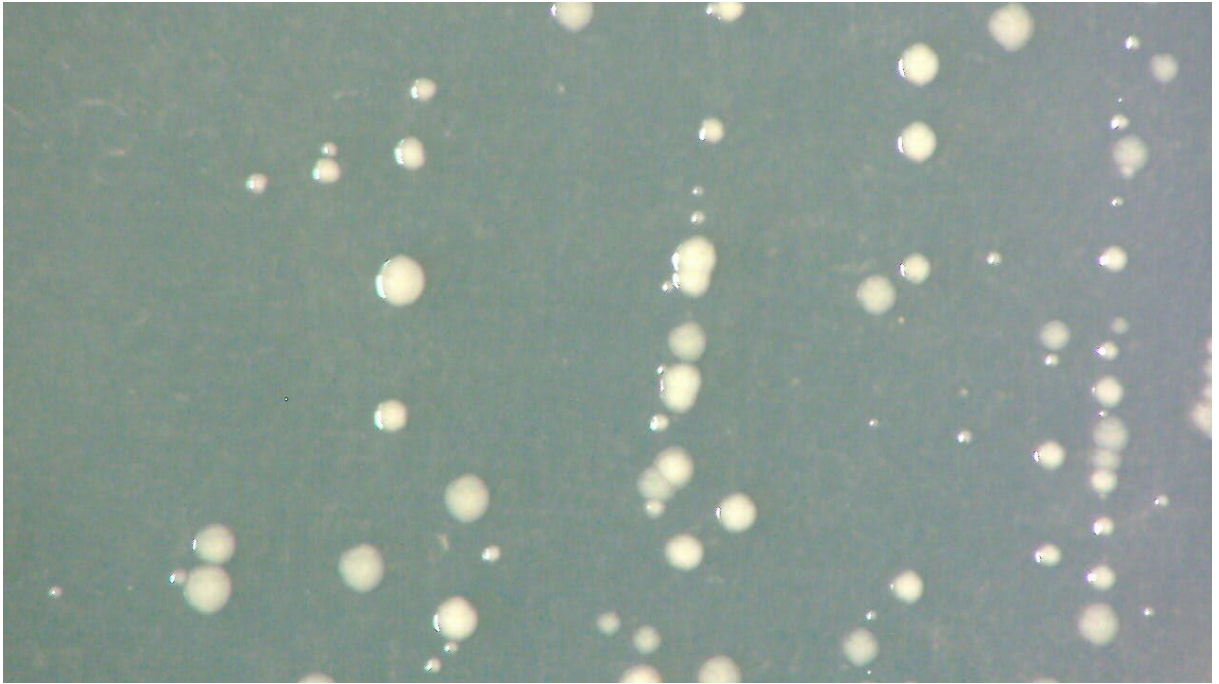
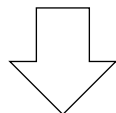


図1 *A. butzrelii*の集落

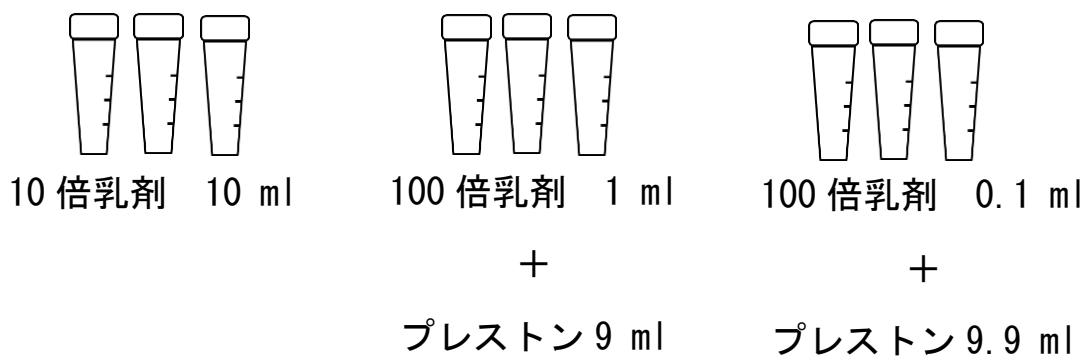
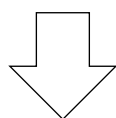


