

[原 著]

1990年から2012年までに分離された腸管出血性大腸菌の臨床微生物学的特徴

小林 治¹⁾・磯崎将博²⁾・北川真喜³⁾・江成 博^{3) 4)}

¹⁾ 七尾市公立能登総合病院臨床検査部

²⁾ 天草郡市医師会立天草地域医療センター検査部

³⁾ 極東製薬工業株式会社製品開発部

⁴⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

(平成 25 年 12 月 9 日受付, 平成 26 年 9 月 16 日受理)

1990年から2012年までに42人から分離・収集した腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 43株を対象に、血清型別、生化学性状、病原遺伝子 (*stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA*), enterohemolysin (E-hly) 産生性, cefixime-tellurite (CT) 感受性および患者情報 (公立能登総合病院分離株) について検討した。血清群では13血清群と2つの群別不能株に分類され、生化学性状では *E. coli* および EHEC O157 の異型と考えられる lysine 陰性, indole 陰性, β-D-galactosidase 陰性株や同じく *E. coli* の sorbitol 陰性株, 同じく EHEC O157 の β-D-glucuronidase 陽性株が認められた。CT-選択剤添加培地の発育不良株は, *eaeA* 保有 36 株中 O157 2 株, O26 2 株含む 10 株および *eaeA* 非保有 7 株であった。E-hly を指標とする EHEC の検出法の検討では全供試中 1 株を除き *hlyA* を保有することから, 今後も E-hly によるスクリーニングは期待出来る。有症者を対象とする微生物学的検査ではあらゆる血清型や異型性状株への対応も不可欠で, 分離・確認培地の使用方法や鑑別点を見直すべきと考えられた。

Key words: 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 異型性状株, 病原遺伝子, enterohemolysin, potassium tellurite 感受性 O157/O26

序 文

わが国における腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 感染症は1990年、埼玉県の幼稚園内で井戸水を介して死者2名におよぶ集団感染¹⁾によりその存在が知られるようになり、1996年には全国に集団感染が多発した。いずれも O157:H7 が原因であった。一方2011年4月、焼き肉チェーン店で発生した O111:H8 による集団感染は、患者34名が溶血性尿毒症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) を発症し、5名が脳症で死亡するとい

う事件に発展した²⁾。EHEC は O157 を始めとする多種類の血清型により構成され、その病原因子も shiga toxin (Stx) を必須として、関連病原遺伝子は *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *hlyA* 他数種類に及んでいる。EHEC の生化学性状は O157 の sorbitol 分解性, O26 の rhamnose 分解性, O111 の sorbose 分解性などが一般の大腸菌と異なり、陰性となる性状を指標とした培地が開発され、O157 では sorbitol MacConkey 寒天培地 (SMAC) 等が利用されるようになった。さらに、これら主要血清型は cefixime-tellurite (CT) に耐性であり、一般の大腸菌の多くは CT に感受性であることから、発色酵素基質培地を含む CT-選択剤添加培地 (CT 培地) が開発・利用され、鑑別・同定が容易になった。また多くの EHEC は腸管溶血素である enterohemolysin (E-hly) を産生³⁾し、E-hly 陽性株から Stx を検索する目的で開発された EHT 寒天培地 (極東製薬, 東京) やエンテロヘモリジン血液寒天培地 (関

著者連絡先: (〒926-8610) 石川県七尾市藤橋町ア部 6-4
七尾市公立能登総合病院臨床検査部細菌室
小林 治
TEL: 0767-52-8734
FAX: 0767-52-8755
E-mail: noto-saikin@noto-hospital.jp

東化学, 東京) などが用いられている。これらは多くの EHEC を分離するための方策でもある。

日本臨床微生物学会が上梓した腸管感染症ガイドラインでは「EHEC の検出・同定は志賀毒素の検出が最も重要であり血清型や菌種の同定は補助的な手段」と記載されている¹⁾。しかしながら、毒素の検出が必要な株を効率良く分離する手順は明確でない。そのため、ここ十数年で検出・収集した EHEC 株の微生物学的特徴や患者情報から、効率的な毒素検出に至る手順を検討・考察した。

材料と方法

1. 供試菌株

公立能登総合病院および医療関連機関で、1990 年から 2012 年の間に同一症例省く 42 人から分離された 43 株の EHEC を用いた。対照株としては *E. coli* の Stx 陰性株 (ATCC 25922), Stx 産生株 (ATCC 35150; O157:H7) を用いた。公立能登総合病院での分離株については、分離年月・患者の年齢・性別・症状を記載した。

