

VNC 状態の大腸菌計測方法の研究

八戸高専 正会員 矢口 淳一 池田 義嗣
工藤 栄一 中山 雄介
類家 翔

1. はじめに

水環境や水道水、排水中に活性のある微生物がどれだけ存在しているかは衛生学上非常に重要なポイントである。従来微生物の存在量は、寒天培地を使用した平板培養法などによって測定されてきた。しかし、最近水環境中には生存しているものの培養できない状態 (Viable but nonculturable; VNC) にある細菌が少なからず存在することが明らかになってきた。このような VNC 状態にある細菌類は従来の手法では計数できず、存在する細菌数を過小評価してしまう。また平板培養法は長期の培養期間が必要で、より迅速な検出法が求められている。本研究では、近年著しく発展している分子生物学的手法を糞便汚染の指標である大腸菌に適用して、遺伝子レベルで大腸菌のみを特異的に検出する方法を開発する。遺伝子レベルの解析は、大腸菌に特異的な塩基配列を利用することにより選択培地が変わる大腸菌の新しい検出方法を提案できる。また活性のない細菌のみを攻撃する試薬を用いることにより、VNC 状態の大腸菌を選択的に検出する方法を検討する。

2. 実験材料および方法

2-1 実験材料

理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichiacoli*(JCM1649^T)を購入して実験に用いた。全菌数測定のために使用した蛍光試薬は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(和光純薬)で、活性のある菌とない菌を区別するためには PMA(propidium monoazide)(Biotium 社)を使用した。

2-2 実験方法

大腸菌の培養 大腸菌を LB 液体培地を使用して一晩 37 °C で振とう培養した。極少量の培養液を新しい LB 液体培地に添加してさらに数時間培養した。培養液の全菌数はポリカーボネイトフィルターにろ過捕集後、蛍光染色剤 DAPI 溶液で染色し落射蛍光顕微鏡で計数した。生菌数は LB 寒天培地を使用して平板培養法で計測した。細菌の不活化は熱処理 (80 °C, 10 分間)で行い、LB 寒天培地で処理液を 1 週間 20 °C で平板培養して確認した。

PMA 処理 光照射時間実験では大腸菌 DNA 抽出液 (1.2×10^4 cfu/tube) 混合実験では培養液をそれぞれ 0.5mL の透明なマイクロチューブに準備し、PMA を最終濃度が 50 μ M となるように添加した後、暗室で 5 分間放置し、ハロゲン光 (300 ~ 500W) を照射した。照射中チューブは氷の中で冷却した。

DNA の抽出 大腸菌培養液を遠心分離して菌体を 2 回洗浄し、菌液 10 μ L を 190 μ L の InstaGene Martix(Bio-rad 社)が入ったマイクロチューブに添加した。チューブを 56 °C で 30 分間加熱し、混合後さらに 100 °C で 8 分間加熱した。混合して遠心分離し、上澄み液を PCR 反応に用いた。また混合実験では DNeasy blood and tissue kit (Qiagen 社)を使用して DNA を抽出した。手法はグラム陰性菌のプロトコール¹⁾に従った。

リアルタイム PCR 大腸菌の選択的検出に使用される グルクロニダーゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、リアルタイム PCR 反応を MiniOpticon システム(Bio-rad 社)で行った。用いたプライマーとプローブ²⁾を表 - 1 に示した。PCR 反応は、iQ Supermix(Bio-rad 社)を使用して、プライマーとプローブ濃度は表 - 1 に示したように調整した。温度条件は、95 °C で 10 分間熱変性させた後、(95 °C : 45s, 60 °C : 1min) のサイクルを 40 回繰り返した。

表 - 1 使用プライマーの塩基配列

| | プライマー | 塩基配列(5'-3') | 濃度 (nM) |
|----------------|-------|---|---------|
| Forward primer | 784F | GTG TGA TAT CTA CCC GCT TCG C | 900 |
| Reverse primer | 866R | AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA | 300 |
| Probe | EC807 | FAM ^b -TCG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T-TAMRA ^c | 200 |

3. 結果及び考察

3-1 DNA 定量実験

まず、リアルタイムPCRで大腸菌が計数できるか検討するため、大腸菌の生菌数が $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ cfu/tube となるように調整してPCR反応を2回行った。生菌数が 1×10^0 cfu/tube の場合は検出できなかったため、そこが検出限界と思われる。図-1には、生菌数とDNA増幅が検出されたサイクル数 $C(t)$ の関係を示した。検量線の傾きからDNAの増幅効率(E)が求められる。増殖効率と決定係数は以下のようになり、実験2の方が増幅効率も100%に近く

