

2 浄水中の従属栄養細菌迅速測定を目的とした プロモデオキシウリジン修飾 DNA 定量法の確立

浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (京都大学)

Quantification of DNA labeled with bromodeoxyuridine for a rapid measurement of
heterotrophic bacteria in drinking water

Yasuhiro ASADA, Yumiko OHKOUCHI, Sadahiko ITOH (Kyoto Univ.)

1. はじめに

現在の水道システムでは塩素消毒により病原微生物の感染リスクを低減させている一方で、消毒副生成物の生成による健康影響や塩素消毒によりカルキ臭が発生し快適性が低下することから、需要者の水道水離れが進んでいる¹⁾。そのためこれらの生成抑制を目的として、残留塩素濃度の低減が検討されており、より厳密な微生物管理が必要となってくる。従属栄養細菌数は、浄水処理過程や消毒過程での微生物の挙動評価、塩素消失や滞留の結果としての微生物再増殖に代表される給配水過程での微生物汚染の評価に適している²⁾とされている。しかし、その測定には7日間の培養期間を要することから、給配水時間が短い我が国の水道システムにおいては従属栄養細菌数測定結果のフィードバックによる水質管理は実現が難しいと考えられ、培養法に代わる迅速測定法の確立が必要である。

そこで本研究では5-プロモ-2'-デオキシウリジン(以下、BrdUと記載)を用いた核酸標識法(以下、BrdUラベル化法と記載)により従属栄養細菌数の迅速測定を試みた。まずモデル微生物を使用し、全体的な作業時間の短縮、抗原抗体反応の向上を目的として標識DNAの担体への固定化手法に関する検討を行った。そして、実際の浄水中の従属栄養細菌を対象として本手法を適用し、BrdUラベル化法の従属栄養細菌数迅速測定法としての適用性について比較検討した。

2. 実験方法

2.1 従属栄養細菌数の測定

試料中の微生物濃度の測定については、R2A寒天培地を用いた平板培養法を用いた。

2.2 BrdUラベル化法によるBrdU標識DNA量の定量

本研究で行うBrdUラベル化法は、微生物検出を目的とした検討として海洋微生物の生産速度測定^{3),4)}への適用が報告されているのみである。そこで本研究ではHamasakiらによる方法³⁾を参考にし、多検体同時処理が可能となるよう96穴マイクロプレートにBrdU標識DNAを固定化し、酵素抗体法により標識DNAを定量する方法に改善した。96穴マイクロプレート上へのBrdU標識DNAの固定化法としては、BrdUを取り込ませた微生物細胞をマイクロプレートに固定化して定量的測定を行う手法(以下、細胞固定化法と記載)と、抽出したBrdU標識DNAを直接マイクロプレートに固定化して抗原抗体反応を行う手法(以下、DNA固定化法と記載)の2種類を比較検討した。検討の際にはモデル微生物として、*Pseudomonas fluorescens* P17(ATCC 49642; P17株)および*Aquaspirillum* sp. NOX(ATCC 49643; NOX株)を使用した。ラベル化反応条件は、BrdU濃度1 μ M、BrdUラベル化反応時間5時間と設定した³⁾。細胞固定化法の主な実験の流れとしては、1日目に段階的に希釈した微生物懸濁液を用いたBrdUラベル化反応、マイクロプレートへの微生物細胞固定を行った。そして、2日目に前処理として内因性ペルオキシダーゼと細胞壁の処理、最後に酵素抗体法を利用してBrdU標識DNAの検出を行い、平板培養法で求めた微生物濃度との関係を調べた。簡易的な操作フローを図1に示す。DNA固定化法の主な実験の流れとしては、1日目に微生物懸濁液を用いたBrdUラベル化反応、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)による全DNA抽出を行った。そして2日目にマイクロプレートへのDNA固定、DNA変性を行い、以降は細胞固定化法と同様な操作を行った。簡易的な操作フローを図2に示す。ここで、細胞固定には4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液、内因性ペルオキシダーゼ不活化には3% H_2O_2 溶液、細胞壁消化にはペプシン(2 mg/mL:

