

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

協力研究報告書

食品での *Escherichia albertii* 検査法の基礎検討

研究要旨

日本では、*Escherichia albertii*による集団食中毒事例の発生が多数報告されているが、原因食品が特定された事例はわずかしか報告されていない。このため、原因食品特定に対応する食品中の *E. albertii*を迅速かつ高感度に検出する遺伝子検査法および *E. albertii*を効率的に分離するための培養法の確立を目的に、多種類の食品を用いて検討した。その結果、接種菌数に関わらず、リアルタイム PCR 法ではほぼ全ての *E. albertii*接種検体が PCR 陽性であった。また、12.3 cfu 以上を 25 g の食品に接種し、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 にて分離培養する条件では、8 割以上の検体で *E. albertii*が分離された。本研究にて実施した一連の試験法について、今後の食中毒事例検査や汚染実態調査などでの利用が期待される。

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、齋木 大

(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

*Escherichia albertii*による食中毒が日本において大腸菌近縁の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（大岡，日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。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。

平成 30 年度から令和 2 年度に実施した厚生労働科学研究費補助金による研究「食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究」の分担研究「*E. albertii* の制御法の確立」において、*E. albertii* を食品から効率よく検出すること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。その際に条件検討に使用していた食品は、過去に *E. albertii* 汚染が報告されていた鶏肉が主であり、接種菌数などの条件も限定的であった。そこで、開発した方法について多様な食品への応用性を評価するために、3 試験機関にて各種試験条件を設定し検討した。

B. 研究方法

本試験では、8 種類の食品を対象に *E. albertii* の 3 種類の接種菌数レベルを設定した。菌を接種した食品を 3 種類の増菌培地中で培養し、その培養液をリアルタイム PCR 法および 2 種類の分離培地を用いた分離培養法に供試し、*E.*

albertii の検出性を検討した（図 1）。

（1）菌株

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。

（2）食品検体

食肉として鶏肉および豚肉、野菜としてキュウリ、モヤシ、キャベツ、海産物としてカキ、ワカメ、その他食品としてトウフを供試した。食品検体の一般生菌数、大腸菌数および大腸菌群数を計測するために、食品検体 10 g をストマッカー袋に秤量し、滅菌リン酸緩衝食塩水（滅菌 PBS）90 mL を加え 1 分間ストマッカー処理した乳剤（ 10^{-1} 希釈液）を PBS 9 mL で 10 倍希釈して 10^{-2} ～ 10^{-6} 希釈液を調製した。各希釈液 0.1 mL を標準寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、48 時間培養した。同時に各希釈液 0.1 mL を XM-G 寒天培地に塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～22 時間培養した。培養後の XM-G 寒天培地の青（青～青紫）および赤（ピンク～赤紫）コロニー数を計測し、それぞれ検体 1 g あたりの大腸菌数および大腸菌群数を算出した。また、標準寒天培地のコロニー数を計測し、検体 1 g あたりの生菌数を算出した。

（3）接種菌液の調製

まず、各試験研究機関において接種菌数の再現性を確認した。カジトン培地に保存された *E. albertii* 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。増菌培養液を滅菌 PBS にて 10^{-1} から 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、 10^{-7} 希釈液 0.1 mL を 10 枚の Tryptic soy agar (TSA) に塗抹し、37°C にて 18~24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。この作業を繰り返し実施し、TSB 中にて 18 時間培養した場合の cfu を計算し、接種菌液調製のための希釈倍率を試験機関ごとに決定した。

添加回収試験では、カジトン培地に保存された *E. albertii* 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。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 となるように希釈菌液を調製した。接種菌数測定のために、各接種菌液 0.1 mL を 10 枚の TSA に塗抹し、37°C にて 18~24 時間培養した。TSA のコロニー数を計測し、接種菌数を算出した。

(4) 食品への *E. albertii* 接種

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。

菌を接種した後、ストマッカー袋の外側から手でなじませ、modified EC 培地 (mEC、日水製薬)、ノボビオシン加 mEC (NmEC、栄研化学) 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。培養液は、試験終了まで冷蔵保管した。

(5) 培養液の DNA 抽出およびリアルタイム PCR 法

各増菌培養液 0.1 mL からアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出した。

この培養液から抽出した DNA に対して *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法を実施した。*E. albertii* を標的としたプローブは FAM-BHQ、インターナルコントロール (IC) の 16S rRNA 遺伝子を標的としたプローブは HEX-BHQ で標識した。リアルタイム PCR 試薬には、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。上記にて

