

EMA-PCR法による殺菌効果の確認

○赤鹿玉季、吉崎美和、鳶田雅光、向井博之（タカラバイオ株式会社）

研究の背景

生死と病原性の有無が同義である細菌の検出は、衛生上、特に水や食品の安全性を検査する分野では非常に重要である。伝統的生菌検出方法としては培養法によるコロニーカウントやPCR法による特定遺伝子の増幅などがある。しかしながら、細菌は環境によっては生存しているにもかかわらず培養が不可能なケースがあり、培養に必要な時間と培地の選択、代謝活性のリカバリーなどのバイアスが原因で、信頼性のある結果を得られないことがあった。一方、PCR法では、細胞死後のDNAの安定性によって、病原性リスクの過剰評価、所謂偽陽性という検出結果を招くことが多く、生菌のリスクを評価することは困難であった。したがって、分子レベルの迅速なリアルタイム検出方法が求められた。（参考文献1）

生菌(viable cell)、死菌(Dead cell)はしばしば培養、代謝、膜完全性の有無によって4種類に分類される。すなわち、Live、viable but not culturable(VNC)、Ghosts、Membrane compromised である。分類方法は右図に示した。前述の通り、培養法では検査対象に生菌であるVNCが混在しても陰性と判断されるケースがあり、一方、PCR法では殺菌処理後も生菌死菌ともに検出してしまう為、VNCを生菌として判断することは困難であった。（参考文献2）

本報告は、大腸菌(JM109 K12由来株)をモデルとし、VNCを含めた生菌検出を行う方法の開発を目的に、塩素、UV、アルコール、加温という代表的な殺菌法によってEMA-PCR法ではどのような結果が得られるか、培養法、PCR法の結果を併せて比較する。

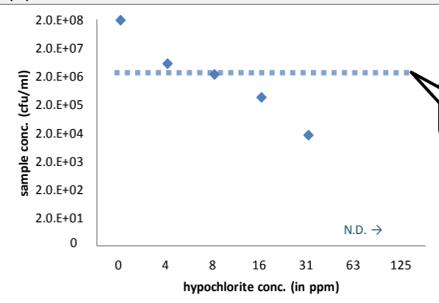
	Viable Cell		Dead cell	
	Live	VNC	Ghosts	Membrane compromised
culturable	+	-	-	-
Metabolically Active	+	+	-	-
Intact	+	+	+	-
culture	+	-	-	-
PCR	+	+	+	+

生菌死菌分類例。参考文献2より改変。

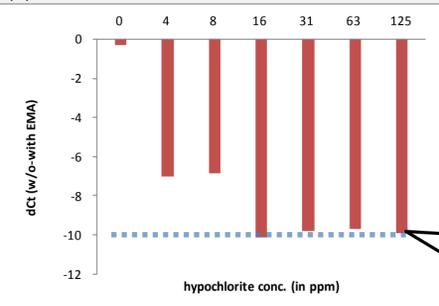
結果

(1) 塩素による殺菌(次亜塩素酸 5分)

(1)-A 培養結果

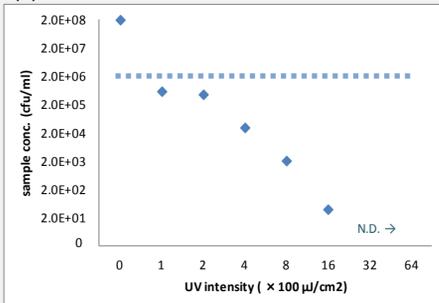


(1)-B EMA-PCRとPCRの差

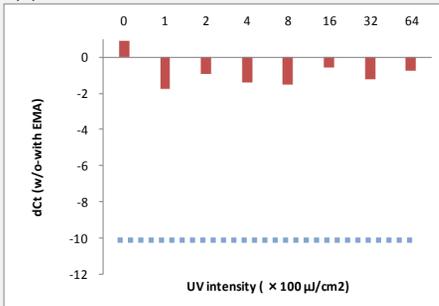


(2) UV照射による殺菌(UV crosslinker 254 nm 直射)

