

(5)ブタにおける *Escherichia albertii* の PCR 検出限界の検討

○三宅沙季、加藤千尋、高橋宏明、西村肇

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、国内でも本菌による患者 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³⁾。また、特徴的な生化学的性状を持たないほか、大腸菌と誤同定されやすく⁴⁾ 公衆衛生分野で標準的な分離同定方法の確立が求められている。

E. albertii の同定方法として、2005 年に Hyma らが *clpX*、*lysP*、*mdh* の 3 遺伝子を標的とした multiplex PCR を報告⁵⁾して以降、*E. albertii* 特異的配列検出用プライマーを用いた PCR⁶⁾ (以下菌種特異的 PCR) 及び nested PCR⁷⁾ による PCR などの手法が開発されてきている。

国内のと畜場搬入豚における *E. albertii* の浸潤状況調査では、検出率は 10%~20%であったと報告されている^{8), 9)}。当所では、令和 3 年度から令和 4 年度に所管と畜場搬入豚における保菌状況調査を行ったところ、multiplex PCR を用いたスクリーニング検査で 6.5%が陽性となったものの菌分離はされなかった。multiplex PCR が必ずしも *E. albertii* に特異的でないとする報告⁶⁾があることから、本調査では当所における *E. albertii* 保菌状況調査方法を確立することを目的として、multiplex PCR の他、菌種特異的 PCR 及び nested PCR の *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)材料

E. albertii 菌株は宮城県保健環境センターより分与された 1 株を用いた。

試験液の調製にあたっては、と畜場に搬入されたブタ複数頭から採材した盲腸内容物を試験に供した。滅菌盲腸内容物は、採材したブタの盲腸内容物をオートクレーブ (121℃、15 分) によって滅菌し、作製した。

(2)方法

1. *E. albertii* 培養液の作製及び生菌数算定

E. albertii 菌株から一白金耳量を 10mL の緩衝ペプトン水 (以下 BPW、日本製薬株式会社) に接種した後、好気条件下 37℃で一晩振とう培養し、*E. albertii* 培養液を作製した。

E. albertii 培養液を BPW により 10 倍段階希釈し、 10^{-3} ~ 10^{-8} の各希釈液 100 μ L を普通寒天培地 2 枚にそれぞれ接種した。コンラージ棒を用いて均一に塗布し、好気条件下 37℃で一晩培養後、発育したコロニー数を計測して生菌数を算定した。算定した生菌数は各試験液における PCR の検出限界の評価のための指標として用いた。

2. 試験液の調製

盲腸内容物からの増菌培養及び PCR による検出限界を確認するため、以下の 3 種類の試験液を準備した。各希釈段階の試験液は調製後に好気条件下 37℃で一晩振とう培養を実施した。

①培養液のみ

E. albertii 培養液から 10 倍段階希釈した各希釈段階液を試験液とした。

②滅菌盲腸内容添加培養液

E. albertii 培養液から 10 倍段階希釈した各希釈段階液 9mL に対し滅菌盲腸内容物 1mL を添加し、試験液とした。

③盲腸内容添加培養液

E. albertii 培養液から 10 倍段階希釈した各希釈段階液 9mL に対し盲腸内容物約 1g を添加し、試験液とした。

3. DNA の抽出

培養前後の各希釈段階の試験液は、いずれもボイル法を用いて DNA を抽出した。ただし、盲腸内容添加培養液についてはボイル法に加え、簡易 DNA 抽出キット version2 (以下抽出キット、kaneka) による抽出を試みた。

①ボイル法における DNA 抽出

各希釈段階の試験液の上清 100μL をヒートブロッカーによって 100℃で 10 分間加熱した後、氷上に 5 分間静置、10,000×g で 10 分間遠心した上清を DNA テンプレートとして PCR に用いた。

②抽出キットにおける DNA 抽出

各希釈段階の試験液の上清 10μL から付属の説明書に従い DNA を抽出した。

4. 試験液からの検出限界の検討

培養前後の各試験液から抽出した DNA をテンプレートとして、multiplex PCR、菌種特異的 PCR、nested PCR の各種 PCR 法による検出限界を確認した。

3 結果

各試験液に用いた *E. albertii* 培養液の生菌数は表1の通りであった。

培養前の試験液における各種 PCR 検出限界を表2に示した。①培養液のみでは、multiplex PCR、nested PCR で 3.8×10^3 CFU/mL、菌種特異的 PCR で 3.8×10^5 CFU/mL であった。②滅菌盲腸内容添加培養液では、すべての PCR で 2.8×10^4 CFU/mL であった。③盲腸内容添加培養液では、ボイル法により DNA 抽出を実施した場合、multiplex PCR、菌種特異的 PCR 及び nested PCR (first) においてすべての濃度で陰性であった。nested PCR (second) では 2.7×10^4 CFU/mL であった。抽出キットにより DNA 抽出を実施した場合は multiplex PCR、菌種特異的 PCR で 4.9×10^5 CFU/mL、nested PCR で 4.9×10^4 CFU/mL であった。

培養後の試験液における各種検出限界を表3に示した。①培養液のみでは、すべての PCR で 3.8 CFU/mL であった。②滅菌盲腸内容添加培養液では、すべての PCR で 2.8 CFU/mL であった。③盲腸内容添加培養液では、ボイル法により DNA 抽出を実施した場合、multiplex PCR、菌種特異的 PCR 及び nested PCR (first) においてすべての濃度で陰性であった。nested PCR (second) では 2.7 CFU/mL であった。抽出キットにより DNA 抽出を実施した場合はすべての PCR で 4.9 CFU/mL であった。