2. EHEC の病原遺伝子と EHT 寒天培地・CT 培地の発育状況

EHEC の病原遺伝子の検索は *stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA* の計 7 種を標的遺伝子として PCR を実施した。PCR に用いたプライマーの塩基配列は伊藤の方法⁵⁾に従った。反応条件は 98°C 5 秒, 55°C 5 秒, 72°C 10 秒を計 30 サイクルで増幅し、その産物を 2% アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色バンドの有無を確認した。E-*hly* の検索は EHT 寒天培地を用い、接種方法は穿刺画線塗抹法で 35°C 18 時間培養後、混濁した溶血帯を認めた株を陽性とした⁶⁾。CT 培地での発育状況は CT-SMAC (極東製薬), CT-Rhamnose MacConkey 寒天培地 (CT-RMAC: 極東製薬) を用いて検討した。接種方法・判定方法は MacFarland #1.0 に調整した菌液の 5 μL をそれぞれの培地全面に均等塗抹し、35°C 18 時間培養後発育状況を確認した。判定基準は培地の 2/3 以上発育を 3+, 1/2 以上 2/3 未満を 2+, 50 CFU 以上 1/2 未満までを 1+, それ以下は CFU で表記した。

3. EHEC の生化学性状

ID32 E API (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), CLIG 寒天培地 (極東製薬) を用いて生化学性状を調べた。その操作方法・判定方法は添付文書に従った。

E. coli, EHEC O157, EHEC O26 の定型的生化学性状を基に異型性状株を調べた。定型的性状の判定

は、陽性率表から ≥90% 陽性を (+), ≤10% 陽性を (-), それ以外は (d) とした⁷⁻⁹⁾。

4. CT 培地発育不良 EHEC O157/O26 株の CT 濃度調整培地を用いた発育能試験

CT 培地に発育不良の O157/O26 の CT 感受性を確認するため、CT 添加濃度を調整した SMAC, RMAC をそれぞれ作成した。内訳は (a): CT 未添加, (b): 0.05 mg/L cefixime (CFIX), (c): 2.5 mg/L potassium tellurite (PT), (d): 1.25 mg/L PT, (e): 0.625 mg/L PT, (f): 0.312 mg/L PT, (g): 0.156 mg/L PT, (h): 0.078 mg/L PT の 8 濃度とした。SMAC には O157 (N-16, N-17), RMAC には O26 (n-7, n-8), 対照として *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35150 を用いた。菌液は滅菌生理食塩水にて MacFarland #1.0 に調整し、菌液の 5 μL をそれぞれの培地に画線塗抹し、35°C 18 時間培養後発育状況 (colony 所見) を調べた。

結 果

1. 菌株・患者情報

Table 1 に排菌者の菌株・患者情報を示す。42 人から分離した 43 株は 13 血清群と 2 つの群別不能株に分類された。公立能登総合病院分離株の患者情報は、無症状 4 人、嘔吐 1 人、腹痛 1 人、下痢 10 人、腹痛・下痢 9 人、腹痛・下痢・血便 6 人、腹痛・下痢・出血性大腸炎 3 人、腹痛・下痢・血便・HUS 1 人 (N-2) であった。13 歳女児から複数の EHEC (N-15, n-14) が分離された。他の菌株の由来は、北海道、埼玉、東京、長野、静岡、大阪、長崎であった。

2. EHEC の病原遺伝子と EHT 寒天培地・CT 培地の発育状況

*stx*₂ は、43 株中 O157 の全 19 株, O121 の全 3 株を含む 29 株が保有した。*eaeA* は 43 株中 O157 の全 19 株, O26 の全 3 株, O111 の全 3 株を含む 36 株が保有した。*eaeA* 陰性株は 7 株であり、これらの全ては CT 培地に発育不良であった。*eaeA* 保有株の内、O157 の 2 株 (N-16, N-17), O26 の 2 株 (n-7, n-8) を含む 10 株は CT 培地に発育不良であった。1079 を除く O157 は CT-RMAC で微かなピンク色を示した。*hlyA* は n-13 を除く全ての株が保有した。*hlyA* 保有の K は、EHT 寒天培地上で 18 時間培養後完全溶血となったため、α-hemolysin (α-hly) 陽性とした。*astA* は O157 19 株中 14 株と n-4 が保有した。*aggR* と *bfpA* 保有株は認めなかった (Table 1)。

