

B-1 LED光源を用いたPMA-PCR法による 生存可能な大腸菌の計数

○類家 渉¹・矢口 淳一^{2*}

¹八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 (〒039-1192 青森県八戸市大字田面木上野平16-1)

²八戸工業高等専門学校 産業システム工学科 (〒039-1192 青森県八戸市大字田面木上野平16-1)

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

1. はじめに

近年、水環境中には生存しているにも関わらず培養できない状態(VBNC: Viable but non-culturable)にある細菌が存在することが明らかになってきた¹⁾。VBNC 状態の細菌で最も問題視されるのは病原菌やその指標細菌である。従来それらの細菌の検出は培養法によってきたため、VBNC 状態の細菌は死滅しているとみなされ、消毒などの不活化効果を過大に評価し飲料水や水環境からの感染リスクを過小に評価してきた可能性がある。最近、VBNC 状態を含む生存可能な細菌のみを検出することができる PMA-PCR 法が研究開発された²⁾。サンプルの PMA 処理には従来ハロゲン光源が用いられてきたが、ハロゲン光の照射で発生する高熱によってサンプルが劣化する可能性が危惧されていた。また、PMA-PCR 法を水環境に適用するためにはさらなる検出感度の改善が必要である。そこで本研究では、ハロゲン光源の代わりに LED 光源を使用して PMA 処理を行った場合の PMA-PCR 法の最適条件を検討した。また、リアルタイム PCR で増幅させる DNA の塩基長の影響を検討し、PMA-PCR 法の検出感度の改善を図った。そしてそれらの結果を総合的に評価し、LED 光源を用いた PMA-PCR 法の分別効果を明らかにした。

2. 実験材料および方法

2-1 実験材料

理化学研究所系統施設から大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649^T)を購入し実験に使用した。全菌数測定に用いる蛍光染色試薬として DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(和光純薬工業)、生存可能な細菌と死滅した細菌を区別する試薬として核酸染色試薬 PMA(propidium mono-azide)(Biotium)を使用した。

2-1 実験方法

まず、リアルタイム PCR の検出感度に対する DNA の塩基長の影響を検討するため、遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を4種類のプライマー、プローブの組み合わせについて求めた。次に、LED 光源を使用した PMA-PCR 法の最適条件の検討として、必要な LED 照射時間を求める実験を行った。その際、チューブ内で浮遊状態の大腸菌とメンブレンフィルターにろ過捕集した大腸菌の2つの場合について検討した。さらに求めた最適条件下で、熱処理した大腸菌と無処理の大腸菌の混合比率を数段階に変化させて実験を行い、PMA-PCR 法の分別効果について検討した。

2-2-1 大腸菌の培養

大腸菌をLB液体培地に植菌し、一晚37℃で振とう培養した。さらに極少量の培養液を新しいLB液体培地に添加して数時間培養しそれを実験に使用した。培養液の全菌数はポリカーボネイトフィルター(Advantec, 孔径0.2μm, 直径25mm)にろ過捕集後、蛍光染色試薬DAPIで染色し落射蛍光顕微鏡(オリンパス, BX41)で計数した。大腸菌の不活化は熱処理(80℃,15分間)によって行い、LB寒天培地を使用して20℃で1週間平板培養し、コロニーが形成されないことを確認した。

2-2-2 PMA処理

本実験におけるサンプルの PMA 処理については以下のように行った。まず浮遊状態の大腸菌については菌体液を 0.5mL の透明なマイクロチューブに準備し、PMA 濃度が 50μM となるように添加して暗室で 5 分間放置した。さらに同量の PMA を繰り返し添加して 5 分間放置した。その後 LED 光源(タカラバイオ, LED Cross linker12)を所定の時間照射した。メンブレンフィルターにろ過捕集した大腸菌については、サンプルをポリカーボネイトフィルター(Advantec, 孔径 0.4μm, 直径 47mm)でろ過し

た後、100 μ M の濃度の PMA を 2mL 添加して 5 分間暗室で放置し、LED 投光器(Global Japan, GJ-LP-30RGB)の青色光(波長 460~470nm)を所定の時間照射した。

2-2-3 DNAの抽出

浮遊状態の大腸菌液については、PMA 処理したマイクロチューブを 12000rpm で 1 分間遠心分離して上澄み液を除去し滅菌済み生理食塩水で洗浄した後、InstaGene Matrix(Bio-rad)を 200 μ L 添加し Bio-rad 社のプロトコルに従って DNA を抽出した。メンブレンフィルターにろ過捕集した大腸菌については、PMA 処理後フィルターを 0.5mL のマイクロチューブに丸めて挿入し、InstaGene Matrix を 200 μ L 添加してボルテックスを激しく繰返した後、Bio-rad 社のプロトコルに従い DNA を抽出した。

