

従来の 1/10 の時間で大腸菌数を測定する手法を開発

～早く・安く・簡単に多くの飲料水や食品の安全性を確認～

ポイント

- ・大腸菌が分解できる蛍光色素の蛍光強度を高感度で測り、大腸菌数を測定する技術を開発。
- ・測定時間はわずか 2 時間、測定コストは約 2 円の上、一度に 96 サンプルも測定可能。
- ・浄水場や食品加工場、開発途上国の井戸といった実際の現場での利用に期待。

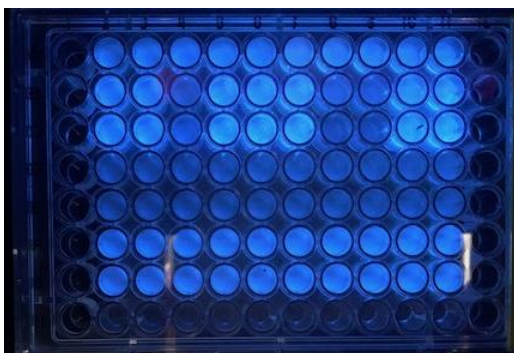
概要

北海道大学大学院工学研究院の佐藤 久教授、セルスペクト株式会社の平野麗子研究員らの研究グループは、一度に多数のサンプル中の大腸菌数を早くて安価な上、簡単に測定できる技術の開発に成功しました。

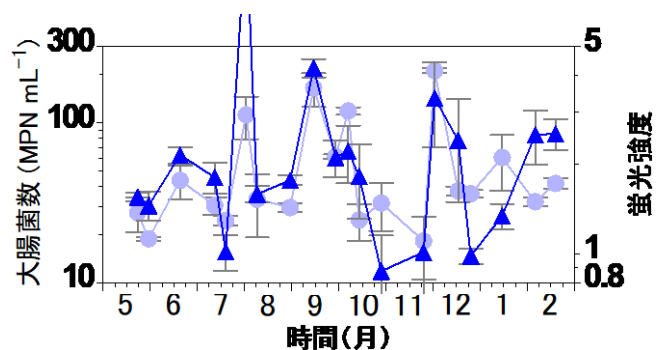
大腸菌は本来、その名のとおり大腸の中に存在する細菌であり、自然界や食品には存在しません。そのような大腸菌が河川や地下水、飲料水や食品に存在することは、それらが大腸の中にあるもの、すなわち糞便で汚染されていることを示しています。ほとんどの大腸菌はヒトにとって無害ですが、糞便中には多種多様な病原菌が存在する可能性が極めて高く、糞便で汚染されたものを口にするのは好ましくないため、水や食品中の大腸菌数の測定が法律で定められています。また、大腸菌数の調査結果が出るまで安全性を保証できず水や食品を出荷できないため、製品が汚染されているかどうかをできるだけ早く調査する必要があります。

現在、大腸菌数は寒天培地*¹ や液体培地を用いて測定していますが、従来の方法では結果を得るまでに 24 時間程度かかります。研究グループは、大腸菌が持つ酵素を蛍光色素により高感度に検出することで、測定時間をわずか 2 時間に短縮することに成功しました。また、蛍光強度は大腸菌数と比例するため大腸菌数も測定できるほか、一度に 96 サンプルも測定できるため 1 サンプルあたりの測定コストは約 2 円と非常に安価であることも特徴です。

なお、本研究成果は、2020 年 1 月 25 日（土）公開の *Science of The Total Environment* 誌に掲載されました。



マイクロプレートの写真。1 つのくぼみに 0.2mL の液体が入っており、大腸菌が存在するくぼみだけ青い蛍光を発する。



10 ヶ月に渡る大腸菌数測定の結果。▲は公定法の測定結果（左縦軸）、●は本方法での測定結果（右縦軸）。新手法での測定結果は公定法の測定結果とほぼ一致。

【背景】

大腸菌は本来、その名のとおり大腸の中に存在する細菌であり、自然界や食品には存在しません。そのような大腸菌が河川や地下水、飲料水や食品に存在することは、それらが大腸の中にあるもの、すなわち糞便で汚染されていることを示しています。糞便中には多種多様な病原菌が存在する可能性が極めて高く、糞便で汚染されたものを口にするのは好ましくないため、水や食品中の大腸菌数の測定が法律で定められています。このように、それ自体は有害な菌ではないのに存在すると汚染されていると判断できるような細菌は「指標細菌」と呼ばれ、大腸菌はその代表例です。また、大腸菌数の調査結果が出るまで安全性を保証できず水や食品を出荷できないため、製品が汚染されているかどうかをできるだけ早く調査する必要があります。

【研究手法・研究成果】

現在、大腸菌数はシャーレに大腸菌用の寒天培地を入れ、培地の上でサンプル中の大腸菌を培養し、コロニー*²数を数えることで測定されています。しかし、従来の方法の最大の問題は、結果を得るまでに24時間程度かかることです。

研究グループは、わずか2時間で大腸菌数を測定できる新手法の開発に成功しました。具体的には、大腸菌の液体培地の中に蛍光基質*³を加えたものをマイクロプレート*⁴に0.02mL入れた後、液体サンプルを0.18mL入れます。このマイクロプレートをマイクロプレートリーダー*⁵にセットし、37°Cで温めながら10分ごとに培地の蛍光強度を自動で測定します(p.1左図)。測定はわずか2時間で終了するだけでなく、蛍光強度が上がっていく度合いから大腸菌の数がわかる上、サンプルを事前に処理する必要も全くありません。

この新手法開発成功のカギは、大腸菌が持つ酵素に着目した点にあります。この酵素は基質のみを分解する働きを持っているため、酵素に分解される前は蛍光を発せず、分解後にのみ蛍光を発する基質を用いることで大腸菌の存在を知ることになりました。

研究グループは、測定の一例として未処理及び処理された下水を測定しました。測定原理を明らかにするためにまず遺伝子を測定しました。大腸菌は、測定開始から4時間程度から増殖し始め、この段階で急激に蛍光強度が増大しました。従来の方法ではこの強い蛍光を測定していますが、本研究で用いた高感度の装置により、大腸菌が増殖する前の培養開始直後の微弱な蛍光も30分以内に検出できたため、わずか2時間で大腸菌の数を測定できました。新手法では、下水のような汚れたサンプルでも事前の処理なく測定できたほか、分解能は高く、80 MPN*⁶/mLと96 MPN/mLの差も十分判別できました。従来の方法では、大腸菌数が多いサンプルは希釈しなければいけませんが、新手法では10~10,000 MPN/mLの範囲であれば希釈しなくても測定できる上、10ヶ月に渡り何の問題もなく下水中の大腸菌数を測定できました(p.1右図)。さらに、未処理の下水も処理した下水も同じ方法で測定できるほか、測定に使用する試薬が0.02mLでよく、一度に96サンプルも測定できるため、1サンプルあたりの測定コストは約2円と非常に安価であることも特徴です(マイクロプレートリーダーのコストは除く)。

【今後への期待】

本研究では下水しか測っていませんが、研究グループは大腸菌数が1 MPN/L程度という低濃度のサンプルの測定や、河川水や牛乳中の大腸菌数の測定にも成功しています。実験室での検証は終わっているため、今後は浄水場や食品加工場、開発途上国の井戸などの実際の現場で使用していく考えです。

論文情報

論文名 Simple and Reliable Enumeration of *Escherichia coli* Concentrations in Wastewater Samples by Measuring β -D-glucuronidase (GUS) Activities via a Microplate Reader
(マイクロプレートリーダーを用いた β -D-グルクロニダーゼ (GUS) 活性を測ることによる簡易かつ信頼性の高い廃水中の大腸菌の計数)

著者名 佐藤 久¹, 菊地 凱², 片寄由貴², 津田 収², 平野麗子³, 平片悠河⁴, 北島正章¹, 石井聡⁵, 押木 守⁶, 幡本将史⁴, 高橋正宏¹, 岡部 聡¹ (¹北海道大学大学院工学研究院, ²北海道大学大学院工学院, ³セルスペクト株式会社, ⁴長岡技術科学大学, ⁵ミネソタ大学, ⁶長岡工業高等専門学校)

雑誌名 Science of The Total Environment (環境学の専門誌)

DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.136928

公表日 2020年1月25日(土)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院工学研究院 教授 佐藤 久 (さとうひさし)

T E L 011-706-6277 F A X 011-706-6277 メール qsatoh@eng.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html>

セルスペクト株式会社メディカルサイエンス部 林 秀洋 (はやしひでひろ)

T E L 080-5734-9809 F A X 019-903-0418 メール hhayashi@cellspect.com

U R L <https://cellspect.com/>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp

セルスペクト株式会社 (〒020-0857 岩手県盛岡市北飯岡1丁目10-82)

T E L 019-681-6710 F A X 019-903-0418 メール info@cellspect.com

【用語解説】

- *1 培地 … 微生物の培養に用いられる, エサを含んだ液体や固体のこと。
- *2 コロニー … 24時間程度微生物を培養すると目に見えるようになる, 微生物の塊のこと。
- *3 基質 … ある酵素が分解できる特定の物質のこと。蛍光基質はこれに蛍光色素が付いたもの。
- *4 マイクロプレート … 縦 8cm×横 13cm×高さ 1.5cm 程度の板状のプラスチック容器。0.2mL の液体が入る小さなくぼみが 96 個ある。
- *5 マイクロプレートリーダー … マイクロプレートの一つ一つのくぼみの中の蛍光強度を測る装置。
- *6 MPN … 微生物の数の単位。正確には匹ではないが, 1MPN は 1 匹 (1cfu) と考えて差し支えない。