

原 著

山形県内と畜場搬入豚の *Escherichia albertii* 保菌状況
及びその疫学的特徴

佐藤空見子^{1)†} 永井章子¹⁾ 小原 準¹⁾ 遠藤千春^{1)*} 林 哲也²⁾
大岡唯祐³⁾ 瀬戸順次⁴⁾ 村上光一⁵⁾

- 1) 山形県庄内食肉衛生検査所 (〒 999-7762 東田川郡庄内町家根合字中荒田 21-7)
2) 九州大学大学院医学研究院 (〒 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)
3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 (〒 890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1)
4) 山形県衛生研究所 (〒 990-0031 山形市十日町 1-6-6)
5) 国立感染症研究所感染症疫学センター (〒 208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1)

(2019年7月19日受付・2019年10月18日受理)

要 約

食中毒原因菌 *Escherichia albertii* の豚での保菌状況と分離株の特徴を明らかにするため、2017年及び2018年に山形県内のと畜場搬入豚の保菌調査を行った。525検体の盲腸便を調査し、17検体(3.2%)から37株を分離した。このうち、20分離株(54.1%)がテトラサイクリン等の何らかの抗菌薬に耐性を示した。また、パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法では、37分離株は6グループに分類された。各グループを代表する6菌株は、ゲノムワイド系統解析により既知の5つの系統群の中のG1群及びG3群(2重系統群)に分類された。当該3群は、いずれも人由来株を含んだ。本研究により、山形県と近隣県の豚は多様なPFGE型を示す *E. albertii* を保菌することが判明し、豚の生産物が本菌の人への感染源となり得ることが示唆された。

——キーワード：薬剤耐性, *Escherichia albertii*, ゲノムワイド系統解析, パルスフィールド・ゲル電気泳動, 豚。

-----日獣会誌 73, 265~273 (2020)

Escherichia albertii は、グラム陰性通性嫌気性桿菌で、2003年に *Escherichia* 属の新菌種として提唱された新興下痢症原因菌である [1, 2]。人の *E. albertii* 感染例は、1990年のバングラデシュにおける小児下痢症患者以降、ギニアビサウ、ドイツ、ブラジル、アメリカ、ポーランド、ノルウェー、オーストラリア、日本において報告されている [2]。わが国では、2019年4月現在10件以上の *E. albertii* 集団感染事例が報告されており、少なくともうち4件は、有症者数100人を超える集団食中毒事例である [2, 3]。このような状況下、わが国での *E. albertii* 感染症に関するより詳細な研究が求められている。

E. albertii の保菌動物として、一部の鳥類及び哺乳類が知られているが、豚における保菌状況は明らかでない。

哺乳類では、猫、豚、コウモリ、海獣(seals)からの分離があるが [2, 4-6]、豚では Hinenoya ら [5] により偶然に分離された1株が唯一の報告である。豚肉でも、Wang ら [7] による中国での調査における1株の分離に留まっており、豚での *E. albertii* 保菌状況調査は進んでいない。

上記の *E. albertii* 豚分離株の性状として、非運動性、硫化水素非産生性、インドール陰性、 β -グルクロニダーゼ非産生、乳糖非分解性、ソルビトール分解性が示されている [5]。豚由来株の性状に多様性があるか、人あるいは他の動物由来株と同じ性状を示すか否かを確認することは、*E. albertii* の多様性を把握するためにも必要である。

E. albertii の病原関連因子として、Ⅲ型分泌装置や細

† 連絡責任者：佐藤空見子 (山形県庄内食肉衛生検査所)

〒 999-7762 東田川郡庄内町家根合字中荒田 21-7

☎ 0234-45-1285 FAX 0234-42-3850 E-mail: satokumiko1@pref.yamagata.jp

* 現所属：遠藤千春 (山形県中央家畜保健衛生所) 〒 990-2161 山形市大字漆山 736

表1 *Escherichia albertii* 検出用及び病原遺伝子検出用のプライマー及びPCR反応条件

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度	サイズ(bp)	引用文献
<i>lysP</i>	lysP_107F	5'-GGG CGC TGC TTT CAT ATA TTC TT-3'	60°C	252	[12]
	lysP_358R	5'-TCC AGA TCC AAC CGG GAG TAT CAG GA-3'			
<i>mdh</i>	mdh_50F	5'-CTG GAA GGC GCA GAT GTG GTA CTG ATT-3'	60°C	115	[12]
	mdh_164R	5'-CTT GCT GAA CCA GAT TCT TCA CAA TAC CG-3'			
<i>clpX</i>	clpX_28	5'-TGG CGT CGA GTT GGG CA-3'	60°C	384	[13]
	clpX_411R	5'-TCC TGC TGC GGA TGT TTA CG-3'			
<i>E. albertii</i> 特異的配列	EA0134_283F	5'-TTG CGT ACT AAC GCA GGA TG-3'	58°C	209	[14]
	EA0134_446R	5'-TGT GAC TGT TGG GCT ATT GG-3'			
<i>eae</i>	eaek1	5'-GCT TAG TGC TGG TTT AGG AT-3'	55°C	591	[15]
	EA2	5'-CTC TGC AGA TTA ACC TCT GC-3'			
<i>stx</i> *	upstream	5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'	50°C	906	[16]
	downstream	5'-TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'			
<i>cdtB</i> II/III/V	CDT-s1	5'-GAA AGT AAA TGG AAT ATA AAT GTC CG-3'	55°C	466	[17]
	CDT-as1	5'-AAA TCA CCA AGA ATC ATC CAG TTA-3'			
<i>cdtB</i> I/IV	CDT-s2	5'-GAA AAT AAA TGG AAC ACA CAT GTC CG-3'	55°C	466	[17]
	CDT-as2	5'-AAA TCT CCT GCA ATC ATC CAG TTA-3'			

