

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

平成 30～令和 2（2018～2020）年度

総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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. 総合研究分担研究報告書

1. <i>Escherichia albertii</i> の制御法の確立 . . . . .	25
--	----

工藤 由起子

2. <i>Escherichia albertii</i> の感染性・病原因子の解明 . . . . .	41
---	----

大岡 唯祐

3. <i>Arcobacter butzleri</i> の制御法の確立 . . . . .	67
---	----

大西 貴弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	75
-------------------------------	----

平成 30～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

### 総合研究報告書

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* およびアルコバクター属菌を対象にして実施した。分担研究(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立では、①modified EC 培地、薬剤加 mEC 培地、ラムノース・キシロース添加 DHL 寒天培地等が選択分離培養に優れていることが判明した。②検出性に優れる *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR を開発した。③食中毒事例での調査において①②で示した方法を使用し原因食品を明らかにした。④食品検体で分離率は低いながら *E. albertii* が分離された。⑤ *E. albertii* は食品中での増殖、環境水中での生残が判明し、環境から農作物、家畜等への汚染の可能性が推察された。(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明では、①本菌特異的な病原関連候補 12 遺伝子について病原性を検討し、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子を同定し、発現条件を明らかにした。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 (TccP4) を同定した。③O 抗原および鞭毛抗原 (H 抗原) の多様性を明らかにした。④O 抗原型および H 抗原タイピングツール (EA0-、EAH-genotyping PCR) 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鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌が検出され、水耕栽培野菜および魚介類でも高濃度に検出され、食中毒の原因食品となりうる可能性が示された。②アルコバクター属菌の低温での生存、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、畠山 薫、 鈴木 淳
岩手県環境保健研究センター	上山 昭、山中拓哉、太田美香子 高橋幸子、佐藤徳行
秋田県健康環境センター	今野貴之
宮城県保健環境センター	山谷聡子、佐藤千鶴子、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
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
大津市保健所	安田敬子、小椋容子
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
滋賀県衛生科学センター	梅原成子、長谷川嘉子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、佐伯美由紀、森村実加、 松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	仙波敬子、浅野由紀子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也、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	高良武俊、宮平勝人、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
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、阿部光一朗
静岡市環境保健研究所	丸山幸男、望月瑞葉、高橋直人
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸、松永典久
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
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	新井沙倉、廣瀬昌平、都丸亜希子、 大屋賢司

## A. 研究目的

新たな食中毒細菌（流行株などを含む）が流行し、定着する可能性があるが、流行前に対策をとり制御することが重要である。近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では2003年以降に食中毒が発生し、患者数200人以上の事例も報告されている（日本食品微生物学会雑誌34:151-157, 2017）。また、*Arcobacter* 属菌は胃腸炎患者の便からしばしば分離されており、食中毒との関連性が示唆されている。特に、*Arcobacter butzleri* は、食中毒原因菌としての可能性が示唆されている。これら2菌種に着目し、食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究を行うこととした。

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

（1）工藤は、*E. albertii* の食品での検査法の検討として、選

択増菌培地、選択分離培地、特異的リアルタイムPCR法を検討した。また、食品・環境等の汚染実態調査、食品・環境検体中での挙動について明らかにした。また、（2）大岡は、*E. albertii* の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行った。さらに（3）大西は、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ために、検査法、食品での汚染実態調査、カンピロバクター食中毒患者便からの検出、*A. butzleri* 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）食品での検査法の検討

腸管出血性大腸菌（EHEC）の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法、選択分離培地を含め、さらに *E. albertii* の薬剤耐性や生化学性状の特徴を取り入れた培地について本菌の食品での検査法を検討した。検討対象食品には *E. albertii* 汚染が報告されている鶏肉として、各種濃度の本菌を接種した菌接種鶏肉培養液や鶏肉にて分離を行った。また、既知の Nested PCR

法 (Ooka et al.) についても、検出感度を検討した。

## 2) リアルタイム PCR の開発

*E. albertii* 株計 113 株を対象に、大岡唯祐研究分担者が同定した *E. albertii* 特異的遺伝子上で SNP の少ない遺伝子配列領域を選定し、プライマーおよびプローブ候補を設計し、至適濃度を検討した。特異性を多菌種の株を用いて確認した。また、感度を菌接種鶏肉培養液にて検討した。さらに、鶏検体での汚染実態調査で nested PCR を行った検体でリアルタイム PCR での検出性を比較した。

## 3) *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

*E. albertii* 食中毒事例の発生時に原因食品中の本菌菌数を定量するための最確数 (MPN) 法を確立した。令和 2 年度の食中毒事例においては冷凍保管検食、それら食品の混合培養液または個別培養液を事例発生の地方自治体から受け取り、上記の食品での検査法を応用して原因食品の確定を行った。地方自治体で分離した混合食品や患者からの *E. albertii* 株も受け取り、当所で分離した株と並べて性状比較や RAPD 型別を行った。

## 4) 食品等における汚染実態調査

地方自治体の協力機関と協力し、食肉を含んだ食品検体 1918 検体、施設の拭き取りも含む環境検体 229 検体および糞便 (ヒトおよびウシ) 検体 5,636 検体について調査した。乳糖非分解のコロニーについてブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性、キシロース非分解を確認し、nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。*E. albertii* 計 75 株について 0 抗原型を大岡らの PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。

## 5) *E. albertii* の食品・環境中での挙動

食品検体として、トリ肉、ブタ肉、イワガキおよびマガキ、環境水検体として、井戸水および海水に *E. albertii* を接種し、4℃、10℃、20℃および 30℃で保管した。食品検体では 6 時間から 3 日間、環境水検体では 9 日間保管し、経時的に *E. albertii* の菌数を培養法およびリアルタイム PCR での定量分析にて測定した。

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

1) 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝

## 子群の網羅的探索

自らの *E. albertii* 株の全ゲノム情報に加えて NCBI データベース情報について、各株の遺伝子レパートリーを同定した。ドイツの患者由来株である CB9786 株を参照株とし、アミノ酸配列相同性が 90%以上の遺伝子を網羅的に抽出した。他の *Escherichia* 属細菌に存在しない遺伝子群も併せて検索した。

## 2) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii* CB9786 株と、*Escherichia* 属細菌および近縁菌種のゲノム塩基配列との比較を行い、CB9786 株にのみ存在する配列を取得した。*E.*

*albertii* 55 株において、塩基配列相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定し、塩基配列保存性が 99%以上である遺伝子を診断疫学マーカー候補遺伝子とした。

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

NCBI データベース登録 57 株に加え、Enterobase website v1.1.2. 登録 186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E.*

*albertrii* 主要病原因子 (III 型分泌系をコードする locus of enterocyte effacement (LEE) 領域と第 2 の III 型分泌系をコードする ETT2 領域のマーカー遺伝子として *eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子、*E. albertii* の病原因子として *stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*paa* 遺伝子) の保有状況を調べた。

## 4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

遺伝子破壊には、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には全ゲノム配列決定株であるヒト臨床分離株 HIPH08472 株および EC06-170 株、トリ由来株である NIAH\_Bird3 株の計 3 株を対象とした。

## 5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目 4) で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

## 6) 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°C、20°C)で培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。付着能および細胞内生存能に關与が示唆された病原關連候補遺伝子を標的としてリアルタイム RT-PCR を実施し、 $\Delta \Delta Ct$  法にて発現レベルを解析した。

7) *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

*E. albertii* 243 株について、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。当該遺伝子の上下流に存在する *cesT* 遺伝子、*escD* 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。既知のインチミンサブタイプ 38 種類のアミノ酸配列に 95%未満の塩基配列相同性の場合には新規インチミンサブタイプと同定した。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 は本研究中で新たに同定])に關しては 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、*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解析した。

8) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4]の機能解析

ヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を保有)を対象として、項目 7)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* 遺伝子を改良 Wanner 法により遺伝子破壊した。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。

9) *E. albertii* の 0 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび自らが新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、既知の *Escherichia/Shigella* 属及び近縁菌種の 0 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、*Escherichia/Shigella* 属の 0 血清群と類似した 0-AGC を保有する株については、該当する



*Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した。

#### 10) EAO-genotyping PCR の開発および実用性の検討

*E. albertii* の各 O-AGC に共通して保存されている O-antigen flippase をコードする *wzx* 遺伝子について *E. albertii* 内および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で見られる配列多様性を利用し、PCR による O 抗原遺伝子型タイピングツール (EAO-genotyping PCR) の開発を行った。また、*E. albertii* の同定が同時に行える検出系とした。多種の *E. albertii* 株にて本ツールの検出感度を検討した。

#### 11) *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での 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。*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。

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

*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、*E. albertii* の同定が同時に行える検出系とした。多種の *E. albertii* 株にて本ツールの有用性を検討した。

#### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

##### 1) アルコバクター属菌の検査法の確立

*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を作製した。

##### 2) アルコバクター属菌の最確数法の確立

アルコバクター属菌の最確数法を確立するために、アルコバクター属菌の発育に適した培地、および選択剤を検討した。

##### 3) アルコバクター属菌の汚染実態調査

確立したアルコバクター属菌の最確数法およびマルチプレックス PCR を用い、食肉、水耕栽培野菜、魚介類の汚染実態調査を行った。食肉に関しては、カンピロバクター属菌に対する最確数法も同時に行い、汚染状況を比較した。

##### 4) *A. butzleri* の増殖挙動の

解析

*A. butzleri* を、pH、塩濃度、水分活性などを調整したアルコバクター基本培地に接種し、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。

5) カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

カンピロバクター食中毒が発生した場合、研究協力機関において患者便からアルコバクター属菌の分離を行った。

## C. 研究結果

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

1) 食品での検査法の検討

増菌培地の検討では、BPW よりも mEC および NmEC の方が、36°C よりも 42°C の方が *E. albertii* の分離率が高かった。また、薬剤 A および B を添加した mEC 培地 (mEC+AB 培地) では、*E. albertii* 194 株すべてで増殖が認められ、鶏肉由来細菌 20 株中 17 株で増殖が認められず、菌接種鶏肉培養液でも本菌の増殖は抑制されず、鶏肉由来細菌の増殖は抑制されたことから、優れた選択性が示された。分離培地

の検討では、DHL、*E. albertii* が非分解の糖であるキシロース・ラムノースを添加した DHL (XR-DHL) 上では多くの株が無色のコロニーを形成した。また、薬剤 C および D を添加した DHL 培地 (DHL+CD 培地) では、*E. albertii* の分離の向上が認められた。Nested PCR では、接種菌数が 0.5~21.4 cfu/25 g の鶏肉を増菌培養した場合に 1st PCR と 2nd PCR で共に遺伝子が検出された。

2) リアルタイム PCR の開発

候補のリアルタイム PCR の系では、全 *E. albertii* 株が陽性かつその他細菌種は全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液による検出限界は、0.3~3.4 cfu/PCR tube (=6.8×10~6.8×10<sup>2</sup>cfu/mL) であり、検出蛍光値は内因性コントロールとしての 16S rRNA 遺伝子の蛍光値よりも大幅に高く、優れた duplex リアルタイム PCR の系であった。また、菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた。検出限界は、食品培養液では 0.5~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10<sup>2</sup>~1.5×10<sup>3</sup>cfu/mL)、菌接種鶏肉では 1.2~1.4 cfu/25 g であった。汚染実態調査での Nested PCR の結果と

比べてリアルタイム PCR でたか  
検出結果であった。

### 3) *E. albertii* 食中毒事例での 原因食品の解析

確立した MPN3 本法による定量  
検査法を自治体と共有し、協力  
体制を構築した。令和 2 年度の  
食中毒検体では、春雨中華サラ  
ダのリアルタイム PCR で陽性と  
なり、A-mEC 培地による二次増菌  
を試みた結果、XR-DHL 培地での  
培養によって *E. albertii* が分  
離された。しかし、MPN 法による  
菌数測定では、*E. albertii* は検  
出限界以下であった。また、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  
者由来株は、いずれの遺伝子型  
別も一致した。

### 4) 食品等における汚染実態調 査

鶏肉 118 検体中 2 検体 (2%)、  
内臓肉 165 検体中 30 検体 (18%)  
で PCR 陽性であった。また、地方  
自治体との協力研究では、食品  
検体 1918 検体中鶏肉を含む 4 検  
体 (0.2%)、環境検体 229 検体中  
2 検体 (0.8%)、糞便検体 5636 検  
体中 6 検体 (0.1%) から *E.*  
*albertii* が分離された。分離株  
は、様々な EA0g 型であった。

### 5) *E. albertii* の食品・環境中

での挙動

*E. albertii* 接種食品検体で  
は、20℃あるいは 30℃で、すべ  
ての検体で菌数が増加した。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  
も菌数の大きな増減はみられな  
かった。また、環境水検体では、  
20℃あるいは 30℃で、すべての  
検体で菌数が減少した。4℃およ  
び 10℃では、井戸水検体の菌数  
はほぼ変化しなかったが、海水  
検体の菌数は緩やかに減少した。

