

短報

稀なO血清群の志賀毒素産生性大腸菌検出における

CHROMagar™ STECの有用性の検討

市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸・堀川和美

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) O157、O26及びO111を藤色に発色させて鑑別することができる CHROMagar™ STECを用いて、O157、O26及びO111以外の稀なO血清群のSTECにおける CHROMagar™ STEC の有用性を確認するために、当所保有の稀なO血清群のSTEC 64株の発育状況を調査した。その結果、O103 (3株中3株)、O118 (1株中1株)、O121 (4株中4株)、O128 (1株中1株)、O145 (3株中3株)、O150 (1株中1株) 及びOUT (4株中1株) の計14株 (21.9%) は発育し、藤色の集落を形成した。しかし、その他の STEC 50株は本培地では発育しなかった。このことから、CHROMagar™ STEC は、特定のO血清群の STEC 分離については使用可能で、特にO103、O121、O145 など集団発生事例の原因として比較的分離株数の多い STEC の検査において有用であると推察された。

[キーワード：稀なO血清群の志賀毒素産生性大腸菌、CHROMagar™ STEC]

1 はじめに

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染症は、公衆衛生、特に食品衛生上重要な感染症である。平成 20 年に、大量調理施設衛生管理マニュアル¹⁾ が改正され、O157 だけでなく、その他の O 血清群の STEC も検査対象となった。主要な O 血清群の O157、O26、O111 に関しては、糖分解などの性状の違いを利用した種々の選択分離培地や、選択的に濃縮するための免疫磁気ビーズが市販されており、食肉からの検査法も確立されている^{2), 3)}。しかし、その他の O 血清群の STEC の性状に関しては不明な点も多く、志賀毒素遺伝子保有を確認後に分離を行うなどの方法が一般的であるが、分離の決め手となる性状が分かっていないため、多種類の培地を使用することとなり、経済性、操作性の面から大きな負担となる。

O157、O26、O111 などの代表的な STEC を特徴的に藤色に発色させて鑑別することができる CHROMagar™ STEC (クロモアガーSTEC、関東化学) が発売された⁴⁾。本培地は、O157、O26 及び O111 の場合、約 97% 以上の株が藤色集落を形成し、分離培養で迅速に志賀毒素産生性大腸菌を推定鑑別できるため、O157、O26 及び O111 の分離には有効な培地であるとされる。しかし、その他の O 血清群の STEC に対する有効性は不明な点が多い。その他の O 血清群の STEC を分離する能力が確認されれば、汎用性がさらに高まると期待される。そこで、O157、O26 及び O111 以外の志賀毒素産生性大腸菌分離培養における CHROMagar™ STEC の有用性を確認するために、

各 STEC の発育状況の検討を行ったのでその概要を報告する。

2 材料と方法

2・1 供試菌株

菌株は、1996 年度から 2010 年度までに、福岡県内 (福岡市、北九州市、大牟田市、2008 年度からは久留米市を除く) 在住者から分離された O157、O26、O111 以外の O 血清群の STEC 64 株を試験に供した (表 1)。分離は、民間検査施設、県内保健福祉環境事務所および当所で行われた。

2・2 培養方法

保存菌株を Tryptone soya broth (TSB) に接種し、35±1℃で一晩培養した培養菌液 10µl を CHROMagar™ STEC に接種し、35±1℃で 20±2 時間培養後、発育の有無および発育集落の色調を観察した。比較のため、セフィキシム・亜テルル酸ソルビトールマッコンキー培地 (CT-SMAC) における発育の有無も同様に観察した。

2・3 発育菌数の比較

従来から使用されている培地との発育菌数を比較するために、CHROMagar™ STEC、CT-SMAC、CHROMagar™ O157 及び Brain heart infusion (BHI) 培地を用いて、Miles & Misra 法⁵⁾を応用し O157 Sakai 株の発育菌数を確認した。O157 Sakai 株を TSB に接種し、35±1℃で 1 晩培養後、滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈し、原液および各希釈液をそれぞれ 10µl ずつ培地に滴下し、

35±1℃ で一晚培養した。発育集落数を計測し、1ml あたりの菌数を算出した。

表 1 供試菌株の O 血清群と株数

	O血清群	株数
STEC (計64株)	O1	2
	O8	1
	O25	1
	O41	1
	O63	2
	O76	2
	O91	25
	O103	3
	O113	1
	O115	3
	O118	1
	O119	1
	O121	4
	O128	1
	O143	1
	O145	3
	O148	1
O150	1	
O165	6	
	OUT*	4

*OUT : O血清群型別不能

3 結果

3・1 CHROMagar™ STEC と CT-SMAC における培養結果

CHROMagar™ STEC と CT-SMAC に発育した株数を表 2 に示す。CHROMagar™ STEC においては、64 株中 14 株 (約 22%) が 20±2 時間で発育し、且つ藤色集落を形成した。発育した株の O 血清群は、今回検討した範囲では、O103、O118、O121、O128、O145、O150 及び O 血清群別不能 (OUT)の一部であった。他の 50 株については、CHROMagar™ STEC 上では発育が認められなかった。

一方、CT-SMAC においては、今回検討した範囲では、O91、O165 の一部、O41 及び O113 は、発育しないか、釣菌不可能な極小集落を形成したが、これら以外の O 血清群の STEC35 株 (約 55%) のうち、O1、O8、O25、O103 の一部、O115、O119、O121、O128、O143、O148、O165 の一部、O76、O118、O150 及び OUT は赤色集落を形成し、O63 及び O103 の一部は白色集落を形成した。

3・2 発育菌数の比較

CHROMagar™ STEC、CHROMagar™ O157、CT-SMAC 及び BHI 培地における発育集落数及び算出した平均菌数 (n=2) を図 1 に示す。CHROMagar™ O157、CT-SMAC 及び BHI に発育した集落数は、それぞれ 2.6×10^9 CFU/ml、

1.5×10^9 CFU/ml 及び 1.6×10^9 CFU/ml であったが、CHROMagar™ STEC に発育した集落数はその 5 分の 1 程度の 3.5×10^8 CFU/ml であった。

4 考察

当所に保有する O157、O26 及び O111 以外の O 血清群の STEC の CHROMagar™ STEC での発育について検討した結果、今回検討した範囲では O103、O121、O128、O145、O118、O150 及び OUT の一部は、20±2 時間培養で藤色集落を形成し、これら以外の血清型の株は、集落を形成しないことが確認された(表 2)。また CT-SMAC における発育状況と比較すると、CT-SMAC の方が集落を形成する株数が多かったが、そのほとんどが赤色集落を形成した。CT-SMAC は O157 検出用培地であるため、白色集落が釣菌対象となる。そのため、通常の検査では見過ごされる可能性が示唆された。さらに、O157 Sakai 株を用いた菌数測定の結果から、CHROMagar™ STEC は今回検討した他の培地に比べ、発育抑制が強く、培地上に多くの標的コロニーを得るためには、検体量を多めに塗抹する必要があると考えられた。O103、O121 及び O145 は集団発生事例の原因として比較的分離株数の多いが、分離培養時に釣菌の指標となる性状が不明であるため、釣菌に苦慮していたが、今回の検討結果から、本培地を用いることにより釣菌効率が上昇し、省力化できるものと考えられた。一方、今回発育が認められなかった STEC に関しては、本培地のみでは検出が困難であることが考えられた。今後、他の O 血清群の STEC が検出できるよう CHROMagar™ STEC の選択剤の工夫が望まれる。

謝辞

血清型別を実施していただきました、国立感染症研究所細菌第一部 寺嶋 淳先生ならびに伊豫田 淳先生に感謝いたします。

文献

- 1) 大量調理施設衛生管理マニュアル. 平成 9 年 3 月 24 日衛食第 85 号別添. 最終改正 : 平成 20 年 6 月 18 日食安発第 0618005 号.
- 2) 腸管出血性大腸菌 O157 及び O26 の検査法について. 平成 18 年 11 月 2 日食安監発第 1102004 号.
- 3) 腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について. 平成 23 年 6 月 3 日. 食安監発 0603 第 2 号.
- 4) 関東化学株式会社 : クロモアガー™ STEC. (<http://www.kanto.co.jp/rinsyo/pdf/416.pdf>)
- 5) 坂崎利一. 新 細菌培地学講座・上 1978. 近代出版、東京

表2 CHROMagar™ STEC と CT-SMAC における培養結果

STEC (計64株)	O血清群	H血清型	志賀毒素型	供試株数	CHROMagar™ STEC		CT-SMAC [*] における発育			
					発育あり (藤色集落)	発育なし	発育あり (赤色集落)	発育あり (白色集落)	発育なし****	
O1	H-		Stx1	1		1	1			
			Stx2	1		1	1			
O8	NT**		Stx2	1		1	1			
O25	H51		Stx1	1		1	1			
O41	H51		Stx2	1		1			1	
O63	H-		Stx2	1		1		1		
			Stx2	1		1		1		
O76	H-		Stx1	1		1	1			
			Stx2	1		1	1			
O91	H-		Stx1	1		1			1	
			H10	1		1			1	
			H21	5		5			5	
			H42	1		1			1	
			H51	4		4			4	
			HUT***	1		1			1	
			H51	Stx1 + Stx2	1		1			1
			H14	Stx1	11		11			11
O103	H-		H11	1	1			1		
			H2	1	1		1			
			HUT	1	1		1			
O113	H-		Stx2	1		1		1		
O115	H10		Stx1	2		2	2			
			H1	1		1	1			
O118	H-		Stx1	1	1		1			
O119	H7		Stx1	1		1	1			
O121	H19		Stx2	3	3		3			
			H14	1	1		1			
O128	H2		Stx1	1	1		1			
O143	H9		Stx1	1		1	1			
O145	H-		Stx2	3	3		3			
O148	H51		Stx1	1		1	1			
O150	H11		Stx1	1	1		1			
O165	H-		Stx1	1		1	1			
			Stx1 + Stx2	2		2	1		1	
			Stx2	1		1			1	
			H14	2		2	2			
OUT	H-		H16	1		1	1			
			H18	2	1	1	2			
			H21	1		1	1			
総計				64	14	50	32	3	29	

*CT-SMAC: セファイギシム・亜テレル酸ソルビトールマッコンキー培地

**NT: Not tested

***HUT: H血清型別不能

****発育なし: 釣菌不可能な極小集落を認めたものを含む

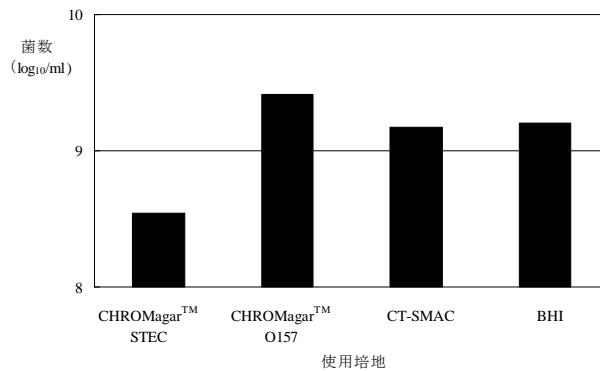


図1 各培地における STEC O157 Sakai 株の菌数(n=2)

Utility evaluation of CHROMagarTM STEC for isolation of non-O157, non -O26, and non -O111 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

**Sachiko ICHIHARA, Yoshiki ETOH, Mitsuhiro HAMASAKI,
Koichi MURAKAMI, Shigeyuki TAKENAKA and Kazumi HORIKAWA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

In order to investigate the usefulness of CHROMagarTM STEC for isolation of non-O157, non-O26 and non-O111 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), 64 strains of the minor serogroup were cultivated with this media. As a result, a particular serogroup STEC (O103, O121, O128, O145, O118 and O150) formed pale purple colonies. However, 50 strains of 64 STECs (84%) showed non-growth on the medium. Therefore, it could be difficult to detect other serogroup STECs (like O1, O8, O25, O41, O63, O76, O91, O113, O115, O119, O143, O148, O165 and OUT) using CHROMagarTM STEC.

[Key words; non-O157, -O26, and -O111 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, CHROMagarTM STEC]