

溶血を指標とした腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査用培地の比較検討

石畝 史・前田 央子^{*1}・京田 芳人・堀川 武夫

Comparative Study of Selective Screening Media
of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Depending on Hemolysis

Fubito ISHIGURO, Chikako MAEDA, Yoshito KYOTA, Takeo HORIKAWA

1 はじめに

腸管出血性大腸菌（EHEC）におけるVT産生性が、エンテロヘモリジン（E-hly）産生性、すなわち溶血性と高い相関性をもつというBeutinらの報告^{1,2)}に基づいて、近年、EHECのスクリーニング検査用培地に溶血を指標とした培地が用いられる傾向にある。しかしながら、我々は下水からのO157分離のためのスクリーニング用に、市販培地を使用したところ、見逃したO157株があることが分かった。そこで、我々はヒト、食品および環境由来のEHECを用いて、市販および自家製のE-hly血液寒天培地（以下、E-hly培地）において、溶血しない株、すなわち見逃す可能性のある株がどの程度存在するのか調べた。また、検査施設におけるE-hly培地の使用状況も調査したので報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

2.1.1 供試株

表1のとおり、1996年4月から2003年3月までに福井県で分離されたヒト由来O157:H7 156株およびO26:H11 11株、下水流入水由来O157:H7 83株、市販の牛内臓（いわゆるホルモン）由来O157:H7 10株、ヒト由来O63:

H6および豚肉由来O8:H19などの稀な血清型の6株など、計281株を使用した。なお、これらの株はすべてPCR法あるいはRPLA法によりVT産生性あるいはVT保有を確認しているEHECである。

2.3 使用培地

市販の2社のE-hly培地（以下、A培地、B培地）および木村らの報告³⁾に基づいて作成した自家製培地（以下、自家製）の3種類で、菌株は穿刺培養した。

2.3 VT産生性および病原遺伝子などの検索

稀な血清型の6株については、小林のプライマー⁴⁾によりVT1およびVT2産生遺伝子を、Adrienne et alのプライマー⁵⁾によりVT1、VT2、hlyAおよびeaeAの4種類の病原遺伝子等をPCRにより検索し、VTが確認されなかった株については、さらにWang et alのプライマー⁶⁾によりVT2 variant c、d、eおよびfについて検索した。また、デンカ生研製のキットを用いてRPLA法によるVT産生性も調べた。

2.4 エンテロヘモリジン（E-hly）培地の使用状況

県内の病院検査室9施設および民間の衛生検査所7施設における、E-hly培地の使用状況および培養方法について電話で聞き取り調査を実施した。

表1 材料

STECの由来	O157:H7			O157:HNM	O26:H11		O26:HNM	O111:HUT
VT	1	2	1+2	2	1	1+2	1	1
ヒト		31	125	2	10	1	3	3
下水・河川水	6	49	35					
牛内臓		1	9					
ヒト	O63:H6	O91:NNM	O114:HUT	O128:H2				
牛直腸内容物	O136:H12							
豚肉	O8:H19							

*1 丹南健康福祉センター

2. 5 同一のPFGEパターンを示す溶血微弱株の検出施設

当センターでは患者および保菌者由来のEHECについて随時PFGEを実施している。その中で、2002年8月1日から8月29日および10月26日に発症したEHEC 0157患者および保菌者由来の9株において、同一のPFGEパターン(Ia Ia ND)を示す溶血微弱株があることが分かり、それらの株の検出施設を調べた。

3 結果

表2 ヒト由来EHECにおける培地別の溶血性の比較

血清型	VT	株数	溶血微弱株数		
			A培地	B培地	自家製培地
O157:H7	2	31	0	0	0
	1+2	125(56)*	13(6)	11(6)	2(2)
O157:HNM	2	2	0	0	0
O111:HUT	1	3	0	0	0
O26:H11	1	10	0	0	0
	1+2	1	0	0	0
O26:HNM	1	3	0	0	0

*()PFGEのパターン数を示す

3. 2 環境および食品由来株における培地別の溶血性の比較

河川水、下水および牛内臓由来のO157:H7株について、VT型別に溶血性を示すと表3に示すとおりである。ここでも微弱な溶血しか示さない株があり、河川水由来のVT1産生の1株を除いて、やはりVT1+2産生株であった。すなわち、微溶血株は下水由来のVT1+2産生の32株中、A培地では4株、B培地では2株あり、自家製培地で確認されなかった。PFGEパターン別にみると、26パ

