

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

工藤 由起子

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

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

病原大腸菌食中毒の食品検査法確立

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

病原大腸菌の食品での検査法確立のために、大腸菌近縁の新興食中毒細菌である *Escherichia albertii* および *astA* 保有大腸菌を対象に研究を実施した。*E. albertii* についてはこれまでの研究で明らかになっていた増菌培養法、分離培養法、リアルタイム PCR 法等の評価を2段階に分けて最終評価を行った。〔1〕食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討：複数の自治体と多種食品を供試して評価し、mEC、NmEC または薬剤 AB を添加した mEC にて増菌培養後に RX-DHL または RX-MAC にて分離培養することで、8割以上の検体から *E. albertii* が分離された。

〔2〕食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価：11試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施し、汚染レベル約 18 CFU/25 g では鶏肉検体で9割以上、モヤシ検体で5から7割、80 CFU 以上の汚染レベルではほとんどの検体から分離されることが示された。また、*E. albertii* 遺伝子検出リアルタイム PCR 法 (IC を含む) は、スクリーニング法として優れていることが示された。また、*astA* 保有大腸菌については、〔3〕*astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立：*astA* 保有大腸菌に対応する食品での検査法の確立を目的に本研究を行った。その結果、本菌の培養に有用な各種条件を選定し、*astA* 特異的遺伝子検出法の新規開発の必要性が示された。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

土井りえ、榊田 希

東京都健康安全研究センター

小西典子、尾畑浩魅、齊木 大

岩手県環境保健研究センター

山中拓哉

宮城県保健環境センター

佐藤千鶴子、山谷聡子

秋田県健康環境センター	今野貴之
宇都宮市衛生環境試験所	床井由紀
山梨県衛生環境研究所	柳本恵太
三重県保健環境研究所	小林章人
大分県衛生環境研究センター	成松浩志、溝腰朗人
川崎市健康安全研究所	小嶋由香
静岡市環境保健研究所	高橋直人
広島市衛生研究所	末永朱美、池田伸代
北九州市保健環境研究所	大羽広宣、藤崎道子、有川衣美
福岡市保健環境研究所	松永典久
熊本市環境総合センター	小畑裕子
(公社)日本食品衛生協会	甲斐明美
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、国内外において大腸菌近縁の *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。既に日本では 2003 年以降に集団食中毒事例が発生しており、患者数 200 人以上の事例も報告され新興食中毒細菌として注目されている。しかし、食中毒事例において原因食品が特定された事例は少ないため（大岡，2017）、原因食品特定に対応する *E. albertii* の検査法の確立が求められており、令和 2 年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金事業「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」において、効率的な検出を

目的とした遺伝子検出法、増菌培養法および分離培養法を決定した。本研究課題では、2 段階に分けて最終評価を行うこととした。[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討では、複数の自治体と多種食品を供試し、増菌培養法および分離培養法を評価した。[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価では、上記[1]で検討した各種方法の結果を踏まえて、優れた方法を組み合わせて 11 試験研究機関の参加のもとコラボレイティブ・スタディを実施した。

また、近年、*astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 ; EAST1 をコードする遺伝子) 保

有大腸菌による集団食中毒事例が発生している。本菌に特異的な検査法は国内外で確立されておらず、原因食品が不明であることが多い。そこで、[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立として、増菌培養法、分離培養法、遺伝子検出法を主にして本菌に適する効率的かつ特異的な検査法の開発を行うこととした。

B. 研究方法

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

食中毒事例由来株である *E. albertii* EA12 および EA21 の 2 株を供試した。鶏肉、豚肉、キュウリ、モヤシ、キャベツ、カキ、ワカメ、トウフの 8 食品を供試した。低菌数接種として 7 cfu/25 g、中菌数接種として 14 cfu/25 g、高菌数接種として 30 cfu/25 g となるように *E. albertii* の希釈菌液を調製した。食品検体 25 g をストマッカー袋に入れ、各接種菌数レベル用希釈菌液 0.1 mL を接種した。食品検体への接種は、各接種菌数レベルごとに 1 食品につき 3 袋 (=3 検体) 用意した。菌を接種後、modified EC 培地 (mEC)、ノボビオシン加 mEC (NmEC) または薬剤 AB 加 mEC (薬剤 AB-mEC)

225 mL を加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、42°C にて 22 時間培養した。それぞれの試験において、各増菌培養液につき 1 検体の菌非接種の検体も同時に培養した。各増菌培養液 0.1 mL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL) およびマッコンキー寒天培地 (MAC) を基本としてそれぞれに 1% ラムノースおよび 1% キシロースを添加した培地 (RX-DHL、RX-MAC) を用いた。食品培養液を各 2 枚の RX-DHL および RX-MAC に画線し、37°C にて 22~24 時間培養した。各寒天培地に生育したコロニーを観察し、各培地あたり陽性と疑われるコロニー 3 個を RX-DHL に単離し、37°C にて 22~24 時間培養した。生育したコロニーの色に関わらず、コロニーから DNA を熱抽出し、*E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

