

13. 新興細菌 *E. albertii* の検査法の開発と汚染実態に関する研究

- 村田 学博 (旧所属静岡県環境衛生科学研究所 現所属東部農林事務所)
- 長岡 宏美 (静岡県環境衛生科学研究所)
- 鈴木 香菜 (静岡県環境衛生科学研究所)
- 中嶋 洋平 (旧所属静岡県生活衛生局衛生課 現所属医療健康局疾病対策課)

【研究目的】

2016年7月、本県で *Escherichia albertii* (*E. albertii*) を原因とする大規模食中毒事例が発生した。*E. albertii* は2003年に新種として報告された細菌であり、これまでに本菌による食中毒事例は、全国で8例が報告されている。本菌はこれまでヒト・野鳥から分離され、鶏肉・アヒル肉・ブタ・ネコからの分離も報告されているが、その汚染実態は未解明である。また、その性状についても不明な点が多い。

そこで今回私たちは、食鳥肉から本菌を分離した報告に注目し、県内の食鳥処理場に搬入された鶏、食肉処理場に搬入されたブタ及びウシ、静岡県動物管理指導センターに搬入されたイヌ及びネコについて、その汚染実態を調査するとともに分離株の性状についても精査した。

【研究方法】

< 供試材料 >

食鳥処理場検体（鶏盲腸便 200 検体、羽毛 4 検体およびチラー水 4 検体）、食肉処理場検体（ブタの便 217 検体、ウシの便 37 検体、ブタの枝肉の拭き取り 5 検体および排水 12 検体）、および動物管理指導センター検体（ネコの便 16 検体、イヌの便 1 検体、センター周囲の土 5 検体および排水 1 検体）を供試した。

< 方法 >

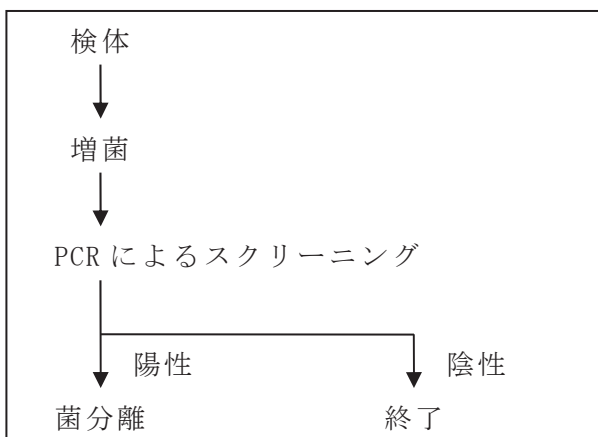


図1. 検査のフローチャート

E. albertii の検査は図1で示す検査フローに従って実施した。検体に10倍量のBPWを加え37°C24時間増菌後DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型にし、Hymaらの診断的マルチプレックスPCR法により遺伝子スクリーニングを行い、表1に示す *E. albertii* に特異的な3種類の遺伝子の増幅を試みた。反応液の組成、プログラムは以下のとおりである。反応液の組成：DW 11.25 μ l、 $\times 10$ Blend Taq

buffer 2.5 μ l、dNTP 2.5 μ l、プライマーセット (Forward/Reverse それぞれ 10 μ M) 1.0 μ l、Blend Taq 0.25 μ l、DNA 2.5 μ l、計 25 μ l。

プログラム : 94°C・10分→(92°C・1分→58°C・1分→72°C・1分)×35 サイクル→72°C・5分→4°C

増幅が確認された検体については、増菌した BPW を DHL 寒天培地に塗抹し、白色を呈したコロニーを分離し、TSI、LIM 培地を用い生化学的性状を調べた。同時に、分離菌から DNA を抽出し、Hyma らの診断的マルチプレックス PCR 法およびシーケンスにより *E. albertii* の同定を行った。

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5' -3')	増幅 DNA (bp)
clpX	clpX_28	TGG CGT CGA GTT GGG CA	383
	clpX_411R	TCC TGC TGC GGA TGT TTA CG	
lysP	lysP_107F	GGG CGC TGC TTT CAT ATA TTC TT	251
	lysP_358R	TCC AGA TCC AAC CGG Gag TAT CAG GA	
mdh	mdh_50F	CTG GAA GGC GCA GAT GTG GTA CTG ATT	114
	mdh_164R	CTT GCT GAA CCA GAT TCT TCA CAA TAC CG	

表 1. *E. albertii* の同定に使用した PCR プライマー

【結果】

(1) 遺伝子スクリーニング

食鳥処理場で採取された検体では、鶏盲腸便 200 検体中 7 検体 (3.5%) から、*E. albertii* に特異的な遺伝子の増幅が確認された。チラー水は 4 検体中 1 検体 (25%) で陽性が確認された。一方、羽毛は 4 検体いずれからも遺伝子の増幅は認められなかった。

食肉衛生検査所で採取された検体では、ブタの便 217 検体の増菌液を農場ごとのグループにまとめて DNA 抽出後、遺伝子スクリーニングを行ったところ 49 グループ中 8 グループ (16.3%) で陽性が確認された。一方、ウシの便 37 検体、ブタの枝肉拭き取り 5 検体および排水 12 検体からはいずれからも遺伝子の増幅は認められなかった。

