

B-33 VNC状態の大腸菌計測方法の研究

○矢口 淳一^{1*}・金子 伸一郎¹¹八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (〒039-1192 青森県八戸市大字田面木字上野平16の1)

* E-mail: yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

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¹⁾。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。また培養によって細菌数を計測する平板培養法など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

(1) 実験材料

理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649T) 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) 大腸菌の培養

大腸菌を LB 液体培地を使用して一晩 37℃ 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℃, 10 分間) によって行い、LB 寒天培地で処理液を 1 週間 20℃ で平板培養して確認した。

(3) PMA 処理

光照射時間実験では大腸菌 DNA 抽出液 (1.2 × 10⁸ cfu/tube)、PMA 処理実験と混合実験では培養液をそれぞれ 0.5 mL の透明なマイクロチューブに準備し、PMA を最終濃度が 50 μM 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 (300~500nm) を照射した。照射中チューブは氷の中で冷却した。

(4) 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 μL を 190 μL 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℃ で 30 分間加熱し、混合後さらに 100℃ 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 PMA 処理実験と混合実験では 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ル²⁾に従った。

(5) リアルタイム PCR

大腸菌の選択的検出に使用される β-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³⁾を表-1に示し

表-1 使用したプライマーとプローブの塩基配列と濃度

(文献 3 を一部改変)

	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	300
Reverse primer	866R	AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA	300
Probe	EC807	FAM-TGG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T-TAMRA ⁴⁾	200

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℃で10分間熱変性させた後、(95℃:45s, 60℃:1min)のサイクルを40回繰り返した。

3. 実験結果および考察

(1) 大腸菌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増幅が検出された閾値サイクル数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。増幅効率と決定係数は下記のようになり、実験2の方が増幅効率も100%に近く、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。

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

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

(2) DNA光照射実験

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分ではほぼ一定となった。

光照射実験2では、まずPMAのみにハロゲン光(300W)を照射し、その後抽出した大腸菌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) 大腸菌のPMA処理実験

PMA試薬のDNAに対する効果が確認できたので、次に菌体液をPMA処理して活性の有無を区別できるか検討した。熱処理した大腸菌の菌体と無処理菌体にPMAを添加し、ハロゲン光(300W)を照射後DNeasy抽出キット(Qiagen)でDNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。しかし熱処理した菌体と無処理菌体では閾値サイクル数

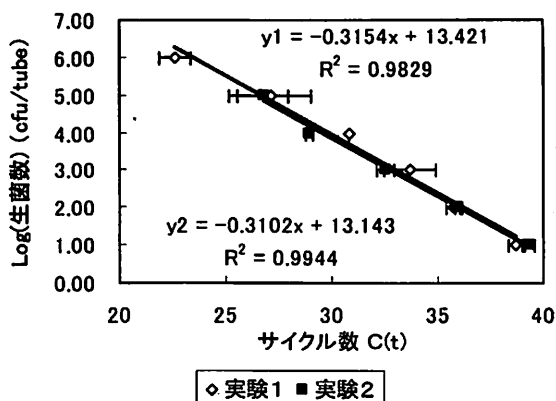


図-1 大腸菌生菌数と閾値サイクル数C(t)値の関係

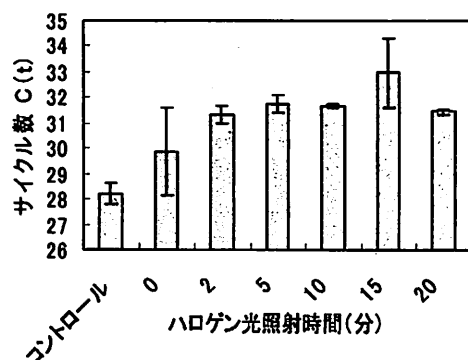


図-2 光照射実験1の結果
(光照射による大腸菌DNAの不活化)

