

Ⅲ 報告

新規食中毒原因菌エシェリキア・アルバーティーの迅速検出法の検討と感染源の解明
(平成30～令和2年度)

リアルタイム PCR による *Esherichia albertii* の 迅速検出法の確立

今野貴之 高橋志保 鈴木純恵 檜尾拓子 熊谷優子

新規の食中毒原因菌である *Esherichia albertii* の迅速検出法を確立するため、*E. albertii* に特異的とされる EA0134 遺伝子について、秋田県で初めて分離した *E. albertii* の菌株である EC15062 株を用いてシーケンス解析を行い、リアルタイム PCR に使用するプローブの設計を行った。*E. albertii* EC15062 株を含む *E. albertii* 23 株とその他の菌種 8 株について設計したプローブを用いてリアルタイム PCR を試行したところ、*E. albertii* 23 株すべて陽性、その他の菌種 8 株はすべて陰性であり、*E. albertii* を特異的に検出できることが確認された。また、*E. albertii* EC15062 株の増菌培養液から DNA を抽出してリアルタイム PCR を試行したところ、10 cfu/tube まで安定して検出可能であった。

1. はじめに

Esherichia albertii は、2003 年に新種として承認された菌種で、元々バングラデシュ人民共和国の小児の下痢便から見つかった菌である¹⁾。ヒトに下痢などを引き起こす病原菌と考えられており、秋田県では 2011 年に発生した食中毒疑い事例の検査の過程でこの菌が検出された²⁾。その後、国内においても *E. albertii* の存在が知られるようになり、過去の食中毒における原因菌の再調査などによって、少なくとも 2003 年には国内で *E. albertii* による食中毒が発生していたことが明らかになっている¹⁾。現在では、この菌を原因とする集団食中毒の発生が複数確認されており、*E. albertii* は、公衆衛生上の新たな課題の一つとなっている。

E. albertii は特徴的な性状に乏しく、一般的な細菌検査では同定が困難であり、食品等における検査法は未だ確立されていない。そこで、本研究では当センターの保管菌株を活用し、食品等から迅速検出法として *E. albertii* を特異的に検出できる EA0134 遺伝子のリアルタイム PCR について検討した。

2. 方法

2.1 EA0134 遺伝子のシーケンス解析

E. albertii EC15062 株について、アルカリ加熱抽出法により DNA を抽出した。DNA 抽出液を

テンプレートにし、プライマーとして EA0134-283F (5'-TTG CGT ACT AAC GCA GGA TG-3') 及び EA0134-446R (5'-TGT GAC TGT TGG GCT ATT GG-3') を用いて、PCR を行った³⁾。QIAquick PCR Product Purification Kit (キアゲン) を用いて PCR 増幅断片を精製後、シーケンス解析をファスマック社に依頼して行った。得られた DNA 配列について、BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により *E. albertii* の登録配列と相同性解析した後、代表株について ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて比較解析を行った。

2.2 リアルタイム PCR の評価試験

機器は 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems)、反応試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、プライマーは EA0134-283F 及び EA0134-446R を使用し、プローブは本研究にて設計したプローブを使用した。反応条件は、50℃2 分、95℃10 分の後、95℃15 秒及び 60℃1 分を 45 サイクル行った。特異性を評価するため *E. albertii* 23 株、*E. coli* 3 株 (enteropathogenic *E. coli* 1 株、enteroinvasive *E. coli* 1 株含む)、*Hafnia alvei* 1 株、*Salmonella enterica* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、*Klebsiella aerogenes* 1 株、及び *K. pneumoniae* 1 株を供試した。また、菌数を測定した *E. albertii* EC15062 株の増菌培養液 200μl からアルカリ加熱抽出法

EC15062 0134 gene	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCCGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain KF1 (CP007025)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCCGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain NCTC9362 (CP034213)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCAGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain ChinaSP140150 (CP025676)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCAGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain 1551-2 (CP025317)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCAGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain CB9786 (AP014856)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCCGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50
strain NIAH Bird 3 (AP014855)	ACCTGAATACTCTGATGGCAGCCGAATTATATTAGACGAATCAGAGGAAG	50

EC15062 0134 gene	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain KF1 (CP007025)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain NCTC9362 (CP034213)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain ChinaSP140150 (CP025676)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain 1551-2 (CP025317)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain CB9786 (AP014856)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100
strain NIAH Bird 3 (AP014855)	GTAAATTAGCGTCAGCGTGTTACTTTATAATGAAATGGTGAGTGGTTAT	100

プローブ設計箇所		
EC15062 0134 gene	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTATGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain KF1 (CP007025)	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTATGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain NCTC9362 (CP034213)	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTATGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain ChinaSP140150 (CP025676)	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTATGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain 1551-2 (CP025317)	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTACGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain CB9786 (AP014856)	ATGGTTGATTCCGCTCATCCATCTTACGAAATGCTTCATTTATTTTT	148
strain NIAH Bird 3 (AP014855)	ATGGTTGATTCCATCATCCATCTTACGAAATGCTTCATTTATTTTT	148

