

飼育犬から分離された *Escherichia albertii* の性状Karn Duangtathip¹⁾ Nguyen Thi Thu Huong²⁾ 井口 純³⁾三澤尚明⁴⁾ 谷口喬子^{4)†}

- 1) Veterinary Teaching Hospital in Huahin, Kasetsart University (9 Phet Kasem Rd. Huahin district, Prachuap khiri Khan, Thailand, 77110)
 2) 宮崎大学大学院農学工学総合研究科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)
 3) 宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)
 4) 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

(2019年9月3日受付・2019年10月17日受理)

要 約

Escherichia albertii は新しく認定された腸管病原性細菌で、わが国でも集団食中毒事例が報告されている。本菌は特徴的な生化学性状に乏しく、腸管病原性大腸菌 (EPEC) や腸管出血性大腸菌 (EHEC) との鑑別が難しい。われわれは、健康な飼育犬の糞便から、*E. albertii* を分離・同定した。本分離株は、病原性関連遺伝子 (*eae*) 及び細胞膨張化致死毒素 (*cdt*) を保有していたが、志賀毒素遺伝子 (*stx2f*) は保有していなかった。また、既報と同様、ペニシリン、アンピシリン及びエリスロマイシンに耐性を示した。飼育犬から *E. albertii* が分離されたことより、犬が人への感染源となり得る可能性が示唆された。——キーワード：犬, *Escherichia albertii*.

-----日獣会誌 73, 191~194 (2020)

Escherichia albertii は、2003年に新種として認定されたグラム陰性、通性嫌気性桿菌の腸内細菌で、人において下痢、腹痛、発熱症状を引き起こす新興感染症である [1-3]。国内では集団食中毒事例としての報告も散見されており [3, 4]、公衆衛生上重要視されている。

本菌は、生化学的性状が比較的乏しい上、腸管病原性大腸菌 (EPEC) の病原性関連因子であるインチミン遺伝子 (*eae*) と細胞膨張化致死毒素遺伝子 (*cdt*) を高い割合で保有し、さらに、志賀毒素をコードする遺伝子のうち、*stx2f* 遺伝子を保有する株も報告されている。そのため、EPEC や EHEC と誤同定されることがある [2, 4-6]。現在では、従来の生化学的性状検査ではなく、マルチプレックス PCR 法や Multilocus sequence typing (MLST) 法に用いるハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析により鑑別・同定する手法が広く用いられている [2, 4, 7]。

本菌に関する疫学調査によると、主に鳥類の消化管内に分布しているほか、猫、豚、鶏肉などからも分離されているが [2, 8-10]、感染源や感染経路については依然

として不明な点が残されている。今回われわれは、犬の糞便からカンピロバクターを分離する検査において、通常はカンピロバクター血液無添加選択寒天基礎培地 (*Campylobacter blood-free selective agar base*: Oxoid, U.K.) に抗菌剤である CCDA 選択剤 (CCDA Selective Supplement, Oxoid, U.K.) を添加した mCCDA 培地 (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) を用いるところ、誤って基礎培地のみを用いた。その結果、犬の糞便より、*E. albertii* が分離されたため、その分離株の性状について調べた。

材料及び方法

検体：36頭の健康な犬の糞便 (動物介在活動犬11頭、宮崎大学動物病院飼育犬5頭、宮崎動物愛護センター譲渡犬20頭) を検査材料とした。すべての検体は医療用捲綿子 (シードスワブγ3号、栄研化学(株)、東京) で採取し、検査まで4℃で保存した。

細菌学的検査：基礎培地にスワブで採取した糞便検体を直接塗抹し、37℃で48時間、微好気培養 (80%

† 連絡責任者：谷口喬子 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1 ☎・FAX 0985-58-7784 E-mail: t_iwata@cc.miyazaki-u.ac.jp

N₂, 10% CO₂, 5% H₂, 5% O₂) した。分離された単一集落は微生物分類同定分析装置 (MALDI-TOFMS バイオタイパー, Bruker Daltonics, U.S.A.) を用いて同定した。*E. albertii* が疑われた菌株については, DHL 寒天培地 (日水製薬(株), 東京) 及び mCCDA 培地に塗布し, 37°C で 24 時間, 好気培養した。

***E. albertii* 特異的遺伝子の検出:** アルカリポイル法 [11] によって DNA を抽出し, これを鋳型として *E. albertii* の *lysP*, *mdh* 及び *clpX* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を実施した [7, 8]。

