

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

Escherichia albertii の制御法の確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

研究要旨

日本では、*Escherichia albertii*による食中毒の発生が多数報告されている。このため、食肉など食品での汚染実態の解明を行い、汚染が起こりやすい食品群を明らかにすることを目標に研究を行った。その結果、食品から *E. albertii* が分離された。そのため、他の食品および環境についても今後の調査を注視する必要があると考えられた。また、過去に分離された *E. albertii* の O 抗原型を PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。その結果、国内分離株は様々な O 抗原型に型別され、一部の集団食中毒事例では、複数の O 抗原型が混在していた。そのため、1 検体または 1 事例から複数の株が分離された際には、本 EA0-genotyping などの遺伝子型別法を利用して、分離株の相同性について考察することが重要と考えられた。

研究協力者

東京都健康安全研究センター	小西典子、尾畑浩魁
岩手県環境保健研究センター	山中拓哉、太田美香子
秋田県健康環境センター	今野貴之
宮城県保健環境センター	山谷聡子、高橋陽子
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
富山県衛生研究所	磯部順子、木全恵子
静岡県環境衛生科学研究所	長岡宏美、大越 魁
奈良県保健研究センター	吉田孝子、森村実加、松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	浅野由紀子
福岡市保健環境研究所	松永典久

熊本県保健環境科学研究所	前田莉花
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司、内山浩子、福留智子
沖縄県衛生環境研究所	柿田徹也、大山み乃り、久手堅 剛
仙台市衛生研究所	山田香織
さいたま市健康科学研究センター	土屋彰彦、曾根美紀、加藤直樹
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
鹿児島大学	大岡唯祐
国立医薬品食品衛生研究所	廣瀬昌平、新井沙倉

A. 研究目的

近年、国内外で *Escherichia albertii* の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されているが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている（大岡，日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。また、本菌の主要な汚染食品や汚染環境は不明であり、解明が求められている。食中毒の原因食品には、複合調理食品の他に井戸水も推定されている。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなどの家畜および家禽（Wang et al., *Epidemiol. Infect.*, 2016, 144 45-52）や、野鳥、アシカ（Grillová et al., *J. Vet. Med. Sci.*, 2018, 80 138-146）、アライグマ（Hinenoya et al., *Emerg Infect Dis.*, 2020, 26 1304-1307）などの野生動物の保菌が報告されており、動物からの水の汚染が考えられる。また、河川水を含む日本の環境水からも *E. albertii* が分離されたため（Takahashi

et al., *Jpn. J. Food Microbiol.*, 2020, 37 81-86）、環境から食品が汚染される可能性も危惧される。これらの背景から、食肉など食品での汚染実態の解明を行い、汚染が起こりやすい食品群を明らかにする必要がある。

これらの課題について研究を進めることによって食中毒の予防対策の提案を行うことが可能になると考え、本研究を実施する。平成 30（2018）年度および令和元（2019）年度には、食品（主に食肉）等での汚染実態調査を行った。その結果を踏まえながら、令和 2（2020）年度は、昨年度に引き続き、これまでの試験結果を反映した暫定的な検査法を決めて、食品・環境検体等を対象に *E. albertii* を検出する食品等における汚染実態調査を行うこととした。さらに、これまでに分離されたヒト由来、食品由来、および環境由来株について、0 抗原型を決定（EAO-genotyping）（Ooka et al., *Microb. Genom.*, 2019, 5:e000314）した。

B. 研究方法

(1) 汚染実態調査

地方自治体の協力機関と協力し、食肉を含んだ食品検体 709 検体と環境（施設の拭き取り）検体 60 検体の計 769 検体を収集、試験した（表 1）。また、計 570 検体のヒト便検体を試験した（表 2）。食品検体および環境検体は、BPW または mEC 等で増菌し、その培養液を通常の試験法で使用する培地（マッコンキー寒天培地、DHL 等）で培養し、乳糖非分解の菌株を *E. albertii* であるか確認した。非選択培地（普通寒天、TSA 等）に単離し、ここから TSI および LIM に接種し、ブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性の性状を示す株を選択した。それらの株を 1%キシロース添加アンドレイドペプトン水（オキシイド）に接種し、キシロース非分解の株を nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。なお、一部の自治体では、増菌培養液の遺伝子スクリーニング（PCR）を行い、結果が陰性であった場合は、試験を中止した。

便検体については、上記の分離培地に直接塗抹して、以降の試験を実施した。

(2) 分離株の EA0-genotyping

1) 菌株

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

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

2) DNA 溶液の調製

E. albertii 株は、カジトン培地に保存している菌株 1 エーゼ分（10 μ L）を TSB 10 mL に接種し、37°C にて 18 時間培養した。菌培養液を以下の方法でアルカリ熱抽出法に供試した。菌培養液 100 μ L を 10,000 \times g にて 10 分間遠心し、沈渣に 50mM NaOH を 85 μ L 加え混和後、100°C にて 10 分間加熱した。冷却後、1M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ L 加え、10,000 \times g にて 10 分間遠心し、その上清を DNA 溶液として保存した。

3) EA0-genotyping

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

C. 研究結果

(1) 汚染実態調査

1) 食品・環境検体での汚染実態調査

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

2) ヒト由来株での調査

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

(2) 分離株の EA0-genotyping

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

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

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

食品由来株では、9 株中 2 株が EA0g3 お

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

D. 考察

(1) 汚染実態調査

市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されている食品も存在することが判明した。今後、分離株の病原性解析などにより、ヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。今年度の環境検体からは *E. albertii* の汚染が検出されなかったものの、過去の報告では、国内の動物の糞便や河川水からの分離報告がある。そのため、動物や環境を介して食品が汚染される可能性も考慮する必要がある。今後も *E. albertii* の汚染実態に関する研究を注視し、食品への影響を考察する必要があると考えられる。

ヒト由来株での調査では、今年度は *E. albertii* は分離されなかった。本菌は、従来、*Hafnia alvei*、ボイド赤痢菌血清型 13、あるいは大腸菌として同定されていた菌株から構成されているため、同定が難しい。そのため、自治体等検査機関で乳糖非分解かつ非運動性の腸内細菌が得られた際には本菌を疑う必要がある。

(2) 分離株の EA0-genotyping

集団食中毒事例由来株に関しては、特定の 0 抗原型への偏りが確認されなかつ

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

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

(学会等発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

表1. 供試食品・環境検体

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

表2. 供試便検体

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

表3. EAO-genotyping供試株

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

表4. EAO-genotypingのプライマー

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

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

表5. 集団食中毒事例由来株のEAOg型

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

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

表6. 下痢症および無症状保菌者由来株のEAO_g型

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

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

表7. 動物由来株のEAO_g型

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

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

表8. 食品および環境由来株のEAO_g型

分離年	機関	由来	EAO _g 型
2018	l	食品A	UT*
2019	k	食品A	UT
		食品A	UT
		食品A	EAO _g 40
	l	食品A	UT
		食品A	UT
	c	食品A	UT
		食品B	UT
	m	環境A	EAO _g 40
		環境A	EAO _g 23
	n	食品C	EAO _g 3

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