

5. 新興食中毒細菌エシェリキア・アルバーティーの貝類における汚染実態の解明

○今野 貴之 佐藤 由衣子（秋田県健康環境センター）

【研究目的】

本研究では、秋田県内に流通する食品の内、特に貝類に着目して新興食中毒細菌エシェリキア・アルバーティーの汚染実態を調査し、本菌の自然界での生態を解明する。さらに、病原性や遺伝子解析を用いた系統学的な観点から環境や人との関連性を明らかにし、本菌による食中毒の疫学的な背景を考察することで、秋田県における食品衛生や感染症対策といった公衆衛生の向上に寄与することを目的とする。

【研究の必要性】

エシェリキア・アルバーティーは、腸管出血性大腸菌や赤痢菌に類似する新興の食中毒原因菌である。国内では、福岡県、沖縄県、静岡県で患者 100 名を超える大規模な食中毒事例も確認されており、公衆衛生上の新たな課題となっている。秋田県においては、2011 年に本菌を全国に先駆けて検出し、以前から継続的に患者が発生していたことが判明している（図 1）。また、2019 年に集団食中毒も発生しており、本菌の食中毒が発生しやすい疫学的な背景が存在する可能性がある。これまでの研究で、秋田県内の河川等の環境水には、本菌が高頻度に生息していることが分かっている。しかしながら、それら環境中のエシェリキア・アルバーティーがどのような経路で人に感染するかは、十分に分かっていない。

食品の内、特に貝類は水中の微生物を取り込んで体内に濃縮させることが知られている。貝類は、環境水に由来する本菌の感染経路の一端を担っている可能性があることから、その汚染実態を調査する必要がある。

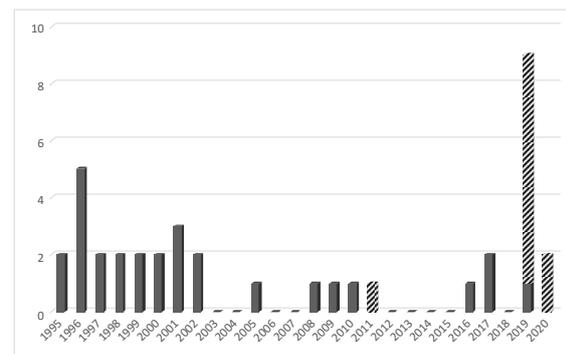


図 1 秋田県における人由来エシェリキア・アルバーティーの年別分離状況
*斜線は、食中毒事例（疑い含む）由来株

【研究計画】

1. 2023.9～2024.4 貝類の汚染実態調査

秋田県内に流通する貝類を買い上げ、エシェリキア・アルバーティーの有無を、リアルタイム PCR による高感度な遺伝子検査法にて調査する。また、検査においてはエシェリキア・アルバーティーの増菌に適した培地の検討も行う。

2. 2024.5～2024.6 病原遺伝子解析

検体から分離されたエシェリキア・アルバーティーについて、ベロ毒素 *stx*、インチミン *eae*、細胞膨化致死毒素 *cdt* 等の主要な病原遺伝子を PCR にて検出する。検出された遺伝子については、詳細な型を調べて貝類由来の菌株の特徴を確認する。

3. 2024.7～2024.8 系統解析

分子疫学的な手法を用いて、分離されたエシェリキア・アルバーティーと環境水由来や人由来の菌株とを比較し、それらの関連性を考察する。

【実施内容・結果】

1. 貝類の汚染実態調査

2023年10月～2024年7月末までに、貝類112検体を供試した。

増菌培養法の検討のため、一次増菌としてノボビオシン加 mTSB 培地、二次増菌として cefixime-tellurite (CT) 加 mTSB 培地を用いた二段階増菌を実施した。選択剤の濃度や培養温度は、Wakabayashi ら²⁾の報告を参考に設定した。培養液から DNA を抽出・精製し、EA0134 を標的としたリアルタイム PCR¹⁾にてエシェリキア・アルバーティーの有無を確認した。分離培養にはキシロース、ラムノース、メリビオース加マッコンキー寒天培地を使用し、平板上の白色集落について、*clpX*、*mdh*、*lysP* を標的としたエシェリキア・アルバーティー同定用 PCR^{3,4)}を行った。

