

集団感染事例における 腸管出血性大腸菌 O26 分離培養法の検討

川合 常明 廣地 敬 坂本 裕美子
赤石 尚一 大谷 倫子 藤田 晃三

要 旨

2002年7月のほぼ同時期に2個所の保育園において腸管出血性大腸菌(EHEC)O26志賀毒素1(+)
による集団感染が起こった。両保育園の園児、職員及びその家族の便832検体、保存食40検体、ふ
きとり21検体、計893検体の培養検査を行った。その結果、両保育園児47名(うち有症者21名)、
A保育園の職員2名(無症状)、B保育園の家族5名及びB保育園の水遊び用組み立て式プール底の
ふきとり1検体からEHEC O26が分離された。

本事例の検査結果を基に、今後同様な集団発生時の大量検体を効率的かつ正確に検査するために、
分離培地及び増菌培地について検討を加えた結果、セフィキシム・亜テルル酸カリウム加ラムノー
ス・マッコンキー培地(CT-RMAC)がEHEC O26の選択性に優れていた、modified Escherichia coli
brothを用いた42-18時間増菌培養の併用により、更に検出感度が向上した、CT-RMACにセロビ
オースを添加することによりEHEC O26の選択性を向上させることが可能である、と考えられた。

1. 緒言

腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団感染は、
保育園、病院、福祉・養護施設などで多く発生し、
血清型ではO157が最も多く¹⁾、それ以外ではO26
による保育園の集団感染事例も多く報告されてい
る^{2,3,4,5,6,7)}。

2002年7月中旬から下旬のほぼ同時期に市内2
個所の保育園においてEHEC O26による集団感染
が発生し検便等893検体の検査を行った。

集団感染事例においては大量の検体を迅速かつ
正確な検査が要求されることから、本事例の検査結
果を基に、検査法について検討を行ったので、その
概要を報告する。

2. 事例の概要

A事例:2002年7月10日、医療機関から女兒(2
歳)のEHEC O26・志賀毒素(*Stx*)1(+)による

3類感染症発生届があった。患者及び家族の健康状
況調査を行ったところ、患者はA保育園に通園し
ていることが判り、同保育園における健康調査を行
うとともに、患者家族の検便及び給食施設のふきと
り検査を行ったが、EHEC O26は分離されなかった。
その後7月15日、下痢症状を呈し医療機関を受診
していた、患者と同組の女兒(2歳)の発生届があ
った。そのため、7月18日届出のあった園児2名
を除く、全園児(0~5歳)156名、全職員25名及
び園児の家族42名計223名の便検査を実施した。
その結果、園児10名(うち有症者3名)及び職員
2名(無症状)計12名からEHEC O26が分離され
た。その後、7月25日から毎週1回陰性確認のため
の検便を行ったが、初発から48日目の8月27日
をもって陽性者全員の陰性が確認された。A保育園
の感染者数は園児16名(うち有症者7名)及び職員
2名、計18名であった。

B 事例：2002 年 7 月 24 日，A 事例と同じ医療機関から男児（1 歳）の EHEC O26・Stx1（+）による 3 類感染症発生届があり，調査を行ったところ患者は B 保育園（A 保育園と同区）に通園していることが判った。このため B 保育園における健康調査を行った結果，同保育園では複数の有症者が確認された。このため，給食施設及び水遊び用の組み立て式プールのふきとり検査並びに届出のあった園児 1 名を除く，全園児 111 名，全職員 25 名及び園児の家族 67 名の検便を行った。その結果，園児 29 名（うち有症者 12 名），園児の家族 5 名及び組み立て式プール底部のボルト取り付け溝の滞留水から EHEC O26 が分離された。その後，8 月 5 日から毎週 1 回検便を行ったが，初発から 44 日目の 9 月 6 日をもって陽性者全員の陰性が確認された。B 保育園の感染者数は園児 31 名（うち有症者 14 名）及び園児の家族 5 名，計 36 名であった。

