

希釈倍率を用いた大腸菌培養および標準曲線描画による、 アスリート健康への影響のない新型消毒システムの支援

Supporting a Novel Disinfection System for Athletes' Health through E. coli Cultivation and Standard Curve Drawing Using Dilution Ratios

蔡 承 達^{*, **, ***}, 許 繼 方^{*, ***, *}, 小 林 久 美^{*7}, 櫻 井 勝^{*, **, ****, *****}
小酒井 和 輝^{****}, 西 田 祐 士^{*8}, 羽 田 克 彦^{*, **, ****, *****}, *6, 金 子 雅 希^{*, ***}

Chengta TSAI^{*, **, ***}, Hsu ChiFang^{*, ***, *}, Kumi KOBAYASHI^{*7}
Masaru SAKURAI^{*, ****, *****}, Kazuki KOZAKAI^{****}, Yushi NISHIDA^{*8}
Katsuhiko HATA^{*, **, ****, *****}, *6 and Masaki KANEKO^{*, ***}

背景と目的

アスリート環境の文脈において、アスリートは清潔度の不足による感染の潜在的なリスクに直面している。大腸菌 (E. coli) は一般的な病原体であり、不十分な清潔度により感染のリスクが高まる。E. coliは原核生物に分類され、細胞膜と細胞壁の両方を備えており、この微生物の特性である。

この実験の焦点は、新しい消毒システムの開発に寄与することである。この目標を達成するために、E. coliの表現型変換が行われ、アンピシリン耐性 (Amp⁺) が導入されている。実験セットアップでは、アンピシリンを含む培地 (LB培地) を用いて、E. coliのみが結果に影響を与え、他の汚染物質からの干渉を防ぐ。

E. coliの量を定量することは、後続のデータの再現性を確保するための重要なステップである。

そのため、時間ベースのフィルトレーション (タイムコース) が実施され、最適なサンプリングタイミングを特定する。時間条件では、毎時のサンプリングと吸光度値の測定が行われ、E. coliをその活性状態で最適に取得する。

特定の波長で光吸収を測定する原理に基づく分光光度計は、吸光度値を通じて目標物質の濃度を決定するのに役立つ (図1)。

大腸菌の数の計算はLB寒天培養 (クローニング) に基づき、CFU/mLで統計的な表現を提供する。

キャリブレーション曲線の確立は、信号と濃度を正確に関連づけるために基本的である。これには、さまざまな濃度 (x 値) の標準サンプル溶液を準備し、器具を使用してそれらの信号 (y 値) を測定する作業が含まれる。期待される結果は、濃度と信号の間に線形な関係があり、各濃度にお

* 国士舘大学体育研究所 (The Institute of Physical Education, Kokushikan University)

** 数理医科学研究センター (Department of Neuroscience, Research Center for Mathematical Medicine)

*** 株式会社分子栄養学研究所 (Orthomolecular Nutrition Laboratory, Inc.)

**** 国士舘大学 救急システム研究科 (Department of Emergency Medical System, Kokushikan University)

***** 国士舘大学体育学部スポーツ医科学科 (Department of Sport and Medical Science, Kokushikan University)

*6 東京理科大学大学院理学研究科物理学専攻 (Department of Physics, Tokyo University of Science)

*7 帝京大学大学院公衆衛生学研究科 (Teikyo University Graduate School of Public Health)

*8 国士舘大学体育学部体育学科 (Department of Sport Science, Kokushikan University)

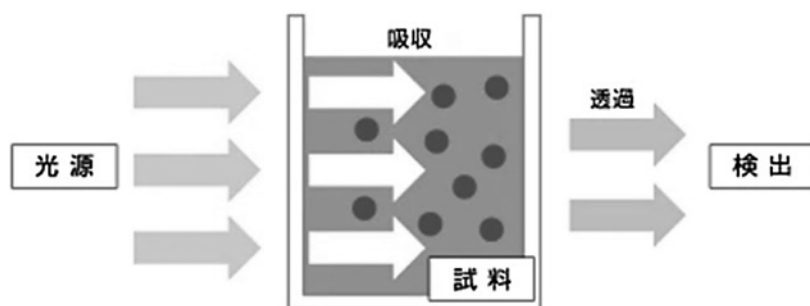


図1 吸光度計模式図

いて信号と濃度の一貫した比率を確保する。

この実験デザインは、消毒システムの向上だけでなく、アスリート環境における細菌の定量的理解を進め、正確で再現可能なデータの確保の重要性を強調している。

方 法

①大腸菌培養と凍結保存

まず、Ampicillin (Amp+) を含む载体DNAを転送した大腸菌を250mlのLB培地に培養する。培養時間は12時間で、菌液のOD値濃度を確認し、0.8~1.2の範囲内であることを確認する。確認されたOD値の範囲に達したら、1mlずつ5つの微量遠心管に取り、凍結保存する。

説明：このステップでは、必要な時に後続の実験を行うためにAmpicillinを含む転送された大腸菌を確認する。

② テストバクテリア液の塗布プレート

1mlの菌液を取り、可塗盤テストを行う。

説明：これは、培養された大腸桿菌がAmpicillinを含んでいるかどうかを確認し、転送が成功したかを検証するためのもの。

③ 10の倍数で希釈して数養盤

10の倍数で希釈し、培地上で大腸桿菌の各希釈倍率を培養する。

説明：これは、後続の実験のために異なる濃度

の大腸桿菌を得ることを目的としている。

④菌落数の計算

培地上の菌落数を計算する。

説明：菌落数を計算することで、異なる希釈倍率での大腸桿菌の密度を評価できる。

⑤Excelを使用して検量線を算出

Excelソフトウェアを使用してデータ処理を行い、大腸桿菌の密度と吸光度の検量線を作成する。

説明：このステップは、吸光度値に基づいて大腸桿菌の密度を正確に推定できるようにし、さらなる実験と分析を行う。

結果と考察

この研究では、大腸菌の密度を測定するために595nmと660nmの波長を使用した場合の違いを考察した。実験室の分光光度計の制約から、私たちは最大限のOD595nmの波長を選択して測定した。

