＝技 術＝

腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 および O157 の食品からの検出における 選択増菌培地および酵素基質培地の検討

工藤由起子^{*1, †}・磯部順子^{*2}・古川一郎^{*3}・
権平文夫^{*4}・寺嶋 淳^{*1}・齊藤志保子^{*5}

(^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所, ^{*2} 富山県衛生研究所, ^{*3} 神奈川県衛生研究所,
^{*4} デンカ生研株式会社, ^{*5} 秋田県健康環境センター)

(受付: 2014年11月 6日)

(受理: 2014年12月22日)

Selective Enrichment Broth and Chromogenic Agar for Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145 and O157

Yukiko HARA-KUDO^{*1, †}, Junko ISOBE^{*2}, Ichiro FURUKAWA^{*3},
Fumio GONDAIRA^{*4}, Jun TERAJIMA^{*1} and Shioko SAITO^{*5}

(^{*1} National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501; [†] Corresponding author)

(^{*2} Toyama Institute of Public Health)

(^{*3} Kanagawa Institute of Public Health)

(^{*4} Denka Seiken, Co., Ltd.)

(^{*5} Akita Prefectural Research Center for Public Health and Environment)

Enrichment in modified EC broth (mEC) at 42°C for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O111 and O157 as an official method in Japan enhanced the growths of serogroups of O103, O121 and O145. In addition, various chromogenic agars were tested for the growth and morphology of various serogroups of EHEC. Multi or simple serogroups were distinguished in monocolor or various color depended in each serogroup. Furthermore, developed immunomagnetic beads targeting serogroups O103, O121 and O145 showed efficient performance to concentrate targeted bacteria in enrichment culture of food. In this study, it was suggested that enrichment in mEC, immunomagnetic separation method and culture on chromogenic agar were effective to isolate the 6 serogroups of EHEC.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, enrichment, immunomagnetic separation, chromogenic agar, colony morphology

[†] 連絡先 ykudo@nihs.go.jp

^{*1} ☎158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

^{*2} ☎939-0363 富山県射水市中太閤山17-1

^{*3} ☎253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1

^{*4} ☎959-1695 新潟県五泉市木越鏡田1359-1

^{*5} ☎010-0874 秋田市千秋久保田町6-6

緒 言

腸管出血性大腸菌(EHEC)はヒトへの病原性が強く、重症者や死者が発生する食中毒事例が社会的に問題になっており^{9, 10)}、食品での検査は流通食品での汚染状況の調査や食中毒発生時の原因食品の調査において重要である。しかしながら、食品におけるEHECの検査法は、血清群O26, O111およびO157については通知されているものの¹²⁾、血清群O103, O121, O145の検査法については感染事例が例年継続的に報告されているにもかかわらず¹¹⁾、いまだ定められていない。一方、諸外国では血清群O157に加え、感染の多い血清群4～6種類を対象にした食品または牛肉での検査が実施されている^{3, 18)}。このため、日本でも独自にEHECの主要な血清群を決定し、食品での検査法を確立することが求められている。本研究では日本で通知されている血清群O26, O111およびO157の食品での試験法¹²⁾を参照し、それら3血清群に次いで日本での主要な血清群であるO103, O121およびO145について、既定の試験法と同じ増菌培養法での増殖性の確認および新規に開発された免疫磁気ビーズによる濃縮効果を検討した。さらに、EHECの鑑別分離に優れるとされている酵素基質培地について、血清群O103, O121およびO145を中心として、その鑑別・分離能を検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

25種類のO血清群とO untypable (UT)に属する計87株のEHEC (表1)をmEC培地(日本製薬)中での増殖性の試験に供試した。また、免疫磁気ビーズ法については大腸菌血清群O26, O103, O111, O121, O145およびO157の各血清群につき1株(各菌株番号ESC95, ESC291, ESC470, ESC545, ESC555およびEC79)を供試した。さらに、mEC培地中での増殖性の試験に供試した87株および別の60株のEHECを加えた計147株(29種類のO血清群とOUT)(表1)を各種酵素基質培地でのコロニー形態および生育性の確認に供試した。

