

分子生物学的手法を用いた生存レジオネラ菌の
定量的検出方法に関する研究

東北学院大学工学部 学生員○石神清隆
東北学院大学工学部 学生員 蒔苗靖子
東北学院大学工学部 正会員 遠藤銀朗

【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、水源確保の必要上生活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ある。このような病原性微生物数の指標として現在は、水中に存在する大腸菌群の数をを用いている。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病原微生物が存在しているかどうかについては、詳しい調査がなされていない。また、現在我々が用いている病原微生物の検査方法では、用廃水中に存在する病原微生物の存在の有無を確実に評価することは、困難であると考えられる。

水環境の衛生工学的安全性について考えるとき、現在進行している水質汚濁は重大な問題を提起している。水中の病原微生物の存在を検知する方法の開発とそれによる水の検査は、水の衛生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取り上げ、環境水中に生存しているこの細菌を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：検出の対象とする病原細菌として *Legionella pneumophila* Type Strain ATCC 33152 を用いた。また、本研究で開発を試みた検出法の、この細菌に対する検出の特異性を検討するための対照菌株として *Escherichia coli* と *Pseudomonas putida* の2つの菌を用いた。
- (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とってTTEに懸濁することで、細菌懸濁液を得た。これから染色体DNAを回収し、Lmp-1プライマーとLmp-2プライマーを用いたPCR増幅によって *L. pneumophila* 特有の遺伝子配列である *mip* 遺伝子を特異的に増幅した。その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することで、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に関する試験：コロニーハイブリダイゼーションに用いるメンブランフィルターには、BCYE α 寒天培地上に滅菌したメンブランフィルターを載せ、その上から *L. pneumophila*、*E. coli*、*P. putida* の3種の菌を直接植え付けて培養することで菌を付着させた。その後、このフィルターを強アルカリ性の変性液（1M NaOH-1.5M NaCl）に浸して溶菌とDNAの変性を行い、UVクロスリンクによってDNAをフィルター上に固定した。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50℃、60℃、65℃、70℃の4段階と、洗いの際の洗浄液の塩濃度の条件を5×SSC/0.1%SDS→1×SSC/0.1%SDS、1×SSC/0.1%SDS→0.2×SSC/0.1%SDSの2種類を、それぞれ組み合わせた計8つの

条件を設定した。検出は、酵素標識抗体（抗ジゴキシゲニン、アルカリホスファターゼ結合抗体）を用いたELISA法による発色反応によって行った。

- (4) コロニーハイブリダイゼーション法を用いた環境水中の *Legionella* の検出: ハイブリダイゼーションに用いるメンブランフィルターは、滅菌したメンブランフィルターを吸引ろ過器にセットし、試料水を吸引ろ過し、そのフィルターを vancomycin 他4つの抗生物質を添加したBCYE α 寒天培地に載せて培養することで菌を付着させたものを用いる。ハイブリダイゼーション操作については、ハイブリダイゼーション温度を65℃、洗いの際の洗浄液の塩濃度の条件を1×SSC/0.1%SDS→0.2×SSC/0.1%SDSに設定し、その他は(3)に示した方法と同様に操作を行った。検出は、酵素標識抗体（抗ジゴキシゲニン、アルカリホスファターゼ結合抗体）を用いたELISA法による発色反応によって行った。

【3. 結果】

- 1) 本研究において開発した検出法の特異性に関する試験から、本検出法においてはハイブリダイゼーション温度を60℃以上に設定することにより、十分な特異的検出結果が期待できることがわかった。洗いの条件に関しては、温度条件ほど検出結果の特異性に影響しないことがわかった(図1)。
- 2) 本検出法を環境水に対して適用したところ、代表例として図2に示した生下水に対する検出結果から知られるように、発色シグナルが不鮮明であるなどのことから、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な検出法として評価できるまでには至らなかった。しかし、検出結果に画像処理等を付加することなどによって、本検出法を *L. pneumophila* の存在を裏付けるための検出法として確立できることが期待できる。



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: 65℃ 5×SSC→1×SSC

右: 65℃ 1×SSC→0.2×SSC

いずれも上から時計回りに *P. putida*, *L. pneumophila*, *E. coli*

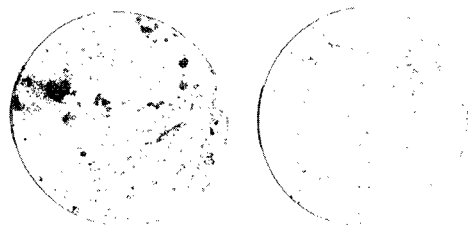


図2 コロニーハイブリダイゼーション法を用いた
生下水中の *Legionella* の検出結果

左: 生下水20μl + *L. pneumophila*

右: 生下水20μl + *L. pneumophila*

【4. おわりに】

本研究において開発されたコロニーハイブリダイゼーション法は、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。今後は、ハイブリダイゼーション操作を行う前の培養の段階での選択性の向上、すなわち抗生物質の添加濃度の増加、試料の酸処理等による前処理、培養温度の上昇などについての検討、ならびに酵素標識抗体による検出への発光基質の導入による検出シグナルの鋭敏化についての検討を行うことが必要と考えられる。