

## 【原著】

# 各種液体培養法における下痢原性大腸菌関連遺伝子の検出状況

藤岡美幸<sup>\*1</sup> 林 稜太<sup>\*2</sup> 月足正辰<sup>\*3</sup> 吉岡 翔<sup>\*1</sup>  
松下 紬<sup>\*2</sup> 阿部 翼<sup>\*2</sup> 野坂大喜<sup>\*1</sup>

(2020年7月27日受付, 2020年8月25日受理)

**要旨:** ヒトや動物の腸管に常在する大腸菌は通常病原性はないとされるが、特にヒトに下痢症を引き起こす大腸菌は下痢原性大腸菌 (DEC) と呼ばれる。DEC はその病原機序から5種類に大別され、各病原因子の遺伝子も明らかである。本研究では糞便系大腸菌を選択的に培養する液体培地を用いて、温度等の培養条件別に DEC 関連遺伝子の検出状況を調査した。対象とした全218検体から *eae* 1株, *aggR* 2株, *astA* 20株, *aggR+astA* 1株が検出された。通常の EC ブロスの培養温度 44.5°C ではいずれの遺伝子も検出状況が悪く、EC ブロスおよび HI ブイオンいずれも 40°C 培養での検出が良好であった。本研究により、糞便検体を平板培地に塗抹・培養することなく、液体培地を用いることで DEC 関連遺伝子の迅速検出が可能となり、また培養温度を 40°C にすることで、より多くの DEC 関連遺伝子の検出が可能となった。

**キーワード:** 下痢原性大腸菌, 遺伝子検索, 液体培養, 培養温度

## I. はじめに

大腸菌はもともとヒトや動物の腸管内常在菌のひとつである一方で、病原因子の獲得により下痢を起こす下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *Escherichia coli*: DEC) や、髄膜・尿路などの腸管以外の部位に感染を起こすものがある<sup>1)</sup>。DEC は腸管出血性大腸菌, 腸管病原性大腸菌, 腸管毒素原性大腸菌, 腸管侵入性大腸菌, 腸管凝集付着性大腸菌の5種類に大別され、その病原性の特徴から遺伝子検索により各カテゴリーに分類することが可能である<sup>2)</sup>。一般に DEC の検索は糞便検体を直接平板培地に分離培養し、培地上に発育した大腸菌を対象に遺伝子検索が行われるため、手技が煩雑であり、検査結果が得られるまでに時間を要する。また、腸内細菌は 25~40°C で最もよく増殖する<sup>3)</sup>とされるが、糞便系大腸菌を分離するための選択培地として液体培地が知られており<sup>4)</sup>、いくつかの EC 培地 (極東製薬, 関東化学, 栄研化学, ニッスイ) は主に 44.5°C の高温で培養される。この温度は大腸菌の発育可能限界温度でもある<sup>5)</sup>ため、一部の細菌を見逃してしまう可能性が考えられる。そこで本研究では適切かつ迅速に下痢原性大腸菌を検出する方法の確立のため、糞便検体を直接用いた液体培地での

DEC 関連遺伝子検出状況を選択培地や非選択培地を用いて培養温度別に検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 対象

対象は弘前市医師会健診センターに提出された下痢症患者由来便を滅菌生理食塩水に懸濁した218検体とした。

### 2. 方法

#### 1) 各種培養法

滅菌生理食塩水 1 mL に懸濁された検体は同センターにて糞便検査に供試され、その残り 200~500  $\mu$ L を翌日まで冷蔵保存した。これを懸濁液検体とし、弘前大学大学院保健学研究科に搬入後、当日中に各種培養に用いた。残った懸濁液検体は -30°C で凍結保存した。懸濁液検体を対象とした各種液体培地を用いた培養法の流れを図1に示す。

#### ①培養法 1

培養法 1 は弘前市医師会健診センターで 44.5°C 培養が行われた EC ブロス (極東製薬) とした。同センターにおいて EC ブロスで一晩選択培養されたものを当日中に弘前大学に搬入した。

#### ②培養法 2

懸濁液検体 100  $\mu$ L を EC ブロス (栄研化学) 1 mL に添加し、40°C 一晩選択培養したものを培養法 2 とした。

#### ③培養法 3

懸濁液検体 100  $\mu$ L を非選択培地であるハートインヒュージョンブイオン (HI ブイオン, ニッスイ) 1 mL に添加し、40°C 一晩培養したものを培養法 3 とした。

\*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科

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

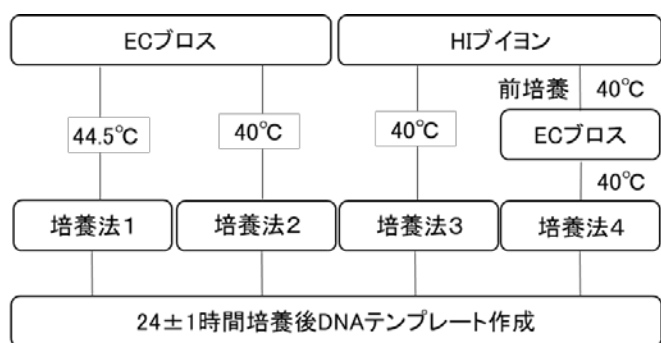


図1 各種液体培地を用いた培養法の流れ

④培養法 4

懸濁液検体 100 μL を HI ブイオン 1 mL に添加し、40°C 一晩前培養した。その後、培養液 100 μL を EC ブロス (栄研化学) 1 mL に添加し、さらに 40°C 一晩選択培養したものを培養法 4 とした。

2) PCR による遺伝子検索

DEC の遺伝子検索は 5 種類に分類されるカテゴリーを代

表1 下痢原性大腸菌における標的遺伝子

下痢原性大腸菌	標的遺伝子
腸管出血性大腸菌	<i>stx1, stx2, eae</i>
腸管病原性大腸菌(Typical)	<i>eae, bfpA</i>
(Atypical)	<i>eae</i>
腸管侵入性大腸菌	<i>invE</i>
腸管毒素原性大腸菌	<i>esth, estp, elt</i>
腸管凝集付着性大腸菌	<i>aggR, astA</i>

表する *stx1, stx2, eae, bfpA, aggR, elt, esth, estp, invE, astA* の 10 種類を標的遺伝子とした<sup>6)</sup>(表 1)。また腸管病原性大腸菌が保有する *eae* を共通遺伝子として保有する *E. albertii* の報告もある<sup>11)</sup>ことから、同菌との鑑別には *E. albertii* 特異遺伝子 *mdh, lysP* を用いた。今回使用したプライマーを表 2 に示す。

各条件で培養した培養液 100 μL を TE 緩衝液 (pH8.0, 富士フィルム和光純薬工業) 900 μL に加え、100°C で 5 分

表2 使用プライマー一覧

Target gene	Sequence (5' to 3')	Size of PCR product (bp)	Reference
<i>stx1</i>	AGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGC	347	6)
<i>stx2</i>	TTCGGTATCCTATTCGCCGG CGTCATCGTATACACAGGAG	589	6)
<i>eae</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881	7)
<i>bfpA</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	324	8)
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	254	9)
<i>elt</i>	AACGTTCCGGAGGTCTTATG CAACCTTGTGGTGCATGATG	511	6)
<i>esth</i>	TTCACCTTCCCTCAGGATG ATAGCACCCGGTACAAGCAG	172	6)
<i>estp</i>	ACTGAATCACTTGACTCTTCA TCACAGCAGTAAAAATGTGTTGT	120	6)
<i>invE</i>	GCAGGAGCAGATCTTGAAG GAAAGGCACGAGTGACTTTC	208	6)
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCG ACGGCTTTGTAGTCCTTCCA	101	6)
<i>mdh</i>	CTGGAAGGCGCAGATGTGGTACTGATT CTTGCTGAACCAGATTCTTACAATACCG	115	10)
<i>lysP</i>	GGGCGCTGCTTTCATATATTCTT TCCAGATCCAACCGGGAGTATCAGGA	252	10)

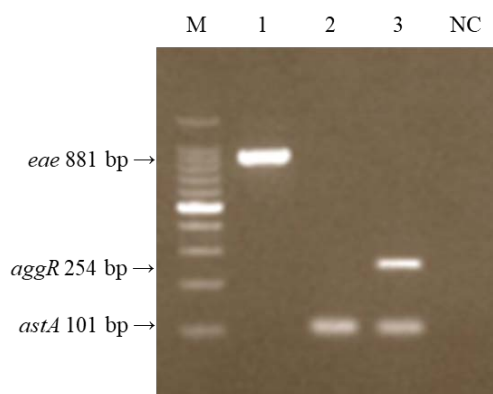


図2 PCRによるDEC関連遺伝子の検出例

M: Marker(100 bp ladder), 1: *eae*, 2: *astA*, 3: *aggR* + *astA*, NC: Negative control

間加熱後, 10,000 rpm で 5 分間遠心分離した上清を DNA テンプレートとした。PCR の反応条件は 1 検体あたり滅菌蒸留水 18.375  $\mu$ L, 10 $\times$ Ex Taq<sup>TM</sup> buffer(TaKaRa) 2.5  $\mu$ L, dNTP mixture(TaKaRa) 0.125  $\mu$ L, DNA テンプレート 2.5  $\mu$ L, 25  $\mu$ M プライマー各 0.125  $\mu$ L とし, 全量を 25  $\mu$ L とした。PCR の条件は前熱変性を 94 $^{\circ}$ C1 分間行い, 熱変性 94 $^{\circ}$ C1 分間, アニールリング 60 $^{\circ}$ C1 分間, 伸長反応 72 $^{\circ}$ C1 分間を 25 サイクル, 最終伸長反応を 72 $^{\circ}$ C10 分間行った。PCR 産物はエチジウムブロマイド添加 2.5%アガロースゲルにて 100 V, 30 分間電気泳動 (Mupid-21, コスモバイオ社) を行い, UV 照射にて遺伝子の確認を行った。

遺伝子陽性検体は凍結懸濁液から再分離したコロニーを対象に, PCR にて DEC 関連遺伝子の確認を行った。再分離は凍結した懸濁液検体を HI ブイヨンに 1 白金耳接種し, 37 $^{\circ}$ C一晩培養後, HI 寒天培地 (栄研化学) に塗抹・培養し, 対象コロニーを分離した。

さらに *aggR* 陽性検体は簡易同定法である Clump 試験<sup>12)</sup>を行った。再分離したコロニーはガラス試験管を用いて HI ブイヨン 3 mL に接種後, 100 rpm で 37 $^{\circ}$ C 20 時間振盪培養し, 菅壁の凝集を観察した。

なお, 本研究は弘前大学大学院保健学研究科倫理委員会 (整理番号: 2020-011) により承認され実施した。

### III. 結果

下痢症患者由来 218 検体を対象に, 4 種の液体培養法を用いて DEC カテゴリーを代表する 10 種類の遺伝子を検索した。その結果, *eae* 1 検体, *aggR* 3 検体, *astA* 21 検体が検出された。*stx1*, *stx2*, *bfpA*, *elt*, *esth*, *estp*, *invE* は検出されなかった。これら遺伝子陽性検体は凍結懸濁液から再分離したコロニーを対象に DEC 遺伝子を確認した結果, 24 株が DEC 関連遺伝子 3 種類を保有しており, *eae* 1 株, *aggR* 2 株, *astA* 20 株, *aggR* + *astA* 1 株であった。PCR による検出例を図 2 に示した。

DEC 関連遺伝子陽性の *eae* 1 検体, *aggR* 3 検体, *astA* 21 検体における培養法別の検索結果を表 3 に示す。*eae* 陽性 1

表 3 培養法別DEC関連遺伝子検索結果

培養法	液体培地	培養温度	<i>eae</i> (n=1)	<i>aggR</i> (n=3)	<i>astA</i> (n=21)
1	ECブロス	44.5 $^{\circ}$ C	0	0	8
2	ECブロス	40 $^{\circ}$ C	1	3	19
3	HIブイヨン	40 $^{\circ}$ C	1	3	20
4	HIブイヨン $\rightarrow$ ECブロス	40 $^{\circ}$ C	1	3	18

検体および *aggR* 陽性 3 検体は, 培養法 1 では検出できなかったが, 培養法 2~4 ではすべて検出された。*astA* 陽性 21 検体は, 培養法 1 では 8 検体, 培養法 2~4 では 18~20 検体の検出であり, 21 検体すべてを検出した方法はなかった。

*eae* 保有 1 検体は凍結懸濁液から再分離し, *E. albertii* 特異遺伝子を標的とする PCR を行った結果, *mdh*, *lysP* 遺伝子は検出されなかった。また *aggR* 保有 3 検体も同様に再分離し, 確認試験として Clump 試験を行った。1 検体は検査不能であったが, 2 検体のうち 1 検体が Clump 試験陽性であった。

### IV. 考察

糞便汚染指標菌として大腸菌や大腸菌群等が知られているが, この大腸菌群には腸内細菌ではないエロモナス属等も含まれ, すべてが糞便由来ではない問題があるとされる。そのため温血動物の糞便由来大腸菌群を高温で増菌・培養することで, 糞便系大腸菌群として通常の大腸菌群と区別する<sup>13)</sup>。一般に大半の細菌は 30 $^{\circ}$ C以上の温度で増殖可能であり, 増殖の温度域により低温菌, 中温菌, 高温菌に分類される。腸内細菌は中温菌に分類されるが, 糞便系大腸菌を分離するためのいくつかの EC 培地は主に 44.5 $^{\circ}$ Cの高温で培養される。この温度は大腸菌の発育可能限界温度でもあるため<sup>5)</sup>, 大腸菌の発育も抑制している可能性がある。本研究では糞便由来検体を対象とし, 液体培地を用いた 4 種類の培養法別に選択増菌・培養し, DEC 関連遺伝子の保有状況を検討した。