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

#### 1) 全ゲノム情報を基にした種 特異的遺伝子群の網羅的探索

*E. albertii* に保存される 55  
遺伝子が同定された。その中に  
は、III 型分泌装置により宿主細  
胞へ分泌されるエフェクターな  
どの既知の病原関連因子の遺伝  
子ホモログ 9 個に加えて、機能  
未知の遺伝子も多数含まれた。

#### 2) 配列保存性の高い診断疫学 マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii* に特異的な 34 遺  
伝子について抽出し、NCBI に登  
録された *E. albertii* 26 株を対  
象に blastn 解析した結果、全株  
に共通し、99%の塩基配列保存性

を示す 9 遺伝子が診断疫学マーカー候補遺伝子とされた。

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

*E. albertii* は大きく 2 つのクレードに分かれるが分離地や分離源とは相関がなかった。*eae*、*cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* がほとんどの株で保存され、ETT2 領域の保存性も高かった。*stx2* が異なる系統の *E. albertii* 株において検出され、その保有と *cdtB*-I サブタイプの分布に相関が見られた。

4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

形質転換効率の比較的高い株を選択し、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用した。それにより、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、用いた全 3 株の破壊株が作製された。

5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目 1) で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株を用いて、培養細胞に対する感染実験の実施を試みた結

果、付着および細胞内生存能に関連すると考えられる遺伝子を複数同定した。

6) 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。

7) *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 株中 241 株が *eae* 陽性であり、そのうちの 224 株が既知のサブタイプ 20 種類のいずれかを保有していた。検出数の多かったサブタイプは、 $\sigma 1$ 、 $\iota 2$ 、 $\sigma 2$  であった。

Tir: 243 株中 241 株が *tir* 陽性であり、V1~V5 の 5 つのバリエーションに分かれた中でも V1、V3、V5 が主要であった。また、V1、V2 は、TccP を要する (EHEC タイプ [Tir-Nck 非依存的]) が、V3-V5 は TccP を要さない (EPEC タイプ [Tir-Nck 依存的]) ことが示され

た。

TccP：これまで同定されていた 3 つのバリエーション (TccP1, TccP2, TccP3) に加え、新規バリエーションの TccP4 が同定された。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。

8) *E. albertii* における付着因子 インチミン、Tir、TccP の分布  
*tir* と *eae* を保有する株の 89% が TccP バリエーションを 1-3 コピー保有していた。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、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。

9) TccP バリエーション (TccP4) の機能解析

*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。

10) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

O-AGC は 40 種類に分かれた。また、25 種が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝

子セットを保有していた。*E. albertii*、*Escherichia*、*Shigella* 属間で O-AGC が頻繁に水平伝播していることが考えられた。また、*E. coli* や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似した *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことも明らかとなった。

11) EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

40 種類の EA0 型を識別できるプライマーセットを構築した。O 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした。国内および海外分離株について、*in silico* EA0-genotyping を実施した結果、82.4% の EA0 型が同定された。

12) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

解析した 243 株中 215 株の *fliC* が同定された。*E. albertii* の *fliC* は大腸菌のものとは異なり、4 つの遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在し、EAHg4 が高頻度に検出された。各 EAHg 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* 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。

13) EAH-genotyping PCR の開発

および実用性の検討

項目 12) で同定した 4 つの EAH 型を型別するマルチプレックス PCR を構築した。解析した国内ヒトおよびトリ由来株の全株の EAH 型が同定された。*in silico* 解析結果と同様に EAHg4 が高頻度に存在した。

### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

#### 1) アルコバクター属菌の検査法の確立

マルチプレックス PCR を作製したところ、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定することができた。この PCR の感度は、検体中に 100 から 200 cfu/ml のアルコバクター属菌が存在すれば検出することができた。また、*C. jejuni* および *C. coli* の DNA では陽性にならなかつた。

#### 2) アルコバクター属菌の最確数法の確率

増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシル添加アルコバクター基本培地、分離培地として CAT サプリメント添加アルコバクター基本寒天培地を用いた最確数法を作製した。試験は三本法で行い、培養液からの菌の検出はマルチプレックス PCR を用

いた。

### 3) アルコバクター属菌の汚染実態調査

鶏肉、豚肉、牛肉、各 20 検体ずつ調査した。鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90% の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が  $10^2$  MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。また、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染は汚染率、汚染菌量ともにカンピロバクター属菌を上回っていた。

水耕栽培野菜では、20 検体中、10 検体から *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かった (陽性率 71%)。

魚介類では、*A. butzleri* はエビ類 3 検体、イカ類 1 検体から検出された。*A. cryaerophilus* はエビ類 1 検体から検出された。*A. skirrowii* は貝類 1 検体から検出された。

#### 4) *A. butzleri* の増殖挙動の解析

*A. butzleri* は 4℃ や 10℃ でも生存できることが明らかになった。pH による影響では、アルカリ性域には耐性はないが、酸性域では長期間生残できることが明らかになった。また、海水の塩濃度に匹敵する高塩濃度下でも増殖が可能であることが明らかになった。水分活性に関しては、低水分活性条件では増殖できななかった。しかし、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ため、注意が必要であることが明らかになった。

5) カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

204 検体の患者便の内、1 検体から *A. skirrowii* が検出された。

#### D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

1) 食品での検査法の検討

増菌培養としては、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考えて、mEC および NmEC 中の両方で 42℃ の増菌培養条件が適用可能と考えられた。また、mEC+AB 培地はさらに選択性に優れ有用であることが示された。

乳糖、ラムノースおよびキシロース非分解性が *E. albertii* に共通した性状であり、分離培地および同定の指標として有用であり、XR-DHL は優れた鑑別性を有することが示された。また、一部の白糖分解の性状を示す *E. albertii* を食品から分離するためにも、白糖を含まない XR-MAC も有用であると考えられた。一方、糖含有培地の調製には手間がかかるため、状況に応じて適宜培地を選択する必要があると思われる。また、選択性を高めるために薬剤 C・D を添加した DHL+CD 培地でも有用であると思われるが、*E. albertii* の一部菌株の増殖を抑制してしまうため、分離培養の際には XR-DHL 培地との併用が望ましいと考えられる。

2) リアルタイム PCR の開発

本研究によって、特異性および感度が高くリアルタイム PCR が確立された。また、内因性コントロールとしての 16S rRNA 遺伝子の検出が行えるため、結果の信頼性の高いリアルタイム PCR の系が確立された。鶏肉培養液および鶏肉での検討の結果から、PCR 阻害は少ないものと予想され、実検体での応用性が示された。

### 3) *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

すでに患者便および原因と疑われる食事の食品混合検体から *E. albertii* が分離されており、個別食品のいずれが原因食品であるかを確定することに焦点を絞り試験を実施した。春雨中華サラダの培養液検体からリアルタイム PCR にて *E. albertii* が明確に検出されたが、その培養液からは分離されず、A-mEC 培地にて二次増菌した結果、XR-DHL 培地で *E. albertii* が分離され、本研究で開発された増菌培地およびリアルタイム PCR の有用性が示された。分離株は患者由来株と遺伝子型が一致したことから、本食中毒の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。

### 4) 食品等における汚染実態調査

本研究でも、過去の報告と同様に鶏の保菌が示唆された。市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されているものも存在することが判明した。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を考慮する必要がある。ヒト便から分離されたが、本菌

の同定は難しいため、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。また、様々な O 抗原型株が分離され、本 EA0-genotyping は、食品の汚染源を探る手法として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* の汚染経路の推定のため、食品および環境水での本菌の増殖挙動の解析を行った。*E. albertii* は汚染食品の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示された。また、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。

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

本研究では、*E. albertii* に特異的な遺伝子群(特に病原関連遺伝子)や共通するゲノム領域を同定し、本菌の病原機構解明と診断疫学マーカー同定、さらにそれを利用した診断疫学ツールの開発を目的として解析を進めた。



病原関連候補遺伝子の機能解析については、当該遺伝子の破壊株を作製し、宿主細胞への感染実験により付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定することを目的としたが、*E. albertii* の DNA 取り込みおよび組換え効率が非常に低かったことから、遺伝子破壊株の作製法改良などに時間を要し、実験計画が遅れた。遺伝子破壊株作製法の改良により、令和元年度以降は順調に遺伝子破壊を行うことができ、その後の培養細胞への感染実験による機能解析で付着および感染細胞内増殖能に関与する遺伝子を同定することに成功した。また、これら病原関連遺伝子の発現条件を明らかにすることも出来たが、抗体を用いたタンパク質レベルでの細胞内分布など、さらなる解析が必要である。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。

EPEC や EHEC と共通な既知の病原因子として III 型分泌系とそのエフェクタータンパク質に関連した *E. albertii* での多様性解析および EHEC/EPEC との比較解析も進め、*E. albertii* の種としての特徴も見いだすことが出来た（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエント（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 バリエント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行い、他のバリエントの存在有無を確認する必要がある。

ゲノム特性を利用した診断疫学ツールの開発に関しては、本菌における O 抗原および H 抗原の多様性を明らかにし、それぞれの違いを利用したマルチプレックス PCR による疫学ツールを構築することが出来た。O-AGC 解析では、40 種類の EAO 型を同定したが、約 300 株のゲノムおよび分離株を用いた解析の結果、O 抗原型を同定出来ないものもあったため、今後、多様性に関してさらなる解析が必要であると考えられる。H 抗原に関しては、4 種類の EAH 型を同定し、さらに解析株約 300 株全ての遺伝子型を同定することが出来た。国内外の分離地域や由来の異なる株を対象にした解析の結果であることから、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) 食中毒細菌としての可能性

今回の結果から、アルコバクター属菌は、食中毒細菌として確立されている *C. jejuni* よりも重度に鶏肉を汚染していることが明らかになった。また、水耕栽培野菜も重度に汚染していることが明らかになった。しかし、水耕栽培野菜で原因物質不明の食中毒が発生しているという情報もない。以上のことから、アルコバクター属菌は、病原性を持っていたとしても、非常に弱いものではないかと考えられた。海外では事例が発生していることから、条件を整えば病原性を発揮する、いわゆる日和見菌のような存在ではないかと考えられた。

#### 2) アルコバクター属菌に対する衛生管理における注意点

本研究結果から、アルコバクター属菌は環境適応能力の高い細菌であることが示唆された。また、鶏肉や水耕栽培野菜、魚介類で重度の汚染が認められた。水耕栽培野菜や魚介類は生食さ

れる頻度が高いため注意が必要であると思われる。

### E. 結論

*E. albertii* については、分担研究 (1) *Escherichia albertii* の制御法の確立および (2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明、が協力して成果を得た。食品での検査法として、優れた増菌培養法、分離培養法、リアルタイム PCR 法が確立され、食中毒事例での調査において原因食品を明らかにした。このことから、本研究で確立した各検査法は食中毒の解析に現実的に有用な方法として評価された。また、*E. albertii* の O 抗原および H 抗原の多様性解析結果から、分離株の O 抗原および H 抗原の genotyping の系が確立され、疫学・診断に有用と考えられた。また、分離率は低いが *E. albertii* が食品検体で分離され、加熱処理による殺菌など食品調理が食中毒予防に重要と考えられた。*E. albertii* は食品中での増殖、環境水中での生残が判明し、環境から農作物、家畜等への汚染の可能性が推察された。*E. albertii* の感染性・病原因子について、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子を同定し、発現条件を明らかにした。ま

た、病原因子 TccP のバリエーション (TccP4) を同定するなど新知見が得られ、今後の発展が期待される研究成果が得られた。アルコバクター属菌については、分担研究 (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立、では、鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌が検出され、水耕栽培野菜および魚介類でも高濃度に検出された。食中毒の原因食品となりうる可能性はあるが、アルコバクター属菌は病原性の弱い日和見菌的な存在ではないかと考えられた。また、アルコバクター属菌の低温での生存、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、他の細菌が死滅する環境でも、長期間生残する可能性を考えると、食品の衛生管理に注意を払う必要が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Major vehicles and O-serogroups in foodborne

enterotoxigenic *Escherichia coli* outbreaks in Japan, and effective detection methods of the pathogen in food associated with an outbreak. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 59(4): 161-166, 2018.

