

都内のと畜場に搬入されたブタの*Escherichia albertii* 検出状況と遺伝子解析

神門 幸大^a, 畠山 薫^b, 小林 甲斐^a, 久保田 寛顕^a, 小西 典子^c, 小林 和弘^d,
藤澤 美和子^e, 横山 敬子^c, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^f

Escherichia albertii は 2003 年に新たに報告された新興下痢症起因菌であり, わが国では本菌を原因とする集団食中毒事例が複数報告されている. 本菌は鳥類や哺乳類から分離報告があるものの, その保菌状況の詳細は明らかになっていない. 本研究では 2019 年から 2020 年に都内のと畜場に搬入されたブタの *E. albertii* 保菌状況を調査し, 分離された菌株について遺伝子解析を行った.

検査したブタ盲腸便 80 検体中 6 検体 (7.5%) から 6 株の *E. albertii* が分離された. すべての分離株が *eae*, *cdtB* 陽性, *stx* 陰性であった. 6 株中 3 株は供試薬剤すべてに感性, 2 株は 2 剤耐性, 1 株は 3 剤耐性であった. PFGE 解析では, 同一バンドパターンを示す分離株が 2 組認められたが, いずれも当センターに搬入された都内下痢症患者由来株とは異なっていた. この 2 組の株はそれぞれ同一農場から出荷されたブタ由来であり, 農場内での同一クローンの存在が示唆された. 全ゲノム解析では約 1,500 の core gene が検出され, 系統解析の結果, 分離株はブタおよびヒト由来株と同一クレードに属した. 今回分離されたブタ由来株はヒト由来株と分子系統学的に近縁であることが示され, ブタにおける本菌の動態について更なる調査が必要であると考えられた.

キーワード: *Escherichia albertii*, ブタ, 食中毒, 全ゲノム解析, core gene, 系統解析

はじめに

Escherichia albertii はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で, 大腸菌 (*Escherichia coli*) に近縁の新種として 2003 年に報告された新興下痢症起因菌である¹⁾. これまでアメリカ, ドイツ, ノルウェー等の様々な国や地域でヒトの感染例が報告²⁾されており, 近年, 国内においても患者数 100 名を超える集団食中毒事例が複数報告されている³⁻⁵⁾.

本菌の保有する病原因子として, 腸管上皮への接着に関わるインチミンや, 外毒素の一つである細胞膨化致死毒素が同定されている²⁾が, 一部の株は腸管出血性大腸菌の主要病原因子である志賀毒素を産生することも報告されている⁶⁾. 国内でも志賀毒素産生株による溶血性尿毒症候群の発生事例が報告⁷⁾されたことを受けて, 2016年11月に厚生労働省から各自治体の衛生主管部局へ本菌についての情報提供を依頼する通知が発出されている⁸⁾.

このように*E. albertii* はヒトへの危害要因として注目されるようになったものの, ヒトへの感染源や感染経路に関する情報は少なく, 不明な点が多い. これらを解明する上で, 環境中における本菌の分布状況を把握し, そこから分離される株とヒト由来株との関連を推定することは非常

に重要である. 本菌は一部の鳥類や哺乳類, 環境水等からの分離が報告されている^{9,10)}が, 保菌状況の詳細や自然宿主についてはいまだ情報が少ない. そこで, 本研究では都内のと畜場に搬入されたブタの*E. albertii* 保菌状況を調査し, 分離された菌株についてゲノム解析を行い, さらに当センターに搬入された都内下痢症患者由来株と比較したのでその結果を報告する.

方 法

1. 検体

2019年および2020年に都内のと畜場に搬入されたブタの盲腸便80検体(14農場由来, 各年40検体)を検査対象とした.

2. リアルタイムPCRによるスクリーニング

検体を滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し, 0.5 mL を EC 培地 (栄研化学) に接種した. 42°C で 18~24 時間培養後, 増菌液 100 µL から DNA 抽出を行い, DNA-binding transcriptional activator of cysteine biosynthesis gene (EAKF1_ch4033, Accession number: CP007025) をターゲット

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
^b 東京都芝浦食肉衛生検査所
108-0075 東京都港区港南2-7-19
^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
^d 東京都動物愛護相談センター
156-0056 東京都世田谷区八幡山2-9-11
^e 東京都動物愛護相談センター 城南島出張所
143-0002 大田区城南島3-2-1
^f 東京都健康安全研究センター微生物部

Table 1. Primers and Probe Used for Screening of *E. albertii*

Name		Sequence (5'-3')
EaF	(forward)	CGTTAAGCGGTTAGGTATCGATTG
EaR	(reverse)	GCGCGTACGGACTGGTAATAAAA
EaT	(probe)	FAM-TTGCTCCAGGAACAGCGGCTTCACT-TAMRA

ットに設計したプライマーおよびプローブ (Table 1) を用いて, リアルタイムPCR法でスクリーニングを行った. 反応試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い, 反応条件は 50°C 2分, 95°C 10分の後, 95°C 15秒および 60°C 1分を 45 サイクルとした.

