

マイナーな血清群 (O113、O156 及び O55) の腸管出血性大腸菌が分離同定された事例

北橋 智子、鈴木 信一、篠田 亮子、東尾 裕江、大木 旬子

三枝 真奈美、横井 一、山本 一重

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 マイナーな血清群の腸管出血性大腸菌 (EHEC) を分離同定した事例を経験した。事例 1 では、クロモアガーSTEC の選択性の強さを利用することにより、牛肉から EHEC O113 を分離同定することができた。事例 2 では、検体の増菌培養液 0.1mL をクロモアガーSTEC にコンラージすることにより、EHEC O156 を分離同定することができた。事例 3 では、分離過程の EHEC が CT-SMAC に発育したこと及び生菌が EHEC O157 血清と交差反応を示したことにより、EHEC O55 を分離同定することができた。

なお、これらの事例では、コロニーのスクリーニングとして、LAMP 法による VT 遺伝子の検出を優先させたことから、マイナーな血清群の EHEC の分離同定に繋がったものと考えられた。

Key Words : クロモアガーSTEC, O113, O156, O55

1. はじめに

2017 年度は全国的に腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症の発生が多い年であった。本市では、厚生労働省通知¹⁾に準じて EHEC の分離同定を行っている。本法は、主要 6 血清群 (O26、O103、O111、O121、O145 及び O157) を対象とした検査法であり、これら以外の血清群に対する効率的な検査法は示されていない。

そこで、主要 6 血清群以外のマイナーな血清群の EHEC を効率的に分離同定する際の補助とするため、主要な EHEC に対するクロモアガーSTEC の鑑別性能に着目してマイナーな血清群 (O113、O156 及び O55) の EHEC を分離同定した 3 事例の概要を報告する。

2. 事例 1 【EHEC O113】

2.1 検体の情報

①受付日 : 2017 年 6 月 20 日

②検 体 : 食品 (牛肉)

③検査目的 : 収去食品検査

2.2 方法と結果

分離同定までの検査フローを図 1 に示した。検体 25g に mEC 培地 (関東化学) 225mL を添加し、ストマッキング後、42℃で 22 時間増菌培養した。この増菌液からベロ毒素 (VT) 遺伝子の検出を LAMP 法 (栄研化学) により行った。VT 遺伝子陽性の増菌液を、主要 6 血清群 (O26、O103、O111、O121、O145 及び O157) の免疫磁気ビーズにより濃縮後、それぞれを DHL (栄研化学)、クロモアガー O157TAM (O157TAM、CHROMagar 社)、CT-SMAC (OXOID) 及びクロモアガーSTEC (クロモ STEC、CHROMagar 社) の平板培地 4 種類に塗抹し、37℃で 20 時間培養した。その結果、各平板培地のコロニーは数個であり、主要 6 血清群に対する生菌の試し凝集試験は全ての平板培地で陰性であった。

これと並行して、増菌液の直接塗抹法を実施した結果、各平板培地のコロニーは、約 30~約 100 個であった。4 種類の平板培地のコロニー計 30 個 (主にクロモ STEC 上の藤色コロニー及び CT-SMAC 上の白色コロ

ニー) を 5 個ずつまとめて DNA をアルカリ抽出し、VT 遺伝子を LAMP 法により確認した。VT 遺伝子陽性の DNA 抽出液については、再度、個々のコロニーに戻って、VT 遺伝子の確認を行い、遺伝子陽性のコロニーに対して、VT 産生性試験、生化学性状の確認及び血清型別を実施し、最終的に EHEC O113:H- (VT2) と同定した。なお、VT 遺伝子陽性のコロニーはクロモ STEC のみに認められた。(表 1)

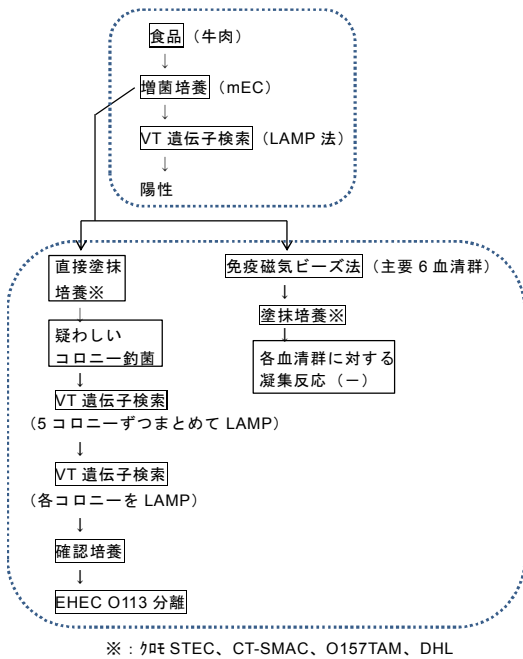


図 1 事例 1 の検査フロー

表 1 事例 1 平板培地上のコロニーに対する VT 遺伝子検索の結果

培地	発育したコロニー数	釣菌したコロニー数	VT 遺伝子陽性コロニー数
ｸﾛﾓ STEC	約 30	15	10
CT-SMAC	約 30	7	0
O157TAM	約 100	4	0
DHL	約 100	4	0

