

腸管出血性大腸菌 O157 の検査法の確立

山井志朗, 大澤 朗

1. はじめに

EHEC O157 感染症は、1982年2月アメリカのオレゴン州、ついで5月にミシガン州で発生し、アトランタの Centers for Disease Control and Prevention (CDC) で原因菌および原因食品の究明が行なわれ初めて報告¹⁾された。わが国では1984年に大阪での散発事例²⁾で初めて EHEC O157 が確認されたが、広く一般に知られるようになったのは、1990年埼玉県浦和市の幼稚園で、飲料水を原因とした本菌による集団下痢症³⁾で、2名の園児が死亡した事例以降である。その後、国立予防衛生研究所(現・国立感染症研究所)の情報収集によると、年間100例前後の VT 産生大腸菌が分離されており⁴⁾、そのほとんどが EHEC O157 で占められているが、多くは散発事例由来であった。

ところが、平成8年5月下旬から O157:H7 による集団食中毒あるいは散発的な感染症が全国で相次いで発生し、7月には大阪府堺市で1万人近くもの発症者を出す大規模集団食中毒の発生を見た。本事例には HUS 等の続発症による死亡者も出るに及んで大きな社会問題となっている。O157 による感染症が世界的にこれほど注目されているにもかかわらず、その感染源および感染経路等の疫学情報が驚くほど乏しいのも事実である。表1はアメリカ、カナダ、英国、そして本邦で1995年までに発生した集団事例に於ける原因食品、物質等を集計したものであるが、汚染源として主な肉および乳製品が特定されている一方で「不明」と表記されるものの件数がアメリカを例外として半数を占めている。この原因の1つとして本感染症の所謂潜伏期間が他の腸管感染症とくらべ非常に長く(平均3日~4日)、そのため感染時の患者の摂取した汚染の疑いのある食品・物質等がすでに消費あるいは廃棄されている場合が非常に多いこと、もう1つには病原性・非病原性を含めた無数の大腸菌の中から O-157 とする特定の血清型しかもベロ毒素を産生する株を見つけ出す、いわば「敷薬に落ちた縫針を捜し出す」ような作業が要求されるからである。

このような状況から、近年 O157 をより効率的かつ迅速に検体から検出する新しい手法が開発され、様々な検出用キットが市販されるようになった。これらキットの大半は O157 の血清型抗原と特異的に反応する抗体を利用した免疫学的手法である。今回我々はこれらの検出用キットについてのその特異性、感度およびキットにかける前段階の増菌培養条件を実験的に検討し、主に食品および環境由来の

表1 腸管出血性大腸菌感染症の推定原因食品

原因食品	(1995年まで)			
	米国	カナダ	英国	日本
牛肉・ハンバーガー	10	5		
生牛乳		1		
ターキーロール			1	
肉類			2	1
サンドイッチ		1		
ヨーグルト			1	
調理ポテト			1	
調理食品類			5	
野菜類			1	
学校ランチ	1			3
アップルサイダー	1			
飲料水	1		1	1
農場	1			
プール水	2		1	
接触感染	2	1	4	
不明		13	9	11
合計	18	21	26	16

検体から効率よく O157 を検出する検査法を確立したので報告する。さらにこの検査法に従い県内で発生した O157 感染事例およびそれらの関連調査としてと畜場および県内4河川から採取された検体から O157 の分離を試みたのでその成績についても報告する。

2. 各種 EHEC O157 検出法の検討

EHEC O157 (以下 O157) を検出のための手法の基本的な流れは、まず(1)検体を選択分離培地に接種培養し O157 の疑いのあるコロニーを釣菌、次に(2)釣菌された株を各種確認培地に接種培養しその生理・生化学性状を確認、さらに(3)確認された菌の血清学的試験による O 抗原、H 抗原型別、最終的に(4)O157 と血清型別された菌株についてラテックス凝集反応、PCR 法⁵⁾、Vero 細胞変性試験による VT 産生の有無の確認、といった作業行程を含んでいる⁶⁾。O157 に感染し発症した患者の糞便では原因菌である O157 の菌数が多いので糞便を直接分離培地に接種培養することで比較的容易に菌の検出が可能である。一方感染しても発症しない所謂「健康保菌者」の糞便また食品、水、拭き取りサンプル等の検体中の O157 については、他の菌と混在し菌数も少

(神奈川県衛生研究所細菌病理部)

ないこと、また温度や薬剤によって菌体細胞が損傷を受けていることがあり検出が極めて困難な場合がある。そこでこのような検体については直接分離培地に接種せず、適当なる増菌培地で培養し菌を相当数に増やしてから分離培地に接種するのが手法の慣例となっている。この場合選択性の低い培地で増菌すると O157 以外の菌も相当数増菌されるので次の段階の分離培養が困難となる。そこで培菌培地に O157 をできるだけ選択的に増菌させるような薬剤を添加したり、その培養温度・時間を設定している。後述される種々の O157 検出用キットによる菌検出においても、その実質検出作業に先だつ適切な増菌のプロセスが必須である。そこで我々はこの増菌に係る培地の種類、培養条件に主眼をおき以下のごとくの検討を行なった。

