

(20) PCR法による下水中の日和見感染菌の定量的検出に関する研究

Study on Quantitative Method for Detection of Opportunistic Infection Bacteria
in Sewage by Polymerase Chain Reaction.

遠藤銀朗*、木村陽平*、梅沢裕美*、加藤勇*

Ginro ENDO, Yohei KIMURA, Hiromi UMESAWA, Isamu KATO

ABSTRACT; Reuse of treated wastewater has been generalized especially in urban area. Under this situation, water quality of reclaimed wastewater is requiring new standard on health related microorganisms. Actual pathogenic microorganisms have been interested by hygienists and sanitary engineers. However, another important attention should be taken for opportunistic infection, because an unspecified number of people including handicapped persons in health are eventually exposed to water born opportunistically infectious microorganisms.

In this paper, the authors present new detection method of sewage *Legionella pneumophila*, which is an important waterborne opportunistic-infection bacteria and causes legionnaire disease. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA-DNA hybridization methods were employed to detect *L. pneumophila* and PCR method was improved to be applied to quantitative detection of *L. pneumophila*. The results from PCR-DNA hybridization test show the possibility that *L. pneumophila* survives through secondary sewage treatment and disinfection process. For sewage sample, conventional selective media method for *L. pneumophila* are not available. The experimental data of PCR-MPN for *L. pneumophila* shows good correlation to the enumeration data obtained by fluorescence stained direct count of this bacteria.

Key words; Opportunistic infectious microorganism, *Legionella pneumophila*, polymerase chain reaction, PCR-MPN, DNA hybridization, sewage.

1. 序論

水資源の有効利用と水辺環境の創造のために、都市下水や産業廃水等の処理水の再利用が検討され、既に一部ではこのような利用が実施に移されつつある。その場合には従来とは違った観点から水の安全性を評価することが必要と考えられる。これまでの廃水処理に於いては、処理水は直接不特定多数の人間に触れることはなく環境の水域に放流され、一旦自然界を経由した後に人間社会に循環されることが殆どであった。しかし、下・廃水の処理・再利用では生活または環境創造のための用水として直接人間社会に戻されて利用されるため、不特定多数の人間がこのような水に直接接触する機会が増えることになる。

これまで用水や環境水の安全性は指定された病原体の存在の有無によって評価され、それによって人間に対する健康障害はほぼ完全に予防されてきた。しかし、修景や水辺アメニティー創造のための処理廃水の再利用や生活雑用水としての再利用では、健康弱者に対する平素無害菌による発病の問題すなわち日和見感染の問題が無視できなくなることが考えられる。特に、今後高齢者人口比率の増大が見込まれるわが国においては、このことと水利用形態の変化との両面から日和見感染菌の問題が重要視されるようになって考えられる。

*東北学院大学工学部土木工学科 (Dept. of Civil Eng., Tohoku Gakuin University)

本論文では、このような日和見感染菌の例として*Legionella pneumophila*（在郷軍人病菌）を取り上げ、高感度な検出を可能とするPolymerase Chain Reaction 法（PCR法）¹⁾をさらに定量的な方法にすることを可能にするPCR-MPN法による定量的検出²⁾の適用について検討した。また、下水中の*L. pneumophila*を検出するためのPCR法とDNAハイブリダイゼーション法の組み合わせによる有効な検出方法の開発を試みた。これによって開発できた方法を用いて下水処理工程においてこの日和見感染菌がどのような挙動を示すかについて調査し、処理工程の最終段階においても生残している可能性を示唆する結果を得たので報告したい。

2. 実験材料および方法

(1) 供試細菌

American Type Culture Collection (ATCC) に登録保存されている*L. pneumophila*のtype strain (ATCC 33152株) および同細菌の ATCC 33153株³⁾。

