

腸管出血性大腸菌感染症患者糞便中の原因菌量と 酵素基質培地クロモアガー STEC の有用性

¹⁾ 安城更生病院臨床検査技術科, ²⁾ 愛知県厚生連医療事業部医務課, ³⁾ 関東化学株式会社

巽 則雄¹⁾ 近藤 好¹⁾ 山田 貴子¹⁾
杉浦 康行¹⁾ 犬塚 和久²⁾ 金子 孝昌³⁾

(平成 23 年 5 月 25 日受付)

(平成 23 年 9 月 9 日受理)

Key words: CHROMagar STEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

要 旨

我々は、DHL 寒天培地にて腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) を検出できなかった EHEC 感染症患者を経験した。本患者便中の腸内細菌数に対する EHEC 菌数を調査したところ 1.7% であり、5 コロニー釣菌法での検出確率は 8.1% と低率となった。一方、近年開発された EHEC 検出用酵素基質培地クロモアガー STEC では、釣菌検出確率が 100% と高率であった。主要 2 血清群 (O157, O26) を添加した *E. coli* 菌液における添加回収試験成績は、O157 添加菌液にて DHL が $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL、クロモアガー STEC が 10^2 CFU/mL、O26 添加菌液では DHL で 10^3 CFU/mL、クロモアガー STEC で 10^2 CFU/mL まで検出可能であった。EHEC 感染症患者の糞便中 EHEC 菌量が低いことを想定すると、クロモアガー STEC のような EHEC スクリーニング培地の利用が有用であると推察された。

[感染症誌 85: 664~669, 2011]

序 文

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) は、ヒトの重症感染症を引き起こす腸管病原性の毒素産生菌であり、ベロ毒素 (Vero toxin; VT, または Shiga toxin; Stx) を産生し、下痢症や出血性大腸炎、それに続発して起きる溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、脳炎等の腸管外へも関与する^{1)~4)}。しかし、EHEC 感染患者の糞便中の菌数は非常に低いことが報告されており⁵⁾⁶⁾、微生物検査学的に大きな問題と考えられる。

検査室における本菌の検出検査には、BTB ならびに DHL 寒天培地等の分離培地が汎用されているが、目的菌を釣菌するには多大な労力を要する。当院では愛知県臨床検査値統一化ガイドライン「日常微生物検査における標準手引書」⁷⁾を参考に、分離培地より *E. coli* を疑うコロニーを 5 コロニー以上釣菌し、エンテロヘモリジン血液寒天培地による溶血性を指標としたスクリーニング法⁸⁾⁹⁾を導入し検査を行っている。しか

し、EHEC 感染患者であることを疑うにもかかわらず、分離培地より EHEC の検出が困難な場合もあり、どれだけのコロニーを分離培地より釣菌すべきか、検査の現場では判断に苦慮している。この度、酵素基質を利用した鑑別分離培地であるクロモアガー STEC を評価する機会を得て、本培地の EHEC 検出能、添加回収能において知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 供試菌株ならびに供試検体

本検討に供試した標準菌株ならびに当院臨床分離株 138 株を Table 1 に示す。EHEC O157: 68 株, O26: 19 株, O111: 7 株, その他の血清型の EHEC 5 株, *E. coli* を含むその他の細菌: 39 株を Tryptone Soy Agar (TSA; 関東化学) にて純培養し、発育試験に供した。

供試検体として、平成 22 年 7 月 1 日から平成 22 年 8 月 31 日までに当院にて細菌性食中毒菌検索目的にて提出された糞便 355 検体を用い、臨床材料を用いた比較検討試験を実施した。