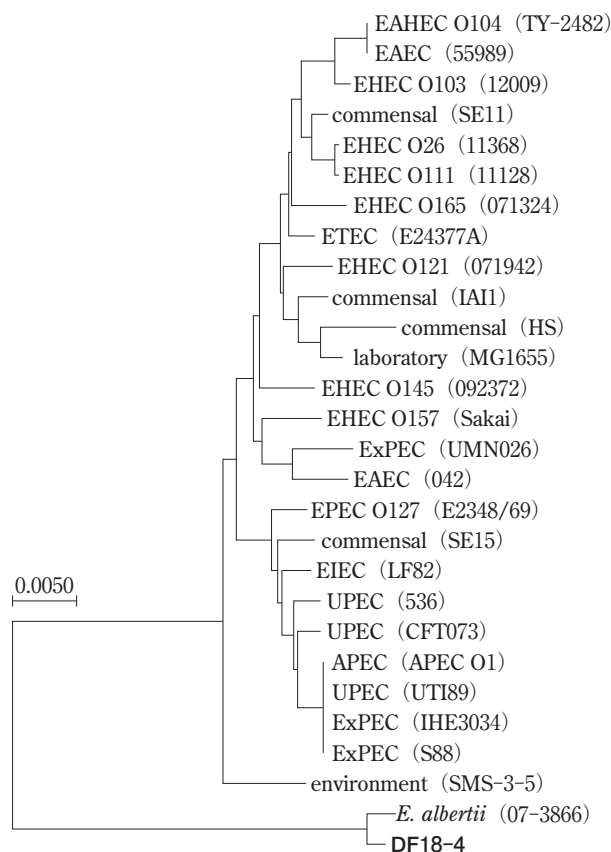
系統樹の作成: 大腸菌の MLST 解析に用いられる 7 種類のハウスキーピング遺伝子 [4] のうち, *fumC* を除く 6 種類の遺伝子 (*adk*-536 bp, *gyrB*-460 bp, *icd*-518 bp, *mdh*-452 bp, *purA*-478 bp, *recA*-510 bp) の塩基配列 (2,954 bp) を常法に従ってキャピラリーシーケンサー (3130 DNA シークエンサー, Applied Biosystems, 東京) を用いて決定した。分離株との近縁関係を調べるため, *E. albertii* 及び病原大腸菌など 26 株の塩基配列をデータベース (GenBank/EMBL/DBJ database) から取得し, 系統解析を行った。系統樹は, フリーソフト (MEGA6.06 ソフトウェア, The Pennsylvania State University, U.S.A.) を用いて Neighbor-joining 法により作成した。

病原性遺伝子及び病原性関連遺伝子の検出: 分離株から抽出した DNA を用いて, 既報に準じた PCR 法により インチミン遺伝子 (*eae*), 細胞膨張化致死毒素遺伝子 (*cdt*) 及び志賀毒素 2f 遺伝子 (*stx2f*) を検出した [5, 12]。

薬剤感受性試験: 日本化学療法学会によって制定された微量液体希釈法 (MIC 測定法改訂委員会報告, Chemotherapy, 29, 76-79 (1981)) に基づいて行った。供試薬剤はペニシリン (PCG: メルク(株), 東京), アンピシリン (ABPC: メルク(株), 東京), エンロフロキサシン (ERFX: メルク(株), 東京), ゲンタマイシン (GM: ナカライテスク(株), 京都), クロラムフェニコール (CP: ナカライテスク(株), 京都), ノルフロキサシン (NFLX: メルク(株), 東京), エリスロマイシン (EM: メルク(株), 東京), ST 合剤 (ST: メルク(株), 東京) の 8 剤を用いた。基準株として *Escherichia coli* ATCC25922 株を使用した。完全に菌の発育が阻止された薬剤の最小濃度を MIC 値と判定した。薬剤耐性の判定は, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準に従った。

成 績

細菌学的及び分子生物学的検査: 基礎培地で増殖した白い円形の平滑なコロニーを MALDI-TOFMS によって同定したところ, 1 頭の動物介在活動犬から分離培養さ



