

〈特集〉

簡易微生物モニタリング技術の開発

佐藤 久

北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門
(〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目 工学部 A5-14 E-mail: qsatoh@eng.hokudai.ac.jp)

概要

我々は大腸菌の酵素活性に基づく簡易大腸菌モニタリング技術を開発した。本法は、サンプルと培地を混合するだけで、無菌環境を必要とせず、最大96サンプルを一斉に、1サンプルあたり約2円で大腸菌を測定できる技術である。酵素活性の増大は大腸菌の遺伝子濃度の増大とほぼ同時に起こった。薬剤耐性大腸菌数を定量できた。下水や河川水中に4.3 MPN/mL以上の大腸菌が存在すれば、2時間程度で大腸菌を半定量できた。下水処理場の各プロセスでの処理効率を評価し、糞便汚染地点を特定した。

キーワード：大腸菌, 酵素活性, 蛍光, 糞便汚染
原稿受付 2023.12.23

EICA: 28(4) 41-45

1. 緒言

1.1 簡易微生物モニタリング技術の重要性

微生物の生存能力は極めて高く、純水製造装置の貯水タンクでも微生物が増殖する¹⁾。水道水の配水施設内に病原性微生物が存在すれば人の健康を害するリスクが高まる。直接飲用される水ではなくても、農業用水や人が触れる可能性のある親水や公共用水中にどれだけ病原性微生物が存在するのかを定量することは極めて重要である。微生物の測定は水処理装置の処理効果の評価にも用いられる。

病原性微生物は多岐にわたるため、全ての病原性微生物を検出することは現実的ではない。そこで水系感染症を引き起こす病原性微生物は主に温血動物の腸管に存在することから、病原性微生物そのものを検出する代わりに糞便汚染を検出するという考え方がある。一般的に水の糞便汚染は腸管内に高い割合で普遍的に存在する細菌である大腸菌、腸球菌、バクテロイデス目の細菌の検出によって評価されている。よってこれら細菌は糞便汚染の指標細菌と呼ばれる。

現在、指標細菌はシャーレや試験管を用いた培養に基づく方法かPCR法により測定されている。培養に基づく方法には、結果を得るまでに24時間程度を要する、生きていないが培養できない病原細菌を見落とす、PCR法には、イニシャルコストが高い、高額な酵素が必要という解決すべき課題があり、これらの課題を克服した新たな測定技術の開発が望まれている。我々は2014年より、大腸菌の酵素活性に基づく簡易大腸菌モニタリング技術を開発してきたのでその成果を紹介する。

2. 研究成果

2.1 現行の大腸菌測定法

日本の水道水質基準の項目には大腸菌が含まれており、厚生労働省が定めるMUGを用いる方法で測定されている²⁾。MUGとは4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニドであり、4-メチルウンベリフェロン(MU)という蛍光分子に、酵素β-グルクロニダーゼ(GUS)の基質であるD-グルクロン酸が結合したものである。大腸菌のほとんどがGUSを産生し、大腸菌以外のほとんどの細菌はGUSを産生しないことから、環境工学ではGUSを産生する細菌を大腸菌と定義している。GUSを産生する細菌(すなわち大腸菌)は、液体培地や寒天培地にMUGを添加することで簡単に検出する。培地にサンプルを添加し、培養し、培養液や寒天培地上のコロニーが紫外線下で4-メチルウンベリフェロン特有の青白い蛍光を発すれば高濃度にMUGが産生された、すなわち大腸菌が存在する証拠となる。

2.2 酵素活性測定に基づく簡易大腸菌モニタリング技術の原理

この知見から我々は定量PCR法と同様のメカニズムで大腸菌を定量できるのではないかと考えた。定量PCR法ではサンプルの温度を上昇、その後低下させることでDNAが2倍に増幅する。DNAはn回の温度変化サイクルの後に理論的には初期濃度の2のn乗倍に増える。DNA濃度は二本鎖DNAと結合すると蛍光を発する蛍光色素の蛍光強度から求められる。増幅前のサンプルの蛍光強度と比較して明らかに高い

