

VII - 5

下水中における *Legionella pneumophila* の
分子生物学的手法による定量的検出に関する研究

東北学院大学工学部 学生員○斎藤 公利
東北学院大学工学部 佐々木こずえ
東北学院大学大学院 学生員 石神 清隆
東北学院大学工学部 正会員 遠藤 銀朗

1. はじめに

近年、環境問題への関心は以前よりも増し高まってきている。それは地球環境から地域環境までを含む広範囲にわたって、大気、土壌、河川、湖沼、海域などにさまざまな環境問題を抱えているためである。生物の生活にとって重要な水域においても、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や湖沼水、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。しかし現在我々が用いている上下水処理方法によって、全ての汚染を健康上安全なレベルまで取り除くことができていないのかどうかは確認されていない。上記のような汚濁水の中には感染症を引き起こす病原性微生物が含まれているのではないかと、ということも考えられる。このような病原微生物の存在は、水環境の衛生工学的安全性に関して、重大な問題を提起していると言える。

本研究では、日和見感染菌である下水中に生残する *Legionella pneumophila* を代表的モデルケースとして、この日和見感染菌を分子生物学的に定量検出することを試みた。また、その定量検出手法によって水環境の衛生工学的安全性を評価する方法を確立することを目的とした。

近代の著しい科学技術の進歩は生命科学分野においても例外ではなく、それは生命の神秘に直結する遺伝子DNAの組み換え実験にまで発展した。本研究でもこのような分子生物学的方法を駆使して病原生物細胞を遺伝子レベルで検出することを試み、この実験手法の1つであるDNAプローブ法を採用した分子生物学的検出法を用いて、高感度かつ定量的に病原微生物を検出する方法の開発を行った。*L. pneumophila* は、染色体に *mip* 遺伝子という種特異的な部位が含まれ、これが *L. pneumophila* の人体感染という特性をコードしている。このことより、*L. pneumophila* を検出するためにはこの遺伝子部位をDNAプローブによって検出するのが最も適切であると考えられる。

本研究では、*L. pneumophila* の種特異的遺伝子配列である *mip* DNA をプローブにして使用したコロニーハイブリダイゼーション法を用い、この手法の適用の妥当性と信頼性がどの程度であるかを調べることで、実際の下水中の *L. pneumophila* を定量検出する上での有効性・実用性を明らかにしたので報告する。

2. 検出

1) DNAプローブ: *L. pneumophila* をBCYE α 寒天培地上で2~3日間純培養し、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TE buffer溶液に懸濁することで、細菌懸濁液を得た。これより染色体の回収を行い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プローブを作成した。

2) コロニーハイブリダイゼーション法による検出方法

(a) BCYE α 寒天培地上に吸引濾過によって表面に微生物を保持したメンブレンフィルターを載せ、それを培養してコロニーを形成させる。1.0M NaOH溶液により微生物を溶解し、溶け出したDNAを1本鎖に変成させる。メンブレンフィルターを中和液中に移し、中和する。その後、中和液中でメンブレンフィルター上の微生物分解残留物等を脱脂綿を用いて拭き取り、再度中和液によって中和する。ついで、メンブレンフィルターを4×SSC中に移して洗浄した後、ベーキング（80℃、2時間）またはUVクロスリンク（出力0.3J/cm²）を行い、変性DNAをメンブレンフィルター上に固定する。

(b) ハイブリダイゼーション液をメンブレンフィルター約100cm²あたり20ml加える。62℃のインキュベーターでプレハイブリダイゼーションを2~3時間行う。プレハイブリダイゼーションが終了した後、メ

