

都内河川水からの*Escherichia albertii* の検出および分離菌株の性状

市川 めぐみ^a, 尾畑 浩魅^a, 西野 由香里^a, 福井 理恵^a, 三橋 華子^a,
黒田 寿美代^a, 山崎 華恵子^a, 横山 敬子^b, 三宅 啓文^a, 貞升 健志^b
(外部機関査読者: 下島 優香子^c)

Escherichia albertii は2003年に報告された新興下痢症起因菌であり, 分離法や生息環境については未だ不明確な点が多い. 今回, 東京都内の河川水における*E. albertii* の検出を試み, また分離菌株について薬剤感受性試験や病原遺伝子等の調査を行った.

2022~2023年度に採水した河川水88検体について, リアルタイムPCRを用いたスクリーニング試験を行ったところ, 58検体 (65.9%) が*E. albertii* 特異的遺伝子 (EAKF1_ch4033) 陽性となり, うち10検体から*E. albertii* が分離された. 河川水検体からの*E. albertii* 分離においては, mEC培地による増菌培養に比べ, その後にNCT-mTSBでの二次増菌培養を加えることで菌株分離が容易になった. また, 糖分解性を利用する培地 (XR-Mac) に加え, 酵素基質培地 (XM-G) の併用が有用と考えられた. 分離菌株の薬剤感受性試験では, 10株すべてが供試した17薬剤に感受性を示し, 病原遺伝子等*eae*, *lysP*, *mdh*および*cdtB*を保有していた. また, PFGE法による解析結果から, 一部の株は遺伝子学的に近縁の可能性が示唆された.

キーワード: 河川水, *Escherichia albertii*, XR-MacConkey agar, XM-G寒天培地, リアルタイムPCR

はじめに

Escherichia albertii は2003年に新興下痢症起因菌として報告されたグラム陰性桿菌¹⁾で, 本菌が原因と考えられる集団感染事例が国内でも複数報告されている²⁻⁵⁾. また, 本菌は病原遺伝子として腸管上皮への接着因子であるインチミン遺伝子 (*eae*) や細胞膨化致死毒素遺伝子 (*cdt*) を保有し, その他の病原因子としてVero毒素遺伝子 (*vt2f*) 等を有す株も認められている^{6,7)}. そのため, 厚生労働省は各自治体の衛生主管部 (局) に向け*E. albertii* の情報提供を求める依頼を发出している⁸⁾.

E. albertii によるヒトへの危害が注目されるようになってきたものの, 本菌は*Escherichia coli* や*Hafnia alvei* 等の他の腸内細菌科細菌に似た性状を示し, かつ有用な分離法が確立されていないため, 原因食品やその汚染経路については未だ解明されていない⁹⁾. *E. albertii* は, 豚, 鳥類等から菌株分離がされている^{6,10,11)}. さらに, 河川水等の環境水中の存在についても報告されている^{12,13)}. そこで, 本研究では東京都内の環境水における*E. albertii* の汚染実態を明らかにするため, 2022年5月から2024年2月の期間に河川水からの*E. albertii* の検出を試みた. なお, 本調査では腸管出血性大腸菌の検査も併せて実施したが, 本稿では*E. albertii* について報告する. 分離された菌株については生化学的性状や薬剤感受性, 病原遺伝子の確認およびパルスフィールド電気泳動 (以下, PFGE) を実施したので, 疫学的性状についても報告する.

Table 1. Primers and Probe used for screening of *E. albertii*

		Sequence(5'-3')
Primers	forward	CGTTAAGCGGTTAGGTATCGATTG
	reverse	GCGCGTACGGACTGGTAATAAA
Probe		FAM-TTGCTCCAGGAACAGCGGCTTCACT-TAMRA

実験方法

1. 供試検体

2022年度と2023年度の2年間に, 年4回 (5月・8月・11月・2月), 東京都内の多摩川水系河川11地点から採取した河川水計88検体を用いた. 11地点は多摩川本流および支流を含み, 上流から地点A~Kとした.

2. 増菌培養

河川水500 mLを孔径0.45 μmのセルロースメンブレンフィルター (Merck) で吸引る過後, フィルターを250 mLのmEC培地 (栄研化学) に入れ, 42°Cで24時間培養した.

