

腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事件で分離された大腸菌について

赤津卓哉 羽賀節子 熊田裕子¹⁾
会津支所¹⁾ 微生物課

要 旨

2014年4月に腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒が発生した。この際、当支所に搬入された食品等の検体の中で、PCR法で VT2 陽性の血清型別不能大腸菌が 2 菌種検出された。詳細同定を依頼したところ、RPLA法でベロ毒素非産生であったため、これらの菌は VT1 及び VT2 非産生の大腸菌と判定された。したがって、食中毒調査時の食品等の PCR法による検査は、このような大腸菌が存在する可能性に留意して判定する必要があると考えられた。

キーワード：腸管出血性大腸菌，血清型別不能，PCR法

はじめに

2014年4月、馬刺しを原因食品とする食中毒事件が発生した。原因菌は腸管出血性大腸菌 O157 (VT1+, VT2+) (以下、“原因 O157”とする。)であった。当支所では、便検体 72 件、食品検体 17 件、施設ふきとり検体 91 件の O157 検査を行った。そのうち、原因 O157 陽性検体は喫食者及び接触者便 9 件であった。この際、当支所に搬入された食品検体の馬刺しモモ (生食用) 1 検体、施設ふきとり検体のと畜場内馬係留所排水溝 1 検体において PCR法で VT が陽性となる菌株を分離した。

本報では、これらの菌株の生化学的性状及び VT 確認試験の結果を報告する。

材料及び方法

以下、微生物検査必携第 3 版、「腸管出血性大腸菌 O26, O111 及び O157 の検査方法について」(厚生労働省監視安全課長通知) 他に従い検査を行った。

1 増菌培養

食品検体 (馬刺しモモ (生食用)) 25g をストマッカー袋に秤量し、mEC 培地 (日水製薬) を 225mL 加え 1 分間以内でストマッカー処理を行い、42±1℃、22±2 時間で増菌培養した。

施設ふきとり検体は、ふきとり液 1mL を

mEC 培地 10mL に加え、36±1℃、18～24 時間で増菌培養した。

2 VT 遺伝子検出 (PCR法)

O-157 PCR Screening Set (タカラバイオ) を使用した。

3 分離培養

VT 遺伝子陽性検体は、増菌培養液の直接塗抹及び免疫磁気ビーズ (ベリタス) 濃縮液の塗抹により分離培養した。培地は CT-SMAC (日水製薬) 及びクロモアガー O157 (クロモアガー社) を用い、培養条件は 36±1℃、18～24 時間で行った。

4 生化学的性状試験

分離培地から O157 の典型的集落を釣菌し、TSI 培地 (日水製薬)、LIM 培地 (日水製薬)、VP 半流動培地 (栄研化学)、シモンズ・クエン酸塩培地 (栄研化学)、CLIG 培地 (極東製薬)、普通寒天培地 (日水製薬) に移植した。培養は 36±1℃、18～24 時間で行った。グラム染色はバーミー M 染色キット (武藤化学)、オキシダーゼ試験はチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙 (日水製薬)、簡易同定キットは EB20 (日水製薬) を用いた。

5 血清型別試験

O 抗原血清型の判定は病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用い、スライド凝集反応により実施した。

6 VT 確認試験 (PCR 法)

食品検体は、O-157 One Shot PCR Typing Kit (タカラバイオ) を使用した。また、施設ふきとり検体では、O-157 PCR Typing Set Plus (タカラバイオ) を使用した。

結果

1 食品検体 (馬刺しモモ (生食用))

