

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2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3(2021)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	21
----------------------------------------	----

工藤 由起子

(1) <i>E. albertii</i> 特異的リアルタイム PCR 開発の検討	33
--------------------------------------------	----

(2) <i>E. albertii</i> 選択培地の開発	48
--------------------------------	----

(3) <i>E. albertii</i> 食中毒事例での原因食品の解析	61
---------------------------------------	----

(4) 食品等における <i>E. albertii</i> 汚染実態調査	72
---------------------------------------	----

(5) <i>E. albertii</i> の食品・環境中での挙動	82
------------------------------------	----

2. <i>Escherichia albertii</i> の感染性・病原因子の解明	98
---------------------------------------------	----

大岡 唯祐

3. <i>Arcobacter butzleri</i> の制御法の確立	112
---------------------------------------	-----

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	127
---------------------	-----

令和2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 *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR は検出性に優れることが判明した。② modified EC 培地に薬剤 A および B を添加、DHL 寒天培地に薬剤 C および D を添加した選択培地を開発した。③ 食中毒事例での調査において②で示した培地を使用し原因食品を明らかにした。④ 食品検体 709 検体中 1 検体で *E. albertii* が分離され、食品汚染の可能性が示された。⑤ *E. albertii* は食品中で中温で増殖し、低温で増殖が抑制されること、環境水中では低温で生残し、中温では死滅しやすいことが判明した。環境から農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。また、（2）*E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、① 病原性に関わると考えられる遺伝子について、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。② 病原因子 TccP について、配列相同性の異なるバリエーションを同定した。③ 鞭毛抗原（H 抗原）は 4 種類の H 抗原遺伝子型しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。④ EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。（3）*Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、① 汚染実態調査によって水耕栽培野菜と魚介類はアルコバクターによる食中毒の原因食品となりうる可能性が示された。② アルコバクターの低温での生存、酸性への耐性、高塩濃度での増殖、VBNC 状態で生存の可能性等が判明した。

#### 研究協力者

埼玉県衛生研究所	佐藤美佳、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
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、高橋陽子
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
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
大津市保健所	安田敬子、小椋容子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、森村実加、松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	浅野由紀子
熊本県保健環境科学研究所	前田莉花
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、大山み乃り、久手堅 剛
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
福岡市保健環境研究所	松永典久
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
鹿児島大学	大岡唯祐
東海大学海洋学部	鈴木恭平、後藤慶一
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、都丸亜希子、新井沙倉、 大屋賢司、大西貴弘

#### A. 研究目的

新たな食中毒細菌（流行株などを含む）が流行し、定着する場合があるが、流行前に対策をとり制御することが重要である。近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている（日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。また、*Arcobacter* 属菌は胃

腸炎患者の便からしばしば分離されており、食中毒との関連性が示唆されている。特に、*Arcobacter butzleri* は、食中毒原因菌としての可能性が示唆されている。これら 2 菌種に着目し、食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を行うこととした。

研究組織としては、（1）*Escherichia albertii* の制御法の確立（工藤由起子）、（2）*Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明（大岡唯祐）、（3）

*Arcobacter butzleri* の制御法の確立（大西貴弘）の3つの分担研究とした。

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、令和元年の研究成果を発展させて、令和2年度には、[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討、[2] *E. albertii* 選択培地の開発、[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析、[4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査、[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動、を行った。

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、令和2年度の成果を発展させて、[1] 病原関連候補遺伝子の発現条件検討、[2] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性、[3] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布、[4] TccP バリエント (TccP4) の機能解析、[5] *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析、[6] EAH-genotyping PCR の

開発および実用性の検討、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。令和2年度には、大西は、令和元年度の結果を踏まえ、[1] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査、[2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析、を行った。

## B. 研究方法

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] *E. albertii* 特異的リアルタイムPCR 開発の検討

昨年度設計した *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR (EA\_rt2) について、*E. albertii* 43 株および各種食中毒細菌や食品由来細菌 29 株の合計 71 株を供試し 2 種類標識 (FAM/ZEN/3IABkFQ および FAM/BHQ1) プローブを用いた特異性試験を実施した。また、リアルタイム PCR の感度を鶏肉培養液中に約  $10^9 \sim 10^2$  cfu/mL となるように *E. albertii* を加えた菌接種鶏肉培養液にて検討した。次に、*E. albertii* を鶏肉に約  $10^3 \sim 10^{-1}$  cfu/25 g となるように接種し、mEC および NmEC 中にて培養後、リアルタイム PCR を実施した。さらに、主に平成30年度の本研究事業にて nested PCR を行った鶏肉 (内臓肉も含む) の DNA をリアルタイム PCR に供試し、鶏検体での汚染実態調査を実施した。

[2] *E. albertii* 選択培地の開発

選択増菌培地として、薬剤 A および薬剤 B を添加した mEC 培地 (mEC+AB 培地) を開発することを考え、各薬剤の至適濃度を検討した。また、選択分離培地として、薬剤 C および薬剤 D を添加した DHL 寒天培地 (DHL+CD 培地) を開発することを考え、各薬剤の至適濃度を検討した。菌株には *E. albertii* 3 株 および鶏肉由来細菌 3 株 (*Escherichia fergusonii* 2 株 および *Morganella morganii* 1 株) を供試した。

[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

食中毒事例での冷凍保管検食、それら食品の混合培養液 (冷蔵) および個別培養

液（冷蔵）を大津市保健所から受け取り、選択剤 A を添加した mEC (A-mEC) 培地等での増菌培養、当所で開発した *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR、*E. albertii* の選択分離培地としてキシロース・ラムノースを添加した DHL (XR-DHL) 培地等での分離培養を行った。大津保健所での食品混合培養液からの分離株および患者検体からの分離株、当所での分離株について、0 抗原遺伝子型別 (EA0-genotyping) および Random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR による型別に供試した。

#### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

地方自治体と協力し、食肉等の食品検体 709 検体と環境（施設の拭き取り）検体 60 検体の計 769 検体を収集、試験した。また、ヒト便検体 570 検体を試験した。食品検体および環境検体は、BPW や mEC 等で増菌し、DHL 等で分離した乳糖非分解の菌株のうち、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。分離株の 0 抗原型を大岡らの方法に従い PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。

#### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

*E. albertii* を国産トリ肉、国産ブタ肉、イワガキおよびマガキ（各 25 g）に接種

し、4℃、10℃、20℃および 30℃で保管した。菌接種後 6 時間から 3 日間まで経時的に *E. albertii* および生菌数を算出した。*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR による菌数の定量分析を行った。また、環境水検体として、井戸水および海水を採水し、*E. albertii* を接種した後に 4℃、10℃、20℃および 30℃で保管し、菌接種後 9 日間、食品検体と同様に菌数およびリアルタイム PCR による菌数の定量分析を行った。

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

##### [1] 病原関連候補遺伝子の発現条件検討

各菌株を異なる栄養条件 (Tryptic Soy Broth [TSB] 原液, 1/10 TSB 希釈液)、培養温度 (37℃, 20℃) で培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。昨年度の研究において、付着能および細胞内生存能への関与が示唆された病原関連候補遺伝子を標的として、リアルタイム RT-PCR を実施し、 $\Delta\Delta Ct$  法により各培養条件における発現レベルを解析した。発現解析の内在性コントロールには *rpoB* 遺伝子を用いた。

##### [2] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性

インチミンをコードする *eae* 遺伝子の多様性解析については、当該遺伝子の上下流に存在する *cestT* 遺伝子、*escD* 遺伝子を blastn 解析により検出して 2 遺伝子間の配列を抽出し、遺伝子アノテーションを行

った。また、インチミンサブタイプ 38 種類のアミノ酸配列に対する tblastn 解析を実施し、95%未満の塩基配列相同性を示した場合は新規インチミンサブタイプと同定した。Tir に関しては既知の Tir バリエント (V1-V5) の全長アミノ酸に対する配列相同性 (97%以上) を、TccP (TccP1~TccP4 [TccP4 は本研究で新たに同定]) に関しては N 末端 56 アミノ酸の配列相同性 (97%以上) を、それぞれ基準としてバリエントタイピングを行った。

[3] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布

*cae* 遺伝子のサブタイプ, *tir* 遺伝子および *tccP* 遺伝子のバリエントについて株ごとの保有パターンに規則性があるのかを調べた。また、*E. albertii* 進化系統におけるこれら 3 遺伝子の分布相関についても解析した。

[4] TccP バリエント (TccP4) の機能解析

新規 TccP バリエントをコードする *tccP4* 遺伝子を、昨年度採用して良好な結果を得た改良 Wanner 法により遺伝子破壊し *tccP* 遺伝子バリエント (*tccP4* 遺伝子) の遺伝子破壊株を作製した。これを Caco-2 細胞に感染させ、TccP4 を介したアクチン重合が起こるかどうかを調べた。具体的には、野生株および遺伝子破壊株を LB 液体培地で一晩前培養し、Caco-2 培養細胞

に MOI=100 で感染させた。感染 3 時間で付着していない菌を洗浄し、新しい培地を添加後さらに 2 時間培養したのち、4%パラホルムアルデヒド in PBS 溶液で 15 分間固定した。0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS 溶液で 20 分間膜処理し、DAPI (0.2 $\mu$ g/ml) 溶液と Actin-stain 488 phalloidin 溶液でそれぞれ核とアクチンを染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

[5] *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析、

NCBI/GenBank/DDBJ などの公開データベースに登録されている *E. albertii* 243 株のゲノム配列を対象にフラジェリンをコードする *fliC* 遺伝子の多様性解析を行った。*fliC* 遺伝子の上下流に位置する *fliA/fliD* 遺伝子を blastn 解析により検出し、両遺伝子間の領域に含まれる *fliC* 遺伝子を同定した。同定された *E. albertii* の *fliC* 遺伝子と既知の大腸菌のフラジェリンコード遺伝子との比較解析を行った。

[6] EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

同定した *E. albertii* の各 *fliC* 遺伝子型の多様性を利用し、PCR による H 抗原遺伝子型タイピングツール (EAH-genotyping PCR) の開発を行った。また、*E. albertii* を特異的に検出可能なプライマーペアを加え、*E. albertii* の同定も同時に行うことが可能な検出系とした。トリおよびヒトから分離された *E. albertii*

92 株を用いて EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

魚介類および水耕栽培野菜を供試し、最確数法によるアルコバクター属菌の計数を平成 31 年度に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。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°C、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、平成 31 年度に確立した *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出するマルチプレックス 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°C、48 時間、培養した。単離した集落をマルチプレックス PCR で試験し、PCR が陽性の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿

酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11,000 MPN/100 g である。

[2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析

培養温度の検討では、*A. butzleri* をアルコバクター基本培地に接種し-20°C、4°C、10°C、25°C で培養した。塩濃度の検討では、1、2、3、4、5%NaCl を加えたアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。なお、アルコバクター基本培地には最初から 0.5%の NaCl が含まれている。pH の検討では、pH を 3.0、3.5、4.5、5.5、6.5、7.0、8.0、9.0 に調節したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。アルコバクター基本培地は製品に添付の使用方法に従って作成した場合、pH6.5 になった。水分活性の検討では、ショ糖を加え Aw 0.99 (ショ糖非添加)、0.96、0.90 に調整したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。なお、いずれの実験においても約 24 時間毎に、菌数を計数するとともに、生菌特異的 PCR を同時に行った。生菌特異的 PCR は、*A. butzleri* に対する定量 RT-PCR を Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (Takara Bio 社製) と組み合わせて実施した。この生菌特異的 PCR は、10<sup>6</sup> cfu/ml の加熱死菌のバックグラウンドが存在する条件で、10<sup>1</sup> から 10<sup>8</sup> cfu/ml の生菌に対

して定量性が認められることが事前に確認された。

## C. 研究結果

### (1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

#### [1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

特異性試験では、供試した *E. albertii* 全株が陽性となりその他細菌種では全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液での検出限界は、両標識プローブで  $0.3 \sim 3.4$  cfu/PCR tube ( $=6.8 \times 10^1 \sim 6.8 \times 10^2$  cfu/mL) であった。また、菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた。食品培養液での検出限界は、両標識プローブで mEC および NmEC 共に  $0.5 \sim 7.5$  cfu/PCR tube ( $=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$  cfu/mL) であった。菌接種鶏肉検体では、両標識プローブで *E. albertii* 接種が  $1.2 \sim 1.4$  cfu/25 g 以上で遺伝子が検出された。汚染実態調査では、市販鶏肉 20 検体のうち、nested PCR で 1 検体、リアルタイム PCR でその他 1 検体計 2 検体が陽性であった。養鶏場から直接購入した各種臓器等合計 234 検体のうち、nested PCR で 37 検体、リアルタイム PCR は 54 検体が陽性であった。

#### [2] *E. albertii* 選択培地の開発

選択増菌培地の薬剤濃度の検討では、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の組合せの mEC+AB 培地で *E. albertii* の増殖は抑制されず、鶏肉由来細菌 20 株中 3 株

(15%) で増殖が認められたものの最も強く鶏肉由来細菌の増殖を抑制した。選択分離培地の薬剤濃度の検討では、薬剤 C  $0.02$   $\mu\text{g/mL}$  および薬剤 D  $10$   $\text{mg/mL}$  濃度の DHL+CD 寒天培地で、*E. albertii* のコロニーを比較的選択的に発育させたが、*E. albertii* 菌株の 15 株 (7.7%) が発育抑制、8 株 (4.1%) で非発育であり、鶏肉由来菌株の 11 株 (55%) が発育良好であった。

#### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

受け入れた検体のうち、各食品の BPW 増菌培養液をそのままリアルタイム PCR に供したところ、春雨中華サラダの培養液が陽性 (Ct 値：約 30) となった。しかし、*E. albertii* の分離には至らなかったため、A-mEC 培地による二次増菌を試みた結果、培養液はリアルタイム PCR で陽性 (Ct 値：約 20) を示し、XR-DHL 培地での培養によって *E. albertii* が分離された。本試験で分離された春雨中華サラダ由来株および食品混合物由来株および患者由来株 (滋賀刑務所および B 施設) は、いずれも 0 抗原遺伝子型が EA0g4 で一致した。また、RAPD PCR による型別でも、いずれの株も同一のバンドパターンを示した。

#### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

食品 709 検体のうち 1 検体から *E. albertii* が分離された。また、環境検体 60 検体からは *E. albertii* の遺伝子が検出されず、ヒト便検体 570 検体からは *E.*

*albertii* は分離されなかった。分離株の EA0-genotyping では、食中毒事例由来では、EA0g1、EA0g2、EA0g5、EA0g8、EA0g9、EA0g11、EA0g12、EA0g18、EA0g25 のいずれかに型別された。下痢症および無症状保菌者由来株では、EA0g2、EA0g3、EA0g4、EA0g8、EA0g9、EA0g28 および EA0g3/29 が検出された。動物、食品および環境由来株では、EA0g3、EA0g4、EA0g7、EA0g8、EA0g16、EA0g23、EA0g25、EA0g40 が検出された。しかし、各由来において型別不能であった株も多数あった。

#### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

*E. albertii* を接種した食品検体を 20°C あるいは 30°C で保管した結果、すべての検体で菌数が増加した。一方で、4°C および 10°C では、いずれの食品検体も測定期間を通して菌数の大きな増減はみられなかった。また、*E. albertii* を接種した環境水検体を 20°C あるいは 30°C で保管した結果、すべての検体で菌数が減少した。20°C よりも 30°C で、井戸水検体よりも海水検体で、菌数減少の傾向が著しかった。4°C および 10°C では、井戸水検体の菌数は測定期間中ほぼ変化しなかったのに対して、海水検体の菌数は計数期間を通して緩やかに減少した。

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

[1] 病原関連候補遺伝子の発現条件検討  
付着および細胞内生存能に関わること

が示唆された A, B, C, D 遺伝子群が 37°C, 1/10 TSB 希釈液 (高温・低栄養) の培養条件下において mRNA レベルでより高い発現を示すことが明らかとなった。現在、当該遺伝子の中でも細胞内生存能に関わる可能性が示唆されている新規病原候補 A 遺伝子について、ペプチド抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現と菌体および感染細胞内での挙動に関する解析を進めている。

[2] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性

インチミン: 243 株のうち 241 株が *eae* 遺伝子陽性であり、224 株が既知のインチミンサブタイプ 20 種類のいずれかを保有していた。残り 19 株中 17 株には 3 種類の新規サブタイプと N1 のバリエーションが含まれた。検出数の多かったサブタイプは、 $\sigma 1$  (62 株),  $\iota 2$  (28 株),  $\sigma 2$  (21 株) であった。

Tir: 243 株のうち 241 株が *tir* 遺伝子陽性であり、バリエーションが 5 タイプ (V1-V5) に分かれ、それぞれ 51 株, 21 株, 47 株, 10 株, 112 株であった。また、V1, V2 は、AE lesion 形成に先立つアクチン重合形成において LEE 領域に III 型分泌系により宿主細胞へ移行するエフェクタータンパク質の 1 つである TccP を必要とするタイプ (EHEC タイプ [Tir-Nck 非依存的]) であり、V3-V5 は TccP を必要としない

(EPEC タイプ[Tir-Nck 依存的])タイプであることも明らかとなった。

TccP : 本解析により新規バリエーションとして TccP4 を同定した。243 株のうち TccP1-TccP4 をそれぞれ、119 株、63 株、7 株、133 株が保有し、TccP1 と TccP4 が *E. albertii*において高頻度に分布していることが明らかとなった。

[3] *E. albertii*における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の分布

*tir* 遺伝子と *eae* 遺伝子を保有する 241 株のうち 215 株 (89.2%) が TccP バリエーションを 1-3 コピー保有していることも明らかとなった (表 3)。ここで、Tir が EPEC タイプであり TccP を保有しない Tir-Nck 依存的経路を示す株、Tir が EHEC タイプであり TccP を保有する Tir-Nck 非依存的経路を示す株、Tir が EPEC タイプでありかつ TccP も保有する両経路を使える株は、それぞれ、25 株、71 株、144 であり、1 株のみどの経路も使えない株が存在した (表 3)。また、全ゲノム高精度系統樹にインチミン、Tir、TccP の分布をプロットした結果、インチミンタイプ、Tir タイプ、TccP タイプともに分布に系統的な相関は見られなかった。また、大きく系統の異なる clade1 と clade2 に同じインチミンタイプが存在したことから、種内で LEE 領域が水平伝播しているあるいは *eae* 遺伝子が組換えを起こしている可能性が示唆さ

れた (図 2)。

[4] TccP バリエーション (TccP4) の機能解析

本解析で新たに同定した TccP4 について、Tir-Nck 非依存的経路を示す EHEC タイプの Tir を持ち、TccP4 バリエーションを保有するヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を保有) 株を用いて、遺伝子破壊株を用いた TccP4 の機能解析を行った。その結果、*tccP4* 遺伝子および *tccP1* 遺伝子の両方を破壊した株においても Caco-2 細胞においてアクチン重合が観察された。

[5] *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析、

解析した 243 株のうち、215 株において *fliC* 遺伝子が同定され、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子は大腸菌のものとは異なっており、大きく 4 つの *fliC* 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在することが明らかとなった。EAHg1-EAHg4 を保有する株はそれぞれ 54 株、22 株、46 株、92 株であり、*E. albertii*においては EAHg4 が高頻度に検出されることがわかった。また、各型が異なる進化系統に散在していることが明らかとなり、*fliC* 遺伝子および鞭毛抗原遺伝子群が種内で頻繁に組換えを起こしている可能性が示唆された。

[6] EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

4 種類の EAHg 型の配列多様性を利用し、4 種類 EAH 型を識別できるマルチプレック

ス PCR 系を構築した。また、*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 組加え、H 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした。国内ヒト臨床分離株およびトリ由来株で実施した結果、全株の EA0 型が同定され、EAHg1-EAHg4 はそれぞれ 29 株、18 株、15 株、48 株であり、*in silico* で実施した 215 株での解析結果と同様に EAHg4 が高頻度に存在することが明らかとなった。

### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

#### [1] *Arcobacter* 属菌の 野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

カイワレ、レタス類、ブロッコリスプラウト、その他のスプラウトの計 20 検体中 10 検体から *A. butzleri* が検出された(陽性率 50%)。この 10 検体のうち 5 検体で 100 g あたりの MPN が 11,000 を超えていた。また、ブロッコリスプラウトでの陽性率が高く、7 検体中 5 検体から *A. butzleri* が検出された(陽性率 71%)。陽性のブロッコリスプラウト 5 検体中 4 検体で *A. butzleri* が 11,000 MPN/100 g を超えていた。*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* は検出されなかった。

エビ類、貝類、イカ類を供試し、*A. butzleri* はエビ 3 検体、イカ 1 検体から検出された。*A. cryaerophilus* はエビ 1 検体から検出された。*A. skirrowii* は貝 1 検体から検出された。

#### [2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖

#### 挙動の解析

培養温度については、*A. butzleri* の培養に用いられる 25°C では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。10°C では、25°C と比べて増殖速度が緩やかになり、7 日目に約  $10^6$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR もほぼ同様の増殖傾向を示した。4°C では、菌数は緩やかに減少し、培養 7 日目に検出限界以下となったが、生菌特異的 PCR では菌量の減少は認められず、接種菌量が 7 日間維持された。顕微鏡観察を行ったところ、ラセン桿菌である *A. butzleri* が球状化していた。-20°C では、菌数は培養 1 日目に検出限界以下となったが、生菌特異的 PCR では 3 日目まで接種菌量が維持され、その後、検出限界以下になった。

塩濃度については、一般的な培養条件である 0.5% では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。1.0%、2.0% でも 0.5% と同様の傾向であった。3.0% では 0.5% と比べ増殖速度の低下が認められ、培養 7 日目に約  $10^7$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

4.0% では、培養 1 日目に菌数は検出限界以下になったが、生菌特異的 PCR の結果では培養 1 日目から緩やかに減少が始まり、培養 4 日目までは生菌が確認された。その後、培養 7 日目に検出限界以下となった。

pHについては、一般的な培養条件である pH 6.5 では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。pH3.0~4.5 では、培養 1 日目に菌数は検出限界以下に低下した。しかし、生菌特異的 PCR では大きな菌量の低下は認められず、7 日間、接種菌量をほぼ維持した。pH5.5 では、培養 1 日目から菌数の低下が始まり、培養 4 日目で検出限界以下となった。生菌特異的 PCR では、培養 2 日目から菌量の低下が始まり、培養 7 日目に検出限界以下となった。pH7.0、pH8.0 では、pH6.5 とほぼ同様の傾向が認められ、pH の影響は認められなかった。pH9.0 では、培養 1 日目で菌数は検出限界以下となった。生菌特異的 PCR による菌量も同様に、培養 1 日目で検出限界以下になった。

水分活性については、一般的な培養条件である  $A_w$  0.99 では、培養 4 日目で約  $10^8$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR も同様の傾向を示した。

$A_w$  0.96 では、培養 2 日目に菌数が検出限界以下になり、生菌特異的 PCR では培養 2 日目から緩やかに減少し、7 日目で、接種菌量から約 1 オーダーの減少が認められた。 $A_w$  0.90 では、培養 1 日目で菌数は検出限界以下となり、生菌特異的 PCR は培養 2 日目から緩やかに減少し、7 日目で、接種菌量から約 1 オーダーの減少が認められた。

#### D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

開発したリアルタイム PCR は高い特異性を示した。また、感度測定では、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度に優れており、食品培養液でも感度が影響されず、優れることが明らかになった。次に、鶏肉に *E. albertii* を接種した検体で検討したところ、検出限界が 1.2~1.4 cfu/25 g であったため、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* 汚染であれば、*E. albertii* が十分に増菌され、リアルタイム PCR にて検出されることが示された。*E. albertii* 汚染鶏検体では、nested PCR 陽性検体が全てリアルタイム PCR 陽性となり、さらに、17 検体はリアルタイム PCR でのみ陽性であったため、nested PCR よりも検出に優れることが示された。本リアルタイム PCR の実検体での応用性が示された。

[2] *E. albertii* 選択培地の開発

結果から薬剤 A 濃度  $V_a$  および薬剤 B 濃度  $V_b$  の mEC+AB 培地が選択増菌培地として有用であることが示された。また、薬剤 C 0.02  $\mu$ g/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地では、*E. fergusonii* および *M. morgani* に対して強く増殖を抑制するが、*E. albertii* の一部菌株に対しても同様に増殖を抑制する

ことが示された。以上のことから、鶏肉から *E. albertii* を分離する際には、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地で増菌培養後に薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地に併用してこれまで用いられているキシロース・ラムノース添加 DHL 寒天培地を用いて画線培養を行い、菌の分離を試みることで、*E. albertii* の分離率が向上すると考えられる。

### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

本事例では、すでに滋賀刑務所での食中毒事例において患者便および原因と疑われる食事に含まれる食品混合検体から大津市保健所にて *E. albertii* が分離されており、個別の食品のうちのいずれが原因食品であるかを解明することに焦点を絞り試験を実施した。結果として、春雨中華サラダの培養液を A-mEC 培地にて二次増菌した結果、XR-DHL 培地での培養により *E. albertii* が分離された。今回の試験で分離された春雨中華サラダ由来株が、食品混合物由来株および患者由来株の 0 抗原遺伝子型 (EA0g4) と一致していること、また、RAPD-PCR のバンドパターンについても同一であることから、滋賀刑務所での食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。

### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

市販食品の汚染率は極めて低いものの

*E. albertii* の汚染があるものも確認された。今後、分離株の病原性解析などヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。環境検体からは *E. albertii* が検出されなかったが、過去の報告から、動物や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。0 抗原型別では、集団食中毒事例由来株に特定の 0 抗原型への偏りが確認されず、国内に様々な 0 抗原型の *E. albertii* が存在することが示された。また、型別不能の株が散見されたため、新規の EA0 型の存在が示唆された。食品の汚染源を探る手法として、本 EA0-genotyping は簡易に実施できる有効な型別方法と考えられた。

### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

本研究では汚染が報告されている、または可能性がある食品や環境水を検体として選定し、*E. albertii* の挙動を中温および低温にて解析した。食品検体での結果から、*E. albertii* 汚染食品の中温での保管によって本菌が増殖することが考えられ、低温では増殖を防げることが判明した。また、環境水検体での結果から、*E. albertii* 汚染環境水中の本菌は低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになった。環境水中で菌が生存することによって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。河川等の環境水のさらなる調査は汚染経路の解明に重要であると考えられた。

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

昨年度は、*E. albertii* に特異的な病原関連遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、宿主細胞への付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定した。今年度はその遺伝子に関する発現解析をすすめ、発現が上がる条件を明らかにした。今後、病原機構の詳細を明らかにするため、ペプチド抗体を用いて機能阻害実験と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。

EHEC, EPEC と同様に細胞付着に必須な *E. albertii* に共通の病原因子として、LEE 領域にコードされるインチミンと Tir、また Tir のバリエーションタイプと関連して病原機構に関わる TccP について、その多様性と分布を明らかにした。その結果、大腸菌においてマイナーなタイプのインチミンが *E. albertii* に多いこと、Tir バリエーションタイプが V1, V2 (EHEC タイプ) の株はほとんどが TccP を保有していることが明らかとなり、V3, V4, V5 (EPEC タイプ) の株においても TccP を保有する株が多いことから、*E. albertii* は Tir-Nck 依存的あるいは Tir-Nck 非依存的のいずれか、もしくは両方の経路により宿主細胞のアクチン重合を引き起こす能力を持つことが示唆された (論文投稿準備中)。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエーション (TccP4) に関して、遺伝子破壊株を用い

た機能解析を実施したが、遺伝子破壊株においてもアクチン重合が観察された。ここで、K7756 株はドラフトゲノム解析株であり、全ゲノム情報が明らかになっていないため、TccP バリエーションが他にも存在する可能性が示唆されるため、現在ナノポアシーケンスシステム MinION により全ゲノム配列の決定を進め、他のバリエーションの存在有無を確認している。

*E. albertii* の H 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 *fliC* 遺伝子を標的とし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。また、この検出系を用いた分離株における解析で同定できない株がなかったことから、今後、解析対象を増やして確認する必要があるものの *E. albertii* においては H 抗原型の多様性はそれほど高くない可能性が示唆された (論文投稿中)。

## (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

これまでに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。昨年度は食肉の汚染状況を最確数法を用いて調査した。今年度は水耕栽培野菜と魚介類におけるアルコバクター属菌の汚染状況を調査した。今回の調査結果から、水耕栽培野菜における *A. butzleri* の汚染率、汚染菌数がとも

に非常に高いことが明らかになった。特にブロッコリスプラウトにおける汚染菌数が非常に高く、陽性となった5検体中、4検体で11,000 MPN/100gを超えていた。魚介類における汚染状況は、水耕栽培野菜と比べて菌数は少なかったが、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii*が検出された。以上の結果から、水耕栽培野菜、魚介類ともにアルコバクテラ属菌の汚染率、汚染菌数が高く、もし、アルコバクテラ属菌が食中毒を引き起こしているとすると、その原因食品となりうる可能性が示唆された。今後、さらに検体数を増やし、調査を行っていく必要があると思われる。

#### [2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析

室温を想定しての25°Cおよび10°C、チルドを想定しての4°C、冷凍を想定しての-20°Cの4つの培養温度で*A. butzleri*を培養した。4°Cでは、菌数は減少していくが、生菌特異的PCRによる菌量に変化は見られず、7日間は生存し、ラセン桿菌の形態が球状菌化することが確認された。*A. butzleri*はカンピロバクテラに近縁の細菌であるため、カンピロバクテラ同様に、いわゆる生きているが培養できない状態(VBNC)になったのではないかと考えられた。カンピロバクテラに関しては、VBNC状態の細菌が動物の腸管に入ると、再び増殖を開始するとの報告がこれまでにある。このことから、VBNC状態の*A. butzleri*も食中毒の原因となる可能性が考えられた。

また、-20°Cでも*A. butzleri*がVBNC状態になった可能性が示唆された。さらに、*A. butzleri*は海水の塩濃度に近い3.0%のNaCl濃度の環境で増殖できることが明らかになった。加えて、アルカリ域に耐性はないが、酸性域において*A. butzleri*はVBNC状態で長期間生存できることが明らかになった。また、*A. butzleri*は低水分活性条件では増殖できないが、VBNC状態での生存も示唆された。これらの情報は、アルコバクテラが関連する食品の衛生管理を考える上で、重要な知見である。

#### 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*E. albertii*特異的リアルタイムPCRは検出性に優れることが判明した。②modified EC培地に薬剤AおよびBを添加、DHL寒天培地に薬剤CおよびDを添加した選択培地を開発した。③食中毒事例での調査において②で示した培地を使用し原因食品を明らかにした。④食品検体709検体中1検体で*E. albertii*が分離され、食品汚染の可能性が示された。⑤*E. albertii*は食品中で中温で増殖し、低温で増殖が抑制されること、環境水中では低温で生残し、中温では死滅しやすいことが判明した。環境から農作物、家畜等への汚

染が起こることが推察された。また、(2) *E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、①病原性に関わると考えられる遺伝子について、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。②病原因子 TccP について、配列相同性の異なるバリエーションを同定した。③鞭毛抗原（H 抗原）は 4 種類の H 抗原遺伝子型しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。④EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、①汚染実態調査によって水耕栽培野菜と魚介類はアルコバクターによる食中毒の原因食品となりうる可能性が示された。②アルコバクターの低温での生存、酸性への耐性、高塩濃度での増殖、VBNC 状態で生存の可能性等が判明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Ohya, K., Konno, T., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Asano, Y., Maruyama, H., Uchiyama, H., Takara, T., and Hara-Kudo, Y. Evaluating methods for detecting *Escherichia albertii* in

chicken meat. *Journal of Food Protection*, 84(4), 553-562, 2020.

大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特徴. *食品衛生研究*. 70:19-35. 2020.

Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y. Presence and quantification of pathogenic *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail meats available in Japan. *Letters in Applied Microbiology* (in press)

Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., Hara-Kudo, Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. (投稿予定)

Arai et al. Detection of *Escherichia albertii* from retail chicken in Japan using a novel quantitative polymerase chain reaction assay. (投稿予定)

(学会等発表)

大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* による最近の食中毒の状況と検査法. 令和 2 年度鹿児島県獣医公衆衛生講習会, 鹿児島, 2020.