2. 増菌培養法

供試菌株(87株)をトリプトソイ・プロス(TSB, ベクトン・ディッキンソン)10 ml/中で37℃にて18時間静置培養し、その培養した各菌液(約 10^9 cfu/ml)0.1 ml/を、PBS(ダルベッコPBS(-), 日本製薬)0.9 ml/で10倍階段希釈して 10^{-7} 希釈菌液(約 10^2 cfu/ml)を調製した。この 10^{-7} 希釈菌液0.1 ml/をmEC培地10 ml/に接種して42℃にて22時間静置培養後、菌の増殖による混濁を目視にて次の3段階に判定した; ++: 非選択培地であるTSB中での増殖と同程度の強い混濁, +: やや弱い混濁, -: 混濁が認められない。また、接種菌液の菌濃度測定のために、 10^{-7} 希釈菌液0.1 ml/を各2枚のトリプトソイ寒天培地(TSA, ベクトン・ディッキンソン)

ン)培地に塗抹し37℃にて18～24時間培養し、生育したコロニー数から接種菌液の菌数を算出した。

3. 免疫磁気ビーズ法

新規に開発された大腸菌血清群O103, O121, O145に対する免疫磁気ビーズ(デンカ生研)の回収率を既に市販されている血清群O26, O111, O157の免疫磁気ビーズ(デンカ生研)とともに検討した。各血清群1株をTSB中で37℃にて18時間培養し、この菌液を牛挽肉のmEC増菌培養液(42℃, 22時間)にて 10^{-3} 希釈した。また、PBSにて 10^{-3} 希釈した菌液も作製した。これらを免疫磁気ビーズ法に供試した。濃縮法は製品説明書を参照した。食品培養液での 10^{-3} 希釈菌液1 ml/のビーズ濃縮液0.1 ml/に関しては 10^{-4} まで10倍階段希釈をした。PBSでの 10^{-3} 希釈菌液1 ml/から作製したビーズ濃縮液0.1 ml/を 10^{-3} ～ 10^{-5} まで希釈し、それぞれをTSA寒天培地1枚に0.1 ml/を接種し、コンラージ棒で塗抹した。食品培養液のビーズ濃縮液に関しては、ビーズ濃縮液の 10^{-3} および 10^{-4} 希釈液をそれぞれCT-クロモアガーSTEC寒天培地1枚に0.1 ml/を接種し塗抹した。それら寒天培地を37℃で18～24時間培養し、TSA上のコロ

表1. 供試した腸管出血性大腸菌株

O血清群	mEC中での増殖試験	酵素基質培地上での生育・発色性試験*
O1	1**	1
O5	1	1
O8	1	1
O26	0	9
O28ae	1	1
O45	0	2
O48	1	1
O55	1	1
O63	3	4
O74	1	1
O91	4	8
O98	1	1
O103	16	26
O111	0	10
O112ac	1	1
O119	1	1
O121	21	23
O124	1	1
O128	4	4
O145	16	26
O146	2	2
O148	1	1
O156	1	1
O157	0	10
O159	1	1
O165	2	4
O168	1	1
O170	1	1
O174	1	1
OUT	2	2
合計	87	147

* mEC中での増殖試験に使用した全菌株は酵素基質培地での生育・発色性試験に供試された。

** 供試菌株数。

表2. 各酵素基質培地の製造・販売者の示す腸管出血性大腸菌および他大腸菌の典型的色調

培地	特徴			
	O26	O111	O157	その他大腸菌
多血清群鑑別性・強選択性を有する培地				
CIX 寒天培地	Dv	Dv	Bg	Dv
CT-クロモアガー STEC 培地	Ma	Ma	Ma	Ma
Vi EHEC 寒天培地	Gr	Dr	Cl	不明
XM-EHEC 寒天培地	Bv	Rv	Rv	NG
1 または 2 種類の血清群の鑑別性・弱選択性を有する培地				
BCM O157 寒天培地	Gr	Gr	Db	Gr
クロモアガー O26/O157 培地	Gr	Rv	Re	Rv
クロモアガー O157 培地	Bl	Bl	Ma	Bl
Vi RX O26 寒天培地	Db	Gr	Gr	Gr
レインボーアガー O157 培地	Rv	Vi	Gy	Re

CT: セフィキシム 0.05 mg/L, 亜テルル酸カリウム 2.5 mg/L

NG: 非生育

Bg: 青緑; Bl: 青; Bv: 青紫; Cl: 無色透明; Db: 紺; Dr: えんじ; Dv: 濃紫; Gr: 緑; Gy: 灰; Ma: 藤; Re: 赤; Rv: 赤紫; Vi: 紫.

