

称号及び氏名	博士（獣医学）	竹平 京司
学位授与の日付	2025年2月28日	
論文名	新興人獣共通感染症起因菌 <i>Escherichia albertii</i> の選択鑑別培地の開発とその評価	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	笹井 和美
	副査	松林 誠
	副査	畑中 律敏

## 論文要旨

### 緒言

*Escherichia albertii* (以下 *Ea* と略す) は 1991 年にバングラデシュの小児下痢症患者から分離され、当初は *Hafnia alvei* として同定されたが、その後誤同定されていたことが明らかとなり、2003 年に *Escherichia* 属の新種として再同定された。本菌は、ヒトの胃腸炎患者のみならず斃死した野鳥からも分離され、新興人獣共通感染症起因菌として注目されている。また、本菌の一部には志賀毒素 2 型 (*stx2a*, *stx2f*) 遺伝子を保有し、溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの重篤な疾患を引き起こす可能性が指摘されており、事実 HUS 患者からも本菌が分離されている。我が国においては *Ea* を原因とする集団食中毒事例が 2003 年以降 10 件以上報告されているが、それらの推定原因食品に共通性はなく、ヒトへの感染源や感染経路は不明である。その理由の 1 つとして、*Ea* の細菌学的性状が大腸菌や赤痢菌と酷似しており、特異的な検出系、適切な増菌培地や選択鑑別培地が無く、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌 (EHEC) と誤同定されていたことが挙げられる。それゆえ、*Ea* 感染症の実態は過小評価されており、不明である。

近年、*Ea* に特異的に存在する細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子を標的とした PCR 法をはじめ、様々な *Ea* 検出用 PCR 法や選択増菌培地、鑑別培地が開発され、*Ea* の検出・分離報告例は増加傾向にある。一方で、*Ea* が検出されたとしても、実際分離する上においては様々な問題があり、検体中の *Ea* の菌数が少ない、あるいは *Ea* の菌数が多くても *Ea* の割合が少ない場合、*Ea* の分離が困難である場合が少なくない。当該研究グループでは、*Ea* はキシロース (X)、ラムノース (R)、メリビオース (M) を分解しない

が、大腸菌を含むある種の細菌はこれらの糖を分解することに着目し、糖を分解し赤色を呈する菌と糖を分解せず無色のコロニーとして鑑別できる XRM-MacConkey agar (XRM-Mac)を開発した。この培地を用いることで、赤色コロニーを形成する大腸菌などと無色コロニーを形成する *Ea* との鑑別が可能となった。しかし、検体には *Ea* 以外にも無色コロニーを形成する菌種が存在し、無色コロニーが必ずしも *Ea* であるとは限らず、加えて、赤色コロニーの割合が多い時にも単一コロニーとしての分離が困難である。それゆえ *Ea* 以外の菌の増殖を抑制し、*Ea* の増殖を特異的に促進する選択培地の開発が急務である。

EHEC の選択鑑別培地には、胆汁酸塩類などに加えてセフィキシム(C)や亜テルル酸(T)が利用されており、EHEC 以外の大腸菌や多くの腸内細菌目細菌の発育抑制にて、効果的な選択鑑別培地となっている。そこで本研究では、C と T を利用し XRM-Mac 上で *Ea* と類似の無色コロニーを形成する菌種の発育に加え、赤色コロニーを形成するより多くの菌種の発育を抑制し、*Ea* の分離効率を向上させる *Ea* の選択鑑別培地を開発することを目的とした。さらに、無色コロニー、赤色コロニーを形成する様々な菌種の単一菌株純培養レベル、ヒト下痢症患者便や食品検体を用いて開発した培地の評価を行なった。