両保育園の園児及び職員の陽性者全員の陰性が確認されるまでに行った検査は，便 832 検体，保存食 40 検体，ふきとり 21 検体計 893 検体に昇った。

3．材料及び方法

3 - 1 EHEC O26 分離培養

分離培地の比較には，A 事例の便 415 検体，保存食 40 検体及びふきとり 21 検体を用いた。

便検査については直接培養をラムノース・マッコンキー培地（RMAC）及びセフィキシム・亜テルル酸カリウム加ラムノース・マッコンキー培地（CT-RMAC）^{8,9)}に接種し 37 18 時間培養を行い，増菌培養は modified Escherichia coli broth（mEC）培地（極東）に接種し 42 18 時間培養後¹⁰⁾，前記と同様に分離培地に接種し培養した。次に両培地上のラムノース陰性の白色集落を 1 検体 3 個釣菌し，確認検査は CLIG 斜面寒天培地（CLIG）（極東）¹¹⁾，LIM（日水），及び TSI（日水）に接種し 37 18 時間培養を行った。CLIG の斜面部赤変・高層部黄変及び LIM のインドール陽性株の濃厚菌液を調製し 121 15 分間加熱した後，病原大腸菌免疫血清 O26

（デンカ生研）によるスライド凝集試験を行った。

保存食については TSB（日水）で 37 6 時間前培養した後 mEC 培地で増菌培養し，分離培地に接種した。別に O26 免疫磁気ビーズ（VERITAS）で集菌後，同様に分離培地に接種し培養を行った。

ふきとり検体については mEC 培地で前記同様に増菌培養後，分離培地に接種した。

3 - 2 CLB 加 CT-RMAC の検討

本事例の陽性者について陰性を確認するために行われた検便 38 検体，保存食 11 検体，及び確認検査で陰性となった菌株（以下，「確認陰性株」という）23 検体の計 72 検体を用いて，MacConkey Agar Base（DIFCO）に -L(+)Rhamnose（和光純薬）及び D-(+)Cellobiose（CLB, ICN Biomedicals）を各々 1% の割合で加え，さらにソルビットマッコンキー寒天 CT サプリメント（アスカ純薬）を加えた培地を調製し，CT-RMAC との発育性状及び選択性を比較した。便及び保存食の培養方法は 3-1 のとおり確認陰性株 23 検体を両培地に接種し 37 18 時間培養した。

3 - 3 パルスフィールド ゲル電気泳動（PFGE）による DNA パターン解析

A 事例菌株 4 検体，B 事例菌株 10 検体及び B 保育園プールのふきとり菌株 1 検体について，PFGE による DNA パターン解析を行った。国立感染症研究所・技術研修会の方法¹²⁾に準拠し，制限酵素 *Xba*（50U）を用い，電気泳動装置 CHEF-DR（BIO RAD）により，泳動条件は電圧 6.0V/cm，イニシャルパルスタイム 4.0-8.0sec；9 時間，ファイナルパルスタイム 8-50sec；13 時間で行った。

また，泳動後の PFGE 画像を画像解析ソフト Fingerprinting（BIO-RAD）によりデンドログラムを作成し，バンドパターンの類似度を比較した。

4．結果

4 - 1 CT-RMAC 及び RMAC による分離培養の比較

A 事例の便 415 検体中 27 検体から EHEC O26：H11 が分離され，Stx1 が陽性であった。直接培養では CT-RMAC 及び RMAC とともに分離されたのは 7

検体であり、CT-RMAC のみが 11 検体、計 18 検体であった（表 1）。また増菌培養では両培地とも分離されたのは 4 検体であり、CT-RMAC のみが 21 検体、RMAC のみが 1 検体、計 26 検体であった（表 2）。なお、増菌培養において RMAC のみで分離された 1 検体は、直接 CT-RMAC においても分離された。また、直接及び増菌培養法の比較では、両培養法とも分離されたのは 17 検体あり、直接のみが 1 検体、増菌のみが 9 検体であった（表 3）。

4 - 2 CT-RMAC 及び RMAC の EHEC O26 検索における分離状況

便 415 検体を CT-RMAC で培養後、ラムノース陰性の白色集落を形成した 112 検体から分離した 261 株について確認検査を行った結果、36 検体 68 株が CLIG の斜面部赤変・高層部黄変及び LIM のインドル陽性となった。これらについて血清 O26 スライド試験を行った結果、EHEC O26 陽性は 18 検体 34 株であった。また、増菌 CT-RMAC では 71 検体 188 株のうち確認検査で陽性となった 32 検体 79 株について血清 O26 スライド試験を行った結果、EHEC O26 陽性は 25 検体 63 株であった（図 1）。

