

# 9

# 調査研究

---

## (1) 報 文

---

1) 大分県における <i>Escherichia albertii</i> の疫学調査 .....	33
--	----

## 大分県における *Escherichia albertii* の疫学調査

溝腰 朗人、後藤 高志\*、佐々木 麻里、成松 浩志、加藤 聖紀

### Epidemiological study of *Escherichia albertii* in Oita Prefecture

Akito Mizokoshi, Takashi Goto, Mari Sasaki, Hiroshi Narimatsu and Miki Kato

Key word : *Escherichia albertii*, 下痢症 Diarrhea, 河川水 River water, 食肉 meat

#### 要 旨

2003年に*Escherichia*属の新種として確立・命名された*Escherichia albertii* (以下*Ea*) について、当センターに保存された*eae* 遺伝子保有菌107株から探索を行ったところ、7株が*Ea*であったと判明した。また、過去の研究で推定された下痢症に占める*eae* 遺伝子保有大腸菌の検出率と組み合わせ、下痢症における*Ea*の寄与率を推定したところ、0.5%~1%程度と推定された。

県内に流通する食肉、および河川水における*Ea*の分布について、PCR法で確認するとともに、*Ea*の分離を試みた。食肉40検体について調査を行ったが、いずれからでも*Ea*は検出分離されなかったことから、流通する食肉における*Ea*の汚染率は高くないと推定された。

河川における*Ea*の汚染調査では、公共用水域の常時監視として採水された河川水57地点分延べ200検体を用いて調査を行った。その結果、7検体においてPCR法で陽性となり、うち2検体について*Ea*の分離に成功した。また、PCR法で陽性となった河川水中の*Ea*菌濃度(最確数)は、最大で71.7MPN/100mL程度と推定された。

#### はじめに

*Escherichia albertii* (以下*Ea*) は2003年に*Escherichia*属の新種として確立・命名された新興下痢症原因菌で、これまでヒト以外にブタ、野鳥、鶏肉などから分離されている<sup>1,2)</sup>。国内における集団感染事例も報告<sup>3)</sup>されており、大分県においても2005年にキャンプ場の湧き水を原因とした大規模な食中毒が発生している(廻り調査で判明)<sup>4)</sup>。菌の性状としては、病原性大腸菌の腸管上皮細胞への付着因子の一つとされるインチミンの遺伝子(*eae*)が陽性であり、37°Cで非運動性という特徴が報告<sup>1,2)</sup>されているが、大腸菌と紛らわしい性状であるため誤同定されやすく、確立された分離検査法はまだない。このため、国内における*Ea*の分布や疫学的な報告も少ない。

そこで、当センターにおける*Ea*検査体制を検討しつつ、当センターの保存菌株について*Ea*の廻り調査を行い、*Ea*の分布や過去の食中毒事件や散発

性下痢症における*Ea*の寄与状況把握を試みた。また、食肉や河川水からの*Ea*検出を試み、県内における*Ea*の分布状況や食中毒予防に資する疫学情報把握を試みた。

さらに、PCR法で*Ea*に特異的な遺伝子が検出された検体にあつては、菌の分離を試みるとともに、PCR法を用いた3×3本の最確数法による菌数の推定を行った。

#### 材料および方法

*Ea*の検出方法としては、Ookaらの報告<sup>5)</sup>による*Ea*特異的PCR法(Nested PCR法のファーストPCR用プライマーE\_al\_1OFとE\_al\_1OF OR)を用いた。

VT2f遺伝子の検出には、国立保健医療科学院における細菌研修のテキスト<sup>6)</sup>のプライマーstx2fk\_S1とstx2fk\_A1を用いた。

DNA抽出(テンプレート調製)については、キレックス液[Chelex 100 Resin 200-400 Mesh Sodium Form (BioRad)を5%w/vの割合でTris-EDTA緩衝液(pH8.0)に混じたもの]200μLに菌体(純培