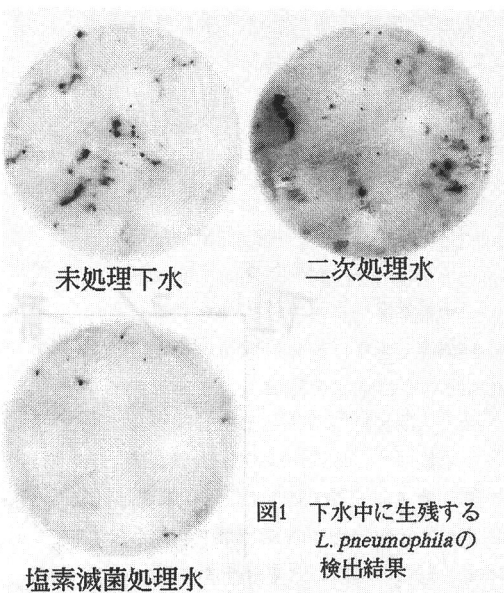
ンブレンフィルター約100cm²あたり熱変性・急冷させたDNAプローブを4 μ lをハイブリダイゼーション液に加えたものを用いて、62℃のインキュベーターで本ハイブリダイゼーションを一晩行う。

本ハイブリダイゼーション終了後ンブレンフィルターを5×SSC/0.1% SDSで5分間、1×SSC/0.1% SDSに移し62℃のインキュベーター内で10分間、振とうしながら洗浄を行う。これらの洗浄は、それぞれ2回繰り返す。Buffer1で1分間振とうした後、Buffer2で30分間緩やかに振とうする。抗体 (DIG-DNA Labeling and Detection Kit Vial 8, Boeringer Mannheim) をメンブレンフィルター約100cm²あたり2 μ l加えたBuffer1にメンブレンフィルターを移し、30分間緩やかに振とうする。メンブレンフィルターをBuffer3に2分間浸す。発光基質であるCSPDを1/400量加えたBuffer 3をメンブレンフィルター約100cm²あたり10ml調製しておき、メンブレンフィルター1枚あたり4ml 加え37℃で30分間インキュベートする。インキュベート後、ポリエチレンバッグを開いて試薬を捨てる。同試薬をメンブレンフィルター1枚あたり1 ml塗布し、直ちに液を捨てる。

メンブレンフィルターをポリエチレンバッグに入れてシールし、暗室中でメンブレンフィルターとX線フィルムを密着させた状態でX線フィルムカセットに挟み、3時間感光させる。感光させたX線フィルムを暗室内で現像液、固定液にそれぞれ4分間浸し、その後水道水で洗浄する。X線フィルム上に感光した黒色のスポットをハイブリダイズした検出シグナルを計数する。

3. 検出結果

本研究において開発したコロニーハイブリダイゼーション法を用いて、実際の下水中より生存している *L. pneumophila* の定量的検出を試みた。未処理下水1ml、二次処理水50ml、塩素滅菌処理水50mlの3つを右の図1に表した。発光基質を用いたmipDNAプローブによるハイブリダイゼーションの検出結果として、黒色スポットを検出することができ、*L. pneumophila*のコロニーをカウントすることができる。図1の未処理下水では59cells、二次処理水では49cells、塩素滅菌処理水には26cellsのコロニーが確認された。これらの検出データをまとめると、未処理下水より5900Cells/l、二次処理水より49cells/l、塩素滅菌処理水より26Cells/lの *L. Pneumophila* のコロニーが検出された。このことから、本研究で開発した手法は、未処理下水及び処理下水中に生残する *L. Pneumophila* の定量的検出が可能であると評価できる。また、このコロニーハイブリダイゼーション法は、*L. pneumophila*の生死判別にも利用可能と考えられる。これらのことにより、本研究によって下水中に生残する *L.pneumophila* の定量的検出手法が確立できたと言える。



4. おわりに

本研究において開発し成果を上げたコロニーハイブリダイゼーション法を用いて、下水中に生残する *L.pneumophila* の定量的検出手法が、確立できたと言えよう。今後この研究で開発した手法が環境・衛生工学分野において生存し感染力をもった病原性微生物の基礎検出手法として活用できることが期待される。