

[原 著]

酵素基質培地 CHROMagar STEC における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の発育性
および亜テルル酸カリウム感受性の検討

青木日出美¹⁾・茂谷美和²⁾・山崎 貢²⁾・祖父江進²⁾
三輪良雄²⁾・澁谷いづみ²⁾・子安春樹¹⁾

¹⁾ 愛知県半田保健所

²⁾ 愛知県一宮保健所

(平成 26 年 5 月 26 日受付, 平成 26 年 12 月 22 日受理)

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) に対し高い検出性能が報告されている酵素基質培地 “CHROMagar STEC” における STEC の発育性および亜テルル酸カリウムに対する感受性を調べた。供試した STEC 123 株のうち 119 株 (96.7%) が CHROMagar STEC に発育し, このうち 115 株 (93.5%) が STEC の指標となる典型的な藤色集落を形成した。残り 4 株のうち, 1 株は褐色集落を形成し, 3 株は藤色および白色の小集落 (直径 1~2 mm) が混在して形成した。

STEC 85 株の亜テルル酸カリウムに対する MIC は幅広く分布 ($\leq 0.2 \sim 100 < \mu\text{g/ml}$) し, CHROMagar STEC に非発育もしくは小集落を形成した 7 株は感受性 ($\text{MIC} \leq 3.13 \mu\text{g/ml}$) であった。亜テルル酸カリウム感受性株を見落とさずに検出するためには, CHROMagar STEC よりも選択性の弱い培地を併用することが望ましいと考えられた。

Key words: 志賀毒素産生性大腸菌, CHROMagar STEC, 亜テルル酸カリウム, MIC

序 文

志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) を産生する志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) は, 腸管出血性大腸菌感染症の起原菌であり, 溶血性尿毒症症候群や脳症等の重篤な症状を起こすことがある¹⁾。STEC の分離培地は糖発酵を利用する培地および合成基質培地があり, 様々な種類の培地が市販されている¹²⁾。最近, 開発された酵素基質培地 “CHROMagar STEC” は, 培地上に発育した藤色の集落を指標にして O157, O26, O111 等の複数の O 血清群の STEC を分離できる利点があり, 夾雑菌に対する強い発育抑制効果を有することから主要な選択分離培地の一つと

なっている²³⁾。しかし, CHROMagar STEC は全ての STEC を検出できるものではなく, 本培地に発育しない STEC や白色集落などの非典型的な集落を形成する STEC が存在することも報告されている^{4)~9)}。

一方, 最も検出頻度の高い STEC O157 の分離培地には, 本血清群の典型的性状であるソルビット非発酵性を利用したソルビット添加マッコンキー培地 (以下, SMAC)¹⁰⁾, および SMAC にセフィキシムおよび亜テルル酸カリウムの選択剤を添加した CT-SMAC¹¹⁾ がある。後者の CT-SMAC は検出性能が高いことから STEC 検査に広く用いられてきたが, 欧州やオーストラリアではソルビット発酵性かつ CT-SMAC に発育しない亜テルル酸カリウム感受性の STEC O157 の出現が報告¹²⁾され, また, 国内では石川県内において CT-SMAC に発育しない O157 が近年増加していることが報告されている¹³⁾。

本論文では, O157 を含むいくつかの O 血清群の STEC を用いて, CHROMagar STEC における発育性および亜テルル酸カリウム感受性を調べ, 亜テルル酸カリウム感受性株を中心に STEC 検査上の問題点を

著者連絡先: (〒448-0857) 愛知県半田市出口町一丁目 45 番地 4
愛知県半田保健所試験検査課
青木日出美
TEL: 0569-21-3341
FAX: 0569-24-7142
E-mail: hidemi_aoki@pref.aichi.lg.jp

Table 1. List of strains tested

Group	Serotype	No. of isolates	Type of Shiga toxin (No. of isolates)
STEC	O157 : H7	67	Stx1 (8), Stx2 (19), Stx1, 2 (40*)
STEC	O157 : HNM	6	Stx1 (1), Stx1, 2 (5)
STEC	O26 : H11	20	Stx1 (17), Stx1, 2 (3)
STEC	O26 : HNM	1	Stx1 (1)
STEC	O111 : H8	10	Stx1 (9), Stx2 (1)
STEC	O111 : HNM [H8]**	1	Stx2 (1)
STEC	O103 : H2	7	Stx1 (7)
STEC	O103 : HUT	1	Stx1, 2 (1)
STEC	O121 : H19	6	Stx2 (6)
STEC	O145 : HUT	1	Stx2 (1)
STEC	O165 : HNM	1	Stx2 (1)
STEC	OUT : H21	2	Stx2 (2)
Total		123	
ETEC (LT, ST)	O6 : H16	1	-
ETEC (ST)	O128 : H45	1	-
ETEC (LT)	O159 : H7	1	-
EAST1EC (<i>astA</i>)	O1 : H45	1	-
<i>E. coli</i>	O1 : H7	1	-
<i>E. coli</i>	O1 : H12	1	-
EPEC (<i>eae</i>)* **	OUT : HUT	1	-
<i>E. coli</i> * **	OUT : H16	1	-
<i>E. coli</i> * **	OUT : HNM	1	-
Total		9	

*This one isolate originated from a known outbreak in Sakai in 1996.

**H type in bracket indicates that the strain encodes H8-flagellar gene.

***These were isolated on CHROMagar STEC during detection of bacterial pathogens from diarrheal patients.

述べる。

材料および方法

1) 供試株

Table 1 に全供試株 132 株の血清型および病原因子を示した。STEC は、1996 年～2014 年に愛知県内の保健所で患者や接触者から分離された株および病院から入手した患者由来株、それに参照株とした O157 界集団事例由来株（以下、Sakai 株）¹⁴⁾であり、市販 O 群血清に凝集しなかった OUT 株を含め 8 種類の O 血清群 123 株を用いた。STEC 以外の大腸菌の菌株は、食中毒もしくは STEC 感染症の調査で分離された毒素原性大腸菌 (ETEC) 3 株、腸管凝集性大腸菌耐熱性腸管毒 (EAST1) の遺伝子 *astA* を保有する大腸菌 (EAST1EC) 1 株、非病原性大腸菌 2 株および CHROMagar STEC に典型的な藤色集落を形成した 3 株（うち 1 株は、腸管病原性大腸菌 (EPEC) の付着

因子 *eae* 陽性) の計 9 株を供試した。また、後述する試験で一部の供試株を検討に用いた場合には改めて示した。

2) STEC 患者糞便

2010 年に発生した O157 感染症 2 事例および O26 感染症 1 事例由来の保存糞便 (各事例 1 検体, -30℃, 3～6 ヶ月保存) を用いた。

3) 選択分離培地

CHROMagar STEC (関東化学) の他、O157, O26, O111 検出用の非酵素基質培地 CT-SMAC¹¹⁾, CT-RMAC¹⁵⁾ および CT-SBMAC¹⁶⁾ を用いた。これらの非酵素基質培地は、ソルビットマッコンキー寒天培地 SMAC (栄研化学)、マッコンキー基礎培地 (Oxoid) にラムノース (和光純薬) を 1% 添加した RMAC および同基礎培地にソルボース (和光純薬) を 1% 添加した SBMAC に、選択剤である CT サプリメント (Oxoid, 各培地の最終濃度はセフィキシム 0.05 μg/

ml, 亜テルル酸カリウム 2.5 µg/ml) をそれぞれ添加して調製した。

4) 菌株を用いた CHROMagar STEC 上における発育性の検討

全供試株である STEC 123 株および STEC 以外の大腸菌 9 株を用いた。菌株をトリプトソイ寒天培地(栄研化学)に 37°C, 20 時間培養し、発育した菌体を 10 µl 定量白金耳を用いて CHROMagar STEC に画線塗抹し、37°C, 24 時間培養後に、集落形成の有無および形態(大きさ・色調)を観察した。β-グルクロニダーゼ陰性である典型的な STEC O157 は、他の O 血清群の STEC と異なり UV 照射による蛍光を発しないので UV 照射試験も実施した。

