宮城県内における *Escherichia albertii* の侵淫状況調査

Characterization of *Escherichia albertii* isolated from food and environmental water in Miyagi Prefecture

山谷　聡子　　椎名　麻衣*1　　矢崎　知子
山口　友美*2　佐藤　千鶴子*3　　山木　紀彦
Satoko YAMAYA,　Mai SHIINA,　Tomoko YAZAKI
Yumi YAMAGUCHI,　Chizuko SATO,　Norihiko YAMAKI

県内における *Escherichia albertii*（以下「*E.albertii*」という。）の侵淫状況を把握するため、令和 4 年 4 月から令和 5 年 8 月まで、食品、河川の河口付近の干潟より採取した海水・海泥、及び下水流入水から *E.albertii* の検出を行ったところ、17 株の *E.albertii* が分離された。内訳は、かきの 4 検体から 9 株、鶏肉 1 検体から 1 株、海水 3 検体から 3 株、海泥 3 検体から 3 株、下水 1 検体から 1 株であった。17 株の生化学的性状を確認したところ生物型 3 が最も多く 15 株であり、生物型 1 が 1 株、生物型 2 が 1 株であった。O 抗原遺伝子型別を実施したところ、かき由来株は EAOg18、EAOg 21、EAOgUT、鶏肉由来株は EAOg4、海水由来株は EAOg7、EAOgUT、海泥由来株は EAOg23、EAOgUT、下水由来株は EAOg9 であった。薬剤感受性試験では、鶏肉由来株が ABPC、TC、KM の 3 剤に耐性を示した。また、PFGE 法による遺伝子解析の結果、分離株の泳動パターンが多様であったことから、県内には様々な遺伝子型の *E.albertii* が生息していると考えられた。分離株の中には過去の食中毒事件で分離された株と同じ O 抗原遺伝子型を持つ株もあり、県内でも *E.albertii* が食中毒の原因菌となる可能性があることが示唆された。

キーワード：*Escherichia albertii*；食品；O 抗原遺伝子型
Key words：*Escherichia albertii*；food；O antigen genotype

1　はじめに

Escherichia albertii（以下「*E.albertii*」という。）は大腸菌の近縁菌種として、2003 年に登録された [1]新興下痢症原因菌の一つである。日本国内においては 100 人を超える大規模食中毒事例も報告されている [2]。本菌は、腸管病原性大腸菌（enteropathogenic *E.coli*；EPEC）及び腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E.coli*；EHEC）の主要病原因子であるインチミン（*eae* 遺伝子にコードされる）を保有し [2]、まれに EHEC がもつ志賀毒素遺伝子（*stx*）を保有する場合がある [3]。これまでにネコ、ブタ、ニワトリ、野鳥 [2)3)]、アライグマ [4]、環境水 [5]など様々な検体からの分離報告があるが、ヒトへの感染経路や保菌動物、汚染の可能性のある食品や病原性などについては不明な点も多く、更なる知見の集積が望まれている。

本県においては、これまで *E.albertii* を原因とした食中毒事例は報告されておらず、また本菌についての調査などは未実施であり、県内におけるその侵淫状況や分布については不明である。

そこで、*E.albertii* による食中毒事例発生リスクの把握の一助とするため、県内に潜在している *E.albertii* の把握を目的とし、県内における食品や環境検体などの検体を対象とした調査を実施したので報告する。

*1　現　環境生活部環境対策課
*2　現　仙南・仙塩広域水道事務所
*3　退職

2　対象及び検査方法

2.1　対　象

調査期間は令和 4 年 4 月から令和 5 年 8 月まで、調査対象は食品収去検査検体（かき、漬物、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類、鶏肉、豚肉、鴨肉）430 件、県中部を流れる河川の河口付近の干潟に設定した調査定点より毎月 1 回採取した海水・海泥各 17 件及び宮城県内の都市部に所在する 2 か所の下水処理場で毎月 1 回採取した流入水 32 件とした。なお、対象とした食品は過去に全国で発生した食中毒事例の推定原因食品を参考とし、*E.albertii* 分離の報告がある鶏肉などの生肉も調査対象とした。

