

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32415
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K10590
研究課題名(和文) 新興病原細菌 *Escherichia albertii* の疫学的全容解明

研究課題名(英文) Epidemiology of *Escherichia albertii*

研究代表者
村上 光一 (Murakami, Koichi)

十文字学園女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：70446839
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本菌は3つの生物グループに分類されることを提唱した。(Front Microbiol 2019; 10:1543)。本菌による食中毒事例の解析：潜伏期間は12-24時間、症状は watery diarrhea (>80%)などであった(Foodborne Pathogens and Disease, <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2654>)。低栄養の培地等にて、20程度で数時間から半日程度培養すると、鞭毛を発現することが判明した(Environmental Microbiology Report doi:10.1111/1758-2229.12818)。

研究成果の学術的意義や社会的意義
人獣共通感染症原因菌 *Escherichia albertii* の 生物型分類の整理・提唱、本菌食中毒の原因食品、潜伏期間等の疫学情報の提供、本菌の鞭毛発現条件の発見、本菌の薬剤耐性の状況の報告、本菌の分離条件等を行い、本菌の疫学的な実態を多少なりとも明らかにしたと考える。

研究成果の概要(英文)：We propose that nonbiogroup 1 or 2 of *E. albertii* should be assigned to biogroup 3 to make screening of them easier in public health and clinical laboratory settings. Clearly, having group criteria for indole-negative/lysine-positive, indole-positive/lysine-negative, and indolepositive/lysine-positive *E. albertii* biogroups 1, 2, and 3 strains, respectively, should provide for more accurate identification of *E. albertii* isolates. According to our study, the most common symptom displayed by patients across the six episodes was watery diarrhea (>80%), followed by abdominal pain (50-84%) and fever (37-39.5 °c) (26-44%). The estimated average incubation period of *E. albertii* infection was 12-24 h. Three of the six outbreak associated *E. albertii* isolates possessed intact ETT2 regions, while the remaining isolates contained disrupted ETT2-encoding genes. We found that *E. albertii* expressed flagella under specific environmental conditions.

研究分野：公衆衛生学

キーワード： *Escherichia albertii* Food pathogen Epidemiology

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Escherichia albertii は2003年、新しく独立した食中毒原因細菌です。ヒトに下痢、腹痛、発熱を惹起します。本菌による集団食中毒が世界で初めて報告(Ooka, et al., 2013)されて以来、国内では複数の集団感染事例が報告されています。中には患者数100名を超える事例もあります。本菌の一部は腸管出血性大腸菌の病原因子であるペロ毒素を産生する場合があります(申請者・Murakami et al., 2014)。本菌は大腸菌に酷似した菌であること、特徴的な生化性状が乏しいことから、本菌の分離・同定は困難を伴います(Maeda, Murakami et al., 2014)。見逃されたり、大腸菌と誤同定された本菌による食中毒事例が多発しており、重要課題です(村上ら: IASR 2016, 37:98-100)。

本菌は特徴に乏しい菌(「陽性」を示す性状が少なく、かつ菌株間で多様性がある)であるため、分離・同定方法も確立されていません。しかし、これを確立することが、本菌の疫学的全容を明らかにする上で最も重要です。

E. albertii の感染事例のほとんどが飲食物を介しての食中毒ですが、複合食品が原因であると判明しても、複合食品の中の真の媒介食材は不明です。*E. albertii* は、ヒト以外に鳩など多くの野鳥から分離されますが、野鳥から直接ヒトに高頻度に感染するとは考え難く、他の媒介食品等の存在が考えられます。本菌が鶏肉(レバー)から分離されることを私共は明らかにしました(Maeda E, Murakami K et al., 2015)。しかし、本菌のヒトへの媒介食品の全体像、間接的な感染源となる本菌のレゼルボア(動物等)の全容は不明です。

E. albertii は菌株の生化学性状のバリエーションが大きく、multilocus sequence typing (MLST) の型も多岐にわたります(投稿中)。すべての *E. albertii* が、ヒトに感染し食中毒症状を起こすのか、特定の菌株のみがヒトに病原性を有するのかが解明すべき問題です。

