ベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) O157 の増菌培養に 関する基礎的検討

岡崎 則男¹・鈴木理恵子¹・佐多 辰¹
大沢 朗¹・渡辺 祐子¹・山井 志朗¹
和田 昭仁²・渡辺 治雄²

¹ 神奈川県衛生研究所細菌病理部 〒241 横浜市旭区中尾1-1-1

² 国立予防衛生研究所細菌部 〒162 東京都新宿区戸山1-23-1

〔受付: 1996年12月2日, 受理: 1997年1月17日〕

ベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) O157 の増菌培養法につき, VTEC O157 分離株を供試して検討した。トリプティックケースソイブロス (TSB) において, 供試した 5 株の VTEC O157 は培養温度 (36°C, 42°C) に係わらず旺盛な増殖を示したが, TSB にセフィキシム (CFIX), 亜テルル酸カリウム (PT) およびバンコマイシンを添加した TSB-CTV においては 36°C の培養で 1 株, 42°C では 4 株の増殖が阻止された。mEC にノボビオシン (NB) を添加した mEC-NB の 36°C における培養では, 1 株の増殖が 8 時間まで抑制されたものの, 24時間後の増殖は 5 株共に良好であった。しかし, 42°C で培養すると, 5 株中 3 株の増殖が阻止された。VTEC O157 分離株90株の CFIX, PT および NB に対する感受性値 (MIC; $\mu\text{g/ml}$) は全てこれらの薬剤の培地添加濃度以上に分布した。このように, mEC-NB および TSB-CTV における VTEC O157 の増殖には培養温度が強く影響し, 42°C では著しい増殖阻害が認められた。従って, これらの培地は 36°C で使用するのがより適切であり, 特に, mEC-NB を 42°C で使用する現行の培養法には問題があると考えられた。また, これらの選択増菌培地に加えて, TSB 等の非選択増菌培地を併用するのが好ましいと考えられた。

ベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) O157 は強い感染力と病原性を有する危険な細菌である。本菌は出血性大腸炎に限らず, 溶血性尿毒症症候群あ

るいは血栓性血小板減少性紫斑病等の腸管外疾病を続発し (3), 患者を死に至らしめることもある。本邦においては最近この VTEC O157 が猛威を振るい, 死亡例も含め多数の患者が発生している (5)。

本菌感染症は汚染された食品や飲料水の摂取あるいは患者からの二次感染により引き起こされる。汚染源追究のための試料として, 当然のことながら様々な食品が検査されるが, 原因食品を特定するのが容易でないことは最近の本症事例が示している通りである。この理由の一つに食品の VTEC O157 汚染菌量が極めて少ないことが挙げ

Norio OKAZAKI¹, Rieko SUZUKI¹, Shin SATA¹, Ro OHSAWA¹, Yuko WATANABE¹, Shiro YAMAI¹, Akihito WADA² and Haruo WATANABE²

Studies on Enrichment Broth for Verotoxin-Producing *Escherichia coli* (VTEC) O157

¹ Department of Bacteriology and Pathology, Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories, Nakao, Asahi-ku, Yokohama, Kanagawa 241

² Department of Bacteriology, National Institute of Health, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162

られており、本菌を選択的にしかも効率良く増菌する培養法の確立が必要と考えられる。

現在、VTEC O157 の増菌培地として、ノボビオシン (NB) を添加した mEC 培地 (mEC-NB) (10)、およびセフィキシム (CFIX)、バンコマイシン (VCM) および亜テルル酸カリウム (PT) を添加したトリプティケースソイブロス (TSB-CTV) (7) が使用されている。しかし、適切な培地および培養条件に関しては確定的な見解が得られているとは言えない。本報では VTEC O157 分離株を供試し、増菌培地の種類と培養温度について検討した。併せて、選択増菌培地に添加されている CFIX, NB および PT に対する本菌分離株の感受性を調べ、これらの薬剤の添加濃度について検討した。

材 料 と 方 法

菌株；増菌培地および培養温度の検討には表 1 に示すように、VTEC O157 5 株、*Escherichia coli* O18 1 株、*Aeromonas* sp. 1 株 および *Pseudomonas* sp. 1 株の計 8 株を供試した。表 1 に示す VT 産生性は PCR (4) により VT 遺伝子を確認したものである。薬剤感受性試験には、当所で分離された 84 株および大阪市立環境科学研究所より分与された 6 株の計 90 株の VTEC O157 を供試した。