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

令和2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] *E. albertii*特異的リアルタイムPCR開発の検討：昨年度までに開発した *E. albertii*特異的リアルタイムPCRは1 CFU/25 g 鶏肉で検出が可能であり検出性に優れることが明らかになった。[2] *E. albertii*選択培地の開発：modified EC培地に薬剤AおよびBを添加した選択増菌培地、DHL寒天培地に薬剤CおよびDを添加した選択分離培地を検討し、鶏肉からの *E. albertii*分離に優れた選択培地を開発した。[3] *E. albertii*食中毒事例での原因食品の解析：食中毒事例での原因食品調査において、選択剤A添加mEC培地およびキシロース・ラムノース添加DHL培地によって食品1検体から *E. albertii*を分離した。[4] 食品等における *E. albertii*汚染実態調査：食品検体709検体中1検体で *E. albertii*特異的PCRが陽性であり本菌が分離され、汚染率は低いですが食品汚染の可能性が示された。[5] *E. albertii*の食品・環境中での挙動：*E. albertii*汚染食品の中温での保管によって本菌が増殖するが、低温では増殖が抑制されることが判明した。また、環境水中では低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになった。環境水中に生存する *E. albertii*によって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。

#### 研究協力者

埼玉県衛生研究所	佐藤美佳、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
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、高橋陽子

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
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
大津市保健所	安田敬子、小椋容子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、森村実加、松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	浅野由紀子
熊本県保健環境科学研究所	前田莉花
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、大山み乃り、久手堅 剛
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
福岡市保健環境研究所	松永典久
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
鹿児島大学	大岡唯祐
東海大学海洋学部	鈴木恭平、後藤慶一
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、都丸亜希子、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。日本では *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が可能になると考え、また、令和元年(2019)年度の研究成果を発展させて、令和 2 年(2020) 年度には、[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討、[2] *E. albertii* 選択培地の開発、[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析、[4] 食品等における *E.*

*albertii* 汚染実態調査、[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動、を行った。

[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討では、開発したリアルタイム PCR 法の鶏肉検体での検出性および以前に特異性・感度を検討した nested PCR と比較し評価した。[2] *E. albertii* 選択培地の開発では、食中毒事例における原因食品調査に有用な選択培地の開発を食品検体として鶏肉を対象として、これまでの基礎検討の結果を応用して行った。[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析では、地方自治体の食中毒原因食品解明に協力し、これまでに検討していた選択培地を中心にした培養法および開発したリアルタイム PCR 法を用いて実施した。[4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査では、令和元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・ヒト便検体から本菌の分離を行った。[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動では、食品検体 4 種類および環境水検体 2 種類を供試して、低温および中温下で本菌の菌数挙動を培養法およびリアルタイム PCR 法にて解析した。

## B. 研究方法

[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

昨年度設計した *E. albertii* 特異的リ

リアルタイム PCR (EA\_rt2) について、まずは FAM/ZEN/IBFQ および FAM/BHQ1 標識の 2 種類のプローブを用いた特異性試験を実施した。*E. albertii* 43 株および各種食中毒細菌や食品由来細菌 29 株の合計 71 株を供試した。NucleoSpin Tissue キットにより抽出した DNA の濃度を測定し、2 ng/ $\mu$ L に統一した。EA\_rt2 のみを検出する条件 (Single) に加え、食品培養液中の細菌全般を検出する 16S rRNA 遺伝子をも標的とした条件 (Duplex) の 2 通りのリアルタイム PCR を行った。50°C2 分および 95°C10 分の熱変性のうち、95°C15 秒-60°C1 分を 45 サイクル増幅反応させた。次に、*E. albertii* 培養液によるリアルタイム PCR の感度を測定した。想定  $10^9 \sim 10^2$  cfu/mL の *E. albertii* type strain (JCM 17328<sup>T</sup>) の菌培養液とその希釈液からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出し、前述の条件にてリアルタイム PCR を実施した。さらに、食品 (鶏肉) 培養液を利用してリアルタイム PCR の感度を検討した。鶏肉検体に 9 倍量の mEC および NmEC を加えて培養し、この鶏肉培養液にて *E. albertii* 4 株の各増菌培養液を 10 倍階段希釈した。この菌接種鶏肉培養液からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出 (想定  $10^3 \sim 10^{-1}$  cfu/ $\mu$ L) し、リアルタイム PCR を実施した。次に、菌を接種した鶏肉でのリアルタイム PCR 検出を検討した。前述と同じ *E. albertii* 4 菌株

の培養液を PBS にて 10 倍階段希釈した。希釈菌液を鶏肉に接種 (想定  $10^3 \sim 1$  cfu/25 g 鶏肉) し、mEC および NmEC 中にて培養後、DNA を抽出し、リアルタイム PCR を実施した。最後に、主に平成 30 年度の本研究事業にて nested PCR を行った鶏肉 (内臓肉も含む) の DNA をリアルタイム PCR に供試し、鶏検体での汚染実態調査を実施した。

#### [2] *E. albertii* 選択培地の開発

選択増菌培地として、薬剤 A および薬剤 B を添加した mEC 培地 (mEC+AB 培地) を開発するため、薬剤 A 濃度 Ia から VIa および薬剤 B 濃度 Ib から VIb の範囲で *E. albertii* を選択的に増殖させる至適濃度を検討した。薬剤 A および薬剤 B を単独あるいは組合せて mEC 培地に添加し、*E. albertii* 3 株 および鶏肉由来細菌 3 株 (*Escherichia fergusonii* 2 株 および *Morganella morganii* 1 株) を接種して 42°C にて  $18 \pm 2$  時間培養し、*E. albertii* を選択的に増殖させる濃度の組合せを決定した。さらに、決定した薬剤濃度の mEC+AB 培地で *E. albertii* 194 株 および鶏肉由来細菌 20 株を 42°C で  $22 \pm 2$  時間培養し、各菌株に対する増殖抑制作用を解析した。加えて、*E. albertii* を接種した鶏肉懸濁液を複数の薬剤濃度 (薬剤 A 濃度 Ia、IIIa、Va および薬剤 B 濃度 Ib、IIIb、Vb の組合せ) の mEC+AB 培地で 42°C にて  $22 \pm 2$  時間培養し、培養液をキシロース・ラムノース添加 DHL

寒天培地に塗抹して、生菌数を算出した。一方で、選択分離培地として、薬剤 C および薬剤 D を添加した DHL 寒天培地 (DHL+CD 培地)を開発するため、添加する薬剤の至適濃度を検討した。薬剤 C を終濃度が 0.0625 µg/mL~4 µg/mL となるように、また、薬剤 D を終濃度が 1.25 mg/mL~80 mg/mL となるようにそれぞれ単独でミュラーヒントンプロス培地に添加した。作製した培地で *E. albertii* および鶏肉由来細菌を 37°Cにて 22±2 時間培養し、暫定的な至適濃度を決定した。次に薬剤 C を 0.006 µg/mL~0.2 µg/mL および薬剤 D を 5 mg/mL~10 mg/mL の濃度となるように混合添加した DHL 寒天培地を作製し、*E. albertii* および鶏肉由来細菌を画線した。37°Cで 20±2 時間培養した後にコロニーの発育状況を観察して、薬剤の至適濃度を決定した。決定した濃度の DHL+CD 培地に *E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株を画線し、37°Cで 20±2 時間培養した後、コロニーの発育状況を観察した。

### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

原因となったことが疑われる食事の冷凍保管検食、それら食品の混合培養液 (冷蔵) または個別培養液 (冷蔵) を大津市保健所から 3 回に分けて受け取った。また、食品混合培養液からの分離株、患者便からの分離株および B 施設での食中毒患者便からの分離株を受け取っ

た。第 1 回送付検体および第 2 回送付検体のうちの食品検体については、mEC 培地で増菌培養し、当所で開発した *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR に供試した。また、*E. albertii* の選択分離培地としてキシロース・ラムノースを添加した DHL (XR-DHL) 培地およびマッコンキー (XR-MAC) に画線し培養した。また、NmEC 培地にて二次増菌し、リアルタイム PCR および XR-DHL 培地への画線に供試した。第 2 回送付検体のうち食品の混合培養液および個別培養液については、NmEC 培地にて二次増菌し、リアルタイム PCR で陽性と判定された検体の培養液を XR-DHL 培地に画線した。生育したコロニーをリアルタイム PCR に供試し、*E. albertii* であるか確認した。第 3 回送付検体の食品の増菌培養液については、リアルタイム PCR に供試し、陽性と判定された検体のみを選択剤 A を添加した mEC (A-mEC) 培地にて増菌培養した。増菌培養液は、リアルタイム PCR および XR-DHL 培地への画線に供試された。生育したコロニーをリアルタイム PCR に供試し、*E. albertii* であるか確認した。上記試験によって *E. albertii* であることが確認された分離株を滋賀刑務所食中毒患者由来株および B 施設食中毒患者由来株とともに O 抗原遺伝子型別 (EA0-genotyping) および Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR による型別に供試した。なお、当所に保

管する *E. albertii* 3 株を参考株とした。

#### [4] 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 709 検体と環境（施設の拭き取り）検体 60 検体の計 769 検体を収集、試験した。また、計 570 検体のヒト便検体を試験した。食品検体および環境検体は、BPW または mEC 等で増菌し、その培養液を通常の試験法で使用する培地（マッコンキー寒天培地、DHL 等）で培養し、乳糖非分解の菌株を釣菌した。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。

次に、分離株の 0 抗原型を PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。集団食中毒事例 (11 事例) の患者、食品、および従事者由来株 35 株に加え、下痢症および無症状保菌者由来株 16 株、動物由来株 13 株、食品由来株 9 株、および環境由来株 2 株の合計 75 株の *E. albertii* を供試した。アルカリ熱抽出により DNA を抽出した。大岡らの方法に従い、KOD Multi &Epi を用いた Multiplex PCR を行った。94°C 2 分の熱変性ののち、94°C 10 秒 - 60°C 30 秒 - 68°C 30 秒を 25 サイクル増幅反応させた。3 プライマーセットのいずれでも型別用の PCR 産物が確認されなかった場合には、型別不能 (UT) とした。

#### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

国産トリ肉、国産ブタ肉、イワガキおよびマガキ各 25g を食品検体とし、*E. albertii* を  $10^2 \sim 10^4$  CFU 接種した後に、4°C、10°C、20°C および 30°C で 6 時間から 3 日間保管した。保管後の検体に滅菌 PBS 225 mL を加えてストマッカー処理し、これを原液乳剤とした。原液乳剤を希釈し、XR-DHL 培地で培養し、生育コロニー数から菌数を算出した。加えて、原液乳剤を用いて *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR による菌数の定量分析を行った。また、環境水検体として、埼玉県内および千葉県内の井戸水、神奈川県内の海水を採水し、*E. albertii* を 40 ~ 400 CFU/mL となるよう接種した後に、4°C、10°C、20°C および 30°C で 9 日間静置し、経時的に菌数の算出およびリアルタイム PCR による菌数の定量分析を行った。

### C. 研究結果

#### [1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

特異性試験では、FAM/ZEN/IBFQ および FAM/BHQ1 標識プローブを用いた EA\_rt2 共に供試した 43 株の *E. albertii* が陽性となり、29 株のその他細菌種では全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液による感度測定では、FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ (Duplex) の条件、

FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ (Single) および FAM/BHQ1 標識プローブ (Single および Duplex) の条件でそれぞれ検出限界は 0.3 cfu/PCR tube (=6.8×10<sup>3</sup> cfu/mL) と 3.4 cfu/PCR tube (=6.8×10<sup>2</sup> cfu/mL) となった。また、16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA\_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かった。さらに、いずれの条件でも菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた。食品培養液での感度の検討では、FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時は、mEC および NmEC で共に 5.4~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10<sup>3</sup>~1.5×10<sup>3</sup> cfu/mL) が検出限界となった。FAM/BHQ1 標識プローブ使用時の検出限界は、mEC の場合 0.6~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10<sup>2</sup>~1.5×10<sup>3</sup> cfu/mL)、NmEC の場合 0.5~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10<sup>2</sup>~1.5×10<sup>3</sup> cfu/mL) となった。菌を接種した鶏肉での検討では、FAM/ZEN/IBFQ および FAM/BHQ1 標識プローブで共に 1.2~1.4 cfu/25 g 鶏肉以上の *E. albertii* を接種した条件にて遺伝子が検出された。鶏検体での汚染実態調査では、合計 20 検体の市販鶏肉を試験し、1st PCR は全検体が陰性、2nd PCR は鶏検体 a の 1 検体が陽性、リアルタイム PCR は鶏検体 a の 2 検体が陽性であった。次に、養鶏場から直接購入した各種臓器を含む合計 17 種類の鶏検体について、mEC および NmEC にて増菌した培養液合計 234 検体を試験したところ、1st PCR は 26 検体、2nd

PCR は 37 検体、リアルタイム PCR は 54 検体が陽性であった。

## [2] *E. albertii* 選択培地の開発

選択増菌培地の薬剤濃度の検討では、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の組合せの mEC+AB 培地が *E. albertii* の増殖を抑制せずに、最も強く鶏肉由来細菌の増殖を抑制した。この薬剤濃度の mEC+AB 培地では、*E. albertii* は 194 株中すべての菌株の増殖が認められ、鶏肉由来細菌は 20 株中 3 株 (15%) で増殖が認められた。*E. albertii* 接種鶏肉の mEC+AB 培地増菌培養液では、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の組合せにおいても *E. albertii* の増殖は抑制されなかったが、鶏肉由来細菌の増殖は薬剤 A および B の濃度依存的に抑制された。選択分離培地の薬剤濃度の検討では、薬剤 C は *E. albertii* に対して、0.0625 µg/mL から 0.125 µg/mL 以上で増殖抑制が認められた。一方で、*E. fergusonii* に対しては、0.125 µg/mL 以上の濃度で 1 株に増殖抑制が認められたが、もう 1 株に対しては増殖抑制を示さなかった。*M. morgani* に対しては、0.0625 µg/mL 以上の濃度で強い増殖抑制が認められた。薬剤 D は *E. albertii* に対して、20 から 40 mg/mL 以上で増殖抑制が認められた。*E. fergusonii* に対しては、2.5 mg/mL 以上の濃度で、*M. morgani* に対しては、20 mg/mL 以上で増殖抑制が認められた。上記の結果を元に作製した薬

剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地に菌株を画線培養したところ、*E. albertii* 株は 194 株中 171 株 (88.1%) が発育良好、15 株 (7.7%) が発育抑制、8 株で非発育であった。鶏肉由来菌株は 20 株中 11 株 (55%) が発育良好、3 株 (15%) が発育抑制、6 株 (30%) で非発育であった。

### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

第 1 回送付検体の培養液は全てリアルタイム PCR で陰性であり、XR-MAC または XR-DHL 培地での分離でも、*E. albertii* のコロニーは分離できなかった。第 2 回送付検体の食品混合物の BPW 増菌培養液を、NmEC 培地で二次増菌した培養液では、リアルタイム PCR で陽性が確認され、XR-DHL 培地へ画線したところ、*E. albertii* が分離された。しかし、食品単体の二次増菌培養液は全てリアルタイム PCR 陰性であった。3 回目を受け入れた各食品の BPW 増菌培養液をそのままリアルタイム PCR に供したところ、春雨中華サラダの培養液が陽性 (Ct 値：約 30) となった。しかし、XR-DHL 培地による *E. albertii* の分離には至らなかった。続いて A-mEC 培地による二次増菌を試みた結果、培養液はリアルタイム PCR で陽性 (Ct 値：約 20) を示し、XR-DHL 培地での培養によって *E. albertii* が分離された。本試験で分離された春雨中華サラダ由来株および食品混合物由

来株および患者由来株 (滋賀刑務所および B 施設) は、いずれも 0 抗原遺伝子型が EA0g4 で一致した。また、RAPD-PCR による型別でも、いずれの株も同一のバンドパターンを示した。

### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

食品・環境検体での汚染実態調査では、食品検体 709 検体のうち 1 検体から *E. albertii* の遺伝子が検出され、その検体から本菌が分離された。また、環境検体 60 検体からは *E. albertii* の遺伝子が検出されず、ヒト便検体 570 検体からは *E. albertii* は分離されなかった。

分離株の EA0-genotyping では、集団食中毒事例由来の 26 株が EA0g1、EA0g2、EA0g5、EA0g8、EA0g9、EA0g11、EA0g12、EA0g18、EA0g25 の 6 種類の EA0g 型いずれかに型別され、9 株は型別不能であった。2005 年の事例では、2 つの型 (EA0g25 および UT)、2019 年の事例では 3 つの型 (EA0g9、EA0g18、および EA0g25) が同時に検出された。下痢症および無症状保菌者由来株では、EA0g2、EA0g3、EA0g4、EA0g8、EA0g9 および EA0g28 の 6 種類に型別され、無症状保菌者由来の 2 株を含む合計 5 株は型別不能であった。2015 年に分離された下痢症患者由来株 1 株は EA0g3 と EA0g29 の両方で PCR 産物が確認された (EA0g3/29)。動物由来株では、EA0g3、EA0g4、EA0g7、EA0g8、EA0g16 および EA0g25 の 6 種類に型別され 13 株中

1株が型別不能であった。食品由来株では、9株中各1株がEA0g3およびEA0g40と型別され、7株は型別されなかった。環境由来株2株は、それぞれEA0g23およびEA0g40に型別された。

#### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

*E. albertii* を接種した食品検体（国産ブタ肉、国産トリ肉、マガキおよびイワガキ）を20℃あるいは30℃で保管した結果、すべての検体で菌数が増加した。20℃に保管したマガキ検体の菌数は1日後から2日後にかけて菌数の増加が弱い傾向であったが、マガキ以外の検体の菌数は急激な増加を示した。一方で、4℃および10℃では、いずれの食品検体も測定期間を通して菌数の大きな増減はみられなかった。また、*E. albertii* を接種した環境水検体を20℃あるいは30℃で保管した結果、すべての検体で菌数が減少した。20℃よりも30℃で、井戸水検体よりも海水検体で、菌数減少の傾向が著しかった。4℃および10℃では、井戸水検体の菌数は測定期間中ほぼ変化しなかったのに対して、海水検体の菌数は計数期間を通して緩やかに減少した。

#### D. 考察

##### [1] *E. albertii* 特異的リアルタイムPCR開発の検討

FAM/ZEN/IBFQ および FAM/BHQ1 標識プ

ローブを用いた EA\_rt2 共に *E. albertii* のみを増幅したため、特異性が高かった。*E. albertii* 株培養液による感度測定では、いずれの蛍光標識であっても検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていることが示された。特に、16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA\_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かったため、16S rRNA 遺伝子の増幅が EA\_rt2 の蛍光値に影響を及ぼす可能性が低いと考えられた。食品培養液での感度検討では、*E. albertii* 株培養液を使用した感度測定の際と同様に、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていた。そのため、本試験に用いた鶏肉培養液においては、PCR 阻害は少ないものと予想された。次に、鶏肉に *E. albertii* を接種した検体で検討したところ、検出限界が 1.2~1.4 cfu/25 g であったため、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合は、本試験の条件にて *E. albertii* 数が十分に増菌され、リアルタイム PCR にて検出されることが示された。鶏検体にて本リアルタイム PCR と nested PCR による検体中の *E. albertii* の検出結果を比較したところ、nested PCR 陽性検体は全てリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、17 検体は Nested PCR 陰性でリアルタイム PCR 陽性となったため、鶏検体に関しては、nested PCR よりもリアルタイム PCR の方が検出に優れていることが示され

た。本試験から、本リアルタイム PCR の実検体での応用性が示された。

#### [2] *E. albertii* 選択培地の開発

薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地では *E. albertii* 194 株中 194 株全ての菌株の増殖が認められた一方で、鶏肉由来細菌は 20 株中 17 株の増殖抑制が認められた。さらに、鶏肉乳剤とともに mEC+AB 培地で培養した *E. albertii* は薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地培養液においても増殖が抑制されず、鶏肉乳剤由来の細菌は薬剤 A および B の濃度依存的に増殖が抑制された。薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地が選択増菌培地として有用であることが示された。また、薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地で *E. albertii* 194 株中 171 株が発育良好であり、23 株は発育が抑制あるいは完全に阻害された。DHL+CD 寒天培地は *E. fergusonii* および *M. morgani* に対して強く増殖を抑制するが、*E. albertii* の一部菌株に対しても同様に増殖を抑制してしまうことが示唆された。以上のことから、鶏肉から *E. albertii* を分離するには、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地で増菌培養後に薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地とキシロース・ラムノース添加 DHL 寒天培地の両者を用いて画線培養を行い、菌の分離を

試みることで、*E. albertii* の分離率が向上すると考えられる。

#### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

本事例では、すでに滋賀刑務所での食中毒事例において患者便および原因と疑われる食事に含まれる食品混合検体から大津市保健所にて *E. albertii* が分離されており、個別の食品のうちのいずれが原因食品であるかを解明することに焦点を絞り試験を実施した。結果として、第 3 回送付検体のうち春雨中華サラダの BPW 培養液からリアルタイム PCR にて *E. albertii* が明確に検出されたが、分離が困難であったため、A-mEC 培地にて二次増菌した結果、XR-DHL 培地での培養により *E. albertii* が分離された。今回の試験で分離された春雨中華サラダ由来株が、食品混合物由来株および患者由来株の O 抗原遺伝子型 (EA0g4) と一致していること、また、RAPD-PCR のバンドパターンについても同一であることから、滋賀刑務所での食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。

#### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されている食品も存在することが判明した。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。今年度の環境検体からは *E. albertii* の汚染が検出されなかったものの、過去の報告では、国内の動物の糞便や河川水からの分離報告がある。そのため、動物や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。本菌の同定は難しいが、今後も引き続き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。

集団食中毒事例由来株では、特定の 0 抗原型への偏りが確認されず、国内に様々な 0 抗原型の *E. albertii* が存在することが示された。2 事例では、1 つの事例から複数の EA0g が検出された。そのため、1 事例から複数の分離株が得られた場合には、EA0-gentyping のような遺伝子型別法を実施し、株の相同性を調べることが重要であると考えられる。また、型別不能の株が散見されたため、新規の EA0 型の存在が示唆された。下痢症患者由来株 13 株中 4 株 (31%) が EA0g3 に型別されたが、検出された時期および分離場所に違いが認められたことから、*E. albertii* EA0g3 が日本に広く分布している可能性は否定できない。ヒト由来株の 0 抗原型については今後も継続的にモニタリングする必要があると考えられた。本試験で収集したニワトリ検体は、1 つの県の 2 つの養鶏場より入手したため、特定の 0 抗原型が検出されたと考えられた。また、食品由来株の 1 株は、

環境由来株の 1 株と同一の EA0g40 に型別されたが、採取機関が異なるため、全く別の株と推察された。しかし、食品の汚染源を探る手法として、本 EA0-gentyping は簡易に実施できる有効な型別方法と考えられた。

[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

*E. albertii* の制御法を考える上で、汚染経路の推定は制御の第一歩となる。そこで、家畜など陸生動物由来の汚染経路および海産魚介類由来の経路を考慮し、ブタ肉、トリ肉、井戸水、マガキ、イワガキ、井戸水および海水での *E. albertii* の増殖挙動の解析を行った。その結果、中温である 20°C および 30°C の食品検体中では、接種した *E. albertii* の菌数は一晩で急速に増加することが明らかになったが、低温である 4°C および 10°C では菌数は大きくは変動しないという傾向であった。有機物濃度が低い環境水検体においては、4°C および 10°C の井戸水検体では菌数はほとんど変動せず、海水検体ではゆるやかに減少し、20°C および 30°C の環境水検体では菌数は 4°C および 10°C より比較的早く減少し、この傾向は海水検体の方が顕著であった。これらのことから、*E. albertii* 汚染食品の中温での保管によって本菌が増殖することが考えられるが、低温では増殖を防げることが判明した。また、*E. albertii* 汚染環境水中の

本菌は低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになった。環境水中で菌が生存することによって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。河川等の環境水のさらなる調査は汚染経路の解明に重要であると考えられた。

#### E. 結論

開発した *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR が鶏肉からの本菌検出に優れた感度を有することが明らかになり、鶏肉以外の食品種への応用が期待された。また、食品からの *E. albertii* 分離のための選択増菌培地および選択分離培地を薬剤の種類および添加量の検討を行い、優れた選択培地を開発した。これらを組み合わせ合わせた方法にて、今年度発生した *E. albertii* 食中毒事例での原因食品究明を地方自治体に協力し実施し、原因食品を明らかにした。しかし、定量法によって検出されず、検体の凍結融解の影響も考えられ、発症菌量推定に有用な菌数を得られなかった。食品等における *E. albertii* 汚染実態調査においては、昨年度と同様の食品群で検出された。*E. albertii* は、食品中で中温での保管によって増殖するが、低温では増殖が抑制されることが判明したことから、食中毒防止には温度管理が有効であると考えられる。また、環境水中では低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになったこ

とから、環境水中に生存する *E. albertii* によって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Ohya, K., Konno, T., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Asano, Y., Maruyama, H., Uchiyama, H., Takara, T., and Hara-Kudo, Y. Evaluating methods for detecting *Escherichia albertii* in chicken meat. *Journal of Food Protection*, 84(4), 553-562, 2020.

Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., Hara-Kudo, Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. (投稿予定)

Arai et al. Detection of *Escherichia albertii* from retail chicken in Japan using a novel quantitative polymerase chain reaction assay. (投稿予定)

(学会等発表)

令和3年度に発表予定

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

令和2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

#### *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

#### 研究要旨

日本では、*E. 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、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の確立を目標に研究を行った。その結果、*E. albertii* に特異性が高く、感度も優れた1組のリアルタイムPCRのプライマーおよびプローブが選定された。*E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養して、そこから検出したところ、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合でリアルタイムPCR陽性となった。さらに、実際の鶏検体においても以前検討した nested PCR よりも *E. albertii* の検出に優れていることが示されたため、実試験での応用性も示された。今後食中毒事例発生時や、食品などの汚染実態を調査する際に本リアルタイムPCRを活用し、試験を実施したい。

#### 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

#### A. 研究目的

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(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* の検査法を確立することが求められている。

*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。昨年度は、*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セットを設計し、その反応組成と特異性試験を実施した。今年度は、昨年度選定したプライマーおよびプローブセットにおいて、検討した反応条件を元に、感度測定や食品培養液を用いた検討を実施した。さらに、実際の鶏検体への応用性についても検討した。

## B. 研究方法

### (1) 特異性試験

昨年度 *E. albertii* 特異的リアルタイムPCR用の1組のプライマーおよびプローブ候補(EA\_rt2)を設計した。その特異性試験の際に、ZENとIBFQの2種類のクエンチャーで標識したFAM/ZEN/IBFQ標識プローブを使用していたため、今年度はより広く使用されているFAM/BHQ1標識プローブを用いて改めて特異性試験を実施した。また、新たに菌株を追加し、特異性を

再評価した。

### 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43株の *E. albertii* を供試した(表1)。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25菌種、29株を供試した(表1)。

### 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 μL)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 μL)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 ng/μL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

EA\_rt2 (表 2) のプライマーおよび 2 種類のプローブそれぞれを供試し、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 DNA 溶液を 5  $\mu$ L 加えた。リアルタイム PCR は、EA\_rt2 のみを検出する条件 (Single) に加え、食品培養液中の細菌全般を検出し、食品による PCR 阻害の評価に利用される 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーおよびプローブを混合した条件 (Duplex) の 2 通りを行った (表 3)。この 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーおよびプローブの配列および反応溶液中の濃度は、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の条件を利用した。1 菌株につき 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°C2 分および 95°C10 分の熱変性ののち、95°C15 秒-60°C1 分を 45 サイクル増幅反応させた。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) *E. albertii* 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定

#### 1) 菌株

*E. albertii* の type strain である JCM 17328<sup>T</sup> 1 株を供試した。

### 2) DNA 抽出

カジトン培地に保存している菌株 1 エーゼ分 (10  $\mu$ L) を TSB10 mL に接種し、37°Cにて 18 時間培養した。この菌培養液 1 mL を 10,000 $\times$ g にて 10 分間遠心し、沈渣に滅菌リン酸緩衝食塩水 (滅菌 PBS) を 1 mL 加え混和した溶液を原液とした。滅菌 PBS にて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-7</sup> まで 10 倍階段希釈し、原液から 10<sup>-7</sup> の希釈溶液 (想定 10<sup>9</sup>~10<sup>2</sup> cfu/mL) の各 100  $\mu$ L を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100  $\mu$ L を 10,000 $\times$ g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85  $\mu$ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15  $\mu$ L 加え、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) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA\_rt2 の 2 種類についてそれぞれ Single と Duplex の 2 通りを行った (表 3)。1 濃度につき 3 反応実施した。

### (3) リアルタイム PCR の食品培養液での感度の検討

*E. albertii* は野鳥からの分離報告が多く、過去に鶏肉からも分離されているため (Asoshima *et al.*, Jpn. J. Infect. Dis., 2015, 68, 248-250; Maeda *et al.*, J. Vet. Med. Sci.,

2015, 77(7), 871-873; Wang *et al.*, *Epidemiol. Infect.*, 2016, 144, 45-52)、鶏肉培養液を利用し感度を検討することとした。

#### 1) 菌株

食中毒事例由来株である EA12、EA21、EA24、EA29 の 4 株を供試した。

#### 2) DNA 溶液の調製

カジトン培地に保存している 4 株の 1 エーゼ分 (10  $\mu$ L) をそれぞれ TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。鶏肉検体を 25 g 採取し、modified EC 培地 (mEC、日水製薬) およびノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42°C にて 22 $\pm$ 2 時間培養した。この鶏肉培養液にて *E. albertii*4 菌株の増菌培養液を 10 倍階段希釈し、菌接種鶏肉培養液 (想定 10<sup>6</sup>~10<sup>2</sup> cfu/mL 鶏肉培養液) を調製した。菌接種鶏肉培養液各 100  $\mu$ L を上記アルカリ熱抽出法に供試した。抽出 DNA をリアルタイム PCR のテンプレート (想定 10<sup>3</sup>~10<sup>-1</sup> cfu/ $\mu$ L) とした。

#### 3) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA\_rt2 の 2 種類についてそれぞれ Duplex にて行った。1 濃度につき 3 反応実施した。

#### (4) 菌を接種した鶏肉でのリアルタイム

#### PCR 検出の検討

前述の (3) 1) と同様に *E. albertii*4 菌株の 1 エーゼ分 (10  $\mu$ L) をそれぞれ 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<sup>4</sup>~10<sup>1</sup> cfu/mL) した。希釈菌液各 100  $\mu$ L を鶏肉 25 g に接種 (想定 10<sup>3</sup>~1 cfu/25 g 鶏肉) し、mEC および NmEC 225 mL を加えて 1 分間ストマッカー処理し、42°C にて 22 $\pm$ 2 時間培養した。培養液 100  $\mu$ L から上記アルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。抽出 DNA をリアルタイム PCR のテンプレートとした。リアルタイム PCR は、前述の (3) 3) と同様に実施した。

#### (5) 鶏検体での汚染実態調査

主に平成 30 年度の本研究事業にて nested PCR を行った鶏肉 (内臓肉も含む) の DNA を用いて、今回開発したリアルタイム PCR を実施した。過去の nested PCR は 1 検体あたり 1 反応のみ実施していたため、リアルタイム PCR の結果と一致しなかった場合は、追加で 2 反応を実施し、合計 3 反応とした。

#### 1) Nested PCR

Nested PCR は、Ooka らが報告した方法 (*Genome. Biol. Evol.*, 2015, 7(12), 3170-3179) を参照した。酵素は、平成 30 年度の本研究事業にて報告した最も感度の優れていた TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。また、プライマー

(表 4) は、終濃度が 0.3  $\mu\text{M}$  となるよう調製した。機器は MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Global Medical Instrumentation) を使用した。反応条件は、94°C 2 分間、94°C 30 秒間 - 54°C 30 秒間 - 68°C 1 分間の 30 サイクル、68°C 2 分間とした。1st PCR 後にその産物を ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって精製し、それを用いて nested PCR の 2 段階目 (2nd PCR) を実施した。1st PCR および 2nd PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供試し、結果を判定した。

## 2) リアルタイム PCR

前述の (1) 3) と同様に実施した。但し、FAM/BHQ1 標識プローブを使用した EA\_rt2 について Duplex にて行った。1 検体につき 3 反応実施した。

