

称号及び氏名	博士(獣医学)	XU BINGTING
学位授与の日付	2023年9月23日	
論文名	Development of an <i>Escherichia albertii</i> selective enrichment broth and bacteriological characterization of <i>E. albertii</i> isolated from wild raccoons (<i>Procyon lotor</i>) in Osaka, Japan (<i>Escherichia albertii</i> の選択増菌培地の開発とそれを用いたアライグマからの <i>E. albertii</i> の分離及び分離菌の性状解析)	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	堀江 真行
	副査	日根野谷 淳

論文要旨

緒言 *Escherichia albertii* は 2003 年に *Escherichia* 属の新たな菌種として同定されたヒトに下痢等の消化器症状を引き起こす新興人獣共通感染症菌である。近年日本では、患者数が 100 人を超える *E. albertii* による集団食中毒事例が相次いで報告され注目を集めている。しかしながら、原因食品として特定の食材が同定されておらず、それらの感染源および感染経路は不明である。そのため本菌食中毒を制御していくためには、環境中での本菌の分布を明らかにすることが重要である。所属研究グループでは、*E. albertii* に特異的な *Eacdt*-PCR により野生動物のアライグマが *E. albertii* を高率 (57.7%) に保菌していることを示した。しかしながら、*E. albertii* の鑑別分離培地である XRM-MacConkey を用いても、アライグマから本菌の分離率は 25% と低かった。アライグマにおける本菌の疫学的特徴をより詳細に解析するには、本菌の分離率の向上が必須であり、このためには選択増菌培地の開発が必要である。

本研究では、第一章で、アライグマでの *E. albertii* の詳細な保菌調査として、季節性、地域性、年齢・性別等と本菌の保菌率との関係について 2017 年～2020 年の 3 年間にわたり調査を行った。また、その過程でアライグマ検体からの本菌の分離率は、検体中の *E. albertii* の菌数と正の相関性があることを明らかとした。第二章ではアライグマ検体からの *E. albertii* 分離率の向上を目的に、選択増菌培地を構築した。第三

章では、従来法および本研究開発した選択増菌培地を用いて分離した *E. albertii* の細菌学的性状について詳細に解析した。

第一章 大阪府下の野生アライグマにおける *E. albertii* の保有状況と分離

大阪府下(北摂、北・中河内、南河内、泉州地域)に生息するアライグマにおける *E. albertii* の保菌率とその季節性、地域性、年齢・性別等との関係を明らかにすることを目的に、*E. albertii* に特異的な *Eacdt*-PCR を用いて *E. albertii* を検出した。2017年10月~2020年12月に捕獲されたアライグマの直腸スワブを TSB で増菌培養し、1,606 検体中 993 検体 (62%) から *Eacdt* 遺伝子を検出した。地域別、年齢別、性別における *Eacdt* 遺伝子の陽性率(*E. albertii* の保菌率)に差は認められなかった。一方、月別保菌率では1月から徐々に減少し4月を境に上昇に転じ、その後、12月まで増加傾向にあった。本傾向は調査を行った3年間いずれの年においても確認され、アライグマにおける *E. albertii* の保菌率には季節性があることを明らかとした。

さらに、*E. albertii* の月別の保菌率と分離率の関係性を検証するために、*Eacdt*-PCR が陽性となったアライグマ 664 検体の直腸スワブの PBS 懸濁液 (PBS 懸濁液) から XRM-MacConkey 培地を用いて、196 検体 (30%) から *E. albertii* を分離することができた。*E. albertii* の総分離率は以前の報告同様に低率であったが、月によって 6~69% と大きく異なっていた。保菌率が低い月は分離率も低い傾向が見られた。そこで、分離率には検体中の *E. albertii* の菌数が影響している可能性を考え、*Eacdt*-PCR 陽性アライグマ PBS 懸濁液 412 検体中の *E. albertii* の菌数を *E. albertii* 特異的 real-time PCR にて定量した。*E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 未満の検体では分離率は 14%であったが、4 log CFU/ml 以上の検体では 66%であり、有意な差が認められた。すなわち、XRM-MacConkey 培地を用いた方法による分離率は検体中の初期菌数に大きく依存することが明らかとなった。本菌を効率的に分離するためには本菌を選択的に増菌できる選択増菌培地の構築が必要であると考えられた。

