

培養法によらない環境中の大腸菌の新規モニタリング方法の開発 ～ 採水からわずか5時間で検出する新たな方法の提案 ～

A novel method on monitoring *Escherichia coli* in the environment without incubation on agar plates

金城 翼, 脇 愛華, 馬 勁含
指導教員 浦瀬 太郎, 後藤 早希
東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 水環境工学研究室

環境中の大腸菌を、リアルタイム PCR を利用して遺伝子の検出を試みた。模擬環境水を用いた検討で 10^2 CFU/mL 以上の濃度であれば大腸菌の遺伝子を定量的に検出することができた。同じ DNA 抽出方法を用いて鶴見川の河川水中の 4 CFU/mL 相当の大腸菌遺伝子を検出することができた。

キーワード：リアルタイム PCR, 大腸菌, 遺伝子モニタリング, 迅速測定

1. 諸言

リアルタイム PCR は、環境中の大腸菌や病原体の検出において非常に有効な手法である。この技術は、特定の遺伝子をターゲットに高感度で DNA を増幅し、短時間で定量が可能である。これまで、公共用水域の水質監視方法として、寒天培地で培養しコロニーを計数することが広く行われてきたが、1 日以上時間を要する。

そこで本研究では、環境中の大腸菌のリアルタイム PCR による迅速モニタリングのため、DNA 抽出方法の比較検討を行った。また、開発した方法を実際の河川水に添加し、大腸菌に特異的な遺伝子 (*ybbW*) のリアルタイム PCR による遺伝子検出を試みた。

2. 方法

2.1 添加実験

東京工科大学の池の水に対して、*E. coli* 15034 (PGY 培地で 24 時間培養し 10^9 CFU/mL としたもの) を加え、想定濃度が約 10^5 CFU/mL、 2×10^3 CFU/mL、 10^2 CFU/mL となる模擬試料水を作成した。

2.2 鶴見川

鶴見川の河川水を 2024 年 9 月 3 日、9 月 24 日、10 月 15 日に採水したものをを用いた。

2.3 DNA 抽出・精製

DNA 抽出を DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN GmbH)によって行い、キットの説明書にある AL 法

または ATL 法にしたがった。具体的には、滅菌済みステリベフィルター (Merck Millipore, 孔径 $0.22 \mu\text{m}$) と滅菌済みシリンジを用いて試料水 (100 ~ 300 mL) を加圧ろ過した。その後 ATL 法 (Buffer ATL と Protenase-K) または AL 法 (Buffer AL と Protenase-K, PBS) で、ステリベクスフィルター (56°C, 30 分加熱) から DNA を 2 mL チューブに回収した。さらに、キットの説明書にしたがい DNA をカラム精製した。

2.4 リアルタイム PCR による DNA 測定

精製した DNA サンプルと PCR 反応酵素 (THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 東洋紡)、プライマーを混合し、リアルタイム PCR で測定した。大腸菌の検出に用いたプライマーを表 1 に示す。また、リアルタイム PCR の温度条件を表 2 に示す。

表1 プライマー配列

対象	指標遺伝子	プライマー名	配列(5'~3')	文献
大腸菌 指標遺伝子	<i>ybbW</i>	<i>ybbW</i> 401F	TGATTGGCAAATCTGGCCG	1)
		<i>ybbW</i> 611R	GAAATCGCCCAAATCGCCAT	

表2 リアルタイムPCRの温度条件

プライマー名	温度条件
<i>ybbW</i> 401F	初期変性95°C-1分 3step(95°C-15秒,60°C-15秒,72°C-30秒) ×40サイクル
<i>ybbW</i> 611R	

3. 結果・考察

3.1 添加実験による検出限界の検討

添加実験のリアルタイム PCR の結果を図 1 に示す。想定濃度が高いほど Ct 値が低く 10^2 CFU/mL 以上の濃度があれば十分にブランクと識別可能であった。また、AL 法より ATL 法の方が、Ct 値が低かった。これより AL 法より ATL 法の方が、DNA 回収が優れていることが考えられる。また、二本鎖 DNA から一本鎖 DNA への解離曲線の結果を図 2 に示す。同じ温度で曲線ピークが確認され、大腸菌の *ybbW* 遺伝子が増幅されたと考えられる。