## C. 研究結果

### (1) 特異性試験

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブを用いた EA\_rt2 および FAM/BHQ1 標識プローブを用いた EA\_rt2 共に供試した合計 43 株の全 *E. albertii* が陽性となり、合計 29 株のその他全ての細菌種では、陰性となった (表 1)。

### (2) *E. albertii* 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定

FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時に Duplex の条件下では、0.3 cfu/PCR

tube ( $=6.8 \times 10$  cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 5)。FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時に Single の条件下、FAM/BHQ1 標識プローブ使用時に Single および Duplex の条件下では、3.4 cfu/PCR tube ( $=6.8 \times 10^2$  cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 5)。

得られた Ct 値と蛍光値をプロットした像では、いずれの条件でも等間隔に蛍光が検出されており (図 1~図 4)、特に Duplex の条件下では 16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA\_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かった (図 2、図 4)。また、いずれの条件でも菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた (図 5~図 8)。

### (3) リアルタイム PCR の食品培養液での感度の検討

FAM/ZEN/3IABkFQ 標識プローブ使用時は、mEC および NmEC で共に 5.4~7.5 cfu/PCR tube ( $=1.1 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^3$  cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 6)。FAM/BHQ1 標識プローブ使用時は、mEC の場合 0.6~7.5 cfu/PCR tube ( $=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$  cfu/mL)、NmEC の場合 0.5~7.5 cfu/PCR tube ( $=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$  cfu/mL) において 3 反応中 3 反応で遺伝子を検出した (表 6)。

### (4) 菌を接種した鶏肉でのリアルタイム PCR 検出の検討

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブおよび

FAM/BHQ1 標識プローブで共に 1.2~1.4 cfu/25 g 鶏肉以上の *E. albertii* を接種した条件にて遺伝子が検出された (表 7)。

#### (5) 鶏検体での汚染実態調査

合計 20 検体の市販鶏肉を試験したところ、1st PCR は全検体で陰性であった (表 8)。また、鶏肉部位 a の 1 検体が 2nd PCR 陽性であり、この 1 検体を含む鶏肉部位 a の 2 検体がリアルタイム PCR 陽性となった (表 8)。但し、2nd PCR およびリアルタイム PCR の両方で陽性となった鶏肉部位 a 検体 (ブランド H) はリアルタイム PCR において 3 反応中 3 反応が陽性 (Ct 値: 35.7、35.8、36.6) であり、リアルタイム PCR でのみ陽性となった鶏肉部位 a 検体 (ブランド A) は 3 反応中 1 反応が陽性 (Ct 値: 41.0) であった。

次に、養鶏場から直接購入した内臓 a~q の合計 17 種類の鶏検体について、mEC および NmEC にて増菌した培養液合計 234 検体を試験したところ、1st PCR は 26 検体、2nd PCR は 37 検体、リアルタイム PCR は 54 検体が陽性であった (表 9)。1st PCR で陽性の 26 検体は全て 2nd PCR 陽性であり、Nested PCR で陽性の 37 検体は全てリアルタイム PCR 陽性となった。

#### D. 考察

FAM/ZEN/IBFQ 標識プローブを用いた

EA\_rt2 および FAM/BHQ1 標識プローブを用いた EA\_rt2 共に *E. albertii* のみを増幅し、非特異的反応が認められなかったため (表 1)、特異性が高いことが示された。

*E. albertii* 株培養液によるリアルタイム PCR の感度測定では、いずれの蛍光標識であっても検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていることが示された (表 5)。特に、Duplex の条件下において、16S rRNA 遺伝子の蛍光値が EA\_rt2 の蛍光値よりも大幅に低かった (図 2、図 4) ことから、16S rRNA 遺伝子の増幅が EA\_rt2 の蛍光値に影響を及ぼす可能性が低いと考えられた。今回利用した 16S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーおよびプローブ配列、さらにその濃度は、腸管出血性大腸菌の食品での検査法と共通の条件を参照したが、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR においても Duplex の条件として利用可能であることが示された。

食品培養液でのリアルタイム PCR の感度を検討したところ、*E. albertii* 株培養液を使用した感度測定の際と同様に、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていることが示された (表 6)。そのため、本試験に用いた鶏肉培養液においては、PCR 阻害は少ないものと予想される。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、増菌培地による検出感度の差はほとんど認められなかった。

次に、鶏肉に *E. albertii* を接種した検体で検討したところ、1.2~1.4 cfu/25

gであった(表7)ため、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合は、本試験の増菌培養条件にて *E. albertii* 数が十分に増え、リアルタイム PCR にて検出できることが示された。なお、鶏肉の培養を mEC および NmEC で行ったが、増菌培地による検出感度の差は認められなかった。

鶏検体にて本リアルタイム PCR と nested PCR による検体中の *E. albertii* の検出結果を比較したところ、nested PCR 陽性検体は全てリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、Nested PCR 陰性でリアルタイム PCR 陽性の結果が得られた検体が 17 検体存在したことから、鶏検体に関しては、nested PCR よりもリアルタイム PCR の方が検出に優れていることが示された。本試験から、本リアルタイム PCR の実検体での応用性が示された。

#### E. 結論

*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR として、EA\_rt2 の特異性と感度を測定したところ、本リアルタイム PCR は特異性が高く、感度も優れていることが示された。さらに、*E. albertii* を接種した食品検体を増菌培養して、そこから検出したところ、鶏肉 25 g あたりに 1 cfu 以上の *E. albertii* が汚染している場合でリアルタイム PCR 陽性となった。さらに、実際の鶏検体においても、以前検討した nested PCR よりも本リアルタイム PCR の方が *E.*

*albertii* の検出に優れていることが示され、実試験での応用性も示された。今後食中毒事例発生時や、食品などの汚染実態を調査する際に本リアルタイム PCR を応用したい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Arai et al. Detection of *Escherichia albertii* from retail chicken in Japan using a novel quantitative polymerase chain reaction assay. (投稿予定)

(学会等発表)

令和 3 年度に発表予定

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

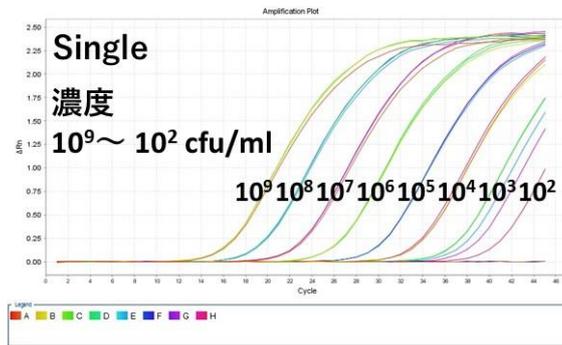


図 1. FAM/ZEN/IBFQ 標識 EA\_rt2 の Single 条件下の Linear 蛍光プロット像

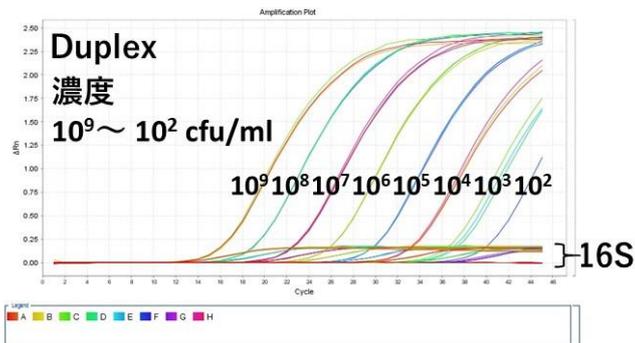


図 2. FAM/ZEN/IBFQ 標識 EA\_rt2 の Duplex 条件下の Linear 蛍光プロット像

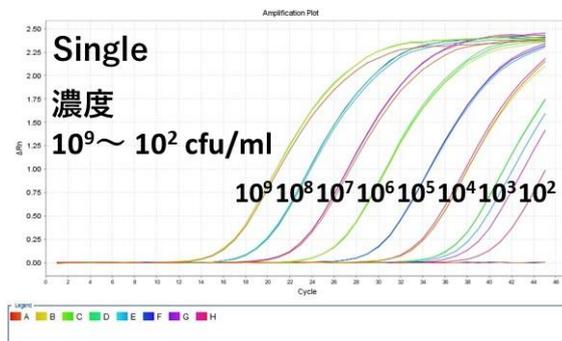


図 3. FAM/BHQ1 標識 EA\_rt2 の Single 条件下の Linear 蛍光プロット像

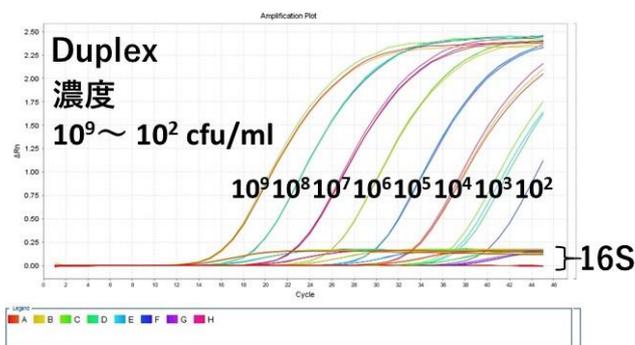


図 4. FAM/BHQ1 標識 EA\_rt2 の Duplex 条件下の Linear 蛍光プロット像

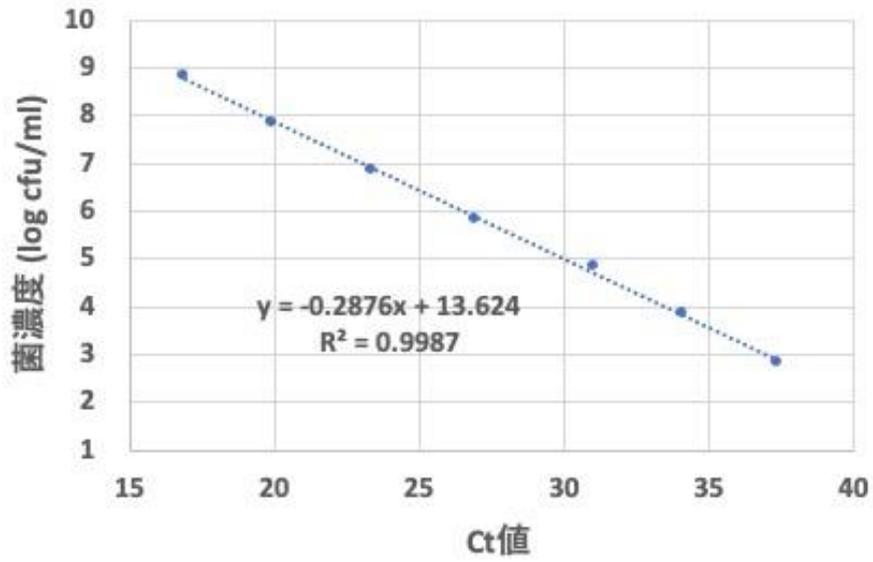


図5. FAM/ZEN/IBFQ標識 EA\_rt2のSingle条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

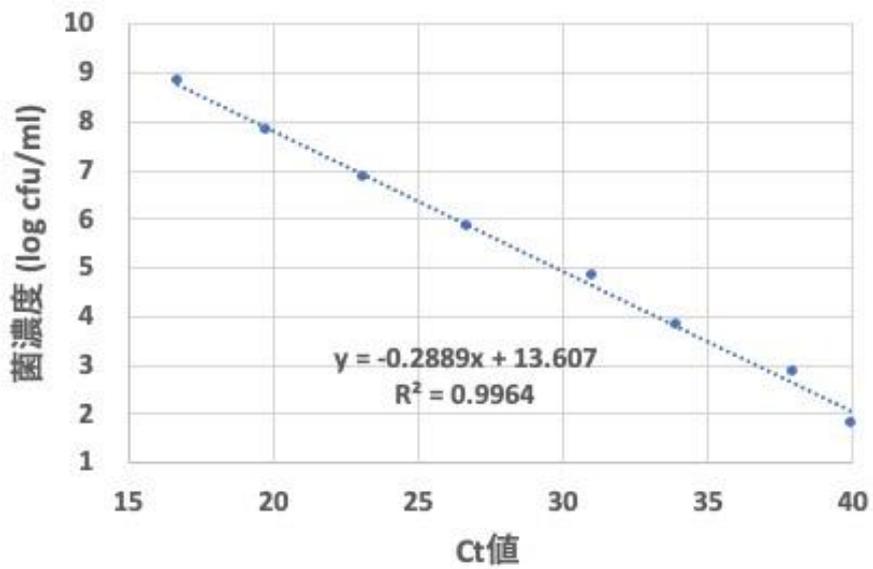


図6. FAM/ZEN/IBFQ標識 EA\_rt2のDuplex条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

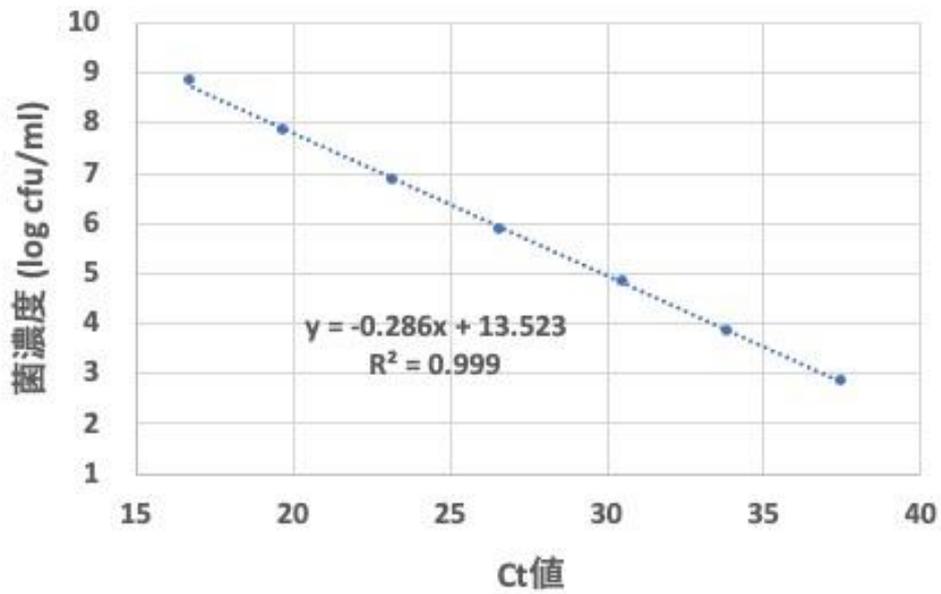


図7. FAM/BHQ1標識 EA\_rt2のSingle条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

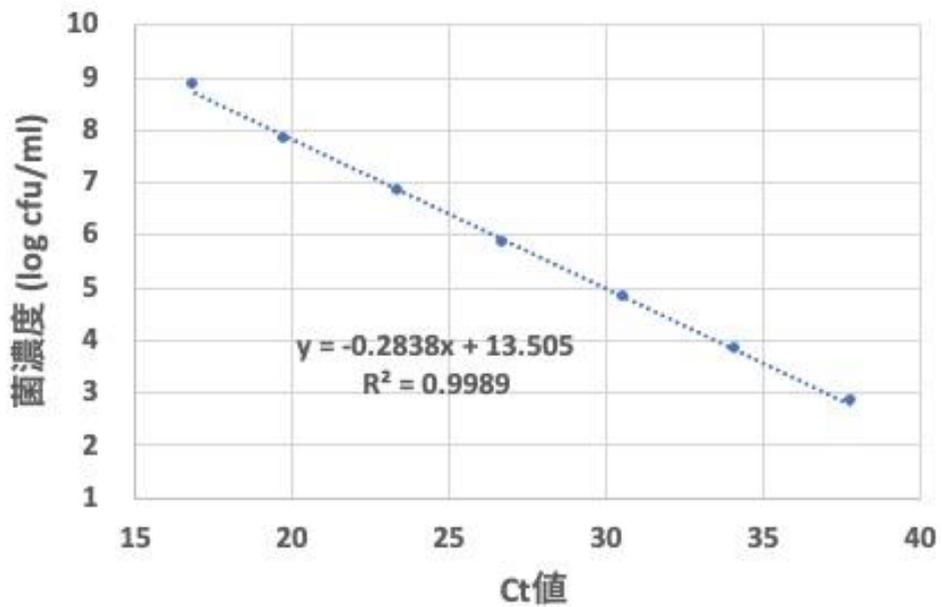


図8. FAM/BHQ1標識 EA\_rt2のDuplex条件下の*E. albertii*を標的とした検量線

表1. 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

細菌種	供試株数	リアルタイムPCR陽性株数	
		FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2	FAM/BHQ1標識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	0	0
<i>Escherichia albertii</i>	43	43	43
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	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> serovar Typhimurium	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	4	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0

表2. *Escherichia 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
FAM/ZEN/3IABkFQ標識 EA_rt2	フォワードプライマー：EA_rt2F リバースプライマー：EA_rt2R プローブ：EA_rt2P (FAM/ZEN/IBFQ)	97 bp
FAM/BHQ1標識 EA_rt2	フォワードプライマー：EA_rt2F リバースプライマー：EA_rt2R プローブ：EA_rt2P (FAM/BHQ1)	97 bp

表3. リアルタイムPCRの1 wellあたりの反応溶液組成

試薬	Single	Duplex
Taqman Environmental Master Mix	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L
20 $\mu$ M EA_rt2F	0.45 $\mu$ L	0.45 $\mu$ L
20 $\mu$ M EA_rt2R	0.45 $\mu$ L	0.45 $\mu$ L
10 $\mu$ M EA_rt2P (FAM標識)	0.45 $\mu$ L	0.45 $\mu$ L
20 $\mu$ M 16S F primer		0.24 $\mu$ L
20 $\mu$ M 16S R primer		0.24 $\mu$ L
5 $\mu$ M 16S probe (HEX標識)		0.6 $\mu$ L
MQ	8.05 $\mu$ L	7.57 $\mu$ L
DNA	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
合計	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L

表4. Nested PCRのプライマー配列

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

表5. 異なるクエンチャー標識を利用したEA\_rt2の検出限界の比較

菌濃度 (cfu/ml)	菌濃度 (cfu/PCR tube)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識クエン チャー		FAM/BHQ1標識クエン チャー	
		Single*	Duplex**	Single	Duplex
$6.8 \times 10^8$	$3.4 \times 10^6$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^7$	$3.4 \times 10^5$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^6$	$3.4 \times 10^4$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^5$	$3.4 \times 10^3$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^4$	$3.4 \times 10^2$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^3$	$3.4 \times 10$	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10^2$	3.4	3/3	3/3	3/3	3/3
$6.8 \times 10$	0.3	1/3	3/3	2/3	1/3

\* *E. albertii*のみを検出する条件

\*\* *E. albertii*および16S rRNA遺伝子を検出する条件

表6. 鶏肉培養液にて*Escherichia albertii*培養液を希釈した場合のリアルタイムPCRにおける異なるプローブでの検出限界の比較

供試菌株	菌濃度 (cfu/ml)	菌濃度 (cfu/PCR tube)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2		FAM/BHQ1標識EA_rt2	
			mEC*	NmEC*	mEC*	NmEC*
EA12	$1.1 \times 10^6$	$5.7 \times 10^3$	3/3	3/3	NT	NT
	$1.1 \times 10^5$	$5.7 \times 10^2$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^4$	$5.7 \times 10$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^3$	5.7	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^2$	0.6	2/3	2/3	3/3	3/3
EA21	$1.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^3$	3/3	3/3	NT	NT
	$1.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^2$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.5 \times 10^3$	7.5	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.5 \times 10^2$	0.8	2/3	2/3	2/3	1/3
EA24	$1.2 \times 10^6$	$6.1 \times 10^3$	3/3	3/3	NT	NT
	$1.2 \times 10^5$	$6.1 \times 10^2$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.2 \times 10^4$	$6.1 \times 10$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.2 \times 10^3$	6.1	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.2 \times 10^2$	0.6	2/3	1/3	1/3	2/3
EA29	$1.1 \times 10^6$	$5.4 \times 10^3$	3/3	3/3	NT	NT
	$1.1 \times 10^5$	$5.4 \times 10^2$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^4$	$5.4 \times 10$	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^3$	5.4	3/3	3/3	3/3	3/3
	$1.1 \times 10^2$	0.5	1/3	2/3	2/3	3/3
非接種			0/3	0/3	0/3	0/3

NT: 試験していない

\*鶏肉の増菌に用いた培地

表7. 鶏肉に *Escherichia albertii* を接種し、増菌培養した場合のリアルタイムPCRにおける異なるプローブでの検出限界の比較

供試菌株	接種菌数 (cfu/25 g鶏肉)	FAM/ZEN/3IABkFQ標識EA_rt2		FAM/BHQ1標識EA_rt2	
		mEC*	NmEC*	mEC*	NmEC*
EA12	1.2 × 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	NT*	NT
	1.2 × 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2	3/3	3/3	3/3	3/3
EA21	1.4 × 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	NT	NT
	1.4 × 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4	3/3	3/3	3/3	3/3
EA24	1.4 × 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	NT	NT
	1.4 × 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.4	3/3	3/3	3/3	3/3
EA29	1.2 × 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	NT	NT
	1.2 × 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2 × 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	1.2	3/3	3/3	3/3	3/3
非接種		0/3	0/3	0/3	0/3

NT: 試験していない

\*鶏肉の増菌に用いた培地

表8. 市販鶏肉の *Escherichia albertii* 汚染実態調査

ブランド	部位	検体数	PCR陽性検体数		
			Nested PCR		リアルタイム
			1st	2nd	PCR
A	a	2	0	0	1
	b	1	0	0	0
	c	1	0	0	0
B	a	3	0	0	0
C	a	1	0	0	0
D	a	2	0	0	0
	d	1	0	0	0
	c	1	0	0	0
E	a	1	0	0	0
F	a	3	0	0	0
G	a	2	0	0	0
	c	1	0	0	0
H	a	1	0	1	1
		20	0	1	2

表9. 養鶏場より直接入手した鶏の*Escherichia albertii*汚染実態調査

臓器	増菌培地	供試検体数	PCR陽性検体数		
			Nested PCR		リアルタイム
			1st	2nd	PCR
a	mEC	21	2	4	4
b	mEC	21	2	2	5
	NmEC	6	0	0	0
c	mEC	20	5	7	10
	NmEC	6	2	3	4
d	mEC	21	1	3	4
	NmEC	11	2	2	2
e	mEC	21	2	3	4
f	mEC	21	6	7	9
g	mEC	17	1	2	4
h	mEC	17	0	0	1
	NmEC	6	0	0	0
i	mEC	17	0	0	0
	NmEC	6	0	0	0
j	mEC	1	0	0	0
k	mEC	1	0	0	1
l	mEC	16	3	4	4
m	mEC	1	0	0	1
n	mEC	1	0	0	0
o	mEC	1	0	0	1
p	mEC	1	0	0	0
q	mEC	1	0	0	0
合計		234	26	37	54

令和2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

#### *E. albertii* 選択培地の開発

#### 研究要旨

日本では、*E. albertii*による食中毒の発生が多数報告されているが、原因食品が特定されるケースは多くない。その原因の一つに *E. albertii* に適する選択培地の開発が不十分であることが挙げられる。そこで、*E. albertii* 食中毒事例における原因食品調査に有用な選択培地の開発を目標に、食品検体として鶏肉を用いて本研究を行った。基礎研究の結果から、選択増菌培地として modified EC 培地に薬剤 A および B を添加した mEC+AB 培地を、選択分離培地として DHL 寒天培地に薬剤 C および D を添加した DHL+CD 寒天培地の開発を目指し、詳細な薬剤添加濃度・組合せを検討した。その結果、*E. albertii* の増殖が抑制されず鶏肉由来細菌の増殖が抑制される最適な濃度を決定し、優れた選択培地を開発した。この選択培地と昨年度に開発したリアルタイム PCR を用いることで、食品からの *E. albertii* 分離率の向上が期待される。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平、新井沙倉、大屋賢司

#### A. 研究目的

*E. albertii* は下痢原性を有する新興食中毒細菌として知られており、近年、日本で多くの食中毒事例が報告されている。ニワトリ、アヒル、ヒツジ、ブタなどの腸や肉から *E. albertii* の分離が報告され

ているものの（Wang et al., Epidemiol. Infect., 2016, 144, 45-52）、食中毒事例の原因食品が特定された事例は多くない。その原因の一つに *E. albertii* に適する選択培地の開発が不十分であることが挙げられる。昨年度まで

の研究では、*E. albertii*の増菌培養には腸管出血性大腸菌の試験法と同じく modified EC 培地 (mEC) およびノボビオシン加 m EC を用いた 42°C 培養が有用であることが明らかにされた。また、分離培地として、*E. albertii*が乳糖、キシロースおよびラムノース非分解性である性質を利用するキシロース・ラムノース添加 DHL (XR-DHL) 寒天培地が、従来から使用されている DHL 寒天培地と比較して鶏肉中の *E. albertii* 分離に有用であることも報告された (Arai et al., J. Food Prot., 2021, 84(4), 553-562)。これは、XR-DHL 寒天培地上では、キシロース・ラムノース分解性の細菌は赤色コロニーを形成するため、白色コロニーを形成する *E. albertii* の分離がより容易になるためである。しかし、鶏肉の増菌培養液中の鶏肉由来細菌のコロニーが XR-DHL 寒天培地で優勢に生育し、*E. albertii* の分離が困難な場合が認められる。そこで、本研究では鶏肉を対象食品として、鶏肉由来細菌の増殖を抑制し、*E. albertii* を選択的に増殖させる選択培地の開発を目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 選択増菌培地の検討

#### 1) 菌株

選択増菌培地に混合する薬剤の濃度検討のために、*E. albertii* 3 株 (EA12, EA24, EA42; いずれも食中毒由来株) を供試した。これらの菌株は、DHL 寒天培地および XR-DHL 寒天培地上に白

色コロニーを形成する。また、鶏肉由来細菌として、*Escherichia fergusonii* 2 株 (A 株および B 株) および *Morganella morganii* 1 株を供試した。なお、*E. fergusonii* は、*E. albertii* の増菌培地である mEC 中で強く増殖するため、*E. albertii* の分離を困難にする。また、*M. morganii* は DHL 寒天培地上に *E. albertii* と類似した白色コロニーを形成するため、同様に *E. albertii* の分離を妨げることから供試株として選定した。

試作した選択増菌培地の有用性を確かめるために、上記菌株に当研究室保有株を加えて、*E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株を供試した。

#### 2) 至適濃度の検討

*E. albertii* を Tryptone soya broth (オキソイド) に接種し、37°C で 18 時間培養した。この培養液を菌濃度が  $1 \times 10^6$  CFU/mL になるよう mEC で希釈後、96 ウェルプレート各ウェルに 50  $\mu$ L ずつ分注した。次に、薬剤 A および薬剤 B の各薬剤単独または両薬剤混合溶液を、ウェル内の最終濃度が表 1 に示す各種濃度となるように各ウェルに添加した。その後、42°C で  $18 \pm 2$  時間培養し、吸光度 (OD<sub>590</sub>) を測定した。

#### 3) 薬剤 A および B 添加 mEC における *E. albertii* および鶏肉由来細菌の増殖解析

2) で定めた濃度になるよう各薬剤

または両薬剤混合の薬液を添加した mEC (mEC+AB 培地) を小試験管に分注し、各試験管に *E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株をそれぞれ接種した。42°C で 20±2 時間培養し、培地の濁度を観察し菌株の増殖を判定した。

4) mEC+AB 培地での鶏肉培養液中における *E. albertii* および鶏肉由来細菌の増殖抑制

市販の鶏肉 25 g に mEC を 225 mL 加えて 1 分間ストマッカー処理した後、鶏肉乳剤を 10 mL ずつ遠沈管に分注した。そこに、薬剤 A および B 混合の薬液を表 1 に示す組み合わせ I~V になるように添加した。また、*E. albertii* を Tryptone soya broth に接種し 37°C で 18 時間培養し、この培養液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて希釈し、10 から 20 CFU/10 mL になるよう上記の鶏肉乳剤の入った各遠沈管に接種した。各遠沈管を 42°C で 22±2 時間培養した。なお、菌液を接種しない鶏肉乳剤を陰性コントロールとした。培養後、PBS で 10<sup>-5</sup> 希釈し、その 0.1 mL をキシロース (富士フィルム和光) とラムノース (富士フィルム和光) を各々 1% になるよう DHL 寒天培地 (日水製薬) に添加した XR-DHL 寒天培地に塗抹し、37°C で 18±2 時間培養した。培地上の白色コロニー (*E. albertii* 様コロニー) および白色以外のコロニーの数をカウントし

た。各プレートごとに 3 個の白色コロニーを無作為に釣菌し、各コロニーの DNA を熱抽出後、昨年度開発したリアルタイム PCR に供試し、*E. albertii* であることを確認した。

## (2) 選択分離培地の検討

### 1) 菌株

(1) 増菌培地の検討で供試した *E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株を供試した。

### 2) 選択薬剤の至適濃度検討

*E. albertii* を Tryptone soya broth に接種し 37°C で 18 時間培養した。この培養液を菌濃度が 1×10<sup>6</sup> CFU/mL になるようミューラヒントンブロス (BD) 培地で希釈したのち、96 ウェルプレートの各ウェルに 50 μL ずつ分注した。次に、薬剤 C (富士フィルム和光純薬) をミューラヒントンブロス培地で希釈し、ウェル内濃度が 0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL となるよう各ウェルに添加した。同様に薬剤 D (ペプチド研究所) をミューラヒントンブロス培地で希釈し、ウェル内濃度が 1.25、2.5、5、10、20、40、80 mg/mL となるよう各ウェルに添加した。その後、37°C で 22±2 時間培養し、吸光度 (OD<sub>590</sub>) を測定した。

### 3) 培地への薬剤混合濃度の検討

DHL 寒天培地 (日水製薬) に薬剤 C を 0.006、0.02、0.06 あるいは 0.2 μg/mL

および薬剤Dを5あるいは10 mg/mLの濃度となるように添加し、DHL+CD寒天培地を作製した。試作した DHL+CD 寒天培地に *E. albertii*、*E. fergusonii* および *M. morgani* を画線し、37°Cで 20±2 時間培養した後にコロニーの発育状況を観察した。

4) DHL+CD 寒天培地における *E. albertii* および鶏肉由来細菌のコロニー形成

3) で薬剤CおよびDの濃度条件を定めた DHL+CD 寒天培地に *E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株を画線した。37°Cで 20±2 時間培養した後、コロニーの発育状況を観察した。

## C. 研究結果

### (1) 選択増菌培地

#### 1) 選択薬剤の至適濃度検討

薬剤Aは *E. albertii* EA12 に対して、最も濃い濃度 VIa で増殖抑制が認められたが、EA24 および EA42 に対しては増殖抑制が認められなかった (図 1a-c)。また、*E. fergusonii* A 株および B 株に対しては、濃度 Va 以上で (図 1d, e)、*M. morgani* に対しては、濃度 Ia 以上で増殖抑制が認められた (図 1f)。

薬剤Bは *E. albertii* EA12 に対して、最も濃い濃度 VIb で増殖抑制が認められたが、EA24 および EA42 に対しては増殖抑制が認められなかった (図 2a-c)。また、*E. fergusonii* A 株および

B 株に対しては濃度 Vb 以上で (図 2d, e)、*M. morgani* に対しては濃度 Ib 以上で増殖抑制が認められた (図 2f)。

薬剤A および B の混合剤は *E. albertii* EA12 に対して、組合せ VI で増殖抑制が認められたが、EA24 および EA42 に対しては認められなかった (図 3a-c)。また、*E. fergusonii* A 株に対しては、組合せ VI で増殖抑制が認められ、*E. fergusonii* B 株に対しては組合せ V 以上で認められた (図 3d, e)。*M. morgani* に対しては、組合せ I 以上で増殖抑制が認められた (図 3f)。

2) mEC+AB 培地における *E. albertii* および鶏肉由来細菌増殖解析

薬剤A濃度 Va および薬剤B濃度 Vb のmEC+AB 培地では、*E. albertii* は 194 株中すべての菌株の増殖が認められ、鶏肉由来細菌は 20 株中 3 株 (15%) で増殖が認められた (表 2)。

