

8. 神奈川県のアライグマにおける *E. albertii* と下痢原性大腸菌に関する研究

○伊達 佳美 三谷 詠里子 (神奈川県衛生研究所)

【研究目的】神奈川県で捕獲されたアライグマの *Escherichia albertii* および下痢原性大腸菌の保有状況の調査を行うことにより、これらの細菌による県民の健康被害の可能性および県域の侵淫状況の把握が可能となると考えられる。本研究により得られた知見は、県民の人獣共通感染症のリスク管理を行う上での資料とし、得られた菌株の解析により、菌種間の遺伝学的な関連性等を解明するための基礎的データの集積を目的とした。

【研究の必要性】神奈川県では、特定外来生物であるアライグマの生息数の増加に伴い、農業被害のほか、住居および庭への侵入などによる被害の報告が増加傾向にある。神奈川県で行われているアライグマの人獣共通感染症対策は、アライグマ回虫の検査のみであるが、県内のアライグマの多くは、人の生活圏に生息していることから、人獣共通感染症による住民への影響が懸念される。アライグマは、「雑食性」という食性から、アライグマの糞便を用いて病原体を調査することにより、アライグマの生息地域における病原体の侵淫状況が明らかになると考えられる。近年、大阪府に生息するアライグマから、新興細菌の *E. albertii* の遺伝子が高率に検出され、アライグマが宿主と示唆する論文が報告された¹⁾。*E. albertii* は、国内で大規模食中毒の原因菌として報告されており、大腸菌と近縁かつ下痢原性大腸菌が保有する病原因子を保有しているとされる。*E. albertii* と下痢原性大腸菌が同時に検出された食中毒事例も散見され、両菌種間における遺伝学的な関連性も疑われるが、そのメカニズム等は明らかにされていない。さらに、*E. albertii* および下痢原性大腸菌は他の *E. coli* と生化学的性状で区別することができないため、これらの検出、同定には検討が必要である。以上のことから、神奈川県内のアライグマの糞便の *E. albertii* および下痢原性大腸菌の調査は、公衆衛生上、急増するアライグマのリスク管理および感染防止対策を講ずる上で重要であり、本研究で得られた菌株は遺伝子解析により、菌種間の遺伝学的な関連性を明らかにするための基礎的な資料となる。

【研究計画】

1. 検体および検出対象

2021～2022年に神奈川県内の5地域(A・B・C・D・E)から採取したアライグマの糞便 112検体を用いた。検出対象は *E. albertii* および下痢原性大腸菌とした。

2. 検出方法

①遺伝子の検出

検出方法は、各検体約 1g を 0.1%ペプトン加生理食塩水 2mL に懸濁し、この懸濁液 100 μ L を BPW 10mL に添加し、42°Cで 18~20 時間静置培養したものを、増菌培養液とした。この増菌培養液から市販のキット(PureLink Microbiome DNA Purification Kit)を用いて DNA を抽出し、*E. albertii* の特異的な病原因子遺伝子である *Eacdt*¹⁾²⁾ および下痢原性大腸菌の 11 病原因子遺伝子(*stx1*, *stx2*, *stx2f*, *estA1*, *estA2*, *elt*, *eae*, *invE*, *aggR*, *afaD*,

astA)³⁾について、それぞれを標的とした PCR 法を実施した。

②菌株の分離と同定

PCR 法により、上記遺伝子が検出された増菌培養液を、XRM-MacConkey agar¹⁾²⁾およびクロモアガー-ECC(関東化学)に接種し、42°Cで 18~20 時間培養後、各菌における疑わしい集落(*E. albertii* は、XRM-MacConkey agar およびクロモアガー-ECC において白色集落、下痢原性大腸菌は、クロモアガー-ECC において青色集落)を釣菌した。釣菌数は、病原因子遺伝子当たり最大 50~100 集落とし、それぞれアルカリ熱抽出法で DNA 抽出を行った。抽出した集落の DNA について、増菌培養液から検出された遺伝子を標的とした PCR 法により、集落が保有する遺伝子を検索した。病原因子遺伝子が検出された集落について、CLIG 寒天培地(極東製薬)、TSI 寒天培地(アキュディア)、SIM 確認培地(アキュディア)、リジン脱炭酸試験用培地(栄研化学)、VP 半流動培地(栄研化学)および Api20E(ビオメリュー)による生化学的性状の確認を行い、*Eacdt* が検出され、硫化水素陰性、37°C培養で運動性持たず、その他大腸菌様の性状を示す集落を *E. albertii*、上記 11 病原因子遺伝子が検出され、かつ大腸菌の性状を示すものを下痢原性大腸菌として、菌株を分離した。さらに、分離した菌株について、MALDI-TOF MS(微生物分類同定分析装置 MALDI バイオタイパー(BRUKER))による同定を行った。当該装置のライブラリーには当所で保管されていた既知の *E. albertii* 株(人由来、国内分離株)の情報を事前に加え、結果に反映させた。