本コラボレイティブ・スタディには、11 試験検査機関が参加した。鶏肉またはモヤシ検体 (高菌数接

種 3 検体、低菌数接種 3 検体、非接種 3 検体)に添加剤 AB 加 mEC 培地 225 mL を加え、1 分間のストマッカー処理を行い、 42 ± 1 °C、 22 ± 2 時間培養した。培養液 10 μ L ずつを各分離培地 (RX-DHL、RX-MAC、DHL、MAC) に接種し画線し、 37 ± 1 °C にて 22~24 時間培養した。また、培養液からアルカリ熱抽出法にて DNA を抽出し、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR (IC を含む) に供試した。培養後の各平板から各平板種類ごとに疑われるコロニー最大 5 個を釣菌し、RX-DHL に継代し、 37 ± 1 °C にて 22~24 時間培養した。*E. albertii* と思われる無色透明コロニーについてのみ、熱抽出法にて DNA を抽出し、*E. albertii* 検出リアルタイム PCR 法に供試した。結果表に記入した試験結果に基づき、国立衛研にて試験結果を集計後、Outlier 機関の検定および検出方法間の有意差検定を行った。いずれの検定においても、一元配置分散分析を行い、事後解析として、多重比較である Tukey-Kramer 法で解析を行った。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

培養法の検討では、合計 159 株の *astA* 保有大腸菌を供試した。

増菌培養法の検討では、供試菌株を mEC、NmEC、薬剤 AB 加 mEC、薬剤 AB 加 NmEC に接種し、 42 °C にて 18 時間培養後に増殖を観察した。分離培養法の検討では、供試菌株をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) や薬剤 C を添加した培地に画線し、 37 °C にて 22 時間培養後にコロニーを観察した。*astA* 特異的リアルタイム PCR 法の検討では、食品や食中毒事例由来細菌 26 種 35 株について *astA* 特異的コンベンショナル PCR 法 (Ratchtrachenchai et al., 2012) および *astA* 特異的リアルタイム PCR 法 (Hidaka et al., 2009) を試験した。

C. 研究結果

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

E. albertii を接種した条件では、中菌数接種のキャベツ 2 検体を除いた全検体がリアルタイム PCR 法陽性であった。同 2 検体の IC の Ct 値は 39-41 であった。また、*E. albertii* を非接種の条件では、トウフ 2 検体およびモヤシ 3 検体を除く全検体がリアルタイム PCR 法陰性であった。低菌数接種では、分離陽性率が 0-16.7% であった。高菌数接種では、いずれも分離陽性率 100% であった。接種

菌数が中菌数の場合は、分離陽性率が mEC 培地の RX-DHL で 87.2%、RX-MAC で 82.1%、NmEC 培地の RX-DHL で 92.3%、RX-MAC で 94.9%、薬剤 AB-mEC の RX-DHL で 94.9%、RX-MAC で 92.3%であった。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

E. albertii の検出結果は鶏肉検体においては、低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。モヤシ検体においても、鶏肉検体と同様に低菌数接種および高菌数接種ともに全機関で各 3 検体全てが陽性であった。各分離培地で釣菌したコロニーのうち *E. albertii* コロニーの割合(全機関合計)は RX-DHL で 522/581(89.8%)、RX-MAC で 548/615 (89.1%)、DHL で 435/684 (63.6%)、MAC で 404/796(50.8%) であった。リアルタイム PCR 法の検出感度は、鶏肉およびモヤシの両検体の低菌数接種および高菌数接種の両条件で 1.000 であった。分離培養法では、鶏肉検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL および RX-MAC で 1.000、DHL で 0.970、MAC で 0.939 であった。鶏肉検体の高菌数接種の検出感度は、分離に用いた 4 種類の全分離培地で

1.000 であった。モヤシ検体の低菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.667、RX-MAC で 0.727、DHL で 0.576、MAC で 0.515 であった。モヤシ検体の高菌数接種の検出感度は、RX-DHL で 0.970、RX-MAC で 0.939、DHL で 0.879、MAC で 0.848 であった。

統計解析を行った結果、鶏肉検体では方法間に有意な差は認められなかった。一方、モヤシ検体では、分離培養法の DHL および MAC は、リアルタイム PCR 法よりも検出率が有意に低かった。4 種類の培地による分離培養法間を比較した結果、鶏肉検体では、DHL および MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。一方、モヤシ検体では、MAC は、RX-DHL および RX-MAC よりも検出率が有意に低かった。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査法の確立

