

食中毒疑い事例から分離された *Escherichia albertii* 株の性状

阿部祐樹 園部祥代*¹ 仙波敬子 浅野由紀子*² 烏谷竜哉*³ 青野学 井上智 四宮博人

Characterization of *Escherichia albertii* strains isolated from a suspected case of food poisoning

Yuki ABE, Sachiyo SONOBE, Keiko SEMBA, Yukiko ASANO,
Tatsuya KARASUDANI, Manabu AONO, Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Escherichia albertii was described as a new species in the genus *Escherichia* in 2003 and has attracted attention as a causative agent of food poisoning and infectious gastroenteritis. In this study, we identified specific genes in six *E. albertii* strains isolated from a food poisoning case in Ehime prefecture and performed molecular epidemiological analysis of them. The obtained results demonstrated that the six strains belonged to *E. albertii* biogroup non1/2 and harbored virulence genes *eae*, *clpX*, *lysP* and *mdh* but not *stx2a* or *stx2f*. Antimicrobial susceptibility testing of the six strains revealed that they were all sensitive to 18 antimicrobial agents tested. Moreover, pulsed-field gel electrophoresis analyses (PFGE) identified clonal relationships among the six strains. One of these isolates was classified into a cluster of *E. albertii* by multilocus sequence analysis (MLSA) together with dendrogram analyses of seven housekeeping genes.

Keywords : *Escherichia albertii*, Antimicrobial susceptibility testing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)
Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

はじめに

2016年10月に、県内のホテルで1泊2日の研修会が開催され、参加者59名中22名が下痢や腹痛などの胃腸炎症状を呈した。管轄保健所において食中毒疑い事例として調査が進められ、検査を実施した10名中6名から、*eae* 遺伝子(インチミン遺伝子)陽性の腸管病原性大腸菌(EPEC)が検出された。しかし、喫食調査等の疫学調査の結果から、本件は食中毒事例との判断には至らなかった。その後発出された厚生労働省通知に基づき、検出されたEPECについて精査したところ、当該菌が *Escherichia albertii* であることが判明した。

*E. albertii*は2003年に*Escherichia*属の新種として発表された菌種であり、ヒトに腹痛、下痢等の消化器症状を引き起こすことがある¹⁾。主としてヒト、鳥類から分離されるが、ネコやブタなどからの分離も報告されている²⁾。

この菌種は、特徴的な生化学的性状を示さず、また、病原因子として*eae*遺伝子を保有するため、大腸菌と誤同定されやすい性質を持っている³⁾。さらに、一部の菌は*stx2*(Vero毒素遺伝子)のサブタイプである*stx2a*や*stx2f*を保有することがあり、腸管出血性大腸菌と誤同定される可能性もある³⁾。

本菌種は国内での事例報告が少なく、知見の収集が望まれている。そして、2016年11月には、厚生労働省から*E. albertii*に係る報告についての通知が発出され、当該菌種による感染症に係る情報収集が進められている⁴⁾。

今回、愛媛県で分離された*E. albertii*について、特異的

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 食肉衛生検査センター

*2 西条保健所

*3 今治保健所

遺伝子の検出及び分子疫学解析等を行ったので報告する。

材料と方法

1 供試菌株

2016年10月に発生した食中毒疑い事例において、県内のホテルで開催された研修会参加者の便検体から分離された*E. albertii*疑い菌株6株を使用した。

2 方法

(1)確認培地による性状確認

TSI培地、LIM培地、VP半流動培地及びシモンズクエン酸培地を用いて、供試菌株の生化学的性状の確認を行った。また、炭水化物分解試験培地を用いて、キシロース発酵試験を行った。

(2) PCR法

*E. albertii*特異的配列等(*eae*, *clpX*, *lysP*, *mdh*)の有無を確認するため、*E. albertii*検出用プライマー^{5,6,7)}を用いたPCRを実施した。

TSA培地上のコロニーを釣菌し、滅菌精製水に懸濁後、10分間加熱処理し、12,000 rpmで5分間遠心した上清をDNAテンプレートとした。

PCRの条件は、熱変性94 30秒、アニーリング55 30秒、伸長反応72 50秒を32サイクルで行った。増幅産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色後、UV照射により確認した。

また、*stx2a*及び*stx2f*の保有状況を確認するためのPCRも実施した。プライマー及びPCR条件は、「腸管出血性大腸菌検査・診断マニュアル」(国立感染症研究所)を参照

し、DNAテンプレートの作成や電気泳動等は上記と同様の方法で行った。

(3)薬剤感受性試験

各種抗菌剤への耐性を測定するため、Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)のディスク拡散法による薬剤感受性試験を実施した。

