

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 1×10^6 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 μ 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 ± 2 時間培養し、吸光度 (OD₅₉₀) 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 10⁻⁵ 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 1×10⁶ 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 (OD₅₉₀) 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*i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*i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*i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*i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*i 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*i 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*i 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. morgani* 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. 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

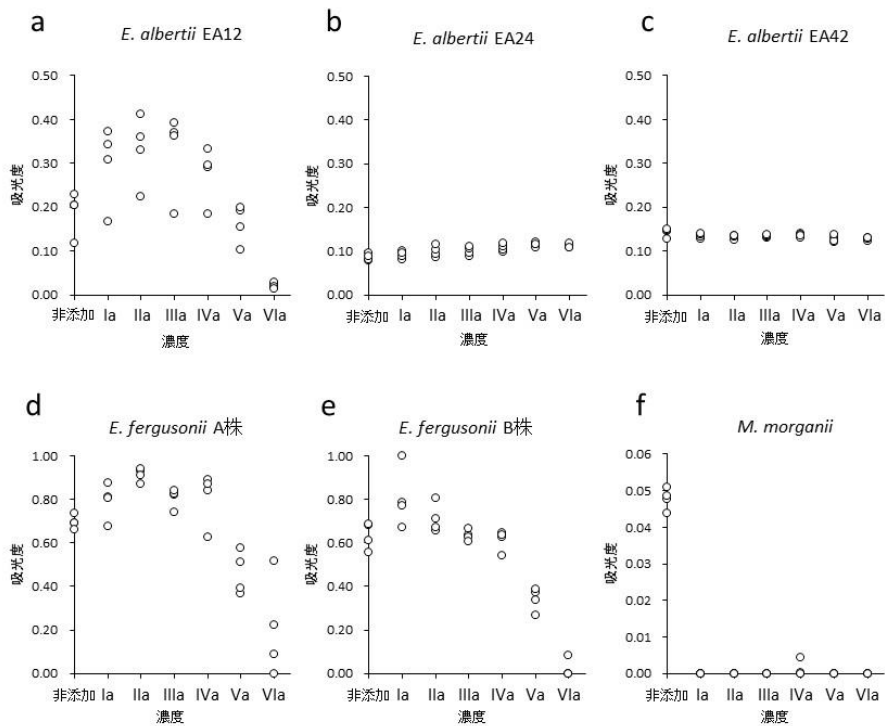


図1 薬剤A添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

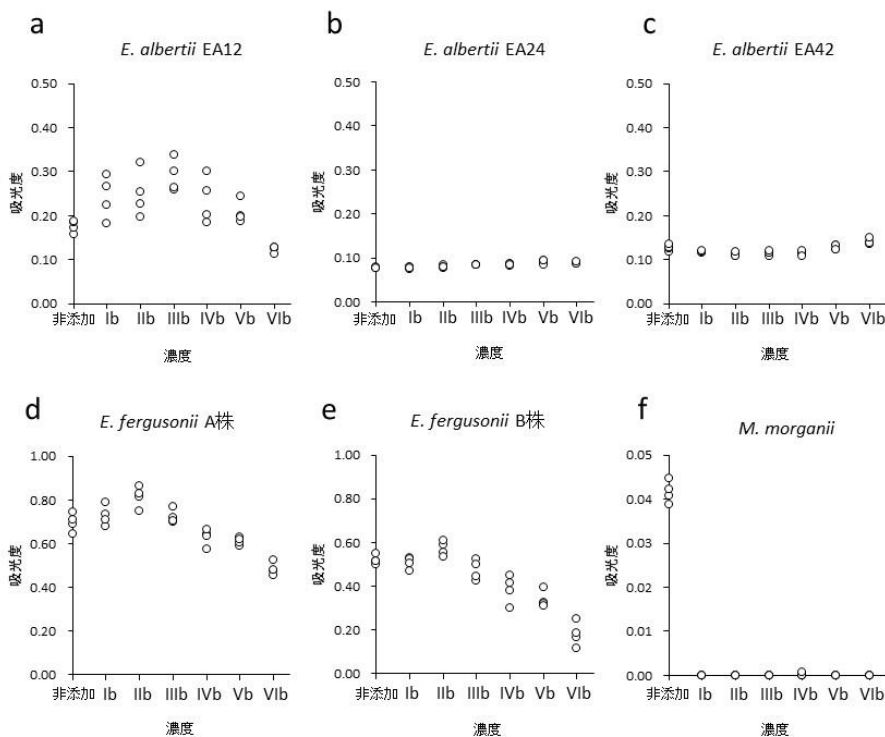


図2 薬剤B添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

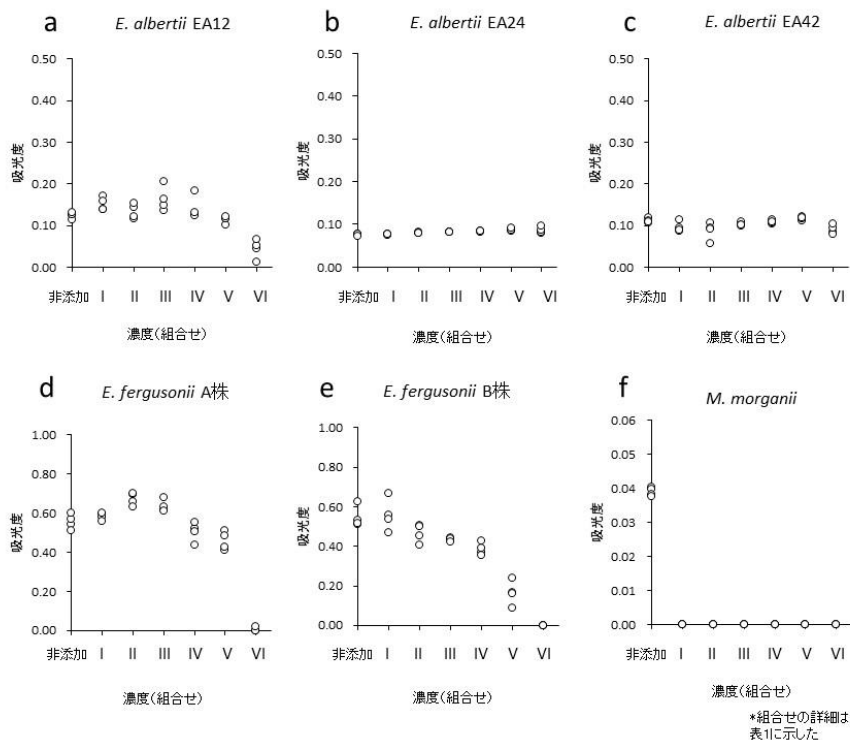


図3 薬剤AおよびB組合せ添加mECの*E. albertii*および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

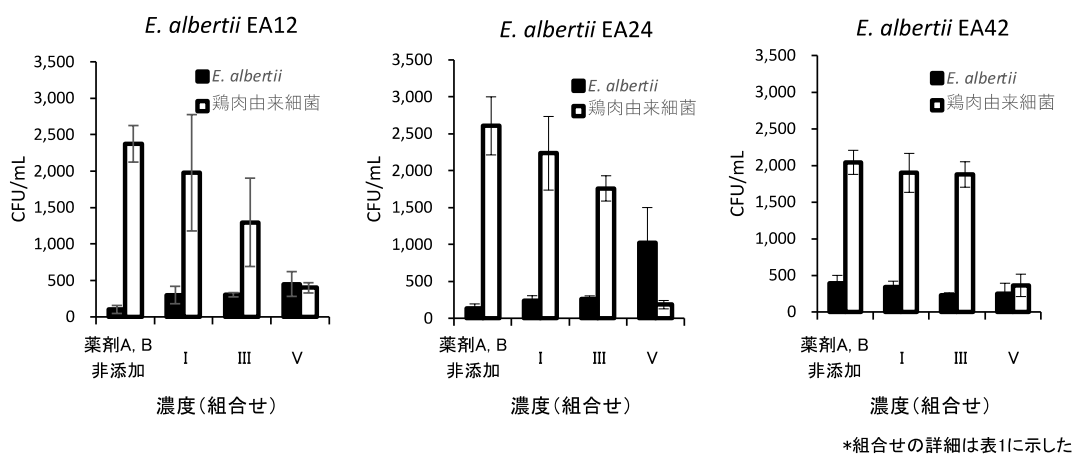


図4 mEC+AB 培地での鶏肉培養液中における*E. albertii*および鶏肉由来細菌の増殖抑制

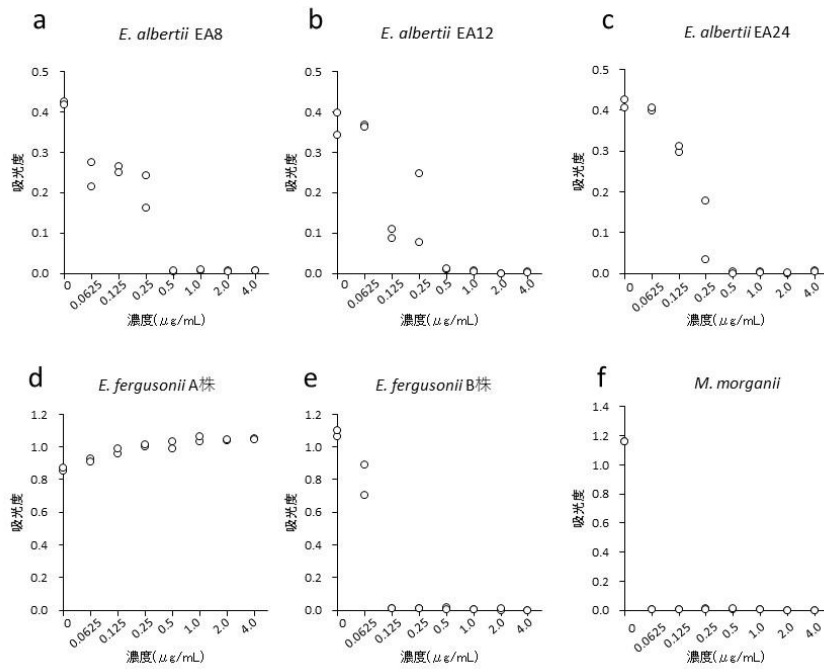


図5 薬剤C添加ミューラヒントンブロス培地の *E. albertii* および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制

