

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19560555

研究課題名（和文） VNC概念による病原性微生物指標の開発

研究課題名（英文） Discrimination of Viable and Dead *Escherichia coli* Cells by Quantitative PCR with Propidium Monoazide

研究代表者

矢口 淳一（YAGUCHI JYUNICHI）

八戸工業高等専門学校・建設環境工学科・教授

研究者番号：80342450

研究成果の概要（和文）：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できた。定量範囲は $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ cfu/tube であった。細菌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。添加した熱処理菌体数を変化させても、活性のある大腸菌と閾値サイクル数の間には一定の関係があることが分かった。しかし、熱処理菌体数が活性のある大腸菌の菌数の 10 倍以上になると検量線の傾きが変化した。また VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果を検討する為、水道原水として使用される河川水を用いて塩素消毒実験を行ったところ、生理的活性のある VNC 状態の細菌の不活性化速度定数は培養可能な細菌の 1/2～2/3 程度であり、河川水中の VNC 状態の細菌は、大腸菌の場合と同様に培養可能な細菌より塩素消毒に対する抵抗性が強いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A real-time PCR method was applied to the detection of fecal indicator, *Escherichia coli* based on the *uid A* gene sequence. Rapid and reliable quantitative estimation of *E. coli* was conducted in concentration ranging from 1×10^1 to 1×10^6 cfu/tube. A combination of PMA(propidium monoazide) and real-time PCR was developed to enumerate viable *E. coli* in the presence of dead cells. Mixtures of viable cells and heat-treated cells were subjected to real-time PCR with PMA treatment. Viable cell counts were linearly related to real-time PCR threshold cycle values for PMA-treated cells as long as the ratio of dead cells to viable cells was no greater than 1×10^1 . The effect of chlorine on the physiological viability of bacteria in the river was also investigated. Microscopic viable bacteria were more chlorine resistant than culturable bacteria. The inactivation rate coefficients of direct viable bacteria were one-second to third those of culturable bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	300,000	90,000	390,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：水質

1. 研究開始当初の背景

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。

VNC 状態にある菌の存在が最も問題となるのは病原菌である。我々は1世紀近くも前から水や食品の消毒を行い、病原菌からの水系感染症の防止に努めてきた。しかし病原菌やその代替指標である大腸菌群の検出方法は培養によってきたため、VNC 状態の菌は不活性と見なされ、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もある。

本研究では近年著しく発展している分子遺伝学的手法を VNC 状態の細菌に適用して、既に確立した4つの方法と組み合わせることにより、細菌の生理的状态や代謝上の変化などを検討して病原性細菌の感染リスクに対するより感度の高い正確な指標を提示し、また従来の大腸菌群や糞便性大腸菌群などに替わる VNC 状態の大腸菌を検出できる方法を開発する。このように本研究は飲料水や水環境の安全性を確保する上で不可欠な研究であり、水に由来する疾患がいまだに起こり続けていることは、病原性細菌の感染リスクに対するより感度の高い正確な指標が必要であることを強く示唆している。

2. 研究の目的

生理的活性のある細菌を直接蛍光顕微鏡下で検出する方法として、既に CTC 法、BacLight 法、DVC 法、マイクロコロニー法の4つの手法を確立した。CTC 法は、呼吸活性を持つ細菌を検出する方法で、BacLight 法は細菌細胞膜の破損状況を検出できる。また DVC 法とマイクロコロニー法はいずれも増殖能力を持つ細菌を顕微鏡下で検出する方法である。これらの方法によって検出され