ニー数を計測した。また、CT-クロモアガー STEC 寒天培地については生育したコロニーを観察し、6 血清群が示すとされている典型的な藤色のコロニーを各平板から 2, 3 個鈎菌し、ラテックス凝集試薬または免疫血清（デンカ生研またはデンマーク国立血清研究所）を用いて O 血清型群試験を行った。凝集反応が陽性だったコロニーと同様の形状のコロニー数を計測し、各平板上のコロニー数を算出し、免疫磁気ビーズ法に供試した菌液中の初期菌数に対する回収率を算出した。これを 2 回繰り返して、回収率の平均値を得た。

4. 分離培養法

供試菌株（147 株）を TSB 10 ml/中で 37℃にて 18 時間培養し、その培養液を以下の 9 種類の酵素基質培地（表 2）に画線した。

そのうちの 4 種類は、選択剤の添加による強選択性の性質を保有する培地であり、3 種類（CIX 寒天培地、Vi EHEC 寒天培地、XM-EHEC 寒天培地）は多血清群を各血清群の特徴的色調で鑑別するものであり、CT-クロモアガー STEC は単色で一括鑑別するものであった。

- ・ CIX 寒天培地（生培地，極東製薬）
- ・ セフィキシム・亜テルル酸カリウム (CT) 加クロモアガー STEC 培地（自家調製，基礎培地：クロモアガー社）
- ・ Vi EHEC 寒天培地（生培地，栄研化学）
- ・ XM-EHEC 寒天培地（生培地，日水製薬）

また、5 種類は、選択性は比較的弱い培地であり、1 または 2 血清群を各血清群の特徴的色調で鑑別するものであった。

- ・ BCM O157 寒天培地（自家調製，栄研化学）
- ・ クロモアガー O26/O157 培地（自家調製，クロモアガー社）
- ・ クロモアガー O157 培地（自家調製，クロモアガー社）
- ・ Vi RXO26 寒天培地（自家調整，栄研化学）
- ・ レインボーアガー O157 培地（自家調製，バイオロ

グ社）

なお、CT 加クロモアガー STEC 培地との比較のために、CT を添加しないクロモアガー STEC 培地も調製し使用した。

各培地を 37℃にて 24 時間培養し、生育したコロニーの発色、大きさなどを観察した。

結 果

1. 増菌培養

mEC 培地 (10 ml) への接種菌数は、供試した全 87 株の平均で 10.8 (最小 5, 最大 28) cfu であった。特に、血清群 O103 では平均で 11.3 (最小 6, 最大 23) cfu, 血清群 O121 では平均で 10.8 (最小 5, 最大 18) cfu, 血清群 O145 の平均で 10.8 (最小 5, 最大 28) cfu であった。

mEC 培地での増殖は、血清群 O103 および O145 では各 16 株のすべてが強く増殖した（表 3）。しかし、O121 では 21 株中 2 株が強い増殖を示したが 19 株がやや弱い増殖であった。他血清群では O28, O48 および OUT でやや弱い増殖を示したものの、多くの株が強い増殖を示した。

2. 免疫磁気ビーズ法

免疫磁気ビーズ法に供試した菌液中の EHEC 菌数は、約 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml であった。免疫磁気ビーズ法による回収率は、新規に開発された血清群 O103, O121 および O145 では、PBS において約 38～47%，牛挽肉培養液において約 34～54% の回収率であった（表 4）。また、6 血清群全体では PBS では約 37～100%，牛挽肉培養液では約 21～60% であった。PBS と牛挽肉培養液での各血清群の回収率は総じて同等に近い結果であった。

3. 分離培養

各酵素基質培地での各血清群のコロニーの生育性および発色性について観察した（表 5）。

多血清群を鑑別対象にした強選択性の 4 種類の培地では、6 血清群以外の大腸菌の多くは生育が抑制された。

CIX 寒天培地では、鑑別分離の対象血清群である O26,

表3. mEC中における42℃, 22時間培養での腸管出血性大腸菌の増殖

O血清型	菌株数	増殖性		
		++	+	—
O1	1	1	0	0
O5	1	1	0	0
O8	1	1	0	0
O28ac	1	0	1	0
O48	1	0	1	0
O55	1	1	0	0
O63	3	3	0	0
O74	1	1	0	0
O91	4	4	0	0
O98	1	1	0	0
O103	16	16	0	0
O112ac	1	1	0	0
O119	1	1	0	0
O121	21	2	19	0
O124	1	1	0	0
O128	4	4	0	0
O145	16	16	0	0
O146	2	2	0	0
O148	1	1	0	0
O156	1	1	0	0
O159	1	1	0	0
O165	2	2	0	0
O168	1	1	0	0
O170	1	1	0	0
O174	1	1	0	0
OUT	2	1	1	0
合計	87	65	22	0