3. 菌分離および同定

リアルタイム PCR によるスクリーニングで陽性となった培養液を, ラムノースおよびキシロースを添加した DHL 寒天培地 (栄研化学) ならびに MacConkey Agar Base (BD) に塗抹し菌分離を行った. 各培地に発育した無色～白色コロニーを TSI 斜面培地 (日水製薬) および LIM 培地 (日水製薬) に接種し, 乳糖・白糖非分解, リジン脱炭酸能陽性, インドール陽性, 非運動性を示した株について遺伝子抽出を行い, *E. albertii* 特異的 PCR 法¹¹⁾を用いて同定した.

4. 薬剤感受性試験および病原遺伝子検索

E. albertii 特異的 PCR 法により陽性と判定された菌株について, 薬剤感受性試験および病原遺伝子検索を行った.

1) 薬剤感受性試験

米国 CLSI 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づいて試験を行った¹²⁾. β -ラクタム系薬剤として, アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフトキシチン (CFX) の 3 剤, キノロン系薬剤として, ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX) の 4 剤, そのほかの薬剤としてクロラムフェニコール (CP), テトラサイクリン (TC), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), アミカシン (AMK), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST), ホスホマイシン (FOM), イミペネム (IPM) およびメロペネム (MEPM) の 10 剤の計 17 薬剤を用いた.

2) 病原遺伝子検索

既報^{13,14)}に従い PCR 法によりインチミン遺伝子 (*eae*), 志賀毒素遺伝子 (*stx*), および細胞膨化致死毒素遺伝子 (*cdtB*) の検出を行った.

5. 遺伝子解析

遺伝子解析として, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析および次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った.

1) PFGE解析

2019年から2020年に分離され, 当センターに搬入された都内下痢症患者由来株とのPFGE解析による比較を行った. PulseNet (CDC) の方法¹⁵⁾を参考に, 分離菌株および都内下痢症患者由来株からブロックを作製し, 制限酵素 *Xba*I を用いたPFGE解析を実施した. PFGE像の解析にはソフトウェア GelJ ver2.0を使用した. 分離株の泳動パターン類似度はDice係数 (Tolerance 1.0%) により算出し, 系統樹作成は平均距離法 (UPGMA) で行った.

2) 全ゲノム解析

分離株のうちPFGE像が異なった株について遺伝子抽出を行った. Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリー調整後, MiSeq (Illumina) を用いて全ゲノムデータを取得した. *E. albertii* 分離株のデータ4株およびTable 2に示したWEB上で公開されている *E. albertii* 25株の計29株の全ゲノムデータについて, データ解析プラットフォーム Galaxy AUSTRALIA (<https://usegalaxy.org.au/>) の解析ツール Prokka (Galaxy Version 1.14.6+galaxy1) およびRoary (Galaxy Version 3.13.0+galaxy2) を用いてアノテーション付けと core gene (解析した株の 99%以上で共通して存在する遺伝子) の抽出を行った. 抽出された core gene を連結し, 遺伝子解析ソフト Molecular Evolutionary Gene Analysis (MEGA) ver.7を用いて近隣結合法 (Neighbor-Joining Method) による系統樹解析を行った.

結 果

1. *E. albertii* の検出および菌株の性状

検査を行ったブタの盲腸便80検体のうち, 6検体 (7.5%) から6株の *E. albertii* が分離された. 分離された菌株の薬剤感受性試験では, 3剤耐性 (TC, CP, ST) が1株, 2剤耐性 (CP, ST) が2株, 供試薬剤すべてに感性が3株であった. 病原遺伝子の検索では, すべての株で *eae* および *cdtB* が陽性, *stx* が陰性であった (Table 3).

