

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

### 総括研究報告書

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 *Arcobacter* 属菌を対象にして実施した。分担研究（1）*E. albertii* の制御法の確立では、① *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR は検出性に優れることが判明した。② modified EC 培地に薬剤 A および B を添加、DHL 寒天培地に薬剤 C および D を添加した選択培地を開発した。③ 食中毒事例での調査において②で示した培地を使用し原因食品を明らかにした。④ 食品検体 709 検体中 1 検体で *E. albertii* が分離され、食品汚染の可能性が示された。⑤ *E. albertii* は食品中で中温で増殖し、低温で増殖が抑制されること、環境水中では低温で生残し、中温では死滅しやすいことが判明した。環境から農作物、家畜等への汚染が起こることが推察された。また、（2）*E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、① 病原性に関わると考えられる遺伝子について、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。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を同定した。③ 鞭毛抗原（H 抗原）は 4 種類の H 抗原遺伝子型しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。④ EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。（3）*Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、① 汚染実態調査によって水耕栽培野菜と魚介類はアルコバクターによる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
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

新たな食中毒細菌（流行株などを含む）が流行し、定着する場合があるが、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。

まず、*E. albertii* についてであるが、本菌は、腸管病原性大腸菌 (EPEC) や腸管出血性大腸菌 (EHEC) と類似した病原因子を保有するが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、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、さらなる研究が求められている。また、本菌の発症菌量や主要な汚染食品は不明であり、解明が求められている。食中毒の原因食品として、複合調理食品の他に井戸水もあり、動物からの水の汚染が考えられる。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜の保菌が報告されている (Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016)。これらのことから、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。加えて、それら食品群での *E. albertii* の挙動を確認する必要がある。しかし、それらに必要な食品の検査法は知られていない。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* 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い。このため、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、本研究を実施する。令和元年 (2019) 年度には、工藤は、令和元年の研究成果を発展させて、令和2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。

また、大岡は、より効果的な食中毒調査および予防対策の実現に必要な遺伝子検査法の開発につながることを期待し、本菌の感染性や病原機構を理解することによって、より効果的に検出できる指標遺伝子配列を見いだす研究を実施することとし、令和2年度の成果を発展させて、[1] 病原関連候補遺伝子の発現条件検討、[2] *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、[3] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布、[4] TccP バリエント (TccP4) の機能解析、[5] *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析、[6] EAH-genotyping PCR の

開発および実用性の検討、を実施した。

次に、*A. butzleri*についてであるが、本菌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。このような性質に加え、他の生化学性状や培養条件も *Campylobacter* 属菌と類似しており、特に *C. coli* とは生化学性状的には区別することができない。このようなことから *Arcobacter* 属菌が *Campylobacter* 属菌として誤同定され、*Campylobacter* の事例として処理されている可能性が示唆されている。このことは、*Arcobacter* 属菌が食中毒の原因菌であるかどうかについての結論が出ていない原因の一つとして考えられる。また、もう一つの理由として、*Arcobacter* 属菌に対する検査は通常の検査項目に入っていないため、*Arcobacter* 属菌が関与している事例が発生しても見逃される可能性が高いことが挙げられる。本研究では、*Arcobacter* 属菌の食中毒への関与について検討する。令和2年度には、大西は、令和元年度の結果を踏まえ、[1] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査、[2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析、を行った。

## B. 研究方法

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] *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* 特異的リアルタイム PCR (EA\_rt2) について、*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 2 種類標識 (FAM/ZEN/3IABkFQ および FAM/BHQ1) プローブを用いた特異性試験を実施した。また、リアルタイム PCR の感度を鶏肉培養液中に約  $10^9 \sim 10^2$  cfu/mL となるように *E. albertii* を加えた菌接種鶏肉培養液にて検討した。次に、*E. albertii* を鶏肉に約  $10^3 \sim 10^{-1}$  cfu/25 g となるように接種し、mEC および NmEC 中にて培養後、リアルタイム PCR を実施した。さらに、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) を開発することを考え、各薬剤の至適濃度を検討した。また、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) を開発することを考え、各薬剤の至適濃度を検討した。菌株には *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) を供試した。

[3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

食中毒事例での冷凍保管検食、それら食品の混合培養液 (冷蔵) および個別培養

液（冷蔵）を大津市保健所から受け取り、選択剤 A を添加した mEC (A-mEC) 培地等での増菌培養、当所で開発した *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR、*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) 培地等での分離培養を行った。大津保健所での食品混合培養液からの分離株および患者検体からの分離株、当所での分離株について、0 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。

#### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

地方自治体と協力し、食肉等の食品検体 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、ヒト便検体 570 検体を試験した。食品検体および環境検体は、BPW や mEC 等で増菌し、DHL 等で分離した乳糖非分解の菌株のうち、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。分離株の 0 抗原型を大岡らの方法に従い PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。

#### [5] *E. albertii* の食品・環境中での挙動

*E. albertii* を国産トリ肉、国産ブタ肉、イワガキおよびマガキ（各 25 g）に接種

し、4℃、10℃、20℃および 30℃で保管した。菌接種後 6 時間から 3 日間まで経時的に *E. albertii* および生菌数を算出した。*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、井戸水および海水を採水し、*E. albertii* を接種した後に 4℃、10℃、20℃および 30℃で保管し、菌接種後 9 日間、食品検体と同様に菌数およびリアルタイム PCR による菌数の定量分析を行った。

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

##### [1] 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℃, 20℃) 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、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。

##### [2] *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

インチミンをコードする *eae* 遺伝子の多様性解析については、当該遺伝子の上下流に存在する *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、遺伝子アノテーションを行

った。また、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 解析を実施し、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 に関しては既知の 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ントタイピングを行った。

[3] *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布

*cae* 遺伝子のサブタイプ, *tir* 遺伝子および *tccP* 遺伝子のバリエント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。

[4] TccP バリエント (TccP4) の機能解析

新規 TccP バリエントをコードする *tccP4* 遺伝子を、昨年度採用して良好な結果を得た改良 Wanner 法により遺伝子破壊し *tccP* 遺伝子バリエント (*tccP4* 遺伝子) の遺伝子破壊株を作製した。これを 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、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。0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS 溶液で 20 分間膜処理し、DAPI (0.2µg/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。

[5] *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。*fliC* 遺伝子の上下流に位置する *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。

[6] EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

同定した *E. albertii* の各 *fliC* 遺伝子型の多様性を利用し、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* を特異的に検出可能なプライマーペアを加え、*E. albertii* の同定も同時に行うことが可能な検出系とした。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。

(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

[1] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

魚介類および水耕栽培野菜を供試し、最確数法によるアルコバクター属菌の計数を平成 31 年度に確立した方法で行った。増菌培地として 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を用い、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た。最確数法は 3 本法で行い、試験管 1 本あたり 10 倍乳剤 10 ml、100 倍乳剤 1 ml および 0.1 ml に増菌培地を加えて最終 10 ml にした。各濃度につき試験管 3 本ずつ用意した。30°C、48 時間、好気培養後、各試験官から培養液を 0.1 ml 取り、平成 31 年度に確立した *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出するマルチプレックス PCR を行い、アルコバクター属菌の検出を行った。陽性となった試験管数をもとに *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* それぞれの最確数を算出した。さらに、マルチプレックス PCR で陽性になった試験管の培養液を 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に塗抹し、30°C、48 時間、培養した。単離した集落をマルチプレックス PCR で試験し、PCR が陽性の場合、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、馬尿

酸の加水分解試験、グラム染色を行い、最終的に菌種を同定した。この検査法の検出下限値は 30 MPN/100 g、検出上限値は 11,000 MPN/100 g である。

[2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析

培養温度の検討では、*A. butzleri* をアルコバクター基本培地に接種し-20°C、4°C、10°C、25°C で培養した。塩濃度の検討では、1、2、3、4、5%NaCl を加えたアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。なお、アルコバクター基本培地には最初から 0.5%の NaCl が含まれている。pH の検討では、pH を 3.0、3.5、4.5、5.5、6.5、7.0、8.0、9.0 に調節したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。アルコバクター基本培地は製品に添付の使用方法に従って作成した場合、pH6.5 になった。水分活性の検討では、ショ糖を加え Aw 0.99 (ショ糖非添加)、0.96、0.90 に調整したアルコバクター基本培地に *A. butzleri* を接種し、25°C で培養した。なお、いずれの実験においても約 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。生菌特異的 PCR は、*A. butzleri* に対する定量 RT-PCR を Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (Takara Bio 社製) と組み合わせて実施した。この生菌特異的 PCR は、10<sup>6</sup> cfu/ml の加熱死菌のバックグラウンドが存在する条件で、10<sup>1</sup> から 10<sup>8</sup> cfu/ml の生菌に対