増菌培養法の検討では、供試した 159 株のうち、mEC、NmEC、薬剤 AB-mEC および薬剤 AB-NmEC 中でそれぞれ 154 株 (96.9%)、127 株 (79.9%)、22 株 (13.8%)、10 株 (6.3%) の増殖が認められた。分離培養法の検討では、CT を添加した培地では、生育良好の株数が少なかった。一方、薬剤 C を添加し

た SMAC では、159 株中 152 株 (95.6%) が生育良好であった。*astA* 保有大腸菌は、コンベンショナル PCR 法およびリアルタイム PCR 法ともに陽性であった。その他の 30 菌株は、コンベンショナル PCR 法陰性であったが、7 株がリアルタイム PCR 法陽性となった。

D. 考察

[1] 食品での *E. albertii* 検査法の基礎検討

低菌数レベル接種 (6.7-7.6 cfu/25 g) の分離培養法では、36 検体中 4 検体のみが陽性となったため、本菌の分離が難しいことが判明した。一方、高菌数接種 (> 37 cfu/25 g) であれば *E. albertii* が 100% の検体から分離されたため、ほぼ確実に分離可能であることが示された。試験的に様々な条件を検討する場合には、中菌数の接種 (12.3-26.5 cfu/25 g 程度) が適当であることが示された。中菌数接種の条件で 3 種類の増菌培地を比較すると、分離陽性率が mEC で 82% 以上、NmEC と薬剤 AB-mEC で 92% 以上と優れていた。また、RX-DHL および RX-MAC において分離成績に大きな差は認められなかった。RX-MAC には RX-DHL の組成にある白糖が含まれない。

一部の *E. albertii* は白糖分解という報告もあるため、RX-DHL 上で無色コロニーが観察されない場合は、RX-MAC の活用が重要と考えられた。また、検出率は分離培養法よりもリアルタイム PCR 法の方が優れていたため、リアルタイム PCR 法にてスクリーニングし、PCR 陽性検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。

キャベツ 9 検体中 2 検体がリアルタイム PCR 法陰性であり、IC の Ct 値も 39-41 と高かったため、供試したキャベツに阻害物質が含まれていた可能性が考えられた。Ct 値が約 40 以上と高い場合や増幅曲線に乱れがある場合は、抽出操作から再度行うことが推奨される。自然汚染の *E. albertii* を検出した可能性は否定できないが、リアルタイム PCR など感度の高い検出系を実施する場合には、試験操作に一層の注意を払う必要がある。

[2] 食品での *E. albertii* 検査法のコラボレイティブ・スタディによる評価

本コラボレイティブ・スタディの結果、高菌数接種 (88.5 CFU/25g) では、全ての検体および手法で検出感度が高かったことから、80 CFU 以上であれば高率に

*E. albertii*が検出されることが判明した。低菌数接種（17.7 CFU/25g）では、鶏肉検体でリアルタイムPCR法および分離培養法のRX-DHLとRX-MACで1.000であり、分離培養法のDHLで0.970、MACで0.939であった。モヤシ検体ではリアルタイムPCR法で1.000であり、分離培養法では0.515-0.727であった。これらの結果から、約18CFUの菌数レベルであっても鶏肉検体からは高率に検出され、モヤシ検体でも過半数からは検出されることが判明した。リアルタイムPCR法で検出されたが、分離培養法で*E. albertii*が検出されない検体があり、リアルタイムPCR法のほうが分離培養法よりも検出性が優れていることが示された。リアルタイムPCR法をスクリーニングに使用し、陽性であった検体を分離培養法に供試することで効率的な試験が行えるものと考えられた。また、本コラボレイティブ・スタディでは、ラムノースとキシロースを添加した培地のほうが感度が高い結果であった。本添加剤を加えて培地の鑑別性を高くすることで、効率的かつ高感度に試験が実施されることが考えられた。

[3] *astA* 保有大腸菌の食品検査

法の確立

腸管出血性大腸菌の食品での検査法との共通のmEC中での42℃培養が*astA* 保有大腸菌に適していることが判明した。選択分離培養法の検討では、*astA* 保有大腸菌の多くがCTに感受性であった。一方、薬剤Cを添加したSMACでは、159株中152株(95.6%)においては、通常の赤色コロニーを示していたため、本菌の分離培養法として適していると考えられた。

astA 特異的リアルタイムPCR法の検討では、既存のHidakaらによる方法では、非特異的反応が生じることが示された。*astA*の配列には多数の遺伝子多型（バリエーション）が報告されているため（Silva et al., 2014）、これらバリエーションを網羅する新しい*astA* 特異的リアルタイムPCR法の開発が求められている。また、過去には*astA* 保有大腸菌が様々な食品から検出されることが報告されている（濱崎ら，平成20年度）。このため、*astA* 保有大腸菌が共通して保有するその他の遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法の開発も必要であることが予想される。今後、本研究課題の他研究分担者の研究結果も参考に、新規の遺伝子検出法について考察する必要がある