3. 1 ヒト由来株における培地別の溶血性の比較

ヒト由来のO157、O111およびO26の3種類の血清型について、VT型別に溶血性を示すと表2に示すとおりである。この中で微弱な溶血しか示さない株があり、それはいずれもO157:H7 VT1+2産生株であり、125株中A培地では13株、B培地では11株および自家製培地では2株であった。56種類に分けられたパルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)パターン別にみると、A培地およびB培地では各6種類、自家製培地では2種類が微溶血しか示さなかった。それ以外のO157:H7 VT2産生株、O111株およびO26株は明らかな溶血を示した。

ターン中A培地では2種類、B培地では2種類が微溶血しか示さなかった。

3. 3 稀な血清型における培地別の溶血性の比較およびVT産生遺伝子等の検索結果

O63:H6およびO91:HNMなどの6種類の稀な血清型について、培地別の溶血性の比較およびPCR法などによるVT産生遺伝子等の検索結果は、表4に示すとおりである。

表3 環境および牛由来EHEC0157:H7における培地別の溶血性の比較

由来	VT	株数	溶血微弱株数		
			A培地	B培地	自家製培地
河川水	1	1	1	0	0
	2	3	0	0	0
	1+2	3	0	0	0
下水	1	5	0	0	0
	2	46*	0	0	0
	1+2	32(26)**	4(4)	2(2)	0
牛内臓	2	1	0	0	0
	1+2	9	1	1	0

*O157:HNM 1株を含む。**()PFGEパターン数を示す。

まず、ヒト由来株について血清型別にみると、O63:H6はA培地では判定が微妙であり、B培地および自家製培地では溶血を示し、RPLAではVT2陽性であったものの、Adrienne et alおよび小林のプライマーでは*hlyA*遺伝子およびVT産生遺伝子は確認できず、Wang et alのプライマーによりVT2 variant f 産生遺伝子が確認できた。O91:HNMおよびO114:HUTは3種類の培地ともに溶血を示し、RPLAではVT1またはVT2に陽性を示し、PCRでも*hlyA*遺伝子およびVT1またはVT2産生遺伝子が確認できた。O128:

H2は3種類の培地ともに非溶血であり、RPLAおよびAdrienne et alのプライマーでは*hlyA*遺伝子およびVT産生遺伝子が陰性であったのに対し、小林のプライマーではVT1産生遺伝子が確認できた。

牛直腸内容物由来のO136:H12および豚肉由来のO8:H19は、3種類の培地ともに非溶血であったものの、RPLAではいずれもVT1陽性であり、2種類のプライマーでもVT1産生遺伝子が確認できたものの、後者では*hlyA*遺伝子が陰性であった。

表4 EHECにおける培地別の溶血性の比較およびPCRによるVT産生遺伝子とRPLA法によるVT検出状況

血清型	A培地	B培地	自家製培地	Cプライマー				Dプライマー		Eプライマー	RPLA法	
				<i>hlyA</i>	<i>eaeA</i>	VT1	VT2	VT1	VT2	VT2 variant	VT1	VT2
O63:H6	±	—	—	—	+	—	—	—	—	f	<2	×8
O91:HNM	+	+	+	+	—	+	—	+	—	NT	×8	<2
O114:HUT	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	<2	×32
O128:H2	—	—	—	—	+	—	—	+	—	NT	<2	<2
O136:H12	—	—	—	+	—	+	—	+	—	NT	×8	<2
O8:H19	—	—	—	—	—	+	—	+	—	NT	×16	<2

Cプライマー: Adrienneのプライマー、Dプライマー: 小林氏のプライマー、Eプライマー: Wangのプライマー

3. 4 エンテロヘモリジン (E-hly) 培地の使用状況

検査施設におけるE-hly培地の使用状況は、表5に示すとおりである。衛生検査所では病院からの委託検査を行っている4施設中2施設でB培地を使用し、培養方法はいずれも穿刺培養であり、集団検診を行っている3施設中2施設でB培地を使用し、培養方法は穿刺培養と画線培養に分かれた。一方、病院検査室9施設ではいずれの施設においても、E-hly培地は使用していなかった。

表5 エンテロヘモリジン (E-hly) 培地の使用状況

検査施設	施設数	A培地	B培地	培養方法	
				穿刺培養	画線培養
衛生検査所(病院からの委託)	4	0	2	2	0
(集団検診)	3	0	2	1	1
病院検査室	9	0	0		

表6 同一のPFGEパターンを示す溶血微弱株の検出施設

2002年8月1日～8月29日、10月26日		
検出施設	B培地	検出数
衛生検査所A(病院からの委託)	使用(穿刺培養)	3
病院検査室B, C, D	未使用	4
衛生環境研究センター	未使用	2

