

を用いて PCR 反応を行い、得られた増幅断片の塩基配列を DNA シーケンサー (ABI 社製) で調べた。決定された 16S rDNA 塩基配列を基に、BLAST サーチで菌種を調べた。

B: 嫌気性細菌

DSMZmedium63 培地に酢酸ナトリウム 2.0g/1 を加えた培地を用い、プレート法及び、液体三本法 (MPN 法) で硫酸還元菌数を測定した。プレート法で得られたコロニーは、好気性菌の a-2 と同様に塩基配列に基づく菌種の同定を行った。

C: 直接計数法 (蛍光染色法)

(1)a と同様に土壌希釈液を調製する。希釈液を 1ml 取りフィルター (ヌクレポア 0.2 μ m 孔径) でろ過後、バッファー (0.1M phosphate buffer pH8.5, 5% NaCl, 0.5mMEDTA2Na) を加える。EtBr 水溶液を 150 μ l (終濃度 100 μ g/l) 加え、室温で 10 分間放置後、吸引ろ過し、ろ過滅菌水 3 ml でフィルターを洗浄する。フィルターを無蛍光オイルで封入し落射型蛍光顕微鏡で菌数を計測した。

(4) 土壌からの高純度 DNA の調製

① 粗 DNA 溶液の調製

DNA 抽出溶液組成: 0.25 M EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 100mM NaCl, 2% SDS 1% ポリビニルピロリドン

サンプル 0.3g、溶菌酵素を 2.5ml エッペンドルフチューブに入れ、pH8.0 に調整した DNA 抽出溶液 0.9 ml を加えボルテックスで懸濁させる。それを、約一時間緩やかに振とうさせる。その後クロロホルム 24:イソアミルアルコール 1 の混合溶液 (CIA) を 0.6ml 加え、よく攪拌し 15,000rpm、10 分、20°C で遠心分離する。遠心後、上清 0.6ml を新たなエッペンドルフチューブに入れ、CIA を 0.6ml 加え、よく攪拌し 15,000rpm、10 分、20°C で遠心分離する。遠心後、上清 0.4ml を新たなエッペンドルフチューブに入れ粗 DNA 溶液とした。

② 菌数計測

上記と同様に調製した DNA 抽出溶液及び溶菌

酵素の代わりに滅菌水を使用したものを調製し、EtBr 染色を行い、サンプル中の総菌数を計測した。

③ 粗 DNA 溶液の濃縮

粗 DNA 溶液 400 μ l をマイクロコン PCR (MILLPORE 社製) を用いて 25 μ l に限外ろ過濃縮した。

④ アガロースゲル電気泳動法を用いた DNA の精製

濃縮した粗 DNA 溶液を 1%アガロースゲル電気泳動後、SYBR Green I (TAKARA 社製) で染色し、染色された高分子 DNA のバンドをカッターナイフで切り出した。

得られたゲル片から CENTRILUTOR (amicon 社製) を用いて DNA の抽出精製を行った。フィルター上にトラップされた DNA を遠心機 (1,000g 15 分) で濃縮後、マイクロチューブに移し、精製標品とした。

(5) Real Time PCR 法による菌数の計測

Real Time PCR は、PCR で増幅される DNA 断片の量を蛍光でリアルタイムに検出し、その増幅速度から基の試料中の遺伝子量を推定する方法である。今回の目的は試料中に存在する全ての菌の数を知ることである。それゆえ、全ての菌種が共通に有している 16S rDNA をターゲット遺伝子として選択した。16S rDNA は全ての菌種が有しているが、種特異的な塩基配列が保存されている領域と、全ての菌種で共通な領域が混在している。プライマーは全ての菌種に共通な領域で設定する必要があり、増幅産物をマイクロアレイ解析におけるプローブとして利用するには、プライマーで挟まれた領域は菌種間で特異的な配列を含んでいる必要がある。さらに塩基配列の違いによる増幅速度の差を軽減するために PCR 増幅断片が 100-200bp のサイズに限定される。

以上の制約を満たすプライマーを設定するために、既知の菌種の 16S rDNA の解析調査を行った。

資料の収集

既知の菌種全ての 16S rDNA の配列情報を得ることは時間的、及び人的制約から不可能と考え、

市販の細菌同定キット (API) に記載されている菌について検討を行った。Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/html/index.html>) の Hierarchy Browser を利用して属名で検索し、最も登録件数が多い菌種を選び、その中で基準株でなおかつ登録されている配列が 1,400bp 前後のものを選択した。得られた配列は、遺伝子解析ソフト DNASIS をもちいて Multiple alignment 解析を行った。

プライマーの設定；

Multipl alignment の結果を参考にし、条件を満たす領域からプライマーを設定した。プライマーは業者依頼合成した。

PCR 反応条件の検討；

大腸菌 JM109 (10^9 /ml) と土から調製した DNA 溶液をテンプレートとして用いて、目的のサイズの PCR 産物の確認とアニーリング温度の検討を行った。変性温度 95°C (30sec)、アニーリング温度 $40-60^{\circ}\text{C}$ (30sec)、伸長反応 72°C (1min) の 40 サイクルで行った。

(6) ダイレクト PCR による土壌中の菌叢解析

土壌から抽出した DNA を鋳型に 16S rDNA の PCR 増幅→大腸菌でのクローニング→塩基配列決定→解析

PCR 反応；プライマー：universal

サンプル：山土、不法投棄現場 3 m の土から抽出した DNA

反応条件； 96°C ：4 分 [96°C ：30 秒 60°C ：30 秒 75°C ：1 分]×(20) 75°C ：10 分 4°C

大腸菌でのクローニング；

TA Cloning Kit(pCR2.1 vector)[Invitrogen]を使用。16S rDNA 断片がクローニングされたと考えられる白コロニーを選ぶ。96-well プレートを用いて培養し、グリセロールストックを行う。

シーケンス；

日立計測器サービス株式会社委託でシーケンスを行う。BLAST サーチで相同性検索を行う。シーケンスデータを基に CLUSTAL W で系統解析を行う。

C 研究結果

(1) 土壌のサンプリング

F 県の硫化水素ガス発生が問題となって 1 年後の不法投棄現場の 0.3m、1.5m、3m の土壌、及び近傍の健康な土壌を採取した。

(2) 理化学的検査

サンプリングした不法投棄現場の 0.3m、1.5m、3m の土壌、及び近傍の健康な土壌の理化学検査結果を表 1 に示す。

有害重金属 (カドミウム、鉛、クロム、水銀、砒素、セレン) 等は全てのサンプルで検出限界以下の濃度であった。電気伝導率は深いところで高くなり、特にカルシウムイオンや硫酸イオンが多く含まれていた。

(3) 土壌細菌の計測

各土壌サンプルの培養法による菌数計測結果を表 2 に示す。好気培養による菌数計測では、山土と 0.3m の土で 10^6 cells/g、1.5m 及び 3.0m で 10^7 cells/g の菌数が計測され、深いところの方が菌数が多い結果になった。コロニーを形成した菌の 16S rDNA の部分塩基配列を調べた結果、山土では *Beta proteobacterium* と *Gamma bacterium* がそれぞれ 70% と 30% を占めていた。既知の菌種としては *Pseudomonas* 属が主に認められた。1.5m の土からは、根粒細菌等の *Alpha proteobacteria* (50%) や、通性嫌気性菌を含む *Actinobacteria* (16%) が優先種として認められた。また 27% は同定されていない菌であった。

嫌気培養でも深い所の土壌の方が菌数が多く、浅い所よりも二桁ほど多い結果になった。硫酸還元菌と考えられる黒色コロニーを形成する菌は、3.0m の土壌が最も多く、嫌気性菌総数の約 1/10 を占めていた。蛍光染色法による菌数計測では、何れのサンプルでも 1g 当たり 10^8-10^9 の菌が計測された。黒色コロニーを形成した菌の塩基配列決定による菌種の推定では、54% が *Clostridium* 属で、35% が *Desulfotomaculum* 属の菌であった。

表1 土壌サンプルの理化学検査結果

項目	単位	山土	0.3m	1.5m	3.0m
含水率	%	14.3	15.3	22.1	16.4
熱しゃく減量	%	1.91	2.32	7.75	15.9
pH	—	7.1	6.9	8.1	8.1
電気伝導率	mS/m	0.65	2.13	69.3	76.9
カドミウム	mg/l	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鉛	mg/l	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
六価クロム	mg/l	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
総水銀	mg/l	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
砒素	mg/l	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
セレン	mg/l	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
鉄	mg/l	1.4	0.13	0.54	1
マンガン	mg/l	0.032	0.1	0.54	1
銅	mg/l	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
ナトリウムイオン	mg/l	0.9	1.4	21.5	12.1
カリウムイオン	mg/l	0.3	0.6	2.3	2.8
マグネシウムイオン	mg/l	<0.1	0.2	4.5	4.9
カルシウムイオン	mg/l	0.4	1.3	93.6	119
塩化物イオン	mg/l	<0.1	0.6	7.1	7.8
硫酸イオン	mg/l	0.7	5.1	285	334