## 第一章 XRM-Mac の鑑別能を保持し、*E. albertii* の選択性を高めた選択鑑別培地の開発

*Ea* の選択鑑別培地の開発を目的に、EHEC の分離選択培地に使用されている C、T または CT をそれぞれ添加した TSB 培地を作製し、*Ea* の増殖を評価した。その結果、TSB ではどの試薬を加えても *Ea* は増殖し、CT は *Ea* の選択培地に使用できることがわかった。そこで、TSB を基本組成とした trypticase soy agar (TSA) と XRM-Mac に、C、T または CT をそれぞれ加えた培地を作製し、同様に *Ea* の発育に及ぼす影響を調べた。その結果、TSA は CT を添加しても *Ea* は発育したが、XRM-Mac では、T が存在すると *Ea* は発育できなかった。そこで、*Ea* の発育に対する TSA におけるポジティブ要因と XRM-Mac におけるネガティブ要因について、それぞれの培地に特異的に含まれる成分を取り除いた欠損培地を作製し、*Ea* の発育性を評価した。その結果、TSA におけるリン酸水素二カリウムが大きなポジティブ要因であり、その他にグルコースやペプトン類(大豆由来ペプトン)もポジティブ要因であることを確認した。また、XRM-Mac におけるペプトン類(肉由来ペプトン)がネガティブ要因であることも確認した。これらの結果を踏まえ *Ea* の選択鑑別培地候補として、CT-PS-XRM-MacConkey agar (CT-PS-XRM-Mac)を構築した。

次に、XRM-Mac を比較対照とした CT-PS-XRM-Mac の純培養した単一菌株を用いた評価では、試験に供した *Ea* 65 株全てが両培地で無色コロニーを形成した。また XRM-Mac で無色コロニーを形成する 5 属 9 菌種 33 株の発育が抑制された。さらに、XRM-Mac で赤色コロニーを形成する 7 属 13 菌種 20 株の発育も抑制された。以上の結果より、新たに構築した CT-PS-XRM-Mac は、XRM-Mac で無色コロニーのみならず、赤色コロニー形成菌の発育も抑制することから *Ea* に対して非常に選択性の高い鑑別培地となることを確認した。また、XRM-Mac の開発時に、XR-Mac では無色コロニーを

形成し、M を加えることで赤色コロニーとなった *Salmonella* Typhimurium の発育が CT-PS-XRM-Mac で抑制されたことから、M を取り除いた CT-PS-XR-Mac として更なる評価を行った。

## 第二章 XRM-Mac を比較対照としてヒト下痢症患者便を用いた開発培地の有効性評価

第一章で構築した CT-PS-XR-Mac の有効性の評価を XRM-Mac を比較対照として、ヒト下痢症患者便検体を用いたスパイク試験にて行った。*Ea* に特異的 PCR 法によって *Ea* 陰性と判定されたヒト下痢症患者便スワブ 3 検体をそれぞれ PBS に懸濁し、*Ea* をスパイクした。懸濁液を XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac 上に植菌し、37°C で培養後、得られた赤色／無色コロニー数をスパイクしていない検体とスパイクした検体で比較した。さらに、得られた無色コロニーについては *Ea* 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で *Ea* か *Ea* でないかを判定した。その結果、3 検体全てでスパイク無しでは無色コロニーは得られなかった。XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac と比較した場合、スパイク無しでは赤色コロニーは 16～30%減少した。一方、スパイクありでは赤色コロニーは 3～47%減少し、無色コロニーは 1.1～3 倍増加した。また、得られた無色コロニーは *Ea* 特異的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って全てが *Ea* と確認された。さらに、ヒト下痢症患者便 61 検体を用いた両培地の比較も行った。ヒト下痢症患者便スワブ検体から PBS 懸濁液を作製し、TSB で増菌培養後、*Ea* に特異的 PCR 法で 5 検体は *Ea* が陽性、残り 56 検体は *Ea* が陰性と判定された。陰性となった 56 検体のうち、47 検体では XR-Mac で赤色コロニーのみが、残り 9 検体では赤色と無色コロニーの両方が得られた。後者 9 検体については、CT-PS-XR-Mac では無色コロニーは得られず、発育抑制された菌種は *Pseudomonas aeruginosa*、*Morganella morganii*、*Providencia rettgeri* と同定された。*Ea* が陽性となった患者便 5 検体では、赤色コロニーは XRM-Mac と比べ CT-PS-XR-Mac を用いることによって 14～68%減少した。さらに陽性検体の両培地で得られた無色コロニーを最大 8 コロニー選び *Ea* に特異的 PCR 法によって調べたところ CT-PS-XR-Mac では無色コロニーの全てが *Ea* であったが、1 検体 XRM-Mac で得られた 8 個の無色コロニーのうち 4 コロニーが *Morganella morganii* と同定された。以上の結果より、CT-PS-XR-Mac は臨床検体を用いても有用である可能性が示された。

## 第三章 XRM-Mac を比較対照として食品検体を用いた開発培地の有効性評価

XRM-Mac を比較対照として第一章で構築した CT-PS-XR-Mac の有効性を、鶏肉検体を用いたスパイク試験にて評価した。市販の鶏肉 10 g に約 10 CFU の *Ea* をスパイクし、90 ml の TSB を添加してストマッカーで処理後 37°C、20±2 時間の増菌培養を行い、増菌培養液の希釈液を両培地に植菌後、得られた赤色及び無色コロニー数を計測した。なお鶏肉は異なる 3 検体を実験に供した。スパイク無しでは、XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac を比較して、赤色コロニー数は 79～100%減少した。一方、得られた 6～25 個の無色コロニーは全てゼロとなった。スパイク試験においても XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac を比較して赤色コロニー数は減少した。一方、無色コロニーは 2 検体

で増加し、1 検体で減少した。しかしながら、無色コロニー数が増加した 2 検体では、XRM-Mac での *Ea* 特異的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る *Ea* 陽性率は 55%と 75%であったが、CT-PS-XR-Mac では 98%と 99%であった。また、無色コロニー数が減少した 1 検体では、XRM-Mac での *Ea* 陽性率は 21%であったが、CT-PS-XR-Mac での *Ea* 陽性率は 97%といずれの検体においても高い陽性率を示した。さらに、XRM-Mac 上にて *Ea* ではないと確認された無色コロニー形成菌は *Aeromonas* spp.、*M. morgani* と同定され、これらは CT-PS-XR-Mac では発育が抑制されていたと考えられた。以上より、食品の中で最も多く *Ea* が検出されている鶏肉を用いた検証実験で、CT-PS-XR-Mac は *Ea* の選択鑑別培地として有用である可能性が示された。

## 総括

1. *Ea* の選択鑑別培地として CT-PS-XRM-MacConkey agar を開発した。
2. CT-PS-XRM-MacConkey agar は単一菌株純培養レベルでの試験において、XRM-Mac にて *Ea* と類似の無色コロニーを示す 5 属 9 菌種 33 株の発育を抑制しただけでなく、赤色コロニーを示す 7 属 13 菌種 20 株の発育を抑制することが確認された。
3. メリビオース (M) を加えることで無色から赤色コロニーを形成した、サルモネラが CT-PS-XRM-MacConkey agar では発育できなかったことから、*Ea* 選択鑑別培地として M を削除した CT-PS-XR-MacConkey agar を構築した。
4. CT-PS-XR-MacConkey agar は XRM-Mac と比較して、ヒト下痢症患者便検体から得られる赤色コロニーのみならず、無色コロニー形成菌の発育も抑制した。
5. CT-PS-XR-MacConkey agar は XRM-Mac と比較して、鶏肉検体から得られる赤色コロニーのみならず無色コロニー形成菌の発育も抑制した。
6. 本研究によって開発した、CT-PS-XR-MacConkey agar は *Ea* に対して選択性の高い選択分離培地であり、臨床検体のみならず食品検体を用いても *Ea* の分離効率を上げる有用性の高い選択鑑別培地であると考えられた。

## 審査結果の要旨

*Escherichia albertii* (以下 *Ea* と略す) は 1991 年にバングラデシュの小児下痢症患者から分離され、当初は *Hafnia alvei* として同定された。その後、誤同定されていたことが明らかとなり、2003 年に *Escherichia* 属の新種として再同定された。本菌は、ヒトの胃腸炎患者のみならず斃死した野鳥からも分離され、新興人獣共通感染症起因菌として注目されている。また、本菌の一部は志賀毒素 2 型遺伝子を保有し、溶血性尿毒症症候群などの重篤な疾患を引き起こす可能性がある。我が国においては *Ea* を原因とする集団食中毒事例が 2003 年以降 10 件以上報告されているが、それらの推定原因食品

に共通性はなく、ヒトへの感染源や感染経路は不明である。その理由の 1 つとして、*Ea* の細菌学的性状が大腸菌や赤痢菌と酷似しており、特異的な検出系、適切な増菌培地や選択鑑別培地が無く、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌 (EHEC) と誤同定されていたことが挙げられる。

近年、*Ea* に特異的な遺伝子を標的とした PCR 法をはじめ、様々な選択増菌培地、鑑別培地が開発され、*Ea* の検出・分離報告例は増加傾向にある。一方で、*Ea* が検出されたとしても、分離率は必ずしも高くない。キシロース (X)、ラムノース (R)、メリビオース (M) を用い無色コロニーを形成する *Ea* と赤色コロニーを形成する大腸菌などと鑑別できる XRM-MacConkey agar (XRM-Mac) が開発されている。本研究では *Ea* の分離効率を高めることを目的に培地にセフィキシム (C) や亜テルル酸 (T) を加えた培地を開発し、*Ea* の発育を従来の培地と比較した。さらに開発した培地を用いて下痢症患者便や食品検体から *Ea* 以外の狭雑菌の増殖が抑制され、*Ea* の分離効率が向上するかを調べた。

第一章では *Ea* の選択増菌鑑別培地の開発を目的に、EHEC の分離選択培地に使用されている C、T または CT をそれぞれ添加した TSB 培地を作製し、*Ea* の増殖を評価した。その結果、TSB ではどの試薬を加えても *Ea* は増殖し、CT は *Ea* の選択培地に使用できると考えられた。そこで、TSB に寒天を添加した TSA とコロニーの色で *Ea* と大腸菌を鑑別できる XRM-Mac に CT をそれぞれ加えた培地を作製し、*Ea* の発育に及ぼす影響を調べた。CT-TSA では *Ea* は発育したが、XRM-Mac では T が存在すると *Ea* は発育できなかった。この違いは TSA に含まれるリン酸 (P) とソイペプトン (S) に基づくことがわかった。CT に加え PS を加えた CT-PS-XR-Mac を作製し、CT-PS-XR-Mac の特異性、感度を XRM-Mac と比較して優れており、*Ea* の選択増菌鑑別培地として有用であると考えられた。

第二章では、第一章で構築した CT-PS-XR-Mac の有用性を XRM-Mac と比較し、ヒト下痢症患者便検体を用いたスパイク試験にて評価した。*Ea* に特異的な PCR 法で *Ea* 陰性と判定されたスワブ 3 検体に *Ea* をスパイクし、スパイク検体を XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac で培養し、赤色と無色コロニー数を計測した。スパイク無しでは 3 検体全てで無色コロニーは得られず、赤色コロニーは XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac と比較し 16~30% 減少した。一方、スパイクありでは赤色コロニーは 3~47% 減少し、無色コロニーは全てが *Ea* と確認され 1.1~3 倍増加した。さらに PCR 法で陰性と判定されたスワブ検体で Mac 上無色コロニーを形成した 56 検体は、XRM-Mac で 9 検体が無色コロニーを形成したが、CT-PS-XR-Mac では 0 であった。PCR 法で *Ea* が陽性と判定されたスワブ 5 検体で、1 検体のみ XRM-Mac で得られた無色コロニーが *Morganella* であった。以上より、CT-PS-XR-Mac は XRM-Mac と比較し下痢便検体に対して非常に選択性の高い培地であることが明らかとなった。

第三章では第一章で構築した CT-PS-XR-Mac の有用性を XRM-Mac と比較し、食品の中で最も多く *Ea* が検出されている鶏肉 3 検体を用いたスパイク試験にて評価した。市販の鶏肉に *Ea* をスパイクし、増菌培養後、両培地に植菌し、得られた赤色及び無色コロニー数を計測した。スパイク無しでは、XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac を比べ赤色コロニー数は 79~100% 減少し、XRM-Mac で得られた 6~25 個の無色コロニーは、

CT-PS-XR-Mac では全てゼロとなった。スパイク試験においても XRM-Mac と CT-PS-XR-Mac を比較して赤色コロニー数は減少し、無色コロニー中のみならず総コロニー数中の *Ea* の割合は3検体全てで増加した。以上より、鶏肉を用いた検証実験で、CT-PS-XR-Mac は *Ea* の選択鑑別培地として有用であることが示された。

以上の結果は、本研究で開発した *Ea* の新規選択増菌鑑別培地は、糞便中や食品中の夾雑菌の増殖を抑え、本菌の分離率を大きく向上させることに繋がることを示すものである。本研究成果は獣医学の分野のみならず、食品衛生学の分野において多大な貢献をすると考えられる。従って、本論文の審査及び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。