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

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

Parvej, Md., Nakamura, H., Wang, L., Zhang, S., Emura, K., Kage-Nakadai, E., Wada,

- T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Host range-associated clustering based on multi-locus variable-number tandem-repeat analysis, phylotypes, and virulence genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(6). pii: e02796-18, 2019.
- T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. *Microb. Genom*, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.
- 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)
- 岩渕香織、土屋 彰彦、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、和田裕久、

木全恵子、永井佑樹、吉田孝子、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価（1）。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

吉田孝子、白石祥吾、稲垣俊一、森 哲也、平塚貴大、永井佑樹、磯部順子、和田裕久、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、土屋 彰彦、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価（2）。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

尾畑浩魅、小西典子、大塚佳代子、鈴木 淳、貞升健志、甲斐明美、工藤由起子。食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法と有用性の検討。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

工藤由起子。病原大腸菌による食中毒と食品の検査法について。平成30年度短期研修 食品衛生危機管理研修。国立保健医

療科学院。平成30年10月24日。和光市

門脇奈津子、大塚佳代子、大阪美紗、小西典子、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌のリアルタイムPCR法における各種検出機器及びクエンチャーでの検出感度の比較。第114回日本食品衛生学会学術講演会。平成30年11月15、16日。広島

小西典子、大塚佳代子、山崎匠子、和田裕久、磯部順子、永井佑樹、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、土屋彰彦、吉田孝子、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。食品を対象とした腸管毒素原性大腸菌検出法確立のためのコラボレイティブスタディによる評価。第114回日本食品衛生学会学術講演会。平成30年11月15、16日。広島

大岡唯祐、勢戸和子、小椋義俊、井口純、中村佳司、後藤恭宏、藺牟田直子、本田己喜子、池田徹也、杉谷和加奈、今野貴之、河野喜美子、工藤由起子、村上光一、林哲也、西順一郎：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の0抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発。第23回腸管出血性大腸

- 菌感染症研究会（一般演題），  
松山，2019.
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
長岡宏美、大屋賢司、工藤由起  
子．鶏肉からの *Escherichia*  
*albertii* 分離法の開発．第 92  
回日本細菌学会総会．平成 31 年  
4 月 23、24、25 日．札幌
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
床井由紀、土屋彰彦、小嶋由香、  
長岡宏美、大屋賢司、甲斐明美、  
工藤由起子．鶏肉からの  
*Escherichia albertii* 検出法  
のための nested PCR の検討．  
第 115 回日本食品衛生学会学術  
講演会．令和元年 10 月 3、4 日．  
東京
- 小西典子、尾畑浩魅、大塚佳代子、  
新井沙倉、仙波敬子、丸山浩幸、  
原田誠也、福留智子、高良武俊、  
工藤由起子．食品を対象とし  
た *Escherichia albertii* 検出  
のための基礎的検討．第 115 回  
日本食品衛生学会学術講演会．  
令和元年 10 月 3、4 日．東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
望月瑞葉、永井祐樹、原田誠也、  
大屋賢司、甲斐明美、工藤由起  
子．鶏肉での *Escherichia*  
*albertii* 検出法の検討および  
汚染実態．第 40 回日本食品微  
生物学会学術総会．令和元年 11  
月 28、29 日．東京
- 佐藤実佳、大塚佳代子、小西典子、  
尾畑浩魅、新井沙倉、今野貴之、  
床井由紀、長岡宏美、佐伯美由  
紀、工藤由起子．鶏肉における  
*Escherichia albertii* 分離培  
養法の検討．第 40 回日本食品  
微生物学会学術総会．令和元年  
11 月 28、29 日．東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
大屋賢司、工藤由起子．鶏肉に  
おける *Escherichia albertii*  
検出のための PCR 法の検討．第  
93 回日本細菌学会総会．令和 2  
年 2 月 19、20、21 日．名古屋
- 大岡唯祐：ゲノムから見えてきた  
新興下痢症起因菌 *Escherichia*  
*albertii* の特性とその応用．  
第 93 回日本細菌学会総会（ワ  
ークショップ），名古屋，2020.
- 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

平成 30～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

本研究では、[1] *E. albertii* の食品での検査法を検討し、腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法(mECおよびNmECを用いた42℃培養)や薬剤を加えたmECが選択増菌培養に、ラムノース・キシロース添加DHL寒天培地やさらに薬剤を加えた培地が選択分離培養に優れることを明らかにした。[2] *E. albertii* 特異的リアルタイムPCRが確立され、鶏肉からの本菌検出に優れた感度を有し、他の食品種への応用が期待される。[3] 食中毒事例での原因食品調査において *E. albertii* を食品検体から分離し、原因食品を特定した。発症菌量の推測に有用なデータについて今後も継続した調査が必要である。[4] 汚染実態調査の結果、鶏肉や他食品で分離されたことから、広い食品群での調査の必要性が考えられた。環境検体からも本菌が分離され、環境を介した食品汚染の可能性が示された。不顕性感染など潜在的に保菌しているヒトがいる可能性が示された。[5] *E. albertii* は、食品中では中温で増殖し、低温で増殖が抑制された。環境水中では低温で生残が維持され、環境水を介した食品汚染の可能性が示された。

#### 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、畠山 薫、

鈴木 淳

岩手県環境保健研究センター	上山 昭、山中拓哉、太田美香子 高橋幸子、佐藤徳行
秋田県健康環境センター	今野貴之
宮城県保健環境センター	山谷聡子、佐藤千鶴子、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
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
大津市保健所	安田敬子、小椋容子
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
滋賀県衛生科学センター	梅原成子、長谷川嘉子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、佐伯美由紀、森村実加、 松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	仙波敬子、浅野由紀子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也、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	高良武俊、宮平勝人、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
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、阿部光一朗
静岡市環境保健研究所	丸山幸男、望月瑞葉、高橋直人
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸、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。日本において *E. albertii* による食中毒が発生しているが、原因食品が特定された事例は少なく、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法を確立することが求められている。さらに、食中毒の基礎的情報でもある *E. albertii* の発症菌量を明らかにすることが必要であるが、これまでに食中毒での原因食品中の菌数が測定された報告はない。

これらの課題について研究を進めることによって食中毒の予防対策の提案を行うことが可能になると考え、[1]食品での検査法の検討、[2]リアルタイム PCR の開発、

[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析、[4] 食品等における汚染実態調査、[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動、について各年の成果を翌年の研究に反映して3年間の研究を行った。

## B. 研究方法

### [1] 食品での検査法の検討

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法、選択分離培地および各種生化学性状について *E. albertii* 46 株を供試し検討した。次に、Nested PCR の食品培養液での感度を検討した。鶏肉培養液にて4株の菌液を希釈し、菌接種鶏肉培養液 (想定  $10^6 \sim 10^2$  cfu/mL 鶏肉培養液) を調製した。抽出 DNA を複数の酵素を用いた Ooka らの nested PCR に供試し感度を確認した。また、各種濃度の菌液を接種した鶏肉を mEC および NmEC にて増菌し、その培養液についても nested PCR に供試し感度を確認した。さらに、各種増菌培養条件 (BPW、mEC、NmEC) および分離培養条件 (DHL、ラムノース・キシロース添加 DHL: XR-DHL、MAC、ラムノース・キシロース添加 MAC: XR-MAC) について、*E. albertii* を接種した鶏肉 (想定  $10^3 \sim 10^2$  cfu/25 g 鶏肉) を用いた添加回収

試験によって検討した。また、選択増菌培地として、薬剤 A および B を添加した mEC (mEC+AB 培地) の開発を試みた。薬剤 A および B の至適濃度を検討し、至適濃度の mEC+AB 培地で *E. albertii* 194 株および鶏肉由来細菌 20 株を培養し、各菌株に対する増殖抑制作用を解析した。さらに、選択分離培地として、薬剤 C および D を添加した DHL (DHL+CD 培地) の開発を試みた。上記と同様に薬剤 C および D の至適濃度を検討し、至適濃度の DHL+CD 培地を作製して各菌株に対する増殖抑制作用を解析した。

### [2] リアルタイム PCR の開発

保存株および NCBI 登録 *E. albertii* 株の計 113 株を対象に、大岡唯祐研究分担者が同定した *E. albertii* 特異的遺伝子上で SNP の少ない遺伝子配列領域を選定し、プライマーおよびプローブ候補を設計した。次に、*E. albertii* 株の DNA とその希釈液を用いてプライマーおよびプローブの至適濃度を検討した。特異性は、*E. albertii* 43 株とその他の細菌種 29 株を用いて検討した。以下の一部の試験では、インターナルコントロールとして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リアルタイム PCR を実施した。感度

は、*E. albertii* type strain の菌培養液とその希釈液から DNA を抽出し、リアルタイム PCR を実施することで測定した。さらに、鶏肉の mEC および NmEC 培養液にて *E. albertii* 4 株の各増菌培養液を 10 倍階段希釈し、DNA を抽出、リアルタイム PCR を実施することで食品（鶏肉）培養液を利用した感度を測定した。さらに、*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。また、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。

### [ 3 ] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

初めに、MPN3 本法による定量検査法を確立した。また、食中毒検体試験依頼を受け、食中毒事例の食事の冷凍保管検食、それら食品の混合培養液または個別培養液を受け取った。加えて、食品混合培養液および患者便からの分離株を受け取った。食品あるいは培養液検体をそのまま、あるいは増菌培地で培養した後、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR に供試した。培養液を XR-DHL および XR-MAC に画線培養し、

菌の分離を試みた。MPN3 本法による定量検査も同時に供試した。リアルタイム PCR で陽性となった培養液を、選択剤 A を添加した mEC (A-mEC) 培地にて増菌培養し、XR-DHL を用いて菌の分離を試みた。以上の試験によって分離された株を、食品混合培養液および患者便からの分離株とともに遺伝子型別に供試した。

[ 4 ] 食品等における汚染実態調査  
鶏肉（内臓肉を含む）検体に mEC を加えて 42℃ にて培養し、nested PCR を実施した。また、DHL にて乳糖非分解コロニーを分離した。地方自治体の協力機関と協力し、食肉を含んだ食品検体 1918 検体、施設の拭き取りも含む環境検体 229 検体および糞便（ヒトおよびウシ）検体 5,636 検体について調査した。食品および環境検体は、BPW または mEC 等で増菌後、MAC、DHL 等で分離培養した。乳糖非分解のコロニーについてブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性、キシロース非分解を確認し、nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。糞便検体については、増菌培養せずに同様に実施した。次に、合計 75 株の *E. albertii* 分離株の 0 抗原型を大岡らの PCR にて型別 (EA0-genotyping) 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に *E. albertii* を  $10^2 \sim 10^4$  CFU/25 g となるよう接種し、4℃、10℃、20℃および 30℃で 6 時間から 3 日間保管した。保管した検体に滅菌 PBS 225 mL を加えてストマッカー処理後、XR-DHL で培養し生菌数を算出した。加えて、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 300mL 採水し、*E. albertii* を 40 ~ 400 CFU/mL となるよう接種した後に、4℃、10℃、20℃および 30℃で 9 日間保管した。経時的に検体の一部を分取し、生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] 食品での検査法の検討

供試菌株は、mEC および NmEC 中で 36℃および 42℃で増殖した。また、EHEC の選択分離培地上では特徴的な発色を示さず、DHL、XR-DHL 上では多くの株が無色のコロニーを形成した。1st PCR は 2nd PCR よりも 10 ~ 1,000 倍感度が低かった。接種菌数が 0.5 ~ 21.4 cfu/25 g の検体を増菌した場合に 1st PCR と

2nd PCR で共に遺伝子が検出された。鶏肉を用いた培養条件の検討では、BPW よりも mEC および NmEC にて、乳糖非分解の無色コロニーが少なかった。さらに、42℃の増菌培養後の分離成功率が高かった。また、mEC よりも NmEC、DHL よりも XR-DHL、MAC よりも XR-MAC で分離率が高い傾向であった。本菌を接種した鶏肉を NmEC 中で 42℃の条件で増菌培養し、XR-MAC で分離した場合は、分離陽性率が 100%であった。また、選択増菌培地については、最も選択性が高い濃度組合せの mEC+AB 培地で、*E. albertii* 194 株中すべての菌株で増殖が認められ、鶏肉由来細菌は 20 株中 3 株で増殖が認められた。鶏肉懸濁液中においても同様に *E. albertii* の増殖は抑制されず、鶏肉由来細菌の増殖は抑制された。選択分離培地については、最も選択性が高い濃度組合せの DHL+CD 培地で、*E. albertii* 菌株は 194 株中 171 株が発育良好、15 株が発育抑制、8 株で非生育であった。鶏肉由来菌株は 20 株中 11 株が発育良好、3 株が発育抑制、6 株で非生育であった。

### [2] リアルタイム PCR の開発

シーケンス結果と登録遺伝子配列の解析から、2 組のプライマーおよびプローブセット候補 (EA\_rt1、EA\_rt2) が設計されたが、後に

EA\_rt1 は *E. albertii* 以外の細菌種が陽性となることが示された。EA\_rt2 は、プライマーとプローブの至適終濃度がそれぞれ  $0.3 \mu\text{M}$ 、 $0.15 \mu\text{M}$  となった。特異性試験では、EA\_rt2 は全 *E. albertii* 株が陽性かつその他の細菌種は全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液による感度測定では、各種条件で  $0.3 \sim 3.4 \text{ cfu/PCR tube}$  ( $=6.8 \times 10 \sim 6.8 \times 10^2 \text{ cfu/mL}$ ) となった。得られた Ct 値と蛍光値をプロットした像において、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。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。食品培養液での感度の検討では、各種条件で  $0.5 \sim 7.5 \text{ cfu/PCR tube}$  ( $=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3 \text{ cfu/mL}$ ) が検出限界となった。菌を接種した鶏肉での検討では、 $1.2 \sim 1.4 \text{ cfu/25 g}$  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。汚染実態調査では、計 20 検体の市販鶏肉のうち 1 検体と 2 検体がそれぞれ 2nd PCR とリアルタイム PCR 陽性であった。養鶏場から直接購入した鶏検体の mEC および NmEC 増菌培養液計 234 検体を試験したところ、26 検体、37 検体、54 検体がそれぞれ 1st PCR、2nd PCR、リアルタイム PCR 陽性であった。