++: トリプトソイ・ブロス(TSB)と同程度の強い増殖

+: TSBより弱い増殖

—: 非増殖

表4. リン酸緩衝生理食塩水および牛挽肉培養液中における腸管出血性大腸菌の免疫磁気ビーズによる回収率

O血清群	リン酸緩衝生理食塩水		牛挽肉培養液	
	供試液の菌濃度*	回収率(%)	供試液の菌濃度*	回収率(%)
O26	6.04	52.3	5.95	34.3
O103	6.08	37.3	5.65	43.0
O111	6.00	53.6	5.45	59.9
O121	6.08	47.3	5.11	34.4
O145	6.04	38.4	5.70	53.6
O157	5.87	100.5	5.68	21.0

* 対数cfu/ml

O111およびO157は菌株にかかわらずO26およびO111は濃紫色、O157は青緑色であった。また、O103およびO145は多くが濃紫色、O121は多くが桃色であったが、6血清群以外の大腸菌で生育したものにも濃紫色、青緑色、桃色を示したものがあった。

CT-クロモアガー STEC培地では、一部が非生育であったが、6血清群の株はほとんどが藤色に生育した。

Vi EHEC寒天培地では、鑑別分離の対象血清群であるO26、O111およびO157は菌株にかかわらずO26は緑

色、O111はえんじ色、O157は無色透明（中心部褐色）、であった。O103、O121、O145では紫色や緑色のコロニーが多かったが、同一血清群の中でも色調は多様であった。

XM-EHEC寒天培地では、鑑別分離の対象血清群であるO26、O111およびO157は菌株にかかわらずO26は青紫色、O157は赤紫色、O111は赤紫色を呈した。しかし、O103、O121、O145では青紫色、青色、赤紫色など同一血清群の中でも色調は多様であり、単一株でも多様な色調のコロニーが生育する場合もあり複雑であった。

1または2血清群を鑑別対象にした弱選択性の5種類の培地では、供試したすべての株が生育した。発色性については、BCMO157寒天培地、クロモアガー O157培地およびVi RXO26寒天培地はそれぞれ2、3種類の色に分かれたが、クロモアガー O26/O157培地およびレインボーアガー O157培地では多様な色を呈した。

BCMO157寒天培地では、鑑別分離の対象血清群であるO157が菌株にかかわらず紺色であった。O26、O111、O103、O145およびほとんどの大腸菌は緑色を呈した。しかし、半数以上のO91株はO157と同様に紺色を示した。また、O121は半数以上が白色であった。

クロモアガー O26/O157培地では、鑑別分離の対象血清群であるO26およびO157は菌株にかかわらずO157は赤色（一部、桃色混在）、O26は緑色であった。多くのO103、O111、O121およびO145は赤紫色であったが、株によっては桃色、赤色、緑色、濃桃色などもあり多様であった。また、他血清群の大腸菌も多くが赤紫色であった。

クロモアガー O157培地では、鑑別分離の対象血清群であるO157が菌株にかかわらず藤色であった。O26、O111、O103、O121、O145および他血清群の多くの大腸菌は青色（一部、灰藤色および白色）であったが、O98、O103およびO128はO157と同様の藤色を示した。

Vi RXO26寒天培地では、鑑別分離の対象血清群であるO26は菌株にかかわらず紺色であった。O121の半数以上が白色であったが、大腸菌のほとんどは緑色を呈した。一部、O26と同様の紺色を示す菌株も認められた。

レインボーアガー O157培地では、鑑別分離の対象血清群であるO157は主に灰色であったが、株によって濃淡を有した。O26は菌株にかかわらず赤紫色であった。O103、O111、O121、O145は赤紫色、灰色、藤色、灰紫色など多様な色を示し、同一血清群の中でも色調は多様であった。