**stx* : *stx1* 及び *stx2*

胞膨化致死毒素が報告されている [2]。また、一部の *E. albertii* からは志賀毒素遺伝子 (*stx2f* あるいは *stx2a*) が検出されている [2, 8]。本菌の病原性を考えるうえで、*E. albertii* の代表的な病原関連因子 [2] であるインチミン、志賀毒素、細胞膨化致死毒素の保有状況の把握は必須であろう。

E. albertii の薬剤耐性について、豚由来株での報告はない。人からは、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系及びオールドキノロン系薬剤等に耐性を示す菌株が分離されている [1, 9]。鶏肉からも、ストレプトマイシン等に耐性を示す株が分離された [10]。家畜における各種抗菌薬の使用量と当該家畜での耐性大腸菌の出現率には相関があるとされる [11]。豚は、家畜の中では抗菌薬使用量が最も多いとされるため [11]、本菌においても豚由来株での薬剤耐性状況の把握が求められる。

一方、*E. albertii* の人・動物間での伝播を検討するために菌株の系統解析が必要であるが、豚由来株に関する系統情報は報告されていない。Ookaら [4] は、人、鳥及び猫由来株の全ゲノム配列に基づいた系統解析により、*E. albertii* を5系統に分類した。豚由来株についても同様の系統解析を進めることで、人を含む動物間での *E. albertii* の感染環への豚の関係を考察することが可能となる。

本研究では、国内の豚における *E. albertii* の保菌状況の解明と豚由来株の生化学的・遺伝学的特徴の解明を目的として、山形県内のと畜場に搬入された豚からの本菌の検出と分離及び分離株の解析を行った。

材料及び方法

供試材料：2017年1～2月及び2017年11月～2018年2月に、山形県内のと畜場に搬入された豚525頭（肥育豚505頭、繁殖豚20頭）の盲腸便を採材した。対象農場は93農場（山形県内65農場、県外28農場）であり、1農場当たり5～12頭から採材した。採材回数は、75農場では1回のみ、17農場では2回、1農場では3回であり、1農場当たりの目標頭数（5検体）を担保するとともに、9農場においては異なる時期に追加採材した。

採材方法：供試豚の盲腸を約2cm切開し、無菌綿棒（メンティップ、日本綿棒(株)、東京）の綿球周囲に盲腸便を付着させたものを検体とした。

スクリーニングPCR：検体を緩衝ペプトン水（日水製薬(株)、東京）10mlに懸濁し、42°C、一晚培養した増菌液の一部を100°C、10分間加熱処理しPCR用鋳型とした。本菌の同定法としてPCR法が報告されている [2, 12-14] が、これまでの研究ではHymaら [12] の *lysP*、*mdh*、*clpX* の3遺伝子を標的としたプライマーセットによるPCR法が汎用されている [2]。

本研究では、この3プライマーのうち、本菌を特異的に検出できるとされる [12, 14] *lysP* 及び *mdh* のうち、*lysP* を1次スクリーニングに、また、検出精度を上げるために *lysP* 及び *mdh* を2次スクリーニングに用いた（表1）。検体は、同一採材日・同一農場ごとに、最大5検体の鋳型DNAを等量混和したプール試料を1次スクリーニング対象とし、PCR陽性となった場合、当該2～5検体の個別検体の鋳型を対象に、2次スクリーニングを実

施した。2次スクリーニングで両遺伝子が検出された検体をスクリーニング陽性とした。

PCR反応は、PCR反応試薬 (Go Taq Green Master Mix, Promega Corporation, U.S.A.) を使用し、PCR装置 (Takara PCR Thermal Cycler, タカラバイオ(株), 滋賀) で測定した。増幅産物の確認は、2%アガロースゲルを用いた電気泳動により行った。

菌株分離: スクリーニング陽性となった検体の増菌液を、0.85%滅菌生理食塩水で10倍または100倍に適宜希釈後、DHL寒天培地 (栄研化学(株), 東京) に塗抹した。37°C, 一晚培養後、乳糖・白糖非分解の白色コロニーを釣菌し、DHL寒天培地に純培養した。純培養菌を滅菌蒸留水100 μ lに懸濁後、100°C, 10分間加熱処理したPCR用鋳型DNAについて、表1に示すように、上記の3遺伝子 (*lysP*, *mdh*, *clpX*) を用いたマルチプレックスPCRを実施した。3遺伝子配列すべてを検出した検体について、本菌特異的配列検出用プライマー (EA0134_283F, EA0134_446R) を用いたPCRを実施し [14], *E. albertii* 特異的配列の検出を試みた。4種類の配列がすべて検出され、グラム陰性桿菌, カタラーゼ陽性, オキシダーゼ陰性を示した分離株を *E. albertii* と同定した。

菌性状試験: β -ガラクトシダーゼ産生能試験 (ONPGディスク, 日水製薬(株), 東京及びXM-G寒天培地, 日水製薬(株), 東京), SIM培地 (栄研化学(株), 東京), LIM培地 (栄研化学(株), 東京), CLIG寒天培地 (極東製薬工業(株), 東京) 及び糖分解培地 (OF基礎培地, 栄研化学(株), 東京) を用いた菌性状試験を実施した。糖分解試験は、乳糖, 白糖, キシロース, ラフィノース, トレハロース (和光純薬工業(株), 大阪) を対象とした。また、簡易同定キット (API20E, bioMérieux Ltd., France) による試験を実施した。

