

平成 30～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

### 総合研究報告書

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* およびアルコバクター属菌を対象にして実施した。分担研究(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立では、①modified EC 培地、薬剤加 mEC 培地、ラムノース・キシロース添加 DHL 寒天培地等が選択分離培養に優れていることが判明した。②検出性に優れる *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR を開発した。③食中毒事例での調査において①②で示した方法を使用し原因食品を明らかにした。④食品検体で分離率は低いが *E. albertii* が分離された。⑤ *E. albertii* は食品中での増殖、環境水中での生残が判明し、環境から農作物、家畜等への汚染の可能性が推察された。(2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明では、①本菌特異的な病原関連候補 12 遺伝子について病原性を検討し、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子を同定し、発現条件を明らかにした。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 (TccP4) を同定した。③O 抗原および鞭毛抗原 (H 抗原) の多様性を明らかにした。④O 抗原型および H 抗原タイピングツール (EA0-、EAH-genotyping PCR) 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鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌が検出され、水耕栽培野菜および魚介類でも高濃度に検出され、食中毒の原因食品となりうる可能性が示された。②アルコバクター属菌の低温での生存、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、畠山 薫、 鈴木 淳
岩手県環境保健研究センター	上山 昭、山中拓哉、太田美香子 高橋幸子、佐藤徳行
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、佐藤千鶴子、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
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
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
三重県保健環境研究所	赤地重宏、小林章人、永井佑樹
滋賀県衛生科学センター	梅原成子、長谷川嘉子
奈良県保健研究センター	吉田孝子、佐伯美由紀、森村実加、 松井恵梨子
愛媛県立衛生環境研究所	仙波敬子、浅野由紀子
広島県立総合技術研究所保健環境センター	平塚貴大
熊本県保健環境科学研究所	原田誠也、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	高良武俊、宮平勝人、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
川崎市健康安全研究所	小嶋由香、阿部光一朗
静岡市環境保健研究所	丸山幸男、望月瑞葉、高橋直人
神戸市環境保健研究所	濱 夏樹
福岡市環境保健環境研究所	丸山浩幸、松永典久
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
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	新井沙倉、廣瀬昌平、都丸亜希子、 大屋賢司

## 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、定着する可能性があるが、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。

（1）工藤は、*E. albertii* の食品での検査法の検討として、選

択増菌培地、選択分離培地、特異的リアルタイムPCR法を検討した。また、食品・環境等の汚染実態調査、食品・環境検体中での挙動について明らかにした。また、（2）大岡は、*E. albertii* の感染性と病原因子の解明および診断疫学マーカーの確立を行った。さらに（3）大西は、アルコバクター属菌による食中毒発生の可能性を検討するために、検査法、食品での汚染実態調査、カンピロバクター食中毒患者便からの検出、*A. butzleri* 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）食品での検査法の検討

腸管出血性大腸菌（EHEC）の食品での検査法との共通性を考慮した増菌培養法、選択分離培地を含め、さらに *E. albertii* の薬剤耐性や生化学性状の特徴を取り入れた培地について本菌の食品での検査法を検討した。検討対象食品には *E. albertii* 汚染が報告されている鶏肉として、各種濃度の本菌を接種した菌接種鶏肉培養液や鶏肉にて分離を行った。また、既知の Nested PCR

法 (Ooka et al.) についても、検出感度を検討した。

## 2) リアルタイム PCR の開発

*E. albertii* 株計 113 株を対象に、大岡唯祐研究分担者が同定した *E. albertii* 特異的遺伝子上で SNP の少ない遺伝子配列領域を選定し、プライマーおよびプローブ候補を設計し、至適濃度を検討した。特異性を多菌種の株を用いて確認した。また、感度を菌接種鶏肉培養液にて検討した。さらに、鶏検体での汚染実態調査で nested PCR を行った検体でリアルタイム PCR での検出性を比較した。

## 3) *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

*E. albertii* 食中毒事例の発生時に原因食品中の本菌菌数を定量するための最確数 (MPN) 法を確立した。令和 2 年度の食中毒事例においては冷凍保管検食、それら食品の混合培養液または個別培養液を事例発生の地方自治体から受け取り、上記の食品での検査法を応用して原因食品の確定を行った。地方自治体で分離した混合食品や患者からの *E. albertii* 株も受け取り、当所で分離した株と並べて性状比較や RAPD 型別を行った。

## 4) 食品等における汚染実態調査

地方自治体の協力機関と協力し、食肉を含んだ食品検体 1918 検体、施設の拭き取りも含む環境検体 229 検体および糞便 (ヒトおよびウシ) 検体 5,636 検体について調査した。乳糖非分解のコロニーについてブドウ糖分解、硫化水素非産生、非運動性、キシロース非分解を確認し、nested PCR の 1st PCR に供試し、*E. albertii* であるか判定した。*E. albertii* 計 75 株について 0 抗原型を大岡らの PCR にて型別 (EA0-genotyping) した。

## 5) *E. albertii* の食品・環境中の挙動

食品検体として、トリ肉、ブタ肉、イワガキおよびマガキ、環境水検体として、井戸水および海水に *E. albertii* を接種し、4℃、10℃、20℃および 30℃で保管した。食品検体では 6 時間から 3 日間、環境水検体では 9 日間保管し、経時的に *E. albertii* の菌数を培養法およびリアルタイム PCR での定量分析にて測定した。

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

1) 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝

## 子群の網羅的探索

自らの *E. albertii* 株の全ゲノム情報に加えて NCBI データベース情報について、各株の遺伝子レパートリーを同定した。ドイツの患者由来株である CB9786 株を参照株とし、アミノ酸配列相同性が 90%以上の遺伝子を網羅的に抽出した。他の *Escherichia* 属細菌に存在しない遺伝子群も併せて検索した。

## 2) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii* CB9786 株と、*Escherichia* 属細菌および近縁菌種のゲノム塩基配列との比較を行い、CB9786 株にのみ存在する配列を取得した。*E.*

*albertii* 55 株において、塩基配列相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定し、塩基配列保存性が 99%以上である遺伝子を診断疫学マーカー候補遺伝子とした。

## 3) 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

NCBI データベース登録 57 株に加え、Enterobase website v1.1.2. 登録 186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E.*

*albertrii* 主要病原因子 (III 型分泌系をコードする locus of enterocyte effacement (LEE) 領域と第 2 の III 型分泌系をコードする ETT2 領域のマーカー遺伝子として *eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子、*E. albertii* の病原因子として *stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*paa* 遺伝子) の保有状況を調べた。

## 4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

遺伝子破壊には、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には全ゲノム配列決定株であるヒト臨床分離株 HIPH08472 株および EC06-170 株、トリ由来株である NIAH\_Bird3 株の計 3 株を対象とした。

## 5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目 4) で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

## 6) 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°C、20°C) で培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。付着能および細胞内生存能に關与が示唆された病原關連候補遺伝子を標的としてリアルタイム RT-PCR を実施し、 $\Delta \Delta Ct$  法にて発現レベルを解析した。

7) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor)、TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性および分布の解析

*E. albertii* 243 株について、インチミンをコードする *eae* 遺伝子の多様性解析を行った。当該遺伝子の上下流に存在する *cesT* 遺伝子、*escD* 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。既知のインチミンサブタイプ 38 種類のアミノ酸配列に 95%未満の塩基配列相同性の場合には新規インチミンサブタイプと同定した。既知の Tir バリエーション (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 は本研究中で新たに同定]) 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ーションタイプングを行った。

*eae* 遺伝子のサブタイプ、*tir* 遺伝子および *tccP* 遺伝子のバリエーションについて株ごとの保有パターン、*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解析した。

8) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4] の機能解析

ヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を保有) を対象として、項目 7) において同定された新規 TccP バリエーションをコードする *tccP4* 遺伝子を改良 Wanner 法により遺伝子破壊した。作製した *tccP* 遺伝子バリエーション (*tccP4* 遺伝子) の遺伝子破壊株を 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。

9) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび自らが新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、既知の *Escherichia/Shigella* 属及び近縁菌種の O 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、*Escherichia/Shigella* 属の O 血清群と類似した O-AGC を保有する株については、該当する

*Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した。

#### 10) EAO-genotyping PCR の開発および実用性の検討

*E. albertii* の各 O-AGC に共通して保存されている O-antigen flippase をコードする *wzx* 遺伝子について *E. albertii* 内および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で見られる配列多様性を利用し、PCR による O 抗原遺伝子型タイピングツール (EAO-genotyping PCR) の開発を行った。また、*E. albertii* の同定が同時に行える検出系とした。多種の *E. albertii* 株にて本ツールの検出感度を検討した。

#### 11) *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での 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。*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。

#### 12) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

*E. albertii* の各 *fliC* 遺伝子型について、その配列多様性を利

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* の同定が同時に行える検出系とした。多種の *E. albertii* 株にて本ツールの有用性を検討した。

#### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

##### 1) アルコバクター属菌の検査法の確立

*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* を同時に検出できるマルチプレックス PCR を作製した。

##### 2) アルコバクター属菌の最確数法の確立

アルコバクター属菌の最確数法を確立するために、アルコバクター属菌の発育に適した培地、および選択剤を検討した。

##### 3) アルコバクター属菌の汚染実態調査

確立したアルコバクター属菌の最確数法およびマルチプレックス PCR を用い、食肉、水耕栽培野菜、魚介類の汚染実態調査を行った。食肉に関しては、カンピロバクター属菌に対する最確数法も同時に行い、汚染状況を比較した。

##### 4) *A. butzleri* の増殖挙動の

解析

*A. butzleri* を、pH、塩濃度、水分活性などを調整したアルコバクター基本培地に接種し、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。

5) カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

カンピロバクター食中毒が発生した場合、研究協力機関において患者便からアルコバクター属菌の分離を行った。

## C. 研究結果

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

1) 食品での検査法の検討

増菌培地の検討では、BPW よりも mEC および NmEC の方が、36°C よりも 42°C の方が *E. albertii* の分離率が高かった。また、薬剤 A および B を添加した mEC 培地 (mEC+AB 培地) では、*E. albertii* 194 株すべてで増殖が認められ、鶏肉由来細菌 20 株中 17 株で増殖が認められず、菌接種鶏肉培養液でも本菌の増殖は抑制されず、鶏肉由来細菌の増殖は抑制されたことから、優れた選択性が示された。分離培地

の検討では、DHL、*E. albertii* が非分解の糖であるキシロース・ラムノースを添加した DHL (XR-DHL) 上では多くの株が無色のコロニーを形成した。また、薬剤 C および D を添加した DHL 培地 (DHL+CD 培地) では、*E. albertii* の分離の向上が認められた。Nested PCR では、接種菌数が 0.5~21.4 cfu/25 g の鶏肉を増菌培養した場合に 1st PCR と 2nd PCR で共に遺伝子が検出された。

2) リアルタイム PCR の開発

候補のリアルタイム PCR の系では、全 *E. albertii* 株が陽性かつその他細菌種は全て陰性となった。*E. albertii* 株培養液による検出限界は、0.3~3.4 cfu/PCR tube (=6.8×10~6.8×10<sup>2</sup>cfu/mL) であり、検出蛍光値は内因性コントロールとしての 16S rRNA 遺伝子の蛍光値よりも大幅に高く、優れた duplex リアルタイム PCR の系であった。また、菌濃度と Ct 値の間に高い相関が認められた。検出限界は、食品培養液では 0.5~7.5 cfu/PCR tube (=1.1×10<sup>2</sup>~1.5×10<sup>3</sup>cfu/mL)、菌接種鶏肉では 1.2~1.4 cfu/25 g であった。汚染実態調査での Nested PCR の結果と



