

称号及び氏名	博士（獣医学）	安田 憲朋
学位授与の日付	平成30年2月28日	
論文名	I I型細胞膨化致死毒素遺伝子保有大腸菌の菌種再同定から見出した <i>Escherichia albertii</i> の検出法の開発と応用	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	三宅 眞実

論文要旨

緒言

2003年、*Escherichia* 属の新たな菌種として *E. albertii* が加わった。以降、我が国において、*E. albertii* による集団食中毒事例が相次いで報告されており、本菌はヒトに対する下痢原性を有すると考えられている。厚生労働省も本菌による感染症に関わる情報の集積およびリスクに係る調査が必要と判断し、日本全国から本菌に纏わる情報提供を呼び掛けている。また、大量死した野鳥からの *E. albertii* 分離例等もあることから、鳥類に対する本菌の病原性も示唆され、*E. albertii* の人獣共通感染症起因菌としての位置づけを早急に評価する必要がある。しかし、*E. albertii* は大腸菌や *Shigella* 属菌などの近縁の他菌種との鑑別が難しく、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌などと誤同定されていた例も多数報告されている。現状では、*E. albertii* 感染症発生動向を把握することすら容易ではない。今後、*E. albertii* 感染症の発生状況および病原性を明らかにしていくためには、*E. albertii* を正確に検出・分離・同定する必要がある。しかし、*E. albertii* の同定・検出法として確立された方法が少なく、*E. albertii* を迅速、簡便かつ正確に検査できる方法を確立することが急務である。

申請者の研究グループは、細胞膨化致死毒素 (CDT) 遺伝子保有大腸菌 (CTEC) のヒトおよび家畜を対象とした疫学調査を行ってきた。この疫学調査において、分離菌の菌種同定は、全て大腸菌の同定試験に汎用される生化学的性状試験に

基づいて行った。また、分離された **CTEC** が保有する *cdt* 遺伝子の型別 (*cdt-I* ~ *cdt-V*) を行い、その分離頻度を調べた結果、*cdt-II* 遺伝子保有大腸菌 (**CTEC-II**) 以外の **CTEC** は全て典型的な大腸菌の性状を示したが、**CTEC-II** はラクトースとスクロースの分解性や運動性が共に陰性という点で通常の大腸菌と異なるため非定型大腸菌と同定した。そこで、**CTEC-II** と同定された **3** 株について、**16S rRNA** 遺伝子解析や糖分解試験を行ったところ、**3** 株の **CTEC-II** はともに大腸菌ではなく *E. albertii* であるという結果を得た。さらに、**Multilocus sequence (MLS)** 解析の結果でも、**3** 株とも *E. albertii* のクレードに収束した。これらの結果より、**CTEC-II** が大腸菌ではなく *E. albertii* である可能性を見出し、第 1 章では供試菌株数を増やしてさらなる検証を行った。この過程で、*E. albertii* の *cdt* 遺伝子 (*Eacdt* 遺伝子) は *E. albertii* 内でよく保存されていることを見出した。また、申請者の研究グループが糖分解性状を指標として過去に腸管病原性大腸菌として同定されていた株を用いて *E. albertii* の探索・再同定を試みたところ、再同定された全ての *E. albertii* 株が *Eacdt* 遺伝子を有していた。これらのことから、*Eacdt* 遺伝子が *E. albertii* の同定・検出の指標になり得ると考え、第 2 章では *Eacdt* 遺伝子を標的とした PCR による本菌の検出、同定法を構築した。さらに、第 3 章では *Eacdt* 遺伝子を標的とした **Nested *Eacdt* PCR** 法を構築し、より少ない菌数の *E. albertii* の検出を試みた。さらに、小児下痢便及び野鳥の糞便から **Nested *Eacdt* PCR** による *E. albertii* の検出を試み、**Nested *Eacdt* PCR** が糞便検体からの *E. albertii* 検出法として有用であるか評価した。

第 1 章 *cdt-II* 遺伝子保有 *E. coli* と *E. albertii* の関連について

先に **CTEC-II** から *E. albertii* に再同定された **3** 株に加え、当研究室が保有する **CTEC-II 19** 株の生化学的性状試験および **MLS** 解析を行うことで、**CTEC-II** は大腸菌ではなく *E. albertii* であるという可能性をさらに検証した。