2.1 O157 株の薬剤感受性

現在 O157 検出の目的で市販されているキットの手法原理は 2 つに大別される。その 1 つは O157 の血清型抗原(おそらくは菌体表層糖鎖抗原)に特異的に反応する抗体を用いた酵素免疫法(EIA)であり、もう 1 つは同様の抗体を磁化されにくい微細鉄ビーズ表面に固定し、これによって菌体それ自体を捕捉する免疫磁気ビーズ法である。前者を用いた場合は検体での O157 の存在の有無がある程度確認できるにとどまるが、後者の手法では有無が確認できるだけでなく実際に生きた菌株が分離できるという利点がある。両者とも実質の反応系に至る前処理として検体を適当な培地に接種し増菌培養する必要があるが、O157 への選択性を高める目的で検体の前培養培地として Trypticase soy broth 培地(以下 TSB; BBL 社)、cefixime(CFIX) 50 μ g/L、亜テルル酸カリウム (TE) 2.5mg/L、バンコマイシン 40mg/L の濃度で添加した TSB (以下 TSB-CTV)、ノボピオシン (NB) を 20mg/L の濃度で添加した modified E. coli 培地(以下 mEC-NB; 極東社)を用いている場合が多い。また mEC-NB による培養では培養温度を通常の 36 $^{\circ}$ C ではなく 42 $^{\circ}$ C に設定して増菌培養している。しかし細菌の薬剤耐性・感受性は株によって異なったりまた培養温度に影響される場合がある、これを無視して「選択的」に前培養を行なった場合、標的細菌が増殖せず、したがって上記の方法で全く検出できない可能性もあると考えられた。そこで我々はこの可能性の是非を確認するべく、本県で発生した各事例および関連調査より分離した総計 119 株の O157 株について CFIX, TE, NB に対する感受性試験を National Committee for Clinical Laboratory Standards⁷⁾ の方法に従って行った。その結果、図 1 で示されるように、CFIX および NB に対して培地添加濃度を下回る最小発育阻止濃度 (MIC) を示した株は NB に対する 1 株 (0.8%) のみであったことから、これらの 2 薬剤については現行の添加濃度で特に問題はないと考えられる。一方、TE に対しては 8 株 (6.7%) が培地添加濃度 (2.5mg/L) 以下の MIC を示した。これら 8 株は牛の糞便由来で、TV 遺伝子保有株であった。Zadik ら⁸⁾は家畜由来の O157 は VT 遺伝子保有株でもヒト由来株と比べかなり低い MIC を示す株がある

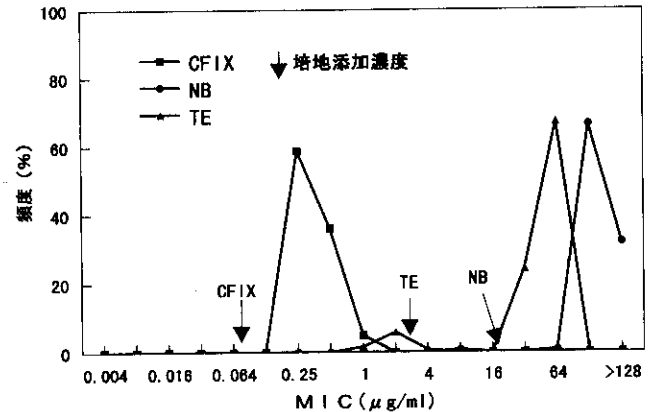


図 1 大腸菌 O-157 (n=119) のセフィキシム (CFIX)、ノボピオシン (NB) および亜テルル酸カリウム (TE) に対する感受性分布

ことを報告している。この所見と今回の試験結果から家畜由来の試料を TSB-CTV で培養する際には TE 添加濃度を低くする等の配慮が必要と考えられる。

2.2 各種培菌培地、培養条件での O157 株の増殖

上記の試験では、各薬剤を含む寒天平板上に高い濃度 (10⁶CFU/ml 以上) の菌液を接種し、培養後に平板上に形成される集落の有無で菌の薬剤感受性が判定されたが、後述される各検出法に係る増菌培地に接種される検体中の菌濃度は遥かに低い濃度であることが想定され、このような場合菌が TSB-CTV あるいは mEC-NB で添加された薬剤の影響を受けずに増殖可能なのは明らかでなかった。そこで我々は種々の検体由来の O157 株 (5 株) について、これらの株を約 10²CFU/ml の濃度で上記前培養培地に接種し 36 $^{\circ}$ C と 42 $^{\circ}$ C で培養した場合の菌数の増殖を経時的に測定した。図 2 はその結果をまとめたもので、(1) TSB においては 36 $^{\circ}$ C および 42 $^{\circ}$ C のいずれの温度で培養しても試験された O157 株総てが良好な増殖を示し、培養開始時の生菌数が 10²CFU/ml 台であったものが培養 6 時間以内に 10⁶CFU/ml 以上に増加した。(2) TSB-CTV で 36 $^{\circ}$ C で培養すると菌株による増殖性に差がみられ 6 時間培養しても菌数が 10⁶個を越えず、中には生菌数が減少するものがあった。また 42 $^{\circ}$ C で培養するとさらに菌株間の増殖性の格差が明らかとなった。(3) mEC-NB 培地において 36 $^{\circ}$ C で培養した場合、1 株が培養 8 時間までは増殖抑制を受け、10⁶CFU/ml の濃度を越える所まで増殖するのに 24 時間の培養が必要であった。42 $^{\circ}$ C で培養すると菌株間での増殖の格差が顕著となり 5 株中 3 株が 24 時間の培養では生菌数減少の傾向を示した。以上の結果より、O157 を速やかに 10⁶CFU/ml の濃度まで増菌させるには薬剤を一切添加しない TSB で 36 $^{\circ}$ C 培養するのが最良と考えられた。

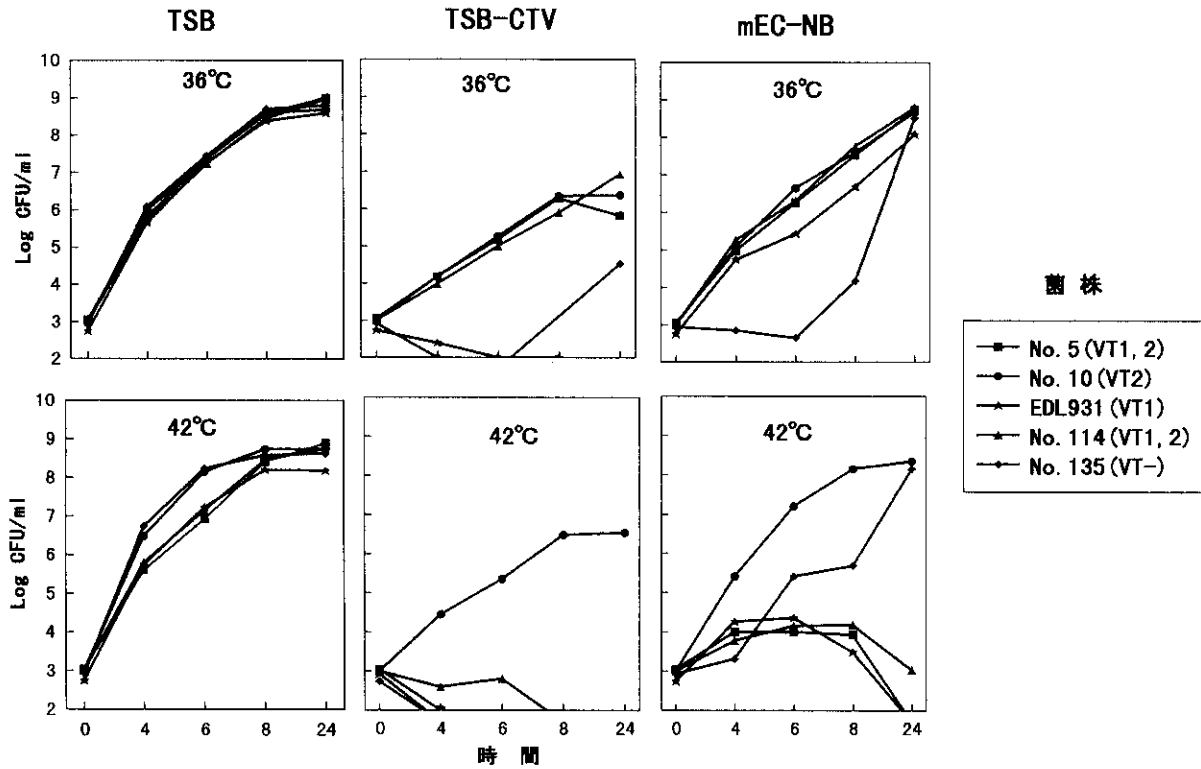


図2 大腸菌O-157のTSB, TSB-CTVおよびmEC-NBにおける増殖

2.3 EIA法に基づくO157検出用各種キットの特異性、感度の比較試験

現在、O157に対する特異抗体を用いた酵素抗体反応により検体中にO157の「有無」を判定する様々なEIAキットが市販されている。今回は4種のキット、EZ Coli Rapid Detection Kit (以下EZ; Difco社), Tecra E. coli O157 (以下TEC; Bioenterprises社), VIP E. coli O157 (以下VIP, グンゼ社), EHEC テック ELISA (以下ETE; チッソ社) について、これらのキットの検出感度および *E. hermannii* との交差反応の有無について検査した。

当所において牛生レバーより分離されたO157: H7(VT2産生), KE10, 牛の肛門周辺の拭き取りサンプルより分離されたO157: NM(VT非産生), KE135, および牛の糞便より分離されO157の市販血清(デンカ生研)と明らかなる交差凝集を起こした *E. hermannii*, KE174, の3株を各々TSBに接種し37°C, 18時間培養し、培養後の培養液を生食水で10段階希釈し、これから上記キットによる感度、特異性を比較した。その結果表2に示すようにKE10についてはEZ, VIP, ETEにおいて菌数 4.9×10^6 CFU/ml以上で明瞭な陽性反応を示し、またTECでは 4.7×10^4 CFU/mlでも検出可能であった。KE135についてはEZとVIPで 6.3×10^6 CFU/ml以上で陽性、TECでは 6.3×10^4 CFU/ml以上で陽性の結果を示したが、ETEでは菌数に関係なく総ての検体で陰性であった。またいずれのキットにおいても菌数に関係なく *E. hermannii* との交差反応は

表2 O157: H7菌株(KE10), O157: NM(KE135), *E. hermannii* (KE174) に対する各種O157検出用ELISAキットの感度・特異性の比較

