

平成 26 年度経済産業省委託

平成 26 年度化学物質安全対策「生分解性評価の合理化に向けた
活性汚泥の呼吸活性阻害の簡易計測システムの調査研究」

調査報告書

平成 27 年 3 月

静岡大学大学院 工学研究科

調査課題名：生分解性評価の合理化に向けた活性汚泥の呼吸活性阻害の簡易計測システムの調査研究

研究代表者：金原 和秀

職名：教授

所属：静岡大学大学院 工学研究科

所属機関住所：〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

調査体制：

金原和秀（調査代表者）：活性汚泥定着条件の検討

木村元彦（調査分担者、静岡大学大学院 工学研究科 教授）
：蛍光計測装置の設計・作製

新谷政己（調査分担者、静岡大学大学院 工学研究科 准教授）
：蛍光色素の選定・蛍光計測システムによる定量性の評価

1. はじめに

化学物質管理において、生分解性の評価は重要な指標の一つである。現状では、OECD テストガイドライン 301C に基づく活性汚泥を用いた試験を行い、生物化学的酸素要求量 (BOD) を指標として生分解性の評価を行っているが、以下の 2 点に問題があることが指摘されている。①使用する汚泥の性状が一定せず、生分解性のデータがばらつく。②汚泥中の微生物の呼吸活性が 301C の規定する被験物質濃度 100 mg/L で阻害を受ける場合、当該物質は生分解されない物質として評価されてしまう。そこで、本調査研究では上記の問題点うち、②に焦点を絞り調査研究を行う。

現在、新規化学物質は多種多様になっており、複雑かつ特殊な構造になる傾向にある。その中には、活性汚泥中の微生物の呼吸活性を阻害する物質も含まれ、これらの物質の生分解性評価に関しては、301C の適用の可否も含めて今後検討が必要である。そこで、化学物質管理において、生分解性を評価する際に、当該物質濃度と呼吸活性の阻害との相関性を評価し、現状の 301C では生分解性を評価できない物質を、迅速に調査する手法を開発することを目的として本調査研究を行う。

調査者はこれまでの研究で、感染症に関与する微生物バイオフィルムの形成を阻害する化合物とその適用濃度について、効率的にスクリーニング可能なデバイスを開発している。本調査研究では、そのデバイスと検出システムを改良し、化学物質が活性汚泥の呼吸活性に与える影響を計測する簡易検出システムの開発を行う。

将来的には、被験物質濃度を低く設定している他の 301 試験法の適応を検討し、評価の合理化に資するため、被験物質の濃度によって微生物の呼吸活性阻害が生じるかどうか調べるとともに、当該物質の生分解性を評価するのに適した濃度を簡便かつ迅速に決定する検出システムの開発を目的としている。また、本調査研究で開発する検出デバイスは、物質の生物影響全般に対応するものであり、供給する基質を水溶性の混合物や水溶性高分子化合物などにすることも可能である。また、扱う細胞も活性汚泥などの微生物集合体だけではなく、動物細胞を用いることも原理的には可能であるなど、他の化学物質管理分野の検定法としても展開可能である。

2. 方法

2. 1 装置の設計製作

2. 1. 1 2チャンネル流通型汎用蛍光リアルタイム計測装置

【測定原理】

装置の構成図を図 2-1 に示す。図 2-2 に GFP の吸収・蛍光スペクトルを示す。また、図 2-3 に、ヨウ化プロピジウム (以下 PI と略す) の吸収・蛍光スペクトルを示す。GFP の最大励起波長は 489nm、最大蛍光波長は 508nm である。PI の最大励起波長は 530nm、最大蛍光波長は 615nm である。サンプルの蛍光のみを測定するためには、励起光は計測する蛍光波長よりも短波長の光を十分に減衰させる必要がある。そこで、励起光用の長波長カットフィルターと蛍光用の短波長カットフィルターを組み合わせる必要がある。

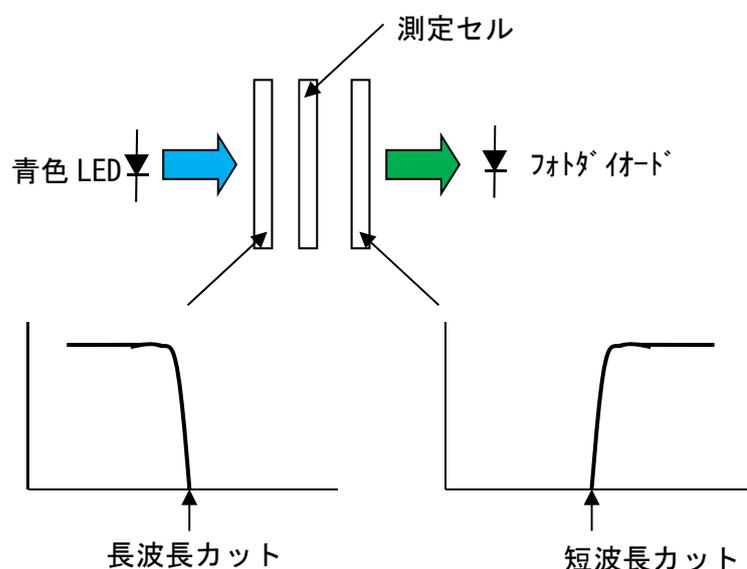


図 2-1 測定原理

本装置において GFP および PI に対するフィルターのカット波長は次のとおりである。測定する蛍光色素に対応して、適切なフィルターを使用する必要がある。

	GFP	PI
(上側) 短波長カットフィルター	490nm	590nm
(下側) 長波長カットフィルター	470nm	550nm

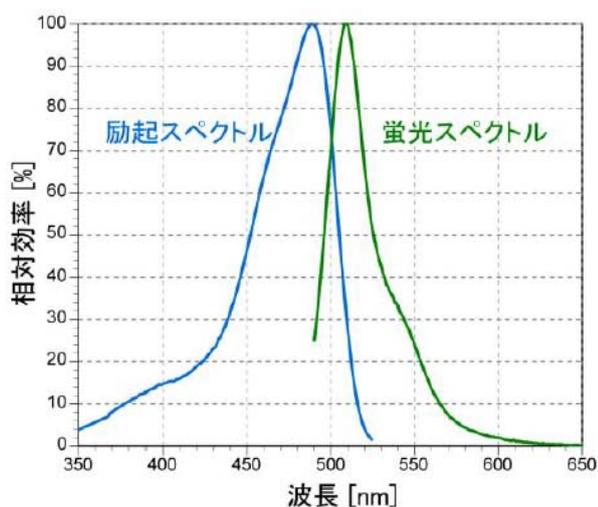


図 2-2 GFP の励起・蛍光スペクトル

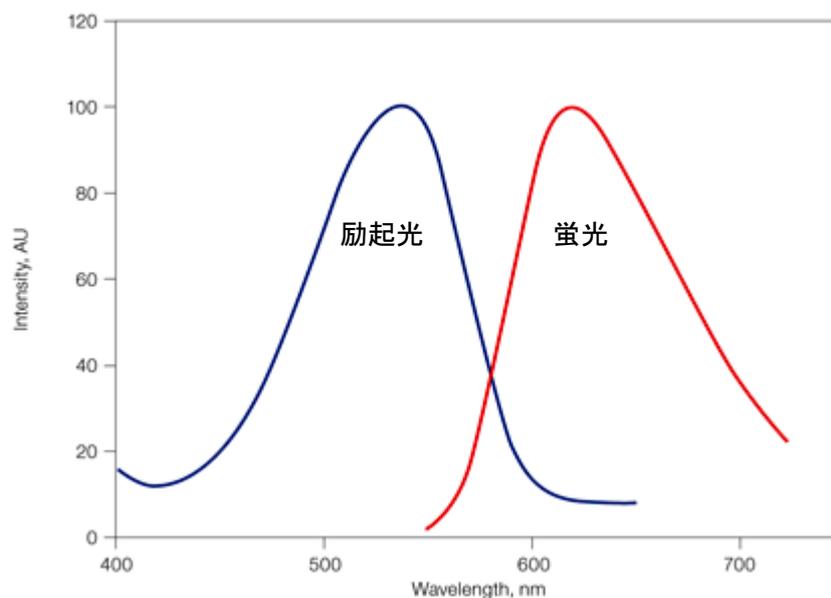


図 2-3 PI の励起・蛍光スペクトル

本装置では、励起光として 460nm にピークを有する青色 LED を使用している。GFP においては、十分な強度の励起光が得られるが、PI に対しては励起光強度が不足する可能性がある。その際には、LED の動作電流を高める必要がある。あるいは、緑色 LED と交換することも有効であると考えられる。

励起光源は、中心波長 460nm の青色 LED を使用している (図 2-4)。LED から発せられた光は、長波長カットフィルター (図 2-5, 2-7) を通過することによって、カット波長よりも波長の短いスペクトルのみが測定試料溶液中に照射される。試料から発せられた蛍光は、短波長カットフィルター (図 2-6, 2-8) を通過し、カット波長よりも波長の長いスペクトルのみがフォトダイオードに入光する。

約 70nA/lx の感度を持つフォトダイオードによって検出された光電流は、 10^7 倍の係数で I-V 変換され電圧信号になり、その後段のアンプによってさらに 10 倍に増幅される。すなわち、出力信号感度は、 7V/lx となる。1 lx は月あかり程度の明るさに相当する。本装置は、0.01 lx 程度の光を検出することができる。なお、本装置の最大出力信号電圧は 12V である。

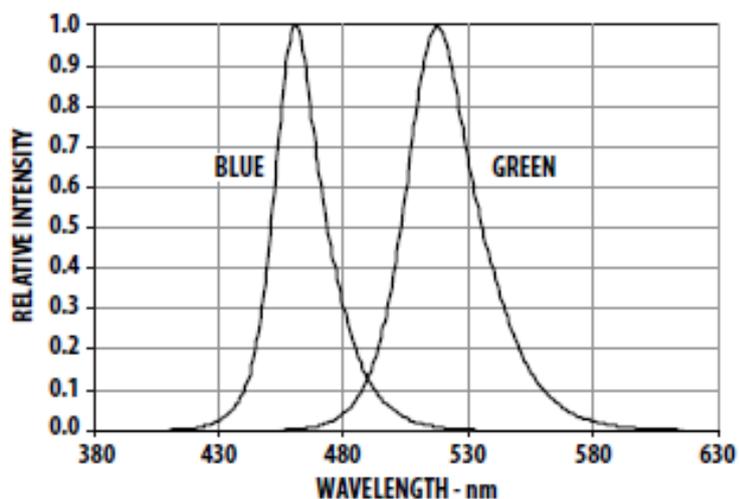


図 2-4 青色 LED HLMP-CB3B-UV0DD 発光波長特性 (BLUE)

