

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：51101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420562

研究課題名(和文) PMA試薬と分子生物学的手法による水系細菌感染リスクの再評価に関する研究

研究課題名(英文) Selective Quantification of Viable Escherichia coli in Water Environment using real-time PCR with Propidium Monoazide

研究代表者

矢口 淳一 (Yaguchi, Junichi)

八戸工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：80342450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メンブレンフィルタにろ過濃縮した大腸菌にハロゲン光源を使用したPMA-qPCR法を適用する場合の最適条件は、PMA添加濃度50 μ M、PMA処理時間5分間、ハロゲン光照射時間5分間であった。八戸市周辺の6つの水域の調査では、水環境中で多くの大腸菌がVBNC状態で存在していることが示され、VBNC状態の大腸菌が全大腸菌数に占める割合は2.3～87.9%となった。LED光源を使用したPMA-qPCR法では、浮遊状態で15分間、メンブレンフィルタにろ過濃縮した場合で40分間の照射時間が必要であり、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。

研究成果の概要(英文)：Using membrane filtration, we first developed and optimized a protocol for sample treatment with propidium monoazide (PMA) in combination with real-time PCR(PMA-qPCR) to distinguish viable and dead Escherichia coli cells. Water sample treatment with 50 μ M PMA for 5 min followed by 5min of halogen light exposure resulted in an effective exclusion of DNA from heat-treated E.coli cells. When applied to water environmental samples, the viable E.coli counts based on the PMA-qPCR method were almost intermediate between the total and culturable counts in water environments. A number of E.coli remained in the VBNC state and the proportion of VBNC cells to total ones ranged from 2.3 to 87.9%.

In addition, light emitting diode (LED) was used to avoid excessive heating of samples as an alternative to halogen light. 15 and 40 min of LED light exposure time were sufficient to exclude DNA from heat-treated E. coli cells in suspension and on membrane filter, respectively.

研究分野：水環境

キーワード：大腸菌 DNA LED PMA試薬

1. 研究開始当初の背景

20 世紀末から新しい感染症が次々と発生して公衆衛生上重大な脅威となっており、感染症は過去のものではないことが広く認識されてきた。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の検出方法は培養によってきたため、VBNC (生きてはいるが培養できない; Viable but nonculturable) 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が指摘されている¹⁾。多くの微生物は、低栄養状態、高温や低温、毒性物質の存在などの環境ストレス下で VBNC 状態に入ると考えられており、この状態にある細菌は、生きてはいるが培養できない。また VBNC 状態の細菌が通常の状態に回復して増殖可能となることも知られている。VBNC 状態にある細菌は平板培養や MPN 法など通常の方法では検出できず、糞便による水域の汚染や病原菌の存在を従来通り培養法による計数で判定するならば、公衆衛生上問題が深刻なのに気付かない事態も起こり得る。

最近、急速に発展している分子生物学的手法を水環境中の微生物に適用して、遺伝子レベルで特定の細菌を検出する方法が研究開発されてきた^{2) 3)}。DNA 中の特定領域を増幅することができる PCR 反応は、特定の細菌に特異的な塩基配列を利用することにより、選択培地に替わる迅速で特異性の高い新しい検出方法を提案できる。ところが PCR 反応では細胞死滅後も DNA が比較的長期間にわたって環境中で保持されるため⁴⁾、生理的活性のある細菌と死滅した活性のない細菌を区別することができない。

そこで、本研究では特定の細菌が検出可能な PCR 反応と VBNC 状態の細菌を検出できる検出法とを組み合わせ、VBNC 状態を含む生理的活性のある病原性細菌やその指標細菌である大腸菌などの特異的検出法を開発することを目的とする。さらに開発した検出法を水環境や上下水道、排水処理施設などに適用して、生理的活性のある病原性細菌、指標細菌の微生物濃度を測定し、水系からの細菌感染リスクを再評価する。

2. 研究の目的

本研究は、VBNC 状態を含む生理的活性のある病原性細菌やその指標細菌を特異的に検出する方法を研究開発し、開発した手法を水環境や上下水道システムに適用してそれらの存在濃度を明らかにし、それに基づいて水系からの病原性細菌感染リスクを再評価することを目的とする。培養法に基づく従来の検出法では感染リスクを過小評価してきた可能性が高く、リスク再評価により現在の水系微生物基準を検証し、さらに上下水道システムなどプロセスの改善策を提案する。

3. 研究の方法

(1) メンブレンフィルタ利用 PMA-qPCR 法
 先ず、メンブレンフィルタ上に捕集した大腸菌に対して PMA 処理を行い、PMA 添加濃度、処理時間、ハロゲン光照射時間及び PMA 添加回数について最適条件を見出し、熱処理と無処理の大腸菌濃度混合比を変えて検証実験を行った。確立した PMA 処理条件を使用して図-1 に示した八戸周辺の河川・海域中に存在する生理的活性のある大腸菌濃度を測定した。

(2) 高感度検出法

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、大腸菌のガラクトシダーゼをコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、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。使用したのは増幅対象塩基長が 75bp⁵⁾、83bp⁶⁾、そして 126bp と 240bp (Primer 3Plus⁷⁾ により作成)となる 4 つのセットを使用した。

(3) LED 光源を使用した PMA-qPCR 法

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、マイクロチューブ内で浮遊状態の大腸菌とメンブレンフィルタ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-qPCR 法の分別効果について検討した。

4. 研究成果

(1) メンブレンフィルタ利用 PMA-qPCR 法 PMA 処理条件の検討

熱処理した大腸菌をメンブレンフィルタにろ過濃縮して PMA 添加濃度を変化させ、DNA 増幅が検出された閾値サイクル数と PMA 濃度の関係を図-2 に示した。PMA 未処理のサンプルでは熱処理で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



図-1 調査水域

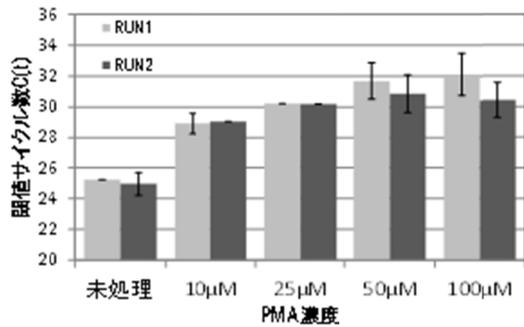


図-2 PMA 添加濃度と閾値サイクル数の関係

ったサンプルでは最適な添加濃度に近づくにつれて 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ル数が高くなっている。PMA 濃度が増加するに伴い 50 µM まで閾値サイクル数も増加しているが、50 µM と 100 µM の違いはほとんど見られなかった。そのため、最適な PMA 濃度は 50 µM と考えられる。以降の実験では PMA 濃度は 50 µM とした。次にメンブレンフィルタに固定された大腸菌を PMA 処理するのに必要な時間の検討を行った。PMA 処理時間 5 分の時に閾値サイクル数は最大値を示しており、5 分以上の処理時間は閾値サイクル数を増加させなかった。実験した PMA 処理時間 0 ~ 15 分では閾値サイクル数にあまり大きな変化が見られなかったが、PMA 処理時間は 5 分間とした。

PMA で処理後ハロゲン光 (500W) を照射して DNA と PMA の結合に必要な照射時間を検討した。照射時間が増加するにつれ、DNA 増幅が検出される閾値サイクル数が増大していき、3 分で最大となりそれ以上はあまり変化が見られなかった。この結果から、照射時間は 3 分以上必要なことが分かったが、安定的なデータを取得するため 5 分間の照射を行うことにした。さらに PMA 試薬を添加する際の回数を変化させ、最適な添加回数を検討した。PMA 添加回数 1 ~ 3 回 (添加間隔 5 分間) で実験したところ、添加回数 1 回でも十分な PMA 処理効果が得られた。

無処理/熱処理大腸菌体混合実験

無処理大腸菌濃度を一定にして、無処理の大腸菌体と熱処理した大腸菌体を様々な比率で混合し、PMA-PCR 法をメンブレンフィルタ法に適用した場合の検出感度について

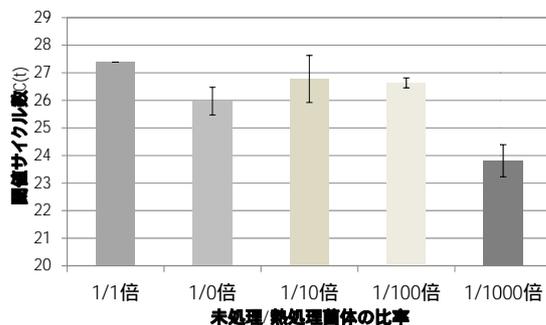


図-3 無処理/熱処理大腸菌体混合実験の結果

検討を行った。混合実験の結果を図-3 に示した。無処理菌体と熱処理菌体を等量混合した場合 (1/1) 少し閾値サイクル数が高くなったが、混合比率 (1/100) までは熱処理菌体無添加の場合 (1/0) とほぼ同程度の閾値サイクル数が得られた。しかし、(1/1000) の比率では閾値サイクル数が大きく低下している。従って、無処理大腸菌濃度の 100 倍まで熱処理した大腸菌が存在しても適用可能であることが分かった。

