腸管出血性大腸菌 O157 の一次鑑別のための 「クロモカルト・コリフォーム/セロビ オース分画鑑別平板」の評価

郡山洋一郎^{*1}・青木眞里子^{*1}・豊岡 弥生^{*1}・越野せつ子^{*1}
中田 善樹^{*2}・高橋正樹^{*3}・斉藤 香彦^{*3}
甲斐 明美^{*3}・五十嵐英夫^{*3}

(^{*1}足立区衛生試験所, ^{*2}足立区都市環境部, ^{*3}東京都立衛生研究所)

(受付: 平成 10 年 8 月 25 日)

(受理: 平成 10 年 11 月 17 日)

Evaluation of Chromocult-Coliform/Cellobiose Combination Agar Plate for Primary Differentiation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

Yoichiro KORIYAMA^{*1}, Mariko AOKI^{*1}, Yayoi TOYOOKA^{*1}, Setsuko KOSHINO^{*1},
Yoshiki NAKATA^{*2}, Masaki TAKAHASHI^{*3}, Kahiko SAITO^{*3},
Akemi KAI^{*3} and Hideo IGARASHI^{*3}

(^{*1}Adachi Public Health Laboratory, 1-5-3 Chuo-honcho, Adachi-ku, Tokyo 120-0011)

(^{*2}Urban Environmental Development Division, Adachi City,
1-17-1 Chuo-honcho, Adachi-ku, Tokyo 120-8510)

(^{*3}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073)

Key words: Chromocult-coliform/cellobiose combination agar, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Primary differentiation

緒 言

腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157 と略) の検索は、ふん便の場合は選択分離培地に直接分離培養し、食品の場合は選択増菌培養液を選択分離培地に分離培養し、発育した集落の中からソルビトール非分解集落を選び、それぞれを鑑別用培地に培養し、O157 の性状を示す菌について、血清凝集反応およびベロ毒素産生試験を行う方法が用いられる。しかし、O157 検査を目的とした鑑別用培地は、これまで 1% セロビオース加 LIG 寒天培地 (以下 CLIG 培地と略)^{1,2)}、SHI 培地⁶⁾ などが報告されているにすぎない。厚生省からの「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」³⁾ および「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」⁴⁾ の通知で

は CLIG 培地が採用されている。

今回著者らは、1 枚の 2 分画シャーレの一方に発色酵素基質を成分としたクロモカルトコリフォーム寒天培地を、残りの分画にセロビオース分解試験用培地を分注したクロモカルトコリフォーム/セロビオース分画鑑別平板 (以下 CC/C 平板と略) を作製し、O157 の一次鑑別用培地として用いることを考案した。この平板の使用により、O157 検査を迅速化および省力化することができたので報告する。

材料および方法

1. CC/C 平板の作製方法

加熱溶解した下記の 2 種の培地を 2 分画シャーレのそれぞれの分画に 10 ml ずつ分注して作製した。①クロモカルトコリフォーム寒天 (Merck)。②セロビオース分解試験用培地は、パープルブロスベース (Difco) 16 g、D-セロビオース (ナカライ) 10 g、寒天 (Difco) 15

^{*1} ☎120-0011 東京都足立区中央本町 1-5-3

^{*2} ☎120-8510 東京都足立区中央本町 1-17-1

^{*3} ☎169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

図1 CC/C 平板への画線方法

g, 精製水 1,000 ml を加え, 高圧滅菌して調製した。

2. 供試菌株

都立衛生研究所で O157 感染症患者から分離された 24 株を用いた。

3. CC/C 平板を使用した検査対象

足立区に搬入された給食従事者などの保菌者検索用のふん便を検査対象とした。平成 8 年 10 月から 12 月までの検体 5,026 検体を前期とし, 平成 9 年 8 月から 12 月の 9,024 検体を後期とした。ふん便は前期には, 選択分離培地に SIB 寒天平板 (極東製薬) を使用し, 後期には CTSMAC 寒天平板 (Sorbitol MacConkey Agar No. 3: Oxoid に Cefixime Tellurite Selectavial: MAST を添加) を使用した。これらの培地に塗抹し, 37℃で 1 夜培養した。両平板上のソルビトール非分解の無色集落を滅菌竹串で釣菌し, 図 1 のように分画シャーレの仕

