

### Ⅲ. 下痢原性大腸菌の検査法

#### 1. はじめに

- 1) 大腸菌：温血動物の重要な腸内常在細菌である。
- 2) 3類感染症菌→ 腸管出血性大腸菌
- 3) 食中毒菌 → 腸管病原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管凝集付着性大腸菌

常在細菌の大腸菌と下痢原性大腸菌は、生化学的性状では区別できない。  
下痢原性大腸菌の検査は、病原因子の検出が必要になる。

#### 2. 分類

表1 下痢原性大腸菌の分類

菌名	病原因子	主要症状	検査法	備考
腸管病原性大腸菌 (EPEC)	<i>eae</i> 、 <i>bfp</i> (定着因子)	持続性下痢	PCR 血清型別	血清凝集だけでは 決定出来ない
腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)	ST LT (腸管毒素)	水様下痢	ELISA RPLA PCR	ST：耐熱性 LT：易熱性、 コレラ毒素と類似
腸管侵入性大腸菌 (EIEC)	<i>invE</i> 、 <i>ipaH</i> (侵入性因子)	粘血便、下痢	PCR LAMP 血清型別	赤痢菌感染と同じ 発症機構
腸管出血性大腸菌 (EHEC)	VT	血性下痢	RPLA LAMP PCR	VT1、VT2の2種類
腸管付着性大腸菌 (EAEC)	AggR	持続性下痢	LAMP	

### 3. 生化学的性状

表2 分離培地上の集落性状

分離培地	EHEC 0157	EHEC 0157以外
DHL寒天培地	赤色集落	赤色培地色
トリカブスキー培地	黄色集落	黄色培地色
CT-SMAC培地	培地色 (中心部 灰色)	生育なし または 赤色
クロモアガー 0157培地	紫色	青色

表3 主な生化学的性状

性状	反応	
	0157	0157以外
TSI 乳糖利用性	+	+(95%)
ブドウ糖 酸	+	+
ガス産生	d	d
H <sub>2</sub> S産生	-	-
LIM リジン	+	+(90%)
運動性	d	+(95%)
イントール	+	+(98%)
CLIG セロビオース利用性	-	-
乳糖 酸	+	+(95%)
$\beta$ -グルクロニダーゼ	-	+
VP	-	-
クエン酸(シモンズ)	-	-
オキシダーゼ	-	-

EHEC 0157:H7は、腸管出血性大腸菌の代表的な血清型

- ソルビトール遅分解の性状を有する。
- $\beta$ -グルクロニダーゼを産生しないので、他の大腸菌との鑑別が容易。

## 血清学的性状

大腸菌の血清型は、O:Hの組み合わせで表現される。

- 1) O抗原：菌体の多糖質抗原  
→ 121°Cの加熱に耐え、アルコールや1N塩酸で不活化されない。
- 2) H抗原：鞭毛の蛋白抗原。100°Cの加熱で不活化される。
- 3) K抗原：O抗原の表層を覆い、きょう膜としてみられることもある。  
→ この抗原が存在すると、生菌でのO凝集反応が阻止されることがある。  
→ 多くの場合多糖質抗原であるが、蛋白性のものもある。  
→ 121°C15分加熱することにより菌体表面から取り除かれる。

