

HUS を起こす可能性がある主要な EHEC 7 血清群を食品から効率的に検出する 検査法の検討及び市販流通食品の汚染実態調査

星野梢 田嶋修 瀬川由加里 門脇奈津子 大塚佳代子

Detection Method for principal Enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroups caused hemolytic-uremic syndrome in Food and survey of Bacterial Contamination in Foods.

Kozue Hoshino, Osamu Tajima, Yukari Segawa, Natsuko Kadowaki, Kayoko Otsuka

はじめに

近年、腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）に汚染されたユッケや浅漬けを原因食品とする大規模食中毒事件が続いて生じている。様々な対策がとられながらもEHEC食中毒の発生及び死者の報告が後を絶たない。国内のEHEC食中毒事件ではO157 によるものが多く報告されているが、ヒト-ヒト感染など食品を介さない感染症としては、他の血清型によるものも多数報告されている。2008～2010年の集計ではO26, O111, O103, O121などのO血清型の分離報告が多かった（図1）¹⁾

つまり、これらのO血清型がすでに国内で分離されている状況では、いつ保菌者が感染源となって食品を汚染し、食中毒事件が生じてもおかしくはない。現に米国では、O157以外の血清型によるEHEC感染が問題となっており、O157よりもNon-O157の方が全感染者数に占める食中毒による感染の割合が高く、Non-O157による食中毒防止が重要視されている²⁾

EHECに感染した場合、下痢や腹痛に始まり、重症者では溶血性尿毒症症候群（以下、HUS）や脳症などの重篤な臨床症状を経て、死に至るケースもある。

国内では食品からEHECを検出する検査方法として「食品からの腸管出血性大腸菌O26, O111及びO157の検査法」(以下、通知法)³⁾が通知されているが、この検査法では血清群ごとに検出するための分離平板培地が異なっている。

そこで今回、通知法に記載された方法に準じて、食品からHUSを起こす可能性のある主要なEHEC 7血清群を共通の検査法で効率的に検出する検査方法を検討した。そして、その検討した検査法を用いて市販流通食品での汚染実態調査を行ったので報告する。

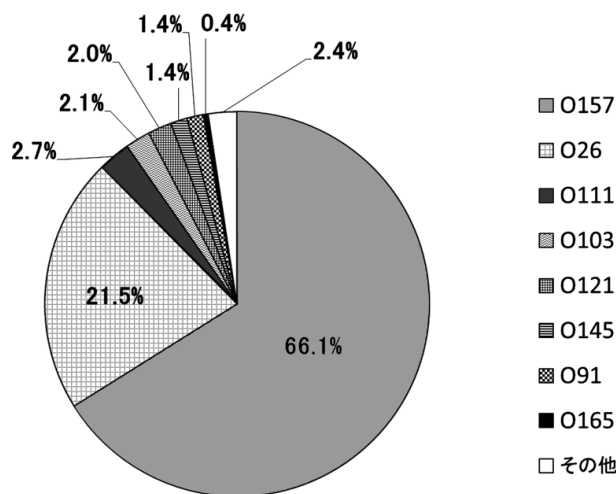


図1 2008～2010年の腸管出血性大腸菌の感染における主要な血清型
国立感染症研究所 病原微生物検出情報より集計。

方法

実験 1 : I ; 菌株を用いた分離平板培地の検討及び
II ; 液体培地における増菌培養法の検討
使用菌株 : O26 (3 株) , O111 (2 株) , O157 (4 株) ,
O103 (3 株) , O121 (8 株) , O145 (3 株) , O165 (4 株) ,
7 血清群 27 株(臨床由来株)
使用分離平板培地 : ①クロモアガー-O157 (以下、クロモ
O157, 関東化学) ②クロモアガー-STEC 培地 (以下、クロモ
STEC, 関東化学) ③ソルビトールマッコンキー寒天培地 (以
下、SMAC, OXOID) ④セフィキシム・亜テルル酸カリウム添加
ソルビトールマッコンキー寒天培地 (以下、CT-SMAC) ⑤DHL
寒天培地(日水製薬)⑥ドリガルスキー改良培地(以下、Dri,
栄研化学) 計 6 種類

