

腸管出血性大腸菌感染症の発生状況と検査法の変遷 —酵素基質培地の導入—

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections in Japan and the progress for the successful detection of EHEC in food - Usefulness of chromogenic culture media-

東京医科大学 微生物学分野 兼任教授 **甲斐 明美**
Akemi Kai, PhD. (Concurrent Professor)
Department of Microbiology, Tokyo Medical University



キーワード

腸管出血性大腸菌, 検査法, 酵素基質培地

01 | はじめに

腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)は、ベロ毒素(Verotoxin, VT)/志賀毒素(Shiga toxin, Stx)を産生することで特徴付けられることから、本菌はベロ毒素産生性大腸菌(Verotoxin-producing *E. coli*, VTEC)、あるいは志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)と呼ばれる。「腸管出血性大腸菌」という呼称は、本菌の発見となった1982年の初発事例¹⁾において、患者の症状が激しい出血性下痢(all blood and no stool)であったという臨床症状に照らして与えられた。現在、本菌による感染症・食中毒は腸管出血性大腸菌感染症・食中毒と称されることが多い。

病原大腸菌(下痢原性大腸菌)の検査では、飲用水から下痢原性大腸菌を分離することはできても、食品からの分離はまず不可能と考えられていた。しかし、O157の検査を契機に検査法は著しく進展し、現在では食品からEHECを分離することが求められる状況となっている。その進歩の3本柱は、PCR法、免疫磁気ビーズ法、そして酵素基質培地の導入である。本稿では、EHECの歴史を振り返りながら、進歩して来た検査の過程について分離培地を中心に辿ってみたい。

02 | わが国における腸管出血性大腸菌O157感染症の発生状況

1. 腸管出血性大腸菌O157の発見とわが国での状況

1982年に米国でビーフハンバーガーを原因とした出血性下痢(hemorrhagic colitis)の集団事例が2件発生し、その原因菌として大腸菌の稀な血清型であるO157が報告¹⁾された。続いてカナダでも2件の集団事例²⁾が発生、その後欧米を中心に本菌による下痢症が発生したことから非常に注目された。本菌に関する研究も活発に行われるようになり、1987年にはカナダのトロントで本菌に関する最初の国際学会(An International Symposium and Workshop on

Verocytotoxin-(Shiga-like Toxin) Producing *Escherichia coli* (VTEC) Infections)が開催された。

一方、わが国における本菌下痢症の最初の報告は、1984年に東京都内の小学校で発生した血清型O145:NMによる集団下痢症事例(患者100名)³⁾である。さらに、1986年には愛媛県の乳児院で血清型O111:NMによる集団事例(患者22名、死者1名)⁴⁾が発生した。

O157の最初の分離は、1984年に大阪で発生した兄弟感染事例であることが小林ら⁵⁾による「さかのぼり」調査により明らかにされた。それ以降もO157の分離例は地方衛生研究所(地研)等から報告され、1979年～1990年までの12年間に散発あるいは家族内感染事例として少なくともO157が36件、O157以外のEHECが26件(O26:11件、O111:10件、O128:3件、O143:1件、OUT:1件)報告されている(表1)。

表1 わが国における散発事例および家族内感染事例からのVTEC 検出状況

年	検出事例数	血清型				
		O157:H7/-	O26:H11/-	O111:H-	O128:H2	その他
1979-83	3	-	-	3	-	-
1984	6	2	2	1	1	-
1985	8	6	1	-	1	-
1986	3	2	-	-	-	1(OUT)
1987	15	9	4	2	-	-
1988	5	1	-	2	1	1(O143)
1989	5	3	2	-	-	-
1990	17	13	2	2	-	-
計	62	36	11	10	3	2

しかし、本菌感染症が我が国で広く知られる様になったのは、1990年に埼玉県浦和市の幼稚園で発生したO157集団事例⁶⁾であろう。この事例では、患者319名、入院52名が確認され、2名の園児が死亡した。この事例を契機に、国立感染症研究所(感染研)は地研からEHEC/VTEC検出情報を収集し、1991年1月からその情報を、感染研が月報として発行する病原微生物検出情報(IASR)に掲載するようになった。1991年には大阪市(保育園:患者161名)、1993年には東京(小学校:患者165名)、1994年には奈良県(小学校:患者250名)で大規模なO157集団事例が発生し、危機感を覚える関係者も増えて

