

【原著】

Escherichia albertii における培養温度の検討藤岡美幸*¹ 吉岡 翔*¹ 野坂大喜*¹

(2020年7月2日受付, 2020年7月16日受理)

要旨: 新興病原体である *Escherichia albertii* は 1998 年にバングラデシュの下痢症患者から分離され、現在わが国でも食中毒の原因菌として知られている。*E. albertii* の生化学的性状は *E. coli* に類似しており、臨床検査機関では誤同定されている可能性がある。そこで本研究では *E. albertii* をはじめ、*E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter freundii* の 4 種類の腸内細菌の混合液を作製し、使用培地や培養温度別に *E. albertii* の検出を検討した。その結果、*E. coli* の選択培地である EC ブロス 44.5°C で選択培養した EMB 寒天培地上では *E. albertii* を検出できなかったが、37~42°C では *E. albertii* 濃度が高い混合菌液での検出を認めた。一方で BTB 寒天培地での発育はいずれの条件でも *E. albertii* の検出は可能であったが、BTB 寒天培地の通常の培養温度である 37°C が最も有効であった。*E. coli* 検出には高温下での選択培養が行われるが、他菌種のみならず一部の *E. coli* の発育も抑制することから、*E. albertii* の分離には 37~42°C での選択増菌後に BTB 寒天培地等を用い、*E. albertii* の特徴である乳糖非分解集落を標的にすることが有効である。

キーワード: *Escherichia albertii*, 食中毒原因菌, 誤同定, 培養温度

I. はじめに

かつて猛威を振るったサルモネラやビブリオは 2001 年の食品衛生法施行規則の改正¹⁾により激減^{2, 3)}した。また、現在食中毒原因菌第 1 位であるカンピロバクターもその特性が解明されつつあり⁴⁾、感染症予防の検討が進められている⁵⁾。

一方で新興病原体の報告もある。*Escherichia albertii* は 1998 年にバングラデシュの下痢症患者より分離され、当初は *Hafnia alvei* と同定されていた⁶⁾。しかし 2003 年に Huys ら⁷⁾により生物化学的性状やハウスキーピング遺伝子の解析等が行われ、*E. albertii* と命名された。現在、*E. albertii* は質量分析等で *E. coli* と誤同定されており⁸⁾、臨床検査機関において正しく菌種同定されていない可能性がある。*E. albertii* の生化学的性状は、乳糖非分解、非運動性、インドール陰性、リジン脱炭酸陽性、D-キシロース非醗酵等⁹⁾が知られているが、当研究室の先行研究ではインドール陽性や D-キシロース発酵等、様々な生物学的な性状を示した。

そこで本研究は *E. albertii* と腸内細菌科細菌を混合させた混合菌液を作製し、菌液中の *E. albertii* の検出について検討した。

II. 対象および方法

対象は腸内細菌科細菌である *E. albertii* JCM17328 株、*E. coli* ATCC25922 株、*Klebsiella pneumoniae* (臨床由来株)、*Citrobacter freundii* (臨床由来株) の 4 菌株とした。

E. albertii は *E. coli* の選択培地 EC ブロス (栄研) でマク

ファーランド標準濁度 (McFarland standard turbidity: McF) 0.5 に調整後に生菌数をカウントし、菌濃度を 1.5×10^8 CFU/mL とした。この菌液 2 mL を 0.2 mL ずつ階段希釈し 10^4 倍まで行い、 10^4 倍希釈液の菌濃度を 1.5×10^4 CFU/mL とした。*E. coli*、*K. pneumoniae*、*C. freundii* の 3 菌種は McF 0.5 に調整後、 10^2 倍希釈し、それぞれの 20 μ L、すなわち生菌数 3.0×10^4 個を各 *E. albertii* 菌液に添加し、これを混合菌液とした。混合菌液における *E. albertii* の菌濃度を表 1 に示す。*E. albertii* の菌濃度 1.5×10^8 CFU/mL では混合菌液に含まれる菌数が *E. coli*、*K. pneumoniae*、*C. freundii* より 10^4 倍相当であるため、この混合菌液を *E. albertii* 濃度 10^4 倍液とした。またこれら 3 菌種と *E. albertii* の生菌数が等量になるように調整した 10^4 倍希釈液を *E. albertii* 濃度等量液とした。これら混合菌液は 37、40、42、44.5°C で一晚培養後、培養液の 1 白金耳を *E. coli* の選択培地である EMB 寒天培地 (ニッスイ)、グラム陰性菌用の非分離用培地である BTB 寒天培地 (ドリガルスキー改良培地、栄研) に塗抹し、37、40、42、44.5°C で一晚培養後、*E. albertii* の分離状況を検討した。