3. EHEC の生化学性状の確認

Table 2 に *E. coli*, EHEC O157, EHEC O26 の性状

Table 1. Characteristics of EHEC strains

Strain	Serotype (Group)	Virulence gene ^a			EHT ^{a,b}		CT-SMAC		CT-RMAC		Other information ^d					
		stx1/stx2	ereA	aggR	bfpA	astA	hlyA	E-hly	Growth ^c	Color	Growth ^c	Color	Isolated on:	Location	Age	Sex
ATCC35150	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'96/07	ISHIKAWA	2	M	AP·D·BD
N-1	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'96/07	ISHIKAWA	4	F	AP·D·BD·HUS
N-2	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'96/08	ISHIKAWA	2	M	D
N-3	O157:H7	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'98/07	ISHIKAWA	4	M	AP·D
N-4	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'98/07	ISHIKAWA	22	F	D
N-5	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'98/07	ISHIKAWA	8	M	AP·D
N-6	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'00/06	ISHIKAWA	73	F	AP·D·HC
N-7	O157:H7	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'01/07	ISHIKAWA	55	M	AP·D·BD
N-8	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'01/07	ISHIKAWA	40	F	AP·D·HC
N-9	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'01/08	ISHIKAWA	26	M	AP·D·HC
N-10	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'02/04	ISHIKAWA	2	M	D
N-11	O157:H7	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'02/09	ISHIKAWA	14	M	D
N-12	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'03/06	ISHIKAWA	4	F	AP·D·BD
N-13	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'04/07	ISHIKAWA	5	M	D
N-14	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'06/08	ISHIKAWA	③	F	AP·D·BD
N-15	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'07/10	ISHIKAWA	21	M	D
N-16	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'09/06	ISHIKAWA	47	F	D
N-17	O157:H7	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	UN	HOKKAIDO	UN	UN	UN
1079	O157:H7	+/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Faint pink	'90/12	SAITAMA	UN	UN	UN
OHM	O103:H2	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'96/08	ISHIKAWA	10	M	AP·D
n-1	O91:H14	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'97/08	ISHIKAWA	37	F	NS
n-2	O91:H14	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'97/11	ISHIKAWA	47	F	NS
n-3	O26:H11	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	colorless	'98/10	ISHIKAWA	1	F	AP·D
n-4	O26:H11	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	colorless	'99/05	ISHIKAWA	17	F	AP
n-5	O121:HAag	-/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'01/10	ISHIKAWA	54	F	NS
n-6	OUT	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'03/06	ISHIKAWA	1	M	AP·D
n-7	O26:H11	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'03/06	ISHIKAWA	31	F	AP·D
n-8	O26:H11	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'03/06	ISHIKAWA	1	M	AP·D
n-9	O1	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'04/03	ISHIKAWA	1	M	D
n-10	O145:H-	-/+	+	-	-	-	+	4CFU	Red	4CFU	Red	'05/08	ISHIKAWA	3	M	AP·D
n-11	O103:H-	+/+	+	-	-	-	+	1CFU	Red	1CFU	Red	'05/11	ISHIKAWA	1	M	AP·D
n-12	O91:H14	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'05/12	ISHIKAWA	23	F	NS
n-13	OUT:H19	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'06/01	ISHIKAWA	2	F	Vomit
n-14	O113:H-	-/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'06/08	ISHIKAWA	③	F	AP·D·BD
n-15	O121:H19	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	colorless	'08/08	ISHIKAWA	12	M	AP·D
n-16	O111:H-	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	Red	'09/07	ISHIKAWA	3	M	D
n-17	O111:H-	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	Red	'09/07	ISHIKAWA	5	F	D
n-18	O111:H-	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	Red	'09/07	ISHIKAWA	57	F	AP·D·BD
n-19	O121:H19	-/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	colorless	'12/06	ISHIKAWA	11	F	AP·D·BD
RC	O165	-/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'97	TOKYO	UN	UN	UN
KCC	O128	+/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'97	NAGANO	UN	UN	UN
K	O177:H-	-/+	+	-	-	-	+	3+	colorless	3+	Red	'03/07	OSAKA	UN	UN	UN
S	O165:H-	-/+	+	-	-	-	+	NG	colorless	NG	colorless	'04/09	SHIZUOKA	UN	UN	UN
AM	O169:H-	+/+	+	-	-	-	+	3+	Red	3+	colorless	'06/05	NAGASAKI	UN	UN	UN

a: +; positive, -; negative
 b: α+; α-hemolysin positive
 c: NG; No growth, + w; Weak growth
 d: ISHIKAWA; Noto general hospital, ③; Same patient, AP; Abdominal pain, D; Diarrhea, BD; Bloody diarrhea, HUS; Hemolytic uremic syndrome, HC; Hemolitic colitis, UN; Unknown, NS; Not symptom