[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

確立した MPN3 本法による定量検査法を自治体と共有し、協力体制を構築した。食中毒検体試験依頼では、食品混合物の培養液検体の二次増菌培養液が、リアルタイム PCR にて陽性であり、XR-DHL を用いて *E. albertii* が分離された。各食品の培養液検体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となった。しかし、XR-DHL による *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、XR-DHL での培養によって *E. albertii* が分離された。MPN 法による菌数測定においては、*E. albertii* は検出限界以下であった。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は、いずれの遺伝子型別も一致した。

[4] 食品等における汚染実態調査

鶏肉（内臓肉を含む）での汚染実態調査の結果、鶏肉 118 検体中 2 検体（2%）、内臓肉 165 検体中 30 検体（18%）で PCR 陽性であった。PCR 陽性の内臓肉 7 検体から 37 株の *E. albertii* が分離された。また、地方自治体との協力研究では、食品検体 1918 検体中鶏肉を含む 4 検体

(0.2%)、環境検体 229 検体中 2 検体 (0.8%)、糞便検体 5636 検体中 6 検体 (0.1%) から *E. albertii* が分離された。分離株の EA0-genotyping では、様々な EA0g 型に型別された。特に、1 つの集団食中毒事例中に複数の EA0g 型が検出された例が 2 件あった。

#### [ 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℃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ほぼ変化しなかったが、海水検体の菌数は緩やかに減少した。

#### D. 考察

#### [ 1 ] 食品での検査法の検討

乳糖、ラムノースおよびキシロース非分解性が *E. albertii* に共通した性状であり、分離培地および同定の指標として有用であると考えられた。また、鶏肉 25 g あたりに数十の *E. albertii* が汚染している場合は増菌培養後の 1st PCR でも十分に検出可能であり、2nd PCR を必ずしも実施しなくても良いことが示された。mEC よりも NmEC が優れていることが示されたが、mEC でも著しく分離率が低いとは評価し難く、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性も考えて、mEC および NmEC 中の両方で 42℃の増菌培養条件が適用可能と考えられた。NmEC 中にて 42℃で増菌培養し、XR-MAC にて分離するのが最も優れた培養法の組み合わせであると考えられたが、XR-DHL での分離も比較的優れていた。一部の白糖分解の性状を示す *E. albertii* を食品から分離するためにも、白糖を含まない XR-MAC は有用であると考えられた。一方、糖含有培地の調整には手間がかかるため、状況に応じて適宜培地を選択する必要があると考えられた。また、選択増菌培地については、mEC+AB 培地が菌接種液および鶏肉培養液において高い選択性を示し、選択増菌培地として有

用であることが示された。一方で、選択分離培地については、最も選択性が高い濃度組合せの DHL+CD 培地で、*E. albertii* 菌株は 194 株中 23 株が発育抑制あるいは非生育であり、鶏肉由来菌株は 20 株中 9 株が発育抑制あるいは非生育であったことから、DHL+CD 培地は選択増菌培地として有用であるが、*E. albertii* の一部菌株の増殖を抑制してしまうため、分離培養の際には XR-DHL との併用が望ましいと考えられる。

#### [ 2 ] リアルタイム PCR の開発

EA\_rt2 のプライマーおよびプローブセットは特異性が高いことが示された。*E. albertii* 株培養液による感度測定では、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていた。また、16S rRNA 遺伝子の蛍光値が 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も、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度が優れていたため、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。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 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 陽性の検体が複数存在したため、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。

#### [ 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 *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検体からリアルタイム 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 培地での培養によって *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の遺伝子型別が、食品混合物由来株および患者由来株と一致したことから、本食中毒事例の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。

[4]食品等における汚染実態調査  
鶏肉での汚染実態調査では、複数  
の内臓肉から *E. albertii* が分離  
されたため、過去の報告と同様に  
鶏の保菌が示唆された。多様な食  
品・環境検体での汚染実態調査では、  
市販食品の本菌汚染率は極めて低  
いものの、*E. albertii*に汚染され  
ているものも存在することが判明  
した。国内の動物の糞便や河川水か  
らの過去の分離報告があるため、動  
物や環境を介して食品が汚染され  
る可能性を考慮する必要がある。ヒ  
ト由来株での調査では、*E.*  
*albertii* がヒト便から分離された  
例もあった。本菌は、従来、*Hafnia*、  
ボイド赤痢菌血清型 13、あるいは  
大腸菌として同定されていた菌株  
から構成されており、同定が難しい。  
そこで、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。また、国内に様々な O 抗原型の  
*E. albertii*が存在することが示さ  
れた。型別不能の株も散見されたた  
め、新規の EA0 型の存在が示唆され  
た。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。本  
EA0-genotyping は、食品の汚染源  
を探る手法として簡易に実施でき  
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* の汚染経路の推定  
のため、食品および環境水での本菌  
の増殖挙動の解析を行った。その結  
果、中温（20℃および 30℃）で保管  
した食品検体中では、*E. albertii*  
の菌数は急速に増加したが、低温  
（4℃および 10℃）では菌数は一定  
であった。環境水検体においては、  
低温に保管した井戸水検体では菌  
数は変動せず、海水検体では緩やか  
に減少した。中温の環境水検体では  
菌数は低温よりも早く減少し、この  
傾向は海水検体で顕著であった。*E.*  
*albertii* は汚染食品の中温での保  
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示された。ま  
た、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。

## E. 結論

本研究では、[1] 食品での検査  
法の検討では、腸管出血性大腸菌の  
試験法と同じ増菌培養法（mEC およ  
び NmEC を用いた 42℃培養）が有用  
であることが明らかになったが、  
mEC に薬剤を加えることでより優



れた選択増菌培地が開発された。また、乳糖・ラムノース・キシロース非分解性の性質を利用したラムノース・キシロース添加 DHL 寒天培地が有用であることが明らかになったが、さらに薬剤を加えた培地についても分離率の向上が期待されることが示された。[2] リアルタイム PCR の開発では、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR が確立され、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った。今後、鶏肉以外の食品種への応用が期待される。[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析では、食中毒事例での原因食品調査において、本研究で検討していた検出方法を駆使して *E. albertii* を検体から分離し、原因食品を特定した。発症菌量の推測に有用な食中毒事例での原因食品中の菌数と摂取食品量のデータを得たかったが、研究期間中に測定が行えなかった。今後も継続した調査が必要である。[4] 食品等における汚染実態調査では、鶏肉から *E. albertii* が分離されたため、鶏が保菌する可能性が示された。また、他の食品でも分離されたことからさらに広い食品群での調査の必要性が考えられた。環境検体からも *E. albertii* が分離されたため、環境を介して食品が汚染さ

れる可能性が示された。さらに、ヒトから分離されたことから、集団食中毒事例以外にも、散发性食中毒事例や、不顕性感染など潜在的に保菌しているヒトがいる可能性が示された。[5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動では、*E. albertii* は、食品中で中温での保管時には増殖するが、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り、環境水を介した食品汚染の可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Major vehicles and O-serogroups in foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli* outbreaks in Japan, and effective detection methods of the pathogen in food associated with an outbreak. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku

- Zasshi). 59(4): 161-166, 2018.
- Ohtsuka, K., Hoshino, K., Kadowaki, N., Ohsaka, M., Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. LWT, 114, 108409, 2019.
- Mori, T., Nagao, S., Kishino, K., Namba, T., Hara-Kudo, Y. DNA extraction for sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food by real-time PCR assays. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 60(6), 183-186, 2019.
- Parvej, Md., Nakamura, H., Wang, L., Zhang, S., Emura, K., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Host range-associated clustering based on multi-locus variable-number tandem-repeat analysis, phlotypes, and virulence genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. Applied and Environmental Microbiology. 85(6). pii: e02796-18, 2019.
- Ooka, T., Seto, K., Ogura, Y., Nakamura, K., Iguchi, A., Gotoh, Y., Honda, M., Etoh, Y., Ikeda, T., Sugitani, W., Konno, T., Kawano, K., Imuta, N., Yoshiie, K., Hara-Kudo, Y., Murakami, K., Hayashi, T., Nishi, J. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. Microb. Genom, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.
- 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)

岩渕香織、土屋 彰彦、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、和田裕久、木全恵子、永井佑樹、吉田孝子、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価(1)。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

吉田孝子、白石祥吾、稲垣俊一、森 哲也、平塚貴大、永井佑樹、磯部順子、和田裕久、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、土屋 彰彦、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによ

る評価(2)。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

尾畑浩魅、小西典子、大塚佳代子、鈴木 淳、貞升健志、甲斐明美、工藤由起子。食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法と有用性の検討。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

工藤由起子。病原大腸菌による食中毒と食品の検査法について。平成30年度短期研修 食品衛生危機管理研修。国立保健医療科学院。平成30年10月24日。和光市

門脇奈津子、大塚佳代子、大阪美紗、小西典子、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌のリアルタイムPCR法における各種検出機器及びクエンチャーでの検出感度の比較。第114回日本食品衛生学会学術講演会。平成30年11月15、16日。広島

小西典子、大塚佳代子、山崎匠子、和田裕久、磯部順子、永井佑樹、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、土屋彰彦、吉田孝子、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。食品を対象とした腸管毒素原性大腸菌検出法

- 確立のためのコラボレイティブスタディによる評価. 第114回日本食品衛生学会学術講演会. 平成30年11月15、16日. 広島
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、長岡宏美、大屋賢司、工藤由起子. 鶏肉からの *Escherichia albertii* 分離法の開発. 第92回日本細菌学会総会. 平成31年4月23、24、25日. 札幌
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、土屋彰彦、小嶋由香、長岡宏美、大屋賢司、甲斐明美、工藤由起子. 鶏肉からの *Escherichia albertii* 検出法のための nested PCR の検討. 第115回日本食品衛生学会学術講演会. 令和元年10月3、4日. 東京
- 小西典子、尾畑浩魅、大塚佳代子、新井沙倉、仙波敬子、丸山浩幸、原田誠也、福留智子、高良武俊、工藤由起子. 食品を対象とした *Escherichia albertii* 検出のための基礎的検討. 第115回日本食品衛生学会学術講演会. 令和元年10月3、4日. 東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、望月瑞葉、永井祐樹、原田誠也、大屋賢司、甲斐明美、工藤由起子. 鶏肉での *Escherichia albertii* 検出法の検討および汚染実態. 第40回日本食品微生物学会学術総会. 令和元年11月28、29日. 東京
- 佐藤実佳、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、新井沙倉、今野貴之、床井由紀、長岡宏美、佐伯美由紀、工藤由起子. 鶏肉における *Escherichia albertii* 分離培養法の検討. 第40回日本食品微生物学会学術総会. 令和元年11月28、29日. 東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大屋賢司、工藤由起子. 鶏肉における *Escherichia albertii* 検出のための PCR 法の検討. 第93回日本細菌学会総会. 令和2年2月19、20、21日. 名古屋
- 大岡唯祐，勢戸和子，小椋義俊，井口純，中村佳司，後藤恭宏，藺牟田直子，本田己喜子，池田徹也，杉谷和加奈，今野貴之，河野喜美子，工藤由起子，村上光一，林哲也，西順一郎. 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発. 第23回腸管出血性大腸菌感染症研究会（一般演題），松山，2019.
- 大岡唯祐. ゲノムから見えてきた新興下痢症起因菌

*Escherichia albertii* の特性  
とその応用. 第 93 回日本細菌  
学会総会 (ワークショップ) ,  
名古屋, 2020.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況  
なし

平成 30～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。公開データベース上に登録されている 55 株の *E. albertii* ゲノムから、本菌特異的な遺伝子群の網羅的抽出を試み、同定された遺伝子群のうち、病原関連候補 12 遺伝子について遺伝子破壊株の作製と培養細胞への感染実験による病原性を検討した。その結果、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子をいくつか同定した。さらに、その遺伝子群について発現条件の解析を行った、高温、低栄養の条件下で発現が亢進す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 (TccP4) を同定した。本菌の O 抗原合成系遺伝子群コード領域 (O-AGC) の多様性に関して、57 株のゲノム配列の解析を行い、本菌に O 抗原型が少なくとも 40 種類 (EAOg1-EAOg40) 存在することを明らかにした。さらに、O-AGC に高度に保存されている *wzx* 遺伝子の配列多様性を利用して PCR による O 抗原型タイピングツール (EAO-genotyping PCR) を開発した。鞭毛抗原 (H 抗原) の多様性に関しても 243 株のゲノム情報を用いた解析を実施し、4 種類の *fliC* 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) しか存在しないこと、いずれも本菌特有であることを明らかにした。さらに、*fliC* 遺伝子の配列多様性を利用した EAHg 型タイピングツール (EAH-genotyping PCR) を開発した。