2. 遺伝子解析

1) PFGE 解析

分離株 6 株のうち, 同一バンドパターン (類似度 100%) を示す株が 2 組存在し, これらは同一クローンであることが示唆された. 一方で, バンドパターンの異なった分離株それぞれの類似度は 80% 以下であった. また, 分離株の中で都内下痢症患者由来株と高い類似性を示した株はなかつ

Table 2. Genbank Accession Numbers of *E. albertii* Reference Strains Used for Phylogenetic Tree Analysis

Strain name	Isolation source	Country	Accession Number
NIAH_Bird_3	Wild Bird	Japan	AP014855
RM9973	Wild Bird	USA	CP043271
ChinaSP140150	Wild Bird	China	CP025676
Sample 165	Poultry	China	CP070292
Sample 166	Poultry	China	CP070296
Sample 168	Poultry	China	CP070287
CB10113	Cat	Brazil	BBVR01000001- BBVR01000144
YS-F12-1	Swine	Japan	BJKW01000001- BJKW01000178
YS-F1-1a	Swine	Japan	BJKU01000001- BJKU01000168
YS-F1-2	Swine	Japan	BJKV01000001- BJKV01000128
CB9786	Human	Germany	AP014856
2014C-4015	Human	USA	CP034166
K7744	Human	Japan	BBWB01000001- BBWB01000116
2013C-4143	Human	USA	CP030787
TW07627	Human	Bangladesh	CH991859
KF1	Human	Poland	CP007025
06-3542	Human	USA	CP034162
05-3106	Human	USA	CP030778
1551-2	Human	Brazil	CP025317
2012EL-1823B	Human	USA	CP030783
07-3866	Human	USA	CP030781
Hiroshima3582	Human	Japan	BEGZ01000001- BEGZ01000493
EC03-195	Human	Japan	BBVV01000001- BBVV01000078
EC06-170	Human	Japan	AP014857
EC05-81	Human	Japan	BBVY01000001- BBVY01000050

た (Fig. 1) .

2) 全ゲノム解析

分離株 6 株のうち PFGE パターンの異なった 4 株の全ゲノムデータおよび WEB 上で公開されている *E. albertii* 25 株の全ゲノムデータをもとに core gene の抽出を行った結果, 1,546 個の core gene が抽出された. core gene を連結

Table 3. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *E. albertii* Isolated from Swine

Strain No.	Virulence genes			Antimicrobial resistant
	<i>eae</i>	<i>cdtB</i>	<i>stx</i>	
19-P9	+	+	—	Susceptible
19-P23	+	+	—	Susceptible
19-P25	+	+	—	Susceptible
20-P16	+	+	—	CP, ST
20-P17	+	+	—	CP, ST
20-P35	+	+	—	TC, CP, ST

TC: Tetracycline, CP: Chloramphenicol,
ST: Sulfamethoxazole/Trimethoprim

して行った系統解析では, 分離株は 2 株ずつ 2 つのクレード (Clade I, II) に分かれた (Fig. 2) . いずれのクレードにもヒト由来株およびブタ由来株が含まれていた. 一方で, 野鳥由来株や鶏肉由来株は分離株とは異なるクレードに属していた.

考 察

国内の家畜における *E. albertii* の検出状況として, 山形県や沖縄県での報告^{16,17)}があるが, 本調査の結果, 都内のと畜場に搬入されるブタ糞便材料においても本菌が検出されることが明らかとなった. 検出された 6 菌株の病原遺伝子として, ヒトへの重大な危害要因となりうる *stx* は保有していなかったものの, 腸管への接着に関与すると考えられる *eae* や細胞毒性活性を示すと考えられる *cdtB* を保有していた. したがって, これらはヒトに対して病原性を有する株であると推測された.

分離株の薬剤感受性試験では, 6 株中 3 株が薬剤耐性を示し, そのうち 2 株はブタにおける使用量が多い¹⁸⁾ テトラサイクリンに耐性を示していた. このことから, ブタの飼育時におけるテトラサイクリン系抗菌薬の使用により, 耐性株の選択が起こる可能性が考えられた. 一方で, 近年グラム陰性桿菌において問題となっているフルオロキノロン系抗菌薬や第 3 世代セファロスポリン系抗菌薬に対する耐性は見られなかった.