Table 2. Typical characteristics of non-EHEC, EHEC O157 and EHEC O26^a

Organism	Biochemical test ^b										
	IND	CIT	PDA	LDC	SOR	RHAM	CEL	LAC	βGAL	αGAL	βGUR
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	+	d	-	+	+	+	+
EHEC O157	+	-	-	+	-	d/+	-	+	+	+	-
EHEC O26	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

^a: Data are those of Farmer III et al⁷, Leclercq et al⁸, Hiramatsu et al⁹

^b: IND; Indole production, CIT; Simons' Citrate, PDA; Phenylalanine deaminase, LDC; Lysine decarboxylase, SOR; Acid from Sorbitol, RHAM; Acid from Rhamnose, CEL; Acid from Cellobiose, LAC; Acid from Lactose, βGAL; β-D-galactosidase, αGAL; α-D-galactosidase, βGUR; β-D-glucuronidase, +; ≥90% positive, -; ≤10% positive, d: 11-89% of strains are positive

Table 3. Biochemical characteristics of EHEC in this study

Serotype (Group)	Strain	ID32 E API ^a								CLIG ^{a, b}			Atypical reaction
		IND	LDC	SOR	RHAM	CEL	βGAL	αGAL	βGUR	CEL/LAC	IND	βGUR	
O157 : H7	ATCC35150	+	+	-	+w	-	+	+	-	K/A	+	-	
O157 : H7	N-1, N-2	+	-	-	+w	-	+	+	-	K/A	+	-	LDC
O157 : H7	N-4	+	+	-	+w	-	-	+	-	K/N	+	-	βGAL/LAC
O157 : H7	1079	+	+	-	-72	-	+	+	+	K/A	+	+	βGUR
O157 : H7	*	+	+	-	+w	-	+	+	-	K/A	+	-	
O1	n-9	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O26 : H11	n-4, n-7, n-8	+	+	+	-	-	+	+	+	K/A	+	+	
O91 : H14	n-2, n-12	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O91 : H-	n-3	-	+	+	+	-	+	+	-	K/A	-	-	IND/βGUR
O103 : H2	n-1	+	+	-	+	-	+	+	+	K/A	+	+	SOR
O103 : H-	n-11	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O111 : H-	n-16, n-17, n-18	+	-	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	LDC
O113 : H-	n-14	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O121 : HAag	n-5	+	+	+	-	-	-	+	+	K/N	+	+	βGAL/LAC
O121 : H19	n-15	+	+	+	-	-	-	+	+	K/N	+	+	βGAL/LAC
O121 : H19	n-19	+	+	+	-	-	+	+	+	K/A	+	+	
O128	KCC	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O145 : H-	n-10	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
O165	RC	+	-	+	-	-	+	+	+	K/A	+	+	LDC
O165 : H-	S	+	-	+	-	-	+	+	+	K/A	+	+	LDC
O169 : H-	AM	+	+	+	-	-	+	+	+	K/A	+	+	
O177 : H-	K	+	-	-	+	-	+	+	+	K/A	+	+	LDC/SOR
OUT	n-6	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	
OUT : H19	n-13	+	+	+	+	-	+	+	+	K/A	+	+	

*: N-3, N-5, N-6, N-7, N-8, N-9, N-10, N-11, N-12, N-13, N-14, N-15, N-16, N-17, OHM

^a: IND; indole production, LDC; Lysine decarboxylase, SOR; Acid from Sorbitol, RHAM; Acid from Rhamnose, CEL; Acid from Cellobiose, βGAL; β-D-galactosidase, αGAL; α-D-galactosidase, βGUR; β-D-glucuronidase, +; positive, -; negative, +w; Weak reaction, -72; Negative after 72 hr culture

^b: LAC; Acid from Lactose, A; Acidic, K; Alkaline, N; Neutral

を記載した。Table 3に対象株の生化学性状を示す。生化学性状で異型反応を示した株は、O157 19株の中で lysine decarboxylase 陰性 (N-1, N-2), β-D-

galactosidase/lactose 陰性 (N-4), β-D-glucuronidase 陽性 (1079) であった。non-O157 24株の中では sorbitol 陰性 (n-1), indole/β-D-glucuronidase 陰性 (n-3),