なお、クロモアガー STECでは、供試した大腸菌の全株が藤色であった。

考 察

食品からEHECを検出するうえで、増菌培養は食品中の競合する細菌叢の増殖を抑制し、EHECが強く増殖することが求められる重要な段階である。これまでの血

表5. 酵素基質培地における腸管出血性大腸菌主要6血清群およびその他血清群の腸管出血性大腸菌の生育性と発色性

培地	腸管出血性大腸菌の血清群												その他血清群の 腸管出血性大腸菌			
	O26	O103	O111			O121			O145			O157				
多血清群鑑別性・強選択性を有する培地																
CIX 寒天培地	Dv 9/9*	Dv 22/26	Bg 3/26	NG 1/26	Dv 10/10		Pi 16/23	Dv 3/23	Dv&Pi 4/23	Dv 22/26	Bg 3/26	NG 1/26	Bg 10/10	NG 25/43 Pi 1/43	Dv 14/43 Bg 1/43	Vi 1/43 Dg 1/43
CT-クロモアガー STEC 培地	Ma	Ma	NG		Ma		Ma			Ma	NG		Ma	NG	Ma	
Vi EHEC 寒天培地	9/9 Gr 9/9	24/26 Vi 14/26	2/26 Gr 5/26	NG 2/26 Gr&Vi	10/10 Dr 10/10		23/23 Gr 10/23	Bl 9/23	Vi 1/23	25/26 Vi 18/26	1/26 Gr 4/26	Bl&Bv 1/26	10/10 Cl 10/10	33/43 NG 33/43	10/43 Vi 6/43	Dr 2/43
XM-EHEC 寒天培地	Bv 9/9	3/26 Bv	1/26 Rv	1/26 NG	Rv 9/10	Bv 1/10	2/23 Bl	1/23 Bv		1/26 Bv	1/26 Bl	1/26 Bl&Bv	Rv 10/10	2/43 NG	Bv	Bl
		17/26 Bl	4/26 Bv&Bl	2/26 Rv&Bl			10/23 Bl&Bv	2/23 Rv&Bl	15/26 Bv&Rv	2/26 NG	6/26	33/43 Rv		4/43 Bl&Rv	3/43 Bl&Bv &Rv	
1 または2種類の血清群の鑑別性・弱選択性を有する培地																
BCM O157 寒天培地	Gr 9/9	Gr 26/26			Gr 10/10		Wh 15/23	Gr 2/23	Gr&Wh 6/23	Gr 26/26			Db 10/10	Gr 32/43	Db 9/43	Wh 2/43
クロモアガー O26/ O157 培地	Gr	Rv	Pi	Re	Rv	Gr	Rv	Vi&Gr		Rv	Gr		Re	Rv	Re	Gr
クロモアガー O157 培地	9/9	23/26	2/26	1/26	7/10 Dp 1/10	1/10 Bl&Rv 1/10	22/23	1/23		25/26	1/26		9/10 Re&Pi 1/10	30/43 Db 2/43	6/43 Vi&Rv 1/43	4/43
		Bl	Bl	Wh	Bl&Gm	Bl	Gm&Bl	Bl		Bl			Ma	Bl	Ma	
Vi RX O26 寒天培地	9/9	22/26 Ma 1/26	2/26	1/26	2/10	8/10	23/23			26/26			10/10	39/43	4/43	
		Db 9/9	Gr 23/26	Bg 2/26	Db 1/26	Gr 9/10	Db 1/10	Wh 15/23	Gr 7/23	Wh&Gr 1/23	Gr 24/26	Bg 1/26	Db 1/26	Gr 9/10 Db 1/10	Gr 35/43	Db 6/43
レインボーアガー O157 培地	Rv	Rv	Gv	Rv&Ma	Gy	Gv	Ma	Gv	Rv&Ma	Rv	Gv	Bl	Gy	Rv	Ma	Gy
クロモアガー STEC 培地	9/9	14/26 Gy 3/26	7/26 Ma 1/26	1/26	7/10 Rv 1/10	2/10	18/23 Gv&Ma 1/23	2/23	2/23	13/26 Ma 1/26	8/26 Gy 1/26	2/26 Gv&Gy 1/26	10/10	31/43 Wh 2/43	6/43 Rv&Ma 1/43	3/43
		Ma	Ma		Ma		Ma	Ma&Cl		Ma			Ma	Ma		
	9/9	26/26			10/10		21/23	2/23		26/26			10/10	43/43		

* 色調を示す株数/試験株数

CT: セフィキシム 0.05 mg/L, 亜テル酸カリウム 2.5 mg/L

NG: 非生育

Bg: 青緑; Bl: 青; Bv: 青紫; Cl: 無色透明; Db: 紺; Dg: 濃緑; Dp: 濃桃; Dr: えんじ; Dv: 濃紫; Gm: 灰藤; Gr: 緑; Gy: 灰; Gv: 灰紫; Ma: 藤; Pi: 桃; Re: 赤; Rv: 赤紫; Vi: 紫; Wh: 白.