5) 亜テルル酸カリウム感受性試験

STEC 123 株のうち、CHROMagar STEC に対する非発育株、非典型的集落形成および Sakai 株を含む 85 株(O157:40 株, O26:16 株, O111:11 株, O103:8 株, O121:6 株, O145:1 株, O165:1 株, OUT:2 株)、それに、食中毒および感染症の検査において CHROMagar STEC に藤色集落を形成したが Stx を産生しなかった 3 株を供試した。亜テルル酸カリウムに対する MIC は、以下のとおり寒天平板希釈法¹⁷⁾により測定した。亜テルル酸カリウム(和光純薬)を 2 倍希釈にて 10 段階(最終濃度 0.20~100 µg/ml)に添加した Muller-Hinton Agar (Oxoid) 平板を作成し、供試株を Muller-Hinton Broth (Difco) にて 2 回継代培養した培養液をさらに滅菌生理食塩水で 10⁶ cfu/ml に希釈し、その 10 µl ずつを各平板に滴下した。これを 37°C, 20 時間培養後、発育が完全に阻止された限界値を MIC とした。

6) CHROMagar STEC と非酵素基質培地の発育支持能の比較

(1) Miles & Misra 法¹⁸⁾による発育支持能の比較

STEC 123 株のうち、3 種類の O 血清群 6 株(O157:4 株, O26:1 株, O111:1 株)を用い、Miles & Misra 法¹⁸⁾に準じて行った。即ち、トリプトソイブイオン(栄研化学)で 37°C, 20 時間培養し、約 10⁹/ml に増殖させた菌液を滅菌生理食塩水により 10⁻¹~10⁻⁸ に希釈し、8 分画した CHROMagar STEC, CT を添加した 3 種類の非酵素基質培地(CT-SMAC, CT-RMAC, CT-SBMAC) および対照としたトリプトソイ寒天培地の各 2 枚の平板上に希釈菌液各 10 µl を滴下し、37°C, 24 時間培養後、集落形成の有無を観察した。

(2) 平板塗布法¹⁸⁾による発育支持能の比較

(1) の項で用いた STEC O157 の 4 株中 2 株を用い、平板塗布法(Conradi の方法)¹⁸⁾に準じて発育

支持能を調べた。即ち、上記(1)のとおり調製した 10⁻⁴~10⁻⁶の希釈菌液 100 µl を CHROMagar STEC および CT-SMAC の各 2 枚に、また、10⁻⁶の希釈菌液 100 µl をトリプトソイ寒天培地の各 2 枚に Conradi 棒で塗布し、37°C, 24 時間培養後、平均集落数を求め、トリプトソイ寒天培地に対する集落形成率を算出した。

結 果

1) 菌株を用いた CHROMagar STEC 上における発育性の検討

Table 2 に STEC の血清型および発育性を示した。全供試株 123 株の STEC 中、119 株(96.7%)が CHROMagar STEC に発育した。発育した 119 株のうち、(a) O157, O26, O111, O103, O121 の 5 血清群 115 株(全体の 93.5%)は典型的な藤色集落を形成し、(b) O145 1 株は褐色集落を形成し、(c) 3 株(O157:2 株, O121:1 株)は直径 1~2 mm 程度の藤色および白色の小集落とを混在して形成した。(d) 非発育株は、O157 1 株, O165 1 株および O 血清群別不能(以下, OUT) 2 株の合計 4 株であった。(c) および (d) において、O157 3 株は全て Stx1 陽性、他の 4 株(O121:1 株, O165:1 株, OUT:2 株)は全て Stx2 陽性であった。また、CHROMagar STEC に藤色集落を形成した 70 株の O157 は、全株が β-グルクロニダーゼ陰性であり STEC O157 の典型的性状と一致した。一方、STEC 以外の大腸菌については、食中毒もしくは感染症の検査で分離された藤色集落形成株 3 株を除き、EPEC 3 株, EAST1EC 1 株および非病原性大腸菌 2 株の合計 6 株は CHROMagar STEC に発育しなかった。