菌株	CFU/ml	判定結果			
		キット名: EZ	TEC	VIP	ETE
KE10	4.9×10^7	+	+	+	+
	$\times 10^6$	+	+	+	+
	$\times 10^5$	-	+	-	-
	$\times 10^4$	-	+	-	-
	$\times 10^3$	-	-	-	-
KE135	6.3×10^7	+	+	+	-
	$\times 10^6$	+	+	+	-
	$\times 10^5$	-	+	-	-
	$\times 10^4$	-	+	-	-
	$\times 10^3$	-	-	-	-
KE174	3.9×10^7	-	-	-	-
	$\times 10^6$	-	-	-	-
	$\times 10^5$	-	-	-	-
	$\times 10^4$	-	-	-	-
	$\times 10^3$	-	-	-	-

なかった。この結果、検査した4つのキットの中では感度においてTECがもっとも優れているが、O157への特異性に関してはETEが他のキットに若干劣ることが示唆された。我々は別途行われた食品および環境汚染実態調査でVIPを用いてO157のスクリーニングを行い明らかに「陽性」と判定される2,3の検体を得た。しかしながら、後述される免疫磁気ビーズ法を用いてそれら検体より菌の分離を試みた結果、分離された菌は抗O157血清で凝集を認める*Citrobacter* sp.であった。VIPをはじめ他のEIAキットのO157に対する特異性に関しては更なる検討が必要と思われる。

2.4 各種O157選択寒天平板上におけるO157株の増殖能の比較

大腸菌の選択的分離用寒天板としては一般にDHL寒天やMacConkey寒天が用いられているが、O157を対象とする場合は本菌がソルビット遅あるいは非分解であることからソルビットを加えたMacConkey寒天(SMAC)が主に用いられている。また本菌が他の大腸菌に比べcefiximeや亜テルル酸カリウムに対して抵抗性があるので、これらの薬剤を上記の平板に添加して選択性をさらに高めた培地(CT-SMAC)も使用している。Zadikら⁹⁾はO157の選択分離平板としてCT-SMACが最も有用であると報告している。後記される免疫磁気ビーズ法ではビーズに捕捉された菌を上記の平板に接触培養し、その結果平板上に形成されたコロニーよりO157が検出されるが、捕捉された菌の内どの位の割合の菌が上記平板でコロニーを形成しうるのかは明らかではない。上記のZadikら⁹⁾の報告では10²個台の菌を平板に接種培養しコロニー形成の「有無」によって平板の有用性が定性的に検討されているのみで、菌の増殖抑制がどの程度起こるのかは明らかでない。そこで我々は食品および患者由来O157の4株について、各種平板におけるコロニー形成能を定量的に測定した。各菌株をHeart Infusion(HI)ブイオンで36℃、18時間培養後、培養液を10⁻⁷まで10段階希釈し、0.1ml当たり100~500個の生菌を含む菌液を調製し、これをHI平板(栄研)、SMAC平板(OXOID)、CT-SMAC平板(SMAC平板にcefixime 50 μg/Lおよび亜テルル酸カリウム2.5mg/Lを添加したもの)に滴下・塗布し、36℃、18時間培養した。培養後、各平板上に形成されたコロニー数をカウントした。その結果、非選択培地であるHI平板でのコロニー数と比べると上記2種の選択培地上(特にCT-SMAC平板上)で形成されるコロニー数が、図3で示されるごとく菌株によっては著しく減少することが明らかとなった。以上の結果からCT-SMAC平板上に塗布される検体中のO157の菌数が低かった場合(100個以下)菌検出が困難となりうることを示唆された。

2.5 免疫磁気ビーズ法によるO157の検出

食品および拭き取り検体からの病原性大腸菌O157の検出・分離は検体に混在する他の血清型の大腸菌またはその

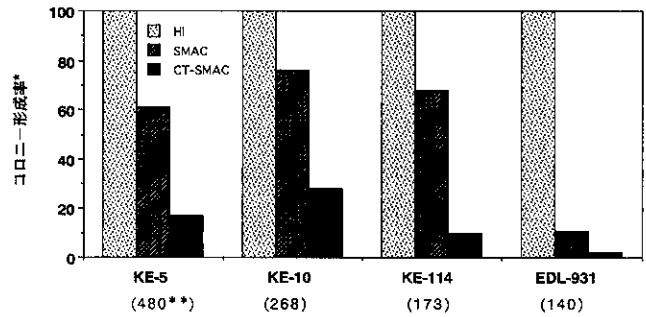


図3 各種平板上のO157株のコロニー数の比較
* HI平板上のコロニー数を100%とした場合
** 菌株番号の下の括弧内の数字はHI平板で形成された実際のコロニー数(平均値)

他の細菌の増殖によって従来の培養法では非常に困難な場合が多い。Dynabeads anti-E. coli O157 (Dynal社;免疫ビーズと略)は増菌した検体から直接O157を微細磁気ビーズを用いて捕捉し、標的菌を選択濃縮・分離する検出キットで、単離、濃縮されたビーズと細菌の結合体を適当な選択培地で直接培養することにより、標的細菌O157が1mlあたり100個以下の低レベルの場合でも検出可能とされている。しかしこの免疫ビーズを用いての標的細菌の検出率は、増菌培養後の検体中の標的細菌の数またそれ以外の細菌(所謂バックグランドフローラ)の多少に顕著に影響され、このため増菌で使用される培地、培養温度、培養時間がこの方法のパフォーマンスの鍵を握っていると言っても過言ではない。そこで我々はO157を市販の牛挽肉と共に下記する如く増菌培養用の液体培地に実験的に接種し、その6時間および24時間後の培養液について免疫磁気ビーズ法による標的細菌の検出率の比較を行った。

増菌用液体培地は上記で紹介されたTSB, TSB-CTV, mBC-NBの3種を用い、TSBとTSB-CTVでの培養温度は36℃またmEC-NBでは42℃であった。本実験に使用したO157菌株は5株で、これらの株をそれぞれHIブイオンにて培養し、対数増殖期にある細菌細胞を25~30個含むように調整した菌液0.5mlを市販牛挽肉(O157陰性と確認されているもの)3gに接種した。このように準備された検体に上記の増菌培養培地27mlを加え、十分に混和したあと上記に示された培養温度で6時間、24時間培養した。培養後、免疫ビーズをキットに添付された操作手順に従って使用し、最終的に調整されたビーズ液50μmlをSMACおよびCT-SMACに塗布し、36℃で18時間~20時間培養した。培養後上記平板上に形成された単離可能なO157のコロニー(透明感のある白色コロニー)とそれ以外の形態のコロニーの数をカウントし、前者の数を前者と後者の和で割った数値を%表示しこれを菌検出率の指標とした。陰性対照としてO157を接種しない検体についても上記と同様の処理をした。

6時間増菌培養した検体についてみると、TSBとTSB-

CTVで増菌培養した場合の菌検出率を比較すると使用した分離用平板の種類は別なく、前者の方が後者よりも検出率が高く、TSB-CTVで増菌培養した検体には分離平板上でO157株およびバックグラウンドフローラのコロニー形成が全く見られないものがあった(図4a, b)。TSBとmEC-NBで前培養した場合の菌検出率を比較すると5株中3株においては差はみられないが残りの2株ではTSBで30~100%の検出率を示したのに対してmEC-NBでの検出率は10%以下となり、中には全く分離できなかった検体もあった(図4a, b)。

24時間増菌培養した検体についてみると、TSBとTSB-CTVで増菌培養した場合の菌検出率を比較すると前者では総ての検体からO157の分離可能であったが、後者では全く分離出来ないものが検体の大勢を占めた(図4c, d)。またTSBとmEC-NBで前培養した場合の菌検出率を比較すると上記6時間培養の場合と同様に後者においてCT-SMAC平板から高い率で5株中3株を分離できたが残り2株はほとんど分離できなかった(図4d)。一方TSBで前培養した場合の培養時間の差による影響についてみると、6時間倍菌培養と24時間倍菌培養された検体を比べると、24時間培養での菌検出率が大幅に低下していることが明らかとなった(図4c)。

以上の結果から、免疫磁気ビーズ法による食品検体からのO157の検出には増菌培地としてTSB、その培養条件と

しては36℃、6時間培養が最も適していることが示唆された。一方TSB-CTVやmEC-NB培地を使つての増菌培養では検出率が低下したり菌株によって検出されない場合もあることが明らかとなった。この差異の原因としては、上記項目でも述べられたように2種の選択増菌培地、TSB-CTVとmEC-NBに添加されている抗生物質・抗菌物質の影響で標的細菌の増殖が抑えられていること、またmEC-NBによる増菌培養では42℃の比較的高い温度で培養したことなどが挙げられる。また本実験で牛挽肉に接種した菌はすべて増殖対数期にありintactと想定される菌細胞であり、上記した抗生物質あるいは温度による影響は熱や低温、貧栄養環境からのストレス・傷害を受けた所謂injured cellsについてさらに大なるものと予想される。この意味でも免疫磁気ビーズ法に至る検体の増菌培養条件としてTSB培地での36℃、6時間培養がもっとも適当であることが示された。

3. 県内で発生したO157感染事例の疫学的調査と関連調査

上記のごとくその有用性が実験的に確認された免疫磁気ビーズ法を用いて、平成8年6月~8月に県内で発生した事例に対し、感染源を追究した3事例の概要と、それらの関連調査として同様の方法で行ったと畜場の汚染調査および県内4河川の汚染調査、検出されたO157の遺伝学的解析

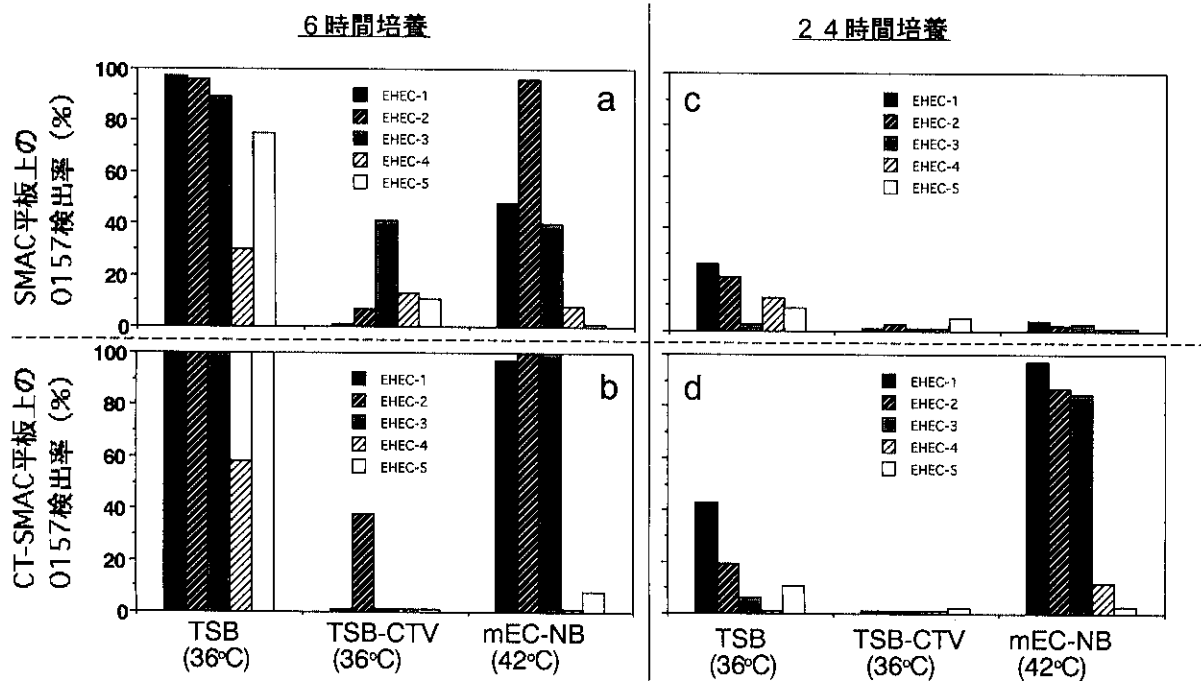


図4 IMS法における増菌培養条件および検出用平板の差異によるO-157菌株の検出率の比較
 a) 6時間培養後SMAC平板に接種
 b) 6時間培養後CT-SMAC平板に接種
 c) 24時間培養後SMAC平板に接種
 d) 24時間培養後CT-SMAC平板に接種

による菌株間の異同等の疫学的検討を行ったので下記する。なお分離菌のVT産生能およびその型別は、VT1およびVT2遺伝子についてPCR法により行ない、用いたプライマーペアおよびPCR反応条件は小林ら⁵⁾の報告に従った。DNAパターン解析では、制限酵素で処理した染色体DNAについて、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行ない泳動像のDNAパターンを解析した。

3.1 患者発生事例について

事例1：患者は三浦市内の小学4年9才の男子児童で、6月12日に発症し頻回の水様性下痢、14日夜から出血性下痢を呈し横須賀市内の病院に入院、18日にO157が検出され、当所でEHEC O157:H7 (VT2陽性)であることを確認した。三崎保健所の調査では、患者が通学している小学校の出席状況は通常の欠席率であり、当所で実施した学校給食共同調理場の拭き取り、検食、従業員の検便等の検査においても当該菌は検出されなかった。6月8日に患者は家族で市内の焼肉店を利用し、患者と父親のみが牛レバー刺しを喫食していたことが判明し、この喫食調査結果から原因と思われる施設を特定した。三崎保健所は18日に焼肉店の立ち入り調査を行ない、患者が喫食した牛レバーと同一ロットのものが残されていなかったため、参考品として別のレバーとその他の食品、施設の拭き取り、従業員の糞便等を採取し当所でmEC-NBを用いて検査を実施したが、当該菌は検出されなかった。

そこで検査法に免疫磁気ビーズ法を導入し、菌検索を再度行なった結果、28日に参考品の牛レバーから患者と同じ型のO157:H7 (VT2陽性)を検出した。これを受けて、7月2日焼肉店の拭き取り、水、排水等を含む再調査を実施したが当該菌は検出されなかった。この間、県衛生部においては牛レバーの流通経路の調査をすすめ、その仕入れ先が特定された。7月4日、焼肉店の牛レバーを卸した川崎市の卸売店に対し、川崎市が立ち入り調査を実施し、当所と川崎市衛生研究所が共同で施設の拭き取り、食肉、排水等の検査を行なった。その結果、牛レバー等の食肉からO157は検出されなかったが、施設内の処理台の下板の拭き取り、氷温冷蔵庫内の排水口の排水、排水溝の汚水の3カ所からO157:H7 (VT1, VT2陽性)を検出した。7月20日PFGEによるDNAパターン解析により、患者と参考品牛レバーから検出された菌の同一性が確認された。

事例2：相模原市内の16才の高校生が7月19日に発症し21日に入院、民間の検査機関で29日にO157:H7 (VT1, VT2陽性)が8月4日に検出された。喫食調査から14日に家族4人で焼肉店を利用していたことが判明し、当該施設の調査が行なわれた。取去食品、拭き取り、従業員の糞便、排水等からの菌検索の結果、流し内側とトイレのドアの把手の2カ所の拭き取りおよび従業員の1名の便から、O157:NM (VT2陽性)が検出された。

初発患者の高校生由来株は血清型、毒素型とも分離株と異なったが、血清型と毒素型が一致した父親、施設の拭き取り、従業員由来株4株間の異同を、PFGEによるDNA

パターンを検討し感染源の追究を行なった。その結果、父親由来株と施設の拭き取り由来株3株のDNAパターンは一致したが、従業員由来株のDNAパターンは上述の3株のそれとは異なっていた。