調製した DNA 溶液を 5 μ L 加えた。培養液のリアルタイム PCR 法では、1 検体につき 2 反応実施した。機器はサーモフィッシャーサイエンティフィックの Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム、QuantStudio 3 リアルタイム PCR システムまたは QuantStudio 5 リアルタイム PCR システムを使用した。50 $^{\circ}$ C 2 分および 95 $^{\circ}$ C 10 分の熱変性ののち、95 $^{\circ}$ C 15 秒 - 60 $^{\circ}$ C 1 分を 45 サイクル繰り返し増幅反応させた。

(6) 分離培養

分離培養法では、Deoxycholate hydrogen sulfide lactose 寒天培地 (DHL、日水製薬) およびマッコンキー寒天培地 (MAC、Difco) 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。(4) の検体培養液を各 2 枚の RX-DHL および RX-MAC に画線し、37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 を熱抽出した。疑われるコロニーが 3 個得られなかった場合には、冷蔵保管している増菌培養液を使用して再度 RX-DHL への画線を行い、

同様にコロニーからの DNA 抽出までの作業を行った。なお、一部の検体は分離培養法の検討には供試しなかった。

(7) コロニーのリアルタイム PCR 法

(5) と同様に実施した。なお、1 コロニーにつき 1 反応とした。

C. 研究結果

(1) 食品中の菌数および接種菌数

本試験にて供試した 8 種類の食品において、生菌数はモヤシで最も高く 7.3 log cfu/g であった (表 1)。鶏肉、キュウリ、カキ、キャベツおよび豚肉の生菌数は、4.0 log cfu/g 以上であった。また、トウフおよびワカメでは生菌数が検出限界以下であった (< 2 log cfu/g)。

大腸菌群数はモヤシで最も高く 7.3 log cfu/g であった。鶏肉、豚肉、一部のキュウリ、2 回目のトウフでも大腸菌群数が検出された。また、カキ、キャベツ、トウフ 1 回目およびワカメでは大腸菌群数が検出現界以下であった。大腸菌は、鶏肉およびキュウリ検体の一部でのみ検出された。

食品に接種した *E. albertii* 菌数は、低菌数接種で 6.7-7.6

cfu/25 g、中菌数接種で 12.3-26.5 cfu/25 g、高菌数接種で 37.0-76.3 cfu/25 g であった（表 2）。

（2）培養液のリアルタイム PCR 法

E. albertii を接種した条件では、低菌数接種の鶏肉 36 検体、中菌数接種の鶏肉 27 検体、キュウリ 27 検体、カキ 18 検体、トウモロコシ 18 検体、モヤシ 9 検体、豚肉 9 検体、ワカメ 18 検体および高菌数接種の鶏肉 27 検体、キュウリ 9 検体は全て *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陽性であった（表 2）。一方、中菌数接種のキャベツは 11 検体中 2 検体がリアルタイム PCR 法陰性であった。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、鶏肉 12 検体、キュウリ 9 検体、カキ 3 検体、キャベツ 3 検体、豚肉 3 検体、ワカメ 3 検体が全て *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陰性であった。一方、*E. albertii* を非接種のトウモロコシ 6 検体中 2 検体およびモヤシ 3 検体中 3 検体が本リアルタイム PCR 法陽性であった。なお、同時に測定した IC は、本試験に供試した全 251 検体で増幅（Ct 値：13-41）が認められた。

（3）分離培養法

鶏肉でのみ試験された低菌数接種では、分離陽性率が 3 種類の増

菌培地で 0-16.7% であり、いずれも低かった（表 3）。接種菌数が高菌数の場合はいずれも分離陽性率 100% であり、増菌培地または分離培地による差は認められなかった。接種菌数が中菌数の場合は、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（表 3）。

D. 考察

食品別に結果を比較した場合、中菌数接種したキャベツ 9 検体中 2 検体が *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法陰性であった（表 2）。この 2 検体に関しては、IC の Ct 値も 39-41 と高かったため、供試したキャベツに PCR 阻害物質が含まれていた可能性および供試したキャベツに細菌の増殖を抑制する成分が含まれていた可能性の 2 つの可能性が考えられた。食中毒事例の検査現場においても、阻害物質が含まれる食品を扱う可能性が考えられるが、どの食品に阻害物質が含まれるのかを事前に把握することは難しいため、IC の Ct 値が高く PCR が阻害されている可能性が考えられる場合には、複数の DNA 抽出法を試すことが有効な方

法と考えられた。

低菌数接種の分離培養法では、3種類の増菌培地を総合しても36検体中4検体のみが陽性となった(表3)。そのため、本試験で利用した一連試験法では、*E. albertii* 6.7-7.6 cfu/25 g程度の接種菌数では本菌の分離が難しいことが判明した。一方、高菌数接種であれば *E. albertii* が100%の検体から分離されたことから、37 cfu/25 g以上の接種菌数では本試験で利用した一連試験法で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、低菌数接種や高菌数接種では結果に差がないため、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。

