

## 千葉市内の河川水における *Escherichia albertii* の検出状況

水村 綾乃<sup>1</sup>、小林 律輝<sup>1</sup>、若岡 未記<sup>1</sup>、本宮 恵子<sup>2</sup>、北橋 智子<sup>1</sup>、  
秋葉 容子<sup>1</sup>、長埜 朗夫<sup>1</sup>、荒井 健二<sup>1</sup>、田中 俊光<sup>1</sup>、横井 一<sup>1</sup>

(1 環境保健研究所 健康科学課、2 健康推進課)

**要旨** 千葉市内の環境水中における *Escherichia albertii* (以下、「*E. albertii*」とする。)の存在実態を把握するため、2024 年 4 月から 2025 年 3 月までの 1 年間に市内の 5 つの河川 16 地点で採水した 192 検体の河川水について、*E. albertii* の検出状況を調査した。その結果、5 つの河川 16 地点のうち 15 地点から *E. albertii* が検出されたことから、*E. albertii* は市内の河川に広く分布していることが示唆された。また、増菌培地および選択培地を用いた 6 通りの分離培養方法について比較検討した結果、CT 加 mEC 培地により増菌し ES サルモネラ寒天培地 II で選択培養する方法が最も *E. albertii* の分離率が高いことが明らかとなった。

**Key Words :** *Escherichia albertii*, 河川水, 分離培養方法

### 1. はじめに

*Escherichia albertii* (以下、「*E. albertii*」とする。)は、グラム陰性通性嫌気性桿菌であり、2003 年に *Escherichia* 属菌の新種として発表された下痢症起因菌である<sup>1)</sup>。近年、日本<sup>2),3)</sup>、中国<sup>4)</sup>、アメリカ<sup>5)</sup>、メキシコ<sup>6)</sup>、ポーランド<sup>7)</sup>、バングラデシュ<sup>1)</sup>、ブラジル<sup>8),9)</sup>等世界各地において *E. albertii* による散発的な感染事例が複数報告されている。日本においては、集団食中毒事例が秋田県<sup>10),11)</sup>、広島県<sup>12)</sup>、静岡県<sup>13)</sup>、および沖縄県<sup>14)</sup>で報告されている。

自然界における詳細な分布は明らかになっていないが、河川などの環境水や犬などのペット、鶏や豚などの家畜動物、ハトやカワウなどの鳥類、アライグマやイタチ等の野生動物など様々な動物から検出されている<sup>15)</sup>。食品では、鶏肉・鶏レバー<sup>16)</sup>、マトン・鴨肉<sup>17)</sup>、チーズ<sup>18)</sup>等からの検出報告がある。また、牡蠣からの検出も報告されていることから、海水域での汚染の可能性も示唆されている<sup>19)</sup>。

そこで、市内の環境水中における *E. albertii* の存在実態を把握することを目的として、市内の河川水における *E. albertii* の検出状況を調査したので報告する。併せて、環境水から *E. albertii* を検出するために有用な分離方法を明らかにするため、2 種類の増菌培地およ

び 3 種類の選択培地を組み合わせた 6 通りの分離培養方法について比較検討した。

### 2. 材料および方法

#### 2.1 河川水

2024 年 4 月から 2025 年 3 月までの 1 年間に、市内の 5 つの河川 (No.1~5) の 16 地点 (A~P) から毎月 1 検体ずつ採水した河川水 192 検体を試料とした (表 1、図 1)。

表 1 採水地点および検体数

河川No.	採水地点	検体数
1	花見川 2地点 (A, B)	24
2	都・葭川 6地点 (C~H)	72
3	鹿島川 6地点 (I~N)	72
4	村田川 1地点 (O)	12
5	生実川 1地点 (P)	12
合計	16 地点	192

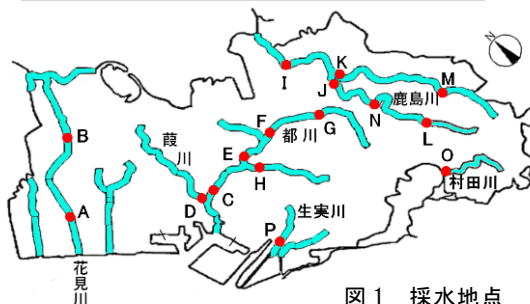


図 1 採水地点

## 2. 2 *E. albertii* の分離培養

検体 70 mL を 0.45 μm メンブレンフィルター（アドバンテック）でろ過し、2 種類の増菌培地で 42°C、20 ± 2 時間増菌培養した後、各増菌液を 3 種類の選択培地に塗抹し、37°C で 20 ± 2 時間培養した。2 種類の増菌培地は、NB 加 mEC 培地（OXOID）および CT 加 mEC 培地（OXOID）を用いた。また、3 種類の選択培地は、キシロース・リジン・デソキシコール酸を添加した XLD 寒天培地（OXOID）、キシロース・ラムノース・メリビオースを添加したマッコンキー寒天培地である XRM-MAC 寒天培地（BD）、ES サルモネラ寒天培地 II（栄研化学）を用いた。以上、6 通りの分離培養方法で発育したコロニーを後述の PCR 法によって同定した。

## 2. 3 *E. albertii* 特異的遺伝子の検出

各選択培地に発育したコロニーのうち、XLD 培地（以下、「XLD」とする。）では中心部がやや黄色～クリーム色を呈するピンク色のコロニー<sup>20</sup>、XRM-MAC 培地（以下、「XRM-MAC」とする。）では糖非分解の無色のコロニー<sup>21</sup>、ES サルモネラ寒天培地 II（以下、「ES サルモネラ」とする。）ではピンク色のコロニー<sup>22</sup>を *E. albertii* が疑われるコロニーとして各 1～5 個釣菌した。次いで、各コロニーからアルカリ熱抽出法により DNA を抽出した後、得られた DNA を鋳型として、*E. albertii* に特異的なマルチプレックス PCR 法<sup>5), 23)</sup>を実施した。本法の標的遺伝子は、「ATP 依存性プロテアーゼ」をコードする *clpX* 遺伝子、「リジン特異的透過酵素」をコードする *lysP* 遺伝子および「リノゴ酸デヒドロゲナーゼ」をコードする *mdh* 遺伝子の 3 遺伝子である。PCR 産物のサイズは、*clpX* 遺伝子が 383 bp、*lysP* 遺伝子が 251 bp、*mdh* 遺伝子が 114 bp であり、*clpX* 遺伝子（内因性コントロール）が検出され、かつ *lysP* と *mdh* 遺伝子が検出されたコロニーを *E. albertii* 分離株とした。なお、6 通りの分離培養方法のいずれかによって、*E. albertii* 分離株が確認された河川水を陽性検体とした。

## 3. 結果

### 3. 1 河川水における *E. albertii* の検出状況

市内の 5 つの河川 16 地点のうち 15 地点から *E. albertii* が検出された。また、河川水 192 検体のうち 42 検体から *E. albertii* が検出された。

採水地点別の *E. albertii* の検出率は 0～66.7% であり、16 地点のうち最も検出率が高い採水地点は、河川 No.3 の M 地点（66.7%）であった。河川別の *E. albertii* の検出率は河川 No.4 が最も高く、58.3% であった（表 2）。

表 2 河川別および採水地点別の *E. albertii* 検出状況

河川 No.	採水地点	検体数	検出数	採水地点別の検出率(%)	河川別の検出率(%)
1	A	12	0	0	4.2
	B	12	1	8.3	
	C	12	1	8.3	
2	D	12	1	8.3	16.7
	E	12	4	33.3	
	F	12	1	8.3	
	G	12	2	16.7	
	H	12	3	25.0	
3	I	12	3	25.0	26.4
	J	12	2	16.7	
	K	12	2	16.7	
	L	12	3	25.0	
	M	12	8	66.7	
4	N	12	1	8.3	58.3
	O	12	7	58.3	
5	P	12	3	25.0	25.0
計		16	192	42	21.9

採水月別の *E. albertii* 陽性検体数は、5 月から 10 月までは増加傾向を示し、10 月の 7 検体をピークに翌年の 3 月まで減少傾向を示した（図 2）。

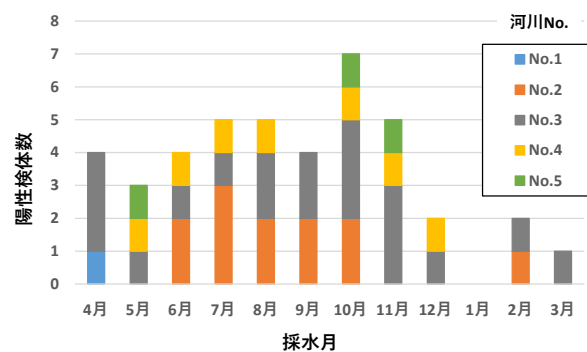


図 2 採水月別の *E. albertii* 検出状況

### 3. 2 *E. albertii* の分離培養方法の検討

河川水 192 検体を増菌培養した結果、全ての検体において菌の増殖が NB 加 mEC 培地と CT 加 mEC 培地の両者に認められた。各増菌液を 3 種類の選択培地（XLD、XRM-MAC、ES サルモネラ）にそれぞれ塗抹し、37°C で 20 ± 2 時間培養したところ、全ての選択培地 1,152 枚（192 検体 × 6 通りの分離培養方法）のうち 165 枚に *E. albertii* を疑うコロニーが観察された。これらのコロニーを対象にマルチプレックス PCR 法による同定を行った結果、最終的に 78 枚（6.8%）の選択培地から *E. albertii* 分離株が得られた。その内訳は、

表 3 培地別の *E. albertii* 分離状況

増菌培地	選択培地			合 計 (n=576)
	XLD (n=192)	XRM-MAC (n=192)	ESサルモネラ (n=192)	
NB加mEC	6 (3.1)	7 ( 3.6)	13 ( 6.8)	26 (4.5)
CT加mEC	7 (3.6)	15 ( 7.8)	30 (15.6)	52 (9.0)
合 計 (n=384)	13 (3.4)	22 (5.7)	43 (11.2)	78 (6.8)

( ) 内の数値は、分離率 (%) を示す

表 4 単一の分離培養方法のみで *E. albertii* が陽性となった検体

増菌培地	選択培地			合 計
	XLD	XRM-MAC	ESサルモネラ	
NB加mEC	0 (0.0)	1 ( 5.0)	5 (25.0)	6 ( 30.0)
CT加mEC	0 (0.0)	1 ( 5.0)	13 (65.0)	14 ( 70.0)
合 計	0 (0.0)	2 (10.0)	18 (90.0)	20 (100.0)

( ) 内の数値は、分離率 (%) を示す

NB加mEC培地による増菌液を塗抹したXLDは6枚、XRM-MACは7枚、ESサルモネラは13枚であった。一方、CT加mEC培地による増菌液を塗抹したXLDでは7枚、XRM-MACでは15枚、ESサルモネラでは30枚であった。増菌培養に使用したNB加mEC培地とCT加mEC培地の分離率は、それぞれ4.5%と9.0%であり、若干ではあるが*E. albertii*に対するCT加mEC培地の選択性はNB加mEC培地に比べて優れていた。分離培養に使用した3種類の選択培地のうち、ESサルモネラの実分離率は11.2%と最も高く、NB加mEC培地による増菌後の分離率は6.8%、CT加mEC培地による増菌後では15.6%であった(表3)。

2種類の増菌培地および3種類の選択培地を組み合わせた6通りの分離培養方法のうち、単一の分離培養方法のみによって*E. albertii*が陽性となった河川水は20検体であった。このうち、5検体(25.0%)がNB加mEC培地とESサルモネラを用いた分離培養方法のみで陽性となり、13検体(65.0%)がCT加mEC培地とESサルモネラを用いた方法のみで陽性となった。なお、20検体のうち2検体(10.0%)は、2種類の増菌培地それぞれにXRM-MACを組み合わせた方法の

みで陽性となった(表4)。

*E. albertii*が陽性となった河川水42検体の採水地点とその分離培養方法を表5に示した。各検体は、単一または複数の分離培養方法によって*E. albertii*が陽性となった。増菌培地に着目すると、河川No.5のP地点から採水した3検体は、NB加mEC培地と各種選択培地を用いた分離培養方法によって*E. albertii*が陽性となったが、CT加mEC培地では全て陰性であった。一方、河川No.1のB地点、河川No.2のC地点・D地点・E地点・F地点および河川No.3のJ地点・K地点・N地点から採水した13検体は、NB加mEC培地では全て陰性であったが、CT加mEC培地と各種選択培地を用いた方法によって*E. albertii*が陽性となった。選択培地に着目すると、河川水42検体のうち30検体(71.4%)がCT加mEC培地とESサルモネラを用いた分離培養方法で*E. albertii*が陽性となったが、残りの12検体は陰性であった。しかし、これら12検体のうち10検体(23.8%)は、NB加mEC培地とESサルモネラを用いた方法によって*E. albertii*が陽性となった。

