

4 *Escherichia albertii* の分離同定方法の検討

○高橋宏明, 菊地利紀

1 はじめに

Escherichia albertii は, グラム陰性通性嫌気性桿菌で, 2003 年に大腸菌 (*Escherichia coli*) の近縁菌種として新たに命名された¹⁾。ヒトに下痢等の消化器症状を惹起し, 国内では, 本菌による患者 100 名を超える集団感染事例が報告されている²⁾。現在までヒト, ネコ, ブタ, 家禽などからの分離が報告されているが³⁾, 保菌状況は不明な点が多い。また, 特徴的な生化学的性状を持たないため, 他の菌種, 特に大腸菌と誤同定されやすく⁴⁾, 標準的な分離同定方法の確立が求められている。

2005 年に Hyma ら⁵⁾が *E. albertii* の同定方法としてマルチプレックス PCR を報告して以降, 選択培地を用いた分離培養と同 PCR の組み合わせにより, 種々の動物からの分離が報告されてきた^{4), 6)}。そこで我々は昨年度, ウシ 20 頭, ブタ 141 頭, 家禽 269 羽からスクリーニングにマルチプレックス PCR を用いた同定方法により, *E. albertii* の分離を試みたところ, ブタ 4 頭でスクリーニング陽性となったが, *E. albertii* の分離には至らなかった。近年, マルチプレックス PCR は *E. albertii* 以外の菌種で *lysP* 及び *mdh* と同サイズのバンドを検出し得るため, 必ずしも *E. albertii* に特異的ではないとする報告⁷⁾が挙げられており, 昨年度の調査はこの報告を支持する結果となった。

そこで本調査では, 主に分離が報告されているブタのみを対象とし, マルチプレックス PCR と XRM-MacConkey⁸⁾による分離培養の組み合わせにより, *E. albertii* の分離を試みるとともに, *E. albertii* の検出限界について検討したので, その概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) と畜場搬入ブタからの *E. albertii* の分離

① 供試材料

所管と畜場に搬入された 37 農場 200 頭のブタの盲腸便を検体とした。

② 採材, 増菌培養

供試動物の盲腸を切開し, 滅菌綿棒(日本綿棒株式会社)で盲腸便を採材した。10mL の緩衝ペプトン水(BPW, 日本製薬株式会社)に懸濁し, 37°C, 好気条件下で一晩培養した。

③ スクリーニング

増菌液を同一採材日, 同一農場ごとに 100 μ L ずつ等量混和(最大 5 検体)し, ボイル法(100°C, 10 分加熱後, 10,000 \times g, 2 分遠心)により DNA 抽出したものを PCR 用鋳型とした。*clpX*, *lysP*, *mdh* の 3 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR⁵⁾を行い, 3 遺伝子が検出された検体をスクリーニング陽性とした。

④ 分離培養, PCR

スクリーニング陽性となった増菌液を XRM-MacConkey⁸⁾に塗抹後, 37°C の好気条件下で一晩培養した。同培地上に発育した無色コロニーからボイル法により DNA を抽出し, *E. albertii* 特異的配列検出用プライマー⁷⁾を用いて PCR を行った。

(2) *E. albertii* の検出限界の検討

① 供試材料

宮城県保健環境センターより分与された *E. albertii* 1 株及びと畜場に搬入されたブタ 1 頭の盲腸便を試験に供した。採材した盲腸便はマルチプレックス PCR 陰性であることを確認した。

② 生菌数算定

E. albertii 菌株を BPW に接種後、37°C、18-24 時間培養して *E. albertii* 培養液を作製した。培養液をリン酸緩衝液により 10^{-8} まで段階希釈し、 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ の各希釈液 100 μ L を普通寒天培地 2 枚にそれぞれ滴下した。コンラージ棒を用いて培地全面に広げ、37°C、18-24 時間好気培養後、発育したコロニー数を計測して生菌数を算定した。

③ *E. albertii* と盲腸便の混合液の *E. albertii* 検出限界

E. albertii 培養液の原液 100mL、10mL、1mL 及び各希釈段階液 1mL をチューブに分注し、2000 \times g、10 分間遠心後、上清を廃棄した。その後、ブタの盲腸便を滅菌綿棒により採取し、重量測定後、集菌した *E. albertii* 及び BPW10mL をそれぞれ加え、表 2 のとおり混合液を作製、37°C、18-24 時間培養した。各混合液 100 μ L をボイル法により DNA 抽出し、マルチプレックス PCR を行った。PCR 陽性となった混合液を XRM-MacConkey に 1 白金耳量塗抹し、37°C、18-24 時間培養した。同培地上に発育した無色コロニーを釣菌し、血液寒天培地に純培養した分離株について *E. albertii* 特異的配列検出用プライマーを用いて PCR を行った。

3 結果

(1) と畜場搬入ブタからの *E. albertii* の分離

37 農場 200 頭のスクリーニングの結果、3 農場 18 検体が陽性となった。スクリーニング陽性となった検体の増菌液を XRM-MacConkey により分離培養したところ、1 農場 4 検体から無色コロニーを分離した。同分離株について PCR により *E. albertii* 特異的配列の検出を行ったところ、すべて陰性となった。

(2) *E. albertii* の検出限界の検討

本試験に用いた *E. albertii* 培養液の生菌数は 2.2×10^8 CFU/mL であった(表 1)。また、*E. albertii* と盲腸便の混合液についてマルチプレックス PCR を行ったところ、陽性バンドが確認できた *E. albertii* の最小添加量は 2.2×10^6 CFU であった(表 2)。陽性となった各混合液 1 白金耳量を XRM-MacConkey により分離培養したところ、すべての混合液から無色のコロニーが得られ、PCR 検出限界菌量 (2.2×10^6 CFU) 添加の混合液からは 3 個の無色コロニーが得られた。XRM-MacConkey に発育した無色コロニーのうち、 $2.2 \times 10^{10} \sim 10^7$ CFU 添加の混合液から各 10 分離株及び 2.2×10^6 CFU 添加の混合液から得られた 3 分離株について、PCR により *E. albertii* 特異的配列の検出を行った。その結果、 $2.2 \times 10^{10} \sim 10^7$ CFU を添加した混合液から得られた 40 分離株はすべて陽性となったが、 2.2×10^6 CFU を添加した混合液から得られた 3 分離株のうち、1 分離株が陽性、2 分離株は陰性となった。

表 1. *E. albertii* 培養液の生菌数

		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	生菌数(CFU/mL)
<i>E. albertii</i> コロニー数	1枚目	176	21	3	0	2.2×10^8
	2枚目	217	22	2	0	

有効コロニー数: 10~100

表 2. *E. albertii* と盲腸便の混合液の PCR 検出状況及び *E. albertii* 分離状況

<i>E. albertii</i> 添加量 (CFU)	2.2×10^{10}	2.2×10^9	2.2×10^8	2.2×10^7	2.2×10^6	2.2×10^5	2.2×10^4	2.2×10^3
盲腸便重量(g)	0.248	0.259	0.276	0.237	0.193	0.189	0.231	0.193
マルチプレックス PCR	+	+	+	+	+	-	-	-
分離率	10/10	10/10	10/10	10/10	1/3	-	-	-

4 考察

E. albertii は 2003 年に命名された新興細菌であり、未だ不明な点が多い。特徴的な生化学的性状を示さない上、他の菌種、特に大腸菌と誤同定されやすい特徴を持つ。また、一部の菌株が Vero 毒素 2f 遺伝子を保有することが報告されており⁴⁾、食中毒の原因となり得るため、*E. albertii* の標準的な分離同定方法の確立は急務となっている。

本調査では、ブタから *E. albertii* の分離を試みた結果、3 農場 18 検体がスクリーニング陽性となったが、*E. albertii* の分離には至らず、スクリーニングに用いるプライマーについて検討を要する結果となった。

E. albertii と盲腸便の混合液のマルチプレックス PCR では、陽性バンドが確認できた *E. albertii* の最小添加量は 2.2×10^6 CFU であった。したがって、増菌培地 (BPW10mL + 盲腸便) に *E. albertii* が 2.2×10^6 CFU 以上存在していれば、マルチプレックス PCR により検出できる菌量まで増殖可能であることが明らかとなった。分離培養では、マルチプレックス PCR 陽性となったすべての混合液から無色のコロニーが得られ、PCR 検出限界菌量 (2.2×10^6 CFU) を添加した混合液からは 3 分離株が得られた。得られた無色のコロニーについて、 $2.2 \times 10^{10} \sim 10^7$ CFU 添加の混合液から各 10 分離株及び 2.2×10^6 CFU 添加の混合液から得られた 3 分離株について、*E. albertii* 特異的配列の検出を行ったところ、前者の 40 分離株はすべて陽性となり、後者の 3 分離株のうち 1 分離株が陽性、2 分離株が陰性となった。このことから、増菌培地内において、*E. albertii* 菌量が少ない場合には、他の細菌との競合により *E. albertii* の増殖効率が低下することが考えられた。既報⁹⁾では、増菌培養の過程で *E. albertii* 以外の夾雑菌の増殖を抑制する選択的増菌培地が報告されており、今後は *E. albertii* を効率的に増菌させる方法を検討するとともに、*E. albertii* 菌量が少ない場合でも検出可能な分離同定方法を模索していきたい。

5 参考文献

- 1) Huys G, et al: *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children, *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 807-810, 2003
- 2) 大岡唯祐: 新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii*, 日本食品微生物学会雑誌, 34, 151-157 (2017)
- 3) Vero 毒素産生株が散見される新興感染症原因菌 *Escherichia albertii* について (IASR Vol. 37 p. 98-100: 2016 年 5 月号)
- 4) Ooka, T., Seto, K., Kawano, K., Kobayashi, H., Etoh, Y., et al.: Clinical significance of *Escherichia albertii*, *Emerg. Infect. Dis.*, 18, 488-492 (2012).
- 5) Hyma K et al: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, *J Bacteriol* 187: 619-628, 2005
- 6) 比嘉万里子, 岡野祥, 高良武俊: 家畜における *Escherichia albertii* 保菌状況調査と分離株の解析, 日獣会誌 74, 315-320 (2021)
- 7) Maeda E, Murakami K, Okamoto F, Etoh Y, Sera N, Ito K, Fujimoto S : Nonspecificity of primers for *Escherichia albertii* detection, *Jpn J Infect Dis*, 67, 503-505 (2014)
- 8) Hinenoya A et al: Development of XRM-MacConkey agar selective medium for the isolation of *Escherichia albertii*, *Diagn Microbial Infect Dis*, Volume 97, Issue 1, May 2020, 115006
- 9) Wakabayashi Y., Seto K., Kanki M., Harada T., Kawatsu K. (2022) Proposal of a novel selective enrichment broth, NCT-mTSB, for isolation of *Escherichia albertii* from poultry samples. *J Appl Microbiol.* 132(3):2121-2130. doi: 10.1111/jam.15353.