3) mEC+AB 培地での鶏肉培養液中における *E. albertii* および鶏肉由来細菌の増殖抑制

*E. albertii* を接種した鶏肉を、薬剤A および B を各種濃度で組合せた mEC+AB 培地で増菌培養し、XR-DHL 寒天培地に塗抹したところ、薬剤A濃度 Va および薬剤B濃度 Vb のmEC+AB 培地培養液においても *E. albertii* 様の白色コロニー数は減少しなかった (図 4)。一方で、鶏肉由来細菌のコロニー数は薬剤A および B の添加濃度依存的に減少

した(図4)。リアルタイムPCRの結果、釣菌した *E. albertii* 様の白色コロニーは全て *E. albertii* であった。*E. albertii* 非接種の培養液では、白色コロニーは認められなかった。

## (2) 選択分離培地

### 1) 選択薬剤の至適濃度検討

薬剤Cは *E. albertii* EA8 に対して、0.0625 µg/mL 以上で増殖抑制が認められた(図5a)。EA12 および EA24 に対しては、0.125 µg/mL 以上で増殖抑制が認められた(図5a-c)。一方、*E. fergusonii* A株に対しては、最も濃い4 µg/mL でも増殖抑制は認められなかった(図5d)。*E. fergusonii* B株に対しては、0.125 µg/mL 以上の濃度で増殖抑制が認められた(図5e)。*M. morgani* に対しては、0.0625 µg/mL 以上の濃度で増殖抑制が認められた(図5f)。

薬剤Dは *E. albertii* に対して、20 から 40 mg/mL 以上で増殖抑制が認められ(図6a-c)、1.25mg/mL から 10 mg/mL の範囲では増殖促進が認められた(図6a-c)。*E. fergusonii* A株およびB株に対しては、2.5 mg/mL 以上の濃度で(図6d,e)、*M. morgani* に対しては、20 mg/mL 以上で増殖抑制が認められた(図6f)。

### 2) DHL 寒天培地への薬剤添加濃度の検討

上記の結果を元に、DHL 寒天培地を

基礎培地として薬剤を添加し DHL+CD 寒天培地を作製した。薬剤C 0.02 µg/mL および薬剤D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地では、*E. albertii* の発育が良好である一方で、*E. fergusonii* A株およびB株および *M. morgani* は非発育であった(図7)。

### 3) 選択分離培地における *E. albertii* および鶏肉由来細菌のコロニー形成解析

薬剤C 0.02 µg/mL および薬剤D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地では、*E. albertii* 菌株は194株中171株(88.1%)が発育良好、15株(7.7%)が発育抑制、8株で非生育であった(表3)。鶏肉由来菌株では20株中11株(55%)が発育良好、3株(15%)が発育抑制、6株(30%)で非生育であった(表3)。

## D. 考察

*E. albertii* に適する選択増菌培地を開発するため、mEC に添加する薬剤AおよびBの至適濃度を検討した。*E. fergusonii* A株およびB株に対して、薬剤A濃度 VIa および薬剤B濃度 VIb で最も高い増殖抑制が認められたが、同濃度では *E. albertii* の EA12 に対する増殖抑制も認められたため、薬剤A濃度 Va および薬剤B濃度 Vb の濃度で mEC+AB 培地を作製した。薬剤A濃度 Va および薬剤B濃度 Vb の mEC+AB 培地では *E. albertii* 194株中194株全ての菌株の増殖が認められ

た一方で、鶏肉由来細菌は20株中17株の増殖抑制が認められた。さらに、鶏肉乳剤とともに mEC+AB 培地で培養した *E. albertii* は薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地培養液においても増殖が抑制されず、鶏肉乳剤由来の細菌は薬剤 A および B の濃度依存的に増殖が抑制された。薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地が選択増菌培地として有用であることが示唆された。

また、*E. albertii* に適する選択分離培地を開発するため、DHL 寒天培地に添加する薬剤 C および D の至適濃度を検討した。薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地で *E. albertii* EA8、EA12 および EA24 の発育が良好であり、*E. fergusonii* A 株および B 株および *M. morganii* は非生育であった。この薬剤濃度の DHL+CD 寒天培地では *E. albertii* 194 株中 171 株が発育良好であり、23 株は発育が抑制あるいは完全に阻害された。DHL+CD 寒天培地は *E. fergusonii* A 株および B 株および *M. morganii* に対して強く増殖を抑制するが、*E. albertii* の一部菌株に対しても同様に増殖を抑制してしまうことが示唆された。

以上のことから、鶏肉から *E. albertii* を分離する際には、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地で増菌後に薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地と XR-DHL 寒天培地の両者を用いて画線培養を行い、菌の

分離を試みることで、*E. albertii* の分離率が向上すると考えられる。

## E. 結論

鶏肉を含む食品から *E. albertii* を分離するための選択増菌培地として mEC+AB 培地を、選択分離培地として DHL+CD 寒天培地を開発した。食品から *E. albertii* の分離を試みる際は、薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B 濃度 Vb の mEC+AB 培地で食品の増菌培養を行った後に、薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地および XR-DHL 寒天培地に画線培養し、分離したコロニーをリアルタイム PCR で同定することで、従来の分離培養法と比較して *E. albertii* の分離率向上が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Ohya, K., Konno, T., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Asano, Y., Maruyama, H., Uchiyama, H., Takara, T., and Hara-Kudo, Y. Evaluating methods for detecting *Escherichia albertii* in chicken meat. Journal of Food Protection, 84(4), 553-562, 2020.

(学会等発表)

令和3年度に発表予定

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

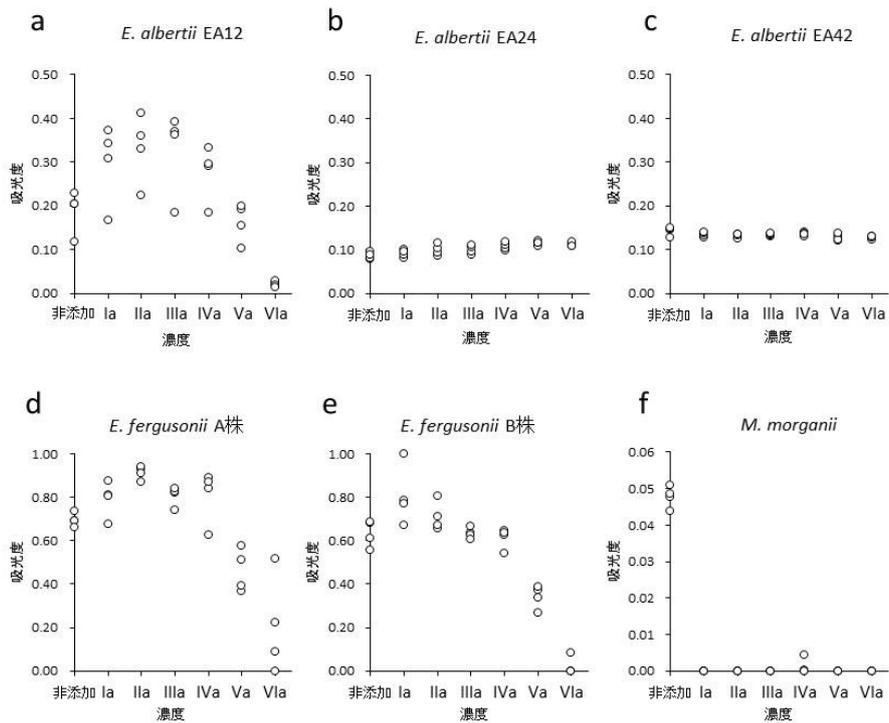


図1 薬剤A添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

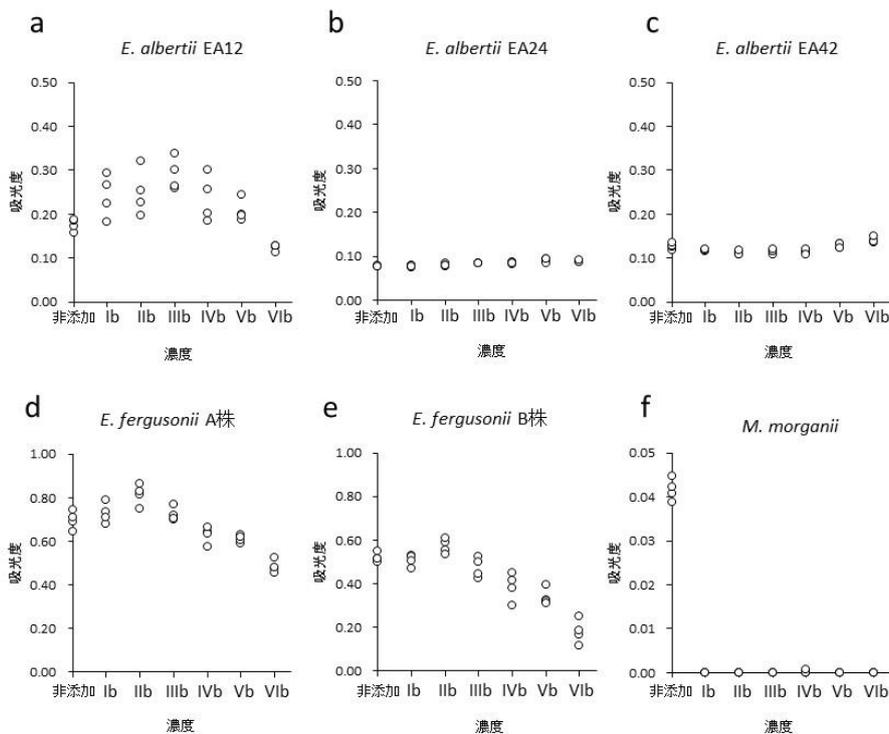


図2 薬剤B添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

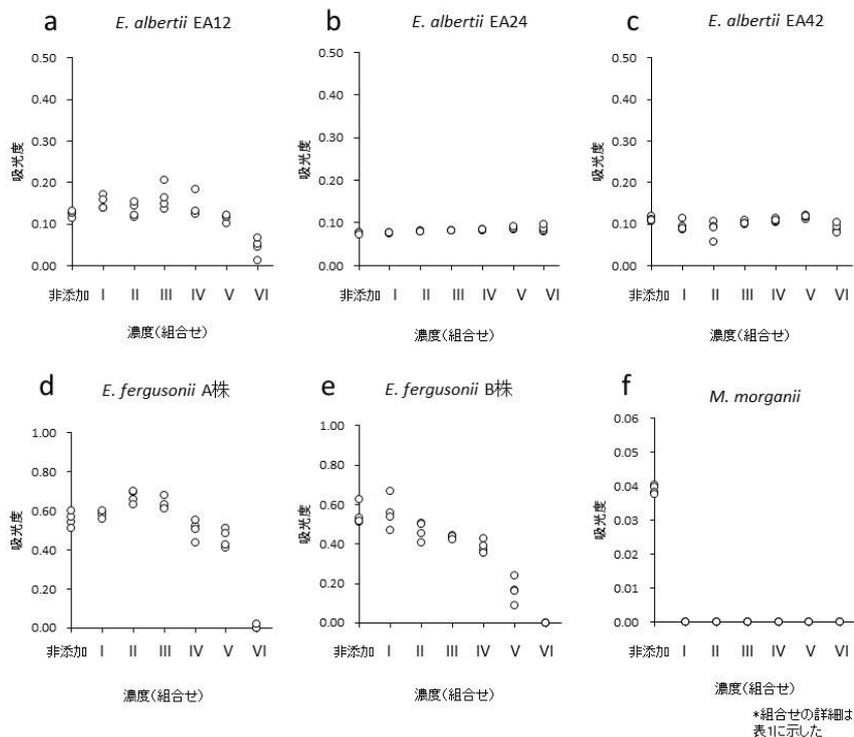


図3 薬剤AおよびB組合せ添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

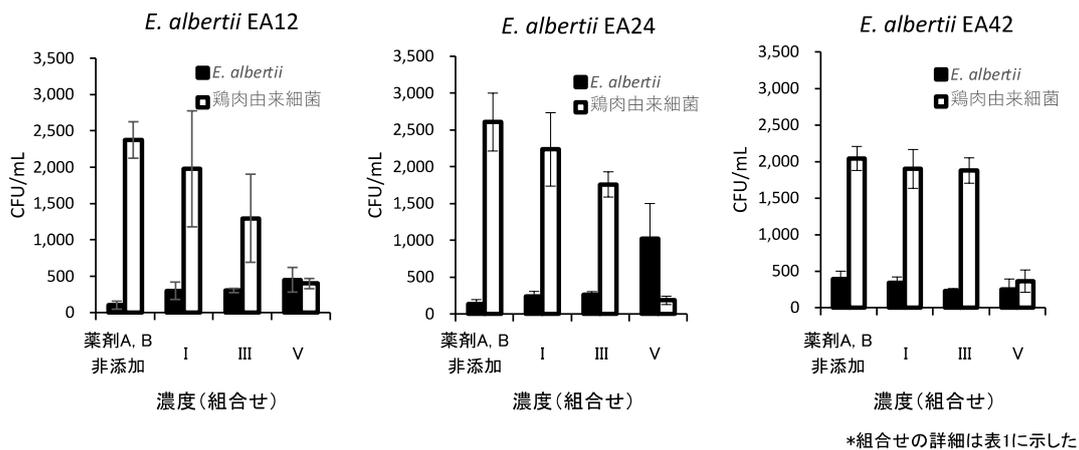


図4 mEC+AB培地での鶏肉培養液中における*E. albertii*および鶏肉由来細菌の増殖抑制

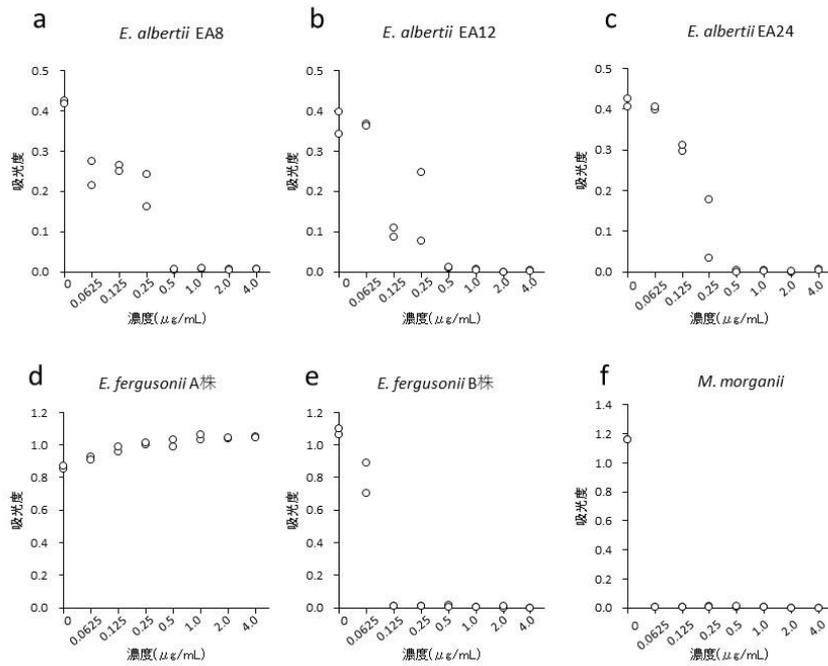


図5 薬剤C添加ミューラヒントンブロス培地の *E. albertii* および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

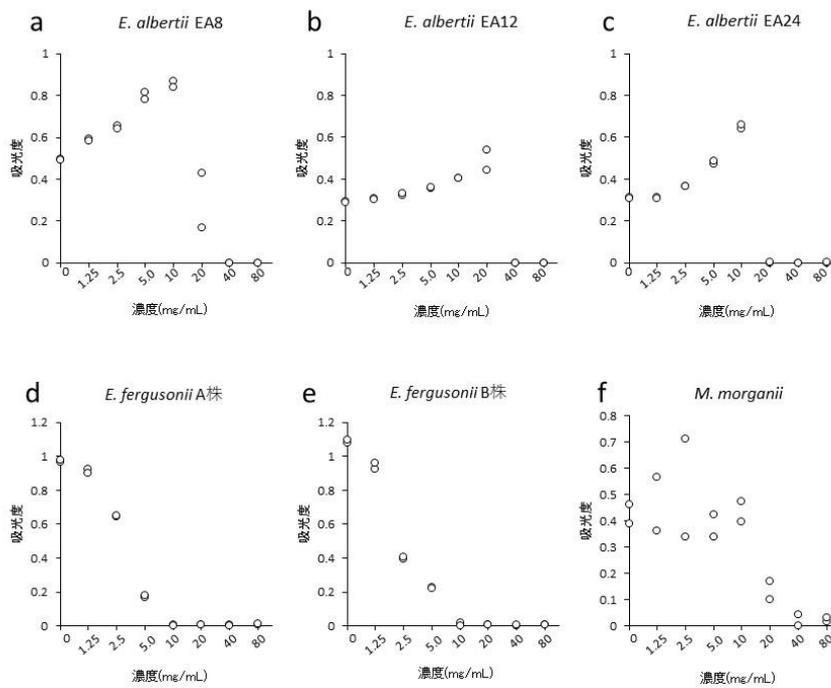


図6 薬剤D添加ミューラヒントンブロス培地の *E. albertii* および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

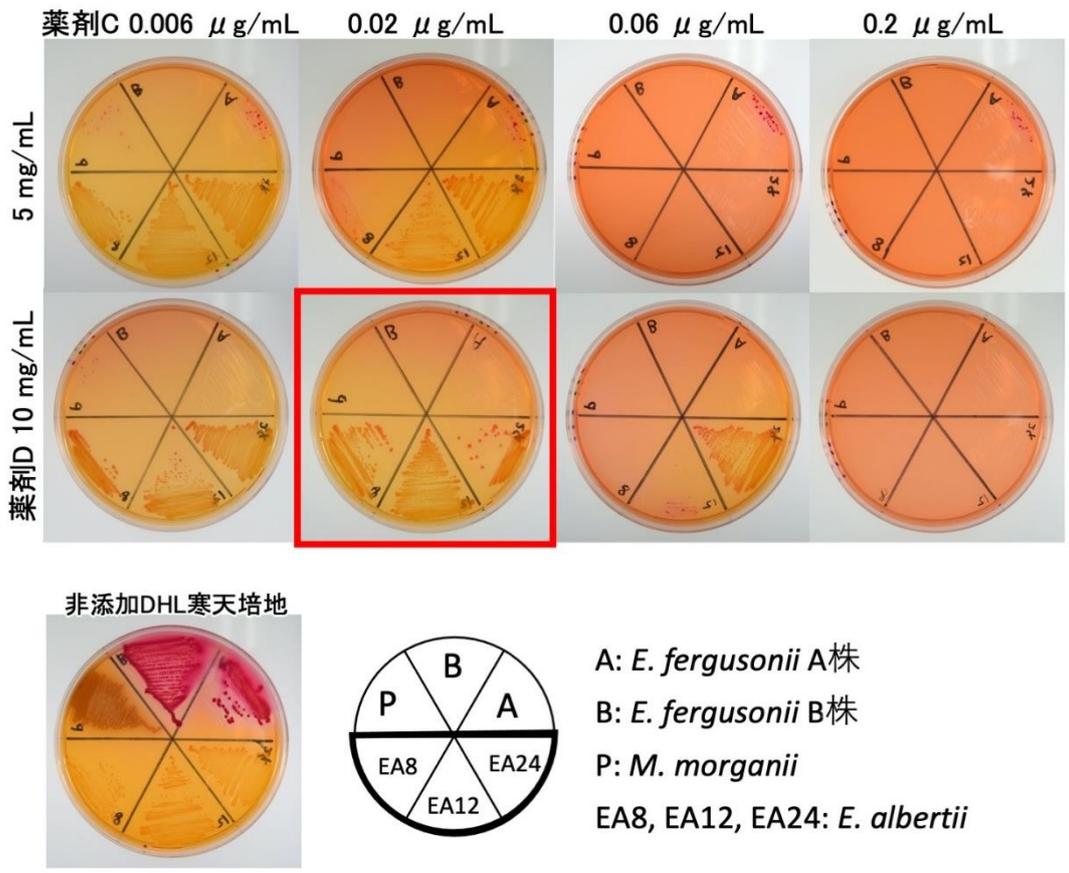


図7 DHL 寒天培地への薬剤CおよびD添加による *E. albertii* および鶏肉由来細菌のコロニー形成抑制

表 1 選択増殖培地への薬剤添加濃度検討における  
 薬剤 A および薬剤 B の単独あるいは組合せ濃度

	薬剤A	薬剤B
薬剤A単独*	Ia	-
	IIa	-
	IIIa	-
	IVa	-
	Va	-
	VIa	-
薬剤B単独**	-	Ib
	-	IIb
	-	IIIb
	-	IVb
	-	Vb
	-	VIb
組合せI	Ia	Ib
組合せII	IIa	IIb
組合せIII	IIIa	IIIb
組合せIV	IVa	IVb
組合せV	Va	Vb
組合せVI	VIa	VIb

\*Iaが最も低くVIaが最も高い

\*\*Ibが最も低くVIbが最も高い

表 2 薬剤 A 濃度 Va および薬剤 B Vb の mEC+AB 培地における  
*E. albertii* および鶏肉由来細菌の増殖

菌株		株数	培地の濁り
<i>E. albertii</i>		194	+
鶏肉由来細菌	<i>E. fergusonii</i>	1 (A株)	+
		1 (B株)	-
	<i>M. morgani</i>	1	-
	未同定株	2	+
		15	-

+: 濁りあり

-: 濁りなし

表 3 薬剤 C 0.02 µg/mL および薬剤 D 10 mg/mL の DHL+CD 寒天培地  
における *E. albertii* および鶏肉由来細菌のコロニー形成

菌株		株数	コロニー形成
<i>E. albertii</i>		171	++
		15	+
		8	-
鶏肉由来細菌	<i>E. fergusonii</i>	2	-
	<i>M. morgani</i>	1	-
	未同定株	9	++
		3	+
		3	-

++: 発育良好

+: 発育抑制あり

-: コロニーなし

令和 2 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

#### *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

#### 研究要旨

食中毒 1 事例（大津市内滋賀刑務所）の原因食品同定を目的として、各食品検体から *E. albertii* の検索を行い、選択剤 A 添加 mEC 培地での増菌培養およびキシロース・ラムノース添加 DHL 培地での分離培養によって春雨中華サラダ検体から *E. albertii* を検出した。この菌株は、患者便分離株と O 抗原遺伝子型および RAPD-PCR のバンドパターンが一致したことから、本食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであると判明した。また、同時期に大津市内 B 施設での事例の患者株も上記事例と同一の O 抗原遺伝子型および RAPD-PCR のバンドパターンであったため、関連性が示唆された。今回の試験では、食品中の *E. albertii* 菌数は検出限界以下であったため、検体保管中の本菌の減少が考えられた。今後の *E. albertii* 食中毒予防のためには、汚染食品や保菌動物等の調査を行い、*E. albertii* の汚染経路の解明に繋がる知見の蓄積が必要であると考えられた。

#### 研究協力者

大津市保健所

安田敬子、小椋容子

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平

#### A. 研究目的

令和 2 年度に大津市内滋賀刑務所で調理した食事を原因とする *Escherichia albertii* 食中毒が発生した。患者は下痢、腹痛、発熱、嘔気等の症状を訴え、患者数

は 2 日間で 120 名に上った。大津市保健所の調査により、患者便および原因となったことが疑われる食事の検食冷凍保管品 10 種の混合物の増菌培養液から *E. albertii* が検出された。しかし、検食 10

種のうちのいずれの食品が原因であるか不明であったため、当所にて検体を受け入れて追加的検査を行った。また、当該食中毒の患者由来株および食品由来株、ならびに同時期に発生した大津市内 B 施設で発生した *E. albertii* 食中毒の患者由来株を受け入れ、当所での検査で分離された食品由来株とともに型別を行った。

## B. 研究方法

### 1) 検体

原因となったことが疑われる食事の冷凍保管検食 10 食品、それら 10 食品の混合培養液（冷蔵）または 10 食品の個別培養液（冷蔵）を大津市保健所から 3 回に分けて受け取った（表 1）。

第 1 回送付では、冷凍保管検食 10 食品のうち 2 食品（2 検体：No. 263、264）の保管一部を受け取った。

第 2 回送付では、冷凍保管検食 9 食品（9 検体：No. 256、257、258、259、260、262、263、264、265）の保管全量、冷蔵保管品として検食 10 食品の増菌培養液（緩衝ペプトン水、BPW）10 検体（No. 256、257、258、259、260、261、262、263、264、265：約 1 ml）および食品混合物（No. 256、257、258、259、260、261、262、263、264、265）の増菌培養液（BPW）1 検体（No. 279、約 1 ml）を受け取った。

第 3 回送付では、第 2 回送付と同じ増菌培養液（約 40 ml）および食品混合培養液からの分離株 3 株、患者便からの分離

株 24 株および B 施設での食中毒患者便からの分離株 13 株を受け取った。

### 2) 試験方法

第 1 回送付検体については、mEC 培地で増菌培養（MPN 法を含む）した（図 1）。その培養液からアルカリ熱抽出により抽出した DNA を当所で開発した *E. albertii* 特異的遺伝子を検出するリアルタイム PCR に供試した。また、*E. albertii* の選択分離培地としてキシロース・ラムノースを添加した DHL（XR-DHL）培地およびマッコンキー（XR-MAC）に画線し 37°C で 18 時間培養した。また、ノボビオシン加 mEC（NmEC）培地にて 42°C で 22 時間培養（二次増菌）し、リアルタイム PCR および XR-DHL 培地への画線に供試した。

第 2 回送付検体のうち食品検体については、第 1 回と同様に mEC 培地にて 42°C で増菌培養（MPN 法を含む）し、リアルタイム PCR および XR-DHL 培地への画線に供試した（図 2）。また、MPN 法での培地に濁りが確認されたチューブについて、NmEC 培地にて 42°C で 22 時間培養（二次増菌）し、リアルタイム PCR に供試した。また、送付検体のうち BPW 増菌培養液についても、NmEC 培地にて 42°C で 22 時間培養（二次増菌）し、リアルタイム PCR に供試した。さらに、リアルタイム PCR で陽性と判定された検体の培養液を XR-DHL 培地に画線した。37°C で 18 時間培養後、生育したコロニーのうち *E. albertii* と疑われる形態のものを分離し、リアルタ

イム PCR にて *E. albertii* であるか確認した。

第 3 回送付検体のうち BPW 増菌培養液については、リアルタイム PCR に供試し、陽性と判定された検体のみを選択剤 A を添加した mEC (A-mEC) 培地にて 42°C で 22 時間増菌培養した (図 3)。これは第 3 回検体送付時点で得られた大津市保健所の患者分離株の性状から考え実施された。増菌培養液は、リアルタイム PCR および XR-DHL 培地への画線に供試された。XR-DHL 培地に生育したコロニーのうち *E. albertii* と疑われる形態のものを分離し、リアルタイム PCR にて *E. albertii* であるか確認した。また、第 1 回送付検体のうち No. 264 の冷凍検体を A-mEC 培地で増菌培養し MPN 法による生菌数測定を試みた。

上記試験によって *E. albertii* であることが確認された分離株を滋賀刑務所食中毒患者由来株および B 施設食中毒患者由来株とともに 0 抗原遺伝子型別 (EA0-genotyping、参考文献 Ooka et al. Microbial Genomics 2019: DOI 10.1099/mgen.0.000314) および Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR による型別に供試した。なお、当所に保管する *E. albertii* 3 株を参考株とした。

## C. 研究結果

### 1) 検体から *E. albertii* の検出・分離

第 1 回送付検体である No. 263, 264 検

体は mEC 培地による培養液および NmEC 培地による二次増菌培養液ともに、*E. albertii* 検出用リアルタイム PCR で陰性であった (表 2)。XR-MAC または XR-DHL 培地での分離でも、*E. albertii* のコロニーは分離できなかった。

第 2 回送付検体である No. 256, 257, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 265 検体を No. 263, 264 検体と同様に mEC 培地による増菌培養および NmEC による二次増菌を試みたが、リアルタイム PCR で全て陰性であった (表 3)。一方、No. 279 (食品混合物) の BPW 増菌培養液を NmEC 培地で二次増菌した培養液では、リアルタイム PCR で陽性が確認され (図 4)、XR-DHL 培地へ画線したところ、*E. albertii* が分離された (表 4)。しかし、食品単体の二次増菌培養液は全てリアルタイム PCR 陰性であった。

3 回目に受け入れた各食品の BPW 増菌培養液をそのままリアルタイム PCR に供したところ、No. 264 が陽性 (Ct 値: 約 30) となった (図 5A)。しかし、XR-DHL 培地による *E. albertii* の分離には至らなかった (表 5)。No. 264 検体 BPW 培養液の A-mEC 培地による二次増菌を試みた結果、培養液はリアルタイム PCR で陽性 (Ct 値: 約 20) を示し、Ct 値が増菌前に比べ小さくなり (図 5B)、*E. albertii* の増殖が推察され、XR-DHL 培地での培養によって分離された (表 5)。この結果を踏まえて、No. 264 の冷凍検体を A-mEC 培地

で増菌培養（図6）し、MPN法による *E. albertii* 菌数測定を行った結果、いずれのMPNチューブにおいても *E. albertii* が確認されなかった（<3 MPN/10g）。

## 2) 分離株の型別

本試験で分離した食品 No. 264 由来株および No. 279（食品混合物）由来株および患者由来株（滋賀刑務所およびB施設）は、いずれも0抗原遺伝子型がEA0g4で一致した（表6、図7）。また、RAPD-PCRによる型別でも、いずれの株も同一のバンドパターンを示した（表6、図8）。

## D. 考察

本事例では、すでに滋賀刑務所での食中毒事例において患者便および原因と疑われる食事に含まれる食品混合検体（No. 279）から大津市保健所にて *E. albertii* が分離されており、個別の食品のうちのいずれが原因食品であるかを解明することに焦点を絞り試験を実施した。なお、当所での試験でも No. 279 の検体から *E. albertii* が分離されている。また、大津市保健所から患者株が食品検体と同時に分与され、性状についても情報があつたこと、これまでの当部での研究において食品からの *E. albertii* 検出に有用な迅速かつ特異性の高いリアルタイムPCR法が開発されていたことが試験実施において有利であった。

結果として、第3回送付検体のうち No. 264 検体（春雨中華サラダ）のBPW培養液

からリアルタイムPCRにて *E. albertii* が明確に検出されたが、Ct値が約30であり若干菌数が低いことが推察された。このため、分離を効率的に行うには二次増菌培養することが有用であるため、患者分離株の性状を参照しA-mEC培地にて増菌培養した。その培養液でのリアルタイムPCRではCt値が約20となり増菌培養前よりもCt値が小さくなったため本菌が増殖したことが示唆された。また、Ct値が約20であれば菌数レベルも高く、XR-DHL培地での培養によって分離が可能であることが推察され、実施によって *E. albertii* が分離された。

第1回送付の冷凍検体から *E. albertii* が検出・分離ができなかった理由として、検体量の不足および凍結融解の繰り返しによる菌の死滅などが考えられる。また、第1回送付のBPW培養液から検出・分離ができなかった理由として、BPW培地が *E. albertii* の増殖に適しておらず、培養液に含まれる菌数が非常に少なかったことが考えられる。BPWは非選択培地であるため、食品中の夾雑菌の増殖が優位であり、*E. albertii* の増殖が抑制された可能性が考えられた。

今回の試験で分離した No. 264 検体（春雨中華サラダ）由来株が、食品混合物（No. 279）由来株および患者由来株の0抗原遺伝子型（EA0g4）と一致していること、また、RAPD-PCRのバンドパターンについても同一であることから、滋賀刑務所での

食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。春雨中華サラダの材料として、春雨、ゴマ、にんじん、キュウリ等が含まれていることが検体から観察されるため、それらの食材のいずれかが汚染されていた、または調理中に調理者や環境から汚染された可能性が考えられた。

また、同時期に発生した滋賀刑務所での患者由来株も同一の 0 抗原遺伝子型および RAPD-PCR 型を示したことから、両食中毒は発生原因に関連があることも考えられる。しかし、参考株の鶏肉由来の 1 株が同一の型であり、まだ *E. albertii* の多様性についての知見や手法が不十分であるため、現状では判断できない。