\* : 現、豊肥保健所

養菌や増菌液の遠心沈渣など)を懸濁し、99℃10分の加熱後に12000rpm 5分遠心して得られた上清をDNAテンプレートとした。

*Ea*の分離や糖分解性状確認用の培地として、長野らが報告<sup>7)</sup>した、乳糖の代わりにキシロース、ラムノースおよびメリビオースを各1%の割合でマッコニー基礎培地(Difco)に添加したもの(以下、albertii用培地1)、またはalbertii用培地1に乳糖も1%濃度で添加した培地(以下、albertii用培地2)を調製して用いた。

分離菌株の生化学的性状確認は、TSI、LIM、シモンズのクエン酸塩培地(SC)(以上、栄研化学)、酢酸ナトリウム培地(BD)、およびXMプロス(エルメックス)の各培地や簡易菌種同定キットIDテストEB-20(日水製薬)を用いて行った。

一部の*Ea*は、大腸菌のO血清に交差凝集性を示すこと<sup>1)</sup>から、病原性大腸菌免疫血清1号セット(デンカ生研)を用いてスライド凝集法でO血清型別も行った。

保存菌株の遡り調査として、1991年から2018年の間に*eae*保有大腸菌として分離同定・保存された107株(EHEC除く)を用いた。内訳は大分県感染症発生動向調査の細菌性下痢症サーベイランス由来65株、食中毒由来9株、健康者由来6株、鶏肉由来7株、ウシ便由来19株、シカ刺し由来1株である。これらについて、PCR法を用いて*Ea*の確認を行い、*Ea*と判定された菌株については、さらにalbertii用培地1を用いて糖非分解コロニーの形成を確認した。

食肉検体としては、2019年度に当センターへ収去検体として搬入された食肉40検体(牛1検体、豚19検体、鶏20検体)を用いた。食肉検体75gを0.1%ペプトン加生理食塩水150mLでリンスし、2×mEC(栄研化学)25mLにリンス液25mLを加え、36℃20時間培養した。培養後、培養液1mLを採取し、増菌液からDNAを抽出し、PCR法で*Ea*の遺伝子検出を試みた。

河川水検体としては、2019年度の大分県公共用水域の水質測定計画に基づき、大分県内の環境基準点等において6月から3月(11月を除く)にかけて採水された河川水57地点分延べ200検体について、大腸菌群数測定に使用した残りを*Ea*調査に利用した。河川水50~60mLを遠心分離により集菌・濃縮し、PBS(-)又は生理食塩水1mLに懸濁し、河川水濃縮液とした。この河川水濃縮液500mLを非選択的増菌培地であるTSB培地(Difco)2mLへ添加し

36℃20時間培養した。その後TSB増菌液からDNAを抽出し、PCR法により*Ea*の遺伝子を検索した。なお、12月以降の検査にあつては、*Pseudomonas*属菌など偏性好気性菌の増殖抑制をねらって、TSB培地に滅菌ミネラルオイルを重層して培養した。

PCR法で*Ea*陽性が確認された河川水検体については、PCR法を用いた最確数法(3本法)によって河川水中の菌数の推定を行った。すなわち、河川水濃縮液の原液、10倍および100倍希釈液を100μLずつ各希釈段階当たり3本のTSB培地2mLに接種し(3段階×3本)、36℃20時間培養した。次いで、各TSB培養液からDNAを抽出し、PCR法で*Ea*の遺伝子の有無を確認し、その希釈段階と陽性本数から河川水濃縮液に含まれる菌数(最確数)を算出し濃縮率で割り戻して推定した。

さらにPCR法で*Ea*遺伝子陽性となった河川水検体については、*Ea*の菌分離を試みた。主な分離方法としては、TSB培養液をalbertii用培地1、又はalbertii用培地2に画線塗抹して36℃20時間培養後、発育した糖非分解コロニーを釣菌し普通寒天培地(栄研化学)に塗抹して純培養した。オキシダーゼ試験紙(日水製薬)を用いてオキシダーゼ陰性を確認した純培養菌株について、5~10株を1グループとしてまとめてPCRにかけて*Ea*の遺伝子を検索した。陽性があれば、そのグループ内の各菌株を個別にPCRにかけて*Ea*株を特定した。特定された*Ea*株については、その生化学性状等を調べた。

