

バクテリオファージを用いた大腸菌迅速計測技術の開発

Rapid Determination of *Escherichia coli* Utilizing Bacteriophage Infection

○野田 直広* 平岡 睦久* 大戸 時喜雄* 多田 弘**
NAOHIRO NODA* MUSTUHISA HIRAOKA* TOKIO OHTO* HIROSHI TADA**
野上 尊子*** 矢野 理江*** 明賀 春樹***
TAKAKO NOGAMI*** RIE YANO*** HARUKI MYOGA***

*株式会社富士電機総合研究所／〒240-0194 神奈川県横須賀市長坂 2-2-1
Fuji Electric Corporate Research and Development/2-2-1, Nagasaka,
Yokosuka, Kanagawa 240-0194, Japan

**富士電機株式会社／〒191-0064 東京都日野市富士町 1
Fuji Electric Corporation/1, Fujimachi, Hino, Tokyo 191-0064, Japan

***オルガノ株式会社／〒335-0015 埼玉県戸田市川岸 1-4-9
Organo Corporation/1-4-9, Kawagishi, Toda, Saitama 335-0015, Japan

Abstract

We developed a new determination method that can quickly quantify *Escherichia coli* (*E.coli*) using bacteriophage (phage) T4 with fluorescent labeled DNA. Phage T4 only infects viable *E.coli* specifically, and injects its DNA into the *E.coli* cells. Therefore, when T4 DNA is labeled with acridine orange (AO), viable *E.coli* can be identified. When AO-labeled phage T4 is mixed with *E.coli*, elliptical fluorescent spots can be observed by microscopy, but these fluorescent spots are not seen when this phage is mixed with other bacteria. Since only *E.coli* are infected by this phage, *E.coli* can be specifically detected. Furthermore, we have developed an original flow cytometric sensor, which can be used to count the number of *E.coli* cells. Using this new flow cytometry method, it took less than 30 minutes to test a 1mL sample, including preparation time, and to obtain a cell count of viable *E.coli*. Correlation between the new method and a conventional *E.coli* determination method (in colony count) was very high, at a coefficient of $r^2=0.99$ (sample number $n=9$). We consider this new, rapid method of *E.coli* determination a very effective technique in assessing fecal contamination.

Key words: *E.coli*, bacteriophage, fluorescent labeling, rapid determination

1. はじめに

大腸菌は、大腸菌群、糞便性大腸菌群に比べて外乱因子が少ないことから、糞便性汚染をより的確に反映する重要な指標である¹⁾。近年、糞便性微生物汚染の問題が上下水や食品、その他の分野で顕在化している²⁾³⁾⁴⁾。しかし、従来の

試験方法では培養行程を含むことから、試験結果を得るまでに簡易検査でも数時間、公定法では24時間以上を要する⁵⁾。従来の微生物汚染管理システムは、この所要時間によって制約されてきた。

こうした状況を解消すべく、近年、培養に依存しない様々な細菌迅速計測技術が検討されている⁶⁾⁷⁾。例えば野上らは、

細菌の DNA に結合する抗体と化学発光を利用する方法を報告している⁹⁾。しかし、それらの技術においても、感度の不足、菌種に対する特異性の欠如、操作が煩雑といった課題が残されている。これに対し我々は、バクテリオファージ(ファージ)を利用する特定細菌の迅速計測技術を確立した。

ファージは宿主である特定の細菌に特異的に感染し、細菌の生理活性によって自己複製を行うウイルスである⁹⁾。ファージは、宿主細菌の表層にあるレセプターを認識して吸着する。その後、宿主細菌の膜電位によって宿主の生理活性を認識して、生理活性を維持している細菌にのみ DNA を注入する。

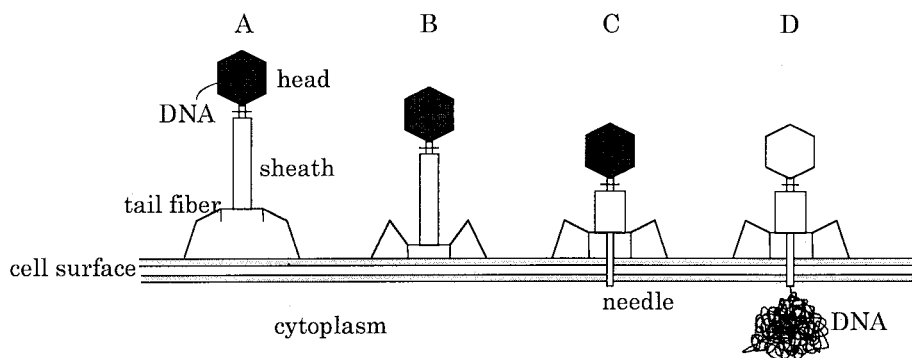


図 1. 大腸菌の検出原理

2. 大腸菌の検出原理と定量方法

2. 1 検出原理

図1に、大腸菌に対するファージ T4 の感染過程を示す。ファージのテイルファイバーは、大腸菌の外膜にあるレセプター分子を特異的に認識し、可逆的に吸着する(図1A、B)。可逆的吸着の後、ファージは形態変化を伴って宿主細胞に非可逆的に結合し、尾部の鞘の収縮によって細胞内にニードルを挿入する(図1C)。ニードル挿入に続き、ファージ頭部にある DNA がそのニードルを通過して大腸菌内に注入される(図1D)。

DNA 注入過程は大腸菌の細胞膜の電位に依存し、ファージは膜電位を維持している菌にのみ DNA を注入する¹⁰⁾。膜電位の有無は細菌が生理活性を維持しているか否かを反映しており、ファージは菌の膜電位によって菌の生死を識別している。逆に、菌の検出という見方に立てば、ファージの感染によって DNA を導入された大腸菌は生きていますと判断できる。

ファージ T4 を 5×10^{10} 個/mL 以上の濃度で添加すれば、数分以内で1個の大腸菌に複数個のファージ T4 が感染する。

このため、予め DNA をアクリジンオレンジ(AO)で蛍光標識しておけば、ファージ T4 の感染によって生きた大腸菌のみに蛍光標識 DNA が導入され、感染した大腸菌が検出可能になる。この方法は培養に依存せず、測定に要する時間は前処理を含めても 30 分以内である。

本論文では以下の知見を報告する。

- ・ファージ T4 を用いる大腸菌の検出原理と定量方法
- ・ファージ T4 感染による大腸菌検出実験
- ・自動検出装置による菌数定量

DNA が AO で標識されていれば、それら AO はファージ T4 の感染によって生きた大腸菌のみに導入される。従って、ファージ感染によって AO 標識された細菌は、生きた大腸菌として検出できる。

AO 標識された DNA は、ファージ頭部に充填されている時には 65~95nm 程度の小さな蛍光輝点である。AO 標識された DNA は大腸菌内に注入されると拡散し、1~5 μm の菌全体が蛍光を発するようになる。AO 分子の蛍光強度は、DNA が大腸菌内で拡散することによって増大する。その上、上述のように 1 個の大腸菌には複数個のファージ T4 が感染し、蛍光標識された DNA を注入する。これらの作用の結果、遊離のファージが共存する条件でも、蛍光強度の違いによって大腸菌を検出することができる。

2. 2 定量方法

蛍光標識した細菌を観察する方法としては、蛍光顕微鏡を用いることが多い。しかしながら、その方法では大量の試料を分析する場合、多大な労力と時間を要する。今回製作した自動検出装置は、フローサイトメトリックな検出手法を用いている。

フローサイトメトリーは、蛍光顕微鏡観察と比較して、

- ・大量の細胞を分析できる
- ・個々の細胞の蛍光強度を迅速に定量的に分析できる

という点で優れている¹¹⁾。

ところが、フローサイトメトリーは、元来、動物や植物などの比較的大きな細胞の解析を目的に開発されてきたため、大きさや細胞内成分量が真核細胞の数から数百分の一である細菌では、得られる蛍光シグナルが非常に小さい。一般的に、

蛍光色素の直接染色によって効率よく細菌を染色した場合でも、そこから得られる蛍光シグナルは市販のフローサイトメーターの検出限界付近である。ファージ感染による蛍光標識では、細菌に導入する蛍光色素量が直接染色より少なく、この方法で蛍光標識した細菌を検出するには、より検出感度の高い装置が必要である。そこで我々は高感度な自動検出装置(図2)を独自開発し、それによって試料を測定した。

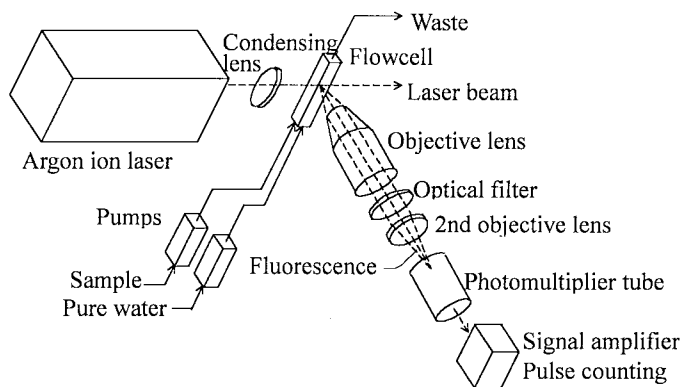


図2. 大腸菌検出用光学系

3. ファージ T4 感染による大腸菌検出実験

3. 1 大腸菌に対するファージ T4 の感染状況観察

LB培地を用いて37℃の好氣的条件下で大腸菌を培養した。培養開始から約 2 時間後、大腸菌は対数増殖期に差しかかり、その濃度は $10^8 \sim 10^9$ 個/mL になった。その培養液 10 μ L をスライドガラス上に採り、そこに濃度が $10^{11} \sim 10^{12}$ 個/mL の AO 標識ファージ 1 μ L を加え、蛍光顕微鏡(ニコン ECLIPS E800)で観察した。

ファージ T4 の感染は非常に迅速で、3分以内に大腸菌表面への吸着および菌体内への DNA 注入は完了した。注入された標識ファージは菌内で拡散し、菌全体から蛍光が発せられるようになった(図3)。

通常、細菌の蛍光標識技術といえば、直接蛍光試薬を投与する直接染色法や、抗体を用いて特異的標識を行う抗体法が知られているが、いずれの方法も染色に 10~30 分を要し、迅速性という点で、標識ファージを用いる本法は優れている。

一方、検出原理で述べたように、大腸菌に対するファージ T4 の DNA 注入は菌の生理活性に左右される。上の実験で用いた対数増殖期の菌は非常に生理活性が高く、このことが速くて効率の良い感染と蛍光標識導入を可能にしている。

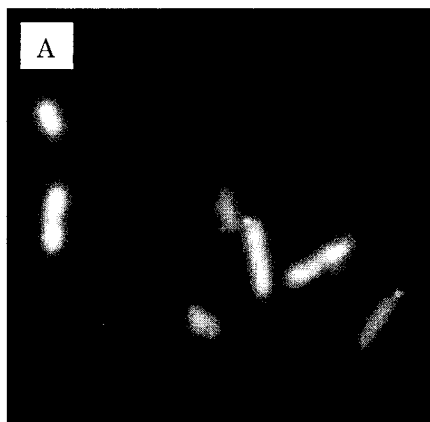


図3. ファージ T4 が DNA を注入した大腸菌

逆に、生理活性が低下した大腸菌に対するファージ T4 の感染性を検証する必要がある。なぜなら、実際に検出すべき菌は、必ずしも培養された菌のように生理活性が高くないからである。例えば、河川水や湖沼水中の大腸菌数評価は重要な応用と思われるが、通常、それら環境水は貧栄養である。したがって、そこに存在する大腸菌は培養液中の菌のように十分な栄養を得ることがなく、生理活性の低い状態にある。

十分な栄養を得ることがなく、生理活性の低い状態にある。

そこで、模擬的に菌の活性を低下させ、ファージ T4 の感染状況を観察することとした。大腸菌培養液を4℃まで冷却し、そこにファージ T4 を混合した。挟雑物の除去のため、この試料を4℃に保ったまま遠心分離で集菌し、生理食塩水で分散させた。その後、生理活性の再現を防ぐため、ホルムアルデヒドを添加し、生理活性を停止させた。この試料を蛍光顕微鏡で観察したところ、小さな蛍光輝点が観察された(図4)。これらは大腸菌に吸着したが、DNA を菌内に注入しなかったファージである。ファージが吸着しただけの大腸菌は DNA が菌体内に注入された菌と比較して蛍光強度が弱い。この結果は、生理活性が低い菌の検出が難しいことを示唆している。しかし、多くの大腸菌は栄養状態が良くなると活性を回復するため、糞便性汚染を適切に把握するには、こうした潜在的な菌も検出する必要がある。

別に行った検討の結果、潜在的な菌も、所定時間、十分な栄養を与えることで活性化が可能であり、それによってファージの感染性が向上し、検出が可能となることを確認している。

3. 2 ファージ感染の特異性検証

前節に示したように、大腸菌に対するファージ T4 の感染は非常に迅速かつシンプルである。この感染作用を大腸菌の計測に応用する際、ファージT4感染の特異性は非常に重要なポイントである。そこで、ファージ T4 にとって非宿主細菌である *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* を選び、それぞれについて数種類の株を用いて感染の特異性検証実験を行った。ちなみに、これらの細菌は全て大腸菌群に含まれる菌である。感染の有無は、蛍光顕微鏡観察によって評価した。

結果を右の表に示す。ファージ T4 の感染によって蛍光標識された菌は大腸菌(*Escherichia coli*)だけであり、それ以外の細菌に対してファージT4は吸着もしなかった。これにより、ファージ T4 の感染が大腸菌に対して非常に特異的であることを確認できた。

4. 自動検出装置による菌数定量

新技術の定量性を評価すべく、AO 標識ファージ T4 を大腸菌培養液に添加し自動検出装置によって測定した。装置から得られる信号をオシロスコープで観測したところ、個々の大腸菌から発せられる蛍光に由来するパルス状の信号が確認できた(図5)。装置はこのパルスの計数によって菌数を得る。バックグラウンドノイズとのシグナルノイズ比は3~4であり、適当なし

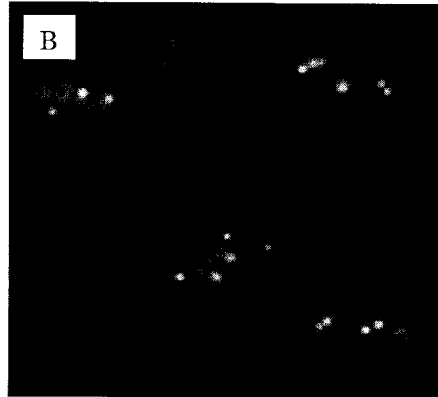


図 4. ファージ T4 が吸着しただけの大腸菌

表. ファージ T4 感染の特異性

Species	IFO No.	Phage infection
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3319	—
	3512	—
	12009	—
	13541	—
	14940	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	3320	—
	12935	—
	12937	—
	13535	—
	13536	—
<i>Citrobacter freundii</i>	12681	—
	13539	—
	13545	—
	13546	—
<i>Escherichia coli</i>	13540	+

+ : 感染して検出された。 - : 感染せず検出されなかった。

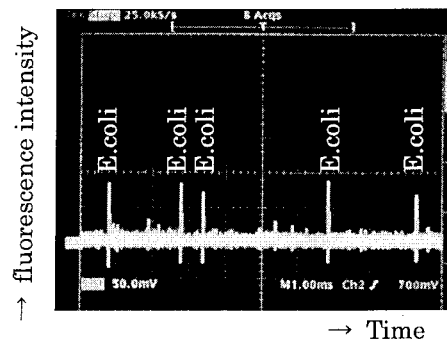


図 5. 個々の大腸菌に対応する蛍光信号

きい値を設けることにより、大腸菌のみを検出、計数できることを確認した。

続いて、自動検出装置と従来の計測方法との相関を比較、検討した(図6)。比較対象とした従来法は、nutrient broth 培地を用いる方法である。この方法では、生きた大腸菌は培地上に白色のコロニーを形成し、これを計数する。比較の結果、大腸菌濃度が $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^4$ 個/mL の範囲で相関係数 $r^2=0.99$ という好結果が得られた。これにより、実用上十分な精度で 10 個/mL 程度の低濃度領域から、大腸菌数の定量が可能であることが分かった。

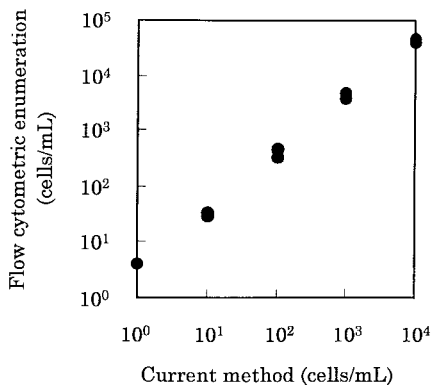


図 6. 自動検出装置の出力と従来法との比較

河川や湖沼といった水環境中にある大腸菌を計測する場合は、元々サンプルに含まれている蛍光性微粒子が大腸菌計測を妨害する。蛍光性微粒子とは、例えば洗剤の凝集物や染料の凝集物、藻類などである。そうした蛍光性微粒子の数は、試料の状況によって数百から数千個にのぼる。こうした挟雑物の多い条件下で誤認を防いで正しい測定を行うには、以下のような方策が必要である。これらによって理論的には大腸菌の検出が可能であり、現在検討中である。

- ・ファージ感染による標識と他種色素による直接染色とを併用し、大腸菌の蛍光を多色化する。
- ・散乱光から得られる情報を加味することで、大腸菌とその他の粒子を識別する。
- ・環境中に存在する粒子とは光学特性が異なる蛍光試薬によってファージT4のDNAを標識する。

5. 結論

・蛍光標識したバクテリオファージT4を利用して、生きた大腸菌のみを 30 分以内の短時間で定量する技術を確認した。

- ・大腸菌の定量に関して新開発の自動計測装置と従来法とを比較した結果、それらは大腸菌濃度 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^4$ 個/mL の範囲で非常に良く相関(相関係数 $r^2=0.99$)していた。
- ・近い将来、この技術が水環境の糞便性汚染管理に応用されることを期待している。

参考文献

- 1) Fewtrell, L., Kay, D., Wyer, M., Godfree A. and O'Neill, G. : Microbiological quality of bottled water. *Wat. Sci. Tech.*, 35(11), 47-53 (1997)
- 2) Eisenberg, J. E., Seto, E. Y. W., Colford Jr, J. M., Olivieri, A. and Spear R. C. : An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. *Epidemiology*, 9, 255-263 (1998)
- 3) 金子光美 : 原虫類やその他の病原性微生物の検出とその除去技術. 用水と廃水, 40(4), 322-336 (1998)
- 4) 平田強 : 微生物汚染指標. 水質衛生学, 技報堂出版, 金子光美編, 468-489 (1997)
- 5) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th edn, American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington DC, USA, pp. 9-44, 9-64 (1995)
- 6) Mayer, C. L. and Palmer, C. J. : Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6), 2081-2085 (1996)
- 7) Joux, F. and LeBaron, P. : Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9), 3643-3647 (1997)
- 8) Nogami, T., Ohto, T., Kawaguchi, O., Zaitzu, Y. and Sasaki, S.. Estimation of bacterial contamination in ultrapure water: application of the anti-DNA antibody. *Anal. Chem.*, 70(24), 5296-5301 (1998)
- 9) Goldberg, E., Grinius, L. and Letellier, L. : Recognition attachment, and injection. In: *Molecular Biology of Bacteriophage T4*, J. D.Karam (ed.), ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 347-356 (1994)
- 10) Labedan, B. and Goldberg, E. B. : Requirement for membrane potential in injection of phage T4 DNA. *Microbiology*, 76(9), 4669-4673. (1979).
- 11) Tanaka, Y., Yoshimitsu, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. : Occurrence of *Escherichia coli* O157: H7 in river water determined by flow cytometry. *Microbes and Environments*, 13(2), 77-83 (1998)