して定量性が認められることが事前に確認された。

## C. 研究結果

### (1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

#### [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、供試した *E. albertii* 全株が陽性となりその他細菌種では全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液での検出限界は、両標識プローブで  $0.3 \sim 3.4$  cfu/PCR tube ( $=6.8 \times 10^1 \sim 6.8 \times 10^2$  cfu/mL) 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。食品培養液での検出限界は、両標識プローブで mEC および NmEC 共に  $0.5 \sim 7.5$  cfu/PCR tube ( $=1.1 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$  cfu/mL) であった。菌接種鶏肉検体では、両標識プローブで *E. albertii* 接種が  $1.2 \sim 1.4$  cfu/25 g 以上で遺伝子が検出された。汚染実態調査では、市販鶏肉 20 検体のうち、nested PCR で 1 検体、リアルタイム PCR でその他 1 検体計 2 検体が陽性であった。養鶏場から直接購入した各種臓器等合計 234 検体のうち、nested PCR で 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 培地で *E. albertii* の増殖は抑制されず、鶏肉由来細菌 20 株中 3 株

(15%) で増殖が認められたものの最も強く鶏肉由来細菌の増殖を抑制した。選択分離培地の薬剤濃度の検討では、薬剤 C  $0.02$   $\mu\text{g/mL}$  および薬剤 D  $10$   $\text{mg/mL}$  濃度の DHL+CD 寒天培地で、*E. albertii* のコロニーを比較的選択的に発育させたが、*E. albertii* 菌株の 15 株 (7.7%) が発育抑制、8 株 (4.1%) で非発育であり、鶏肉由来菌株の 11 株 (55%) が発育良好であった。

#### [3] *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

受け入れた検体のうち、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、*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、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 709 検体のうち 1 検体から *E. albertii* 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、食中毒事例由来では、EA0g1、EA0g2、EA0g5、EA0g8、EA0g9、EA0g11、EA0g12、EA0g18、EA0g25 のいずれかに型別された。下痢症および無症状保菌者由来株では、EA0g2、EA0g3、EA0g4、EA0g8、EA0g9、EA0g28 および EA0g3/29 が検出された。動物、食品および環境由来株では、EA0g3、EA0g4、EA0g7、EA0g8、EA0g16、EA0g23、EA0g25、EA0g40 が検出された。しかし、各由来において型別不能であった株も多数あった。

#### [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°C あるいは 30°C で保管した結果、すべての検体で菌数が増加した。一方で、4°C および 10°C 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°C あるいは 30°C で保管した結果、すべての検体で菌数が減少した。20°C よりも 30°C 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°C および 10°C 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。

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

[1] 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。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。

[2] *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、224 株が既知のインチミンサブタイプ 20 種類のいずれかを保有していた。残り 19 株中 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) であった。

Tir: 243 株のうち 241 株が *tir* 遺伝子陽性であり、バリエーションが 5 タイプ (V1-V5) に分かれ、それぞれ 51 株, 21 株, 47 株, 10 株, 112 株であった。また、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 : 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 株のうち TccP1-TccP4 をそれぞれ、119 株, 63 株, 7 株, 133 株が保有し、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。

[3] *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 2)。

[4] TccP バリエーション (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 バリエーション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) 株を用いて、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。

[5] *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* 遺伝子が同定され、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子は大腸菌のものとは異なっており、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。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* 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。

[6] EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

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、*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。国内ヒト臨床分離株およびトリ由来株で実施した結果、全株の EAO 型が同定され、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。

### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

#### [1] *Arcobacter* 属菌の 野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

カイワレ、レタス類、ブロッコリスプラウト、その他のスプラウトの計 20 検体中 10 検体から *A. butzleri* が検出された(陽性率 50%)。この 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での陽性率が高く、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。*A. cryaerophilus* および *A. skirrowii* は検出されなかった。

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

#### [2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖

#### 挙動の解析

培養温度については、*A. butzleri* の培養に用いられる 25°C では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。10°C では、25°C と比べて増殖速度が緩やかになり、7 日目に約  $10^6$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR もほぼ同様の増殖傾向を示した。4°C では、菌数は緩やかに減少し、培養 7 日目に検出限界以下となったが、生菌特異的 PCR では菌量の減少は認められず、接種菌量が 7 日間維持された。顕微鏡観察を行ったところ、ラセン桿菌である *A. butzleri* が球状化していた。-20°C では、菌数は培養 1 日目に検出限界以下となったが、生菌特異的 PCR では 3 日目まで接種菌量が維持され、その後、検出限界以下になった。