## 結果

保存菌株の遡り調査にあつては、*eae*遺伝子保有大腸菌保存菌107株のうち7株が*Ea*であった。内訳は、下痢症サーベイランス由来6株、食中毒由来1株であった。また、いずれの株も、albertii用培地1、albertii用培地2で糖非分解のコロニーを形成した。*Ea*と判明した菌株の由来、生化学的性状等については、表1-1~1-2に示す。共通してリジン陽性、インドール陽性、運動性陰性、乳糖、キシロース、ラムノースおよびメリビオースの4糖については非分解で、βグルクロニダーゼ(MUG分解)陰性であった。

7株全てVT2f遺伝子は陰性であった。

この7株の検出年は、2001年に1株、2002年に2株、2003年に1株、2011年に2株、2016年に1株であった。下痢症サーベイランス由来株が65株中6株(9.2%)、食中毒由来株が9株中1株(11.1%)であったが、健康者や家畜・食肉由来株からは見つからなかった。

食肉検体にあつては、検査した食肉40検体いずれからも *Ea* を検出しなかった。

河川検体にあつては、200検体のうち、7検体(3.5%)がPCR法で陽性となった。最確数法による河川水中の *Ea* 濃度は、5MPN未満/100mL～71.7MPN/100mLと推定された。検出した地点、*Ea* 濃度等を表2に示す。

今回 *Ea* の遺伝子が検出された7地点の多くが河川の上流域、もしくは中山間地域の河川であった。同一地点での複数回の検出はなかった。また、PCR法で陽性となった河川水検体のうち12月の2検体から *Ea* が分離された。この2検体はTSB培地での増菌時に滅菌ミネラルオイルを重層して培養された。分離された *Ea* 株の生化学的性状等を表3に示す。ヒトの下痢症由来株と同様な性状であった。2株ともVT2f遺伝子は陰性であった。

### 考 察

当センターにおいて大腸菌として保存された *eae* 遺伝子保有菌107株のうち7株が *Ea* であり、少なくとも2001年から県内で *Ea* が下痢症から分離されていたことが明らかになった。また、下痢症由来 *eae* 遺伝子保有菌の約9.5% (74株中7株) が *Ea* であると判明した。

当県での以前の研究<sup>8)</sup>において、下痢症サーベイランス由来大腸菌株および食中毒疑い患者から得られた大腸菌株合計119株のうち、12株(10.1%)が *eae* 遺伝子陽性(うち6株(5.0%)がEHEC、6株(5.0%)がEPEC)であった。その後の県内の下痢症サーベイランスにおける *eae* 保有菌の毎年の検出率もおおよそ5~10%程度であり(データ省略)、これに今回判明した *eae* 保有菌株中の *Ea* の割合9.5%を乗じると、県内の下痢症に占める *Ea* の寄与率は、0.5%~1%程度と推定された。

今回の菌株の遡り調査で判明した7株の *Ea* と河川水から分離された2株の *Ea* の生化学的性状は全てMurakamiら<sup>9)</sup>の提唱する生物グループ3に当てはまり、国内で最も多く分離されるタイプであった。O血清型については、大半は市販血清で型別不能(OUT)か擬凝集(OR)を示したが、O161、O128およびO103など大腸菌のO血清に凝集するのが各1株認められ、大腸菌と間違われやすい要因の一つと思われた。一部の *Ea* はベロ毒素VT2fを産生する<sup>12)</sup>とされるが、今回の調査でVT2fの遺伝子を保有する株は認められなかった。

