



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Detection and quantification of viable bacteria using selectively membrane-permeable dye and PCR [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	藤本, 淳治
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第6892号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53944
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Junji_Fujimoto_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 藤本 淳治

審査委員	主査	教 授	福井 学
	副査	教 授	森川 正章
	副査	助 教	小島 久弥
	副査	参 与	渡辺 幸一 (ヤクルト中央研究所)

学 位 論 文 題 名

Detection and quantification of viable bacteria using selectively
membrane-permeable dye and PCR

(選択的膜透過性色素とPCRを用いる生きた微生物の検出および定量法)

ヒト腸管内には多様な細菌が存在し、複雑な微生物生態系 (腸内細菌叢) が形成され、宿主の健康と密接に関係している。その中でもプロバイオティクスは、“腸内細菌叢のバランスを改善し、宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物” と定義され、予防医学の重要性が見直される今日、その重要性はますます増加している。糞便中のプロバイオティクスの検出には選択培地を用いた培養法とその後の菌株識別など多大の時間と熟練した操作が必要であり、多数の検体を処理することは困難であった。そこで、本研究ではプロバイオティクスの簡便で正確な検出、識別、定量方法の開発を試みた。また、プロバイオティクスは腸管に生きて届くことが求められるため、定量的PCR (qPCR) と選択的膜透過性色素を組み合わせることで生きた菌体のみを定量する方法の開発を試みた。

はじめに、腸内環境改善、免疫刺激、抗腫瘍作用などが明らかにされているプロバイオティクスの一つである*Lactobacillus casei* シロタ株 (LcS) のPCRを用いた菌株特異的な検出・定量を可能にするため、菌株識別法のひとつであるRandomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法を用いて菌株特異的な遺伝子配列を検索した。その菌株特異的配列を用いてPCRプライマー (pLcS) を作製し、*L. casei* 57 菌株を含むヒト腸内からよく分離される157菌株に対して特異性を確認した。LcSの存在しないヒト糞便にLcSを添加し、DNAを抽出してqPCRで定量したところ、糞便1g (湿重量)あたり $10^{4.6}$ cells 以上で検出可能であり、添加した菌数とqPCRの定量値は $10^{4.6}$ – $10^{9.6}$ cells/g でよく一致した。LcSを含む発酵乳を7日間飲用した糞便 からは、培養法で $10^{8.0 \pm 0.9}$ CFU/g (mean $\pm$ S.D.)、菌株特異的プライマーを用いたqPCR法で $10^{9.1 \pm 0.5}$ cells/g のLcSが検出され、培養法での検出菌数が有為に少なかった。培養法での菌数が少なかった理由として選択培地に含まれる抗生剤の影響が考えられたが、qPCR法では生菌のみならず、死菌体を検出している可能性も考えられた。

次に、生菌と死菌を分別定量するため、菌株特異的プライマーと選択的膜透過性色素であるpropidium monoazide (PMA) を組み合わせたPMA-qPCR法による生きている菌の検出・定量を試みた。PMAはイオン性色素であるため、生菌の細胞膜を透過できないが、膜完全性が壊れている死菌体には容易に透過する。また、DNA結合性色素であるため、細胞内に透過した

PMAは2本鎖DNA間に侵入する。その後、PMAは強光を受けることで、DNA鎖同士を共有結合してPCR反応を阻害する。したがって、PMA処理は死菌体からのPCR増幅を阻害するが、生菌の定量には影響しない。そこで腸内環境改善、炎症性大腸炎改善効果や免疫刺激効果が確かめられている*Bifidobacterium breve* ヤクルト株 (BbrY) の菌株特異的プライマーを開発し、さらに、BbrYを50 μ M PMA中で5分間室温保存し、2分間強光照射することにより、生菌に比べて死菌体からのPCR増幅を1/10,000に抑制できることを確認した。生きたBbrYを糞便に添加したところ、 10^5 – 10^9 cells/g で添加菌数とPMA-qPCR法の定量値が一致した。BbrYを含む発酵乳を10日間飲用後の糞便 には培養法で $10^{6.9\pm1.5}$ CFU/g、PMA-qPCR法 (生菌)で $10^{7.5\pm1.0}$ cells/g、通常のqPCR法 (生菌+死菌)で $10^{8.5\pm0.8}$ cells/g検出された。PMA-qPCR法を用いることで膜完全性を維持している生きたBbrYのみを培養することなく検出可能となった。

最後に、*Helicobacter pylori*による胃炎の改善効果やヒトに対する免疫調整能が確認されているプロバイオティクスである*Bifidobacterium bifidum* BF-1株 (BF-1株) の菌株特異的プライマーを特異的RAPDバンドから作製し、*B. bifidum* 30菌株を含む腸内細菌127菌株に対して特異性を確認した。PMA-qPCR法は、BF-1株の加熱死菌体のPCR増幅を通常のqPCR法と比較して約1/10,000に抑制した。つぎに、長期培養 (10日間)、および人工胃液処理 (pH2.8、3時間) におけるBF-1株の膜完全性の変化を継時的にPMA-qPCR法で解析し、DAPIカウント (直接計数法)、16S rRNAを標的とする逆転写qPCR (RT-qPCR) 法、菌体内ATP量、およびBF-1株の選択培地による菌数と比較した。その結果、BF-1株は培養法、ATP法およびPMA-qPCR法では同様に菌数減少が観察されたが、DAPIカウント、通常のqPCR法およびRT-qPCR法では菌数変動は検出できなかった。これにより、PMA-qPCR法が優れた生菌検出法であることが証明された。ヒト糞便に生きたBF-1株を添加してPMA-qPCR法を行うと、添加菌数とPMA-qPCR法による菌数には $10^{5.3}$ – $10^{10.3}$ cells/gの間で非常に高い相関がみられた ($r > 0.99$, $P < 0.001$)。BF-1株を含む発酵乳を26日間飲用後の糞便 から、培養法で $10^{4.5\pm1.5}$ CFU/g、PMA-qPCR法で $10^{6.2\pm0.4}$ cells/g、qPCR法で $10^{7.6\pm0.7}$ cells/gのBF-1株がそれぞれ定量され、膜完全性を指標とするPMA-qPCR法により、コロニー形成能を指標とする培養法に比べ50倍量 のBF-1株が生きて腸内に存在することが確認された。

以上、本研究により、PMA処理と菌株特異的プライマーを用いたqPCR法による糞便中の生きたプロバイオティクスの迅速かつ正確な定量が可能となったことで、プロバイオティクスの理解を深め、プロバイオティクスの健康への影響の検証に大いに役立つことが期待される。

PMA処理は生菌と死菌の分別定量を可能にするため、PMA処理とPCRを利用した微生物検出法 (DGGE、T-RFLP、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析など) を組み合わせることで、ヒト腸内細菌叢のみならず、多様な微生物群を含む様々な一般環境試料に対しても応用可能と考えられ、微生物群集の理解に対して新たな視点を与えることが期待される。さらに、PMA処理と菌株特異的プライマーを組み合わせたPMA-qPCR法はヒト消化管におけるプロバイオティクスの追跡のみならず、微生物を環境に添加するバイオオーグメンテーションの際の添加微生物の消長が計測可能となることが予想され、環境浄化や土壌改良などへの応用も期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。