3. リアルタイムPCRによるスクリーニング試験

mEC培養液100 μLから熱アルカリ抽出法によりDNAを抽出し, 神門らの報告¹¹⁾で使用された*E. albertii* 特異的遺伝子 (EAKF1_ch4033) をターゲットに設計したプライマーおよびプローブ (Table 1) を用いてリアルタイムPCRによるスクリーニング試験を行った. リアルタイムPCRは

^a 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
^b 東京都健康安全研究センター微生物部
^c 東洋大学

Table 2. Composition of NCT-mTSB

Contents	
Basal medium	(g/L)
Pancreatic digest of casein	17.0
Papaic digest of soybean meal	3.0
Sodium chloride	5.0
Dipotassium hydrogen phosphate	4.0
Glucose	2.5
Bile Salts	1.5
Selective supplements	(mg/L)
Novobiocin	20.0
Cefixime	*0.02
Potassium tellurite	1.0

*: Modified from original method by Wakabayashi et al.¹⁴⁾

Applied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。反応試薬はTaqMan™ Universal PCR Master Mix II, with UNG (Thermo Fisher Scientific) を用い、反応条件は50°C2分、95°C3分の後、95°C15秒および60°C1分を45サイクルとした。Ct値はオート解析で求め、Ct値45以下を示した検体をスクリーニング試験陽性とした。

4. 菌分離および同定

リアルタイムPCRによるスクリーニング試験で陽性を示したmEC培養液を、キシロースおよびラムノースをそれぞれ1%添加したMacConkey Agar Base (日本BD, 以下, XR-Mac) に塗抹し37°Cで24時間培養した。この平板は、本菌がキシロースおよびラムノースを分解できない特徴⁹⁾ を利用した選択培地である。

また、2023年5月以降は、増菌培養方法、選択分離培地を以下のとおりに変更し検査を行った。すなわち、増菌培養方法については、mEC培養液を一次増菌培養液とし、1 mLをWakabayashiらの方法¹⁴⁾ を参考に、ノボビオシン・セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加変法TSB (以下, NCT-mTSB) 9 mLに添加し、44°Cで24時間の二次増菌培養を行った。選択分離培地については、糖分解性を利用する培地 (XR-Mac) の他、大腸菌・大腸菌群用酵素基質培地XM-G寒天培地 (島津ダイアグノスティックス, 以下, XM-G) を加えた。mEC培養液をXR-MacおよびXM-Gに塗抹し、XR-Macは37°Cで24時間、XM-Gは35°Cで18時間培養した。なお、NCT-mTSBでは、添加薬剤のうちセフィキシムと亜テルル酸カリウムについて市販のCefixime Tellurite Selective Supplement (Oxoid) で代用した。そのため、Wakabayashiらの方法¹⁴⁾ ではセフィキシム濃度が0.05 mg/Lであったが、今回の検査では0.02 mg/Lで実施した (Table 2)。

XR-Macでキシロース・ラムノース非分解の白色集落、XM-Gで紫色若しくは白色の集落を、TSI寒天培地およびLIM培地 (島津ダイアグノスティックス) に穿刺し、ブド

Table 3. Detection of *E. albertii* in river water in Tokyo during 2022-2024

sampling points	2022		2023				2024	
	5	8	11	2	5	8	11	2
A	-	+	-	-	+	+	+	-
B	+	+	-	+	+	+	+	-
C	-	+	-	-	+	+	+	+
D	+	+	-	-	+	+	+	+
E	+	+	-	-	+	+	+	-
F	+	+	-	+	+	+	+	+
G	+	+	-	-	+	+	+	+
H	-	+	-	-	+	+	+	-
I	+	-	-	-	+	+	+	-
J	+	+	-	-	+	+	+	+
K	+	+	-	-	+	+	+	-

+ :Ct values ≤45.

+ :Ct values ≤45, and strains were isolated.

* :The strain was isolated from mEC culture solution.

ウ糖分解・H₂S非産生・運動性陰性を示した菌株についてMALDI-TOF MS (MALDI Biotyper®, Bruker) およびリアルタイムPCRを用いて同定した。リアルタイムPCRの対象遺伝子、使用機器、試薬および反応条件は3のスクリーニング試験と同様のものを用いた。

5. 薬剤感受性試験

分離された菌株について、米国CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) : Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100に従い、薬剤感受性試験用ディスク (センシ・ディスク, 日本BD) を用いて、アンピシリン、セフトキサシム、セフトジジム、セフトキシチン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、スルファメトキサゾール・トリメトプリム、ホスホマイシン、アミカシン、イミペネムおよびメロペネムの17薬剤の薬剤感受性試験を行った。