病原遺伝子の検出: 分離菌の病原遺伝子保有状況を把握するため、PCR法によりインチミン遺伝子 (*eae*), 志賀毒素遺伝子 (*stx*) 及び細胞膨化致死毒素遺伝子 (*cdt*) の検出を試みた (表1)。I~Vのサブタイプが存在する *cdt* については、*cdtB* の配列に基づいて、PCRにより2グループ (*cdtB* II/III/V, *cdtB* I/IV) に分類した (表1)。

薬剤感受性試験: CLSIの方法に準拠し、*Escherichia coli* ATCC25922を精度管理株とした一濃度ディスク法による薬剤感受性試験を実施した。対象抗菌薬は、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), セフィキシム, セフォタキシム, セフトジジム, セフボドキシム, セフォキシチン, メロペネム, ナリジクス酸 (NA), オフロキサシン及びコリスチンの12薬剤 (Becton Dickinson and Company, U.S.A.) とした。

パルスフィールド・ゲル電気泳動解析: Murakamiら [18] の方法に準拠し、制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 解析を実施した。PFGE像の解析には、画像解析ソフトウェア (FPQuest Software, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) を用いた。分離株の泳動パターン類似度はDice係数 (トレランス1%), 系統樹作成は unweighted pair-group method using average linkage 法にて行った。

次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド系統解析: PFGE解析による分類結果を基に、各グループを代表する1株をランダムに選択し、6菌株のドラフトゲノム配列を取得した。各菌株について、DNA抽出キット (Puregene Yeast/Bact. Kit B, Qiagen, Germany 及び NucleoSpin gDNA Clean-up, Macherey-Nagel, Germany) を用いてゲノムDNAの精製を行った。

次世代シーケンサーライブラリー調整キット (NEB-Next Ultra II DNA Library prep for Illumina, New England Biolab, U.S.A.) を用いてシーケンス用ライブラリーを作成し、次世代シーケンス装置 (HiSeq, Illumina, U.S.A.) を用いて150 bpのペアエンド (PE) 配列を取得した (YS-F1-1a株: DRA008688, YS-F1-2株: DRA008689, YS-F12-1株: DRA008686, YS-F13-1a株: DRA008685, YS-F14-1c株: DRA008684, YS-F5-1a株: DRA008687)。アセンブリには、アセンブルソフトウェア (Platanus version 1.1.4, フリーソフト, <http://platanus.bio.titech.ac.jp/>) [19] を用いた。得られたドラフトゲノム配列を用い、先行研究に準じてゲノムワイド系統解析を実施した [4]。

具体的には、*Escherichia* 属内で高度に保存されている111のシングルコピー遺伝子の塩基配列をドラフトゲノム配列から抽出・連結し、系統ネットワーク推定用ソフトウェア (SplitsTree4, フリーソフト, <http://www.splittree.org>) [20] を用いて neighbor-joining 法により系統樹を作成した。系統樹の作成には、本研究の6株以外に、98菌株 (人, 鳥及び猫由来 *E. albertii* 34株, *E. coli* 44株, *Escherichia fergusonii* 5菌株及び他の *Escherichia* 系統群に属する15菌株) のゲノム配列を用いた。

本研究で得られた6株のドラフトゲノム配列は、DDBJ/GenBank/EMBLデータベースに、以下のaccession番号で登録した。YS-F1-1a株: BJKU01000001-01000168, YS-F1-2株: BJKV01000001-01000128, YS-F12-1株: BJKW01000001-01000178, YS-F13-1a株: BJKX01000001-01000141, YS-F14-1c株: BJKY01000001-01000109, YS-F5-1a株: BJKZ01000001-01000115。

成 績

スクリーニング PCR: 検体別では、525 検体中 96 検体 (18.3%) がスクリーニング陽性となった。農場別では、93 農場中 45 農場 (48.4%) がスクリーニング陽性となり、45 農場のうち 35 農場は山形県内、10 農場は県外に分布した。

菌株分離: 検体別では、スクリーニング陽性となったスクリーニング陽性検体から DHL 寒天培地で単離された白色コロニーを 1 検体から最大 16 コロニー鈎菌し精査したところ、17 検体 (3.2%) から 37 の *E. albertii* 分離株が得られた。農場別では、14 農場 (15.1%) の検体から本菌を分離した。そのうち、12 農場は山形県庄内地域、2 農場は山形県外の農場であった。農場ごとの分離検体数は、11 農場は各 1 検体のみであったが、3 農場では 2 検体から *E. albertii* が分離された。

得られた 37 分離株には、検体採取地域 - 農場番号 - 検体番号を付して菌株番号とした (例: 山形県庄内の F1 農場で分離された 1 番目の菌株は YS-F1-1)。また、同一検体で複数の菌株が分離された場合には、末尾にアルファベットを付して区別した (例: 1a)。

以降これら 37 分離株について追加検査を行った。

菌性状試験: 生化学性状では、硫化水素非産生、インドール陽性、非運動性、リジン脱炭酸能陽性、 β -グルクロニダーゼ非産生、乳糖、白糖、キシロース、ラフィノース非分解性、トレハロース分解性は全 37 株で共通であった。一方、13 検体由来の 22 分離 (59.5%) が β -ガラクトシダーゼ非産生であった (図 1)。

簡易同定キットによる同定検査は、17 検体由来の各代表 1 分離株について実施し、すべて *Escherichia coli* 2 と判定された (API20E コード: 5144102 または 4144102)。

病原遺伝子の検出: 分離株 37 株は、すべて *eae* (インチミンをコードする III 型分泌装置のマーカー遺伝子) と *cdt* が陽性であったが、*stx* は陰性であった。*cdtB* サブタイプ別では、*cdtB* II/III/V が 37 分離株すべて陽性となり、*cdtB* I/IV は 9 検体由来の 15 分離株 (40.5%) が陽性であった (図 1)。