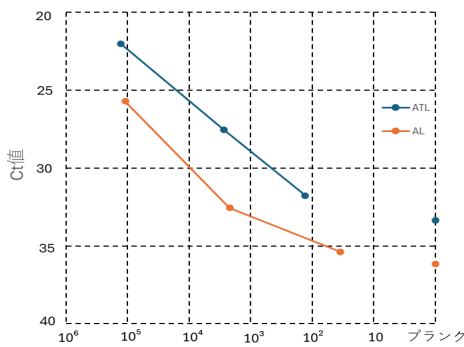


図 1 異なる溶出バッファーを用いたときの Ct 値(ATL 法と AL 法)

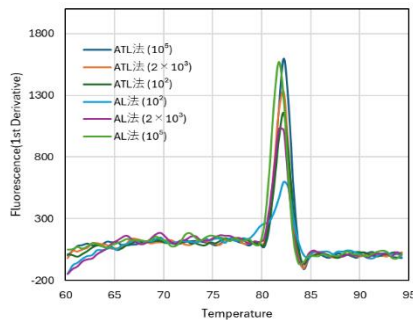


図 2 二本鎖 DNA から一本鎖 DNA への解離曲線(添加回収試験)

3.2 鶴見川河川水に含まれる大腸菌遺伝子の検出
 河川水(9月3日:大腸菌計数値 4.1 CFU/mL, 9月24日:6.5 CFU/mL, 10月15日:11.3 CFU/mL)からの大腸菌指標遺伝子の ATL 法による検出結果を表 3 に示す。全てのサンプルで Ct 値を確認できた(DNA の増幅があった)ことから大腸菌指標遺伝子の検出ができたと考えられる。また、二本鎖 DNA から一本鎖 DNA への解離曲線の結果を図 3 に示す。これより、全てのサンプルで同じ温度で曲線ピークを確認でき、増幅された遺伝子は *ybbW*

であった。試料に含まれる大腸菌数は 10^2 CFU/mL 以下であり、定量性については検討を要するが、定性的には、環境中の大腸菌の検出が十分に可能であった。

表3 鶴見川のリアルタイムPCR結果

採取日	添加量(mL)	溶出Buffer量(μL)	鋳型添加量(μL)	Ct値
9月3日	150	200	1	31.85
	300	200	1	30.72
	150	50	1	29.79
	300	50	1	29.55
	ブランク	200	1	34.18
9月24日	100	100	2	30.61
	300	100	2	28.95
	ブランク	100	2	35.82
10月15日	150	200	1	30.58
	300	200	1	29.32
	ブランク	200	1	≧40
	150	200	2	29.99
	300	200	2	28.71
	ブランク	200	2	≧40

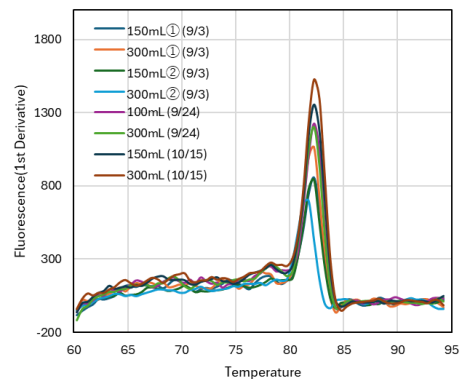


図 3 二本鎖 DNA から一本鎖 DNA への解離曲線(鶴見川)

4. 結論と今後の展望

リアルタイム PCR で環境水中から、大腸菌指標遺伝子を検出が可能であることがわかった。AL 法より ATL 法の方が、DNA 回収能力が優れていた。試料水中に 10^2 CFU/mL 以上の大腸菌が含まれていれば、大腸菌遺伝子を定量的に検出することができた。また、河川水中の 4 CFU/mL 相当の大腸菌遺伝子の検出も定性的には可能であった。本法の実用化には、実河川水での試験を継続し、適用範囲を確認することがさらに必要である。

5. 参考文献

1) David I. Walker et al. Water Research 126 101-110 (2017)