た細菌数と平板培養法などで示された生菌数の差が VNC 状態の細菌数となる。しかしこれらの方法によって検出された細菌に関してはデータも乏しく、まだ適用水も限られ、病原性や感染リスクとの関係は不明瞭である。本研究では、分子生物学的手法を VNC 状態の細菌に適用して4つの検出法と組み合わせることにより、VNC 状態の細菌に対するより感度の高い正確な指標を提示することを目指す。DNA, RNA など遺伝子レベルの解析は、VNC 状態の細菌の生理的状态を明らかにするだけでなく、特異的な塩基配列を利用することにより、選択培地が変わる指標細菌大腸菌の新しい検出方法も提案できる。選択培地では VNC 状態の大腸菌の検出は困難なので、遺伝学的手法を組み合わせた方法は病原性細菌のより信頼性の高い指標となる。さらに本研究では、塩素消毒に替わる消毒方法として採用数が増加している紫外線消毒に注目し、紫外線照射の VNC 状態の細菌に対する効果についても合わせて検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichia coli* (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-phenyl indole) (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 試薬 (propidium mono azide) (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°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。大腸菌の不活化は熱処理 (80°C, 10 分間) によって行い、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。

(3) PMA 処理

光照射時間実験では大腸菌 DNA 抽出液 (1.2 × 10⁴ 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 $50 \mu\text{M}$ 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。

(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 $10 \mu\text{l}$ を $190 \mu\text{l}$ 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 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を抽出する方法も行った。手法はグラム陰性菌のプロトコールに従った。

(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。プライマーとプローブは、Frahm & Obst²⁾ が用いたものを使用した。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 Frahm & Obst²⁾ が用いた値を一部変更して調整した。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。

(6) 塩素消毒実験

実験材料に八戸市内を流れる馬淵川の河川水を使用し、300mL の三角フラスコに河川水を200mL 入れて 20°C の恒温水槽に設置した。塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液 (和光純薬) を使用し、初期塩素濃度を 0.1mg/L ~ 0.9mg/L となるように投入し、三角フラスコをスターラーで攪拌しながら2分間塩素処理して試料を採取した。脱塩素剤としては 100mg/L の濃度のチオ硫酸ナトリウム溶液を用い、残留塩素濃度は DPD 法で測定した。消毒実験前後の河川水の生菌数計測には R2A 培地を使用し、平板培養法で計測した。全菌数はポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 $0.2 \mu\text{m}$) 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。生理的活性のある細菌を評価する手法として、BacLight 法、CTC 法、DVC (Direct viable count 法)、マイクロコロニー法を使用した。4つの方法とも全菌数測定法と同様、ポリカーボネイトフィルター上に細菌を捕集し蛍光試薬を利用して計測した。

4. 研究成果

(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 $1 \times$

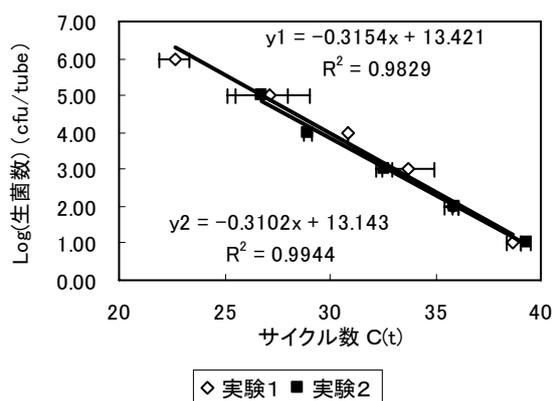


図-1 大腸菌生菌数と閾値サイクル数の関係

$10^1 \sim 1 \times 10^6 \text{cfu/tube}$ となるように調整してリアルタイム PCR 反応を2回行った。生菌数が $1 \times 10^0 \text{cfu/tube}$ 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0~20分間所定時間照射し、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。

光照射実験2では、まずPMAのみにハロゲン光(300W)を0~20分間所定時間照射し、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。

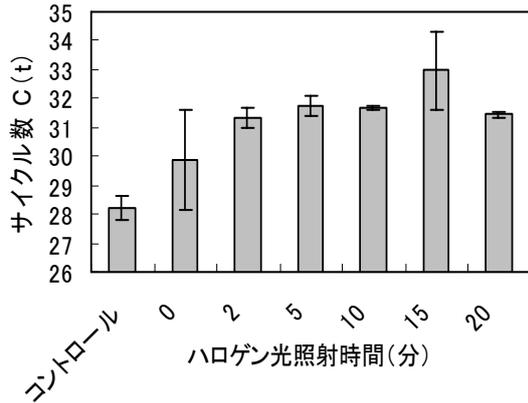


図-2 光照射実験 1 の実験結果
(光照射による DNA の不活化)

