

VII - 4

Legionella pneumophila の分子生物学的手法を用いた 定量的検出方法の開発

東北大学大学院 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 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日本全国で普及しつつある。しかしそこで処理された下水では現在のところ、まだ人々に悪影響を及ぼすと考えられている化学物質、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、特に下水中に存在しているが、その存在数が他の大腸菌などに比べ極めて少なく、増殖速度が遅い微生物もあり、これまで一般的に行われている検出方法では検出が困難であり、そのような病原微生物を対象とした新しい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、これから高齢者のような感染症に対する抵抗力の弱い人々が増加することがわかっている。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検出方法、および定量方法が必要不可欠なものとなると考えた。

そこで我々は、この日和見感染微生物の一つであり、その中でも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 *Legionella pneumophila* を選択した。そして、人々に深刻な感染症を引き起こす病原微生物の定量的検出方法の開発を試みた。

2. 実験方法

実験は図-1 に示した手順で行い、使用菌株は

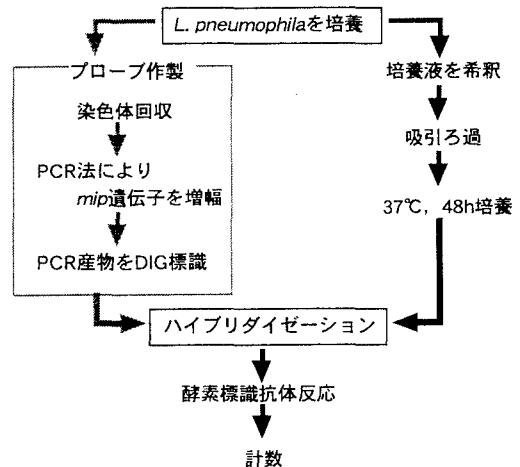


図-1 実験手順の流れ図

Legionella pneumophila Type Strain ATCC 33152（理化学研究所 JCM No.7571）を用いた。

試料の作成

L. pneumophila を BCYE α 液体培地に植菌し、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48時間培養を行う。培養して得られた *L. pneumophila* を TE(1M Tris, 10mM EDTA・2Na・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。

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ゴキシゲニン標識し、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℃、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、統計的な有意差をとることを試みる。

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
62℃	1×SSC/0.1%SDS
65℃	
68℃	b: 2×SSC/0.1%SDS
70℃	0.2×SSC/0.1%SDS

3. 結果と考察

今回の実験の結果では、*L. pneumophila* を検出するための、コロニーハイブリダイゼーション温度や、塩溶液濃度の条件の善し悪しによらず、フィルターの背景にも発色が見られた。これは、強アルカリ溶液で二本鎖DNAを一本鎖に変性し溶菌する際に流されたDNAが、コロニーを形成している場所とは違った場所に付着し、固定されてしまい、その部分にもプローブがハイブリットを形成してしまった結果であると考えられる(図-2)。

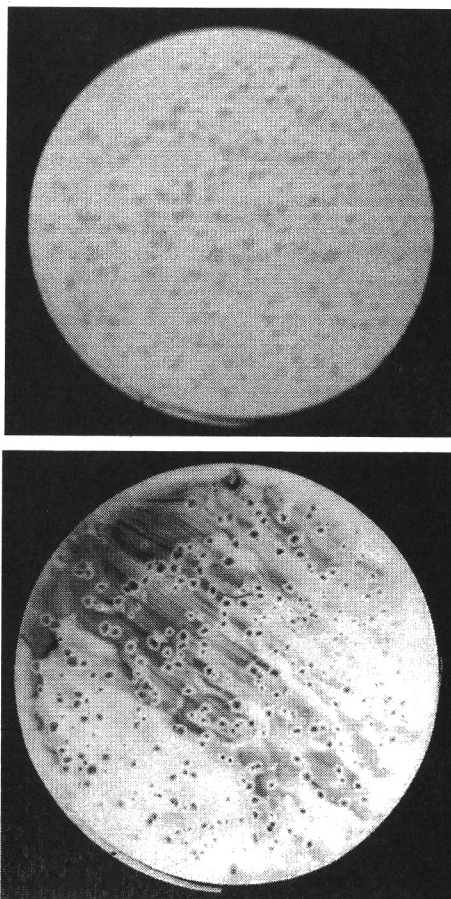


図-2 検出結果

上：培養結果の写真 下：検出結果の写真

4. おわりに

今回の実験から、今後の我々の研究課題としてこの問題を解決するため、*mip* DNA プローブを、コロニーを形成した *L. pneumophila* のDNAに対してのみハイブリットを形成させることである。強アルカリ溶液で変性させる際の溶菌の残渣をフィルターに付着固定させないように、コロニーを形成させた時点で、フィルターを完全にマスキングするための操作として、プラスにチャージしているフィルターの表面をマイナスにチャージさせ、マイナスにチャージしているDNAを反発させる方法を考えている。

<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