

【原著】

各種培養法における大腸菌発育温度の検討

吉岡翔*1 工藤美里*2 吉田千賀雄*1 月足正辰*3 藤岡美幸*1

(2020年10月5日受付, 2020年10月26日受理)

要旨: 大腸菌はヒト・動物の腸管常在菌であるとともに、ヒト感染症原因菌でもある。大腸菌を選択的に分離する検出法として、ECブロスとEMB寒天培地を用いる方法が知られている。この方法ではECブロスは44.5°Cの高温培養を行うため、発育できない大腸菌も考えられ、本研究ではECブロスを44.5°C、40°C、およびHIブイオン前培養後40°C培養の3つの方法で培養し、培養温度・方法の違いによる大腸菌検出状況を調査した。その結果、大腸菌検出数はECブロスにおいて、44.5°C培養より40°C培養で多かった。このことから、44.5°Cの高温培養では一部の大腸菌の発育が抑制され、この培養温度は大腸菌の選択に必ずしも適切ではないことが考えられた。今回、大腸菌検出数が増加することを想定し、HIブイオンによる前培養を追加したが、ECブロス40°C培養と大腸菌の検出数に大きな差を認めなかった。この要因として、HIブイオンでは大腸菌以外の細菌が優位に発育する可能性が考えられ、適切な分離培養法を慎重に選択する必要がある。EMB寒天培地では典型的な大腸菌は分離可能であるが、乳糖非分解の非典型大腸菌は見逃される可能性があり、今後は培養温度とともに、より見逃しの少ない大腸菌分離法を検討していく必要がある。

キーワード: 大腸菌, ECブロス, 培養温度, EMB寒天培地

I. はじめに

大腸菌は、腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、ヒトや動物の腸管内常在菌であり、ときにヒト下痢症の原因にもなる¹⁾。このときの大腸菌の検出方法として、SS, DHL, マッコンキー寒天培地などの腸内細菌科細菌分離培地により分離する方法^{1),2)}やECブロスとEMB寒天培地を用いる方法^{3),4)}がある。ECブロスは44.5°Cの高温培養により大腸菌を選択的に増菌培養する。しかし、この温度では発育できない大腸菌が存在する⁴⁾ことから、大腸菌が見逃されている可能性が考えられる。そこで本研究では、ECブロスの培養方法別大腸菌分離状況を調査した。

II. 対象および方法

1. 対象

対象は2018年5月から7月までに弘前市内の医療機関に提出された下痢症患者便を滅菌生理食塩水1mLに懸濁した207検体とした。なお、本研究は弘前大学大学院保健学研究科倫理委員会の承認を得て行った(整理番号:2020-011)。

2. 方法

1) 培養方法別大腸菌の検出

本研究で実施した便検体懸濁液の培養手順を図1に示す。懸濁液100μLをECブロス(栄研)に接種し、方法1では44.5°C、方法2では40°C、24±2h培養した。これら培養液をEMB寒天培地(栄研)に1白金耳塗抹し、37°C、24±2h培養した。また方法3では懸濁液100μLをハートインフュージョンブイオン(HIブイオン, 栄研)に接種し、40°C、24±2h前培養した後、ECブロスに100μL接種し、40°C、24±2h培養した。その後、EMB寒天培地に1白金耳塗抹し、37°C、24±2h培養した。EMB寒天培地上にシート状の金属光沢がみられたとき大腸菌と判定し(図2)、各種培養法における大腸菌発育状況を比較した。

2) 大腸菌の同定

便検体懸濁液207検体を3つの方法で培養したECブロスより合計621検体のテンプレートDNAを作成し、*Escherichia coli* 16S rRNA遺伝子を標的としたPCRを実施

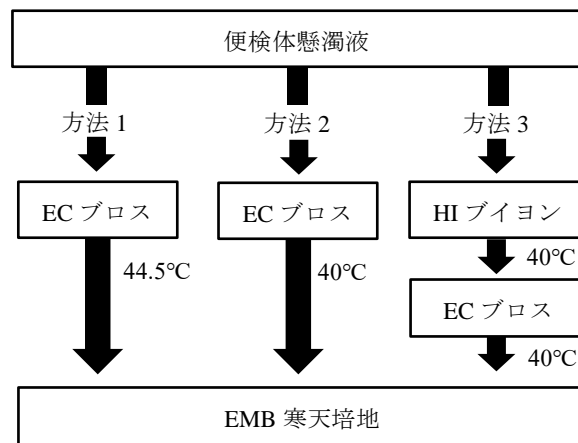


図1 培養手順

*1 弘前大学大学院保健学研究科
Hirosaki University Graduate School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-39-5970
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
*2 弘前大学医学部保健学
Hirosaki University School of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
*3 弘前市医師会健診センター
Hirosaki Medical Association Health Care Center
〒036-8045 青森県弘前市野田 2-7-1 TEL:0172-34-6121
2-7-1, Noda, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8045, Japan
Correspondence Author h19gg302@hirosaki-u.ac.jp



図2 EMB 寒天培地上のシート状金属光沢の様子

した。このとき、単純無作為抽出法によりランダマイザー⁹⁾で乱数を発生させ、その乱数と一致するテンプレートDNAを、621検体から32検体抽出して行った。プライマーは、forward primer (5'- GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC -3'), reverse primer (5'- AGGCCCGGGATTTCACATCTGACTTA -3')を使用した⁵⁾。次式により標本誤差を算出した。ただし、 n は標本に含まれる調査対象数、 p は金属光沢陽性率とした。

$$1.96 \times \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

III. 結果

1) 培養方法別大腸菌検出状況

EMB 寒天培地上において、金属光沢を形成したのは便検体懸濁液 207 検体中 171 検体で、36 検体は金属光沢を形成しなかった。培養方法別の金属光沢検出結果を表 1 に示す。金属光沢検出パターンは、各培養方法における金属光沢検出状況により、8 パターンに分類した。金属光沢がみられた 171 検体中、EC ブロス 44.5°C 培養では 54 検体、EC ブロス 40°C 培養では 153 検体、HI ブイヨン前培養を追加した方法では 151 検体から金属光沢が検出された。(表 2)

2) *E. coli* 16S rRNA 遺伝子検出状況

EC ブロス培養液全 621 検体中、EMB 寒天培地上で金属光沢がみられたのは 358 検体であったことから、金属光沢がみられた検体を大腸菌陽性と仮定すると、陽性率は 57.6% であった。よって、標本誤差は 0.171 となり、真の値は 57.6±17.1% の間にあることになる。培養液全 621 検体のテンプレート DNA を作成し、その中から抽出された 32 検体中 *E. coli* 16S rRNA 遺伝子の増幅が認められたものは 21 検体、増幅が認められなかったものは 11 検体であり大腸菌陽性率は 65.6% であった。この値は、57.6±17.1% の間にあることから、全 621 検体の値として信頼し、金属光沢がみられた検体を大腸菌と同定することとした。その結果、各培養方法のいずれか一つでも大腸菌が検出されたのは便検体懸濁液全 207 検体中 171 検体であった。また、遺伝子の増幅がみられた 21 検体中 7 検体は EMB 寒天培地上で金

表 1 EMB 寒天培地上における金属光沢形成状況 (n=207)

検出パターン*	方法 1	方法 2	方法 3	検体数
1	+	+	+	45
2	+	+	-	4
3	+	-	-	0
4	+	-	+	5
5	-	+	+	88
6	-	-	+	13
7	-	+	-	16
8	-	-	-	36

207

*培地上で金属光沢を形成したものは+、形成しなかったものは-で表記した。

表 2 培養方法別 EMB 寒天培地上における金属光沢形成検体数 (n=171)

培養方法	検体数 (%)
方法 1	54 (31.6%)
方法 2	153 (89.5%)
方法 3	151 (88.3%)

属光沢はみられなかった。これらの検体は *E. coli* 16S rRNA 遺伝子を保有していたことから、大腸菌と同定された。

IV. 考察

EC ブロスは、大腸菌が他の腸内細菌より熱に抵抗性を示す性質⁴⁾を利用して、44.5°C の高温下で培養を行う。しかし、角野ら⁸⁾は豚肉から 44.5°C では発育できない大腸菌を分離し、藤岡ら⁹⁾は 44.5°C の高温培養では他の腸内細菌だけでなく、大腸菌の発育も抑制する可能性を示した。本研究において、金属光沢がみられた検体は EC ブロス 44.5°C 培養で最も少なく、EC ブロスを 40°C で培養したときに最も多く検出された。このことから、EC ブロスの従来の培養温度である 44.5°C より 40°C が適切であると考えられた。

本研究では EC ブロス 40°C 培養の前に HI ブイヨン 40°C 培養を行う方法を追加した。EC ブロスには選択剤として胆汁酸塩が含まれているが、HI ブイヨンには選択剤は含まれていない。そのため、HI 前培養を追加した方法では、EC ブロス 40°C 単独培養よりも大腸菌検出数が多くなると予想されたが、実際には大きな差を認めなかった。この要因として、HI ブイオンは栄養源としてウシ心臓浸出液を含むため¹¹⁾、大腸菌以外の細菌が優位に発育し目的とする菌が検出できない可能性が考えられた。以上のことから、大腸菌の分離培養方法は慎重に選択する必要がある¹²⁾。

