
蛍光指紋分光法による菌数推定手法の開発

(¹ 東京大, ² (国研)農研機構)

○杉本幹太¹, 川崎晋², 蔦瑞樹², 五月女格¹, 牧野義雄¹, 吉村正俊¹

【目的】 食品の細菌検査における非接触・簡便・迅速・試薬不要の手法として、細胞内の自家蛍光分子による蛍光特性を利用した蛍光指紋分光法の研究が進められている¹。蛍光指紋とは、試料に照射する励起光の波長を連続的に変化させながら測定した複数の蛍光スペクトルデータを並べた3次元データのことである。ピークの裾野に至るすべての情報を使うことで、成分固有の情報が得られる。本研究では、大腸菌を対象として細菌懸濁液の蛍光指紋を測定し、得られた蛍光指紋スペクトルの多変量回帰分析により推定可能な生菌数の範囲を探った。

【方法】 大腸菌 *Escherichia coli* (ATCC25922) の冷凍保存菌株(-20℃)から、培養(TSB培地, 35℃, 一昼夜)を行った。無蛍光水(同仁化学, ルミナゾール)を用いて菌体の洗浄を行った後、濁度をOD₆₆₀ = 1.0 に調整したものを10倍ずつ希釈していき、OD₆₆₀ = 1.0 の試料の濃度を1として濃度10⁻¹~10⁻⁸(菌数目安:10⁷~10⁰ CFU/mL)の8段階の試料を作成した。各試料を濁度測定および蛍光指紋測定に供試した。濁度測定には分光光度計(島津製作所, UV-1700)を、蛍光指紋測定には分光蛍光光度計(日立ハイテクノロジーズ, F7000)を使用した。蛍光指紋の測定範囲は励起波長 Ex 200~300 nm、蛍光波長 Em 200~450 nm、波長計測間隔を2 nmとした。測定後の試料を培養(TSA培地, 35℃, 一昼夜)し、生菌数を測定した。データ解析には MATLAB(MathWorks)および PLS-Toolbox (Eigenvector Res.)を用いて、濁度および蛍光指紋と生菌数の関係を解析した。

【結果】 細菌懸濁液の濁度から推定できる生菌数の範囲は10⁶~10⁷ CFU/mLのオーダーであった。蛍光指紋から推定できる生菌数の範囲は10⁴~10⁶ CFU/mLのオーダーであった。全波長(Ex 200~300 nm / Em 200~450 nm)の蛍光指紋データを用いた主成分分析とPLS回帰分析の結果、生菌数の推定にはトリプトファン由来と思われる自家蛍光の情報が重要であることが示された。

1. Ammor, *J. Fluoresc.* **17**, 455-459 (2007).