(2) 使用培地⁴⁾

*L. pneumophila*の純粋培養のために用いたBCYE- α 平板および液体培地の成分はTable 1に示した通りである。また、下水を試水として*L. pneumophila*を選択的に培養して検出することを試みるために、上記Table1の培地にvanco- mycin (0.50 μ g/ml)、cycloheximido (80 μ g/ml)、colistin (16 μ g/ml)、polymixin B (50 units/ml)の4種の抗生物質を加えたBCYE- α 選択平板培地を用いた。

(3) 供試下水

下水処理場における、流入下水、最初沈殿池越流水、活性汚泥（曝気槽混合液）、最終沈殿池越流水、および塩素消毒放流水の5試料を採取して、*Legionella pneumophila*のモニタリングを行った。

(4) PCRによる*L. pneumophila*に特異的なDNA領域を増幅するためのプライマー

*L. pneumophila*のみに特異的に存在が認められておりこの細菌がヒトの大吃細胞（マクロファージ）に寄生する際に必要とされるタンパク質(Mip)の構造遺伝子であるmipの特定領域を、PCR法によって増幅するためにTable 2に示したDNAプライマーを用いた⁵⁾。これらのプライマーは宝酒造に依頼してホスホロアミダイト法によって化学的に合成したものである。

(5) 染色体DNAの抽出回収

液体培養によって培養した*L. pneumophila*を遠心分離によって集菌し、50mM Tris-EDTAに懸濁した後、リゾチーム処理、プロテナーゼ処理、フェノール／クロロホルム処理をし、エタノール沈殿によって染色体を含む核酸成分を回収した。さらにRNaseで処理し、フェノ

Table1 Medium contents of BCYE- α for *Legionella* Cultivation.

Ingredient	Concentration(g/100mL)
Legionella CYE Agar Base:	
Activated Charcoal	0.2
Yeast Extract	1.0
Agar	13.0
BCYE Growth Supplement:	
ACES Buffer/Potassium Hydroxide	1.0
Ferric Pyrophosphate	0.025
L-Cysteine HCl	0.04
α -Ketoglutarate	0.1

Table2 Specific DNA primer for the PCR detection of *Legionella mip* DNA.

Primer Lmp-1
Position 1465bp-1484bp (Reverse primer)
Nucleotide Sequence 5' $\rightarrow$ 3'; 5' - GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3'
Primer Lmp-2
Position 853bp-872bp (Forward primer)
Nucleotide Sequence 5' $\rightarrow$ 3'; 5' - GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG -3'

ール／クロロフォルム処理とエタノール沈殿を行うことによって染色体を回収した。

(6) PCR—DNAハイブリダイゼーション法による増幅DNAの検出
PCR法は回収染色体をテンプレートとして同一反応セットを2回繰り返すダブルPCR法にしたがって行った。この際、2回目のPCRは1/100容の初回PCR反応液をテンプレートDNAを含む液として加えた。また、クロスコンタミネーションを防止するため反応緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ、dNTPsを含むマスターミクスチャーを用い、さらにミネラルオイルの代わりにワックス粒子を用いる方法を採用した⁶⁾。一回のPCRの温度サイクルはTable3に示したように設定した。

得られたPCR増幅液の適量をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイドによってDNAを蛍光染色してトランスイルミネーター上で紫外線を照射して増幅結果を観察した。さらに、このゲルをサザントランスファー法によってナイロンフィルターにプロットし、ジゴキシゲニンで標識したmipDNAプローブをハイブリダイズさせてアルカリフォスファターゼによる発色法によってPCR増幅された*L. pneumophila*由来のmipDNAを検出した。

(7) PCR—MPN法による定量⁷⁾
*L. pneumophila*のPCR法及びハイブリダイゼーション法による検出はFig. 1のフローにしたがって実験を行った。時間経過に伴う*L. pneumophila*の増殖をPCR—MPN法と全細菌法を用いて定量的に検出する方法の検討では、この細菌の液体培養を6時間おきにサンプリングし、3段階の10倍希釈試料を作成し各希釈試料についてPCRを5本のチューブで同時に行った。得られた増

Table 3 Thermal cycling conditions for the one set of PCR.