表 1 CC/C 平板における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の性状 (24 株)

性状	陽性	陰性	陽性率 (%)
MUG	0	24	0
ONPG	24	0	100
セロビオース	0	24	0

MUG: β -グルクロニダーゼ活性

ONPG: β -ガラクトシダーゼ活性

切をはさんで対称に約 15 mm ずつ画線し, 37℃, 1 夜培養した。ふん便 1 検体の選択分離平板から最大 20 個の集落を釣菌し, 前期では合計 8,137 集落, 後期では合計 14,702 集落を CC/C 平板に画線培養し, 検討した。

4. CC/C 平板と CLIG 寒天培地の鑑別性状の比較

平成 9 年 1 月, 足立区に勧奨検便として搬入されたふん便を SIB 寒天平板に分離培養し, 平板上のソルビトール非分解を示した 194 集落について鑑別のために CC/C 平板および CLIG 培地に培養し, 両培地のセロビオース分解性, β -グルクロニダーゼ活性 (以下 MUG と略) および β -ガラクトシダーゼ活性 (以下 ONPG と略) を比較検討した。

結 果

1. CC/C 平板における O157 の性状

表 1 には供試した O157:H7 24 株の CC/C 平板上での性状を示した。すべての菌株は MUG 陰性, ONPG 陽性, セロビオース非分解で, CC/C 平板上の色調は, クロモカルトコリフォーム寒天はピンク, セロビオース分解試験用培地は無変化 (紫) であった。

2. CC/C 平板を用いた実用化の検討

表 2 は SIB 寒天平板および CTSMAC 寒天平板の選択分離培地を用いたふん便検査において, ソルビトール非分解を示した集落の CC/C 平板上での性状をまとめたものである。SIB 寒天平板でソルビトール非分解を示

表 2 選択分離培地でソルビトール陰性を示した集落の CC/C 平板の色調, 抗 O157 血清との凝集およびベロ毒素産生

CC/C 平板の色調		ピンク 紫	ピンク 黄	紫 黄 or 紫	淡青 紫	白 紫
クロモカルトコリフォーム平板 セロビオース分解試験用培地						
生化学性状						
MUG		－	－	＋	＋	－
ONPG		＋	＋	＋	－	－
セロビオース		－	＋	＋ or －	－	－
SIB 寒天平板からの分離集落数 (%)	* 8,137	548 (6.7)	816 (10.0)	6,241 (76.7)	282 (3.5)	250 (3.1)
抗 O157 血清凝集集落数		0				
ベロ毒素産生集落数		0				
CTSMAC 寒天平板からの分離集落数 (%)	*14,702	738 (5.0)	3,672 (25.0)	6,229 (42.4)	143 (1.0)	3,920 (26.7)
抗 O157 血清凝集集落数		55				
ベロ毒素産生集落数		43				

*: 各選択平板において集落の形態から腸管出血性大腸菌 O157 を疑った集落数を示す

表3 SIB寒天平板上でソルビトール非分解を示した194集落のCC/C平板およびCLIG培地における性状の比較

CLIG 培地	MUG (-) CEL (-)	MUG (-) CEL (+)	MUG (+) CEL (-)	MUG (+) CEL (+)
CC/C 平板				
MUG(-), CEL(-)	12*			
MUG(-), CEL(+)		8*		
MUG(+), CEL(-)	1†		168*	
MUG(+), CEL(+)		2†		3*

CEL: セロビオース *: 一致 191, †: 不一致 3

図2 CC/C平板を用いたO157の検査手順

した8,137集落のうちピンク/無変化(紫)の色調を示した集落は548株(6.7%)のみであった。一方、CTSMAC寒天平板でソルビトール非分解を示した14,702集落のうちピンク/無変化(紫)の色調を示した集落は738株(5.0%)のみであった。

SIB寒天平板でソルビトール非分解を示した548株すべては、抗O157血清に凝集を示さなかった。一方、CTSMAC寒天平板でソルビトール非分解を示した738株の中で、抗O157血清に凝集を示した菌株は5名から分離された55株であり、うちベロ毒素が陽性を示した菌株は4名から分離された43株のみであった。