さらに、第 1 回および第 2 回送付の食品検体について実施した MPN 法では *E. albertii* の定量値を得られなかった理由として、食品残量が少なく、定量値を測定するには困難があったこと、かつ冷凍保管品であるため本菌が減少した可能性が考えられた。ちなみに、今回の試験では検出限界は < 3 MPN/10g であった。低菌数での感染が起こる可能性も否定できないが、今後の事例での測定によって知見が蓄積されることが重要である。

#### E. 結論

食中毒 1 事例（天津市内滋賀刑務所）の原因食品同定を目的として、各食品検体から *E. albertii* の検索を行い、春雨

中華サラダ検体から *E. albertii* を検出した。この菌株は、患者便分離株と 0 抗原遺伝子型および RAPD-PCR のバンドパターンが一致したことから、本食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであると判明した。また、同時期に天津市内の B 施設での事例の患者株も上記事例と同一の 0 抗原遺伝子型および RAPD-PCR のバンドパターンであったため、関連性が示唆された。今回の試験では、食品中の *E. albertii* 菌数は検出限界以下であったため、検体保管中の本菌の減少が考えられた。今後の *E. albertii* 食中毒予防のためには、汚染食品や保菌動物等の調査を行い、*E. albertii* の汚染経路の解明に繋がる知見の蓄積が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

（誌上発表）

令和 3 年度に発表予定

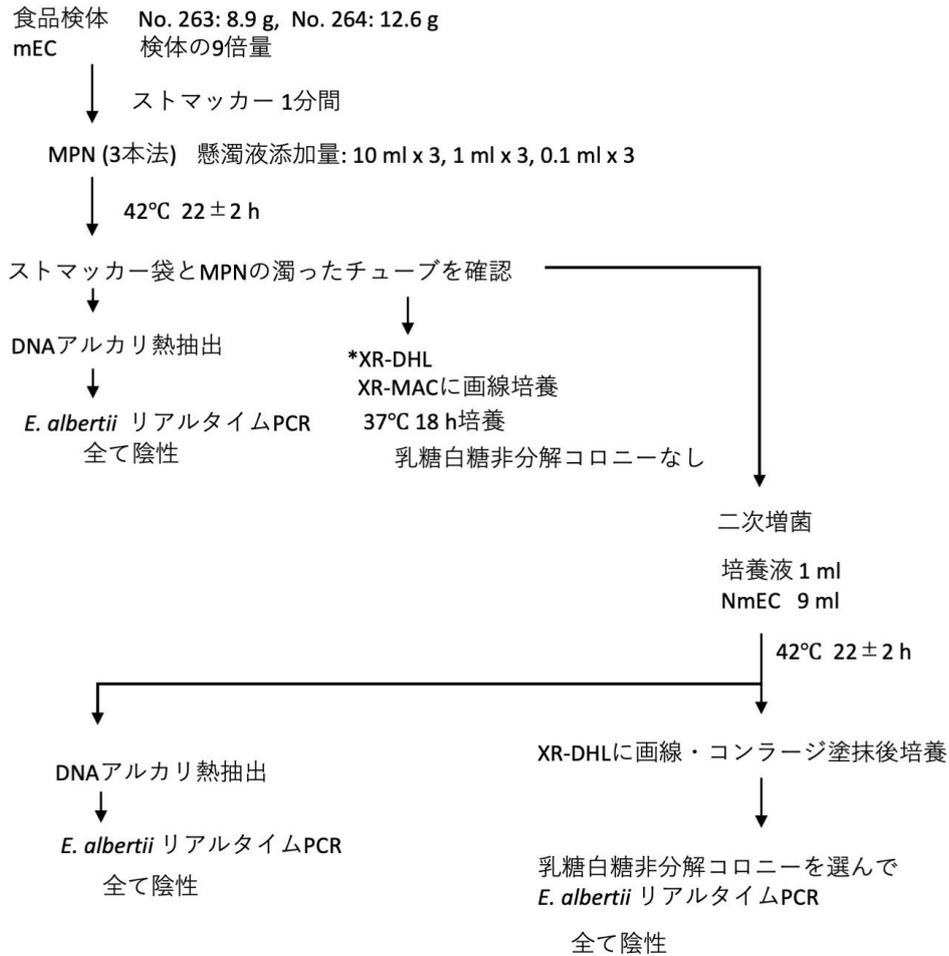
（学会等発表）

令和 3 年度に発表予定

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

冷凍の食品検体: No. 263, 264 2検体



\*XR-DHL: 1% キシロース +1%ラムノース添加DHL培地  
XR-MAC: 1% キシロース +1%ラムノース添加マッコンキー培地

図1 大津市における*E. albertii*食中毒原因食品の検査；第1回送付検体

冷凍の食品検体: : No. 256, 257, 258, 259, 260, 262, 265	7検体
BPW増菌培養液: No. 256~265, 279	11検体

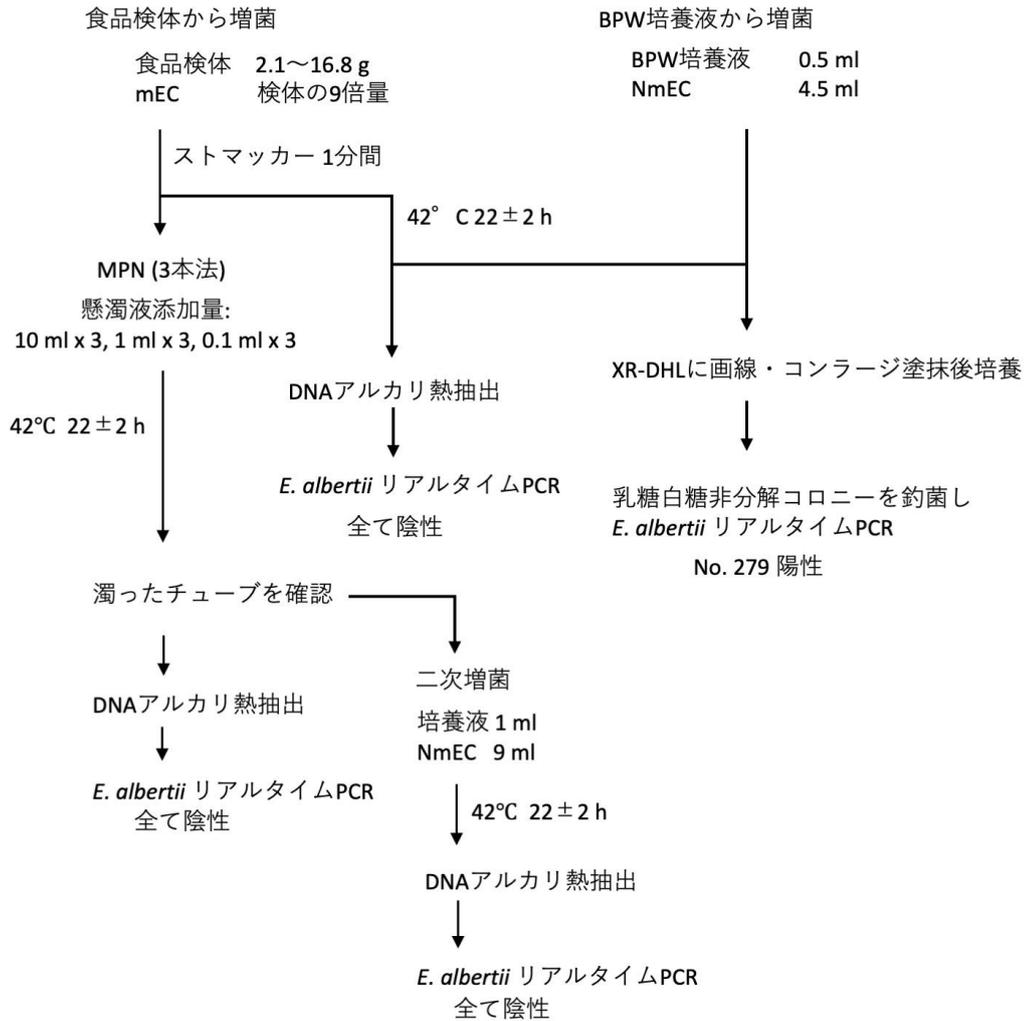


図2 大津市における*E. albertii*食中毒原因食品の検査；第2回送付検体

BPW増菌培養液： No. 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 279 11検体  
菌株： 食材混合培養液分離株、患者便分離株

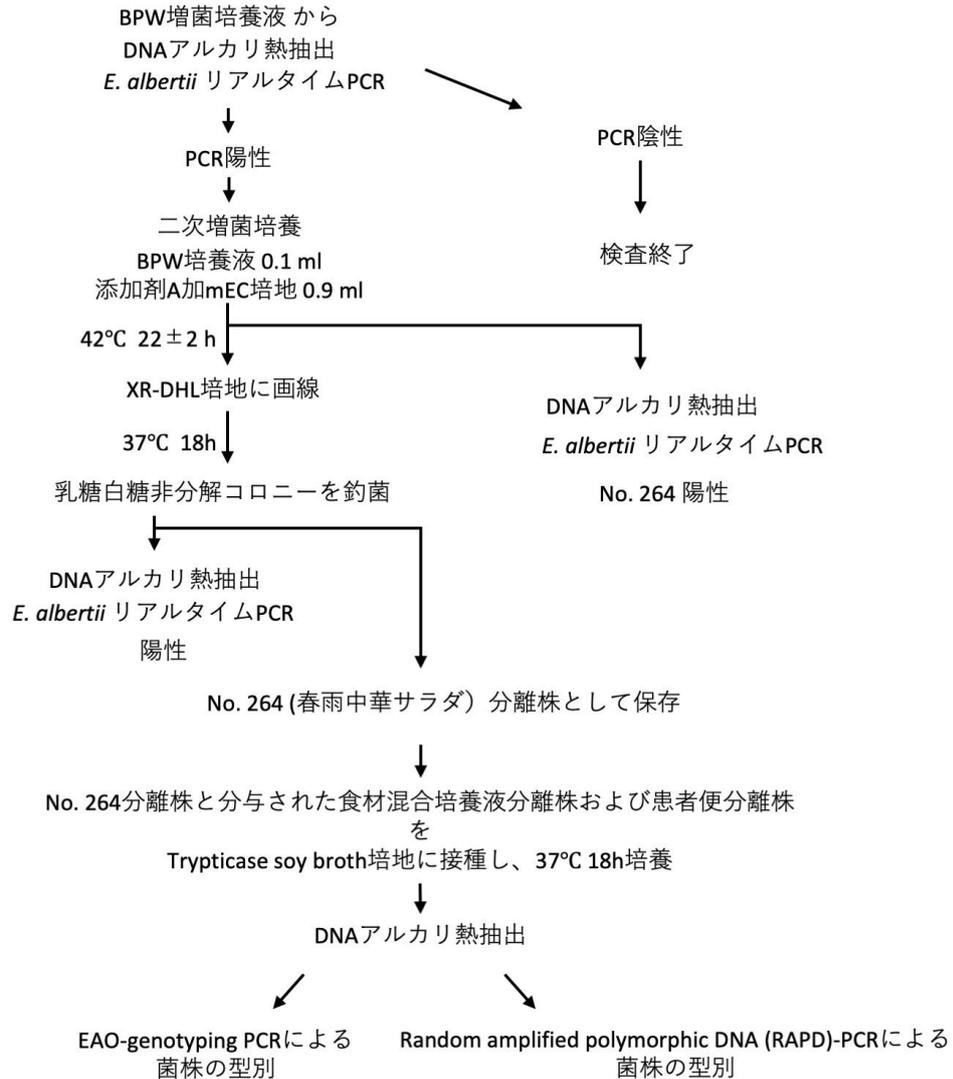


図3 大津市における*E. albertii*食中毒原因食品の検査；第3回送付検体

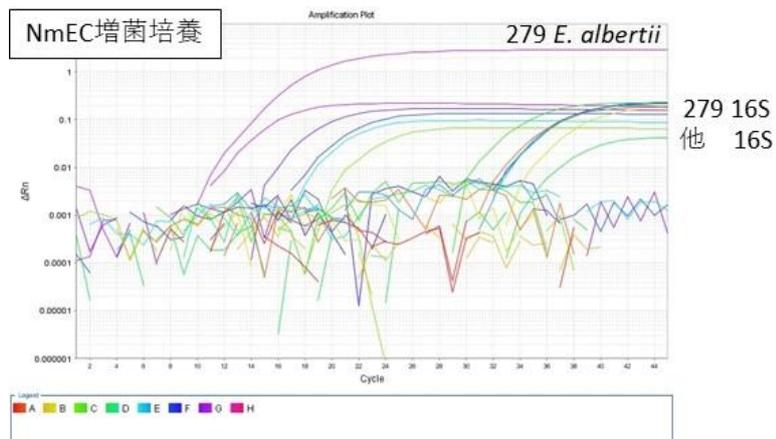
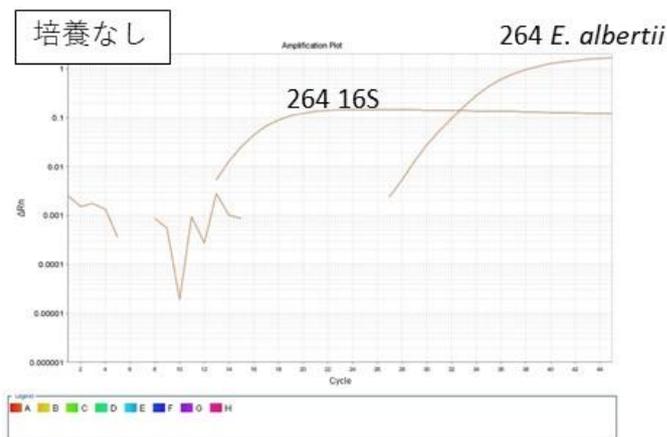


図 4 第 2 回送付検体 BPW 増菌培養液のリアルタイム PCR

A



B

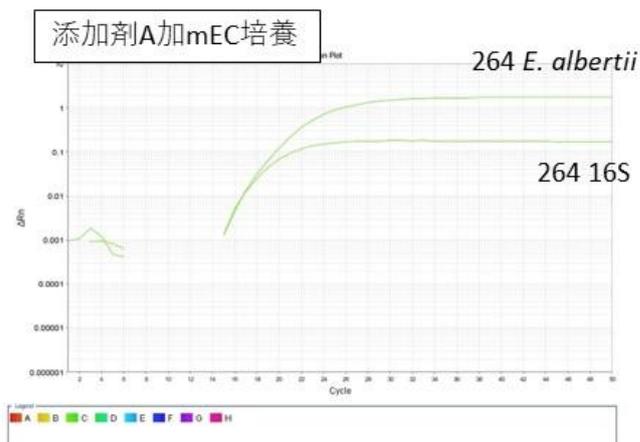


図 5 第 3 回送付検体 BPW 増菌培養液のリアルタイム PCR

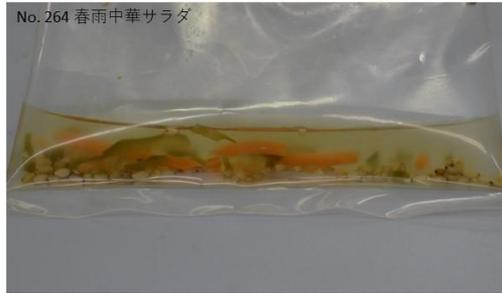
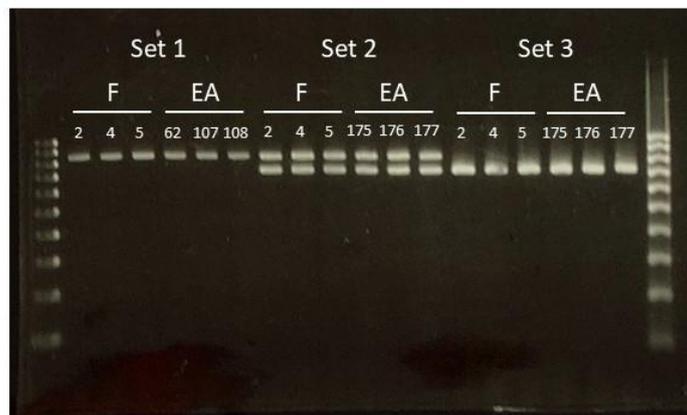
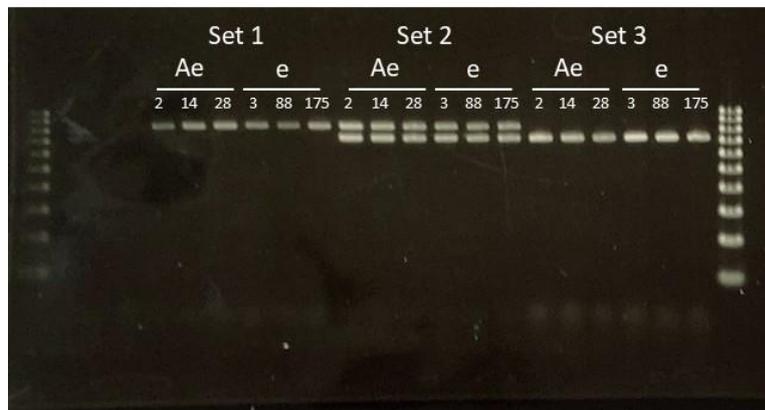


図 6 検体 No. 264 春雨中華サラダの mEC 培養

### EAO-genotyping

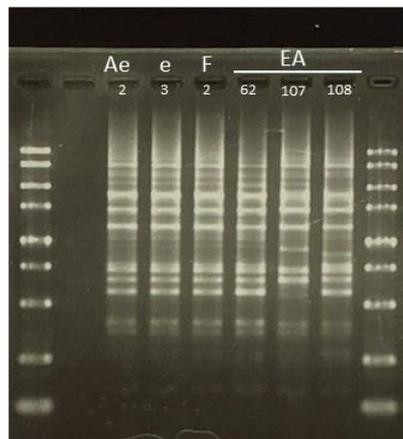
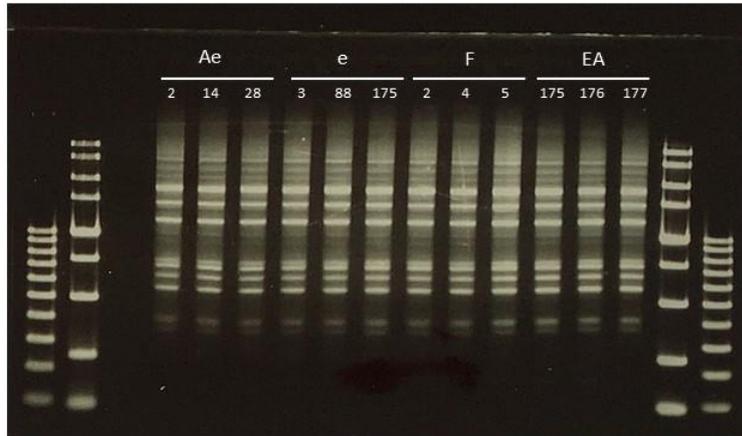


Ae: 大津保健所分離株 (B施設患者便)、e: 大津保健所分離株 (滋賀刑務所患者便)  
 F: 大津保健所分離株 (検体No. 279)、EA: 国衛研分離株 (検体No. 264)

Set1  
 846 bp: Common  
Set2  
 731 bp: Common 840bp: EAOg4  
Set3  
 731 bp: Common

図 7 分離株の型別 (EAO-genotyping)

Random amplified polymorphic DNA-PCR: (RAPD-PCR)



Ae: 大津保健所分離株  
(B施設患者便)  
e: 大津保健所分離株  
(滋賀刑務所患者便)  
F: 大津保健所分離株  
(検体No. 279)  
EA: 国衛研分離株  
(62, 107, 108: 別事例分離株、  
175~177:検体No. 264分離株)

図 8 分離株の型別 (RAPD-PCR)

令和2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 *E. 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、汚染が起こ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、食品から *E. albertii* が分離された。そのため、他の食品および環境についても今後の調査を注視する必要があると考えられた。また、過去に分離された *E. albertii* の O 抗原型を PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。その結果、国内分離株は様々な O 抗原型に型別され、一部の集団食中毒事例では、複数の O 抗原型が混在していた。そのため、1 検体または 1 事例から複数の株が分離された際には、本 EA0-genotyping などの遺伝子型別法を利用して、分離株の相同性について考察することが重要と考えられた。

#### 研究協力者

東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魁
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、高橋陽子
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
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
奈良県保健研究センター	吉田孝子、森村実加、松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	浅野由紀子
福岡市保健環境研究所	松永典久

熊本県保健環境科学研究所	前田莉花
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	柿田徹也、大山み乃り、久手堅 剛
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
(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	廣瀬昌平、新井沙倉

#### 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。食中毒の原因食品には、複合調理食品の他に井戸水も推定されている。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなどの家畜および家禽（Wang et al., *Epidemiol. Infect.*, 2016, 144 45-52）や、野鳥、アシカ（Grillová et al., *J. Vet. Med. Sci.*, 2018, 80 138-146）、アライグマ（Hinenoya et al., *Emerg Infect Dis.*, 2020, 26 1304-1307）などの野生動物の保菌が報告されており、動物からの水の汚染が考えられる。また、河川水を含む日本の環境水からも *E. albertii* が分離されたため（Takahashi

et al., *Jpn. J. Food Microbiol.*, 2020, 37 81-86）、環境から食品が汚染される可能性も危惧される。これらの背景から、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。

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）年度および令和元（2019）年度には、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 2（2020）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。さらに、これまでに分離されたヒト由来、食品由来、および環境由来株について、0 抗原型を決定（EAO-genotyping）（Ooka et al., *Microb. Genom.*, 2019, 5:e000314）した。

## B. 研究方法

### (1) 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 709 検体と環境（施設の拭き取り）検体 60 検体の計 769 検体を収集、試験した（表 1）。また、計 570 検体のヒト便検体を試験した（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* であるか確認した。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。

### (2) 分離株の EA0-genotyping

#### 1) 菌株

集団食中毒事例（11 事例）の患者、食品、および従事者由来株 35 株に加え、下痢症および無症状保菌者由来株

16 株、動物由来株 13 株、食品由来株 9 株、および環境由来株 2 株の合計 75 株の *E. albertii* を供試した（表 3）。

#### 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  $\mu$ L）を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100  $\mu$ L を 10,000 $\times$ g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85  $\mu$ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15  $\mu$ L 加え、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) EA0-genotyping

大岡らの方法に記載のプライマー（表 4）を供試し、Multiplex PCR を行った。PCR 試薬には、KOD Multi &Epi（東洋紡）を用い、上記にて調整した DNA 溶液を 1  $\mu$ L 加えた。1 菌株につき 1st、2nd および 3rd の 3 プライマーセットにて反応を実施した。94°C 2 分の熱変性ののち、94°C 10 秒-60°C 30 秒-68°C 30 秒を 25 サイクル増幅反応させた。3 プライマーセットのいずれでも型別用の PCR 産物が確認されなかった場合には、型別不能（UT）とした。

## C. 研究結果

### (1) 汚染実態調査

#### 1) 食品・環境検体での汚染実態調査

食品検体 709 検体のうち 1 検体から *E. albertii* の遺伝子が検出され、その検体から *E. albertii* が分離された (表 1)。また、環境検体 60 検体からは *E. albertii* の遺伝子が検出されなかった (表 1)。

#### 2) ヒト由来株での調査

ヒト便検体 570 検体を調査したが、*E. albertii* は分離されなかった (表 2)。

#### (2) 分離株の EA0-genotyping

集団食中毒事例由来の 26 株が EA0g1、EA0g2、EA0g5、EA0g8、EA0g9、EA0g11、EA0g12、EA0g18、EA0g25 の 6 種類に型別され、9 株は型別不能であった (表 5)。11 事例中 10 事例では、1 事例中に 1 種類の 0 抗原型であった、2005 年の事例では、2 つの型 (EA0g25 および UT)、2019 年の事例では 3 つの型 (EA0g9、EA0g18、EA0g25) に型別された。

下痢症および無症状保菌者由来株では、EA0g2、EA0g3、EA0g4、EA0g8、EA0g9 および EA0g28 の 6 種類に型別され、無症状保菌者由来の 2 株を含む合計 5 株は型別不能であった (表 6)。2015 年に分離された下痢症患者由来株 1 株は EA0g3 と EA0g29 の両方で PCR 産物が確認されたため、EA0g3/29 とした。

動物由来株では、EA0g3、EA0g4、EA0g7、EA0g8、EA0g16 および EA0g25 の 6 種類の EA0g 型が検出され 13 株中 1 株が型別不能であった (表 7)。

食品由来株では、9 株中 2 株が EA0g3 お

よび EA0g40 と型別され、7 株は型別不能であった (表 8)。環境由来株 2 株は、EA0g23 および EA0g40 に型別された (表 8)。

## D. 考察

### (1) 汚染実態調査

市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されている食品も存在することが判明した。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。今年度の環境検体からは *E. albertii* の汚染が検出されなかったものの、過去の報告では、国内の動物の糞便や河川水からの分離報告がある。そのため、動物や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。今後も *E. albertii* の汚染実態に関する研究を注視し、食品への影響を考察する必要があると考えられる。

ヒト由来株での調査では、今年度は *E. albertii* は分離されなかった。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。

### (2) 分離株の EA0-genotyping

集団食中毒事例由来株に関しては、特定の 0 抗原型への偏りが確認されなかつ

たため、国内に様々な O 抗原型の *E. albertii* が存在することが判明した。11 事例中 2 事例では、1 事例由来の菌株の中に複数の EA0g 株が検出された。そのため、1 事例から複数の分離株が得られた場合には、EA0-gentyping のような遺伝子型別法を実施し、株の相同性を調べることが重要であると考えられる。また、集団食中毒事例由来株の中にも、型別不能の株が散見されたため、新規の EA0 型の存在が示唆された。今後、型別不能の株の情報が十分集積された場合には、より多くの O 抗原型の決定を目的に、本 Multiplex PCR が改良されることが期待される。

下痢症患者由来株 13 株中 4 株 (31%) が EA0g3 に型別されたが、検出された時期 (2000 年、2015 年、2019 年) および分離場所 (機関 i、j、b) に違いが認められたことから、*E. albertii* EA0g3 が日本に広く分布している可能性は否定できない。しかし、本試験で供試した下痢症患者由来株は 13 株と少ないため、ヒト由来株の O 抗原型については今後も継続的にモニタリングする必要があると考えられた。

動物由来株中のニワトリ由来株では、7 株中 5 株 (71.4%) が EA0g3 となり、2 株はいずれも EA0g4 に型別された。本試験で収集したニワトリ検体は、1 つの県の 2 つの養鶏場より入手したため、特定の O 抗原型が検出されたと考えられた。また、食品由来株の 1 株は、環境由来株の 1 株と同一の EA0g40 に型別された。この EA0g40

の 2 株については、採取機関が異なるため、全く別の株と推察された。しかし、食品の汚染源を探る手法として、本 EA0-gentyping は簡易に実施できる有効な型別方法と考えられた。

## E. 結論

食品から *E. albertii* が検出された。他の食品や環境についても今後、注視していく必要がある。ヒトからは分離されなかったものの、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可能性を考慮し、自治体など検査機関との連携が必要である。また、国内には様々な O 抗原型の *E. albertii* が存在することが示された。食品の汚染源を探る手法として EA0-gentyping は有用であるため、今後の食中毒事例検査や疫学調査での利用が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(誌上発表)

Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., Hara-Kudo, Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. (投稿予定)

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

表1. 供試食品・環境検体

検体	種類	検体数	E. albertii分離 陽性検体数	E. albertii 特異的 PCR供試 検体数	E. albertii 特異的 PCR陽性 検体数
食品	鶏肉	17	0	17	0
	その他食肉	40	0	40	0
	その他食品	652	1	205	1
小計		709	0	262	1
環境	施設拭き取り	60	0	60	0
合計		769	1	322	1

表2. 供試便検体

種類	自治体	検体数	E. albertii分離 陽性検体数
ヒト便	A	387	0
	B	135	0
	C	19	0
	D	17	0
	E	11	0
	F	1	0
合計		570	0

表3. EAO-genotyping供試株

由来	株数
集団食中毒事例	35
下痢症および無症状保菌者	16
動物	13
食品	9
環境	2
合計 75	

表4. EAO-genotypingのプライマー

PCRセット	Og type	フォワードプライマー	フォワードプライマー配列 (5'-3')	リバースプライマー	リバースプライマー配列 (5'-3')	産物長	
1st	EAOg16	1_wzx_F_EAOg16	CTATTGCTACTTTTATTGGTCCG	1_wzx_R_EAOg16	ATCACATCTCCCACTAGTTGC	949	
	-*	E_al_1_OF	GGTCCATAAATGAATCTGACTGA	E_al_1_OF	CCATATGACAGGCGTAATTGAT	846	
	EAOg29	1_wzx_F_EAOg29	CCTTATCATTAGTTCAGTTAGCG	1_wzx_R_EAOg29	TTAACAAATCAGCACCATAAGCA	777	
	EAOg26	1_wzx_F_EAOg26	AGTAGCTATATCCAACGCCAG	1_wzx_R_EAOg26	ACTTTCTTGCGATACAAGAGC	701	
	EAOg27	1_wzx_F_EAOg27	ATAGCATGGAGCTTTTACAAAACA	1_wzx_R_EAOg27	GGCACAATAATGGATGACAGC	620	
	EAOg20	1_wzx_F_EAOg20	ACTAGTATTGATGAAAAGAAATGCC	1_wzx_R_EAOg20	GTCCAGCAGCAGAGTAAATACC	537	
	EAOg2	1_wzx_F_EAOg2	GCGATTATTTCCGTTGCATTAG	1_wzx_R_EAOg2	CTTTGCTTTATTTAGTGATACGTG	492	
	EAOg18	1_wzx_F_EAOg18	CATTCTTTAATTATTGCTGATAAG	1_wzx_R_EAOg18	ACACTCAATATTAGCCATGTTAT	434	
	EAOg23	1_wzx_F_EAOg23	TACTCTGCAGAGAACCAAGATA	1_wzx_R_EAOg23	ATGATAGTAATAAGCCAACGC	389	
	EAOg36	1_wzx_F_EAOg36	CGTCTTGTGCTAGGGATTG	1_wzx_R_EAOg36	CACCAATAATGCAAGTATTCTACC	328	
EAOg7	1_wzx_F_EAOg7	CTTCTGTGCTGACAAGAAA TC	1_wzx_R_EAOg7	TCAATAGGTCAGATAACAATAGAG	241		
EAOg13	1_wzx_F_EAOg13	GACCAGCTGGAA TGGCAA TG	1_wzx_R_EAOg13	AAGGAATAGTTTACACACAGAGT	195		
EAOg10	1_wzx_F_EAOg10	CACCTGTGACGACATCCCTA	1_wzx_R_EAOg10	GCATGACAATATACTGAACTGA	156		
2nd	EAOg21	2_wzx_F_EAOg21	ATAATTTTTCTTTCAACTGCCTCC	2_wzx_R_EAOg21	ACCATATCGAATATACACACATTA	953	
	EAOg34	2_wzx_F2_EAOg34	ACCTGA TGAAGACA TGGGAA TG	2_wzx_R2_EAOg34	GGTGAATAATACAACCTGTTGATACT	901	
	EAOg4	2_wzx_F_EAOg4	ACTCGTATAGACAATATTGAACTG	2_wzx_R_EAOg4	TAGGAGGCTCAGTTACTCCAG	840	
	EAOg5	2_wzx_F_EAOg5	TGCTGAAGAGTATGGTCAAGTTG	2_wzx_R_EAOg5	GATGGGATTAACGATATGACAG	774	
	-	E_al_1_NF	CAGTCGA TGGTTTCACTCGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCGAAA TGGCA	731	
	EAOg35	2_wzx_F_EAOg35	GCATGGTTGATAACAATTGGAG	2_wzx_R_EAOg35	ATGTAATCCACAAGGATTTGCG	656	
	EAOg8	2_wzx_F_EAOg8	GCCTGCGAGATTCTCATAAGC	2_wzx_R_EAOg8	AGATTTAGAAAATTGATTCTCTGCT	579	
	EAOg37	2_wzx_F_EAOg37	ATGAGAAAACCTGTTAACGGTTAC	2_wzx_R_EAOg37	TGCTAATCATGATTAAGGTAGCG	502	
	EAOg24	2_wzx_F_EAOg24	GTTCTCTCATTAACTAAAGAAAC	2_wzx_R_EAOg24	TGCATAGAGTAATGTTTTCTCT	458	
	EAOg40	2_wzx_F_EAOg40	TAGCCAGAGTTTATTGCTAGAGG	2_wzx_R_EAOg40	ATGAGATTAAGTTTCCCACTGTC	400	
	EAOg31	2_wzx_F_EAOg31	CTATTCTTACTCGCTGTTGG	2_wzx_R_EAOg31	CAGAAAACACCTCAATAATGGC	366	
	EAOg3	2_wzx_F_EAOg3	TGGGTTTTCTGGTTGTTCTAC	2_wzx_R_EAOg3	ATTCCTTCTGATAGTGCCTTACC	287	
	EAOg1	2_wzx_F_EAOg1	TGAGGAAGCCGGTTATTTGATG	2_wzx_R_EAOg1	CCTGTTCTACTCCAACATATCG	249	
	EAOg15	2_wzx_F_EAOg15	GATGCTATTGACGGATTACAGT	2_wzx_R_EAOg15	TGACAGCTAAGGGTAGTACTAG	205	
	EAOg28	2_wzx_F_EAOg28	GATGCTGATTTCTTATTAGCTG	2_wzx_R_EAOg28	TGATACAGCAGACAAATAGAGC	160	
	3rd	EAOg32	3_wzx_F_EAOg32	TGATTGCTATGTCAAATGCTCC	3_wzx_R_EAOg32	TACCTATTGATGCAAAAGCTGG	915
		EAOg11	3_wzx_F_EAOg11	GACATTGTCAATAAAGCAATTCC	3_wzx_R_EAOg11	TGTTATGCAGATAATTCACACAC	851
		EAOg39	3_wzx_F_EAOg39	GTCTCGA TGGTTGGTGTCTTCT	3_wzx_R_EAOg39	AGATCTTGATATATATTGTGCGAC	782
-		E_al_1_NF	CAGTCGA TGGTTTCACTCGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCGAAA TGGCA	731	
EAOg6		3_wzx_F_EAOg6	GTGCTGATCATGTTATTTGCTG	3_wzx_R_EAOg6	AGCAATGATATTATTCCTCGTG	676	
EAOg17		3_wzx_F_EAOg17	TTTAGCAACAGCAGGCCATGC	3_wzx_R_EAOg17	TGGAAATTTATCCAGATCTGAAG	630	
EAOg19		3_wzy_F_EAOg19	ATGCTTACAGGCAAGCATTCC	3_wzy_R_EAOg19	GAATTTTCATTTGATTAGATTCTGC	585	
EAOg38		3_wzx_F_EAOg38	TCACATAGATGGTGTCTTGTATTG	3_wzx_R_EAOg38	CATAATGAAATCACTTACACGAAG	496	
EAOg22		3_wzx_F_EAOg22	TTGTTACATCATATTTTACTCGAG	3_wzx_R_EAOg22	TGCAACTTGAATAAATGCCATTC	439	
EAOg33		3_wzx_F_EAOg33	TGCCGTAGGAGTGTCTGCTG	3_wzx_R_EAOg33	ACTGCTAACATGTAATGCCCAG	405	
EAOg9		3_wzx_F_EAOg9	AAGCTACTGACTCCTGAAGAG	3_wzx_R_EAOg9	CATTTAATGCACTCATATGATG	355	
EAOg14		3_wzx_F_EAOg14	TGTAGGCGTTATTGGTAATACG	3_wzx_R_EAOg14	TGCAACAGTGAGATAAATACTG	307	
EAOg30		3_wzy_F_EAOg30	AGGTACGCAAATACGTGCAGC	3_wzy_R_EAOg30	TGTAATAATGGATTAACTACTCC	268	
EAOg12		3_wzx_F_EAOg12	CGATGGCTTGTATTTCTGCGAG	3_wzx_R_EAOg12	AGGGCTGGCTGTATTACAGC	209	
EAOg25		3_wzx_F_EAOg25	ACGAACGCTTTTACTGTATTGC	3_wzx_R_EAOg25	TGCACAACGAAAATAACACATTCAA	188	

