

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、汚染が起こりやすい食品群を明らかにすること、*E. albertii*原因食品特定に対応する食品での検査法を確立すること、食中毒の基礎的情報でもある *E. albertii*の発症菌量を明らかにすることを目標に研究を行った。[1] *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/ μ 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^T) 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/ μ 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 ± 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 ± 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 ± 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 (=6.8×10³ cfu/mL) と 3.4 cfu/PCR tube (=6.8×10² 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 (=1.1×10³~1.5×10³ 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 (=1.1×10²~1.5×10³ cfu/mL)、NmEC の場合 0.5~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10²~1.5×10³ 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、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℃および 30℃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℃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