ミューラーヒントン培地(日本ベクトンディッキンソン(BD))及びセンシディスク(BD)を用い、判定はディスクの添付文書判定基準に従った。使用したディスクは、アンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、イミペネム(IPM)、ノルフロキサシン(NFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ST合剤(SXT)、メロベネム(MEPM)、セフトジジム(CAZ)、ホスホマイシン(FOM)、クロラムフェニコール(CP)、セフォキシチン(CFX)、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)及びコリスチン(CL)の18剤とした。ただし、CLには判定基準がないため、阻止円径の測定のみとした。

(4)パルスフィールドゲル電気泳動

分子疫学解析のため、パルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE)を実施した。

TSB培地に菌を接種し、37 で一晩培養した。培養液を12,000 rpmで2分間遠心し、その沈渣を精製水200 µLに再懸濁した。これに等量の1%Seakem Gold Agaroseを加え、アガロースブロックを作成した。アガロースブロックに、溶菌処理液(1 mg/mL ProteaseK, 1% N-lauroylsarcosin, 0.5 M EDTA(pH8.0))を加え、50 で一晩反応した。次いで、制限酵素前処理液(4 mM Pefabloc SC, 0.5 M TE buffer)に置き替え、50 20分間の洗浄処理を2回行った。

表1 MLSAIに使用したプライマー及びアニーリング温度

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列(5' -3')	アニーリング温度()	増幅DNA長
<i>adk</i>	adkF adkR	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT	55.0	583 bp
<i>fumC</i>	fumCF fumCR1	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC TCC CGG CAG ATA AGC TGT GG	62.5	806 bp
<i>gyrB</i>	gyrBF gyrBR	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC ATC AGG CCT TCA CGC GCA TC	65.2	911 bp
<i>icd</i>	icdF icdR	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GCA CA GGA CGC AGC AGG ATC TGT T	55.0	878 bp
<i>mdh</i>	mdhF1 mdhR1	AGC GCG TTC TGT TCA AAT GC CAG GTT CAG AAC TCT CTC TGT	54.0	932 bp
<i>purA</i>	purAF1 purAR	TCG GTA ACG GTG TTG TGC TG CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA	54.0	816 bp
<i>recA</i>	recAF1 recAR1	ACC TTT GTA GCT GTA CCA CG AGC GTG AAG GTA AAA CCT GTG	54.0	780 bp

洗浄後, TE buffer及びH bufferでそれぞれ20分間平衡化した. 制限酵素処理液(30 unit *Xba* , H buffer)で37 °Cで一晩処理し, 0.5 × TBEを用いてPFGEを行った. 泳動条件は, 「6 V/cm, パルスタイム2.2から54.2秒, 19時間」とした. 泳動後, 臭化エチジウム溶液で染色後, UV照射により確認した. 得られたDNA切断断片像は, 画像解析ソフト(BioNumerics Ver.6.5, Applied Maths)を用いて解析を行い, 系統樹を作成した.

(5)16S rRNA遺伝子の塩基配列解析

16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し, これまでに報告されている*E. albertii*の塩基配列と比較した⁸⁾.

塩基配列と比較は, 供試菌株のうち1株について行った. (2)PCR法と同様の方法でDNAテンプレートを作成し, 16S rRNA 遺伝子のプライマー(10F(5'-GTT TGA TCC TGG CTC A-3')と800R(5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'), 800F(5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3')と1500R(5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3'))を用いてPCRを実施した. PCR条件は, 前熱変性を94 °C 90秒行い, 熱変性98 °C 5秒, アニール60 °C 10秒, 伸長反応72 °C 10秒を25サイクル, そして最終伸長反応を72 °C 1分で行った. 増幅産物はマイクロコン(ミリポア)を用いて精製し, ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 及び ABI3130 Genetic Analyzerを使用して塩基配列を決定した.

系統樹は, Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0(MEGA6)ソフトウェアを使用し, 近隣結合法により作成した.

(6)Multilocus Sequence Analysis(MLSA)

*E. albertii*の7つのハウスキーピング遺伝子(*adk*, *fum*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*)の塩基配列を決定し, これらを*adk-fum-gyrB-icd-mdh-purA-recA*の順に連結した3,423 bpの塩基配列を用いて系統樹解析を行った⁸⁾.

塩基配列と比較は, 供試菌株のうち1株について行った. DNAテンプレートは, (2)PCR法と同様の方法で作成

し, 表1の各プライマーを用いてPCRを行った. PCR条件は, 前熱変性を95 °C 2分行い, 熱変性95 °C 1分, アニールは表1記載の温度で1分, 伸長反応72 °C 2分を30サイクル, そして最終伸長反応を72 °C 5分で行った. 塩基配列の決定は, (5)16S rRNA遺伝子の塩基配列解析と同様の方法で行った.