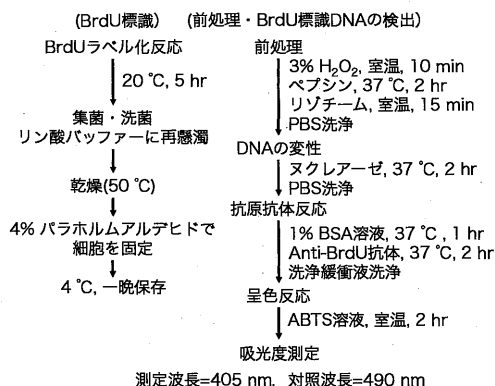


図1 細胞固定化法の操作フロー

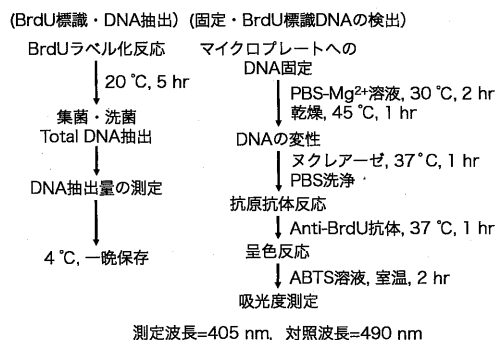


図2 DNA固定化法の操作フロー

0.01 N HCl 溶液) とリゾチーム (3 mg/mL : TE 緩衝液)、DNA 固定には 0.2 M PBS-Mg²⁺ 溶液、ペルオキシダーゼ基質には ABTS 基質 (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) を使用した。

2.3. 浄水中の従属栄養細菌数測定への BrdU ラベル化法の適用

高度浄水処理水の給水区域として大阪市水道局給水区域、急速ろ過による急速ろ過処理水給水区域として京都市水道局給水区域を選定し、それぞれ 6 地点で給水栓水 100 mL のサンプリングを行った。チオ硫酸ナトリウム溶液により塩素中和した後、遮光状態で、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で 4 日間培養した。塩素中和直後の試料を 0 日目の試料とし、0、2、3、4 日目に試料を採取して従属栄養細菌数の測定と細胞固定化法・DNA 固定化法による BrdU 標識 DNA 量の定量を同時に行った。なお、0、2 日目の試料は通常の培養法に加えて、吸引ろ過により微生物を捕集したメンブレンフィルター (C020G047A、ADVANTEC) を R2A 液体培地に吸収させたパッド上で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、7 日間培養するメンブレンフィルター法により測定を行った。なお微生物濃度は、平板法で検出限界を下回った際にのみメンブレンフィルター法で得られた値を採用した。

3. 実験結果と考察

3.1 BrdU 標識 DNA 固定化法の比較

細胞固定化法を用いて同一条件で得られた結果を図 3 に示す。BrdU 標識 DNA 量 (すなわち、吸光度) は、R2A 寒天培地で求めた微生物細胞数 (以下、HPC と記載) の対数値に比例していた。P17 株では細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量が 0.023 ~ 0.029、NOX 株は 0.033 ~ 0.041 と比較的安定した結果となった。また、 $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mL の範囲で直線性が得られた。HPC 濃度が高い領域では、各細胞に対して BrdU の取込みが十分に行われなかったあるいはマイクロプレートのウェル内での細胞固定が上手く作用しなかったなどの可能性により吸光度の低下が生じていると考えられる。そのため HPC 定量可能範囲として、 $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mL 付近であると判断した。この範囲は、水道システムにおける初期の微生物再増殖の挙動把握に対して有効であると考えられる。しかし部分的に測定値が大きく変動している。この原因として微生物細胞への BrdU の取込み率が均一でないことや、同一試料間での細胞壁処理効果の違いが考えられる。細胞壁処理では、部分的に消化されなかった細胞壁が残存すると、分子量の大きい抗体が通過することができずに、抗原抗体反応効率低下させる可能性がある。一方、測定に要する時間は、約 2 日間に短縮することが可能になった。

続いて DNA 固定化法を用いて同一条件で得られた結果を図 4 に示す。細胞数 1 log 当たりの吸光度変化量は P17 株で 0.053 ~ 0.059、NOX 株で 0.047 ~ 0.057 と両株とも類似かつ比較的安定した値を示した。そしてこれらの吸光度変化量は、細胞固定法を用いた場合に得られた値よりも向上していた。この影響としては、各測定法の大きな違いである細胞壁処理が強く影響していると考えられる。細胞固定化法の場合、細胞をマイクロプレートに固定してから細胞壁処理を行っているため、消化しきれなかった細胞壁が残存しやすく、吸光度変化量の低下が起こったと考えられる。一方、DNA 固定化法は、DNA 抽出段階により細胞壁を完全に除去していることから細胞壁による抗原抗体反応への影響がなく、吸光度変化量の低下がほ