2.3 考察

クロモ STEC 上で EHEC O113 が発育し、EHEC に特徴的な藤色のコロニーを形成したこと及び LAMP 法による VT 遺伝子の検出をスクリーニングとして優先させたことから、分離同定が可能となった事例であった。

3. 事例 2 【EHEC O156】

3.1 検体の情報

①受付日 : 2017 年 7 月 21 日

②検体 : 便

③検査目的 : 接触者検便

(患者から EHEC O103 を分離同定)

3.2 方法と結果

分離同定までの検査フローを図 2 に示した。患者から分離された EHEC O103 の確認を優先して検査を開始した。便を事例 1 と同様の 4 種類の平板培地に直接塗抹し 37°C で 18 時間培養すると並行して、ノボピオシン加 mEC 培地 (N-mEC、極東製薬工業) を用いて 42°C で 20~22 時間増菌培養した。直接塗抹した培地上の疑わしいコロニーについて O103 血清に対する生菌の試し凝集試験を行ったが全て陰性であった。

一方、増菌培養については VT 遺伝子の検出を LAMP 法により行ったところ VT 遺伝子陽性であったため、免疫磁気ビーズ O103 により濃縮後、事例 1 と同様に 4 種類の平板培地に塗抹し、37°C で 18~20 時間培養した結果、クロモ STEC にコロニーの発育はなかった。他 3 種類の平板培地上のコロニーについて O103 血清に対する生菌の試し凝集試験を行ったが全て陰性であった。

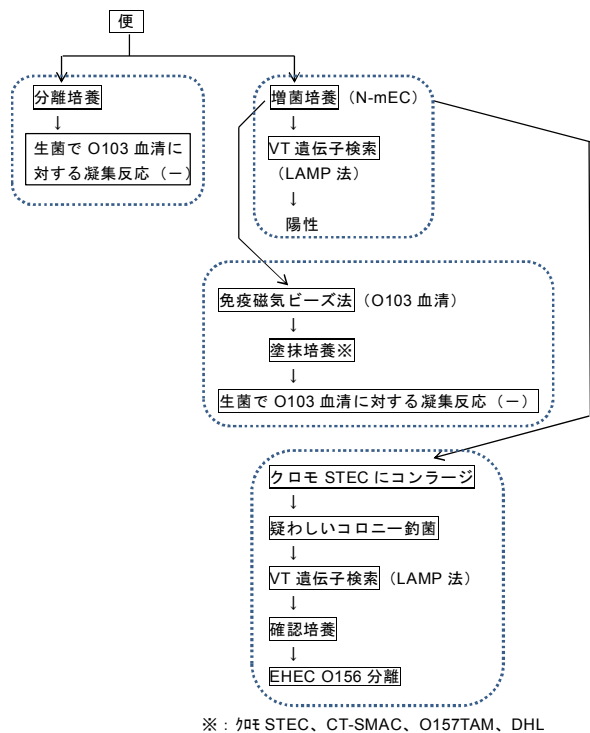


図 2 事例 2 の検査フロー

そこで、増菌液 0.1mL をクロモ STEC にコンラージし 37°C で 18~20 時間培養したところ、約 20 個の藤色コロニーが認められた (表 2)。コロニーを 5 個ずつまとめ、VT 遺伝子を LAMP 法により確認し、VT 遺伝子陽性の場合、再度、個々のコロニーに戻って、VT 遺

伝子の確認を行った（表 2）。遺伝子陽性のコロニーに対して、VT 産生性試験、生化学性状の確認及び血清型別を実施し、最終的に EHEC O156:H25 (VT1) と同定した。

表 2 事例 2 分離法の違いによるコロニー数

増菌液	加糖 STEC	CT-SMAC	O157TAM	DHL
O103 ビーズによる濃縮	0	2	約 10	約 10
直接コンラージ	約 20 (8/10)※	NT	NT	NT

※：(VT 遺伝子陽性コロニー数/釣菌したコロニー数)、 NT：実施せず

3.3 考察

増菌液 0.1mL をクロモ STEC にコンラージしたことによって、EHEC O156 が培地上に藤色のコロニーを形成したこと及びコロニーのスクリーニングとして生菌の試し凝集ではなく VT 遺伝子の検出を優先させたことにより、EHEC O156 を分離同定することができた事例であった。マイナーな血清群の EHEC がクロモ STEC に発育し、且つクロモ STEC が増菌液中に存在する夾雑細菌の発育を抑制する場合は、クロモ STEC に増菌液 0.1mL をコンラージすることにより、エーゼの 10 倍量塗抹できるため、目的の EHEC を分離できる可能性が高まるものと考えられた。

4. 事例 3 【EHEC O55】

4.1 検体の情報

①受付日：2017 年 8 月 14 日

②検体：便

③検査目的：接触者検便

(患者から EHEC O157 を分離同定)