いた。

そして、1996年5月に岡山県邑久町(小学校・幼稚園)、6月に岐阜市(小学校)、広島県東城町(小学校)、岡山県新見市(小学校・中学校)、東京都(会社)、7月に群馬県境町(小学校)で相次いで患者100人以上のO157による大規模集団事例^{7,8)}が発生した。さらに大阪府堺市で、学校給食を原因として患者8,000人(死者3名)にも及ぶこれまでに類を見ない大規模なO157集団食中毒が発生したことで、大きな社会問題となった。厚生省は同年8月6日に「腸管出血性大腸菌感染症」を伝染病予防法に基づく指定伝染病に指定した。また1997年食品衛生法施行規則の一部改正も行われ、病因物質の種別において、「腸管出血性大腸菌」として「その他の病原大腸菌」と分けて分類されることになった。この様な経過の中で、本菌に関する調査・研究が一挙に重要性を増し、活発に行われるようになった。

2. 腸管出血性大腸菌感染症・食中毒の発生状況

1996年以降のEHEC感染症報告数を図1に示した。最近の報告数は、2013年4,045件、2014年4,156件、2015年3,565件で、2000年以降3,500件を上回る状況が続いている。一方、厚生労働省(厚労省)に報告された食中毒事件数は、2013年13件、2014年25件、2015年17件で、感染症報告数に比べて非常に少ないことが分かる(図2)。

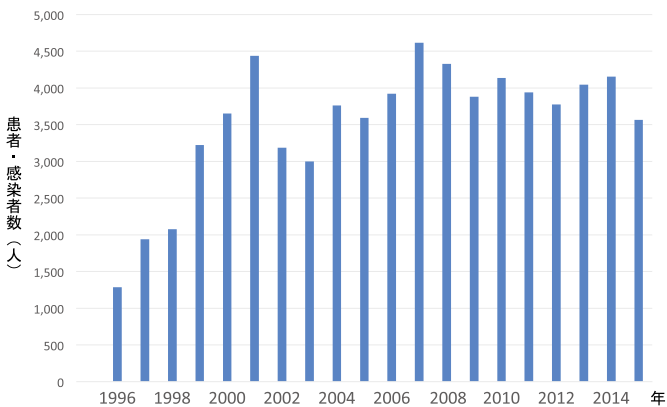


図1 腸管出血性大腸菌感染症の患者及び感染者報告数
1999年3月31日までは伝染病統計(厚生省)
1999年4月1日以降は感染症発生動向調査
(国立感染症研究所)から作成

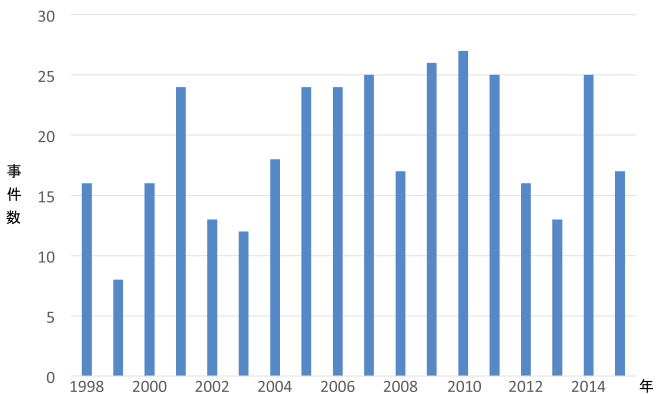


図2 腸管出血性大腸菌による食中毒事件数(全国)
食中毒発生状況(厚生労働省)から作成

この要因の一つは、EHECの感染形態が「食品媒介」と、食品を介さない、いわゆる「感染症(ヒト-ヒト感染)」の両面を持つことである。表2に、2013年～2015年の3年間に発生したEHEC感染症集団事例(菌陽性者10名以上の事例)^{9,10,11)}の感染形態を血清群ごとに示した。

表2 腸管出血性大腸菌感染症集団事例とその感染形態
(2013年～2015年に発生した菌陽性者10名以上の事例)

血清群	事例数	感染形態			
		ヒト-ヒト感染	食品媒介	動物由来	不明
O157	18	6	10	1	1
O26	28*	26*	1		1
O111	3	3			
O76	1	1			
O103	4*	4*			
O121	1	1			
O145	3	3			
計	56(100%)	42(75.0%)	11(19.6%)	1(1.8%)	2(3.6%)

* 内2事例は、O26とO103の混合感染事例
病原微生物検出情報(国立感染症研究所)から作成

56事例中ヒト-ヒト感染症事例が42事例(75.0%)、食品媒介事例は11例(19.6%)、動物由来1事例(1.8%)、不明2事例(3.6%)である。菌陽性者10名以上の中規模事例では食品を介さない「感染症」事例が非常に多いことが分かる。なかでも、O157による事例では食品媒介事例が55.6%、感染症事例が33.3%と両者によるものが認められるが、血清群O26による事例は保育所などで発生する「感染症事例」が非常に多い。