19 株の **CTEC-II** の生化学的性状試験をより詳細に行ったところ、供試菌 **19** 株全てが非定型大腸菌の性状を示した。すなわち、糖分解試験で、これら **19** 株はキシロース、ズルシトール、メリビオース、ラムノース、ラクトースの分解性が陰性という点で大腸菌とは異なる性状を示した。**MLS** 解析でも **19** 株全てが大腸菌ではなく *E. albertii* のクレードに収束した。すなわち、追加の供試菌 **19** 株も *E. albertii* と再同定された。これら再同定された *E. albertii* 株の中には、初めて *cdt-II* 遺伝子保有大腸菌株として報告された菌株 (**9142-88** 株) と同じ血清型を有する株が含まれていた。さらに、*E. albertii* に再同定された **22** 株および *E. albertii* 基準株の *cdt* 遺伝子の全塩基配列を決定し、既報の大腸菌 **9142-88** 株の *cdt* 遺伝子配列とともに系統解析を行った。再同定した菌株の *cdt* 遺伝子は、大腸菌 **9142-88** 株の *cdt-II* 遺伝子及び *E. albertii* 基準株の *Eacdt* 遺伝子と互いに高い相同性 (**93.5~100%**) を有し、大腸菌のその他の *cdt* 遺伝子 (*cdt-I*、*cdt-III*、*cdt-IV* および *cdt-V*) とは全く異なる系統に属した。

残念ながら、**9142-88** 株の菌種再同定は行えていないものの、以上より

CTEC-IIは大腸菌ではなく *E. albertii*であることを示唆する結果が得られた。また、新たな CDT の分類として、CDT-II と EaCDT の 2 つを EaCDT の 1 つに統合すべきであると考えられた。*E. albertii* 株間で *cdt* 遺伝子がよく保存されていたことに加え、申請者の研究グループが糖分解性状を指標として大腸菌株から *E. albertii* 株の探索・再同定を試みたところ、再同定された全ての *E. albertii* 株が *Eacdt* 遺伝子を有していた。このことから、*Eacdt* 遺伝子が *E. albertii* 検出・同定のための指標になり得ると考え、次に *E. albertii* 同定用の PCR 法の開発を試みた。

第 2 章 *E. albertii* 同定用 PCR 法の構築

大腸菌以外にもグラム陰性細菌には CDT を産生する細菌種が多数存在する。*E. albertii* の *Eacdt* 遺伝子と塩基配列の相同性が高い大腸菌の *cdt-III* および *cdt-V* 遺伝子に加え、*P. alcalifaciens* の *Pacdt* 遺伝子のアライメントを作製し、*E. albertii* に特異的な配列を選択して、PCR プライマーを作製した。得られたプライマーを基に *E. albertii* 同定用 PCR 法 (*Eacdt* PCR 法) を構築し、その感度・特異性・検出下限を評価した。

感度の評価は、当研究室で保管されている *E. albertii* 計 51 株を供した。すべての菌株より予想通りの大きさの増幅産物が得られた。よって本 PCR の感度は 100%であった。特異性の評価には、*E. albertii* 以外のグラム陰性細菌 36 菌種を含む合計 91 株を用いた。このうち 2 株からのみ *Eacdt* 遺伝子由来と思われる増幅産物が得られた。よって、本 PCR の特異性は 100%であった。検出下限の評価を *E. albertii* 基準株を用いて行ったところ、検出下限は 1.0×10^3 CFU/PCR tube であった。以上より、*Eacdt* PCR 法は *E. albertii* の同定法として有用であると考えられた。

さらに、糞便検体からの *E. albertii* 基準株の添加回収試験を行った。TSB 培地に健常者の糞便を 0.05 g/3 mL の割合で懸濁した。この TSB 培地 3 mL に $3.1 \times 10^6 \sim 10^0$ CFU の *E. albertii* 基準株をそれぞれ植菌し、増菌液からの *Eacdt* 遺伝子の検出を試みたところ、糞便中に 6.2×10^3 CFU/g 糞便の *E. albertii* が存在すれば *Eacdt* PCR で検出可能であった。一般に、健常な動物の糞便中の病原菌の菌量は多くなく、*E. albertii* の動物糞便への排菌量も、類縁菌の健常な動物からの排菌量と同程度と類推すると、添加回収試験における *Eacdt* PCR 法の検出下限の結果は、十分でない。一方、当研究室で本法をいくつかの検査材料に供したところ、これまでに *E. albertii* ではない菌を一切検出しておらず、本法が特異性の高い方法であると考えられた。そこで、第 3 章では、より少ない菌数の *E. albertii* の検出を目的に *Eacdt* 遺伝子を標的とした Nested *Eacdt* PCR 法の構築を試みた。

