

VII-58

コロニーハイブリダイゼーション法による *Legionella* 菌の
定量検出における最適条件の検索

東北大学大学院工学研究科 学生会員 ○蒔苗靖子
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

近年世界中で、人口増加に伴う水資源の枯渇化が深刻な問題として取り上げられている。そのような状況の中で、現在我々が生活する上で必要な水資源を確保するために、一度利用された生活用水や産業用水等を再利用するための水利用システムが開発されている。しかし現在のところ、その水処理システムで処理された下水は、まだ人々に悪影響を及ぼすと考えられている化学物質や、塩素消毒に強い耐性を持ち、かつ感染症の原因となり得る病原微生物の混入など数々の問題点を残しており、人々が生活する上で必要とされる安全性を完全に約束できるものとはなっていない。そのうちの病原微生物に関しては、下水をはじめとした環境水中での存在数が他の大腸菌などに比べ極めて少なく、また少数で人々に感染症を引き起こす恐れのあるような病原微生物に対しては、その検出方法により高い感度が要求されるため、正確な定量検出が困難となっている。したがって、そのような病原微生物を対象とした確実な定量的検出方法の開発が必要であると思われる。また特に日本では現在、既に高齢社会となっており、将来、感染症に対する抵抗力の弱い人々が増加することが予想される。したがって、日和見感染微生物による感染症の流行も避けては通れない深刻な問題の一つである。そのようなことから、我々は再利用する水をより安全なものとするために、また再利用することによって起きる可能性のあるこれらの問題を予防するためにも、病原微生物に対するより正確な定量的検出方法が必要不可欠なものとなると考えた。

そこで我々は、その中でも環境中に特に広範囲に存在し、我々の最も身近に存在すると思われる、日和見感染微生物の一つである *Legionella pneumophila* を検出の対象とした。そして、*L. pneumophila* が特有に持つ遺伝子断片を、コロニー

ハイブリダイゼーション法を用いて探し出すことにより同定し、発色されたコロニー数を数えることにより定量を行った。そこで我々は、最も *L. pneumophila* を正確に定量できると思われる最適条件を統計的な解析を行うことにより検索した。

2. 実験方法

実験は図-1に示した手順で行い、使用菌株は *Legionella pneumophila* Type Strain ATCC 33152（理化学研究所 JCM No.7571）を用いた。

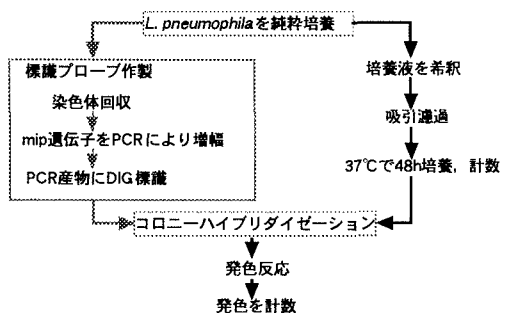


図-1 実験手順の流れ図

試料の作成

L. pneumophila をBCYE α 液体培地に植菌し、約48時間培養する。その培養液を、適当な希釈率まで希釈し、それを試料とした。

DNA プローブの作製

L. pneumophila をBCYE α 寒天培地を用い、37℃のインキュベーターの中で約48時間培養を行う。培養して得られた *L. pneumophila* をTE(1M Tris, 10mM EDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H₂O)に1.5mlのマイクロチューブの中で懸濁し、染色体DNAを回収した。そして、*L. pneumophila* の特異的塩基配列断片を増幅するために、以下に示す2種類のプライマーを用い、アニーリング温度50℃のPCR法（Polymerase Chain Reaction method）によって増幅させた。

Key Words : 病原微生物, ハイブリダイゼーション, 定量的検出, コロニー計数

東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉06 ☎022-217-7484

Lmp-1 5'-GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3'
(部位 1465bp ~ 1484bp)
Lmp-2 5'-GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG-3'
(部位 853 ~ 872bp)