図2 *C. jejuni* の集落

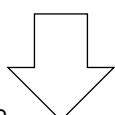
検体 25 g + 5%馬血液加プレストン培地 225 ml



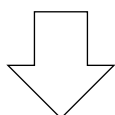
ストマッキング 2 分間 (10 倍乳剤)



各 3 本を 37°C、48 時間、微好気培養



マルチプレックス PCR



最確数を算出

図 3 最確数法によるカンピロバクター属菌の計数

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

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

結果判定 (以下の分子量のバンドが検出された場合、陽性とする)

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

図 4 アルコバクター属菌のマルチプレックス PCR の条件

プライマー

CjSPCU1: TTTAGCCTTTGCAACTCCTA
CjSPCR2: AAGGGTAGCAGCTGTAA
CcSPCU1: TAGGGATATGCACGCAAAG
CcSPCUR1: GCTTAATACAGTTACGATAG
CfSPCU2: AAGCATAAGTTTTGCAAAG
CfSPCR1: GTTTGGATTTTCAAATGTTCC

反応液の組成

Quick Taq HS DyeMix	12.500 μ l
CjSPCU1 (50 μ M)	0.125 μ l
CjSPCR2 (50 μ M)	0.125 μ l
CcSPCU1 (50 μ M)	0.500 μ l
CcSPCUR1 (50 μ M)	0.500 μ l
CfSPCU2 (50 μ M)	0.500 μ l
CfSPCR1 (50 μ M)	0.500 μ l
Template DNA	2.000 μ l
滅菌精製水	8.250 μ l

PCR 反応条件

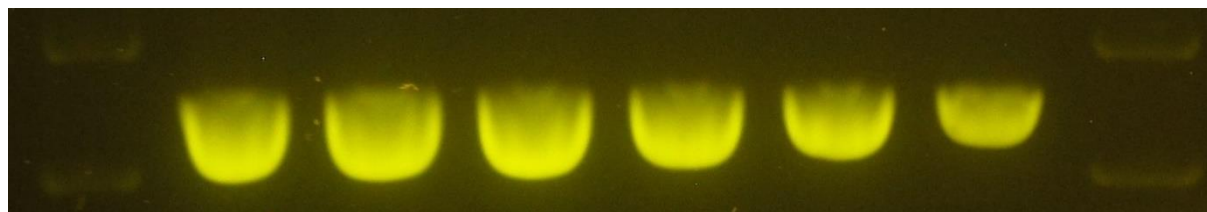
<u>94°C</u>	<u>2 min</u>
94°C	30 sec
55°C	30 sec
<u>68°C</u>	<u>42 sec × 35</u>
68°C	5 min

結果判定（以下の分子量のバンドが検出された場合、陽性とする）

<i>C. jejuni</i>	524 bp
<i>C. fetus</i>	397 bp
<i>C. coli</i>	313 bp

図 5 カンピロバクター属菌のマルチプレックス PCR の条件

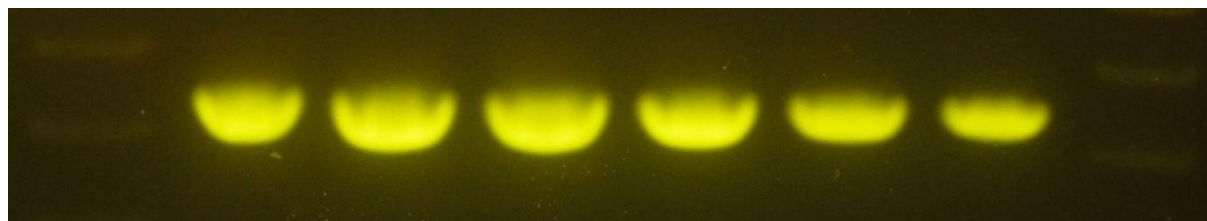
C. jejuni



6×10^6 6×10^5 6×10^4 6×10^3 6×10^2 6×10^1

cfu/ml 増菌培養液

C. coli



1×10^7 1×10^6 1×10^5 1×10^4 1×10^3 1×10^2

cfu/ml 増菌培養液

図 6 カンピロバクター属菌のマルチプレックス PCR の感度

1. 対象

カンピロバクター食中毒およびカンピロバクター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℃、15分滅菌後、50℃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。