大腸菌の病原型と血清型, カッコ内は菌株名を示す。

- EPEC: 腸管病原性大腸菌 (entero-pathogenic *E. coli*)
- EHEC: 腸管出血性大腸菌 (entero-hemorrhagic *E. coli*)
- ETEC: 腸管毒素原性大腸菌 (entero-toxigenic *E. coli*)
- EAEC: 腸管凝集付着性大腸菌 (entero-aggregative *E. coli*)
- EIEC: 腸管侵入性大腸菌 (entero-invasive *E. coli*)
- EAHEC (entero-aggregative-hemorrhagic *E. coli*)
- ExPEC (extra-intestinal *E. coli*)
- UPEC: 尿路病原性大腸菌 (uropathogenic *E. coli*)
- APEC: 鶏病原性大腸菌 (avian pathogenic *E. coli*)

図 6 種類のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を基にした *E. albertii* 及び病原大腸菌の系統樹解析

れた単一集落が, *E. coli* または *E. albertii* であることを示す高いインデックスを示した。この分離株 (DF18-4) を DHL 寒天培地で好気培養したところ, 乳糖・白糖非分解を示す無色透明コロニーを形成したが, mCCDA 培地では生育しなかった。次に, これらの分離株から DNA を抽出し, *E. albertii* に特異的な遺伝子に対するプライマーを用いた PCR を行ったところ, *lysP*, *mdh* 及び *clpX* 遺伝子が検出された。

系統樹解析: 今回分離された DF18-4 株は, データベースに登録されている人由来 *E. albertii* 9194 株 [7] と同じクラスターに属し, 病原大腸菌など 26 株とは異なるクラスターを形成した (図)。以上の結果から, 分離株を *E. albertii* と同定した。

病原性遺伝子及び病原性関連遺伝子の検出: 分離され

表 分離株の薬剤感受性試験

薬 剤*	最小発育阻止濃度 (MIC : $\mu\text{g/ml}$)	
	<i>E. albertii</i>	<i>E. coli</i>
	DF18-4	ATCC 25922
PCG	128	32
ABPC	32	8
ERFX	0.03	0.03
GM	0.5	0.5
CP	4	4
NFLX	0.03	0.03
EM	16	64
ST	1	2

*ペニシリン：PCG, アンピシリン：ABPC,
エンロフロキサシン：ERFX, ゲンタマイシン：GM,
フロラムフェニコール：CP, ノルフロキサシン：NFLX,
エリスロマイシン：EM, ST合剤：ST

たDF18-4株から、*eae*及び*cdt*遺伝子がPCRで検出されたが、*stx2f*遺伝子は増幅されなかった。

薬剤耐性試験：分離されたDF18-4株は、ペニシリン系薬剤(PCG, ABPC)及びマクロライド系薬剤(EM)に耐性を示したが、その他の供試薬剤に対して感受性を示した(表)。

考 察

われわれは飼育犬の糞便からカンピロバクターの検査を定期的に行っている。今回、誤って抗菌剤を加えていない基礎培地を用いて分離培養を行った。この培地には、デソキシコレート酸ナトリウムは添加されているが、選択抗菌剤であるセフォペラゾン及びアンフォテリシンBが添加されていないため、*E. albertii*が発育したと考えられた。しかしながら、結果には示していないが、基礎培地には*E. coli*が生育することを確認した。したがって、両菌種をコロニー形態だけで区別することは困難であり、*E. albertii*の選択培地としての有用性は低いと考えられた。実際、mCCDA培地では、*E. albertii*は生育しなかった。

今回は、MALDI-TOFMSを用いた検査にて、*E. coli*と共に*E. albertii*が候補として挙がったため、検査を進め、*E. albertii*と同定することができた。このことは、MALDI-TOFMSでも*E. albertii*と大腸菌との鑑別は困難であることを示すもので、候補菌種として*E. albertii*が示された場合には、本菌である可能性を考慮し、検査を進める必要がある[13]。よって、3つのハウスキーピング遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR及びMLSTに用いる遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析により*E. albertii*と同定した。しかしながら、*E. albertii*のMLST解析に用いられる7種類の遺伝子のうち、今回は増幅効率が悪い*fumC*遺伝子を除く6種類の遺伝子塩基配列を用いて解析を行ったが、菌の同定

には影響しなかった。

今回分離された犬由来株の病原性の有無は明らかでないが、*eae*遺伝子と*cdt*遺伝子を保有していた。*eae*遺伝子は、腸粘膜への接着因子であるインチミンをコードする病原性関連遺伝子で、*E. albertii*の多くがこの遺伝子を保有している[2, 6, 8]。また*cdt*遺伝子は、細胞膨張化致死毒素をコードする遺伝子で、細胞の増殖停止、細胞膨化及び細胞死を引き起こし、人の胃腸炎に関連している[14]。一方、Shiga毒素をコードする*stx2f*遺伝子を保有する株もいくつか報告されているが[2, 4, 6]、本分離株はこれを保有していなかった。