蛍光強度を閾値に設定すると、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。閾値に達するまでのサイクル数 (Ct 値と呼ばれる) と初期 DNA 濃度の対数値には負の相関が見られる。これに並行して初期 DNA 濃度が既知のスタンダードサンプルを用いて検量線を作成することで、初期 DNA 濃度が未知のサンプルの DNA 濃度を算出できる³⁾。

我々は、大腸菌も 2 の n 乗倍で増えること、かつ大腸菌数を蛍光色素 (MUG) で検出できることが定量 PCR 法と同様であることから、以下の方法で大腸菌数を定量することを発想した。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 0.18 mL を添加する。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 0.1 g を添加し、最後に MUG を最終濃度で 2.5 μ M になるように添加したものとした。この混合液を 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°C に設定し、10 分毎に最長 24 時間にわたり蛍光強度を測定する。

2.3 結果と考察

(1) 大腸菌数と蛍光強度の関係

Fig. 1 に MU の蛍光強度 (F.I.) および *uidA* 遺伝子濃度の経時変化を示した。*uidA* 遺伝子は GUS をコードする遺伝子である。遺伝子濃度は定量 PCR 法で測定した⁴⁾。サンプルの F.I. はおよそ 5 時間から増加した。*uidA* 遺伝子濃度は 5 時間から 8 時間の間に指数関数的に増加した。この結果は F.I. の急激な増大が大腸菌の対数増殖に対応していることを示している。

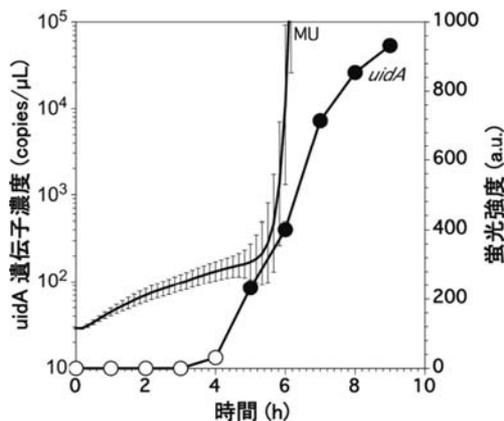


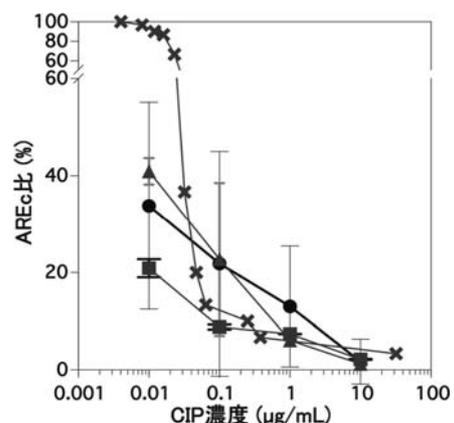
Fig. 1 MU の蛍光強度と *uidA* 遺伝子濃度の経時変化

(2) 大腸菌数の定量

そこで、サンプルを蒸留水としたブランクサンプルの F.I. を 24 時間にわたり測定し、その平均値に標準偏差の 10 倍を加えた値を閾値とし、大腸菌を含むサンプルの F.I. が閾値を超えた時間を「対数増殖開始時間 (Ti)」と定義した⁵⁾。大腸菌数が異なるサンプルの Ti を測定したところ、Ti と大腸菌数の対数値には負の相関が見られた⁵⁾。この原理を利用して、サンプル中の大腸菌数を、さらには蛍光分子を MUG から大腸菌群測定用の 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドに変更することによって大腸菌群を定量できることがわかった⁶⁾。

(3) 薬剤耐性大腸菌数の定量

本法は培養可能な大腸菌のみを定量できる方法であることから、大腸菌の活性を阻害した際の効果 (阻害率または生存率) を判別できるのではないかという仮説を立て、蛍光測定用培地に抗菌薬を入れることで、抗菌薬存在下でも増殖可能な大腸菌、すなわち薬剤耐性大腸菌 (AREc) を検出することを試みた⁵⁾。A 下水処理場の最終沈殿池からサンプルを採取し、シプロフロキサシン (CIP) に対する AREc の全大腸菌に対する比率を、Chromocult Coliform Agar ES, Colilert 法, ETEST 法, および本法にて算出した (Fig. 2)。CIP 濃度が 10 μ g/mL の時の AREc 比率は全ての方法で 3% 以下であった。10 から 0.01 μ g/mL の範囲では、本法の結果は Chromocult 法と比較して、平均 AREc 比率の違いは 7% 以内であった。CIP 濃度が 0.1 から 0.01 μ g/mL の範囲では、Colilert 法では本法および Chromocult 法よりも AREc 比率は低かった。また、CIP 濃度が 0.01 μ g/mL の場合、ETEST 法では他の 3 つの方法よりも AREc 比率は高かった。これは ETEST ストリップの最小発育阻止濃度の判別が難しかったためと考えられる。各 CIP 濃度での AREc 比率の標準偏差は、本法 (<23%) では他の方法 (<3%) よりも高く、本法は他の方法よりも精度が低いこ



▲ : Chromocult 法, ■ : Colilert 法, × : ETEST 法, ● : 本法

Fig. 2 CIP 濃度に対する AREc の全大腸菌に対する比率

とがわかった。これは本法のサンプル量が0.18 mLであるのに対し、他の方法では10 mL以上のサンプルを用いるためと考えられる。精度は劣るが本法ではAREcを半定量的にスクリーニングすることが可能であることがわかった。

(4) 大腸菌数測定迅速化

Fig. 1を見ると蛍光強度が急上昇する前にも直線的に増大していることがわかる。これは、培養前のサンプル中に存在する大腸菌が既にGUSを保有しているためであり、サンプルと培地を混合した瞬間からGUSが分解されているためと考えられる。すなわち、蛍光強度の経時変化(傾き)は培養前のサンプル中のGUS活性を表しているものと考えられる^{4,7)}。そこで傾きと大腸菌数との相関を解析するために、大腸菌数166±39 MPN/mLの下水処理水を生理食塩水で1.2倍に、計4回希釈し、傾きと大腸菌数を測定した(Fig. 3)。これらのサンプルのF.I.は、培養後0.5時間から2.0時間まで直線的に増加した(Fig. 3a)。傾きは希釈倍率に従って低下した。ブランクサンプルの傾きは-0.18 h⁻¹であった。これらの結果に基づいて、サンプルの傾きからブランクサンプルの傾きを差し引き、既往の方法に準じてGUS活性(mMFU/mL)に変換した(Fig. 3b)。大腸菌数とGUS活性との間に

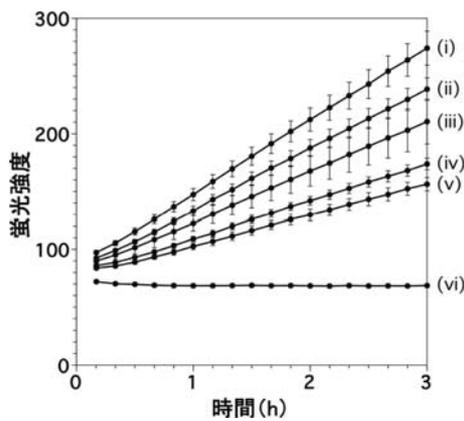


Fig. 3a 下水処理水 (i) とこれを段階的に希釈したサンプル (ii から vi) の蛍光強度の経時変化

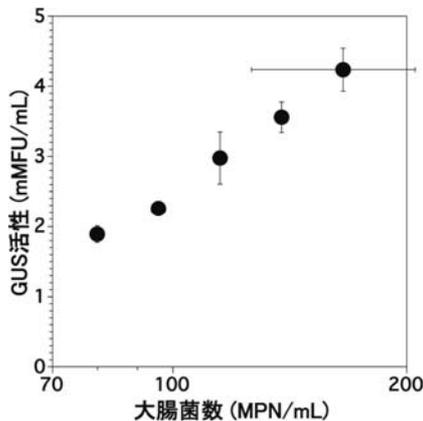


Fig. 3b サンプル (i) から (vi) のGUS活性と大腸菌数の関係

は相関係数0.997で高い正の相関が見られた。この結果から、本法にて2時間で下水処理水中の大腸菌数を測定できることがわかった。本法の標準偏差はColilert法よりも低かった。これは、本法の測定数(n=10)がColilert法のそれ(n=2)よりも多いためと考えられる。さらに、本法の変動係数は<12.5%未満であり、Colilert法のそれ(23.8%)よりも低く、本法はColilert法よりも信頼性が高いことが示された。t検定のp値はFig. 3bの2つの隣接したプロット全てで<0.0005であり、本法は下水中の大腸菌数80 MPN/mLと96 MPN/mLを高い精度で区別できること、少なくとも16 MPN/mLまで測定できることが明らかとなった。

続いて、本法を河川水に適用した⁸⁾。2017年5月から2018年1月の間、毎週3つの下水処理場の処理水放流口の直上および直下の河川で採水を行い、103サンプルを採取した(Fig. 4)。大腸菌数が100 MPN/100 mL以下の場合、GUS活性は大腸菌数に依存して変化しなかった(約0.2 mMFU/mL)。一方、大腸菌数が100 MPN/100 mLを超えるとGUS活性は大腸菌数に依存して増加した。近似式は $y=0.012x^{0.51}$ 、相関係数は0.87、p値は 2.8×10^{-32} であった。大腸菌数が100 MPN/100 mL以下の場合、GUS活性の平均値と標準偏差(σ)はそれぞれ0.18と0.023であった。これらの値を用いて、本法の検出限界($LoD=3 \times \sigma / \text{傾き}$)を算出したところ、LoDは430 MPN/100 mLであった。

さらに3つの下水処理場の最初沈殿池および最終沈殿池から10ヶ月にわたり下水を採取した⁷⁾。最終沈殿池サンプルを測定するとともに、データを増やすために、最初沈殿池サンプルの少量(<1%)を最終沈殿池に添加したスパイクインサンプルも測定した(Fig. 5)。A処理場から取得したサンプルのGUS活性と大腸菌数に高い相関が見られた($\text{Log } y=0.47 \text{ Log } x - 0.53$, $r=0.86$, $p \text{ 値} = 1.6 \times 10^{-12}$)、またB処理場

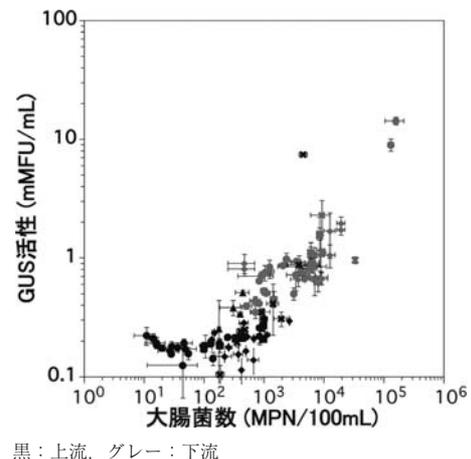
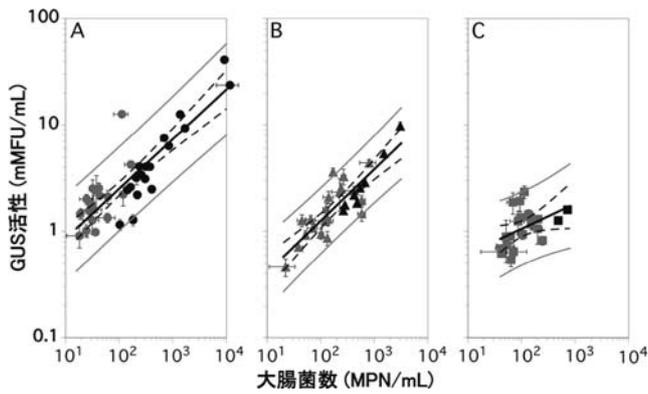


Fig. 4 河川サンプルのGUS活性と大腸菌数の関係



グレー：終沈，黒：スパイクサンプル

Fig. 5 3 下水処理場の GUS 活性と大腸菌数の関係

でも相関が高かった ($\text{Log } y = 0.48 \text{ Log } x - 0.87$, $r = 0.86$, $p \text{ 値} = 4.8 \times 10^{-9}$)。一方，C 処理場では相関が低かった ($\text{Log } y = 0.24 \text{ Log } x - 0.45$, $r = 0.44$, $p \text{ 値} = 0.04$)。この結果から，相関式は処理場によって異なることがわかった。また，スパイクインサンプルと最終沈殿池サンプルが同じ式で近似できたことから，大腸菌以外の細菌や有機物や無機物などの下水中の物質は本法を阻害しないことがわかった。

さらに，A 下水処理場の初沈，終沈，砂ろ過槽，塩素接触槽から採水し，一つの処理場の各処理プロセスにおける大腸菌除去効率を評価した⁷⁾ (Fig. 6)。算出した GUS 活性を Fig. 5 A の関係式を用いて大腸菌数に変換した。大腸菌数は初沈越流後には約 10^4 MPN/mL であったが，終沈越流後には 2 から 3 桁減少していた。終沈越流後と比較し砂ろ過後は，Colilert 法で測定した大腸菌数は同程度であったが，本法で測定した大腸菌数は低下した。この結果から，砂ろ過処理は培養可能な大腸菌数を変化させない一方で，大腸菌内の GUS 活性を低下させることがわかった。逆に，塩素消毒後は Colilert 法で測定した大腸菌数は < 1 MPN/mL に減少したが，本法で測定した大腸菌数は過大評価された。この理由として，塩素消毒

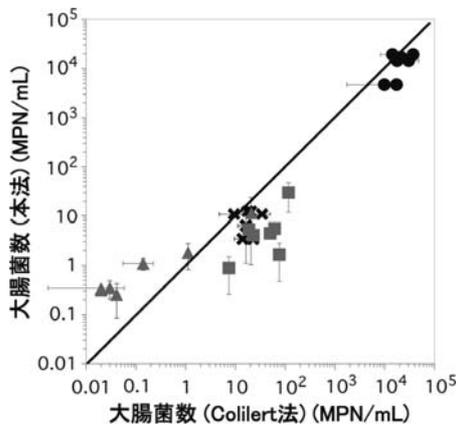


Fig. 6 A 下水処理場の初沈 (●)，終沈 (×)，砂ろ過槽 (■)，塩素接触槽 (▲) における Colilert 法 (横軸) および本法 (縦軸) で測定した大腸菌数