清群 O26, O111 および O157 を対象とした検査の通知¹²⁾では、選択増菌培地での各血清群の増殖性、食品中の競合する細菌叢に対する増殖抑制性などに鑑み mEC 培地での 42℃ 培養が設定されている。今回の血清群 O103, O121 および O145 での検討においても、同一の手法を用いることを優先し mEC 培地での 42℃ 培養について検討した。その結果、3 血清群のいずれにおいても増殖が抑制されないことが判明した。予備試験の結果を参照すると、増殖の肉眼での判定が++ (TSB での増殖と同等) では菌濃度は約 10^9 cfu/ml, + (TSB での増殖より弱い) では約 10^7 cfu/ml と考えられる。O121 では、他血清群に比べて増殖がやや弱い傾向が認められ 21 株中 19 株が+の判定であった。食品成分による選択剤の効果の減少など O121 の増殖強化を加味すると食品検査時には十分に増殖すると考えられたが、今後、食品を増菌培養

した際の増殖性について検討が必要であると思われる。また、mEC 培地での 42℃ 培養下にて 6 血清群の EHEC が増殖をすることが明らかになったものの、ほかの血清群もほとんどが増殖するため 6 血清群の EHEC だけを選択的に増殖させることは期待できないことが示された。

新たに開発された血清群 O103, O121 および O145 の免疫磁気ビーズ法での回収率は、牛挽肉培養液中 (生菌数: 約 10^8 cfu/ml, 詳細略) でも 30% 以上の回収率を示し、既に市販されている血清群 O26, O111 および O157 のビーズと比べても同等の回収率であった。食品から、O103, O121 および O145 を検出するうえで実用に耐えるものと期待される。しかし、Fratamico らの報告⁴⁾では、O111 免疫磁気ビーズ製品による牛挽肉培養液からの O111 分離において直接塗抹法よりも検出率が劣ることが報告されており、ビーズ製品の性能について製造者間

やロット間での違いがあることも考えられる。このため、ビーズ法での回収率が劣る場合があることを考えると、直接塗抹法は分離の補助的方法として有効と思われる。

分離培養では、食品の増菌培養液中のEHECを競合菌から選択的に平板培地上で生育させ視覚的に競合菌と識別できることが必要である。そのような性能を兼ね備えた酵素基質培地^{2, 13, 16, 17)}が国内外にて多数の菌種を対象にして開発され販売されており、食品からのEHEC分離に有用な酵素基質培地も、多数開発されている。開発当初は、米国で開発されたレインボーアガー O157培地¹⁵⁾、フランスで開発されたクロモアガー O157培地¹⁾、国内で開発されたBCMO157寒天培地など血清群O157分離を目的にした培地であった。現在、米国USDA法ではノボピオシン・セフィキシム・亜テルル酸加レインボーアガー O157培地¹⁹⁾が7血清群(O26, O45, O103, O111, O121, O145およびO157)の分離に用いられている。これは、選択剤としてノボピオシン(5.0 mg/L)、セフィキシム3水和物(0.05 mg/L)および亜テルル酸カリウム(0.15 mg/L)を添加して競合菌の生育を抑制し、7血清群の分離性を向上させたものである。しかし、レインボーアガー O157培地上のコロニーの発色性は多様であり、灰色、薄紫色、藤色、紫色など同一の血清群でもさまざまな色調が掲載されており、Fratamicoらの報告⁴⁾においても、牛挽肉での添加回収実験において各血清群が複数の色調を示すこと、血清群間の色調の違いが不明瞭であることが示されている。ヨーロッパでは、血清群O104による大規模食中毒事例での試験にクロモアガー STEC培地⁶⁾が使用された。日本では、特にO26, O111およびO157を対象として開発が進んでおり、国内の複数社からの市販品として普及している。クロモアガー O26/O157培地¹⁴⁾は海外製品であるが、日本においても販売が進んでいる。本研究では、培地ごとに発色性が異なる酵素基質培地を日本で重要な6血清群(O157, O26, O111, O103, O121, O145)の分離に応用することを検討した。また、その他多数の血清群についても比較のために併せて試験した。