第二章 *E. albertii* 選択増菌培地の構築

本章では、アライグマ糞便からの本菌の分離率を向上させることを目的に、*E. albertii* の選択増菌培地の構築を試みた。まず増菌培地に加える選択剤を選定するために、アライグマ糞便から非選択的に分離した *E. albertii* 以外の 85 株の菌種を生化学性状試験および 16S rRNA / *rpoB* 遺伝子の塩基配列解析より同定した。その結果、11 株がグラム陽性菌、74 株が *Proteus* 属を含む 10 種の腸内細菌目細菌であった。本結果より、グラム陽性菌および *Proteus* 属を含む多くの腸内細菌目細菌の発育を阻止する Deoxycholate (D, 1.04 g/l), Tellurite (T, 2.5 mg/l), Cefixime (C, 0.05 mg/l) の 3 種の薬剤を用い、D-TSB、TD-TSB、CTD-TSB の 3 種類の選択増菌培地を作製した。基礎培地の TSB を含む計 4 種類の増菌培地を用いて、*E. albertii* 50 株および non-*E. albertii* 85 株の発育を調べた。その結果、全ての *E. albertii* は全ての培地で増殖したが、他菌種 85 菌株のうち 11 株は D-TSB で、57 株は TD-TSB、61 株は CTD-TSB で増殖が抑制された。以上の結果より、選択剤 TD と CTD が *E. albertii* 以外の菌種の発育を有意に抑制し、CTD が分離率の向上に寄与する可能性が示唆された。

次に、アライグマ検体を用いて TD と CTD の有効性を検証するため、PBS 懸濁液中の *E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 未満と 4 log CFU/ml 以上の 23 および 11 検体を用い、TSB、TD-TSB、CTD-TSB と以前に *E. albertii* の分離に用いられていた EE Broth で培養し *E. albertii* の菌数を定量した。同時に、各増菌液と PBS 懸濁液から XRM-MacConkey 培地を用いて *E. albertii* の分離を行った。*E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 以上の 11 検体では *E. albertii* の分離率、平均菌数ともいずれの選択増菌培地においても有意差は認められなかった。一方、*E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 未満の 23 検体においては、増菌後の平均菌数は TSB、TD-TSB、CTD-TSB、EE Broth でそれぞれ 6.17 ± 1.31 、 7.33 ± 1.62 、 7.76 ± 1.74 、 6.28 ± 1.12 log CFU/ml となり、TD-TSB および CTD-TSB での菌数は TSB と比較し有意に高かった。さらに PBS 懸濁液、TSB 増菌液および EE Broth からの分離率はそれぞれ 22、13、4.0%であったが、増菌後の菌数が多かった TD-TSB および CTD-TSB 増菌液からの分離率はそれぞれ 65、87%であった。以上の結果より、3 種類の抗菌物質 C、T、D を加えることで、アライグマ検体からの *E. albertii* の分離率を大きく向上させることができた。

さらに構築した CTD-TSB の有用性を検証するため、CTD-TSB、TSB および従来の PBS 懸濁液を用いた場合のアライグマ検体からの *E. albertii* の検出・分離率の比較を行った。アライグマ糞便 412 検体を TSB で増菌した時の *Eacdt*-PCR による検出率は 65%、CTD-TSB 増菌では 64%であり、有意な差が認められなかった。しかしながら、PBS 懸濁液と TSB 培地からの分離率はそれぞれ 19%と 13%であったが、CTD-TSB 培地からの分離率は 48%と大幅に向上した。以上の結果より、*E. albertii* の選択増菌培地である CTD-TSB はアライグマ検体からの *E. albertii* の分離率を大きく向上させ、アライグマを始めとする野生動物からの XRM-MacConkey 培地を用いた *E. albertii* の分離に有用であり、*E. albertii* の疫学調査に役立つと考えられた。