DEC 関連遺伝子検索の結果, 対象 218 検体中, *eae* 1 検体, *aggR* 3 検体, *astA* 21 検体が検出された。遺伝子陽性検体を再分離し遺伝子検索した結果, *eae* 1 株, *aggR* 2 株, *astA* 20 株, *aggR* + *astA* 1 株であった。これら 3 種類の DEC 関連遺伝子は培養法 1 での検出数が低く, 他の方法では大きな差はなかった。このことから, 検体中の大腸菌量が多くなかったことや 44.5 $^{\circ}$ Cの高温下での発育に適していなかった可能性が考えられた。この高温下における大腸菌の選択培養は, 菌量が多くない場合には少なからず増菌・発育に影響を受けるものと考えられる。PCR は数個の菌数で遺伝子検出が可能である<sup>14)</sup>ことから, 増幅された DEC 関連遺伝子は必ずしも下痢症の原因に関係していない可能性が示唆され, 今後は菌量による培養条件別の検出感度の検討が必要である。

*eae* 保有 1 株は *bfpA* を保有していなかったことから、Atypical 腸管病原性大腸菌に分類された。腸管病原性大腸菌は EAF プラスミドを保有する Typical と保有しない Atypical に分類され、このプラスミド上にある集束形成線毛関連遺伝子である *bfpA* により分類する<sup>8)</sup>。*bfpA* を持たない *eae* 保有大腸菌は健康人からの分離報告<sup>15)</sup>もあることから、その病原性の診断は慎重に判断する必要がある。またこの *eae* 保有 1 検体は *E. albertii* 特異遺伝子 *lysP* および *mdh* を保有していなかったことから、大腸菌と同定された。*E. albertii* は 2003 年に新興病原体として命名され<sup>16)</sup>、わが国でも食中毒の原因菌としてしばしば報告されている<sup>11)</sup>。しかしながら、その性状は大腸菌と類似していることから臨床検査機関では多くが誤同定されており、また近年多くの臨床検査機関で導入が進んでいる質量分析でも正しい同定ができていない現状である<sup>17)</sup>。現在、これらの鑑別は PCR による特異遺伝子の検索が有効とされている<sup>11)</sup>ことから、今後 *eae* 保有大腸菌検出の際には、これらの特異遺伝子の検索も併せて行うことが重要である。

*aggR* は腸管凝集付着性大腸菌の凝集付着に関する活性因子であり、腸管凝集付着性大腸菌と同定するためには細胞付着試験<sup>18)</sup>等が必要となる。しかしながら細胞を用いた付着試験は手技が煩雑で実用的ではないことから、*aggR* 保有株にはガラス付着特性を活かした Clump 試験<sup>12)</sup>を行った。*aggR* 保有 3 検体のうち、1 検体は生菌が得られず判定不能であったが、1 検体は Clump 試験陽性、もう 1 検体は陰性であった。*aggR* は *eae* と同様に健康人からの検出報告<sup>16)</sup>があり、特に *aggR* 保有にも関わらず凝集付着特性を示さない株は下痢症の直接の原因ではない可能性も考えられた。

今回最も多く検出された遺伝子は *astA* であり、218 検体中 21 検体から検出された。*astA* は腸管凝集付着性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1(EAST-1) をコードする遺伝子であり、DEC では *aggR* と同様に腸管凝集付着性大腸菌に分類される<sup>2)</sup>。しかしながら腸管凝集付着性大腸菌において凝集付着に関与する遺伝子は *aggR* であり、*astA* の病原性は未だに明らかになっていない<sup>6)</sup>。*astA* は単独保有による集団食中毒の報告<sup>19)</sup>がある一方で、健康人での保有例<sup>15)</sup>も報告されている。桶嶋ら<sup>20)</sup>は、*astA* 保有大腸菌が他の菌と相互作用することで病原性を発揮している可能性を否定できないとしていることから、*astA* 保有大腸菌の病原性の判定は *eae* と同様に慎重に行われることが望まれる。

本研究では下痢症患者由来便の懸濁液を対象に平板培地による分離培養をせず、液体培養にて DEC 関連遺伝子を検索した。44.5°C の高温下での液体培養では大腸菌の発育抑制が考えられたが、40°C の中温下では遺伝子の検出が良好であった。今回検出された 3 種類の DEC 関連遺伝子は健康人保有の報告もあることから、病原性の判断は慎重に行うことが必要である。今後は他の検査材料にも応用し、遺