により培養可能な大腸菌数は大きく減少する一方で大腸菌内の GUS 活性はさほど低下しなかったことが考えられる。

(5) 糞便汚染源の特定

上記の結果から，砂ろ過処理のように基質や栄養が律速する環境では培養可能な大腸菌数が維持される一方で GUS 活性が低下したり，塩素消毒のように培養可能な大腸菌数が減少する一方で GUS 活性が維持されたりすることがわかった。このことは Colilert 法で測定した大腸菌数と GUS 活性の比率は，それまでに大腸菌が置かれてきた環境に依存することを示唆している。そこで下水処理場の処理水放流口の直上および直下の河川から採水し大腸菌数と GUS 活性を測定した⁴⁾ (Fig. 7)。上流サンプルの GUS 活性は < 0.24 mMFU/mL であり，大腸菌数が増大するにつれて増加する傾向が見られた。一方，下流サンプルの GUS 活性は > 0.21 mMFU/mL であった。興味深いのは，一部の上流サンプルが，下流の全ての大腸菌が検出された範囲 (10^4 から 10^5 MPN/mL) に含まれていたものの，これらのサンプルのほとんどが下流サンプルよりも GUS 活性が低かったことである。一方，いくつかの下流サンプルの大腸菌数は比較的 low かった ($< 10^4$ MPN/mL) もの，これらサンプルの GUS 活性は，同じ大腸菌数の範囲の上流サンプルよりも高かった (> 0.21 mMFU/mL)。本測定においては下流サンプルは明らかに糞便汚染源直下であり，この放流口よりも上流には下水処理場は存在しないことから上流サンプルは糞便汚染を受けていないサンプルと考えることができる。よってこの結果から，GUS 活性の閾値 (0.21 mMFU/mL) を設定することで，糞便汚染源を容易に特定できることがわかった。

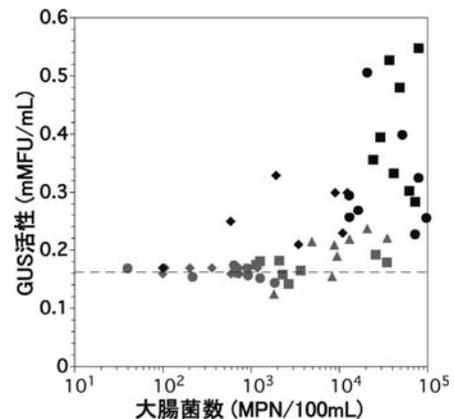


Fig. 7 下水処理場の処理水放流口の直上 (グレー) および直下 (黒) の河川の大腸菌数と GUS 活性。点線はブランクサンプルの GUS 活性 (1.6 mMFU/mL)

3. 結 論

本研究では、本法を用いることで、4.3 MPN/mL 以上の大腸菌を含む下水や河川水であれば、2時間程度で大腸菌を半定量できることを明らかにした。本法は、サンプルと培地を混合するだけの簡便な操作で、無菌環境を必要とせず、最大96サンプルを一斉に、1サンプルあたり約2円で大腸菌を測定できる技術であり、下水処理場の各プロセスでの処理効率を評価したり、糞便汚染地点を特定できる技術であることがわかった。現在は他の特定酵素蛍光基質を本法に適用し、腸球菌や緑膿菌の簡易分析技術の開発に取り組んでいる。

参考文献

- 1) メルク(株) 2019 蒸留水と RO-EDI 水の水質優位性の検証
URL: https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-JP-Site/ja_JP/-/JPY/ShowDocument-Pronet?id=201408.023
- 2) 上水試験方法 2020. 日本水道協会 東京.
- 3) 佐藤 久, 中屋佑紀 2022. 簡易水質分析 ぶんせき, 11月号, 454-459.
- 4) M. N. M. Shayan, H. Satoh et al. 2023. A simple and rapid method for detecting fecal pollution in urban rivers by measuring the intrinsic β -D-glucuronidase activity of *Escherichia coli*. *Water Research*, 246, 120689.
- 5) H. Satoh et al. 2022. Screening antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater and river water using a novel simple phenotypic antibiotic- susceptibility testing method. *ACS ES&T Water*, 2(8), 1301-1308.
- 6) 佐藤久ら 2019. 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. *下水道協会誌*, 684, 110-117.
- 7) H. Satoh et al. 2020. Simple and reliable enumeration of *Escherichia coli* concentrations in wastewater samples by measuring β -D-glucuronidase (GUS) activities via a microplate reader. *Science of The Total Environment*, 715, 136928.
- 8) H. Satoh et al. 2021. Simple enumeration of *Escherichia coli* concentrations in river water samples by measuring β -D-glucuronidase activities in a microplate reader. *Water Science and Technology*, 83(6), 1399-1406.