便を塗抹し、30℃、48時間、好気培養を行う。



カンピロバクター様コロニーを10個選択する。



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。



マルチプレックスPCRによって *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を検出する。

図7 便からのアルコバクター属菌分離手順

DNA 抽出方法

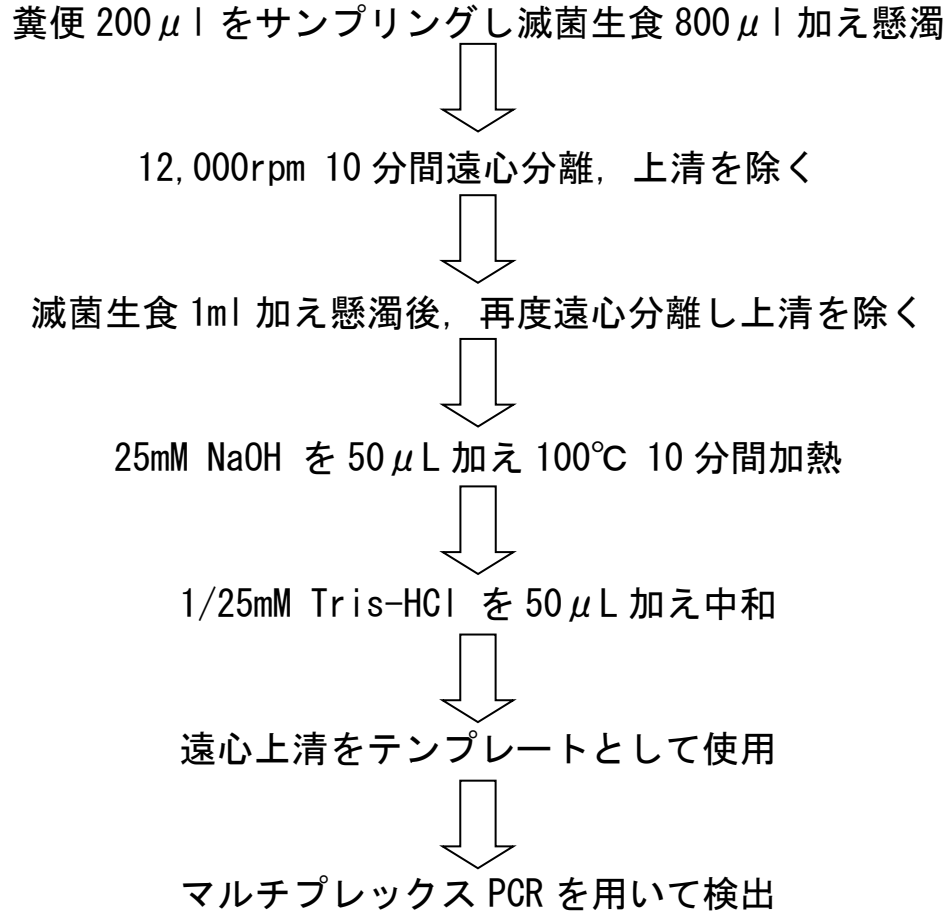


図 8 糞便を対象とした *Arcobacter* 属菌の検出手順
(糞便中 DNA の検出)

