

Escherichia albertii による食中毒における病因物質の特定について

環境衛生科学研究所微生物部 ○森主博貴 鈴木秀紀 村田学博 松橋平太
山田俊博 長岡宏美 佐原啓二
御殿場健康福祉センター衛生業務課 泊明季 岩田佐知子 杉山智登勢 鈴木眞二
東部健康福祉センター細菌検査課 高井健太 平井愛 西尾智裕 野田佳宏

【はじめに】

2016年7月、*Escherichia albertii*（以降 *Ea* と略す）を原因とする大規模食中毒事例が発生した。*Ea* は 2003 年に新種として発表された菌種であり、世界的にも症例は少なく、国内の食中毒事例は本事例が 7 例目、静岡県では初の事例となった。本事例の病因物質の特定に至った経緯について報告する。

【事件の概要】

陸上自衛隊東富士演習場（御殿場市）で 3～11 日まで野営訓練をしていた陸自高等工科学校（神奈川県横須賀市）の生徒と職員、計 154 人（17～54 歳）が 10 日夕から下痢や腹痛を訴え、48 人が一時入院した。演習場で 9・10 日に自炊した食品が原因と考えられた。

【材料および方法】

1 供試材料

環境衛生科学研究所に搬入された患者便 10 検体、従事者便 7 検体および食品 4 検体（ゆで卵、ビーフン、ヤングコーン、水）、計 21 検体を検査材料とした。

2 食中毒起因菌一斉遺伝子検索

糞便は、QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)、食品は QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した後、飯田ら¹⁾が開発した 16 種類の食中毒起因菌遺伝子を網羅的に検出できるリアルタイム PCR 法を用いて原因菌の遺伝子検索を行った。

3 分離培養

便検体は DHL 寒天培地に直接塗抹し 37℃ 一晚培養後、コロニーを確認培地（TSI 寒天培地、LIM 培地）に釣菌し性状確認を行った。食品は

滅菌 PBS でストマッキング後、ノボビオシン加 m-EC 培地に接種し 42℃ 一晚培養後、培養液を分離培地（DHL）に塗抹し、37℃ で一晚培養した。分離平板上の *Ea* 様コロニーを対象に性状試験を実施した。

4 マルチプレックス PCR

食中毒起因菌一斉遺伝子検索で抽出した DNA について、Nanami ら²⁾が報告した *Ea* の診断的マルチプレックス PCR 法を実施し、*lysP* 遺伝子、*mdh* 遺伝子および *clpX* 遺伝子の有無を調べた。陽性となった 16 株について PFGE を実施した。

5 DNA シーケンス

Ea 様コロニー分離株は、PCR 増幅産物を材料としてダイレクトシーケンス法により確定した塩基配列について Genbank に登録されている細菌の塩基配列と比較して同定した。

6 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

菌液 100μl に proteinase K(20mg/ml)を 10 μl ずつ添加後、1% SeaKem Gold agarose を 110μl 添加しプラグを作成した。消化操作は Xba I (37℃ 3 時間)で制限酵素処理を行った後、12℃ で 20 時間泳動(6V/cm、initial2.2sec、final54.2sec)し、切断パターンを比較した。

【結果】

患者便および従事者便は、ウイルス（ノロ、アデノおよびロタウイルス）陰性であり、食中毒起因菌一斉遺伝子検索はインチミン遺伝子(*eae*)のみ陽性であったため、当初、原因は腸管病原性大腸菌であると予想された。しかしながら、患者便の直接分離平板上に乳糖または白糖を分解するコロニー、乳糖および白糖非分解のコロニーが両方みられたため、非分解のコロニーも釣菌したところ、確認培地で特定の性状を示す菌株が患者便検体すべてから分離された。これら菌株の性状は、乳糖および白糖非分解、運動性陰性、リジンデカルボキシラーゼ陽性、インドール陽性、O 血清 OUT であり、大腸菌としては極めて非定型性状であることが確認された。

乳糖・白糖非分解型の腸管病原性大腸菌を疑ったが、他県より *Ea* の可能性があるとの情報を得て、腸管病原性大腸菌か *Ea* かを鑑別するため、マルチプレックス PCR を実施した。その結果、*Ea* 特異的な配列である *lvsP* および *mdh* が陽性であり、また *Ea* の病原因子のひとつとして報告されている *clpX* についても陽性であった（図 1）。

DNA シーケンスでは、*Ea* 様コロニー 8 株について 16SrRNA 遺伝子の一部(401bp)に関して相同性解析を実施したところ、7 株の塩基配列が、*E.albertii* strain NB-07 16S ribosomal (KX262878)の配列と 100%一致した。これらの結果から分離菌は *Ea* と同定された。患者便 10 検体中 10 検体、従事者便 7 検体中 5 検体から *Ea* が検出された。食品 4 検体から *Ea* は分離されなかったが、遺伝子検査(マルチプレックス PCR)で 1 検体が陽性となった。

PFGE では患者由来株、従事者由来株はすべて同一のバンドパターンを示した（図 2）。また、これらの切断パターンは静岡県外の地衛研で分離され当所へ搬入された菌株と同一であった。以上のことから当該保健所は、自炊した食品を原因とする *E.albertii* 集団食中毒事件と断定した。

