

食中毒疑い事例検査における新規病原菌 *Escherichia albertii* の検出

今野貴之 八柳 潤 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 千葉真知子 齊藤志保子

2011 年 11 月に秋田県内の一保健所管内における食中毒疑い事例において、腸管病原性大腸菌 (EPEC) や多くの腸管出血性大腸菌の病原因子として知られるインチミンの遺伝子 (*eae*) を持った菌が患者から分離された。今回、我々は菌の生化学的な性状やリボソームの小サブユニットを構成する 16S rRNA 遺伝子の解析に加え、*stx*, *eae*, *uidA*, *lysP*, *mdh*, *cdtB* の有無を EPEC と比較した PCR 法により本菌を新規の下痢原性病原菌とされる *Escherichia albertii* と同定した。

1. はじめに

Escherichia albertii は、ヒトに下痢原性を示す可能性のある新規のエシエリキア属菌として 2003 年に報告された^{1,2)}。*E. albertii* は、当初、腸管病原性大腸菌 (EPEC) や多くの腸管出血性大腸菌の病原因子として知られるインチミンの遺伝子である *eae* を持った非典型的な *Hafnia alvei* とされていたが、その後の研究でハフニア属ではないことが示された^{1,3-5)}。これらの *H. alvei* 様の菌は、Huys ら²⁾ による遺伝学的な系統解析により新規のエシエリキア属菌 *E. albertii* とされた。

Sharma らは、*E. albertii* がアメリカ合衆国における約 62,000,000 事例の原因不明の食中毒及び 3,200 の死亡例の要因のうちの 1 つかもしれないことを指摘している^{6,7)}。しかしながら、日本における *E. albertii* の分離報告はほとんどなく、その疫学や病原菌としての重要性についてはこれまでのところ分かっていない。

2011 年 11 月、秋田県において患者 22 人の食中毒疑い事例が発生した。我々はこの事例において *eae* を保有する EPEC 様の菌を分離し、菌の生化学的な性状試験、細菌の系統解析に広く用いられる 16S rRNA 遺伝子の解析や *stx*, *eae*, *uidA*, *lysP*, *mdh*, *cdtB* に対する PCR 法等の遺伝学的な手法により本菌の同定を試みた。

2. 方法

2.1 菌分離

施設従業員便 16 検体、患者便 19 検体、施設内拭き取り 10 検体に関して食中毒原因菌及び

ノロウイルスを調査した。食中毒原因菌としては、病原大腸菌 (腸管出血性大腸菌含む)、赤痢菌、サルモネラ属菌、ビブリオ属菌、エルシニア、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、ウェルシュ菌を調査した。

病原大腸菌の検出は、PCR 法により各病原大腸菌の主要な病原因子、すなわち腸管出血性大腸菌の *stx*, EPEC の *eae*, 腸管侵入性大腸菌の *invE*, 毒素原性大腸菌の *est* 及び *elt*, 腸管集合性大腸菌 *aggR* 及び *astA* の有無を確認することで行った⁸⁻¹¹⁾。

生化学的な性状は、indole 及び lysine decarboxylase の産生性、lactose 及び xylose の発酵性、motility (運動性) について調査した。

2.2 16S rRNA の相同性解析

16S rRNA の遺伝子解析は Falske¹²⁾ ら及び Lane¹³⁾ らの方法を基に行った。

遺伝子の相同性解析は、BLASTN.2.2.24 によるオンラインの解析システムにより行った (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)。

2.3 *E. albertii* と EPEC の保有因子の比較

stx 及び *eae* に加えて、EPEC の確認のため、大腸菌に特異的な *uidA* の検出を行った。一方、*E. albertii* の確認は、Hyma ら¹⁴⁾ が報告した *lysP* と *mdh* を標的にした *E. albertii* 検出用の PCR 法により行った。また、*E. albertii* の病原因子の一つとして報告されている *cdtB* についても、Tóth ら¹⁵⁾ の報告を基に検出を行った。また、*cdtB* の型別を Kim ら¹⁶⁾ の報告を基に行った。

表1 *E. albertii* 同定 PCR に使用したプライマー

Target	Property	Sequence (5'-3')
<i>stx</i>	Shiga toxin	GAGCGAAATAATTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT
<i>eae</i>	intimine	CAGGATCGCCTTTTTATACG CTCTGCAGATTAAACCTCTGC
<i>uidA</i>	beta-D-glucuronidase	TCAGCGCGAAGTCTTTATACC CGTCGGTAATCACCATTCCC
<i>lysP</i>	lysine-specific permease	GGGCGCTGCTTTCATATATTCTT TCCAGATCCAACCGGGAGTATCAGGA
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	CTGGAAGGCGCAGATGTGGTACTGATT CTTGCTGAACCAGATTCTTCACAATACCG
<i>cdtB</i>	cytolethal distending toxin	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA

3. 結果と考察

2011 年 11 月に秋田県内で発生した食中毒疑い事例の検査では、患者便より EPEC O 抗原型別不能が 1 名から、ノロウイルスが 2 名から検出された。また、ノロウイルスが検出されたうちの 1 名から、病原大腸菌の検査に関連して EPEC 様の菌株 (EC15062) が検出された。

EC15062 は病原大腸菌の検査で *eae* のみ (+) で *stx* を含むその他の病原大腸菌の主要病原因子は (-) であった (図 1)。そのため、当初、EC15062 は EPEC であると予想された。しかしながら、生化学的な性状試験の結果、indole (+), lysine (+) であるが、motility (-), lactose (-), xylose (-) であり、大腸菌としては極めて非定型的性状であることが確認された (表 2)。

次に、EC15062 の 16S rRNA 遺伝子の一部 823 nt に関して、相同性解析を実施したところ、EC15062 の配列は *E. albertii* strain KWB09-600 (accession no. HM194877) の配列と 100% 一致したものの、多くの大腸菌の配列とも高い相同性を示した。一般に、非定型的な性状を示す菌の同定には、16S rRNA 遺伝子の相同性解析が有用であることが知られているが、*E. albertii* と大腸菌は非常に近縁であり、EC15062 の同定においては 16S rRNA 遺伝子の相同性解析では不十分と思われた。

そこで、EC15062 が EPEC か *E. albertii* かを鑑別するため、EPEC E2348/69 株を対照にして、PCR 法により *stx*, *eae*, *uidA*, *lysP*, *mdh* 及び *cdtB* の検出を行った (図 2)。その結果、EC15062 は、EPEC E2348/69 株と同じく *stx* (-), *eae* (+) である一方、EPEC E2348/69 株とは対照的に、大腸菌に特徴的な *uidA* が (-), *E. albertii* 特異

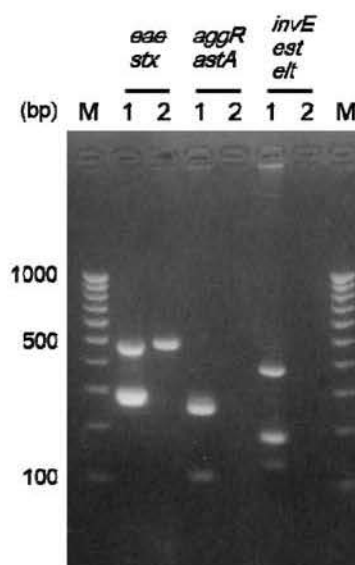


図1 病原大腸菌の主要病原因子の検出
stx (289 bp), *eae* (479 bp), *aggR* (254 bp), *astA* (106 bp), *elt* (186 bp), *est* (130 bp), *invE* (382 bp). Lanes: M, 100 bp size ladder (Bio-Rad); 1, 陽性コントロール; 2, EC15062.

的に設計された *lysP* 及び *mdh* が (+) であった。これらの結果から、EC15062 は *E. albertii* と同定された。

また、EC15062 は *E. albertii* の病原因子の一つとして報告されている *cdtB* に関しても (+) であった。大腸菌では、CDT はその遺伝子配列から 5 つの型に分けられる。図 3 に示したように、EC15062 の *cdt* は typeIII と typeV に陽性を示した。これらの結果は、Hyma ら¹⁴⁾ の *E. albertii* の *cdt* の DNA 配列の解析結果と一致した。

E. albertii は、大腸菌の典型的な性状と異なるため、通常の病原大腸菌の検査では見過ごされたり、誤同定を招きかねない。今回、病原大腸

菌の病原因子の探索に加えて, *uidA* や *lysP* 及び *mdh* といった菌種特異的もしくは菌種により多型性を持つ遺伝子の PCR を併用することで *E. albertii* の同定が可能であった。ただし, 本事例において *E. albertii* が検出された患者からはノロウイルスも検出されており, 病原性や臨床症状に対する本菌の関与は不明であった。

E. albertii の病原性や疫学, 臨床症状との関連については知見が不足しており, その解明のためには今後もさらなる事例の集積が必要と考えられる。

表2 *E. coli*, *E. albertii*, EC15062 の性状比較

	<i>E. coli</i> ¹⁷⁾	<i>E. coli</i> inactive ¹⁷⁾	<i>E. albertii</i> ¹⁸⁾	EC15062
Motility	+	—	—	—
Indole production	98%	80%	—	+
Lysin decarboxylase	90%	40%	+	+
Lactose fermentation	95%	25%	—	—
Xylose fermentation	95%	70%	—	—