表2 菌数計測結果の比較

	山土	0.3m	1.5m	3.0m
好気培養 (CFU/g)	5.5×10^6	8.1×10^6	2.9×10^7	2.7×10^7
	$\pm 1.2 \times 10^6$	$\pm 9.0 \times 10^5$	$\pm 3.8 \times 10^6$	$\pm 1.3 \times 10^6$
嫌気培養				
プレート法 (CFU/g)	1.3×10^4	4.7×10^4	4.5×10^6	1.4×10^6
硫酸還元菌 (黒色コロニー)	10	6.5×10^3	3.7×10^4	1.3×10^5
液体三本法 (MPN/g)	23	70	9.3×10^5	2.4×10^5
蛍光染色法 (cells/g)	2.3×10^9	3.9×10^8	1.6×10^9	2.3×10^9
	$\pm 1.3 \times 10^9$	$\pm 3.0 \times 10^7$	± 0	$\pm 1.5 \times 10^8$
Real time PCR法 (cells/g:大腸菌換算)	4.7×10^8	1.3×10^8	5.4×10^8	1.3×10^9

表3 各サンプル (0.3g) から得られた DNA 量と純度

	土	0.3m	1.5m	3.0m	産医大山	大腸菌 (JM109)
DNA量 (μ g)	2.2	1.3	2.3	3.5	4.0	2.9
純度 (260/280nm)	1.95	1.86	1.89	1.77	1.95	1.68

(4) 土壌からの高純度 DNA の調製

0.3g の土壌サンプルから 1.3~3.5 μg の DNA を得た。各土壌から得られた DNA の純度 (260/280nm) はいずれも 1.8 前後の値を示した (表 3)。

抽出した DNA 溶液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動で確認した結果、高分子の状態で抽出されていることが明らかになった (図 1)。16S rDNA のユニバーサルプライマーを用いて PCR を行ったところ、いずれのサンプルでも良好な増幅が認められた (図 2)。

マ ± 1.53.0 産 J
I 0.3 m m 医 M
カ m 大 1
ー 山 0
ー 9

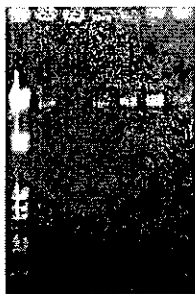


図 1 精製済 DNA のアガロースゲル電気泳動

マ N ± 1.53.0 産 J
I T 0.3 m m 医 M
カ C m 大 1
ー 山 0
ー 9

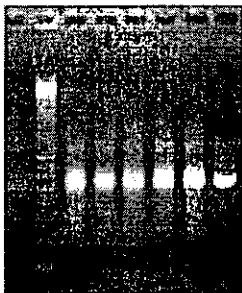


図 2 抽出 DNA 精製後の PCR の結果

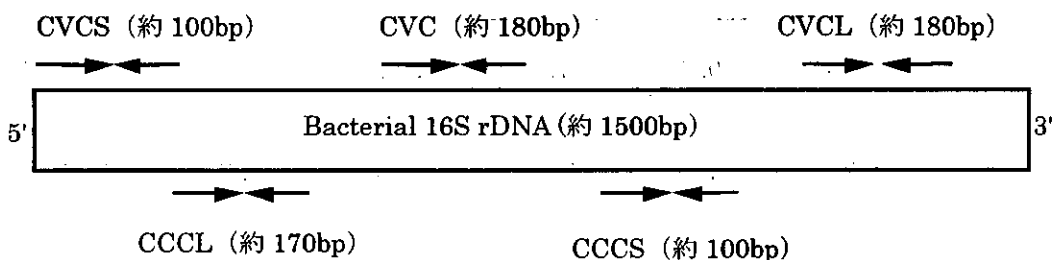


図 3 細菌由来 16S rDNA におけるプライマーのロケーション

(5) Real Time PCR 法による菌数の計測

Ribosomal Database Project II での資料収集の結果、腸内細菌 21 属、腸内細菌以外のグラム陰性桿菌 28 属、レンサ球菌 8 属、ブドウ球菌及びマイクロコッカス 3 属、コリネバクテリア類縁菌 13 属及び、硫酸還元菌 11 属 23 種、合計 96 種の基準株の 16S rDNA の塩基配列情報を収集した。

今回設定したプライマーの位置については図 3 に簡単に示す。CVC 標記のプライマーセットは、プライマーに挟まれる領域の塩基配列が種によって大きく異なるものを示している。CCC 標記についてはプライマーに挟まれる領域が比較的類似しているものを示している。これらのプライマーセットを土から調製した DNA 溶液と大腸菌 JM109 (107/ml) から調製した DNA 溶液をテンプレートとして PCR を行った結果を図 4 に示す。図 4A は土から調製した DNA 溶液の結果である。CVC、CVCS、CCCS、及び CCCL はそれぞれ目的のサイズとほぼ一致するサイズの増幅断片が得られた。

