

## B-8 新規蛍光色素を用いた 迅速な大腸菌検出法の開発

○津田 収<sup>1</sup>・高橋 正宏<sup>1</sup>・佐藤 久<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院 工学研究院 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

\* E-mail: qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

### 1. はじめに

飲料水、用水、親水を生物学的に安全に利用するためには、病原微生物の濃度を適切に管理することが不可欠である。現在、環境基準や一律排水基準では大腸菌群数が<sup>1)</sup>、水道水質基準では大腸菌数が衛生指標となっている<sup>2)</sup>。これは、水系感染症は糞便を介した経口感染が感染経路である事が多く、糞便汚染の有無を確認する指標としては、腸内に生息する細菌であって、ほとんどすべての温血動物の糞便に比較的多量に存在する腸管内常在菌であり、さらに環境水中ではほとんど増殖できない大腸菌が衛生指標として優れていると考えられているためである。しかしながら、大腸菌群数の測定では大腸菌以外の土壌由来の細菌群も検出してしまうため、糞便性大腸菌群数や大腸菌数よりも高い値を示す場合が多い。特に清澄な水域においてその傾向が顕著である。このような背景から、大腸菌数を新たな環境基準の衛生指標として用いることが検討されている。

大腸菌群数や大腸菌数は、寒天培地上にコロニーを形成させる方法や細菌が生産する酵素により発色する指示薬を用いる方法(特定酵素基質培地法)により検出されている。これら2つの方法を比べると、前者は寒天培地の作製に労力と時間を要するのに対し、後者は比較的簡便な方法である。しかしながら、特定酵素基質培地法は24時間程度の培養時間を必要とする。水環境における糞便汚染の有無を確認するために行うスクリーニング試験は迅速さが求められ、かつ、比較的簡単な方法であることが望ましい。従って、病原微生物の検出法としては未だ改善の余地がある。

そこで本研究では、特定酵素基質培地法を用いて、簡便かつ迅速に大腸菌群数を定量する方法を開発することを試みた。これを達成するために、第一に、大腸菌群数を検出する指示薬として蛍光色素を用いることとした。現行の大腸菌群数検出用指示薬は発色基質である。蛍光色素は発色指示薬に比べて、光強度測定時のバックグラ

ウンドが小さいのでSN比を低く押さえられることが知られている。また、環境サンプル中には光を吸収する物質が含まれているため、環境分析には吸光度を測定するよりも蛍光強度を測定する方がより信頼度の高い分析が可能と考えられる。第二に、本研究では光強度を経時的に測定することで初期大腸菌群濃度を定量することを試みた。大腸菌群の初期濃度が高い程、指示薬は早く反応し、早い時間から菌を含まないブランクサンプルに比べて相対的な光強度が増大する、と考えた。具体的には、バイオイメージングの研究においてβ-ガラクトシダーゼ活性の分析に用いられている蛍光色素を、大腸菌群数の定量に用いることができるかを検討した。初期濃度の異なるO157含有液体サンプルに蛍光色素を添加し、経時的に蛍光スペクトルを測定した。培地の振とうが蛍光スペクトルの経時変化に及ぼす影響を検討した。同様の実験を、市販の発色指示薬についてもを行い、結果を比較した。

### 2. 実験方法

#### (1) 大腸菌含有サンプルの準備

大腸菌としてペロ毒素非産生性の大腸菌O157:H7(ATCC 700728)を使用した。O157をBrilliant Green Bile Broth (BGBB)培地にて24時間、37°Cの条件下で培養し、O157ストック溶液を得た。O157を生理食塩水で3度洗浄した。

#### (2) 蛍光色素および発色指示薬を用いた大腸菌含有サンプルの定量

洗浄後のO157ペレットを液体培地で再懸濁した後に希釈してO157サンプルを作製した。液体培地の組成は、トリプトース:5g/L、塩化ナトリウム:5g/L、ソルビトール:1g/L、トリプトファン:1g/L、リン酸水素二カリ

ウム：2.7 g/L、リン酸二水素カリウム：2 g/L、ラウリル硫酸ナトリウム：0.1 g/L、IPTG：0.1 g/L、とした。O157濃度はQuanti-Tray®2000 (IDEXX Laboratories, Inc.)を用いたMPN法で定量した。濃度調整後のO157含有液体培地5 mLを50 mLの三角フラスコに入れた後、最終濃度が5  $\mu$ Mとなるように蛍光色素を添加した。蛍光色素を添加した後、経時的(0、6、8時間)に培地の蛍光スペクトルを分光蛍光光度計(日本分光, V-630)を用いて分析した。励起波長は525 nmとした。吸光分析によりO157濃度