☆☆現在までに、184種類のO抗原と53種類のH抗原が明らかになっている。☆☆  
デンカ生物研（株）からO抗原免疫血清50種類、H抗原免疫血清22種類が販売

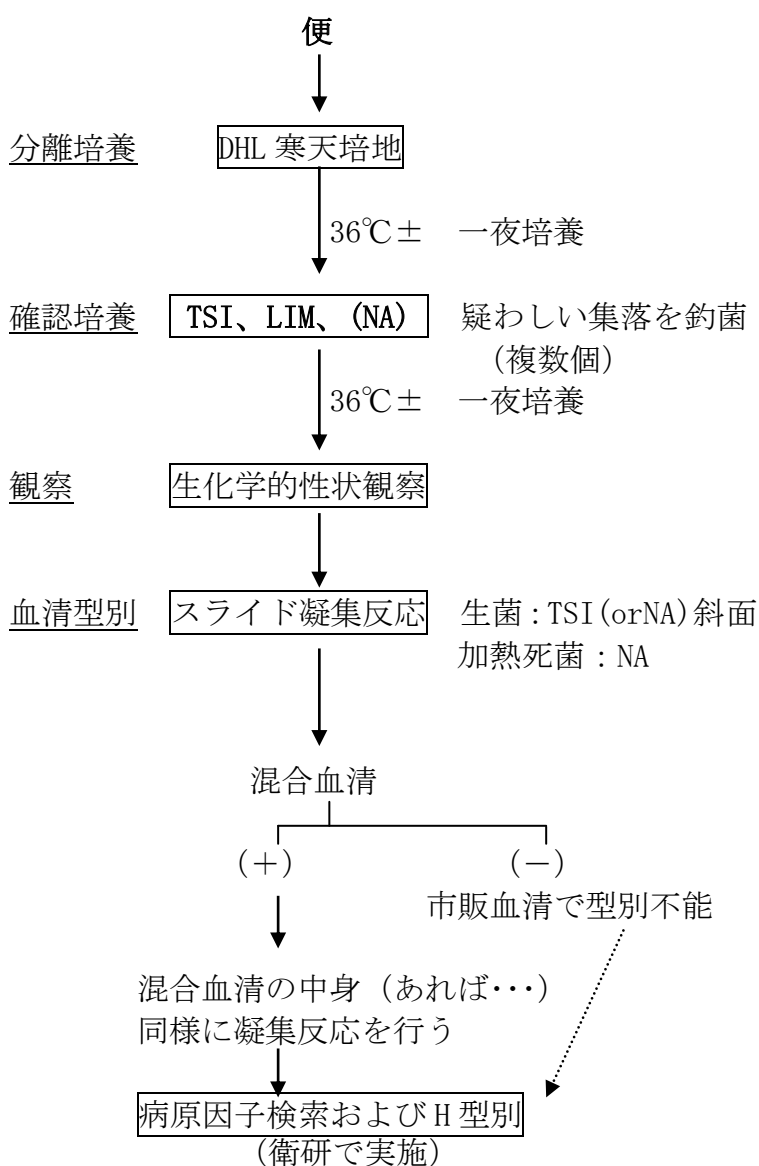
表4 下痢原性大腸菌のおもな血清型

EPEC			ETEC			EIEC			EHEC		
O	K	H	O	K	H	O	K	H	O	K	H
18	—	7、14、NM	6	15	16、NM	28a、c	—	NM	1	1	NM
20a、b	—	26、NM	7	—	18	29	—	NM	26	—	11
26	—	11、NM	8	*	2、9、NM	112a、c	—	NM	91	—	21
44	74	18、34	11	—	27	124	—	30、32NM	111	—	8、NM
55	—	6、7、NM	15	—	11、NM	136	—	NM	113	—	21
86a	—	2、34、NM	20a、c	—	11、NM	143	—	NM	117	—	4
111	—	2、12、21、NM	25	7、98	7、20、NM	144	—	35、NM	121	—	NM
114	—	1、10、32	27	—	7、20	152	—	NM	145	—	NM
119	—	6、NM	63	—	12	159	—	NM	157	—	7、NM
125	—	21	78	—	11、12	164	—	NM			
126	—	27、NM	114	—	21						
127a	—	9、21、NM	115	—	40、51						
128a、b	—	2、7	126	—	12						
142	—	6	128a、c	—	7、21						
146	—	21	148	—	28						
151	—	50	153	—	10						
158	—	23	159	—	4、20、34						
166	—	4	167	—	4、5						
(1 51 7)			168	—	16						
			169	—	8						

市販免疫血清は、過去に下痢原性大腸菌として分離された大腸菌株を型別出来るように準備されている。しかし、市販免疫血清にふくまれる血清型の大腸菌は健康人からも分離され、しかもその菌株は下痢を起こす病原因子を保有しない普通の大腸菌であることが多い。従って、市販免疫血清で血清型別されても下痢原性大腸菌であるとは限らない。必ず確定のための遺伝子検査等が必要である。

#### 4. 検査法

- 1) 通常時業態者検便（食品取扱者、給食施設従事者等）
  - CT-SMAC培地等からの腸管出血性大腸菌検査
  - \*\*腸管出血性大腸菌陽性検体は、VT産生性の確認をする。
- 2) 海外旅行者下痢患者
  - 海外旅行者下痢症の約30%から毒素原性大腸菌が分離された。
  - 他の病原菌(-)の場合は、毒素原性大腸菌による下痢の可能性が高い。
  - DHL寒天培地上の集落を3~5個釣菌し検査する。
  - \*\*必要に応じてLT、ST産生試験等を行う。（衛研に依頼）
- 3) 集団下痢症発生時
  - DHL上の集落を一人当たり3~5個釣菌し検査する。（TSI、LIM、NA）
  - TSI、LIMの各性状、血清型の共通性を比較する。
  - 性状が患者によってバラバラ → 原因が下痢原性大腸菌の可能性なし
  - 多くの患者から同じ性状の菌が分離されている → 可能性あり
  - \*\*必要に応じて菌株を衛研に送付。（衛研では、病原因子検索を行う）



分離培地：DHL寒天培地  
SS寒天培地は選択性が強く  
生育できない大腸菌がある

表1を参照に、疑わしい集落  
を釣菌する

確認培養  
➤ 集団食中毒事例：  
1検体当たり3~5コロニー

確認培地  
TSI、LIM、(NA)

生化学的性状確認  
➤ 表1を参照に、大腸菌で  
あることを確認する

O型別  
混合血清1~9 (中身50種)  
生菌：スライド凝集反応  
死菌：80ウエル大プレートが便利  
H型別 (22種)  
ホルマリン死菌 (衛研で実施)

集団発生の場合  
(TSI) 乳糖分解性  
ガス産生  
(LIM) リジン  
運動性  
(インドール)  
の性状について、患者間の  
共通性の有無を検討し、共  
通性がみられた場合型別す  
る。

患者の発生状況等から病原因子検索の必要性を判断することが重要

## 5. 腸管出血性大腸菌 0157、026及び0111の検査法

### A. 増菌培地 → ノボビオシン加mEC 培地

EC 培地より胆汁酸塩濃度が低い：0157、026 及び 0111 の生育を高める

42℃で培養：0157、026 及び 0111 の生育を高める

ノボビオシン添加：雑菌(Pseudomonas、Klebsiella、Citrobacter、Proteus 等)の生育を押さえるため

### B. 分離培地 → ① CT-SMAC、CT-RMAC 又は-SBMAC

#### ② クロモアガーSTEC

#### CT-SMAC

C：セフィキシム(Cefixime)・・・プロテウスを抑制する。大腸菌は生育する。

T：亜テルル酸カリウム(Tellurite)・・・アエロモナス、プロビデンシア、モルガネラおよび一般の大腸菌を抑制する。(プロテウス、モルガネラはソルビット非分解)

**EHEC 0157 およびその他の EHEC は亜テルル酸耐性**

→ ほとんどの EHEC は、CT 添加培地に生育する

**その他の大腸菌は、亜テルル酸感受性**

→ ベロ毒素非産生大腸菌は CT 添加培地に生育しにくい

S：ソルビトール・・・EHEC 0157 は遅分解、その他の大腸菌は分解

**0157 はソルビトール遅分解 → EHEC 0157 は培地色コロニー**

R：ラムノース・・・EHEC 026 は非分解、その他の大腸菌は分解

**0157 はソルビトール非分解 → EHEC 026 は培地色コロニー**

SB：ソルボース・・・EHEC 0111 は遅分解、その他の大腸菌は分解

**0157 はソルビトール遅分解 → EHEC 0111 は培地色コロニー**

MAC：マッコンキー（基礎）培地

#### クロモアガーSTEC 酵素基質添加培地

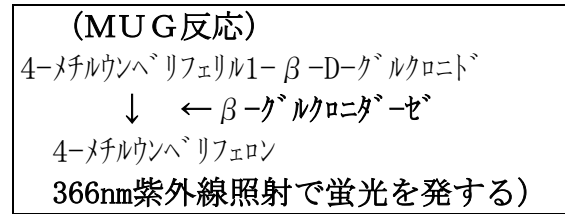
EHEC (0157、026、0111、0103、0121、及び0145等)が特異的に産生する酵素の基質を培地中に含むため、紫色を発色しコロニーを形成する。