## 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。

## B. 研究方法

### (1) 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝子群の網羅的探索

これまでに取得している 29 株の *E. albertii* 株の全ゲノム情報 (完全長配列 3 株、ドラフト配列 26 株)、加えて、NCBI データベースに登録されている 26 株 (計 55 株) について、国立遺伝学研究所が提供している DFAST により遺伝子アノテーションを行い、各株の遺伝子レパートリーを同定した。ドイツの患者由来株である CB9786 株を参照株とし、遺伝子長が 60%以上でありアミノ酸配列相同性が 90%以上の保存性を示す遺伝子を網羅的に抽出した。また、同定された遺伝子群のうち、他の *Escherichia* 属細菌に存在しない遺伝子群も併せて検索した。

### (2) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出 (図 2 参照)

前出の *E. albertii* CB9786 株の全ゲノム塩基配列に関して、

*Escherichia* 属細菌および近縁菌種のゲノム塩基配列との比較を行い、塩基配列相同性 80%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を除去し、*E. albertii* CB9786 株にのみ存在する配列を取得した。次に、*E. albertii* 55 株のゲノム情報に対して、塩基配列相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定した。最終的に、抽出された領域に存在する遺伝子を検出し、塩基配列保存性が 99%以上であることを診断疫学マーカー候補遺伝子とした。

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

NCBI データベース登録 57 株に加え、Enterobase website v1.1.2. (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) に登録されている 186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E. albertii* 主要病原因子の保有状況を調べた。進化系統解析は Prokka でアノテーションした後、Roary によりコア遺伝子の抽出し、コア遺伝子全体で配列が同一の株を除いて Maximum-likelihood tree を作成することに

より行った。主要病原因子の検索は、*eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子を、それぞれ EPEC や EHEC の主要病原因子である III 型分泌系をコードする locus of enterocyte effacement (LEE) 領域と第 2 の III 型分泌系をコードするとされる ETT2 領域のマーカー遺伝子として、加えて、これまでに *E. albertii* の病原因子として同定されている *stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*paa* 遺伝子についてゲノム配列に対する相同性解析を行い、保存性を確認した。

### (4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

遺伝子破壊には、当初、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用したが、解析で用いた *E. albertii* 株は 2 株ともプラスミドや組換え用 PCR 産物などの DNA 取込効率が低かったため、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には全ゲノム配列決定株であるヒト臨床分離株 HIPH08472 株および EC06-170 株、トリ由来株である NIAH\_Bird3 株の計 3 株を対象とし、標的遺伝子をクロラムフェニコール遺伝子 (*cat*) と置換するため、各標的遺



伝子の前後の配列を含むプライマーを用いて pKD3 プラスミド上に存在する *cat* 遺伝子を PCR 増幅した。具体的には、相同組換えにより遺伝子置換が可能となるように、標的遺伝子の両末端約 50 bp の配列を付加したプライマーペアを設計した。PCR 増幅産物を組換え酵素を発現するプラスミドを形質転換した株に導入し、標的部位への相同組換えによりクロラムフェニコール耐性を獲得したクローンを取得した。取得したクローンについては、標的部位に正しく *cat* 遺伝子が挿入されていることを標的周辺部に作成したプライマーペアを用いた PCR により確認した。

(5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目(4)で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

1) 付着効率の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着し

ていない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 2 時間でメタノール固定・ギムザ染色を行い、コロニー数をカウントした。

2) 細胞内生存能の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 24 時間した。その後、終濃度 200 $\mu$ g/ml の gentamicin で 15 分処理することにより細胞外に存在する菌を殺菌した。PBS で洗浄後、1% Triton X-100 in PBS で処理することにより培養細胞を壊して細胞内に存在する菌を放出させ、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に希釈液をまいて、37°C で 16 時間培養、コロニー数（培養細胞内の生存菌数）をカウントした。

(6) 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。

(7) *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

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。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ピ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ピングを行った。

*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。

(8) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4] の機能解析

項目 (7) 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。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 (0.2 $\mu$ 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。

#### (9) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、O 抗原合成遺伝子領域 (O-AGC) の前後に存在することが分かっている *wcaM* 遺伝子と *hisI* 遺伝子を検索して O-AGC を同定し IMC-GE ソフトウェアを用いて遺伝子アノテーションを行った。既知の *Escherichia/Shigella* 属及び近縁菌種の O 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、*Escherichia/Shigella* 属の O 血清群と類似した O-AGC を保有する株については、該当する *Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した (図 2)。

(10) EAO-genotyping PCR の開発  
および実用性の検討

項目 (9) で同定した *E. albertii* の各 O-AGC に共通して保存されている O-antigen flippase をコードする *wzx* 遺伝子について *E. albertii* 内 および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で見られる配列多様性を利用し、PCR による O 抗原遺伝子型タイプングツール (EAO-genotyping PCR) の開発を行った。また、そのプライマーセットの中に *E. albertii* を特異的に検出可能なプライマーペアを加えることで、*E. albertii* の同定も同時に行うことのできる検出系とした。構築した検出系の検討として、日本国内でトリおよびヒトから分離された *E. albertii* 92 株を用いて EAO-genotyping PCR を行い、さらにデータベース上に登録されている 186 株のゲノム情報に対してプライマー配列を用いた *in silico* EAO-genotyping を実施することにより、本ツールの検出感度を検討した。

(11) *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。

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

項目 (11) 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 抗原遺伝子型タイプングツール (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できる検出系とした。構築した検出系の検討として、日本国内でトリおよびヒトから分離された *E. albertii* 92 株を用いて EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

## C. 研究結果

### (1) 全ゲノム情報を基にした種特異的遺伝子群の網羅的探索

解析の結果、*E. albertii* に保存性される遺伝子が 55 遺伝子同定された。その中には、宿主細胞接着への関与が考えられる繊維毛タンパク、蛋白分解酵素、III 型分泌装置により宿主細胞へ分泌されるエフェクターのホモログ、細胞膨化致死毒素など既知の病原関連因子の遺伝子ホモログが 9 個、また、フマル酸代謝や基質輸送に関わる遺伝子群などの遺伝子ホモログが 2 個、加えて、機能未知の遺伝子も数多く含まれていた。

### (2) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii* に特異的な領域として、まず当研究グループで実施した 29 株の比較解析および近縁菌種とのゲノム比較解析から、118 領域（計 71,280 bp）を抽出しており、本研究ではそこに含まれる 34 遺伝子を解析対象とした。NCBI データベースに登録された *E. albertii* 26 株に対して、blastn により各遺伝子の保有および配列保存性を確認した。その結果、全 55 株に共通し、

99% の塩基配列保存性を示す遺伝子を計 9 個、診断疫学マーカー候補遺伝子として同定した。

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

計 243 株のゲノム情報を基に、全ゲノム高精度系統解析と主要病原因子の分布の解析を行った。系統解析の結果、*E. albertii* は大きく 2 つのクレードに分かれること、分離地や分離源と系統関係には相関がないことも明らかとなった。主要病原因子の分布についての解析からは、*eae* 遺伝子（LEE 領域）と *cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* 遺伝子がほとんどの株で保存されており、過去の分離株を用いた報告と一致していた。第 2 の III 型分泌系をコードする ETT2 領域についても、ほとんどの株でその領域が欠失している *E. coli* とは異なり、保存性が高いことも明らかとなった。また、過去の報告において、一部の株で保有が示されている *stx2* 遺伝子が異なる系統に属する *E. albertii* 株において検出されること、その保有と *cdtB*-I サブタイプとの分布に相関が見られることも明らかとなった（図 2）。

(4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

*E. albertii* は DNA の形質転換効率および DNA 組換え効率が、大腸菌と比べて低い。そのため、比較的、形質転換効率の高いヒト臨床由来 EC06-170 株と HIPH08472 株、トリ由来 NIAH\_Bird 3 株の 3 株に変更し、加えて、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、遺伝子破壊株を効率良く取得できるようになった。それにより、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、3 株すべてで破壊株を作製することができた。

(5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

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

(6) 病原関連候補遺伝子の発現条

件検討

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 3）。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。

(7) *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)。

(8) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (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 4)。

#### (9) 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) 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。

#### (10) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

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

*albertii* 株間の比較から、O-AGC は 40 種類 (EAOg1-40) に分かれることが明らかとなった (図 5)。また、同定された O-AGC を *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と比較した結果、25 種類 (EAOg3, EAOg6, EAOg8, EAOg9-30) が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝子セットを保有していた。中でも、特に 7 種類 (EAOg9-15) は塩基レベルで 98% 以上の相同性を示し、*E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の全ゲノムレベルでの塩基配列相同性が 90% 程度であることから、これらの菌種間で O-AGC が頻繁に水平伝播していることが考えられた。また、*E. coli* や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似し、配列相同性の高い O-AGC を保有する *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことも明らかとなった (図 6)。

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

項目 (10) で同定した 40 種類の O-AGC に保存される *wzx* 遺伝子の配列を抽出し、近縁菌種の *wzx* 遺伝子との系統解析を行った。その結果、O 抗原型間で *wzx* 遺伝子に塩基配列多様性がある



ことが明らかとなった（図 7）。そこで、この配列多様性を利用し、40 種類の EAO 型を識別できるプライマーセット（3 セット）を構築した。また、その中には *E. coli* や *Shigella* の *wzx* 遺伝子との識別が出来ないものも存在したことから、3 プライマーセットそれぞれに *E. albertii* 特異的遺伝子領域を検出可能なプライマーセットを 1 組ずつ加え、O 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした（図 8, 9）。このシステムの有効性を検討するため、国内および海外分離株（計 278 株）について、実際の PCR およびプライマー配列の相同性検索による *in silico* EAO-genotyping を実施した結果、229 株（82.4%）の EAO 型を同定することが出来た（図 10）。

#### (12) *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 11）。*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 12）。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 13）、*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。

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

項目（12）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 14）。このシステムの有効性を検討するため、

国内ヒト臨床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 EAH 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

本研究では、*E. albertii* に特異的な遺伝子群（特に病原関連遺伝子）や共通するゲノム領域を同定し、本菌の病原機構解明と診断疫学マーカー同定、さらにそれを利用した診断疫学ツールの開発を目的として解析を進めた。

病原関連候補遺伝子の機能解析については、当該遺伝子の破壊株を作製し、宿主細胞への感染実験により付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定することを目的としたが、*E. albertii* の DNA 取り込みおよび組換え効率が非常に低かったことから、遺伝子破壊株の作製法改良などに時間を要し、実験計画が遅れた。遺伝子破壊株作製法の改良により、令和元年度

以降は順調に遺伝子破壊を行うことができ、その後の培養細胞への感染実験による機能解析で付着および感染細胞内増殖能に関与する遺伝子を同定することに成功した。また、これら病原関連遺伝子の発現条件を明らかにすることも出来たが、抗体を用いたタンパク質レベルでの細胞内分布など、さらなる解析が必要である。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。

EPEC や EHEC と共通な既知の病原因子として III 型分泌系とそのエフェクタータンパク質に関連した *E. albertii* での多様性解析および EHEC/EPEC との比較解析も進め、*E. albertii* の種としての特徴も見いだすことが出来た（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエント（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 バリエント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

定を行い、他のバリエーションの存在有無を確認する必要がある。

ゲノム特性を利用した診断疫学ツールの開発に関しては、本菌における O 抗原および H 抗原の多様性を明らかにし、それぞれの違いを利用したマルチプレックス PCR による疫学ツールを構築することが出来た。O-AGC 解析では、40 種類の EAO 型を同定したが、約 300 株のゲノムおよび分離株を用いた解析の結果、O 抗原型を同定出来ないものもあったため、今後、多様性に関してさらなる解析が必要であると考えられる。H 抗原に関しては、4 種類の EAH 型を同定し、さらに解析株約 300 株全ての遺伝子型を同定することが出来た。国内外の分離地域や由来の異なる株を対象にした解析の結果であることから、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）。

#### E. 結論

*E. albertii* の特性を解明するにあたり、本菌特異的遺伝子の特定とそれを利用した疫学ツールの開発を行うことが出来た。病原因子に関しても本菌特異的因子を同定

することが出来たが、遺伝子破壊株作製法の改良に時間を要したこと、また、当該遺伝子の抗体作製に苦慮したことなどから、機能解析を完了することが出来ず、論文化には至らなかった。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、国際科学雑誌での論文化を進める必要がある。

#### F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. **Microb. Genom**, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.