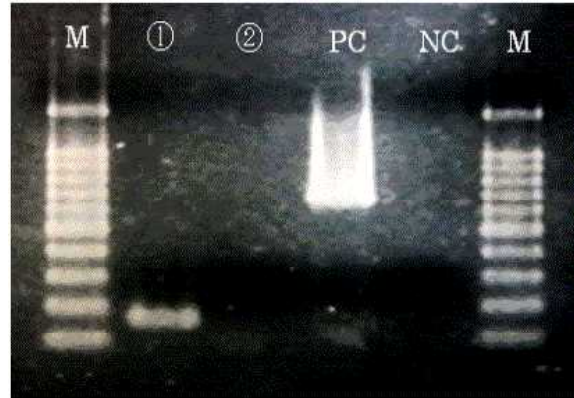
増菌培養液から PCR 法により VT 遺伝子を確認したところ、1 検体で VT 遺伝子陽性であった (図 1)。増幅産物は 171bp で検出される。

分離培養の結果、クロモアガー O157 培地において、直接塗抹培養したもの及び免疫磁気ビーズで塗抹培養したもののどちらからも O157 の典型的集落の発生が見られた。また、CT-SMAC 培地においては、典型的集落の発生は確認されなかった。

典型的集落を 10 菌株釣菌し、生化学的性状試験を行った (表 1)。また、グラム染色し鏡検したところ、グラム陰性桿菌であった。オキシターゼ試験は陰性であった。簡易同定キットでは *E. coli* と同定されたため、血清型別試験を行ったところ、市販血清では型別不能であった。

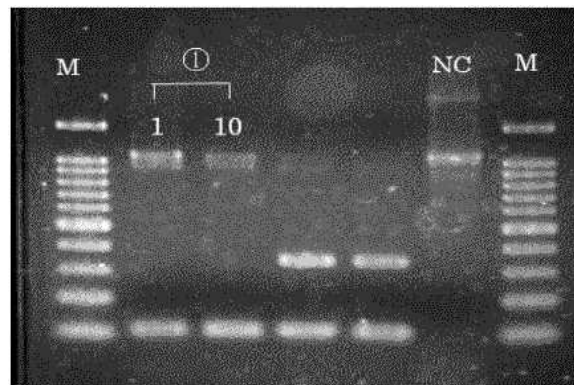
VT 確認試験は PCR 法により行った。その結果、VT2 陽性を示した (図 2)。増幅産物は VT1 : 349bp, VT2 : 112bp で検出される。

以上のことから、原因 O157 ではなく、血清型別不能 VT2 陽性大腸菌と判定し、微生物課に詳細同定を依頼した。その結果、RPLA 法でベロ毒素非産生であり、病原遺伝子も保有していない VT1 及び VT2 非産生の大腸菌であった。また、血清型は市販血清では型別不能であったが、国立感染症研究所による血清型別試験の結果 O21:H1 であった。



①, ② : 食品検体 (馬刺しモモ)
PC : Positive Control
NC : Negative Control
M : 100bp DNA ladder

図 1 VT 遺伝子 PCR 産物電気泳動図



①-1, ①-10 : 型別不能大腸菌
NC : Negative Control
M : 100bp DNA ladder
他 : 原因 O157 (喫食者便)