一方、2013年～2015年の3年間に55件の食中毒事例が厚生労働省に報告されているが、患者数からみた発生規模では、患者数10名未満の事例が43件(78.2%)、10～30名が8件(14.5%)、51～100名が3件(5.5%)、100名以上が1件(1.8%)である(表3)。

表3 腸管出血性大腸菌による食中毒の患者規模(2013年～2015年)

発生年	事例数	患者数からみた規模別事例数				
		< 10*	10-30	31-50	51-100	> 100
2013年	13	10	3			
2014年	25	19	3		2	1
2015年	17	14	2		1	
計	55	43	8		3	1
(%)	(100)	(78.2)	(14.5)		(5.5)	(1.8)

* 患者数

EHECの食品媒介事例(食中毒)では、大きな集団事例も発生しているが、全体的には患者数10名以下の小規模事例が多い。また、感染源が特定できないまま、感染事例として報告された例も数多く存在すると推定される。

3. 分離される腸管出血性大腸菌の血清群

2013年～2015年に分離されたEHECの血清群^{9,10,11)}を表4にまとめた(分離株の血清群が報告された事例の集計であるため、感染症報告数とは一致しない)。

表4 ヒトから分離された腸管出血性大腸菌の血清群(2013年～2015年)

血清群	分離数(%)				
	2013年	2014年	2015年	計	
O157	1,077 (51.7)	1,355 (59.2)	1,040 (60.9)	3,472 (57.1)	
O26	529 (25.4)	502 (21.9)	363 (21.2)	1,394 (22.9)	
O111	151 (7.2)	78 (3.4)	52 (3.0)	281 (4.6)	
O103	98 (4.7)	93 (4.1)	71 (4.2)	262 (4.3)	
O121	91 (4.4)	67 (2.9)	33 (1.9)	191 (3.2)	
O145	49 (2.3)	94 (4.1)	23 (1.3)	166 (2.7)	
O91	23 (1.1)	15 (0.7)	30 (3.0)	68 (1.1)	
その他*	49 (2.3)	60 (2.6)	67 (3.9)	176 (2.9)	
型別不能	19 (0.9)	25 (1.1)	30 (1.8)	74 (1.2)	
計	2,086 (100)	2,289 (100)	1,709 (100)	6,084 (100)	

* O1, O5, O6, O8, O15, O18, O19, O25, O28, O43, O51, O55, O57, O63, O65, O69, O71, O74, O76, O78, O79, O82, O84, O98, O100, O101, O109, O110, O113, O115, O119, O128, O136, O142, O146, O152, O156, O159, O163, O165, O168, O172, O175, O176, O177, O181, O183
病原微生物検出情報(国立感染症研究所)から作成

3年間に分離された6,084株中O157が全体の50~60%を占め、次いでO26が20~25%で、この2血清群で全体の77~82%を占めている。これら以外の血清群はいずれも10%未満で、O111、O103、O121、O145、O91などである。その他、1%未満の報告である血清群は47種類に及んでいる。

03 | 腸管出血性大腸菌の検査と分離培地

大腸菌の分離には、わが国ではDHL寒天培地やマッコンキー寒天培地が使われている。しかし、EHEC O157が発見され、その検査用の分離培地として新たな機序に基づく酵素基質培地が導入されるなど分離培地は大きく進展してきた。

1. 初期のEHEC検査法

糞便を対象にしたEHEC O157の検査では、DHL寒天培地やマッコンキー寒天培地を使って分離された菌について同定を行い、血清学的試験によりO157であることを確認後、vero細胞を使った培養細胞法で毒素(VT, Stx)産生性を調べていた。著者らは、1984年に東京で発生したO145による集団下痢症事例の解明に続き、Vero毒素の簡易迅速検査法としてラテックス(Latex)凝集反応法を開発¹²⁾し、その後、市販診断薬(VTEC-RPLA, デンカ生研)として広く使われる様になった。そして、1990年の浦和市の幼稚園でのO157集団事例を契機に、本菌の迅速診断法の標準化と普及を図ることが急務となった。1991年に国立予防衛生研究所(現在の感染研)が中心となり、「腸管出血性大腸菌迅速検査法技術研修会」が全国の地研の職員を対象に開催され、Vero毒素検査法として、PCR法やLatex法の研修が行われ、その成果は1996年のO157大流行時に十分に生かされた。すなわち、菌の産生するVT/Stxの検査法は、培養細胞法に始まり、Latex法、PCR法、イムノクロマト(IC)法と発展・普及してきた。