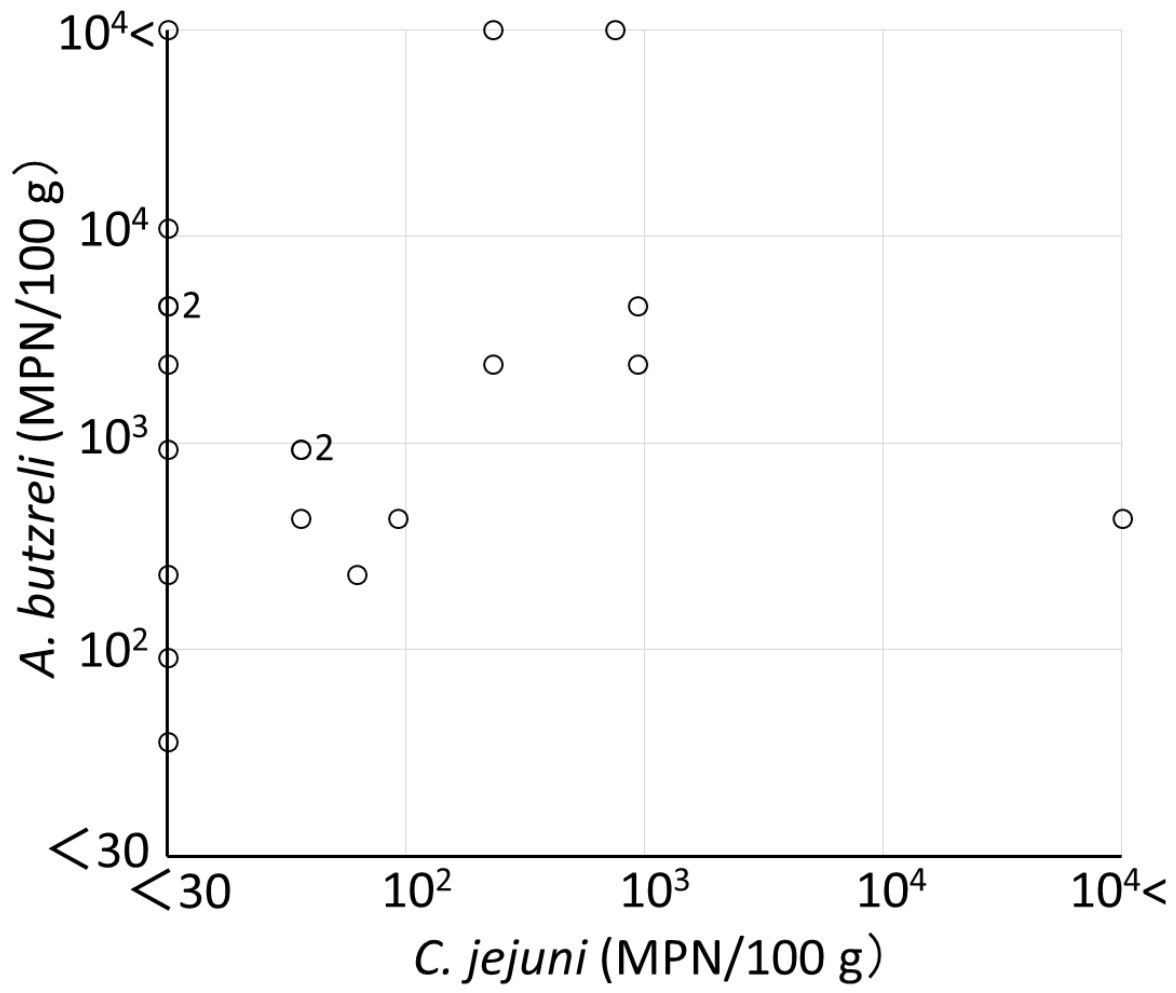


図9 鶏肉における *A. butzreli* と *C. jejuni* の汚染菌数の比較

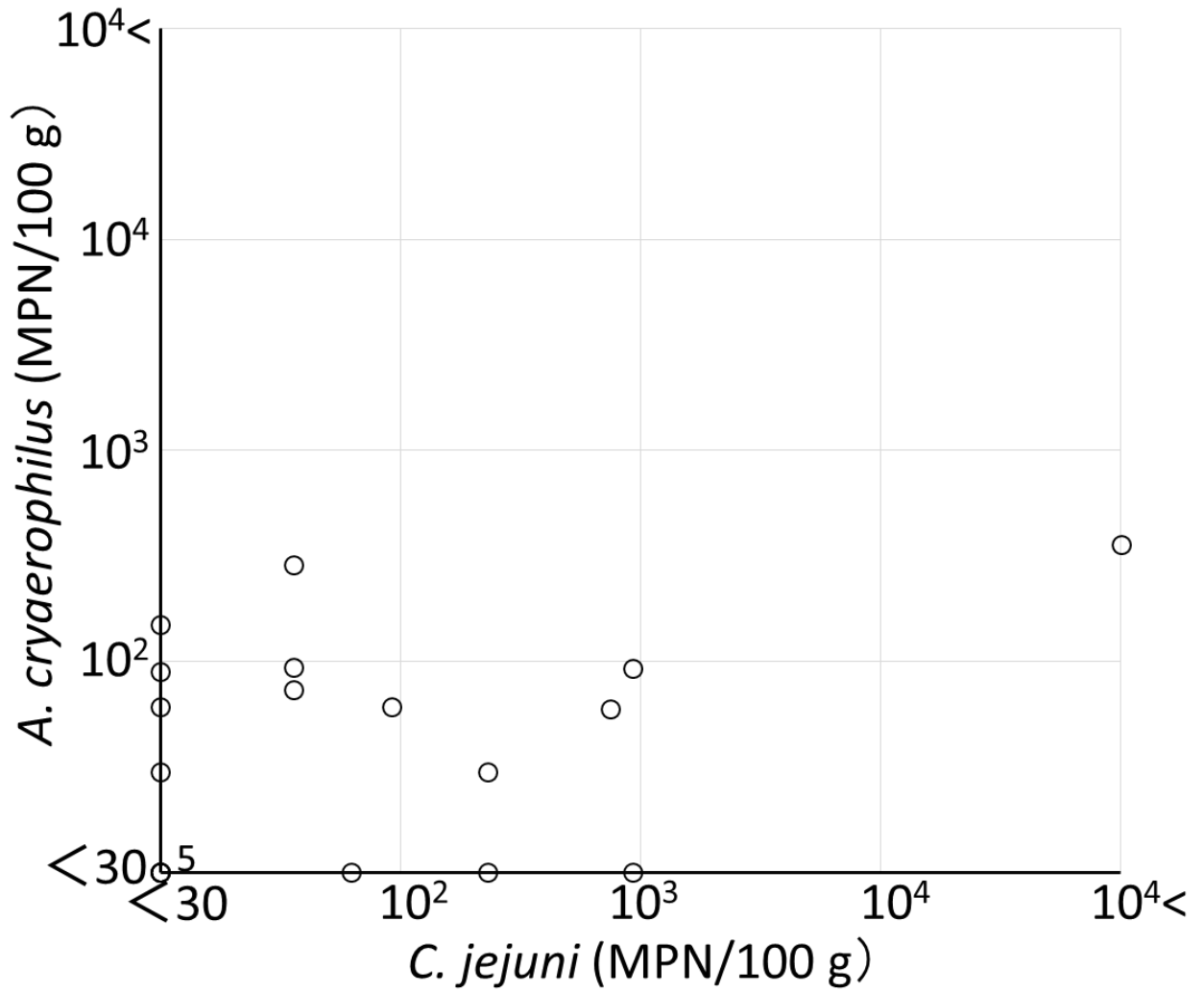


図 10 鶏肉における *A. cryaerophilus* と *C. jejuni* の汚染菌数の比較

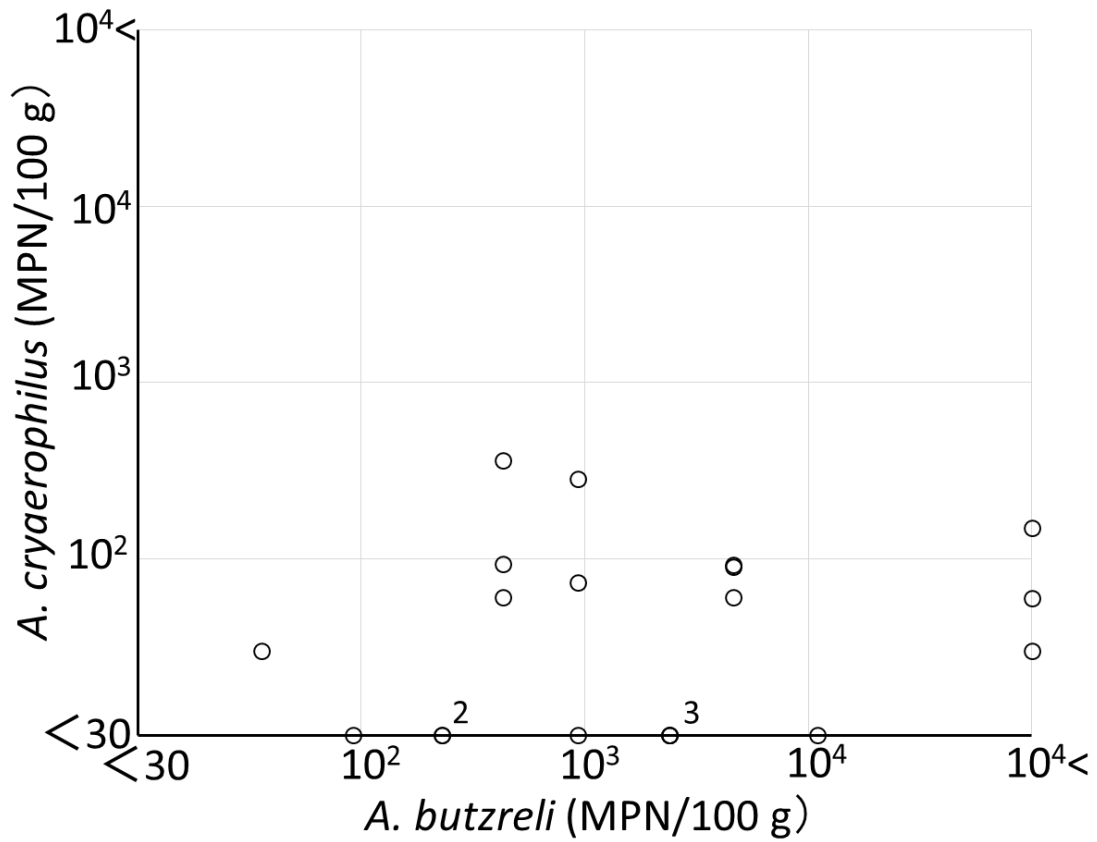


図 11 鶏肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の汚染菌数の比較

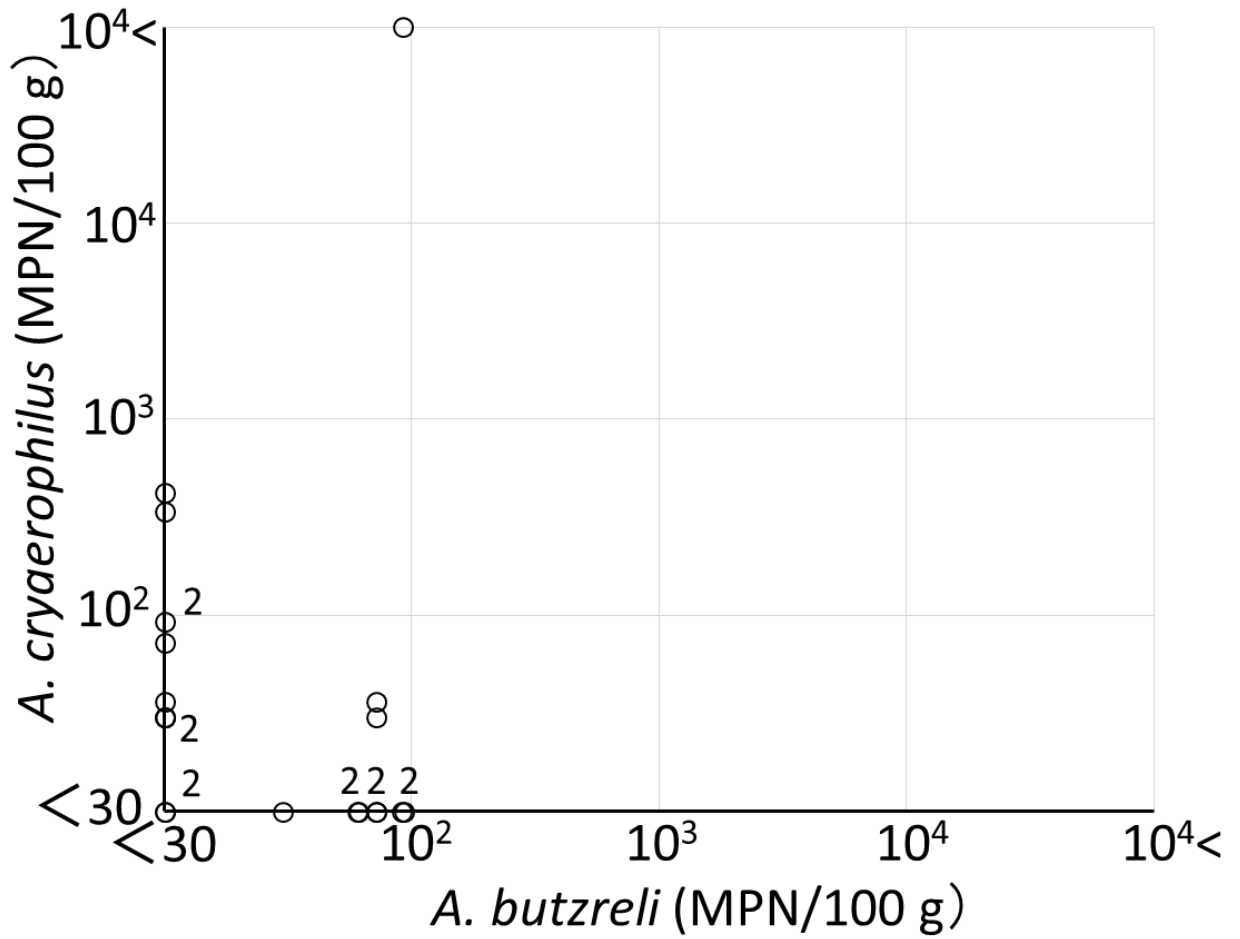