薬剤感受性試験: 17 検体由来の 37 分離株中、検査した 12 薬剤のいずれかに耐性を示したのは 9 検体由来 20 分離株 (54.1%) であった。薬剤耐性状況は、SM 単剤耐性が 15 分離株、TC、KM 単剤耐性が各 1 分離株、TC/SM/NA の 3 剤耐性が 3 分離株であった (表 2, 図 1)。薬剤別では、SM 耐性が最も多く、次いで TC、NA、KM 耐性の順に検出された (表 2)。

また、3 剤耐性を含む耐性・感受性パターンは、検体ごとにすべて共通していた (図 1)。農場別では、YS-F1 農場由来の 2 検体から分離された株が異なる耐性パ

ターンを示したほかは、共通していた。

PFGE 解析: 分離株 37 株は、類似度 60% での型別により a~f の 6 グループに分類された。a, d, e, f グループは 1 農場由来株のみで構成された一方、b, c グループはそれぞれ 4 及び 7 農場由来株で構成された (図 1)。同一検体から複数株が分離された 8 検体では、検体ごとにすべての分離株が同一グループに分類された。

県外 2 農場由来株は、複数の山形県庄内地域農場由来株とともに b, c グループにそれぞれ含まれた。また、同一農場由来株は、同一の PFGE グループを示す傾向にあったが、F1 農場由来の YS-F1-1 株 (2017 年 2 月採材) と YS-F1-2 株 (2017 年 11 月採材) が異なるグループ (a と b グループ) に分類された。

今回の PFGE 解析の結果では、同一グループに分類される分離株は同一クローンの可能性が高いと判断可能で、本調査において 14 農場 17 検体から得られた 37 分離株は 6 菌株 (strains) にて構成されていると考えられた。

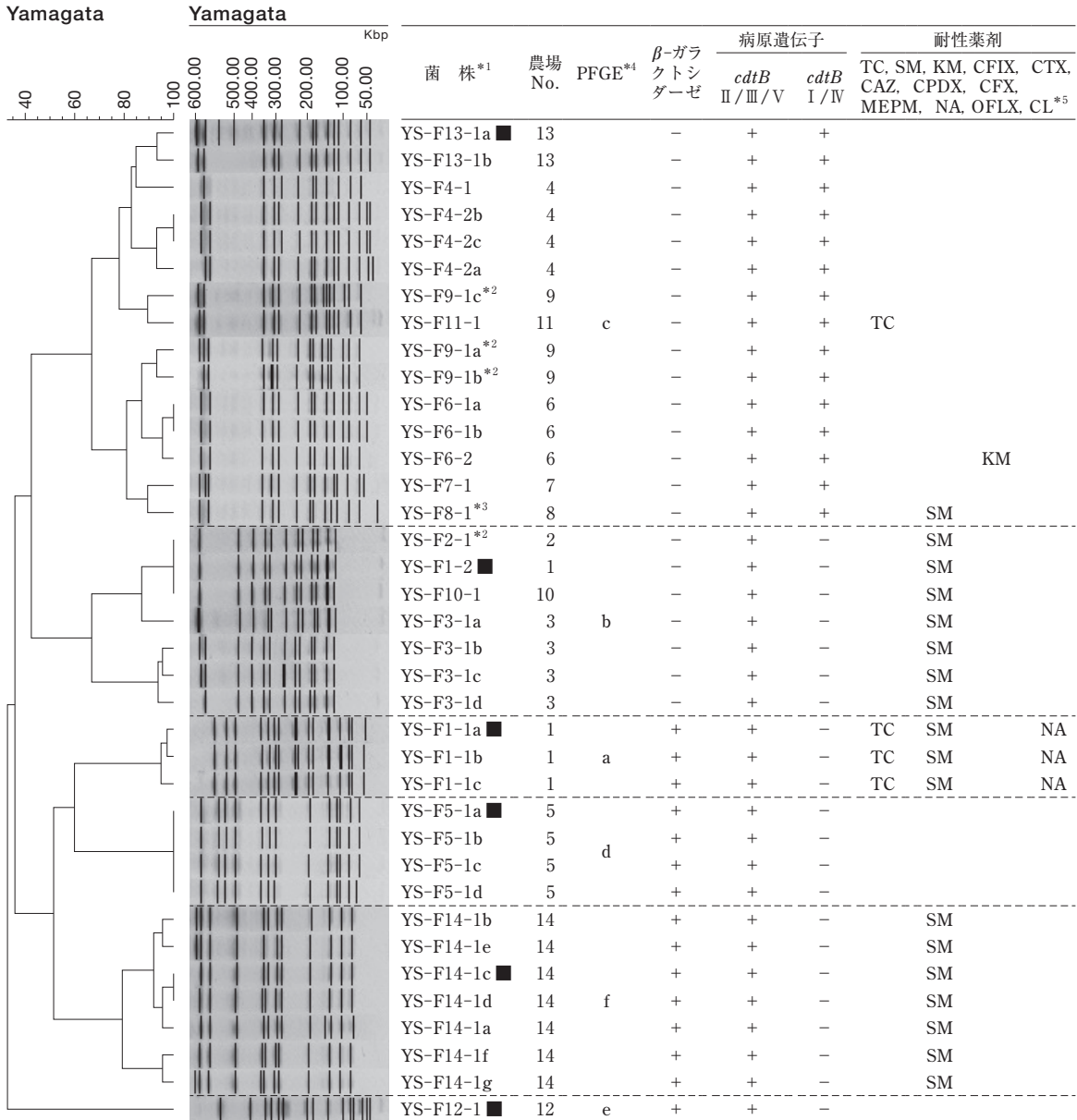
生化学的性状及び病原遺伝子検出状況との比較の結果: β -ガラクトシダーゼ非産生株は b, c グループ、*cdtB* I/IV 陽性株は、c グループのみにそれぞれ偏在していた。薬剤耐性は、c グループを除き PFGE グループごとに同一の耐性状況を示した。c グループでは、全剤感受性が 6 検体由来 12 分離株、TC、SM、KM 単剤耐性が各 1 分離株であった。