EHECの多血清群を鑑別対象にした強選択性の培地であるCT-クロモアガー STEC培地、CIX寒天培地⁸⁾、Vi EHEC寒天培地、XM-EHE寒天培地⁷⁾では、いずれも6血清群以外のEHECの生育は抑制される傾向にあった(表3)。CT-クロモアガー STEC培地では、藤色一色であったため個別の血清群の判別はできないが、指標が単色という単純性が実用上有利であるとも考えられた。CIX寒天培地では、O157は青緑色、O26, O103, O111, O145は濃紫色、O121は多くが桃色であり、主要な血清群を色調である程度鑑別できることが示された。Vi EHEC寒天培地では、O111はえんじ色、O26は緑色、O157は無色透明であり、これら3血清群を色調に基づいてある程度鑑別できることが示された。しかし、

O103, O121およびO145では紫色、緑色など多様な色調を示し代表的な色を決めることが難しかった。XM-EHEC寒天培地では、O111は赤紫色、O26は青紫色、O157は赤紫色であり、これら3血清群を色調である程度鑑別できることが示された。しかし、O103, O121およびO145では青紫色、青色、赤紫色など多様な色調を呈し、同一株の中でも多様なコロニーの生育が認められた。このように目的に合わせて、単色を指標にして分離し血清群をその後に確認することやO26, O111, O157など標的とする血清群を決めて効率的に分離することが、これらの分離培地を用いることで可能になると考える。

EHECの1または2血清群を鑑別対象にした弱選択性の培地では、BCMO157寒天培地、クロモアガー O157培地、Vi RXO26寒天培地が血清群O26またはO157に特徴的な色を呈し、クロモアガー O26/O157培地はO26およびO157がおのおの特徴的な色を示した。クロモアガー STEC培地にCTを添加することによって6血清群以外のEHECを抑制していることから、同様のことがこれらの弱選択性の培地にも期待される。しかし、レインボーアガー O157培地では、6血清群のいずれの血清群においても同一血清群内での色のバリエーションが多く、血清群の指標となる色は明確ではなかった。

本研究で供試した*eae*を保有する主要6血清群は、CT添加の培地にほとんどが生育し、*eae*を保有しない株ではCT添加の培地で生育しない傾向が認められた。しかし、その他の血清群の*eae*を保有する株(血清群O63, O165など)ではCT添加の培地に生育しないものも少なからず認められた。Fukushimaら⁵⁾は、*eae*を保有する腸管出血性大腸菌は亜テルル酸の耐性が高い傾向があり、CT添加ソルビトールマッコンキー培地での生育性は*eae*を保有しない腸管出血性大腸菌に比べ保有する腸管出血性大腸菌が有意に高いことを示している。しかし、血清群O103およびO165では、*eae*を保有していてもCT-SMACに生育しない株が多い結果も示しており、CT添加培地にて*eae*保有株が分離しやすい傾向があるものの、必ずしもすべての*eae*保有株の分離に優れるわけではないと考えられた。特に、血清群O165は重症化率も高く主要な6血清群に次いで患者から分離される重要な血清群であるため、分離には新たな選択分離培地の開発が必要と考えられる。

以上の結果から、酵素基質培地での発色性を利用した6血清群の分離方法として、CTなどの選択剤を加えて選択性を強めた培地が有用であることが示された。また、血清群を鑑別せずに単色または2, 3の指標となる色によって分離した後に血清群を確認する方法、ある程度は血清群の鑑別性を有する培地を使用して分離する方法が考えられた。これらの二つの方向性を意識して目的に応じた分離培地を選択することが必要である。

本研究では、EHECO26, O103, O111, O121, O145およびO157について食品からの検出に適切な増菌培養法、

免疫磁気ビーズ法および選択分離培地を検討した。その結果、mEC培地での42℃培養による増菌培養によってそれら血清群が共通して増殖すること、選択剤を添加した酵素基質培地にて血清群全体または個々の血清群に特徴を有する発色性を持つ分離培地の使用が有用であること、新たに作製されたO103, O121およびO145の免疫磁気ビーズが標的血清群の濃縮と検出率向上に有用であることが示された。