培地；TSB (BBL)、TSB に CFIX 50 $\mu\text{g/L}$ 、VCM 40 mg/L および PT 2.5 mg/L を添加した TSB-CTV および mEC 培地 (極東) に NB 20 mg/L を添加した mEC-NB を用いた。

増菌培養と菌数の定量；各増菌培地 (10 ml) は菌株、培養温度および培養時間ごとに 3 本ずつ用意し、これらに TSB にて前培養 (36°C, 18 時間) した各菌株の培養液を $10^2 \sim 10^3/\text{ml}$ となるように接種した。その後、36°C あるいは 42°C で培養し、4, 6, 8 および 24 時間後に Miles と Misra (11) の方法により生菌数 (colony forming unit; CFU) の定量を行った。各培養時間における CFU/ml は 3 本の培地の CFU/ml を平均して算出した。

薬剤感受性試験；TSB-CTV あるいは mEC-NB に添加されている CFIX, PT および NB に対する最小発育阻止濃度 (MIC; $\mu\text{g/ml}$) を寒天平板希釈法 (9) により調べた。尚、NB に関しては、mEC-NB が通常 42°C の培養温度で使われるので、36°C と 42°C の両温度で感受性試験を実施した。

結 果

VTEC O157 を含む各菌株の増殖に及ぼす増菌培地の種類と培養温度；VTEC O157 (No. 32)、*E. coli* O18 (No. 115)、*Aeromonas* sp. および *Pseudomonas* sp. の 4 菌株を使用し、これらの増殖に及ぼす培地の種類および培養温度について調べた。結果を図 1 に示す。TSB にて 36°C で培養すると、各菌株共に旺盛な増殖を示し、培養 6 時間後には当初と比べて $10^3 \sim 10^5$ 倍の菌数に達した。培養温度を 42°C にすると、VTEC O157 と *Pseudomonas* sp. が比較的良く増殖したが、*E. coli* O18 は増殖せず、*Aeromonas* sp. の増殖は

表 1. 増菌培養法の検討に供試した 8 菌株の性状と由来

菌株 No.	菌種	血清型	VT ¹⁾	由 来
No. 5	<i>Escherichia coli</i>	O157 : H7	+	患者便
No. 10	<i>E. coli</i>	O157 : H7	+	牛レバー
No. 32	<i>E. coli</i>	O157 : H7	+	牛大腸内容物
No. 114	<i>E. coli</i>	O157 : H7	+	和菓子
No. 115	<i>E. coli</i>	O18 : H?	—	スルメイカ
EDL931	<i>E. coli</i>	O157 : H7	+	患者便 ²⁾
<i>Aeromonas</i> sp.				牛レバー
<i>Pseudomonas</i> sp.				弁当

¹⁾ VT 遺伝子を PCR で確認。

²⁾ 1982年にアメリカ合衆国で発生したハンバーグ食中毒事例における分離菌。

図1. VTEC O157 No. 32 株 (■), *E. coli* O18 No. 115 株 (▨), *Aeromonas* sp. (▤) および *Pseudomonas* sp. (▥) の TSB, TSB-CTV および mEC-NB における増殖。

8時間まで良好だったものの、24時間後には死滅した。この *Aeromonas* sp. が示した現象はブドウ糖添加培地で培養した時に本菌種の一部が発現する suicidal 現象 (8) と考えられるが、詳細は不明である。

TSB-CTV において 36°C で培養すると、VTEC O157 は選択的に増殖するが、その増殖はやや抑制される傾向があった。42°C での培養では供試した 4 菌株全てが増殖しなかった。

mEC-NB を使用し 36°C で培養すると、VTEC O157 および *E. coli* O18 の *E. coli* のみが選択的に増殖したが、VTEC O157 の増殖は培養 6～8 時間までやや抑制され、十分な増殖には 24 時間を要した。培養温度を 42°C にすると、8 時間までは 4 菌株共に増殖しなかったが、24時間

後に VTEC O157 のみの増殖がみられた。

VTEC O157 の各増菌培地および培養温度における増殖；図 2 に VTEC O157 5 株の各培地および培養温度における増殖を示す。TSB では培養温度 (36°C, 42°C) に係わらず全株共に旺盛に増殖した。一方、TSB-CTV においては全般的に増殖が抑制され、しかも、36°C で EDL931 が、42°C では No. 10 以外の 4 株が増殖しなかった。

mEC-NB の 36°C における培養では、No. 32 の増殖が 8 時間までやや抑制されたが、24 時間の培養により 5 株共に比較的良く増殖した。しかし、42°C では No. 32 の増殖が培養 8 時間まで強く抑制されただけでなく、No. 5, No. 114 および EDL931 の 3 株が増殖しなかった。