ゲノムワイド系統解析: PFGE 解析で e グループに分類された 1 菌株は、人及び鳥由来株が含まれる G1 系統に分類された (図 2)。他の 5 菌株はいずれも人、鳥、及び猫由来株が含まれる G3 系統に分類された。ただし、G3 系統は多様性に富んだ系統であるため、b, c グループの 2 菌株と a, d, f グループの 3 菌株は異なる亜系統に分類されたが、いずれの亜系統にも人由来株が含まれていた。また、この解析から、b, c グループの株と a, d, f グループの株は、それぞれ遺伝的に非常に近縁の菌株であることが明らかとなった。

考 察

本研究では、国内の一地域ではあるが、比較的大規模な豚の *E. albertii* 保菌調査を実施し、3.2% (17/525 検体) の豚盲腸便から *E. albertii* を分離した。本研究で分離された菌株の生化学性状は従来報告されていた本菌の性状と同様であった [2, 17]。さらに病原遺伝子に関しては、すべての分離株から *eae* と *cdt* が検出され、加えてゲノムワイド系統解析では、今回分離された豚由来分離株を代表する 6 菌株は人由来株を含む系統あるいは亜系統に分類された。これら結果は、豚が保有する *E. albertii* が人由来株と近縁であることを示唆し、人への媒介動物として豚が無視できないことを示している。

Dice (Tol 1.0% -1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0% -100.0%]



- *1 分離菌株名：検体採取地域-農場番号-検体番号の順に示す。末尾のアルファベットは、同一豚検体での菌株通し番号を示す。
- *2 県外農場、他 33 株は山形県庄内地域農場由来豚を示す。
- *3 繁殖豚由来株、他 36 株は肥育豚由来株を示す。
- *4 PFGE 型別 (a~f グループ)。■：PFGE グループの代表株 (6 株)。
- *5 使用薬剤 TC：テトラサイクリン、SM：ストレプトマイシン、KM：カナマイシン、CFIX：セフィキシム、CTX：セフォタキシム、CAZ：セフトラジジム、CPDX：セフボドキシム、CFX：セフォキシチン、MEPM：メロベナム、NA：ナリジクス酸、OFLX：オフロキサシン、CL：コリスチン。
- *6 人・鳥・猫由来株で構成される 26 株の検査値。
- *7 () 内は、cdt 遺伝子の検出状況 (cdtB II/III/V 及び I/IV は未実施)。
- *8 SM, CFIX, CTX, CAZ, CPDX, CFX, MEPM, NA, OFLX, CL は検査未実施。
- *9 CTX, CAZ, CPDX, CFX, MEPM, NA, OFLX, CL は検査未実施。

人由来株 (参考)

株数	β-ガラクトシダーゼ	病原遺伝子		耐性薬剤			参考文献
		cdtB II/III/V	cdtB I/IV	TC, SM, KM, CFIX, CTX, CAZ, CPDX, CFX, MEPM, NA, OFLX, CL			
5	NT	(NT)*7		TC (100%), KM (0%)*8		[1]	
21	100%	(NT)		TC (100%), SM (76%), KM (0%), CFX (0%)*9		[9]	
1	100%	100%	0%	NT		[21]	
45	NT	100%	8.9%	NT		[8, 22]	
14	88.5%*6	100%	7.1%	NT		[17]	
60	96.7%	(86.7%)		NT		[23, 24]	
6	100%	(NT)		NT		[25, 26]	
15	NT	(100%)		NT		[3, 27, 28]	

NT：検査未実施。

図1 豚由来 *Escherichia albertii* 37 株のバルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 解析結果及び PFGE グループで分類された各種性状結果。また、人由来株の文献値を参考として示す。文献値は同様の調査内容であるものは合算して 1 行に示している。

山形県における豚の *E. albertii* 保菌状況調査

表2 豚由来 *Escherichia albertii* の薬剤耐性菌株数割合 (%)

由来	株数 (n)	テトラサイクリン系	アミノグリコシド系		セフェム系	カルバペネム系	キノロン系		ポリペプチド系	参考文献
		TC*	SM	KM	CFIX, CTX, CAZ, CPDX, CFX	MEPM	NA	OFLX	CL	
本研究 豚	37	10.8	48.6	2.7	0	0	8.1	0	0	-
参考 鶏肉 (肝臓)	2	0	50.0	0	0	-	0	-	-	[10]
人	4	100	-	0	-	-	-	-	-	[1]
人	21	100	76.0	0	0	0	-	0	-	[9]

*TC: テトラサイクリン, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, CFIX: セフィキシム, CTX: セフトキシム, CAZ: セフトジジム, CPDX: セフポドキシム, CFX: セフォキシチン, MEPM: メロペネム, NA: ナリジクス酸, OFLX: オフロキサシン, CL: コリスチン. -: データなし

