

令和 2 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究
研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

Escherichia albertii の制御法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

E. albertii 食中毒事例での原因食品の解析

研究要旨

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

研究協力者

天津市保健所

安田敬子、小椋容子

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

1) 検体

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

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

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

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

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

2) 試験方法

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

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

イム PCR にて *E. albertii* であるか確認した。

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

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

C. 研究結果

1) 検体から *E. albertii* の検出・分離

第 1 回送付検体である No. 263, 264 検

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

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

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

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

2) 分離株の型別

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（誌上発表）

令和 3 年度に発表予定

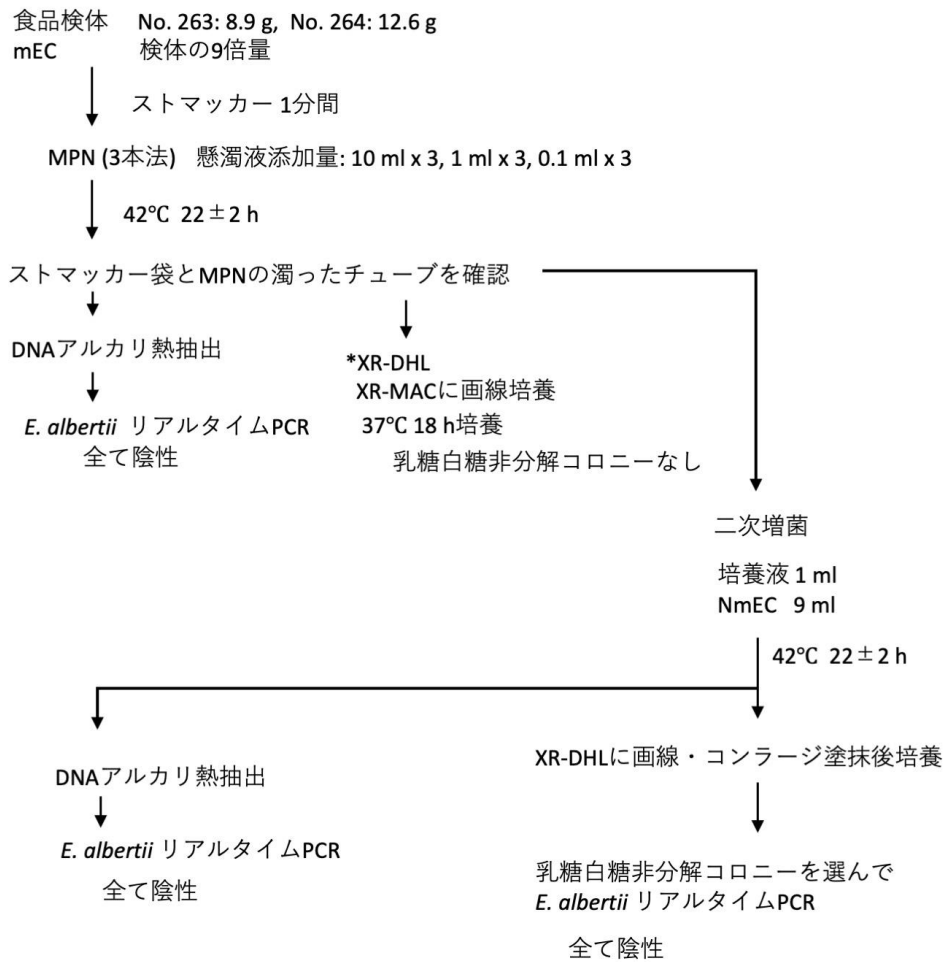
（学会等発表）

令和 3 年度に発表予定

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

冷凍の食品検体: No. 263, 264 2検体



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

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

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

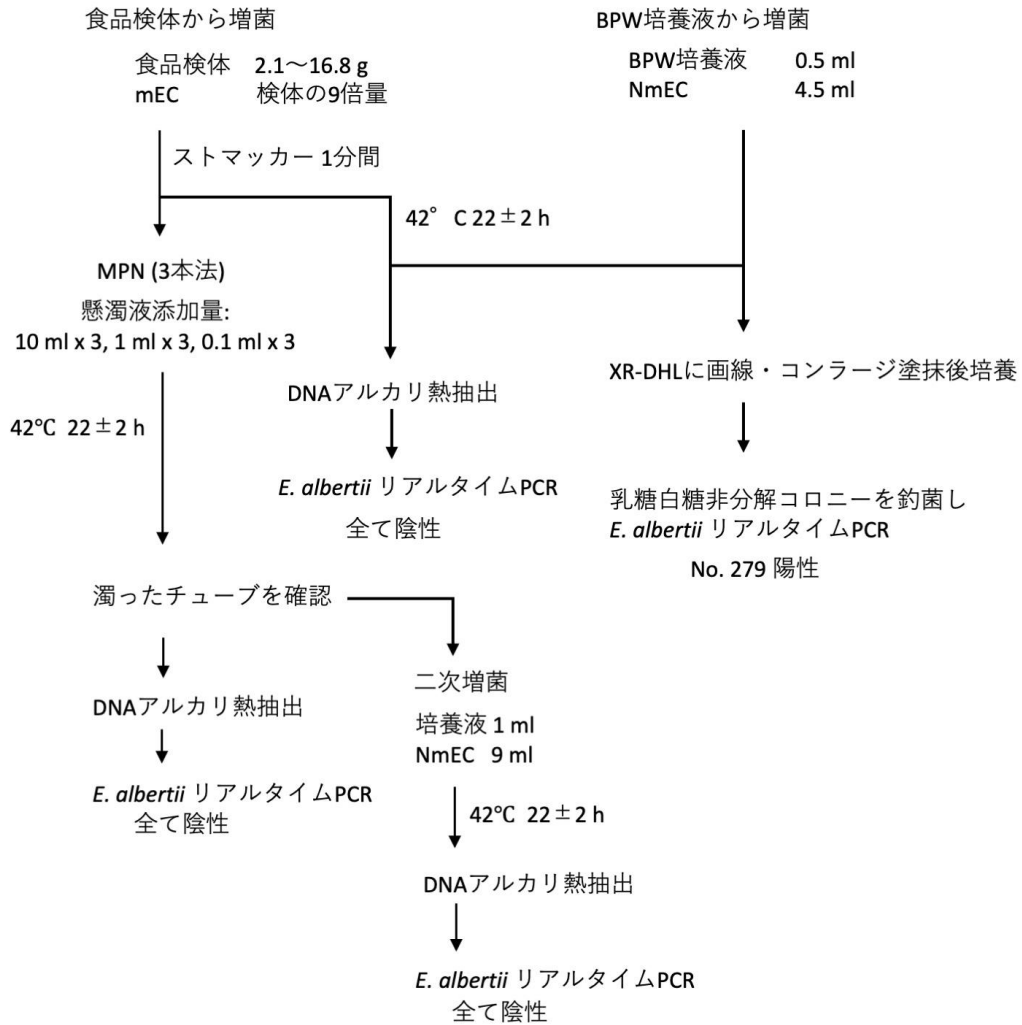


図2 大津市における*E. albertii*食中毒原因食品の検査；第2回送付検体

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

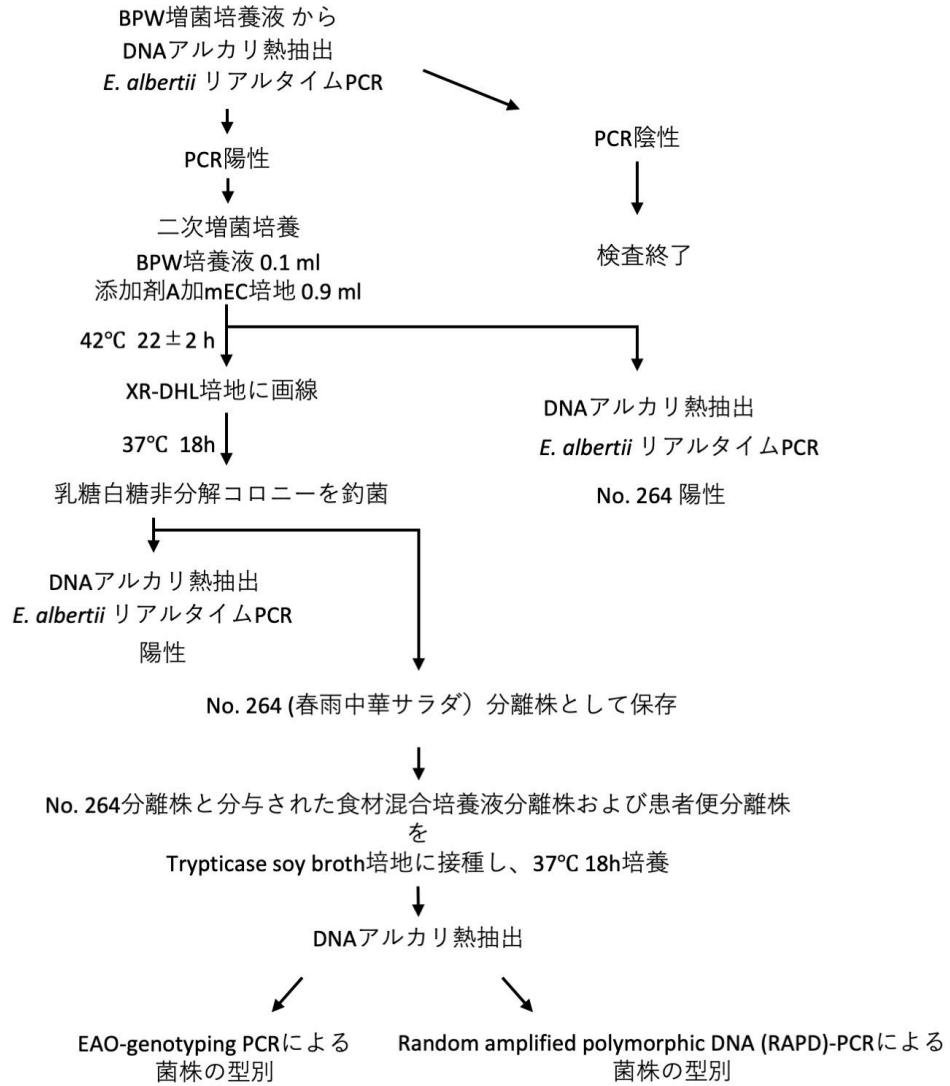


図3 大津市における*E. albertii*食中毒原因食品の検査；第3回送付検体

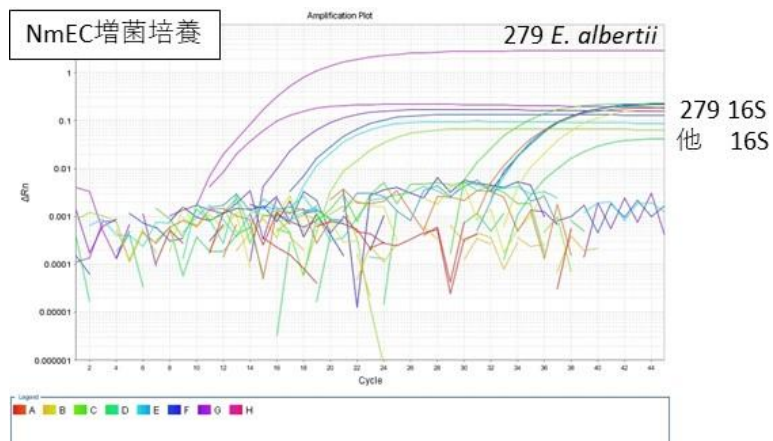
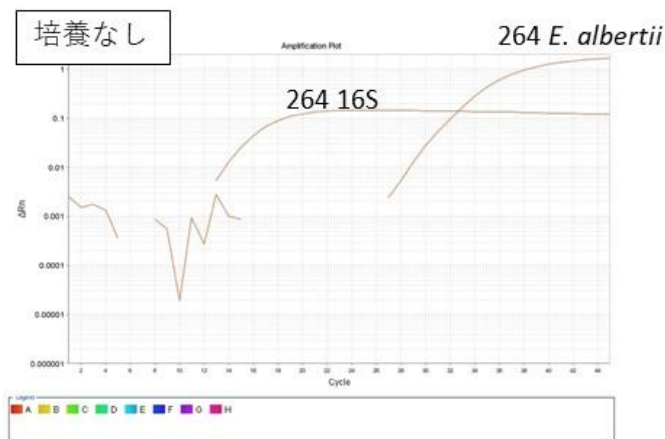