【実施内容・結果】

1. 遺伝子検出と菌株の分離状況

アライグマ糞便の増菌培養液からの *E. albertii* および下痢原性大腸菌の病原因子遺伝子の検出状況を表 1 に示した。112 検体のうち、対象となる病原因子遺伝子が検出されたのは 63 検体で、そのうち複数の病原因子遺伝子が検出されたのは 49 検体、1 検体からは最大で 4 種類の病原因子遺伝子が検出された。病原因子遺伝子の最も多い組み合わせは、*astA* および *eae* が 22 検体、次いで *Eacdt*、*astA* および *eae* が 15 検体であった。アライグマの捕獲地域および糞便の増菌培養液並びに集落の遺伝子検出状況を表 2 に示した。*Eacdt* は 112 検体中 19 検体(17.0%)、下痢原性大腸菌の病原因子遺伝子の *astA* は 53 検体(47.3%)、*eae* は 48 検体(42.9%)、*invE* は 3 検体(2.7%)、*aggR* および *afaD* は 1 検体(0.9%)から検出された。菌株は、*E. albertii* が 9 検体(8.0%)、下痢原性大腸菌のうち *astA* 保有株が 21 検体(18.7%)、*eae* 保有株が 17 検体(15.2%)、*invE* 保有株が 1 検体(0.9%)、および *afaD* 保有株が 1 検体(0.9%)から分離された。地域別の検出状況をみると、*Eacdt* は全ての地域で検出されたが、検出率が最も高い地域 A は 33.3%、最も低い地域 B は 6.4%と、検出率に幅がみられた。*E. albertii* の菌株も全ての地域で検出されたが、地域 E では *Eacdt* が検出された 10 検体中、*E. albertii* が分離できたのは 1 検体のみで、他の地域に比べ菌株の検出率は低い傾向にあった。また、下痢原性大腸菌の病原因子遺伝子の検出率は、増菌培養液および集落共に、検体数が少なかった地域 A を除いて、*astA* が最も高く、次いで *eae* であった。

表1 アライグマ糞便の増菌培養液からの病原因子遺伝子検出状況

検体数 (n=112)	病原因子遺伝子					
	<i>Eacdt</i>	<i>astA</i>	<i>eae</i>	<i>invE</i>	<i>afaD</i>	<i>aggR</i>
22		+	+			
15	+	+	+			
13		+				
6			+			
2	+		+			
1	+	+	+	+		
1	+		+		+	
1		+	+	+		
1		+		+		
1						+
49						

表2 アライグマの捕獲地域および糞便の増菌培養液並びに集落の遺伝子検出状況(n=112)

検出遺伝子 (検出率%)	検出対象	捕獲地域					計
		A	B	C	D	E	
<i>Eacdt</i>	増菌培養液	1(33.3)	2(6.4)	3(21.4)	3(16.7)	10(21.7)	19(17.0)
	集落	1(33.3)	1(3.2)	3(21.4)	3(16.7)	1(2.1)	9(8.0)
<i>astA</i>	増菌培養液		16(51.6)	6(42.9)	7(38.9)	24(52.1)	53(47.3)
	集落		8(25.8)	3(21.4)	5(27.8)	5(10.9)	21(18.7)
<i>eae</i>	増菌培養液	2(66.7)	12(38.7)	5(35.7)	7(38.9)	22(47.8)	48(42.9)
	集落*		6(19.5)	1(7.1)	5(27.7)	5(10.9)	17(15.2)
<i>invE</i>	増菌培養液		2(6.4)		1(5.6)		3(2.7)
	集落		1(3.2)				1(0.9)
<i>afaD</i>	増菌培養液					1(2.1)	1(2.1)
	集落					1(2.1)	1(2.1)
<i>aggR</i>	増菌培養液		1(3.3)				1(3.3)
	集落						

* *Eacdt*保有集落を除く

2. 分離菌株の保有遺伝子および同定結果

分離した菌株は、*E. albertii*が45株、下痢原性大腸菌の*astA*が検出された37株、*eae*が検出された28株(*Eacdt*保有株を除く)、*invE*が検出された3株、*afaD*が検出された2株、計115株であった。*Eacdt*が検出された45株について、下痢原性大腸菌の上記11病原因子遺伝子の保有状況を調べたところ、全てから*eae*が検出されたが、それ以外は検出されなかった。また、下痢原性大腸菌のうち、複数の病原因子遺伝子を保有する菌株はなかった。得られた菌株のMALDI-TOF MSによる同定結果は、*Eacdt*を保有する45株すべてにおいて、事前に登録した*E. albertii*がOrganism(best match)と示され、ScoreValueも2.0以上かつRank1位であった。下痢原性大腸菌の病原因子遺伝子保有株は、*astA*を保有する8菌

株を除き、*E. coli*と同定された。また、*Eacdt*保有45株は、いずれの菌株もリシン脱炭酸(+)、インドール産生(+)⁴⁾で、生化学的性状からすべて生物型3⁴⁾であった。

