

VII-14

コロニーハイブリダイゼーション法を用いた
レジオネラ生菌の定量的検出方法に関する研究

東北大学大学院工学研究科	学生員○蒔苗靖子
東北学院大学大学院工学研究科	学生員 石神清隆
東北学院大学工学部	正会員 遠藤銀朗
東北大学大学院工学研究科	正会員 大村達夫

1. はじめに

近年、生活にとって重要な水域において、生活排水や産業廃水、下水処理水等の流入による汚濁がいたるところで見られ、それらの汚濁を受けた河川水、湖沼水やダム貯留水を水源確保上生活用水や修景用水として利用せざるを得ない状況が生じてきている。そのような汚濁を受けた水には、病原性を持つ微生物が含まれている可能性も考えられる。このような病原微生物数の指標として現在は、水中に存在する大腸菌群数を用いている。しかし、大腸菌よりも消毒に対する抵抗力の強い微生物、しかも感染症を引き起こす原因となる病原微生物が存在するかどうかについては、詳しい調査がなされていないのが現状である。また、現在用いられている病原微生物の検出方法では、用廃水中に生存している病原微生物の有無を確実に評価することは、困難である場合が多いと考えられる。

水中の病原微生物の存在を検知する方法の開発、及びそれらを用いた水の検査は、水の衛生工学的安全性を確保する上で欠かすことはできない。そこで、本研究では日和見感染微生物である *Legionella pneumophila* を代表的モデルケースとして、環境水中に増殖可能な状態で生存しているこの細菌を、選択培養法と分子生物学的手法であるコロニーハイブリダイゼーション法を組み合わせることによって定量的に検出することを試みたので報告する。

2. 材料と方法

- (1) 供試菌株：検出対象とした病原細菌として *Legionella pneumophila* Type Strain ATCC33152 を用いた。また、本研究における検出法の、この細菌に対する特異性を検討するための対象菌株として *Escherichia coli* と *Pseudomonas putida* の2種類の菌を用いた。
- (2) DNAプローブ：*L. pneumophila* を BCYE α 寒天培地上で2日間純粋培養し、BCYE α 寒天培地上に形成されたコロニーを白金耳でかき取り TE に懸濁した。その懸濁液から染色体 DNA を回収し、Lmp-1 プライマー（5'-GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3'）と Lmp-2 プライマー（5'-GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG-3'）を用いた PCR 増幅によって *L. pneumophila* の種特異的塩基配列である *mip* 遺伝子を増幅した。そこで得られた PCR 産物をランダムプライミングによってジゴキシゲニン標識し、DNA プローブを作製した。
- (3) コロニーハイブリダイゼーション法による検出の特異性試験：滅菌したナイロンメンブランフィルターを BCYE α 寒天培地上に載せ、そのフィルター上に *L. pneumophila*、*E. coli*、*P. putida* の3種類の菌を直接植え付け培養した。その後、フィルターを培地から剥がし、アルカリ変性液（1M NaOH-1.5M NaCl）に浸して溶菌及び DNA の変性を行い、UV クロスリンキング（0.3J/cm²）によって DNA の固定されたフィルターを用いてコロニーハイブリダイゼーション操作を行った。ハイブリダイゼーションを行う際の条件は、ハイブリダイゼーション温度 50℃、60℃、65℃、70℃の4段階と、洗いの塩溶液濃度 5×SSC/0.1%SDS→1×SSC/0.1%SDS、1×SSC/0.1%SDS→0.2×SSC/0.1%SDS の2つを組み合わせた計8つを設定した。その後、酵素標識抗体（抗ジゴキシゲニン、アルカリフォスファターゼ結合抗体）を用いた ELISA 法によって発色させ、検出した。

キーワード：*Legionella pneumophila*、下廃水、特異的検出、生菌計数、コロニーハイブリダイゼーション

連絡先：〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 東北大学大学院 環境水質工学研究室 Tel.022-217-7483

〒985-8537 多賀城市中央1-13-1 東北学院大学 環境生物工学研究室 Tel.022-368-1115 (ex.294)

- (4) 環境水中に存在する *L. pneumophila* のコロニーハイブリダイゼーション法による検出：滅菌したナイロンメンブランフィルターを吸引ろ過器にセットし、表-1に示した試料水をそれぞれ吸引ろ過した。そのフィルターを4種の抗生物質（vancomycin, cycloheximide, colistin, polymyxin B）を添加した BCYE α 寒天培地上に載せ、（3）と同じ方法で操作を行った。ただし、ハイブリダイゼーション操作においては、ハイブリダイゼーション温度を 65℃、洗いの塩溶液濃度を 1×SSC/0.1%SDS→0.2×SSC/0.1%SDS に設定した。検出は、酵素標識抗体（抗ジゴキシゲニン、アルカリフォスファターゼ結合抗体）を用いた ELISA 法により検出を行った。

表-1 環境水試料	
流入下水	20 μ l + 精製水
	200 μ l + 精製水
	20 μ l + 精製水*
	200 μ l + 精製水*
二次処理水 及び	10 ml + 精製水
クーリングタワー水	100 ml
	100 ml *

*Positive control

3. 結果

- 本研究において開発した検出法の特異性試験の結果から、本検出法に関してはコロニーハイブリダイゼーション温度を 60℃以上を設定することで十分な特異的検出が可能であることがわかった（図-1）。また、洗いの塩溶液の濃度に関しては、温度条件ほど特異性に影響しないことがわかった。
- 本検出法を環境水に適用したところ、実験操作の際にフィルターについた傷、雑菌の繁殖による着色などの要因により、フィルター上の発色シグナルが不鮮明となり、いずれの試料においても、環境水中に生存する *L. pneumophila* の存在を確実に裏付ける定量的検出方法として評価できるまでには至らなかった（図-2）。しかし本検出法は、検出結果に画像処理を施すことなどにより、環境水中に生存する *L. pneumophila* を検出する方法として確立する可能性が期待できる。



図-1 コロニーハイブリダイゼーションによる
検出の特異性に関する実験結果
左：50℃ 5×SSC→1×SSC
右：65℃ 5×SSC→1×SSC
P: *P. putida*, L: *L. pneumophila*, E: *E. coli*

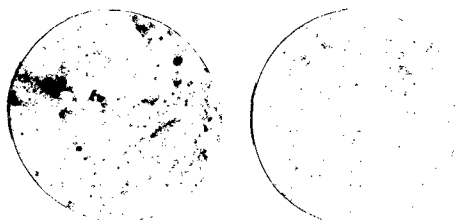


図-2 コロニーハイブリダイゼーション法を用いた
生下水中の *Legionella* の検出結果
左：生下水 20 μ l + *L. pneumophila*
右：生下水 200 μ l + *L. pneumophila*

4. おわりに

本研究において用いたコロニーハイブリダイゼーション法は、更なる改良により、今後の検出技術の開発にとって重要な基礎技術になることが期待される。そのために、標的となる *L. pneumophila* に対する選択性をより高めるため、下水等の試料に酸処理、熱処理等の前処理を行うこと、ハイブリダイゼーション操作前の培養段階で培地に添加する抗生物質の種類と濃度を増加させることなどによる改善が考えられる。また、酵素標識抗体による検出法に発光基質を導入することで、発色シグナルの鋭敏化を図ることも有効な方法と考えられる。