

Escherichia albertii の分離同定方法の検討

○高橋宏明, 菊地利紀, 工藤剛, 天野隆之

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⁾。現在までヒトのほか, ネコ, ブタ, 鶏肉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, 他の菌種と誤同定されやすく³⁾, 標準的な分離同定方法の確立が求められている。

本調査は, *E. albertii* の分離同定方法として通常用いられる DHL 寒天培地とマルチプレックス PCR 法 (従来法) により, ウシ, ブタ, 食鳥から同菌の分離を試みるとともに, 近年報告された XRM-マッコンキー寒天培地と菌種特異的 PCR 法 (改良法) により精査したので, その結果を報告する。

2 材料および方法

(1) 供試材料

宮城県のと畜場および食鳥処理場に搬入されたウシ 20 頭 (5 農場), ブタ 141 頭 (33 農場), 食鳥 (ブロイラー 269 羽 (26 農場), アイガモ 42 羽 (2 農場), フランスガモ 10 羽 (1 農場)) の盲腸便を検体とした。

(2) 採材, 増菌

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 (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 PCR

増菌液を同一採材日・同一農場ごとに 100 μ L ずつ等量混和したプール試料とし, 100°C, 10 分間加熱処理したものを PCR 用鋳型とした。*clpX*, *lysP*, *mdh* の 3 遺伝子を標的としたプライマーセット⁴⁾を用いて PCR を行い, 3 遺伝子が検出されたプール試料をスクリーニング陽性とした。

(4) 分離培養, マルチプレックス PCR

従来法: スクリーニング陽性となった増菌液を DHL 寒天培地 (栄研化学株式会社) に塗抹し, 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, スクリーニングと同様のプライマーセットを用いたマルチプレックス PCR を実施した。

改良法: マルチプレックス PCR で 3 遺伝子が検出された分離株を XRM-マッコンキー寒天培地⁵⁾ に塗抹後, 37°C の好気条件下で一晩培養し, 発育したコロニーの性状を確認した。

(5) 菌種特異的 PCR, 生化学的性状検査

マルチプレックス PCR で 3 遺伝子を検出した分離株について, 菌種特異的 PCR⁶⁾ を実施し, *E. albertii* 特異的配列の検出を試みた。また, 簡易同定キット (API20E, ビオメリュー・ジャパン株式会社) を用いて生化学的性状検査を実施した。

3 結果

(1) スクリーニング PCR

ブタの1農場4検体のプール試料が陽性となった。ウシ、食鳥では、すべて陰性となった。

(2) 分離培養, マルチプレックス PCR

従来法:スクリーニング陽性となった1農場4検体の増菌液を DHL 寒天培地により培養し、無色のコロニーをマルチプレックス PCR に供したところ、2検体由来2分離株から3遺伝子が検出された。

改良法:マルチプレックス PCR で3遺伝子が検出された2分離株を XRM-マッコンキー寒天培地により純培養したところ、一方は無色のコロニーを形成したが、他方は赤色コロニーを形成した。

(3) 菌種特異的 PCR, 生化学的性状検査

マルチプレックス PCR 陽性となった2分離株について菌種特異的 PCR を行ったところ、いずれも陰性となった。これらの分離株について簡易同定キット(API20E)による生化学的性状検査を行ったところ、それぞれ *Providencia stuartii*(APIコード:0260200)および *Serratia ficaria*(APIコード:1206573)が推定された。

4 考察

*E.albertii*は2003年に承認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¹⁾、腸管出血性大腸菌と誤認される可能性もあるため、*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。

本調査では従来法および改良法により、ウシ、ブタおよび食鳥から *E.albertii* の分離同定を試みた結果、ブタの 33 農場のうち1農場4検体のプール試料がスクリーニング陽性となり、そのうち2検体から分離された2株がマルチプレックス PCR 陽性となったが、菌種特異的 PCR は陰性となった。

2005年に Hyma ら⁴⁾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、DHL 寒天培地等の選択培地を用いた培養と同 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^{7), 8)}。しかし、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* に特異的でないとする報告がある⁶⁾。他方で、マルチプレックス PCR による3遺伝子の検出により *E.albertii* を同定している既報もある⁹⁾。それゆえ、今回分離された2分離株は従来法において *E.albertii* と同定され得るが、その生化学的性状において、一方はリシン脱炭酸陰性、他方はリシン脱炭酸陰性およびラムノース・メリビオース分解能を有する点が既報¹⁾とは異なる結果となった。また、菌種特異的 PCR ではいずれも陰性を示し、1分離株は XRM-マッコンキー寒天培地上で赤色を示す等、改良法の結果においても既報⁵⁾と相違した。これらの結果から、従来法で分離された2分離株を *E.albertii* とする確証を得られず、正確な菌種名は不明のまま残された。今後は、今回分離された2分離株について、*E.albertii* に特異的と報告のある他のプライマーの使用等、分離同定方法に関する検討を重ねるとともに、家畜および家禽における *E.albertii* の保有状況を明らかにしていきたい。

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) *Escherichia* の新種 *E.albertii* について (IASR Vol. 33 p. 134-136: 2012 年 5 月号)
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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)
- 7) Ooka, T., Seto, K., Kawano, K., Kobayashi, H., Etoh, Y., et al.: Clinical significance of *Escherichia albertii*, *Emerg. Infect. Dis.*, 18, 488-492 (2012).
- 8) Wang, H., Li, Q., Bai, X., Xu, Y., Zhao, A., et al: Prevalence of *eae*-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China. *Epidemiol. Infect.*, 144, 45-52 (2016).
- 9) 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)