



## 飲料水の大腸菌群検査法

麻布大学 環境保健学部 微生物学研究室 古畑勝則

### 1. はじめに

2001年8月、待望の上水試験方法改訂版が刊行された。1992年の水道法水質基準の改正に伴い、大腸菌群の検査方法に発色酵素基質によるまったく新しい特定酵素基質培地法(MMO-MUG法)が導入されてから実に9年の歳月が流れた。

当時、わが国では、厚生省監修、上水試験方法(日本水道協会、1985)を改訂する時期にあっており、水質試験方法等調査専門委員会(日本水道協会)を中心にこのMMO-MUG法を大腸菌群の迅速試験法として新たに採用することの是非について検討が進められていた。その結果、本法は従来法と同程度の感度を有する検査法として利用できるものと判断され、厚生省に対し、省令法としてMMO-MUG法を採用すべく打診した。そしてこれまでの乳糖ブイオン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地法(LB-BGLB法)に加えて、MMO-MUG法が追加採用されたことは実に画期的なことであった。

ところが、この方法は迅速かつ簡易である反面、開発されたばかりの発色酵素基質を用いることから従来法に比べてコストが高くなる欠点があった。また、発色酵素基質が加熱に不安定なことやMMO-MUG法に用いられた培地成分に公表されない物質が含まれていたことから、この培地は自家調製できず、輸入品に頼らざるを得ない状況となり、結果的に1社独占の販売形態となってしまった。

その後、類似した発色酵素基質を利用し、培養時間が短縮された上に安価な大腸菌群検査培地が何種類か市販され、これらの利用が強く望まれてきた。

今回の上水試験方法の改訂は、こうした数種類ある特定酵素基質培地に対して公の評価が下されたものである。その内容について以下に解説する。

### 2. 特定酵素基質培地法の反応原理と特徴

特定酵素基質培地法の導入によって大腸菌群の概念が変わった。従来のLB-BGLB法では乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の無芽胞桿菌と定義されてきた。しかし、MMO-MUG法では発色酵素基質であるガラクトピラノシドを分解できるグラム陰性の無芽胞桿菌となった。すなわち、MMO-MUG法では乳糖の分解性をみるのではなく、乳糖分解に関与する $\beta$ -ガラクトシダーゼを検出しているにすぎない。この酵素を検出するための発色酵素基質がONPG(*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)である。また、今回記載された培地にはONPGに代わりXGal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を利用しているものもある(表1)。

図1にはこれらの反応を示した。すなわち、大腸菌群が産生する誘導酵素の $\beta$ -ガラクトシダーゼが発色酵素基質のONPGやXGalを分解して黄色物質の*o*-ニトロフェノールや青色のインジゴを生成するのである。したがって、培養後、培地の黄変や青変によって $\beta$ -ガラクトシダーゼの存在が明らかとなり、間接的に大腸菌群の有無を容易に判別することができる。

今回記載された培地には、ガラクトシダーゼを誘導する非代謝性誘導酵素基質であるIPTG(イソプロピル-1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を添加したり、塩素による損傷を回復させるためにピルビン酸を添加しているものもある。また、MMO-MUG培地が最小限の栄養素だけを含む最

小培地法であるのに対し、他の培地はペプトン等の栄養分が加えられ、グラム陽性菌の発育抑制剤としてラウリル硫酸ナトリウムを使用している。さらに、ある培地は弱酸性下で損傷菌の回復を促すためにpH調整剤としてTMAO(トリメチルアミン-N-オキシド)を用い、培養とともにpH値を変化させている。一方、大腸菌(*E.coli*)を同時に検出するための発色酵素基質として、いずれの培地もMUG(4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルクロニド)が含まれている。

特定酵素基質培地法での測定結果がLB-BGLB法と比較して高めに出る傾向がある<sup>1~4)</sup>。それは定義の違いによりそれぞれの方法に該当する大腸菌群に違いがあり、前者で定義される大腸菌群の方が多くの菌種を包含するからである。乳糖の分解には乳糖分解酵素である $\beta$ -ガラクトシダーゼとともに細胞膜透過酵素の関与が必要である。これが欠けると $\beta$ -ガラクトシダーゼが存在していても乳糖は分解されない。したがって、LB-BGLB法では大腸菌群に該当しない乳糖非分解菌であっても、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ陽性菌は、特定酵素基質培地法では大腸菌群に該当するのである。この点で両者は完全には相関しない。しかしながら、安全性を最重視する水道界では従来より広範囲の大腸菌群を網羅できる特定酵素基質培地法は、その迅速性を加味して高く評価されたのである。

### 3. 特定酵素基質培地法による試験操作

本法による試験操作は非常に簡単である。検水 50mL を各種の特定酵素基質培地に無菌的に入れ、スクリーキャップを閉めて攪拌し、培地を溶解あるいは混合させるだけである。これを一定時間培養後、培地が黄変したもの、あるいは青変したものを大腸菌群陽性、色調に変化のないものを陰性と判定する。ただし、試料によっては色調が希薄なものがあるが、その場合はコンパレーターと呼ばれる陽性確認液と比較する。これは陽性の限界を示すので、これより濃い色調であれば陽性である。

さらに、このままの状態では366nmの長波長の紫外線を照射することによって大腸菌(*E.coli*)の有無を判定することができる。青白色の蛍光を発したものが大腸菌陽性、変化のないものが陰性である。なお、大腸菌群と同様にコンパレーターは陽性限界を示すので参考にする。