比べてリアルタイム PCR でたか  
検出結果であった。

### 3) *E. albertii* 食中毒事例での 原因食品の解析

確立した MPN3 本法による定量  
検査法を自治体と共有し、協力  
体制を構築した。令和 2 年度の  
食中毒検体では、春雨中華サラ  
ダのリアルタイム PCR で陽性と  
なり、A-mEC 培地による二次増菌  
を試みた結果、XR-DHL 培地での  
培養によって *E. albertii* が分  
離された。しかし、MPN 法による  
菌数測定では、*E. albertii* は検  
出限界以下であった。また、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  
者由来株は、いずれの遺伝子型  
別も一致した。

### 4) 食品等における汚染実態調 査

鶏肉 118 検体中 2 検体 (2%)、  
内臓肉 165 検体中 30 検体 (18%)  
で PCR 陽性であった。また、地方  
自治体との協力研究では、食品  
検体 1918 検体中鶏肉を含む 4 検  
体 (0.2%)、環境検体 229 検体中  
2 検体 (0.8%)、糞便検体 5636 検  
体中 6 検体 (0.1%) から *E.*  
*albertii* が分離された。分離株  
は、様々な EA0g 型であった。

### 5) *E. albertii* の食品・環境中

での挙動

*E. albertii* 接種食品検体で  
は、20℃あるいは 30℃で、すべ  
ての検体で菌数が増加した。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  
も菌数の大きな増減はみられな  
かった。また、環境水検体では、  
20℃あるいは 30℃で、すべての  
検体で菌数が減少した。4℃およ  
び 10℃では、井戸水検体の菌数  
はほぼ変化しなかったが、海水  
検体の菌数は緩やかに減少した。

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

#### 1) 全ゲノム情報を基にした種 特異的遺伝子群の網羅的探索

*E. albertii* に保存される 55  
遺伝子が同定された。その中に  
は、III 型分泌装置により宿主細  
胞へ分泌されるエフェクターな  
どの既知の病原関連因子の遺伝  
子ホモログ 9 個に加えて、機能  
未知の遺伝子も多数含まれた。

#### 2) 配列保存性の高い診断疫学 マーカー候補遺伝子の抽出

*E. albertii* に特異的な 34 遺  
伝子について抽出し、NCBI に登  
録された *E. albertii* 26 株を対  
象に blastn 解析した結果、全株  
に共通し、99%の塩基配列保存性

を示す 9 遺伝子が診断疫学マーカー候補遺伝子とされた。

3) 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

*E. albertii* は大きく 2 つのクレードに分かれるが分離地や分離源とは相関がなかった。*eae*、*cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* がほとんどの株で保存され、ETT2 領域の保存性も高かった。*stx2* が異なる系統の *E. albertii* 株において検出され、その保有と *cdtB*-I サブタイプの分布に相関が見られた。

4) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

形質転換効率の比較的高い株を選択し、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用した。それにより、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、用いた全 3 株の破壊株が作製された。

5) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析

項目 1) で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株を用いて、培養細胞に対する感染実験の実施を試みた結

果、付着および細胞内生存能に関連すると考えられる遺伝子を複数同定した。

6) 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。

7) *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 株中 241 株が *eae* 陽性であり、そのうちの 224 株が既知のサブタイプ 20 種類のいずれかを保有していた。検出数の多かったサブタイプは、 $\sigma 1$ 、 $\iota 2$ 、 $\sigma 2$  であった。

Tir: 243 株中 241 株が *tir* 陽性であり、V1~V5 の 5 つのバリエーションに分かれた中でも V1、V3、V5 が主要であった。また、V1、V2 は、TccP を要する (EHEC タイプ [Tir-Nck 非依存的]) が、V3-V5 は TccP を要さない (EPEC タイプ [Tir-Nck 依存的]) ことが示され

た。

TccP：これまで同定されていた 3 つのバリエーション (TccP1, TccP2, TccP3) に加え、新規バリエーションの TccP4 が同定された。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。

8) *E. albertii* における付着因子 インチミン、Tir、TccP の分布  
*tir* と *eae* を保有する株の 89% が TccP バリエーションを 1-3 コピー保有していた。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、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。