PFGE 解析により同一バンドパターンを示した 2 組の分離株 (19-P23 と 19-P25 および 20-P16 と 20-P17) は, それぞれ同一農場のブタ由来であった. このことから, 農場に特定のクローン株が存在しており, 同居するブタの間で共有されている可能性が示唆された. 農場内でクローン株が維持されている場合, 農場間のブタの輸送や, 人や物資の移動等に伴って汚染されていない他農場へ本菌が拡散されていく可能性がある. また, 分離株と都内下痢症患者由来株とのバンドパターンの比較では, 類似度が高いものでも

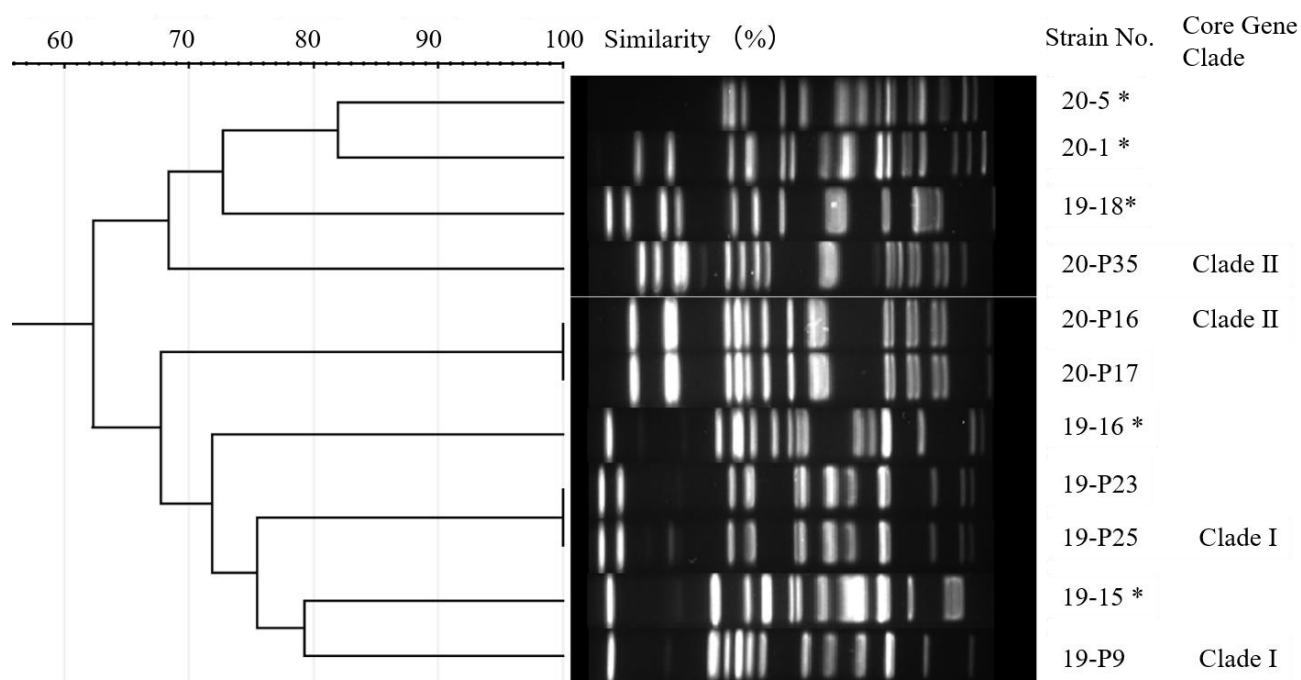


Fig.1. UPGMA Dendrogram of *Xba*I-generated PFGE Patterns of *E.albertii* Strains Isolated from Swine and Diarrhea Patients in Tokyo. Asterisk marks were strains from diarrhea patients. Core gene clade was described clade number in Fig. 2.