リアルタイム PCR で陽性となったのは貝類112検体中7件（シジミ3件、マガキ2件、岩ガキ2件）であり、シジミ1検体からは2種類の菌株が分離された（表1）。一次増菌からのみ菌株を分離できた検体が1件、二次増菌からのみ菌株を分離できた検体が1件あった。

分離された8株について、生化学的性状試験を実施したところ、いずれもリジン脱炭酸能(+)、インドール産生性(+)で生物型3に該当した。

表1 エシェリキア・アルバーティーの検出状況

種類	検体数	陽性数
シジミ	21	3
マガキ	36	2
岩ガキ	31	2
その他*	24	0

*アサリ、ホタテ など

2. 病原遺伝子解析

病原遺伝子として、*eae*、*cdt*、*stx*、及び *paa* (porcine attaching and effacing associated) を PCR にて確認した。貝類由来の8株は、いずれも *eae*、*cdt*、*paa* を保有していた。また、その内の1株は、エシェリキア・アルバーティーの *cdt* とは系統的に異なる大腸菌の *cdt-I* 型に相当する亜型の *cdt* や *stx* の亜型である *stx2f* も保有していた。

3. 系統解析

分離された菌株の血清型を把握するため、O 抗原と H 抗原の遺伝子型別を実施した^{5,6)}。さらに、分子疫学解析法のひとつであるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施し、秋田県が保有する他の由来のエシエリキア・アルバーティーの PFGE パターンとデータベース上で比較し、類似度を算定した。

貝類由来の 8 株の遺伝子型別による血清型は、EAOg29:Hg2 が 2 株、EAOg33:Hg4 が 1 株、EAOg36:Hg1 が 1 株、EAOg40:Hg2 が 1 株、O 抗原不明の EAOgUT:Hg3 が 1 株、EAOgUT:Hg4 が 2 株であった。

分離された 8 株の PFGE パターンを図 2 に示す。これらの PFGE パターンをデータベース上で我々が保有する他の由来株と比較したところ、EAOg29:Hg2 の 1 株が人由来 1 株、環境水由来 1 株と類似度 80% を超えるクラスターを形成した。

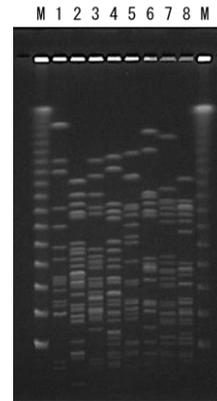


図 2 本研究で分離された菌株の PFGE パターン
M: DNA サイズスタンダード.

【考察と今後の課題】

本研究では、貝類 112 検体中 7 件から 8 株のエシエリキア・アルバーティーを分離し、エシエリキア・アルバーティーによる貝類の汚染実態を明らかにした。これまで貝類においては、カキからの検出報告はあったが、今回、カキ以外にシジミからもエシエリキア・アルバーティーを検出した。Arai ら⁷⁾は、マガキ及び岩ガキからエシエリキア・アルバーティーが通年にわたり検出されると報告している。我々の調査においても、シジミからは 2023 年 11 月に 1 検体と 2024 年 5 月に 2 検体、マガキからは 2024 年 3 月に 1 検体と 2024 年 4 月に 1 検体、岩ガキからは 2024 年 7 月に 2 検体で検出されており、貝類においては通年にわたりエシエリキア・アルバーティーの汚染が起こりうるものと考えられた。また、今回の調査における貝類のエシエリキア・アルバーティー陽性率は、シジミ 14.3%、マガキ 5.6%、岩ガキ 6.5% であり、我々が以前に行った食肉の汚染実態調査⁸⁾におけるトリ肉類の陽性率 (2.5%) よりも高く、貝類もエシエリキア・アルバーティーの重要な感染源となり得ると考えられた。

近年、エシエリキア・アルバーティーによる集団食中毒事例が散見されているものの、原因となった食品からの菌分離は少ない。その理由として、エシエリキア・アルバーティーの検査法が確立していないことが指摘されている。現在、エシエリキア・アルバーティーの培養法に関しては、選択性を高めた増菌培地や糖分解を利用して判別を容易にした分離培地が報告されている。特に、Wakabayashi ら²⁾は、ノボビオシンと CT の濃度をエシエリキア・アルバーティーに最適化させた増菌培地を開発しており、今回の調査ではそれを参考にノボビオシンと CT による二段階増菌を行った。ほとんどの検体でノボビオシンのみを添加した一段階目の増菌培養からでも菌分離が可能であったが、CT を添加した二段階増