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

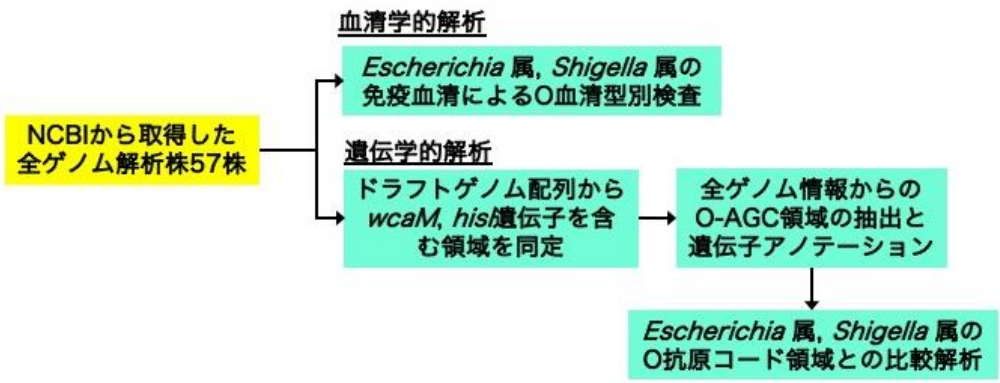
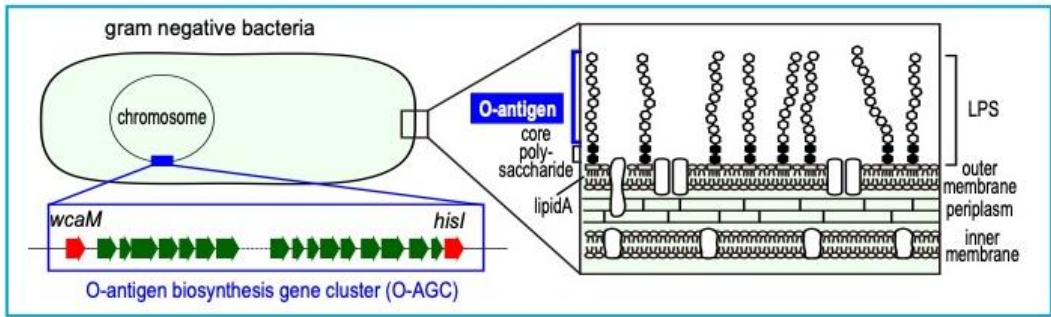


図1：O抗原コード領域解析のフローチャート



図 2 : 225 株の *E. albertii* 全ゲノム高精度進化系統樹および主要病原因子の分布

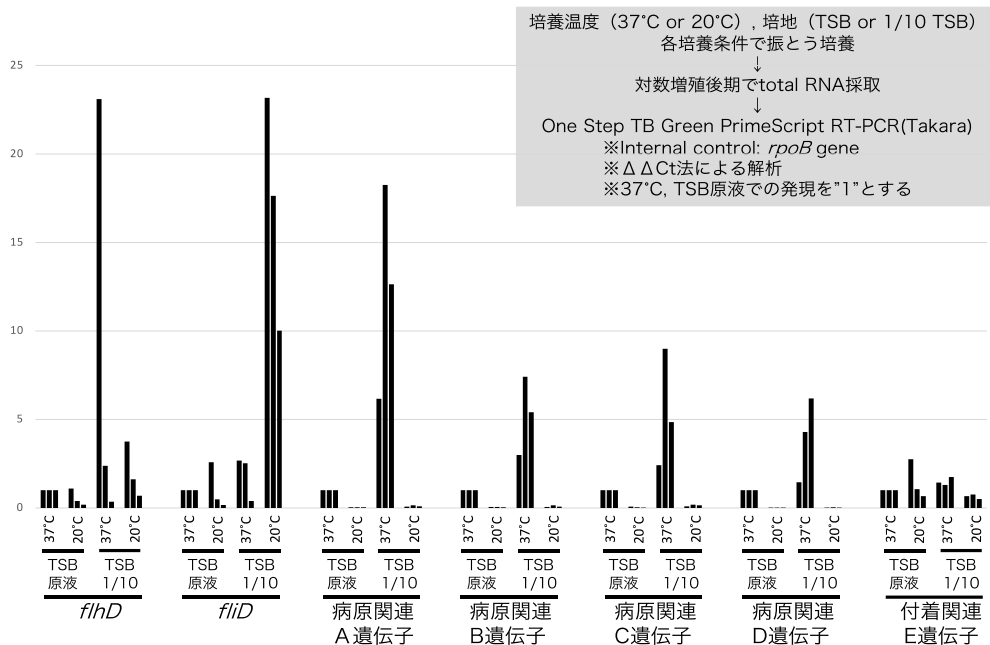


図 3 : 異なる培養条件でのリアルタイム RT-PCR 結果

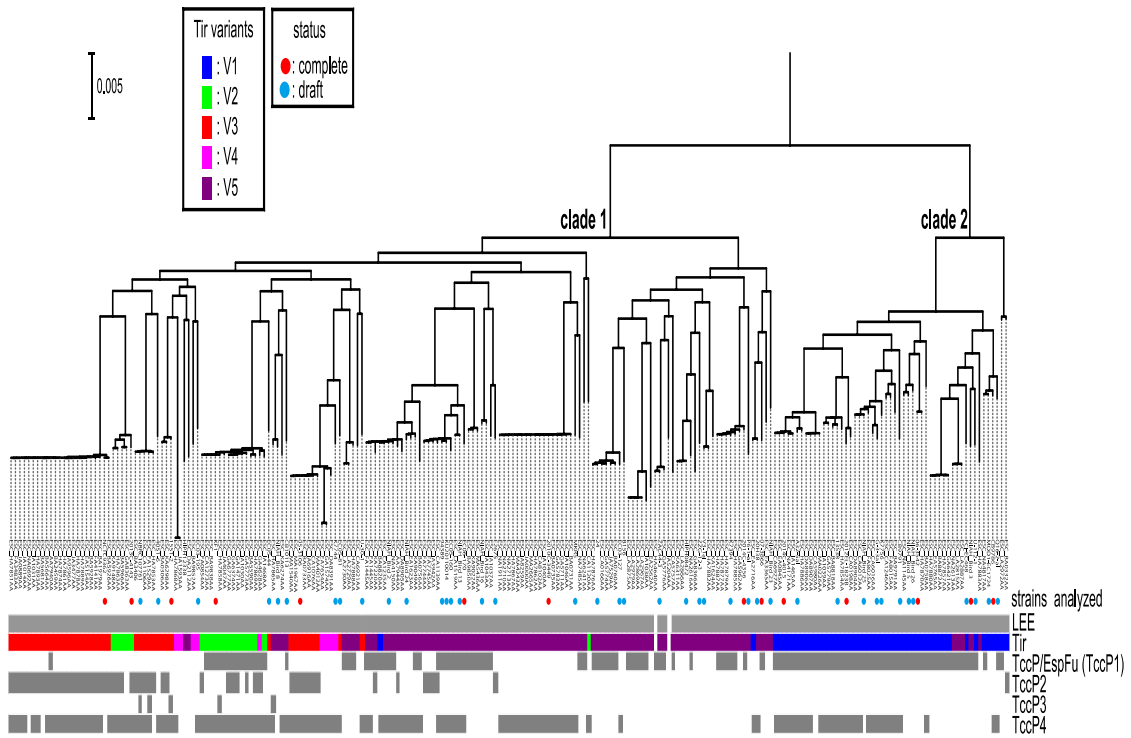


図 4 : *E. albertii* 進化系統における Tir および TccP の分布



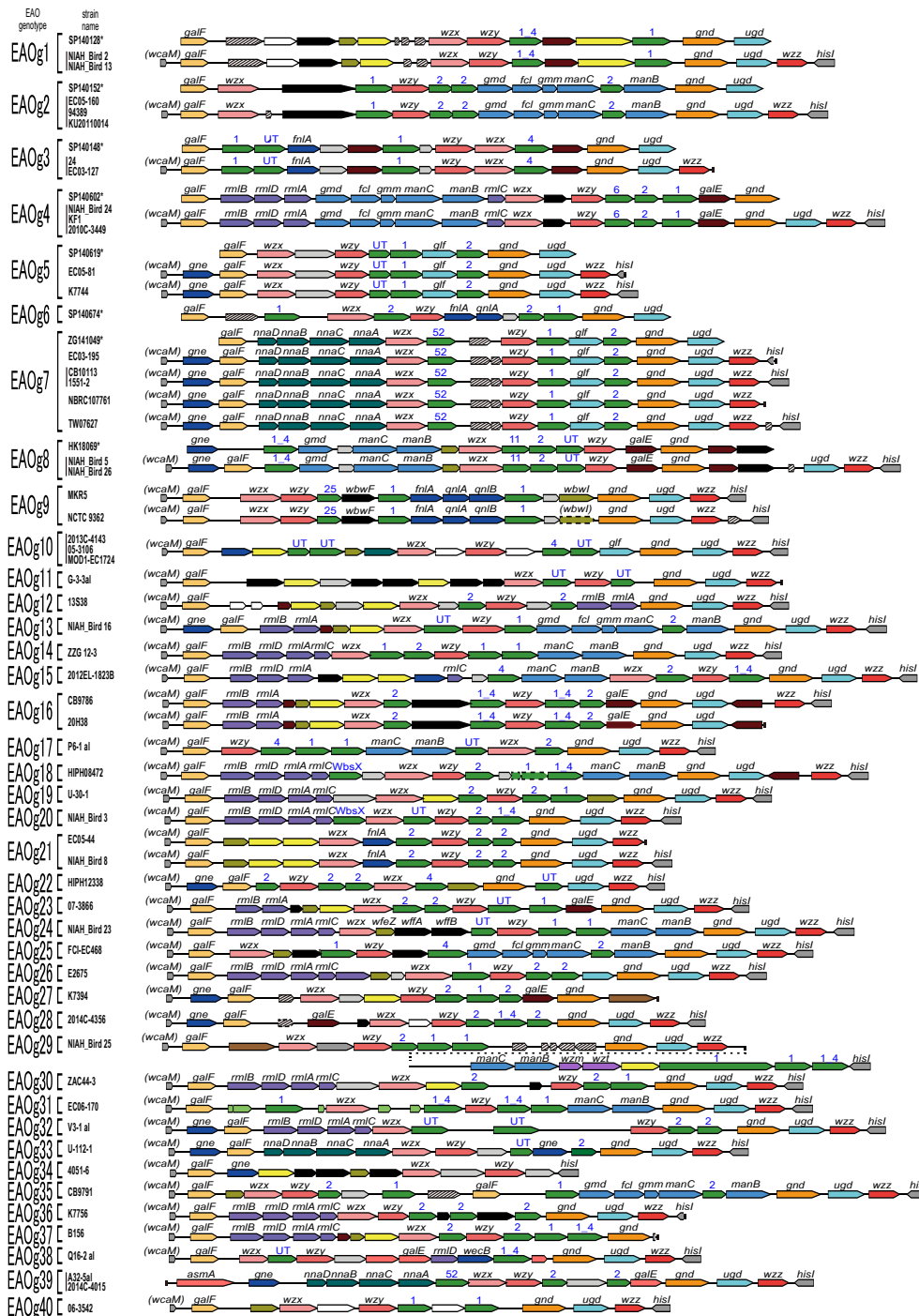


図 5 : 全ゲノム配列解析 57 株のから同定された *E. albertii* の O 抗原型 (EOAg1-40)  
(Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 1 を改変)