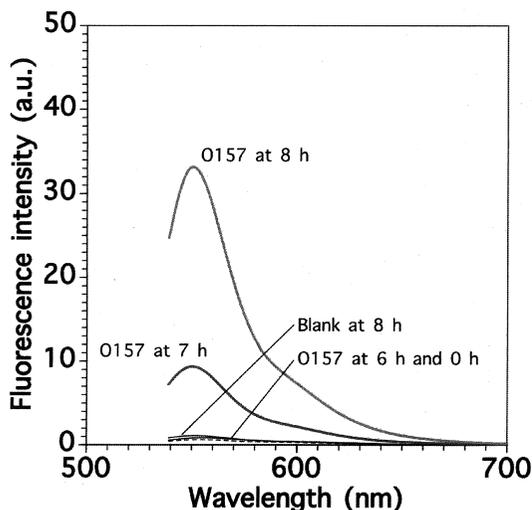


図1 ブランクおよびO157を含む蛍光色素含有培養液の蛍光スペクトルの経時変化

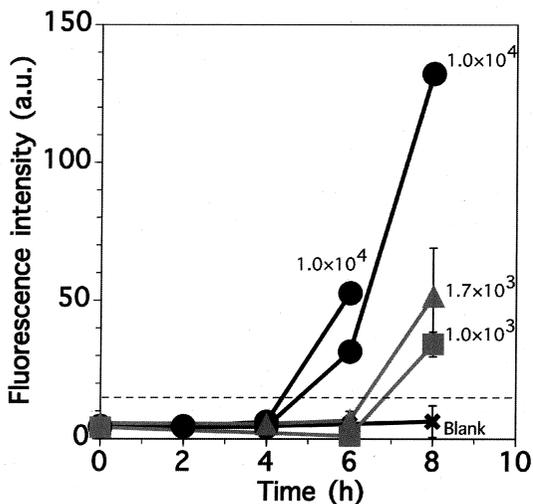


図2 異なる初期濃度のO157を含む蛍光色素含有培養液の550 nmにおける蛍光強度の経時変化

を求める場合はECブルー(日水製薬)を用いた。

### 3. 結果と考察

#### (1) 蛍光色素を用いた大腸菌含有サンプルの定量

図1に蛍光色素を含む培養液でO157(初期濃度は $4.1 \times 10^3$  MPN/mL)を培養し、培養液の蛍光スペクトルを経時的に測定した結果を示す。O157を含む培養液の培養開始時の蛍光スペクトルは、O157を含まない培養液(ブランクサンプル)のそれと同様であった。6時間後にもO157含有培養液の蛍光強度は0時間のそれと大きく変わらなかったが、7時間後には550 nmにピークが表れた。8時間後にはピーク強度はさらに増大した。これに対し、8時間後のブランクサンプルの吸光スペクトルは0時間のそれと同様であった。蛍光強度が最大となった550 nmの蛍光強度の経時変化を図2に示した。O157の初期濃度が $10^4$  MPN/mLの条件では、4時間から6時間の間にブランクサンプルに比べて優位に蛍光強度が増大した。これに対し、 $10^3$  MPN/mLの条件では、6時間から8時間の間に蛍光強度が増大した。このように、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の分析に用いられている蛍光色素の蛍光強度を経時的に測定し、ブランクサンプルに比べて優位に吸光度が増大する(図2では一例として15とした)までの時間を測定することで、大腸菌群を定量できることが本研究から明らかとなった。現状では測定間隔が2時間と長い場合、今後はより詳細に蛍光強度の時間変化を追って行く予定である。

#### (2) 蛍光強度におよぼす振とうの影響

次に培地の振とうが蛍光の発色に与える影響を検討した。図3に、初期濃度 $2.0 \times 10^3$  MPN/mLでO157を含む培地の、8時間後の蛍光スペクトルを示した。この結果より、振とうの有無は蛍光強度の増大にさほど影響を与えないこと、振とうしない方が蛍光強度が高まる可能性があることが明らかになった。

#### (3) 発色指示薬を用いた大腸菌含有サンプルの定量

図4にECブルーでO157(初期濃度は $4.1 \times 10^3$  MPN/mL)を培養し、培養液の吸収スペクトルを経時的に測定した結果を示す。O157を含む培養液の培養開始時の吸収スペクトルは、O157を含まない培養液(ブランクサンプル)のそれと同様であった。6時間後、O157培養液の吸光度は400 nmから700 nmの範囲で増大した。7時間後には吸光度はさらに増大した。これに対し、7時間後のブ