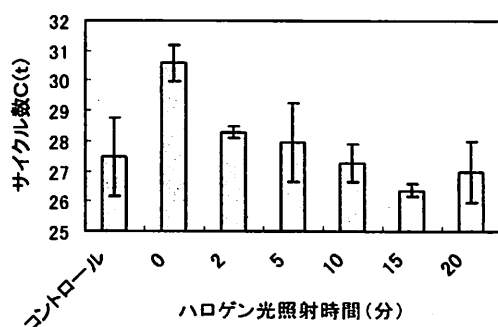


図-3 光照射実験2の結果
(光照射によるPMAの不活化)

に大きな差がなく、細菌の活性の有無を区別する明確なPMAの効果は認められなかった。そこでハロゲン光の光源の強さを500Wに変更した。図3に500Wのハロゲン光の照射時間と閾値サイクル数の関係を示した。熱処理菌体におけるサイクル数は照射時間5分まで増加してから

7分で僅かに減少後、照射時間10分で再び増加している。一方無処理の菌体では照射時間10分まではほぼ一定の値を示している。このように活性のある無処理菌体ではPMAの効果は認められないが、活性のない熱処理菌体ではPMAの効果でPCR反応が進まず、閾値サイクル数が増加した。

(4) 混合実験

活性のある大腸菌に熱処理した菌体を表-1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。DNAの抽出はDNeasy抽出キット (Qiagen) を用い、ハロゲン光の強さは300Wと500Wで実施した。図-5に添加した無処理菌体液量と閾値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、熱処理菌体の実験(V)との差もあまり大きくなかった。無処理菌体の実験(I)と実験番号(V)との閾値サイクル数の差は、300Wで1.8サイクル、500Wで2.6サイクルで、Nogvaら⁴⁾やRudiら⁵⁾がEPA試薬を用いて行った実験結果とほぼ匹敵するが、活性のある細菌とない細菌を区別して定量するには十分とは言えない。

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、ハロゲン光照射約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た。PMA試薬で菌体液を処理した後、リアルタイムPCR反応を施すことで活性のある菌体とない菌体を定量できるか検討したが、活性の有無による閾値サイクル数の差は十分とは言えなかった。

<参考文献>

- 1) Sawaya et al.; Water Science & Technology, Vol. 58, No. 7 pp. 1343-1348 (2008)
- 2) Qiagen; DNeasy Blood & Tissue Handbook, p44 (2006)
- 3) E. Frahm & U. Obst; J. Microbiol. Methods, Vol. 52, p123~131 (2003)
- 4) Nogva et al.; BioTechniques, Vol. 34, p804~813 (2003)
- 5) Rudi et al.; Appl. Environ. Microbiol., Vol. 71, p1018~1024 (2005)

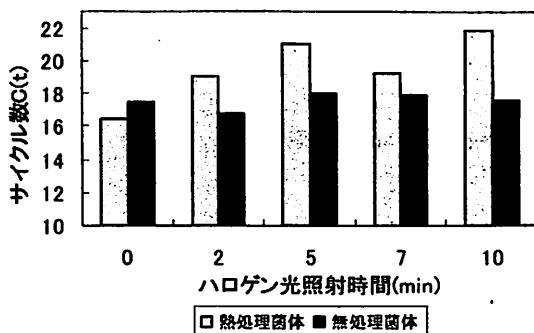


図-4 照射時間と閾値サイクル数の関係 (500W)

表-1 混合実験における無処理菌体と熱処理菌体の混合割合

実験番号	I	II	III	IV	V
無処理菌体液量(μL)	1000	100	10	1	0
熱処理菌体液量(μL)	0	900	990	999	1000

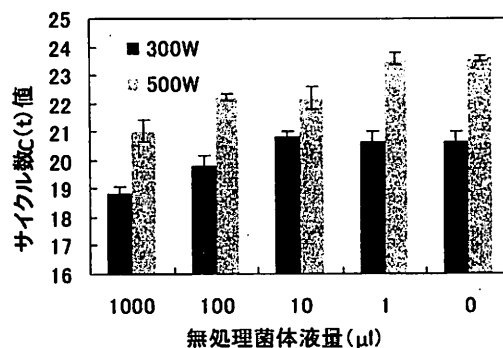


図-5 熱処理菌体との混合実験の結果