6. 病原遺伝子等の解析

既報^{15, 16)} に従い、PCRにて*eae*, リジン特異的パーミアゼ遺伝子 (*lysP*), リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*mdh*), *cdtB*, *vt2f*, β-D-グルクロニダーゼ遺伝子 (*uidA*) の病原遺伝子等の探索を行った。

7. PFGE法による解析

PFGEにより菌株間の関連を調べた。制限酵素は*Xba*I (タカラバイオ) を、機器はCHEF MAPPER™ (BIO RAD) を用いた。泳動には0.5×TBE (温度14°C) および1% SeaKem® Goldアガロースゲル (ロンザ株式会社) を用いた。泳動条件は、電圧は6.0 V/cm, パルスタイムは0.47

Table 4. Isolation status of strains

Strain No.	Sampling Times	Sampling Points	Ct Value	mEC		mEC → NCT-mTSB	
				XR-Mac	XM-G	XR-Mac	XM-G
21 A	2023	5 A	25.4	+	+	+	+
21 B		B	35.0	-	-	-	+
21 I		I	32.2	-	-	-	+
22 A	8	A	32.7	-	-	+	-
22 C		C	32.0	-	-	+	+
22 F		F	34.5	-	-	+	+
23 B	11	B	32.2	-	-	-	+
23 K		K	33.9	-	-	+	-
24 G		2024	2 G	28.5	-	-	+
24 J	J			30.9	-	-	-

+ :Strains were isolated.

- :Strains were not isolated.

Table 5. Biogroups of *E. albertii* ^{17,18)}

Biochemical characteristics	<i>E. albertii</i> Biogroups			<i>E. coli</i> ATCC 11775 ^T
	1	2	3	
H ₂ S	-	-	-	-
Lysine	+	-	+	+
Indole	-	+	+	+
Motility	-	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-
D-Sucrose	-	-	±	-

+ :Positive, - :Negative, ± : Can be both positive and negative

秒から35.38秒, および泳動時間は20時間18分で実施した。

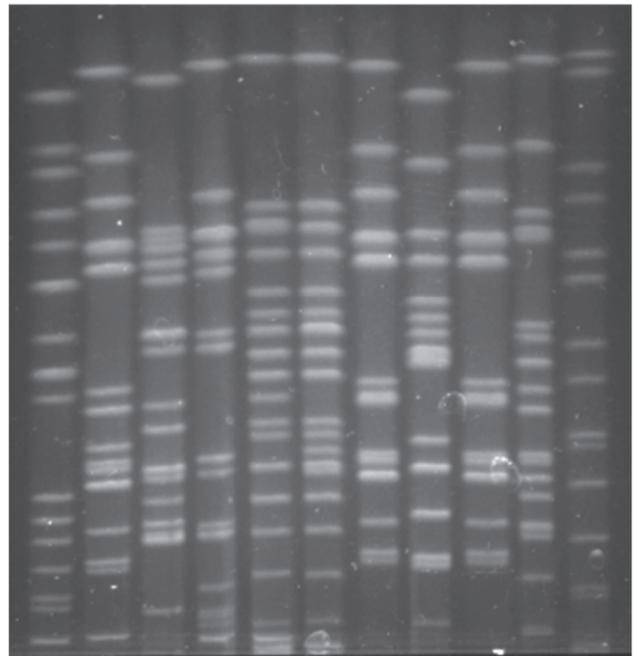
結 果

1. 菌分離および同定

リアルタイムPCRによるスクリーニング試験では, 河川水88検体中58検体 (65.9%) で陽性となった。全8回のうち2022年11月の採水では11地点のすべてでスクリーニング試験陰性となったが, 他の時期では多くの地点でスクリーニング試験陽性となった。陽性58検体中10検体から菌株が分離された (Table 3)。

分離状況の詳細をみると, 1検体 (Ct値25.4) ではmEC培養液をXR-MacおよびXM-Gに塗抹し, 菌株を分離することができた。一方, 9検体 (Ct値28.5~35.0) ではmEC培養液を選択分離培地に塗抹したが菌株は得られなかった。しかし, NCT-mTSBでの二次増菌培養を追加することで, XR-Mac若しくはXM-G, または両者から菌株が分離された (Table 4)。なお, スクリーニング試験陽性のうち菌株が分離できなかった検体は, 2023年2月までは20検体 (Ct値28.6~44.4), 2023年5月以降では28検体 (Ct値28.5~40.9) の計48検体であった。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

Fig. 1. *Xba*I-generated PFGE patterns of *E. albertii* strains isolated from river water.