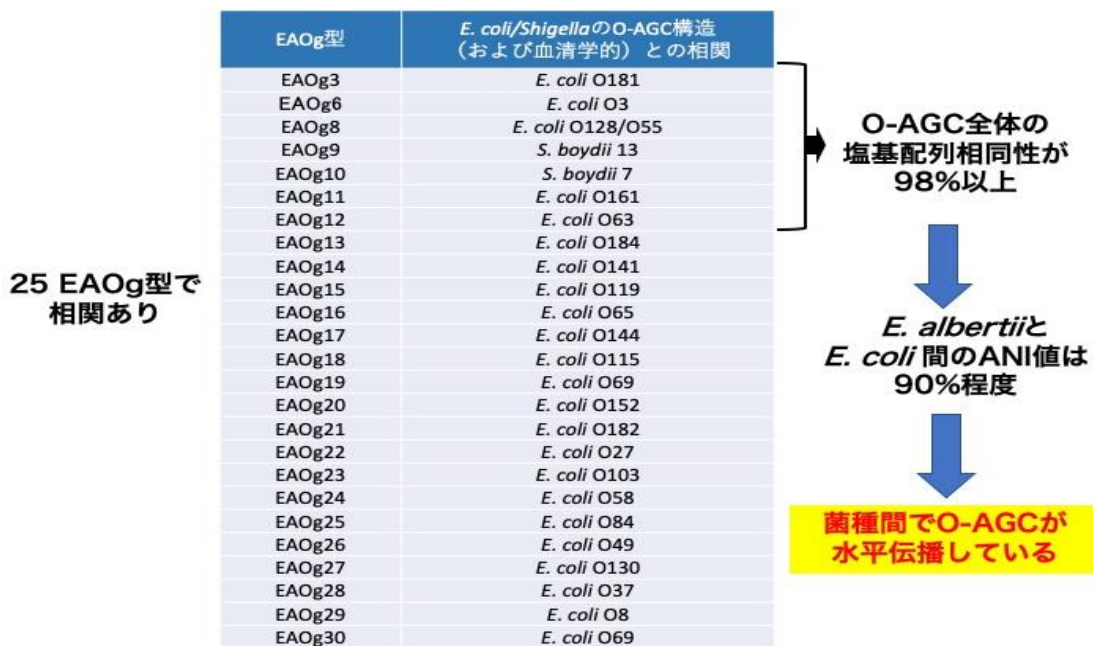


図 6 : *E. albertii* の O 抗原型(EAOG)と *Escherichia/Shigella* 属の O 抗原型との比較

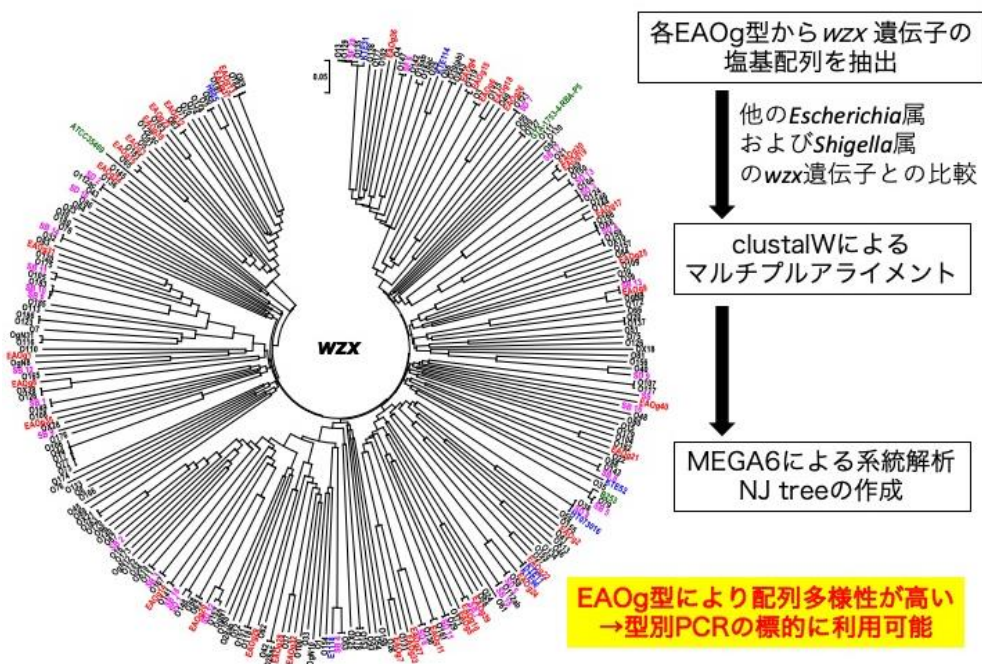


図 7 : *E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の *wzx* 遺伝子の系統解析

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

EAOG type	Set and forward primer name	Sequence (5'3')	Set and reverse primer name	Sequence (5'3')	Expected amplicon size (bp)	Reference strain
1st set	EAOG16	1_wzx_F_EAOG16	1st set forward	1st set reverse	949	CB9786
	E_al_1_OF	GGTCATATGATCTGACTGA	E_al_1_OF	ATCACATCTCCCACTAGTTC	846	common
	EAOG29	1_wzx_F_EAOG29	CGTTATCATTGCTCAGTAGCG	1_wzx_R_EAOG29	777	NIH_Bird 25
	EAOG26	1_wzx_F_EAOG26	AGTAGCTATATCCACGCGCAG	1_wzx_R_EAOG26	701	E2675
	EAOG27	1_wzx_F_EAOG27	ATAGCATGAGCGTTTACAAACA	1_wzx_R_EAOG27	620	K7394
	EAOG20	1_wzx_F_EAOG20	ACTAGTATTGTAAGAAATGCC	1_wzx_R_EAOG20	537	NIH_Bird 3
	EAOG2	1_wzx_F_EAOG2	GGATATTTCGGTTGCGATTG	1_wzx_R_EAOG2	492	EC06-160
	EAOG18	1_wzx_F_EAOG18	CATTCTTAATTATGCTGATAAG	1_wzx_R_EAOG18	434	HIPH08472
	EAOG23	1_wzx_F_EAOG23	TACTCTGCAGAGAACCAAGATA	1_wzx_R_EAOG23	389	07-3669f
	EAOG36	1_wzx_F_EAOG36	CGTCTGTGTCTAGGGAATTG	1_wzx_R_EAOG36	328	K7756
2nd set	EAOG21	2_wzx_F_EAOG21	2nd set forward	2_wzx_R_EAOG21	953	EC06-44
	EAOG34	2_wzx_F2_EAOG34	ACCTGATGAGCAATGGGAATG	2_wzx_R2_EAOG34	901	4051-6
	EAOG4	2_wzx_F_EAOG4	ACTCTATAGACAATATTGAAC	2_wzx_R_EAOG4	840	NIH_Bird 24
	EAOG5	2_wzx_F_EAOG5	TGCTGAAGAGTATGGCTGAGTTG	2_wzx_R_EAOG5	774	EC05-81
	E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTCACTGGA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCCAAATGGCA	731	common
	EAOG35	2_wzx_F_EAOG35	GCATGGTTGATACAATTGAG	2_wzx_R_EAOG35	656	CB9791
	EAOG8	2_wzx_F_EAOG8	GCTCTGCAGATCTCTCAACAG	2_wzx_R_EAOG8	579	NIH_Bird 5
	EAOG37	2_wzx_F_EAOG37	ATGAGAAACTGTTAACGGTAC	2_wzx_R_EAOG37	502	B15f
	EAOG24	2_wzx_F_EAOG24	GTCTCTCATTAACTAAGAAMC	2_wzx_R_EAOG24	458	NIH_Bird 23
	EAOG40	2_wzx_F_EAOG40	TAGCCAGATTTTCTCAAGG	2_wzx_R_EAOG40	400	06-3542-
3rd set	EAOG32	3_wzx_F_EAOG32	3rd set forward	3_wzx_R_EAOG32	915	V3-1al
	EAOG11	3_wzx_F_EAOG11	GACATTTGATATAAGCAATTC	3_wzx_R_EAOG11	851	G-3-3al
	EAOG39	3_wzx_F_EAOG39	GTCTCGATGCTGGTGGTTCTTC	3_wzx_R_EAOG39	782	A32-5al
	E_al_1_NR	CAGTCGATGGTTCACTGGA	E_al_1_NR	ACACCGTGGCCAAATGGCA	731	common
	EAOG6	3_wzx_F_EAOG6	GTGCTGATCATGTTATTTGCTG	3_wzx_R_EAOG6	676	SP146274
	EAOG17	3_wzx_F_EAOG17	TTTAGACAGCAGCCGCAATCG	3_wzx_R_EAOG17	630	F6-1 al
	EAOG19	3_wzx_F_EAOG19	ATGCTTACAGCGCAACCTCG	3_wzx_R_EAOG19	565	U-30-1
	EAOG38	3_wzx_F_EAOG38	TCACATAGATGCTGTTGATTG	3_wzx_R_EAOG38	496	Q16-2 al
	EAOG22	3_wzx_F_EAOG22	TTGTTACATCATATTTACTCGAG	3_wzx_R_EAOG22	439	HIPH12338
	EAOG33	3_wzx_F_EAOG33	TGCGTAGGAGTGTCTGCTG	3_wzx_R_EAOG33	405	U-112-1

図 8 : EAO-genotyping PCR のプライマー情報 (3 プライマーセット)