9) TccP バリエーション (TccP4) の機能解析

*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。

10) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

O-AGC は 40 種類に分かれた。また、25 種が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝

子セットを保有していた。*E. albertii*、*Escherichia*、*Shigella* 属間で O-AGC が頻繁に水平伝播していることが考えられた。また、*E. coli* や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似した *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことも明らかとなった。

11) EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

40 種類の EA0 型を識別できるプライマーセットを構築した。O 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした。国内および海外分離株について、*in silico* EA0-genotyping を実施した結果、82.4% の EA0 型が同定された。

12) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

解析した 243 株中 215 株の *fliC* が同定された。*E. albertii* の *fliC* は大腸菌のものとは異なり、4 つの遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在し、EAHg4 が高頻度に検出された。各 EAHg 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* 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。

13) EAH-genotyping PCR の開発

および実用性の検討

項目 12) で同定した 4 つの EAH 型を型別するマルチプレックス PCR を構築した。解析した国内ヒトおよびトリ由来株の全株の EAH 型が同定された。*in silico* 解析結果と同様に EAHg4 が高頻度に存在した。

### (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立

#### 1) アルコバクター属菌の検査法の確立

マルチプレックス PCR を作製したところ、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種を明確に同定することができた。この PCR の感度は、検体中に 100 から 200 cfu/ml のアルコバクター属菌が存在すれば検出することができた。また、*C. jejuni* および *C. coli* の DNA では陽性にならなかつた。

#### 2) アルコバクター属菌の最確数法の確率

増菌培地として 0.005% 5-フルオロウラシル添加アルコバクター基本培地、分離培地として CAT サプリメント添加アルコバクター基本寒天培地を用いた最確数法を作製した。試験は三本法で行い、培養液からの菌の検出はマルチプレックス PCR を用

いた。

### 3) アルコバクター属菌の汚染実態調査

鶏肉、豚肉、牛肉、各 20 検体ずつ調査した。鶏肉、豚肉、牛肉すべてからアルコバクター属菌が検出されたが、特に鶏肉では *A. butzleri* が 20 検体すべてから検出され、*A. cryaerophilus* は 12 検体から検出された。90% の鶏肉検体で *A. butzleri* の菌数が  $10^2$  MPN/100g をこえており、重度の汚染が認められた。また、鶏肉におけるアルコバクター属菌の汚染は汚染率、汚染菌量ともにカンピロバクター属菌を上回っていた。

水耕栽培野菜では、20 検体中、10 検体から *A. butzleri* が検出された。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の陽性率が高かった (陽性率 71%)。

魚介類では、*A. butzleri* はエビ類 3 検体、イカ類 1 検体から検出された。*A. cryaerophilus* はエビ類 1 検体から検出された。*A. skirrowii* は貝類 1 検体から検出された。

#### 4) *A. butzleri* の増殖挙動の解析

*A. butzleri* は 4℃ や 10℃ でも生存できることが明らかになった。pH による影響では、アルカリ性域には耐性はないが、酸性域では長期間生残できることが明らかになった。また、海水の塩濃度に匹敵する高塩濃度下でも増殖が可能であることが明らかになった。水分活性に関しては、低水分活性条件では増殖できななかった。しかし、見かけ上、菌が死滅したように見えても、VBNC 状態で生存している可能性があるため、注意が必要であることが明らかになった。

5) カンピロバクター食中毒患者便からのアルコバクター属菌の分離

204 検体の患者便の内、1 検体から *A. skirrowii* が検出された。

#### D. 考察

(1) *Escherichia albertii* の制御法の確立

1) 食品での検査法の検討

増菌培養としては、腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通性を考えて、mEC および NmEC 中の両方で 42℃ の増菌培養条件が適用可能と考えられた。また、mEC+AB 培地はさらに選択性に優れ有用であることが示された。