遺伝子解析により本菌は完全に鞭毛オペロンを有していることが分かっていますが、通常の分離同定検査の中では運動性を示しません。一方、本菌は人獣共通感染症病原体であり、宿主内のみならず環境中に放出されることも多いため、鞭毛を有している方が生存に有利であると考えられます。何か培養条件を整えれば本菌は鞭毛を発現するのではないのでしょうか？また鞭毛が発現するとすればどのような化学的、物理的变化が本菌の鞭毛発現を促すのでしょうか？

2. 研究の目的

- (1) 本菌の最適な分離・同定手法を確立すること。
- (2) 本菌のヒトへの感染源、媒介食品、レゼルボア等を明らかにすること。
- (3) 全ての *E. albertii* がヒトに病原性を有するか、次世代シーケンサーを駆使した菌株の分子疫学的解析にて明らかにすること。
- (4) 通常非運動性である本菌が運動性に变化する条件、つまり、通常発現していない鞭毛が発現する条件を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 【本菌の最適な分離・同定手法の確立】

増菌培地は試料中の *E. albertii* のみを残存させることができれば、最良の増菌培地であると言えます。次世代シーケンサーとリアルタイム PCR 法を活用し、「増菌液中の *E. albertii* 標的 DNA コピー数 ÷ 増菌液中の細菌の全 DNA 量」を指標(高値であるほど優れた培地)とし、より優れた増菌培地を開発します。

(2) 【ヒトへの感染源、媒介食品、レゼルボア(動物等) 媒介食品等の解明】

前項目の培地が開発されるまでの間、私共が開発した界面活性剤入り専用寒天培地にて、ヒト糞便、食品、環境、及び動物の試料から本菌を分離し、本菌の汚染状況を調査し、本菌のヒトへの感染源、媒介食品、レゼルボアを解明します。同時に、過去に発生した、あるいは今後発生する集団感染事例において、実地疫学的手法を用い、媒介食品等を明らかにします

(3) 【全ての *E. albertii* がヒトに病原性を有するか明らかにするため、分離菌株の全ゲノム DNA 解析による分子疫学的解析】

環境由来株や多様な動物、食品由来菌株、250 菌株程度について、次世代シーケンサーを用いてゲノム DNA 塩基配列を取得し、ヒト由来株との分子疫学的比較解析を行います。そして、分子疫学的解析により、どのような遺伝学的特徴がある菌株がヒトに感染するか明らかにします。

(4) 【鞭毛の発現条件の解明】

培地等の環境条件のどのような要因が変化すると鞭毛が発現するか、温度、化合物等の濃度

(硫酸イオン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、鉄、ホウ素、亜鉛、銅、マンガン、モリブデン、全有機炭素、全窒素、アンモニア性窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、全リン、溶存態全リン、リン酸態リン、尿素等)及び pH 等について、先ず検討します。

4. 研究成果

(1) 化学性状等の確認：PFGE の型が異なる 100 余株について、生化学性状を確認しました。本菌に共通する生化学性状のうち、大腸菌と比較し比較的本菌に特徴的なものは非運動性(37%)、硫化水素陰性(TSI 寒天培地)、キシロースからの酸の産生陰性、 α -glucuronidase 活性陰性だと思われました。本菌は、リシン脱炭酸試験(リジン脱炭酸試験用培地使用)及びインドール産生試験の結果から、3つの生物グループに分類されることを提唱しました。リシン脱炭酸試験およびインドール産生試験結果の組み合わせは+- (生物グループ1)、-+ (生物グループ2)あるいは++ (生物グループ3)であり、日本では生物グループ3が主要なグループであります。従来報告を含めても乳糖からの酸産生は多くの菌株にて陰性であるが、ごく一部に陽性の菌株が存在します(Front Microbiol 2019;10:1543)。

(2) 本菌による食中毒事例の解析：典型的潜伏期間は 12-24時間、症状は watery diarrhea (>80%), followed by abdominal pain (50%-84%) and fever (37.0-39.5°C) (26%-44%)でありました Foodborne Pathogens and Disease, <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2654>。