伝子検索と同時に生菌数あるいは菌量の評価をあわせて下痢症原因菌迅速検出法を検討したい。

**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: 戸田細菌学 改訂 34 版. pp317-327, 南山堂, 東京, 2013.
- 2) Nataro JP, Kaper JB: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 11(1): 142-201, 1998.
- 3) 林 英生, 岩本愛吉, 他: ブラック微生物学 第 2 版. pp157-159, 南山堂, 東京, 2007.
- 4) 日本食品衛生学会: 食品安全の辞典. pp393-395, 朝倉書店, 東京, 2009.
- 5) 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): 666-669, 1982.
- 6) Fujioka M, Otomo Y, et al.: A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. J Microbiol methods, 92(3): 289-292, 2013.
- 7) Oswald E, Schmidt H, et al.: Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun, 68(1): 64-71, 2000.
- 8) Gunzberg ST, Tomieporth NG, et al.: Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR based detection of the bundle-forming pilus gene. J Clin Microbiol, 33(5): 1375-1377, 1995.
- 9) Ratchtrachenchai OA, Subpasu S, et al.: Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR, Bull Dept Med Sci, 39:211-220, 1997.
- 10) Hyma KE, Lacher DW, et al.: Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. J Bacteriol, 187(2), 619-628, 2005.
- 11) 大岡唯祐: 新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii*. 日本食品微生物学会雑誌, 34(3), 151-157, 2017.
- 12) Fujioka M, Ahsan CR, et al.: Rapid detection method for enteroaggregative *Escherichia coli* using simple Clump formation and aggregative assay. Adv Microbiol, 3: 552-556, 2013.
- 13) 吉田眞一, 柳 雄介, 他: 戸田細菌学 改訂第 34 版. pp194, 南山堂, 東京, 2013.
- 14) 西島裕人, 増山博幸: これからの微生物検出について. SCAS NEWS, 22(2): 7-10, 2005.
- 15) 藤岡美幸, 月足正辰, 他: Multiplex PCR を用いた健康人における下痢原性大腸菌の保有状況. 医学検査, 60(6): 871-874, 2011.
- 16) Huys G, Cnockaert N, et al.: *Escherichia albertii* sp. Nov., a diarrheagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. Int J Syst Evol Microbiol, 53(3): 807-810, 2003.
- 17) 杵渕貴洋, 角谷不二雄, 他: 同定に MALDI-TOFMS が有効であった患者由来 *Escherichia albertii* 2 株の細菌学的概要—北海道. IASR, 39(5), 83, 2018.
- 18) Scaletsky ICA, Lourdes M, et al.: Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun, 45(2): 534-536, 1984.
- 19) Yatsuyanagi J, Saito S, et al.: Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. J Clin Microbiol, 41(5): 2033-2039.
- 20) 桶嶋三津子, 王 麗麗, 他: 非定型下痢原性大腸菌について 1—腸管凝集接着性大腸菌耐熱性償還毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌—. 生活衛生, 54(4): 271-284, 2010.

**【Original article】**

**Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli*-related genes on various liquid culture methods**

MIYUKI FUJIOKA<sup>\*1</sup> RYOTA HAYASHI<sup>\*2</sup> SEISHIN TSUKIASHI<sup>\*3</sup>  
SHO YOSHIOKA<sup>\*1</sup> TSUMUGI MATSUSHITA<sup>\*2</sup> TSUBASA ABE<sup>\*2</sup>  
HIROYUKI NOZAKA<sup>\*1</sup>

(Received July 27, 2020 ; Accepted August 25, 2020)

**Abstract:** Some *Escherichia coli* strains have acquired virulence genes that confer pathogenicity and are referred to as diarrheagenic *E. coli* (DEC) and has been categorized into the five groups. In this study, we used some selective liquid culture methods to detect DEC-related genes. As the results, we detected 24 DEC-related gene harboring strains (one *eae*, two *aggR*, 20 *astA*, and one *aggR+astA*) from 218 samples. The detection status of all genes was not good at the normal EC broth incubation at temperature of 44.5°C, and the detection of genes were good at 40°C culture of both EC broth and HI bouillon. This study enabled the rapid detection of DEC-related genes on liquid culture instead of smearing and culturing fecal specimens on agar plate, and more DEC-related genes could be detected by incubating the specimens at 40°C.

**Keywords:** Diarrheagenic *Escherichia coli*, Gene detection, Liquid culture, Culture temperature