このように本法では、同一試験管で大腸菌群と大腸菌を同時に検出することができる。

本法による培地は10mL用のものも市販されているので、これを用いれば最確数による定量試験も可能である。

### 4. 従来法との比較検討

日本水道協会水質試験方法等調査専門委員会では、その後市販されている特定酵素基質培地が公定2法(LB-BGLB法とMMO-MUG法)と同等の性能を有するか否かの評価試験を実施した<sup>5, 6)</sup>。ここでは詳細は割愛するが、概要は以下の通りである。

評価試験は、標準株を用いて陽性となる最小菌数、培養時間、塩素処理した場合の検出感度、共存細菌の影響についての基礎的検討と、実際の環境水での比較試験、さらに環境水を塩素処理した場合の検出感度について実施した。

その結果、標準株を用いた評価試験では、一部の菌株が検出しにくい傾向はあったが、実用上は問題ないと考えられた。また、共存細菌の影響についても同様の評価結果であった。標準株を塩素処理して検出感度をみたところ、XGal培地における24時間培養では公定2法よりも感度が低かったが、他の培地はいずれも感度良好であった。

環境水を用いた比較試験では、どの培地でも高い相関はあったが、最確数はピルビン酸添加XGal培地 $\geq$  IPTG添加ONPG培地 $\geq$  XGal培地48時間培養 $\geq$  MMO-MUG培地 $>$  XGal培地24時間培養 $\geq$  LB-BGLB法の順であった。LB-BGLB法が低いのは既述したようにガス非産生株を

検出できないためであるが、XGal 培地はガス非産生株も検出した上で低いことから、MMO-MUG 培地と比較しても 48 時間の培養が必要と考えられた。環境水を塩素処理した比較試験では、最確数は IPTG 添加 ONPG 培地 > MMO-MUG 培地  $\geq$  ピルビン酸添加 XGal 培地  $\geq$  XGal 培地 48 時間培養  $\geq$  LB-BGLB 法 > XGal 培地 24 時間培養の順であった。また、XGal 培地 24 時間培養では誤陰性を生ずる可能性もあり、この培地に関しては 48 時間の培養が必要であった。

以上の結果から、XGal 培地を除く他の培地では 24 時間培養後の判定で水道水中の大腸菌群を良好に測定できるものと判断された。

## 5. おわりに

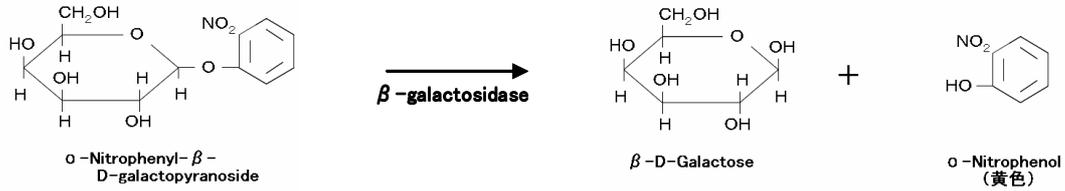
以上のように、今回の上水試験方法の改訂により新たな特定酵素基質培地が3種類追加記載された。現時点では、これらはいずれも公定法に準じたものであり、直ちに水道法水質基準試験に使用できるものではない。しかしながら、試験法の性格から近い将来、省令法にも採用されるであろう。

### 参考文献

- 1) 古畑勝則、松本淳彦: 水中の大腸菌群及び大腸菌の酵素反応による迅速試験法に関する検討、東京衛研年報、42、194~201(1991)
- 2) 古畑勝則: 水道水の大腸菌群試験方法として新たに採用された特定酵素基質培地法について、防菌防黴、22、109~116(1994)
- 3) 古畑勝則: 酵素基質を用いた大腸菌群および大腸菌の検出法、環境管理技術、13、171~178(1995)
- 4) 古畑勝則: 酵素基質による大腸菌群及び大腸菌の迅速試験法、食品工業、38、45~49(1995)
- 5) 宮川徹也、宮内孝夫、小川 明、安藤正典: 大腸菌群検査試薬の評価試験の中間報告(I) —標準菌株を用いた1次分の評価試験結果—、第50回全国水道研究発表会講演集、628~629(1999)
- 6) 宮内孝夫、小川 明、宮川徹也、安藤正典: 大腸菌群検査試薬の評価試験の中間報告(II) —環境水を用いた2次分の評価試験結果—、第50回全国水道研究発表会講演集、630~631(1999)

図1 発色酵素基質の反応

1. ONPG 反応



2. XGal 反応

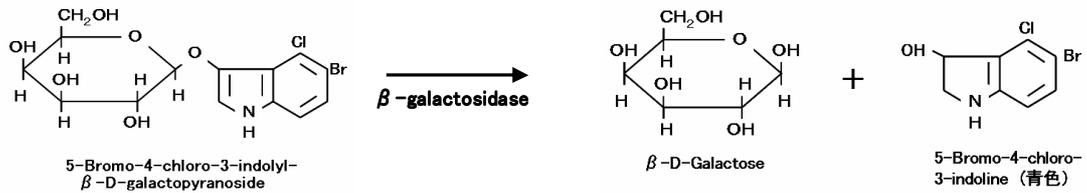


表1 上水試験法 2001 年版に記載された大腸菌群試験用特定酵素基質培地

培地	ONPG法		XGal法	
	MMO-MUG	IPTG添加ONPG-MUG	XGal-MUG	ピルビン酸添加XGal-MUG
酵素基質	ONPG(+MUG)*	ONPG(+MUG)IPTG	XGal(+MUG) IPTG	XGal(+MUG) IPTG
培養温度	36±1℃	36±1℃	36±1℃	36±1℃
培養時間	24時間	24時間	48±3時間	24時間
判定色調	黄	黄	青~青緑	青~青緑

\*:大腸菌試験用発色酵素基質