(3) 本菌の鞭毛発現条件について検討した。本菌を低栄養の培地(例えば、鳩の排泄物を池の水に懸濁したもの、あるいは20倍希釈したトリプトンソイブイオン培地等)にて、20°C程度で数時間から半日程度培養すると、鞭毛を発現し、運動性を示す菌株が存在します(45/90菌株, 50%) (Environmental Microbiology Report doi:10.1111/1758-2229.12818)。

(4) ヒト由来の本菌の特徴を解析するため、薬剤耐性試験、遺伝子型別による血清型別、培養法の改良等を行いました。薬剤耐性試験(アンピシリン、セフトロキム、メロペネム、アジスロマイシン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン、テトラサイクリン(TC)、ホスホマイシン)を、国内分離株を対象に実施したところ、人由来株では、7/27株(NA・SM・TCのうちのいずれかまたは複数)に耐性が認められました。遺伝子型別による血清型別は型別不能の菌株が多く認められ、現在その原因を調査中です。

(5) 本菌の最適な分離・同定手法を確立するため、分離培養法の高精度化を図りました。「培養後の培地中の単位当たりのDNA量に占める対象病原細菌特異的遺伝子のコピー数」を指標として、本菌の増菌培地の能力をより客観的に評価する新手法を開発しました(数値が大きいものが優秀な方法)。本法によれば、例えばある選択剤の濃度の差が分離能力に与える影響をコピー/ng(DNA)の数値の差として評価することが可能で、従来手法では評価できなかったブラックボックス部分の評価が可能となりました。

以上の成果をもとに、今後も、*E. albertii*による感染症の予防のための基礎的な知見をさらに積み重ねることが可能となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murakami Koichi, Maeda-Mitani Eriko, Kimura Hirokazu, Honda Mikiko, Ikeda Tetsuya, Sugitani Wakana, Konno Takayuki, Kawano Kimiko, Etoh Yoshiki, Sera Nobuyuki, Mizukoshi Fuminori, Saitoh Takehito, Kawamura Yoshiaki, Ishioka Taisei, Ohnishi Makoto, Oishi Kazunori, Fujimoto Shuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-biogroup 1 or 2 Strains of the Emerging Zoonotic Pathogen <i>Escherichia albertii</i> , Their Proposed Assignment to Biogroup 3, and Their Commonly Detected Characteristics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masuda K, Ooka T, Akita H, Hiratsuka T, Takao S, Fukada M, Inoue K, Honda M, Toda J, Sugitani W, Narimatsu H, Ishioka T, Hirai S, Sekizuka T, Kuroda M, Morita Y, Hayashi Ta, Kimura H, Oishi K, Ohnishi M, Fujimoto S, Murakami K	4. 巻 17
2. 論文標題 Epidemiological Aspects of <i>Escherichia albertii</i> Outbreaks in Japan and Genetic Characteristics of the Causative Pathogen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 144~150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2019.2654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Koichi, Kimura Shinya, Nagafuchi Osamu, Sekizuka Tsuyoshi, Onozuka Daisuke, Mizukoshi Fuminori, Tsukagoshi Hiroyuki, Ishioka Taisei, Asai Tetsuo, Hirai Shinichiro, Musashi Manami, Suzuki Motoi, Ohnishi Makoto, Oishi Kazunori, Saruki Nobuhiro, Kimura Hirokazu, Iyoda Sunao, Kuroda Makoto, Fujimoto Shuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Flagellum expression and swimming activity by the zoonotic pathogen <i>Escherichia albertii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 92~96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1758-2229.12818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubomura Akiko, Sekizuka Tsuyoshi, Onozuka Daisuke, Murakami Koichi, Kimura Hirokazu, Sakaguchi Masahiro, Oishi Kazunori, Hirai Shinichiro, Kuroda Makoto, Okabe Nobuhiko	4. 巻 2020
2. 論文標題 Truncated Class 1 Integron Gene Cassette Arrays Contribute to Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/4908189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	重村 洋明 (Shigemura Hiroaki) (50761540)	福岡県保健環境研究所・その他部局等・研究員 (87107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------