2.2　方　法

2.2.1　分離培養

食品検体については、採取した検体にその 9 倍量の modified EC 培地(mEC)を加え培養した。海水については、海水 500mL を孔径 0.45μm のセルロースアセテートメンブレンフィルターで吸引ろ過後、フィルターを mEC100mL で培養した。海泥については、20g を mEC180mL に加え培養した。下水流入水については、検体 100mL を 2 倍濃度のノボビオシン加 mEC 100mL で培養した。培養条件についてはいずれの検体も 42℃、22±2 時間とした。培養後、増菌培養液からアルカリ熱抽出により DNA を抽出し、大岡らの方法による Nested

PCR 法[6]の 1stPCR に供試した。また、DHL 寒天培地と 1%キシロース・1%ラムノース・1%メリビオース添加マッコンキー寒天培地（XRM-MAC）[7]に画線し、36℃で 18～24 時間培養した。ただし、海水、海泥、下水流入水については、PCR 陽性検体のみ分離平板培地に画線し培養を行った。一部の食品検体（漬物、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類）については増菌培養液の PCR を実施せず、分離平板培地への画線培養のみを行った。いずれの場合においても、DHL 及び XRM-MAC に発育した無色透明のコロニーを *E.albertii* 疑い株とした。

2.2.2 菌株の同定

E.albertii 疑い株については、コロニーPCR（前述の大岡らの方法による Nested PCR 法の 1stPCR）に供試した。PCR 陽性となった菌株については、TSI 寒天培地、LIM 培地、1%キシロース加アンドレイドペプトン水に接種し生化学的性状の確認を行った。また、保有病原因子（*eae*、*stx1*、*stx2* 、*stx2f*）については既報に従って確認したほか（表 1）、Hyma らのマルチプレックス PCR（*clpX*、 *lysP*、*mdh* ）[8]及び Ooka らの方法による O 抗原遺伝子型別[9]を実施した。ただし、*clpX* の PCR については配列の訂正されたプライマーを使用した[10]。また、同一検体より複数の株が分離された場合は、プライマー1283（5'-GCG ATC CCC A-3'）を用いた random amplified polymorphic DNA(RAPD) PCR[11]により、菌株の選別を行った。

2.2.3 薬剤感受性スクリーニング試験

E.albertii と同定した株について、平成 30 年度厚生労働科学研究「食品由来薬剤耐性菌のサーベランスのための研究」のプロトコールに従い、薬剤感受性スクリーニング試験を行った。試験には、アンピシリン（ABPC）、セフォキシチン（CFX）、セフォタキシム（CTX）、セフタジジム（CAZ）、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、アミカシン（AMK）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、クロラムフェニコール（CP）、ST 合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）の 17 種類の感受性ディスク（市販）を使用し、培養後の発育阻止円直径を計測するディスク拡散法により感受性の有無を確認した。

2.2.4 菌株の遺伝子解析

制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を実施した。CHEF MAPPER（BIO RAD）を用い、パルスタイム 2.2～54.2 秒、電圧 6.0V／cm、泳動時間 17 時間の条件で行った。データ解析は BIONUMERICS Ver8.0（Applied Maths）を使用し、解析は Dice 法（最適化 0.5%、トレランス 0.5%）、系統樹作成は平均距離法（UPGMA）により行った。

3 結 果

3.1 *E.albertii* の検出状況

調査対象とした食品430件のうち208件の増菌培養液についてPCRを行ったところ、5件がPCR陽性となり5件全てから*E.albertii*を分離した（表2）。PCR陽性とな

表１ 保有病原因子確認用プライマー

Target	Name	Sequence (5'-3')	Size (bp)	参考文献
eae	mSK1	CCGGCACAAGCATAAGC	310	Moriya,et al., J Jpn Assoc Infect Dis,74,134-142(2000)
	eaekas_a	TGGCAAAATGATCTGCTG		（食品衛生検査指針微生物編 2018掲載）
stx2f	128-1	AGATTGGGCGTCATTCACTGGTTG	428	Schmidt H et al., Applied and Environmental Microbiology,
	128-2	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC		p. 1205–1208 Vol. 66, No. 3 (2000)
stx	EVC-1&2	Takara プライマーセット	171	タカラバイオ株式会社