図1 *Escherichia albertii* EC15062 株の EA0134 遺伝子と登録配列の比較

により DNA を抽出し、段階希釈して感度を評価した。試験は 2 回行い、1 回につき 2 ウェル測定した。

3. 結果

3.1 リアルタイム PCR 用プローブの設計

シーケンス解析により 148 塩基について DNA 配列を特定した。特定した DNA 配列中には、*E. albertii* の登録配列と 3 ヲ所で不一致があった（図 1）。比較的保存性の高い箇所に 6FAM-CGT CAG CGT GTT ACT TTA TAA TGA AAT GG-TAMRA のプローブを設計した。

3.2 リアルタイム PCR の評価

設計したプローブを用いてリアルタイム PCR を試行したところ、供試した *E. albertii* 23 株すべての陽性を確認した。一方、供試したその他の菌種 8 株はすべて陰性であり、設計したプローブを用いたリアルタイム PCR が *E. albertii* を特異的に検出できることが確認された。

また、*E. albertii* EC15062 株の増菌培養液を用いた検討では、10cfu/tube まで安定して検出可能であった（表 1）。

表 1 リアルタイム PCR の検出感度の検討

検討	ウェル	cfu/tube				
		10 ⁻¹	1	10	100	1,000
Ct値	1回目	1	ND	ND	36.7	32.9
		2	ND	ND	36.8	33.4
	2回目	1	40.4	41.2	34.5	32.2
		2	41.3	38.2	33.7	31.2

ND:不検出。

4. 考察

E. albertii が原因と考えられる食中毒や集団感染が国内で散見されているが、*E. albertii* の検査法は十分に確立されていない。*E. albertii* は、以前は *E. coli*、*Shigella*、*Hafnia alvei* と同定されていたこともあり、通常の検査ではこれらの菌種との鑑別は困難である。また、enteropathogenic *E. coli* の主要な病原因子である *eae* を保有することから、enteropathogenic *E. coli* との鑑別は特に重要である。*E. albertii* の EA0134 遺伝子は *E. albertii* 以外では確認されておらず、本研究で設計したリアルタイム PCR においても enteropathogenic *E. coli* を含むその他の菌種では不検出であり、*E. albertii* に特異的であることが確認された。*E. albertii* は、食中毒における病因物質調査ではその病原因子の共通性から病原大腸菌の検査に付随して分離されることも多く

2), 病原大腸菌との鑑別に時間を要していたが, 本研究で設計したリアルタイム PCR を行うことで, より迅速に *E. albertii* の有無を確認することが可能と考えられる。また, *E. albertii* の選択性が比較的高い培地や非典型的性状の菌株の分離も可能な培養法も報告されていることから^{4,5)}, これらの手法と組み合わせることで, より効率的に *E. albertii* の分離を行えるようになることが期待される。

E. albertii はヒト以外からは鳥類からよく検出されており, 鳥類は自然界での重要な保菌動物と考えられる⁶⁾。トリ肉からも *E. albertii* が分離されているが⁷⁾, 過去の集団食中毒事例においては, 様々な食品が原因として推定されており¹⁾, *E. albertii* の感染源や感染経路についてはよく分かっていない。腸管出血性大腸菌では, 平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号のとおりリアルタイム PCR 等を用いた遺伝子検出を積極的に導入することで食品の検査が効率的に行われている。リアルタイム PCR の検出感度は使用する試薬や検査条件によって異なるが, 適切な系では少なくとも標的とする遺伝子 10 コピー前後の鋳型を検出できるとされている。設計したプローブを用いたリアルタイム PCR の感度は一般的に適切とされている感度と同等であり, 食品等のスクリーニング検査に十分活用できると考えられる。今後, 本研究で確立したリアルタイム PCR を用いて感染源となりうる食品等の調査を進めるとともに, 検出された菌の特性を明らかにすることで, *E. albertii*

の食品等における汚染実態とその感染源の解明が期待される。

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**, 2017, 151-157.
- 2) Konno T., et. al.: Isolation and identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis, Jpn J Infect Dis., **65**, 2012, 203-207.
- 3) Maeda E., et. al.: Nonspecificity of primers for *Escherichia albertii* detection, Jpn J Infect Dis., **67**, 2014, 503-505.
- 4) Hinenoya A., et. al.: Development of XRM-MacConkey agar selective medium for the isolation of *Escherichia albertii*, Diagn Microbiol Infect Dis., 2020, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115006.
- 5) Maheux AF., et. al.: Method for isolation of both lactose-fermenting and -non-fermenting *Escherichia albertii* strains from stool samples, J Microbiol Methods, **154**, 2018, 134-140.
- 6) Oaks JL., et. al.: *Escherichia albertii* in wild and domestic birds, Emerg Infect Dis., **16**, 2010, 638-646.
- 7) Maeda E., et. al.: Detection of *Escherichia albertii* from chicken meat and giblets, J Vet Med Sci., 2015, doi:10.1292/jvms.14-0640.