増菌培地については、中菌数接種の条件において試験した3種類の増菌培地の結果を比較すると、mECにて増菌培養した条件で分離陽性率が82%以上と優れていたが、NmECと薬剤AB-mECでは92%以上とさらに優れていた(表3)。NmECと薬剤AB-mECの間には分離陽性率に大きな差は認められなかった。分離培地はラムノースとキシロースを添加したRX-DHLおよびRX-MACを利用したが、2種類の培地において分離成績に大きな差は認められ

なかった。この2種類の分離培地の違いとしては、RX-DHLには乳糖および白糖が含まれる一方でRX-MACには乳糖のみ含まれる。*E. albertii*はその多くが乳糖および白糖の両方が非分解であるが、一部白糖分解の株も報告されている。そのため、RX-DHLを用いて試験した場合に無色コロニーが全く観察されない際には、RX-MACも用いて検査することが重要と考えられた。

E. albertii 特異的リアルタイムPCR法と分離培養法を比較すると、リアルタイムPCR法の方が検出率が優れており、分離陰性であった検体であってもリアルタイムPCR法は全て陽性であった。特に、鶏肉のみ試験した低菌数接種であっても、全検体がリアルタイムPCR法で陽性であった。そのため、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。

培養液由来の夾雑物によるリアルタイムPCRの増幅効率への影響もあるため、Ct値が約40以上など大きい値の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。

E. 結論

接種菌数に関わらず、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た。ただし、今回供試した 8 食品の 1 つであるキャベツでは、中菌数接種検体の一部で 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がある。

本試験にて検討した 12.3 cfu/25 g 以上を食品に接種し、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。本試験にて検討した各種条件については、さらに多機関にて検討を重ね、食品における *E. albertii* 検出法として今後提案したい。また、一連の試験法について、今後の食中毒事例検査や汚染実態調査など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)

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.

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、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