\*E. albertii 特異的プライマー: 全EAOg型のE. albertiiは、本プライマーにより増幅される

表5. 集団食中毒事例由来株のEAOg型

分離年	機関	由来	EAOg型
2003	a	患者1	EAOg1
		患者2	EAOg1
2005	a	患者1	EAOg25
		患者2	EAOg25
		患者3	UT*
2011	b	従事者	EAOg2
		患者	EAOg2
2013	b	患者	EAOg12
		食品	EAOg12
2014	c	患者	EAOg8
	a	患者	EAOg12
2016	d	患者1	EAOg5
		患者2	EAOg5
		患者3	EAOg5
		患者4	EAOg5
		従事者	EAOg5
	e	患者1	UT
		患者2	UT
		患者3	UT
		患者4	UT
		患者5	UT
		患者6	UT
	f	食品	UT
		従事者	UT
2017	g	食品	EAOg11
		患者1	EAOg11
		従事者	EAOg11
		患者2	EAOg11
		患者3	EAOg11
2019	h	患者1	EAOg9
		患者2	EAOg18
		患者2	EAOg18
		患者3	EAOg18
		患者4	EAOg25
		患者5	EAOg18

\*1st、2nd、および3rdプライマーセットのいずれでも型別用のPCR産物が確認されなかった

表6. 下痢症および無症状保菌者由来株のEAO<sub>g</sub>型

分離年	機関	由来	O <sub>g</sub> 型
1994	i	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 2
2000	i	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 3
2011	h	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 4
2013	c	下痢症患者	UT*
2014	b	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 9
		下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 28
	i	無症状保菌者	UT
2015	i	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 3
		下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 3/29
2017	b	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 23
	i	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 8
2018	j	下痢症患者	UT
	i	無症状保菌者	UT
	c	症状不明	UT
2019	j	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 3
	b	下痢症患者	EAO <sub>g</sub> 3

\*1st、2nd および 3rd プライマーセットのいずれでも型別用の PCR 産物が確認されなかった。

表7. 動物由来株のEAO<sub>g</sub>型

分離年	機関	由来	EAO <sub>g</sub> 型
2014	b	野鳥	EAO <sub>g</sub> 8
		野鳥	EAO <sub>g</sub> 25
		ムクドリ	UT*
		スズメ	EAO <sub>g</sub> 8
		ニホンザル	EAO <sub>g</sub> 16
		カラス	EAO <sub>g</sub> 7
2019	k	ニワトリ	EAO <sub>g</sub> 3
			EAO <sub>g</sub> 4
			EAO <sub>g</sub> 4
		EAO <sub>g</sub> 3	

\*1st、2nd および 3rd プライマーセットのいずれでも型別用の PCR 産物が確認されなかった。

表8. 食品および環境由来株のEAO<sub>g</sub>型

分離年	機関	由来	EAO <sub>g</sub> 型
2018	l	食品A	UT*
2019	k	食品A	UT
		食品A	UT
		食品A	EAO <sub>g</sub> 40
	l	食品A	UT
		食品A	UT
	c	食品A	UT
		食品B	UT
	m	環境A	EAO <sub>g</sub> 40
		環境A	EAO <sub>g</sub> 23
	n	食品C	EAO <sub>g</sub> 3

\*1st、2nd および 3rd プライマーセットのいずれでも型別用の PCR 産物が確認されなかった。

令和2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

*E. albertii* の食品・環境中での挙動

#### 研究要旨

食品および環境水での *E. albertii* の増殖挙動の解析を行った。食品検体（トリ肉、ブタ肉、マガキおよびイワガキ）では、中温である20℃および30℃において *E. albertii* は一晩で10,000から100,000倍に急速に増加することが明らかになったが、低温である4℃および10℃において菌数は大きくは変動しない傾向であった。また、環境水検体（井戸水および海水）では、4℃および10℃において井戸水検体中の菌数はほとんど変動せず、海水検体ではゆるやかに減少し、20℃および30℃において井戸水検体中の菌数は4℃および10℃よりも比較的早く減少し、この傾向は海水検体の方が顕著であった。これらのことから、*E. albertii* 汚染食品の中温での保管によって本菌が増殖することが考えられ、低温では増殖を防げることが判明した。また、*E. albertii* 汚染環境水中の本菌は低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになった。環境水中で菌が生存することによって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。河川等の環境水のさらなる調査は汚染経路の解明に重要であると考えられた。

#### 研究協力者

埼玉県衛生研究所

佐藤美佳、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

東海大学海洋学部

鈴木恭平、後藤慶一

国立医薬品食品衛生研究所

都丸亜希子、廣瀬昌平、新井沙倉

#### A. 研究目的

日本国内における *E. albertii* 集団食中毒での原因食品として、ニガナの白和え（2016年、沖縄県、患者217名）、キ

ャンプ場内の湧き水（2005年、大分県、患者273名）など食品や環境水が報告されている。過去の *E. albertii* 汚染実態の調査で、食品では、トリ肉（日本、中国）、アヒ

ル肉やブタ肉等の食肉(中国)、レタス(ドイツ)およびチーズ(エジプト)からの分離報告があり、動物では、鶏や豚といった家畜での分離報告がある。また、環境水では、河川および公園の濠から*E. albertii*が分離された報告がある。これらのことから食肉や環境水での*E. albertii*の増殖や死滅など挙動を解明することによって本菌の食中毒防止対策に有益な知見が得られることが考えられる。

本研究では、食肉としてトリ肉およびブタ肉、環境水として井戸水および海水、また、淡水と海水が混合する汽水域で生息する貝類であるマガキおよびイワガキを*E. albertii*の汚染の可能性が考えられる検体に選定し、低温から中温下での本菌の挙動を解析することとした。これによって、食品の取扱条件や自然環境からの食品の汚染について考察に役立つ知見が得られると考えられる。

## B. 研究方法

### (1) 供試菌株

東京都で2013年に発生した散発食中毒の患者由来株(菌株番号EA21)および宇都宮市内で2017年に発生した集団食中毒の患者便由来株(菌株番号EA24)を供試した(両菌株ともに乳糖、白糖、キシロースおよびラムノース非分解性)。

### (2) 供試検体

食品検体として、東京都内または埼玉県内で購入した国産トリ肉(ささみ・皮なし)、国産ブタ肉(もも肉)、イワガキおよびマガキを供試した。それら25gずつストマッカー袋に採り試験検体とした。また、環境水検体として、埼玉県内

および千葉県内の井戸水、神奈川県内の海水を滅菌ボトルを用いて採水し供試した。それらを滅菌したメディウムビンに分注し試験検体とした。いずれも条件ごとに3検体ずつとした。

### (3) 供試検体の*E. albertii*非汚染の確認

食品検体では、検体25gを入れたストマッカー袋にノボビオシン加mEC培地(NmEC、栄研化学)225mLを加えて1分間ストマッカー処理した。環境水検体では、検体125mLを入れた滅菌メディウムビンに2倍濃度のNmEC 125mLを加えた。これらを42°Cで22±2時間培養した。

この培養液を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。培養液0.1mLを1.5mLネジロチューブに分注し、10,000×gで10分間遠心し、上清を除いた。50mM NaOHを85μL添加して再浮遊させ、ヒートブロックを用いて100°Cで10分間加熱した。氷上で冷却後、1M Tris-HCl(pH 7.0)を15μL添加して中和した。中和後、10,000×gで10分間遠心し、上清約100μLを2.0mLネジロチューブに移し、DNA抽出液とした。

DNA抽出液5μLを*E. albertii*特異的リアルタイムPCR法(Arai, S., et al 未発表)に供試した(表1)。反応溶液の組成および量を表2に示す。リアルタイムPCRの反応条件を、50°C2分および95°C10分の熱変性ののち、95°C15秒-60°C1分を45サイクルとし、Applied Biosystems 7500を用いて行った。

### (4) 供試検体の生菌数、大腸菌数および大腸菌群数の測定

食品検体では、検体25gを入れたスト

マッカー袋にPBS 225 mLを加え、袋の外から揉み潰したものを乳剤原液とした。環境水検体では、PBSにて  $10^{-4}$ まで10倍階段希釈した。これらを標準寒天培地に塗抹し、37°Cで24~48時間培養し生菌数をカウントした。また、XM-G寒天培地（XM-G、日水製薬）に塗抹し、37°Cで24時間培養し大腸菌数および大腸菌群数をカウントした。

#### (5) *E. albertii*接種菌液の作製および検体への接種

*E. albertii*の食品検体への接種菌数について、4°Cおよび10°Cで保管する検体には4.0 log CFU/25 g、20°Cおよび30°Cで保管する検体には2.0 log CFU/25 gとなるように、また、環境水検体への接種菌数について、4°Cおよび10°Cで保管する検体には4.0 log CFU/25 mL、20°Cおよび30°Cで保管する検体には3.0 log CFU/25 mLとなるように次の方法にて調製した。*E. albertii*の菌株をトリプトソイブロス (TSB) 中で37°C、18時間培養した。食品検体用には、菌培養液をPBSで  $10^{-4}$ まで10倍階段希釈した。さらに5.0 log CFU/mlの濃度になるように微調製のための希釈を各株ごとに行った。これを4°Cおよび10°C保管の検体への接種菌液A (5.0 log CFU/mL) とした。また、接種菌液AをPBSにて  $10^{-2}$ 希釈まで10倍階段希釈した。これを20°Cおよび30°C保管の検体への接種菌液B (3.0 log CFU/mL) とした。これら接種菌液 (菌株EA21またはEA24) 0.1 mLをストマッカー袋に入った食品検体25 gに接種し、手で少しなじませた後、ヒートシールし菌非接種検体と共に4°C、10°C、20°Cおよび

30°Cで保管した。

環境水検体用には、菌培養液をPBSで  $10^{-3}$ まで10倍階段希釈した。さらに4.0 log CFU/mlの濃度になるように株ごとに希釈した。これを4°Cおよび10°C保管用の検体への接種菌液A (4.0 log CFU/mL) とした。また、接種菌液AをPBSに加えて10倍階段希釈し20°Cおよび30°C保管用の検体への接種菌液B (3.0 log CFU/mL) とした。これら接種菌液AまたはB 1.2 mL ( $1.2 \times 10^4$  CFU または  $1.2 \times 10^5$  CFU) を接種し (接種後: 400 CFU/mLまたは40 CFU/mL)、菌非接種検体と共に4°C、10°C、20°Cおよび30°Cで保管した。

#### (6) 各種温度条件で保管した *E. albertii*接種検体の菌数測定

食品検体では、4°C、10°C、20°Cおよび30°Cで表3に示す時間保管した後に、各検体にPBS 225 mLを加えストマッカー処理し、これを乳剤原液とした。乳剤原液または表3に示した各希釈段の希釈液0.1 mLを1%キシロース・1%ラムノース添加DHL培地 (XR-DHL、DHL:日水製薬) に2枚ずつ塗抹した。また、接種直後については、乳剤原液0.1 mLをXR-DHL5枚 (計1 mL) に塗抹した。なお、残りの乳剤原液を-20°Cで冷凍保存した。

環境水検体では、4°C、10°C、20°Cおよび30°Cで表4に示す時間保管した後に、それぞれ10 mLを採取し、これを原液とした。原液または表4に示した希釈段の希釈液0.1 mLをXR-DHL 10枚に、 $10^{-1}$ 希釈液及び $10^{-2}$ 希釈液0.1 mLずつをXR-DHL 2枚に塗抹した。また、接種直後については、原液0.2 mLをXR-DHL 5枚に、 $10^{-1}$ 希

积液0.1 mLをXR-DHL 2枚に塗抹した。なお、残りの原液を $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

XR-DHLを $37^{\circ}\text{C}$ で $22\pm 2$ 時間培養し、生育した*E. albertii*の典型的コロニー（不透明の乳白色）の数をカウントした。また、各検体につき、典型的コロニーのうち3コロニーをリアルタイムPCRに供試して*E. albertii*であることを確認した。その陽性率を典型的コロニーの数に乘じ、菌数を算出した。

#### (7) リアルタイムPCRを用いた検体中の*E. albertii*定量分析

食品由来細菌の生育によりコロニー数のカウントが困難であった、またはリアルタイムPCRに供試したコロニーの陽性率が0であった場合、検体の原液に含まれる*E. albertii*の菌数をリアルタイムPCRで定量し推定した。

##### 1) 検量線の作成

*E. albertii*供試菌株をTSB中で $37^{\circ}\text{C}$ で18時間培養し、EA21の培養液ではPBSで3/5倍希釈、EA24の培養液では4/5倍希釈したものを原液とした。これを $10^{-8}$ まで10倍階段希釈した。原液および各希釈液を凍結保存されていた菌非接種検体で $20^{\circ}\text{C}$ で1日培養した検体原液に加えて菌数が約 $8 \log \text{CFU/mL}$  ( $10^{-1}$ ) ~ 約 $0 \log \text{CFU/mL}$  ( $10^{-9}$ ) 希釈液を作製した。これらからDNAを抽出した。

これらのDNA抽出液を、「(3) 供試検体の*E. albertii*非汚染の確認」に従ってリアルタイムPCRを行った。Ct値およびその菌数から検量線をプロットし

##### 2) 検体のCt値からの菌数算出

検体液からDNA抽出し、リアルタイムPCRを行った。そのCt値を検量線の式に

代入し、推定菌数を算出した。

#### C. 研究結果

1) 供試検体の*E. albertii*非汚染の確認  
リアルタイムPCR測定の結果、供試したすべての検体で*E. albertii*は検出されず、汚染のないことが確認された。

2) 供試検体の生菌数、大腸菌数および大腸菌群数

供試検体の生菌数、大腸菌数および大腸菌群数を表5に示す。食品検体では、マガキ2およびイワガキ1の生菌数、大腸菌数および大腸菌群数はいずれも非検出であった。これら以外の食品検体では、生菌数については $4.5 \times 10^2 \text{CFU/g}$  ~  $3.7 \times 10^4 \text{CFU/g}$ 、大腸菌については $1.0 \text{CFU/g}$  ~  $4.0 \times 10^3 \text{CFU/g}$ 、大腸菌群については $2.0 \times 10^2 \text{CFU/g}$  ~  $3.1 \times 10^4 \text{CFU/g}$ が検出された。

これに対して、環境水検体では、すべての検体において生菌数および大腸菌数は非検出であった。大腸菌群は海水1 ( $2.0 \times 10^2 \text{CFU/g}$ ) のみ検出され、他の環境水検体から検出されなかった。

3) *E. albertii*接種菌数

各検体へ接種するための*E. albertii*の増殖菌数および接種菌数を表6に示す。EA21およびEA24の培養液の菌数は、全試験機間において $9.0 \sim 9.4 \log \text{CFU/mL}$ であった。

また、食品検体用の接種菌数は、 $4^{\circ}\text{C}$ および $10^{\circ}\text{C}$ では $4.5 \sim 3.8 \log \text{CFU/mL}$ であり、 $20^{\circ}\text{C}$ および $30^{\circ}\text{C}$ では $1.8 \sim 2.5 \log \text{CFU/mL}$ であり、環境水検体の接種菌数は、 $4^{\circ}\text{C}$ および $10^{\circ}\text{C}$ では $3.0 \sim 3.6 \log \text{CFU/mL}$ であり、 $20^{\circ}\text{C}$ および $30^{\circ}\text{C}$ では

2.0 ~2.6 log CFU/mLであり、予定した接種菌数で試験を行った。

#### 4) *E. albertii*の菌数の変動（培養法による測定）

食品検体の20℃および30℃では、すべての検体で菌数は増加した（図1と2）。ただし、マガキ（菌株EA21および菌株EA24）での20℃において、1日後から2日後にかけて菌数は増加しない傾向であった。これに対して、4℃および10℃では、いずれの食品検体も測定期間を通して菌数の大きな増減はみられなかった。

しかし、30℃のトリ肉（菌株EA21および菌株EA24）で6時間、20℃のトリ肉（菌株EA21）の2日後およびトリ肉（菌株EA24）の1日後と2日後、10℃ではトリ肉（菌株EA24）の3日後で*E. albertii*は検出されなかった。食品検体での非検出（ND）の要因は、食品由来細菌が多数生育し典型的な*E. albertii*のコロニーの鑑別が困難となったためである。

環境水検体の20℃および30℃では、すべての検体で菌数は減少した。この傾向は、20℃よりも30℃で、井戸水検体よりも海水検体で、菌数の減少は著しかった。4℃および10℃では、井戸水検体の菌数は測定期間中ほぼ変化しなかったのに対して、海水検体の菌数は計数期間を通して緩やかに減少した。

海水1の20℃および30℃では2日後以降、海水2の30℃では2日後以降、海水2の20℃では3日後以降、井戸水検体ではともに30℃の6日後以降、20℃の井戸水1では9日後、海水2の10℃の6日後以降にコロニーが生育しなかった。環境水検体での非検出（ND）は、コロニー

が生育していないためであり、食品検体での非検出とは理由は異なる。

#### 5) *E. albertii*の菌数の変動（リアルタイムPCR法による測定）

各検体での検量線を図4から6に示す。この結果から推定した菌数による*E. albertii*の菌数の変動を図7から9に示す。

ブタ肉検体の検量線（図4）は、いずれ場合も3.0 ~8.0 log CFU/mLで直線性があり、培養法での挙動とリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動の違いは見られなかった。

トリ肉検体の検量線（図4）は、菌株EA24では直線性があったが、菌株EA21では低菌数での直線性がフィットしていなかったために2次式を用いた。このため、菌株EA24は培養法での挙動とリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動の傾向はほぼ同じであったのに対して、菌株EA21では低菌数である4℃および10℃では、培養法での挙動よりリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動の方が高い値となった。

マガキ検体の検量線（図5）は、菌株EA24では直線性があったが、菌株EA21では高菌数および低菌数での直線性がフィットしていなかったために2次式を用いた。菌株EA21では非検出がなかったため培養法での挙動とリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動の傾向はほぼ同じであったのに対して、菌株EA24ではリアルタイムPCRによる検出が30℃1日後のみであったため、ほとんどのプロットが検出限界値もしくはこの値を下回った推定菌数となった。このため培養法

での挙動とリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動が異なる傾向となった。

イワガキ検体の検量線 (図5) は、いずれの場合も直線性があったが、4℃および10℃に関してはマガキ (菌株EA24) と同様にUDが多いためリアルタイムPCR法による推定菌数の多くは検出限界値となったため計測期間中に増減がない結果となった。20℃および30℃のリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動は、いずれの場合も培養法での挙動に比較すると高い値の傾向になり、特にイワガキ (菌株EA24) の20℃の推定菌数では1日後から2日後に急激な増加となった。

環境水検体では、いずれの検量線でも直線性となった (図6) が、これらの検体のほとんどのケースがUDであったためリアルタイムPCR法による推定菌数のほとんどが検出限界値となった。このため培養法での挙動とリアルタイムPCR法による推定菌数の挙動は異なる結果を示した。

#### D. 考察

本研究での*E. albertii*の検出方法は、昨年度開発したキシロースおよびラムノースを添加したDHL寒天培地、同じく昨年度に開発した本菌特異的リアルタイムPCR法を併用し、*E. albertii*を接種した食品および環境水から検出を試み、その挙動を解析した。

食品検体では、XR-DHL選択培地上に増殖する食品由来細菌が多く、*E. albertii*コロニーの分離が難しい場合があることが判明した。また、*E. albertii*の典型的コロニーがリアルタイムPCR法にて陰性にな

り、*E. albertii*に類似のコロニーが多く生育することが明らかになった。このため、リアルタイムPCR法による*E. albertii*の定量分析を行ない、菌数を推定することを試みた。培養法での計測値と大きく異なる場合もあるが、良好な検量線が作成されていることを考えると、リアルタイムPCR法での推定菌数の信頼性は高いと考えられた。しかし、リアルタイムPCRでは $10^3 \sim 10^8$  CFU/mLの検出は良好であったが、*E. albertii*の濃度がさらに低い場合でも検出が可能になることが望まれる。また、分離の目的のためには、さらに選択性を高めた選択培地の改良を行う必要がある。

これまでの食中毒事件および保菌動物調査、環境調査による報告では、食肉を含む家畜、ニワトリ、アヒル、ブタ、ウシ、野鳥や環境水の報告があった。*E. albertii*の制御法を考える上で、汚染経路の推定は制御の第一歩となる。そこで、家畜など陸生動物由来の汚染経路、および、これまで報告はされていないが、海産魚介類由来の経路を考慮し、ブタ肉、トリ肉、井戸水、マガキ、イワガキ、海水での*E. albertii*の増殖挙動の解析を行った。

この結果、中温である20℃および30℃の食品検体中では、接種した*E. albertii*は一晩で10,000から100,000倍に急速に増加することが明らかになったが、低温である4℃および10℃では菌数は大きくは変動しないという傾向であった。

有機物濃度が低い環境水検体においては、4℃および10℃の井戸水検体では菌数はほとんど変動せず、海水検体ではゆるやかに減少し、20℃および30℃の環境水検体では菌数は4℃および10℃より比較的早く

減少し、この傾向は海水検体の方が顕著であった。このことから、*E. albertii*は塩分耐性に弱く、低温では増殖しない、もしくは増殖能力が低いことが示唆された。しかし、測定期間中に経時的にコロニー数が減少した原因として、接種した*E. albertii*が死滅したのか、コロニー形成能が一時的に消失しただけなのかなどの生理状態に関する検討は行っていない。

これらの結果から、有機物が豊富な状態で、塩濃度が低く、20～30℃くらいの温度条件下では*E. albertii*は短時間で急激に増加すること考えられる。このことは、家畜および農作物などは塩濃度が低い環境水を経由して汚染される可能性があること、淡水の魚介類は環境水から保菌する可能性が高いことが示唆され、*E. albertii*に汚染されてから中温に保存されるとその菌数は急激に増加することによって食中毒の原因の食材になる可能性が考えられる。一方、海水由来の魚介類では海水を経由した保菌の可能性より、流通過程、保存状態や調理過程における汚染および増殖によって食中毒を誘発する原因となる可能性が高いことが示唆された。これらのことから、*E. albertii*の汚染経路の推定およびその増殖と死滅を推定する上でも、温度、塩濃度、pHなど個々の環境要因との増殖および死滅との関係も明確にする必要がある。

#### E. 結論

食品および環境水での*E. albertii*の増殖挙動の解析を、昨年度開発したキシロースおよびラムノースを添加した選択培地およびリアルタイムPCR法を用いて行っ

た。食品検体（トリ肉、ブタ肉、マガキおよびイワガキ）では、中温である20℃および30℃において*E. albertii*は一晩で10,000から100,000倍に急速に増加することが明らかになったが、低温である4℃および10℃において菌数は大きくは変動しない傾向であった。また、環境水検体（井戸水および海水）では、4℃および10℃において井戸水検体中の菌数はほとんど変動せず、海水検体ではゆるやかに減少し、20℃および30℃において井戸水検体中の菌数は4℃および10℃よりも比較的早く減少し、この傾向は海水検体の方が顕著であった。これらのことから、*E. albertii*汚染食品の中温での保管によって本菌が増殖することが考えられるが、低温では増殖を防げることが判明した。また、*E. albertii*汚染環境水中の本菌は低温で生残が維持され、中温では死滅しやすいことが明らかになった。環境水中で菌が生存することによって環境汚染の維持や農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。河川等の環境水のさらなる調査は汚染経路の解明に重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

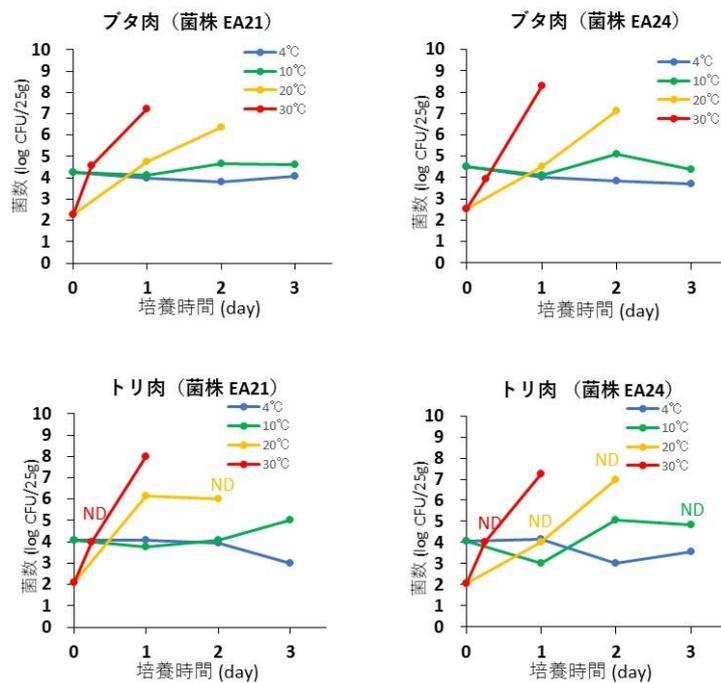


図1. ブタ肉およびトリ肉中の *E. albreitii* 菌数の変動 (培養法による測定)

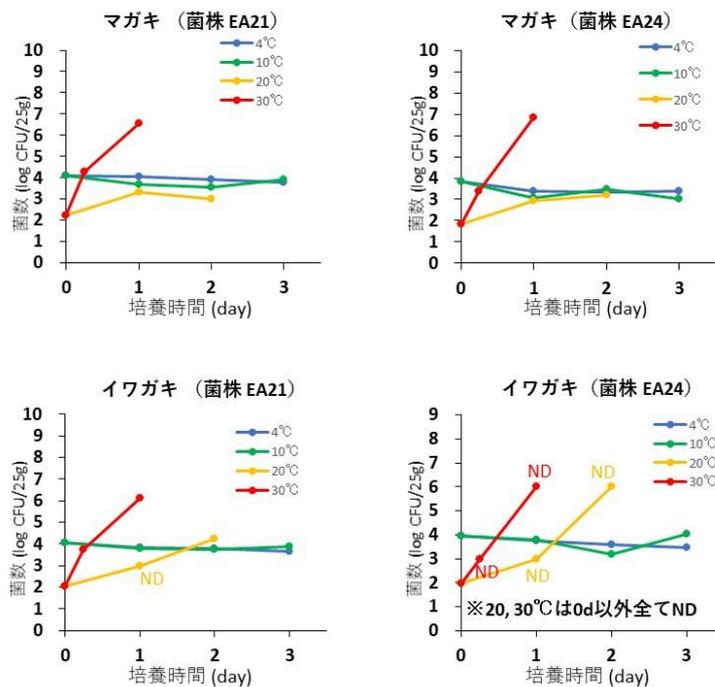


図2. マガキおよびイワガキ中の *E. albreitii* 菌数の変動 (培養法による測定)

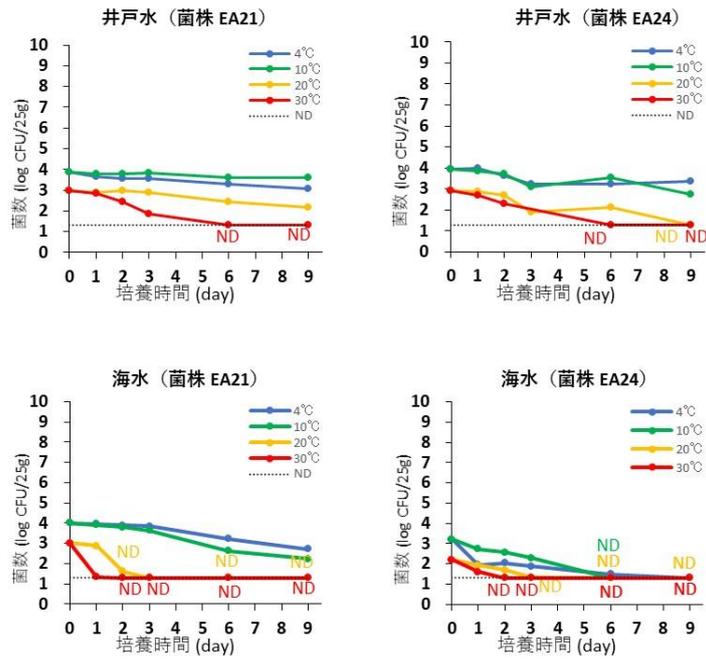


図3. 井戸水および海水中の *E. albreitii* 菌数の変動 (培養法による測定)

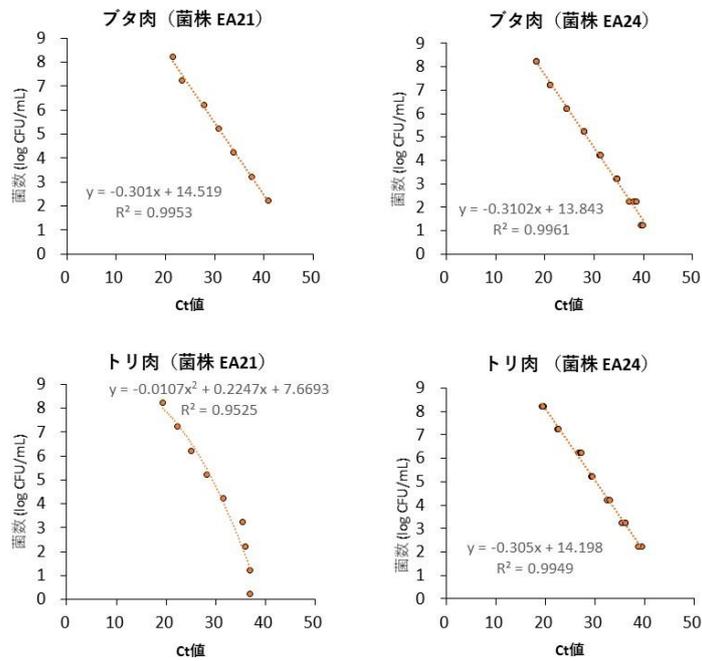


図4. ブタ肉およびトリ肉におけるリアルタイム PCR による *E. albreitii* 菌数算出のための検量線

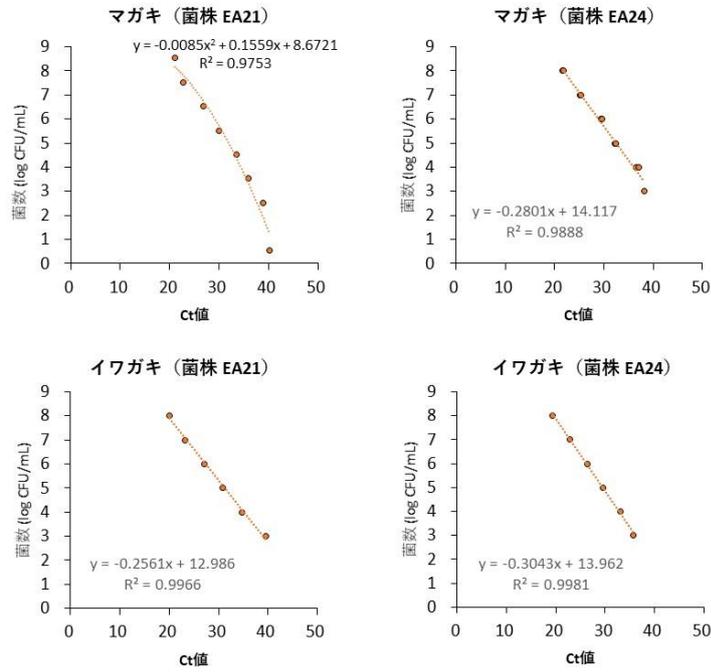


図5. マガキおよびイワガキにおけるリアルタイム PCR による *E. albreitii* 菌数算出のための検量線

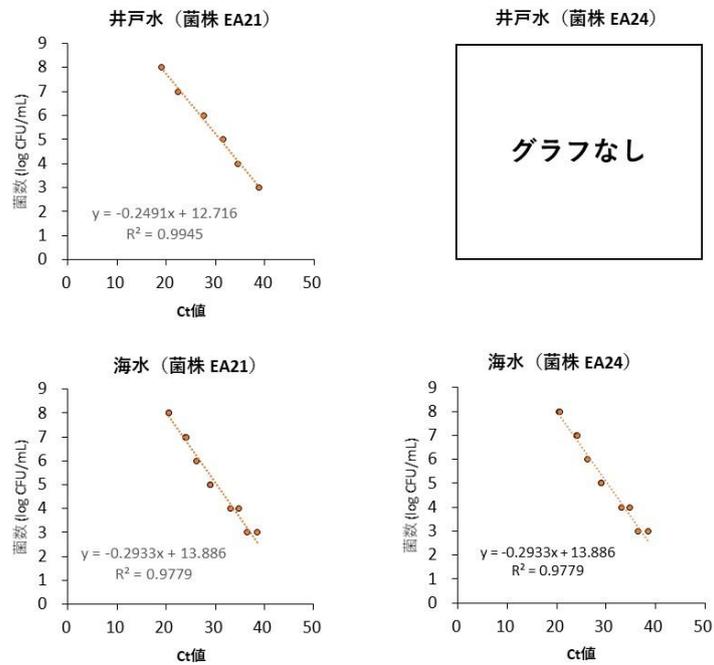


図6. 井戸水および海水におけるリアルタイム PCR による *E. albreitii* 菌数算出のための検量線

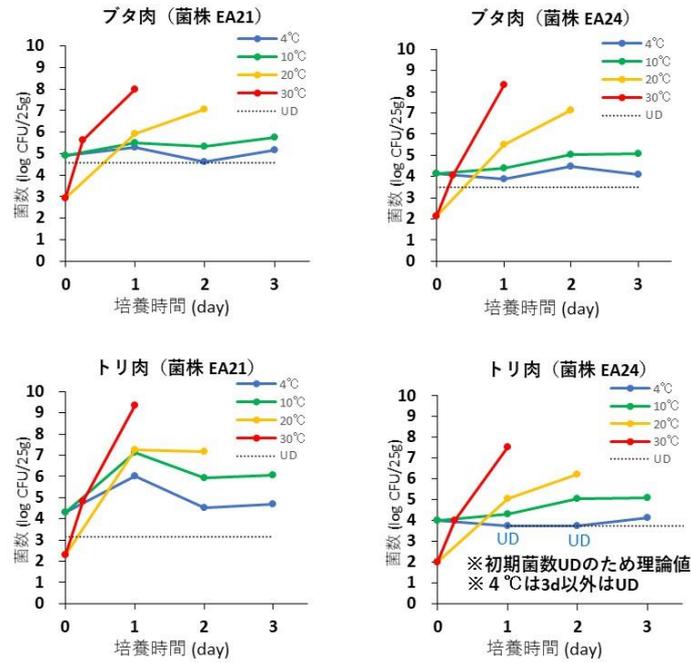


図7. ブタ肉およびトリ肉中の *E. albreitii* 菌数の変動 (リアルタイム PCR 法による測定)

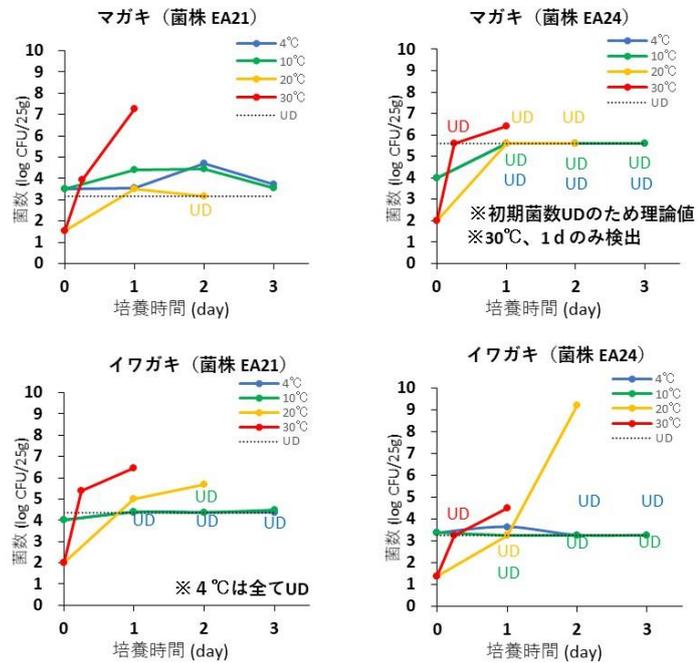


図8. マガキおよびイワガキ中の *E. albreitii* 菌数の変動 (リアルタイム PCR 法による測定)

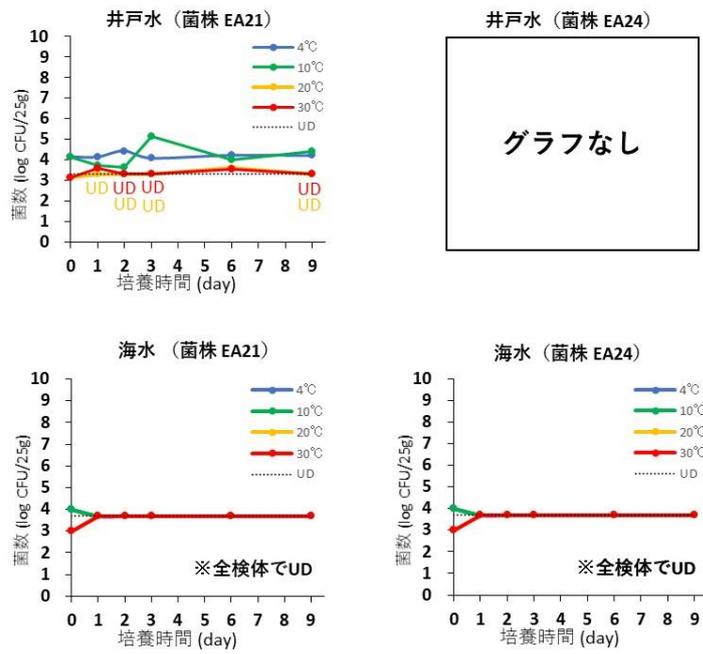


図9. 井戸水および海水中の*E. alberti*菌数の変動 (リアルタイムPCR法による測定)

表1. *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

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_rt2	フォワードプライマー : EA_rt2F	97bp
	リバースプライマー : EA_rt2R	
	プローブ : EA_rt2P (FAM/BHQ)	

表2. 1 反応あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 ( $\mu$ l)
2 $\times$ Taqman Environmental Mastermix Master Mix	15.00
Primer EA_rtF2 (20 $\mu$ M)	0.45
Primer EA_rtR2 (20 $\mu$ M)	0.45
Probe EA_rtP2 (10 $\mu$ M)	0.45
滅菌蒸留水	8.65
DNAテンプレート	5.00
合計	30.00

表3. *E. albertii* 接種食品検体の保存温度・時間の組み合わせおよびその菌数測定に供試した乳剤の希釈段

温度 (°C)	保存時間				
	0 時間	6 時間	1 日	2 日	3 日
4	原液		原液	原液	原液
				-1	-1
					-2
10			原液	原液	原液
				-1	-1
					-2
20			原液	-4	
				-4	-5
				-5	-6
30		原液	-4		
		-1	-5		
			-6		

表4. *E. albertii* 接種環境検体の保存温度・時間の組み合わせおよびその菌数測定に供試した乳剤の希釈段

温度 (°C)	保存時間									
	0 日	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日
4	原液	原液	原液	原液			原液			原液
10		原液	原液	原液			原液			原液
20		原液								
		-1	原液	原液			原液			原液
30		原液								
		-1	原液							
		-2								

表5. 各検体の生菌数、大腸菌数および大腸菌群数

検体	菌株	生菌数 (CFU/g or mL)		
		大腸菌数 (CFU/g or mL)	大腸菌群数 (CFU/g or mL)	
ブタ肉	EA21	$3.6 \times 10^4$	4.0	$2.4 \times 10^2$
	EA24	$7.9 \times 10^2$	1.0	$2.0 \times 10^2$
トリ肉	EA21	$9.3 \times 10^3$	6.0	$3.9 \times 10^2$
	EA24	$3.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4$
マガキ	EA21	$4.6 \times 10^4$	2.0	$1.8 \times 10^3$
	EA24	ND	ND	ND
イワガキ	EA21	ND	ND	ND
	EA24	$4.5 \times 10^2$	5.7	$4.1 \times 10^2$
井戸水	EA21	ND	ND	ND
	EA24	ND	ND	ND
海水	EA21	ND	ND	2.0
	EA24	ND	ND	ND

ND：非検出（検出限界は食品では生菌数：50 CFU/g、大腸菌および大腸菌群：10 CFU/g  
環境水では生菌数：5 CFU/mL、大腸菌および大腸菌群：1 CFU/mL）

表6. 各検体へのEA21およびEA24の接種菌数の確認

検体	菌株	接種菌数 (log CFU / 25 gまたはmL)	
		4°Cおよび10°C	20°Cおよび30°C
ブタ肉	EA21	4.3	2.3
	EA24	4.5	2.5
トリ肉	EA21	4.3	2.3
	EA24	4.1	2.1
マガキ	EA21	4.3	2.3
	EA24	3.8	1.8
イワガキ	EA21	4.1	2.1
	EA24	4.0	2.0
井戸水	EA21	3.0	2.0
	EA24	3.6	2.6
海水	EA21	3.0	2.0
	EA24	3.0	2.0

令和 2 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 12 遺伝子のうち、病原性に関わると考えられる遺伝子について発現条件の解析を行った。その結果、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。また、これとは別に既知の病原因子である TccP について、配列相同性の異なるバリエーションを同定した。鞭毛抗原（H 抗原）の多様性に関してデータベース上に登録された 243 株のゲノム情報を用いて解析を実施し、本菌に 4 種類の H 抗原遺伝子型（EAH genotype [EAHg]; EAHg1-EAHg4）しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。さらに、この情報を利用して、EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。本システムの有用性を確認するため、92 株の *E. albertii* 分離株の検定を実施し、全株が 4 タイプのいずれかに分類されることも確認した。

#### 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。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）と共通の locus of enterocyte effacement（LEE 領域）にコードされる III 型分泌系などの病原因子を保有することが分かっているが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、EPEC や EHEC と感染性や病原機構などが異なる可能性が

示唆されており、加えて、志賀毒素産生株による溶血性尿毒症症候群も発生していることから、さらなる研究が求められている。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜において保菌が報告されている (Epidemiol. Infect. 144: 45-52, 2016) が、本菌の発症菌量や主要な汚染食品は不明である。

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を目的としており、それらを達成することにより、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 2 年度は、前年度に同定した病原性への関連が明らかとなった病原関連候補遺伝子について、その発現条件や機能解析を行った。また、これまでに全く明らかにされていないが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鞭毛抗原 (H 抗原) に着目し、その抗原性に関わるフラジェリン (*fliC* 遺伝子にコードされる) の多様性検討と疫学ツールの開発を目指す。

## B. 研究方法

### (1) 配列解析使用菌株

*eae*, *tir*, *tccP*, *fliC* 遺伝子の多様性解析は、NCBI/GenBank/DDBJ などの公開データベースに登録されている *E. albertii* 243 株のゲノム配列を対象として実施した。

### (2) 病原関連候補遺伝子の発現条件検討

各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、異なる栄養条件 (Tryptic Soy Broth [TSB] 原液, 1/10 TSB 希釈液)、培養温度 (37°C, 20°C) で培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。昨年度の研究において、付着能および細胞内生存能への関与が示唆された病原関連候補遺伝子を標的として、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR (Takara) を用いてリアルタイム RT-PCR を実施し、 $\Delta \Delta Ct$  法により各培養条件における発現レベルを解析した。発現解析の内在性コントロールには *rpoB* 遺伝子を用いた。

### (3) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性および分布の解析

インチミンをコードする *eae* 遺伝子の多様性解析を行った。*eae* 遺伝子は多様性が高いことが分かっているため、当該遺伝子の同定はその上下流に存在し、比較的配列保存性の高い *cesT* 遺伝子、*escD* 遺伝子を blastn 解析により検出して 2 遺伝子間の配列を抽出し、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。インチミンサブタイプ

ングには既知のインチミンサブタイプ 38 種類のアミノ酸配列に対する tblastn 解析により実施し、95%未満の塩基配列相同性を示した場合は新規インチミンサブタイプと同定した。

Tir および TccP はそれぞれ内部および C 末端に複数のリピート配列が含まれているため、ドラフトゲノムから遺伝子の全長を得ることが難しい。そのため、Tir に関しては既知の Tir バリエーション (V1-V5) の全長アミノ酸に対する配列相同性 (97%以上) を、TccP (TccP1~TccP4 [TccP4 は本研究で新たに同定]) に関しては N 末端 56 アミノ酸の配列相同性 (97%以上) を、それぞれ基準としてバリエーションタイプングを行った。

*eae* 遺伝子のサブタイプ、*tir* 遺伝子および *tccP* 遺伝子のバリエーションについて株ごとの保有パターンに規則性があるのかを調べた。また、*E. albertii* 進化系統におけるこれら 3 遺伝子の分布相関についても解析した。

#### (4) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4] の機能解析

項目 (3) において同定された新規 TccP バリエーションをコードする *tccP4* 遺伝子を、昨年度採用して良好な結果を得た改良 Wanner 法により遺伝子破壊した。遺伝子破壊はヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝

子を保有) を対象とし、標的遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) あるいはカナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) 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それぞれ pKD3 プラスミドと pKD4 プラスミドに存在する *cat* 遺伝子と *kan* 遺伝子を PCR 増幅した。具体的には、相同組換えによる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などを発現する pSIM6 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耐性を獲得したクローンを取得した。取得したクローンについては、標的部位に正しく耐性遺伝子が挿入されていることを標的遺伝子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。

作製した *tccP* 遺伝子バリエーション (*tccP4* 遺伝子) の遺伝子破壊株を Caco-2 細胞に感染させ、TccP4 を介したアクチン重合が起こるかどうかを調べた。具体的には、野生株および遺伝子破壊株を LB 液体培地で一晩前培養し、DMEM 培地を入れた 24 well plate で confluent になるまで増殖させた Caco-2 培養細胞に MOI=100 で感染させた。感染 3 時間で付着していない菌を PBS により 3 回洗浄し、新しい培地を添加後さらに 2 時間培養したのち、

4%パラホルムアルデヒド in PBS 溶液で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS 溶液で 20 分間膜処理をした。その後、DAPI (0.2µg/ml) 溶液と Actin-stain 488 phalloidin 溶液でそれぞれ核とアクチンを染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

(5) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

NCBI/GenBank/DDBJ などの公開データベースに登録されている *E. albertii* 243 株のゲノム配列を対象にフラジェリンをコードする *fliC* 遺伝子の多様性解析を行った。実際には、*fliC* 遺伝子は多様性が高いため、その上下流に位置し、大腸菌においても配列保存性が高いとされている *fliA/fliD* 遺伝子を blastn 解析により検出し、両遺伝子間の領域に含まれる *fliC* 遺伝子を同定した。同定された *E. albertii* の *fliC* 遺伝子と既知の大腸菌のフラジェリンコード遺伝子との比較解析を行った。

(6) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目 (5) で同定した *E. albertii* の各 *fliC* 遺伝子型について、その配列多様性を利用し、PCR による H 抗原遺伝子型タイピングツール (EAH-

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出来る検出系とした。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 EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

C. 研究結果

(1) 病原関連候補遺伝子の発現条件検討

昨年度、宿主細胞への付着、細胞内生存能に関わることが明らかとなった病原関連候補遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を用いた mRNA 発現の解析を行った。その結果、付着および細胞内生存能に関わることが示唆された A, B, C, D 遺伝子群が 37°C, 1/10 TSB 希釈液 (高温・低栄養) の培養条件下において mRNA レベルでより高い発現を示すことが明らかとなった (図 1)。現在、当該遺伝子の中でも細胞内生存能に関わる可能性が示唆されている新規病原候補 A 遺伝子について、ペプチド抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現と菌体および感染細胞内での挙動に関する解析を進めている。

(2) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の多様性

インチミン : 243 株のうち 241 株が *eae* 遺伝子陽性であり、そのうちの 224 株が既知のインチミンサブタイプの中の 20 種類 ( $\alpha 8$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ,  $\iota 2$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\omicron$ ,  $\rho$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$ ,  $\tau$ ,  $\upsilon$ , N1, N2, N3, N4, N5) のうち、いずれかを保有していた。残り 19 株うち、17 株には 3 種類の新規サブタイプと N1 のバリエーションが含まれており、2 株は *eae* 遺伝子がスプリットしていたため、サブタイプを同定出来なかった。検出数の多かったサブタイプは、 $\sigma 1$  (62 株),  $\iota 2$  (28 株),  $\sigma 2$  (21 株) であり、これら 3 つのサブタイプが *E. albertii* に多いタイプであることが明らかとなった (表 1)。

Tir : 243 株のうち 241 株が *tir* 遺伝子陽性であり、相同性解析の結果、バリエーションが 5 タイプ (V1, V2, V3, V4, V5) に分かれること、それぞれ 51 株, 21 株, 47 株, 10 株, 112 株であり、*E. albertii* では V1, V3, V5 が主要なバリエーションであることが明らかとなった (表 2)。また、この 5 つのバリエーションのうち、V1, V2 は、AE lesion 形成に先立つアクチン重合形成において LEE 領域に III 型分泌系により宿主細

胞へ移行するエフェクタータンパク質の 1 つである TccP を必要とするタイプ (EHEC タイプ [Tir-Nck 非依存的]) であり、V3-V5 は TccP を必要としない (EPEC タイプ [Tir-Nck 依存的]) タイプであることも明らかとなった。

TccP : TccP はこれまで 3 つのバリエーション (TccP1, TccP2, TccP3) が同定されていたが、本解析により新規バリエーションとして TccP4 を同定した。243 株において、TccP1-TccP4 はそれぞれ、119 株, 63 株, 7 株, 133 株が保有しており、TccP1 と TccP4 が *E. albertii* において高頻度に分布していることが明らかとなった (表 2)。

(3) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布

*tir* 遺伝子と *eae* 遺伝子を保有する 241 株のうち 215 株 (89.2%) が TccP バリエーションを 1-3 コピー保有していることも明らかとなった (表 3)。ここで、Tir が EPEC タイプであり TccP を保有しない Tir-Nck 依存的経路を示す株、Tir が EHEC タイプであり TccP を保有する Tir-Nck 非依存的経路を示す株、Tir が EPEC タイプでありかつ TccP も保有する両経路を使える株は、それぞれ、25 株, 71 株, 144 であり、

1 株のみどの経路も使えない株が存在した (表 3)。また、全ゲノム高精度系統樹にインチミン、Tir、TccP の分布をプロットした結果、インチミンタイプ、Tir タイプ、TccP タイプともに分布に系統的な相関は見られなかった。また、大きく系統の異なる clade1 と clade2 に同じインチミンタイプが存在したことから、種内で LEE 領域が水平伝播しているあるいは *eae* 遺伝子が組換えを起こしている可能性が示唆された (図 2)。

#### (4) TccP バリエント (TccP4) の機能解析

本解析で新たに同定した TccP4 について、Tir-Nck 非依存的経路を示す EHEC タイプの Tir を持ち、TccP4 バリエントを保有するヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を保有) 株を用いて、遺伝子破壊株を用いた TccP4 の機能解析を行った。その結果、*tccP4* 遺伝子および *tccP1* 遺伝子の両方を破壊した株においても Caco-2 細胞においてアクチン重合が観察された。

#### (5) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

解析した 243 株のうち、215 株において *fliC* 遺伝子を同定できた。遺伝子多様性を解析するため、既知の大腸

菌 H 抗原 (H1-H56 [H13, H22, H50 は欠番]) のフラジェリンコード遺伝子との系統解析を行った結果、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子は大腸菌のものとは異なることが明らかとなった (図 3)。*E. albertii* の *fliC* 遺伝子のみで再解析した結果、本菌には大きく 4 つの *fliC* 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在することが明らかとなった (図 4)。EAHg1-EAHg4 を保有する株はそれぞれ 54 株, 22 株, 46 株, 92 株であり、*E. albertii* においては EAHg4 が高頻度に検出されることがわかった。また、各 EAHg 型が *E. albertii* 進化系統においてどのように分布しているかを調べて結果、各型が異なる進化系統に散在していることが明らかとなり (図 5)、*fliC* 遺伝子および鞭毛抗原遺伝子群が種内で頻繁に組換えを起こしている可能性が示唆された。

#### (6) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目 (3) で同定した 4 種類の EAHg 型の配列多様性を利用し、4 種類 EAH 型を識別できるマルチプレックス PCR 系を構築した。また、その中には *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 組加え、H 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした (図 6)。このシステムの有効性を検討するため、国内ヒト臨床分

分離株およびトリ由来株（計 92 株）について、実際の PCR を実施した結果、全株の EAO 型を同定することができた。EAHg1-EAHg4 はそれぞれ 29 株, 18 株, 15 株, 48 株であり、*in silico* で実施した 215 株での解析結果と同様に EAHg4 が高頻度に存在することが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

#### D. 考察

昨年度は、*E. albertii* に特異的な病原関連遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、宿主細胞への付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定した。今年度はその遺伝子に関する発現解析をすすめ、発現が上がる条件を明らかにした。今後、病原機構の詳細を明らかにするため、ペプチド抗体を用いて機能阻害実験と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。

EHEC, EPEC と同様に細胞付着に必須な *E. albertii* に共通の病原因子として、LEE 領域にコードされるインチミンと Tir、また Tir のバリエーションタイプと関連して病原機構に関わる TccP について、その多様性と分布を明らかにした。その結果、大腸菌においてマイ

ナーなタイプのインチミンが *E. albertii* に多いこと、Tir バリエーションタイプが V1, V2 (EHEC タイプ) の株はほとんどが TccP を保有していることが明らかとなり、V3, V4, V5 (EPEC タイプ) の株においても TccP を保有する株が多いことから、*E. albertii* は Tir-Nck 依存的あるいは Tir-Nck 非依存的のいずれか、もしくは両方の経路により宿主細胞のアクチン重合を引き起こす能力を持つことが示唆された（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエーション (TccP4) に関して、遺伝子破壊株を用いた機能解析を実施したが、遺伝子破壊株においてもアクチン重合が観察された。ここで、K7756 株はドラフトゲノム解析株であり、全ゲノム情報が明らかになっていないため、TccP バリエーションが他にも存在する可能性が示唆されるため、現在ナノポアシーケンスシステム MinION により全ゲノム配列の決定を進め、他のバリエーションの存在有無を確認している。

*E. albertii* の H 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 *fliC* 遺伝子を標的とし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。また、この検出系を用いた分離株における解析で同定できない株がなかったことから、今後、解析対象を増やして確認する必要はあるものの *E. albertii*

においては H 抗原型の多様性はそれほど高くない可能性が示唆された（論文投稿中）。

#### E. 結論

*E. albertii* の特性を解明するにあたり、昨年度、遺伝子破壊株と野生株の表現型の比較から、病原機構に関わることが明らかとなった遺伝子の発現条件検討を行い、37°C、低栄養条件下でそれら病原因子の発現が上がることを明らかにした。しかしながら、ペプチド抗体を用いたタンパク局在解析や詳細な機能解析を行う必要があり、今後も継続して進めていく。診断疫学ツールの開発に関しては、*E. albertii* の H 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、H 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。今後、これまでの解析で得たデータをまとめて学会発表を行うとともに、国際学術雑誌での論文文化を進める。

#### 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

・大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特徴. 食品衛生研究. 70:19 - 35. 2020.

##### 2. 学会発表

・大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* による最近の食中毒の状況と検査法. 令和 2 年度鹿児島県獣医公衆衛生講習会, 鹿児島, 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

表1：243株のインチミンサブタイプ

サブタイプ	株数
$\alpha 1$ (alpha1)	0
$\alpha 2$ (alpha2)	0
$\alpha 8$ (alpha8)	6
$\beta 1$ (beta1)	12
$\beta 2$ (beta2)	0
$\beta 3$ (beta3)	7
$\epsilon 1$ (epsilon1)	3
$\epsilon 2$ (epsilon2)	0
$\epsilon 3$ (epsilon3)	11
$\epsilon 4$ (epsilon4)	2
$\eta$ (eta)	0
$\eta 2$ (eta2)	0
$\gamma 1$ (gamma1)	0
$\gamma 2$ (gamma2)	0
$\iota 1$ (iota1)	0
$\iota 2$ (iota2)	28
$\kappa$ (kappa)	0
$\lambda$ (lambda)	0
$\mu$ (mu)	0
$\nu$ (nu)	12
$\omicron$ (omicron)	11
$\pi$ (pi)	0
$\rho$ (rho)	15
$\sigma$ (sigma)	62
-	21
$\tau$ (tau)	5
$\theta$ (theta)	0
$\xi$ (xi)	10
$\upsilon$ (upsilon)	1
$\zeta$ (zeta)	0
$\zeta 3$ (zeta3)	0
<b>C. rodentium</b>	<b>0</b>
N1.1	4
N1.2	1
N1.3	1
N2	8
N3	1
N4	1
N5	2
N6 (新規)	1
N7 (新規)	1
N1.4 (新規)	3
N8 (新規)	10

Tirタイプ	バリエントタイプ	株数				
		計	TccP1	TccP2	TccP3	TccP4
EHECタイプ	V1	51	47	1	0	32
	V2	21	14	11	1	21
EPECタイプ	V3	47	1	42	5	42
	V4	10	1	1	0	8
	V5	112	55	8	1	30
非保有		2	1	0	0	0
計		243	119	63	7	133

Tirタイプ	計	TccPバリエントのコピー数				
		0コピー	1コピー	2コピー	3コピー	4コピー
EHECタイプ (V1, V2)	72	1	22	42	7	0
EPECタイプ (V3, V4, V5)	169	25	86	51	7	0
Tir非保有	2	1	1	0	0	0
計	243	27	109	93	14	0