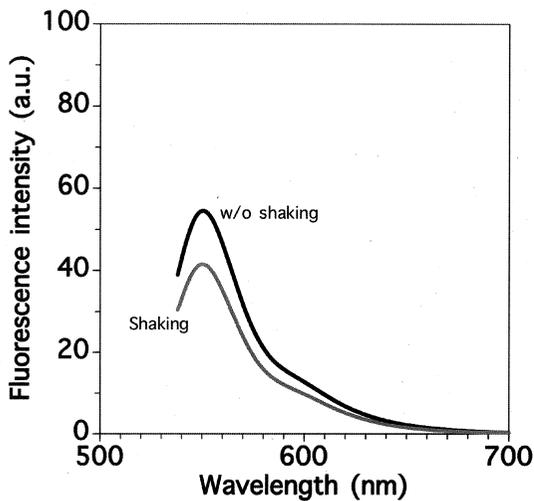


図 3 O157 を含む蛍光色素含有培養液の蛍光スペクトル。Shaking: 振とう培養、w/o shaking: 静置培養

ランクサンプルの吸光スペクトルは0時間のそれと同様であった。500 nmの吸光度の経時変化を図5に示した。O157の初期濃度が $1.0 \times 10^3$  MPN/mLの条件では、6時間後にブランクサンプルに比べて優位に吸光度が増大した。これに対し、 $4.1 \times 10^3$  MPN/mLの条件では、6時間以内に吸光度が増大した。このように、蛍光色素と同様に、市販の大腸菌群検出用培地の吸光度を経時的に測定し、ブランクサンプルに比べて優位に吸光度が増大する(図には一例として0.1とした)までの時間を測定することで、大腸菌群を定量できることが本研究から明らかとなった。検出までの時間は蛍光色素よりもECブルーの方が早かった。

#### 4. 結論

本研究ではバイオイメージングに用いられる蛍光色素を用いて、大腸菌群数の迅速な定量が可能か否かを検討した。蛍光色素は有機溶媒を含まない水溶液にも良く溶解し、蛍光スペクトルを測定することもできた。初期濃度が $10^4$  MPN/mLのサンプルよりも $10^3$  MPN/mLのサンプルの方が蛍光検出時間が短く、蛍光検出時間を測定することにより大腸菌群を定量できる可能性が示唆された。振とうしなくても蛍光強度が上がったことから、今後はプレートリーダーを用いて大腸菌を培養し、より詳細に蛍光強度の時間変化を追って行く予定である。予想に反し、市販の発色指示薬の方がより短期間に $10^3$  MPN/mLのサンプルを検出できた。今後は、蛍光色素の蛍光特性をさらに改良する、また、蛍光色素の大腸菌への取り込みメカニズムを明らかにすることで分析法を改良して行

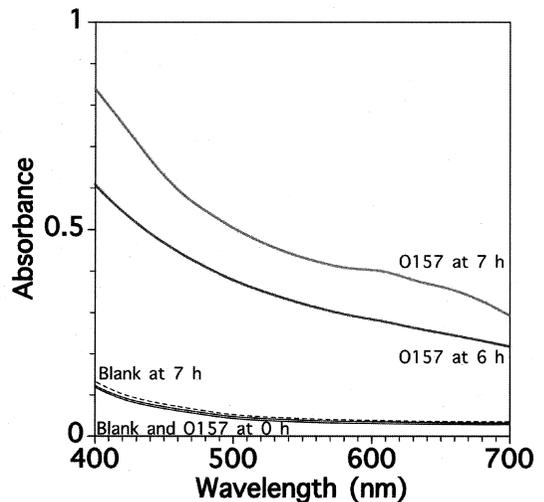


図 4 ブランクおよび O157 を含む EC ブルーの吸収スペクトルの経時変化

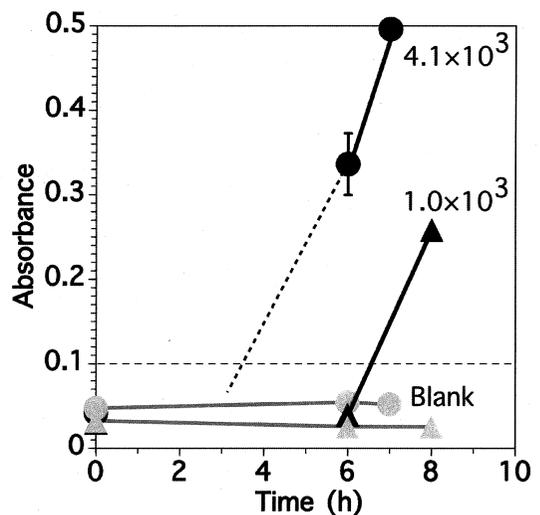


図 5 異なる初期濃度の O157 を含む EC ブルーの 500 nm における吸光度の経時変化

く予定である。 $\beta$ -グルクロニダーゼと反応し蛍光を発する蛍光色素も開発し、大腸菌の分析も同様に行う予定である。

#### 参考文献

- 1) 環境省 website
- 2) 厚生労働省 website