7 血清群 27 株は Trypticase Soy Broth (以下、TSB, 日本
BD) で増菌後、上記に示した 6 平板に画線塗抹し、35±1℃
で一晩培養した。

次に増菌培養法の検討を行うため、O103, O121, O145, O165
の血清群を TSB で増菌後、2.5～13.0 cfu/ml に菌液を調製

した。その後、それらを1mlずつ3mlのmEC(日水製薬)、NmEC(栄研化学)にそれぞれ添加し、35±1℃及び42±1℃の2条件で培養後、TSAを用いて発育の有無を確認した。

実験2: 添加菌を用いた食品検体からの検査法の検討

使用菌株: 026, 0111, 0157, 0103, 0121, 0145, 0165の

7血清群各1株(臨床由来株)

使用食品: トマト・牛挽き肉

食品25gに1.0~20.0cfu/mlに調製した菌液1mlを添加し、mEC225mlを加え、42±1℃で22±2時間増菌培養した。

その後、026, 0111, 0157の3血清群は通知法に従い検査を実施した。他の4血清群は通知法に準じて、直接塗抹法及びDynabeads[®]M-280 (Sheep anti-Rabbit IgG, invitrogen)と大腸菌0群免疫血清(デンカ生研)で自家調製した免疫磁気ビーズ塗抹法で検査した。4血清群に使用した分離平板培地はクロモ0157, クロモSTEC, CT-SMAC, Driの4種類とした。

全ての血清群について、増菌培養液からのアルカリ熱抽出試料を用いて通知法に記載されているVT遺伝子検出をリアルタイムPCR法(ABI PRISM 7900)にて実施した。また、各分離平板培地に認められたEHECを疑うコロニーは血清型別試験, 生化学的性状試験, VT確認試験を実施した。

実験3: 市販流通食品の汚染実態調査

使用食品: 鶏肉6検体(国産5, 輸入品1), 牛肉2検体(国産1, 輸入品1), 豚肉2検体(国産1, 輸入品1), ナチュラルチーズ4検体(輸入品4) 水菜, 大葉, イチゴ, カキ各4検体(全て国産), 計30検体はH26年1月に県内のスーパーにて購入した。

実験2と同様の検査方法で、市販流通食品から7血清群が検出されるか調査した。なお、使用した分離平板培地は7血清群ともクロモSTEC, CT-SMAC, Driの3種類に統一した。

結果及び考察

1: 分離平板培地の検討及び増菌培養法の検討

7血清群を用いた分離平板培地における発育状況の結果を表1に示した。7血清群は用いた6種類の分離平板培地全てに発育が観察された。しかし、0165はクロモSTECやCT-SMACのような選択性のある分離平板培地において、他の6血清群の株と比べると発育が不良であった。よって、EHEC 7血清群を分離するために必要な平板培地の条件として①食品の夾雑菌の存在を考慮し選択性があること②培地成分によるEHECの発育抑制が回避できること③コロニーの色調で推定鑑別が可能な酵素基質培地であることが考えられた。

上記3点を考慮した結果、分離平板培地として、クロモ0157, クロモSTEC, CT-SMAC, Driが適していると考えたことから、今回の食品添加実験には、この4平板を用いることとした。

次に、増菌培養条件の検討を行った結果を表2に示し

た。mEC培地では35℃及び42℃、どちらの培養温度でも使用した27株全てに発育が認められた。一方、NmEC培地においては、35℃培養では0121の8株中5株、0145では用いた3株全てに発育が認められなかった。42℃培養でも、0121の4株、0145の1株で発育が認められなかった。

このことから、増菌培養としてはNmECよりmECが有用であると考えられた。また、mECでの培養温度による発育の差が認められなかったため、通知法でも増菌培養時に採択されている42±1℃を食品添加実験での増菌培養温度として用いることとした。

2: 食品添加実験での検討

増菌培養液からVT遺伝子検出法を実施した結果、7血清群ともVT陽性を示した。つまり、食品の存在下でもmECで増菌培養することにより、EHEC 7血清群が増えることがわかった。分離培養法の結果について表3, 4, 5に示した。トマトでは026, 0111, 0157の3血清群、牛挽き肉では0157が通知法に記載された分離平板培地から検出できた。牛挽き肉に添加した026, 0111では、用いたCT-RMAC, CT-SBMAC上に特徴的な無色透明コロニーが多数認められたが、血清型別試験, 生化学的性状試験ともEHECと合致しなかった。しかし、ViRX026, CT-SMAC, クロモSTECでは検出できた(表3)。