2-2-4 リアルタイムPCR

本研究では、大腸菌の選択的検出に使用される β -グルクロニターゼ酵素をコードするuid4遺伝子をターゲットとし、リアルタイムPCRをMiniOpricon™システム(Bio-rad)で行った。PCR用試薬にはSsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-rad)を使用した。プライマー、プローブについては、増幅対象塩基長が75bp(Takahashi et al.³⁾)、83bp (Frahm & Obst⁴⁾)、そして126bpと240bp (Primer 3Plus⁵) により作成)となる4つのセットを使用した。PCRのアニーリング温度については、MiniOpticon™システムの温度グラジエント機能により最適な温度を決定した。

3. 結果および考察

3-1 検出感度の検討

大腸菌培養液から DNA を抽出し、10 倍ずつ段階的に希釈した試料を用いてリアルタイムPCRを行い、それぞれの塩基長のプライマー、プローブの組み合わせについて大腸菌遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を求め、検出感度に対する DNA の塩基長の影響を検討した。図-1 にリアルタイム PCR の蛍光曲線から得られた各塩基長の遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を示し、また表-1 には図-1 から計算された回帰直線式、決定係数 R^2 、増幅効率(E)および%効率を示した。塩基長 75bp のプライマーセットを用いた場合、増幅効率が最も 100% に近い値となり、決定係数の値から直線性も良く、遺伝子コピー数 $2.1(\text{copies/PCR 反応液})$ まで検出可能であった。83bp の塩基長は75bp に次いで増幅効率が100%に近いが、遺伝子コピー数 $2.1(\text{copies/PCR 反応液})$ および $2.1 \times 10^1 (\text{copies/PCR 反応液})$ の大腸菌 DNA を検出することができなかった。また、83bp では他の塩基長と比較するとリアルタイムPCRの蛍光強度が著しく低かった。コピー数

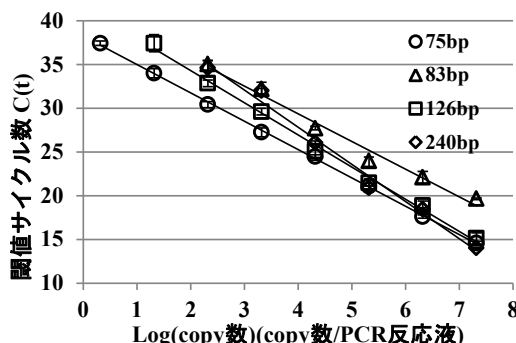


図-1 遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係

表-1 回帰直線式、決定係数 R^2 、増幅効率(E)、%効率

塩基長	回帰直線式	決定係数 R^2	増幅効率(E)	%効率(%)
75bp	$y = -3.2431x + 38.238$	0.9994	2.034	103.4
83bp	$y = -3.1672x + 42.036$	0.9824	2.069	106.9
126bp	$y = -3.6782x + 41.66$	0.9956	1.870	87.0
240bp	$y = -4.2436x + 44.788$	0.9873	1.720	72.0

$2.1 \times 10^7 (\text{copies/PCR 反応液})$ の場合、83bp のプライマーセットでは立ち上がってすぐに最大蛍光強度 0.4 に達し、それ以上強度が増加しなかった。これはPCRサイクルによるDNAの増幅量が少なく、PCR反応が良好に進んでいない可能性が考えられる。126bpの塩基長のプライマーセットでは、遺伝子コピー数 $2.1 \times 10^1 (\text{copies/PCR 反応液})$ まで検出することができたが、増幅効率は90%以下であった。240bpのDNA断片は増幅効率が最も低く、検出限界は83bpと同じであった。以上の結果から、75bpのDNA断片の検出感度が最も良く、大腸菌の検出に適していると考えられる。以降の実験では塩基長75bpのプライマーセットを使用した。

3-2 LED光照射時間の検討

熱処理した大腸菌を浮遊状態とメンブレンフィルターにろ過濃縮した2つの場合についてPMA処理し、LED光を照射してDNAとPMAの結合に必要な照射時間を検討した。図-2に浮遊状態の場合とろ過濃縮した場合のLED照射時間と閾値サイクル数の関係を示した。照射時間は浮遊状態で0~20分間、ろ過濃縮した場合で0~50分間変化させ、それぞれPMA処理を行わないサンプルについても実験を行った。浮遊状態およびメンブレンフィルターにろ過濃縮した場合の何れについても、照射時間が増加するにつれてDNA増幅が検出される閾値サイクル数は増大するという傾向を示している。この結果は、PMA処理を行わないサンプルでは熱処理死滅した大腸菌を排除できず、リアルタイムPCRによって早いサイクル数でDNAの増幅が検出され閾値サイクル数が低い値を示しているのに対し、PMA処理を行ったサンプルでは最適な照射時間に近づくにつれてPMAの死菌を分別排除する効果が発揮され、DNA増幅が検出される閾値サイク

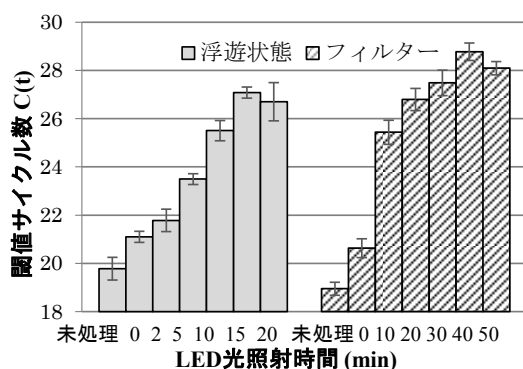


図-2 LED 照射時間と閾値サイクル数の関係

ル数が高くなっていることを示している。PMA処理を行わないPMA未処理の結果と照射時間0minの結果を比較すると、光を照射しない場合でも若干のPMAの効果が得られることが分かる。閾値サイクル数が最大となる照射時間は、浮遊状態では15分、フィルターの状態では40分となり、大腸菌の状態やLED光源の違いによって必要な照射時間には大きな差がみられた。浮遊状態でもフィルターの場合でもそれ以上の照射時間ではあまり変化が見られなかった。従って、最適なLED光照射時間は、浮遊状態では15分間、メンブレンフィルターにろ過濃縮した場合は40分間であると考えられる。

3-3 PMA-PCR法による分別効果の検討

以上の実験結果より得られた条件を用いて、無処理の大腸菌濃度を一定にして、無処理の大腸菌と熱処理した菌体との混合比率を数段階に変化させたサンプルを作製し、LED 照射による PMA-PCR 法の分別効果について検討した。図-3 に浮遊状態の大腸菌とメンブレンフィルターに固定した大腸菌の実験結果を示した。無処理菌体のみの場合(1/0 倍)ではサンプル内に存在する生存可能な大腸菌が検出される。熱処理した大腸菌を混合した場合(1/1~1/5000 倍)には PMA の分別効果が持続していれば生存可能な大腸菌のみが検出されるため、閾値サイクル数

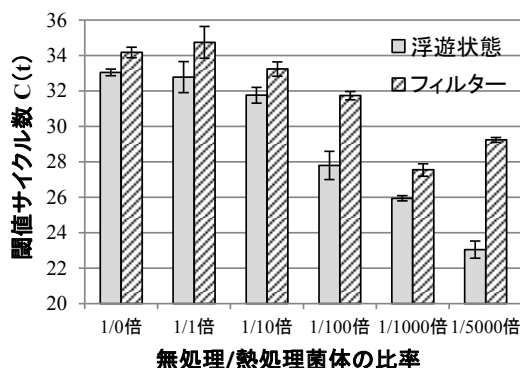


図-3 無処理/熱処理菌体の比率と閾値サイクル数の関係

は無処理菌体のみの場合(1/0 倍)と同等の値を示す。しかし熱処理で死滅した大腸菌濃度が高く、PMA の分別効果が十分発揮できない場合、熱処理菌体の DNA も増幅されるため、閾値サイクル数は低下する。本実験では浮遊状態およびろ過濃縮した場合の何れの結果でも、無処理の大腸菌に対して熱処理した大腸菌を 10 倍混合した場合(1/10 倍)までは無処理の大腸菌のみの場合(1/0 倍)とほぼ同等の閾値サイクル数を示し、混合比率 1/100 倍から閾値サイクル数は低下し始めている。つまり、熱処理菌体が無処理菌体の 100 倍以上存在する状態では、PMA の分別効果が限界を示していることが分かる。従って、無処理大腸菌濃度の 10 倍まで熱処理した大腸菌が存在しても PMA の分別効果が得られることが分かった。

4. まとめ

リアルタイムPCRの検出感度に対するDNAの塩基長の影響を検討した結果、75bpのDNA断片が最も増幅効率が100%に近い値となり、遺伝子コピー数2.1(copies/PCR 反応液)まで検出可能であることから、大腸菌の検出に適していると考えられた。次にLED光源を使用したPMA-PCR法の最適条件を検討し、浮遊状態では15分間、メンブレンフィルターにろ過濃縮した場合は40分間の照射時間が最適であると考えられた。これらの結果により得られた条件を用いて、LED光照射によるPMA-PCR法の分別効果について検討した結果、熱処理した大腸菌が無処理大腸菌濃度の10倍以内であればPMAの分別効果が得られることが分かった。

参考文献

- 1) 木暮一啓：バイオサイエンスとインダストリー、Vol.57, No.11, pp.731-736, 1999.
- 2) Nocker, A., Cheung, C. and Camper, A.K.: Journal of Microbiological Methods, Vol.67, pp.310-320, 2006.
- 3) Takahashi H, Kimura B, Tanaka Y, Shinozaki J, Suda T, and Fujii.: Journal of Microbiological Methods, Vol.79, pp.124-128, 2009.
- 4) Frahm E and Obst U: Journal of Microbiological Methods, Vol.52, pp.123-131, 2003.
- 5) Primer3Plus[<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3Plus/>](2015年2月20日現在)

謝辞

本研究は科学研究補助金基盤研究 C(課題番号 25420562)の支援を得て行われました。ここに記して深く感謝の意を表します。