乳糖、ラムノースおよびキシロース非分解性が *E. albertii* に共通した性状であり、分離培地および同定の指標として有用であり、XR-DHL は優れた鑑別性を有することが示された。また、一部の白糖分解の性状を示す *E. albertii* を食品から分離するためにも、白糖を含まない XR-MAC も有用であると考えられた。一方、糖含有培地の調製には手間がかかるため、状況に応じて適宜培地を選択する必要があると思われる。また、選択性を高めるために薬剤 C・D を添加した DHL+CD 培地でも有用であると思われるが、*E. albertii* の一部菌株の増殖を抑制してしまうため、分離培養の際には XR-DHL 培地との併用が望ましいと考えられる。

2) リアルタイム PCR の開発

本研究によって、特異性および感度が高くリアルタイム PCR が確立された。また、内因性コントロールとしての 16S rRNA 遺伝子の検出が行えるため、結果の信頼性の高いリアルタイム PCR の系が確立された。鶏肉培養液および鶏肉での検討の結果から、PCR 阻害は少ないものと予想され、実検体での応用性が示された。

### 3) *E. albertii* 食中毒事例での原因食品の解析

すでに患者便および原因と疑われる食事の食品混合検体から *E. albertii* が分離されており、個別食品のいずれが原因食品であるかを確定することに焦点を絞り試験を実施した。春雨中華サラダの培養液検体からリアルタイム PCR にて *E. albertii* が明確に検出されたが、その培養液からは分離されず、A-mEC 培地にて二次増菌した結果、XR-DHL 培地で *E. albertii* が分離され、本研究で開発された増菌培地およびリアルタイム PCR の有用性が示された。分離株は患者由来株と遺伝子型が一致したことから、本食中毒の原因食品は春雨中華サラダであることが判明した。

### 4) 食品等における汚染実態調査

本研究でも、過去の報告と同様に鶏の保菌が示唆された。市販食品の本菌汚染率は極めて低いものの、*E. albertii* に汚染されているものも存在することが判明した。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を考慮する必要がある。ヒト便から分離されたが、本菌

の同定は難しいため、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。また、様々な O 抗原型株が分離され、本 EA0-genotyping は、食品の汚染源を探る手法として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* の汚染経路の推定のため、食品および環境水での本菌の増殖挙動の解析を行った。*E. albertii* は汚染食品の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示された。また、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。

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

本研究では、*E. albertii* に特異的な遺伝子群(特に病原関連遺伝子)や共通するゲノム領域を同定し、本菌の病原機構解明と診断疫学マーカー同定、さらにそれを利用した診断疫学ツールの開発を目的として解析を進めた。

病原関連候補遺伝子の機能解析については、当該遺伝子の破壊株を作製し、宿主細胞への感染実験により付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定することを目的としたが、*E. albertii* の DNA 取り込みおよび組換え効率が非常に低かったことから、遺伝子破壊株の作製法改良などに時間を要し、実験計画が遅れた。遺伝子破壊株作製法の改良により、令和元年度以降は順調に遺伝子破壊を行うことができ、その後の培養細胞への感染実験による機能解析で付着および感染細胞内増殖能に関与する遺伝子を同定することに成功した。また、これら病原関連遺伝子の発現条件を明らかにすることも出来たが、抗体を用いたタンパク質レベルでの細胞内分布など、さらなる解析が必要である。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。

EPEC や EHEC と共通な既知の病原因子として III 型分泌系とそのエフェクタータンパク質に関連した *E. albertii* での多様性解析および EHEC/EPEC との比較解析も進め、*E. albertii* の種としての特徴も見いだすことが出来た（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエント（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 バリエント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行い、他のバリエントの存在有無を確認する必要がある。

ゲノム特性を利用した診断疫学ツールの開発に関しては、本菌における O 抗原および H 抗原の多様性を明らかにし、それぞれの違いを利用したマルチプレックス PCR による疫学ツールを構築することが出来た。O-AGC 解析では、40 種類の EAO 型を同定したが、約 300 株のゲノムおよび分離株を用いた解析の結果、O 抗原型を同定出来ないものもあったため、今後、多様性に関してさらなる解析が必要であると考えられる。H 抗原に関しては、4 種類の EAH 型を同定し、さらに解析株約 300 株全ての遺伝子型を同定することが出来た。国内外の分離地域や由来の異なる株を対象にした解析の結果であることから、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) 食中毒細菌としての可能性