表 5 *E. albertii* 陽性検体の採水地点と分離培養方法

河川 No.	採水地点	NB加mEC培地による増菌培養			CT加mEC培地による増菌培養		
		XLD	XRM-MAC	ESサルモネラ	XLD	XRM-MAC	ESサルモネラ
1	B						●
2	C						●
2	D				●		●
	E						●
2	E				●	●	●
	E					●	●
	E						●
2	F					●	●
2	G						●
	G			●			
	H			●			
2	H						●
	H						●
	I			●			
3	I					●	●
	I	●	●	●			
3	J						●
	J					●	
3	K						●
	K						●
	L			●			●
3	L					●	●
	L					●	●
	M						●
	M	●			●	●	●
	M					●	●
3	M					●	●
	M			●	●		●
	M			●	●		●
	M		●	●			●
	M	●		●			●
3	N				●	●	●
	O			●			
	O				●	●	●
	O						●
4	O						●
	O		●				
	O		●			●	●
	O	●	●	●	●	●	●
	P	●	●	●			
5	P			●			
	P	●	●	●			
合計	42	6	7	13	7	15	30

●は、*E. albertii* が分離されたことを示す

#### 4. 考察

市内における *E. albertii* の存在実態を明らかにするため、2024年4月～2025年3月までの1年間に市内5つの河川16地点で採水された計192検体の河川水を調査した。その結果、5つの河川15地点から採水された42検体から *E. albertii* が検出され、市内の河川中に *E. albertii* が広く分布していることが示唆された。特に検出率が高かった河川 No.3 の M 地点と河川 No.4 の O 地点の周辺には田畑が広がり、畜産施設や樹林地が多く、谷津田や森林が保全されている地域でもあるため、野生動物や野鳥が生息している。*E. albertii* は、豚などの家畜、アライグマやイタチなどの野生動物および様々な種類の野鳥から分離された報告<sup>16)</sup>があることから、市内でも河川水などの環境水と動物の間で循環している可能性が考えられた。

*E. albertii* は、水環境の温度によって生存率が変化することが報告されており、低温(4℃)では生存は維持されるが増殖は抑制され、高温(30℃)では低温時に比べて早期に死滅する傾向が示されている<sup>24)</sup>。本研究においても、*E. albertii* は春季から秋季に採水した河川水から検出され、10月をピークに冬季の検出数は減少する傾向を示した。以上のことから、冬季の低温環境では *E. albertii* の検出数は低く、夏季ではなく秋季に検出ピークが認められたものと思われた。また、Xuらは、*E. albertii* の主な宿主と考えられている野生のアライグマから採取した直腸スワブを調査した結果、*E. albertii* の検出率は冬季に高く、春季に低かったことを報告<sup>25)</sup>しており、本研究における河川水からの検出時期と異なっていた。しかしながら、野生のアライグマは、寒い時期になると巣穴を作り、ほとんど活動しなくなることから、環境水から *E. albertii* が検出される時期は、宿主である野生動物の活動パターンに依存するものと考えられた。

*E. albertii* の分離培養方法を検討した結果、増菌培地の分離率は NB 加 mEC 培地が 4.5 %、CT 加 mEC 培地が 9.0 %であったことから、若干ではあるが CT 加 mEC 培地の選択性が優位であると考えられた。しかし、河川 No.5 から採水した 3 検体は、NB 加 mEC 培地で *E. albertii* 陽性となったが、CT 加 mEC 培地は全て陰性となった。逆に、河川 No.1、No.2 および No.3 から採水した 13 検体は、NB 加 mEC 培地は全て陰性となったが、CT 加 mEC 培地で *E. albertii* 陽性となった。このことは、*E. albertii* に対する増菌培地の選択性は、検体中に存在する *E. albertii* と共存菌の競合や薬剤感受性の違いによる増殖抑制等の影響を受けている可能性を示唆しており、採水地点の水質に適した

増菌培地の選択が必要であると考えられた。従って、今後も 2 種類の増菌培地の併用が *E. albertii* の分離培養に必須であると考えられた。

選択培地については、3 種類のうち ES サルモネラの分離率が最も高く、NB 加 mEC 培地を用いた場合の分離率は 6.8 %、CT 加 mEC 培地の場合は 15.6 %であった。また、単一の分離培養方法のみによって *E. albertii* が陽性となった河川水は 20 検体であったが、このうち 18 検体(90.0 %)が ES サルモネラを用いた方法であった。以上のことから、ES サルモネラは、*E. albertii* の分離に特化した XRM-MAC よりも分離率が高いことが明らかとなった。さらに、*E. albertii* 陽性の河川水 42 検体のうち 40 検体(95.2 %)が 2 種類の増菌培地と ES サルモネラを用いる方法で陽性となったことから、2 種類の増菌培地を併用し、それぞれの増菌液を ES サルモネラに塗抹することで、検査効率の大幅な向上が期待できることに加えて、食中毒調査における患者便等の臨床検体や原因食品からの *E. albertii* 検出にも応用が可能であると考えられた。

*E. albertii* は、腸管病原性大腸菌(EPEC)や腸管出血性大腸菌(EHEC)と類似した多様な病原遺伝子(インチミンをコードする *eae* 遺伝子、細胞膨化致死毒素をコードする *Eacdt* 遺伝子、2 型志賀毒素をコードする *stx2a* または *stx2f* 遺伝子等)を保有することが報告されている<sup>26), 27)</sup>。しかし、本研究では、これらの病原性に関与する遺伝子の保有状況を調査していないため、*E. albertii* 分離株の病原性の有無等については今後の検討課題である。特に、市内医療機関の下痢症患者から *E. albertii* が分離されていることから、患者由来株と河川水由来株の病原遺伝子の保有状況を比較する必要があると考えられた。

#### 文献

- 1) Geert Huys, Margo Cnockaert, J. Michael Janda, et al. : *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children, International journal of systematic and evolutionary microbiology 53, 807-810, 2003.
- 2) Atsushi Hinenoya, Noritomo Yasuda, Takumi Hibino, et al. : Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* strain producing three different toxins from a child with diarrhea, Japanese Journal of Infectious Diseases, 70, 252-257, 2017.

- 3) Tadasuke Ooka, Kazuko Seto, Kimiko Kawano, *et al.* : Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerging infectious diseases*, 18, 488-492, 2012.
- 4) Qun Li, Hong Wang, Yanmei Xu, *et al.* : Multidrug-resistant *Escherichia albertii* : Co-occurrence of  $\beta$ -lactamase and MCR-1 encoding genes, *Frontiers in Microbiology*, 9, 00258, 2018.
- 5) J. Lindsay Oaks, Thomas E. Besser, Seth T. Walk, *et al.* : *Escherichia albertii* in wild and domestic birds, *Emerging infectious diseases*, 16, 638-646, 2010.
- 6) Samantha Maldonado-Puga, Mario Meza-Segura, Adriana Becerra, *et al.* : Draft genome sequence of *Escherichia albertii* strain Mex-12/320a, isolated from an infant with diarrhea and harboring virulence genes associated with diarrheagenic strains of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Microbiology Resource Announcements*, 8, e00208-19, 2019.
- 7) Krzysztof Fiedoruk, Tamara Daniluk, Izabela Swiecicka, *et al.* : First complete genome sequence of *Escherichia albertii* strain KF1, a new potential human enteric pathogen, *Genome announcements*, 2, e00004-14, 2014.
- 8) Mauricio P. Lima, Denise Yamamoto, Ana Carolina de Mello Santos<sup>1</sup>, *et al.* : Phenotypic characterization and virulence-related properties of *Escherichia albertii* strains isolated from children with diarrhea in Brazil, *Pathogens and disease*, 77, ftz014, 2019.
- 9) E. L. Ori, E. H. Takagi, T. S. Andrade, *et al.* : Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance, *Epidemiology & Infection*, 147, e10, 2019.
- 10) Takayuki Konno, Jun Yatsuyanagi, Shiho Takahashi, *et al.* : Isolation and Identification of *Escherichia albertii* from a Patient in an Outbreak of Gastroenteritis, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 203-207, 2012.
- 11) 樫尾拓子, 今野貴之, 高橋志保, 他 : 複数の O 抗原遺伝子型の *Escherichia albertii* が病因物質として特定された食中毒事例, *日本食品微生物学会雑誌*, 37, 183-187, 2020.
- 12) 深田真美, 福原亜美, 立脇邦雄, 他 : 集団感染事例から検出された *Escherichia albertii* について—広島県, *IASR*, 37, 100-101, 2016.
- 13) 長岡宏美, 鈴木秀紀, 村田学博, 他 : 静岡県で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について—同定までの経緯, *IASR*, 37, 254-255, 2016.
- 14) 高良武俊, 仲間絵里, 喜屋武向子, 他 : ニガナの白和えを原因食品とする *Escherichia albertii* による集団食中毒事例—沖縄県, *IASR*, 37, 252-253, 2016.
- 15) Atsushi Hinenoya, Keigo Nagano, Sharda P. Awasthi, *et al.* : Prevalence of *Escherichia albertii* in raccoons (*Procyon lotor*), Japan, *Emerg. Infect. Dis.*, 26, 1304-1307, 2020.
- 16) Nanami Asoshima, Masanori Matsuda, Kumiko Shigemura, *et al.* : Isolation of *Escherichia albertii* from Raw Chicken Liver in Fukuoka City, Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 68, 248-250, 2015.
- 17) H. WANG, Q. LI, X. BAI, *et al.* : Prevalence of eae-positive, lactose non-fermenting *Escherichia albertii* from retail raw meat in China, *Epidemiol. Infect.*, 144, 45-52, 2016.
- 18) Nagah M. Saad, Mohammed S. Sabreen, Wallaa F. Amin, *et al.* : Prevalence of *Escherichia albertii* and other *Escherichia* species in raw milk and some dairy products in Assiut city, Egypt, *Journal of American Science*, 8, 333-341, 2012.
- 19) Arai Sakura, Satoko Yamaya, Kayoko Ohtsuka, *et al.* : Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters, *Journal of Food Protection*, 85, 173-179, 2022.
- 20) Rebecca L. Lindsey, Paula J. Fedorka-Cray, Melanie Abley, *et al.* : Evaluating the Occurrence of *Escherichia albertii* in Chicken Carcass Rinses by PCR, Vitek Analysis, and Sequencing of the *rpo B* Gene, *Appl Environ Microbiol.*, 81, 1727-1734, 2015.
- 21) Atsushi Hinenoya, Keigo Nagano, Kentaro Okuno, *et al.* : Development of XRM-MacConkey agar selective medium for the isolation of *Escherichia albertii*, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 97, 115006, 2020.
- 22) 増田 加奈子, 平塚 貴大, 深田 真美, 他 : ES サルモネラ寒天培地 II における *Escherichia albertii* の特徴, *広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告*, 28, 7-11, 2020.

- 23) Katie E. Hyma, David W. Lacher, Adam M. Nelson, *et al.* : Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species : *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains, *Journal of bacteriology*, 187, 619-628, 2005.
- 24) Shouhei Hirose, Noriko Konishi, Mika Sato, *et al.* : Growth and survival of *Escherichia albertii* in food and environmental water at various temperatures, *Journal of food protection*, 87, 100249, 2024.
- 25) Bingting Xu, Noritoshi Hatanaka, Sharda Prasad Awasthi, *et al.* : Seasonality of detection rate of *Escherichia albertii* in wild raccoons (*Procyon lotor*) in Osaka, Japan, *Journal of Veterinary Medical Science*, 86, 180-183, 2024.
- 26) Atsushi Hinenoya, Noritomo Yasuda, Natsuko Mukaizawa, *et al.* : Association of cytolethal distending toxin-II gene-positive *Escherichia coli* with *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen, *International Journal of Medical Microbiology*, 307, 564-571, 2017.
- 27) Lin Thorstensen Brandal, Hege Smith Tunsjø, Trond Egil Ranheim, *et al.* : Shiga toxin 2a in *Escherichia albertii*. *Journal of clinical microbiology*, 53, 1454-1455, 2015.