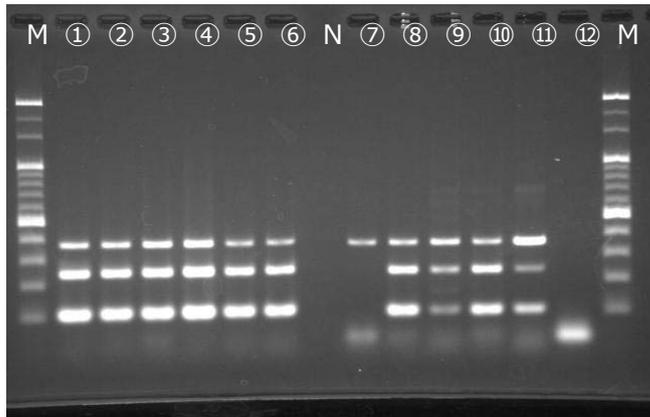
【考察】

今回の食中毒事例では、通常の食中毒検査法マニュアルに従った方法で検体からは有力な病原体が検出されなかった。しかし、患者の症状や糞便の性状から何らかの病原体が関与していることが示唆された。そこで、本来は対象ではない乳糖・白糖非分解のコロニーを釣菌した結果、すべての患者便から *Ea* が検出された。

Ea は特徴的な性状に乏しく、病原因子等については高い割合で *eae*、*cdt* を有する腸管病原性大腸菌と誤同定されることがある³⁾。さらに *Ea* の中には *stx2* サブタイプのうち、*stx2f* あるいは *stx2a* を保有する菌株も報告されており、感染症法上の 3 類感染症原因菌である腸管出血性大腸菌と誤同定される可能性がある。また *Shigella boydii* 血清型 13 と同じ菌体抗原性を示す菌株が存在する。以上のことから、同定に関しては、①*eae* 陽性・非運動性・乳糖非発酵・硫化水素非産生の菌株、②*stx2f* 陽性の菌株、③*S.boydii* 血清型 13 と同定された菌株、これら 3 つのうち少なくとも 1 つにでも該当する菌株は *Ea* を疑い検査することが賢明であるとされている⁴⁾。本事例分離株は①に該当したが、②に該当する株は、従来からの病原体検出情報システム上の取り扱いが「3 類感染症原因菌」となるため *stx2* サブタイプの検査は必須であるといえる。

今回のように食中毒が疑われるにもかかわらず原因菌が検出されない場合には、非定型性状の菌を考慮に入れて通常の検査方法を見直す必要があると考えられる。*Ea* については、これまで報告されているプライマーを用いることで、既存の設備の中で対応可能であり、迅速・正確な実験室内診断法を確立できたと考えている。

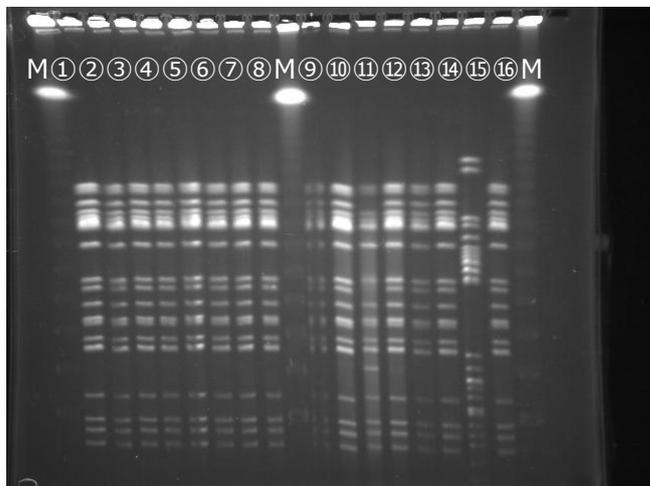
最後に、検体および情報提供にご協力頂きました衛生課、山梨県、横須賀市の関係各位に深謝いたします。



M : DNA マーカー
 ①～⑥ : 患者由来株 (県内)
 ⑦～⑪ : 従事者由来株 (県内)
 ⑫ : 陰性コントロール

※*clpX* : 増幅 DNA 383bp
lysP : 増幅 DNA 251bp
mdh : 増幅 DNA 114bp

図1 マルチプレックス PCR による *E. albertii* 特異的遺伝子の確認



M : DNA マーカー
 ①～② : 患者由来株 (県外)
 ③～⑫ : 患者由来株 (県内)
 ⑬～⑯ : 従事者由来株 (県内)

※⑮の株は運動性あり

図2 PFGE による分離株の遺伝子相同性の比較

【文献】

- 1) Natsuko Iida *et al.*: Development of duplex SYBR Green real-time PCR for rapid and simultaneous detection of 16 specific genes of 16 major foodborne bacteria. 日本食品微生物学会雑誌. 30.160-164 (2014)
- 2) Nanami Asoshima, *et al.*: Isolation of *Escherichia albertii* from Raw Chicken Liver in Fukuoka City, Japan. Jpn J. Infect. Dis., 68, 248-250 (2015)
- 3) Murakami K *et al.*, Jpn J Infect. Dis 67(3), 204-208 (2014)
- 4) IASR 37:98-101 (2016)