神奈川県衛生研究所研究報告　No. 52 (2022)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

資料

接触者検便および陰性確認検便からの腸管出血性大腸菌検出状況（2016年度～2021年度）

今井良美，片山丘，小松祐子，近藤木綿子，
森口真理子，岩井宏樹*，宮原香代子

Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in contact and negative confirmation stool specimen (April,2016 - March,2022)

Yoshimi IMAI, Takashi KATAYAMA,
Yuko KOMATSU, Yuko KONDO,
Mariko MORIGUCHI, Koki IWAI,
and Kayoko MIYAHARA

当所では三類感染症（コレラ，細菌性赤痢，腸チフス，パラチフス，腸管出血性大腸菌感染症）の蔓延防止対策として，保健福祉事務所の依頼により，接触者の病原体保有状況確認や患者の陰性確認（治療等により病原体を保有していないことの確認）の検査を実施している．2016年度から2021年度までの６年間に実施した三類感染症の病原体検査実施検体数は1348検体で，腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*：以下，EHECと略す）が1290検体，赤痢菌が45検体，コレラ菌が４検体，チフス菌が６検体，パラチフス菌が３検体であった．三類感染症の中ではEHECが最も多く，全国的に同様の傾向がみられた[1,2]．

当所では対象とするO群により異なる培地及び増菌培養法を採用している[3,4]．そこで今回2016年度から2021年度までの６年間に実施したEHECの検査について，O群別分離状況，直接分離培養法と増菌培養法による分離状況，使用した選択分離培地およびベロ毒素（以下，VTと略す）遺伝子スクリーニング検査結果についてまとめたので報告する．

EHECは1290検体中149検体より分離され，そのO群の内訳はO157が58検体，O26が78検体，O111が５検体，O121が４検体，O103が３検体，O145が１検体であった（表１）．

表１　EHECの分離状況

陽性検体数			149
	O群内訳	O157	58
		O26	78
		O111	5
		O121	4
		O103	3
		O145	1
陰性検体数			1141
計			1290

検査は便を滅菌生理食塩水で約10％乳剤にした後，スポイトで数滴滴下し選択分離培地に塗抹する直接分離培養法と，便の乳剤を数滴滴下し増菌培地で培養後，一白金耳量を選択分離培地に塗抹する増菌培養法を併用した．増菌培養法はノボビオシン加mEC培地（以下，n＋mEC培地と略す，栄研化学）を用いて42℃にて20時間から24時間培養し，O157以外のO群についてはmEC培地（日水製薬）を用いた37℃培養を併用した．検査を行っている中で，直接分離培養法でEHECが分離されない場合は，増菌培養法でも菌が分離されない検体が多いと思われた．そこでEHECが分離された149検体について，検出法の内訳をまとめた（表２）．

EHECが分離された149検体中141検体は直接分離培養法で分離され，８検体は直接分離培養法では分離されず，増菌培養法のみで分離された．

増菌培養法のみで分離された８検体の内訳は，O157が５検体，O26，O111およびO121が各１検体であった．O157はn＋mEC培地を用いた42℃培養を採用しているが，O157以外のO群はn＋mEC培地を用いた42℃培養とmEC培地を用いた37℃培養を併用し，そのうちmEC培地を用いた37℃培養で分離された．O157が分離された５検体のうち３検体は治療後の排菌を確認するための検査（陰性確認）であった．

EHECの分離培養は糖の分解性を利用し鑑別する培地と酵素基質を利用し色調から鑑別する培地（以下，酵素基質培地と略す）を併用している[3]．またセフィキシム0.05 mg/Lおよび亜テルル酸カリウム2.5 mg/L（以下，CTと略す）を添加することでその他の腸内細菌の発育を抑制しEHECの分離率を高めている．分離検体数が多

神奈川県衛生研究所　地域調査部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1－3－1
＊現　神奈川県衛生研究所　地域調査部　小田原分室
〒250 - 0042　小田原市荻窪350－1　小田原合同庁舎内４階

表２　EHECの検出法の内訳

O群	検出数	培養方法 直接	増菌培養法のみで検出
O157	58	53	5
O26	78	77	1
O111	5	4	1
O121	4	3	1
O103	3	3	
O145	2	1	
計	149	141	8

いO157，O26について直接分離培養法で使用した分離培地をまとめたところ表３に示した組合せであった．

CT‐ソルビトールマッコンキー培地（以下，CT‐SMAC培地と略す，栄研化学）およびCT‐ラムノースマッコンキー培地（以下，CT‐RMAC培地と略す，ベクトン・デイッキンソン）は糖の分解を利用している選択分離培地である[3,4]．クロモアガーO157培地（クロモアガー社），クロモアガーO157TAM培地（クロモアガー社），クロモアガーSTEC培地（以下，STEC培地と略す，クロモアガー社）およびViRx O26培地（栄研化学）は酵素基質培地である．通常STECは添付の選択剤混合物を添加して使用するが，菌分離を考慮して選択性の弱い培地も作製して検査を実施している．表３では選択剤混合物を添加したSTECを選択剤混合物‐STEC培地，添加していないSTECをSTEC培地とした．

分離平板培地には糖の分解性を利用した培地を必ず使用した．酵素基質培地は当初１つのO群を鑑別するクロモアガーO157培地やViRx O26培地を使用していたが，その後，様々なO群のEHECを単色で一括鑑別できるSTEC培地を使用するようになったため，様々な組合せとなっている．