動物管理指導センターで採取された検体においては、ネコの便 16 検体、イヌの便 1 検体、センター周囲の土 5 検体、排水 1 検体のいずれからも遺伝子の増幅は認められなかった。

表 1 検体とスクリーニング陽性数

採材施設	検体	スクリーニング陽性数
食鳥処理場	鶏盲腸便	7/200
	羽毛	0/4
	チラー水	1/4
食肉衛生検査所	ブタの便	8/49 グループ
	ウシの便	0/37
	ブタの枝肉拭き取り	0/5
	排水	0/12
動物管理指導センター	ネコの便	0/16
	イヌの便	0/1
	センター周囲の土	0/5
	排水	0/1

(2) 検出菌の生化学的性状

(1) で陽性を示した 40 検体について分離培養を行い、乳糖・白糖非分解の分離菌について生化学的性状を検査した。食鳥処理場の 8 検体から *E. albertii* を疑うグラム陰性桿菌が検出され、これらは運動性を有し、硫化水素は非産生であったがインドール、ガス産生性、リジン脱炭酸は陽性を示した。これらの性状を *E. albertii* および *E. coli* の生化学的性状と比較したところ、*E. albertii* とは運動性以外の性状が一致していた。

食肉衛生検査所の 32 検体からは、*E. albertii* と運動性も含め性状が一致した菌と、食鳥処理場と同様に運動性以外の性状が一致した菌が分離された。

表 2 *E. albertii* の生化学的性状

	<i>E. albertii</i> (文献)	<i>E. coli</i>	分離菌
乳糖・白糖分解	—	+	—
硫化水素産生	—	—	—
ガス産生	+	+	+
インドール	+	+	+
リジン脱炭酸	+	+	+
37℃での運動性	—	+	+ / —

(3) 検出菌の遺伝子検査および同定

Hyma らの診断的マルチプレックス PCR 法により、*E. albertii* に特異的な遺伝子の検出を行ったところ、食鳥処理場の 8 株からはいずれも *clpX* および *lysP* 遺伝子が検出されたが、

mdh 遺伝子は検出されなかった。シーケンス法による同定を試みたところ、*Escherichia fergusonii* と同定された。

食肉衛生検査所の検体から分離した菌株のうち、2 株から *E. albertii* に特異的な遺伝子 *clpX*、*lysP* および *mdh* 遺伝子が検出された。これら 2 株はシーケンス法により *E. albertii* と同定された。

【考察と今後の課題】

今回、本調査フロー（図 1）に従った遺伝子スクリーニングにより食鳥処理場検体における鶏盲腸便及びチラー水、食肉処理場のブタ糞便から *E. albertii* 特異的遺伝子が検出された。このことから、搬入された食鳥やブタが本菌を保有していた可能性も考えられた。食鳥処理場や食肉処理場において、本菌を保有した食鳥やブタが搬入された場合、処理工程を介して他の食肉・と体や環境へ汚染を拡げてゆくことが考えられる。今回の調査においても、食鳥処理場にて処理後の食鳥肉を冷却するためのチラー水からも遺伝子が検出されておりその危険性が示された。

遺伝子スクリーニング陽性の検体のうち、食肉処理場のブタ 2 検体から *E. albertii* を分離することができた。分離菌の生化学的性状はこれまで文献で報告されているもの、及び本県で発生した食中毒患者由来株と同様であり、診断的マルチプレックス PCR によりブタからの分離株が *E. albertii* であることが確定された。ブタにおける *E. albertii* の保有が確認されたことから、ブタ食肉を介して本菌がヒトに感染する可能性が示唆された。しかし、スクリーニングによる遺伝子は検出されたものの、菌が分離できなかった検体もあり、より効率的な検査方法の確立が必要と考えられた。

E. albertii は 2003 年に *Escherichia* 属の新種として発表され、新興感染症原因菌として位置づけられ、近年、食中毒の原因物質として特定される事例も増えている。しかしながら、本菌の分離、同定にあたり、特徴的な生化学的性状が乏しく腸管出血性大腸菌や赤痢菌と誤同定する危険性をはらんでいることから、注意深く検査を進める必要があると思われる。厚生労働省は平成 28 年 11 月 9 日付け結核感染症課長通知により *E. albertii* を疑う性状を明記し、検査および報告を行うことを全国自治体に依頼した。本菌は感染経路や保菌宿主、病原機序等についてもいまだ解明に至っていない。また、更なる疫学情報の集積とリスク評価が必要であり、加えて細菌学的な解明が急務であると思われる。

今後も基礎的な疫学調査による情報の蓄積を進めるとともに、標準的な分離同定方法の確立を目指してゆきたい。

【参考文献】

Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, et al. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J Bacteriol.* 2005;187:619-28.

Murakami K, Etoh Y, Tanaka E, et al. Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia albertii* from a Symptomatic Human. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67:204-8.

村上光一、齊藤剛仁 *Escherichia albertii* について. *食衛誌* 2017;Vol.58:No.6:157-9

【経費使途明細】

検査消耗品費 (フィルターチップ)	97,108 円
食中毒起因菌分離用培地・試薬 (LIM 培地、TSI 培地、DHL 寒天培地、エタノール)	52,604 円
遺伝子検査試薬 (DNA 抽出キット、PCR 試薬、シーケンス消耗品)	158,752 円
消耗品費 (コピー用紙、文具等)	48,668 円
振込み手数料	1,620 円
合計	358,752 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円