VTEC O157 分離株の CFIX, NB および

図2. VTEC O157 の TSB, TSB-CTV および mEC-NB における増殖。No. 5 株 (■), No. 10 株 (▨), No. 32 株 (▩), No. 114 株 (▧), EDL 931 株 (□)。

PT に対する感受性；各薬剤に対する VTEC O157 分離株90株の MIC 値分布頻度を図3に示す。NB に対する感受性試験は 36°C と 42°C の両培養温度で実施したが、差は殆どなかったので 36°C における成績を示した。各薬剤の VTEC O157 分離株に対する MIC は CFIX, 0.25~1.0 $\mu\text{g/ml}$ ；NB, 64~>128 $\mu\text{g/ml}$ ；PT, 32~64 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、全株に対してそれぞれの薬剤の培地添加濃度以上の値を示した。

考 察

現在、VTEC O157 の選択増菌培養法として TSB-CTV で 36°C あるいは mEC-NB で 42°C とする方法が汎用されている (2, 6, 12)。しか

し、今回の検討で、これらの培養法では一部の VTEC O157 の増殖が強く阻害されることが示された。殊に、mEC-NB における 42°C での培養で供試した 5 株の VTEC O157 の内、3 株の増殖が阻止されたことは、この培養法が汚染菌量の少ないと想定される食品への利用頻度が高いだけに注目されよう。

本邦においては、VTEC O157 の増菌培養における mEC-NB の培養温度を 42°C とする (2, 6) のが一般的である。しかし、Okrend ら (10) は 42°C における本菌の増殖抑制を認め、35°C とすべきことを報告しており、著者らが調べた限りでは、VTEC O157 を増菌する目的で mEC-NB を使用する時に 42°C での培養がより優れている

図3. VTEC O157 分離株 (n=90) の CFIX, NB および PT に対する MIC 値分布。

との根拠を示した報告は見当たらない。今回の成績をみても、mEC-NB を 36°C で使用した場合には、VTEC O157 以外の *E. coli* も増殖することおよび VTEC O157 の株により培養初期の増殖がやや抑制されること等に留意する必要があるが、培養24時間後の本菌の増殖は良好であった。これらのことおよび VTEC O157 感染の原因食品を特定するのが容易ではない本邦の現状を併せて考えると、少なくとも食品試料の検査に mEC-NB を利用する際には現行の 42°C という培養温度を改め、36°C にする必要があるように思われる。

TSB-CTV あるいは mEC-NB には VTEC O157 を選択的に増菌させる目的で種々の抗菌薬剤が添加されているが、これらは添加濃度により VTEC O157 の増殖をも阻害する。今回、CFIX, NB および PT の本菌分離株90株に対する MIC を調べたところ、培地添加濃度を下回る MIC 値に分布した株は存在しなかった。一方で、CFIX と PT を含む TSB-CTV における 36°C での培養で1株の VTEC O157 が増殖しなかったことは事実であり、この理由は不明であるが、上記2薬剤の相乗作用の影響である可能性も考えられる。また、VTEC O157 の PT に対する感受性に関し、Zadik ら (13) は家畜由来株の中にはヒト由来と比べてかなり低いMICを示す株があることを報告している。更に、著者らは VT 非産生性 *E. coli* O157 分離株の 27.5% (n=29) が PT に対して培地添加濃度より低い MIC を示すこと

を経験している (未発表成績)。従って、mEC-NB の NB 濃度については現行のままで特に問題はないとしても、TSB-CTV の CFIX および PT 濃度については今後検討の余地を残していると言えよう。但し、TSB-CTV を 36°C で使用する増菌培養法は、VTEC O157 を選択的に増殖させる点で今回検討した方法の中では最も優れており、著しい雑菌混入が想定される試料に対しては利用価値があるように思われる。

このように、VTEC O157 の確定的な選択増菌培養法を見出すには今後更に検討を重ねる必要があるが、今回の成績からは mEC-NB を 36°C で使用するのが最良であり、次に TSB-CTV で 36°C の培養法が良いと判断された。また、これらの方法を被検試料の種類により選択して使用するとより効果的な増菌培養ができよう。しかし、いずれの選択増菌培養法を採用するにしても、VTEC O157 に対して多少の増殖抑制がかかることは避けられないと考えられる。更に、試料の汚染菌量が少ない場合あるいは試料の保存状態により汚染菌がダメージを受けていること等も選択増菌培養法における本菌の増殖阻害要因として考慮する必要がある。従って、選択増菌培養法と TSB 等を使用した非選択増菌培養法の同時併用、もしくは両者を組み合わせた増菌培養法の実施を推奨したい。