0103, 0121, 0145の3血清群はトマト・牛挽き肉とも用いた4種類の分離平板培地から検出できた。選択性のある分離平板培地での発育が不良であった0165は、クロモ0157, Driの2平板から2食品とも検出できた(表4, 5)。

実験1及び2の結果から、EHEC 7血清群を分離するための平板培地として、クロモ0157, クロモSTEC, CT-SMAC, Driの併用が有効であることが示唆された。

上記のことを踏まえ、HUSを起こす可能性がある主要なEHEC 7血清群を食品から効率的に検出する方法として図2に示す方法が有用と考えた。

図2 HUSを起こす可能性のある主要なEHEC 7血清群を検出する検査方法

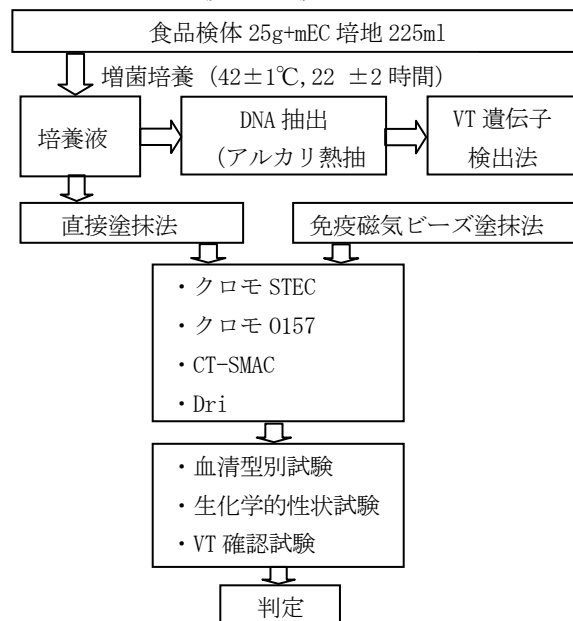


表1 実験1 分離平板培地の結果

	クロモ 0157	クロモ STEC	SMAC	CT-SMAC	DHL	Dri
7 血清群 27 株	青：22 株 藤色：4 株 白濁ピンク：1 株	藤色：27 株	ピンク：23 株 無色透明：4 株	ピンク：23 株 無色透明：4 株	ピンク：23 株 無色透明：4 株	黄色：23 株 白濁：4 株

表2 実験1 増菌培養条件の検討結果 ○：発育有/×：発育無

	0103 (3 株)	0121 (8 株)	0145 (3 株)	0165 (4 株)
mEC (35°C/42°C)	○	○	○	○
NmEC (35°C)	○	○：3 株 ×：5 株	×	○
NmEC (42°C)	○	○：4 株 ×：4 株	○：2 株 ×：1 株	○

表3 実験2 トマト・牛挽き肉 0157/026/0111 検出結果 ○：検出可 ×：検出不可 NT：Not tested

	CT-SMAC		クロモ STEC		CT-ViRX026		CT-RMAC		CT-SBMAC		クロモ STEC	
	トマト	牛肉	トマト	牛肉	トマト	牛肉	トマト	牛肉	トマト	牛肉	トマト	牛肉
0157	○	○	○	○	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
026	NT	NT	NT	NT	○	○	○	×	NT	NT	NT	NT
0111	○	○	NT	NT	NT	NT	NT	NT	○	×	○	○