(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、次に大腸菌を液体培養して得られた菌体液を 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 (500W) を照射後 DNA を抽出しリアルタイム PCR を行った。図-4 に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 0 分では、PMA 無添加のコントロールとほとんど変わらなかったが、照射時間 1 分から大きく増加し、5 分でほぼ一定となった。一方無処理の菌体では、照射時間 10 分まで閾値サイクル数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 5 分以上の照射時間で PMA の効果が増大し、閾値サイクル数が最大となった。

(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

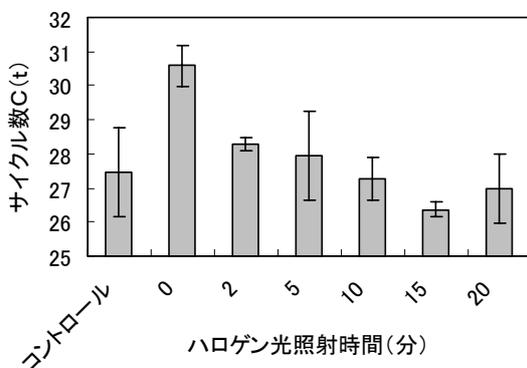


図-3 光照射実験 2 の実験結果
(光照射による PMA の不活化)

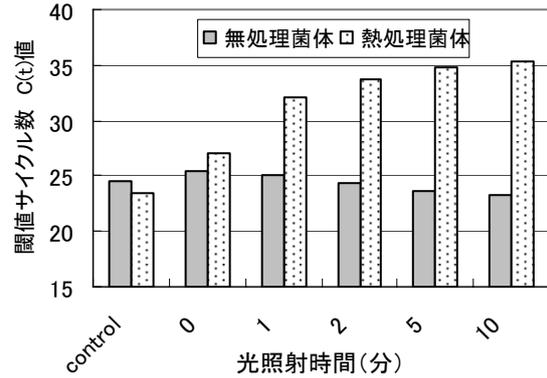


図-4 光照射時間と閾値サイクル数の関係

菌のみを検出できるか検討した。実験は 2 回行い、PMA 処理後のハロゲン光 (500W) の照射時間は 5 分間である。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。RUN 1、2 ともに活性のある無処理菌体液量が増加するにつれて、閾値サイクル数が顕著に減少する傾向が認められた。無処理菌体のみの実験 (I) と熱処理菌体のみの実験 (VI) とのサイクル数の差が大きく生じているため、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であると考えられる。実験番号 (I) と実験番号 (VI) との閾値サイクル数の差は、RUN1 で 12.2 サイクル、RUN 2 で 8.13 サイクルとなり、Nogva ら³⁾ や Rudi ら⁴⁾ が EPA 試薬を用いて行った実験結果を大きく上回り、Nocker ら⁵⁾ が病原性大腸菌 O157:H7 を PMA 試薬で処理した場合とほぼ匹敵する差が得られた。

(5) 活性のある大腸菌の定量実験

熱処理した一定量の大腸菌を活性のある

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	VI
無処理菌体液量 (μl)	1000	500	100	10	1	0
熱処理菌体液量 (μl)	0	500	900	990	999	1000