要 約

EHEC血清群O103, O121およびO145はO26, O111およびO157と同一の増菌培養法（mEC培地での42℃培養）によって十分に増殖することが確認された。また、多種類の酵素基質培地について、多数の菌株を供試してコロニーの形成および発色を検討した結果、複数または単独の対象血清群を単色または複数色で鑑別・分離されることが示された。さらに、新規に開発された血清群O103, O121およびO145に対する免疫磁気ビーズによって食品培養液中の菌を十分に濃縮する性能を示した。以上のことから、上記6血清群の食品からの分離にはmEC培地での増菌培養、免疫磁気ビーズ濃縮法、酵素基質培地での分離培養を効果的に組み合わせることで確立できることが示された。

謝 辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業によって実施された。

文 献

- 1) Bettelheim, K. A.: Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. J. Appl. Microbiol., **85**, 425-428 (1998).
- 2) Craven, R. R., Weber, C. J., Jennemann, R. A. and Dunne, Jr. W. M.: Evaluation of a chromogenic agar for detection of group B streptococcus in pregnant women. J. Clin. Microbiol., **48**, 3370-3371 (2010).
- 3) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA J., **11**, 3138 (2013).
- 4) Frataamico, P. M., Bagi, L. K., Cray Jr., W. C., Narang, N., Yan, X., Medina, M. and Liu, Y.: Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef. Foodborne Pathog. Dis., **8**, 601-607 (2011).
- 5) Fukushima, H., Hoshina, K. and Gomyoda, M.: Selective isolation of *eae*-positive strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., **38**, 1684-1687 (2000).
- 6) Gouali, M., Ruckly, C., Carle, I., Lejay-Collin, M. and

- Weill, F.X.: Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in stool specimens. J. Clin. Microbiol., **51**, 894-900 (2013).
- 7) 金田光稔, 田崎 恵, 長崎広美, 神山清志: XM-EHEC 選択培地の有用性. 埼臨技会誌, **57**, 73-77 (2010).
 - 8) 北川真喜, 市石 卓, 葛原繁明, 江成 博: 主要な血清型の大腸菌を検出する酵素基質培地の開発. 日本臨床微生物学雑誌, **22**, 214-220 (2012).
 - 9) 小林直樹, 工藤由起子, 寺嶋 淳: 腸管出血性大腸菌感染症. 臨床と微生物, **41**, 27-31 (2014).
 - 10) 国立感染症研究所感染症情報センター: 腸管出血性大腸菌O111による焼肉チェーン店での集団食中毒事件—富山県. 病原微生物検出情報, **33**, 119-120 (2012).
 - 11) 国立感染症研究所感染症情報センター: 〈特集〉腸管出血性大腸菌感染症 2013年4月現在. 病原微生物検出情報, **34**, 123-125 (2013).
 - 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 腸管出血性大腸菌O26, O111及びO157の検査法について. 平成24年12月17日, 食安監発1217第1号(2012).
 - 13) Le, Bars, H., Kayal, S., Bonnaure-Mallet, M. and Minet, J.: CASA chromogenic medium for enteric *Campylobacter* species. J. Clin. Microbiol., **49**, 3675-3677 (2011).
 - 14) Nihonyanagi, S., Nakazaki, N., Hirata, Y., Munekata, S., Ohtani, S., Takemoto, T., Kanoh, Y. and Akahoshi, T.: The role of the genetic test of verotoxin for bacterial carrier investigation of cooking staff: detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Kitasato Med. J., **40**, 129-134 (2010).
 - 15) Ogden, I. D., Hepburn, N. F. and MacRa, M.: The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. J. Appl. Microbiol., **91**, 373-379 (2001).
 - 16) Renaud, N., Lecci, L., Courcol, R. J., Simonet, M. and Gaillot, O.: CHROMagar Yersinia, a new chromogenic agar for screening of potentially pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates in stools. J. Clin. Microbiol., **51**, 1184-1187 (2013).
 - 17) Saito, R., Koyano, S., Nagai, R., Okamura, N., Moriya, K. and Koike, K.: Evaluation of a chromogenic agar medium for the detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Lett. Appl. Microbiol., **51**, 704-706 (2010).
 - 18) United States Department of Agriculture. Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products. Laboratory Guidebook Notice of Change. Chapter new, revised, or archived: MLG 5B.02. Effective Date: 6/4/12.
 - 19) United States Department of Agriculture. Morphologies of representative strains from six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) grown on modified Rainbow Agar. Chapter new, revised, or archived: MLG 5B.Appendix 2.01 Effective Date: 6/4/12.