表1 *E. albertii* 培養液の生菌数

	生菌数 (CFU/mL)
① <i>E. albertii</i> 培養液のみ	3.8×10^8
② 滅菌盲腸内容添加培養液	2.8×10^8
③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法)	2.7×10^8
③-2 盲腸内容添加培養液 (抽出キット)	4.9×10^8

表2 培養前の試験液における各種PCR検出限界 (CFU/mL)

	multiplex PCR	菌種特異的PCR	nested PCR
① <i>E. albertii</i> 培養液のみ	3.8×10^3	3.8×10^5	3.8×10^3
② 滅菌盲腸内容添加培養液	2.8×10^4	2.8×10^4	2.8×10^4
③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法)	-	-	2.7×10^4 ※
③-2 盲腸内容添加培養液 (抽出キット)	4.9×10^5	4.9×10^5	4.9×10^4

※③-1のnested PCRにおけるfirst PCRではすべての濃度で陰性となった。

表3 培養後の試験液における各種PCR検出限界 (CFU/mL)

	multiplex PCR	菌種特異的PCR	nested PCR
① <i>E. albertii</i> 培養液のみ	3.8	3.8	3.8
② 滅菌盲腸内容添加培養液	2.8	2.8	2.8
③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法)	-	-	2.7※
③-2 盲腸内容添加培養液 (抽出キット)	4.9	4.9	4.9

※③-1のnested PCRにおけるfirst PCRではすべての濃度で陰性となった。

4 考察

2003年に承認された新興細菌である *E. albertii* は、国内において集団食中毒事例が報告されており、公衆衛生分野で標準的な分離同定方法の確立が求められている。当所で実施した過去の *E. albertii* 保菌状況調査においては multiplex PCR を用いたスクリーニング検査で 6.5% が陽性となったものの、菌分離はされなかった。multiplex PCR が必ずしも *E. albertii* に特異的でないとする報告⁶⁾もあり、当所における保菌状況調査で PCR の結果と菌分離が一致なかった要因として、検体とした所管と畜場搬入豚が *E. albertii* を保菌していない可能性、*E. albertii* を保菌していても盲腸内容中の他の菌に増殖が阻害され、検出限界まで増菌できていない可能性、または盲腸内容中の夾雑物等により PCR が阻害されている可能性、さらにこれらの複合的な要因が考えられた。

本調査では、当所における保菌状況調査方法の確立を目的として、*E. albertii* 培養液、滅菌盲腸内容添加培養液及び盲腸内容添加培養液における各種 PCR の検出限界を比較した。

①培養液のみ、②滅菌盲腸内容添加培養液、③-2 盲腸内容添加培養液 (抽出キット) における培養前の検出限界は、いずれの PCR においても $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL 程度であった。また、これらの条件における培養後の検出限界は、いずれの PCR においても 10^0 CFU/mL 程度であった。このことから盲腸内容物中の他の菌や夾雑物が存在していても *E. albertii* を保菌していれば、一晚培養後の検出限界はいずれの PCR でも同程度であることが明らかとなった。

一方、③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法) においては、multiplex PCR、菌種特異的 PCR で培養前後ともに陰性であった。③-2 抽出キットで DNA 抽出を行った場合では、培養液中の *E. albertii* は PCR で陽性であり、十分検出が可能な菌量まで増殖していると推定できたことから、③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法) においても、*E. albertii* は増菌できていたと考えられる。ボイル法による DNA 抽出では、抽出キットより盲腸内容物中の夾雑物の影響を排除しきれずに PCR の反応が阻害された可能性が考えられた。③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法) においては nested PCR のみ陽性を確認した。nested PCR では、first PCR で目的の遺伝子領域が増幅された産物を second PCR のテンプレートとしているため、second PCR のみで陽性を確認できたと考えられる。また、②滅菌盲腸内容添加培養液と③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法) は、ともにボイル法による DNA 抽出を行ったものの ③-1 盲腸内容添加培養液 (ボイル法) のみすべての濃度において陰性であった。盲腸内容物中の夾雑物は PCR を阻害すると推察されたが、滅菌盲腸内容物中の夾雑物はオートクレーブによって熱変性したため、未滅菌の盲腸内容物に比べ PCR 反応を阻害せず、このような違いが見られたと考えられた。

本研究の結果より、夾雑物による影響を排除するためには抽出キットによる DNA 抽出が有効であり、培

養後の増殖した菌量では multiplex PCR、菌種特異的 PCR および nested PCR で同程度の感度を持つことが分かった。multiplex PCR は *E. albertii* 以外の菌種も非特異的に検出してしまう可能性があることや、nested PCR は検査のために 2 回の PCR を必要とすることを踏まえ、今後の保菌状況調査においては培養後、抽出キットで DNA 抽出を行い、菌種特異的 PCR による検出方法を試行する。併せて、調査後に実施する *E. albertii* 菌株の分離同定をより確実なものとするため、*E. albertii* 以外の夾雑菌の増殖を抑制する増菌培地を検討し、分離同定方法も確立していきたい。

5 参考文献

- 1) Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J: *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) Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TA, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T: Clinical significance of *Escherichia albertii*, *Emerg Infect Dis*, 18:488-492 ,2012
- 5) Hyma K , Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, *J Bacteriol* 187: 619-628, 2005
- 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, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, Tokuoaka E, Furukawa M, Harada S, Yoshino S, Seto J, Ikeda T, Yamaguchi K, Murase K, Gotoh Y, Imuta N, Nishi J, Gomes TA, Beutin L, Hayashi T: Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. *Genome Biol Evo*,Nov,3: 3170-3179,2015
- 8) 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)
- 9) 佐藤空見子, 永井章子, 小原準, 遠藤千春, 林哲也, 大岡唯祐, 瀬戸順次, 村上光一:山形県内と畜場搬入豚の *E.albertii* 保菌状況及びその疫学的特徴, 日獣会誌 73:265-273,2020