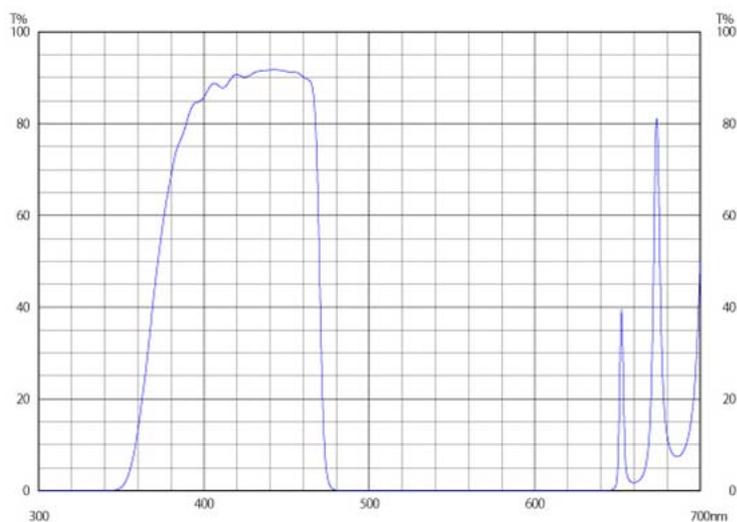


図 2-5 SV0470(朝日分光) 470nm 長波長カットフィルター特性

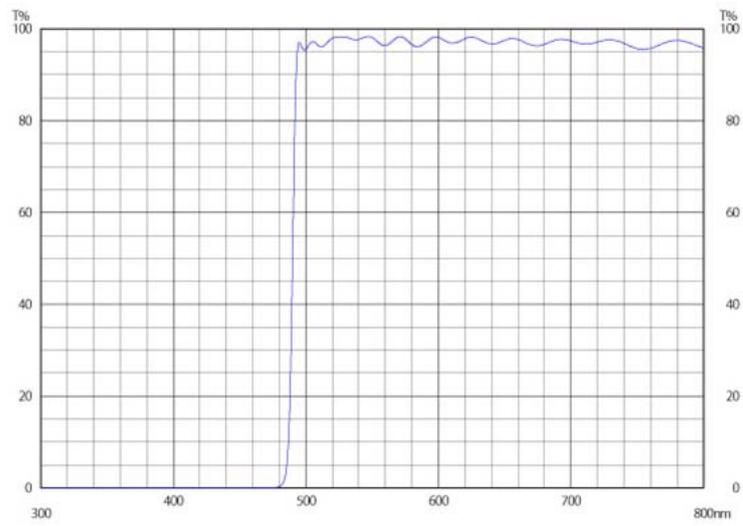


図 2-6 LV0490 (朝日分光) 490nm 短波長カットフィルター特性

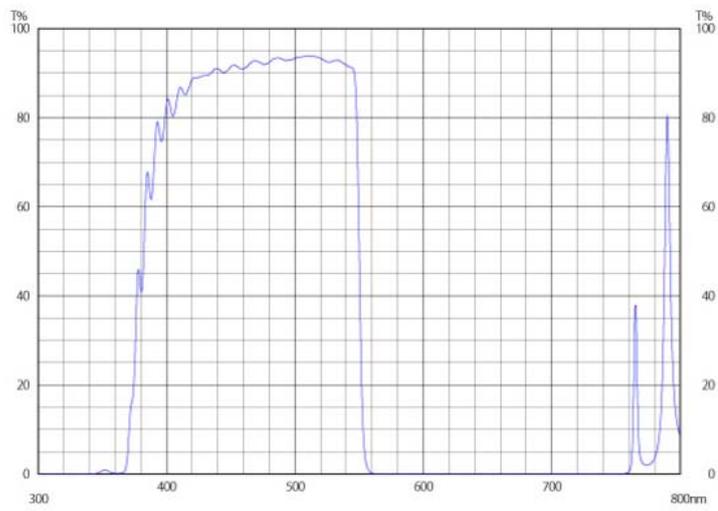


図 2-7 SV0550 (朝日分光) 550nm 長波長カットフィルター特性

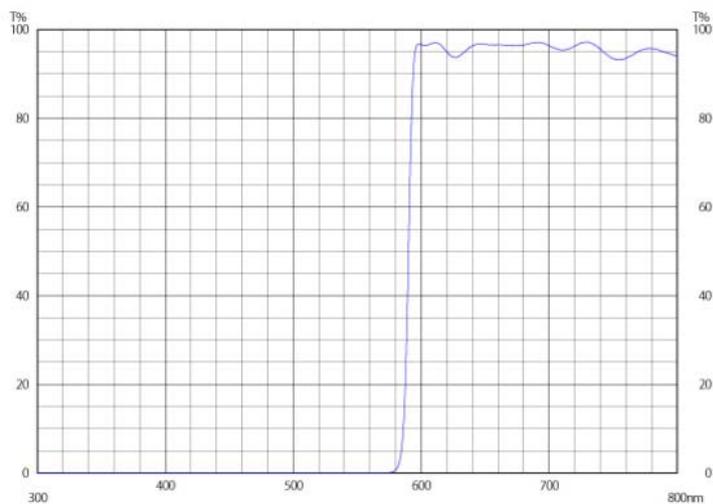


図 2-8 LV0590 (朝日分光) 590nm 短波長カットフィルター特性

GFP および PI 以外の蛍光試料を使用する場合には、朝日分光(株)から適切なカットフィルターを購入して使用する必要がある。大きさは、50mm×50mm×1mm である。

< 参考資料 >

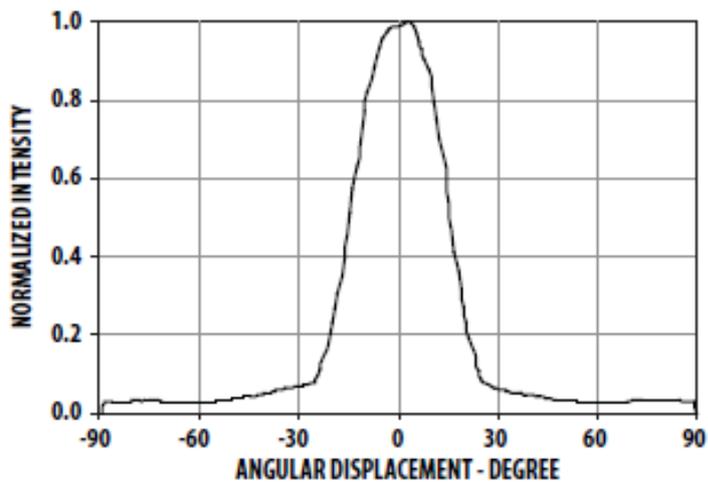


図 2-9 青色 LED HLMP-CB3B-UVODD 指向性

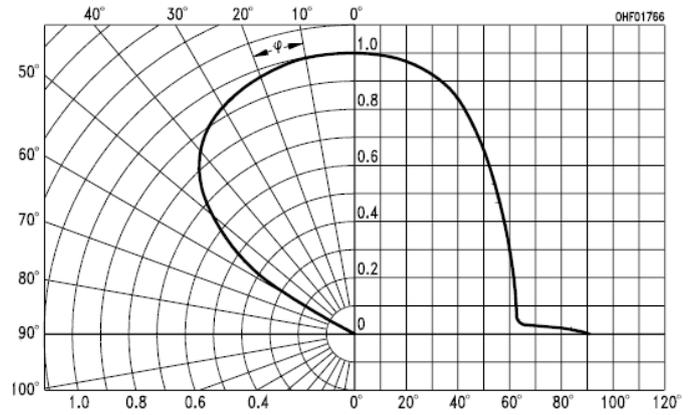
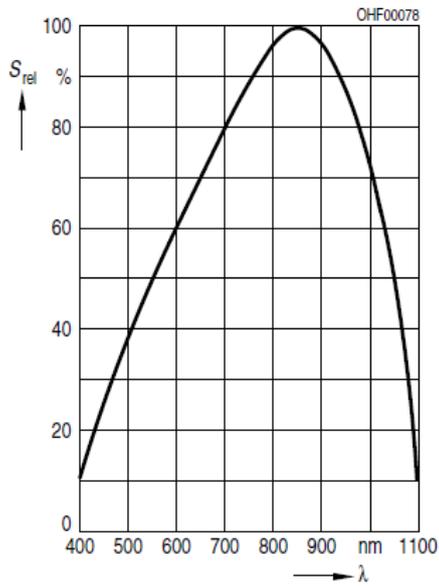


図 2-10 フォトダイオード BPX-61 特性

【回路図】 1 ch 分のみ

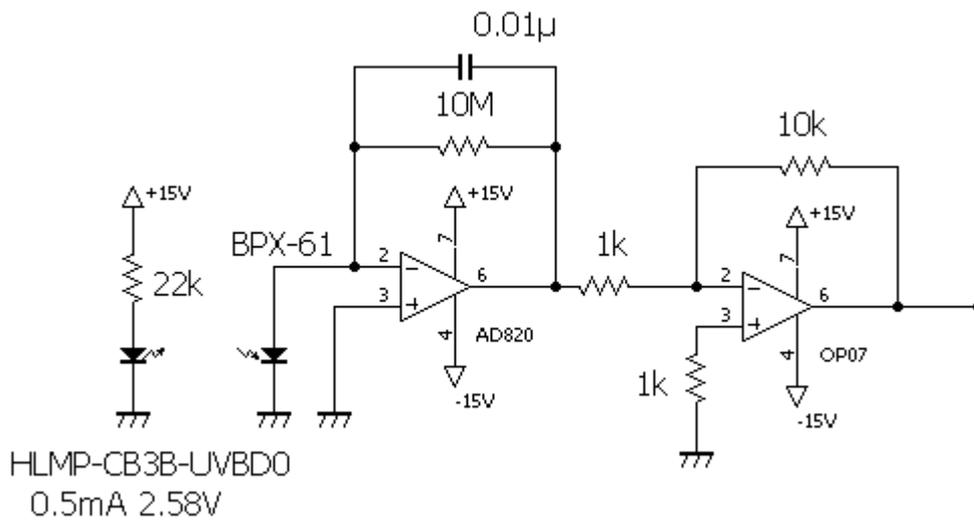


図 2-11 回路図

【出力端子】

測定セルの流路と出力信号端子との関係を下図に示す。

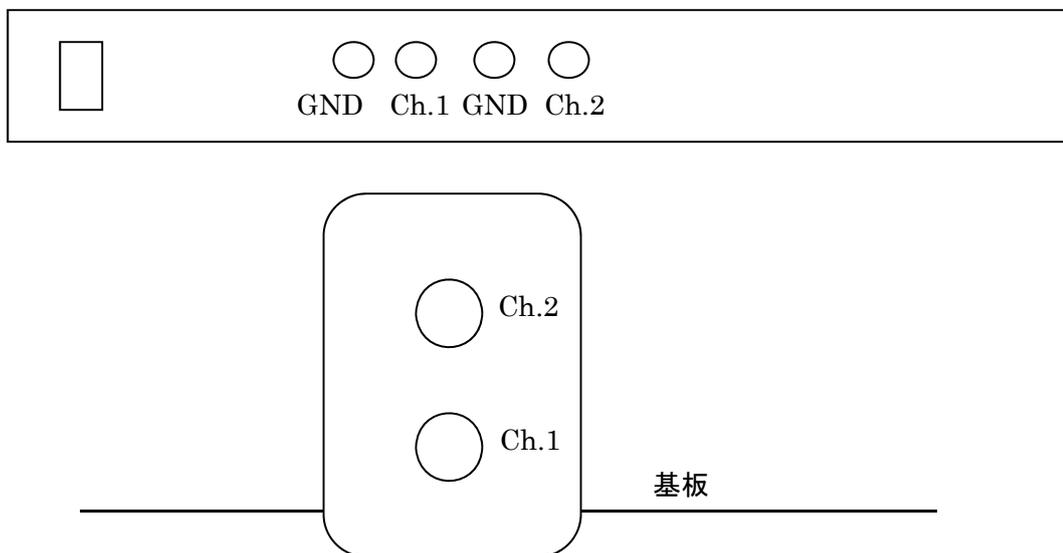


図 2-12 測定流路と出力端子との関係

【測定セルの設計】

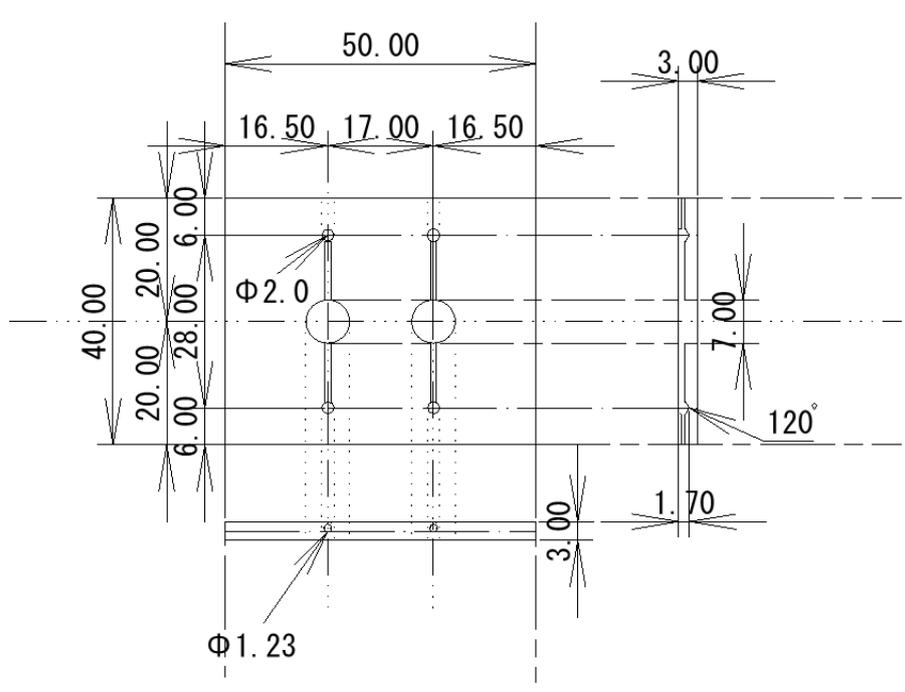


図 2-13 測定用セル (GFP, PI 用)

【測定方法】

(1) ケースのフタを開け、短波長カットフィルターを上側基板下部のガイドに沿ってはめ込む。また、長波長カットフィルターを下側基板上部の溝にはめ込む。次に、測定セルを長波長カットフィルターの上に静かに設置してガイドの溝に固定する。このとき、長波長カットフィルターを傷付けないように注意する。流通セルをカットフィルターの上に静かに乗せるようにする。(カットフィルターの上で滑らせないように注意する。)

(2) 図 2-14 に示すように、ケース両側の流路貫通孔を使用して流路を設置する。このとき、外部から光が入らないように流路を遮光する必要がある。

(3) ケースのフタを閉じ、ケース内部に外部から光が入らないようにして計測を開始する。

(4) 増幅された信号がケースの出力端子に出力される。出力端子は短絡しないよう注意する。

(5) LabVIEW (日本ナショナルインスツルメンツ株式会社製) のソフトウェアを実行することによって、2チャンネルのリアルタイム計測ができる。本装置の応答速度は、0.1秒(10Hz)である。商用電源周波数のノイズ対策のために10Hzとしているが、改造によって100kHz程度まで高速化することが可能である。DAQのAD変換速度が不足する場合、より高速のDAQが必要である。