3. 5 同一のPFGEパターンを示す溶血微弱株の検出施設

2002年8月から10月に検出されたEHEC 19株のうちの9株が同一のPFGEパターンを示す溶血微弱株であり、その検出施設は表6に示すとおりである。病院からの委託検査を行い、B培地を使用している衛生検査所の2施設中1施設から3株、E-hly培地未使用の病院検査室および当センターから計6株検出された。

4 考 察

Beutinらの^{1,2)} VT産生性と溶血との間に高い相関性があるという報告に基づき、木村らは³⁾自家製のBeutin血液寒天培地を用いて、EHEC 18株について溶血をみたところ、全株が陽性を示した。試薬メーカーはこの報告に基づき、E-hly培地を販売し始めた。今回我々は、EHEC 0157で市販の培地でほとんど溶血を示さない（微溶血）株があることに気づき、そのような株がどのくらいの割合で存在するのかを調べるために、保存株のEHECを用いて市販培地と自家製培地について溶血性を調べた。病原微生物検出情報^{6,7)}によれば、2002年および2003年の腸管出血性大腸菌3,090株において、0157:H7 VT1+2産生株は1,047株（33.9%）であり、その他の0157:H7 VT2産生株の20.2%、0157:H7 VT1産生株の0.5%、026の20.0%および0111の1.7%などに比べて最も多くを占めている。このような状況下で、今回検査した0157、026および0111のうち、市販の2種類のE-hly培地および自家製培地のいずれかに微弱な溶血しか示さない株は、0157:H7 VT1+2産生の169株中20株と0157:H7 VT1産生の6株中1株の計21株に認められ、0157 VT2産生株、026および0111では認められなかった。前者の20株について培地別にみると、A培地で18株（10.7%）、B培地で14株（8.3%）および自家製培地で2株（1.2%）が微溶血しか示さなかった。このように、自家製培地が最も感度が良好であったが、いずれにしてもヒト由来株の中で検出頻度の最も高い0157:H7 VT1+2において、市販、自家製培地にかかわらず溶血が微弱な株が確認されたことから、見逃す危険性があることが示唆された。

6種類の稀な血清型のEHECについても、同様にE-hly培地の溶血性を比較したところ、ヒト由来の091:HNHおよび0114:HUTは3種類の培地ともに溶血を示し、PCRでもVT産生遺伝子およびhlyA遺伝子が確認された。それに対し、ヒト由来の063:H6および0128:H2、家畜由来の0136:H12および08:H19では、PCRではVT産生遺伝子を確認したものの、いずれの培地でもほとんど溶血性を示さなかった。以上の結果、さらにBeutinら²⁾も0157のVT産生株の中にも稀に不溶血株があると報告していること、および木村ら²⁾も非溶血VT産生株を逃す可能性を否定できないと述べているとおり、EHECのスクリーニング検査としてE-hly培地を用いる際には注意を要することが確認された。なお、Beutinら¹⁾は特定の血清型（0113、0114）のVT産生株では不溶血であると述べているが、今回供試した0114:HUT株はいずれの培地でも溶血を示した。

E-hly培地の使用状況については、病院からの委託検

査を行っている民間の衛生検査所の4施設中2施設でB培地を使用しており、いずれも穿刺培養を実施していた。溶血微弱株を衛生検査所に分与し、その溶血性を確認して頂いたところ、溶血と判定するとの回答があった一方、非溶血と判定してしまうとの回答もあった。溶血性を調べるための培養方法は穿刺と画線の2種類あり、穿刺培養の方が一度に多数の株を検査することができるため、コスト面を考えると穿刺培養を選択してしまうと思われるが、判定しやすい画線培養で検査することが望まれる。

参 考 文 献

- 1) Beutin L et al: Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*, J Clin Microbiol, 27. 2559-2564 (1989)
- 2) Beutin, L. et al: Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin(Verotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay, J Clin Microbiol, 34. 2812-2814 (1996)
- 3) 木村晋亮他: Beutin血液寒天培地での溶血を指標とした腸管出血性大腸菌のスクリーニング, 感染症誌, 72. 223-230 (1998)
- 4) 小林一寛: 腸管出血性大腸菌の同定法 2. PCR法, 臨床検査, 36. 1334-1338 (1992)
- 5) Adrienne W. Paton et al: Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb* 0111' and *rfb* 0157, J Clin Microbiol, 36. 598-602 (1998)
- 6) Wang G. et al: Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the 0157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR, J Clin Microbiol, 40. 3613-3619 (2002)
- 7) 感染症情報センター: <特集> 腸管出血性大腸菌感染症 2003年5月現在, 病原微生物検出情報, 24. 129-131 (2003)
- 8) 感染症情報センター: <特集> 腸管出血性大腸菌感染症 2004年5月現在, 病原微生物検出情報, 25. 138-140 (2004)