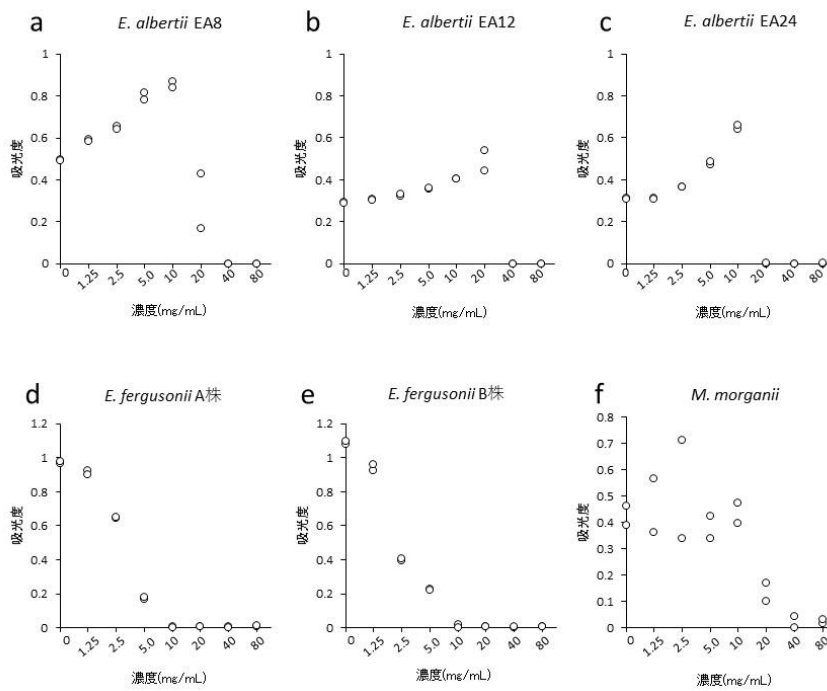
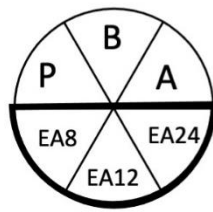
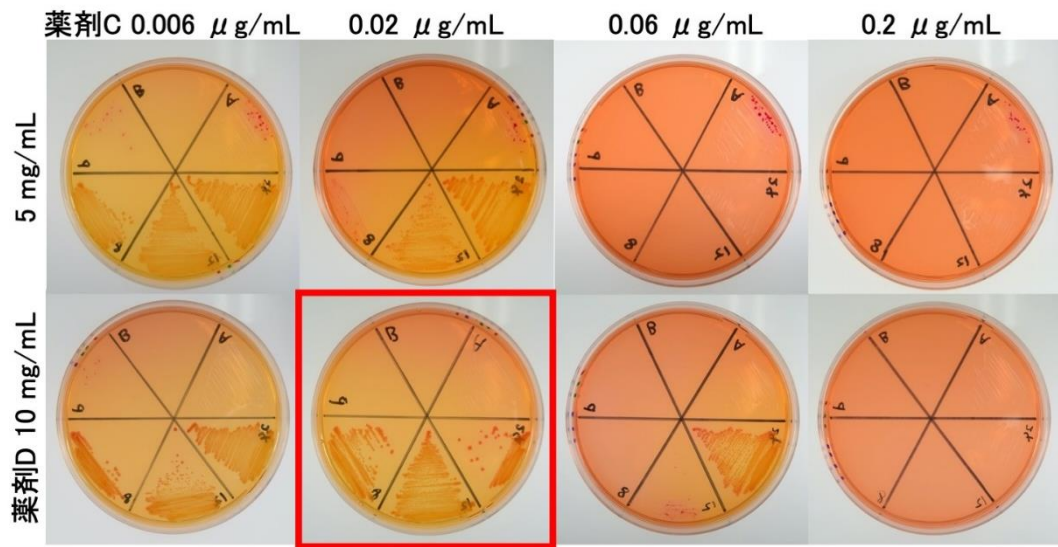


図6 薬剤D添加ミューラヒントンブロス培地の *E. albertii* および鶏肉由来細菌に対する増殖抑制



A: *E. fergusonii* A株
 B: *E. fergusonii* B株
 P: *M. morganii*
 EA8, EA12, EA24: *E. albertii*

図7 DHL 寒天培地への薬剂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