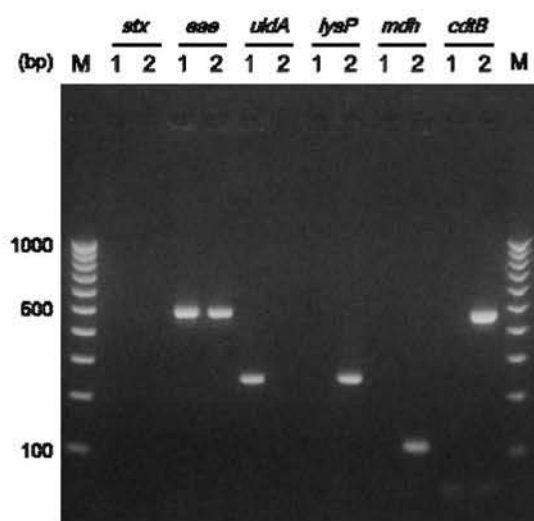


図2 分離株と EPEC における各遺伝子検出比較

Lanes: M, 100 bp size ladder (Bio-Rad);
1, EPEC E2348/69 株; 2, EC15062.

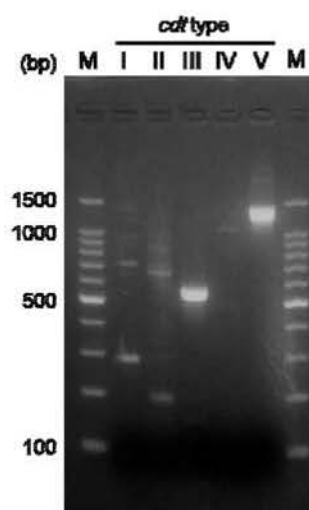


図3 分離株の CDT 型別
Lanes: M.

参考文献

- 1) Albert MJ, Alam K, Islam M, Montanaro J, Rahaman AS, Haider K, Hossain MA, Kibriya AK, Tzipori S: *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans, *Infect. Immun.*, **59**, 4, 1991, 1507–1513.
- 2) 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**, 3, 2003, 807–810.
- 3) Janda JM, Abbott SL, Albert MJ: Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 8, 1999, 2399–2401.
- 4) Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Probert W: Phenotypic and genotypic properties of the genus *Hafnia*, *J. Med. Microbiol.*, **51**, 7, 2002, 575–580.
- 5) Ridell J, Siitonen A, Paulin L, Lindroos O, Korkeala H, Albert MJ: Characterization of *Hafnia alvei* by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR, and partial sequencing of the 16S rRNA gene, *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 9, 1995, 2372–2376.

- 6) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV: Food-related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.*, **5**, 5, 1999, 607–625.
- 7) Sharma M, Kniel KE, Derevianko A, Ling J, Bhagwat AA: Sensitivity of *Escherichia albertii*, a potential food-borne pathogen, to food preservation treatments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 13, 2007, 4351–4353.
- 8) Ito K, Watanabe H, Toyosato M, Kosaka T, Mizuno K: Genetic analysis of *Shigella* pathogenesis and rapid detection method of *Shigella* virulence gene by the polymerase chain reaction, *Jpn. J. Clin. Med.*, **50**, July, 1992, 368–372 (in Japanese).
- 9) Itoh F, Ogino T, Itoh K, Watanabe H: Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers, *Jpn. J. Clin. Med.*, **50**, July, 1992, 343–347 (in Japanese).
- 10) Yatsuyanagi J, Saito S, Ito I: A case of hemolytic-uremic syndrome associated with shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **55**, 5, 2002, 174–176.
- 11) Konno T, Yatsuyanagi J, Saito S: Virulence Gene Profiling of Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-stable Enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) Derived from Sporadic Diarrheal Patients, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **64**, 3, 2012, 314–320.
- 12) Felske A, Rheims H, Wolterink A, Stackebrandt E, Akkermans AD: Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class *Actinobacteria* in grassland soil, *Microbiology*, **143**, 9, 1997, 2983–2989.
- 13) Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR: Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 20, 1985, 6955–6959.
- 14) Hyma KE, 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**, 2, 2005, 619–628.
- 15) Tóth I, Héroult F, Beutin L, Oswald E: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV), *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 9, 2003, 4285–4291.
- 16) Kim JH, Kim JC, Choo YA, Jang HC, Choi YH, Chung JK, Cho SH, Park MS, Lee BK: Detection of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Republic of Korea, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 5, 2009, 525–529.
- 17) Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, O'hara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ: Biochemical identification of new species and biogroups of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens, *J. Clin. Microbiol.*, **21**, 1, 1985, 46–76.
- 18) Abbott SL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL, Janda JM: Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 10, 2003, 4852–4854.