表２ 各検体からの *E.albertii* 検出結果

検体		検体数	PCR陽性数（陽性数／検体数%）	菌株分離検体数（分離検体数／検体数 %）	分離菌株数
食品・海産物	かき	196	4（2.0）	4（2.0）	9
	漬物	80	―*	0	0
	生食用鮮魚介類	140	―*	0	0
	生食用冷凍鮮魚介類	2	―*	0	0
生肉	鶏肉	5	1（20.0）	1（20.0）	1
	豚肉	5	0	0	0
	鴨肉	2	0	0	0
海水		17	4（23.5）	3（17.6）	3
海泥		17	5（29.4）	3（17.6）	3
下水		32	30（93.8）	1（3.1）	1

＊ PCR未実施

った食品別の内訳は、かきが4件（PCR陽性率2.0%、菌分離率2.0%）、鶏肉が1件（PCR陽性率は20.0%、菌分離率20.0%）であった。豚肉と鴨肉は全検体がPCR陰性、菌分離陰性であった。また、増菌培養液のPCR未実施である漬物、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類については平板培地からの菌分離は全て陰性であった。

海水のPCR陽性率は23.5%（4件/17件）、菌分離率は17.6%（3件/17件）、海泥のPCR陽性率は29.4%（5件/17件）、菌分離率は17.6%（3件/17件）であった。

下水流入水のPCR陽性率は、93.8%（30件/32件）、菌分離率3.1%（1件/32件）であった。

3.2　分離株の生化学的性状、保有病原因子及びO抗原遺伝子型

分離した菌株について、生化学的性状試験を行ったところ、全ての株で*E.albertii* として典型的な性状である運動性陰性を示した。このうち15株がリジン脱炭酸試験陽性、インドール反応陽性の生物型3[12]、1株がインドール反応陰性の生物型1、1株がリジン脱炭酸試験陰性の生物型2に分類[13]された。糖の分解性については、本調査ではDHLとXRM-MAC培地上で糖非分解の無色透明のコロニーをターゲットにしているため、全ての株で共通の性状、すなわち乳糖、白糖、キシロース分解陰性を示していた。

病原因子については、全ての株で*eae* 陽性、*clpX*、*lysP*、*mdh* 陽性であった。*E.albertii* が保有すると報告のある*stx2f* を含む*stx* は全ての株で陰性であった。

O抗原遺伝子型別を実施したところ、かき由来株はEAOg18（1株）、EAOg 21（1株）、EAOgUT（7株）、鶏肉由来株はEAOg4（1株）、海水由来株はEAOg7（1株）、EAOgUT（2株）、海泥由来株はEAOg23（1株）、

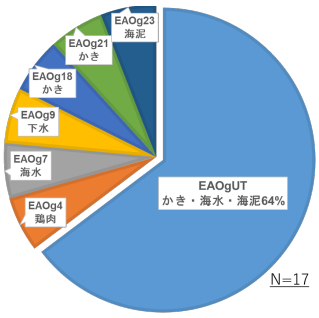

図１　分離株のＯ抗原遺伝子型

下水由来株はEAOg9（1株）に型別された（図1）。

かき検体では、*E.albertii* が分離された4件中3件において、同一検体から生化学的性状又はO抗原遺伝子型の異なる複数の菌株が分離された。かき以外の検体では、それぞれ1検体から1種類の株のみ分離された（表3）。

3.3　薬剤感受性スクリーニング試験結果

薬剤感受性試験では、鶏肉由来株 1 株が ABPC、TC、KM の 3 剤に耐性を示した。その他の分離株は全ての薬剤に感性を示した（表 3）。

3.4　菌株の遺伝子型解析

PFGE による遺伝子型解析では、同日に採取した海水由来株と海泥由来株のバンドパターンが全て一致し相同性 100%であった。その他の株は異なる泳動パターンを示し相同性 80%以上の株は認められなかった（図 2）。