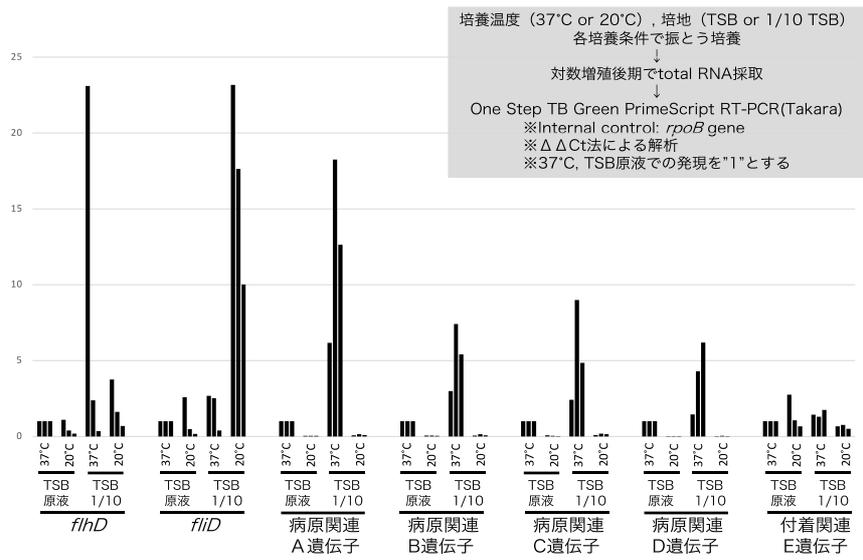


図 1 : 異なる培養条件でのリアルタイム RT-PCR 結果

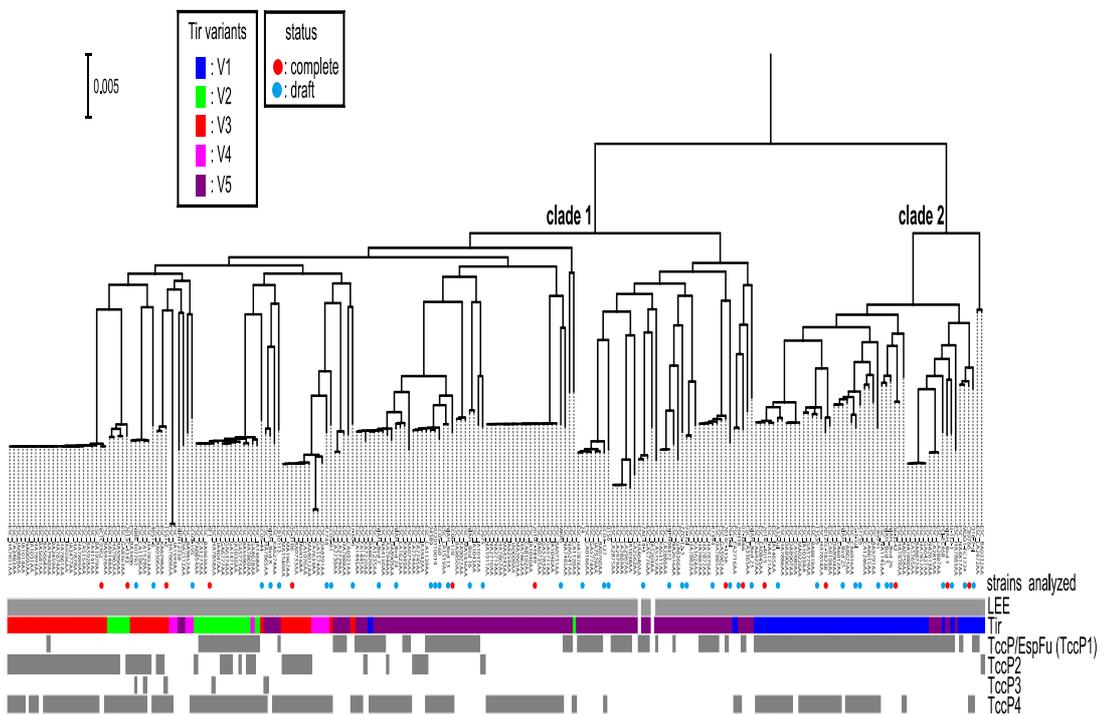


図 2 : *E. albertii* 進化系統における Tir および TccP の分布

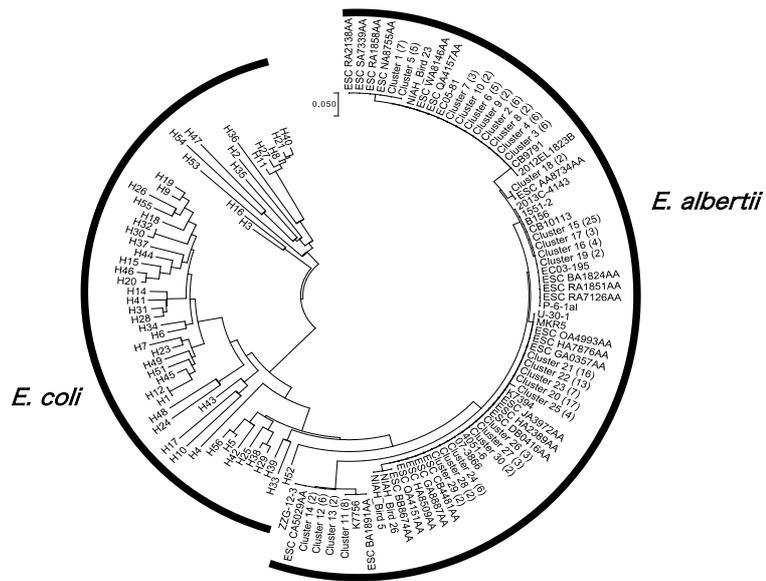


図 3 : 大腸菌および *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

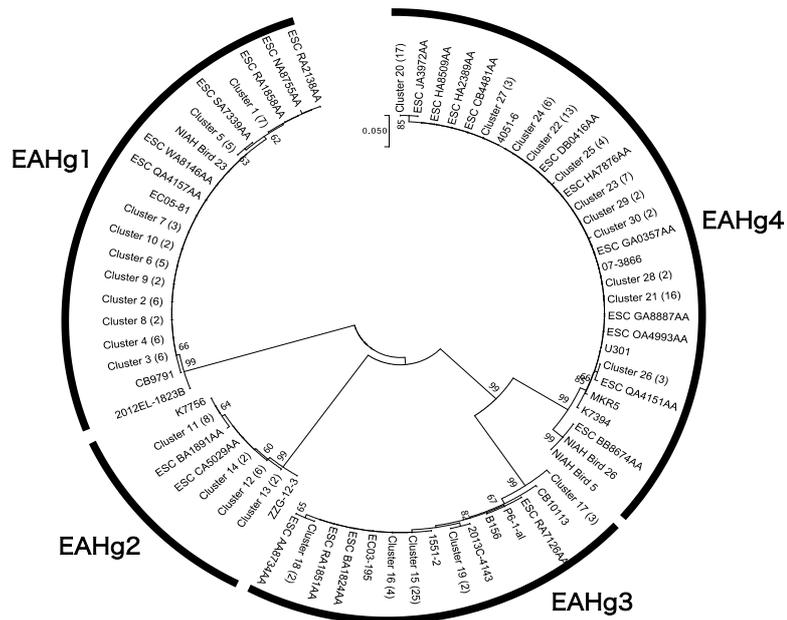


図 4 : *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

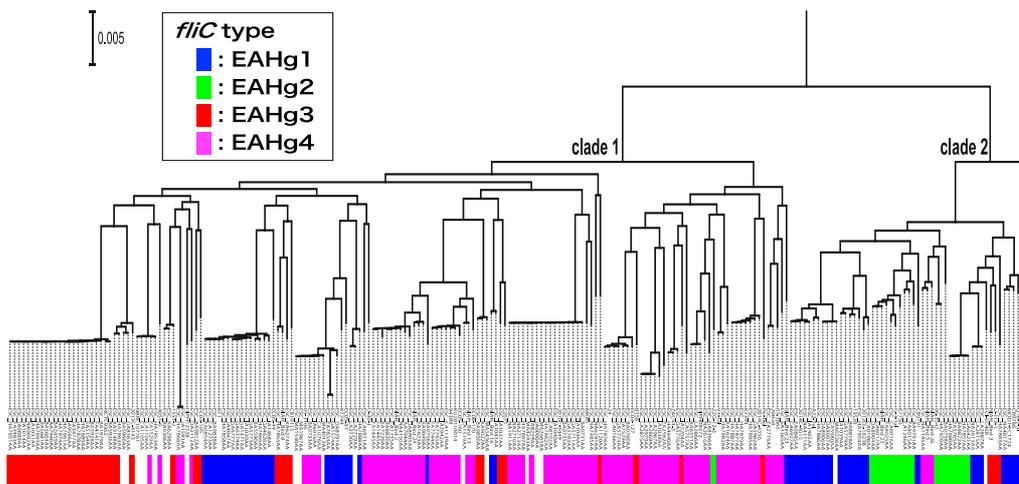


図 5 : *E. albertii* 進化系統における EAHg1-EAHg4 の分布

a

EAHg typing primers

primer	sequence (5'-3')	product size (bp)
fliC_F	████████████████████████████████████████	—
fliC_R-1	████████████████████████████████████████	167
fliC_R-2	████████████████████████████████████████	309
fliC_R-3	████████████████████████████████████████	404
fliC_R-4	████████████████████████████████████████	515

Common primers for *E. albertii*

common_F	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	731
common_R	ACACCGTGGCGAAATGGCA	

b

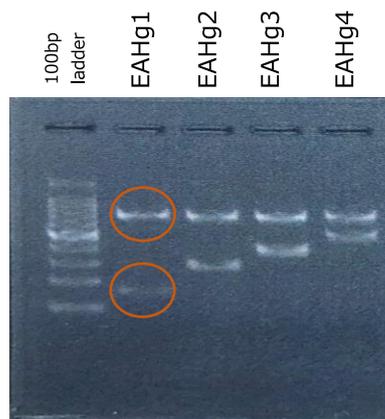


図 6 : EAH-genotyping PCR のプライマー情報 (a) および基準株で PCR を実施した際の泳動結果 (b)

令和2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水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査および増殖挙動の解析を行った。水耕栽培野菜は20検体中10検体で陽性となった。検出されたのは全て *Arcobacter butzleri* であった。陽性となった10検体中5検体で11,000 MPN/100 gを超えていた。また、魚介類17検体中6検体が陽性となった。菌数は少なかったが、魚介類からは *A. butzleri* 以外に *A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* も検出された。以上の結果から、水耕栽培野菜と魚介類はアルコバクターによる食中毒の原因食品となりうる可能性が示された。*A. butzleri* の増殖挙動を解析した結果、4℃や10℃のような低温でも生存できること、酸性域に耐性があること、高塩濃度でも増殖が可能であること、低水分活性条件では増殖できないこと、見かけ上、菌が死滅したように見えても、VBNC状態で生存している可能性があることが明らかになった。アルコバクター属菌に対する衛生管理を行う場合、これらの点に注意する必要がある。

#### 研究協力者

宇都宮市衛生環境試験所

床井由紀

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

## 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。また、アルコバクター属菌が原因微生物である可能性がある食中毒事例も発生している。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。

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、見逃されてい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。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非常に近似している。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。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。

昨年度は食肉におけるアルコバクター属菌の汚染状況の調査を行い、アルコバクター属菌が鶏肉において、カンピロバクター属菌よりも高率かつ高菌量で汚染している実

態を明らかにした。今年度は野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査を行った。また、アルコバクター属菌の衛生管理を考える場合には、アルコバクター属菌の増殖特性を知っておく必要がある。そこで本年度はさらに、アルコバクター属菌の中で食中毒原因菌としての疑いが最も高い *A. butzleri* の増殖挙動の解析を行った。

## 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

魚介類および水耕栽培野菜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

最確数法によるアルコバクター属菌の計数は平成 31 年度に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 倍乳剤とした。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、各試験管から培養液を 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 11,000 MPN/100 g である。

#### [5] マルチプレックス PCR

*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出するマルチプレックス PCR は平成 31 年度確立した方法を用いた。PCR 条件を図 1 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。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  $\mu$ 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  $\mu$ l 加えた。100℃、

10 分間加熱後、1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15  $\mu$ 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。

#### [6] *A. butzleri* の増殖挙動の解析

アルコバクター基本寒天培地で 25℃、48 時間培養した *A. butzleri* を、アルコバクター基本培地に約  $10^4$  cfu/ml になるように浮遊させ、特に指定のない場合、25℃で培養した。約 24 時間毎に、菌数を計数するとともに、生菌特異的 PCR を同時に行った。

培養温度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響を見る場合、アルコバクター基本培地に接種した *A. butzleri* を -20℃、4℃、10℃、25℃で培養した。

塩濃度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響を見る場合、アルコバクター基本培地に 1、2、3、4、5% になるように NaCl を加えた後、高圧蒸気滅菌を行い、*A. butzleri* を接種し、25℃で培養した。なお、アルコバクター基本培地には最初から 0.5% の NaCl が含まれている。

pH が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響を見る場合、滅菌後のアルコバクター基本培地に、1 N の HCl もしくは NaOH を加え、pH を 3.0、3.5、4.5、5.5、6.5、7.0、8.0、9.0

に調節した。その後、*A. butzleri* を接種し、25°Cで培養した。アルコバクター基本培地は製品に添付の使用方法に従って作成した場合、pH6.5になった。

水分活性が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響を見る場合、アルコバクター基本培地にシヨ糖を加え、高圧蒸気滅菌を行ったあと、水分活性を測定した。本研究では  $A_w$  0.99 (シヨ糖非添加)、0.96、0.90 に調整した。*A. butzleri* を接種し、25°Cで培養した。

#### [7] 生菌特異的 PCR

*A. butzleri* に対する生菌特異的 PCR には Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (Takara Bio 社製) を使用した。培養液 40  $\mu$ l に Kit 付属の Sol.A を 10  $\mu$ l、Sol.B を 5  $\mu$ l 加え、混合した後、遮光し氷上で 5 分間、静置した。その後、光照射器 (LED Crosslinker 12、Takara Bio 社製) で光照射を 5 分間、行った。14,500 rpm で 10 分間、遠心処理を行った後、上清を取り除いた。QIAamp DNA mini kit (QIAGEN 社製) を用いて、沈渣から DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて *A. butzleri* に対する定量 RT-PCR を行った。PCR 条件を図 2 に示す。この生菌特異的 PCR は  $10^6$  cfu/ml の加

熱死菌のバックグラウンドが存在する条件で、 $10^1$  から  $10^8$  cfu/ml の生菌に対して定量性が認められた (図 3)。

## C. 研究結果

### [1] 水耕栽培野菜における汚染状況

水耕栽培野菜におけるアルコバクター属菌の汚染状況を調査した (表 1)。カイワレ 3 検体、レタス類 5 検体、ブロッコリスプラウト 7 検体、その他のスプラウト 5 検体、計 20 検体を供試した。20 検体中、10 検体から *A. butzleri* が検出された (陽性率 50%)。 *A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* は検出されなかった。*A. butzleri* が検出された 10 検体のうち 5 検体で 100 g あたりの MPN が 11,000 を超えていた。また、ブロッコリスプラウトの陽性率が高く、7 検体中 5 検体から *A. butzleri* が検出された (陽性率 71%)。陽性のブロッコリスプラウト 5 検体中、4 検体で *A. butzleri* が 11,000 MPN/100 g を超えていた。

### [2] 魚介類における汚染状況

魚介類におけるアルコバクター属菌の汚染状況を調査した (表 2)。調査にはエビ類 6 検体、貝類 7 検体、イカ類 4 検体を供試した。*A.*

*butzreli* はエビ 3 検体、イカ 1 検体から検出された。*A. cryaerophilus* はエビ 1 検体から検出された。*A. skirrowii* は貝 1 検体から検出された。

[3] 培養温度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

*A. butzreli* の増殖における温度の影響を調べるために、アルコバクター基本培地に約  $10^4$  cfu/ml に接種した *A. butzreli* を  $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $10^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$  で 7 日間、培養した (図 4)。

通常、*A. butzreli* の培養に用いられる  $25^{\circ}\text{C}$  では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

$10^{\circ}\text{C}$  では、 $25^{\circ}\text{C}$  と比べて増殖速度が緩やかになり、7 日目に約  $10^6$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR もほぼ同様の増殖傾向を示した。

$4^{\circ}\text{C}$  では、菌数は緩やかに減少し、培養 7 日目に検出限界以下となったが、生菌特異的 PCR では菌量の減少は認められず、接種菌量が 7 日間維持された。顕微鏡観察を行ったところ、ラセン桿菌である *A. butzleri* が球状化していた (図 5)。

$-20^{\circ}\text{C}$  では、菌数は培養 1 日目に検出限界以下となったが、生菌特

異的 PCR では 3 日目まで接種菌量が維持され、その後、検出限界以下になった。

[4] 塩濃度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

*A. butzreli* の増殖における塩濃度の影響を検討するために、NaCl 濃度を 0.5~4.0% に調整したアルコバクター基本培地に *A. butzreli* を接種し、 $25^{\circ}\text{C}$  で 7 日間、培養した (図 6)。一般的な培養条件である 0.5% で培養したところ、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

1.0%、2.0% でも 0.5% と同様の傾向が見られ、塩濃度の上昇による増殖への影響は認められなかった。

3.0% では 0.5% と比べ増殖速度の低下が認められ、培養 7 日目に約  $10^7$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

4.0% では、培養 1 日目に菌数は検出限界以下になった。一方、生菌特異的 PCR の結果では培養 1 日目から緩やかに減少が始まり、培養 4 日目までは生菌が確認された。その後、培養 7 日目に検出限界以下となった。

[5] pHが *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

*A. butzleri* の増殖における pH の影響を検討するために、pH を 3.0~9.0 に調整したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25℃で7日間、培養した(図7)。一般的な培養条件である pH 6.5 で培養したところ、培養4日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

pH3.0~4.5 では、培養1日目に菌数は検出限界以下に低下した。しかし、生菌特異的 PCR では大きな菌量の低下は認められず、7日間、接種菌量をほぼ維持した。

pH5.5 では、培養1日目から菌数の低下が始まり、培養4日目で検出限界以下となった。生菌特異的 PCR では、培養2日目から菌量の低下が始まり、培養7日目に検出限界以下となった。

pH7.0、pH8.0 では、pH6.5 とほぼ同様の傾向が認められ、pH の影響は認められなかった。

pH9.0 では、培養1日目で菌数は検出限界以下となった。生菌特異的 PCR による菌量も同様に、培養1日目で検出限界以下になった。

[6] 水分活性が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

*A. butzleri* の増殖における水分活性の影響を検討するために、水分活性を Aw 0.99、0.96、0.90 に調整したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25℃で7日間、培養した(図7)。一般的な培養条件である Aw 0.99 では、培養4日目で約  $10^8$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR も同様の傾向を示した。

Aw 0.96 では、培養2日目に菌数が検出限界以下になった。生菌特異的 PCR では培養2日目から緩やかに菌量の減少が認められた。最終的に7日目で、接種菌量から約1オーダーの減少が認められた。

Aw 0.90 では、培養1日目で菌数は検出限界以下となった。生菌特異的 PCR は培養2日目から緩やかに菌量の減少が認められた。最終的に7日目で、接種菌量から約1オーダーの減少が認められた。

#### D. 考察

[1] 水耕栽培野菜および魚介類における汚染状況

これまでに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。昨年度は食肉の汚染状況を最確数法を用いて調査した。今年度は水耕栽培野菜と魚介類におけるアルコバクター属菌の汚染状況

を調査した。今回の調査結果から、水耕栽培野菜における *A. butzleri* の汚染率、汚染菌数がともに非常に高いことが明らかになった。特にブロッコリスプラウトにおける汚染菌数が非常に高く、陽性となった 5 検体中、4 検体で 11,000 MPN/100g を超えていた。魚介類における汚染状況は、水耕栽培野菜と比べて菌数は少なかったが、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* が検出された。以上の結果から、水耕栽培野菜、魚介類ともにアルコバクター属菌の汚染率、汚染菌数が高く、もし、アルコバクター属菌が食中毒を引き起こしているとする、その原因食品となりうる可能性が示唆された。今後、さらに検体数を増やし、調査を行っていく必要があると思われる。

## [2] 培養温度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

室温を想定しての 25℃および 10℃、チルドを想定しての 4℃、冷凍を想定しての -20℃の 4 つの培養温度で *A. butzleri* を培養した。この結果から、*A. butzleri* を 4℃で培養すると、見かけ上、菌数は減少していくが、生菌特異的 PCR による菌量に変化は見られなかった。このことから、*A. butzleri* は

4℃でも少なくとも 7 日間は生存できることが明らかになった。顕微鏡観察を行うと、ラセン桿菌の *A. butzleri* が球状菌化していた。*A. butzleri* はカンピロバクターに近縁の細菌であるため、カンピロバクター同様に、いわゆる生きてはいるが培養できない状態 (VBNC) になったのではないかと考えられた。カンピロバクターに関しては、VBNC 状態の細菌が動物の腸管に入ると、再び増殖を開始するとの報告がこれまでにある。このことから、VBNC 状態の *A. butzleri* も食中毒の原因となる可能性が考えられた。

-20℃で培養した場合、菌数は培養 1 日目で検出限界以下になっているが、生菌特異的 PCR では培養 3 日目まで、接種菌量が維持されていた。-20℃でも *A. butzleri* が VBNC 状態になった可能性が示唆された。しかし 4℃と異なり、-20℃では培養 4 日目で、生菌特異的 PCR による菌量も検出限界以下になった。培養 4 日以降で生菌特異的 PCR による菌量が検出限界以下になった原因は不明である。

## [3] 塩濃度が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

今回の結果から *A. butzleri* は高塩濃度の環境で増殖できること

が明らかになった。特に海水の塩濃度に近い3.0%のNaCl濃度でも、増殖速度こそ低下するが、増殖が可能であった。このことは、今回、魚介類から *A. butzleri* が検出された結果と一致する。また、4.0%でも増殖こそできないが、VBNC状態で4日間、生存が可能であった。以上のことから、アルコバクターに対する衛生管理を行う場合、食肉だけでなく魚介類に対しても注意を払う必要が認められた。

[4] pHが *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

今回の結果から、アルカリ域 (pH9以上) に耐性はないが、酸性域 (pH3.0~4.5) において *A. butzleri* はVBNC状態で長期間生存できることが明らかになった。*A. butzleri* が腸内細菌であることを考えれば、妥当な結果であると思われる。pH5.5では、*A. butzleri* は増殖もできず、また、VBNC状態にもならず、菌数が減少した。*A. butzleri* がVBNC状態に入るためには、少なくともpH4.5以下になる必要があることが示唆された。いずれにせよ、アルコバクターに対する衛生管理を考える上で、酸性域は菌の増殖には向かないが、菌が死滅したわけではないことに注意する必要がある。

[5] 水分活性が *A. butzleri* の増殖におよぼす影響

今回の結果から、*A. butzleri* は低水分活性条件では増殖できないことが明らかになった。しかし、 $A_w$  0.96、0.90ともにVBNC状態で少なくとも7日間、生存できていることに留意しておく必要があると思われる。

## E. 結論

本年度は水耕栽培野菜および魚介類における汚染実態調査、さらに *A. butzleri* の増殖挙動の解析を行った。汚染実態調査の結果から、水耕栽培野菜や魚介類はアルコバクター食中毒の原因食品となる可能性が認められた。一方で、水耕栽培植物におけるアルコバクター属菌の汚染菌数は非常に高く、昨年度調査した鶏肉における汚染菌数に匹敵する。しかし、水耕栽培野菜による原因物質不明の有症事例が多発しているとの情報は今のところない。水耕栽培野菜は基本的に生食するものであることを考慮するならば、アルコバクターによる事例がもう少し報告されても良いと思われる。以上のことから、アルコバクター属菌の病原性は非常に弱いものであるか、もしくは日和見細菌的存在なのかもしれない。

増殖挙動の解析から、*A. butzlerii* の特徴をまとめると以下のようなになる。

- ・4℃や10℃のような低温でも生存できる。
- ・酸性域に耐性がある。
- ・高塩濃度でも増殖が可能。
- ・低水分活性条件では増殖できない。
- ・見かけ上、菌が死滅したように見えても、VBNC状態で生存している可能性がある。

*A. butzlerii*に対する衛生管理を行う場合は以上のような点に留意する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahiro Ohnishi, Yukiko Hara-Kudo:  
Presence and quantification of pathogenic *Arcobacter* and *Campylobacter* species in retail meats available in Japan. Letters in Applied Microbiology (in press)

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### プライマー

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

#### 反応液の組成

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

#### PCR 反応条件

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

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1 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

ARCO-F: CGTATTCACCGTAGCATAGC  
ARCO-R: CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA

#### 反応液の組成

Powerup SYBR master mix	10.0 $\mu$ l
ARCO-F	0.4 $\mu$ M
ARCO-R	0.4 $\mu$ M
Template DNA	1.0 $\mu$ l
滅菌精製水	up to 20 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

50°C	2 min
95°C	2 min
95°C	15 sec
60°C	1 min

図2 生菌特異的 PCR の条件

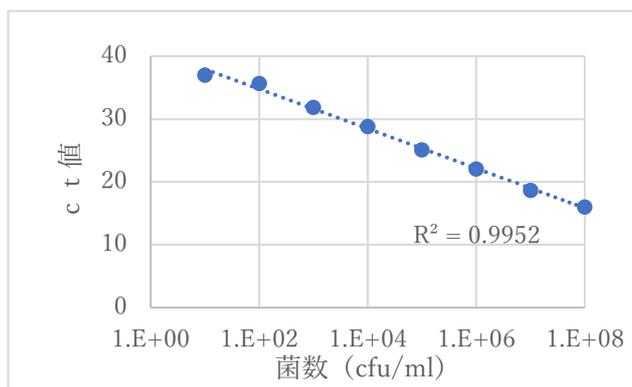


図3 生菌特異的 PCR の検量線

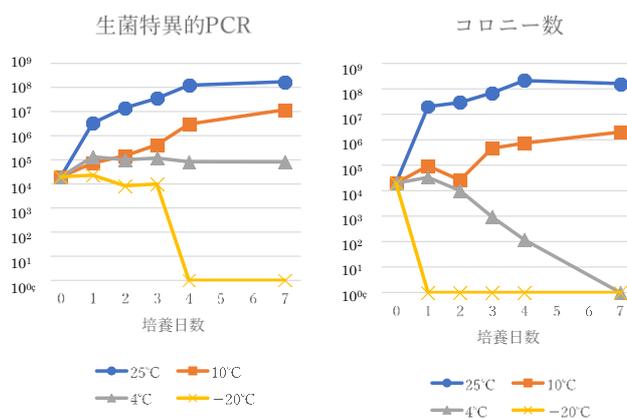
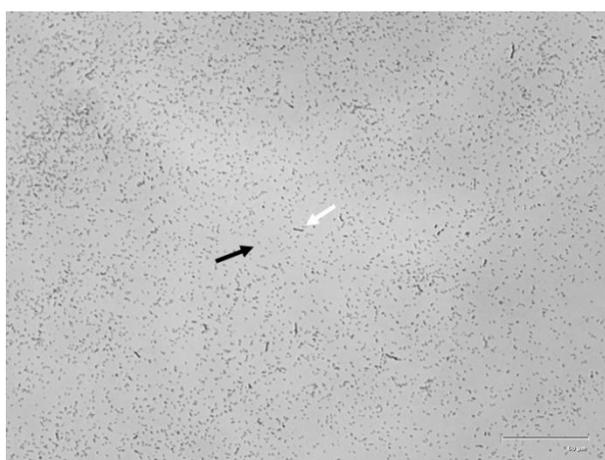


図4 *A. butzreli* の増殖に対する培養温度の影響



黒矢印：球状菌化した *A. butzreli* 白矢印：ラセン状菌のままの *A. butzreli*

図5 *A. butzreli* の球状化

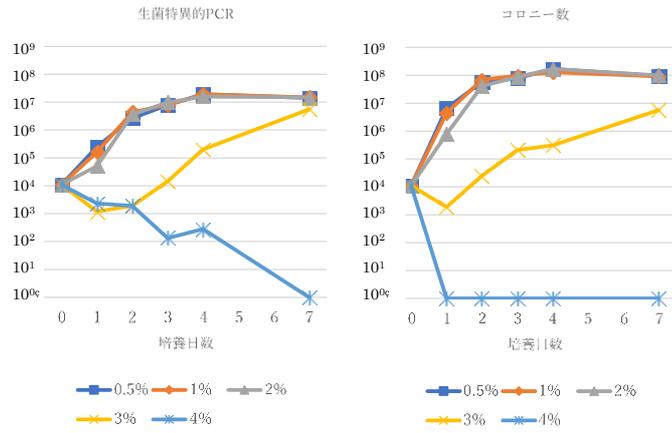


図6 *A. butzreli*の増殖に対する塩濃度の影響

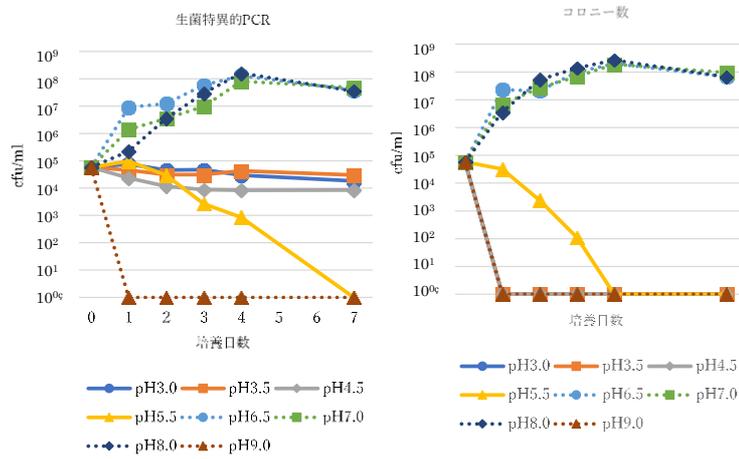


図7 *A. butzreli*の増殖に対するpHの影響

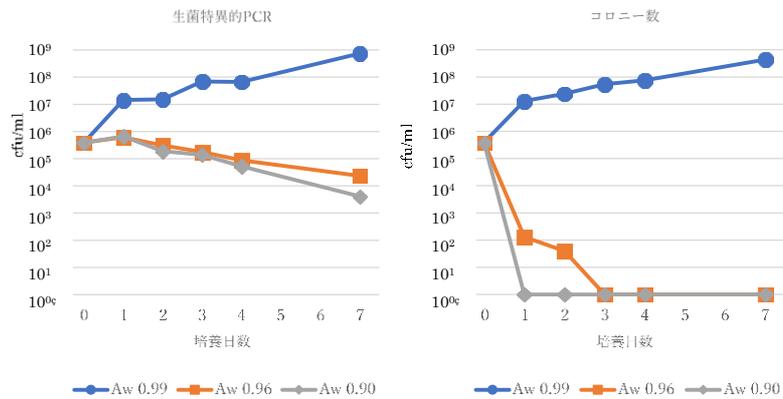


図8 *A. butzreli*の増殖に対する水分活性の影響

表1 水耕栽培野菜におけるアルコバクター属菌の汚染状況

	産地	MPN/100 g		
		<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
フリルレタス	神奈川県	<30	<30	<30
フリルレタス	静岡県	30	<30	<30
ロメインレタス	福島県	<30	<30	<30
プリーツレタス	長野県	<30	<30	<30
かいわれ大根	千葉県	<30	<30	<30
かいわれ大根	岐阜県	>11000	<30	<30
かいわれ大根	千葉県	92	<30	<30
ブロッコリースプラウト	広島県	>11000	<30	<30
ブロッコリースプラウト	滋賀県	<30	<30	<30
ブロッコリースプラウト	山梨県	<30	<30	<30
ブロッコリースプラウト	岐阜県	932	<30	<30
ブロッコリースプラウト	広島県	>11000	<30	<30
ブロッコリースプラウト	岐阜県	>11000	<30	<30
ブロッコリースプラウト	埼玉県	>11000	<30	<30
グリーンリーフ	長野県	<30	<30	<30
アルファルファスプラウト	岐阜県	<30	<30	<30
赤ラディッシュの新芽	岐阜県	<30	<30	<30
空心菜の新芽	岐阜県	749	<30	<30
みつば	静岡県	36	<30	<30
豆苗	広島県	<30	<30	<30

表2 魚介類におけるアルコバクター属菌の汚染状況

	産地	冷凍 処理	MPN/100g		
			<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
生かき（加熱用）	岡山県	なし	<30	<30	<30
生かき（生食用）	宮城県	なし	<30	<30	<30
生かき（加熱用）	広島県	なし	<30	<30	<30
生ホタテ（生食用）	北海道	なし	<30	<30	<30
生ホタテ（加熱用）	北海道	冷凍	<30	<30	<30
生ホタテ（生食用）	北海道	なし	<30	<30	<30
生ホタテ（生食用）	青森県	なし	<30	<30	36
むきエビ（加熱用）	インドネシア	冷凍	<30	<30	<30
赤エビ（生食用）	アルゼンチン	不明	<30	<30	<30
バナメイエビ	メキシコ	不明	430	<30	<30
むきエビ（加熱用）	インドネシア	冷凍	<30	<30	<30
ブラックタイガー	インドネシア	冷凍	748	61	<30
白エビ	富山県	なし	30	<30	<30
スルメイカ（加熱用）	石川県	なし	<30	<30	<30
スルメイカ	青森県	なし	36	<30	<30
イカ（生食用）	北海道	冷凍	<30	<30	<30
イカ（生食用）	北海道	なし	<30	<30	<30

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
Arai, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Ohya, K., Konno, T., Tokoi, Y., Nagaoka, H., asano, Y., Maruyama, H., Uchiyama, H., Takara, T., and Hara-Kudo, Y.	Evaluating methods for detecting <i>Escherichia albertii</i> in chicken meat	Journal of Food Protection	84 (4)	553-562	2020
大岡唯祐	新興下痢症起因菌 <i>Escherichia albertii</i> の特徴	食品衛生研究	70	19-35	2020
Takahiro Ohnishi, Yukiko Hara-Kudo	Presence and quantification of pathogenic <i>Arcobacter</i> and <i>Campylobacter</i> species in retail meats available in Japan	Letters in Applied Microbiology			印刷中

令和 3 年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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 3 年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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記入人(※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) 座前前の「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。

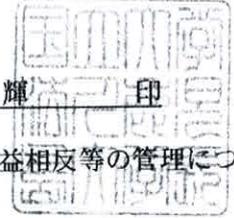
令和3年5月10日

厚生労働大臣  
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
(国立保健医療科学院長)

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 輝 印



次の職員の令和2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) 大学院医歯学総合研究科・准教授

(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。