菌を行うことでエシェリキア・アルバーティーの選択性が高まり、菌分離が容易になった。新井ら⁹⁾は、食品及び環境水からのエシェリキア・アルバーティーの分離法を複数の施設における様々な検査法で比較検討しており、菌数が多い場合は一段階増菌で十分であるが、菌数が少なかったり夾雑菌が多かったりする場合には選択性を高めた二段階増菌を検討することを推奨している。また、今回の調査においては一部の検体でCTを添加した培地でエシェリキア・アルバーティーが増菌されなかった。選択剤に弱い菌株もあることから、食品等からエシェリキア・アルバーティーを分離する際は、ノボビオシンとCTを分けた二段階増菌が有効な検査法と考えられた。

貝類から分離された菌株の性状については、大部分の人由来株と同様にいずれも生物型3であった。また、エシェリキア・アルバーティーの主要な病原遺伝子である *eae* と *cdt* の他、ブタ由来の大腸菌で重要視されている *paa* についても保持されていた。貝類から分離された菌株の生化学的性状や病原遺伝子の保有状況は人由来株と同様であり、人への感染性は保持されているものと推察された。また、一部の菌株からは複数の *cdt* 型や *stx2f* も確認された。これらの病原遺伝子の本菌の病原性への関与は不明であるが、病原性を強化する可能性があるため注意が必要である。

貝類から分離された菌株の血清型の内、EAOg29:Hg2 は環境水や人からも分離されている。また、以前の我々の調査¹⁰⁾では、EAOg33 は環境水由来の菌株に多い血清群であり、貝類と環境水から分離される菌株は類似する傾向にあった。PFGE による分子疫学解析においても、一部の菌株ではあるが環境水由来株や人由来株と比較的高い類似度を示したのがあり、貝類が環境水に由来する本菌の感染経路の一端を担っている可能性を示唆した。ただし、PFGE による分子疫学解析では、供試する菌株数や解析条件が結果の精度に影響するとされている。本研究で貝類から分離されたエシェリキア・アルバーティーの菌株数は限られており、精度の高い解析にはより多くの菌株を集積する必要がある。また、今後さらにエシェリキア・アルバーティーの自然界での生態や人への感染経路を解明していくためには、ゲノム情報をもとにしたより詳細な系統解析等、さらなる研究を進めていく必要があると考えられる。

【参考文献】

- 1) 高橋志保ら: 秋田県内の環境水からの *Escherichia albertii* の検出と分離株の性状, 日本食品微生物学会雑誌, 37, 81–6 (2020).
- 2) Wakabayashi Y, et al.: Proposal of a novel selective enrichment broth, NCT-mTSB, for isolation of *Escherichia albertii* from poultry samples, J Appl Microbiol, 132, 2121–30 (2022).
- 3) Hyma KE, et al.: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, J Bacteriol, 187, 619–28 (2005).
- 4) Oaks JL, et al.: *Escherichia albertii* in wild and domestic birds, Emerg Infect Dis, 16, 638–46 (2010).
- 5) Ooka T, et al.: O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *Escherichia coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method, Microb Genom, 5, article 000314 (2019).

- 6) Nakae K, et al.: Diversification of *Escherichia albertii* H-Antigens and development of H-genotyping PCR, *Front Microbiol*, 12, article 737979 (2021).
- 7) Arai S, et al.: Detection of *Escherichia albertii* in Retail Oysters, *J Food Prot*, 85, 173–9 (2022).
- 8) 今野貴之ら: 秋田県内で市販されている食肉および野菜類からの *Escherichia albertii* の検出と分離株の性状, *日本食品微生物学会雑誌*, 38, 144–52 (2021).
- 9) 新井沙倉ら: 食品および環境水からの *Escherichia albertii* 分離法の検討および分離株の解析, *日本食品微生物学会雑誌*, 41, 65–76 (2024).
- 10) Konno T, et al.: Distribution of the O-genotypes of *Escherichia albertii* isolated from humans and environmental water in Akita Prefecture, Japan, *Jpn J Infect Dis*, 74, 381–4 (2021).

【経費使途明細】

使 途	金 額
検体購入費	100,415 円
試薬 (培地、合成 DNA など)	95,040 円
消耗品 (ピペットなど)	96,888 円
輸送費 (検体収集に係る交通費)	8,000 円
事務費 (振込手数料)	1,320 円
合 計	301,663 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円