4　考　察

本調査において、県内の様々な検体より 17 株の *E.albertii* が検出された。菌が分離された検体の内訳は、かき 4 検体、鶏肉 1 検体、海水 3 検体、海泥 3 検体、下水処理場で採取した流入水 1 検体であった。

表３　分離株の生化学的性状、他

菌株 No.	検体	TSI			LIM			糖分解	病原因子		生物型	EAOg 型	耐性薬剤	
		乳糖・白糖	ブドウ糖	硫化水素	リジン	インドール	運動性	キシロース	*eae*	*stx*				
No.1	かき	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		同一検体より分離
No.2		−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	21		
No.3	かき	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		同一検体より分離
No.4		−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	18		
No.5		−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.6	かき	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.7	かき	−	+	−	+	−	−	−	+	−	1	UT		同一検体より分離
No.8		−	+	−	−	+	−	−	+	−	2	UT		
No.9		−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.10	鶏肉	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	4	ABPC、TC、KM	
No.11	海水	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.12	海水	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		同日同地点で採取
No.13	海水	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	7		
No.14	海泥	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	23		
No.15	海泥	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.16	海泥	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	UT		
No.17	下水	−	+	−	+	+	−	−	+	−	3	9		

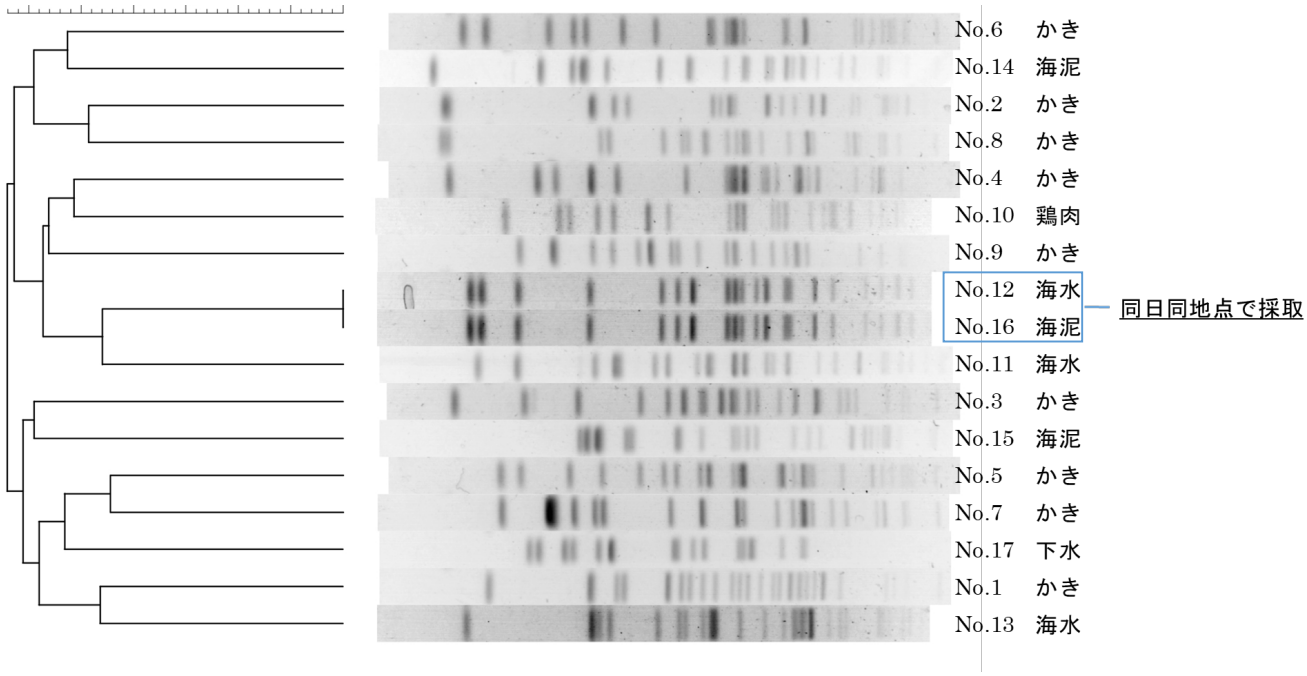

図２　分離株のＰＦＧＥ解析結果