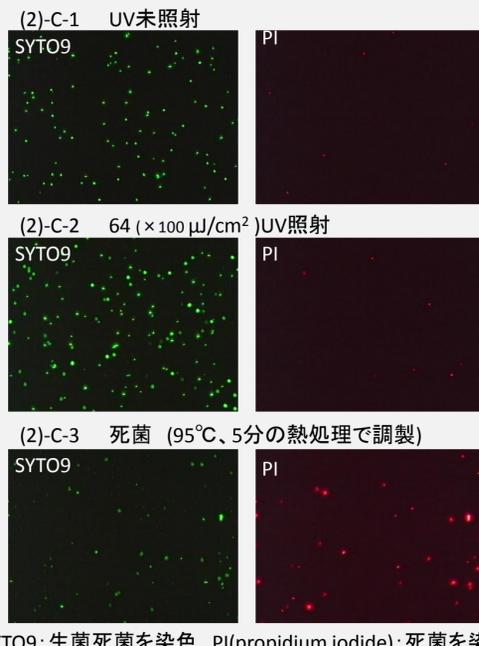
(2)-A 培養結果



(2)-B EMA-PCRとPCRの差



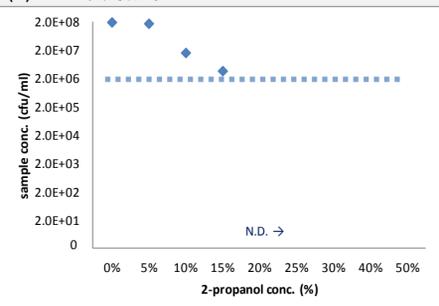
(2)-C UV殺菌検体におけるBacLight染色



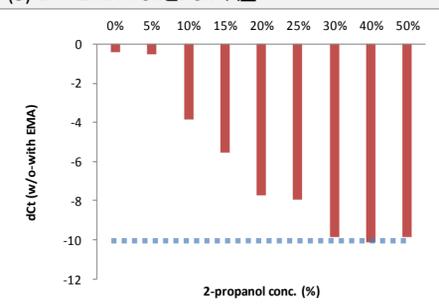
SYTO9: 生菌死菌を染色、PI(propidium iodide): 死菌を染色

(3) アルコールによる殺菌(2-propanol 15分)

(3)-A 培養結果

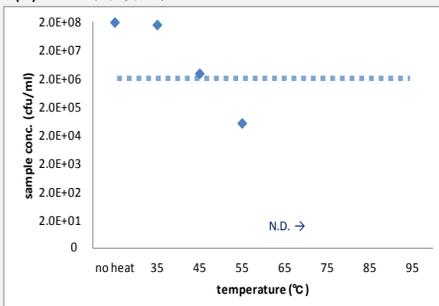


(3)-B EMA-PCRとPCRの差

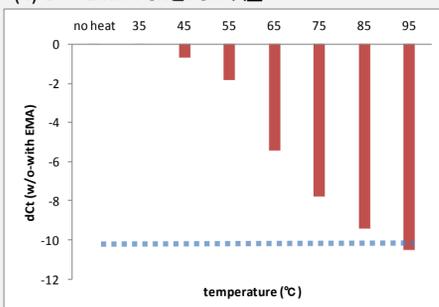


(4) 加温殺菌(ヒートブロック 15分一定)

(4)-A 培養結果

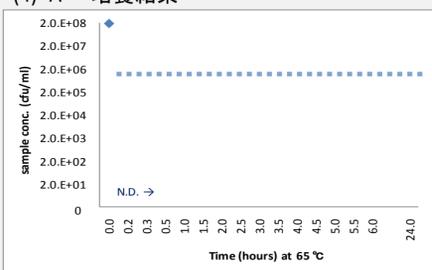


(4)-B EMA-PCRとPCRの差

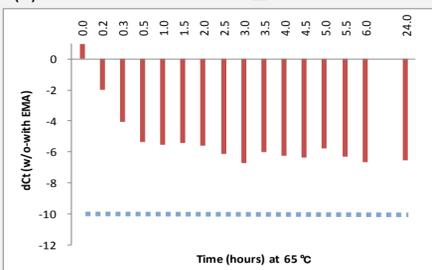


(4)' 加温殺菌(ヒートブロック 65°C一定)

(4)'-A 培養結果



(4)'-B EMA-PCRとPCRの差



disinfection (1)-(4)	Detection limit culture		EMA-PCR	PCR
chlorine (ppm)	5-8	<	9-16	< none
UV (x 100 μJ/cm²)	less than 1	<<	none	≡ none
alcohol (%)	16-20	<	26-30	< none
Heat (°C)	46-55	<	86-95	< none