水域調査の結果

メンブレンフィルタでろ過濃縮した八戸市周辺の水域サンプルに PCR 法、PMA-PCR 法を適用して水環境中の大腸菌数を計測し、従来法のメンブレンフィルタ法による大腸菌群、糞便性大腸菌群、及び MPN 法による大腸菌の計数結果と比較した。図-4 と図-5 に 2013 年 9 月 24 日と 11 月 16 日に実施した St. 1 ~ St. 6 の調査結果を示した。PCR 法では死滅した大腸菌を含むすべての大腸菌が検出され、PMA-PCR 法では VBNC 状態の大腸菌を含む生理的活性のある大腸菌のみが検出される。また培養可能な大腸菌は MPN 法で検出されるので、本研究では PMA-PCR 法と MPN 法の計数値の差が VBNC 状態の大腸菌濃度を表すことになる。図に示した 6 つの調査地点のうち、蕪島海水浴場 (St. 6) を除いて大腸菌群、糞便性大腸菌群及び大腸菌ともほぼ同程度の計数値となり、大腸菌群数は $10^3 \sim 10^4$ 個/mL、糞便性大腸菌群数は $10^1 \sim 10^2$ 個/mL、大腸菌数は 10^1 個/mL 前後であった。蕪島海水浴場 (St. 6) は 3 つの指標とも 1 ~ 2 オーダー程度低くなった。大腸菌群数の計数値は他の指標より 2 オーダ

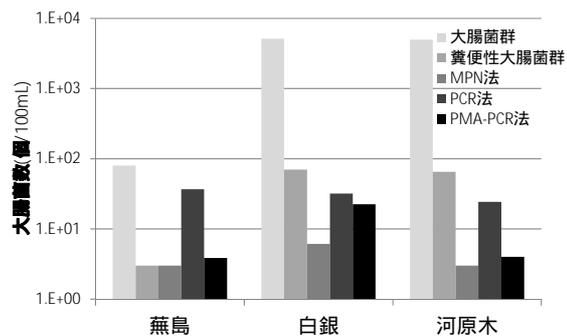


図-4 水域調査結果 (9月24日)

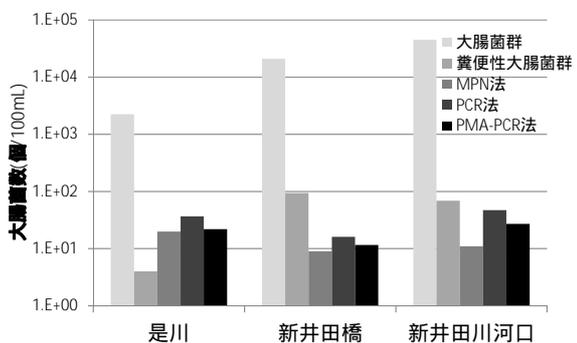


図-5 水域調査結果 (11月16日)

一程度高く計数されたことから、大腸菌以外の自然由来の細菌を多く計数していることが分かる。PMA-PCR 法の計数値は、PCR 法の計数値と MPN 法の計数値の中間に位置し、このことから水環境中では多くの大腸菌が VBNC 状態で存在していることが示された。PCR 法、PMA-PCR 法および MPN 法で計測された大腸菌数を使用して VBNC 状態の大腸菌が全大腸菌数に占める割合を計算した結果、VBNC 状態の大腸菌は 2.3~87.9%となった。

(2) 高感度検出法の検討

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-6 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た。塩基長 75bp のプライマーセットを用いた場合、増幅効率は 103.4%で最も 100%に近く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(copies/PCR 反応液)まで検出可能であった。83bp の塩基長では増幅効率が 106.9%となったが、遺伝子コピー数 2.1(copies/PCR 反応液)および 2.1×10^1 (copies/PCR 反応液)の大腸菌 DNA を検出することができなかった。126bp の塩基長のプライマーセットでは、遺伝子コピー数 2.1×10^1 (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) LED 光源を使用した PMA-qPCR 法