第 3 章 *E. albertii* 検出用 Nested *Eacdt* PCR 法の構築

第 2 章と同様に、*E. albertii* に特異的な配列から PCR プライマーを作製した。得られたプライマーを用いて Nested *Eacdt* PCR 法を構築し、その感度、特異

性及び検出下限を第 2 章と同様に評価した。感度及び特異性とも 100%であった。検出下限の評価に *E. albertii* 基準株を供したところ、検出下限は 2.4×10^0 CFU/PCR tube であった。この結果は既報の *E. albertii* 検出用 Nested PCR 法よりも検出下限が 10 倍低く、今回構築した Nested *Eacdt* PCR 法はこれまでで最も検出下限が低い検出法となった。さらに、構築した Nested *Eacdt* PCR 法が、糞便検体からの *E. albertii* 検出法として有用であるか小児下痢症患者糞便検体を用いて評価した。申請者の研究グループが過去に作製した鋳型 DNA の中から、*E. albertii* が分離された 16 検体、および *Eacdt* 遺伝子が検出されなかった 20 検体を用い、Nested *Eacdt* PCR 法で得られた検出結果を過去の結果と比較した。過去に行った大腸菌の *cdt-II* 遺伝子検出結果と、Nested *Eacdt* PCR 法による *Eacdt* 遺伝子検出結果は、全ての検体で一致した。Nested *Eacdt* PCR 法を用いれば、*E. albertii* 株が含まれる糞便検体を識別可能であると考えられた。

最後に、Nested *Eacdt* PCR 法の実際の検体への応用を試みた。申請者の研究グループの過去のデータより、ヒトの *E. albertii* 保菌率は非常に低率であった。そこで、海外で *E. albertii* の保菌動物との指摘がある野鳥の *E. albertii* 保菌率調査を試みた。大阪南部地区のドバトを計 121 羽捕獲し、クロアカスワブ回収して、Nested *Eacdt* PCR 法による *E. albertii* 検出を試みた。1st PCR 法では 121 検体のうち 1 検体より *Eacdt* 遺伝子由来と思われる大きさの増幅産物が得られ、この検体より *E. albertii* 株が分離された。2nd PCR まで行くと陽性率が 9.1% (11 羽/121 羽) に上昇した。また、2nd PCR まで行っても一切の非特異的な増幅を認めなかった。これらのことから、Nested *Eacdt* PCR 法は *E. albertii* 株の検出率上昇に寄与し、*E. albertii* 株の分離作業の効率化に資する方法であると考えられた。今後、Nested *Eacdt* PCR 法を用いた分子疫学調査が進められ、*E. albertii* の環境中における分布・動態の調査や、菌株の収集が進むことで本菌に対する理解も進むことを願ってやまない。

総括

- ・ *cdt-II* 遺伝子保有大腸菌を *E. albertii* に再同定できることを見出し、CTEC-II が *E. albertii* であることを明らかとした。*E. coli* の *cdt* 遺伝子は *cdt-I*、*-II*、*-III*、*-IV* 及び *-V* の 5 種が報告されていたが、これらを *cdt-I*、*-III*、*-IV* 及び *-V* の 4 種とし *cdt-II* を *Eacdt* 遺伝子に再分類した。
- ・ *Eacdt* 遺伝子が *E. albertii* のマーカー遺伝子になり得ることから、*Eacdt* 遺伝子を標的にした *Eacdt* PCR 法を構築し、*E. albertii* の同定法として有用であることを示した。さらに、*Eacdt* PCR 法を Nested *Eacdt* PCR 法へと発展させ、*E. albertii* の検出法になり得ることを示した。
- ・ 大阪南部地域における野生ドバトのクロアカ中にも、*E. albertii* が保菌されていることを初めて示すとともに、Nested *Eacdt* PCR 法を用いれば *E. albertii* の分子疫学調査が実施できることを示した。

審査結果の要旨

Escherichia albertii は、2003年、*Escherichia* 属の新たな一菌種として認められた下痢症起因菌である。以後、我が国において *E. albertii* による集団食中毒事例が相次いで報告されている。鳥類に対する病原性も示唆され、*E. albertii* は新興人獣共通感染症起因菌としての可能性も指摘されている。また、一部の *E. albertii* が2型志賀毒素を産生することから近年大きな注目を集めている。しかしながら、*E. albertii* は大腸菌や *Shigella* 属菌などと細菌学的性状が酷似していることから、腸管病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌や赤痢菌と誤同定されていた例も多数あり、感染源や感染経路なども明らかとされていない。それゆえ、*E. albertii* 感染症の発生動向を正確に把握するためには、*E. albertii* を正確に検出・分離・同定する方法を確立することが急務である。