Program Step	Action Step	Temperature(℃)	Duration Time(min)
program-1	denature	94	1.8
	annealing	58	2.8
	extension	72	3.8
		↓	
Program-2	denature	94	0.5
	annealing	58	1.8
	extension	72	1.8
		↓	
program-3	denature	94	1.8
	annealing	58	2.8
	extension	72	3.8
		↓	
		1 cycle	

*These three programs were linked sequentially.

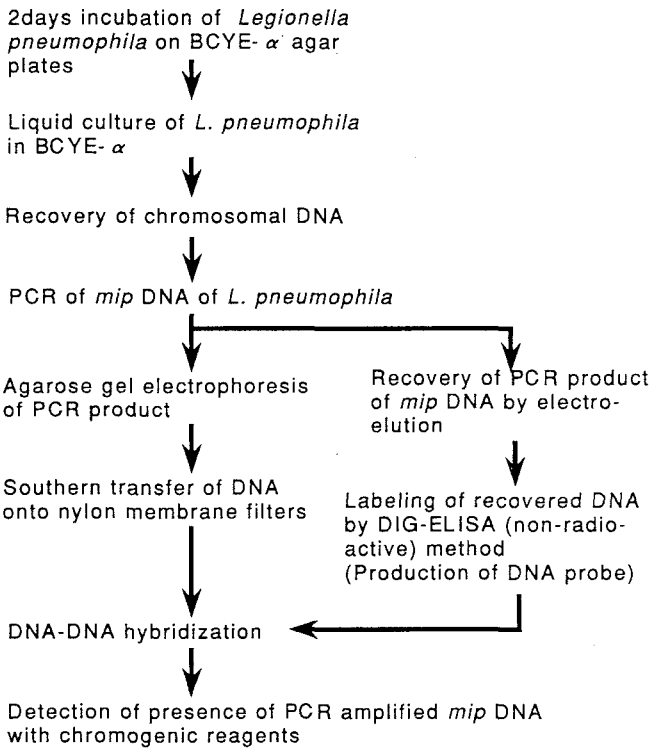


Fig. 1 Protocol for Detection of *L. pneumophila* by PCR-DNA Hybridization.

幅結果から5本法の最確数を求め、それがサンプル中の細菌数を表すものとして、時間経過に伴う*L. pneumophila*の増殖をPCR-MPN法を用いて定量的に検出することを試みた。

(8) アクリジンオレンジ蛍光染色法による全細菌数の定量⁸⁾

液体培養した*L. pneumophila*を適当段階まで希釈したサンプルの適量をヌクレオポアフィルターによって吸引濾過してフィルターに固定し、アクリジンオレンジ溶液を滴下したスライドガラス上に20分おいて菌体のアクリジンオレンジによる蛍光染色を行った。余分な染色液をリンシングによって除去し、無蛍光スライドガラス、カバーガラス、イマージョンオイルによって染色フィルターをサンドイッチ状にはさみ、B励起の落射蛍光顕微鏡によって一定顕微鏡視野の細菌数を計数し、使用サンプル量等から換算した全*L. pneumophila*数を測定した。

3. 実験結果

Fig. 2に、48時間純粋培養した*L. pneumophila*から回収した染色体を、PCR法を用いて種特異的染色体遺伝子部位である*mip*DNAをLmp-1、Lmp-2の2つのプライマーによって増幅した際の増幅産物DNA断片のゲル電気泳動の結果を示した。ポジティブコントロールにおいてPCR産物のDNA断片が確認できたものの、2. (5)に示した方法で回収したDNAを鋳型とするPCRの増幅産物は、ゲル電気泳動・エチジウムブロマイド染色・UV照射による検出では確認できない程に低濃度であると考えられた。この同一ゲルを2. (6)に示した方法でサザンハイブリダイゼーションによってPCR増幅DNAを検出した結果をFig. 3に示した。この結果は、サザンハイブリダイゼーション法を用いることによってFig. 2では確認できなかったPCR増幅された*mip*DNAを高感度で検出できたことを示している。以上のことから、PCR-サザンハイブリダイゼーションによる方法は、*L. pneumophila*のDNA増幅とそのサイズを明らかにできるとともに、より高感度で確実なPCR増幅結果の判定方法として採用できると考えられる。

