食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出法に関する検討

秦 昌紫子・檀 上 博 子・檀 原 真 弓

吉 村 由 美・井 上 正 直

(岡山市中央保健所検査課)

(受付 平成 10 年 1 月 9 日)

(受理 平成 10 年 7 月 23 日)

Studies on the Method of Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157 from Food

Yoshiko HADA, Hiroko DANJOU, Mayumi NARAHARA, Yumi YOSHIMURA
and Masanao INOUE

(Central Health Center, Okayama City, 1-1-17 Furugyou-cho, Okayama-shi 703-8278)

Key words: EHEC O157, Enrichment methods, Isolation medium, STEC

緒 言

腸管出血性大腸菌 O157 (*Escherichia coli* O157) による集団下痢症は、1982 年米国オレゴン州およびミシガン州での集団発生¹²⁾の報告以来、アメリカ、カナダ、イギリスなどにおいて多くの事例が報告されている⁸⁾。我が国でも 1990 年埼玉県での集団発生の報告⁷⁾以来、毎年全国各地で発生している。

このように毎年多くの発生があり³⁾、その生態が徐々に明らかになっているにもかかわらず、本菌集団事例で感染源が解明されたものは少なく⁴⁾、我が国でも埼玉県の飲料水として利用していた井戸水および岐阜県の学校給食におけるドレッシングサラダ（おなかサラダ）など数例しかない^{2, 10)}。このように本菌感染症の原因食品から菌を分離するのが容易でないことは多くの事例が示している。1997 年 6 月岡山市 R 病院で発生した病院給食を原因とする集団感染症の保存食（101 検体）検査において *E. coli* O157 を除く食中毒菌はすべて検出されず、また厚生省生活衛生局が各都道府県に於てた衛食第 195 号、衛乳第 174 号（平成 8 年 7 月 18 日）「病原性大腸菌 O157 に係る食品等の汚染実態調査の実施について」に記載されている免疫磁気ビーズ法で実施したがすべての検体が陰性であった。培養温度を 37℃に変更し、分離培地として血液寒天培地を追加して再検査を行った結果、保存食 101 検体中 1 検体より SIB 培地（極東）およびソルビットマッコンキー培地（SMC, 日水）からは検出されず、血液寒天培地から 1 株のみ検出された。

E. coli O157 感染は 100 個程度の少数で感染が成立することが報告⁵⁾されているおり、少数の *E. coli* O157 で汚染された食品により感染が成立したにもかかわらず、原因食品からの菌の分離ができず、原因究明の支障となっている。今回、我々は本菌検査の段階で種々の検討を加え、*E. coli* O157 を検出するに至ったのでその概要を報告する。

材料および方法

1. 材料

(1) 供試菌株

培養温度を検討のため、1996 年岡山県での集団発生例の患者から分離された *E. coli* O157:H7 (VT1, VT2 産生) 1 株と、増殖中における共存雑菌を想定してヒト由来の非病原性大腸菌 1 株を使用した。

(2) 検査材料

増菌法の検討のため、1997 年 6 月岡山市 R 病院で発生した食中毒の際に *E. coli* O157 が検出された原因食品 1 検体（冷やし日本そば）を用いた。

2. 実験方法

(1) 確認方法

① O 抗原決定のための凝集反応

市販の病原大腸菌 O157 免疫抗血清（デンカ生研）を使用し、スライド凝集反応を行った。

② PCR

小林らの方法⁹⁾に準拠して VT1 および VT2 産生遺伝子の検出を行った。

③ ラテックス法

図1 培養温度別の経時的 *E. coli* O157 検出菌数

市販の大腸菌ベロトキシン検出用キット（デンカ生研）を用いて VT1 および VT2 産生性試験を行った。

④ 分離培地

分離率を向上させるために発育阻止力の低い血液寒天を用いた。

(2) 免疫磁気ビーズ法

1 次増菌培養液 1 ml をマイクロチューブに移して、DYNABEADS anti *E. coli* O157 (Dynal) を 20 μ l 添加し、室温で 30 分間穏やかに混和し、反応させた。ついで磁石板でチューブ壁に細菌 (O157) 磁気ビーズ複合体を 3 分間静置して集めた。試料液を吸引除去したのち磁石板を抜き取り、洗浄緩衝液 (PBS-Tween) を 1 ml 加え、ビーズを洗浄し、再度上述と同様に磁石板で吸着、洗浄液を吸引除去した。この操作を 2 回繰り返した後、洗浄緩衝液 100 μ l に再懸濁させ、ビーズ集菌液とした。

(3) 培養温度の検討方法

ブレインハートインフュージョン培地 (BHI, Difco) 10 ml に BHI 培地で別々に前培養 (36°C, 18 時間) した *E. coli* O157 の菌株培養液と非病原性大腸菌株培養液を各々 10^2 CFU/ml となるよう BHI 培地に接種した。その後 20°C, 25°C, 37°C, 42°C, 45°C で培養し、5 時間おきに 20 時間まで培養液を採取した。

増殖度をできるだけ正確に得るために発育阻止力の弱い血液寒天培地を用い、本培地 2 枚に適宜希釈した培養液を各々 0.1 ml ずつコンラージ棒で塗抹した。30～300 集落が発生した希釈段階の全集落について *E. coli* O157 血清凝集試験を行い、培地 1 ml 中の *E. coli* O157 検出菌数を算定した。

(4) 増菌法の検討方法

検討した増菌法の概略を図 2 に示した。

① 1 次増菌培養

この度の *E. coli* O157 食中毒事例の原因食品検体 10 g をノボオシン加 mEC 培地²⁾ (mEC+n, 極東) および

トリプトソイブイオン培地 (TSB, 日水) 90 ml で 2 分間ホモジナイズ後、37°C で培養し、6 時間後から 3 時間おきに 18 時間まで培養液を採取して、PCR で増殖を確認するとともに、免疫磁気ビーズ法を実施した。

② 2 次増菌培養

1 次増菌培養液のビーズ集菌液 20 μ l を各々 mEC+n および TSB 2 ml に接種し、37°C で培養した。6 時間後と 12 時間後に PCR で増殖を確認した。

③ 3 次増菌培養

2 次増菌培養液 40 μ l を BGLB 培地 (日水) 4 ml に接種し、37°C で 12 時間培養し、分離培養を行った。

④ 分離培養

2 次および 3 次増菌培養液を 3 枚平板法で血液寒天培地に塗抹し、37°C, 24 時間培養後、特徴的なコロニー各 100 個について凝集反応を行った。凝集菌株は、性状の確認と、Vero 毒素産生性を PCR およびラテックス法により確認した。

(5) *E. coli* O157 の PCR による試料培養液中の最低初発菌数の推定方法

検体から分離された *E. coli* O157 の菌株を mEC+n 培地および TSB 培地に 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} CFU/ml となるように接種した。37°C で培養し、6 時間後と 12 時間後に PCR を実施し、培地に接種した菌が増菌により PCR で検出できる時間を調べた。

また、この結果と表 1 に示す検体の 2 次増菌培養法の PCR 結果を比較することにより菌数の推定を行った。

結 果

(1) 培養温度の検討

20°C を除き培養開始後 5 時間で増殖が認められ、増殖速度は 37°C と 42°C はほぼ同じで菌接種直後約 10^2 CFU/ml が約 10^6 CFU/ml に増殖していた。その後 10 時間で 42°C が約 10^7 CFU/ml であるのに対して 37°C

図2 腸管出血性大腸菌 O157 検査の改良法

では約 10^9 CFU/ml と増殖率は優れているが 15 時間を経過し、20 時間後では 25℃, 37℃, 42℃ とほぼ同じオーダーに達した。20℃では20時間後でも約 10^6 CFU/ml と発育が悪かった(図1)。

(2) 増菌法の検討

① 1 次増菌培養

1 次増菌培養後、増殖度の確認のため PCR を実施したが、すべて陰性であった。

② 2 次増菌培養

2 次増菌 6 時間後、増殖度の確認のため PCR を実施した結果、表 1 に示すように、1 次増菌を 6 時間 mEC+n 培地で行い、TSB 培地で 2 次増菌した組み合わせで、すでに陽性を示し、以降の培養もすべて陽性を示した。

1 次 mEC+n 培地 6~18 時間増菌、2 次増菌 mEC+n 培地の組み合わせでは 6 時間後は陰性であったが、12 時間後は陽性を示した。1 次増菌に TSB 培地を用いた

表1 *E. coli* O157 検査法 (改良法) における 1 次および 2 次増菌後の PCR による検出結果

	培地	時間	2 次 増 菌			
			TSB		mEC+n	
			6	12	6	12
1 次 増 菌	mEC+n	6	+	+	-	+
		9	+	+	-	+
		12	+	+	-	+
		15	+	+	-	+
		18	+	+	-	+
	TSB	6	-	-	-	-
		9	-	-	-	-
		12	-	-	-	-
		15	-	-	-	-
		18	-	-	-	-

注 1 次増菌 mEC+n 培地—2 次増菌 BGLB 培地の PCR もすべて陰性

表2 *E. coli* O157 検査法 (改良法) における増菌培地別 検出菌株数

1 次増菌培地	2 次増菌培地	3 次増菌培地	検出菌株数*
mEC+n	TSB	—	5
		BGLB	19
	mEC+n	—	1
		BGLB	NT**
	BGLB	—	0

* スライド凝集反応を試みた菌株数は計 500 株

** 検査せず

ものおよび 1 次増菌 mEC+n 培地、2 次増菌 BGLB 培地を用いたものの PCR はすべて陰性であった。

③ 3 次増菌培養

3 次増菌培養後の *E. coli* O157 の検出結果 (表 2) は、3 次増菌に BGLB 培地を用いることにより *E. coli* O157 の検出率が著しく向上した。

1 次増菌培養と 2 次、3 次増菌培養の培養時間による検出菌株数の結果は表 3 に示すとおり、1 次増菌培養時間が 12 時間でその後 2 次、3 次増菌も各々 12 時間行ったものが最も検出率が高く、次いで、1 次増菌 15~18 時間後 3 次増菌を行ったものであった。

(3) *E. coli* O157 の PCR による試料培養液中の最低初発菌数の推定結果

37℃増菌 6 時間と 12 時間後の PCR の検査結果 (表 4) は、増菌培養 6 時間で PCR 陽性となるためには、*E. coli* O157 の最低初発菌数は TSB 培地で培養すれば 10^1 CFU/ml, mEC+n 培地では 10^2 CFU/ml 必要となる。同様に 12 時間増菌培養では TSB 培地で 10^{-1} CFU/ml, mEC+n 培地では 10^0 CFU/ml のレベルの *E. coli* O157 が存在すればよいことになる。

考 察

病原性大腸菌による下痢症の発症には少なくとも 10^6

表3 *E. coli* O157 検査法 (改良法) における各増菌培養と検出菌株数の関係

増 菌 時 間			O157 検出 菌株数*	計
1 次増菌 mEC+n	2 次増菌 TSB	3 次増菌 BGLB		
6	12	12	0	0
		—	0	
9	12	12	0	0
		—	0	
12	12	12	9	11
		—	2	
15	12	12	5	6
		—	1	
18	12	12	5	7
		—	2	

* スライド凝集反応を試みた菌株数は各実験群 100 株で計 1,000 株

CFU/g 以上の菌量でないとは発症しない¹⁰⁾と考えられてきた。しかし、*E. coli* O157 は赤痢や腸チフスなどの経口感染症と同様に、少ない菌数での発症が報告されている。原因食品の菌数について、Todd ら¹³⁾は 1987 年カナダの養老院事例でのハンバーガーパティ 10² CFU/g、同年カナダの家庭でのシチュー 10^{1~2} CFU/g、およびカツレツ 10^{2~3} CFU/g と少量の *E. coli* O157 が検出されたと報告している。このような少数汚染菌量では、通常の検査法による原因食品からの菌検出は困難であり、汚染源の解明ができないことを多くの発生例が示している。本事例でも、汚染菌量は 1 次増菌では PCR でも検出できないほどの微量の菌量であった。また、厚生省の示した方法では検出できなかったため、増菌培地および分離培地などについてさまざまな検討を加えた。

岡崎ら¹¹⁾は、42℃増菌で著しい増殖阻害を認めたと報告しているが、我々の *E. coli* O157 と非病原性大腸菌混合培養実験例では *E. coli* O157 は培養開始 10 時間後には 37℃で優位に増殖するが、15~20 時間培養では 42℃とほぼ同じ程度の増殖を認めた。しかし、実際の原因食品検体を用いた検査では 42℃培養は *E. coli* O157 は検出されず、表 3 に示すように増菌時間 37℃、12 時間で最も高率に *E. coli* O157 が検出されており、また、37℃が本菌の至適発育温度であるという浅井ら¹⁾の報告もある。

一方、1 次増菌に TSB 培地を用いたものはすべて陰性であった。このことは TSB 培地のような栄養豊富な増菌培地ではすべての菌が旺盛に増殖するため、background にある雑菌が過大な増殖をきたし *E. coli* O157 の増殖を抑制することを示している。*E. coli* O157 の汚染菌数が少ない原因食品を増菌すると、少数菌の *E. coli* O157 は上述の理由により増殖が抑制されるものと考え

表4 初発菌数における各培養後の PCR による検出結果

培養 時間	培地	初発菌数 (CFU/ml)					
		10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹
6	TSB	+	+	+	+	—	—
	mEC+n	+	+	+	—	—	—
12	TSB	+	+	+	+	+	+
	mBC+n	+	+	+	+	+	—

られる。ビーズ集菌液を 2 次、3 次と繰り返し増菌培養を行い、分離可能な菌量にまで増菌した。1 次増菌培養法については、種々の検討がなされているが、2 次、3 次の増菌については、伊藤ら⁶⁾の報告のほかには余り詳細に検討された例はない。3 次増菌時に使用した BGLB 培地は従来、大腸菌群の選択と増菌に用いられており、本検査で BGLB 培地を利用したことにより *E. coli* O157 が選択増菌され分離率が向上したものとする (表 2, 3)。以上の結果より培養温度による *E. coli* O157 の増殖率と増菌時間との関係から、1 次、2 次、3 次増菌とも 37℃、12~18 時間培養が最も高い分離率が得られた (表 3)。

分離培地については *E. coli* O157 の汚染菌量が少数であれば、常用される腸内細菌分離培地では発育が阻害され、分離率が低下することは当然であり、血液寒天培地などの選択性の弱いものを併用することが必要である。培地上に適正な集落数を発生させると、その集落より直接ためしスライド凝集反応を行い *E. coli* O157 の分離には良好な結果を得ることができる。

E. coli O157 の PCR による試料培養液中の最低初発菌数の推定結果から、検体の mEC+n 培地で 1 次増菌後、2 次増菌培養前の培地中には、表 1 から 10¹ CFU/ml、10⁰ CFU/ml の *E. coli* O157 が存在したものと推定され、原因食品を汚染していた菌数を mEC+n 培地で 37℃、6 時間増菌した状態でも 10¹~10² CFU/ml と非常に乱暴に推定した。

文 献

- 1) 浅井良夫, 村瀬敏之, 大澤 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: 免疫磁気分離 (IMS) 法による腸管出血性大腸菌 O157 の検出。感染症誌, 71, 46-55 (1997)。
- 2) 伊藤 武: 腸管出血性大腸菌の食品および環境における抵抗性。獣医畜産新報, 50, 246-249 (1997)。
- 3) 伊藤 武: 我が国における細菌性食中毒の発生動向。食衛誌, 38, 158-166 (1997)。
- 4) 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況。医学のあゆみ, 178, 909-914 (1996)。
- 5) 伊藤 武, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌 O157 感染症と食品。食衛誌, 38, 275-285 (1997)。
- 6) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 貫名正文, 黒木 学, 仲西寿男: 食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出法。日食微誌, 13, 205-219 (1997)。

- 7) 城 宏輔：埼玉県某幼稚園で流行した *E. coli* O157:H7 による出血性腸炎. 臨床と微生物, **18**, 457-465 (1991).
- 8) 小林一寛：下痢原性大腸菌について—腸管出血性大腸菌とは—. 環境管理技術, **9**, 65-76 (1991).
- 9) 小林一寛：腸管出血性大腸菌の PCR 法による検出. 臨床と微生物, **18**, 507-513 (1991).
- 10) 仁科徳啓, 品川邦汎：志賀毒素産生性（腸管出血性）大腸菌 O157. 臨床獣医, **15**, 18-24 (1997).
- 11) 岡崎則男, 鈴木理恵子, 佐多 辰, 大沢 朗, 渡辺祐子, 山井志朗, 和田昭仁, 渡辺治雄：ペ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. 日本細菌誌, **52**, 505-511 (1997).
- 12) Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Targrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L.: Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New Engl. J. Med., **308**, 681-685 (1983).
- 13) Todd, E. C. D., Szabo, R. A., Peterkin, P., Sharpe, A. N., Parrington, L., Bundle, D., Gidney, M. A. J. and Perry, M. B.: Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 2536-2540 (1988).