塩濃度については、一般的な培養条件である 0.5% では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。1.0%、2.0% でも 0.5% と同様の傾向であった。3.0% では 0.5% と比べ増殖速度の低下が認められ、培養 7 日目に約  $10^7$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。

4.0% では、培養 1 日目に菌数は検出限界以下になったが、生菌特異的 PCR の結果では培養 1 日目から緩やかに減少が始まり、培養 4 日目までは生菌が確認された。その後、培養 7 日目に検出限界以下となった。

pHについては、一般的な培養条件である pH 6.5 では、培養 4 日目に  $10^8$  cfu/ml に達し、平衡状態になった。生菌特異的 PCR でも同様の増殖傾向が認められた。pH3.0~4.5 では、培養 1 日目に菌数は検出限界以下に低下した。しかし、生菌特異的 PCR では大きな菌量の低下は認められず、7 日間、接種菌量をほぼ維持した。pH5.5 では、培養 1 日目から菌数の低下が始まり、培養 4 日目で検出限界以下となった。生菌特異的 PCR では、培養 2 日目から菌量の低下が始まり、培養 7 日目に検出限界以下となった。pH7.0、pH8.0 では、pH6.5 とほぼ同様の傾向が認められ、pH の影響は認められなかった。pH9.0 では、培養 1 日目で菌数は検出限界以下となった。生菌特異的 PCR による菌量も同様に、培養 1 日目で検出限界以下になった。

水分活性については、一般的な培養条件である  $A_w$  0.99 では、培養 4 日目で約  $10^8$  cfu/ml に達した。生菌特異的 PCR も同様の傾向を示した。

$A_w$  0.96 では、培養 2 日目に菌数が検出限界以下になり、生菌特異的 PCR では培養 2 日目から緩やかに減少し、7 日目で、接種菌量から約 1 オーダーの減少が認められた。 $A_w$  0.90 では、培養 1 日目で菌数は検出限界以下となり、生菌特異的 PCR は培養 2 日目から緩やかに減少し、7 日目で、接種菌量から約 1 オーダーの減少が認められた。

#### D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

[1] *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 開発の検討

開発したリアルタイム PCR は高い特異性を示した。また、感度測定では、検出限界が約  $10^3$  cfu/mL 以下となり、感度に優れており、食品培養液でも感度が影響されず、優れることが明らかになった。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* 汚染であれば、*E. albertii* 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。*E. albertii* 汚染鶏検体では、nested PCR 陽性検体が全てリアルタイム PCR 陽性となり、さらに、17 検体はリアルタイム PCR でのみ陽性であったため、nested PCR よりも検出に優れることが示された。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

結果から薬剤 A 濃度  $V_a$  および薬剤 B 濃度  $V_b$  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  $\mu$ g/mL および薬剤 D 10 mg/mL 濃度の DHL+CD 寒天培地では、*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する

ことが示された。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 寒天培地に併用してこれまで用いられているキシロース・ラムノース添加 DHL 寒天培地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、春雨中華サラダの培養液を 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 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。

### [4] 食品等における *E. albertii* 汚染実態調査

市販食品の汚染率は極めて低いものの

*E. albertii* の汚染があるものも確認された。今後、分離株の病原性解析などヒトへの感染性を評価することが重要と考えられる。環境検体からは *E. albertii* が検出されなかったが、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も考慮する必要がある。0 抗原型別では、集団食中毒事例由来株に特定の 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。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。食品の汚染源を探る手法として、本 EA0-genotyping 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

本研究では汚染が報告されている、または可能性がある食品や環境水を検体として選定し、*E. albertii* の挙動を中温および低温にて解析した。食品検体での結果から、*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、低温では増殖を防げることが判明した。また、環境水検体での結果から、*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。

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

昨年度は、*E. albertii* に特異的な病原関連遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、宿主細胞への付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定した。今年度はその遺伝子に関する発現解析をすすめ、発現が上がる条件を明らかにした。今後、病原機構の詳細を明らかにするため、ペプチド抗体を用いて機能阻害実験とタンパク質局在についての解析を進める。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。