得られた大腸菌の吸光度に基づき、OD660nm波長を使用した一般的な方法がデータにどのような影響を与えるかを確認した。文献調査によれば、基本的には影響を受けないとされている。なぜなら、OD660nmは大腸菌のサイズに基づいており、大腸菌のサイズは密度の最大値に関連しており、これは2021年の関連研究を参照してください

(Jeong-Eun Hyun et al.2021)。この研究では、大腸菌の抑制量を評価するためにOD595nm波長が使用されている。相対値であるため、OD595nmに検菌基準を設定するだけで、得られる標準曲線は一貫している。

実験では、希釈された三つの菌液（濃度はそれ

ぞれOD595nm 0.8851、0.6246、0.3533）に対して、培地（LBプレート、Amp+）で培養を行い、それぞれ155、124、59個の菌コロニー（図3）が得られた。これらのデータを使用して検量線を作成し、 $y = 0.0053x + 0.0101$ の式を得た（図2）。 R^2 値が1に近いことから、実験の正確性が確認された。

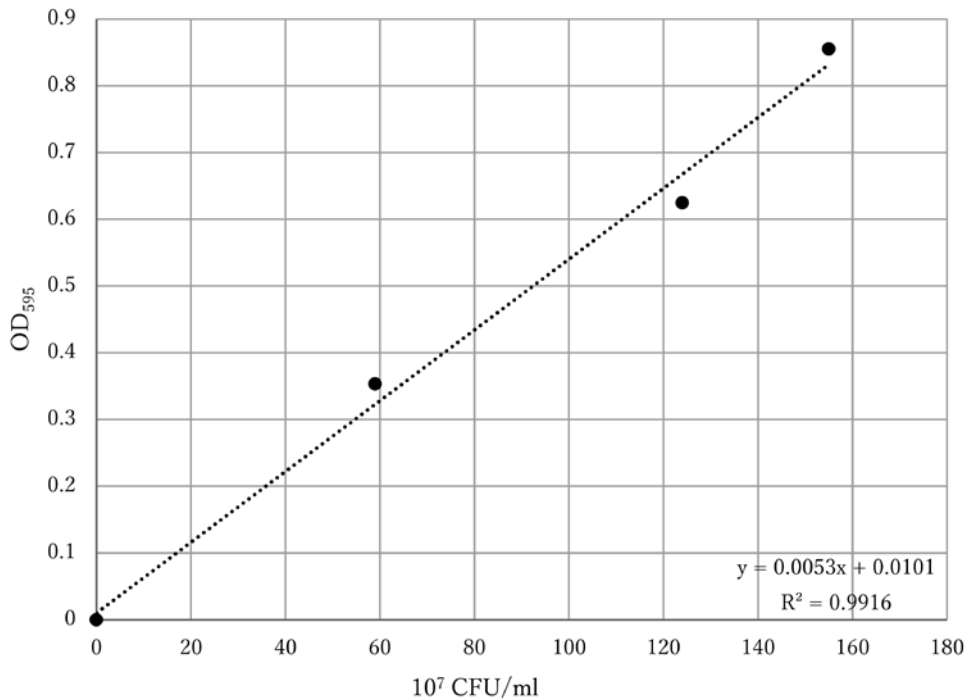


図2 大腸菌溶液中で大腸菌数

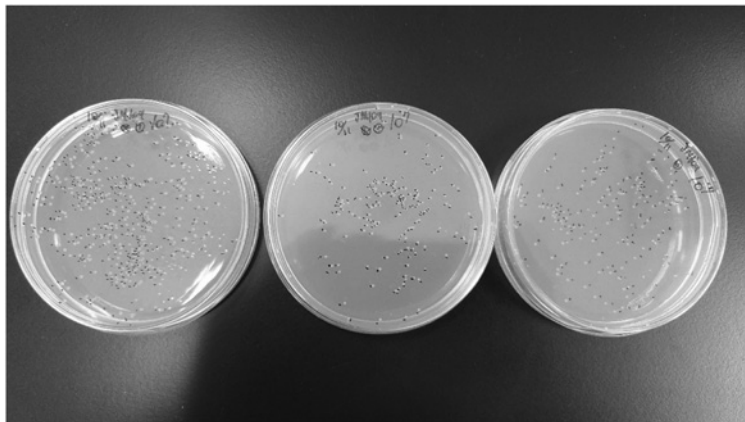


図3

これは、後続の培養実験で吸光度の値（y 値）をこの式に代入することで対応する菌コロニー数（x 値）を得ることができる。

参考資料

- 1) 大腸菌形質転換キット、(LacZ 発見系) 取扱説明書 第五版. (参照 2023-01-24).
- 2) 研究ネット 用語集 吸光光度計とは.
<https://www.wdb.com/kenq/dictionary/absorption-photometer> (参照 2023-07-03)
- 3) Jeong-Eun Hyun^{1, 2} and Sun-Young Lee^{corresponding author} (2021) Comparison of measurement methods at determining the target sites injured by antimicrobials in Escherichia coli O157 : H7 using metabolic inhibitors. Food Sci Biotechnol. 2021 Aug ; 30 (8) : 1117-1127.
- 4) デンキシコレート寒天培地（大腸菌群） https://as-kitchen.as-1.co.jp/shop/pages/ip_02.aspx
- 5) Excelでの検量線作成手順 <https://bake-pito.hatenablog.com/entry/2020/09/27/215547>