図 2 VT1, VT2 遺伝子 PCR 産物電気泳動図

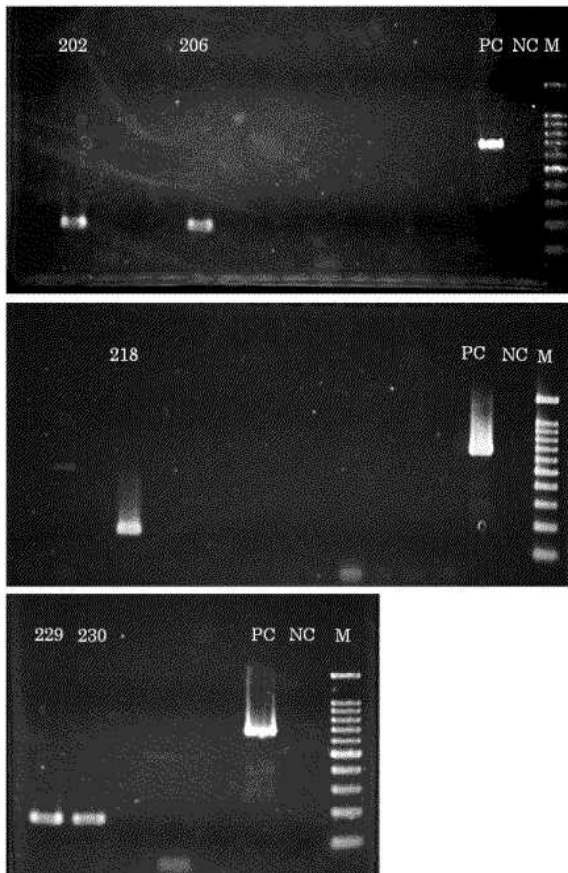
2 施設ふきとり検体

増菌培養液から PCR 法により VT 遺伝子を確認したところ、5 検体で VT 遺伝子陽性であった (図 3)。増幅産物は 171bp で検出される。

VT 遺伝子陽性であった検体の分離培地より 15 菌株を釣菌し、その分離培養の結果及びその生化学的性状を表 2 に示す。これらの検体を VT 確認試験に供したところ、202 の検体 (と畜場内馬係留所排水溝) から分離した 202-1, 202-2, 202-3 の 3 菌株で VT2 陽性であった (図 4)。増幅産物 VT2 は 112bp で

表1 分離培地から釣菌した各集落の生化学的性状（食品検体）

菌株No.	TSI				LIM			VP	SC	CLIG		
	斜面	高層	硫化水素	ガス産生	リジン	インドール	運動性	V P 産生	ク エ ン 酸	斜面	高層	M U G
①-1	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-4	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-5	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-6	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-7	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-8	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
①-9	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
①-10	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
O157	+(-)	+(-)	-	+(-)	+(-)	+(-)	+(-)	-	-	-	+	-



PC : Positive Control
 NC : Negative Control
 M : 100bp DNA ladder
 他 : 施設ふきとり検体

図3 VT遺伝子PCR産物電気泳動

検出される。

これらは表2のとおり、O157の典型的な集落ではなく、TSI培地においても硫化水素を産生していた。また、グラム陰性桿菌、オキシターゼ陰性、簡易同定キットでは*E. coli*と判定され、血清型別不能であった。

微生物課に詳細同定を依頼した結果、市販血清では型別されず、RPLA法でベロ毒素を検出しなかった。また、16SrRNA系統解析により大腸菌であることも確認された。よって、VT1及びVT2非産生血清型別不能大腸菌と同定された。ただし、病原遺伝子*astA*を保有していた。

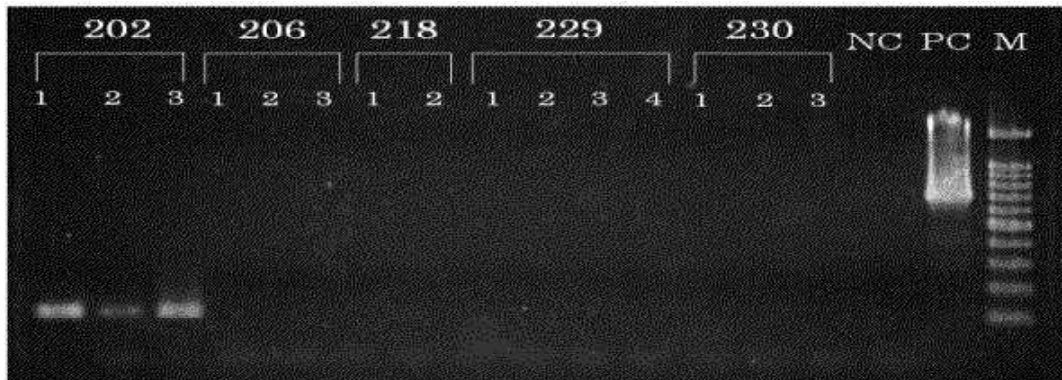
考 察

今回分離した菌株の同定結果を表3にまとめた。

表3 分離した大腸菌の同定結果

菌株No.	①-1	202-1
VT遺伝子	VT2	VT2
VT産生	-	-
血清型	O21:H16	OUT*
病原遺伝子	-	<i>astA</i>

*OUT : O serotypes untypable



PC : Positive Control NC : Negative Control M : 100bp DNA ladder 他 : 菌株 (表 2)