EHEC, EPEC と同様に細胞付着に必須な *E. albertii* に共通の病原因子として、LEE 領域にコードされるインチミンと Tir、また Tir のバリエーションタイプと関連して病原機構に関わる TccP について、その多様性と分布を明らかにした。その結果、大腸菌においてマイナーなタイプのインチミンが *E. albertii* に多いこと、Tir バリエーションタイプが V1, V2 (EHEC タイプ) の株はほとんどが TccP を保有していることが明らかとなり、V3, V4, V5 (EPEC タイプ) の株においても TccP を保有する株が多いことから、*E. albertii* は Tir-Nck 依存的あるいは Tir-Nck 非依存的のいずれか、もしくは両方の経路により宿主細胞のアクチン重合を引き起こす能力を持つことが示唆された (論文投稿準備中)。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエーション (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 バリエーション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進め、他のバリエーションの存在有無を確認している。

*E. albertii* の H 抗原型の多様性が明らかとなり、診断疫学マーカー候補遺伝子として *fliC* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 反応系による疫学ツールを構築することが出来た。また、この検出系を用いた分離株における解析で同定できない株がなかったことから、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] *Arcobacter* 属菌の野菜、特に水耕栽培野菜と魚介類における汚染実態調査

これまでにアルコバクター属菌の汚染実態は調査されてきたが、具体的な菌数を調査したものは少ない。昨年度は食肉の汚染状況を最確数法を用いて調査した。今年度は水耕栽培野菜と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。今回の調査結果から、水耕栽培野菜における *A. butzleri* の汚染率、汚染菌数がとも

に非常に高いことが明らかになった。特にブロッコリスプラウトにおける汚染菌数が非常に高く、陽性となった5検体中、4検体で11,000 MPN/100gを超えていた。魚介類における汚染状況は、水耕栽培野菜と比べて菌数は少なかったが、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii*が検出された。以上の結果から、水耕栽培野菜、魚介類ともにアルコバクテラ属菌の汚染率、汚染菌数が高く、もし、アルコバクテラ属菌が食中毒を引き起こしているとすると、その原因食品となりうる可能性が示唆された。今後、さらに検体数を増やし、調査を行っていく必要があると思われる。

#### [2] *A. butzleri* の各種条件下での増殖挙動の解析

室温を想定しての25°Cおよび10°C、チルドを想定しての4°C、冷凍を想定しての-20°Cの4つの培養温度で*A. butzleri*を培養した。4°Cでは、菌数は減少していくが、生菌特異的PCRによる菌量に変化は見られず、7日間は生存し、ラセン桿菌の形態が球状菌化することが確認された。*A. butzleri*はカンピロバクテラに近縁の細菌であるため、カンピロバクテラ同様に、いわゆる生きてはいるが培養できない状態(VBNC)になったのではないかと考えられた。カンピロバクテラに関しては、VBNC状態の細菌が動物の腸管に入ると、再び増殖を開始するとの報告がこれまでにある。このことから、VBNC状態の*A. butzleri*も食中毒の原因となる可能性が考えられた。

また、-20°Cでも*A. butzleri*がVBNC状態になった可能性が示唆された。さらに、*A. butzleri*は海水の塩濃度に近い3.0%のNaCl濃度の環境で増殖できることが明らかになった。加えて、アルカリ域に耐性はないが、酸性域において*A. butzleri*はVBNC状態で長期間生存できることが明らかになった。また、*A. butzleri*は低水分活性条件では増殖できないが、VBNC状態での生存も示唆された。これらの情報は、アルコバクテラが関連する食品の衛生管理を考える上で、重要な知見である。

#### E. 結論

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*Arcobacter*属菌を対象にして実施した。分担研究(1)*E. albertii*の制御法の確立では、①*E. albertii*特異的リアルタイムPCRは検出性に優れることが判明した。②modified EC培地に薬剤AおよびBを添加、DHL寒天培地に薬剤CおよびDを添加した選択培地を開発した。③食中毒事例での調査において②で示した培地を使用し原因食品を明らかにした。④食品検体709検体中1検体で*E. albertii*が分離され、食品汚染の可能性が示された。⑤*E. albertii*は食品中で中温で増殖し、低温で増殖が抑制されること、環境水中では低温で生残し、中温では死滅しやすいことが判明した。環境から農作物、家畜等への汚

染が起こることが推察された。また、(2) *E. albertii* の感染性・病原因子の解明では、①病原性に関わると考えられる遺伝子について、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。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を同定した。③鞭毛抗原（H 抗原）は 4 種類の H 抗原遺伝子型しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。④EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。(3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立では、①汚染実態調査によって水耕栽培野菜と魚介類はアルコバクターによる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。

#### 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.

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)

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