培養法、EMA-PCR法、PCR法において、検出限界にいたる各種殺菌手段の処理条件を左テーブルに示した。テーブル中の不等号は、殺菌手段の大小関係を検出方法別に比較したものである。

検出限界は上グラフに示した点線の通り、培養法では生存率1%(2.0E+06)未満、PCR法とEMA-PCR法ではCt値の差dCt値(w/o - with EMA)を95°C5分処理で得られる死菌コントロールの平均値より約10と定めた。検出限界の設定が困難なものは"none"とした。

考察

detection method	disinfection	Viable Cell		Dead cell	
		Live	VNC	Ghosts	Membrane compromised
culture	almost all	○	×	○	○
		←→	←→	←→	←→
EMA-PCR	chlorine	○	○	-	○
	UV	○	○	×	-
	alcohol	○	○	-	○
	heat	○	○	×	○

○ : correct
 × : false
 - : hardly existed
 ←→ : detection range

塩素殺菌

塩素による殺菌効果のメカニズムは完全には解明されていないが、細菌細胞を塩素に曝露することで膜を穿孔すると考えられている。EMA-PCR法では、検出限界に至る塩素濃度が培養法と比較して大きかったことから、EMA-PCR法では膜の損傷を受けていないVNCをPCR増幅していることが示唆された。

UV殺菌

UVによる殺菌効果のメカニズムは完全には解明されていないが、膜穿孔型の殺菌方法とは異なり、短時間の照射では膜への影響は少ないと考えられている。培養法ではUV照射によって検出限界に至ったが、EMA-PCR法とPCR法とではUV強度に関係なく一定の値が得られた。加えて、膜非透過性生死判別用染色試薬BacLight染色においても判別が不可であった。このことからUV照射による死菌の多くはMembrane compromisedではなくGhostsの状態であることが示唆された。

アルコール殺菌

塩素殺菌と同じく、細菌細胞をアルコールに曝露することで膜を穿孔すると考えられている。EMA-PCR法では、検出限界に至るアルコール濃度が培養法と比較して大きかったことから、EMA-PCR法では膜の損傷を受けていないVNCをPCR増幅していることが示唆された。

加温殺菌

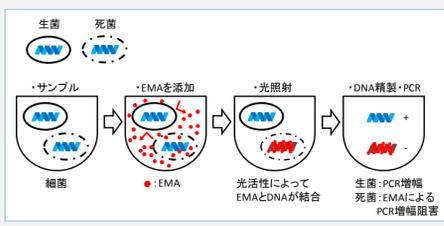
温度によってEMA-PCRの効果が異なっていたことが膜損傷の指標となった。培養法とEMA-PCR法とでは検出限界に至る温度に差が生じたが、低温では加温時間に関わらずEMA-PCR法でも検出限界に至らず、培養法では検出が不可であった。このことから、EMA-PCR法では膜の損傷を受けていないGhostsとVNCをPCR増幅していることが示唆された。

結論

一部Ghostsを含む偽陽性反応として検出される可能性があるものの、これまで不可能であったVNCを含む生菌の検出が可能であることが示唆された。ただし、UV殺菌のような膜の損傷が小さいと考えられる殺菌法では適用が難しいこともあり、EMA-PCR法の特徴を活かして実用化されることが望ましい。

EMA-PCR法の原理

EMA (Ethidium monoazide bromide)は核酸のインターカレーターとして働く色素で、可視光に曝露することで核酸に対する共有結合能を獲得する。EMAは死菌(膜損傷菌)の細胞内に侵入し、光活性によってDNAに修飾、その結果、死菌由来のPCR増幅が抑制される。一方、生菌は膜の完全性により、EMAが細胞内部に侵入することができず、正常にPCR増幅する。EMA-PCR法は、EMAの能力を最大限活用した、細菌の膜完全性に基づく生死判別方法である。



EMA-PCR法の概念図

参考文献

- Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. J Microbiol Methods. 2007 Aug;70(2):252-60.
- Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. FEMS Microbiol Lett. 2009 Feb;291(2):137-42.
- Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. Biotechniques. 2003 Apr;34(4):804-8, 810, 812-3.
- Ethidium monoazide (EMA) 処理とリアルタイムコンピネーションによる環境中のレジオネラ生菌のみを定量検出する方法に関する研究 -迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場の衛生管理手法に関する研究- 平成21年度 総括・分担研究報告書