図 4 VT2遺伝子PCR産物電気泳動図

表 2 分離培地から釣菌した各集落の形態と生化学的性状 (施設ふきとり検体)

菌株No.	コロニー形態		TSI				LIM			VP	SC	CLIG		MUG
	培地	観察	斜面	高層	硫化水素	ガス産生	リジン	インマル	運動性	V P 産生	クエン酸	斜面	高層	
202-1	クロモ*1	青	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
202-2	クロモ	青	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
202-3	CT-SM*2	赤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
206-1	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	-	-	+	+
206-2	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	-	-	+	+
206-3	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	-	-	+	+
218-1	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	-	-	+	+
218-2	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	+	-	+	+
229-1	クロモ	藤色	+	+	-	+	±	+	+	-	-	-	+	+
229-2	クロモ	藤色	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
229-3	CT-SM	透明	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
229-4	CT-SM	透明	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
230-1	クロモ	藤色	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
230-2	クロモ	藤色	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
230-3	CT-SM	透明	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
O157	クロモ	藤色												
	CT-SM	透明	1(-)	1(-)		1(-)	1(-)	1(-)	1(-)				1	

* 1 クロモ : クロモアガー O157 培地 * 2 CT-SM : CT-SMAC 培地

食品から分離された菌株①-1, 10 に関して、集落の形態及び生化学的性状は O157 の典型的な性状と酷似していたが市販血清で型別不能であったため、原因 O157 ではないと判断した。また、この血清型の菌は他機関の定期検便で VT2 単独産生菌株として分離されている¹⁾。

施設ふきとり検体から分離された菌である 202-1, 202-2, 202-3 は O157 の典型的集落を形成していないが VT2 陽性となった。また、その他の菌株は O157 の典型的集落を釣菌し

たのにもかかわらず、PCR 検査では VT は検出されなかった。以上のように大腸菌の場合、分離培地での形態が同様でも、様々な生化学的性状を示し、保有遺伝子が相違することもある。そのため、分離培地からの釣菌にも注意が必要である。

また、この菌が保有していた *astA* 遺伝子は、腸管凝集付着性大腸菌から発見された耐熱性毒素 EAST-1 をコードする遺伝子として知られており、集団食中毒事例も報告されている²⁾。しかし、*astA* が病原性を発現しない

ケースもあり，PCR 法による検出だけでは判断すべきではないとされている³⁾。
 今回の食中毒は，検査項目が O157 であり明確であったが，食中毒事件では原因菌を特定するために多様な項目を検査することになる。さらに，今回分離された大腸菌のように，菌株によって示す性状も様々である。機器や検査員数が限定されている環境での検査において，迅速性や検出感度ともに優れた PCR 法での判定は重要なものである。また，RPLA 法は安価で検出感度が高いが，VT2 バリアントのうち VT2c の検出感度が低いという特徴がある⁴⁾。このような特徴を考慮し，1つの方法を絶対的なものとせず，生化学的性状や血清学的性状などを精査し総合的に判断することで，原因菌を特定していくことが必要である。このためには，日頃から他の部署や他の機関との連携を図り，検査体制を整えておくことが重要であると思われる。

引用文献

- 1) 村上光一，前田詠里子，岡元冬樹，他．平成 24 年度感染症細菌検査概要．福岡県保健環境研究所年報 2013；40：125-127.
- 2) 国立感染症研究所．病原微生物検出情報 2002；23：229-230.
- 3) 杉谷和加奈，中田恵子，森田美加，他．*astA* 保有大腸菌が原因と考えられた食中毒事例．熊本市環境総合センター研究所報 2007；14：39-42.
- 4) 国立感染症研究所，編．腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル