

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18894

研究課題名(和文) 特定酵素蛍光基質を用いた病原細菌および薬剤耐性細菌の簡易迅速定量法の開発

研究課題名(英文) Development of a simple and rapid quantification method of pathogenic bacteria and drug-resistant bacteria based on fluorogenic substrates

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)：大腸菌は糞便汚染の指標であり大腸菌群に変わる指標細菌として利用することが議論されている。現在の大腸菌数測定法は培地の作製，希釈，18時間以上の培養，陽性の判定作業など多大な労力を要する。昨年度，大腸菌簡易測定法の開発に成功した。そこで今年度は3カ所の下水処理水から10ヶ月に渡り下水処理水の大腸菌数を測定した。処理場Aと処理場Bでは，GUS活性と大腸菌数に高い正の相関がみられた。処理場Cでは相関は低かった。回帰式の関数は処理場ごとに異なった。この結果から，本法により処理場ごとにGUS活性と大腸菌数の回帰式を求めれば，それを検量線として終沈越流水中の大腸菌数を簡易に定量できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌は糞便汚染の指標であり大腸菌群に変わる指標細菌として利用することが議論されている。現在の大腸菌数測定法は培地の作製，希釈，18時間以上の培養，陽性の判定作業など多大な労力を要する。本研究で開発した技術を用いれば，サンプルを液体培地の入ったマイクロプレートに添加するだけという極めて簡便な操作のみで希釈も必要なく，大腸菌数が100 MPN/mL程度およびそれ以上の最終沈殿池越流水であれば2時間で測定が終了する。本技術が普及すれば世界中で頻繁に下水中や河川水中の大腸菌数を測定することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：Monitoring of Escherichia coli concentrations at wastewater treatment plants (WWTPs) is important to ensure process performance and protect public health. However, conventional E. coli enumeration methods are complicated, and time- and labor-consuming. Here, we developed a novel simple, rapid, and reliable method to enumerate E. coli concentrations in wastewater samples. The method is simple and does not require sample pretreatment. By incubating sample-medium mixture in a microplate reader for <2 h, -D-glucuronidase (GUS) activities were obtained. Positive correlations were observed between GUS activities and E. coli concentrations in wastewater samples, although correlation equations were specific to WWTP. Difference in the E. coli population structures among WWTPs may explain the difference in the correlation equations. By using a WWTP-specific correlation equation as a calibration curve, E. coli concentrations could be estimated based on the GUS activities in wastewater samples.

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、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌は糞便汚染の指標であり、大腸菌群に変わる指標細菌として利用することが議論されている。現在の大腸菌数測定法は、培地の作製、希釈、18 時間以上の培養、陽性の判定作業など多大な労力を要する。大腸菌数の判定は迅速かつ簡易であることが望ましいが、現在これを達成しうる技術が確立されているとは言い難い。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、特定酵素基質培地法を液体培地に適用しこの課題を解決することとした。具体的には、マイクロプレートリーダー内で下水処理水を 37℃ で培養しながら蛍光強度の経時変化を測定することにより、下水処理水中の大腸菌数を測定することを試みた。

### 3. 研究の方法

大腸菌の特定酵素蛍光基質である 4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド (MUG、富士フイルム和光純薬株式会社) を用いた。蛍光スペクトル測定実験で用いた培地はレディーカルトコリフォーム 100 から XGal と MUG を除き、MUGal を加えたものとした (蛍光測定用培地と称す)。すなわち蛍光測定用培地は、Milli-Q 水 1 L にトリプトース 5 g、塩化ナトリウム 5 g、ソルビトール 1 g、トリプトファン 1 g、リン酸水素二カリウム 2.7 g、リン酸二水素カリウム 2.0 g、ラウリル硫酸ナトリウム 0.1 g、イソプロピル-β-D チオガラクトピラノシド (IPTG) 0.1 g を添加し、最後に MUG を最終濃度で 2.5 μM になるように添加し作製した。上述の吸光スペクトル測定実験で用いた大腸菌サンプルと同じ液を蛍光測定用培地に添加し、8 時間の培養の間に分光蛍光光度計 (日本分光株式会社 FP-6600) で蛍光スペクトルを測定した。

96 ウェルマイクロプレート (TPP 社 細胞培養プレート 96well 平底) の 1 ウェルに蛍光測定用培地 0.02 mL とサンプル (大腸菌 O157 株培養液や下水、ブランクサンプルとして Milli-Q 水) 0.18 mL を添加した。この培養液を 1 サンプルにつきマイクロプレートの 4、8 または 10 ウェルに分注した。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 分毎に最長 16 時間にわたり蛍光強度を測定した。測定中プレートは攪拌せず、また、マイクロプレートはフィルム等の覆いをせずにマイクロプレートリーダーに装着した。

### 4. 研究成果

下水処理場初沈水中大腸菌数を測定した。初沈水を 10 倍希釈し、その後順に 1.5 倍希釈し 8 種類のサンプルを準備した。10 分毎にマイクロプレートリーダー (TECAN 社 Infinite F200Pro、励起フィルター 485nm/蛍光フィルター 535nm, 37℃, gain 50) で蛍光強度を測定した。高濃度のサンプルほど蛍光強度が早く増大した。各サンプルの蛍光強度の 1 から 3h の間を 1 次式で近似し、その傾きを蛍光強度増加速度とした。正の直線関係が得られた。

下水処理場初沈水中大腸菌数を測定した。原液を順に 1.5 倍希釈し、8 種類のサンプルを準備した。10 分毎にマイクロプレートリーダー (TECAN 社 Infinite F200Pro, 励起フィルター 485nm/蛍光フィルター 535nm, 37 °C, gain 100) で蛍光強度を測定した。高濃度のサンプルほど蛍光強度が早く増大した。各サンプルの蛍光強度の 1-3h 間を 1 次式で近似し、その傾きを蛍光強度増加速度とした。大腸菌数が 55000MPN/mL 以下のサンプルは正の直線関係がみられた。82000MPN/mL 以上の濃度では蛍光強度の上限値・増加速度が頭打ちになった。これは蛍光基質がほぼ全て分解された、すなわち酵素生成速度ではなく蛍光基質量が反応を律速したためと考えられる。

下水中大腸菌数を測定した。S 下水処理場初沈水および終沈水を採取し、初沈水と終沈水を混ぜて大腸菌数が異なるサンプルを作製した。初沈水と終沈水を混ぜ大腸菌数が異なる 8 種類のサンプルを作製した。サンプルを Milli-Q で準備したブランクサンプルも用意した。1 サンプルにつき 10 サンプルをマイクロプレート (96 ウェル) に分注した。10 分毎にマイクロプレートリーダー (TECAN 社 Infinite F200Pro, 励起フィルター 485nm/蛍光フィルター 535nm, 37 °C, gain 100) で蛍光強度を測定した。各サンプルの蛍光強度の 1~3h の間を 1 次式で近似し、その傾きを蛍光強度増加速度とした。蛍光強度増加速度と大腸菌数には正の直線関係がみられた。上述と同様に蛍光強度増加速度を求めた。蛍光強度増加速度と大腸菌数には正の直線関係がみられた。

下水処理水およびそのろ液中の大腸菌数を測定した S 下水処理場初沈水および終沈水と各々のろ液は孔径 0.45  $\mu\text{m}$  と 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターを用いて準備した。初沈水と終沈水の原液、およびそれぞれをろ過したサンプルをそれぞれ 2 つずつ、計 8 サンプルを作製した。1 サンプルにつき 10 サンプルをマイクロプレート (96 ウェル) に分注した。マイクロプレートリーダーを用いた測定は前回と同様の条件で行った。初沈水では、ろ液は原液よりはゆるやかであったが蛍光強度が増加した。ろ液は細菌が除去されているので、この結果はサンプルの液相中に酵素が存在することを示している。ろ過時に細菌表面に付着していた酵素が液相中に溶出してきたことも考えられる。一方、終沈水のろ液はわずかに蛍光強度の増加がみられ、原液は約 7 時間後に急激に増加した。ろ液の蛍光強度増加速度(1h~3h)を算出すると、以前測定したブランクの蛍光強度増加速度より大きかった。これはろ過時に細菌表面に付着していた酵素が液相中に溶出してきたこと、もしくは下水中に酵素が存在していることを示すものである。このことから、原液は 7 時間までは菌数の増加ではなく菌が元々持っている酵素により、ろ液では細菌から脱離した、もしくは下水に存在した酵素量に比例して蛍光強度が増大したと考えられる。

Sh 下水処理場および T 下水処理場下水処理水中大腸菌数を測定した。Sh および T 下水処理場初沈水および終沈水を採取し、初沈水と終沈水を混ぜて大腸菌数が異なるサンプルを作製した。初沈水と終沈水を混ぜ大腸菌数が異なる 4 種類のサンプルを作製した。これを二つの下水処理場のサンプルで行った。Sh および T 下水処理場ともに、それぞれのサンプルからは相関関係があまりみられなかった。蛍光強度増加速度が下水処理場によって異なることが分かった。

また、ここでこれまでのデータを基に、基準値（3000 MPN/mL）付近の蛍光強度増加速度のグラフを作成した。各サンプルの蛍光強度の1hから3hの間を1次式で近似し傾きを求め、サンプルの傾きとブランクの傾きの差を蛍光強度増加速度とした。蛍光強度増加速度と大腸菌数には正の直線関係がみられた。この結果から、この回帰直線を検量線とすることで本法によりS下水処理場の下水処理水の大腸菌数を定量できることが分かった。また、下水処理場によって蛍光強度増加速度が異なった。これは下水処理場ごとに細菌叢が異なるためと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 岩崎 隼・平野 麗子・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久 特定酵素蛍光基質を用いた下水中大腸菌の新規薬剤感受性試験法の開発 第55回環境工学研究フォーラム 2018年 査読なし
2. 長橋 夏実・片寄 由貴・菊地 凱・平野 麗子・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久 新規簡易迅速大腸菌測定法を用いた下水処理水中薬剤耐性大腸菌数の測定 第55回環境工学研究フォーラム 2018年 査読なし
3. 佐藤 久・平野 麗子・高橋 正宏・岡部 聡 下水処理水中の $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を利用した簡易迅速大腸菌定量法の開発 下水道研究発表会 2018年 査読なし
4. 菊地 凱・片寄 由貴・平野 麗子・北島 正章・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久  $\beta$ -グルクロニダーゼを用いた新規簡易大腸菌数測定法の開発 下水道研究発表会 2018年 査読なし
5. 片寄 由貴・平野 麗子(セルスペクト)・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 新規簡易大腸菌数測定法による下水処理水中大腸菌数の網羅的測定 下水道研究発表会 2018年 査読なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。