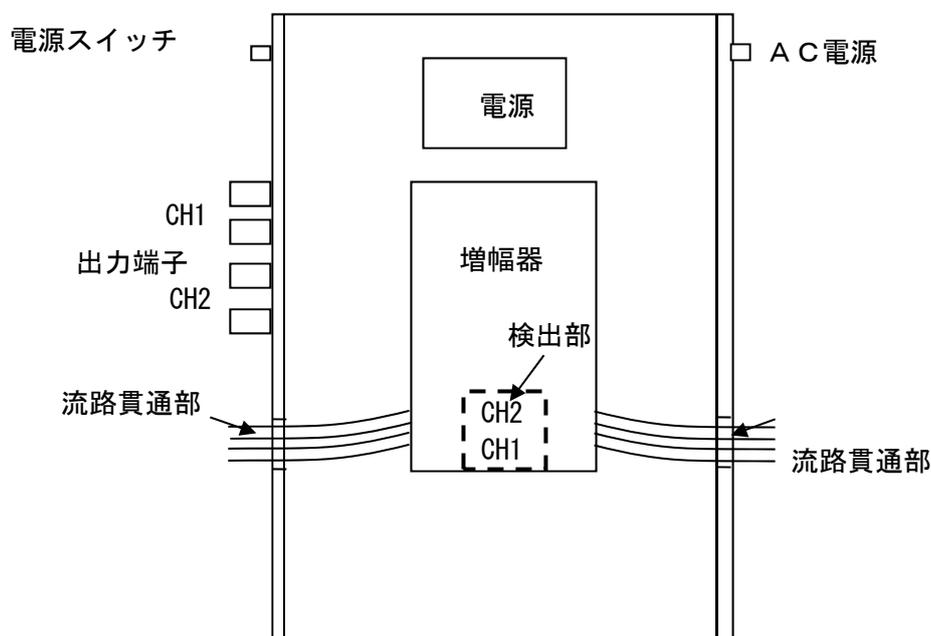
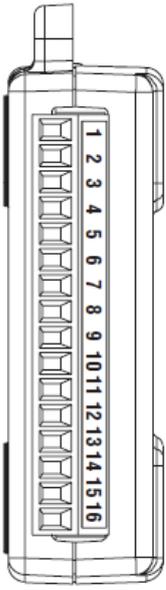


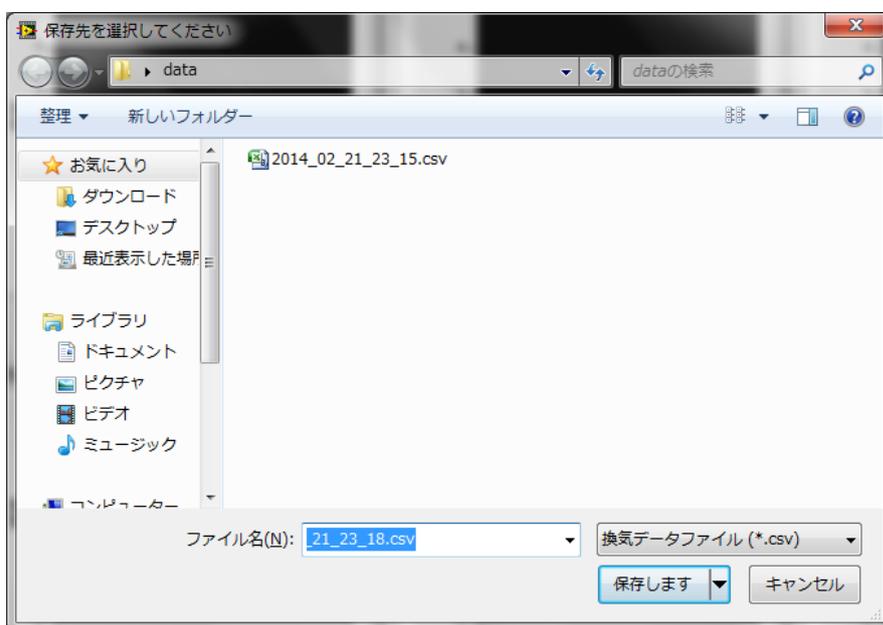
図 2-14 流路をケース外に導く方法

【 LabVIEW による 2 チャンネルデータ表示・記録装置 】

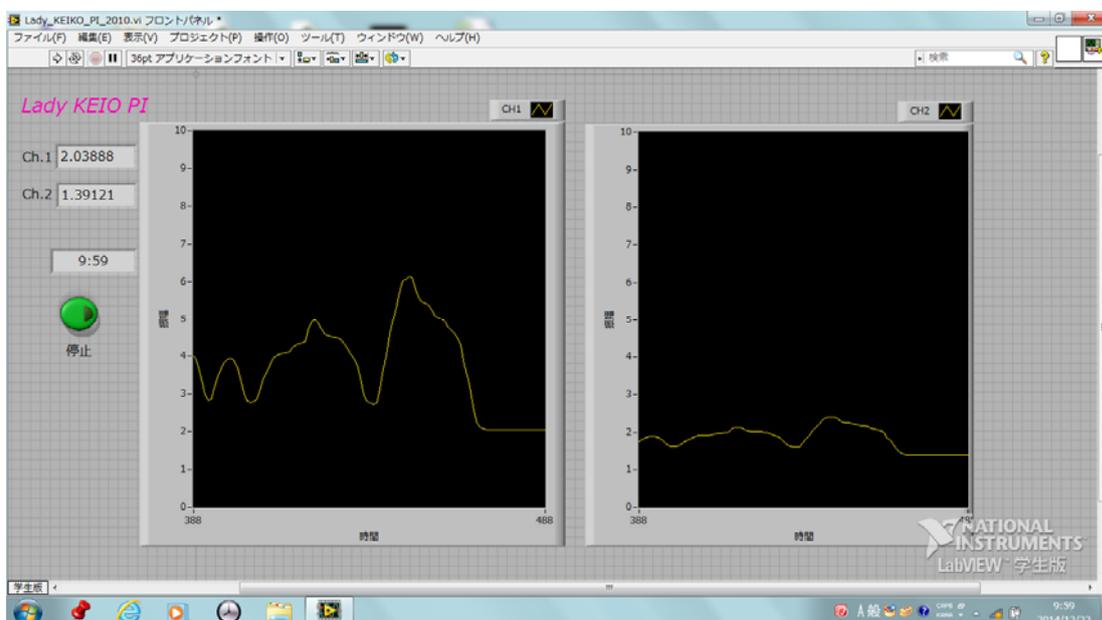
DAQ USB6008 または USB6009 の入力端子 AI0, AI1, GND と本体とを接続する。
DAQ の AD 変換分解能は、USB6008 は 12bit であり、USB6009 は 14bit である。

モジュール	端子	信号、 シングルエンドモード
	1	GND
	2	AI 0
	3	AI 4
	4	GND
	5	AI 1
	6	AI 5
	7	GND
	8	AI 2
	9	AI 6
	10	GND
	11	AI 3
	12	AI 7
	13	GND
	14	AO 0
	15	AO 1
	16	GND

LabVIEW のプログラム “Lady_KEIKO PI” を実行すると次の window が表示される。

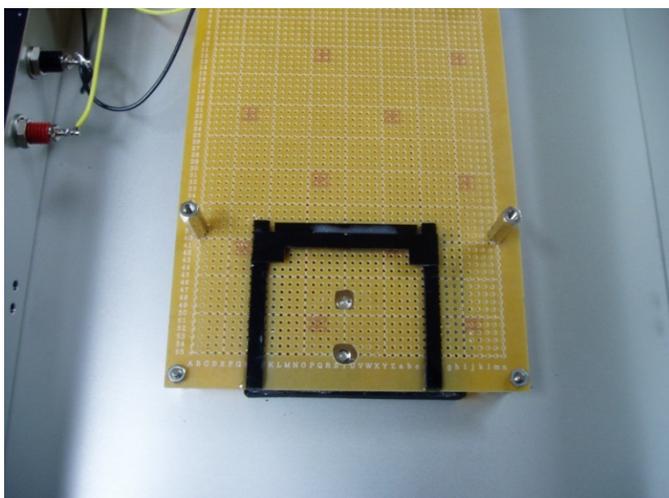


データを保存したいフォルダー等とファイル名を指定し、「保存します」をクリックする。毎秒 10 点のデータが計測され、csv 形式でファイルに保存される。データのレコード形式は、時刻 (秒), Ch1, Ch2 である。

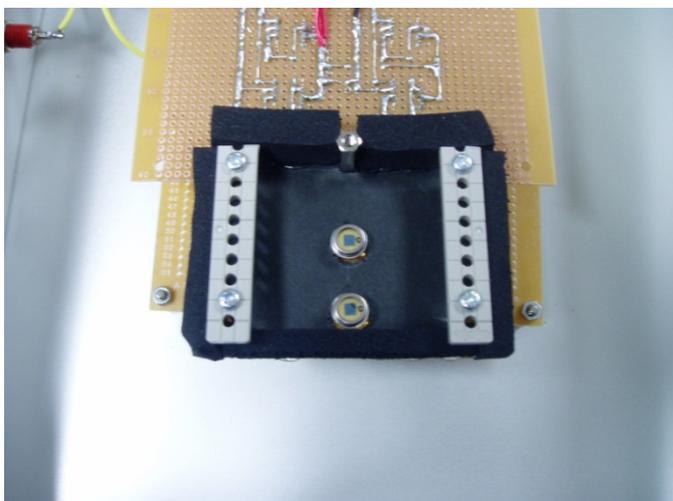


LabVIEW のソースファイルを適宜修正して使用する。

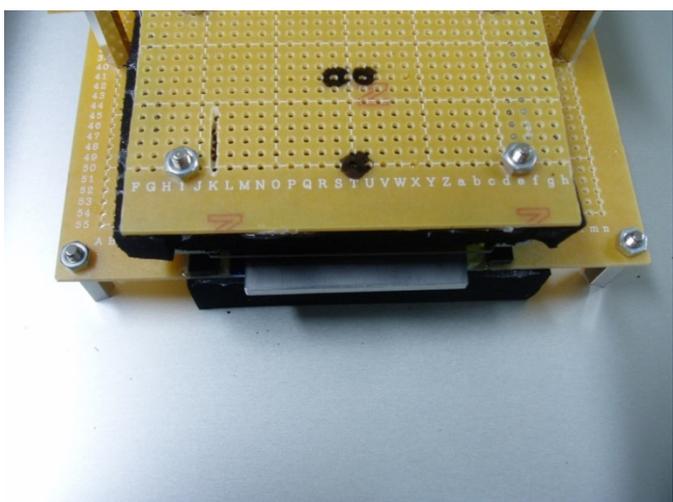
【参考資料】



励起光源



フォトダイオード



フィルターとセルをセットした状態

2. 1. 2 2チャンネル流通型発光リアルタイム計測装置

【測定原理】

装置の構成図を図 2-15 に示す。測定セルの測定窓から発した微弱光を、フォトンカウンティングヘッド(浜松ホトニクス H10682-210) (光電子増倍管とパルス検出回路、高圧電源回路を組み合わせたもの) によって検出する。フォトンカウンティングヘッドから出力される信号は、光子 1 個あたり 10ns のパルス信号として出力される。日本ナショナルインスツルメンツ株式会社製の LabVIEW 用 DAQ である USB6008 のカウンター機能を利用するために、フォトンカウンティングヘッドからの 10ns のパルス幅を 100ns に拡大している。(USB6008 の検出最小パルス幅は 100ns である) DAQ のカウンターで計測されたパルス数を LabVIEW によってパソコン画面上に表示すると同時に CSV 形式のファイルとして記録する。

パルス幅拡大回路を使用しているために、100ns の間に 2 つ以上の光子がセンサーに入った場合にはカウントされない。したがって、本装置でカウントされる光子数は、100ns の分解能での光子数の相対数である。

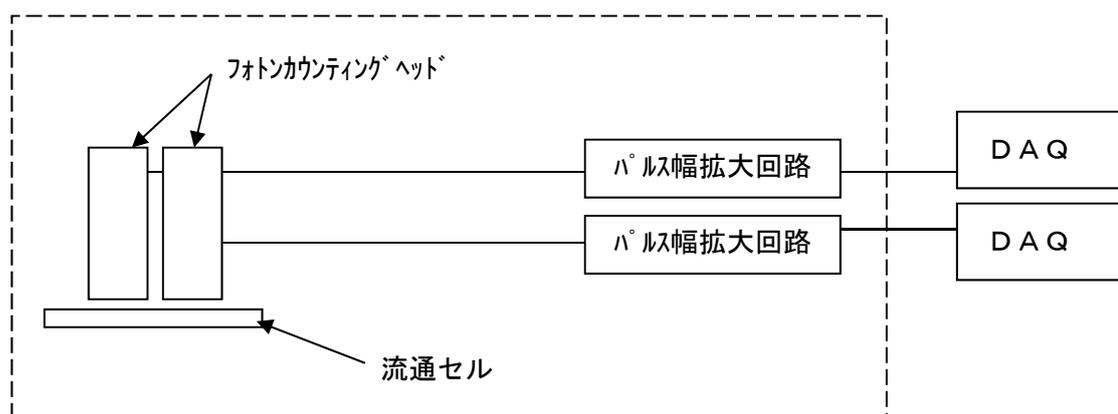


図 2-15 測定原理

図 2-16 に、フォトンカウンティングヘッドのカウント特性を示す。フォトンカウンティングヘッドは毎秒 1×10^7 個の光子までの範囲でリニアな特性を持っている。本装置では、パルス幅拡大回路によってパルス幅を約 10 倍としているため、リニアな範囲は、毎秒 1×10^6 個の光子までの範囲となる。