E\_al\_1\_OF/OR および E\_al\_1\_NF/NR : *E. albertii* 検出プライマー2セット

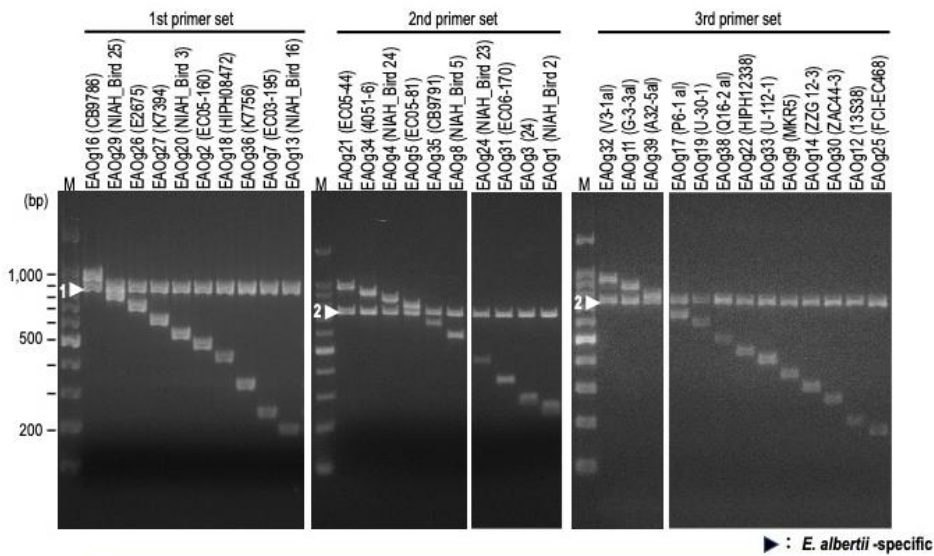


図 9 : EAO-genotyping PCR による各 EAOg 型参照株の PCR・泳動結果

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

. Fig. 4 を改変) Δ1, Δ2 : *E. albertii* 検出プライマーによるバンド

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

図 10 : EAO-genotyping PCR 系を用いた 278 株の EAO 型の同定結果

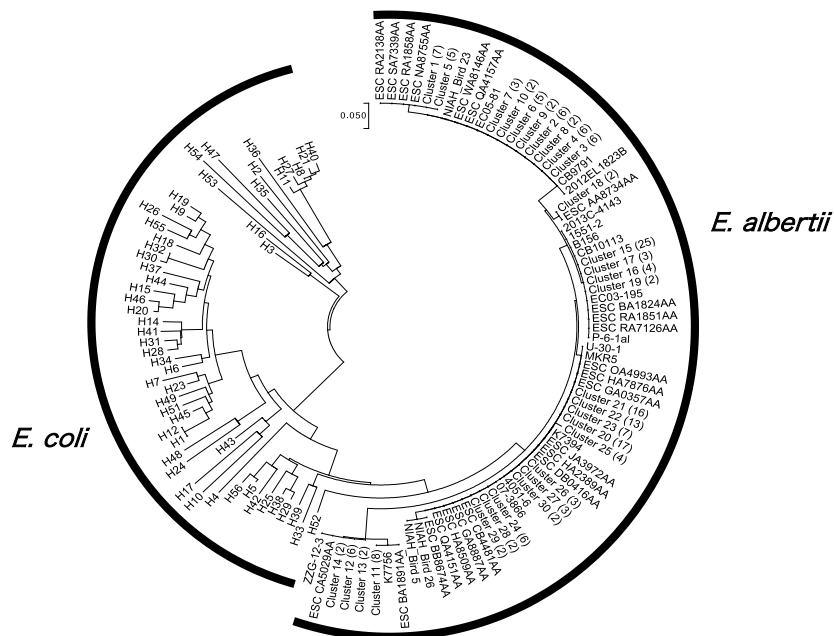


図 11 : 大腸菌および *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

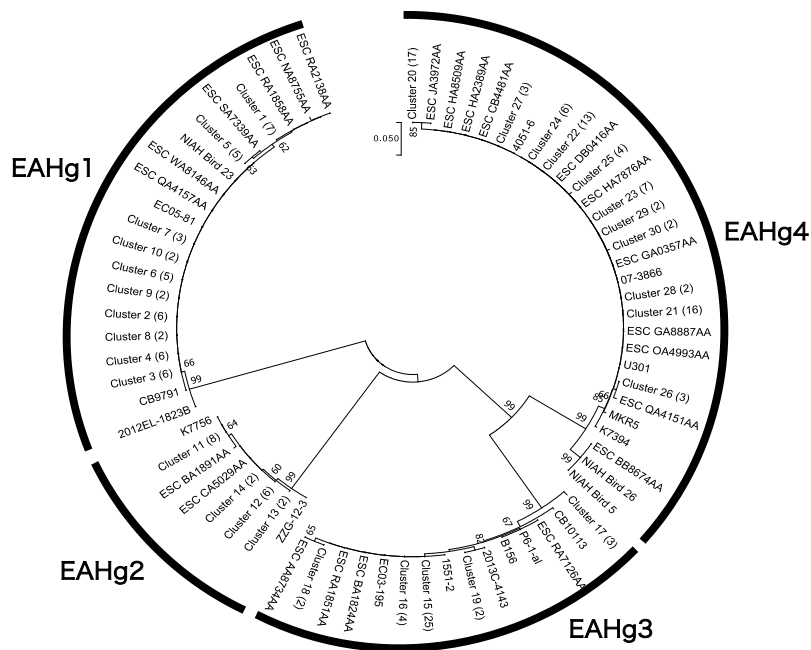


図 12 : *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

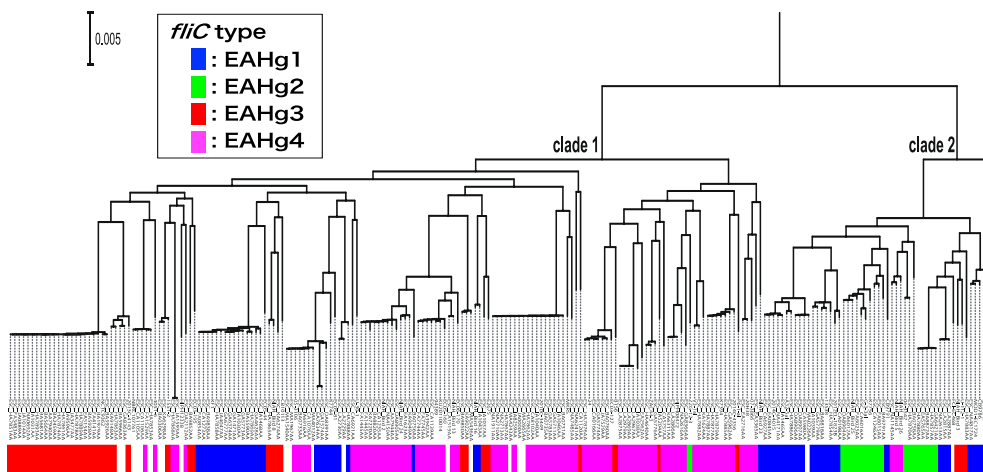


図 13 : *E. albertii* 進化系統における EAHg1-EAHg4 の分布

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

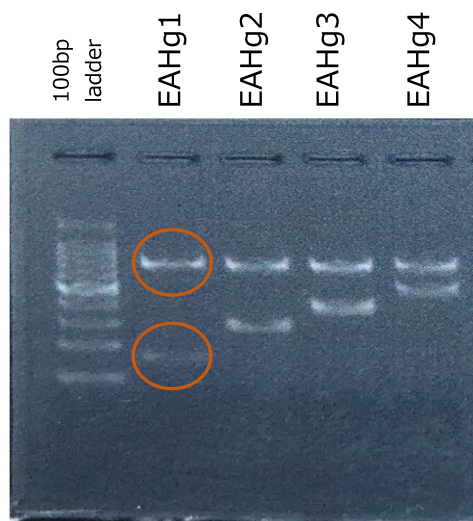


図 14 : EAH-genotyping PCR のプライマー情報

(a) および基準株で PCR を実施した際の泳動結果 (b)

平成 30～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。3年間の研究期間内に、アルコバクター属菌の検査法の作成、食肉、水耕栽培野菜、魚介類における汚染実態調査、カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の検出、*Arcobacter butzleri* の増殖挙動の解析を行った。汚染実態調査の結果から、鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌に汚染されていること、水耕栽培野菜や魚介類もアルコバクター属菌の感染源になりうることが明らかになった。増殖挙動の解析から、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

岩手県環境保健研究センター

上山昭、山中拓哉、太田美香子

高橋幸子、佐藤徳行

宇都宮市衛生環境試験所

床井由紀

さいたま市健康科学研究センター

土屋 彰彦

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子

東京都健康安全研究センター	小西典子
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美
静岡市環境保健研究所	高橋直人、望月瑞葉
三重県保健環境研究所	赤地重宏
奈良県保健研究センター	佐伯美由紀
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也
沖縄県衛生環境研究所	柿田徹也、高良武俊

#### 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。海外では、アルコバクター属菌は胃腸炎患者便からしばしば分離されており、また、アルコバクター属菌が原因物質と疑われている事例が発生している。このため、アルコバクター属菌と食中毒との関連性が従来から指摘されている。しかし、我が国ではアルコバクター属菌に対する検査は日常の食中毒検査項目に含まれてい

ないため、万が一、アルコバクター属菌による食中毒が発生しても、見逃されている可能性がある。また、アルコバクター属菌はカンピロバクター属菌と非常によく似た性状を持っている。カンピロバクター属菌を分離する際には 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、他の生化学性状も非常に類似している。このため、アルコバクター属菌がカンピロバクター属菌として誤同定されている例が海外で報告されている。以上のことから、アルコバクター属菌と食中毒との関連性については未だに結論が出ていない。

この研究では、アルコバクター属菌と食中毒との関連性を明らか



にし、さらに、アルコバクター属菌の制御法を提案するために、以下の項目を検討した。

1) 食品におけるアルコバクター属菌の汚染実態調査

2) カンピロバクター患者便からのアルコバクター属菌の検出

3) アルコバクター属菌の増殖挙動の解析

## B. 研究方法

[1] アルコバクター属菌の検査法の確立

*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR は Houf らの方法 (FEMS Microbiol. Letter, p.89-94, 2000) を改良して作製した。サンプルからの DNA 抽出はアルカリ熱抽出法で行った。

[2] アルコバクター属菌の最確数法の確立

アルコバクター属菌の最確数法を確立するために、アルコバクター属菌の発育に適した培地、および選択剤を検討した。

[3] アルコバクター属菌の汚染実態調査

確立したアルコバクター属菌の最確数法およびマルチプレックス PCR を用い、食肉 (鶏肉、豚肉、牛肉)、水耕栽培野菜、魚介類 (貝類、エビ類、イカ類) の汚染実態調査を

行った。食肉に関しては、カンピロバクター属菌に対する最確数法も同時に行い、汚染状況を比較した。

[4] *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、pH、塩濃度、水分活性などを調製した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。*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) を使用し作製した。

[5] カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

カンピロバクター食中毒もしくはカンピロバクターが原因菌として疑われる事例が発生した場合、研究協力機関において患者便からアルコバクター属菌の分離を行っていただいた。分離培地として CAT サプリメントを添加したアルコバクター基本寒天培地を用い、これに患者便を塗抹後、30℃、48 時間、好気培養を行った。また、フィルター法に

よる菌分離も行った。培養後、カンピロバクター様コロニーを 10 個選択し、アルカリ熱抽出法もしくは熱抽出法で DNA を抽出し、マルチプレックス PCR を行った。

### C. 研究結果

#### [1] アルコバクター属菌の検査法の確立

まず、他の研究に先立ち、アルコバクター属菌の検査方法を作製した。標準株から抽出した DNA をテンプレートとして使用し、今回作製したマルチプレックス PCR を行ったところ、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定することができた。次に本 PCR 法の感度を検討した。0.005% 5-フルオロウラシルを添加したアルコバクター基本培地 225 ml に *A. butzleri*、*A. cryaerophilus* が存在しないことがあらかじめわかっている鶏肉 25 g を加え、ストマッカー処理し、乳剤を作製した。この乳剤に既知の菌数の *A. butzleri* もしくは *A. cryaerophilus* 菌液を加え攪拌後、この乳剤から DNA を抽出し、本マルチプレックス PCR を行った。その結果、乳剤中に 100 から 200 cfu/ml の *Arcobacter* 属菌が存在すれば検出することができた。また、*C.*

*jejuni* および *C. coli* から抽出した DNA をテンプレートとして本 PCR を行っても陽性にならなかつた。

#### [2] アルコバクター属菌の最確数法の確率

最確数法を確立するために、まず、アルコバクター属菌の発育に適した培地と選択剤の検討を行った。その結果、アルコバクター基本培地 (Oxoido 社製) が *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の発育に適していることが明らかになった。選択剤としては 5-フルオロウラシル (最終濃度 0.005%) および CAT サプリメント (Oxoido 社製) が適していることが、明らかになった。これらの結果をもとに、増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシル添加アルコバクター基本培地、分離培地として CAT サプリメント添加アルコバクター基本寒天培地を用いた最確数法を作製した。試験は三本法で行い、培養液からの菌の検出はアルコバクター属菌に対するマルチプレックス PCR を用いた。

#### [3] アルコバクター属菌の汚染実態調査

鶏肉、豚肉、牛肉、各 20 検体ずつ調査し、アルコバクター属菌の汚染菌量を最確数法を用いて定量し

た。その結果、鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90%の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が  $10^2$  MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。また、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染は汚染率、汚染菌量ともにカンピロバクター属菌を上回っていた。

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。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。

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

[4] *A. butzleri* の増殖挙動の解析

*A. butzleri* は 4℃ や 10℃ のような低温でも生存できることが明らかになった。pH による影響では、アルカリ性域には耐性はないが、酸性域では長期間生残できることを明らかにした。また、海水の塩濃度に匹敵する高塩濃度下でも増殖が可能であることが明らかになった。水分活性に関しては、低水分活性条件では増殖できななかった。しかし、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ため、注意が必要であることが明らかになった。

[5] カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

204 検体の患者便の内、1 検体から *A. skirrowii* が検出された。

#### D. 考察

[1] 食中毒細菌としての可能性

アルコバクター属菌は食中毒細

菌としての可能性が指摘されている。その可能性を検証するために食品における汚染実態調査を行った。鶏肉における調査結果では *A. butzleri* の鶏肉における汚染率は100%、一方、*C. jejuni* は55%であった。汚染菌数も *A. butzleri* のほうが高かった。つまり、アルコバクター属菌は、食中毒細菌として確立されている *C. jejuni* よりも重度に鶏肉を汚染していることになる。もし、*A. butzleri* が *C. jejuni* に匹敵するような病原性を持っているとするならば、*A. butzleri* の検査が日常的に行われていないことを考慮しても、もう少し *A. butzleri* の事例が報告されても良いと思われる。また、水耕栽培野菜を調査した結果では、20 検体中 10 検体が *A. butzleri* 陽性であり、うち 5 検体で 11,000 MPN/100 g を超えていた。水耕栽培野菜は基本的に生食されることを考えると、これだけ *A. butzleri* に汚染されているにもかかわらず、水耕栽培野菜で原因物質不明の食中毒が発生しているという情報もない。これらのことから、アルコバクター属菌は、病原性を持っていたとしても、非常に弱いものではないかと思われた。しかしながら、海外ではアルコバクター属菌が関与していると考えられる

事例が発生していることから、条件が整えば病原性を発揮する、いわゆる日和見菌のような存在ではないかと考えられた。

[2]アルコバクター属菌に対する衛生管理における注意点

本研究結果から、*A. butzleri* は4℃、低 pH、高塩濃度条件下でも増殖もしくは生残できることが明らかになった。*A. butzleri* はカンピロバクター属菌と近縁であるため、VBNC 状態で長期間生残できることが、本研究結果から示唆された。以上のことからアルコバクター属菌は環境適応能力の高い細菌であると言える。また、アルコバクター属菌が汚染している食品として、鶏肉や水耕栽培野菜、イカ類、貝類、エビ類などの魚介類が挙げられる。特に水耕栽培野菜や魚介類は生食される頻度が高いため注意が必要であると思われる。

## E. 結論

本研究ではアルコバクター属菌による食中毒の可能性を検討した。結論として、アルコバクター属菌は病原性の弱い日和見菌的な存在ではないかと考えられた。しかし、アルコバクター属菌は他の細菌では死滅してしまうような環境でも、長期間生残できることから、衛生管理

には細心の注意を払う必要性が認められた。

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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y.	Major vehicles and O-serogroups in foodborne enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> outbreaks in Japan, and effective detection methods of the pathogen in food associated with an outbreak.	Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi)	59 (4)	161- 166	2018
Ohtsuka, K., Hoshino, K., Kadowaki, N., Ohsaka, M., Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y.	Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in vegetables.	LWT	114	10840 9	2019
Mori, T., Nagao, S., Kishino, K., Namba, T., Hara- Kudo, Y.	DNA extraction for sensitive detection of Shiga toxin- producing <i>Escherichia coli</i> in food by real- time PCR assays.	Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi)	60 (6)	183- 186	2019

Parvej, Md., Nakamura, H., Wang, L., Zhang, S., Emura, K., Kage-Nakadai, E., Wada, T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y.	Host range- associated clustering based on multi-locus variable-number tandem-repeat analysis, phylotypes, and virulence genes of atypical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains.	Applied and Environmental Microbiol ogy.	85 (6)	e0279 6-18	2019
T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi.	O-antigen biosynthesis gene clusters of <i>Escherichia</i> <i>albertii</i> : their diversity and similarity to <i>E.</i> <i>coli</i> gene clusters and the development of an O-genotyping method.	Microbial Genomics	5 (11)	e000314	2019
大岡唯祐	新興下痢症起因菌 <i>Escherichia</i> <i>albertii</i> の特徴.	食品衛生 研究	70	19-35	2020

<p>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.</p>	<p>Evaluating methods for detecting <i>Escherichia albertii</i> in chicken meat.</p>	<p>Journal of Food Protectio n</p>	<p>84 (4)</p>	<p>553- 562</p>	<p>2020</p>
<p>Ohnishi, T., Hara-Kudo, Y.</p>	<p>Presence and quantification of pathogenic <i>Arcobacter</i> and <i>Campylobacter</i> species in retail meats available in Japan.</p>	<p>Letters in Applied Microbiol ogy</p>			<p>in press</p>