

主要な血清型別の大腸菌を検出する酵素基質培地の開発

○北川 真喜¹⁾、市石 卓¹⁾、葛原 繁明¹⁾、江成 博¹⁾²⁾
 1) 極東製薬工業株式会社 研究開発本部、2) 岐阜大学嫌気性菌研究分野

I. 目的

「大量調理施設衛生管理マニュアル」(食安発第0618005号)では、調理従事者等の検便検査は「腸管出血性大腸菌 (EHEC) の検査を含めること」となっている。しかし、具体的な検査法が明示されておらず、各検査機関で独自に対応している状況である。近年、O157, O26, O111 を酵素基質培地で検出する方法が繁用されているが、酵素基質のみでは類似の呈色を示す菌種を *Escherichia coli* と誤判定する頻度が高い。今回、*E. coli* 以外の菌種による誤判定を可能な限り低減させる培地を開発し、その基本性能について検討した。

II. 方法

CIX寒天培地(検討培地)について、以下の検討を行った(培地組成; Table 1)。

1. 保存菌株での検討

前培養した*E. coli* (ATCC株; 4株、臨床分離株; 26株)及び *E. coli* 以外の腸内細菌 (ATCC株; 7株、臨床分離株; 1株)を McFarland #1.0 に調整し、試験菌液とした。試験菌液を検討培地に画線塗抹し 35°C, 18時間培養した。判定は菌株の発育及び集落の呈色を確認した。また、発育した集落について直接 O血清の試し凝集と Duopath Verotoxins (DV) による VT産生の有無を確認した。

2. 糞便検体での検討

EHEC 陽性の糞便検体 19件 (O157; 12件、O26; 6件、O128; 1件)及び EHEC 陰性糞便検体 21件を検討培地、A社酵素基質培地(以下 A社培地)、B社酵素基質培地(以下 B社培地)に画線塗抹し、35°C, 18時間培養した。判定は発育した集落について、その呈色を確認し、O血清型及び VT産生の有無を確認した(各社培地での集落色調の特徴; Table 2)。

Table 1 検討培地組成 (L)

カゼインペプトン	9.7g
胆汁酸塩	1.5g
塩化ナトリウム	5.0g
糖類	10.0g
寒天	15.0g
酵素基質 2種	
選択剤	
pH指示薬	

Table 2 各社培地での集落色調の特徴

	O157	O26	O111
検討培地	青～青緑色	群青色～濃紫色	群青色～濃紫色
A社培地	赤色	緑色	赤紫色～紫色
B社培地	(赤)紫色	青紫色	紫色(白濁)

III. 結果

1. 保存菌株での検討

ATCC株を含む保存菌株を用いた検討では、O157 は青～青緑色、O26, O111 は群青色～濃紫色を呈した (Fig. 1)。供試した *E. coli* 30株のうち VT産生の有無に関わらず CT感受性の 16株は非発育であった (Table 3)。また、検討培地に発育した集落から直接行った O血清の試し凝集と DV による VT産生確認は、各添付文書に記載の方法で行った結果と一致した (Table 4)。 *E. coli* 以外の菌種については、*E. hermannii* を除き全て発育が抑制された (Table 5)。

2. 糞便検体での検討

糞便検体を用いた検討では、検討培地において O157 様の色調を示す O26 が 1株認められた (Table 6)。また、CT耐性の *E. coli* (VT陰性)が、O157 及び O26, O111 と類似の色調を示した (Table 7)。A社培地では、薄茶色を呈する O157, O26 が各々 1株認められた (Table 6, Fig. 2)。また、B社培地において、O111 様の色調を示す O26 が 1株認められた (Table 6, Fig. 3)。検討に用いた全ての培地において、発育した *Enterobacter* spp. は EHEC と類似の色調を呈する傾向であった (Table 7)。また、常在菌で最も多く発育が認められた菌種は *Klebsiella* spp. であり、次いで *Enterobacter* spp. であった (Table 8)。

Table 3 供試した *E. coli* 30株の成績

strain			発育及び集落色	strain			発育及び集落色
菌株No.	O抗原	VT1/2		菌株No.	O抗原	VT1/2	
ATCC 43894	O157	+/+	青緑	2	O145	-/+	微発育(青)
ATCC 35150	O157	+/+	青緑	1	O1	+/-	NG
4	O157	+/+	青緑	8	O91	+/-	NG
OHM	O157	-/+	青緑	9	O91	+/-	NG
33	O157	+/+	青緑	7	O103	+/-	NG
42	O157	+/+	青緑	10	O103	+/-	NG
228	O157	+/+	青緑	5	O113	+/+	NG
1079	O157	+/+	濃紫	O128-1	O128	+/+	NG
1119	O157	-/-	NG	O128-2	O128	+/+	NG
NS99	O157	-/-	NG	K-1	O165	-/+	NG
O26(1)	O26	+/-	濃紫	K-2	O165	-/+	NG
O26(2)	O26	+/-	濃紫	3	OUT	+/-	NG
O111(1)	O111	+/+	濃紫	6	OUT	+/-	NG
O111(2)	O111	+/+	濃紫	ATCC 25922	O6	-/-	NG
NOT OUT	O121	-/+	暗ピンク	ATCC 11775	O1	-/-	NG