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。浮遊状態およびメンブレンフィルタにろ過濃縮し

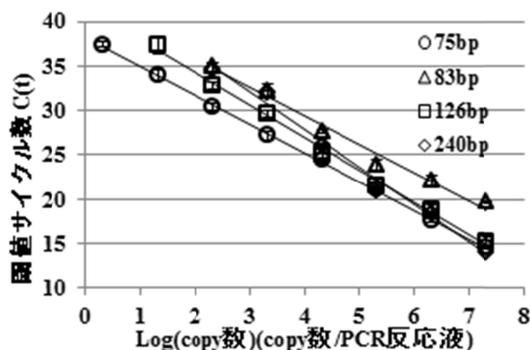


図-6 各塩基長の遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係

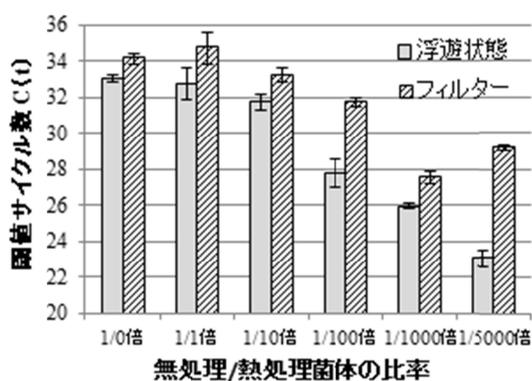


図-7 無処理/熱処理菌体の比率と閾値サイクル数の関係

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。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、フィルタの場合では 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にろ過濃縮した場合は 40 分間であると考えられる。

PMA-qPCR 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-7 に浮遊状態の大腸菌とメンブレンフィルタに固定した大腸菌の実験結果を示した。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。

- 1) J. D. オリバー：生きているが培養できない細菌の公衆衛生上の重要性, R. R. コールウェル, D.J. グリムズ (遠藤圭子, 清水 潮訳): 培養できない微生物たち, pp.259-280, 学会出版センター(2004)
- 2) Vliegen I., Jacobs J.A., Beuken E., Bruggeman C.A. and Vink C.: Rapid identification of bacteria by real-time amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, J. Microbiol. Methods, Vol.66, pp.156-164 (2006)

3) Girones R., Ferrus M. A., Alonso J. L., Rodriguez-Manzano J., Calgua B., Correa A., Hundesa A., Carratala A. and Bofill-Mas S.: Molecular detection of pathogens in water -The pros and cons of molecular techniques, Wat. Res., Vol.44, pp.4325-4339 (2010)

4) Josephson K.L., Gerba C.P. and Pepper I.L.: Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, pp.3513-3515 (1993)

5) Takahashi H., Kimura B., Tanaka Y., Shinozaki J., Suda T., and Fujii T.: Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of *Escherichia coli*, Journal of Microbiological Methods, Vol.79, pp.124-128 (2009)

6) Frahm E. and Obst U.: Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in water samples Journal of Microbiological Methods, Vol.52, pp.123-131 (2003)

7) Primer3Plus[http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer_3Plus](2015年2月20日現在)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

上野亮超, 矢口淳一: 水環境における VBNC 状態の大腸菌の検出と挙動について, 第 50 回環境工学研究フォーラム講演集 B45 p.176-178 (2013)

上野亮超, 矢口淳一: 水環境における VBNC 状態の指標細菌の挙動について, 第 48 回日本水環境学会年会講演集, p.225 (2014)

類家涉, 矢口淳一: LED 光源を用いた PMA-PCR 法による生存可能な大腸菌の計数, 平成 26 年度土木学会東北支部技術研究発表会講演概要 CD-ROM, -24 (2015)

Ueno R., Ruike W., Kaneko N., and Yaguchi J.: Selective quantification of viable *Escherichia coli* in Water Environment using real-time PCR with Propidium

Monoazide, The 6th IWA-ASPIRE Conference, Beijing China, Poster N0009 (2015) 査読有

類家涉, 山本歩, 金子仲一郎, 矢口淳一: LED 光源を用いた PMA-PCR 法による生存可能な大腸菌の計数, 土木学会第 52 回環境フォーラム講演集, pp.33-35 (2015)

類家涉, 山本歩, 金子仲一郎, 矢口淳一: LED 光源を用いた PMA-PCR 法による生存可能な大腸菌の計数, 第 50 回水環境学会年会講演集 L-25, p645 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者 矢口 淳一

(Junichi Yaguchi)

八戸工業高等専門学校 産業システム工
学科環境都市・建築デザインコース 教授
研究者番号: 80342450

(2) 研究分担者 山本 歩

(Ayumu Yamamoto)

八戸工業高等専門学校 産業システム工
学科マテリアル・バイオコース 准教授
研究者番号: 60523800

(3) 連携研究者 金子 仲一郎

(Nakaichiro Kaneko)

八戸工業高等専門学校 産業システム工
学科環境都市・建築デザインコース 助手
研究者番号: 70099761