一方、RMAC では 111 検体 211 株のうち確認検査で陽性となった 65 検体 126 株について血清 O26 スライド試験を行った結果、EHEC O26 陽性は 7 検体 7 株であった。また、増菌 RMAC では 51 検体 126 株のうち確認検査陽性となった 32 検体 75 株について血清 O26 スライド試験を行った結果、EHEC O26 陽性は 5 検体 7 株であった（図 1）。

4 - 3 CLB 加 CT-RMAC 及び CT-RMAC

の発育性状の比較

確認陰性株の数株について簡易同定キット（Api20E; 日本ビオメリュー, EB20; 日水）を用いて生化学的性状を調べた結果、*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* と同定された。確認陰性株 23 株及び対照に EHEC O26 株を用いて、CT-RMAC 及び CLB 加 CT-RMAC に接種した結果、確認陰性株は CT-RMAC では全株ともラムノース陰性の白色集落を形成したのに対し、CLB 加 CT-RMAC では赤色混濁集落を形成した。一方、EHEC O26 株は両培地とも白色集落を形成し、確認陰性株と EHEC O26 株を容易に識別できた。

便 38 検体のうち CT-RMAC では 13 検体、CLB 加 CT-RMAC では 15 検体から EHEC O26 が分離された。

保存食からは両培地ともに EHEC O26 は分離されなかった。

4 - 4 パルスフィールド ゲル電気泳動 (PFGE) による DNA パターン分析

A 及び B 事例の関連性について、両事例の菌株及び B 保育園のプール分離株について、PFGE のバンドパターンを解析した結果、90%以上と極めて類似していた（図 2）。このことから、両保育園における集団感染が共通の感染源によることが示唆されたが、特定するには至らなかった。また、保育園における感染まん延の要因については園児の衛生管理や異年齢交流、プール遊びなどが複雑に関わっていたと考えられた。