図 12 豚肉における *A. butzreli* と *A. cryaerophilus* の汚染菌数の比較

表 1 *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 2 汚染実態調査 陽性検体数

	陽性検体数					
	<i>A. butzreli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>
鶏肉	20	12	0	11	0	0
豚肉	10	10	0	0	0	0
牛肉	0	2	0	0	0	0

鶏肉、豚肉、牛肉それぞれ 20 検体ずつ調査した

表3 鶏肉における汚染菌数

番号	産地	部位	MPN/100g						
			<i>A. butzeli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	
1	国産	モモ	>11000	150	<30	<30	<30	<30	
2	国産	ムネ	430	94	<30	36	<30	<30	
3	国産	不明	930	74	<30	36	<30	<30	
4	国産	モモ	4600	61	<30	<30	<30	<30	
5	国産	モモ	230	<30	<30	<30	<30	<30	
6	国産	モモ	2400	<30	<30	230	<30	<30	
7	国産	モモ	430	61	<30	92	<30	<30	
8	国産	ムネ	930	<30	<30	<30	<30	<30	
9	国産	ムネ	36	30	<30	<30	<30	<30	
10	国産	モモ	230	<30	<30	62	<30	<30	
11	国産	モモ	>11000	60	<30	750	<30	<30	
12	国産	モモ	>11000	30	<30	230	<30	<30	
13	国産	モモ	4600	93	<30	930	<30	<30	
14	国産	手羽先	430	360	<30	>11000	<30	<30	
15	国産	ササミ	92	<30	<30	<30	<30	<30	
16	国産	モモ	2400	<30	<30	<30	<30	<30	
17	国産	ムネ	11000	<30	<30	<30	<30	<30	
18	国産	ムネ	2400	<30	<30	930	<30	<30	
19	国産	ムネ	4600	90	<30	<30	<30	<30	
20	国産	ムネ	930	286	<30	36	<30	<30	