2. 腸管出血性大腸菌の分離培地の進展

1) マッコンキー寒天培地を基本にした分離培地

最初に発見されたEHEC O157がソルビトール非・遅分解であったことが米国CDC(Centers for Disease Control and Prevention)の研究者¹³⁾により明らかにされたことから、大腸菌の分離に使われていたマッコンキー寒天培地組成中の乳糖をソルビトールに代えたソルビトール・マッコンキー(SMAC)寒天培地がO157の分離培地¹⁴⁾として推奨された。

ソルビトール・マッコンキー寒天培地(OXOID)の組成は、培地1L当たり、ペプトン20.0g、ソルビトール10.0g、胆汁酸塩(No3)1.5g、塩化ナトリウム5.0g、中性紅0.03g、クリスタルバイオレット0.001g、寒天15.0g、pH7.1±0.2である。この組成は、メーカーにより多少異なる。この培地上で大腸菌の93%はソルビトールを分解¹⁵⁾して生ずる酸のため、中性紅の黄色は赤色に変化する。さらに胆汁酸塩から不溶性の胆汁酸が析出し中性紅と強く結合するので集落は鮮やかなレンガ色となる。一方、SMAC寒天培地上でO157は、ソルビトール非・遅分解であるため、18-20時間の培養で半透明の集落となる。

このソルビトール非・遅分解性に着目した分離培地として、日本ではSIB(Sorbitol IPA Bile salts)寒天培地(極東製薬)、

DHL-ソルビトール寒天培地なども考案された。

また、選択性を増強するために、CT選択剤(セフィキシム 0.05mg/Lおよび亜テルル酸カリウム 2.5mg/L)を添加したCT-SMAC寒天培地が広く使われる様になった。

その後、血清型O157のみではなく、O26 やO111の分離も要求される様になり、O157のソルビトール非・遅分解と同じ原理に基づき、O26ではマッコンキー寒天培地の乳糖をラムノースに代えたラムノース・マッコンキー(RMAC)寒天培地、O111ではソルボースに代えたソルボース・マッコンキー(SBMAC)寒天培地が使われる様になった(表5)。

表5 マッコンキー寒天培地を基礎にした分離培地

培地名	対象菌	集落の色			
		O157	O26	O111	腸内細菌
ソルビトール・マッコンキー(SMAC)寒天	O157	白色・透明	赤色	赤色	赤色
ラムノース・マッコンキー(RMAC)寒天	O26	赤色	白色・透明	赤色	赤色
ソルボース・マッコンキー(SBMAC)寒天	O111	赤色	赤色	白色・透明	赤色
ソルビトール-IPA-Bile salts(SIB)寒天*	O157	白色・透明	赤色	赤色	赤色

* 極東製薬

また、CT選択剤を添加したCT-RMAC寒天培地やCT-SBMAC寒天培地も使われる。しかし、RMAC寒天培地上のO26集落やSBMAC寒天培地上のO111集落の特徴は、SMAC寒天培地上でのO157集落の特徴ほど優れたものではなく、類似菌が多数発育することも多いため、より判別力の優れた選択培地が求められる結果となった。

2) 酵素基質培地の登場

酵素基質培地は、菌の産生するβ-ガラクトシダーゼやβ-グルコニダーゼに特異的な酵素発色基質(ガラクトシド誘導体、グルクロニド誘導体)等を分離培地に添加することで、対象とする菌をその色調から識別できるように考案された培地である。さらに目的以外の菌の発育を抑制するためにセフィキシム、亜テルル酸塩、セフスロジン等が添加されている。しかし、酵素基質培地の組成の詳細はメーカー側から公表されていない。

3) 酵素基質培地の特徴

酵素基質培地は、SMAC寒天培地等とは対象集落の発色機構が異なる。EHEC O157 はCT-SMAC寒天培地上では透明の集落であるのに対して、酵素基質培地上ではそれぞれの培地により異なるが、藤色や青色などと色彩に富む集落となり判別し易い。また、所定の時間培養して出現した集落の色は、その後室温に放置して時間が経過しても大きく変化しないのも利点である。

問題は価格がDHL寒天培地やマッコンキー寒天培地の2倍以上と高いことである。しかし、食品の検査においてはEHECをはじめとした下痢原性大腸菌の分離が糞便に比べて非常に難しく、酵素基質培地は非常に有効である。そのため、酵素基質培地は糞便の検査より食品の検査で採用され、広く普及してきた。

酵素基質培地を使う上での主な注意点は、以下のとおりである。

- ① 粉末培地から作製する時には加温溶解が必要であるが、特に過度の加熱を避けることである(オートクレーブは不可)。溶けにくいのが、時々混ぜて十分に溶解する必要がある。

- ② 作製した培地は、遮光して冷蔵保存する。保存期間が長くなると発色が悪くなる。
- ③ 粉末培地の状態でも保存期間が長くなると発色が悪くなる。
- ④ 集落が密集した培地上では、その色調からEHECの存在が示されることもあるが、説明書どおりの色調を示さないこともあるので、この様な場合には必ず再分離が必要である。
- ⑤ 酵素基質培地で示された色調の集落全てがEHECとは限らないので、菌の同定とVT(Stx)産生性の確認は不可欠である。

学)、レインボーアガーO157(Biolog:グンゼ産業)、BCM O157(Biosynth:栄研、Merk)、COLI ID寒天培地(バイオメリュー・バイテック)、フルオロカルトE.coli O157:H7寒天培地(Merk)などがあつた。

その後、O157の次に分離頻度の高いO26の検査が行われる様になり、クロモアガーO26/O157、Vi RX O26寒天培地などが開発・市販された。さらにO111を始め多くの血清群を分離できるという目的で、クロモアガーSTEC、CIX寒天培地、Vi EHEC寒天培地、XM-EHEC寒天培地などが登場した(表6)。それぞれの培地でのEHECの色調等は異なっているが、クロモアガーでは、対象菌の色は基本的に藤色として調製されているので、使用者は覚えやすいというメリットがある。

04 | 食品の腸管出血性大腸菌検査の歩み

1. 血清群 O157 以外のEHEC への対応

1996年(平成8年)のO157大流行当時の検査は、O157を中心に行われていた。1997年当時に使われていた酵素基質培地には、クロモアガーO157(CRHOMagar:関東化

2. 厚労省通知法に基づく食品からのEHEC分離法

これまで厚労省は、食品からのEHEC分離法について、多くの通知を発出してきた(表7)。平成8年(1996年)7月のO157の大流行に伴い急遽出された「病原大腸菌O-157に係る食品等

表6 EHEC分離用の主な酵素基質培地

酵素基質培地*	対象菌	O157	O26	O111	製造元(販売元)
レインボーアガー O157培地	O157	黒色~灰色			Biolog社(セントラル科学貿易)
クロモアガー O157培地	O157	藤色	青色	青色	CHROMagar社(関東化学)
クロモアガー O157TAM	O157	藤色	青色	青色	CHROMagar社(関東化学)
BCM O157寒天培地	O157	黒~濃青色	緑色	緑色	栄研化学
O157:H7 ID 寒天培地	O157	青緑色	紫色	紫色	日本バイオメリュー
Coli ID 寒天培地	O157他	灰色~青色	ピンク~赤紫色	ピンク~赤紫色	日本バイオメリュー
クロモアガー O26/O157培地	O26,O157	赤色	緑色		CHROMagar社(関東化学)
Vi RX O26寒天	O26	黄緑~青緑	青紫~黒色	黄緑~青緑	栄研化学
クロモアガー STEC培地	EHEC	藤色	藤色	藤色	CHROMagar社(関東化学)
CIX寒天培地	EHEC	青色~青緑色	群青色~濃紫色	群青色~濃紫色	極東製薬
Vi EHEC寒天培地	EHEC	無色・中心部褐色	緑色	えんじ色	栄研化学
XM-EHEC寒天培地	EHEC	赤紫~紫色	青紫色	白濁した赤紫~紫色	日水製薬

* 培地 1,000mL 当たり,CT(セフィキシム0.05mg, 亜テリル酸カリウム2.5mg)を添加して使う場合もある。

表7 食品からの腸管出血性大腸菌の検査法に関する厚生労働省通知と分離培地

通知			分離培地
平成8年7月18日	衛食第195号・衛乳第174号	病原大腸菌 O-157に係る食品等の汚染実態調査の実施について	SIB寒天 または SMAC寒天
平成9年7月4日	衛食第207号・衛乳第199号	腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について	・CT-SMAC ・酵素基質添加培地2種類(BCM O157, レインボーアガーO157, クロモアガーO157) ・(SMAC, DHS または SIB も使用することが望ましい)
平成9年7月17日	厚生省生活衛生局食品保健課・乳肉衛生課 事務連絡	腸管出血性大腸菌 O157の検査法の解説について	
平成18年11月2日	食安監発第1102004号	腸管出血性大腸菌 O157及び O26の検査法について	O157用: CT-SMAC, 酵素基質培地1種類(BCM O157, クロモアガーO157, クロモアガーO157TAM, CT-O157:H7 ID寒天, レインボーアガーO157) O26用: CT-RMAC, 大腸菌分離培地1種類(CT-Vi RX O26, ST-SMAC, CT-ColiID)
平成21年6月18日 (平成21年7月15日)	食安輸発第0618002号 食安輸発0715第1号最終改正)	食品衛生法第26条第3項に基づく検査命令の実施について(フランス産ソフト及びセミソフトタイプのナチュラルチーズの腸管出血性大腸菌O103)	SMAC 又は Vi RX O26
平成23年6月3日	食安監発0603第2号	腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について(食肉からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法)	・CT-SBMAC 又は CT-SMAC ・酵素基質培地1種類(クロモアガー-STEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC寒天)
平成23年6月14日	食安輸発0614第1号	腸管出血性大腸菌 O104 の検査法について	SMAC と CT-SMAC, 又は Vi RX O26 と VT-Vi RX O26
平成23年10月3日	食安監発1003号第1号	腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について(食品からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法)	・CT-SBMAC 又は CT-SMAC ・酵素基質培地1種類(クロモアガー-STEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC寒天)
平成24年5月15日	食安監発0515第1号	腸管出血性大腸菌 O26, O111及び O157 の検査法について	O26用: CT-RMAC, O26用酵素基質培地1種類(CT-Vi RX O26, CT-クロモアガーO26/O157, CT-ColiID寒天) または CT-SMAC O111用: CT-SBMAC 又は CT-SMAC, O111用酵素基質培地1種類(クロモアガー-STEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC等)
平成24年12月17日	食安監発1217第1号	腸管出血性大腸菌O26, O111 及び O157の検査法について	O157用: CT-SMAC, O157用酵素基質培地1種類(BCM O157, クロモアガーO157, クロモアガーO157TAM, CT-O157:H7 ID寒天, レインボーアガーO157)
平成24年12月18日	食安輸発1218第4号	腸管出血性大腸菌 O103 の検査法について(チーズからの腸管出血性大腸菌 O103 の検査法について)	SMAC 又は Vi RX O26
平成24年12月18日	食安輸発1218第5号	腸管出血性大腸菌 O104 の検査法について	SMAC と CT-SMAC, 又は Vi RX O26 と CT-Vi RX O26
平成26年11月20日	食安監発1120第1号	腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157の検査法について	・CT-SMAC(O26ではCT-RMAC, O111ではCT-SBMACも可) ・EHEC分離用酵素基質培地1種類(CT-クロモアガー-STEC, CIX, XM-EHEC, Vi EHEC, CT-クロモアガーO26/O157, CT-クロモアガーO157, CT-BCM O157, CT-Vi RXO26, CT-レインボーアガーO157)
平成27年3月24日	厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 事務連絡	食品からの腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145及び O157 の検査法	

の汚染実態調査の実施]では、分離培地として、SIB寒天培地またはSMAC寒天培地が使われたが、翌年の平成9年7月に発出された「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」では、CT-SMAC寒天培地と酵素基質添加培地2種類を使うように指示されている。この時の酵素基質添加培地として、BCM O157、レインボーアガーO157、クロモアガーO157が記載されている。この通知が、酵素基質培地について明記された最初の通知ではないだろうか。それ以降、食品からEHECを分離するための培地としては、①マッコンキー寒天培地を基礎とした培地と②酵素基質培地の併用が採用されている。

その後、血清群O26の感染事例が増加したことから、平成18年11月にO26の検査が追加された。また、平成23年4月に富山県を中心に牛ユッケを原因とした大規模食中毒事件¹⁶⁾が発生し、患者数181名、死者5名、HUS発症者32名と多数の重症者

が確認された。この事例の病因物質がEHEC O111及びEHEC O157であったことから、平成23年6月に「腸管出血性大腸菌O111の検査法について」が発出された。この通知では、分離培地として①CT-SBMAC寒天培地またはCT-SMAC寒天培地、そして②酵素基質培地1種類(クロモアガー-STEC、CIX寒天培地、Vi EHEC、XM-EHEC寒天培地など)が使われている。

さらに、平成26年11月には「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145、O157の検査法について」が発出された。わが国で分離頻度の高い6血清群についての検査法¹⁷⁾を示したものである。ここでは、①CT-SMAC寒天培地と②EHEC分離用酵素基質培地1種類の2系統で分離することを求めている。それぞれの培地の長所・短所を補完する目的と考えられる。直近の検査法の概略を図3に示した。

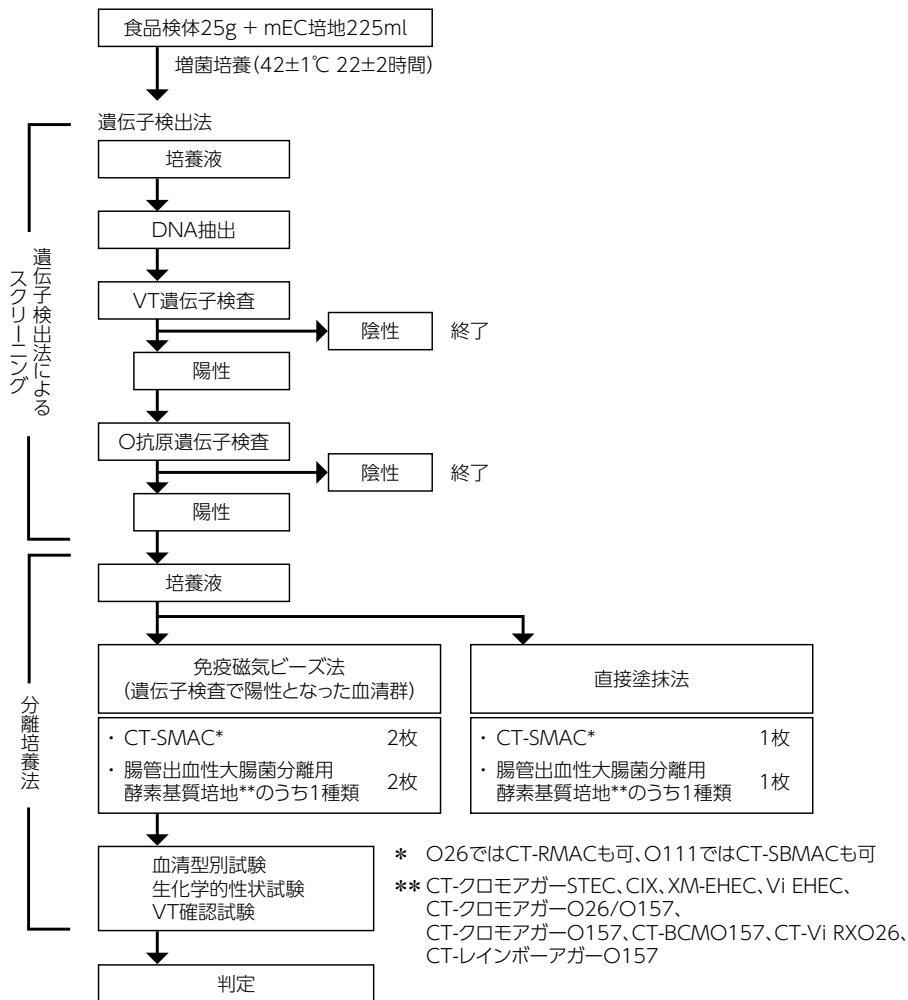


図3 食品からの腸管出血性大腸菌検査法 (O26、O103、O111、O121、O145 及び O157)
(厚労省通知 食安監発1120第1号、平成26年11月20日)

表8 腸管出血性大腸菌による集団事例: 2000年以降の推定原因食品(焼肉, レバ刺し以外)が判明した主な事例, 日本

発生年月	発生地	発生施設	推定原因食品	患者数	死者数	原因菌	
2011年	5月	山形県他	菓子製造業者	だんご, 柏餅	287	1	O157
2011年	6月	富山県・石川県	仕出し屋	千切りキャベツ(仕出し弁当)	19	-	O26:H11
2011年	7月	長野県	小学校	飲用水	15+	-	O103, O121, O145
2011年	8月	日光市	老人保健施設	ナスと大葉のみみ漬	15	-	O157, O145
2011年	8月	千葉市	高齢者福祉施設	卵サンドの具	14	1	O157:H7
2012年	7-8月	北海道	高齢者施設・ホテル	白菜の浅漬	169	8	O157:H7
2014年	4月	福島県他	飲食店・家庭等	馬刺し	88	-	O157:H7
2014年	7月	静岡県	花火大会の出店	冷やしキュウリ	510	-	O157:H7
2015年	5月	福岡県	飲食店・家庭(3グループ)	馬刺し	9	-	O157
2016年	7-8月	沖縄県	飲食店	サトウキビジュース	22	-	O157
2016年	8月	千葉県	老人ホーム(2か所)	きゅうりのゆかり和え*	52	5	O157:H7
2016年	8月	東京都	老人ホーム	きゅうりのゆかり和え*	32	5	O157:H7
2016年	11月	神奈川県, 千葉県他	家庭(Diffuse outbreak)	冷凍メンチカツ	58	-	O157:H7