事例3：相模原市の7人家族内で発生した事例である。初発患者は7月20日発症、23日入院、便培養からO157:NM (VT2陽性)が26日に菌決定された。家族の健康調査から他にも有症状者がいたため、相模原保健所と共同で便培養を行なった結果、患者を除く6名のうち3名から同型菌を検出した。患者株とこれら3株のDNAパターンはすべて同一で、同じ起源と推定された。喫食調査では15日に牛肉調理品、自家製ミートボールを喫食していたが、残品がなく検査できなかった。患者の勤務先等関連施設での調査が所轄の保健所で行なわれたが、異常は見られなかった。

3.2 関連調査

と畜場汚染状況実態調査：県内4カ所のと畜場でと殺解体された牛、豚の直腸内容物132件、処理工程中の枝肉、肝臓表面の拭き取り213件、洗浄後の枝肉、肝臓表面の拭き取り87件、水、排水等15件、その他拭き取り61件の計508件について免疫磁気ビーズ法によりO157の検索を行なった。その結果、牛直腸内容物1件中1件(3.8%)、処理工程中の牛枝肉拭き取り26件中1件(3.8%)からO157:H7 (VT1, VT2陽性)を検出した。検出した個体は同一牛であった。また、豚直腸内容物106件中5件(4.7%)、処理工程中の豚肝臓拭き取り80件中2件(2.5%)からO157:HUT (VT陰性)が検出された。その他および洗浄後の検体からは標的細菌は一切検出されず、と殺解体時における糞便汚染が明かとなった。

河川水汚染調査：県下の4河川、相模川3地点、酒匂川3地点、滑川2地点、森戸川2地点の計10地点の河川水を採取し、各々5Lの遠心沈渣あるいはメンブランフィルター濾過したフィルターを供試し免疫磁気ビーズ法によりO157の検索を行なった結果、いずれも菌は検出されなかった。1回の調査ではあったがO157による県内4河川の河川水汚染は少ないものと推察された。

4. おわりに

腸管出血性大腸菌による食中毒、感染症が全国的に続発し、原因菌のO157:H7またO157:NMは各地に定着してしまっただけの様相を呈している。本菌感染症の実態を把握するには感染経路、感染源の究明による原因食品の特定が必須であり、効率の良い検査法の確立が急務である。EHEC検出のための簡易・迅速な方法としてELISA法を利用した検査キットが市販されているが、いずれも培養液中のO157抗原性を有する菌の「有無」を判定するものであり、この手法から直接菌を分離することはできない。これに対して免疫磁気ビーズ法は、標的菌(O157)を抗原抗体反応によって効率的に捕捉し、しかもその後培養ができることから菌株の諸性状(VT1, VT2の産生性、薬剤感受性、DNAパターン)についての調査を可能にする唯一の方

法である。今回、我々は免疫磁気ビーズ法を導入し、食品、拭き取り材料、排水等からO157を捕捉し、分離することができた。それに伴う増菌、分離培地、培養条件等の検討も行ない、汚染の比較的少ない食品等の材料はTSB培地、糞便等はTSB-CTV培地との併用で36℃、6時間培養後、免疫ビーズ処理を行ない、SMAC寒天培地あるいはCT-SMAC寒天培地で分離する検査手順を確立した(図5)⁹⁾。この方法で県内散発事例の菌検索を実施した結果、感染源の究明と感染経路を解明することに成功した。免疫磁気ビーズ法によるO157分離の有用性は、最近Karchら¹⁰⁾の報告によって証明されている。また、TSBを用いた6時間培養によって、標的菌O157の検出率が上がることは制作・販売元であるDynal社の利用法改訂版にも述べられている。さらに、今回我々の実験では糞便材料における増菌培養条件の検討は行なわなかったが、これについてもTSBとTSB-CTVとの併用で36℃、6時間培養が推奨されている。これらのことはいずれも我々の得た成績を支持してい

る。

分離菌株のPFGEによるDNAパターン解析において、事例2由来株間に相違が見られた。即ち、患者の父親由来株1株、拭き取り由来株2株、従業員由来株1株はいずれもO157:NM(VT2陽性)であったが、これらのうち従業員由来株のみが異なったDNAパターンを示した。このことから感染源は飲食店と推測されたが、従業員由来株の起源は異なると考えられ、従業員と本事例との関係は否定された。また、本事例2で分離されたDNAパターンが一致した3株と、事例3から分離されたO157:NM(VT2陽性)4株のDNAパターンは一致し、さらに両事例は発生地域、発生日もほぼ一緒であることから、何らかの接点があったことも考えられる。

わが国の集団事例においては、初発事例である埼玉県の水質汚濁で井戸水が汚染された水系感染事例⁵⁾と、今回の全国的な発生事例における岐阜県と岩手県の小学校および北海道の保育園の3事例以外、汚染源あるいは原因食品を特定するまでには至っていない。その原因の一つに本菌感染症の潜伏期間が他の下痢症に比べて長く、原因食品が処分されたり、良好な検体が入手できないことが挙げられる。欧米などでは本菌感染症がしばしば発生しており、O157:H7による集団事例の原因食品がハンバーガー、牛肉などであることが明らかにされている³⁾ことから、本菌の主な感染源として家畜や食肉等が疑われ、中でも牛が重要視されている。本菌が牛など家畜の腸管に分布していることは欧米や我々の調査からも明かであり、食肉処理施設での処理工程中に枝肉が糞便汚染を受け、二次汚染につながる可能性が非常に高い。従来法で行なわれていた過去4年間の県内と畜場におけるO157の調査では、当該菌を検出した事例はなかったが、今回の関連調査として行なったと畜場等の調査からO157の食肉汚染を裏付ける成績が得られたことは、食肉施設、処理工程、流通過程に対する抜本的な見直しと早急な予防対策が望まれる。また、O157以外のVT産生大腸菌による感染症も報告されており¹¹⁾⁻¹⁵⁾、詳細な生態分布調査が必要である。