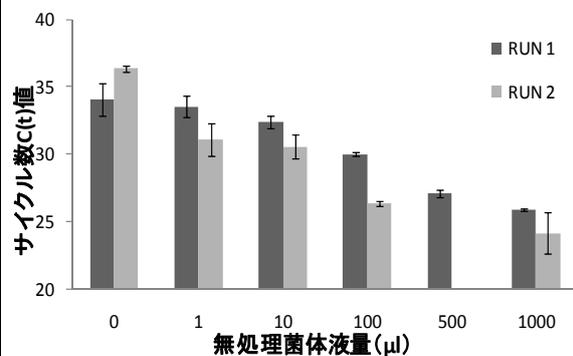


図-5 無処理菌体と熱処理菌体の混合実験

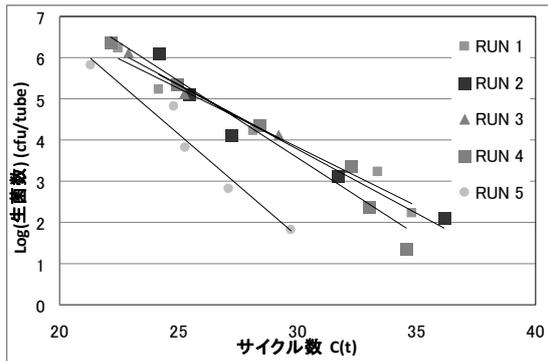


図-6 活性のある大腸菌の定量実験結果
表-2 検量線とPCR増幅効率

	死菌数 (cfu/tube)	数式	決定係数 R ²	増幅効率 E	%効率
RUN 1	0	y=-0.2848x+12.372	0.9667	1.927	92.7
RUN 2	1.154 × 10 ⁻¹	y=-0.3091x+13.052	0.9357	2.038	103.8
RUN 3	1.166 × 10 ²	y=-0.3096x+13.095	0.9786	2.040	104.0
RUN 4	2.054 × 10 ³	y=-0.3728x+14.751	0.9586	2.359	135.9
RUN 5	6.000 × 10 ⁴	y=-0.4491x+15.096	0.9527	2.813	181.3

大腸菌に添加し、活性のある大腸菌が定量できるか検討した。図-6 に生菌数と閾値サイクル数 C(t) との関係を示した。また、表-2 には得られた検量線から決定した増幅効率と%効率を示した。添加した熱処理菌体数を変化させても、活性のある大腸菌と閾値サイクル数の間には一定の関係があることが分かった。しかし、RUN 4、5 から分かるように熱処理菌体数が活性のある大腸菌の菌数の 10 倍以上になると、検量線の傾きが変化していることが分かる。

(6) 河川水中の細菌に対する塩素消毒効果

塩素処理前後の全菌数及び培養可能な生菌数の変化を見ると、塩素処理によって不活性化された全菌数は、処理前後でほとんど変化がなく 1 × 10⁹ ~ 1 × 10¹⁰ 個/mL の範囲で推移した。河川水中の全菌数に対する培養可能な生菌数の割合は 2~5 オーダー程度低く、2005 年に行った調査結果¹⁾とだいたい一致した。R2A 培地で計数された培養可能な生菌数は塩素処理によって 3~6 オーダー低下し、大腸菌より低下の割合は幾分少なかった。生理的活性のある細菌を顕微鏡下で検出する 4 つの方法で求めた、河川水中の VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果を見ると、生理的活性のある VNC 状態の細菌は塩素処理前に比べると、処理後は 1~3 オーダー程度の菌数の減少が確認され、大腸菌の場合と大きく変わらなかった。

(7) 不活性化速度定数

塩素処理による大腸菌などの細菌の減少は(1)式で表される⁶⁾。

$$\ln(N/N_0) = -k \int C \cdot dt \quad \dots (1)$$

N: 塩素処理後細菌数 N₀: 塩素処理前細菌数
k: 不活性化速度定数 C: 塩素濃度
t: 塩素処理時間

大腸菌と河川水中の細菌の塩素処理に伴う不活性化の割合と CT 値(残留塩素濃度と時間の積) の関係から不活性化速度定数 k を算出した。河川水中の VNC 状態の細菌を計測する 4 つの方法で求めた k 値は、0.7~0.9 (L/mg/min) の範囲で、R2A 培地による培養法の 1/2~2/3 程度であった。大腸菌と河川水中の細菌を比較すると、培養可能な細菌も直接顕微鏡で検出した生理的活性のある細菌も、河川水中の細菌の k 値は大腸菌の 1/2 以下となり、大腸菌の方が河川水中の細菌より塩素消毒に対する感受性が高いことが知られる。これは河川水中には様々な汚濁物質が存在し、消毒以外に塩素が消費されるためだと考えられる。

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することができた。PMA 試薬で菌体液を処理した後、リアルタイム PCR 反応を行う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、活性の有無による閾値サイクル数の差は十分だったため、定量は可能と言えた。活性のある大腸菌の定量実験では、熱処理菌体数が活性のある大腸菌の菌数の 10 倍以上になると傾きが変化していることが分かる。また VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果を検討する為、河川水を用いて塩素消毒実験を行った。生理的活性のある VNC 状態の細菌の不活性化速度定数は、培養可能な細菌の 1/2~2/3 程度であり、河川水中の VNC 状態の細菌は大腸菌の場合と同様に培養可能な細菌より塩素消毒に対する抵抗性が強いことが明らかとなった。

表-3 不活性化速度定数

細菌数計測法	k(L/mg/min)	
	大腸菌	河川水
R2A	4.8	1.4
m-Endo	5.1	
BacLight	2.1	0.9
CTC	2.3	0.9
マイクロコロニー	2.5	0.8
DVC	2.1	0.7

(参考文献)

- 1) 沢谷圭介, 金子伸一郎, 矢口淳一: 環境工学研究論文集 Vol. 43, pp551-558 (2006)
- 2) E. Frahm&U. Obst; J. Microbid. Methods, Vol. 52, p123~131 (2003)

- 3)Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H., Rudi, K.; BioTechniques, Vol. 34, p804~813 (2003)
- 4)Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., Holck, A. L.; Appl. Environ. Microbial, Vol. 71, p1018 ~1024(2005)
- 5)Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K.; J. Microbiol. Methods, Vol. 67, p310 ~320 (2006)
- 6) 窪華奈子, 大瀧雅寛: 第 42 回環境工学研究フォーラム講演集, pp75-77 (2005)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① K. Sawaya, N. Kaneko, K. Fukushi and J. yaguchi; Behaviors of physiologically active bacteria in water environment and chlorine disinfection, Water Science & Technology, 査読有, Vol. 58, No. 7, 2008, pp1343-1348

[学会発表] (計 5 件)

- ① 矢口淳一、金子仲一郎、VNC 状態の大腸菌計測方法の研究、第 46 回環境工学研究フォーラム、2009 年 11 月 30 日、新島学園短期大学
- ② 矢口淳一、池田義嗣、工藤栄一、中山雄介、類家 翔、VNC 状態の大腸菌計測方法の研究、平成 20 年度土木学会東北支部技術研究発表会、2009 年 3 月 7 日、東北学院大学
- ③ 沢谷圭介、金子仲一郎、矢口淳一、VNC 状態の細菌に対する塩素消毒効果、第 45 回環境工学研究フォーラム、2008 年 11 月 28-30 日、大阪工業大学
- ④ J. yaguchi N. Kaneko and K. Sawaya; Viable but nonculturable bacteria in water environment and effect of chlorine disinfection, The 8th International Symposium on Global Renaissance by Green Energy Revolution, 22-23 Jan. 2008, Nagaoka
- ⑤ K. Sawaya, N. Kaneko, K. Fukushi and J. yaguchi; Behaviors of physiologically active bacteria in water environment and chlorine disinfection, WaterMicro 2007; 14th International Symposium on Health-Related Microbiology, 12-13 Sep. 2007, Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢口 淳一 (YAGUCHI JYUNICHI)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・教授
研究者番号：80342450

(2) 研究分担者

金子 仲一郎 (KANEKO NAKAICHIRO)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・助手
研究者番号：70099761

(2) 研究分担者

福士 謙介 (FUKUSHI KENSUKE)

東京大学サステイナビリティ連携研究機構・准教授
研究者番号：30282114

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究者協力者

沢谷 圭介 (SAWAYA KEISUKE)

八戸工業高等専門学校専攻科建設環境工学専攻・学生

(4) 研究者協力者

横町 尚亨 (YOKOMACHI KEISUKE)

八戸工業高等専門学校専攻科建設環境工学専攻・学生

(4) 研究者協力者

池田 義嗣 (YOSHIDA YOSHITUGU)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・学生

(4) 研究者協力者

工藤 栄一 (KUDO EIICHI)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・学生

(4) 研究者協力者

中山 雄介 (NAKAYAMA YUSUKE)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・学生

(4) 研究者協力者

類家 翔 (RUIKE SYO)

八戸工業高等専門学校建設環境工学科・学生