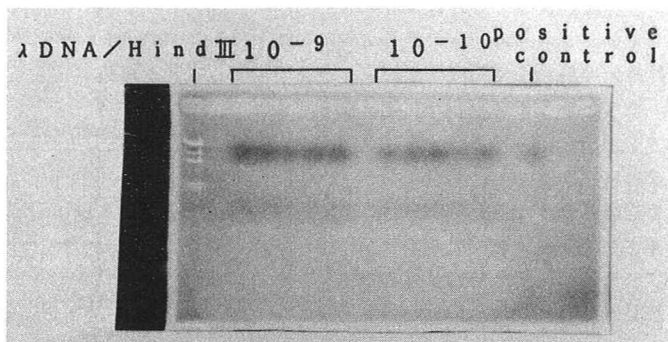


Fig. 2 Detection Result of PCR Product of *Legionella* DNA on Agarose Gel Electrophoresis.

培養時間の経過に伴う*L. pneumophila*の増殖を、2. (7)で示したPCR-MPN法によって調べた結果はTable 4に示した通りであった。培養初期のデータ(培養開始後6~18時間)は、供試培養液の希釈倍率を正しく設定できなかったために、正確なMPN計数値を得ることはならなかった。しかし、30時間、36時間、42時間、48時間培養については、希釈率を上げて実験を行ったところ、それぞれの希釈段階において十分に定量的と考えられるPCR-MPN値が得られた。

一方、2. (8)で示したアクリジンオレンジ蛍光染色全細菌計数法によって測定した各経過時間における*L. pneumophila*培養液1 ml中の全細菌数の測定結果はTable 5に示した通りであった。時間から42時間の培養においては6時間おきに約2倍ずつ全細菌数が増加していることがわかった。しかし42時間から48時間でのこの細菌の増加はあまり見られず、菌体増殖のピークは42時間を過ぎたところと考えられる。以上の結果を、ア

リジンオレンジ染色法による *L. pneumophila* の全細菌数 (AO Total Count) と PCR-MPN 法によって求められた細菌数とを対比して、図にまとめたものが Fig. 4 である。この結果より、PCR-MPN 法は AO Total Count に比べて計数値が低くなるものの、*L. pneumophila* の種特異的な定量的検出に有効であり、計数感度もほぼ満足できるものであることが知られた。AO Total Count は全ての細菌を計数できる優れた方法であるが、様々な細菌等の微生物が混在する試料中の特定の細菌を計数することには採用できないため、下水中の *L. pneumophila* の定量的な目的のためには PCR-MPN 法の適用が必要でありかつ有効であると考えられる。また、これらの結果から考察して PCR 法と DNA ハイブリダイゼーション法による *L. pneumophila* の検出限界は、*L. pneumophila* の培養液から染色体 DNA を回収して PCR 法によって増幅して検出する場合には、現在の DNA 回収方法によっては 10^2 cells/mL 前後と考えられる。PCR 法による検出限界をさらに高めるためには、DNA の抽出回収技術をさらに改良することが必要である。このような改良は、下水や環境水から *L. pneumophila* を PCR 法によって検出するうえでは特に重要と考えられる。

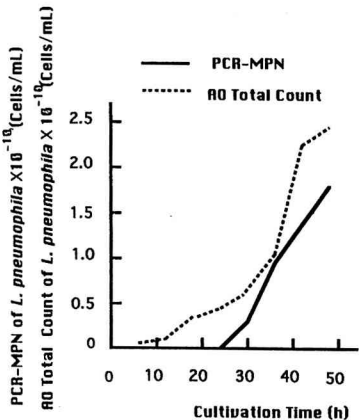


Fig. 4 Enumeration Data of *L. pneumophila* by PCR-MPN and AO Total Count.