直接分離培養法でO157が分離された53検体のうち，CT‐SMAC培地とクロモアガーO157培地の組合せが７検体，CT‐SMAC培地とクロモアガーO157TAM培地の組合せが３検体，CT‐SMAC培地とクロモアガーO157培地およびクロモアガーO157TAM培地の組合せが２検体，CT‐SMAC培地とクロモアガーO157培地および選択剤混合物‐STEC培地の組合せが28検体，CT‐SMAC培地とクロモアガーO157TAM培地および選択剤混合物‐STEC培地の組合せが13検体であった．表には示していないが，クロモアガーO157培地およびクロモアガーO157TAM培地のみでO157が分離された検体はなかった．

直接分離培養法でO26が分離された77検体のうち，CT‐RMAC培地とViRx O26培地の組合せが２検体，CT‐RMAC培地と選択剤混合物‐STEC培地の組合せが12検体，CT‐RMAC培地とViRx O26培地および選択剤混合物‐STEC培地の組合せが56検体，CT‐RMAC培地とViRx O26培地，選択剤混合物‐STEC培地およびSTEC培地の組合せが７検体であった．表には示していないが，ViRx O26培地，STEC培地のみでO26が分離された検体はなかった．

表３　選択分離培地の組合せ

O157

使用培地			菌が分離された検体数
CT-SMAC	クロモアガー0157		7
CT-SMAC	クロモアガー0157TAM		3
CT-SMAC	クロモアガー0157	クロモアガー0157TAM	2
CT-SMAC	クロモアガー0157	選択剤混合物‐STEC	28
CT-SMAC	クロモアガー0157TAM	選択剤混合物‐STEC	13
計			53

O26

使用培地				菌が分離された検体数
CT-RMAC	ViRX O26			2
CT-RMAC	選択剤混合物‐STEC			12
CT-RMAC	ViRX O26	選択剤混合物‐STEC		56
CT-RMAC	ViRX O26	選択剤混合物‐STEC	STEC	7
計				77

O157，O26およびO111以外のEHECは，糖分解で鑑別する培地がなくSTECの色調もO群によっては明記されていないため，VT遺伝子のスクリーニング検査を追加した．VT遺伝子のスクリーニング検査は選択分離培地から単独集落の複数をまとめたもの，もしくは濃厚発育部からかきとり得た菌体（以下，コロニースイープと略す）または増菌培養液を検体として実施した．VT遺伝子の検出方法はPCR法（タカラバイオ）またはLamp法（栄研化学）を使用した[3,4]．この結果を表４に示した．VT遺伝子スクリーニング検査実施数は，43検体であった．そのうちスクリーニング結果が陽性で分離培養が陽性であった検体は６検体，スクリーニング結果が陰性で分離培養が陽性であった検体は０検体，スクリーニング結果が陽性で分離培養が陰性であった検体は２検体，スクリーニング結果が陰性で分離培養も陰性であった検体は35検体であった．VT遺伝子スクリーニング検査実施数43検体のうち41検体はスクリーニング結果と分離培養の結果が一致した．しかし２検体はVTスクリーニング検査が陽性であったが，EHECの菌分離には至らなかった．その２検体はO103であり，そのうち１検体は，DHL培地（栄研化学）からのコロニースイープや増菌培養液を検体としたものはスクリーニング検査が陽性であったが，選択剤混合物‐STEC培地にEHECの色調を示すコロニーが見られなかった．その検体についてDHL培地からコロニーの釣菌および増菌培養液はビーズ法も実施したが，O103は分離できずVTスクリーニング検査の結果と分離培養の結果は必ずしも一致しないことを経験した．使用したDHL培地は一般的な大腸菌分離培地であり、糖分解で鑑別する培地がない場合に採用している[3,4]．

VTスクリーニング検査が陽性であり，かつEHECが分離された６検体はO121，O103，O145であった．

過去６年間に検査を実施したEHECの検体について分離状況等についてまとめた結果，９割以上が直接分離培養法で分離されていることから，検査の選択肢を増やしEHECを効率よく分離するために，選択分離培地の種類，STEC培地に添加する選択剤混合物の変更，CT濃度を検討していく必要がある．増菌培養法のみでEHECが分離された検体数は少ないが，O157以外のO群は37℃mEC培地で検出された．また陰性確認のような菌量が少ないと予想される検体について増菌培養法は有効であった．現在は直接分離培養法でEHECが分離された場合は増菌培養法での同定は行っていないが，今後は増菌培養法での同定も行い，増菌培地の種類や温度条件のデータを蓄積していくことも重要である．

最後に衛生研究所への迅速な検体搬送，情報提供にご尽力いただきました各保健福祉事務所およびセンター保健予防課の方々，ご指導をいただきました衛生研究所微生物部の方々に深謝いたします．

参考文献

１）腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報．43，1（103）-4（106）
２）国立感染症研究所：感染症発生動向調査，感染症発生動向調査年別一覧表‐2020‐，三類感染症 https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10066-report-ja2020-10.html　（2022/6/10アクセス）
３）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1120第1号
４）国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌（EHEC）検査・診断マニュアル 2022年4月改訂3-6　（2022）

表４　VT遺伝子スクリーニング及びEHEC分離培養結果

		分離培養		
		陽性	陰性	計
VT遺伝子スクリーニング	陽性	6	2	8
	陰性	0	35	35
		6	37	43