3. CC/C平板とCLIG培地の性状の比較

表3はCC/C平板とCLIG培地の性状を比較した成績である。勧奨検便においてSIB寒天平板でソルビトール非分解を示した194集落のうち3集落以外はセロビオース分解性およびMUG陽性または陰性の性状が一致し、その一致率は98.5%であった。一方、両培地で性状の不一致を示した3集落はCC/C平板ではMUG陽性であるが、CLIG培地ではMUG陽性の蛍光がみられなかった。

考 察

O157の検出にはSIB寒天平板、ソルビトールマッコンキー寒天平板などが分離培地として用いられている。これはO157の大多数がソルビトール非分解の性状であることを利用している。しかしソルビトールを分解しない細菌はO157以外にも多く、選択培地の選択性が低いため、O157を検索するためには、多数の集落を鑑別培養しなければならない。実際O157が検出された食品の事例においては、多数のソルビトール非分解集落の中の数集落がO157であったにすぎないと報告されている⁵⁾。そのため、一次鑑別用培地は、結果の判定が簡便で、容易に多数の集落の検査が可能であり、さらにコストが廉価であることが望まれる。O157検査における厚生省通知^{3,4)}で一次鑑別用培地として例示され、実用化されたCLIG培地にも下記に示すような欠点がある。すなわちCLIG培地は蛍光の有無でMUG陽性または陰性を判定するため、暗い部屋を必要とし、さらに一部の菌では発生する蛍光に強弱があり不明瞭である^{1,2)}。また、選択分離培地からソルビトール非分解の1集落を1本の試験管に釣菌するため、多数の検体処理にあたっては労力を要し、さらにコスト面にも大きな問題があるように思われる。

今回、著者らが考案したCC/C平板はMUGおよびONPGの反応性、そしてセロビオース分解性の3性状をより明瞭に判別できた。O157感染症患者由来のO157 24株はすべてCC/C平板において典型的な性状、すなわちピンク/無変化(紫)の色調を示した。本培地の実用化の検討では選択分離培地上のソルビトール非分解集落の約93～95%がCC/C平板上でO157陰性と判定され、O157抗血清との凝集反応を実施する集落はわずか5～7%であった。またCC/C平板への約15mmの画線培養で得られる菌量は、生菌および加熱菌とO157抗血清との凝集反応のためには十分であった。またCC/C平板は色調の拡散が少ないため、1平板当たり20集落を画線培養し判定することができる。そのため、多数の検体の処理が容易に行うことができ、結果として1集落当たりの検査コストが廉価となる。

図2にCC/C平板を用いたO157の検査手順を示した。CTSMAC寒天平板による選択分離後、一次鑑別用培地にCC/C平板を用いることによりO157抗血清との凝集反応を実施する集落数は激減する。O157抗血清

と凝集を示したわずかな集落についてのみ TSI, LIM およびシモンズのクエン酸塩の二次鑑別培養とペロ毒素産生試験を同時に行う。このことにより O157 検査に要する時間および労力の削減が可能となる。

以上のことから O157 検査に CC/C 平板を用いることは、検査の簡易化および省力化、多数の検体処理、検査コストの廉価など多くの有用性があることが示された。

文 献

- 1) 江成 博, 島田園子, 荻原博和, 矢野信禮, 神田 隆: 腸管出血性大腸菌の検査手順についての試案. 第 6 回日本臨床微生物学会 (1995).
- 2) 甲斐明美, 伊藤 武, 工藤泰雄, 島田園子, 江成 博: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査の簡略化を目的とした LIG 寒天培地の検討. 第 5 回日本臨床微生物学会 (1994).
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課長, 乳肉衛生課長: 病原性大腸菌 O-157 に係る食品等の汚染実態調査の実施について. 衛食第 195 号/衛乳第 174 号 (1996).
- 4) 厚生省生活衛生局食品保健課長, 乳肉衛生課長: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について. 衛食第 207 号/衛乳第 199 号 (1997).
- 5) 小田隆弘, 椿本 亮, 財津修一, 池田嘉子, 樋脇 弘, 金堂正也: 市販食品からの志賀毒素産生大腸菌の検出. 日食微誌, **14**, 169-173 (1997).
- 6) 高橋正樹, 斉藤香彦, 五十嵐英夫: 腸管出血性大腸菌 O157 鑑別用 SHI 培地について. 感染症学誌, **71**, 375-376 (1997).