*) 同一の給食事業者が提供

3. 食品からのEHEC検査の進展

食品からのEHECの検査では、試料(食品)に増菌培地(液体)を加えて増菌後、その増菌培養液中に目的とするEHECが存在するか否かを、EHECが保有するVT(*stx*)遺伝子を対象としたPCR法でスクリーニング試験を行う。PCRで陽性となった培養液について、免疫磁気ビーズ法を用いて対象菌を濃縮する。そして、この濃縮液を選択分離用の寒天培地に塗抹して、EHECを分離するという手法で行われる。この様な検査法の進展によって、食品からEHECを分離できた事例、特に、肉類以外の食品を原因食品と推定できた食中毒事例も増えてきた。2011年以降に発生したEHEC食中毒事例で肉類(焼肉、レバ刺し)以外の食品が原因と推定された主な事例を表8にまとめた。この様に、肉類以外の食品でもEHEC食中毒の原因となっていることが分かり、その対策が急がれている。

05 | おわりに

SMAC寒天培地やCT-SMAC寒天培地などのマッコンキー寒天培地を基礎とした培地、および各種の酵素基質培地が開発された。特に、酵素基質培地は、免疫磁気ビーズ法やPCR法と併せて、食品からの病原菌分離法の進歩に大きく寄与した。そして、これらの検査法は、食品検査を通して広く普及してきた。しかし、糞便の検査においては、酵素基質培地が高価であるために、食品検査ほど使われていない。糞便検査において、O157を対象とする場合にはCT-SMAC寒天培地でかなり効率良く菌を分離することができる。しかし、O157以外の血清群のEHEC検査では、EHEC分離用の酵素基質培地はかなり有効であると考えている。

昨今、細菌検査分野においても遺伝子レベルの検査が進んでいる。しかし、多くの情報を正確に与えてくれる病原菌の分離は不可欠である。それに欠くことのできない分離培地については、その特性をしっかり把握して有効に使うことが重要である。

参考文献

- 1) L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgeson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, M. L. Cohen, *N. Engl. J. Med.* **308**(12), 681-685 (1983).
- 2) W. M. Johnson, H. Lior, G. S. Bezanson, *Lancet* **321**(8314-8315), 76 (1983).
- 3) 伊藤武, 甲斐明美, 齊藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 高橋正樹, 高野伊知郎, 松下秀, 工藤泰雄, 寺山武, 大橋誠, 唐木一守, 山下征洋, 池上重明, 佐藤穂積, 関友次, 加藤喜市, 弘岡淑夫, 山田幸正, 秋山博, 大関哲也, 大芝豊, 山之内淳, 土谷啓文, 綱川敏夫, 田崎達明, *東京衛研年報* **36**, 16-22 (1985).
- 4) 田中博, 大瀬戸光明, 山下育孝, 篠原信之, 井上博雄, 佐々木嘉忠, 柿原良俊, 塚本定三, 湯通堂隆, 奥祐一, 武田美文, *感染症学雑誌* **63**(10), 1187-1194 (1989).
- 5) 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, 神野逸郎, 石井経康, 下辻常介, 田村和満, 坂崎利一, *感染症学雑誌* **59**(11), 1056-1060 (1985).
- 6) 城宏輔, *臨床と微生物* **18**(4), 457-465 (1991).
- 7) 国立予防衛生研究所, *病原微生物検出情報(IASR)* **17**(8), 1-11 (1996).
- 8) 国立感染症研究所, *病原微生物検出情報(IASR)* **19**(6), 1-2 (1998).
- 9) 国立感染症研究所, *病原微生物検出情報(IASR)* **35**(5), 1-4 (2014).
- 10) 国立感染症研究所, *病原微生物検出情報(IASR)* **36**(5), 1-4 (2015).
- 11) 国立感染症研究所, *病原微生物検出情報(IASR)* **37**(5), 1-4 (2016).
- 12) 甲斐明美, 尾畑浩魅, 畠山薫, 五十嵐英夫, 伊藤武, 工藤泰雄, *感染症学雑誌* **71**(3), 248-254 (1997).
- 13) J. G. Wells, B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, G. R. Morris, *J. Clin. Microbiol.* **18**(3), 512-520 (1983).
- 14) S. B. March, S. Ratnam, *J. Clin. Microbiol.* **23**(5), 869-872 (1986).
- 15) P. R. Edwards, W. H. Ewing, in *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd ed. (Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972), pp. 67-72.
- 16) M. Watahiki, J. Isobe, K. Kimata, T. Shima, J. Kanatani, M. Shimizu, A. Nagata, K. Kawakami, M. Yamada, H. Izumiya, S. Iyoda, T. Morita-Ishihara, J. Mitobe, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Sata, *J. Clin. Microbiol.* **52**(8), 2757-2763 (2014).
- 17) 工藤由起子, *食品衛生研究* **65**(3), 13-20 (2015).