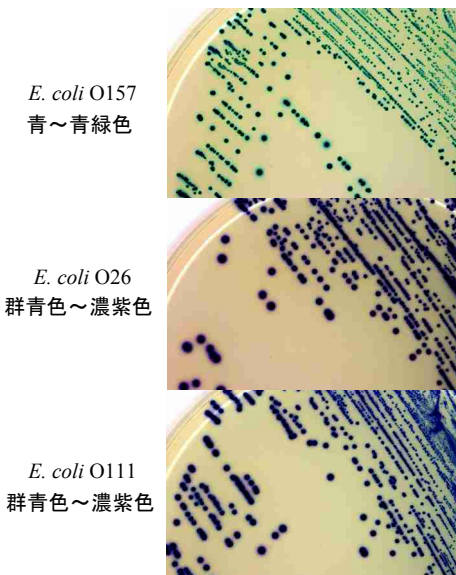


Fig. 1 検討培地における集落の呈色

Table 4 O血清による試し凝集とDVへの適応確認

strain 菌株No.	O抗原	O血清 試し凝集	DV VT1/VT2
<i>E. coli</i> ATCC 43894	O157	+	+/+
<i>E. coli</i> ATCC 35150	O157	+	+/+
4	O157	+	+/+
OHM	O157	+	-/+
33	O157	+	+/+
42	O157	+	+/+
1079	O157	+	+/+w
228	O157	+	+/+
O26(1)	O26	+	+/-
O26(2)	O26	+	+/-
O111(1)	O111	+	+/+
O111(2)	O111	+	+/+
NOT OUT	O121	+	-/+

Table 5 *E. coli* 以外の菌種の発育及び集落性状

strain	発育及びコロニー色
<i>E. hermannii</i> 臨床株	微発育(ピンク、紫混在)
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	NG
<i>P. mirabilis</i> ATCC 43071	NG
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	NG
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	NG
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	NG
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	NG
<i>M. organii</i> ATCC 25830	NG



Fig. 2 A社培地におけるO157発育例(例外)



Fig. 3 B社培地におけるO26の発育例(例外)

Table 6 EHEC の発育結果(糞便検体での分離培養結果)

検体No.	検討培地		A社		B社		血清型	VT
	growth	色	growth	色	growth	色		
1	1+	青緑	1+	赤	1+	紫	O157	VT2
2	1+	青緑	1+	赤	孤立集落無	紫?	O157	VT2
3	4+	青緑	3+	薄茶色	2+	紫	O157	VT1,2
4	3+	青緑	3+	赤	2+	紫	O157	VT1,2
5	2+	青緑	2+	赤	1+	紫	O157	VT1,2
6	1CFU	青緑	1CFU	赤	NG	-	O157	VT1,2
7	1+	青緑	1+	赤	2+	紫	O157	VT1,2
8	2+	青緑	1+	赤	1+	紫	O157	VT2
9	4+	青緑	2+	赤	2+	紫	O157	VT2
10	1+	青緑	1CFU	赤	1+混	紫	O157	VT1,2
12	1+	青緑	1CFU	赤	1+	紫	O157	VT1,2
13	1+w	青緑	1+w	赤	1CFU	紫	O157	VT1,2
102	2+	濃紫	孤立集落無	緑?	2+	青ムコイド	O26	(-)
104	2+	濃紫	2+	暗緑	2+	青紫	O26	VT1
105	3+	濃紫	2+	暗緑	3+	青紫	O26	VT1
106	2+	青緑	2+	薄茶色	2+	薄紫白濁	O26	VT1
110	3+	濃紫	2+	暗緑	3+	青紫	O26	VT1
112	3+	濃紫	2+	暗緑	2+	青紫	O26	VT1
201	1+	濃紫	1+	暗緑	1+	青	O128	(-)

Table 7 発育した常在菌(糞便検体での分離培養結果)

検体No.	検討培地		A社		B社		同定結果
	growth	色	growth	色	growth	色	
10	1+	濃紫					<i>E. coli</i> VT(-)
13	2CFU	濃紫					<i>E. coli</i> VT(-)
102	2+	青緑	1+	赤	2+	白ムコイド	<i>E. coli</i> VT(-)
108	1+	濃紫					<i>Enterobacter</i> spp.
302	1+	紫	1+	赤	1+	薄紫白	<i>Enterobacter</i> spp.
	8CFU	紫			5CFU	紫	<i>Enterobacter</i> spp.
308	2+	紫	2+	赤紫	2+	紫白濁	<i>Enterobacter</i> spp.
			2+	赤			<i>Enterobacter</i> spp.
309	3+	ピンク	1+	赤	3+	白ムコイド	<i>Enterobacter</i> spp.
202	1+	濃紫	2+	赤	混	赤白濁	<i>Enterobacter</i> spp.

Table 8 発育した常在菌(糞便検体での分離培養結果)

	検討培地		A社		B社	
	検体数	集落色	検体数	集落色	検体数	集落色
<i>Klebsiella</i> spp.	11	ピンク~紫	7	赤~赤紫	11	白~薄紫(ムコイド)
<i>Enterobacter</i> spp.	10	ピンク~紫	4	赤紫	9	白~薄紫
<i>E. hermannii</i>	4	非着色~薄茶	3	非着色~薄茶	3	非着色~薄茶
<i>P. aeruginosa</i>	1	薄茶	1	薄茶	1	薄茶
その他腸内細菌	3	紫	3	薄茶~赤紫	2	白~薄茶

IV. 考察

2種類の酵素基質と糖及び pH指示薬を添加した検討培地では、類似色を呈する *E. coli* 以外の菌種による誤判定が低減され、検査の効率化が期待される。

検討培地では、CT耐性である特定の血清型は判別可能であるが、他の VT陽性株をいかに検出するかが課題である。