【考察と今後の課題】本研究で調査したすべての地域において、捕獲されたアライグマの糞便から *E. albertii* の特異的病原因子遺伝子および菌株が検出され、*E. albertii* が神奈川県環境中に侵淫していることが示唆された。いずれの捕獲地域でも *Eacdt* が検出されたが、地域 B の *Eacdt* の検出率は、他の地域よりも低い傾向にあることから、地域によって *E. albertii* の侵淫状況が異なっていると考えられた。また、地域 E は *Eacdt* の検出率に比べ、得られた *E. albertii* の菌株が他の地域よりも少ない傾向にあったが、この理由として、地域 E は主に農地、それ以外の地域は住宅街であったことから、アライグマの生息環境が影響している可能性が考えられた。

本研究で分離された *E. albertii* の菌株は、すべて、主に日本で分離された *E. albertii* の主要グループ⁴⁾である生物型3であった。日本で発生した *E. albertii* による主な集団食中毒事例の原因食品のうち、疑わしいとされるのは、井戸水やサラダや生野菜等、環境に由来するものが示唆されており⁴⁾、これら食中毒事例のあった地域では、環境中に *E. albertii* が侵淫していると考えられる。アライグマの糞便から *E. albertii* が検出されたことにより、神奈川県においても環境中に *E. albertii* が存在し、食中毒が発生する可能性があると考えられた。また、下痢原性大腸菌の *astA* および *eae* が、*Eacdt* よりも高率に検出されたことから、*E. albertii* と同様に、これらを原因とする食中毒発生の可能性があると考えられた。*astA* は食肉や家畜の糞便から高率に検出され、食肉を介してヒトに感染するとされる⁵⁾。動物から排泄されたこれらの菌は環境中に侵淫していると考えられ、近年、*astA* を保有する下痢原性大腸菌による大規模な食中毒も発生している⁶⁾。さらに、複数のアライグマの糞便から *E. albertii* と共に複数種類の下痢原性大腸菌の病原因子遺伝子が検出されたことから、アライグマの糞便中に、これらの菌が共存していることが明らかとなった。今回分離した *E. albertii* は、すべて *eae* を保有しており、同時に *eae* を保有する下痢原性大腸菌も検出されたことから、関連性が疑われる。*E. coli* は、周辺の菌から遺伝子を獲得、周囲へ遊離を繰り返しながら生息しており⁷⁾、遺伝子の関連性を見出すためには、次世代シーケンサーによる解析が有用であることから、今後、分離された菌株について解析を行う予定である。

本研究では、*E. albertii* および下痢原性大腸菌を選択的に分離するため、選択平板培地として XRM-MacConkey agar およびクロモアガー-ECC を用い、選択性を高めるため、培養温度は 42°C とした。*E. albertii* については、いずれの培地でも疑わしい集落を選択的に釣菌でき、効果的であったが、これらの培地では *E. albertii* は大腸菌と競合して発育するため、大腸菌に対して *E. albertii* の数が少ない場合、発育が確認できないことがあった。また、下痢原性大腸菌においては、外観上同じ集落に見えるため、PCR 法での確認に莫大な労力と時間を要した。今後、これらの検出方法についての検討が必要であろう。今回、菌株の同定には MALDI-TOF MS(微生物分類同定分析装置 MALDI バイオタイパー(BRUKER))を用いた。*E. albertii* の同定は、従来のライブラリーには日本以外で分離された基準株が登録されていたため、一致率が低かったが、事前に国内で分離された同じ生物型の菌株を登録したことにより、高い一致率で同定が可能となった。今後、*E. albertii* を分離するためのスクリーニングに使用することで、検出の効率化を図ることが可能であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Atsushi Hinenoya *et al*: Prevalence of *Escherichia albertii* in Raccoons (*Procyon lotor*), Japan Emerg Infect Dis. Jun, 26(6), 1304–1307(2020)
- 2) 日根野谷淳：新興人獣共通感染症細菌 *Escherichia albertii* に関する研究, 日本細菌学雑誌. 76(4), 175–185(2021)
- 3) 矢儀田優佳ら：マルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いた下痢原性大腸菌迅速同定検査法の開発, 令和 2 年度愛媛衛環研年報 23.1-10(2020)
- 4) 村上光一ら：*Escherichia albertii*, モダンメディア. 66, 1-10(2020)
- 5) 涌嶋三津子ら：非定型下痢原性大腸菌について 1, 生活衛生. 54(4), 271-284(2010)
- 6) 鹿島かおりら：埼玉県で発生した腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌による大規模食中毒事例について, IASR. Vol. 43(2022)
- 7) 三宅真実ら：下痢原性大腸菌の Pathotype と病原因子について, 日本食品微生物学会雑誌. 28 (2), 57-67(2011)

【経費使途明細】

使 途	金 額
器材・試薬等（実験器材、培地類、PCR 反応試薬等）	121,008 円
相乗リシーケンス解析	177,672 円
振込手数料	1,430 円
	円
	円
	円
合 計	300,110 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円