III. 結果

1. 各寒天培地 37°C 培養における対象菌株の発育状況

1) EMB 寒天培地における発育状況

E. coli は集落が密集しているところでは金属光沢が認め

表1 混合菌液中における *E. albertii* 濃度

	10 ⁴ 倍液	10 ³ 倍液	10 ² 倍液	10倍液	等量液
菌数 (CFU/mL)	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	1.5×10^5	1.5×10^4
菌数 (個)	2.7×10^8	2.7×10^7	2.7×10^6	2.7×10^5	2.7×10^4

*1 弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-39-5970
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
Correspondence Author mfujioka@hirosaki-u.ac.jp

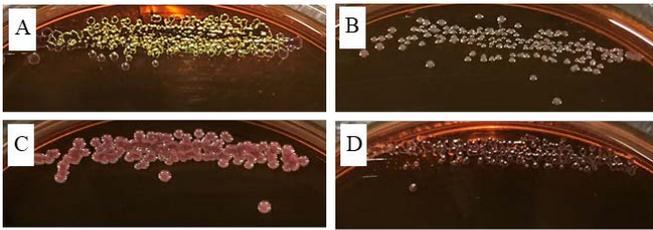


図1 EMB寒天培地における対象株の発育

A: *E. coli*, B: *E. albertii*, C: *K. pneumoniae*, D: *C. freundii*

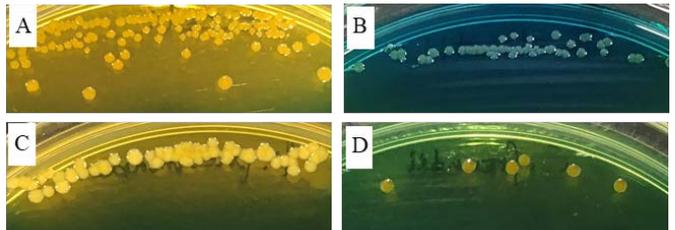


図2 BTB寒天培地における対象株の発育

A: *E. coli*, B: *E. albertii*, C: *K. pneumoniae*, D: *C. freundii*

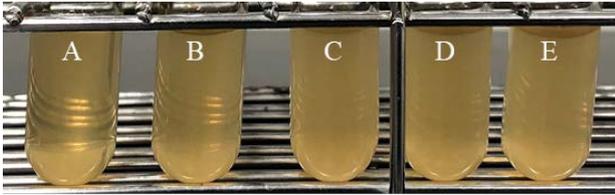


図3 ECブロス44.5°C培養における各混合菌液

A: *E. albertii* 10⁴倍混合菌液, B: 10³倍混合菌液, C: 10²倍混合菌液, D: 10倍混合菌液, E: 等量混合菌液

られたが、単離集落は黒色であった。*E. albertii* は無色透明の小集落、*K. pneumoniae* は赤紫色の大集落、*C. freundii* はやや小さい濃赤紫色集落であった(図1)。

2) BTB 寒天培地における発育状況

E. coli は黄色集落、*E. albertii* は無色透明の小集落、*K. pneumoniae* は淡黄色の大集落、*C. freundii* はやや小さい黄色集落であった(図2)。

2. EC ブロスにおける温度別の発育状況

1) 混合菌液における EMB 寒天培地での発育状況

EC ブロス 44.5°C 選択培養では *E. albertii* 濃度 10³ 倍および 10⁴ 倍混合菌液における培養液の濁度は McF 2~3 であったが、等量~10² 倍混合液および EC ブロス 37, 40, 42°C の選択培養温度におけるすべての濃度で強い混濁が認められた(図3)。

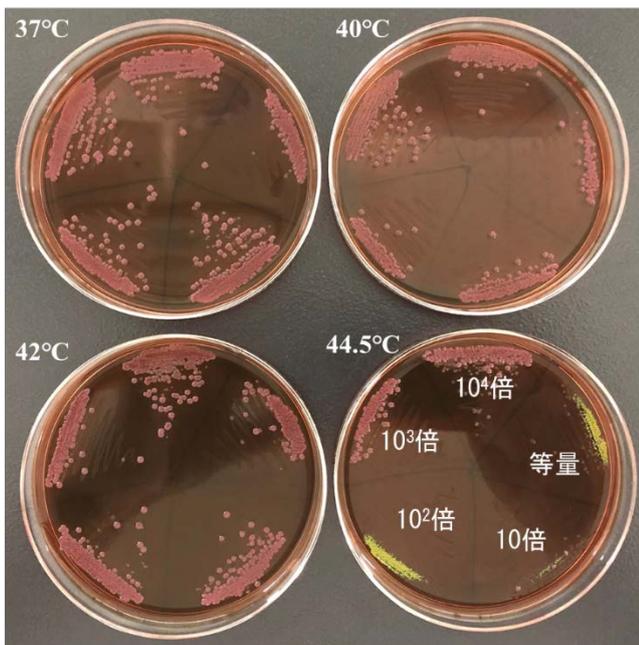


図4 EMB寒天培地におけるECブロス培養温度別混合菌液

これらの培養菌液をそれぞれ EMB 寒天培地に塗抹し 37°C 培養した結果を図4に示す。EC ブロス 44.5°C 選択培養における *E. albertii* 濃度が等量~10² 倍混合菌液では金属光沢集落が認められたが、10³, 10⁴ 倍混合菌液では認められなかった。また EC ブロス 37, 40, 42°C 培養後の EMB 寒天培地ではいずれの *E. albertii* 濃度でも金属光沢は認められず、*K. pneumoniae* の発育が良好であった。これらの培地上の小集落を釣菌した結果、すべて *E. coli* であった。

EC ブロス 37, 40, 42°C 選択培養後の EMB 寒天培地での発育は 37, 40, 42°C 培養ともに等量~10² 倍混合菌液では金属光沢集落が認められたが、10³, 10⁴ 倍混合菌液では認められなかった。また 44.5°C 培養では全濃度の混合菌液で黒色集落のみ認められた。これらの EMB 寒天培地上の半透明小集落を釣菌した結果、すべて *E. coli* であった。

2) 混合菌液における BTB 寒天培地での発育状況

EC ブロスを各温度で培養した菌液を BTB 寒天培地に塗抹し、37°C 培養した結果を図5に示す。EMB 寒天培地と同様に、EC ブロス 44.5°C 培養における *E. albertii* 濃度が等量~10² 倍混合菌液では黄色集落が認められ、*E. coli* が優位に発育していた。一方で *E. albertii* 濃度が 10³, 10⁴ 倍混合菌液において乳糖非分解の透明集落を釣菌した結果、すべて *E. albertii* であった。

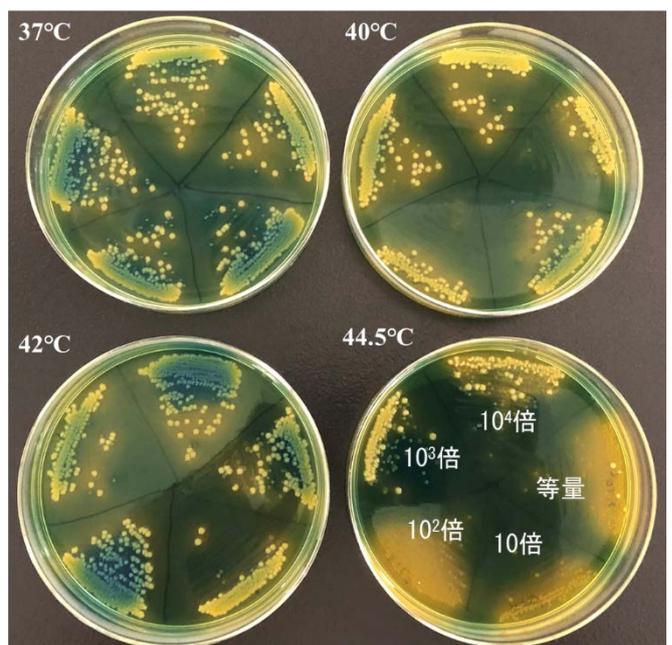


図5 BTB寒天培地におけるECブロス培養温度別混合菌液

EC ブロス 37, 40, 42°C 選択培養後の BTB 寒天培地での発育は 37, 40, 42°C 培養ともに乳糖分解菌の発育が良好であったが, 44.5°C 培養では EC ブロスの培養温度に関わらず, 対象菌株の発育が抑制されていた。また *E. albertii* 全濃度の混合菌液において, 各培養温度から乳糖非分解集落を釣菌した結果, すべて *E. albertii* であった。

IV. 考察

近年, 新興病原体である *E. albertii* による食中毒事例がいくつか報告^{10,11)}されている。しかしながら *E. albertii* は臨床検査機関における質量分析等では *E. coli* 等と誤同定されており⁸⁾, 同定には PCR による *E. albertii* 特異遺伝子の検索等が必要であるため, 通常臨床検査では下痢症原因菌として分離しても菌種同定が正しくできていない現状がある。そこで本研究では大腸菌群である *E. coli*, *E. albertii*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* の 4 菌種を対象に混合菌液を作製し, 大腸菌群を選択的に分離・培養する EC ブロスや EMB 寒天培地, グラム陰性桿菌や腸内細菌を分離する BTB 寒天培地を用いて *E. albertii* の分離を検証した。

EC ブロスは添付書により, 37°C で 48 時間培養後にガスの産生があれば大腸菌群陽性, 44.5°C で 24 時間培養後にガスの産生があれば *E. coli* 陽性と判定されるが, 実際に菌種同定するためには集落の分離が必要である。今回対象とした 4 菌種は大腸菌群に含まれ, また *E. albertii* は *E. coli* と同じ *Escherichia* 属であることから, 本研究では各培地上の集落の様子を詳細に確認した。EC ブロス 37, 40, 42, 44.5°C の温度で一晩選択培養後, EMB 寒天培地に塗抹し, その様子を観察した。EMB 寒天培地は大腸菌群の確定試験に使用され, 添付書に準じた 37°C 培養により, *E. coli* は中心部黒色で黄金色の金属光沢を示し, サルモネラや赤痢菌は透明な小集落を形成するとされる。今回, *E. albertii* はうすいピンク色の透明なやや小さな集落を形成しており, サルモネラや赤痢菌と類似した透明な小集落を形成した。一方, *E. coli* は集落が密集しているところでは金属光沢が認められたが単離集落は黒色集落, *K. pneumoniae* はピンク色の大集落, *C. freundii* は黒色小集落であった。よって EMB 培地における *E. albertii* の分離は透明集落を標的にすることが有効であると考ええる。

EC ブロス 37, 40, 42°C で選択培養後の EMB 寒天培地における各培養温度別の分離状況では, *E. albertii* の菌濃度に関わらず *K. pneumoniae* が優位に発育し, 他の 3 菌種は発育があまり良くなかった。一方で EC ブロス 44.5°C で選択培養後の EMB 寒天培地 37, 40, 42°C 培養した培地での発育は, *E. albertii* の菌濃度 10^3 , 10^4 倍混合菌液では *E. albertii* の発育を認めた。しかしながら 44.5°C での培養ではいずれの選択培養温度でも *E. albertii* や *K. pneumoniae*, *C. freundii* は検出できず, また *E. coli* も黒色集落のみで金属光沢集落を形成しなかった。このことから 44.5°C の高温下での培養