表1 直接培養の結果

		直CT-RMAC		
		+	-	合計
直 RMAC	+	7	0	7
	-	11	397	408
合計		18	397	415

表2 増菌培養の結果

		増CT-RMAC		
		+	-	合計
増 RMAC	+	4	1	5
	-	21	389	410
合計		25	390	415

表3 培養法の比較

		直接培養		
		+	-	合計
増菌培養	+	17	9	26
	-	1	388	389
合計		18	397	415

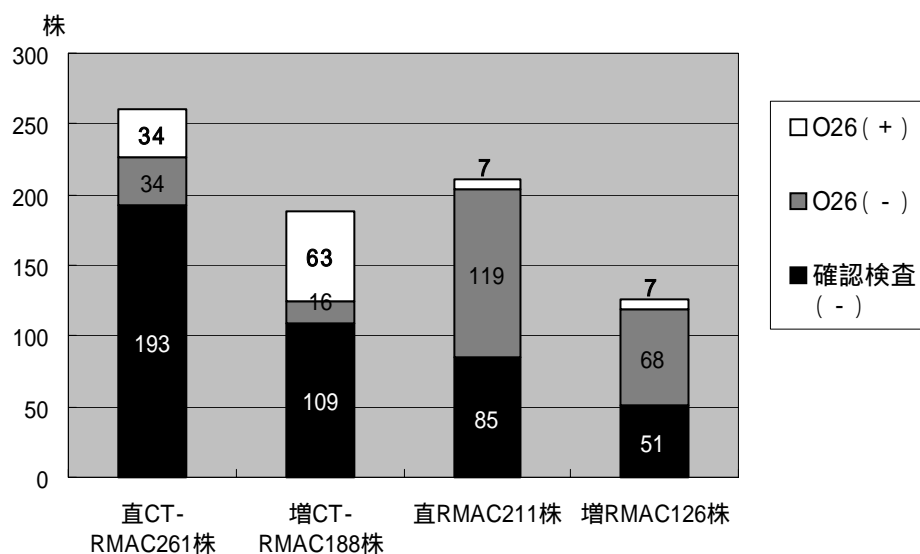


図1 各培地における分離株の内訳

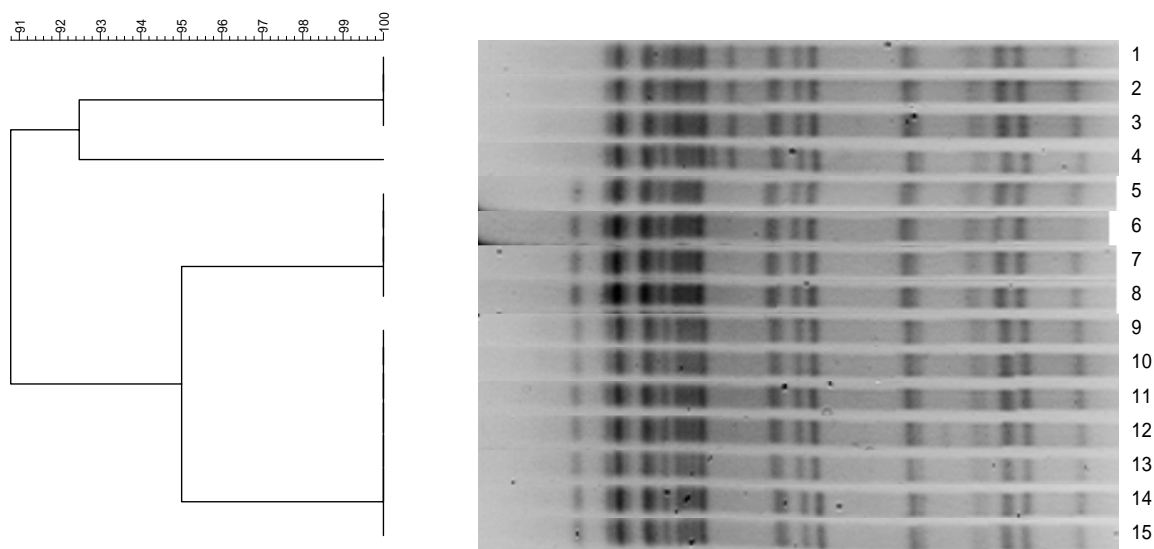


図2 制限酵素 *Xba* による PFGE パターンのデンドログラム

レーン No.1,2,3,4,6,9,10,11,12,13 : B 事例菌株

レーン No.5 : B 保育園プール株

レーン No.7,8,14,15 : A 事例菌株

5. 考察

5-1 CT-RMAC 及び RMAC の比較並びに mEC 培地の増菌効果

EHEC O26 の検査法については、ラムノース陰性の炭水化物分解性状を利用した RMAC 及び選択性の強い CT-RMAC 等の選択分離培地が開発され、検

査には両培地が併用され、また、mEC 培地を用いた増菌培養方法も検討されている¹⁰⁾。

今回、A 事例 415 検体の培養結果をもとに EHEC O26 分離のための CT-RMAC 及び RMAC の比較並びに mEC 培地による 42 18 時間培養の増菌効果を検討した。その結果、両培地において直接培養で分離

された割合は CT-RMAC が EHEC O26 陽性 18 検体すべて、RMAC は EHEC O26 陽性 18 検体中 7 検体であり、増菌培養では CT-RMAC が EHEC O26 陽性 26 検体中 25 検体、RMAC は EHEC O26 陽性 26 検体中 5 検体であった。また、両培地で分離培養後、確認検査を行った株のうち EHEC O26 と同定された株の割合は直接培養では CT-RMAC が 261 株中 34 株、RMAC では 211 株中 7 株であり、増菌培養では CT-RMAC が 188 株中 63 株、RMAC は 126 株中 7 株であった。これらのことから、CT-RMAC は RMAC と比較して EHEC O26 の検出率が高く、選択性に優れていることが確認された。

増菌培養の効果については、増菌培養で分離された 26 検体のうち 9 検体は直接培養では分離されず、増菌培養でのみ分離され、mEC 培地を用いた 42 増菌培養の有効性が認められた。

5 - 2 CLB 加 CT-RMAC の検討

ラムノース陰性の *Enterobacter cloacae* は CT-RMAC では EHEC O26 と外見上区別できない集落を形成するため、釣菌後に EHEC O26 との鑑別が必要とされ⁹⁾、今回の事例でも確認陰性株は *Enterobacter cloacae*、*Enterobacter asburiae*、*Klebsiella pneumoniae* であった。直接 CT-RMAC で釣菌した集落のうち確認陰性株の割合は 261 株中 193 株（約 74%）と極めて高く、このことは検出精度及び検査効率の低下にもつながると考えられた。そのため容易に集落を鑑別でき選択性をさらに高めた培地が必要と考えた。また、EHEC O26 を含むほとんどの大腸菌は CLB 非分解性¹³⁾であるのに対し、*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter asburiae*、*Klebsiella pneumoniae* は CLB 分解性^{14,15)}であることから、CT-RMAC に CLB を添加した培地を検討した。確認陰性株は赤色混濁集落を形成したのに対し、EHEC O26 は白色集落を形成し容易に識別が可能であることが判明した。今後、さらに炭水化物分解試験及び発育試験等の基礎実験を重ね、また CLB 加 CT-RMAC を用いて多くの便及び食品検体などの試験を行い、本培地の有用性を検討したい。

6 . 結語

私たちは集団感染事例における EHEC O26 検出法の検討を行い、以下の結果を得た。CT-RMAC が EHEC O26 の選択性、分離性に優れていた。mEC 培地を用いた 42 18 時間培養による増菌により検出率が向上した。CT-RMAC に CLB を加えることにより選択性がさらに向上した。

7 . 文献

- 1) 国立感染症研究所：特集 腸管出血性大腸菌 2002 年 4 月現在 病原微生物検出情報 23 ,1-2, 2002
- 2) 同上：18, 7-8, 1997
- 3) 同上：19, 7-8, 1998
- 4) 同上：21, 8-9, 2000
- 5) 同上：21, 14, 2000
- 6) 同上：23, 15-16, 2002
- 7) 同上：23, 16-17, 2002
- 8) 森本洋，藤原修，長野秀樹他，他：腸管出血性大腸菌 O26 の分離培地についての検討，道衛研所報，48, 61-63, 1998
- 9) 平松礼司，松本昌門，三輪良雄，他：腸管出血性大腸菌 O26 の生化学的性状及びその選択分離培地に関する検討，感染症誌，73, 407-413, 1999
- 10) 森良一，八柳潤，内村真佐子，他：腸管出血性大腸菌 O26 のスクリーニング方法に関する研究，平成 9 年度厚生科学研究費補助金・O157 以外の腸管出血性大腸菌スクリーニング方法に関する研究，1-12, 1998
- 11) 厚生省生活衛生局食品課長通知：腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について，衛食第 207 号，1997
- 12) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会，17-31, 1997
- 13) 坂崎利一，田村和満：腸内細菌，下，75-106, 1992
- 14) 同上：39-64, 1992
- 15) 同上：115-136, 1992

Investigation for the Method of Isolation and Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 in Case of Big Outbreaks

Tsuneaki Kawai, Takashi Hirochi, Yumiko Sakamoto, Shoichi Akaishi,
Tomoko Otani and Kozo Fujita

In July 2002, we experienced outbreaks of enterohemorrhagic *E. coli* O26 (EHEC O26) infection in two nurseries. Eight hundred and thirty two stool samples from children, staffs in both nurseries and their family, and 40 frozen meal samples were cultivated for isolation of EHEC O26. Another 21 samples as residual water in the bottom of playing pool and wiped materials were also tested. As a result, EHEC O26 was isolated from a total of 47 children (including 21 patients), two asymptomatic nurses in nursery A, five persons of children's family in nursery B and one water sample remaining in a bolt hole of the bottom of nursery B playing pool.

We investigated the optimal media for the effective isolation and identification of EHEC O26 by using samples which we got in those outbreaks. Our results suggest that; (1) Cefixime-potassium-tellurite rhamnose MacConkey (CT-RMAC) agar is more selective and useful than Rhamnose MacConkey agar for the detection of EHEC O26; (2) Enrichment cultivation by modified *Escherichia coli* broth for 18 hours at 42 °C raises detection rates of EHEC O26; and (3) Addition of cellobiose to CT-RMAC agar promotes the selectivity for isolation of EHEC O26.