2. EHEC 分離株ならびにその他の腸内細菌を用いた発育試験

別刷請求先: (〒446-8602) 愛知県安城市安城町東広畔 28 番地
安城更生病院臨床検査技術科 巽 則雄

Table 1 Strains tested

Strains	Serover	Origin	VT	N
EHEC	O157:H7	ATCC 35150 Isolates	VT1, 2	1
			VT1, 2	14
			VT2	12
			VT1	2
	O157: H-	Isolates	VT1, 2	4
			VT2	3
	O157: H NT	Isolates	VT1, 2	20
			VT2	11
			VT1	1
	O26: H11	Isolates	VT2	7
	O26: H-	Isolates	VT2	3
	O26	Isolates	VT2	9
	O111: H-	Isolate	VT1	1
	O111	Isolates	VT1	6
	O103	Isolate	VT1	1
	O121	Isolate	VT2	1
	OUT	Isolates	VT2	3
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	—	1
	O26: H-	Isolate	—	1
	O157: H-	Isolate	—	1
<i>Citrobacter freundii</i>		ATCC8090	—	1
<i>Enterobacter cloacae</i>		ATCC13047	—	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		NCTC9636	—	1
<i>K. oxytoca</i>		ATCC13182	—	1
<i>Proteus mirabilis</i>		ATCC29906	—	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC27853	—	1
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC6633	—	1
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC25923	—	1
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC29212	—	1
<i>Candida albicans</i>		ATCC10231	—	1
Other bacteria*		Isolates	—	26
Total				138

NT, Not tested; OUT, O-untypeable

**E. hermannii* (1), *E. fergusonii* (2), *C. freundii* (2), *E. cloacae* (2), *E. tarda* (2), *K. pneumoniae* (2), *K. oxytoca* (2), *P. mirabilis* (2), *P. rettgeri* (2), *P. aeruginosa* (2), *B. subtilis* (2), *S. aureus* (2), *E. faecalis* (2), *C. albicans* (1)

前述の供試菌株純培養コロニーを、滅菌生理食塩水にて McFarland No. 0.5 に調整し、10μL 定量白金耳を用いてクロモアガー STEC へ画線塗抹した。37℃にて 24 時間ならびに 48 時間培養後、コロニー所見を観察した。

3. 臨床糞便検体を用いた比較検討試験

当院にて細菌性食中毒菌検索目的で検査依頼のあった糞便 355 検体を用い、クロモアガー STEC と DHL 寒天培地へ画線塗抹し EHEC を疑うコロニーの出現率を調査した。なお、両培地に発育した EHEC を疑うコロニーは、*E. coli* の同定、エンテロヘモリジン産生性、病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）による O 型別および VT 産生性を調査した。*E. coli* の同定は、性状確認培地である TSI 寒天培地（極東製薬）、SIM 培地（極東製薬）、VP 半流動培地（栄研化学）およびシモンズ・クエン酸ナトリウム培地（栄研化学）に接種し同定した。エンテロヘモリジン産生性は、エン

テロヘモリジン血液寒天培地（関東化学）にスポット接種して判定した。VT 産生性は、デュオパス VT（MERCK）および Paton らの報告^{10）}した PCR 法にて確定した。

4. DHL 寒天培地からの検出が困難であった EHEC O26 感染患者便中の目的菌釣菌確率調査

DHL 寒天培地では検出できず、クロモアガー STEC にて EHEC O26 が検出された EHEC O26 感染患者便を用い、再度、両培地へ画線塗抹し 37℃にて 24 時間培養した。DHL 寒天培地にて *E. coli* を疑うコロニーならびにクロモアガー STEC での藤色コロニーはできる限り釣菌し、前述と同様に目的菌の同定を行った。また、目的菌の釣菌確率は Iijima らの方法^{11）} $[D=1-(1-P)^n]$ を用い算出した。

5. EHEC 菌株添加 *E. coli* 浮遊液を用いた検出能試験

DHL 寒天培地で典型的な赤色コロニーを形成する

Table 2 EHEC colony observation on CHROMagar STEC and Enterohemolysin Agar

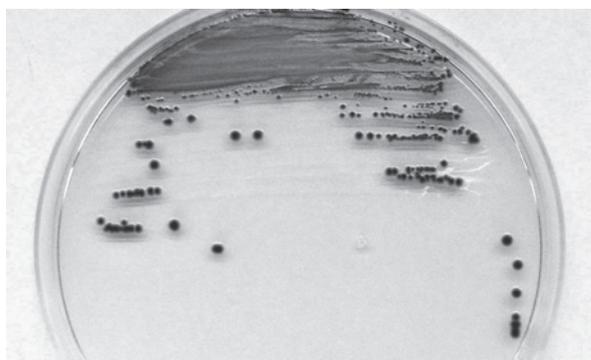
Strain	Colony observation				No growth	Enterohemolysis	
	Mauve MUG (-)	Mauve, MUG (+)	Blue	Clear		Pos	Neg
EHEC O157	68					68	0
EHEC O26		19				19	0
EHEC O111		7				7	0
EHEC O103		1				1	0
EHEC O121		1				1	0
EHEC OUT		2			1	3	0
Other <i>Escherichia coli</i>					3	0	3
Other bacteria			2*	1**	41	0	44

MUG, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide; -, negative; +, positive; OUT, O-untypable

* *Enterobacter cloacae* (2), ** *Escherichia hermannii* (1)

Fig. 1 Representative observation on CHROMagar STEC

EHEC O157 ATCC 35150 on CHROMagar STEC after 24-hour incubation at 37°C.



VT非産生 *E. coli* 臨床分離株5株を各々 TSA にて 37°C, 18時間純培養した. 本純培養株を各々滅菌生理食塩水にて McFarland No. 0.5 に調整, 次いで等量混合, 滅菌生理食塩水にて 10^3 希釈して約 10^5 CFU/mL の基礎 *E. coli* 浮遊液を調整した. 基礎 *E. coli* 浮遊液へ評価株 (EHEC O157 ATCC 35150 および臨床分離株, EHEC O26 臨床分離株) を $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL となるようにクロモアガー STEC および DHL 寒天培地へ接種し, 評価株の添加回収試験を実施した. すなわち, 評価株を滅菌生理食塩水にて McFarland No. 0.5 に調整し, 10^{-2} から 10^{-5} に希釈, 各 10 倍段階希釈液 0.1 mL と基礎 *E. coli* 浮遊液 0.9 mL とをミキサーでよく均一化後, 10 μ L 定量白金耳を用いた画線塗抹培養に供した. 37°C にて 18 時間培養後のコロニー所見を観察した. 疑わしいコロニーが得られた際は 30 コロニーを目標にできる限り釣菌し, 前述と同様に目的菌の同定試験を行った. なお, 評価株の各段階希釈液は 10 μ L ずつ Tryptone Soya Agar (関東化学) へ滴下し菌数算定を行った¹²⁾.

結 果

1. 菌株を用いた評価培地のコロニー所見ならびに発育阻止能試験成績

材料と方法の 2 に準じて, 当院保存 EHEC 98 株ならびに EHEC O157 ATCC35150 のコロニー所見を評価したところ, クロモアガー STEC については 98 株 (99.0%) が典型的なコロニー所見 (藤色) であった (Table 2, Fig. 1). なお, EHEC O157 は UV 照射により蛍光を認めなかったが, それ以外の EHEC は蛍光を認めた. 非発育を示した EHEC は市販の病原大腸菌免疫血清では O 型別できない株であった. またコロニー所見については, 培養時間 24 時間と 48 時間で色調差を認めなかった. EHEC 以外の供試菌株は 41 株 (93.2%) が非発育を示し, 発育の認められた *Enterobacter cloacae* 2 株は青色, *Escherichia hermannii* 1 株は無色のコロニーを形成し鑑別可能であった. DHL 寒天培地では, いずれの EHEC も *E. coli* 様の赤色コロニーを形成したが, EHEC 以外の *E. coli* についても同様に赤色コロニーを形成するため両者の区別はできなかった.

2. 臨床糞便検体を用いた比較検討試験成績

細菌性食中毒菌検索目的で提出された患者糞便検体 355 検体をクロモアガー STEC ならびに DHL 寒天培地で分離培養し, EHEC を疑うコロニーの出現頻度を Table 3 に示す. 本検討中に EHEC O157 が 16 件, EHEC O26 が 5 件, 合計 21 件の EHEC 感染が確認された. うち EHEC O26 検出事例の 1 件は, クロモアガー STEC で純培養状に検出されたが, DHL 寒天培地からは検出できなかった. 各々の培地にて EHEC を疑った検体からの EHEC 検出率 (的中率) は DHL 寒天培地で 5.6% (20/355), クロモアガー STEC で 51.2% (21/41) であった. クロモアガー STEC で偽陽性を示した 20 検体から分離された藤色コロニー形成菌株は, すべて *E. coli* であり, かつエンテロヘモリジン産生性は認めなかった.

Table 3 Accuracy ratio of DHL Agar and CHROMagar STEC in EHEC infection

Colonies:	Stool samples for recognized		Accuracy ratio (%)
	EHEC-like	EHEC	
DHL agar	355	20	5.6
CHROMagar STEC	41	21	51.2

n = 355

Fig. 2 Colonies plated out from EHEC O26 stool specimens
Left: DHL agar. Right: CHROMagar STEC

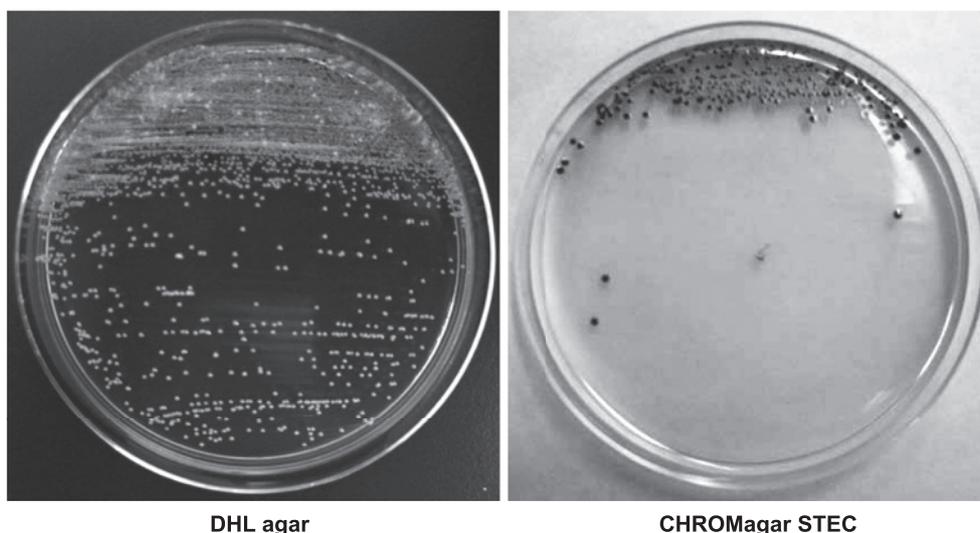


Table 4 Detection ratio of DHL Agar and CHROMagar STEC in EHEC O26 fecal samples

Culture media	No. of colonies		Existing probability (%)	Detection ratio (%)*
	EHEC-like	EHEC O26		
DHL agar	60	1	1.7	8.1
CHROMagar STEC	42	42	100	100

*Detection ratio calculated by Iijima method¹¹⁾ (n = 5 strains).

3. DHL 寒天培地からの検出が困難であった EHEC O26 感染患者便中の目的菌釣菌確率調査成績

先の評価にて DHL 寒天培地から EHEC を検出することができなかった EHEC O26 感染患者便を用い、材料と方法の 4 に準じて目的菌の釣菌確率調査を行った。DHL 寒天培地およびクロモアガー STEC の分離培養所見を Fig. 2 に、糞便中腸内細菌に占める目的菌の存在率を Table 4 に示す。本患者糞便中の腸内細菌に占める EHEC O26 存在率は 1.7% (1/60) と低く、DHL 寒天培地において釣菌数を 5 コロニーと仮定した目的菌釣菌確率は低値 (8.1%) となった。一方、クロモアガー STEC における目的菌釣菌確率は 100% であった。

4. EHEC 菌株添加 E. coli 浮遊液を用いた検出能試験成績

EHEC 菌株を添加した E. coli 浮遊液 (疑似陽性検体) を用いて、材料と方法の 5 に準じて目的菌の検出能を比較検討した成績を Table 5 に示す。クロモアガー STEC における検出可能菌濃度は、EHEC O157, EHEC O26 とともに 10²CFU/mL にて検出可能であった。また、目的菌釣菌確率はいずれの濃度でも 100% となり非常に高かった。DHL 寒天培地では疑わしいコロニーが多く、目的菌の釣菌確率は低く、いずれも約 10³~10⁴CFU/mL 以上存在しないと検出されなかった。以上の結果より、先の評価にて DHL 寒天培地から EHEC を検出することができなかった EHEC O26 感染患者便中の EHEC O26 菌量は 10²~10³CFU/

Table 5 Detection limit for EHEC in simulated samples inoculated with EHEC O157 or O26

	Concentration (CFU/mL) of EHEC O157 ATCC35150				Detection limit (CFU/mL)
	4.3×10^5	4.3×10^4	4.3×10^3	4.3×10^2	
DHL agar	25/30 17/30	15/30 17/30	3/30 2/30	ND/30 ND/30	$>10^3$
CHROMagar STEC	30/30 30/30	30/30 30/30	30/30 30/30	9/9 8/8	$>10^2$
	Concentration (CFU/mL) of EHEC O157 isolate				Detection limit (CFU/mL)
	3.0×10^5	3.0×10^4	3.0×10^3	3.0×10^2	
DHL agar	22/30 14/30	7/30 11/30	ND/30 ND/30	ND/30 ND/30	$>10^4$
CHROMagar STEC	30/30 30/30	30/30 30/30	30/30 30/30	1/1 NG	$>10^2$
	Concentration (CFU/mL) of EHEC O26 isolate				Detection limit (CFU/mL)
	3.4×10^5	3.4×10^4	3.4×10^3	3.4×10^2	
DHL agar	21/30 24/30	10/30 11/30	10/30 10/30	ND/30 ND/30	$>10^3$
CHROMagar STEC	30/30 30/30	30/30 30/30	30/30 30/30	6/6 2/2	$>10^2$

ND, Not detected; NG, Not growth

mLであった推察された。

考 察

我々は、酵素基質を利用したクロモアガー STEC の有用性について検討した。その結果、クロモアガー STEC は EHEC 検出能において優れた成績を得た。本邦にて主に検出報告されている EHEC O157, O26 および O111 については、すべて典型的な藤色コロニーを形成した。一方、供試した腸内細菌のすべてが非発育もしくはその他の色調で明瞭に区別された。その他の EHEC 血清型の検討は少ないが、当院保存 EHEC 菌株のうち 1 株 (O 型別不能株) が非発育であった。実際の EHEC 検査依頼検体を用いての比較検討では、355 検体より EHEC O157 (16 検体) ならびに EHEC O26 (5 検体) が検出され、いずれの EHEC 感染患者においてもクロモアガー STEC から純培養状に EHEC が分離された。なお、供試検体 355 検体のうち 20 検体より藤色コロニーを形成する *E. coli* が検出されたが、偽陽性率は低く (5.6%) 実務上問題ないと考えられた。一方、DHL 寒天培地については、すべての検体で *E. coli* 様コロニーが形成され、続く EHEC 疑いのコロニー釣菌に苦慮した。また、EHEC O26 感染患者便から目的菌の検出できない事例が認められた。Karmari ら⁵⁾によると、EHEC 感染により HUS を併発している患者便 16 検体において、MacConkey 寒天培地に出現した乳糖分解菌を調べたところ、20 コロニー釣菌しても検出できない事例が 5 件 (31.3%) あったと報告している。我々の検討患者も、60 コロニー釣菌してかろうじて 1 コロニーが EHEC となる

感染患者であった。腸内細菌中に存在する EHEC の割合 [P] を 1/60 (1.7%) と仮定し、Iijima らの報告¹¹⁾ した目的菌検出確率の計算式 $[D=1-(1-P)^n]$ に従い確率 [D] を算出すると、釣菌数 [n] を 5 コロニーとした場合の検出確率は 8.1% となり理論上検出困難と判断された。疑似陽性検体を用いた検討でも *E. coli* 浮遊液中の EHEC 存在率が低くなるほど、DHL 寒天培地では検出が困難となったことから裏付けられた。また、DHL 寒天培地からの検出が困難であった EHEC O26 感染患者便中の EHEC O26 の菌量は、疑似陽性検体を用いた検討成績と類似する濃度である $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL であったと推察された。

以上の成績から、原因菌量の少ない患者が認められることを考慮し、クロモアガー STEC は主要 EHEC 血清型の選択分離培地として非常に有用であると推察された。一方で、本培地上で発育しない EHEC も確認された。この非発育を示した O 型別不能株は、セフィキシムおよび亜テルル酸を選択剤として加えた分離培地 CT 加ソルビトールマッコンキー (CT-SMAC) 寒天培地にも発育を示さなかった (data not shown)。恐らく、クロモアガー STEC には選択剤としてセフィキシムか亜テルル酸に類似した物質が用いられており、それらに感受性の菌株は発育しないのではないかと推測される。Fukushima ら¹³⁾ は、*eae*-positive EHEC にて CT-SMAC 寒天培地の有用性を報告しているが、一部、亜テルル酸への感受性株があり、CT-SMAC 寒天培地で発育しない株 (6.0%) があることを報告している。これらのことから、DHL 寒天培地や BTB 寒

天培地等の選択性の低い分離培地を併用することも必要であると考えられる。

多くの血清型の EHEC が報告されている現在、血清型にとらわれず、培地に用いられる選択剤の影響を受けず、VT 産生菌を選択分離できるような培地開発が望まれる。

文 献

- 1) Edelman R, Karmali MA, Fleming PA : From the National Institutes of Health. Summary of the International Symposium and Workshop on Infections due to Verocytotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis 1988 ; 157 : 1102—4.
- 2) Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H : The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J Infect Dis 1985 ; 151 : 775—82.
- 3) Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE : Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* : a two-year prospective study. J Infect Dis 1988 ; 157 : 1054—7.
- 4) Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* : Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983 ; 308 : 681—5.
- 5) Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS : Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed culture by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. J Clin Microbiol 1985 ; 22 : 614—49.
- 6) 福島 博, 角森ヨシエ : リアルタイム PCR 法による食中毒菌の迅速スクリーニングの検討. 感染症誌 2005 ; 79 : 644—55.
- 7) 山口育男, 内藤 淳, 清水聖一, 笹野正明, 濱岸真奈美, 羽佐田香代 : 愛知県臨床検査値統一化ガイドライン「日常微生物検査における標準手引書」第 1 版. 山菊印刷株式会社, 愛知, 2006 ; p. 13.
- 8) 木村晋亮, 小崎明子, 佐々木富子, 小松原彰 : Beutin 血液寒天培地での溶血性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 1998 ; 72 : 223—30.
- 9) 金子孝昌, 小川正之, 金子通治 : エンテロヘモリジン血液寒天培地での溶血性を指標とした腸管出血性大腸菌のスクリーニング検査法について. 日臨腸微誌 2002 ; 4-5 : 85—8.
- 10) Paton AW, Paton JC : Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. J Clin Microbiol 1998 ; 43 : 2944—7.
- 11) Iijima Y, Tanaka S, Miki K, Kanamori S, Toyokawa M, Asari S : Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens : low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. Diagn Microbiol Infect Dis 2007 ; 58 : 303—8.
- 12) 坂崎利一 : 培地の試験法. 新細菌培地学講座 (上). 近代出版, 東京, 1978 ; p. 201—10.
- 13) Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M : Selective isolation of *eae*-positive strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1684—7.

Etiological Bacterial Level in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection Feces and Chromogenic Culture Medium CHROMagar STEC Usefulness

Norio TATSUMI¹⁾, Konomi KONDOU¹⁾, Takako YAMADA¹⁾, Yasuyuki SUGIURA¹⁾, Kazuhisa INUZUKA²⁾ & Takamasa KANEKO³⁾

¹⁾Department, Anjo Kosei Hospital, ²⁾Aichikouseiren, ³⁾Kanto Chemical Co., Inc.,

We report a case of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection in which EHEC was not detected by culture on DHL agar medium. The proportion of EHEC bacterial count to enterobacterial count in feces was 1.7%, and the detection probability by 5-colony angling was low (8.1%). The probability of angling detection using CHROMagar STEC, a chromogenic medium for detecting EHEC, was high (100%). An additional and collection test was done using *E. coli* bacterial solutions to which two main sera groups—O157 and O26 were added. The maximum detectable level in the bacterial solution with O157 was 10³—10⁴CFU/mL in DHL and 10²CFU/mL in CHROMagar STEC. Bacterial solution levels with O26 were 10³CFU/mL in DHL and 10²CFU/mL in CHROMagar STEC. Assuming that the EHEC bacterial amount in feces of those with EHEC infection is low, we speculated that CHROMagar STEC may be useful as on EHEC screening medium.