

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2019～2020
課題番号：19K21979
研究課題名(和文) 蛍光プローブを用いた簡易・迅速・低コストのオンサイト指標細菌一斉計測技術の開発

研究課題名(英文) Development of simple, rapid and low-cost onsite simultaneous measurement technique of indicator bacteria based on fluorescence probes

研究代表者
佐藤 久 (Sato, Hisashi)
北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：80326636
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光プローブを用いた簡易・迅速・低コストのオンサイト指標細菌一斉計測技術を開発した。大腸菌数40cfu/Lのサンプルは7時間程度で、4cfu/Lのサンプルでも13時間程度で検出できた。操作は未処理下水であってもいかなる前処理もなしに液体培地または寒天培地にサンプル水を供し、37℃に設定したマイクロプレートリーダーで蛍光強度を10分に一回自動で測定するのみと極めて簡便である。通常の下処理水であれば3時間程度で大腸菌数を測定できるので、時間的にも空間的にも高頻度で大腸菌数を分析でき、処理効率の悪化を迅速に把握できる。測定培地は0.02mL程度であるので1サンプルあたりのコストは2円程度である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
極めて簡易にオンサイトで大腸菌を計測できるようになり、特に熟練の技術者がおらず分析にコストをかけられない開発途上国の人の健康と環境を守ることができる。現在は指標細菌数を計測するまでに約24時間かかるが、本法ではわずか3時間で計測が終了するので、指標細菌数が基準値を超えた場合に迅速に対応することが可能となる。現在世界中で広く用いられている計測キットのコストは1サンプル当たり約1300円であるが、本法は1サンプル2円であるので、開発途上国でも問題なく使用できる。一度に96サンプル測定できるので高頻度で指標細菌の経時変化を追う、広範囲の指標細菌の分布を計測する、などが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple, rapid, and low-cost simultaneous on-site indicator bacteria measurement technique using fluorescent probes. A sample with 40 cfu/L of E. coli could be detected in about 7 hours, and a sample with 4 cfu/L in about 13 hours. The operation is extremely simple: even with untreated sewage, the sample water is placed in a liquid medium or agar medium without any pretreatment, and the fluorescence intensity is automatically measured once every 10 minutes using a microplate reader set at 37 °C. Since the number of coliform bacteria can be measured in about three hours for normal treated sewage water, the number of coliform bacteria can be analyzed with high frequency in both time and space, and deterioration of treatment efficiency can be quickly identified. Since the measurement medium is about 0.02 mL, the cost per sample is about 2 Japanese yen.

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2018年2月のWHOの報告(Fact sheets/Drinking-water)によれば、世界の約20億人が糞便で汚染された水源の飲料水を利用している。水系感染症の病原体は主に温血動物の腸管に存在するので、水源の糞便汚染は水系感染症のリスク拡大を意味する。病原体は多種多様なため、各水源で個々の病原体を計測することは不可能である。ここで考えられる代替策は糞便汚染の指標細菌の計測である。指標細菌とは糞便中に多く含まれている細菌群であり、指標細菌の存在は水源の糞便汚染を意味する。現在、大腸菌、大腸菌群、腸球菌が指標細菌として世界中で計測されている。

細菌の定量法に関する研究は100年以上の歴史があり、今日では実に多様な定量法が存在する。理系の大学を卒業した方なら誰しも培養に基づく細菌の計測をした事があるはずである。これが記憶に残るのは、作業に多大な労力(培地の準備、希釈、ろ過)を要するためであろう。これに対し近年良く使われている核酸量を測る方法は、精度は高いものの核酸の抽出や精製が面倒である。

2. 研究の目的

本研究では蛍光プローブを用いて、極めて簡易に(培地とサンプル液を混合するのみ)迅速に(2時間以内)低コストで(1サンプル10円)オンサイトで環境基準に含まれる複数の指標細菌数を一斉に計測できる技術を開発する。得られる成果: 本法が完成すれば極めて簡易にオンサイトで細菌を計測できるようになり、特に熟練の技術者がおらず分析にコストをかけられない開発途上国の人の健康と環境を守ることができる。現在は指標細菌数を計測するまでに約24時間かかるが、本法ではわずか2時間で計測が終了するので、指標細菌数が基準値を超えた場合に迅速に対応することが可能となる。現在世界中で広く用いられている計測キット(Colilert®とQuanti-Tray: IDEXX社)のコストは1サンプル当たり約1300円であるが、本法は1サンプル10円であるので、開発途上国でも問題なく使用できる。

一度に96サンプル測定できるので高頻度(例えば10分間隔)で指標細菌の経時変化を追う、広範囲(例えば川の上流から下流に渡り網羅的)の指標細菌の分布を計測することができる。

3. 研究の方法

既に本研究室で開発済み(科研費 挑戦的研究(萌芽): 研究課題番号17K18894の成果)の指標細菌3種(大腸菌、大腸菌群、腸球菌)を特異的に検出する蛍光プローブを用いる。96ウェルマイクロプレートの1ウェルに培地0.02 mLとサンプル液0.18 mLを添加する(図1)。培地は一般的な細菌が増殖可能な有機物と無機塩類を含む緩衝溶液とする。これに蛍光プローブを濃度100mg/Lとなるように添加する。この培養液を1サンプルにつきマイクロプレートの10ウェルに分注する。マイクロプレートをマイクロプレートリーダー(TECAN社、インフィニット F200Pro、励起フィルター360 nm、蛍光フィルター460 nm)に設置し、温度を37℃に設定し、10分毎に3時間にわたり蛍光強度を測定する(図2)。Microsoft Excelを用いて直線的に増大する蛍光強度(2時間まで)の傾きを求める(図2)。この傾きは酵素活性に等しい。求めた酵素活性と公定法で測定した細菌数から検量線を作成し(図3)、細菌数が未知のサンプルの細菌数を計測する。

4. 研究成果

特定酵素蛍光基質を用いた下水中の大腸菌(群)の簡易、迅速、低コスト分析法の開発に成功した。大腸菌(群)に特異的な特定酵素蛍光基質が市販されていること、かつ細菌は指数関数的に増殖することから、指数関数的にDNA分子を増幅し蛍光色素を用いて濃度を定量する「リアルタイムPCR法」から本法を着想した。リアルタイムPCR法ではサーマルサイクラーを用いてDNA分子を増幅する。DNA分子は温度上昇とそれに続く温度低下の1サイクルで2倍に増える。n回のサ

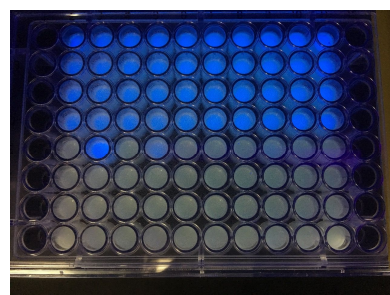


図1 2時間で蛍光を発するサンプル

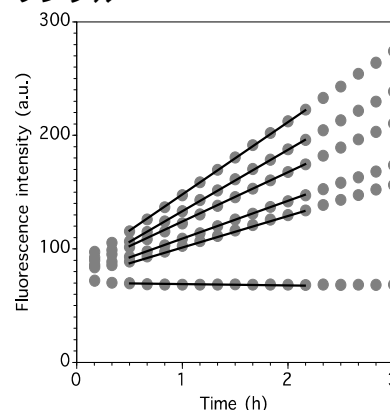


図2 細菌数が異なるサンプルの蛍光強度の経時変化

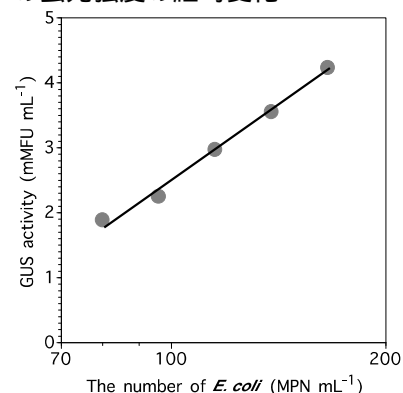


図3 図2の結果から作成した検量線

イクルの後には DNA 分子量は理論的には初期濃度の $2n$ 倍に増えている。DNA 分子濃度は DNA 分子と特異的に反応する蛍光色素の蛍光強度からリアルタイムに求められる。増幅前のサンプルの蛍光強度（ベースライン）と比較して明らかに高い蛍光強度を閾値とすると、初期 DNA 濃度が高いサンプルほど早く蛍光強度が閾値に達するので、閾値に達したサイクル数（ C_t 値と呼ばれる）と初期 DNA 濃度の対数値には負の相関がある。初期 DNA 濃度既知のサンプルを用いて予め検量線を作成しておき、初期 DNA 濃度未知のサンプルも同様の条件で増幅し蛍光強度を分析して C_t 値を求めると、検量線から初期 DNA 濃度を算出できる、この分析メカニズムを利用して、水サンプルに特定酵素基質を添加し、蛍光強度をリアルタイムで分析し、蛍光強度が閾値に達した時間とサンプル水中大腸菌（群）数から検量線を作成することで、水サンプル中の未知の大腸菌群数を分析できるのではないかと考えた。本法の河川水への適用例を示す。河川水 1L を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した。6 ウェルマイクロプレートの各ウェルに大腸菌用の寒天培地を作製した。寒天培地には大腸菌用の特定酵素蛍光基質である 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) を添加した。1 ウェルにろ過後のメンブランフィルター1枚を載せた。マイクロプレートを 37 に設定したマイクロプレートリーダーにセットし、10分毎にウェルの蛍光強度を分析しながら 24 時間培養した。蒸留水をサンプルとした場合には蛍光強度は増加しなかった。フィルター当たり大腸菌数 40cfu のウェルでは 7 時間程度で、4cfu のウェルでは 13 時間程度で蛍光強度が指数関数的に増大した（図 4）。蛍光強度の増大はウェル内で大腸菌が対数増殖したためと考えられる。サンプルの蛍光強度が閾値を超えた時間を「対数増殖開始時間」と称する。閾値はブランクの蛍光強度の平均値にその標準偏差の 10 倍を足した値と定義した。同様の分析を繰り返し、公定法で求めた大腸菌数と対数増殖開始時間の関係を解析した（図 5）。公定法で大腸菌が検出されなかった 15 サンプルのうち、13 サンプルは蛍光が閾値を超えなかったが、残り 2 サンプルは 17.4 時間と 23.7 時間に閾値を超えた。この理由として、本技術の結果が偽陽性であった、または本技術の方が公定法よりも感度が良いことが考えられる。公定法で大腸菌が検出されたサンプルは 4 つで、大腸菌数の増大に伴い対数増殖開始時間は短くなった。これらは指数関数で近似できた。相関関数は $Y=15.6 \exp(-0.019x)$ 、決定係数は 0.99 であった。以上の結果から、この相関関数を検量線として用いることで、4 cfu/L という低濃度の大腸菌をも定量できることがわかった。