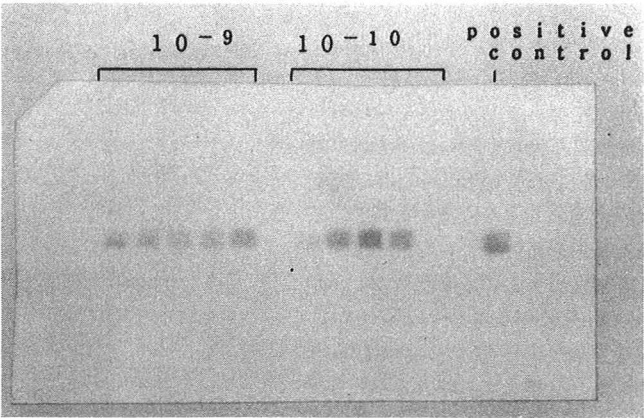


Fig. 3 Detection Result of PCR Product of *Legionella* DNA by Southern Hybridization.

Table 4 PCR-MPN of *L. pneumophila* at each cultivation time.

Cultivation Time	Detection Frequency by PCR at Each Dilution Ratio (5 tubes method)			PCR-MPN	Cells/ml
6h	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	1600<	1.6×10 ⁴ <
	+++++	+++++	+++++		
12h	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	81	8.1×10 ²
	+++++	+++++	+++++		
18h	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	1600<	1.6×10 ⁴ <
	+++++	+++++	+++++		
24h	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	33	0.33×10 ⁹
	+++++	+++++	+++++		
30h	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	350	0.35×10 ¹⁰
	+++++	+++++	+++++		
36h	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	920	0.92×10 ¹⁰
	+++++	+++++	+++++		
42h	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	1600<	1.6×10 ¹⁰ <
	+++++	+++++	+++++		
48h	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	1600	1.6×10 ¹⁰
	+++++	+++++	+++++		

以上に記した研究成果に基づいてPCR法とDNAハイブリダイゼーション法による下水中の*L. pneumophila*検出について検討した。それに先だって、下水処理場における各工程の検水を用い、存在の可能性が示唆される*L. pneumophila*を選択的に培養するため抗生物質を添加した培地を用いてこの細菌を生菌数として検出することを試みた。cephalothinを添加したものに関しては純粋分離株である*L. pneumophila*の標準株を培養しても増殖がみられず、*L. pneumophila*はcephalothin耐性でないことがわかった。vancomycinとcycloheximideの添加をベースとして、colistin、polymyxin Bを添加したものは培地上*L. pneumophila*を培養した際には増殖が見られ、下水試料をこれと同じ選択培地に塗抹した場合には種の不明な微生物の増殖が多数見られた (Fig. 5 および Fig. 6)。その結果、*Legionella*と思われるコロニーは識別できなかった。これらのことより、下水を対象とする場合には抗生物質の種類とその添加量を新たに考え直したうえで培養する必要があると考えられる。しかし、下水中に使用可能な抗生物質に対する耐性を持つ雑菌が多く存在するために、抗生物質を含む選択培地による従来の計数方法は基本的には採用し難いと考えられる。

Table 5 AO total cell count of *L. pneumophila* at each cultivation time.

Cultivation Time	Counted Cell Number	Sample Volume(ml)	Dilution Ratio	Cells/ml
6h	1.73	10	10 ⁻⁵	6.124×10 ⁸
12h	3.276	10	10 ⁻⁵	1.1597×10 ⁹
18h	8.248	10	10 ⁻⁵	2.920×10 ⁹
24h	13.09	10	10 ⁻⁵	4.633×10 ⁹
30h	17.38	10	10 ⁻⁵	6.153×10 ⁹
36h	30.646	10	10 ⁻⁵	1.0849×10 ¹⁰
42h	6.412	10	10 ⁻⁶	2.270×10 ¹⁰
48h	6.945	10	10 ⁻⁶	2.458×10 ¹⁰