図 4 第 2 回送付検体 BPW 増菌培養液のリアルタイム PCR

A



B

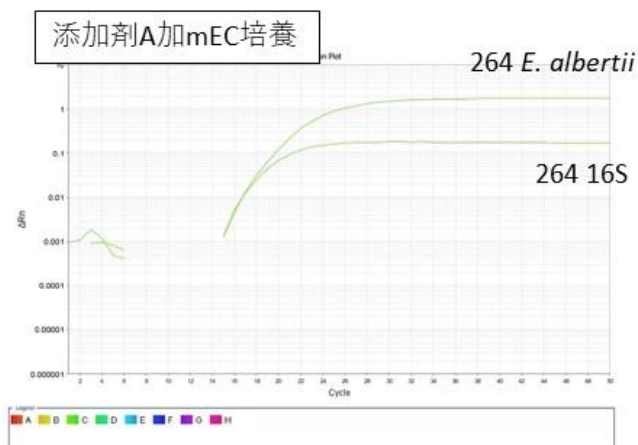


図 5 第 3 回送付検体 BPW 増菌培養液のリアルタイム PCR

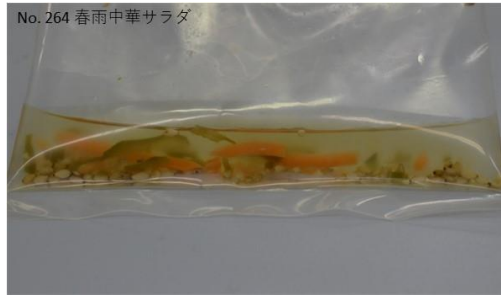
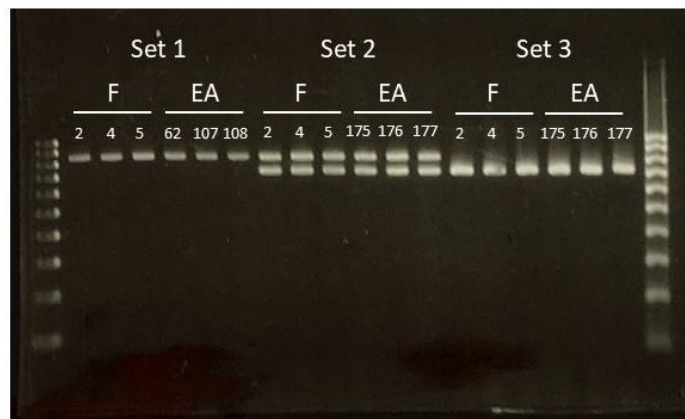
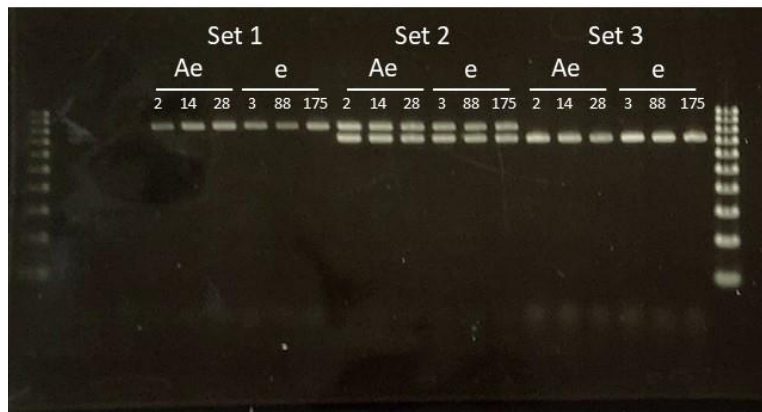


図 6 検体 No. 264 春雨中華サラダの mEC 培養

EAO-genotyping

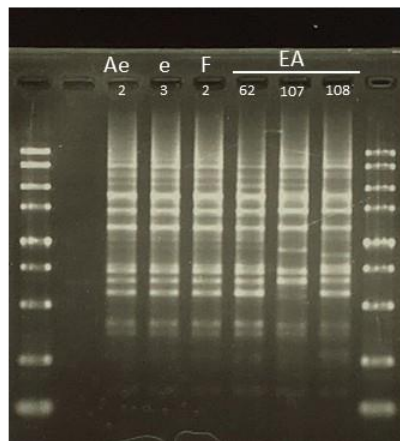
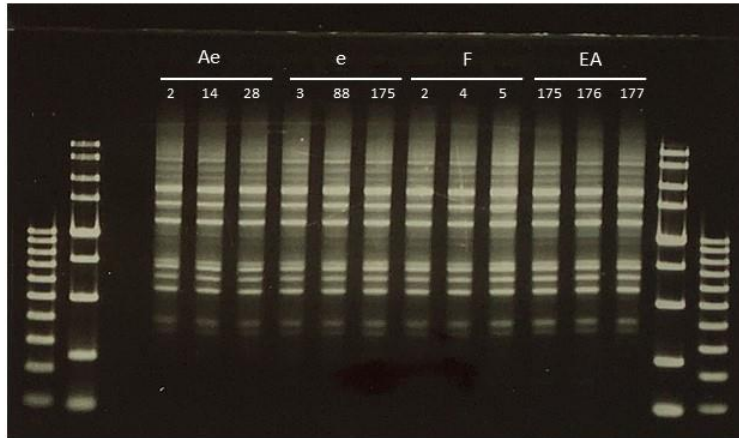


Ae: 大津保健所分離株 (B施設患者便)、e: 大津保健所分離株 (滋賀刑務所患者便)
 F: 大津保健所分離株 (検体No. 279)、EA: 国衛研分離株 (検体No. 264)

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

図 7 分離株の型別 (EAO-genotyping)

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



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

図 8 分離株の型別 (RAPD-PCR)