第三章 アライグマから分離した *E. albertii* の細菌学的性状の解析

本章では、従来の分離方法および CTD-TSB 培地から分離された *E. albertii* の細菌学的性状を解析することを目的とした。同一検体由来の分離株の重複を避けるため、286 検体から分離した *E. albertii* 1,362 株に対して ERIC-PCR を行った。その結果、243 検体からは 1 種類、33 検体からは 2 種類、9 検体からは 3 種類、1 検体からは 4 種類の遺伝子型を示す *E. albertii* が同定された。次に、それぞれの検体から異なる遺伝子型として同定された 340 株の *E. albertii* のクローナリティーをより詳細に解析するために、*Xba*I 消化による PFGE 解析を行った。340 株は 119 種類の PFGE パターンに分類され、アライグマ由来の *E. albertii* には多様性があることが明らかになった。また、340 株のうち 39%に相当する *E. albertii* 133 株は 9 種類の PFGE クラスタに型別され、これらの *E. albertii* が少なくとも大阪府下でドミナントな株であると考えられた。かつ、これらの 9 種類の PFGE クラスタに型別された *E. albertii* は、アライグマより少なくとも 2 年間継続的に分離されており、今回の調査地域において適応性の高い遺伝子型であると考えられた。さらに、アライグマなどの動物および臨床由来の *E. albertii* 株との関連性を検証するため、当研究室で保有する豚由来 1 株、臨床由来 50 株を含め再度 PFGE で比較解析した。その結果、PFGE パターンの類似度が 85%以上

となる異なる由来の菌株を含むクラスターは6つ確認された。そのうち2つのクラスターはそれぞれアライグマ由来2株と臨床由来1株または豚由来1株で構成され、残り4クラスターはそれぞれアライグマ由来1株と臨床由来1株で構成されていた。

アライグマ由来の *E. albertii* 340株の病原性を評価するために、腸管粘膜への接着に関与する *eae*, *paa*, *bfpA* 遺伝子、細胞膨化致死毒素 (*EccdtI*) 遺伝子、志賀毒素 (*stx1*, *stx2[a-e, g]*, *stx2f*) 遺伝子をそれぞれに特異的な遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法により検出した。340株全てから *eae*, *paa*、7株から *bfpA*、23株から *EccdtI*、3株から *stx2f* 遺伝子のみをそれぞれ検出した。*stx2f* 陽性 *E. albertii* 3株の培養上清を Vero 細胞に添加したところ致死活性が認められ、これら3株は活性のある *Stx2f* を産生していることがわかった。以上より、アライグマはヒトに下痢症のみならず溶血性尿毒症症候群も引き起こす可能性がある *E. albertii* を保菌していることが明らかとなった。

総括

1. アライグマの *E. albertii* の保菌率には季節性があり、1月から4月にかけて減少後、5月から12月にかけて保菌率が高くなる傾向があった。
2. 従来の分離法における *E. albertii* の分離率は検体中の *E. albertii* の菌数と正の相関性があった。
3. *E. albertii* の選択増菌培地として CTD-TSB を新たに構築し、本培地を用いることでアライグマ検体からの *E. albertii* の分離率を大幅に向上することできた。
4. 大阪府下のアライグマが保菌する *E. albertii* には多様性があること、*stx2f* 保有株など高病原性の可能性がある株も存在することを明らかとした。

審査結果の要旨

Escherichia albertii は2003年に *Escherichia* 属の新たな菌種として同定されたヒトに下痢等の消化器症状を引き起こす新興人獣共通感染症菌である。近年我が国では、患者数が100人を超える *E. albertii* による集団食中毒事例が相次いで報告され問題となっている。しかしながら、原因食品として特定の食材が同定されておらず、それらの感染源および感染経路は不明である。そのため本菌食中毒を制御していくためには環境中での本菌の分布を明らかにすることが重要である。野生動物のアライグマが *E. albertii* を高率 (57.7%) に保菌していることが明らかとされているが、季節性、年齢、性別との関係は明らかとなっていない。また、アライグマからの本菌の分離率は25%と低い。それゆえ、アライグマにおける本菌の疫学的特徴をより詳細に解析するには本菌の分離率の向上が必須であり、その改善策の1つとして *E. albertii* の選択増菌培地の構築が挙げられる。そこで本研究では、1) アライグマの *E. albertii* の保菌率に関して、季節性、地域性、年齢・性別等との関連性を調べ、2) アライグマ検体から