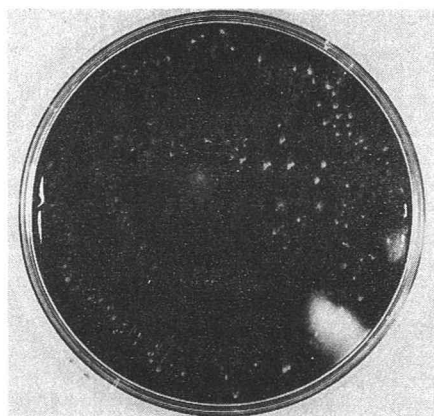


Fig. 5 Sewage Microbial Colonies formed on Vancomycin, Cycloheximide, and Colistin Selective Medium.

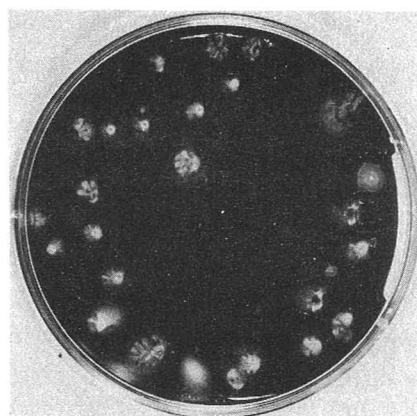


Fig. 6 Sewage Microbial Colonies formed on Vancomycin, Cycloheximide, and Polymyxin B Selective Medium.

上記の結果から、下水中の*L. pneumophila*を高感度で検出する方法を確立するために、PCR法とDNAハイブリダイゼーション法による*L. pneumophila*検出について検討した。すべての下水においてPCRによる*mip* DNAの増幅が可能であった訳ではなく、Fig. 7に示したように流入下水と活性汚泥において試料水中の*L. pneumophila*はPCRスロ

ットプロットDNAハイブリダイゼーション法では検出できなかった。

これら2つ下水試料にはPCRの阻害剤となるフミン質等が高濃度で同時に抽出される可能性が高く、また菌類が多量に含まれている試水の場合には、それらの抽出物質が阻害剤となってPCR反応がうまく機能しない場合があることが知られているので⁹⁾、前述した2つの下水試料については、このようなことが原因となり回収した染色体をそのままPCR反応を行った場合と1/100に希釈した場合においても、プローブとハイブリダイズするだけのDNAのPCR増幅が得られなかったものと考えられる。

一方それ以外の最初沈殿池越流水、最終沈殿池越流水、塩素消毒放流水の3つの下水試料からは、ダブルPCR法とスロットプロットDNAハイブリダイゼーション法によって*L. pneumophila*の特異的遺伝子DNAが検出された (Fig. 7)。PCR法は検出対象生物のDNAの存在が評価できるに過ぎないため、この対象生物が感染性や発病性を持った状態で生残しているかどうかについては最終的には評価できない。しかし、リスクの可能性を評価するための一次スクリーニングとしては有効であると考えられる。また、安全性の評価の観点からいえば、PCR法によってネガティブの結果が得られるならば少なくとも日和見感染菌については安全性が立証できたものとして扱うことができると考えられる。本研究で行ったPCR法による下水処理場における各処理工程の調査結果からは、*L. pneumophila*のDNAの存在が示唆され、一次スクリーニングとしては安全性を立証できないことが示唆された。このことは直ちに*L. pneumophila*による日和見感染のリスクを証明したものではないものの、下水中のこのような日和見感染菌の有効な検出方法が他にない場合には、感染試験等によるリスク評価を行うなど特別な監視と評価が必要であることを示している。特に、大量に確保可能な第2の都市水資源として下水処理水の再利用を推進するためには、今後は*L. pneumophila*のような日和見感染菌についてもモニタリングの対象にすることが必要であると考えられる。またPCR法を含めてこのようなモニタリング方法は、それらの病原微生物の下水処理工程における挙動を明らかにし、処理工程における有効な除外技術の開発を検討するうえでも必要であると考えられる。