**EHEC：紫色のコロニー**

その他の大腸菌：青色コロニー

C. 確認培地 → CLIG

- C: セロビオース...大腸菌は非分解  
(斜面は赤)
- L: ラクトース...EHEC 0157、026 及び  
0111 は、白糖を分解 (高層部は黄色)
- I: インドール
- G:  $\beta$ -グルクロニダーゼ...  
紫外線照射で蛍光 (-)



$\beta$ -グルクロニダーゼ (-) 株は、  
MUG (-) で、蛍光 (-) である

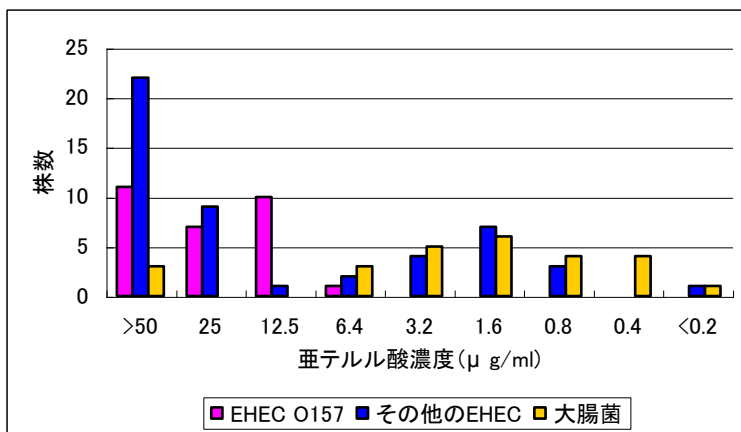
クロモアガー-STEC でも、 $\beta$ -グルクロニダーゼを確認できるので、CLIG を用いなくとも良い。

0	H	VT	ソルビトール	
			(-)	(+)
0157	H7/H-	+	1 1 1	0
	H7	-	2	0
	その他	-	0	4 1
0157 以外の 大腸菌		+	1	5 0
		-	1 3	1 0 2

大腸菌のソルビトール分解性

0	H	VT	MUG(-)	MUG(+)
0157	H7/H-	+	1 1 1	0
	H7	-	2	0
	その他	-	0	4 1
0157 以外の 大腸菌		+	0	5 1
		-	5	7 0

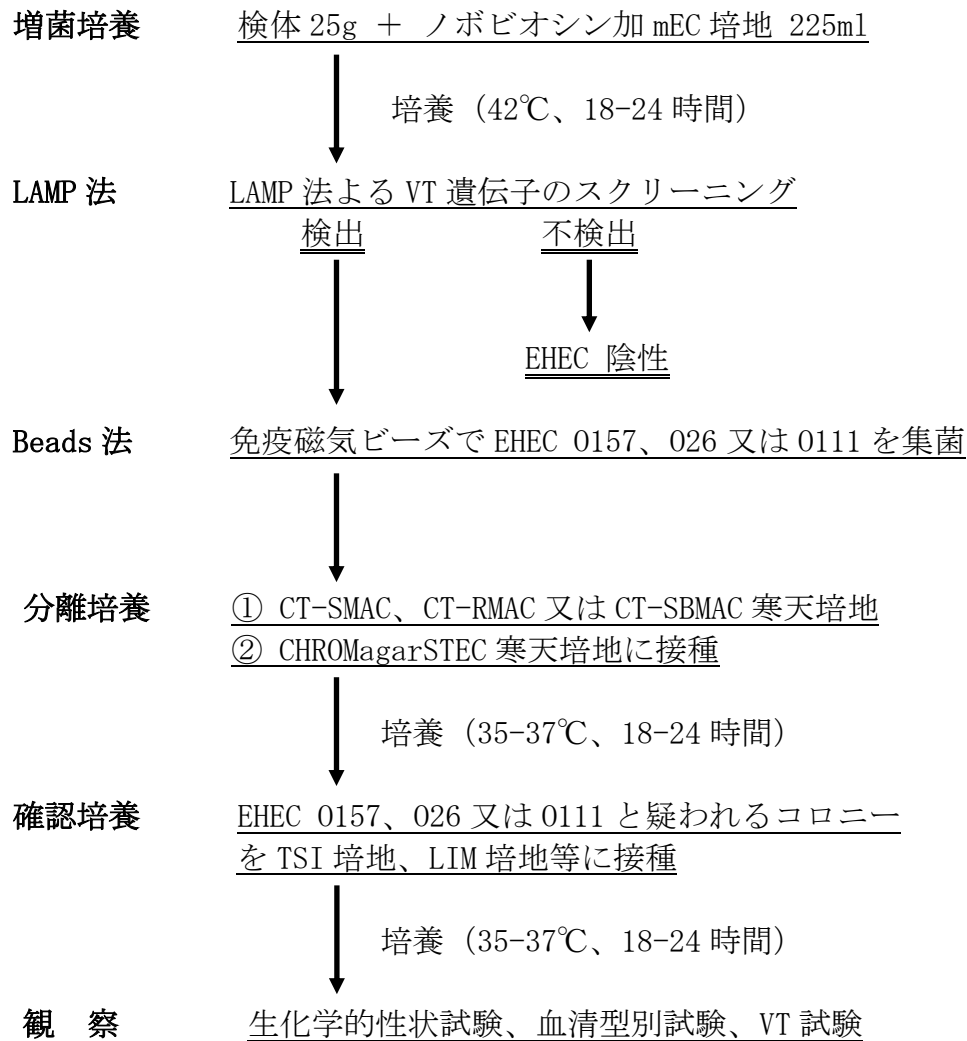
EHEC およびその他の大腸菌の  
血清型、ベロ毒素産生性と  
MUG 反応



EHEC およびその他の大腸菌の  
亜テルル酸耐性

## 6. 食品からの EHEC 0157、026 及び 0111 の検査法

### A. 検査の流れ



### B. 検査法の出典

平成 24 年 12 月 17 日 食監安発 1217 第 3 号  
厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 発  
腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について

メリット：遺伝子が検出されなければ、検査を陰性として打ち切れる。

デメリット：陽性の場合、遺伝子検査費用が余分に必要となる。

## 2) 増菌培養

“5. 腸管出血性大腸菌 O 157、026 及び O111 の検査法 A. 増菌培地” を参照

## 3) LAMAP 法による VT 遺伝子の検出

### A. 使用する機材・試薬等

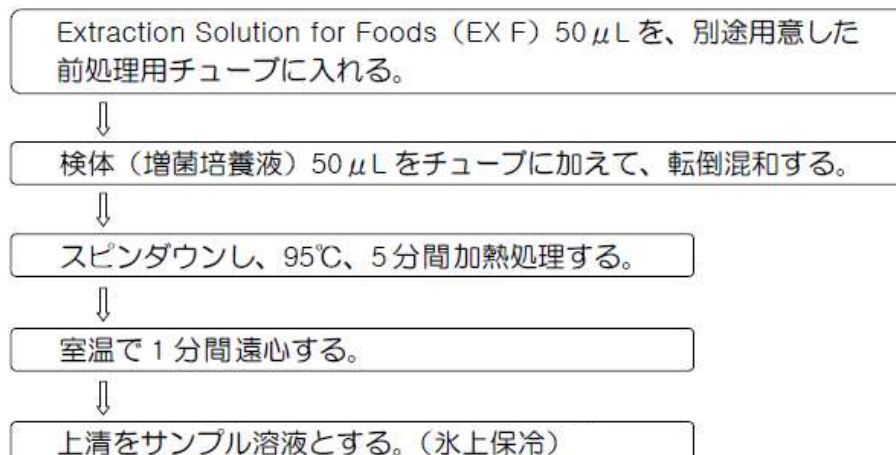
- ① Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学)
- ② Loopamp 蛍光・目視試薬キット (栄研化学)
- ③ 200  $\mu$ l マイクロチューブ (nuclease free)
- ④ 1.5ml マイクロチューブ (nuclease free)
- ⑤ リキッドハンドリング (nuclease free)
- ⑥ PCR 装置
- ⑦ 紫外線照射装置

### B. 準備

- ① Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を購入したら、EX-F 試薬を 1.5ml マイクロチューブに 50  $\mu$ l 分注し、凍結保存。
  - ② 200  $\mu$ l マイクロチューブ (nuclease free)
  - ③ 1.5ml マイクロチューブ (nuclease free)
  - ④ リキッドハンドリング (nuclease free)
  - ⑤ 紫外線照射装置
- nuclease free を購入するか、オートクレーブ処理する
- 365nm 付近の長波長が出せるもの。CLIG の判定に使用しているものでかまわない。

### C. DNA 抽出

- ① 培養液を小試験管に 5ml 程度採取し、20~30 分程度放置して食品成分を沈降させる。
- ② 凍結保存してある EX-F を取り出し、培養液を 50  $\mu$ l 加える。
- ③ よく混合し、95°C のヒートブロックで 5 分間加熱。
- ④ マイクロチューブを遠沈し、氷上で保存。





#### D. 試薬調整 (氷上調整)

- ① サンプル 1 つにつき当たり、RM VT 試薬 20 $\mu$ l、*Bst* polymerase 1 $\mu$ l、FD 試薬 1 $\mu$ l を使用するので、1.5ml マイクロチューブに、検体数に陽性コントロール 1 サンプル、陰性コントロール 1 サンプル加えたサンプル数分の試薬を分注し、ボルテックスで泡立たないように注意しながらよく混和する。
- ② サンプル数分の 200 $\mu$ l マイクロチューブを準備し、上記で準備した試薬を 20 $\mu$ l ずつ分注する。
- ③ 試薬を分注したマイクロチューブに、氷上で保存してある DNA 抽出液を 5 $\mu$ l 加え、ピペッティングでよく混和する。
- ④ 陽性コントロールには Cont VT を 5 $\mu$ l 加え、ピペッティングでよく混和する。
- ⑤ 陰性コントロールには EX-F を 5 $\mu$ l 加え、ピペッティングでよく混和する。
- ⑥ 気泡が生じている場合は、卓上簡易遠心機で遠心して気泡を除去する。



#### E. LAMP 反応

- ① 試薬調整前にリアルタイム濁度計の電源を入れておく。
- ② ボンネットの温度が一定温度に到達していることを確認して、検体をセットする。
- ③ LAMP 反応は 65 $^{\circ}$ C で 60 分実施後、80 $^{\circ}$ C で 2 分加熱して酵素を失活させる。
- ④ すぐに判定しない場合は 4 $^{\circ}$ C で保存する。

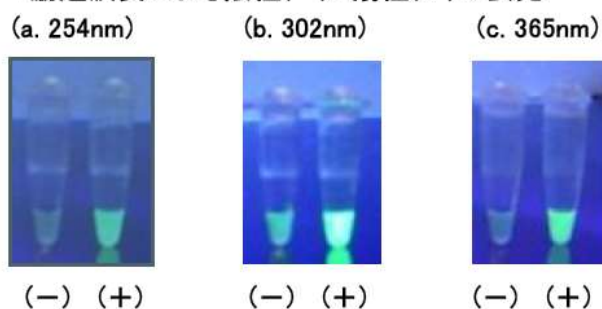
## F. 判定

LAMP 反応の進行に伴い、副生成物のピロリン酸マグネシウムが生成する。リアルタイム濁度計は濁りを検出することで、陽性又は陰性を判定する。

リアルタイム濁度計を用いなくても、蛍光試薬の FD 試薬と PCR 法装置でも LAMP 反応を行える。FD 試薬には、カルセインカルシウムが含まれており、LAMP 反応の進行に伴いピロリン酸カルシウム及びカルセインイオンが生成する。カルセインイオンは、紫外線の照射により蛍光を発する。

このため中波長(320nm)付近の紫外線では、陽性検体において最も強い蛍光が観察されると共に、バックグラウンドの蛍光も強くなります。

図 励起波長による陰性(-)と陽性(+)の蛍光



従いまして、蛍光目視試薬により判定を行う際には、なるべく短波長(240~260nm)または長波長(350~370nm)の紫外線を励起光として蛍光を観察して下さい。波長が 320nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見えることがありますので、陽性コントロール、陰性コントロールと比較して判断してください。