尚、最近免疫磁気ビーズ法による VTEC O157 の迅速検出法が注目されており、神奈川県ではこの方法により全国に先がけて本菌感染の原因食品

を特定できた (1)。免疫磁気ビーズ法における試料の前培養 (約 6 時間) には TSB-CTV で 36°C の培養法に加えて TSB で 36°C の方法が併用されているが、これが理にかなったものであることを今回の成績は示していると考えられる。

文 献

- 1) 浅井良夫, 村瀬敏之, 大沢 朗, 沖津忠行, 鈴木理恵子, 佐多 辰, 山井志朗, 和田昭仁, 田村和満, 渡辺治雄 (1997): 免疫磁気分離 (IMS) 法による腸管出血性大腸菌 O157 の検出. 感染症学雑誌 **71**, 46-55.
- 2) 伊藤 武 (1993): ペロ毒素産生大腸菌と食品衛生. モダンメディア **39**, 3-18.
- 3) Karmali, M.A., Steel, B.T., Petric, M., Lim, C. (1983): Sporadic case of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **1**, 619-620.
- 4) 小林一寛 (1991): 腸管出血性大腸菌の PCR 法による検出. 臨床と微生物 **18**, 69-75.
- 5) 厚生省生活衛生局食品保健課 (1996): 病原性大腸菌 O157 による食中毒等の発生状況. 病原微生物検出情報 **17**, 182-190.
- 6) 厚生省生活衛生局食品保健課, 同乳肉衛生課 (1996): 病原大腸菌 O157 に係る食品等の汚染実態調査の実施について. 臨床と微生物, 臨時増刊号 **23**, 113-117.
- 7) Kadva, I.T., Hatfield, P.G., Havde, C.J. (1996): *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 431-433.
- 8) Namdari, H., Bottone, E.J. (1988): Correlation of the suicide phenomion in *Aeromonas* species with virulence and entero-pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2615-2619.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993): Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ED. Approved Standard, Vol. 13, No. 25.
- 10) Okrend, A.J.G., Rose, B.E., Bennet, B.: (1990): A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J. Food Prot.* **53**, 249-252.
- 11) 坂崎利一 (1981): 培地の試験法, 新細菌培地学講座・上 p. 200-208. 東京, 近代出版.
- 12) 渡辺治雄 (1996): 腸管出血性大腸菌 O157:H7 による食中毒とその予防. 食品衛生研究 **46**, 7-16.
- 13) Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A. (1993): Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* **39**, 155-158.

Studies on enrichment broth for verotoxin-producing

***Escherichia coli* (VTEC) O157**

Norio OKAZAKI¹, Rieko SUZUKI¹, Shin SATA¹
Ro OHSAWA¹, Yuko WATANABE¹, Shiro YAMAI¹
Akihito WADA² and Haruo WATANABE²

¹ Department of Bacteriology and Pathology, Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories,
Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241, Japan

² Department of Bacteriology, National Institute of Health, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

Growth of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in conventionally recommended pre-enrichment broth media at different temperatures was evaluated. In addition, sensitivity of VTEC O157 isolates to several antibacterial drugs, which were added to the selective enrichment broth, was tested. All five isolates of VTEC O157 tested grew well in trypticase soy broth (TSB) at 36°C and 42°C, while the growth of one isolate was markedly suppressed in TSB supplemented with cefixime (CFIX), potassium tellurite (PT), and vancomycin (TSB-CTV) even at 36°C. A significant growth suppression was also observed in three of the isolates cultured in novobiocin (NB)-supplemented modified EC broth (mEC-NB) at 42°C. In mEC-NB after 24-hr incubation at 36°C, the five VTEC O157 isolates grew well, although one isolate was slightly suppressed during the first 8 hours. Minimum growth inhibitory concentrations of CFIX, NB and PT for a total of 90 clinical and environmental isolates of VTEC O157 were all above the concentrations usually prescribed for mEC-NB and TSB-CTV. These findings suggest that mEC-NB and TSB-CTV should be used at 36°C for growth of VTEC O157 and that use of a nonselective pre-enrichment broth medium (i.e. TSB) together with a selective one (i.e. TSB-CTV or mEC-NB) is necessary for successful isolation of VTEC O157 from various specimens.