Table 4. Effect of cefixime/tellurite for growth of *E. coli*

Strain	Basal medium	Conc. of CFIX/PT (mg/L) ^c							
		(a): 0/0	(b): 0.05/0	(c): 0/2.5	(d): 0/1.25	(e): 0/0.625	(f): 0/0.312	(g): 0/0.156	(h): 0/0.178
<i>E. coli</i> ATCC 25922		3+	3+	NG	33 CFU	1+	2+	3+	3+
<i>E. coli</i> O157 ATCC 35150	SMAC ^a	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<i>E. coli</i> O157 N-16		2+	2+	9 CFU ^T	1+ ^T	1+	2+ ^S	2+	2+
<i>E. coli</i> O157 N-17		2+	2+	8 CFU ^T	1+ ^T	1+ ^S	1+	2+	2+
<i>E. coli</i> ATCC 25922		3+	3+	NG	29 CFU	1+	3+	3+	3+
<i>E. coli</i> O157 ATCC 35150	RMAC ^b	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<i>E. coli</i> O26 n-7		2+	2+	NG	7 CFU ^T	23 CFU ^T	2+ ^S	2+	2+
<i>E. coli</i> O26 n-8		2+	2+	1 CFU ^T	12 CFU	1+ ^T	2+ ^S	2+	2+

^a: Sorbitol MacConkey agar

^b: Rhamnose MacConkey agar

^c: NG; No growth, T; Tiny colony, S; Small colony

β-D-galactosidase/lactose 陰性 (n-5, n-15), lysine decarboxylase 陰性 (n-16, n-17, n-18, RC, S), および lysine decarboxylase/sorbitol 陰性 (K) であった。1079 を除く O157 は ID32 E API で rhamnose 区画が微弱陽性を示した。

4. CT 培地発育不良 EHEC O157/O26 株の CT 濃度調整培地を用いた発育能試験

Table 4 に発育能試験を示す。何れの株も (b) 濃度添加培地 (a) 濃度添加培地とほぼ同等の発育から CFIX 添加の影響は見られなかった。(c) 濃度添加培地では ATCC 35150 以外の株は発育不良で PT に感受性であった。当該株は ATCC 25922 同様 PT を希釈するごとに colony が増加し菌の性状も改善された。PT の濃度を 0.156 mg/L, 0.078 mg/L に希釈した培地で、当該株は CT 未添加培地と同等の発育を示した。PT に最も感受性と見られる O26 (n-7) の発育状況を Figure 1 に一例表示した。

考 察

分離・収集した EHEC は多様性に富み、典型的な特徴が見られない株や *E. coli* として異型を示す株が見られ、Stx 検索に至るまでの過程を難解なものにしてきた。とりわけ、異型性状を複数保有する株は誤同定を惹起する可能性が高く、他菌種と誤認することが危惧された。

今回分離・収集した EHEC は主に乳幼児を中心に高齢者に至る広い年齢層から分離され、様々な血清型から分離された生化学的異型株は HUS 発症株を含む 32.6% (14/43) で確認された。北川らは新しい発色酵素基質培地の検討で O157 に対して α-D-

galactosidase, O26 に対して α-D-galactosidase/β-D-glucuronidase 陰性の異型株を報告している¹⁰⁾。なお、異型ではないが 1079 を除く O157 の rhamnose 所見は陰性とも取れる色調を示し、遅分解が影響していると考えられた。Zadik らは人由来 O157 の 99.7%¹¹⁾, Fukushima らは O157 : H7 の 99.4%, O26 : H11 の 96.9%, O111 : H- の 95.7%¹²⁾ が CT-SMAC に発育すると報告している。これら血清型は *eaeA* を保有し、*eaeA* は O165 などの血清型を除き CT-SMAC の発育性に相関が認められる¹²⁾。しかし、検討した株は *eaeA* 陰性株が CT-SMAC/CT-RMAC に発育不良であったが、*eaeA* 陽性株の中にも発育不良株が認められ、この中には CT 培地発育不良の O157/O26 が確認された。この O157/O26 も異型であり、合わせた異型株は 41.8% (18/43) に及んだ。北川らは近年 O157 において CT-SMAC 不発育株の経年的な増加が見られる¹³⁾と報告しているが、その存在は一地域的分布なのかその実態は不明である。当該 O157/O26 の CT 培地発育不良の要因は、PT 濃度に依存することが明らかとなったが、O26 の 96.8% (31/32) は PT に耐性 (MIC : ≥50 mg/L) であり O157, O111 を上回る⁹⁾との報告から、当該 O26 は極めて稀な株と考えられた。PT 濃度を 1/16 に減量した培地で当該 O157/O26 は CT 未添加培地と同等の発育を示した。Chapman らは SMAC に rhamnose と CFIX とを添加し、PT に依存しない O157 の選択培地を過去に報告している¹⁴⁾。他の sorbitol 陰性 *E. coli* との鑑別に有用としているが rhamnose が陰性であるとしている。O157 の rhamnose 分解能の差異は、Leclercq らは株による⁸⁾とし、Hiramatsu らは全株分解⁹⁾であると報告してお

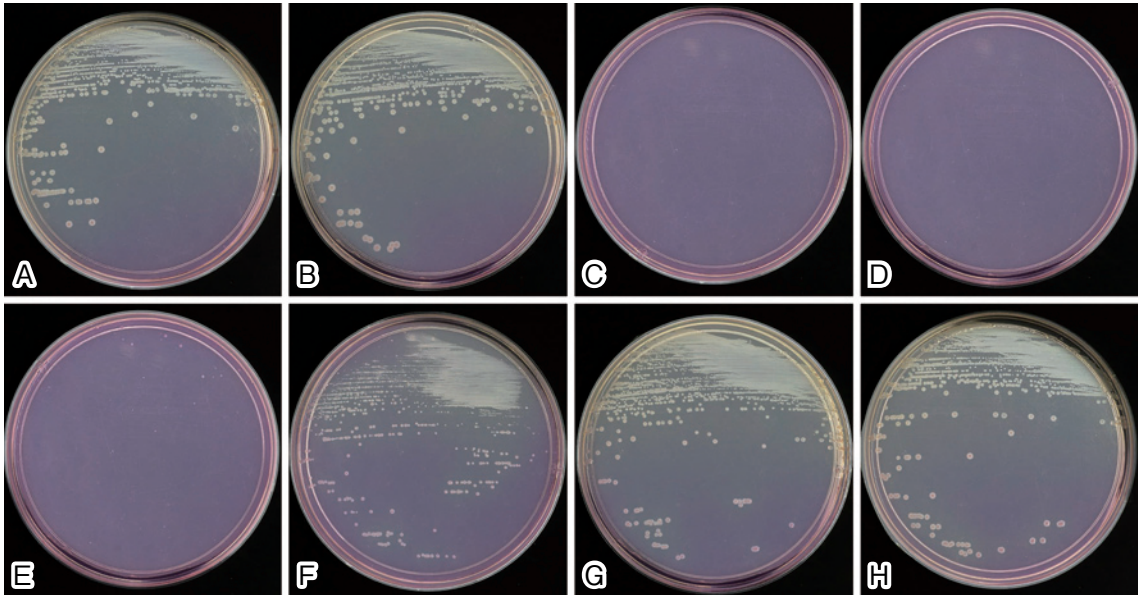


Figure 1. Growth inhibition by potassium tellurite (EHEC O26; n=7)
 A; RMAC W/O selective agents, B; CFIX 0.05 mg/L, C; PT 2.5 mg/L
 D; PT 1.25 mg/L, E; PT 0.625 mg/L, F; PT 0.312 mg/L, G; PT 0.156 mg/L
 H; PT 0.078 mg/L

り、筆者らは遅分解による影響と考えた。全てのEHECを検索対象とするならば、特定の血清型や特定の生化学性状を指標とした検索方法では限界があるため、CT培地の単独使用は避けるべきと考えた。

筆者はEHECnon-O157の検索で、1999年5月にE-hlyを指標に極東製薬が試作したBuetin hemolysin test agarを用い、当時の市販抗O血清に凝集しないO121:HAagを報告している⁶⁾。さらに、2006年8月には、13歳女兒からEHT寒天培地を用い、同一検体でO157:H7に加え市販抗O血清に凝集しないO113:H-を分離した。このE-hlyは遺伝子*hlyA*が関与し、*hlyA*保有株が陰性株に比してHUS発症確率が高いことがO111で報告されている¹⁵⁾。さらに、*hlyA*保有株は*eaeA*と*stx₂*の存在下で人のEHEC感染者の重症化に関わる¹⁶⁾とされ、*hlyA*はEHECの重要な病原遺伝子の一つと考えられている。E-hlyを指標としたスクリーニングは一例を除き有用であったが、収集株Kは*hlyA*を保有しながら、EHT寒天培地ではα-hlyが確認され判定不能となる現象が起きた。ドイツ北部を中心にヨーロッパで流行したO104は*hlyA*および*eaeA*が陰性でありながらHUSを発症している¹⁷⁾。この菌は腸管凝集付着性のenteroaggregative *E. coli*に*stx_{2a}*を獲得したEHECであり、