参考文献

- 1) Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D. et al.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 306, 681-685, 1983.
- 2) 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, 他: *Escherichia coli* O157:H7による出血性大腸炎の“さかのぼり”調査. *感染症学雑誌*, 59, 1056-1060, 1985.
- 3) 城 宏輔: 埼玉県某幼稚園で流行した *E. Coll* O157:H7による出血性大腸炎. *臨床と微生物* 18, 457-465, 1991.
- 4) 渡辺治雄: 腸管出血性大腸菌O157:H7による食中毒とその予防. *食品衛生研究*, 46(8): 7-16, 1966.
- 5) 小林一寛: 腸管出血性大腸菌のPCR法による検出. *臨床と微生物*, 18, 507-513, 1991.
- 6) 伊藤武: ペロ毒素産生性大腸菌と食品衛生. *モダンメディア* 39, 307-322, 1993.
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standard:

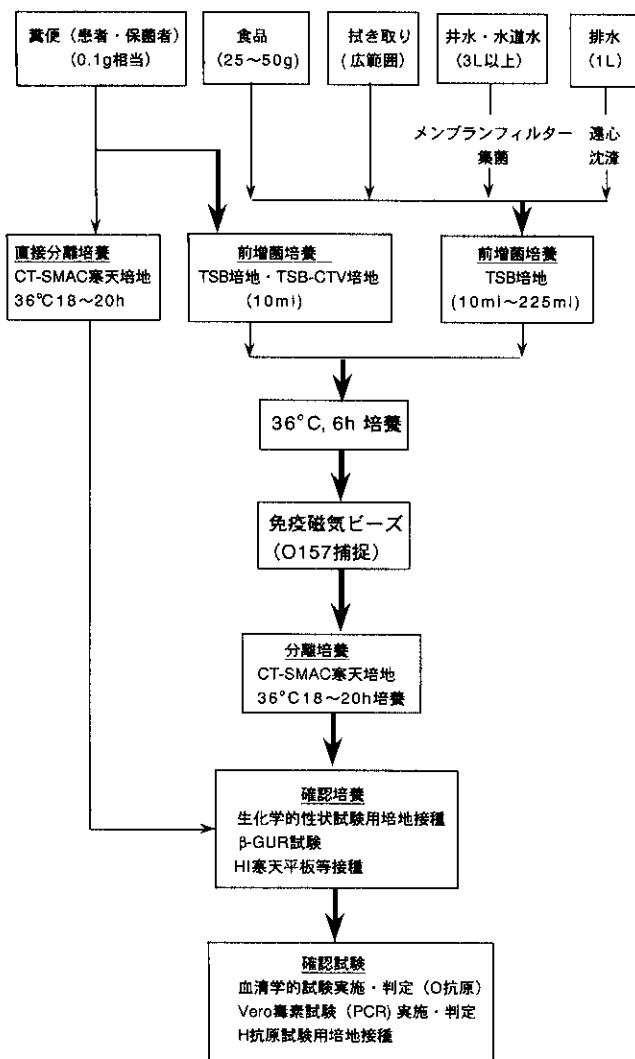


図5 腸管出血性大腸菌O157の検査法

- Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ed., Approved Standard, 13(25), 1993.
- 8) Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A. : Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, 39, 155-158, 1993.
 - 9) 浅井良夫, 山井志朗, 渡辺治雄, 他 : 免疫磁気分離 (IMS) 法による腸管出血性大腸菌 O157 の検出. *感染症学会誌*, 71, 46-54, 1997.
 - 10) Karch, H., Janet-Mittmann, C., Aleksic, S., Datz M. : Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 516-519, 1996.
 - 11) 伊藤武, 甲斐明美, 斎藤香彦, 他 : Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* O145 : H- による集団下痢症の細菌学的研究・疫学的検討. *東京都衛研年報*, 36, 16-22, 1985.
 - 12) 田中博, 大瀬戸光明, 山下育孝, 他 : Vero 毒素産生性大腸菌 O111 : H- による集団下痢症の細菌学的研究. *感染症学会誌*, 63, 1187-1194, 1988.
 - 13) 甲斐明美, 尾畑浩魅, 楠淳, 他 : Vero 毒素産生性大腸菌 OUT : H19 によると推定された集団下痢症の疫学的・細菌学的検討成績. *東京都衛研年報*, 43, 1-7, 1992.
 - 14) 村瀬敏之, 沖津忠行, 鈴木理恵子, 諸角浩利, 松島章喜, 山井誌朗 : Vero 毒素 1 産生性 *Escherichia coli* O1 : H20 の分離例. *神奈川県衛研報告*, 25, 42-43, 1995.
 - 15) Goldwater, P.N., Bettelheim, K.A. : An outbreak of hemolytic uremic syndrome due to *Escherichia coli* O157 : H- ; or was it ? *Emerging Infectious Diseases*, 2, 153-154, 1996.