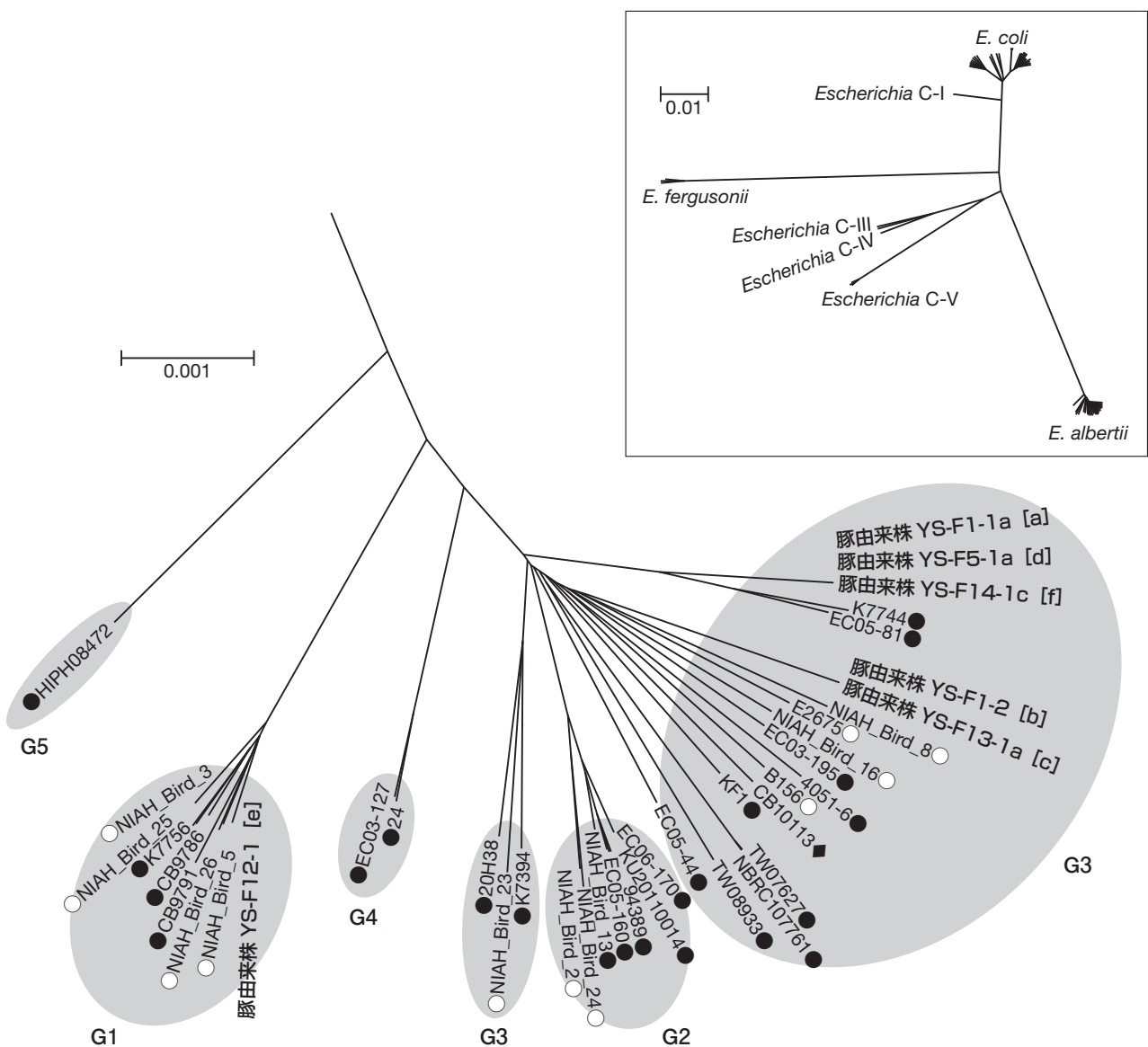


図2 次世代シーケンサーを用いた *Escherichia* 属ゲノムワイド系統解析結果. 本研究で取得した豚由来6株及び98株の参照ゲノム配列について, 111のシングルコピー遺伝子の系統関係を neighbor-joining 法により解析した. 枠内は, *Escherichia* 属の関係性を示し, 枠外は *Escherichia albertii* 系統の拡大図を示す.

●: 人由来株, ○: 鳥由来株, ◆: 猫由来株, []: PFGE グループの代表株 (a~f).

本研究では、PCRを用いたスクリーニング陽性率(18.3%)と菌分離率(3.2%)が乖離した。この点に関して、検出に用いたプライマーが*E. albertii*以外にも検出することがあるとの報告を踏まえると[14]、スクリーニング陽性率が過大評価されている可能性がある。スクリーニングにおけるプライマーの選択について検討が必要である。一方で、現状では*E. albertii*の標準的な分離培養手法が未確立であるため、本研究における菌分離率が過小評価されている可能性もある。より正確な*E. albertii*の保菌状況把握のためには、精度の高いPCR検出法や、分離培養手法の確立と選択性の高い培地の開発が望まれる。

生化学性状では、すべての分離株でソルビトール非分解性、59.5%(22/37分離株)は β -ガラクトシダーゼ非産生株を示した。 β -ガラクトシダーゼ非産生株が既報[2, 18, 23]と比較して多かった点は、今後さらなる検討が必要であるが、これらの22分離株はc, bのPFGEグループに分類された(図1)。さらに、c, bグループの代表株はG3系統の中の同じ亜系統に属し、きわめて近縁の菌株であることから(図2)、今回の分離株セットには、 β -ガラクトシダーゼ非産生性の近縁株が多く含まれていたことが原因である可能性が高い。

また、簡易同定キット(API20E)において、本分離株は*E. coli* 2と判定された。Hinenoyaら[5]も同様の報告をしている。本菌への簡易同定キット使用時には注意が必要である。現段階で、*E. albertii*はAPI20Eで判定可能な菌種に含まれていないため(アピ20添付文章、2015年3月改訂(第4版))、今後本菌が当該簡易同定キットのデータベースに追加されることが望まれる。

本研究の分離株は、54.1%がTC, SM, KM, NAのいずれかの抗菌薬に耐性を示した(表2, 図1)。豚で用量が多いテトラサイクリン系及びアミノグリコシド系薬剤[11]に対しては、本研究においても耐性株が確認された。特に、SM耐性は6農場由来の18分離株(48.6%)に認められた。

YS-F1農場由来の1検体からは、3分離株のNA耐性株が分離されたが、これらはTCとSMにも耐性であった。また、オールドキノロンであるNAに対する耐性株はいわゆるニューキノロン耐性を獲得する可能性も高いため[29]、今後ニューキノロン系薬剤への耐性化によるさらなる高度耐性化に注意が必要である。今後、農場における薬剤の使用状況とあわせて動向を注視していく必要がある。

分離株が農場ごとに特定のPFGEグループに分類されたことは、農場に固有の菌株が存在している可能性を示す。一方で、同一農場であっても時期的に異なる豚群から異なるグループの菌株が分離され、山形県外を含め経営母体の異なる複数の農場由来の菌株が、PFGE解析

で同一グループに分類された(b, cグループに、4及び7農場由来の菌株が分類されていた)(図1)。この知見は、農場間の豚、人、物資の移動とともに、*E. albertii*も移動している可能性が示唆された。今後、本菌の農場間での伝播や農場固有菌株の有無に関して、さらなる調査が必要である。

ゲノムワイド系統解析においては、Ookaら[4]の解析でG3系統とされていたものが、本研究で得られた6株を追加することで3つの亜系統に分かれた。今後、種々の動物由来株等のゲノム情報を追加していくことで*E. albertii*の系統が細分化され、系統群の見直しが必要になる可能性がある。

本研究の限界として、少なくとも1点があげられる。本研究は定性的な豚の*E. albertii*保菌調査に留まっており、定量的な検討は実施していない。豚が*E. albertii*の大量保菌動物であるのか、あるいは一過性に少量保菌しているだけなのかについては、定量法が確立された後に検討を進めていく必要がある。

結論として、本研究により、山形県及びその隣県の豚は一部の抗菌薬に耐性をもち、多様なPFGE型を示す*E. albertii*を保菌しており、豚の生産物が人への感染源となり得ることが明らかとなった。

引用文献

- [1] Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J : *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children, *Int J Syst Evol Micr*, 53, 807-810 (2003)
- [2] 大岡唯祐 : 新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii*, *日本食品微生物学会雑誌*, 34, 151-157 (2017)
- [3] 床井由紀, 片岡俊輔, 若月 章, 谷澤 輝, 中田友理, 関 哲, 石岡真緒, 荒井恒潤, 大籠裕子, 金子淳子, 長谷充啓, 木原晴子 : 宇都宮市で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について, *日本食品微生物学会雑誌*, 35, 159-162 (2018)
- [4] Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, Tokuoaka E, Furukawa M, Harada S, Yoshino S, Seto J, Ikeda T, Yamaguchi K, Murase K, Gotoh Y, Imuta N, Nishi J, Gomes TA, Beutin L, Hayashi T : Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*, *Genome Biol Evol*, 7, 3170-3179 (2015)
- [5] Hinenoya A, Shima K, Asakura M, Nishimura K, Tsukamoto T, Ooka T, Hayashi T, Ramamurthy T, Faruque SM, Yamasaki S : Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan, *Bmc Microbiol*, 14, 97 (2014), (online), (<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-97>), (accessed 2019-07-17)
- [6] Grillová L, Sedláček I, Páchníková G, Staňková E,

- Švec P, Holochová P, Mícenková L, Bosák J, Slaninová I, Šmajš D : Characterization of four *Escherichia albertii* isolates collected from animals living in Antarctica and Patagonia, *J Vet Med Sci*, 80, 138-146 (2018)
- [7] Wang H, Li Q, Bai X, Xu Y, Zhao A, Sun H, Deng J, Xiao B, Liu X, Sun S, Zhou Y, Wang B, Fan Z, Chen X, Zhang Z, Xu J, Xiong Y : Prevalence of *eae*-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China, *Epidemiol Infect*, 144, 45-52 (2016)
- [8] Brandal LT, Tunsjø HS, Ranheim TE, Løbersli I, Lange H, Wester AL : Shiga toxin 2a in *Escherichia albertii*, *J Clin Microbiol*, 53, 1454-1455 (2015)
- [9] Stock I, Rahman M, Sherwood KJ, Wiedemann B : Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of *Escherichia albertii* and *Hafnia alvei* strains, *Diagn Microb Infect Dis*, 51, 151-163 (2005)
- [10] Maeda E, Murakami K, Sera N, Ito K, Fujimoto S : Detection of *Escherichia albertii* from chicken meat and giblets, *J Vet Med Sci*, 77, 871-873 (2015)
- [11] Asai T, Kojima A, Harada K, Ishihara K, Takahashi T, Tamura Y : Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan, *Jpn J Infect Dis*, 58, 369-372 (2005)
- [12] Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, Young VB, Whittam TS : Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, *J Bacteriol*, 187, 619-628 (2005)
- [13] Oaks JL, Besser TE, Walk ST, Gordon DM, Beckmen KB, Burek KA, Haldorson GJ, Bradway DS, Ouellette L, Rurangirwa FR, Davis MA, Dobbin G, Whittam TS : *Escherichia albertii* in wild and domestic birds, *Emerg Infect Dis*, 16, 638-646 (2010)
- [14] Maeda E, Murakami K, Okamoto F, Etoh Y, Sera N, Ito K, Fujimoto S : Nonspecificity of primers for *Escherichia albertii* detection, *Jpn J Infect Dis*, 67, 503-505 (2014)
- [15] 小林一寛, 勢戸和子, 八柳 潤, 齊藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎 貢, 林 賢一, 松根 渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田 亨, 伊藤健一郎 : 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察, *感染症学雑誌*, 76, 911-920 (2002)
- [16] Lin Z, Kurazono H, Yamasaki S, Takeda Y : Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction, *Microbiol Immunol*, 37, 543-548 (1993)
- [17] Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T : Clinical significance of *Escherichia albertii*, *Emerg Infect Dis*, 18, 488-492 (2012)
- [18] Murakami K, Noda T, Maeda E, Sera N, Fujimoto S : Easy washing of lysed cell plugs for bacterial typing by pulsed-field gel electrophoresis using simple equipment, *J Microbiol Meth*, 101, 67-69 (2014)
- [19] Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T : Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads, *Genome Res*, 24, 1384-1395 (2014)
- [20] Huson DH, Bryant D : Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Mol Biol Evol*, 23, 254-267 (2006)
- [21] Konno T, Yatsuyanagi J, Takahashi S, Kumagai Y, Wada E, Chiba M, Saito S : Isolation and identification of *Escherichia albertii* from a patient in an outbreak of gastroenteritis, *Jpn J Infect Dis*, 65, 203-207 (2012)
- [22] Ooka T, Tokuoka E, Furukawa M, Nagamura T, Ogura Y, Arisawa K, Harada S, Hayashi T : Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan, *Emerg Infect Dis*, 19, 144-146 (2013)
- [23] Murakami K, Maeda-Mitani E, Kimura H, Honda M, Ikeda T, Sugitani W, Konno T, Kawano K, Etoh Y, Sera N, Mizukoshi F, Saitoh T, Kawamura Y, Ishioka T, Ohnishi M, Oishi K, Fujimoto S : Non-biogroup 1 or 2 strains of the emerging zoonotic pathogen *Escherichia albertii*, their proposed assignment to biogroup 3, and their commonly detected characteristics, *Front Microbiol*, 10:1543, doi:10.3389/fmicb.2019.01543 (2019), (online), (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01543/full>), (accessed 2019-07-17)
- [24] Nimri LF : *Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties, *Diagn Microb Infect Dis*, 77, 91-95 (2013)
- [25] Abbott SL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL, Janda JM : Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*, *J Clin Microbiol*, 41, 4852-4854 (2003)
- [26] Inglis TJJ, Merritt AJ, Bzdyl N, Lansley S, Urosevic MN : First bacteraemic human infection with *Escherichia albertii*, *New Microbe and New Infect*, 8, 171-173 (2015)
- [27] Hinenoya A, Yasuda N, Hibino T, Shima A, Nagita A, Tsukamoto T, Yamasaki S : Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* strain producing three different toxins from a child with diarrhea, *Jpn J Infect Dis*, 70, 252-257 (2017)
- [28] Fiedoruk K, Daniluk T, Swiecicka I, Murawska E, Sciepek M, Leszczynska K : First complete genome sequence of *Escherichia albertii* strain KF1, a new potential human enteric pathogen, *Genome Announc*, 2:e00004-14, doi: 10.1128/genomeA.00004-14. (2014), (online), (<https://mra.asm.org//content/2/1/e00004-14>), (accessed 2019-07-17)
- [29] 勝田 賢 : 耐性菌と抗生物質による治療, *家畜感染症学会誌*, 2, 1-8 (2013)

Survey of *Escherichia albertii* in Swine Feces Sampled at a Slaughterhouse
in Yamagata Prefecture, Japan

Kumiko SATO^{1)†}, Akiko NAGAI¹⁾, Jun OBARA¹⁾, Chiharu ENDO^{1)*}, Tetsuya HAYASHI²⁾,
Tadasuke OOKA³⁾, Junji SETO⁴⁾ and Koichi MURAKAMI⁵⁾

- 1) *Yamagata Prefectural Shonai Meat Inspection Center, 21-7 Aza-Nakaarata, Kaneai, Shonai-machi, Higashitagawa-gun, 999-7762, Japan*
- 2) *Faculty of Medical Sciences, Kyusyu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan*
- 3) *Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan*
- 4) *Department of Microbiology, Yamagata Prefectural Institute of Public Health, 1-6-6 Tokamachi, Yamagata, 990-0031, Japan*
- 5) *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, 208-0011, Japan*

SUMMARY

Swine fecal samples collected from a slaughterhouse in Yamagata Prefecture, Japan in 2017 and 2018, were examined for the presence of *Escherichia albertii* to determine whether swine carry this emerging zoonotic pathogen. In total, 37 *E. albertii* isolates were obtained from 17/525 (3.2%) cecal feces samples. Of the 37 isolates, 54.1% were resistant to one or more antibiotics, including tetracycline. The isolates were classified into 6 groups by pulsed-field gel electrophoresis. Using genome-wide phylogenetic analysis, 6 representative isolates (one from each of the 6 groups) were classified into phylogroup G1 and 2 sublineages of phylogroup G3, each of which includes human-derived strains. Therefore, our results showed that swine from Yamagata and nearby prefectures in Japan harbor *E. albertii* exhibiting diverse PFGE types, which suggested that swine-derived food products could be vehicles for the transmission of this pathogen to humans. — Key words : Antimicrobial resistance, *Escherichia albertii*, genome-wide phylogenetic analysis, pulsed-field gel electrophoresis, swine.

† Correspondence to : Kumiko SATO (Yamagata Prefectural Shonai Meat Inspection Center)

21-7 Aza-Nakaarata, Kaneai, Shonai-machi, Higashitagawa-gun, 999-7762, Japan

TEL 0234-45-1285 FAX 0234-42-3850 E-mail : satokumiko1@pref.yamagata.jp

* Current affiliation : Chiharu ENDO (Yamagata Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center)

736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 265 ~ 273 (2020)