E. albertii の分離率を向上させるための選択増菌培地を構築し、3) 分離した *E. albertii* の細菌学的性状について詳細に解析した。

第1章では大阪府下の様々な地域に生息するアライグマの *E. albertii* の保菌率とその季節性、地域性、年齢・性別等との関係を明らかにすることを目的に、*E. albertii* に特異的な *Eacdt*-PCR を用いて *E. albertii* を検出した。その結果、2017年10月~2020年12月に捕獲されたアライグマ 1,606 検体中 993 検体 (62%) から *Eacdt* 遺伝子を検出した。地域別、年齢別、性別における *Eacdt* 遺伝子の陽性率に差は認められなかった。*Eacdt*-PCR 陽性アライグマの PBS 懸濁液 412 検体中の *E. albertii* の菌数を real-time PCR で定量した結果、*E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 未満の検体では分離率は 14%であったが、4 log CFU/ml 以上の検体では 66%と有意な差が認められた。*E. albertii* の分離率は検体中の初期菌数に大きく依存することが明らかとなった。

第2章ではアライグマ糞便からの本菌の分離率を向上させることを目的に、*E. albertii* の選択増菌培地の構築を試みた。アライグマ糞便から分離した *E. albertii* 以外のグラム陽性菌 11 株と腸内細菌目細菌 74 株の増殖を抑制できると考えられる Deoxycholate (D), Tellurite (T), Cefixime (C) の3種の薬剤を含む、D-TSB、TD-TSB、CTD-TSB の3種類の選択増菌培地を作製した。*E. albertii* 50 株は全ての培地で増殖したが、他菌種 85 菌株のうち 11 株は D-TSB で、57 株は TD-TSB で、61 株は CTD-TSB で増殖が抑制された。PBS 懸濁液中の *E. albertii* の菌数が 4 log CFU/ml 未満と 4 log CFU/ml 以上の 23 および 11 検体を用いて選択増菌培地の評価を行った。4 log CFU/ml 以上の 11 検体は、いずれの選択増菌培地においても有意差は認められなかった。一方、4 log CFU/ml 未満の 23 検体においては、増菌後の平均菌数は CTD-TSB で TSB の 6.17 ± 1.31 log CFU/ml と比較し 10 倍以上上昇した。CTD-TSB 増菌液からの分離率は 87%と TSB の 13%と比べて大幅に上昇した。さらにアライグマ糞便 412 検体を TSB で増菌した時の *Eacdt*-PCR による検出率は 65%、CTD-TSB 増菌では 64%であり、有意な差が認められなかった。しかしながら、CTD-TSB 培地からの分離率は 48%と TSB の 13%と比べて大幅に上昇した。

第3章では *E. albertii* の細菌学的性状を解析することを目的に、アライグマ 286 検体から分離した *E. albertii* 1,362 株を ERIC-PCR で 340 株に絞り込み、PFGE 解析、病原遺伝子プロファイル解析を行った。その結果、大阪府下で分離された *E. albertii* は、地域や分離年を越えて類似のパターンを示す株、さらには患者由来株と類似のパターンを示す株も存在した。さらに、全ての株が *E. albertii* に特徴的な *eae* や *cdt* 遺伝子を保持するのみならず重症化に関わると言われている *stx2f* 遺伝子を保有する株も存在し、患者由来株と同等あるいはそれ以上の Stx2f を産生していた。

以上の結果は、*E. albertii* の新規選択増菌培地の開発に成功し、特に *E. albertii* の初期菌数が少ない検体の本菌の分離を大きく改善させた。さらに、アライグマの *E. albertii* 保菌率には季節性があること、分離株には患者分離株と類似の遺伝子型を持つ株が存在することを明らかとした。本研究成果は獣医学の分野のみならず、公衆衛生学の分野において多大な貢献をされると考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。