*aggR*が関与していた。E-hlyを指標とするスクリーニングにおいても捕らえきれない株も存在することは今後の検討課題である。*astA*はO157で高率に検出されたが、HUS発症株からは検出されなかった。

これまで公立能登総合病院で実施してきたEHEC O157の検索は、SIB寒天培地(極東製薬)を用い sorbitol 陰性株を対象に生化学性状・血清型からStxの検索を進めた。2000年6月以降はSIB寒天培地やドルガルスキー改良培地(栄研化学、東京)から*E. coli*と思われる菌を10 colony以上釣菌してEHT寒天培地に穿刺・画線し、E-hly陽性株からStxの検索へと進めてきた。この方法は有用であったがE-hly陰性のEHECや収集株ではα-hly陽性(*hly-A*陽性)のEHECも確認された。また、培地上での*E. coli*とそれ以外の菌との区別が難しい問題もある。この点を解決するためにもCT不含有の*E. coli*を特定する培地は必要である。江成らは*E. coli*と他の菌との鑑別可能な培地TRX-CIP agar(仮称)を開発し第22回臨床微生物学会にて報告した。その内容は、EHECのなかでα-D-galactosidase, β-D-galactosidase, β-D-glucuronidase活性の何れかが陰性を示す異型株が存在するが、これらの酵素活性の何れか一つでも陽性を示す*E. coli*であれば同一系統の発色を示す。一方、*E. coli*以外の

菌でも同系統の発色を示す菌種が存在することから、これらの酵素活性に関わる発色酵素基質 (X- α -D-galactoside, X- β -D-galactoside, X- β -D-glucuronide) に cellobiose, inositol, phenylalanine deaminase, propylene glycole を加えることにより *E. coli* を鑑別し他のグラム陰性桿菌を除外出来る CT 不含有の培地を作成した¹⁸⁾。

EHEC の検索を考えた場合、あらゆる血清型や血清型不明の EHEC までも釣菌の対象としなければならない。① EHEC は血清型ごとに生化学性状に特徴が見られる。② 同一血清型であっても生化学性状が異なる異型株が存在する。③ *E. coli* としても異型を示す株が見られる。④ 血清型ごとに CT 培地での発育性が異なる。⑤ O157/O26 で CT 培地発育不良の異型株が存在する。⑥ EHEC としては新しいタイプの病原遺伝子を保有する EHEC も確認されている。これらを考慮したスクリーニングは、まずは *E. coli* の特定が先決である。そこで効率のよい EHEC 検出をどうあるべきか考えてみた。O157 検出では、SMAC 寒天培地などの sorbitol 分解能を指標とした培地から、non-O157 検出では TRX-CIPagar などの *E. coli* を特定する培地から、それぞれ目的株を数多く (10 colony 以上が望ましい。) 釣菌し E-hly を指標とした培地を用い、E-hly 陽性株から Stx の検索を提案する。しかし、E-hly 陰性や α -hly 陽性の EHEC も存在することから、患者病態によっては、E-hly の有無に関わらず Stx の検索へと進むことも考えなければならない。Stx 陽性株のみ生化学性状や血清型の特定を行ったほうが網羅的に効率良い検査ができる。EHEC の主要血清型と特定された後の患者のフォローや感染伝播確認では、夾雑菌の影響を受けずに早期に菌を特定する発色酵素基質培地¹⁰⁾の併用も必要と考える。

多様な EHEC 検出を効率よく行うためには、分離あるいは確認培地の使用方法や鑑別点を見直すべきと考える。

利益相反： 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 城 宏輔. 1991. 埼玉県某幼稚園で流行した *Escherichia coli* O157:H7 による出血性大腸炎. 臨床と微生物 18: 457-465.
- 2) 磯部順子, 嶋 智子, 木全恵子, 他. 2012. 腸管出血性大腸菌 O111 による焼肉チェーン店での集団食中毒事件—富山県. IASR 33: 119-120.
- 3) Beutin, L., M.A. Montenegro, I. Ørskov, et al. 1989.

- Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27: 2559-2564.
- 4) 腸管感染症検査ガイドライン. 2010. 第2章 腸管感染症の検査対象となる微生物と同定のポイント. 日臨微誌 20: 19-21.
 - 5) 伊藤健一郎, 熊谷則道, 原田 誠, 他. 2010. 平成22年度新興再興感染症技術研修遺伝子検査法実習テキスト, p. 13-15, 国立保健医療科学院.
 - 6) 小林 治, 宮田豊徳, 江成 博. 2001. 市販抗O血清に凝集しない腸管出血性大腸菌を検出した4例. 医学検査 50: 802-807.
 - 7) Farmer, J.J. III, K.D. Boatwright, J. Michael Janda. 2007. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. p. 649-669. In: Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. (P.R. Murray, E.J. Baron, M.L. Landry, et al ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 - 8) Leclercq, A., B. Lambert, D. Pierard, et al. 2001. Particular Biochemical Profiles for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates on the ID 32E System. J. Clin. Microbiol. 39: 1161-1164.
 - 9) Hiramatsu, R., M. Matsumoto, Y. Miwa, et al. 2002. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains and Establishment of Selective Isolation Media for These Strains. J. Clin. Microbiol. 40: 922-925.
 - 10) 北川真喜, 市石 卓, 葛原繁明, 他. 2012. 主要な血清型の大腸菌を検出する酵素基質培地の開発. 日臨微誌 22: 214-220.
 - 11) Zadik, P.M., P.A. Chapman, C.A. Siddons. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 39: 155-158.
 - 12) Fukushima, H., K. Hoshina, M. Gomyoda. 2000. Selective Isolation of *ae*-Positive Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 38: 1684-1687.
 - 13) 北川恵美子, 浅田征彦, 山岸喜信, 他. 2011. 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キー寒天培地に発育しない志賀毒素産生性大腸菌 O157 の実態. 石川保環研報 48: 31-34.
 - 14) Chapman, P.A., C.A. Siddons, P.M. Zadik. 1991. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 35: 107-110.
 - 15) Schmidt, H., H. Karch. 1996. Enterohemolytic Phenotypes and Genotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111 Strains from patients with Diar-

- rhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2364-2367.
- 16) Boerlin, P., S.A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, et al. 1999. Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *J. Clin. Microbiol.* 37: 497-503.
- 17) European Food Safety Authority. 2011. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104: H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal* 9: 2390-2411.
- 18) 江成 博, 市石 卓, 北川真喜, 他. 2010. 腸管出血性大腸菌検出用培地の試み. *日臨微誌* 20: 123.

Clinical microbiological characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains isolated from 1990 to 2012

Osamu Kobayashi¹⁾, Masahiro Isozaki²⁾, Maki Kitagawa³⁾, Hiroshi Enari³⁾⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Noto General Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, Amakusa Medical Center

³⁾Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.

⁴⁾Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

We carried out a study for the detection of biochemical characterization and virulence genes (*stx*₁, *stx*₂, *eaeA*, *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA*) from forty-three strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). These strains were isolated from 1990 to 2012 and consisted of 13 serogroups (O1, O26, O91, O103, O111, O113, O121, O128, O145, O157, O165, O169, O177) and nontypable (2 strains). The number of strains possessing the following virulence genes were broken down as follows: *stx*₁: 30, *stx*₂: 29, *eaeA*: 36, *aggR*: 0, *bfpA*: 0, *astA*: 15, and *hlyA*: 42. Although 41 strains were confirmed to produce enterohemolysin, the remaining one strain could not be confirmed enterohemolysin by producing alpha-hemolysin on EHT agar. For the characterization of these forty-three (EHEC) isolates, we assayed for the following: lysine decarboxylase, indole production, β-D-galactosidase, β-D-glucuronidase, sorbitol fermentation, shiga toxin typing, confirmation test of enterohemolysin, and cefixime tellurite (CT) sensitivity test. In our study, fourteen strains of EHEC did not grow on CT-SMAC (CT-RMAC) agar plates. Among the fourteen strains, O157 and O26 of two strains each were included. For even targeting EHEC O26 or EHEC O157, a screening plate without CT must also be used. There were several atypical EHEC strains that could not be detected even using multiple media. A new selective media for detection of EHEC is required.