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

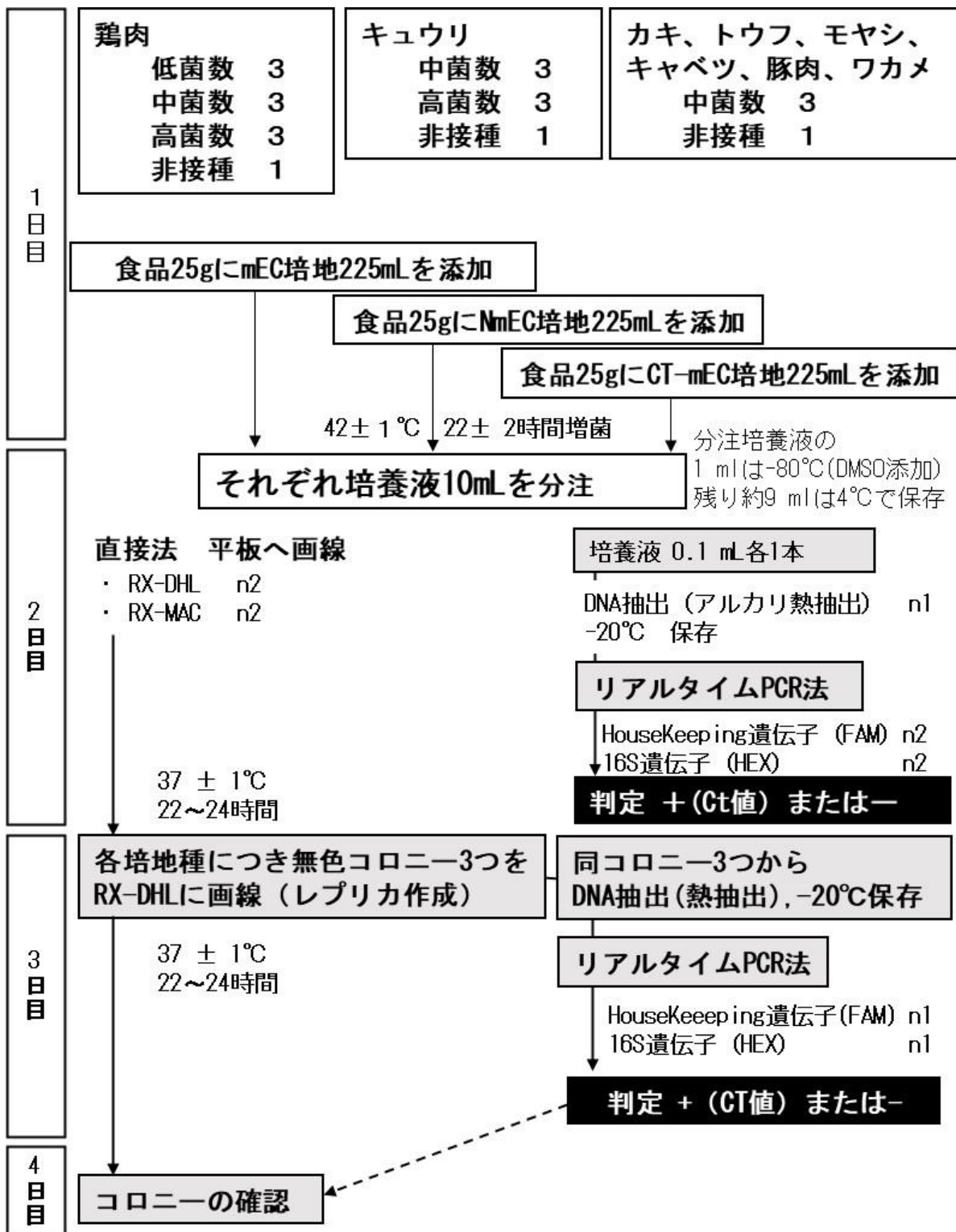


図1. *Escherichia albertii* 添加回収試験のフロー図

表 1. 供試食品における菌数

グループ	食品	菌数 (log cfu/g)		
		生菌	大腸菌群	大腸菌
食肉	鶏肉	4.7-6.3	3.9-5.0	1.7-3.8
	豚肉	4.1	4.0	< 1.7
野菜	キュウリ	5.8-6.2	< 2-3.8	<2-2.2
	モヤシ	7.3	7.3	< 2
	キャベツ	4.2	< 1.7	< 1.7
海産物	カキ	5.3	< 2	< 2
	ワカメ	< 2	< 2	< 2
その他	トウフ	<2, 4.6	<2, 3.0	<2

表 2. 各種食品の各種接種菌数におけるリアルタイム PCR 法と分離培養法の結果

食品	接種菌数 (cfu/25 g)	リアルタイム PCR 法*			
		<i>E. albertii</i>		IC	
		判定**	Ct 値	判定	Ct 値
鶏肉	低菌数 (6.7-7.6)	36/36	22-34	36/36	16-19
	中菌数 (12.5-26.5)	27/27	19-30	27/27	15-16
	高菌数 (37.0-76.3)	27/27	20-29	27/27	14-17
	接種：小計	90/90		90/90	
	非接種	0/12		12/12	15-17
キュウリ	中菌数 (10.7-20.0)	27/27	19-38	27/27	15-24
	高菌数 (76.3)	9/9	20-21	9/9	15-18
	接種：小計	36/36		36/36	
	非接種	0/9		9/9	15-19
カキ	中菌数 (11.7-13.8)	18/18	20-24	18/18	16-20
	非接種	0/3		3/3	16-34
トウモロコシ	中菌数 (15.6-22.3)	18/18	18-21	18/18	13-19
	非接種	2/6		6/6	13-36
モヤシ	中菌数 (22.3)	9/9	20-26	9/9	16-17
	非接種	3/3		3/3	16-17
キャベツ	中菌数 (10.7-12.7)	9/11	16-33	11/11	14-41
	非接種	0/3		3/3	39-40
豚肉	中菌数 (26.5)	9/9	18	9/9	15-16
	非接種	0/3		3/3	15-17
ワカメ	中菌数 (12.3-18.0)	18/18	16-18	18/18	14-17
	非接種	0/3		3/3	37-40
接種：合計		207/209			
非接種：合計		5/42			

* 2 株 (EA12、EA21) および 3 種類の増菌培地 (mEC、NmEC、CT-mEC) の合計

** 陽性検体数/供試検体数

増菌培地	接種菌数レベル*	食品	リアルタイムPCR陽性率** (%)	分離率*** (%)	
				RX-DHL	RX-MAC
mEC	低	鶏肉	12/12 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)
	中	鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ	45/45 (100)	34/39 (87.2)	32/39 (82.1)
	高	鶏肉, キュウリ	12/12 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)
NmEC	低	鶏肉	12/12 (100)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)
	中	鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ	45/45 (100)	36/39 (92.3)	37/39 (94.9)
	高	鶏肉, キュウリ	12/12 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)
	低	鶏肉	12/12 (100)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)
薬剤AB-mEC	中	鶏肉, キュウリ, カキ, トウフ, モヤシ, キャベツ, 豚肉, ワカメ	45/47 (95.7)	37/39 (94.9)	36/39 (92.3)
	高	鶏肉, キュウリ	12/12 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)

*低は約7 cfu/25 g、中は約11-27 cfu/25 g、高は約37-76 cfu/25 g

**リアルタイムPCR陽性検体数/供試検体数

***分離陽性検体数/供試検体数