は他菌種のみならず, 一部の *E. coli* も発育を抑制される可能性が示唆された¹²⁾。また EMB 寒天培地の培養温度も必要以上に高温にせず, 添付書による 37°C 培養が有効であることを再確認した。

今回, EC ブロスで増菌培養後, EMB 寒天培地と同様に BTB 寒天培地での混合菌液の分離状況も検討した。BTB 寒天培地は 37°C で 24 時間培養をすると, 乳糖分解菌は黄色集落となり, 一方で乳糖非分解菌は透明な集落となる。本研究の対象菌株は *E. albertii* のみ乳糖非分解であるため, いずれの培養条件でも分離が困難ではなく, *E. albertii* の濃度が高ければ容易に分離が可能であった。また EMB 寒天培地と同様に高温下での培養は対象菌種も発育抑制される可能性があり, 添付書による 37°C の培養温度が有効であった。

食中毒の原因菌である赤痢菌や腸管出血性大腸菌, カンピロバクター等は 100 個程度でも感染・発症が可能であるとされるが, 一般には 10^6 ~ 10^8 個の原因菌の摂取により食中毒を起こす¹³⁾。よって *E. albertii* が原因となる食中毒では, 患者便中には相当数が含有されていることが想定されるため, 増菌培養を行わずに *E. albertii* の検出が可能であると考ええる。一般に便培養には BTB 寒天培地は使用されないが, 同様に乳糖を含有する SS 寒天培地ではサルモネラや赤痢菌以外の発育は強く抑制される¹⁴⁾。また SS 寒天培地より選択性が強くない腸内細菌分離培地である DHL 寒天培地は乳糖と白糖が含まれている¹⁵⁾。*E. albertii* は乳糖および白糖非分解との報告が多い^{16, 17)} が, 白糖分解 *E. albertii* の報告¹⁸⁾ もあることから, DHL 寒天培地の 2 種類の糖非分解の集落を対象とすることは見落としの可能性を否定できない。さらに BTB 寒天培地は非選択培地であるため, 便を塗抹・培養した際には様々な菌種が発育することが予想される。そこで EC ブロス 44.5°C で選択培養することで, 非目的菌の発育を抑制することが可能となる。菌量が少ないことが予想される検体では直接あるいは濃縮して BTB 寒天培地に塗抹・培養し, 乳糖非分解菌を標的にすることで, *E. albertii* を見逃す可能性を減少させることができると考える。他にマッコンキー寒天培地¹⁹⁾ が乳糖を含有するが, 当研究室の先行研究では BTB 寒天培地と同様の発育状況であった。しかしながらマッコンキー寒天培地は NaCl を含有するグラム陰性桿菌の選択培地であり, 一部のグラム陽性球菌が発育可能な BTB 寒天培地より選択性が強いことから, 検体の種類により使用培地の選択は慎重に行う必要がある。

臨床検体等から検出した乳糖非分解菌が *E. coli* に類似した生化学的性状であり, 自施設で *E. albertii* との詳細な鑑別が難しい場合は, 現段階では PCR 等を用いた鑑別が可能な施設へ同定依頼が必要になると思われる。よって今後は生化学的性状の解析や検出技術の検討等を進め, 一般の施設でも実施可能な *E. albertii* 簡易同定法の開発に努めたい。