系統樹は, MEGA6ソフトウェアを使用し, 近隣結合法により作成した.

結果

1 確認培地による性状確認

供試菌株6株について, 生化学的性状を確認したところ, 全てが同一の性状を示した(表2). *E. albertii*は生化学的性状により, Biogroup 1, Biogroup 2及びNon 1/2(Biogroup 1, 2以外)に分類される^{3,9,10)}が, 供試菌株はNon 1/2に分類された.

2 PCR法

PCR法により, *E. albertii*特異的配列等の有無を検討したところ, 全ての株で*eae*, *clpX*, *lysP*, *mdh*が陽性であっ

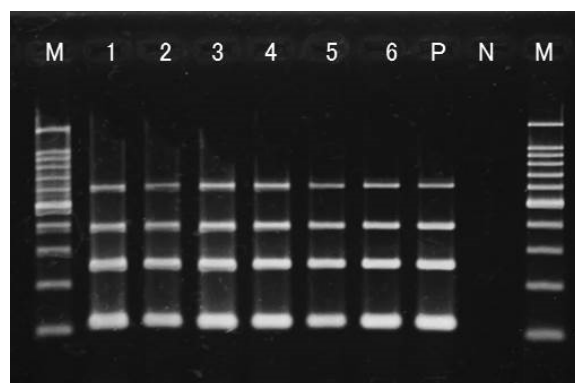


図1 *eae*, *clpX*, *lysP*, *mdh*遺伝子の検出 (M: サイズマーカー(100 bp DNAラダー), 1-6: 供試菌株, P: 陽性コントロール(*eae*: 591 bp, *clpX*: 383 bp, *lysP*: 251 bp, *mdh*: 114 bp), N: 陰性コントロール)

表2 供試菌株の生化学的性状

供試菌株	Biogroup 1	Biogroup 2	Non 1/2
乳糖・白糖分解性	-		
ブドウ糖分解性	+		
H ₂ S産生	-		
リジン脱炭酸	+	-	+
インドール	+	+	+
運動性	-		
VP反応	-		
クエン酸利用能	-		
キシロース発酵	-		

Biogroupの分類に必要な性状のみ記載.

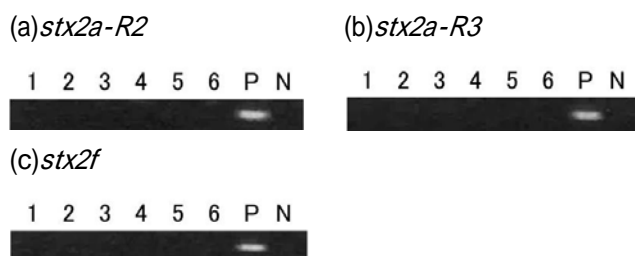


図2 *stx2a*及び*stx2f* 遺伝子の検出 (1-6: 供試菌株, P: 陽性コントロール, N: 陰性コントロール)

た(図1). *E. albertii*特異的配列である*clpX*, *lysP*, *mdh*が陽性であったことから, これらは*E. albertii*であると同定された. また, *stx2a*及び*stx2f*はともに陰性で, ペロ毒素非産生株であることが確認された(図2).

3 薬剤感受性試験

18剤の抗菌剤含有ディスクを用いて, ディスク拡散法による薬剤感受性試験を実施した. 供試菌株6株ともに, 使用した全ての薬剤に感受性を示し, 耐性株は見られなかった.

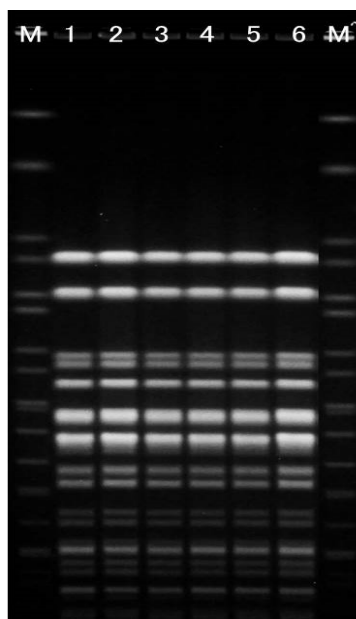


図3 PFGEによる分子疫学解析

(M: サイズマーカー(*S. Braenderup* H9812), 1-6: 供試菌株)

4 PFGE

PFGE解析は, 制限酵素*Xba*を用いて, DNA切断パターンの比較を行った. 解析結果を図3に示す. 全ての供試菌株の泳動パターンが一致した.