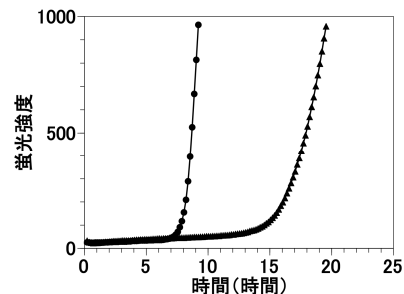


図 4 大腸菌を捕捉したフィルターの蛍光強度の経時変化。大腸菌数は、フィルター当たり 40 cfu (○), および 4 cfu (□)。

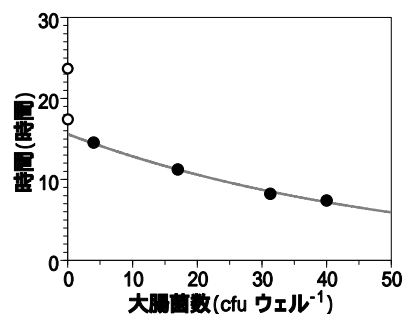


図 5 大腸菌数と対数増殖開始時間の関係。白抜きプロットは公定法で大腸菌が検出されなかったサンプル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Hisashi, Kikuchi Kai, Katayose Yutaka, Tsuda Shu, Hirano Reiko, Hirakata Yuga, Kitajima Masaaki, Ishii Satoshi, Oshiki Mamoru, Hatamoto Masashi, Takahashi Masahiro, Okabe Satoshi	4. 巻 715
2. 論文標題 Simple and reliable enumeration of Escherichia coli concentrations in wastewater samples by measuring -d-glucuronidase (GUS) activities via a microplate reader	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 136928 ~ 136928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2020.136928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 佐藤 久、津田 収、菊地 凱、平野 麗子	4. 巻 56
2. 論文標題 特定酵素蛍光基質を用いた下水中の大腸菌群の簡易迅速測定法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 下水道協会誌	6. 最初と最後の頁 110 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24748/jswa.56.684_110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hisashi, Katayose Yutaka, Hirano Reiko	4. 巻 83
2. 論文標題 Simple enumeration of Escherichia coli concentrations in river water samples by measuring -d-glucuronidase activities in a microplate reader	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water Science and Technology	6. 最初と最後の頁 1399 ~ 1406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wst.2021.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 H. Sato, K. Kikuchi, Y. Katayose, S. Tsuda, R. Hirano, S. Ishii, S. Okabe
2. 発表標題 A Simple and Rapid Method for Enumerating Escherichia coli in Wastewater by Measuring -D-glucuronidase Activity
3. 学会等名 IWA Water and Development Congress & Exhibition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田 翔介, 佐藤 久
2. 発表標題 簡易大腸菌分析法による下水中大腸菌数の測定
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮島龍太, 赤澤優弥, 小野寺岳史郎, 岩崎隼, 佐藤久
2. 発表標題 新規簡易大腸菌分析技術を用いた都市河川の糞便汚染源の解明
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深田翔介, 平野 麗子, 佐藤 久
2. 発表標題 極少数の大腸菌を測定可能な新規の簡易大腸菌数測定法の開発
3. 学会等名 下水道研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北大 佐藤久研究グループ
<https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSato/index-HisashiSato.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	羽深 昭 (Hafuka Akira) (30735353)	北海道大学・工学研究院・助教 (10101)	
研究 分 担 者	齋藤 伸吾 (Saito Shingo) (60343018)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スリランカ	University of Ruhuna	University of Peradeniya	