実験1: $E = 1.067$, %効率 = 106.7%, $R^2 = 0.9829$

実験2: $E = 1.043$, %効率 = 104.3%, $R^2 = 0.9944$

また決定係数も高かった。これらの検量線を使えば、サイクル数から生菌数が求められ、従来のように平板培養法で24時間培養しなくても数時間で生菌数が決定できる。

3-2 光照射時間実験

活性のある菌と不活性の菌を区別できるPMA試薬は、DNAと結合して光と反応するとDNAを固定化し、PCR反応でDNAが増幅できなくする。そこで実験1として抽出した大腸菌のDNAにPMAを添加してハロゲン光(300W)を照射し、DNA固定化に必要な照射時間を検討した。実験1の結果を図-2に示した。照射時間が増加するにつれ、DNA増幅が検出されるサイクル数 $C(t)$ が増大し、照射時間5分でほぼ一定となった。光照射時間実験2では、まずPMAのみにハロゲン光を照射し、その後大腸菌DNAと混合して10分間光照射した後PCR反応を行った。その結果を図-3に示した。図から照射時間10分のところでサイクル数がPMA無添加のコントロールと同じになり、その後ほぼ一定になっている。このことからPMA試薬単体に10分光を当てると、不活性化し試薬としての機能が消えDNAとの反応が起きなくなることが分かった。

3-3 混合実験

活性のある大腸菌に熱処理した菌体を表-2のように混合し、PMAで処理して活性のある菌のみを検出できるか検討した。図-4に実験番号(混合割合)とDNA増幅が検出されるサイクル数の関係を示した。活性のある大腸菌量の減少に伴って、サイクル数が増加していく傾向は認められるが、指数関数的に減少している活性のある菌量に比較して顕著ではなく、熱処理菌体のみの実験()との差もあまり大きくなかった。

4. まとめ

大腸菌に特異的な塩基配列を用いてリアルタイムPCRを行うことで、大腸菌の生菌数を迅速に定量できることが分かった。定量範囲は $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ cfu/tube であった。また活性の有無を区別できるPMA試薬は光照射10分間でDNAを不活化でき、またPMA試薬自身も不活性化される。

参考文献 1) Qiagen; DNeasy Blood & Tissue Handbook ,p44 (2006)

2) E. Frahm&U.Obst;J.Microbid.Methods,Vol.52,p123~131(2003)

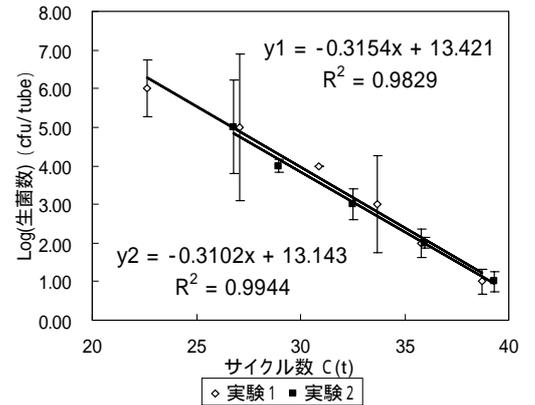


図-1 大腸菌生菌数と $C(t)$ 値の関係

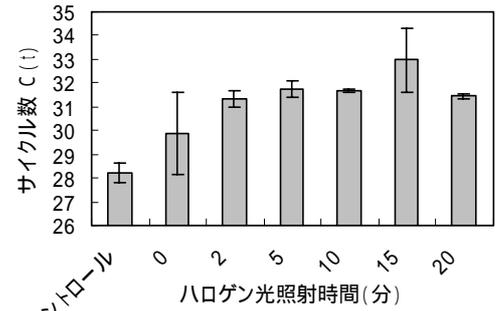


図-2 光照射時間実験1の結果 (光照射によるDNAの不活化)

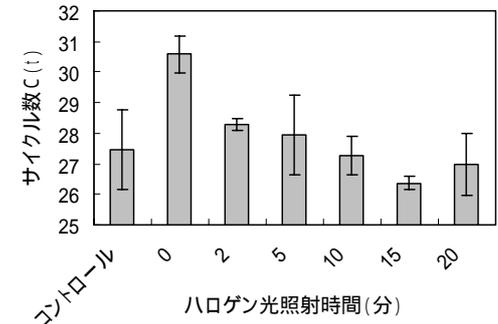


図-3 光照射時間実験2の結果 (光照射によるPMAの不活化)

表-2 混合実験大腸菌体液量の割合

| 実験番号 | | | | | |
|----------------------|------|-----|-----|-----|------|
| 活性のある菌体液量 (μ L) | 1000 | 100 | 10 | 1 | 0 |
| 熱処理菌体液量 (μ L) | 0 | 900 | 990 | 999 | 1000 |

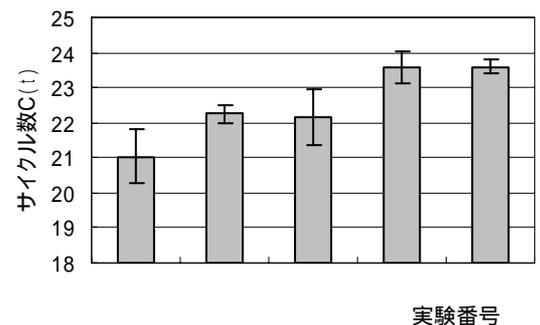


図-4 混合実験の結果