食肉における *Ea* の汚染状況調査として、国産・外国産を問わず県内で入手できる食肉40検体(牛肉1検体、豚肉19検体、鶏肉20検体)を検査したが、いずれからも *Ea* は検出されなかった。今回、牛肉は1検体しか検査していないので評価できないが、当センターで毎年実施している食肉の取去検査でサルモネラやカンピロバクターは鶏肉の10~20%程度に検出されている(データ省略)。また、国内のAsoshimaらの調査<sup>10)</sup>では、鶏肉からの *Ea* の検出率は1.9%と低いことから、当県で流通する鶏肉や豚肉における *Ea* の汚染率についても、サルモネラ等と比べればそれほど高くないと推察された。ただし、検体数も少なく食肉からの検査法も確立されてはいないのでさらなる研究が必要とされる。

河川における *Ea* の分布調査においては、河川水57地点分延べ200検体を検査したところ、PCR法により7検体が陽性となった(検出率3.5%)。同一地点で複数回検出されていないことから、特定の地域に限って汚染されているのではなく、県内河川で幅広く検出されうると考えられた。また、今回検出された地点の多くが山間部の上流域や中山間地域の河川であり、中には当該地点上流側に人家があまりみられない地点(南田位橋、津民小橋)もあることから、*Ea* はヒトや生活系排水を由来とするものではなく、むしろ自然環境(野生動物の糞尿等由来など)に由来する可能性が考えられる。この点に関連して、Hinenoyaらは、国内の野生アライグマが高率(PCR陽性57.7%)に *Ea* を保菌していることを報告<sup>11)</sup>しており、注目される。

河川水中の菌数は、河川水100mLあたり5MPN未満から71.7MPN程度と推定され、大腸菌群数と比較すると、菌数はかなり少ない。また、100mLあたりの菌数が5MPN未満の検体が多いことから、検体における *Ea* 菌数が少なすぎるため検出できていない可能性があり、濃縮に用いる河川水検体の量を増やせば、PCR法での検出率は向上すると考える。*Ea* による食中毒発症菌量は明確になっていないが、水が原因と疑われる食中毒事例においては、十分な量の検水を確保する必要があると考える。

河川水からの *Ea* の分離にあつては、確実性をもって分離できる手法が定まっていない。また、PCR法による *Ea* の遺伝子の検出の報告はあるが、実際に河川水から *Ea* が分離された報告はほとんどない。そのような中、本報告の分離方法は一定の有用性を示した。albertii用培地1,2において、



*Pseudomonas* 属菌が *Ea* 同様の糖非分解コロニーを形成するため、分離率を著しく低下させる要因となっている。増菌培養時に培地に滅菌ミネラルオイルを重層することによって簡便に酸素を遮断し、嫌気的条件下で培養することで、偏性好気性菌である *Pseudomonas* 属菌の増殖を抑えることができ、結果として *Ea* の分離率向上に寄与すると考える。また、河川水中に存在し、同様に非分解コロニーを形成する *Aeromonas* 属菌や *Morganella* 属菌等の増殖を抑制するためにも、培養温度の検討や選択剤の検討も重要かと考えられた。今後とも、*Ea* の分離率を向上できるよう方法を検討したい。

参 考 文 献

1) 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(3), 151-157 (2017)

2) Shantanu Bhatta et al.: The Evasive Enemy: Insights into the Virulence and Epidemiology of the Emerging Attaching and Effacing Pathogen *Escherichia albertii*. Infect Immun, 87(1), e00254-18 (2018)

3) Masuda K et al.: Epidemiological Aspects of *Escherichia albertii* Outbreaks in Japan and Genetic Characteristics of the Causative Pathogen. Foodborne Pathog Dis, 17(2), 144-150 (2020)

4) 緒方喜久代ら: キャンプ場の湧き水を原因とし

た食中毒事例 (大分県). 公衆衛生情, 47(4), 11-13 (2017)

5) Ooka T et al.: Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. Genome Biol Evol 7(12), 3170-3179 (2015)

6) 平成27年度国立保健医療科学院細菌研修「遺伝子検査法」実習テキスト

7) 長野恵吾ら: 新興腸管感染症起因菌 *Escherichia albertii* 選択分離培地の開発. 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会抄録, 演題No.12, 29 (2017)

8) 成松浩志ら: 大分県における下痢症由来大腸菌の病原性関連遺伝子の保有状況調査. 大分県衛生環境研究センター年報. 29, 51-55 (2001)