食品衛生検査指針³⁾では、大腸菌群の中で 44.5°C で発育し乳糖を分解する細菌を糞便系大腸菌群、さらにその中で

インドール産生能陽性, メチルレッド反応陽性, VP 反応陰性, シモンズクエン酸塩利用能陰性の4つの性状を示す細菌を大腸菌と規定している。本研究では, これらの生化学的性状を用いず, 大腸菌が EMB 寒天培地で金属光沢を伴うコロニーを形成する性質¹⁰⁾を利用して, 大腸菌の検出を行った。EMB 寒天培地には乳糖が含まれており, この乳糖を分解したときに生じる酸による pH の変化により培地上で金属光沢が認められる¹⁰⁾。今回, PCR による大腸菌の同定において, 32 検体中 7 検体は EMB 寒天培地上で金属光沢がみられず, *E. coli* 16S rRNA 遺伝子が増幅された。これらは EMB 寒天培地上で金属光沢を形成せず, 乳糖非分解の大腸菌であると考えられた。このことから, 培養温度や培養手順に関わらず乳糖非分解などの大腸菌の見逃しがある可能性が示唆された。今後は EC ブロスの培養温度について継続調査していくとともに, より見逃しの少ない大腸菌の検出法を考案する必要がある。

利益相反 開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) 吉田眞一, 柳雄介, 他. 戸田新細菌学 改訂 34 版. pp317, 南山堂, 東京, 2013.
- 2) 一般社団法人日本臨床検査技師会. JAMT 技術教本シリーズ 臨床微生物検査技術教本. pp148-150, 丸善出版, 東京, 2017.
- 3) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版 2018. pp175, 大和綜合印刷, 東京, 2018.
- 4) 坂崎利一. 新訂 食水系感染症と細菌氏食中毒. pp212, 中央法規出版, 東京, 2000.
- 5) 計算サイト 乱数の計算(<http://calc-site.com/randoms/integral>) 2020 年 10 月 5 日アクセス
- 6) Sabat G, Rose P, *et al.*: Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in Soil. *Appl Environ Microbiol*, 66(2): 844-849, 2000.
- 7) 森實敏夫. わかりやすい医学統計学 第 1 版. pp235-236, 株式会社メディカルトリビューン, 東京, 2004.
- 8) 角野猛, 佐久間久仁子: 大腸菌群の発育に及ぼす培養温度の影響について. *家政学雑誌*, 33(12): 46-49, 1982.
- 9) 藤岡美幸, 吉岡翔, 他: *Escherichia albertii* における培養温度検討. *保健科学研究*, 11(1): 1-5, 2020.
- 10) Leininger DJ, Roberson JR, *et al.*: Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. *J Vet Diagn Invest*, 13: 273-275, 2001.
- 11) 岡田淳, 設楽政次, 他. 臨床検査医学講座 第 3 版 微生物学/臨床微生物学. pp379, 医歯薬出版, 東京, 2010.
- 12) 工藤美里, 吉岡翔, 他: 弘前市周辺の河川水等の水系における汚染状況. *保健科学研究*, 9(2): 27-33, 2019.

【Original article】

**Investigation of growing temperature of *Escherichia coli*
in different culture methods**

SHO YOSHIOKA^{*1} MISATO KUDO^{*2} CHIKAO YOSHIDA^{*1}
SEISHIN TSUKIASHI^{*3} MIYUKI FUJIOKA^{*1}

(Received October 5, 2020 ; Accepted October 26, 2020)

Abstract: *Escherichia coli* is an indigenous bacterium commonly found in the intestinal tract of Homo sapiens and animals and also acts as an infectious disease pathogen in humans. Common methods for the detection and isolation of *E. coli* include EC medium and EMB agar plates. A high temperature of 44.5°C is required for detection with this method. However, some *E. coli* strains may not grow at this temperature. In this study, we investigated the optimized conditions for *E. coli* detection based on culture method involving the EC medium. The efficacy of *E. coli* detection was the lowest at 44.5°C and highest at 40°C. This indicates that some *E. coli* strains could not grow at 44.5°C, and hence, this temperature may not be appropriate for their detection. The results of the detection of *E. coli* when cultured using the EC medium at 40°C and HI broth at 40°C were almost similar. A dominant presence of bacterial species except *E. coli* was observed in the HI broth. Therefore, it was necessary to determine which method was more appropriate. The EMB agar plate can isolate typical *E. coli* but does not demonstrate similar results for atypical *E. coli* that do not ferment lactose. Therefore, it is necessary to identify a method for the isolation of *E. coli* with less overlook of *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*, EC medium, culture temperature, EMB agar plate