Lane 1: 21A, 2: 21B, 3: 21I, 4: 22A, 5: 22C, 6: 22F, 7: 23B, 8: 23K, 9: 24G, 10: 24J, M: *Salmonella* Braenderup

2. 生化学的性状

分離された10株のうち, 8株がブドウ糖分解・乳糖白糖非分解, 2株 (Strain No. 22A, 23K) はブドウ糖分解・乳糖白糖分解であった。全株はH₂S非産生・リジン脱炭酸酵素産生・インドール産生・37°Cで非運動性であった。*E. albertii*はリジン脱炭酸酵素およびインドール産生能の組み合わせにより3種類の生物型に分類された (Table 5) ¹⁷⁾。日本では生物型3型が主要なグループと報告され, ¹⁸⁾ 今回分離された株もすべて生物型3型に属していた。

3. 薬剤感受性試験

分離菌株10株すべてが供試した17薬剤に感受性を示した。

4. 病原遺伝子等の解析

分離菌株はすべて *eae*, *lysP*, *mdh* および *cdtB* は陽性, *uidA* および *vt2f* は陰性であった。

5. PFGE法による解析

分離された10株のうち, Strain No. 23B (Lane 7) と24G (Lane 9) はパターンが一致し, この2株と21B (Lane 2) とは2バンド違いであった。また, 22C (Lane 5) と22F (Lane 6) は2バンド違いであった (Fig. 1)。

考 察

今回の調査では、一次増菌培養液であるmEC培地のリアルタイムPCRを用いたスクリーニング試験において検体の半数以上が陽性となったが、2022年5月に採水した河川水からは2023年2月では菌株を分離することはできなかった。一方、NCT-mTSBを用いた二次増菌培養を追加した以降では10株分離できた。Wakabayashiらの報告では、鶏肉への*E. albertii* 添加回収実験における夾雑菌の抑制等、NCT-mTSBの有用性が挙げられていた¹⁴⁾。本研究ではNCT-mTSBをmEC培養液からの二次増菌培地として用いており、既報¹⁴⁾とは培養条件が異なる形ではあるが、NCT-mTSBの有用性が示された。ただし、Wakabayashiらは亜テルル酸カリウムや高温での培養は*E. albertii* にも抑制的に働くため、損傷菌には必ずしも有効ではない可能性があると報告している¹⁴⁾。本研究でも、スクリーニング試験でCt値30未満の低Ct値を示しているにもかかわらず菌株を分離できない検体があった。河川水から*E. albertii* の分離を試みる場合、NCT-mTSBでの二次増菌培養、および糖分解性で判別する培地 (XR-Mac) と酵素基質培地 (XM-G) の併用が有用と考えられた。

なお、本調査では*E. albertii* と同時に腸管出血性大腸菌も調査していたため、mECを用い42°Cで増菌培養を行った。しかし、Wakabayashiらは食品検体への添加回収試験において、NCT-mTSBを用いた44°Cでの培養が*E. albertii* の分離に適していると報告しており¹⁴⁾、今回の42°Cの培養条件が、*E. albertii*が増殖するにあたり最適でなかった可能性がある。今回、採水量も限られた中での検査だったことから、このような培養条件で行った。しかし、十分な検体量が確保され、*E. albertii* に特化した分離を試みる際には、NCT-mTSBによる一段階培養法について検討することも考えられる。

薬剤感受性試験において、分離された10株は供試した17薬剤すべてに感受性であったが、他自治体では河川等の環境水からアンピシリン耐性菌が分離されたとの報告¹²⁾もあるため、継続的なモニタリングを行い、耐性菌の動向を把握することが重要である。また、*eae*や*cdtB*等の病原遺伝子等についてはいずれの分離菌株も有していた。

PFGE結果を、Tenoverらの解析基準¹⁹⁾に照らし合わせると、Strain No. 21B・23B・24G、および22C・22Fはそれぞれ遺伝子学的に近縁と考えられた。また、他の5株はPFGEパターン不一致となり、それぞれの関連性が認められなかったことから、遺伝子学的に多様な*E. albertii* 菌株が多摩川水系河川水中に広く分布していたことになる。過去には湧水や井戸水が原因と推定される食中毒事例⁶⁾の報告もあることから、今後も環境水中における*E. albertii* について注視する必要がある。