今回の結果から、アルコバクター属菌は、食中毒細菌として確立されている *C. jejuni* よりも重度に鶏肉を汚染していることが明らかになった。また、水耕栽培野菜も重度に汚染していることが明らかになった。しかし、水耕栽培野菜で原因物質不明の食中毒が発生しているという情報もない。以上のことから、アルコバクター属菌は、病原性を持っていたとしても、非常に弱いものではないかと考えられた。海外では事例が発生していることから、条件を整えば病原性を発揮する、いわゆる日和見菌のような存在ではないかと考えられた。

#### 2) アルコバクター属菌に対する衛生管理における注意点

本研究結果から、アルコバクター属菌は環境適応能力の高い細菌であることが示唆された。また、鶏肉や水耕栽培野菜、魚介類で重度の汚染が認められた。水耕栽培野菜や魚介類は生食さ

れる頻度が高いため注意が必要であると思われる。

### E. 結論

*E. albertii* については、分担研究 (1) *Escherichia albertii* の制御法の確立および (2) *Escherichia albertii* の感染性・病原因子の解明、が協力して成果を得た。食品での検査法として、優れた増菌培養法、分離培養法、リアルタイム PCR 法が確立され、食中毒事例での調査において原因食品を明らかにした。このことから、本研究で確立した各検査法は食中毒の解析に現実的に有用な方法として評価された。また、*E. albertii* の O 抗原および H 抗原の多様性解析結果から、分離株の O 抗原および H 抗原の genotyping の系が確立され、疫学・診断に有用と考えられた。また、分離率は低いが *E. albertii* が食品検体で分離され、加熱処理による殺菌など食品調理が食中毒予防に重要と考えられた。*E. albertii* は食品中での増殖、環境水中での生残が判明し、環境から農作物、家畜等への汚染の可能性が推察された。*E. albertii* の感染性・病原因子について、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子を同定し、発現条件を明らかにした。ま



た、病原因子 TccP のバリエーション (TccP4) を同定するなど新知見が得られ、今後の発展が期待される研究成果が得られた。アルコバクター属菌については、分担研究 (3) *Arcobacter butzleri* の制御法の確立、では、鶏肉はカンピロバクター属菌以上にアルコバクター属菌が検出され、水耕栽培野菜および魚介類でも高濃度に検出された。食中毒の原因食品となりうる可能性はあるが、アルコバクター属菌は病原性の弱い日和見菌的な存在ではないかと考えられた。また、アルコバクター属菌の低温での生存、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、他の細菌が死滅する環境でも、長期間生残する可能性を考えると、食品の衛生管理に注意を払う必要が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Major vehicles and O-serogroups in foodborne

enterotoxigenic *Escherichia coli* outbreaks in Japan, and effective detection methods of the pathogen in food associated with an outbreak. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 59(4): 161-166, 2018.

Ohtsuka, K., Hoshino, K., Kadowaki, N., Ohsaka, M., Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Terajima, J. and Hara-Kudo, Y. Selective media and real-time PCR assays for the effective detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in vegetables. LWT, 114, 108409, 2019.

Mori, T., Nagao, S., Kishino, K., Namba, T., Hara-Kudo, Y. DNA extraction for sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food by real-time PCR assays. Food Hygiene and Safety Science (shokuhin eiseigaku Zasshi). 60(6), 183-186, 2019.