分離株は、薬剤感受性試験において、ペニシリン系薬剤(PCG, ABPC)及びマクロライド系薬剤(EM)に耐性を示した(表)。PCG及びEM耐性の株はいくつか報告されているが、ABPC耐性株の報告は少ない[15, 16]。一方で、ERFX, GM, CP, NFLX, STに対して感受性であることは、これまでの報告と一致していた[1, 9, 15, 16]。

今回、健康な飼育犬から*E. albertii*が分離されたことで、新たな保菌動物としての可能性が示唆されたが、本菌が犬の腸管に定着したものであるのか、通過菌であるのかは不明であり、今後さらなる疫学調査が必要である。

本論文は、日本獣医師会の助成による平成30年度アジア地域臨床獣医師等総合研修事業に参加した研修生の研究成果である。

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] Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TA, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T : Clinical significance of *Escherichia albertii*, Emerg Infect Dis, 18, 488-492 (2012)
- [3] 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)
- [4] Murakami K, Etoh Y, Tanaka E, Ichihara S, Horikawa K, Kawano K, Ooka T, Kawamura Y, Ito K : Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human, Jpn J Infect Dis, 67, 204-208 (2014)
- [5] Maheux AF, Boudreau DK, Bergeron MG, Rodriguez MJ : Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water, J Appl Microbiol, 117, 597-609 (2014)
- [6] Nimri LF : *Escherichia albertii*, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties,

- Diagn Micr Infec Dis, 77, 91–95 (2013)
- [7] 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)
- [8] 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)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] Birnboim HC, Doly J : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res*, 7, 1513–1523 (1979)
- [12] Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S : Prevalence and characteristics of intimin- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland, *J Vet Med Sci*, 64, 1071–1073 (2002)
- [13] 杵渕貴洋, 角谷不二雄, 西川浩司, 水越文徳, 松井真理, 鈴木里和, 大西 真, 村上光一, 斎藤剛仁, 大石和徳 : 同定に MALDI-TOFMS の使用が有効であった患者由来 *Escherichia albertii* 2 株の細菌学的概要—北海道, 病原微生物検出情報 (LASR), 39, 84 (2018)
- [14] Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H : Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene, *Infect Immun*, 64, 2070–2078 (1996)
- [15] Stock I, Rahman M, Sherwood KJ, Wiedemann B : Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of *Escherichia albertii* and *Hafnia alvei* strains, *Diagn Micr Infec Dis*, 51, 151–163 (2005)
- [16] Perez KL, Alam MJ, Castillo A, Taylor TM : Antibiotic resistance and growth of the emergent pathogen *Escherichia albertii* on raw ground beef stored under refrigeration, abuse, and physiological temperature, *J Food Protect*, 76, 124–128 (2013)

Characterization of *Escherichia Albertii* Isolated from a Domestic Dog

Karn DUANGTATHIP¹⁾, Nguyen Thi Thu HUONG²⁾, Atsushi IGUCHI³⁾,
Naoaki MISAWA⁴⁾ and Takako TANIGUCHI^{4)†}

- 1) *Veterinary Teaching Hospital in Huahin, Kasetsart University, 9 Phet Kasem Rd., Huahin District, Prachuap khiri Khan, Thailand, 77110*
- 2) *Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*
- 3) *Department of Animal and Grassland Sciences, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*
- 4) *Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*

SUMMARY

Escherichia albertii is recognized as an emerging gastrointestinal pathogen in humans and several foodborne outbreaks have been reported in Japan. However, it is difficult to differentiate this organism from entero-pathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and entero-hemorrhagic *E. coli* (EHEC) due to its poorly defined biochemical characteristics. We have isolated and identified an isolate as *E. albertii* from the feces of a healthy domestic dog. The isolate harbored the intimin gene (*eae*) and cytolethal distending toxin gene (*cdt*), but lacked the Shiga toxin gene (*stx2f*). Moreover, the isolate was resistant to penicillin, ampicillin, and erythromycin, as reported elsewhere. The current study suggests that domestic dogs may act as a reservoir for this organism, transmitting it to humans. — Key words : dog, *Escherichia albertii*.

† Correspondence to : Takako TANIGUCHI (Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan

TEL · FAX 0985-58-7784 E-mail : t_iwata@cc.miyazaki-u.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 191 ~ 194 (2020)