利益相反 開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) 厚生労働省生活衛生局長. 食品衛生法施行の一部を改正する省令の施行等について. 生衛発第 1836 号, 1998.
- 2) 国立感染症研究所. 細菌性食中毒 1998~2007 年. IASR, 29(8): 213-215, 2008.
- 3) 国立感染症研究所. サルモネラ症. IASR, 27(8): 191-192, 2006.
- 4) 藤岡美幸, 木村俊太, 他: 凍結環境が *Campylobacter* 生存に与える影響に関する調査. 保健科学研究. 10(1): 39-42, 2019.
- 5) 畜産技術協会. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書. 98-113, 2010.
- 6) Albert MJ, Alam K, et al.: *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. Infect Immun, 59(4): 1507-1513, 1991.
- 7) Huys G, Cnockaert M, et al.: *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrheagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. Int J Syst Evol Microbiol, 53(3): 807-810, 2003.
- 8) 杵淵貴洋, 角谷不二雄, 他: 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. IASR, 39(5): 84, 2018.
- 9) Abbott SL, O'Connor J, et al.: Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. J Clin Microbiol, 34(3): 4852-4843, 2003.
- 10) 深田真美, 福原亜美, 他: 集団感染事例から検出された *Escherichia albertii* について. IASR, 37(5), 100-101, 2013.
- 11) 石岡真緒, 関 哲, 他: 宇都宮で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について. IASR, 38(8): 175-176, 2017.
- 12) 角野 猛, 佐久間久仁子: 大腸菌群の発育縫い及ぼす培養温度の影響について. 家政学雑誌, 33(12):46-49, 1982.
- 13) 松木隆広: ヒト腸内フローラ構成菌の定量的 PCR 検出保の確立および菌属・菌種分布の解析. 日本細菌学雑誌, 62(2): 255-261, 2007.
- 14) 藤田保健衛生大学「臨床検査学入門」編集委員会: 医学領域における臨床検査学入門 第 2 版. p458-465, KTC 中央出版, 東京, 2009.
- 15) 前田哲司: 栄研マニュアル 第 10 版 DHL 寒天培地. p61, 栄研化学株式会社, 東京, 1996.
- 16) Asoshima N, Matsuda M, et al.: Identification of *Escherichia albertii* as a causative agent of a food-borne outbreak occurred in 2003. Jpn J Infect Dis, 67(3): 139-140, 2014.
- 17) Stock I, Rahman M, et al.: Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of *Escherichia albertii* and *Hafnia alvei* strains. Diagn Microbiol Infect Dis, 51(3): 151-163, 2005.
- 18) Ooka T, Tokuoka E, et al.: Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan. Emerg Infect Dis, 19(1): 144-146, 2013.
- 19) 日本臨床衛生検査技師会: 臨床微生物検査 技術教本 エンテリキア属. p148, 丸善出版, 東京, 2017.

【Original article】

Study on culture temperature in *Escherichia albertii*

MIYUKI FUJIOKA^{*1} SHO YOSHIOKA^{*1}
HIROYUKI NOZAKA^{*1}

(Received July 2, 2020 ; Accepted July 16, 2020)

Abstract: *Escherichia albertii*, an emerging pathogen, was isolated from a patient with diarrhea in Bangladesh in 1998, and is now a known cause of food poisoning in Japan. *E. albertii* is similar to *E. coli* and has been misidentified by clinical laboratories. We prepared a mixture of *E. albertii* with three other types of enterobacteria and assessed the ability to detect *E. albertii* on various different culture media and at various culture temperatures. *E. albertii* was not detected on EMB agar plates, which were cultured at 44.5°C after inoculation with mixed culture in EC broth, a selective medium for *E. coli*. *E. albertii* was detected in mixed bacterial cultures with high *E. albertii* concentrations after culturing at 37, 40, and 42°C in EC broth. In contrast, growth of *E. albertii* on BTB agar plates was detectable under all conditions, although 37°C (the most common incubation temperature for BTB agar plates) was most effective for detection of *E. coli*. Selective culturing at high temperatures inhibits growth not only of other bacterial species, but also of *E. coli* to some extent. We suggest that bacterial culture in selective media at 37, 40, and 42°C, followed by plating on nonselective media such as BTB agar, for non lactose-degrading colonies, is an effective method for detecting *E. albertii*.

Keywords: *Escherichia albertii*, Food poisoning bacteria, Misidentification, Culture temperature