ま と め

2022年度および2023年度に都内多摩川水系河川水88検体を検査対象とし、*E. albertii* の検出および分離菌株の性状

等について調査を行った。

供試した88検体のうち58検体がリアルタイムPCRスクリーニング試験陽性となり、うち10検体から*E. albertii* 菌株が分離された。本調査から、河川水からの*E. albertii* 検出には、mECの一段階増菌培養に比べ、NCT-mTSBによる二次増菌培養の追加および糖分解性を利用する培地 (XR-Mac) と酵素基質培地 (XM-G) の併用が有用であると示唆された。

薬剤感受性試験では10株すべてが17薬剤に感受性を示し、病原遺伝子は*eae*、*lysP*、*mdh*および*cdtB*は陽性、*uidA*および*vt2f*は陰性であった。

謝 辞 本研究の調査試料の採取に御協力いただいた当センター薬事環境科学部環境衛生研究科の皆様へ深謝します。

文 献

- Huys G., Cnockaert M., Janda J.M., et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 807–810, 2003.
- 石岡真緒, 関 哲, 中田友里, 他: 病原微生物検出情報, **38**, 175–176, 2017.
- 深田真美, 福原亜美, 立脇邦雄, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 100–101, 2016.
- 高良武俊, 仲間絵里, 喜屋武向子, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 252–253, 2016.
- 長岡宏美, 鈴木秀紀, 村田学博, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 254–255, 2016.
- 大岡唯祐: 日食微誌, **34**, 151–157, 2017.
- 伊豫田 淳, 石嶋 希, 李 謙一, 他: 病原微生物検出情報, **37**, 255, 2016.
- 厚生労働省健康局結核感染症課長: 健感発1109第2号, *Escherichia albertii*に係る報告について (依頼), 平成28年11月9日.
- 日根野谷 淳: 日細菌誌, **76**, 175–185, 2021.
- 須田朋洋, 今野貴之, 福田有希, 他: 日獣会誌, **76**, e157–163, 2023.
- 神門幸大, 畠山 薫, 小林甲斐, 他: 東京健安研七年報, **73**, 45–50, 2022.
- 高橋志保, 今野貴之, 榎尾拓子, 他: 日食微誌, **37**, 81–86, 2020.
- 溝越朗人, 後藤高志, 佐々木麻里, 他: 大分県衛生環境研究センター年報, **47**, 33–37, 2019.
- Wakabayashi Y., Seto K., Kanki M., et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **132**, 2121–2130, 2022.
- Konno T., Yatsuyanagi J., Takahashi S., et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **65**, 203–207, 2012.
- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1205–1208, 2000.
- Murakami K., Maeda-Mitani E., Kimura H., et al.: *Front Microbiol.*, **10**, 1543, 2019.

- 18) 村上光一, 平井晋一郎, 黒田 誠, 他 : モダンメディア, **66**, 1-10, 2020.
- 19) Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2233-2239, 1995.

Detection of *Escherichia albertii* from river water in Tokyo and properties of isolated strains

Megumi ICHIKAWA^a, Hiromi OBATA^a, Yukari NISHINO^a, Rie Fukui^a, Hanako MITSUHASHI^a,
Sumiyo KURODA^a, Kaeko YAMAZAKI^a, Keiko YOKOYAMA^a, Hirofumi MIYAKE^a, and Kenji SADAMASU^a.
(Reviewed by Yukako SHIMOJIMA^b)

Escherichia albertii is a human enteric pathogen reported in 2003; however, there are still many unknowns about its isolation method and habitat. Therefore, this study aimed to detect *E. albertii* in river water in Tokyo, and antimicrobial susceptibility tests and pathogenic gene investigations were also conducted on the isolated strains.

Of the 88 river water samples tested, 58 (65.9%) samples were positive in the screening test, of which *E. albertii* was isolated from 10 samples. All isolates were susceptible to 18 antibiotics and harbored the pathogenic genes *eae*, *lysP*, *mdh*, and *cdtB*. *E. albertii* isolation could be easier using the secondary enrichment culture method with novobiocin–cefixime–tellurite supplemented modified tryptic soy broth after culturing modified EC broth in river water samples. In addition, this study indicates that the chromogenic enzyme substrate method (XM-G), with some sugars fermentation method (XR-Mac) helps isolation *E. albertii*. Additionally, pulsed-field gel electrophoresis results revealed that some strains were closely related.

Keywords: river water, *Escherichia albertii*, XR-MacConkey agar, XM-G agar, real-time PCR

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Toyo University