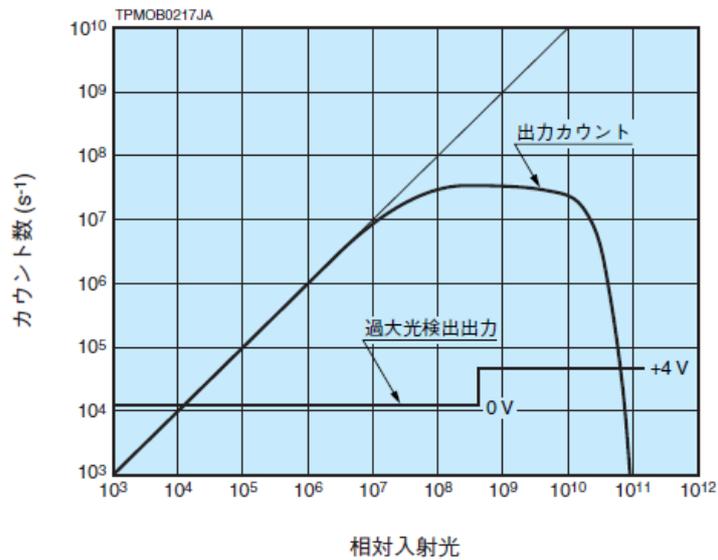


図 2-16 フォトンカウンティングヘッドのカウント特性

DAQ によるカウント数は、0.1 秒あたり約 220000 カウントまでカウントされるが、リニアな範囲は、0.1 秒あたり 100000 (1×10^5) までである。1 秒あたりでは 1×10^6 カウントまでである。

【測定セルの設計】

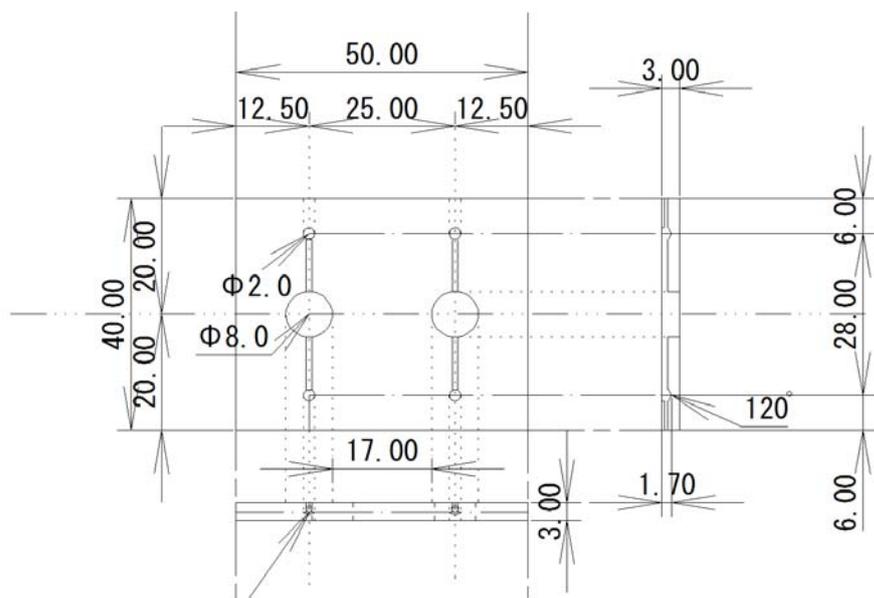


図 2-17 測定用セル（ルシフェラーゼ発光用）

【測定方法】

(1) 本体に電源が供給されていないことを確認してからケースのフタを開け、流通型測定セルをフotonカウンティングヘッドの下の空間に固定する。このとき、流路用デバイスが丁度はまる溝が加工してあるので、流路デバイスを奥まで挿入して溝に合わせる。溝に挿入することによって、光軸が合うように設計されている。また、流路デバイスを挿入する際に、フotonカウンティングヘッドの受光面に流路デバイスが触れないようにする。

(2) 流路を使用する場合には、図 2-18 に示すように、ケースのふたの両側にある直径 3.5mm の 2 組の流路貫通部を使用する。このとき、外部から光が入らないようにケースの外から遮光する必要がある。また、流路から光が入らないように接続部分を改良する。

(3) ケースのフタを閉じ、ケース内部に外部から光が入らないようにして計測を開始する。なお、完全な遮光のために、本装置を暗室内に設置して使用することが望ましい。

(4) 検出信号は、ケースの出力端子に出力される。出力端子は短絡しないように注意する。

(5) LabVIEW のソフトウェア”Lady MITSUKO”を実行することによって、2 チャンネルのリアルタイム計測ができる。本装置の計測間隔は、0.1 秒 (10Hz) である。

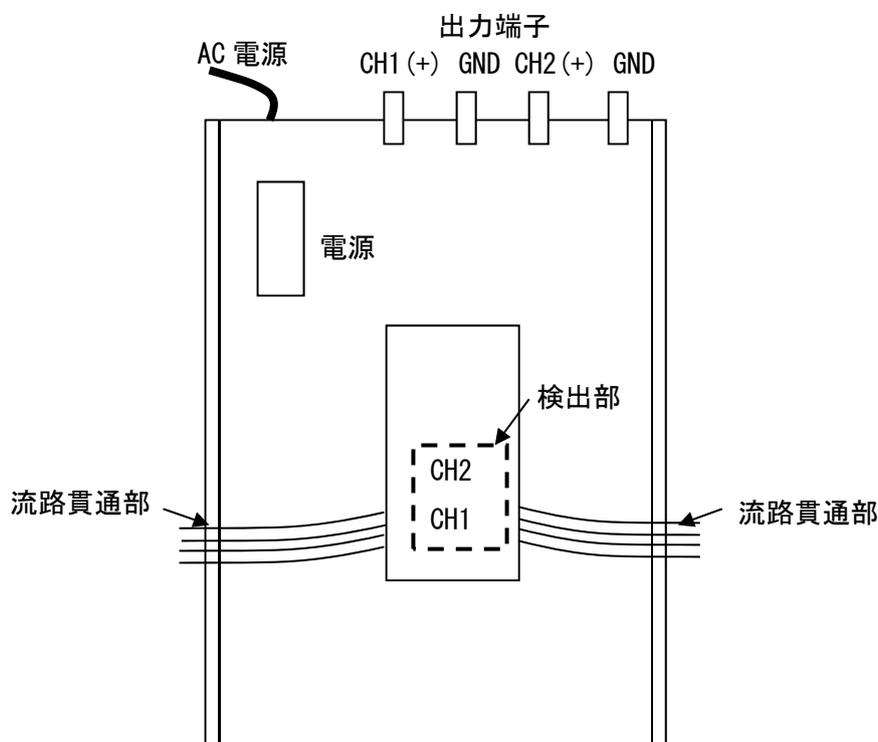
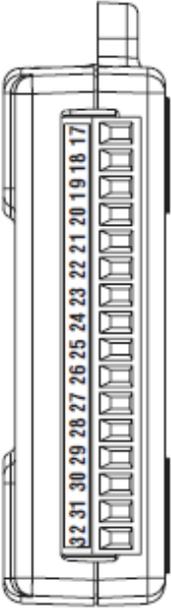


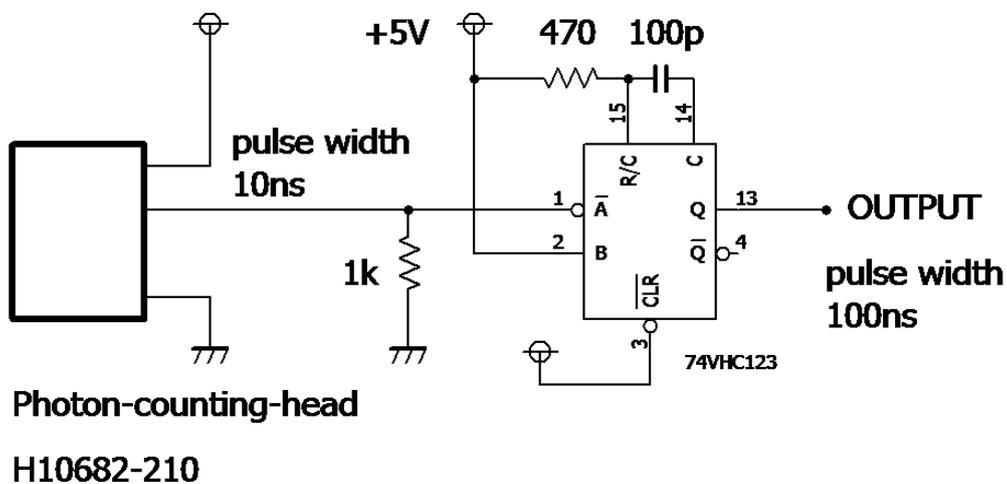
図 2-18 流路をケース外に導く方法

【 LabVIEW による 2 チャンネルデータ表示・記録装置 】

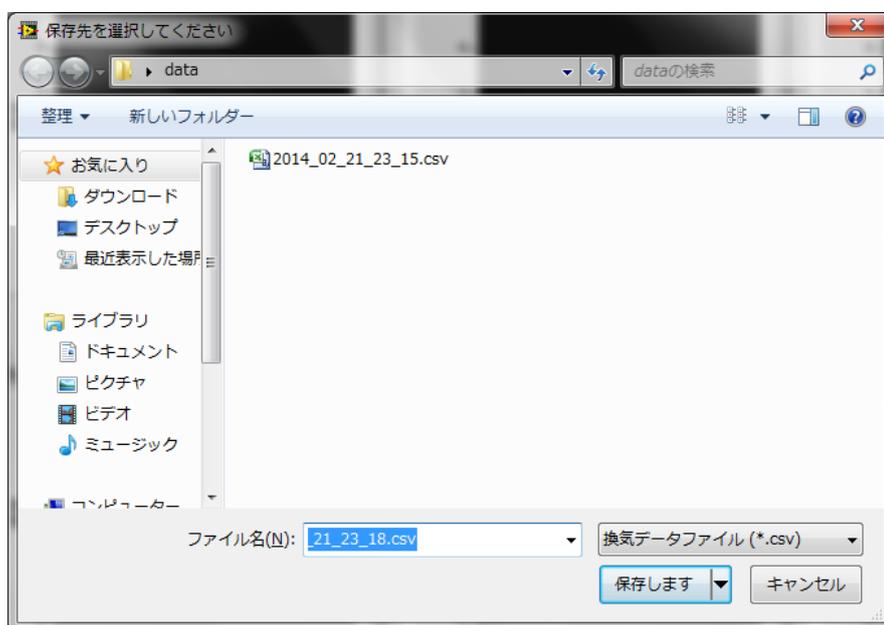
DAQ USB6008 または USB6009 の入力端子 PFI0(29 番), GND(32 番)と本装置とを接続する。DAQ は 2 台必要である。

モジュール	端子	信号
	17	P0.0
	18	P0.1
	19	P0.2
	20	P0.3
	21	P0.4
	22	P0.5
	23	P0.6
	24	P0.7
	25	P1.0
	26	P1.1
	27	P1.2
	28	P1.3
	29	PFI0
	30	+2.5 V
	31	+5 V
	32	GND

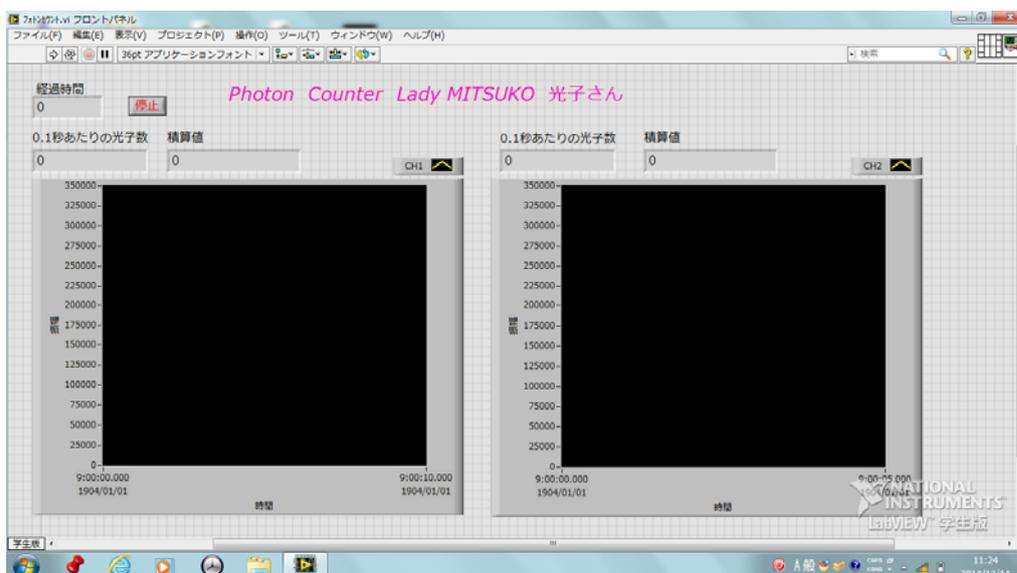
本装置では 2 台の DAQ を使用するため、最初に使用する前に、DAQ デバイス名の設定 (Div1, Div2) を実施する。別の DAQ を 1 度でも使用した場合には、再度デバイス名の設定が必要となる場合がある。