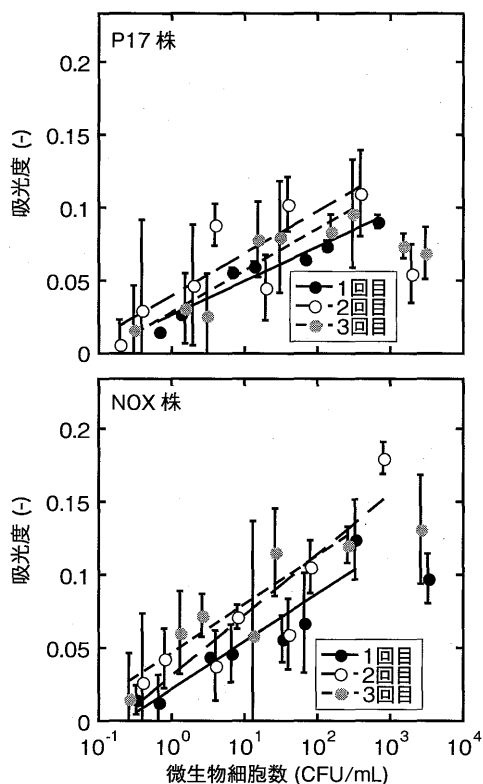


図3 細胞固定化法による微生物細胞数とBrdU 標識 DNA 量の関係 (n=4)

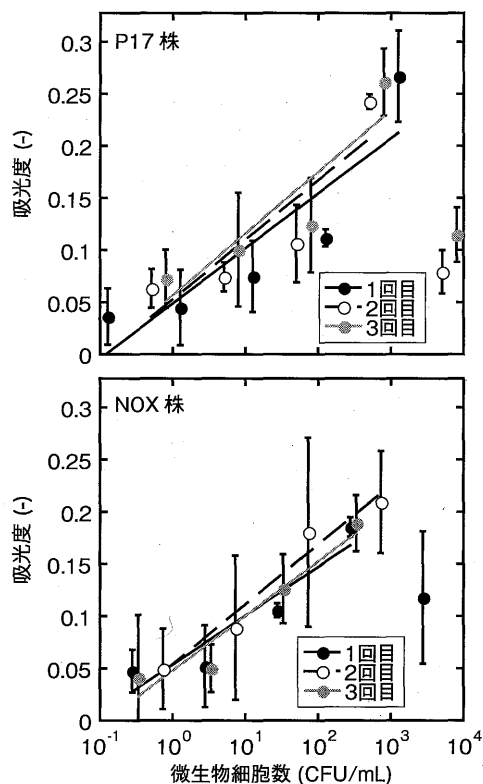


図4 DNA固定化法による微生物細胞数とBrdU 標識 DNA 量の関係 (n=3)

とほとんどなかったと考えられる。そのためこれらの影響から、細胞数1 logあたりの吸光度変化量の違いが各測定法に生じていると考えられる。また細胞数が多い場合については、やはり吸光度の低下が確認されており、この原因として各細胞に対してBrdUの取込みが十分に行われなかった可能性が考えられる。そこで細胞固定化法と同様、直線性が得られる範囲は $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLと判断した。1日の作業時間は、細胞固定法が両日ともに約12時間に対して、本手法では1日目が約10時間、2日目が約8時間と更なる時間短縮が可能となった。

3.2 浄水中の従属栄養細菌数測定へのBrdUラベル化法の適用

水道水中で再増殖した従属栄養細菌に3.1で検討した2種類の固定化法を用いてBrdU標識DNA量を測定し、従属栄養細菌数との関係を調べた。細胞固定化法、DNA固定化法で得られた結果をそれぞれ図5に示す。 10^{-1} CFU/mL以下の領域では両手法ともにブランクにより補正した吸光度がほぼ0あるいは負の値を示し、正確な測定ができていないと考えられる。また、 10^3 CFU/mL以上の領域では吸光度が低下する傾向が確認された。そこで、 $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLの領域で回帰式を算出し、95%信頼区間と合わせて図5に示した。その結果、従属栄養細菌数の対数値とBrdU標識DNA量の間に比例関係が得られた。急速ろ過処理水を対象とした場合の相関係数は細胞固定化法で $R^2 = 0.632$ 、DNA固定化法で $R^2 = 0.711$ であった。また高度浄水処理水では、細胞固定化法で相関係数が $R^2 = 0.643$ 、DNA固定化法で $R^2 = 0.806$ であり、ともに正の相関が確認された。また $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLの範囲で直線性が得られ、この範囲がHPC定量可能範囲であると判断した。3.1で検討した2つの固定化法を比較すると、細胞数1 logあたりの吸光度変化量が細胞固定化法で0.025程度、DNA固定化法で0.05程度と約2倍の値を示した。これはモデル微生物での検討と同様な傾向を示しており、DNA抽出により細胞壁処理の影響を排除することでより大きな吸光度変化量が得られることを示している。同一試料の測定値の変動が抑制できなかったことを考慮すると、吸光度変化量が大いほど微生物数測定値の誤差を低減可能であると言えるため、