5 16S rRNA遺伝子の塩基配列解析

供試菌株のうち1株について, シーケンサーを用いて16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し, 得られた塩基配列を検討した.

村上ら⁸⁾が報告した塩基配列解析結果と比較したところ, 本研究において調査した菌株は, *E. albertii*のクラスターに分類され, アカゲラ由来の菌株(KWB09-398)と100%一致した(図4).

6 MLSA

供試菌株のうち1株について, *E. albertii*の7つのハウスキーピング遺伝子(*adk-fum-gyrB-icd-mdh-purA-recA*)を連結した塩基配列を用いて系統樹解析を行った. 村上ら⁸⁾が報告した解析結果と比較したところ, 本研究において調査した菌株は, *E. albertii*のクラスターに分類された(図5).

考 察

E. albertii は2003年に*Escherichia*属の新種として発表された菌種であり, 日本では静岡県¹¹⁾, 沖縄県¹²⁾や宇都宮市¹³⁾等において, 本菌を原因とする食中毒事例が発生している. 本菌は特徴的な生化学的性状を示さないことから, その同定の難しさが指摘されている.

今回, 愛媛県で発生した食中毒疑い事例において, 検査を実施した10名中6名から*E. albertii*疑い株が分離された. 分離された菌株6株について精査するため, 生化学