4. 結論

本研究によって得られた結論は以下の通りである。

- (1) *L. pneumophila*の種特異部位である*mip* DNAをPCRによって増幅し、ジゴキシゲニンで標識したプローブとハイブリダイズさせるサザンハイブリダイゼーションによって、水中の日和見感染菌を高感度で検出できることが知られた。
- (2) PCR-MPN法はアクリジンオレンジ染色 Total Count法 に比べて計数値がやや低くなるものの、

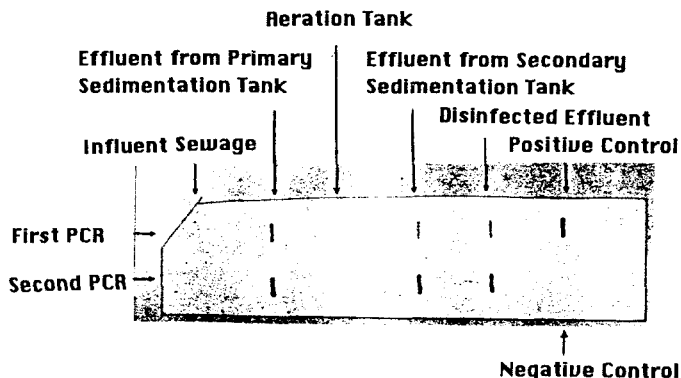


Fig. 7 Detection Results of Sewage *Legionella* by PCR-Dot Blot Hybridization.

アクリジンオレンジ染色法では不可能な*L. pneumophila*の種特異的な定量的検出のために有効であり、計数感度も満足できるものであることが知られた。

- (3) 下水処理工程における*L. pneumophila*の生残性をPCRとスロットプロットハイブリダイゼーション法によって調査したところ、最初沈殿池越流水、最終沈殿池越流水および消毒放流水中にこの細菌のDNAが残存することが示され、この細菌そのものが存在する可能性を否定できないことが示唆された。
- (4) 本研究において用いた選択培地に含まれる抗生物質では、用いた下水試料中に含まれると思われ*L. pneumophila*を選択的に培養し検出することは不可能と考えられた。従来法であるこのような選択培地法を下水中の*L. pneumophila*の検出に適用することは困難であることが知られた。
- (5) 上記のことから、PCR法およびハイブリダイゼーション法の併用による下水中の*Legionella*属細菌などの日和見感染菌の検出方法は、処理下・廃水の再利用とその安全性を評価するための一次スクリーニング法として有用であると考えられる。

<謝辞>

本研究を進めるに当たって実験材料と*L. pneumophila*の培養方法等について貴重なアドバイスをいただきました、清水建設(株)技術研究所の南清司副所長および同研究所未来技術研究部の岡田博氏他の方々に深く感謝いたします。

<参考文献>

- 1) Saiki R. K., et al.; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase., Science, No. 239, pp. 487-491 (1988).
- 2) 遠藤銀朗; 遺伝子操作微生物の環境中でのモニタリング、環境微生物工学研究法、pp. 405-408、技法堂出版(1993)
- 3) American Type Culture Collection; Catalogue of Bacteria and Bacteriophages 18th Ed, p. 178 (1992)
- 4) Edelstein P. H.; Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water, J. of Clinical Microbiology, Vol. 16, No. 4, pp. 697-699 (1982)
- 5) Engleberg N. C., et al.; DNA Sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity., Infection and Immunity, Vol. 57, No. 4, pp. 1263-1270 (1989)
- 6) 遠藤銀朗; PCR法による微生物遺伝子の検出、微生物生態学会報、Vol. 9, No. 1, pp. 29-34 (1994)
- 7) Endo G.; Quantitative Detection of Genetically Engineered Microorganisms by PCR-MPN Method, The Release of Genetically Modified Microorganisms, pp. 250-251, Plenum Press (1992)
- 8) Hobbie J. E., et al.; Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 33, pp. 1225-1228 (1977)
- 9) 土佐光司、他; フミン酸によるPCR阻害に及ぼすマグネシウム濃度の影響、第29回日本水環境学会年会講演集、p. 211 (1995)