増幅された *L. pneumophila* 特異的塩基配列の部位をジギキシゲニン標識し、発色反応のためのプローブとした。

次に、吸引ろ過を行うことにより直径47mmのプラスチックチャージされているナイロンメンブランフィルターの上に、水中に存在する *L. pneumophila* を捕らえる。そのフィルターをBCYE α 寒天培地に張り付け、*L. pneumophila* の培養条件と同じ、37℃、約48時間の培養を行い、フィルター上にコロニーを形成させる。

ハイブリダイゼーション

フィルターを0.5M NaOHの強アルカリ溶液に浸し、2本鎖DNAを1本鎖にし、UV クロスリンクさせる (0.3J/cm²)。そこでDNAがフィルターに固定されたものを用いてハイブリダイゼーションを行うのだが、ハイブリダイゼーション法は、ハイブリダイゼーション温度と、プローブを洗い落とすときの塩溶液の塩濃度によって検出結果が左右されることが知られている。したがって、我々は5通りのハイブリダイゼーション温度と2通り塩溶液濃度を組み合わせた10通りの条件を設けた（表-2）。また、その一つの条件につき10枚の検出結果を記録し、最も最適と思われる条件を選択するために、統計的な有意差を見ることを試みる。

表-2 ハイブリダイゼーションの設定条件

温度	塩溶液濃度
60℃	a: 5×SSC/0.1%SDS, 1×SSC/0.1%SDS
62℃	
65℃	
68℃	b: 2×SSC/0.1%SDS, 0.2×SSC/0.1%SDS
70℃	

3. 結果と考察

今回の実験の結果では、*L. pneumophila* を正確に定量検出するためのコロニーハイブリダイゼーション温度および塩溶液濃度の条件についてそれぞれ統計的解析を行った結果を一部示す（図-2, 3）。これらの結果から、それぞれの条件に有意差が見られることが明らかとなった。そしてこの有意差

は、温度および塩濃度の条件が適切でないときに見られる、コロニーではない発色スポットをカウントしてしまったことからなる差である。条件が適切でないと、実験操作中にフィルターに付着した *L. pneumophila* のDNAが、塩溶液によって十分洗い流されずに残ってしまうことが原因であると思われる。

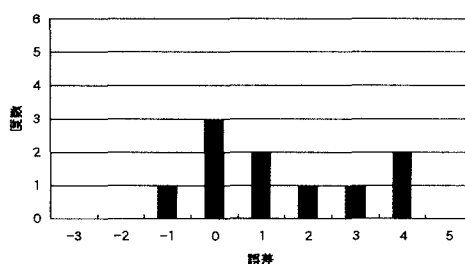


図-2 統計的解析の結果（60℃，条件 a）

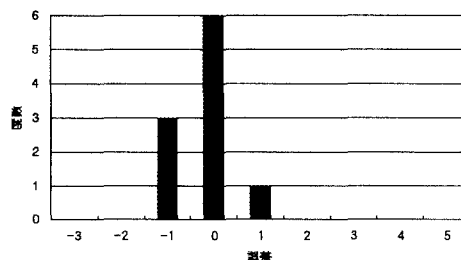


図-3 統計的解析の結果（62℃，条件 b）

4. おわりに

今回の実験から、ハイブリダイゼーション法を用いた *L. pneumophila* の正確な定量に、最も適すると思われる条件が明らかとなった。しかしこの定量方法を下水をはじめとした様々なサンプルに適用し、より実用的なものとするために、今後は他の微生物との混合系で実験を行う必要がある。*L. pneumophila* は、他の微生物よりも増殖速度が遅く、存在数が少ないため、表面積の限られた培地上でそのまま *L. pneumophila* を優先的に増殖させることが困難である。今後の我々の研究課題として、*L. pneumophila* に対する選択性を高める手法を考案中である。

<参考文献>

蒔苗靖子, 石神清隆, 遠藤銀朗: 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, 土木学会第53回年次学術講演会概要集, Vol. 7, pp. 28 ~ 29, 1998