県内流通食品のうち、今回菌が分離された検体は過去に分離報告のある鶏肉[14]とかき[15]のみであり、その他の食品からは検出されなかった。すなわち、現在のところ、通常の衛生管理のもと製造加工された県内流通の漬物、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類については *E.albertii* の侵淫が確認されない結果であった。鶏肉から検出された要因としては、鶏内臓肉からの分離報告[16]もあることから、加工処理工程で汚染された可能性も考えられた。かきからの菌分離については、今回の調査では分離率が 2.0%であり、既報[15]の 1.9%と同程度であった。他の調査では、河川水などの環境水からの分離報告[17)18)]も散見されることから、かきからの菌分離はその生育環境が関係していると示唆された。今回の我々の調査では本菌によるかきの汚染菌数については計測を行っていないが、新井らの報告[15]によると、本菌が分離されたかきの汚染菌数は検出限界以下（＜3MPN/10g）であり、取り扱いの際は通常の食中毒予防対策と同様に加熱調理などが重要であると示されている。

過去の食中毒事例では湧水や井戸水が原因と推定されるものもあり[19]、水系感染と *E.albertii* が密接に関係していると推測される。今回の調査でも、海水・海泥から菌が分離されており、*E.albertii* の生育に適した環境が水系であることを裏付ける結果となった。また、PFGE による遺伝子型別の結果より、別日に採取した海水・海泥からの分離株が異なる遺伝子型であったことから、採取地点に同一の菌株が定着しているわけではなく、多種多様な *E.albertii* が存在している可能性が示唆された。

下水からの菌分離については PCR 陽性率が 93.8%と高い確率であるにも関わらず菌分離率は 3.1%と低い結果であった。分離平板培地では、多数の夾雑菌と *E.albertii* 類似の無色透明コロニーの生育が認められていたことから、目的とする *E.albertii* のコロニーが十分に発育出来なかったこと、培地上でコロニーの鑑別が困難であったことなどが分離率の低さの要因として考えられた。さらに、PCR 法では死菌の遺伝子を検出したために陽性となっていた可能性も考えられた。今後、本菌を選択的に増菌できる培地の使用や選択的に分離培養可能な培地の開発など、培養法について検討が必要であると思われる。また、下水から本菌が分離されたことは、宮城県内に保菌者や潜在的な患者がいる可能性を示唆する他、広く環境中に本菌が存在していることが示された。

O 抗原遺伝子型別では、分離株の約 60%は EAOg1～40 に型別されない EAOUT 株であった。これらの株は、本調査で型別した EAOg1～40 以外の新しい型に型別される可能性がある。型別が可能であった 40%の分離株の中には、他県の食中毒事例の原因菌として分離された株と同じ O 抗原遺伝子型である EAOg9、18[20)]を持つ株も確認されており、本県でも本菌が原因となる食中毒事例が起こる可能性が示唆された。また、病原因子などの確認では、今回の調査で分離された菌株は全て病原遺伝子 *eae* を保有していた。*eae* は *E.albertii* の主要な病原因子の一つであり、ヒトへの病原性を有する株が県内にも存在することが示された。*stx* を保有する株は確認されなかったが今後、本菌を原因とする食中毒事例の発生に注意を払う必要がある。

薬剤感受性試験では、鶏肉由来株が 3 剤耐性を示した。このうち TC は動物用として多く使用されている抗菌剤であり、鶏肉が保菌していた *E.albertii* が TC 耐性を獲得しやすい環境にあった可能性も否定できない[21)]。今回の調査では県内分離 *E.albertii* 株の薬剤耐性率は 6%（1／17 株）となったが、多剤耐性化した *E.albertii* の報告も散見されるため、今後は薬剤耐性菌の拡散にも注