LabVIEW のプログラム “Lady_MITSUKO” を実行すると次の window が表示される。



データを保存したいフォルダー等とファイル名を指定し、「保存します」をクリックする。毎秒 10 点のデータが計測され、csv 形式でファイルに保存される。データのレコード形式は、時刻 (秒), Ch1, Ch2 である。なお、光子数の積算値はファイルには保存されない。



必要に応じて LabVIEW のソースファイルを適宜修正して使用する。

2. 2 使用菌株と方法

2. 2. 1 大腸菌 GFP 挿入株の作製

緑色蛍光タンパク質 GFP 由来の蛍光を指標として、大腸菌の生理変化を測定するため、*Pseudomonas putida* SMDBS pBp136 GFP 挿入株を GFP 供与菌として用い、大腸菌 DH5 α 株への GFP 遺伝子の挿入を行った。ディープフリーザー (-80 $^{\circ}$ C) 内に保管してある両菌株のグリセロールストックを解凍し、DH5 α 株は LB 固体培地に塗布、SMDBS pBp136 GFP 挿入株はカナマイシン (以下 Km) 100 mg/L 入りの LB 固体培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C、12 時間後培養した。生じた 1 コロニーを、DH5 α 株は 5 mL の LB 培地に、SMDBS pBp136 GFP 挿入株は 100 mg/L Km を添加した 5 mL の LB 培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C、12 時間振とうした。増殖した菌液をそれぞれ 500 μ L ずつ採取し、オートクレーブ済みの 1.5mL エッペンドルフチューブ内に入れ、37 $^{\circ}$ C、12 時間インキュベートして接合伝達を行った。インキュベートしたサンプルを 100 mg/L の Km を添加した LB 固体培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C、24 時間インキュベートした。ダークリーダーで発光が認められたコロニーを単離し、大腸菌 DH5 α GFP 挿入株とした。

2. 2. 2 96 穴タイタープレートを用いた GFP 蛍光波長の測定

大腸菌 DH5 α GFP 挿入株を増殖させ、抗生物質であるゲンタマイシン (Gm) を添加してタンパク質の合成を阻害し、GFP 蛍光に与える影響を調べた。当初は 24 穴タイタープレートで調査を計画したが、検体数を増やすため 96 穴のタイタープレートを使用することにした。96 穴タイタープレートに調製した GFP 挿入株の試料を、プレートリーダーを用いて蛍光強度の経時的変化を測定した。なお、Gm は以下のように調製した。Gm 100 mg を miliQ 1mL に溶解させたものを 1 mL シリンジ (テルモ) に入れ、0.22 μ m フィルター (ミリポア) にて濾過滅菌した。

大腸菌 DH5 α 株ならびに、その GFP 挿入株を 12 時間液体培養した。それぞれの培養液に 100 mg/L の Gm を添加したものと添加しないコントロールを用意し、200 μ L ずつ 96 穴タイタープレートに添加した。タイタープレートを 37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 時間後にプレートリーダーで蛍光強度を測定した。測定条件として、機器の励起光と GFP の蛍光波長が重ならないように、励起光の波長を 465nm、測定対象とする波長を 488nm~592nm の蛍光強度、もしくは GFP の蛍光波長である 507nm に近い 508nm での蛍光強度を測定した。

2. 2. 3 静止条件下での測定セルを用いた GFP 蛍光波長の測定と呼吸活性阻害の検出

大腸菌 DH5 α GFP 挿入株を 12 時間培養して用いた。測定セルのチャンネル 1 (Ch 1) に培養液 50 μ L を添加してコントロールとし、Ch2 に 100 mg/L の Gm を添加した培養液を 50 μ L 添加して影響評価用とした。37 $^{\circ}$ C で静置し、3, 6, 9, 12, 24 時間後の蛍

光強度の変化を、本調査で作製した 2 チャンネル流通型汎用蛍光リアルタイム計測装置を用いて測定した。なお、Gm は 2. 2. 2 で調整したものを培養液に対し 1/1000 添加し、終濃度を 100 mg/L とした。

次に、100 mg/L の 2-hydroxybiphenyl (2-OHBP) または 3-hydroxybiphenyl (3-OHBP) を大腸菌 MV1184 株に添加すると、呼吸活性を阻害して、生理活性を変化させるという当研究室の過去の知見を基に、以下の実験を行った。測定セルの Ch1 に菌液 48 μ L と DMSO 2 μ L を添加してコントロールとし、Ch 2 に菌液 50 mL に 2-OHBP 溶液 50 μ L を添加した溶液 50 μ L を入れ、投入直後と 37°C で 3 日静置した試料の蛍光強度の変化を、2 チャンネル流通型汎用蛍光リアルタイム計測装置を用いて測定した。なお、2-OHBP 溶液は以下のように調製したものをを用いた。 σ フェニルフェノール (2-OHBP 関東化学株式会社製) 100 mg を DMSO 1 mL に溶解させ、1 mL シリンジ (テルモ) に入れて 0.22 μ m フィルター (ミリポア) にて濾過滅菌した。調製した溶液を培養液に対し 1/1000 添加し、終濃度 100 mg/L として添加し、コントロールとの蛍光の強さを比較した。

2. 2. 4 GFP と PI 蛍光の同時計測による生細胞死細胞の蛍光波長の同時測定

GFP 蛍光発光と、死細胞に取り込まれて遺伝子にインターカレートするヨウ化プロピジウム (PI) の蛍光発光を計測して、生細胞と死細胞を同時に測定することを可能にするを目的として調査を行った。本調査では、菌体の細胞膜を溶解させることを目的として、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加した調査も行った。

LB 液体培地で 12 時間前培養した大腸菌 1 mL を 50 mL の LB 培地に入れ (2% seed)、① 3 時間培養したもの、② 2.5 時間培養後に 10% SDS を 3 mL 添加し、その後 0.5 時間振盪したものを用意し、それぞれ 10 倍ごとの希釈系列を作製して GFP と PI の蛍光強度を測定した。

上記で得られたサンプルの蛍光顕微鏡による観察を、以下に示した方法により行った。

培養したサンプルを 10 倍ごと ($10^1 \sim 10^3$) の希釈系列を作製した。希釈したサンプルに 0.75 mM PI 溶液を 5.5 μ L 量加え (終濃度 5 μ M)、30°C の暗所で 15 分静置し染色した。染色したサンプル 500 μ l を、濾過器を用いて、ポリカーボネート製黒色メンブレンフィルター (25 mm ϕ 、孔径: 0.2 μ m、K020N025A, ADVANTEC) 上に均等に分散させて捕集した。5 μ l の蛍光顕微鏡用 50% glycerol (PBS で希釈、Wako pure chemical) を滴下したスライドガラス上に、観察面が平らになるように glycerol を伸ばしながらフィルターを置いた。5 μ l の 50% glycerol を滴下したカバーガラスを、glycerol 付着面が下となるように、サンプルを捕集したメンブレンフィルター上に置き、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製、BX53) を用いて観察した。蛍光顕微鏡での観察は、対物レンズ 40 倍、DAPI 偏光フィルター (励起波長は 510-590 nm、蛍光波長 510 nm 以上)、減光フィルター (ND-25) を使用した。デジタルカメラ DP-70 での撮影条件は、

画質：1360×1024 pixels、ISO800 または 1600 に設定した。露出はサンプルの違いにより調節した。

2. 2. 5 ルシフェラーゼ発光の計測による ATP 依存呼吸活性の計測

【フォトダイオードによる計測の試み】

簡易な暗幕内にて、フォトダイオードとその電源部をオシロスコープに接続し、リン酸緩衝液（以下 PBS）で $1\sim 10^{-6}$ 倍まで 10 段階ごとに希釈した LB 培地で 12 時間培養した大腸菌及び、 $10^{-7}\sim 10^{-12}$ まで段階希釈した ATP 標準液（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール ATP 標準試薬セット）を作製した。

その後

- ① 試料 0.1 mL に 0.1 mL の ATP 発光試薬（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール HS セット）を投入し 10 秒以内に観察した
- ② 試料 0.1 mL に ATP 抽出試薬（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール HS セット）を添加し、ボルテックス等で数秒攪拌し、抽出試薬を加えてから 20 秒後に ATP 発光試薬を投入し 10 秒以内に観察した
- ③ 試料 1.0 mL に 0.1 mL の ATP 消去試薬を添加し、ボルテックスで攪拌した。その試料（計 1.1 mL）中から 0.1 mL をピペットマンで採取し、ほこりなどが入らないようにラップなどでかぶせ、30 分間室温で放置した。その後、試料 0.1 mL に ATP 抽出試薬（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール HS セット）を添加し、ボルテックス等で数秒攪拌し、抽出試薬を加えてから 20 秒後に ATP 発光試薬を投入し 10 秒以内に観察した。

2. 2. 6 2チャンネル流通型発光リアルタイム計測装置を用いたルシフェラーゼ発光による光子の検出と定量性の評価

【ATP 標準液を用いた計測装置の動作と ATP 消去剤の効果の検証】

ATP 消去剤をサンプルの調整に用いると、バックグラウンドが減少し、計測の正確さが増すことが報告されている。そこで、ATP 消去剤の添加が本装置を用いた計測に与える効果を調査した。

ATP 標準液を 10^{-7} から 10^{-12} M まで段階希釈し、①サンプルに対し 1/10 量の ATP 消去薬を添加し、攪拌後 30 分静置と②消去薬を加えてないもの 50 μ L に ATP 発光試薬 50 μ L を加え、ATP 消去薬の効果を検査した。

【大腸菌を用いた ATP によるルシフェラーゼ発光の検出】

本調査で設計製作した装置が、ルシフェラーゼ発光に由来する光子の計測が可能かどうか調査した。

大腸菌を 12 時間培養し、10 倍ごとに段階希釈を行い、細胞外 ATP 消去液をサンプル 1 mL に対し、0.1 mL の割合で添加し、30 分間インキュベートした。その後、試料 35 μ L に ATP 抽出試薬（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール HS セット）を等量の 35 μ L 添加し、抽出試薬を加えてから 20 秒後に ATP 発光試薬を 35 μ L 投入し 10 秒以内に装置内に入れ観察した。

3. 結果と考察

3. 1 装置の設計製作

3. 1. 1 2チャンネル流通型汎用蛍光リアルタイム計測装置

図 3-1 のような計測装置を作製した。内部構造は図 3-2 の通りであり、測定セルはステンレス製である (図 3-3)。

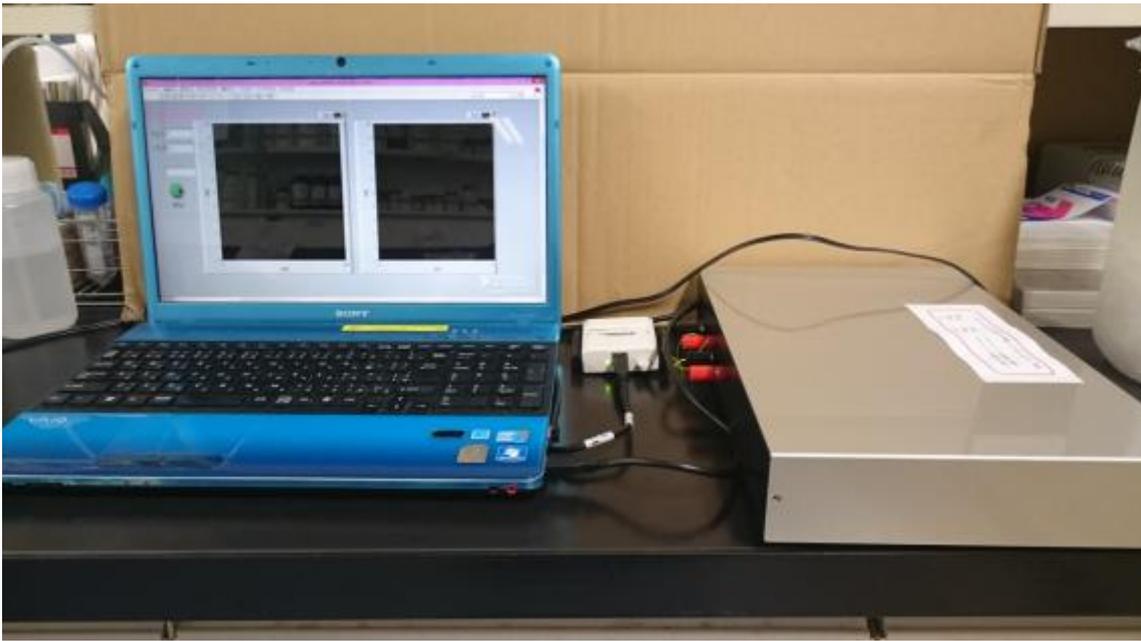


図 3-1 計測装置

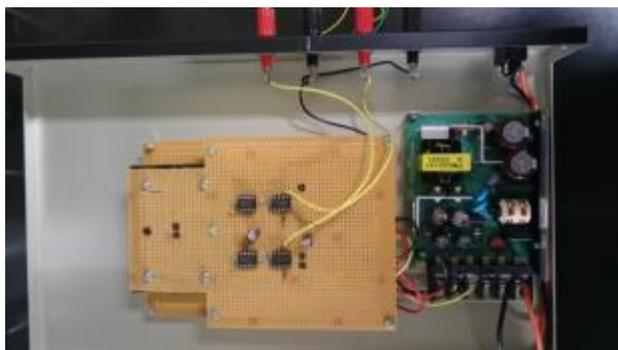


図 3-2 装置内部



図 3-3 測定セル

3. 1. 2 2チャンネル流通型発光リアルタイム計測装置

図 3-4 のような計測装置を作製した。内部構造は図 3-5 の通りであり、測定セルはステンレス製である (図 3-6)。

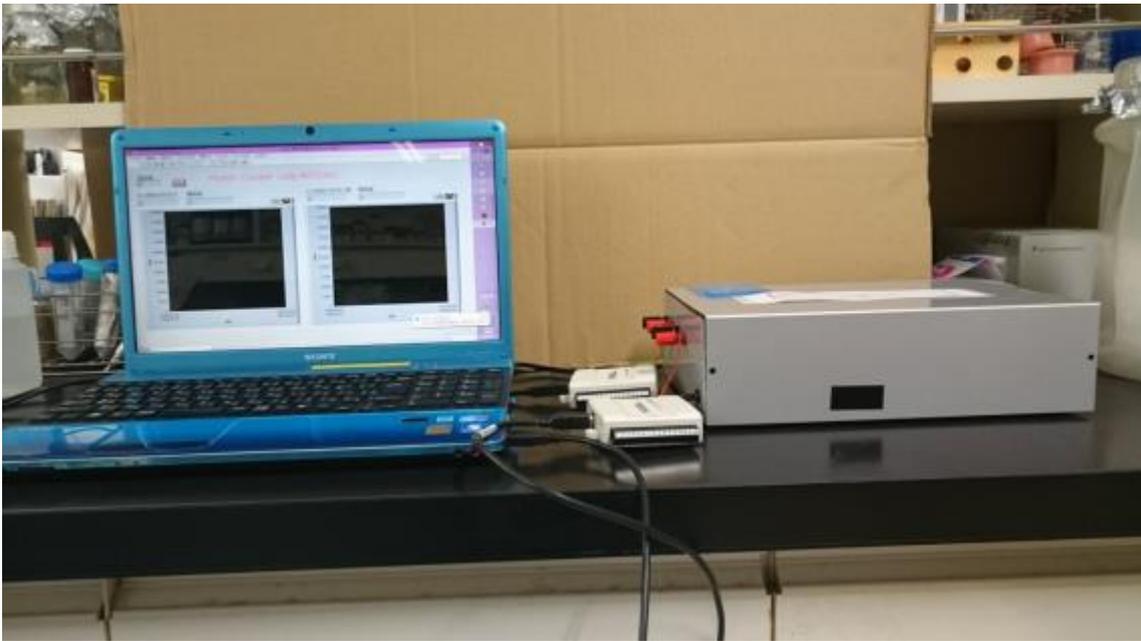


図 3-4 計測装置

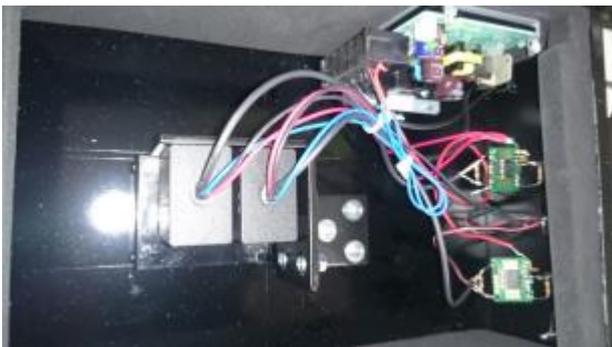


図 3-5 装置内部

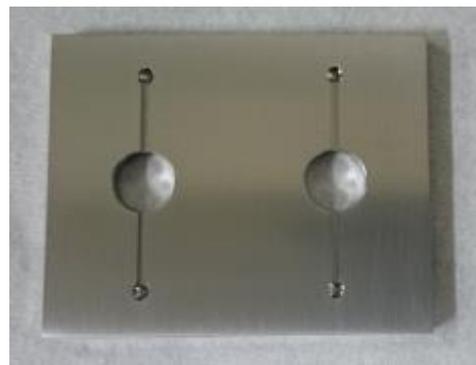


図 3-6 測定セル

3. 2 蛍光波長の測定

3. 2. 1 大腸菌 GFP 挿入株の作製

ダークリーダーで発光が認められたコロニーを単離したところ、大腸菌 DH5 α 株に GFP が挿入されていることを確認した。単離した大腸菌 DH5 α GFP 挿入株の、ダークリーダーによる緑色蛍光発光を図 3-7 に示した。



図 3-7 大腸菌 DH5 α GFP 挿入株

3. 2. 2 96 穴タイタープレートを用いた GFP 蛍光波長の測定

GFP 挿入株と野生株とを比較すると、GFP 挿入株から GFP に由来する蛍光強度が測定され、GFP 蛍光の測定が可能であることが分かった。しかし、Gm 添加の有無で、蛍光強度に差が認められないという結果となった（表 3-1, 3-2、図 3-7, 3-8）。このことは、増殖した菌体のタンパク質合成を阻害しても、それまでに菌体内で合成された GFP タンパク質が、阻害後少なくとも 48 時間残存し、蛍光を発することを示唆するものであった。したがって、GFP 蛍光を指標にして、生育の阻害や生理活性の変化を計測することは、困難であると考えられた。

表 3-1 蛍光強度 (RLU at 488-592 nm)

GFP 挿入の有無	Gm 添加の有無	培養時間 (h)						
		0	3	6	9	12	24	48
無	無	2710	2438.2	2548.7	3451.8	2251.9	3639	4463.1
無	有	2778	2215.6	2564.1	3646.4	2217.1	3440.1	4319.8
有	無	5500	4668.8	5441.1	7585.4	5199.6	9007.5	12448
有	有	5601	5293.4	5822.9	7844.1	5520.7	9835.5	12077

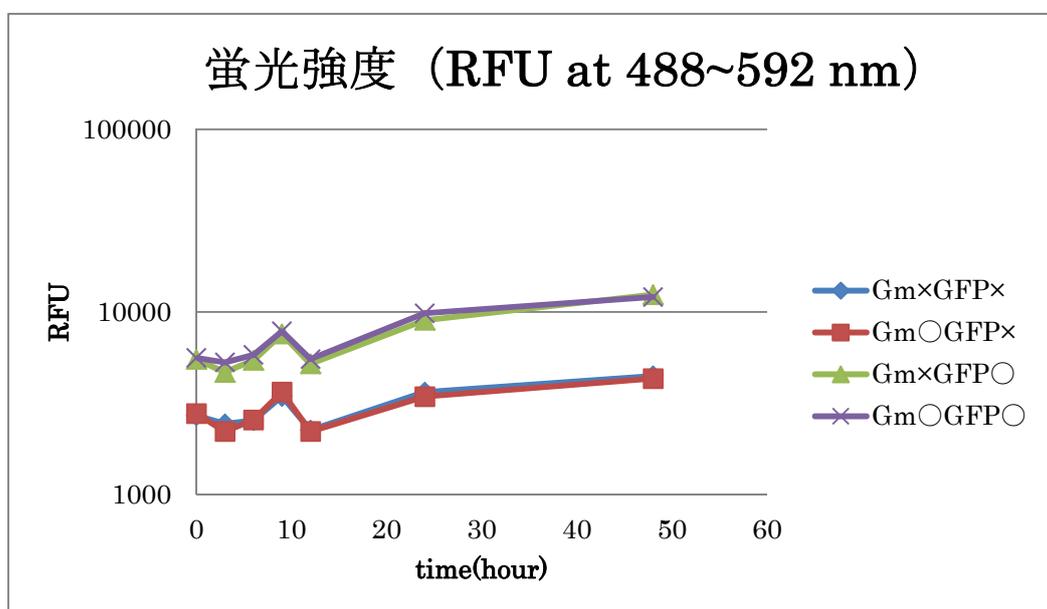


図 3-7 蛍光強度の変化 (検出波長 488~592 nm)

表 3-2 蛍光強度 (RLU at 508 nm)

GFP 挿入の 有無	Gm 添加の 有無	培養時間 (h)						
		0	3	6	9	12	24	48
無	無	283.2	216.2	225.1	304.8	178.8	320.4	397.3
無	有	290	196.7	227.0	321.4	176.3	303.9	384.4
有	無	836.2	568.2	658.3	923.9	547.6	1145.4	1598.6
有	有	850.3	642.0	698.4	945.3	574.3	1232.1	1548.1

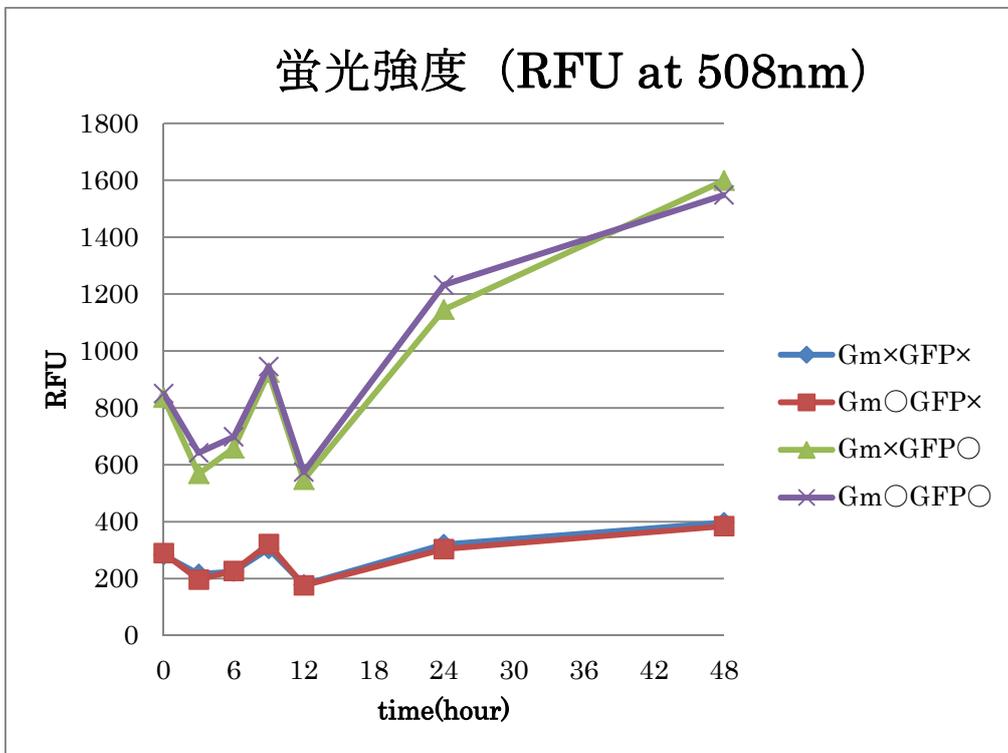


図 3-8 蛍光強度の変化 (検出波長 508 nm)

3. 2. 3 静止条件下での測定セルを用いた GFP 蛍光波長の測定と呼吸活性阻害の検出

ここでは、本調査で作製した計測装置と測定セルを用いて、抗生物質を添加した場合の GFP 蛍光の変化を調査した。Gm を添加したセル中では、12 時間まで蛍光の低下が認められ、それ以降は徐々に上昇した（表 3-3、図 3-9）。24 時間後には、セル中の液量の減少が認められることから、12 時間までは蛍光が減少し、それ以降は水の蒸発による濃縮が蛍光量の計測に影響したことが考えられた。96 穴のタイタープレートを用いた計測では、Gm 添加の有無で蛍光量に変化が認められない結果となったが、作製した測定装置と測定セルを用いた計測では、Gm による影響が認められた。

表 3-3 蛍光（電圧変換）の経時変化

Gm 添加の有無	経過時間 (h)					
	0	3	6	9	12	24
無	1.08	1.14	1.14	1.14	1.25	1.07
有	1.13	1.16	1.02	1.05	0.94	1.05