なお、紫外線照射装置の出力が強い場合には陰性コントロールも蛍光を発して見えることがありますが、その場合はチューブを紫外線照射装置から離したり、チューブの角度を変えるなどして、陽性コントロールと陰性コントロールの差がはっきりするように工夫してください。

## 4) ビーズ法による腸管出血性大腸菌 0157、026、0111 の濃縮

### A. 使用する機材・試薬等

- ① 磁気ラック：DYNAL MPC®-M (Invitrogen 社)
- ② 免疫磁気ビーズ：免疫磁気ビーズ (デンカ生研究 (株))
- ③ 洗浄液：PBS with Tween 20 (Sigma- Aldrich 社)
- ④ 分離培養培地：CT-SMAC、CT-RMAC、CT-SBMAC 寒天培地  
CHROMagar STEC (OXOID 社)

## B. ビーズ法の手順

- ① 培養液を小試験管に 5ml 程度採取し、20-30 分静置して食品成分を沈降させる。
- ② マイクロチューブを磁気ラックにセットする。
- ③ 磁気板を抜き取り、各マイクロチューブに免疫磁気ビーズを 20 $\mu$ l を分注する。
- ④ 静置した培養液 (①) の上清 1ml をマイクロチューブに加える。
- ⑤ 室温で 15-20 分振とうし、腸管出血性大腸菌と免疫磁気ビーズを反応させる。
- ⑥ 磁気板を磁気ラックにセットし、3 分間静置する。
- ⑦ チューブの蓋を注意深く明けて、液を吸い取る。  
この際、免疫磁気ビーズを吸い込まないように注意深く行う。
- ⑧ 磁気板をセットしたままで、洗浄液 1ml 加えた後、注意深く吸い取る。  
この操作を 2 回繰り返す。
- ⑨ 洗浄液 100 $\mu$ l 加えて、免疫磁気ビーズを懸濁する。

## C. 分離培養

マッコンキー系培地及び酵素基質培地の 2 枚の培地に、ビーズ懸濁液を 50 $\mu$ l ずつ滴下し、白金耳で培地上に広げ、35~37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養する。

マッコンキー系寒天培地：CT-SMAC、CT-RMAC 又は CT-SBMAC

酵素基質寒天培地：クロモアガーSTEC

**\*\*クロスコンタミネーションの機会をなるべく少なくするために\*\***

- ① マイクロチューブの蓋を開けるときは、液が周りに飛ばないようにアルコール綿で覆いながら行う。
- ② 検体ごとに洗浄液を交換する。
- ③ 検体ごとにスポイトを交換する。
- ④ 検体ごとにチップを交換する。

等各作業者がコンタミネーションの可能性を意識すると共に、確実な作業が行えるような工夫をするとよい。

#### D. ビーズ法の特徴

原理：表面に抗 EHEC 0157、026 または 0111 抗体がコーティングされているビーズを用いて、これら O 血清型の EHEC をだけを結合する。このビーズは、磁石を近づけると粒子全体が磁化されて磁力に引き寄せられ、磁石をはなすと粒子は磁性を失って元通り分散する性質を持つ。そこで、EHEC 0157、026 または 0111 を表面に吸着したビーズを磁石で集めて、培地及びその他の菌を洗浄し、少量の溶液に再懸濁し、分離培地に塗布し、EHEC 0157、026 または 0111 を培養する。

感度：優れている。(10 倍以上の濃縮効率がある。)

利点：直接法に比べて、雑菌の生育が少ないので判定しやすい。



特に、EHEC 026 及び 0111 はノボビオシン加 m E C での選択増菌が低いので、ビーズ法が必須

欠点：クロス・コンタミネーションを起こしやすいので、細心の注意を払って検査を行わなければならない。特に、陽性コントロールとして使用する EHEC 0157、026 または 0111 菌株のコンタミネーションには要注意。