表4 実験2 トマト 0103/0121/0145/0165 検出結果 ○：検出可 ×：検出不可

	クロモ 0157	クロモ STEC	CT-SMAC	Dri
0103/0121/0145	○	○	○	○
0165	○	×	○	○

表5 実験2 牛挽き肉 0103/0121/0145/0165 検出結果 ○：検出可 ×：検出不可

	クロモ 0157	クロモ STEC	CT-SMAC	Dri
0103/0121/0145	○	○	○	○
0165	○	×	×	○

3：市販流通食品の汚染実態調査

検討した検査方法 (図2) を用いて行った市販流通食品の汚染実態調査では、増菌培養液からのVT遺伝子検出検査で、30検体とも全てVT陰性を示した。

一方、分離培養法によるEHEC 7血清群の検査結果を表6, 7, 8に示した。

クロモSTECで大腸菌を疑うコロニーの発育は、鶏肉にのみ認められた (表6)。一方、CT-SMAC及びDriを併用することで、大腸菌を疑うコロニーの発育を認める食品が増え、Driでは汚染実態調査した食品全てに大腸菌を疑うコロニーの発育を認めた (表7)。しかし、各平板に認めた大腸菌を疑う

コロニーもVT遺伝子は全て陰性であった。

よって、30検体ともEHEC 7血清群は検出されなかった。

表6 実験3 市販流通食品汚染実態調査 クロモ STEC 発育結果

クロモ STEC	直接塗抹法	免疫磁気ビーズ塗抹法						
		0157	0111	026	0103	0121	0145	0165
大腸菌を疑うコロニーの検体数 / 使用した検体数								
鶏肉(6)	6/6	5/6	6/6	6/6	5/6	5/6	4/6	5/6

表7 実験3 市販流通食品汚染実態調査 CT-SMAC 発育結果

CT-SMAC	直接塗抹法		免疫磁気ビーズ塗抹法						
	ピンク	無色透明	0157	0111	026	0103	0121	0145	0165
大腸菌を疑うコロニーの検体数 / 使用した検体数									
鶏肉(6)	6/6	0	0	6/6	6/6	5/6	4/6	5/6	4/6
豚肉(2)	0	0	0	0	0	0	1/2	0	0
水菜(4)	2/4	1/4	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4
大葉(4)	0	0	0	1/4	0	0	0	0	2/4
カキ(4)	2/4	2/4	1/4	1/4	1/4	0	0	0	0

表8 実験3 市販流通食品汚染実態調査 Dri 発育結果

Dri	直接塗抹法	免疫磁気ビーズ塗抹法						
		0157	0111	026	0103	0121	0145	0165
大腸菌を疑うコロニーの検体数 / 使用した検体数								
鶏肉(6)	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
牛肉(2)	0	2/2	0	0	0	2/2	2/2	0
豚肉(2)	0	0	0	0	0	2/2	2/2	0
水菜(4)	3/4	1/4	3/4	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4
大葉(4)	2/4	2/4	2/4	3/4	2/4	2/4	3/4	1/4
イチゴ(4)	1/4	1/4	0	1/4	1/4	0	0	0
カキ(4)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	3/4
チーズ(4)	0	0	0	0	0	1/4	0	0

まとめ

検討を通して、HUSを起こす可能性のある主要なEHEC 7血清群を食品から共通の検査法で効率的に検出する方法として、図2に示す方法が有用と示唆された。今回分離平板培地として汎用性の高い4種類の平板を用いたが、いずれもEHEC 7血清群の検出に効果的であった。

食品中の夾雑菌の存在を考慮し、分離培養法に用いる分離平板は4種類を組み合わせ使用し、また、増菌培養液のVT遺伝子の検査結果と併せることで、より効率的にEHEC 7血清群を検出できると考えられた。また、この時にO血清群の遺伝子スクリーニングの検査結果があれば、遺伝子が陽性となったO血清群に適した分離平板培地を選択することができるため、より効率的であると考えられる。

今後はEHEC汚染率の高い牛肉（輸入・国産）でのスクリーニングを中心に行い、EHEC 7血清群の汚染状況を調査したいと考えている。

そして、食中毒事件の原因食品の迅速な特定並びに市販流通食品の汚染実態を把握し、健康被害の拡大・未然防止に取り組んでいくことが重要であると考えられる。

文献

- 1) 工藤由紀子：食品での腸管出血性大腸菌検査法の最新の動向について、日本食品微生物学会誌, 30 (2), 89-92, 2013
- 2) Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. and Griffin, P. M.: Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. Emerg. Infect. Dis., 17, 7-15, 2011
- 3) 「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」平成 24 年 12 月 17 日食安監発 1217 第 1 号