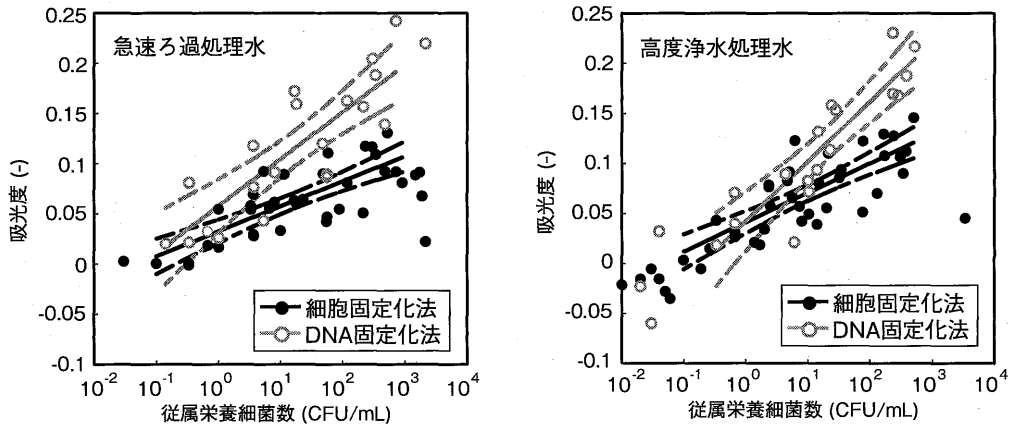


図5 再増殖試料中の従属栄養細菌数とBrdU標識DNA量の関係
(左:急速ろ過処理水、右:高度浄水処理水)

DNA固定化法を採用することが望ましいと考えられる。また95%信頼区間を見ると、細胞固定化法では95%信頼区間をはずれる吸光度値が半数程度存在するのに対して、DNA固定化法では変動幅が抑制されており、より信頼度が高い手法と言える。さらに作業時間に関してもDNA固定化法では、1日あたりの作業時間が大幅に短縮されている。以上から、浄水中の従属栄養細菌数測定法として、DNA固定化法がより有用性が高い測定法であると判断できる。

4. 本研究の結論

本研究では水道システムにおける微生物汚染指標として従属栄養細菌をとりあげ、BrdU標識DNA固定化法を適用したBrdUラベル化法によるその迅速測定手法を提案した。まずモデル微生物を用いて、2種類の固定化法を比較検討した。その結果、両手法ともに微生物細菌数の対数値とBrdU標識DNA量の間に比例関係が得られ、 $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLの範囲で直線性を示すことが確認できた。次に実際の水道水中の従属栄養細菌数を対象として、BrdU標識DNA量に基づいた従属栄養細菌数測定を試みた。両手法ともに $10^{-1} \sim 10^3$ CFU/mLの範囲での定量性と約2日間への測定時間短縮が確認され、両手法の有用性が示された。最後に2種類の固定化法を比較した結果、細胞数1 logあたりの吸光度変化量が大きいこと、変動幅が抑制されていること、1日の作業時間がより短いことから、DNA固定化法を用いたBrdUラベル化法が浄水中の従属栄養細菌数の迅速測定法としてより有用性が高いと結論づけた。

謝辞 本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業、H20-健危-一般-006、代表者 島崎大)によるものである。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 伊藤禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 2008.
- 2) 厚生科学審議会: 水質基準の見直し等について(答申), 2003
- 3) Hamasaki, K., Long, R. A. and Azam, F.: Individual cell growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, No. 3, pp. 217-227, 2004.
- 4) Steward, G. F. and Azam, F.: Bromodeoxyuridine as an alternative to ^3H -thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples., *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 19, pp. 57-66, 1999.
- 5) 大河内由美子, 浅田安廣, 伊藤禎彦: DNA合成量に基づいた従属栄養細菌の迅速定量に関する基礎的検討, 第42回日本水環境学会年会講演集, pp.162, 2008.

キーワード: BrdU、従属栄養細菌、浄水、固定化法

Key Words: BrdU, heterotrophic bacteria, drinking water, immobilization method