2) 亜テルル酸カリウムに対する MIC の分布

Table 3 に、STEC 85 株の亜テルル酸カリウムに対する MIC の分布を示した。STEC 85 株中 78 株(91.7%)が耐性(12.5<µg/ml)であり、残り 7 株が感受性(≤3.13 µg/ml)であった。CHROMagar STEC 上の集落の特徴と亜テルル酸カリウムに対する MIC の関係は、(a) 典型的藤色集落:12.5<µg/ml, (b) 褐色集落:100<µg/ml, (c) 藤色および白色の小集落混在:1.56 または 3.13 µg/ml, (d) 非発育:≤0.78 µg/ml であった。

一方、食中毒および STEC 感染症の調査において CHROMagar STEC に典型的藤色集落を形成した STEC 以外の大腸菌 3 株の MIC は全て 100<µg/ml であった。

Table 2. Growth of STEC on CHROMagar STEC

Serotype	Strain No. of strains tested	Colony morphology			Non growing
		Mauve	Brown	Mauve* and white*	
O157 : H7	67**	64		2	1
O157 : HNM	6	6			
O26 : H11	20	20			
O26 : HNM	1	1			
O111 : H8	10	10			
O111 : HNM	1	1			
O103 : H2	7	7			
O103 : HUT	1	1			
O121 : H19	6	5		1	
O145 : HUT	1		1		
O165 : HNM	1				1
OUT : H21	2				2
Total	123	115	1	3	4

*Small-colonies **This one isolate originated from a known outbreak in Sakai in 1996.

Table 3. MICs of STEC isolates against potassium tellurite

Serotype	Strain No. of strains tested	MIC of potassium tellurite ($\mu\text{g/ml}$) in range of:										
		≤ 0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
O157 : H7	39			1	1	1		1	12	12	5*	6
O157 : HNM	1											1
O26 : H11	15									1	6	8
O26 : HNM	1											1
O111 : H8	10					c		a	2	6	1	1
O111 : HNM [H8]	1		d							1		
O103 : H2	7								1	3	3	
O103 : HUT	1										1	
O121 : H19	6				1			2	2			1
O145 : HUT	1											b
O165 : HNM	1	1										
OUT : H21	2	2										
Total	85	3		1	2	1		3	17	23	16	19

* This one isolate originated from a known outbreak in Sakai in 1996.

a) Mauve colonies b) Brown colony c) Mixture of mauve and white small-colonies d) Non growing

3) 発育支持能の比較

(1) Miles & Misra 法による CHROMagar STEC と非酵素基質培地における発育支持能の比較

Table 4 に、Miles & Misra 法による発育支持能を示した。亜テルル酸カリウムに対する MIC が $100 \mu\text{g/ml}$ の O157 および O26 の各 1 株では、CHROMagar STEC の発育支持能は CT-SMAC および CT-RMAC と比べて大差がなかった。一方、MIC $0.78 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ の亜テルル酸カリウム感受性の O157 3 株は、Miles

& Misra 法では菌数の多い低希釈段階で発育したが、これらの菌株でみた CHROMagar STEC の発育支持能は CT-SMAC に比べて約 1 段低かった。

(2) 平板塗布法による CHROMagar STEC と非酵素基質培地における発育支持能の比較

Table 5 に、トリプトソイ寒天に対する CT-SMAC と CHROMagar STEC の集落形成率を示した。CHROMagar STEC の発育支持能は、亜テルル酸カリウム耐性株 (MIC $100 \mu\text{g/ml}$) では CT-SMAC の約 $2/5$ 、

Table 4. Comparison of CHROMagar STEC and conventional selective medium to support growth of STEC isolates by Miles & Misra method

Strain	Serotype	Toxin type	MIC of potassium tellurite (μg/ml)	Medium	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
E5	O157 : H7	Stx 1, 2	100	Tryptic soy agar	++	++	+5	-
				CT-SMAC	++	++	+3	-
				CHROMagar STEC	++	+6	+2	-
E11111	O157 : H7	Stx 1, 2	12.5	Tryptic soy agar	++	+9	+1	-
				CT-SMAC	++	+9	+1	-
				CHROMagar STEC	++	+2	-	-
E1	O157 : H7	Stx 1	1.56	Tryptic soy agar	++	+9	+1	-
				CT-SMAC	++	+8	+1	-
				CHROMagar STEC	++	+2	-	-
E83	O157 : H7	Stx 1	0.78	Tryptic soy agar	++	+9	+1	-
				CT-SMAC	++	+6	+2	-
				CHROMagar STEC	++	+3	-	-
E2	O26 : H11	Stx 1	100	Tryptic soy agar	++	+2	-	-
				CT-RMAC	++	+4	-	-
				CHROMagar STEC	++	+6	-	-
P4	O111 : H8	Stx 1	25	Tryptic soy agar	++	+4	+2	-
				CT-SBMAC	++	+7	-	-
				CHROMagar STEC	++	+3	-	-

Subscripts show the average of number of colonies on two plates.

Table 5. Recovery rate of STEC isolates on CT-SMAC and CHROMagar STEC

Strain	Serotype	Toxin type	MIC of potassium tellurite (μg/ml)	Selective medium	Recovery rate* (%)
E5	O157 : H7	Stx 1, 2	100	CT-SMAC	75%
				CHROMagar STEC	29%
E1	O157 : H7	Stx 1	1.56	CT-SMAC	57%
				CHROMagar STEC	11%

*Recovery rate shows the percentage of the number of colonies on selective media against those on triptic soy agar plates.

また、感受性株 (MIC 1.56 μg/ml) では約 1/5 と、いずれの株でも CHROMagar STEC の発育支持能が CT-SMAC よりも低かった。

(3) O157 患者および O26 患者の凍結保存便を用いた比較

O157 が検出された保存患者便 2 検体を各平板へ塗抹培養した結果、CT-SMAC には 2 検体とも O157 株が発育したが、CHROMagar STEC には発育が認められなかった。一方、O26 が検出された保存患者便 1 検体を塗抹培養した場合は、CHROMagar STEC と CT-RMAC の両方に STEC O26 が良好に発育した。

考 察

STEC のうち最も高頻度に検出される O157¹⁾ の選択分離培地上の発育性に関して、CT-SMAC に発育しない STEC O157 株の割合は 0.3~1.5% であることが知られている¹³⁾。一方、CHROMagar STEC については、巽ら⁴⁾ は 68 株の STEC O157 を調べて全株が典型的集落を形成した (非発育株 0%) と報告し、また、角屋ら⁷⁾ は 86 株を調べて巽らと同様の結果を報告している。これらの報告に対し、カナダの Wylie ら⁹⁾ は 24 株の STEC O157 を調べて 1 株 (4.2%) が CHROMagar STEC に発育しなかったと報告し、また、フィンランドの Hirvonen ら⁶⁾ はソルビット非発酵性の典型的

STEC O157 183株を調べて4株(2.2%)が同培地に発育しなかったと報告している。今回の結果においても、73株のうち1株(1.4%)がCHROMagar STECに発育せず、また、2株が藤色と白色の小集落を混在し良好な発育性を示さなかったことから、CT-SMACに替えてCHROMagar STECをSTEC O157検査に用いた場合にも一部のSTEC O157を検出できない可能性があると考えられる。

O157以外のO血清群において3株がCHROMagar STECに発育しなかったが、希少なO血清群とO群別不能(OUT)の菌株に非発育株が多いことが知られている^{4)~9)}。今回、CHROMagar STECに発育しなかったO165は、2011年に全国で報告されたSTEC 2,213例のうち4例(0.2%)と稀なO血清群であるが、国内外の報告を見ると、O165はCT-SMACに発育せず¹⁹⁾、また、CHROMagar STECにも発育していない⁵⁾⁶⁾⁹⁾。O165はCHROMagar STECに発育し難いO血清群と推測されるので、本血清群を目的とした検査には分離培地の選択に注意が必要であると考えられる。

STEC O157菌株におけるMiles & Misra法および平板塗布法による発育支持能の比較において、2法ともCHROMagar STECの発育支持能がCT-SMACよりも低い傾向があった。O157患者の保存便を用いたCT-SMACとCHROMagar STECの発育の比較では、STEC O157はCT-SMACに発育したがCHROMagar STECには発育しなかった。このことについては、おそらくCHROMagar STECとCT-SMACの選択性の強さの違いが影響したと推測する。その他に、凍結された糞便を用いた比較であったため、凍結融解による菌の損傷が分離培地上の発育に影響した可能性も考えられる。

STEC O157としては非典型的なソルビット発酵性のO157:HNM(非運動性)株が1988年以降、ドイツ、フィンランド等の欧州やオーストラリアに出現しており、本菌が一般の大腸菌と識別できずCT-SMACにも発育しないことがSTEC感染症の診断上の問題となっている¹²⁾²⁰⁾。Bielaszewskaら¹²⁾は、ソルビット非発酵性のSTEC O157 67株とソルビット発酵性のSTEC O157 86株のうちCT-SMACに非発育であった株について、亜テルル酸カリウムに対する感受性試験を行った結果、感受性株の割合は、ソルビット非発酵株(1.5%)と比較してソルビット発酵株(96.5%)で著しく高い結果であったと報告している。また、ソルビット非発酵株ではStx1陽性株およびStx1, 2陽性株が合計12株(18%)含まれていたのに対し、ソルビット発酵株では全株がStx2陽性であったこと、さ

らに、ソルビット発酵性O157:HNM株が非典型的なβ-グルクロニダーゼ陽性であったことを報告している。一方、CHROMagar STECに関しては、Hirvonenら⁶⁾がソルビット発酵性O157:HNMの29株中28株(96.6%)が発育しなかったと報告している。著者らも対照株Sakai株のMIC(100 μg/ml)が既報(128 μg/ml)²¹⁾とほぼ一致することを確認のうえ、CHROMagar STECの発育性と亜テルル酸カリウム感受性を検討した。CHROMagar STECに発育しなかったSTEC O157 1株(2007年分離)および典型的藤色集落を形成しなかったSTEC O157 2株(2株とも2000年分離)は何れも亜テルル酸カリウム感受性株(MIC非発酵株:0.78 μg/ml, 非典型株:3.13および1.56 μg/ml)であったが、その他の性状は、ソルビット非発酵性、運動性陽性(O157:H7)、β-グルクロニダーゼ陰性、Stx1陽性であり、Bielaszewskaら¹²⁾の報告した亜テルル酸カリウム感受性株とは異なっていた。また、国内では、北川ら¹³⁾が2007年以降、石川県でCT-SMACに発育しないCT感受性のSTEC O157:H7(セフィキシムMIC≤0.025 μg/ml, 亜テルル酸カリウムMIC≤1.25 μg/ml)が増加していると報告しているが、O157:HNM株については全てCT耐性であったと述べている。著者らの調べた範囲では、国内でSTEC O157としては非典型的なCT感受性株¹³⁾やβ-グルクロニダーゼ陽性株²⁾が分離されているものの、欧州等において出現している亜テルル酸カリウム感受性株の性状に一致するSTEC O157は見当たらなかった。しかし、従来のCT-SMAC等の亜テルル酸カリウムを含有する分離培地や選択性の強い酵素基質培地ではこの種の感受性菌の探知が難しいと推測されるので、亜テルル酸カリウム感受性STEC O157の注意深い検査と情報収集が必要であると考えられる。

CHROMagar STECで培養したSTEC株は、集落の色調等の発育性および亜テルル酸カリウム感受性から、(a)典型的な藤色集落形成株、(b)褐色集落形成株、(c)藤色および白色の小集落を混在して形成した株、(d)非発酵株の4種類に分類された。(c)の白色集落を形成するSTECについては、STECの白糖および乳糖の性状との関連性を述べた報告⁸⁾もある。CHROMagar STECの選択剤については開示されておらず、集落の発育性と亜テルル酸カリウム感受性との関係は明確にできないが、今回観察されたCHROMagar STEC上に発育したSTEC株の集落の形態の特徴は、釣菌対象集落の決定や分離培地の選択においてSTEC検査の参考となる情報と思われる。

一方、CHROMagar STECには腸管凝集性大腸菌

や毒素原性大腸菌の一部が藤色集落を形成することが知られている⁶⁾。今回、STEC 感染症関連調査で CHROMagar STEC に藤色集落を形成したが Stx 産生試験の結果から STEC が否定された大腸菌 3 株は亜テルル酸カリウム耐性株であり、うち 1 株が EPEC に分類される *eae* 遺伝子保有株であった。実際の糞便検査において亜テルル酸カリウム耐性であれば一般の大腸菌や STEC 以外の下痢原性大腸菌が CHROMagar STEC に発育すると推測される。

STEC 検査は食中毒や感染症の検便検査だけでなく大量調理施設従事者の定期的な検便²²⁾や食品検査²³⁾においても行われている。近年、STEC 血清型に占める O157 の割合は次第に減少し、約半数を O26, O111, O103, O121 等の O 血清群が占めるようになってきたので²⁴⁾、主要かつ複数の O 血清群を分離できる CHROMagar STEC の有用性は高まってきている。今回の発育支持能の検討から、CHROMagar STEC の選択性が CT を添加した SMAC 等の非酵素基質培地よりもやや強いと考えられたので、STEC 検査には検査目的に応じて培地を選択することや選択性の強さの異なる培地の併用を行う必要があると考える。今後、亜テルル酸カリウム感受性 STEC も分離できるスクリーニング効率の高い選択分離培地の開発が望まれる。

謝辞：本研究に協力を頂いた岡崎市保健所中根邦彦先生、安城更生病院巽 則雄先生、愛知県衛生研究所松本昌門先生、並びに愛知県衣浦東部保健所および愛知県豊川保健所の試験検査課の諸氏に深謝致します。

文 献

- 1) 勢戸和子. 2009. STEC (志賀毒素産生性大腸菌). p. 281-296, 食品由来感染症と食品微生物(仲西寿男, 丸山 努監修), 中央法規, 東京.
- 2) 国立感染症研究所. 2. EHEC の分離と同定 (2) 糞便からの EHEC の分離. p. 4-6, 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル (平成 24 年 6 月改訂). <http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/EHEC.pdf> (2014 年 8 月 20 日アクセス可能).
- 3) 関東化学株式会社. クロモアガー TM STEC. <http://www.kanto.co.jp/rinsyo/pdf/416.pdf> (2014 年 8 月 20 日アクセス可能).
- 4) 巽 則雄, 近藤 好, 山田貴子, 他. 2011. 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. 感染症誌 85: 664-669.
- 5) 市原祥子, 江藤良樹, 濱崎光宏, 他. 2011. 希な O 血清群の志賀毒素産生性大腸菌検出における CHROMagar™ STEC の有用性の検討. 福岡県保健環境研究所年報 38: 62-65.
- 6) Hirvonen, J.J., A Siitonen, S.S. Kaukoranta. 2012. Usability and performance of CHROMagar STEC Medium in detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* Strains. Clin. Microbiol. 50: 3586-3590.
- 7) 角屋勇気, 梅沢政功, 山崎 恒, 他. 2012. 3 種類の腸管出血性大腸菌分離用発色基質培地の基礎的検討とクロモアガー STEC の有用性. 日臨徴誌 22: 231-238.
- 8) 井畑亜仁, 山田和弘, 鈴木匡弘, 他. 2013. クロモアガー STEC による志賀毒素産生性大腸菌発育の検討. 愛知衛所報 63: 9-15.
- 9) Wylie, J.L., P. Van Caesele, M.W. Gilmour, et al. 2013. Evaluation of a new chromogenic agar medium for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and relative prevalences of O157 and non-O157 STEC in Manitoba, Canada. J. Clin. Microbiol. 51: 466-471.
- 10) March, S.B., S. Ratnam. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 23: 869-872.
- 11) Zadik, P.M., P.A. Chapman, C.A. Siddons. 1993. Use tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. J. Med. Microbiol. 39: 155-158.
- 12) Bielaszewska, M., P.I. Tarr, H. Karch, et al. 2005. Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and sorbitol-fermenting O157: NM clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 43: 452-454.
- 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ッ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) Michino, H., K. Araki, S. Minami, et al. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am J Epidemiol. 150: 787-796.
- 15) Hiramatsu, R., M. Matsumoto, M. 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.
- 16) 田中 博, 八柳 潤, 内村真佐子, 他. 1999. 腸管

- 出血性大腸菌 O111 の L-ソルボース非分解性を指標とした分離培地に関する検討. 日臨微誌 9: 48-50.
- 17) 医科学研究所学会編. 1976. 菌量の測定法. p. 167-173. 細菌学実習提要 (改訂5版), 丸善, 東京.
- 18) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二. 1986. 培地の評価法. p. 182-199. 新細菌培地学講座・上 (第2版), 近代出版, 東京.
- 19) Seto, K., M. Taguchi, K. Kobayashi, et al. 2007. Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka prefecture. J. Vet. Med. Sci. 69: 1215-1222.
- 20) Bettelheim, K.A., M. Whipp, S.P. Djordjevic, et al. 2002. First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. J. Med. Microbiol. 51: 713-714.
- 21) Taylor, D.E., M. Rooker, M. Keelan, et al. 2002. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. J. Bacteriol. 184: 4690-4698.
- 22) 大量調理施設衛生管理マニュアル. 平成9年3月24日衛食第85号別添. 最終改正: 平成20年6月18日食安発第0618005号.
- 23) 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について. 平成26年11月20日食安監発1220第1号.
- 24) 国立感染症研究所感染症情報センター. 2013. <特集>腸管出血性大腸菌感染症 2013年4月現在. 病原微生物検出情報 34: 123-124.

Evaluation of chromogenic culture medium CHROMagar STEC in detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

Hidemi Aoki¹⁾, Miwa Motani²⁾, Mitsugu Yamazaki²⁾, Susumu Sobue²⁾,

Yoshio Miwa²⁾, Izumi Shibuya²⁾, Haruki Koyasu¹⁾

¹⁾Aichi Prefectural Handa Health Center

²⁾Aichi Prefectural Ichinomiya Health Center

The chromogenic culture medium CHROMagar STEC, launched recently, is thought to be a promising culture medium for screening and detection of strains belonging to major serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), based on development of its typical mauve colonies. This new culture medium strongly inhibits the growth of fecal coliforms and other bacteria. Of 123 STEC strains, 119 strains (96.7%) grew on CHROMagar STEC, but the remaining 4 strains did not grow on the medium. Of the 119 strains, 115 strains formed typical mauve colonies, 1 strain formed brown colonies, and 3 strains formed both mauve and white small-colonies on the plates.

As for 85 strains of STEC, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of potassium tellurite were distributed in a wide range ($\leq 0.2 \sim 100 < \mu\text{g/ml}$). The MICs of the 7 strains, which did not grow well or formed small-colonies on CHROMagar, showed $\leq 3.13 \mu\text{g/ml}$.

In conclusion, there is an inclination of the CHROMagar STEC medium to suppress the growth of STEC strains, which are sensitive to the potassium tellurite. A combined screening practice with CHROMagar STEC and selective media without potassium tellurite is recommended in order to reduce the risk for under-detection of the STEC strains.