細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子保有大腸菌 (CTEC) が下痢や腸管外感染症を発症したヒトや家畜から分離例が多数報告されているにもかかわらず、CTEC の重要性については明らかにされていない。我々の研究室では、CTEC の疫学調査を行ってきた過程で、CTEC には *cdt-I* から *cdt-V* の5種類それぞれを保有するCTECが存在すること、そのうち *cdt-II* 遺伝子保有大腸菌 (CTEC-II) は他のCTECと細菌学的性状が異なることを明らかとした。さらに、糖分解性試験やMLS (multilocus sequencing) 解析などを利用してCTEC-IIについて詳細に解析した結果、CTEC-IIとして分離、同定した3株は大腸菌ではなく *E. albertii* であることを明らかにした。

以上の結果を受けて、第1章では、過去にCTEC-IIとして分離、同定されていた19株について糖分解性試験やMLS解析などを行い、これまで大腸菌と分類されていたCTEC-IIが *E. albertii* である可能性を検証した。その結果、供試した19株はキシロース、ズルシトール、メリビオース、ラムノース、ラクトースの分解性が陰性という点で大腸菌とは異なる性状を示した。MLS解析でも19株全てが大腸菌ではなく *E. albertii* のクレードに収束した。以上の結果よりCTEC-IIは、大腸菌でなく *E. albertii* であることが明らかとなった。*E. albertii* に再同定された22株および *E. albertii* 基準株の *cdt* 遺伝子の全塩基配列を決定した結果、*Eacdt* 遺伝子は94-100%の相同性を有し、*cdt-I*、*-III*、*-IV*、*-V*とは異なるクレードに属することが明らかになった。

第2章では、*Eacdt* 遺伝子が *E. albertii* を検出、同定するためのマーカー遺伝子になりうると考え、*Eacdt* 遺伝子を標的としたPCR法を構築し、その感度、特異性及び検出下限について評価した。*E. albertii* 51株を用いてPCRを行った結果、全ての菌株から予想される大きさのPCR産物が特異的に得られ、感度は100%であった。また、*E. albertii* 以外のグラム陰性細菌36菌種を含む合計91株を用いて本PCR法の特異性を調べた結果、いずれの株からも増幅産物は

得られず、本 PCR の特異性は 100%であった。*E. albertii* 基準株を用いて検出下限を調べたところ、 1.0×10^3 CFU/PCR tube であった。以上、*Eacdt* PCR 法は *E. albertii* の同定法として有用であることを示した。さらに、*E. albertii* 基準株を用いて、糞便検体からの添加回収試験を行った結果、糞便中に 6.2×10^3 CFU/g 糞便の *E. albertii* が存在すれば *Eacdt* PCR で検出できることを明らかとした。

第 3 章では、*Eacdt* 遺伝子を標的とした PCR 法の検出下限の向上を目的に、*nested Eacdt* PCR 法の構築を試みた。第 2 章で構築した PCR プライマーの内側に新たな PCR プライマーを設計し *nested PCR* を行った。その結果、感度、特異性とも 100%であった。*E. albertii* の基準株を用いて検出下限を調べたところ、 2.4×10^0 CFU/PCR tube の *E. albertii* を検出することができた。この検出下限は既報の *E. albertii* 検出用 *nested PCR* 法より 10 倍低く、本手法はこれまでで最も検出下限が低い検出法であった。過去に CTEC の疫学調査に用いた小児下痢症患者便を検体として遡り調査を行った結果、*cdt-II* 遺伝子が検出された検体全てで PCR 陽性、検出されなかった検体全てで PCR 陰性となり、感度、特異性とも 100%であった。さらに、大阪南部地区のドバト 121 羽を捕獲し、本 *nested Eacdt* PCR を行った結果、121 検体のうち 1st PCR で 1 検体から *Eacdt* 遺伝子が検出され、この検体から *E. albertii* を分離した。さらに、2nd PCR を行くと陽性率が 9.1% (11/121 羽) に上昇した。

以上の結果より本 *nested Eacdt* PCR 法は、*E. albertii* の疫学調査に大きく役立つことが期待できる。よって、本研究成果は獣医学の分野のみならず医学の分野においても多大な貢献をすると考えられる。従って、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。