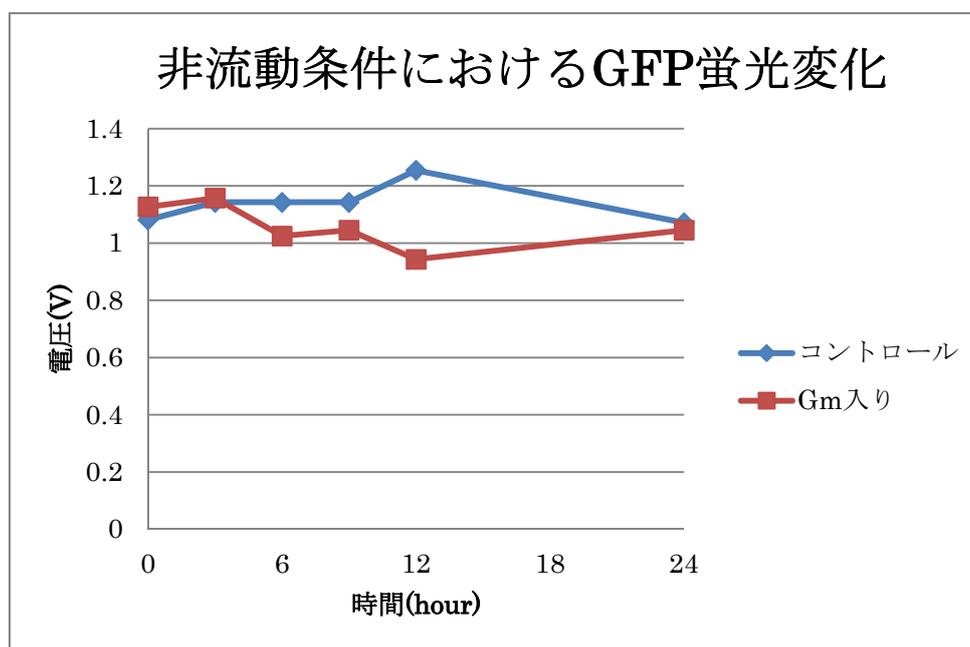


図 3-9 蛍光強度の変化

100 mg/L の 2-hydroxybiphenyl (2-OHBP) を添加した場合、3 日後の GFP 蛍光は大きく低下した (表 3-4、図 3-10)。過去の研究では、2-OHBP) の添加で大腸菌 MV1184 株の呼吸阻害を起こすことが示唆されていることから、同様の影響により蛍光強度が低下したものと考えられた。図 3-9 に示した Gm 添加でも、12 時間後に蛍光強度の低下が認められている。これらの結果は、本調査で設計製作した 2 チャンネル流通型汎用蛍光リアルタイム計測装置を用いることで、薬剤添加の影響を計測することが可能であると考えられた。しかし、この結果は、マイクロタイタープレートを用いたプレートリーダーで計測した場合、影響が認められなかったという結果と異なるものであった。

プレートリーダーの蛍光計測は、迅速であるが、受光部を移動させながら計測するものであり、測定時間は短時間で、得られた光信号を電気的に変換増幅する方式である。今回開発した計測手法は、一つのセルに一つのフォトダイオードを対応させており、セルから発する蛍光をすべて受光する方式になっている。この違いにより、比較的弱い蛍光の微弱な変動を計測することが可能になったのではないかと考えられた。

なお、図中の出力値の電圧 1V は 0.36 lx に相当し、0.24 lx が月明かりであることを考えると、蛍光発光は弱い光であると考えられる。

表 3-4 蛍光 (電圧変換) の経時変化

2,3-OHBP 添加の有無	経過時間 (日)	
	0	3
無	0.531	1.193
有	0.943	0.434

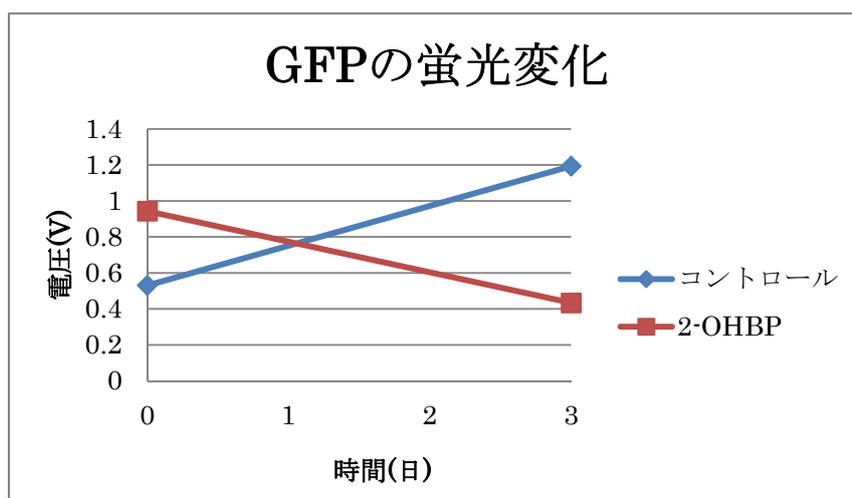


図 3-10 蛍光強度の変化

3. 2. 4 GFP と PI 蛍光の同時計測による生細胞死細胞の蛍光波長の同時測定

生細胞と死細胞の同時計測を可能とするため、GFP と PI 蛍光の同時計測を試みた。SDS で処理した結果から、膜を溶解させることで、蛍光量が増加したことが示唆された。この場合、希釈しない試料で値の低下が認められたのは、蛍光量が検出器であるフォトダイオードの限界値を超えたため、感度低下が生じたためであると考えられた。

細胞膜が破壊されても GFP タンパクが残存し、蛍光を発することが報告されていることから、SDS 処理は GFP 蛍光の測定に影響を与えない物と考えられた。

表 3-5 GFP 変化

培養液の濃度 (10 ⁿ 倍)	none	SDS
-3	0.734771	0.91285
-2	0.836655	0.963739
-1	0.775525	0.994273
0	0.836655	0.943384
LB のみ	0.765336	0.851783

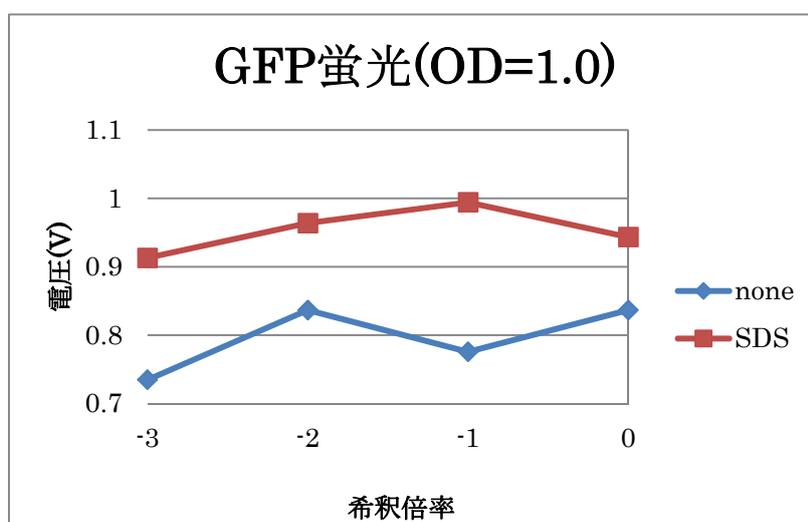
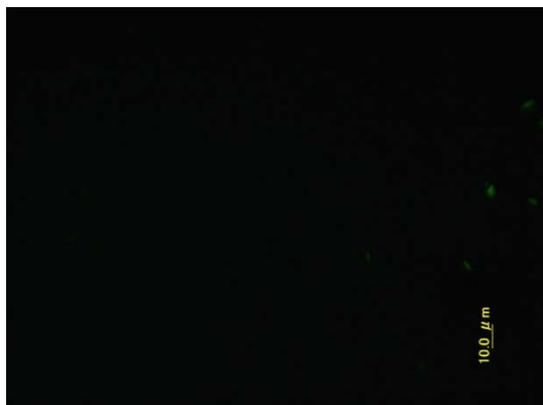


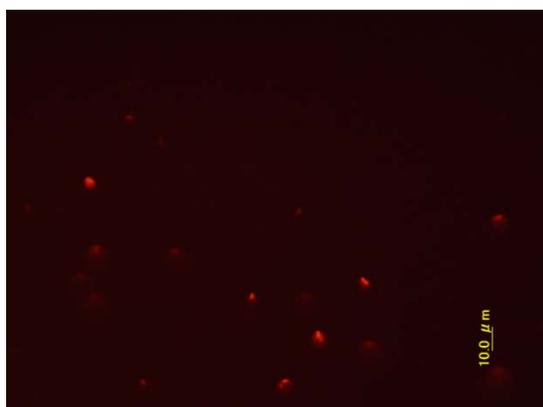
図 3-11 蛍光強度の変化

PI を添加したときの蛍光検出は非常に小さい値となった。これは、PI の励起波長が 535 nm で、蛍光波長が 617 nm であることから、今回作製した計測装置の検出蛍光の波長範囲を超えることが原因であると考えられた。PI の検出を可能とするためには、励起用の LED の波長を変更することと、受光部のフィルターを変更する必要があると考えられた。

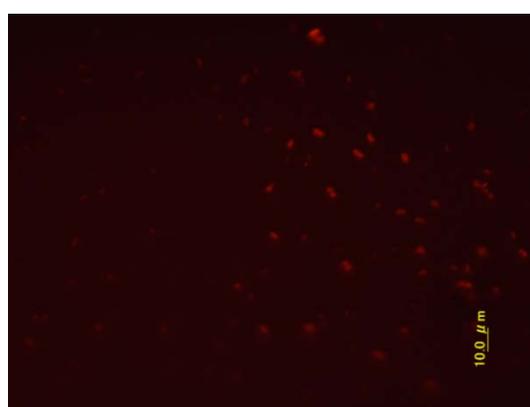
<参考：顕微鏡写真>



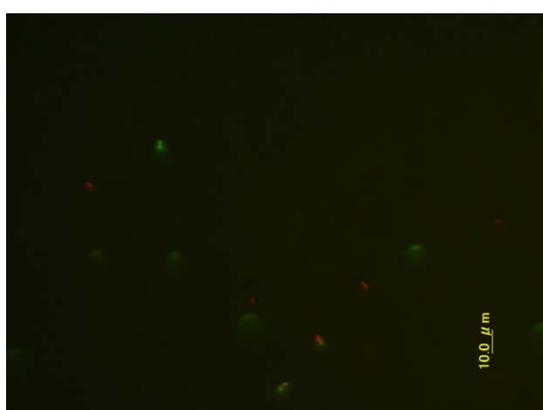
GFP 蛍光画像 (SDS 処理有)



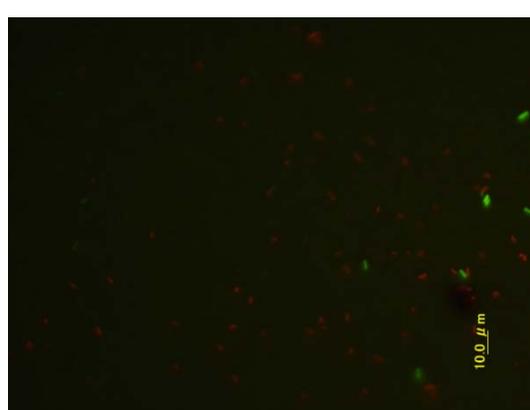
PI 染色画像 (SDS 処理なし)



PI 染色画像 (SDS 処理有)



GFP 蛍光と PI 染色の二重蛍光画像
(SDS 処理なし)



GFP 蛍光と PI 染色の二重蛍光画像
(SDS 処理有)

3. 2. 5 ルシフェラーゼ発光の計測による ATP 依存呼吸活性の計測

【フォトダイオードによる計測の試み】

GFP 蛍光の検出に用いたフォトダイオードが、ATP に由来するルシフェラーゼの反応による発光の検出にも使用可能か確認するため、フォトダイオードをオシロスコープに接続した簡易な検出系を作製し、発光の検出を試みた。しかし、オシロスコープの感度を最大化して計測を試みたものの、どの手法を用いてもフォトダイオードからの信号は検出されなかった。したがって、微生物細胞内の ATP によるルシフェラーゼ反応の発光は、放出する光子の量が少ないため、フォトダイオードでは検出されないことが示唆された。そこで、それより感度が高い、フォトマルチプライヤーを用いて観測装置を作製することにした。

3. 2. 6 2チャンネル流通型発光リアルタイム計測装置を用いたルシフェラーゼ発光による光子の検出と定量性の評価

【ATP 標準液を用いた計測装置の動作と ATP 消去剤の効果の検証】

本調査で作製した計測装置が、ルシフェラーゼの反応による発光に由来する光子数の計測が可能か調査した。その結果、希釈倍率と光子数に直線関係が得られ、計測が可能であることが示された。本装置で用いたフォトマルチプライヤーは、超高感度であり、検出される光子数が 10 万以上になると直線性が失われることが性能上示されていることから、感度的にも十分な値が得られた。また、本装置で利用したフォトマルチプライヤーは、本来 10ns ごと測定が可能であるが、使用している DAQ の関係上 100ns ごとに測定をするため、グラフの上では 10 の n 乗ごとに値が増加しないと考えられた。

