

バイオミディア 2001

バクテリオファージを利用した 特定細菌の迅速検出技術

野上 尊子

細菌検査は、食品、医薬品、化粧品、の製造や上下水の管理など、あらゆる業界で重要な位置を占めている。近年、環境汚染や食品衛生に対する社会的な関心が高まるにつれ、細菌検出技術についての考え方も変化してきた。安全な生活環境を保証しつつ、万が一細菌による汚染事故が発生した場合に迅速な対応ができるよう、短時間で正確に、標的となる悪玉菌を検出する技術が要求されるようになった。時間と人手を費やす従来の培養による細菌試験では、ますますスピードアップする世の中に対応しきれていないのが現状であり、迅速簡単で精度と特異性も持ち合わせた、新しい細菌検出技術の開発が望まれている。このような状況の下、バクテリオファージを利用した細菌の迅速検出技術が紹介され、注目を集めている。

バクテリオファージ（以下ファージと記す）は、抗体に匹敵する精度と感度で厳密に宿主細菌を認識して結合し、感染する。地球上に棲息するあらゆる細菌に対して、これを宿主とするファージが存在すると考えられており、こうした多様性もファージの特徴の一つである。加えてファージの外殻や遺伝子の構造が単純であること、突然変異の誘発が容易であることなど、細菌検出に応用しやすい利点も多い。ここではDNAを蛍光標識したファージT4を利用した大腸菌の検出技術と、プローブとなる遺伝子を導入したファージによる細菌検出技術について簡単に紹介したい。

T4は宿主大腸菌細胞表層の特異レセプター分子を認識して結合し、膜電位に依存して細胞内にDNAを注入する。この性質を利用して、大腸菌の検出系が組み立てられた。¹⁾ファージ頭部のDNAを蛍光色素で標識し、大腸菌に感染させる。ファージDNAの蛍光は頭部に充填されている時には弱いシグナルしか与えないが、大腸菌細胞内に注入されると、強いシグナルを与えるようになり、その蛍光は遊離のファージあるいは吸着してはいるがDNAを注入していないファージとは、蛍光顕微鏡下で明確に区別できる。ファージT4のDNA注入過程は宿主の膜電位に依存しており、膜電位を失った菌、すなわち生物活性を著しく損なった菌にDNAが注入されることはない。したがって大腸菌だけを、しかも活性の高い菌だけを特異的に蛍光染色できる。T4と大腸菌の反応は非常に速く、好条件の下では5

オルガノ株式会社総合研究所（課長代理）

〒335-0015 埼玉県戸田市川岸1-4-9

Tel: 048-446-1246 Fax: 048-443-9060

E-mail: nogami-t@organo.co.jp

1985年 名古屋大学大学院農学研究科博士課程後期課程修了、
農学博士

現在の興味：微生物の高感度迅速検出

分以内に90%以上の細胞が蛍光染色される。蛍光は十分明るく、汎用型のフローサイトメータで計測可能である（共存するファージ粒子からの蛍光シグナルは小さくて計測の妨害とはならない）。本手法はT4に限らずあらゆるファージに適用可能で、サルモネラファージP22、乳酸菌ファージPL-1を用いた系もすでに確立されている。標識に用いる蛍光色素もDNAに親和性があれば特に選ばず、多重染色にも応用できる。こうした汎用性が本手法の特徴であり、多くの研究者に試してもらいたい技術である。

DNAに追跡可能な遺伝子、ルシフェリン/ルシフェラーゼを組み込んだファージはレポーターファージと呼ばれている。レポーターファージが宿主に感染して遺伝子が増幅、発現されるとルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光が生じる。ファージ感染後、ルミノメータで測定するか、X線フィルムを感光させることによって発光が捕らえられたらば、それは宿主細菌の存在を意味することになる。ファージP22を用いてサルモネラ、²⁾ファージTM4を用いて結核菌の検出に成功した例がそれぞれ報告されている。³⁾サルモネラの系では6時間の前培養を経れば10個の菌から検出が可能で、試験の迅速化に期待が持たれる。結核菌の系では薬剤耐性試験を効率化する目的でレポーターファージが開発され、従来1ヶ月以上を費やしていた試験を2時間に短縮できる可能性が示された。BCGにも感染するTM4のホストレンジ変異株についての記載もあり、ファージを利用した検出系の多様性が窺える。

このように蛍光標識法は、目的とする細菌を宿主とするファージを入手できれば簡単に応用できる簡便さが特徴である。一方レポーターファージは、極少数の特定細菌を検出できる利点はあるが、ファージごとに遺伝子を解析し、組換え体を作製するという煩雑さを伴う。

バクテリオファージは遺伝子発現や分子集合、分子間認識などの単純なモデルとして、初期の分子生物学の発展に大いに貢献したが、最近ではすっかり影を潜めてしまっている。ファージを愛する筆者としては、細菌検出という新たな分野で復帰、活躍してくれることを心から願っている。

1) 野上：食品工業，43 (14), 52 (2000).

2) Chen, J. *et al.*: *J. Food Prot.*, 59, 908 (1996).

3) Jacobs, W. R. *et al.*: *Science*, 260, 819 (1993).