Parvej, Md., Nakamura, H., Wang, L., Zhang, S., Emura, K., Kage-Nakadai, E., Wada,

- T., Hara-Kudo, Y., and Nishikawa, Y. Host range-associated clustering based on multi-locus variable-number tandem-repeat analysis, phylotypes, and virulence genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(6). pii: e02796-18, 2019.
- T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T. Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. *Microb. Genom*, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.
- 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)
- 岩渕香織、土屋 彰彦、大塚佳代子、小西典子、山崎匠子、和田裕久、

木全恵子、永井佑樹、吉田孝子、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価（1）。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

吉田孝子、白石祥吾、稲垣俊一、森 哲也、平塚貴大、永井佑樹、磯部順子、和田裕久、山崎匠子、小西典子、大塚佳代子、土屋 彰彦、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌の食品での試験法のコラボレイティブスタディによる評価（2）。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

尾畑浩魅、小西典子、大塚佳代子、鈴木 淳、貞升健志、甲斐明美、工藤由起子。食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法と有用性の検討。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月27、28日。大阪

工藤由起子。病原大腸菌による食中毒と食品の検査法について。平成30年度短期研修 食品衛生危機管理研修。国立保健医

療科学院。平成30年10月24日。和光市

門脇奈津子、大塚佳代子、大阪美紗、小西典子、工藤由起子。腸管毒素原性大腸菌のリアルタイムPCR法における各種検出機器及びクエンチャーでの検出感度の比較。第114回日本食品衛生学会学術講演会。平成30年11月15、16日。広島

小西典子、大塚佳代子、山崎匠子、和田裕久、磯部順子、永井佑樹、平塚貴大、森 哲也、稲垣俊一、白石祥吾、土屋彰彦、吉田孝子、岩渕香織、甲斐明美、寺嶋 淳、工藤由起子。食品を対象とした腸管毒素原性大腸菌検出法確立のためのコラボレイティブスタディによる評価。第114回日本食品衛生学会学術講演会。平成30年11月15、16日。広島

大岡唯祐、勢戸和子、小椋義俊、井口純、中村佳司、後藤恭宏、藺牟田直子、本田己喜子、池田徹也、杉谷和加奈、今野貴之、河野喜美子、工藤由起子、村上光一、林哲也、西順一郎：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の0抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発。第23回腸管出血性大腸

- 菌感染症研究会（一般演題），  
松山，2019.
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
長岡宏美、大屋賢司、工藤由起  
子．鶏肉からの *Escherichia*  
*albertii* 分離法の開発．第 92  
回日本細菌学会総会．平成 31 年  
4 月 23、24、25 日．札幌
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
床井由紀、土屋彰彦、小嶋由香、  
長岡宏美、大屋賢司、甲斐明美、  
工藤由起子．鶏肉からの  
*Escherichia albertii* 検出法  
のための nested PCR の検討．  
第 115 回日本食品衛生学会学術  
講演会．令和元年 10 月 3、4 日．  
東京
- 小西典子、尾畑浩魅、大塚佳代子、  
新井沙倉、仙波敬子、丸山浩幸、  
原田誠也、福留智子、高良武俊、  
工藤由起子．食品を対象とし  
た *Escherichia albertii* 検出  
のための基礎的検討．第 115 回  
日本食品衛生学会学術講演会．  
令和元年 10 月 3、4 日．東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
望月瑞葉、永井祐樹、原田誠也、  
大屋賢司、甲斐明美、工藤由起  
子．鶏肉での *Escherichia*  
*albertii* 検出法の検討および  
汚染実態．第 40 回日本食品微  
生物学会学術総会．令和元年 11  
月 28、29 日．東京
- 佐藤実佳、大塚佳代子、小西典子、  
尾畑浩魅、新井沙倉、今野貴之、  
床井由紀、長岡宏美、佐伯美由  
紀、工藤由起子．鶏肉における  
*Escherichia albertii* 分離培  
養法の検討．第 40 回日本食品  
微生物学会学術総会．令和元年  
11 月 28、29 日．東京
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、  
大屋賢司、工藤由起子．鶏肉に  
おける *Escherichia albertii*  
検出のための PCR 法の検討．第  
93 回日本細菌学会総会．令和 2  
年 2 月 19、20、21 日．名古屋
- 大岡唯祐：ゲノムから見えてきた  
新興下痢症起因菌 *Escherichia*  
*albertii* の特性とその応用．  
第 93 回日本細菌学会総会（ワ  
ークショップ），名古屋，2020.
- 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