4.2 方法と結果

患者から分離された EHEC O157 の確認を優先して検査を開始した。事例 2 と同様に便の増菌培養後、VT 遺伝子の検出を行った。VT 遺伝子陽性の増菌液を CT-SMAC と O157TAM に塗抹すると同時に、増菌液 0.1mL をクロモ STEC にコンラージし、37°C で 18～20 時間培養した。その結果、クロモ STEC では紺色の菌が一面に発育し、釣菌は不可能であった。O157TAM では EHEC O157 を疑う藤色のコロニーは認められなかった。

CT-SMAC では白色コロニーについて、O157 血清に対する生菌の試し凝集試験を行うとともに、VT 遺伝子を LAMP 法により確認した。その結果、両者が陽性であったため、VT 産生性試験、生化学性状の確認及び血清型別を実施し検査を進めたが、EHEC O157 ではなく、EHEC O55:HUT (VT1) と同定された。

以上の結果から、EHEC O157 と EHEC O55 の重複

感染を疑い、増菌液を免疫磁気ビーズ O157 で濃縮したが、EHEC O157 を分離同定することはできなかった。なお、分離同定された EHEC O55:HUT (VT1) を CT-SMAC により 37°C で 18～20 時間培養したが、コロニーの発育は殆ど認められず、さらに培養を継続した結果、少数の赤色コロニーの発育が認められた(表 3)。

表 3 事例 3 EHEC O55 の性状変化

	CT-SMAC		O157 血清に対する凝集	
	発育状況	コロニーの色	生菌	死菌
分離過程	発育	無色	+	NT
分離後	ほとんど発育せず	赤	+	-

NT：実施せず

4.3 考察

EHEC O55 の分離同定で、クロモ STEC は利用できなかったが、免疫磁気ビーズを使用しなかったこと、分離過程の EHEC O55 が CT-SMAC に発育したこと及び EHEC O55 の生菌が O157 血清に凝集したことから、分離同定できた事例である。EHEC O157 は EHEC O55 から派生したと言われており、両者の O 抗原遺伝子は相同性が高いことが報告されている²⁾。このことから、O 抗原の抗原性も類似していると考えられ、O157 血清に対する凝集反応において交差反応を示したと考えられた。なお、分離過程の EHEC O55 は CT-SMAC に白色コロニーとして発育したものの、分離後の EHEC O55 は CT-SMAC に殆ど発育せず、時間の経過とともに極小の赤色コロニーとして僅かに発育したことから、分離培養の過程で EHEC O55 の性状が変化したことが示唆された。その理由の 1 つとして、亜テルル酸塩の耐性に関与するとされている *terA* がプラスミドにも存在し^{3,4)}、分離過程でプラスミドが脱落したことにより、CT-SMAC 感受性に性状が変化した可能性が考えられた。

5. まとめ

マイナーな血清群の EHEC については、増菌液の VT 遺伝子が陽性であるにもかかわらず、菌株として分離同定できないことがある。EHEC の分離同定の成否は、検査法の選択、時間、労力及び経費に左右される。接触者検便では、患者から分離された EHEC と同じ血清群に焦点を絞って検査を進めることが一般的である。患者と接触者から分離された EHEC が同じ血清群であれば、免疫磁気ビーズによる濃縮及び生菌の試し凝集試験によるスクリーニングは、極めて効率的な方法である。しかし、事例 2 や 3 のように患者から分離された EHEC と接触者から分離された EHEC の血清群が

異なるケースには利用できないため、前述の通知¹⁾に準じた主要な血清群の分離ができない場合は、多数のコロニーについて VT 遺伝子を迅速にスクリーニングできる LAMP 法が有効であると考えられる。

クロモ STEC は主要血清群のみならずマイナーな血清群の EHEC の分離にも有効であることが報告されている^{5,6)}。今回の事例においてもマイナーな血清群の EHEC に対するクロモ STEC の有用性が示され、クロモ STEC に増菌液 0.1mL をコンラージすることによって、更にマイナーな血清群の EHEC の分離率が向上するものと思われた。しかし、事例 3 EHEC O55 のようにクロモ STEC によって発育が抑制されるマイナーな血清群の EHEC の存在にも留意すべきである。

文 献

- 1) 厚生労働省，腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について．平成 26 年 11 月 20 日，食安監発 1120 第 1 号
- 2) Iguchi Atsushi, Iyoda Sunao, Kikuchi Taisei *et al.* : A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. DNA Research. 22(1), 101-107, 2015
- 3) Whelan, K. F., Collieran, E. Taylor, D. E. : Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the *IncHI2* plasmid R478. J. Bacteriol., 177, 5016-5027, 1995.
- 4) 秋吉充子，中村寛海，伊豫田淳 他：さまざまな O 血清群に属する志賀毒素産生性大腸菌の市販選択培地上での生育特性．日本食品微生物学会雑誌，32(4)，192-198，2015
- 5) 角屋勇氣，梅沢政功，山崎恒 他：3 種類の腸管出血性大腸菌分離用発色基質培地の基礎的検討とクロモアガー STEC の有用性．日本臨床微生物学雑誌，22(3)，231-238，2012
- 6) 青木日出美，茂谷美和，山崎貢 他：酵素基質培地 CHROMagar STEC における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の発育性および亜テルル酸カリウム感受性の検討．日本臨床微生物学雑誌，25(2)，117-124，2015