また、ATP 消去剤を添加した結果は、バックグラウンドが低下したことを示す値となり、遊離している ATP 薬の消去は測定上効果があることが示唆された。

表 3-6 ATP 標準液による光子数の測定

希釈倍率(10n 倍)	コントロール	ATP 消去
-7	ND	3568
-8	209189	1282
-9	30834	291
-10	6329	468
-11	1771	191
-12	389	63

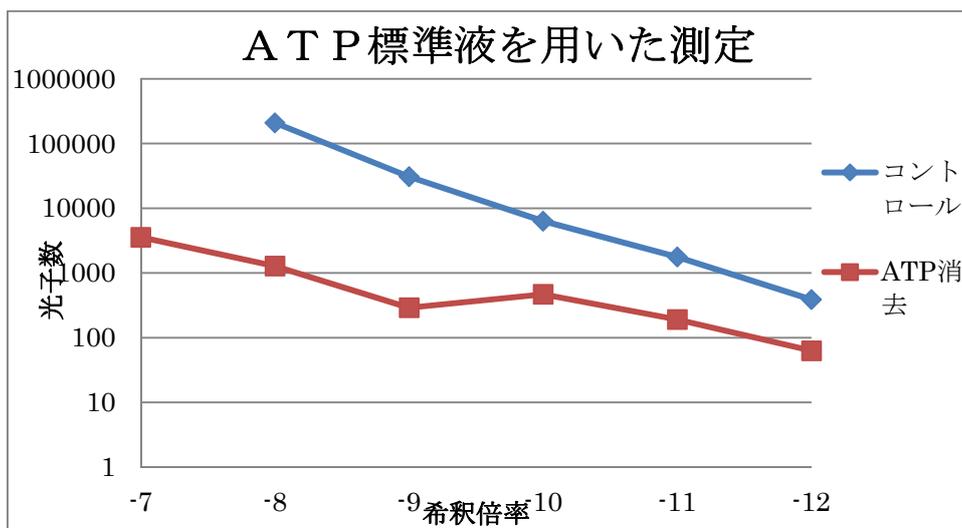


図 3-12 ATP 標準液による光子数の測定

【大腸菌を用いた ATP によるルシフェラーゼ発光の検出】

大腸菌を用いた計測においても、ルシフェラーゼの反応による発光を計測することができた。これにより、本調査で作製した計測装置は ATP 量の測定に使用可能であると示唆された。

表 3-7 大腸菌 ATP 由来の発光の測定

希釈倍率(10n 倍)	光子数
-6	608
-5	1310
-4	2747
-3	18469
-2	97955
-1	194198
0	ND

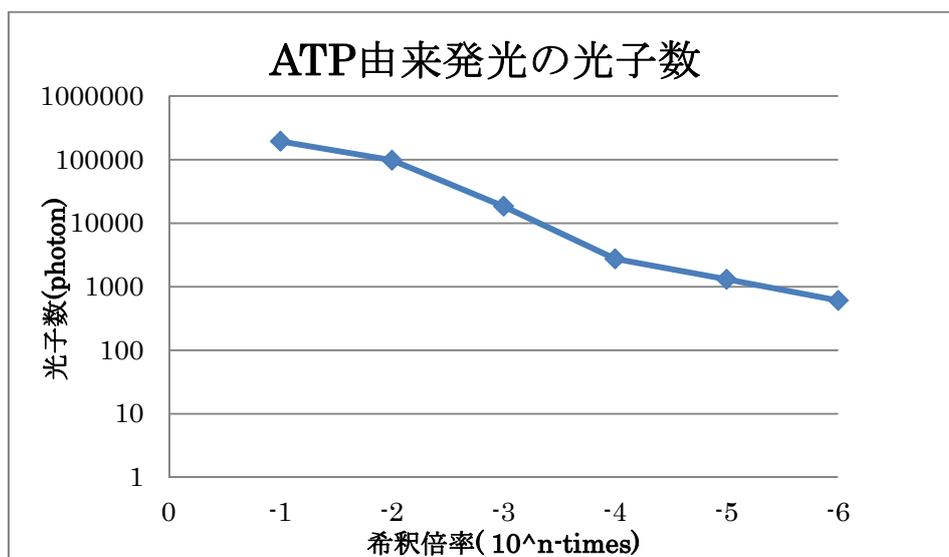


図 3-13 大腸菌 ATP 由来の発光の測定

4. まとめ

化学物質が活性汚泥の呼吸活性に与える影響を計測する、簡易検出システムの開発を目的として、計測装置の設計を行った結果、基本設計を確立した。また、緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するモデル細菌を用い、装置の検出感度を検討した結果、GFP により、呼吸活性の計測が可能であるが、生残性を計測する蛍光色素である PI と組み合わせるには、励起波長と検出波長を変更する必要があることが分かった。開発した計測装置は、発光ダイオードを配置した発光パネルと、それらの配置に合わせたフォトダイオード検出パネルを備えた検出デバイスを備えたもの、フォトマルチプライヤーにより光子数を測定するデバイス備えたものの 2 機種であり、透過する蛍光量ならびに光子数を電流値に変換し計測するシステムを採用した。その結果、蛍光波長に合わせた波長を用いることで、モデル細菌の呼吸活性を感度よく計測できることが示唆された。また、ルシフェラーゼの発光に由来する光子数の測定値から微生物の呼吸活性の計測が可能であることが示された。測定に使用するデバイスのピット中に活性汚泥を定着させるため、検討の結果、ピットの直径を 7~8 mm とし、深さは 3 mm とした。

モデル細菌の呼吸活性を阻害するモデル物質として、タンパク質の合成を阻害する抗生物質である Gm と、微生物の呼吸活性を低下させることが当研究室の過去の研究で明らかになっている 2-hydroxybiphenyl (2-OHBP) を選定し、呼吸活性阻害を蛍光測定で検出可能かどうか検証した。当初は 24 穴タイタープレートを用いる予定であったが、検体数を多くして解析する目的で、96 穴のタイタープレートを用いてプレートリーダーによる蛍光測定を行った。その結果、Gm を添加した培地では、タンパク合成の阻害による蛍光量の変化を測定できなかった。しかし、本調査で作製した計測装置を用

いることで、阻害効果の検出が可能になった。また、2-OHBP による呼吸活性の変化を蛍光測定により検出可能なことが示唆された。以上の結果から、本調査で作製した計測装置は、モデル細菌の呼吸活性の変化を検出することが可能であることが明らかになった。今後は、ATP に由来するルシフェラーゼ反応による発光の変動で、阻害の計測が可能かどうか検証すること、ならびに阻害物質を連続供給した場合の呼吸活性の変動を調査する必要がある。

<参考資料>

【ルミテスターによる計測】

本調査で作製した装置を用いて、ルシフェラーゼ反応による ATP の検出を行うに当たり、用いる反応を事前に調査する目的で、ATP 測定キットとルミテスター（キッコーマンバイオケミファ株式会社製）を用いて、発光の検出を行った。

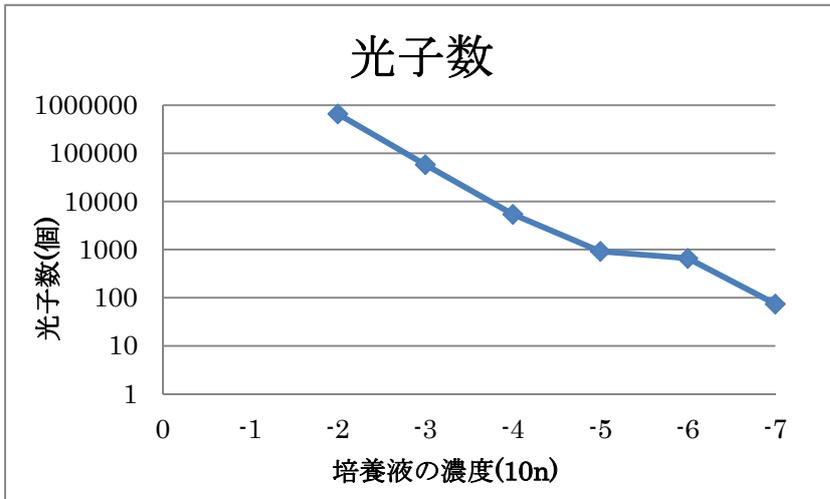
方法：1 から 10^{-7} （※1 回目は 10^{-4} まで）まで 10 倍に段階希釈した LB 培地で 12 時間培養した大腸菌を 0.1 mL 採取し

① 培養液中の全 ATP を測定するために試料 0.1 mL に ATP 抽出試薬を添加し、ボルテックス等で数秒攪拌し（1 回目は手で軽く攪拌した）、抽出試薬を加えてから 20 秒後に ATP 発光試薬を投入し 10 秒以内にルミテスター C-110（キッコーマンバイオケミファ株式会社）の装置内に入れ観察した

② 細胞内 ATP のみを測定するため試料 1.0 mL に 0.1 mL の ATP 消去試薬を添加し、ボルテックス等で攪拌（1 回目は手で軽く攪拌した）した。その試料（計 1.1 mL）中から 0.1 mL をピペットマンで採取し、ほこりなどが入らないようにラップなどでかぶせ、30 分間室温で放置した。その後、試料 0.1 mL に ATP 抽出試薬（キッコーマンバイオケミファ株式会社 ルシフェール HS セット）を添加し、ボルテックス等で数秒攪拌し（1 回目は手で軽く攪拌した）、抽出試薬を加えてから 20 秒後に ATP 発光試薬を投入し 10 秒以内にルミテスター C-110（キッコーマンバイオケミファ株式会社製）の装置内に入れ観察した。

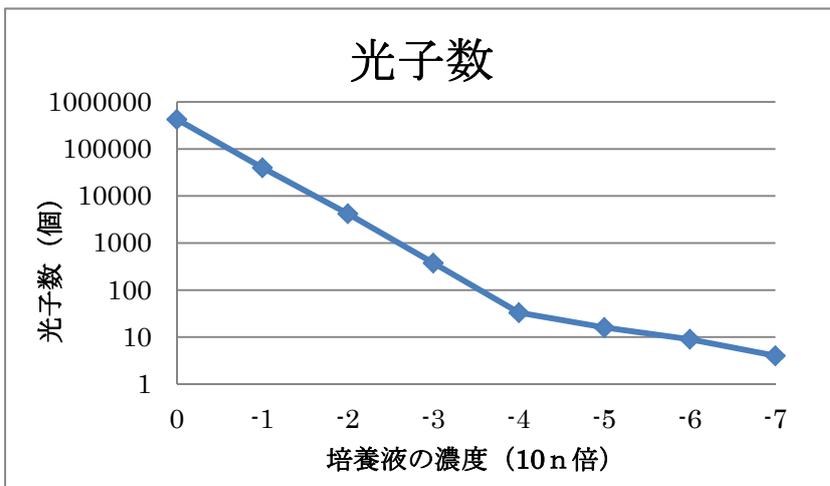
結果：①の計測法で ATP 量を測定した結果、希釈倍率が低いと発光量が強すぎて光子数がオーバーフローしてしまうことが分かった。

培養液の濃度（ 10^{-n} 倍）	光子数（個）
0	ND
-1	ND
-2	655342
-3	57843
-4	5399
-5	916
-6	658
-7	74



②の手法の結果、ATP 消去試薬を添加することで、バックグラウンドが低くなり、無希釈から光子数が検出可能なことが分かった。

培養液の濃度 (10 ⁻ⁿ 倍)	光子数 (個)
0	425139
-1	39820
-2	4186
-3	375
-4	33
-5	16
-6	9
-7	4



参考文献

- 1) Sanchez, Z., Tani, A., Suzuki, N., Kariyama, R., Kumon, H., and Kimbara, K., Assessment of Change in Biofilm Architecture by Nutrient Concentration Using a Multichannel Microdevice Flow System, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 326-331 (2013).
- 2) Sanchez, Z., Tani, A., and Kimbara, K., Extensive reduction of Cell Viability and Enhanced Matrix Production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Flow Biofilms Treated with D-amino Acid Mixture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 1396-1399 (2013).
- 3) Yamada, T., Shimomura, Y., Hiraoka, Y., and Kimbara, K.: Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 452-457(2006).
- 4) Shimomura, Y., Ohno, R., Kawai, F., and Kimbara, K.: Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment. *Appl Environ Microbiol.* 72, 5037-5042(2006).
- 5) JB Andersen, C Sternberg, LK Poulsen et al.: New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 64, 2240-2246(1998).

調査結果の公表

- 1) Takuma Sakurai, Masaki Shintani, Motohiko Kimura, Kazuhide Kimbara: Simple measurement system of respiratory inhibition in biofilm and activated sludge for biodegradability evaluation, Young Scientist Seminar-Kasetsart University, Chulalongkorn University & Shizuoka University Joint Seminar-, p. 11, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, March 5, 2015.