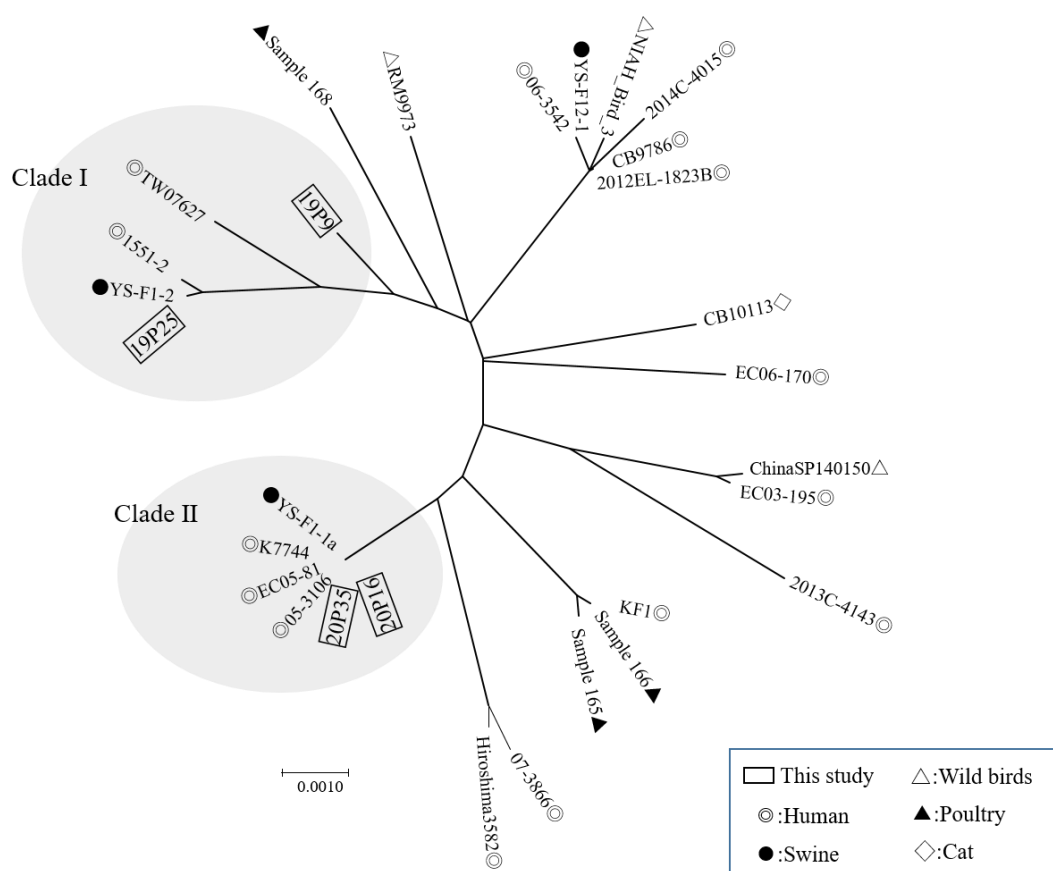


Fig. 2. Phylogenetic Tree Based on Core Gene Mutation of *E. albertii* (Neighbor-Joining Method)

80%以下であり、それぞれの株間の直接的な関連性は低いと推察された。一方で、MiSeqにより取得した全ゲノムデータから抽出したcore geneを用いた系統解析では、分離株は大きく離れた2つのクレードに分類された。いずれのクレードにもデータベース上のヒト由来株およびブタ由来株が属していた。このことから、分離株を含むブタ由来株の中にはヒト由来株と分子系統学的に近縁のものが存在することが明らかとなった。また、分離株は野鳥由来株や鶏肉由来株、ネコ由来株とは異なるクレードに分類された。しかし、データベース上のブタ由来株は野鳥由来株と同一クレードに分類されており、ブタ由来株と他の動物由来株の分子系統学的な違いは明確にはならなかった。

本調査の結果から、ブタが*E. albertii*の保菌動物となりうることを示唆された。さらに、分子系統解析により、一部のブタ由来株とヒト由来株は近縁であることが判明した。過去に国内で発生した本菌による食中毒とブタの関連は明らかではないものの、これらの結果から、食品衛生上の注意が必要であると考えられた。しかし、本調査では定量的な検討を行っておらず、ブタにおける本菌の動態については今後更なる調査が必要である。

本菌は発見から日が浅く、一般的な認知度はいまだ低いと考えられることから、今回実施した調査結果の一部は、食肉衛生検査所を通して当該ブタの出荷者に対しフィードバックが行われた。本菌による食中毒リスク低減のためには、関係組織内での情報共有だけでなく、家畜生産者や食肉関連事業者、消費者に対しても情報提供と注意喚起を合わせて行っていくことが重要である。

ま と め

2019年から2020年に都内と畜場に搬入されたブタの盲腸便80検体を検査対象とし、*E. albertii*の検出および分離した菌株の薬剤感受性試験、病原遺伝子検索および遺伝子解析を行った。

供試した80検体のうち6検体から6株の*E. albertii*を分離した。薬剤感受性試験では1株が2剤耐性、2株が3剤耐性であった。病原遺伝子検索では6株すべてが*eae*、*cdtB*陽性かつ*stx*陰性であった。core geneを用いた系統解析の結果、分離株を含むブタ由来株の一部は、ヒト由来株と分子系統学的に近縁であることが明らかとなった。

本調査の結果から、ブタが*E. albertii*の保菌動物となりうることを示唆された。また、一部のブタ由来株とヒト由来株は近縁であることが判明し、食品衛生上の注意が必要であると考えられた。