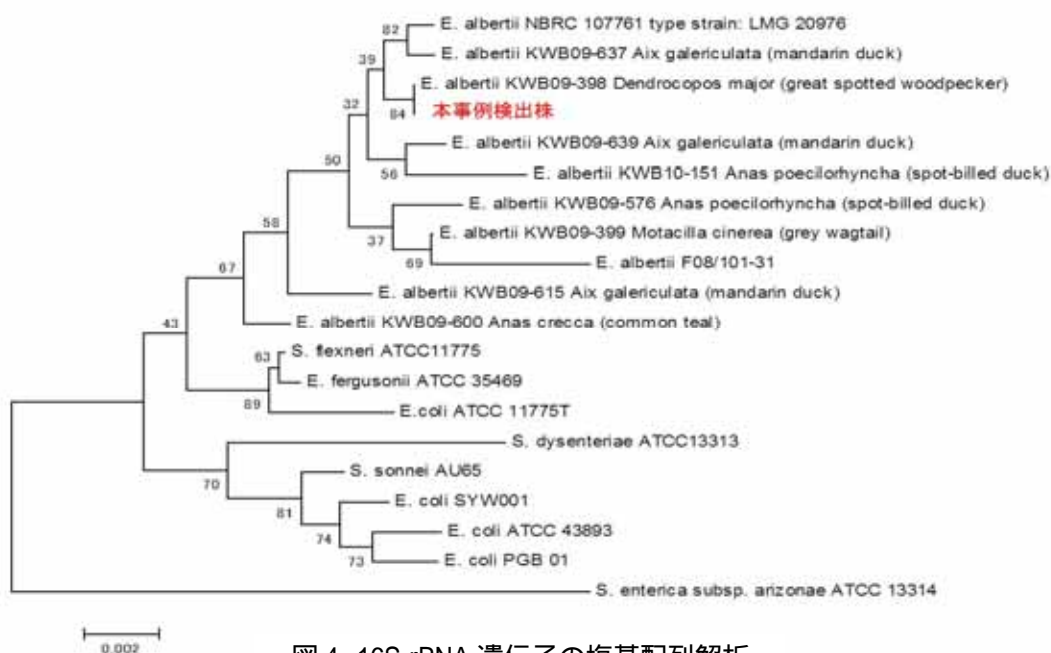


図4 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

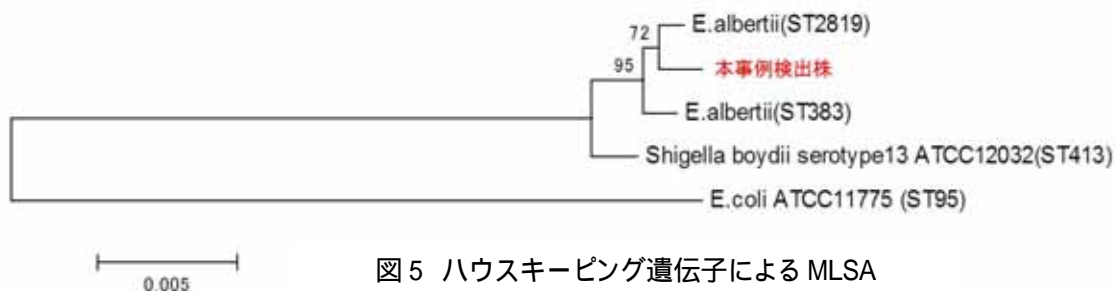


図5 ハウスキーピング遺伝子による MLSA

的性状の確認, *E. albertii* 特異的配列の検出, 薬剤感受性試験, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析及びハウスキーピング遺伝子による MLSA を実施した。生化学的性状は, 非運動性, 乳糖非分解, 硫化水素非産生, そしてキシロース非発酵であり, *E. albertii* を疑うべき性状と一致した。さらに, PCR 法による *E. albertii* 特異的配列等 (*aeae*, *clpX*, *lysP*, *mdh*) が検出されたことで *E. albertii* と同定された。これらの検査は *E. albertii* の同定に多く利用されているが, 本事例においても有用であったと考えられる。

生化学的性状による Biogroup 型別では, リジン脱炭酸陽性/インドール産生陽性で, Non 1/2 に分類された。大岡ら³⁾ は, 96.2% の *E. albertii* がリジン脱炭酸陽性/インドール産生陽性であると報告し, Oaksら⁵⁾ はトリから分離された *E. albertii* がこの性状であったことを報告している。また, 村上らが報告した分離株もこの性状であり, 再型別の必要性を提唱している⁸⁾。

薬剤耐性試験の結果は, すべての薬剤に感受性であった。中国では多剤耐性化した *E. albertii* の検出が報告されている¹⁴⁾ が, 日本においては今のところ報告されていない。今後, 海外からの耐性菌の持ち込みや拡散には注意しなければならない。

PFGE のバンドパターンは供試菌株 6 株で一致した。これらは生化学的性状, 薬剤感受性試験の結果が同一であり, また, PFGE によるバンドパターンが一致したため, 感染の原因や経路は不明であるものの, 同一クローン由来の株であると考えられた。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析及び MLSA の結果を村上らの報告⁸⁾ と比較したところ, 供試菌株はそれぞれ *E. albertii* のクラスターに含まれた。これらの結果は, 生化学的性状の検査結果及び PCR による特異的遺伝子検出による同定結果を支持するものであった。また, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析によると, 最も近縁であった菌株はトリから分離されたものであり, もともと本菌は鳥類に広く分布しているため, 本事例でもトリ由来株が何らかの原因で感染した可能性が考えられた。

本菌種が認知されるに従って, 全国での報告例が増え, 今後も報告が増加することが予想される。このた

め, 今後も発生状況を注視する必要がある。

まとめ

- 1 食中毒疑い事例から検出された菌株について, 生化学的性状の確認, 特異的配列の検出により, *E. albertii* と同定され, その Biogroup は, Non 1/2 であると分類された。
- 2 薬剤感受性試験の結果, 用いた全ての薬剤に感受性であった。
- 3 生化学的性状, 薬剤感受性試験の結果は同一であり, PFGE による泳動パターンが一致したため, 同一クローン由来の株であると考えられた。
- 4 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析及び MLSA の結果, 供試菌株は *E. albertii* のクラスターに含まれた。
- 5 本菌種が認知されるに従って, 全国での報告例が増え, 今後の発生動向を注視する必要がある。

文献

- 1) Huys G, et al: Int J Syst Evol Microbiol: 53, 807-810(2003)
- 2) Ooka T: Jpn J Food Microbiol: 34, 151-157(2017)
- 3) Ooka T, et al: Emerg Infect Dis, 18, 488-492(2012)
- 4) 平成28年11月9日付, 健感発1109第2号, 厚生労働省健康局結核感染症課長通知
- 5) Oaks JL, et al., Emerg Infect Dis 16: 638-646(2010)
- 6) Hyma KE, et al: J bacteriol: 187, 619-628(2005)
- 7) 病原微生物検出情報月報, 37, 100-101(2016)
- 8) K. Murakami, et al: Jpn J Infect Dis, 67, 204-208(2014)
- 9) Nataro J, et al, Escherichia, Shigella, and Salmonella, 670-687, In Murray P et al, Manual of clinical microbiology, 9th edition, ASM Press, Washington DC(2007)
- 10) Lindsay Oaks J, et al: Emerg Infect Dis, 16, 638-646(2012)
- 11) 病原微生物検出情報月報, 37, 254-255(2016)
- 12) 病原微生物検出情報月報, 37, 252-253(2016)
- 13) 病原微生物検出情報月報, 38, 175-176(2017)
- 14) Qun Li, et al: Front Microbiol, 9, 258-265(2018)