意しなければならない。

全分離株を PFGE 法により遺伝子型別した結果では、同日に採取した海水由来株と海泥由来株が同じバンドパターンを示し相同性が認められたが、その他に一致する株は無く、多様なバンドパターンを示した。このことから、県内には様々な遺伝子型の *E.albertii* が生息していることが明らかとなった。また、同一検体から複数の株が分離されたかき由来株 9 株については、バンドパターンは一致せず、遺伝子型が異なる株であった。すなわち、食品検体が複数の *E.albertii* に汚染されている可能性も十分にあり得ることが示された。

今回の調査結果において県内の食品、海水、海泥、下水流入水から本菌が分離され、県内には様々な汚染源が存在し、広い範囲に *E.albertii* が存在することが明らかとなった。これら分離株は異なる遺伝子型であることが確認できたことから、県内では特定の株の蔓延は認められず、遺伝子型の多彩な *E.albertii* が生息していると考えられる。

さらに、全ての分離株は病原遺伝子 *eae* を持ち、他県の食中毒事例株と同じ血清型を持つ株も分離されたことより、県内でも本菌を原因とする食中毒事例が発生する可能性があると示唆される。今回の調査で分離した生息域の異なる株について、株同士の関連性は明らかにならなったが、今後は食品、環境由来株とヒト由来株との比較、汚染食品、保菌動物の調査、ヒトへの感染経路の解明など、更なる知見の集積を重ねる必要があると考える。

謝　辞

本研究を行うにあたり、検体採取に協力いただいた各保健所職員の方々、下水流入水の採取にご協力いただいた中南部下水道事務所、株式会社みずむすびサービスみやぎ及び *E.albertii* 検出に関しご指導いただきました星薬科大学工藤由起子先生ほか、関係各位に深謝いたします。

参考文献

1) Huys G et al. : Int.J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 807-810(2003)
2) 大岡唯祐：日本食品微生物学会雑誌、34(3)、151-157 (2017)
3) 村上光一ら：病原微生物検出情報、37、98–100 (2016).
4) A.Hinenoya et al. : Emerg.Infect.Dis.26,1304–1307(2020)
5) 髙橋志保ら：日本食品微生物学会雑誌　37(2)、81-86(2020)
6) T.Ooka et al. : Genome Biol.Evol, 7, 3170-3179 (2015)
7) A.Hinenoya et al. : Diagn Microbiol Infect Dis. 97, 115006. (2020)
8) Hyma K.E. et al. : J.Bacteriol. , 187 , 619–628(2005).
9) T.Ooka et al. : Microb. Genom., 5, article 000314 (2019)
10) Oaks J. L. et al. : Emerg. Infect. Dis.16 , 638–646(2010)
11) Nielsen K.L. et al. : J. Microbiol. Methods, 103, 101–103 (2014)
12) K.Murakami et al. : Front. Microbiol.10 article 1543(2019)
13) Nataro J et al. ; *Escherichia,Shigella,*and *Salmonella*, p.670-687,In Murray P *et al.*,(ed), Manual of clinical microbiology, 9th edition, ASM Press, Washington, DC, (2007)
14) Wang H. et al. : Epidemiol.Infect.144 , 45–52(2016)
15) S.Arai et al. : J. Food Prot., 85、173–179 (2022)
16) S.Arai et al. : Foodborne Pathog. Dis.19、823–829 (2022).
17) 髙橋志保ら：食品微生物学会雑誌、37、81–86 (2020)
18) T.Konno et al. : Jpn. J. Infect. Dis.74 , 381–384(2021)
19) 村上光一ら：モダンメディア、66、101–110 (2020)
20) 樫尾拓子ら：日本食品微生物学会 雑誌、37、183–187 (2020)
21) 佐藤千鶴子ら：宮城県保健環境センター年報 38、35-37 (2020)