9) Murakami K et al.: Non-biogroup 1 or 2 Strains of the Emerging Zoonotic Pathogen *Escherichia albertii*, Their Proposed Assignment to Biogroup 3, and Their Commonly Detected Characteristics. Front Microbiol, 10, Article 1543 (2019)

10) Asoshima N et al.: Isolation of *Escherichia albertii* from Raw Chicken Liver in Fukuoka City, Japan, Jpn J Infect Dis, 68,248-250 (2015)

11) Atsushi Hinenoya et al.: Prevalence of *Escherichia albertii* in Raccoons (*Procyon lotor*), Japan. Emerging Infectious Diseases, 26(6), 1304-1307 (2020)

表1 PCR法でEaと判定された保存菌株の由来

番号	由来	年齢	性別	分離年月	O血清型	備考
1	サーベイランス	2	男	2001/8	O128	同時検出菌 カンピロバクター
2	サーベイランス	1	女	2002/8	OUT*	下痢、腹痛、粘血便 純培養状
3	サーベイランス	8	男	2002/11	O161	下痢、腹痛 黄色ブドウ球菌
4	サーベイランス	14	男	2003/9	OUT	下痢、発熱
5	サーベイランス	11	女	2011/9	OUT	
6	食中毒(疑い)	3	男	2011/6	OUT	家族4名中有症の2名を検査し1名から分離
7	サーベイランス	2	女	2016/5	OUT	下痢

※:分離当時はO153

表2 PCR法でEa陽性となった河川水の採水地点等およびEa最確数

採取月	水域名	採水地点	河川水中のEa菌数 (MPN/100ml)			(参考) 河川水の 大腸菌群数 (MPN/100ml)	Eaの 分離
			Ea菌数	95%C.I. 下限	95%C.I. 上限		
9月	大野川上流	犬飼	< 5	-	-	17,000	無
9月	大野川上流	猿飛橋	6.7	< 0.83	33.3	130,000	無
10月	寄藻川	浮殿橋	< 5	-	-	3,300	無
10月	玖珠川	協心橋	71.7	11.7	350	33,000	無
10月	朝見川上流	南田位橋	< 5	-	-	33,000	無
12月	津民川	津民小橋	< 5	-	-	1,300	有
12月	伊呂波川	高津橋	15	1.7	60	1,100	有

表3 PCR法でEaと判定された保存菌株および河川水分離のEa株の生化学的性状

菌株番号 または 採水地点	TSI培地		LIM培地				XMブロス			酢酸塩	大腸菌 O血清型	albertii用培地1 でのコロニー	簡易同定による 推定菌種
	斜面/高層		L	I	M	SC	X-GAL	MUG	I				
保存菌株-1	-/AG		+	+	-	-	-	-	+	NT	OUT*	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-2	-/AG		+	+	-	-	-	-	+	NT	O161	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-3	-/AG		+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	-	+	NT	O128	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-4	-/AG		+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	-	+	NT	OUT	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-5	-/AG		+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	-	+	NT	OUT	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-6	-/AG		+	+	-	-	-	-	+	NT	OUT	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
-7	-/AG		+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	-	+	NT	OUT	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
津民小橋	-/AG		+	+	-	-	+ <sup>w</sup>	-	+	+	OR	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>
高津橋	-/AG		+	+	-	-	-	-	-	+	O103	糖非分解(無色)	<i>Escherichia coli</i>

NT:未検査 ※:分離当時はO153

TSI培地での-/AGは、斜面部で乳糖・白糖非分解で、高層部で糖からの酸・ガス産生を示す。

LIM培地での性状は左からL:リジンの分解性、I:インドール産生、M:運動性

SC:シモンズのクエン酸塩培地でのクエン酸利用性

XM-ブロスでの性状;左からX:X-GAL分解性、M:MUG分解性、I:インドール産生、+<sup>w</sup>:弱陽性

簡易同定による推定菌種:IDテストEB-20による検査で推定された菌種