ある。

E. 結論

*E. albertii*について、食品での検査法の基礎検討を行った結果、接種菌数および増菌培地の種類に関わらず、*E. albertii*特異的リアルタイム PCR 法ではほぼ全ての *E. albertii* 接種検体が検出され、本リアルタイム PCR が優れることが示された。ただし、一部で PCR 陰性が認められたことから、食品による阻害についてはさらに検討する必要性が考えられた。汚染レベル 12.3 cfu/25 g 以上では、mEC、NmEC、または薬剤 AB-mEC 培地にて増菌培養し、RX-DHL または RX-MAC にて分離培養する条件では、8 割以上の検体で *E. albertii* が分離されたことから、これらの優れた培地から選定して、多試験研究機関によるコラボレイティブ・スタディが実施された。その結果、リアルタイム PCR 法は、分離培養法と同等またはそれよりも優れており、分離培養法のなかではラムノースおよびキシロースを添加した分離培地が添加しないものよりも優れていた。本コラボレイティブ・スタディで実施したこれらの手法は、食品での *E. albertii* 検査法として優れた方法であると考えられる。また、

astA 保有大腸菌の食品検査法の確立については、腸管出血性大腸菌の試験法と同じ増菌培養法（mEC を用いた 42℃ 培養）および薬剤 C 添加 SMAC での分離培養が有用であることが明らかになった。また、既存の *astA* 特異的リアルタイム PCR 法では非特異的反応が生じることから、*astA* のバリエーションも考慮した方法を新規に開発する必要と考えられた。また、*astA* 以外の遺伝子を標的とした遺伝子検出法についても検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（誌上発表）

Nguyen, T.K., Bui, H.T., Truong, T.A., Lam, D.N., Ikeuchi, S., Ly, L.K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., and Hayashidani, H. Retail fresh vegetables as a potential source of *Salmonella* infection in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*. Mar 2;341, 109049, 2021.

Ikeuchi, S., Hien, BT, Thuan, NK, Thi, L., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. Contamination of pathogenic *Escherichia coli* in

- retail fresh vegetables in the Mekong Delta, Vietnam. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 62(3), 94-99, 2021.
- Arai, S., Yamaya, S., Ohtsuka, K., Konishi, N., Obata, H., Ooka, T., Hirose, S., Kai, A., and Hara-Kudo Y. Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. *Journal of food protection* 85(1), 173-179, 2022.
- Hirose, S., Nakamura, Y., Arai, S., and Hara-Kudo, Y. Development of a selective enrichment medium for the detection of *Escherichia albertii* in foods and the analysis of a foodborne outbreak. (投稿中)
- Arai, S., Ooka, T., Shibata, M., Nagai, Y., Tokoi, Y., Nagaoka, H., Maeda, R., Tsuchiya, A., Kojima, Y., Ohya, K., Ohnishi, T., Konishi, N., Ohtsuka, K., and Hara-Kudo, Y. Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. (投稿中)
- (学会等発表)
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子 *Escherichia albertii*特異的リアルタイムPCR法の開発と鶏の保菌状況調査. 第164回日本獣医学会学術集会. 令和3年9月7-13日. オンデマンド
- 新井沙倉、大塚佳代子、小西典子、床井由紀、長岡宏美、永井佑樹、前田莉花、土屋彰彦、小嶋由香、柴田瑞葉、大岡唯祐、大屋賢司、大西貴弘、工藤由起子. *Escherichia albertii* 特異的リアルタイムPCR法の開発と市販鶏肉の汚染実態調査. 第42回日本食品微生物学会学術総会. 令和3年9月21日-10月20日. オンデマンド
- 廣瀬昌平、大屋賢司、新井沙倉、小椋容子、工藤由起子. *Escherichia albertii* に適する選択増菌培地の開発. 第117回日本食品衛生学会学術講演会. 令和3年10月26日-11月9日. オンライン
- 新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、甲斐明美、工藤由起子. 市販カキにおける *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第117回日本食品衛生学会学術講演会. 令和3年10月26日-11月9日. オンライン
- 新井沙倉、山谷聡子、大塚佳代子、小西典子、尾畑浩魅、大岡唯祐、廣瀬昌平、工藤由起子. 市販カキの *Escherichia albertii* 汚染実態調査. 第94回日本細菌学会総

会．令和 3 年 3 月 29-31 日．オン
デマンド

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし