

ノート

ESサルモネラ寒天培地Ⅱにおける *Escherichia albertii* の特徴

増田 加奈子, 平塚 貴大, 深田 真美*¹, 長岡 宏美*², 江藤 良樹*³, 大熊 博*⁴, 村上 光一*⁵

Characteristics of *Escherichia albertii* on ES Salmonella Agar II.

MASUDA KANAKO, HIRATSUKA TAKAHIRO, FUKADA MAMI*¹, NAGAOKA HIROMI*²,
ETOH YOSHIKI*³, OOKUMA HIROSHI*⁴ and MURAKAMI KOICHI*⁵

(Received : November 18, 2020)

There is a strong need for specific differential agar plates for emerging enteropathogen *Escherichia albertii* because it displays few unique biological characteristics. We therefore examined characteristics of *E. albertii* on ES Salmonella Agar II (Eiken Chemical Co., Ltd.). *E. albertii* formed pink colonies, similar to those of *Salmonella* sp., on the agar plates following incubation at 36°C–37°C for 24 hr. When the colony characteristics of 109 *E. albertii* strains were examined, 97.2% of the strains formed pink colonies on ES Salmonella Agar II following incubation at the same condition. *Salmonella* strains grown on ES Salmonella Agar II produce pink colonies based on the following biochemical characteristics : positive for mannitol fermentation, negative for β -galactosidase production, and negative for β -glucuronidase production. While *E. albertii* produces a positive result for β -galactosidase production using an ApiZyme test kit (bioMérieux Japan Ltd.), it forms pink colonies on ES Salmonella Agar II following incubation at 36° C–37° C for 24 hr. Therefore, ES Salmonella Agar II may be helpful for isolation of *E. albertii*.

Key words : *Escherichia albertii*, ES Salmonella Agar II

緒 言

Escherichia albertii はグラム陰性、通性嫌気性桿菌で、2003年に新種として発表された菌種である [1]。近年では、*E. albertii* が原因菌と考えられる集団感染事例が報告されるようになった [2-8]。そして、2016年11月には、厚生労働省から *E. albertii* に係る報告を求める通知があり [9]、*E. albertii* の検査が多くの施設で必要とされている。しかし、*E. albertii* は特徴的な性状に乏しいため、同定が困難であり、見落とし、あるいは誤同定する可能性がある。広島県、静岡県および宇都宮市の事例では、DHL寒天培地やSSB寒天培地上

の乳糖および白糖非分解のコロニーから *E. albertii* を釣菌・同定し [5, 7, 8]、沖縄県の事例ではソルビトール・マッコンキー寒天培地上のソルビトール非分解のコロニーから *E. albertii* を釣菌・同定していた [6]。しかし、いずれの培地も本菌に対する選択性が高いとは言えない。そのような中、広島県の事例で分離した *E. albertii* が *Salmonella* 属菌選択分離培地であるESサルモネラ寒天培地Ⅱ (栄研化学株式会社) で特徴的な性状を示すことを見出したため、複数の菌株を用いて当該培地上の発育性を調べ、コロニーの色調に影響する酵素活性を調査した。

*¹ 広島県西部保健所 : Hiroshima Prefectural Western Center for Public Health

*² 静岡県環境衛生科学研究所 : Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

*³ 福岡県保健環境研究所 : Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

*⁴ 栄研化学株式会社 : Eiken Chemical Co., Ltd.

*⁵ 国立感染症研究所感染症危機管理研究センター : Center for infectious disease risk management, National Institute of Infectious Diseases

材料および方法

1 ESサルモネラ寒天培地Ⅱ上におけるコロニー特性確認試験

広島県および静岡県で発生した集団感染事例由来の *E. albertii* (以下, 広島株, 静岡株) を各1株, ヒトや鳩など野鳥由来の *E. albertii* を107株 (福岡県保健環境研究所・国立感染症研究所保存株 [10], 以下, 福岡・感染研株), および *Salmonella* 属菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* ATCC51741, *S. Infantis* 臨床分離株1株, *S. Enteritidis* 臨床分離株1株) のESサルモネラ寒天培地Ⅱ上のコロニーを比較するために, 菌株を培地に塗抹し, 36℃~37℃で24時間および48時間培養後に観察を行った.

2 *E. albertii* の酵素活性確認試験

ESサルモネラ寒天培地Ⅱには β -ガラクトシダーゼによって分解されるものと β -グルコシダーゼにより分解されるものの2種類の合成酵素基質が含まれている [11]. アピザイム (ビオメリュー・ジャパン株式会社, 東京都) を用いて *E. albertii* の酵素活性 (β -ガラクトシダーゼおよび β -グルコシダーゼ) を確認した. 方法は, 添付マニュアルのとおりに行い, 広島株1株, 静岡株1株および福岡・感染研株107株の計109株について確認した.

結 果

1 ESサルモネラ寒天培地Ⅱ上における *E. albertii* のコロニー特性

広島株および静岡株を使用してコロニー形成能を確認したところ, 24時間培養ではいずれもピンク色コロニーを形成し, 48時間培養ではコロニーの中心部が青色に変化した (Fig. 1). 一方, *Salmonella* 属菌は24時間および48時間培養後もピンク色のままであった (Fig. 1). また, 福岡・感染研株のコロニー形成能を確認したところ, 培養24時間時点では, 107株中104株がピンク色コロニーを形成し, 残りの3株は青みがかったピンク色あるいは紫色のコロニーを形成した (Table 1). さらに, 培養48時間時点では, 107株中86株が青色に変化し, 21株はピンク色のままであった (Table 1). よって, 供試した *E. albertii* の97.2% (106/109株) がESサルモネラ寒天培地Ⅱにて, 36℃~37℃, 24時間培養で *Salmonella* 属菌に類似したピンク色のコロニーを形成し, 48時間培養では80.7% (88/109) が青色のコロニーを形成したことになる.

2 *E. albertii* の酵素活性の確認

E. albertii の酵素活性の確認では, β -ガラクトシダーゼ活性は全て陽性, β -グルコシダーゼ活性は全て陰性であった (Table 1).

考 察

ESサルモネラ寒天培地Ⅱはマンニト分解性, β -ガラクトシダーゼおよび β -グルコシダーゼ非産生により *Salmonella* 属菌を選択的に分離する培地であり, マンニトを分解して生じた酸により中性紅を析出させてピンク色のコロニーを形成する [11]. β -ガラクトシダーゼ, β -グルコシダーゼいずれかの酵素を産生する場合は, 培地中の酵素基質を分解させ, 青から青紫色のコロニーを形成する [11]. 本調査において, *E. albertii* は β -ガラクトシダーゼ活性陽性にもかかわらず, ESサルモネラ寒天培地Ⅱで, 36℃~37℃, 24時間培養にてピンク色のコロニーを形成することが判明した. *E. albertii* をESサルモネラ寒天培地Ⅱに塗抹し, 36℃~37℃で48時間培養すると, コロニーが青色に変化することから, 24時間時点でピンク色コロニーを形成するのは, 本菌の β -ガラクトシダーゼ活性が比較的弱いことが原因と考えられた.

β -ガラクトシダーゼは *Escherichia coli* や *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* および *Serratia* 属菌などが産生する酵素であり, これらの菌種はESサルモネラ寒天培地Ⅱ上で24時間培養後に青から青紫色のコロニーを形成する [11]. β -グルコシダーゼは *Salmonella* や *Proteus* 属菌を除く腸内細菌科細菌が産生する酵素で青から青紫色のコロニーを形成する [11]. また, *Proteus* や *Pseudomonas* 属菌は培地に含まれるノボピオシンにより発育が抑制されるか, 発育しても無色のコロニーのため, *Salmonella* 属菌との鑑別が可能となる [11]. よって, 当該培地上で, ピンク色コロニーを形成する菌種は *Salmonella* 属菌と *E. albertii* にほぼ限られることから, ESサルモネラ寒天培地Ⅱは *E. albertii* の分離用寒天培地として使用できる可能性がある. 釣菌後の鑑別試験において, 非運動性 (37℃), 硫化水素陰性 (TSI培地), クエン酸陰性 (シモンズクエン酸塩培地), VP反応陰性, キシロースからの酸の産生陰性, β -グルクロニダーゼ活性陰性であり, リジン脱炭酸陽性またはインドール陽性の菌株であれば, *E. albertii* である可能性が高く [12], サルモネラ属菌との鑑別 [13] は容易であると考えられる.

Table 1 Appearance of 109 *Escherichia albertii* strains on ES Salmonella Agar II and results (positive/negative) of β -galactosidase and β -glucosidase testing for each strain.

No.	Strain name	Isolationplace (Prefecture)	Isolation year	Origin	Colony color on ES Salmonella Agar II		β -galactosidase	β -glucosidase
					24hr	48hr		
1	Hiroshima strain	Hiroshima	2015	Human feces	Pink	Blue	+	-
2	Shizuoka strain	Shizuoka	2016	Human feces	Pink	Blue	+	-
3	FIH09/A1-1	Fukuoka	2009	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
4	F08/101-31	Fukuoka	2008	Human feces	Pink	Blue	+	-
5	Myz 20100	Miyazaki	1994	Human feces	Pink	Blue	+	-
6	Myz 20416	Miyazaki	2000	Human feces	Pink	Blue	+	-
7	A56-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
8	V3-1al	Tokyo	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
9	N-1al	Saga	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
10	H-1-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
11	H-2-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
12	H-2-4al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
13	H-5-3al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
14	H-6-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
15	I-1-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
16	G-3-3al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
17	G6-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
18	G-10-1al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
19	A32-5al	Fukuoka	2010	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
20	P6-1 al	Fukuoka	2011	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
21	P6-2 al	Fukuoka	2011	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
22	P6-7 al	Fukuoka	2011	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
23	Q16-1 al	Fukuoka	2011	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
24	Q16-2 al	Fukuoka	2011	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
25	ZAC44-3	Hokkaido	2012	Pigeon feces	PinkBlue	Blue	+	-
26	ZAA1-1	Hokkaido	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
27	ZAD-1-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
28	ZAE-2-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
29	ZAE-3-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
30	ZAE-5-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
31	ZAE-6-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
32	ZAE-7-1	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
33	ZAE-7-3	Kanagawa	2012	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
34	Mku1	Mie	2012	Human feces	Pink	Blue	+	-
35	Mku5	Chiba	2012	Human feces	Pink	Blue	+	-
36	Mku45	Tokyo	2012	Human feces	Pink	Blue	+	-
37	U-30-1	Fukuoka	2012	Common kingfisher intestine	Pink	Blue	+	-
38	U-31-1	Fukuoka	2012	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
39	U-11-2-1	Fukuoka	2012	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
40	U-112-f13	Fukuoka	2012	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
41	U-119-b1	Fukuoka	2012	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
42	U-129b	Fukuoka	2012	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
43	EC15062-1	Akita	2011	Human feces	Pink	Blue	+	-
44	HIPHI2312	Hokkaido	2012	Eurasian magpie cloaca	Pink	Blue	+	-
45	HIPHI2322	Hokkaido	2012	Eurasian magpie feces	Pink	Blue	+	-
46	HIPHI2338	Hokkaido	2012	Slaty-backed gull feces	Pink	Blue	+	-
47	HIPHI2355	Hokkaido	2012	Slaty-backed gull cloaca	Pink	Blue	+	-
48	HIPHI2454	Hokkaido	2012	Slaty-backed gull feces	Pink	Blue	+	-
49	HIPHI2457	Hokkaido	2012	Jungle crow cloaca	Pink	Blue	+	-
50	HIPHI2493	Hokkaido	2012	Tree sparrow cloaca	Pink	Blue	+	-
51	HIPHI2534	Hokkaido	2012	Black-tailed gull cloaca	Pink	Blue	+	-
52	HIPHI2567	Hokkaido	2012	Japanese thrush cloaca	Pink	Blue	+	-
53	HIPHI2571	Hokkaido	2012	Brown hawk owl feces	Pink	Blue	+	-
54	HIPHI2583	Hokkaido	2012	Eurasian woodcock feces	Pink	Blue	+	-
55	ZAH-1-3	Tokyo	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
56	ZAH-4-2	Tokyo	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
57	ZAH-12-1	Tokyo	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
58	ZAH-14-1	Tokyo	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
59	ZAI4-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Purple	Blue	+	-
60	ZAI-5-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
61	ZAI-13-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
62	ZAI-13-2	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
63	ZAI-13-7	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
64	ZAI-21-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
65	ZAI-28-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
66	ZAI-29-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Purple	Blue	+	-
67	ZAI-52-1	Kyoto	2013	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
68	EC468	Fukuoka	2005	Human feces	Pink	Blue	+	-
69	EC479	Fukuoka	2005	Human feces	Pink	Blue	+	-
70	EC447	Fukuoka	2003	Human feces	Pink	Blue	+	-
71	13S38	Kumamoto	2013	Human feces	Pink	Blue	+	-
72	13S45	Kumamoto	2013	Human feces	Pink	Blue	+	-
73	U350-1	Fukuoka	2013	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
74	U350-3	Fukuoka	2013	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
75	U350-8	Fukuoka	2013	Pale thrush intestine	Pink	Blue	+	-
76	AZK-6-1	Aichi	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
77	AZK-6-2	Aichi	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
78	AZK-6-3	Aichi	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
79	AZK-6-4	Aichi	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
80	AZK-12-4	Aichi	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
81	AZN-8-1	Kyoto	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
82	ZAN-15-1	Kyoto	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
83	ZAO-3-1	Tokyo	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
84	U439-1	Fukuoka	2014	Chicken liver	Pink	Blue	+	-
85	ZAP-30-1	Shizuoka	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
86	ZAR-25-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
87	ZAS-1-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
88	ZAT-2-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
89	ZAT-11-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
90	ZAT-16-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
91	ZAT-19-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
92	ZAT-23-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
93	ZAT-29-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
94	ZAT-34-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
95	ZAT-40-1	Kanagawa	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
96	ZAW-2-1	Osaka	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
97	ZAX-3-1	Osaka	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
98	ZAY-15-1	Osaka	2014	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
99	U-567-1	Fukuoka	2014	Chicken liver	Pink	Blue	+	-
100	U-567-5	Fukuoka	2014	Chicken liver	Pink	Blue	+	-
101	ZZG 2-1	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
102	ZZG 11-1	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
103	ZZG 12-3	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
104	ZZG 14-2	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
105	ZZG 48-1	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
106	ZZG 63-2	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
107	ZZG 63-3	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
108	ZZG 76-1	Saga	2015	Pigeon feces	Pink	Blue	+	-
109	EC648	Fukuoka	2014	Human feces	Pink	Blue	+	-
					Pink	Blue	+	-
					106/109	88/109	109/109	109/109
					97.2%	80.7%	100%	100%

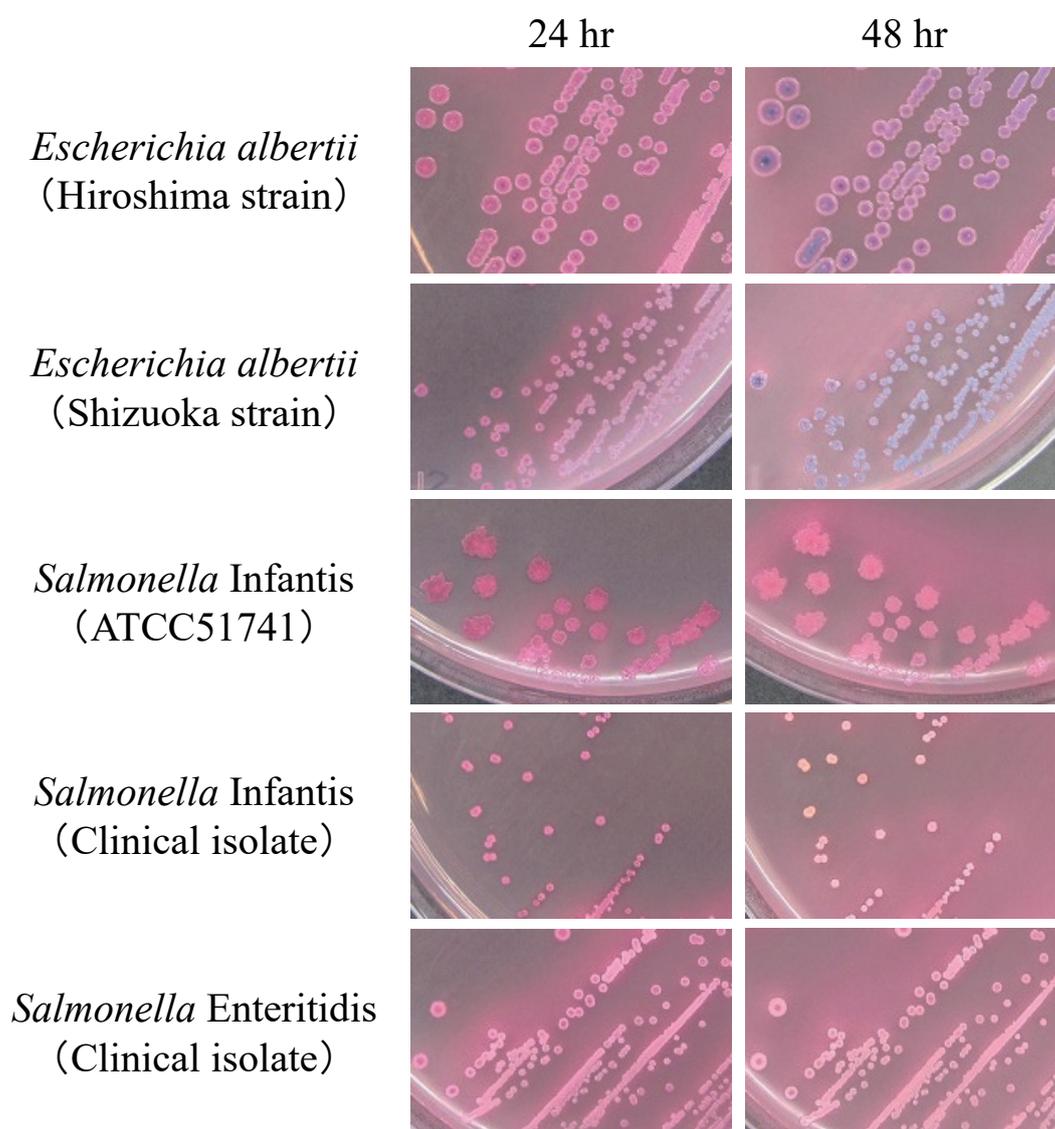


Fig. 1 Colonies formed by *Escherichia albertii* and *Salmonella* spp on ES Salmonella Agar II following aerobic incubation at 36°C -37°C for 24 hr and 48 hr.

謝 辞

本研究を実施するにあたり、菌株の使用を許可してくださった福岡市保健環境研究所本田先生、北海道立衛生研究所池田先生、熊本市環境総合センター杉谷先生、秋田県健康環境センター今野先生、宮崎県衛生環境研究所河野先生に深謝いたします。また、本研究はAMED 課題番号 JP19fk0108065 および一般財団法人東洋水産財団(令和元年)の支援を受けています。

文 献

- [1] Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. (2003) : *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrheagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. Int J Syst Evol Microbiol. 53 : 807-810.
- [2] Ooka T, Tokuoka E, Furukawa M, Nagamura T, Ogura Y, Arisawa K, Harada S, Hayashi T. (2013) : Human gastroenteritis outbreak associated with *Escherichia albertii*, Japan

- Emerg Infect Dis. 19 : 144-146.
- [3] Asoshima N, Matsuda M, Shigemura K, Honda M, Yoshida H, Hiwaki H, Ogata K, Oda T. (2014) : Identification of *Escherichia albertii* as a causative agent of a food-borne outbreak occurred in 2003. Jpn J Infect Dis. 67 : 139-140.
- [4] Murakami K, Etoh Y, Tanaka E, Ichihara S, Horikawa K, Kawano K, Ooka T, Kawamura Y, Ito K. (2014) : Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human. Jpn J Infect Dis. 67 : 204-208.
- [5] 深田真美, 福原亜美, 立脇邦雄, 住川博紀, 田組善雄, 井上佳織, 増田加奈子, 平塚貴大, 山田裕子, 高尾信一, 他. (2016) : 集団感染事例から検出された *Escherichia albertii* について—広島県. IASR. 33 : 100-101.
- [6] 高良武俊, 仲間絵理, 喜屋武向子, 柿田徹也, 久場由真仁, 加藤峰史, 久高潤, 天久朝信, 伊元信治, 仲宗根猛智, 他. (2016) : 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.
- [7] 長岡宏美, 鈴木秀紀, 村田学博, 森主博貴, 松橋平太, 山田俊博, 泊明季, 岩田佐知子, 杉山智登勢, 鈴木真二, 他. (2016) : 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.
- [8] 石岡真緒, 関哲, 中田友理, 谷澤輝, 若月章片, 岡俊輔, 床井由紀, 木原晴子, 長谷充啓, 金子淳子, 他. (2017) : 宇都宮市で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について. IASR. 38 : 175-176.
- [9] 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. 平成28年11月9日.
- [10] Murakami K, Maeda-Mitani E, Kimura H, Honda M, Ikeda T, Sugitani W, Konno T, Kawano K, Etoh Y, Sera N, et al. (2019) : Non-biogroup 1 or 2 strains of the emerging zoonotic pathogen *Escherichia albertii*, their proposed assignment to biogroup 3, and their commonly detected characteristics. Front Microbiol. 10 : 1543.
- [11] 寺本哲也. (2011) : 栄研マニュアル (第11版), 355-356, 栄研化学株式会社.
- [12] 村上光一, 平井晋一郎, 黒田誠, 長岡宏美, 藤本秀士. (2020) : *Escherichia albertii*. モダンメディア. 66 : 101-110.
- [13] Barrow G I, Feltham R K A. 坂崎利一監訳, (1993) : Cowan and Steel's 医学細菌同定の手びき 第3版, 158-160, 近代出版.