文 献

- 1) Huys, G., Cnockaert, M., Janda, J.M., *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, **53**, 807–810, 2003.
- 2) 大岡唯祐：日食微誌, **34**, 151–157, 2017.
- 3) 長岡宏美, 鈴木秀紀, 村田学博, 他：病原微生物情報 (IASR), **37**, 254–255, 2016.
- 4) 高良武俊, 仲間絵理, 喜屋武向子, 他：病原微生物情報 (IASR), **37**, 252–253, 2016.
- 5) 石岡真緒, 関 哲, 中田友理, 若月 章, 他：病原微生物情報 (IASR), **37**, 98–100, 2016.
- 6) Brandal, L.T., Tunsjø, H.S., Ranheim, T.E., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1454–1455, 2015.
- 7) 伊豫田 淳, 石嶋 希, 李 謙一, 他：病原微生物情報 (IASR), **37**, 255, 2016.
- 8) 厚生労働省健康局結核感染症課長：健感発1109第2号, *Escherichia albertii*に係る報告について (依頼) . 平成28年11月9日.
- 9) 日根野谷 淳：日細菌誌, **76**, 175–185, 2021.
- 10) 高橋志保, 今野貴之, 樫尾拓子, 他：日食微誌, **37**, 81–86, 2020.
- 11) Lindsey, R.L., Garcia-Toledo, L., Fasulo, D., *et al.*: *Microbiol. Methods.*, **140**, 1–4, 2017.
- 12) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24), 2014, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- 13) Tóth, I., Hérault, F., Beutin, L., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4285–4291, 2003.
- 14) Konno, T., Yatsuyanagi, J., Takahashi, S., *et al.*: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **65**, 203–207, 2012.
- 15) Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautam, R., *et al.*: *Foodborne Pathog. Dis.*, **3**, 59–67, 2006.
- 16) 比嘉万理子, 岡野 祥, 高良武俊：日獣会誌, **74**, 315–320, 2021.
- 17) 佐藤空見子, 永井章子, 小原 準, 他：日獣会誌, **73**, 265–273, 2020.
- 18) 伊藤 貢, 武田浩輝, 藤原孝彦：豚病会報, **71**, 10–16, 2018.

Detection and Genome Analysis of *Escherichia albertii* Isolated from Swine Brought to a Slaughterhouse in Tokyo

Yukihiro KODO^a, Kaoru HATAKEYAMA^b, Kai KOBAYASHI^a, Hiroaki KUBOTA^a, Noriko KONISHI^a,
Kazuhiro KOBAYASHI^c, Miwako FUJISAWA^d, Keiko YOKOYAMA^a, Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^a

Escherichia albertii is a human enteric pathogen that was recently discovered in 2003 and has been associated with the cases of food poisoning reported in Japan. Although *E. albertii* has been previously isolated from birds and mammals, their role as the carriers of *E. albertii* has not been demonstrated yet. We performed molecular epidemiological analysis of *E. albertii* strains isolated from the swine that were brought to a slaughterhouse in Tokyo from 2019 to 2020.

Six strains of *E. albertii* were isolated from the cecal stools of 6 of the 80 swines. All the isolated strains were positive for the *eae* and *cdtB* genes but were negative for the *stx* gene. Of the six strains, three were susceptible to all the tested drugs while two were resistant to two drugs and one was resistant to three drugs. In pulsed-field gel electrophoresis analysis, two of the swine-isolated strains showed the same pattern, whereas all the strains differed from the strains isolated from the diarrhea patients examined in Tokyo Metropolitan Institute of Public Health. Each of these two sets of *E. albertii* strains was isolated from swine of the same farm, suggesting that the clone strains had existed on the farm. In whole-genome analysis, ~1,500 core genes were detected in the isolated strains. Phylogenetic analysis of these core genes showed that the isolated strains belonged to the same clade as the strains previously isolated from swine and human-isolated strains. As some swine-isolated strains were phylogenetically related to human-isolated strains, further investigation on the source of infection of *E. albertii* in swine is needed.

Keywords: *Escherichia albertii*, swine, food poisoning, genome-wide analysis, core gene, phylogenetic analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Shibaura Meat Sanitary Inspection Station
2-7-19 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-0075, Japan

^c Tokyo Metropolitan Animal Care and Consultation Center
2-9-11 Hachimanyama, Setagaya-ku, Tokyo 156-0056, Japan

^d Tokyo Metropolitan Animal Care and Consultation Center Jonanjima Branch Office
3-2-1 Jonanjima, Ota-ku, Tokyo 143-0002, Japan