出来ればやりたくない検査

## 7. ベロ毒素検出法（ラテックス凝集法）

### ラテックス凝集法に必要な器材及び消耗品等

器材： 1) マイクロピペッター（10～100  $\mu$  l が計測できるもの）

2) プレートミキサー

消耗品： 1) マイクロピペッター用チップ（10～100  $\mu$  l）

2) V型96穴マイクロプレート

試薬及び培地

1) CAYE 培地

2) ポリミキシン B 溶液

### ① 毒素液の調整

#### 液体培養法

CAYE 培地に接種

37°C 1夜

振とう培養

#### 寒天培地培養法

寒天培地上の菌を掻き取って

→5000u/ml ポリミキシン B 溶液(0.5ml)に懸濁

37°Cで20分振とう

遠心分離（3,000rpm 10分）し、上清を毒素液とする。

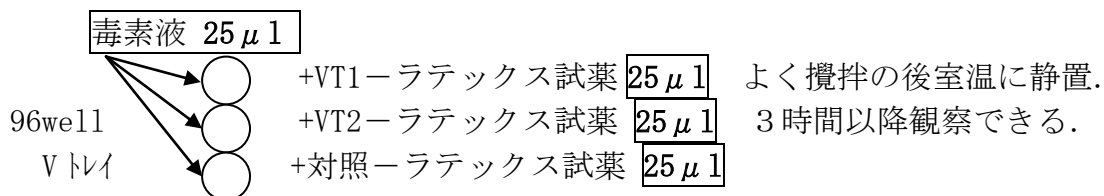
### 注意点

液体培養法 → 振とう培養のスピード、培養時間の影響を受ける

寒天培養法 → 非特異的凝集が起こりやすい。

→ 掻き取る菌量によって、偽陰性、偽陽性を生じやすい

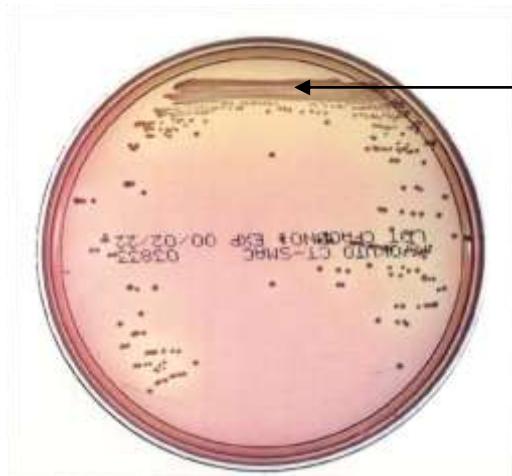
### ② ラテックス凝集法の手技



3時間後を目安に、実体顕微鏡で凝集像を観察すると、ベロ毒素産生量の少ない菌株でも判定を誤ることが少なくなる。

## 8. コロニー掻き取り法 (colony sweep 法) によるスクリーニング

(CT-SMAC、TSI、普通寒天等)



菌液作成

ポリミキシン B (5000u/ml) 0.5ml  
コロニー密集部を1 $\epsilon$ ゼ $\epsilon$ とり菌液を作る



37 $^{\circ}$ Cで20分振とう後

3、000回転10分間遠心分離



上清を用いてRPLA(約3h後判定)

RPLA (+)  $\rightarrow$  腸管出血性大腸菌陽性?

単離コロニー数個についてそれぞれ生化学的性状検査、毒素産生性検査、血清型別を行い、ベロ毒素産生性と大腸菌であることが確認されたら、血清型別の如何に関わらず、腸管出血性大腸菌と決定する。

EHEC 0157、026 及び 0111 以外のコロニー性状に特徴のない腸管出血性大腸菌をスクリーニングするのに有効

## 9. 腸管出血性大腸菌感染症の届出基準

1) 腸管出血性大腸菌を分離し、ベロ毒素産生を確認した場合

①毒素産生の確認  $\rightarrow$  RPLA

②毒素産生遺伝子の確認  $\rightarrow$  PCR

2) HUS の場合は病原菌が検出困難なため、以下の条件のどれかを満たす場合

①便からのベロ毒素の検出

$\rightarrow$  病原菌が検出出来ないような状況では毒素も検出出来ないことが多い。

②血清からの O 抗原凝集抗体の検出

$\rightarrow$  抗 0157 LPS 抗体検査は保険適用になっているので、医療機関で実施していることがある。他の血清型については衛生研究所で実施する。

③血清からの抗ベロ毒素抗体の検出

$\rightarrow$  現状ではこの方法は実施不可能

検査担当者であっても、担当する感染症の届出基準を把握しておくことは重要