表4 豚肉における汚染菌数

番号	産地	部位	MPN/100g						
			<i>A. butzreli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	
1	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
2	アメリカ	不明	61	<30	<30	<30	<30	<30	<30
3	オーストラリア	ロース	91	<30	<30	<30	<30	<30	<30
4	国産	ロース	72	<30	<30	<30	<30	<30	<30
5	国産	ロース	30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
6	国産	ロース	<30	336	<30	<30	<30	<30	<30
7	アメリカ	ロース	<30	424	<30	<30	<30	<30	<30
8	国産	モモ	<30	72	<30	<30	<30	<30	<30
9	国産	不明	93	<30	<30	<30	<30	<30	<30
10	国産	モモ	<30	36	<30	<30	<30	<30	<30
11	国産	不明	<30	93	<30	<30	<30	<30	<30
12	カナダ	ロース	60	<30	<30	<30	<30	<30	<30
13	アメリカ	不明	<30	30	<30	<30	<30	<30	<30
14	アメリカ	ロース	72	<30	<30	<30	<30	<30	<30
15	国産	不明	72	36	<30	<30	<30	<30	<30
16	アメリカ	ロース	92	>11000	<30	<30	<30	<30	<30
17	国産	モモ	<30	30	<30	<30	<30	<30	<30
18	国産	ロース	72	30	<30	<30	<30	<30	<30
19	国産	ロース	<30	30	<30	<30	<30	<30	<30
20	国産	ロース	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30

表5 牛肉における汚染菌数

番号	産地	部位	MPN/100 g						
			<i>A. butzreli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	
1	国産	モモ	<30	4600	<30	<30	<30	<30	<30
2	国産	不明	<30	92	<30	<30	<30	<30	<30
3	オーストラリア	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
4	国産	モモ	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
5	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
6	アメリカ	肩ロース	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
7	オーストラリア	サーロイン	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
8	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
9	国産	モモ	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
10	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
11	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
12	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
13	国産	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
14	オーストラリア	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
15	アメリカ	肩ロース	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
16	オーストラリア	モモ	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
17	国産	肩ロース	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
18	オーストラリア	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
19	オーストラリア	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
20	アメリカ	不明	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30

表6 鶏肉における汚染菌数の分布

MPN/100g	菌名		
	<i>A. butzreli</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. jejuni</i>
<30	0	8	9
10 ¹	2	9	5
10 ²	8	3	5
10 ³	6	0	0
10 ⁴	1	0	0
>11000	3	0	1

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
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 <i>Escherichia coli</i> 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 <i>Escherichia coli</i> in food by real-time PCR assays.	Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi)	60 (6)	183-186	2019
Ooka, T., Seto, K., Ogura, Y., Nakamura, K., Iguchi, A., Gotoh, Y., Honda, M., Etoh, Y., Ikeda, T., Sugitani, W., Konno, T., Kawano, K., Imuta, N., Yoshiie, K., Hara-Kudo, Y., Murakami, K., Hayashi, T., Nishi, J.	O-antigen biosynthesis gene clusters of <i>Escherichia albertii</i> : their diversity, similarity to <i>E. coli</i> gene clusters, and the development of an O-genotyping method.	Microbial Genomics	5 (11)		2019

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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) 未審査に場合は、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。

令和 2 年 3 月 27 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 雅

次の職員の令和元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
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 (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) 未審査に場合は、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。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴々

次の職員の令和元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) 未審査に場合は、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。