しかしながら、CVCL は本来 180bp の増幅断片が得られるはずであるが、結果は 100bp 以下のサイズで増幅されていた。大腸菌 JM109 から同様の結果が得られた (図 4B)。両試料において CVC のセットでクリアなバンドが得られたのでこのプライマーセットを全菌数計測の為に Real Time PCR に用いた。大腸菌の DNA の希釈系列を基に検量線を作成した。3.3 × 10⁹ ~ 3.3 × 10⁵ cells/ml の間で相関計数 0.998 であり、十分な定量に用いる検量線が得られた (図 5)。不法投棄現場付近の山土、不法投棄現場の 0.3、1.5、3.0m

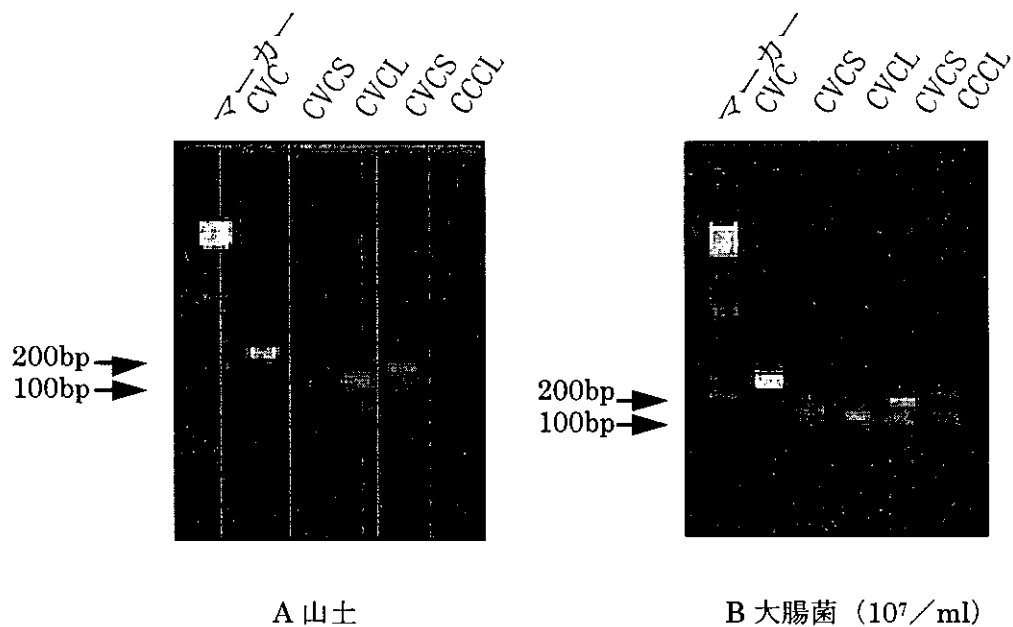


図4 設定したプライマーによる PCR 増幅産物

の土壌、及び産業医科大学校内の山の土のいずれも検量線における大腸菌 $3.3 \times 10^9 \sim 3.3 \times 10^7$ cells/ml の間で蛍光の上昇が認められた (図 6)。蛍光染色法による全菌数と Real Time PCR 法による全菌数の計測結果を表 2 に示す。Real Time PCR 法ではいずれも蛍光染色法による全菌数よりも低い結果となった。

(6) ダイレクト PCR による土壌中の菌叢解析

16S rDNA 断片がクローニングされた大腸菌 576 個 (山土から調製した 96 ウェルプレート 3 枚 (MS-2、3、4) 不法投棄現場深さ 3m の土壌から調製したプレート 3 枚 (DS-2、3、4) 計 6 枚分) を日立計測器サービス株式会社に送付した。現在のところ (MS-4、DS-2、3、4) 4 枚分の結果が得られている。

MS-4 は 69/96 クローン (72%)、DS-2 プ

レートは 68/96 (71%)、DS-3 は 66/96 (69%)、DS-4 は 76/96 (79%) のシーケンス成功率で、山土から 69 クローン、3m の土から 210 クローン計 279 のシーケンスデータが得られた。

これらのデータを基に、各プレートごとの系統樹を作成した。図 7 は山土から得られた菌叢を示している。BLAST サーチの結果は既知の菌種との高い相同性が得られた。主として、*Actinobacteria*、*Streptococcus* に類似する菌が全体の 60% と高い割合を占めていた (表 4)。図 8 は不法投棄現場 3m の土から得られた菌叢を示しているが、BLAST サーチの結果はほとんどが *Uncultured bacterium* として登録されている菌であった。主として得られた菌種は *Bacteroides* (30%)、*Uncultured sulfate-reducing bacteria* (16%)、*Spirochaetales*、等に類似の偏性、通性嫌気性菌であった (表 4)。

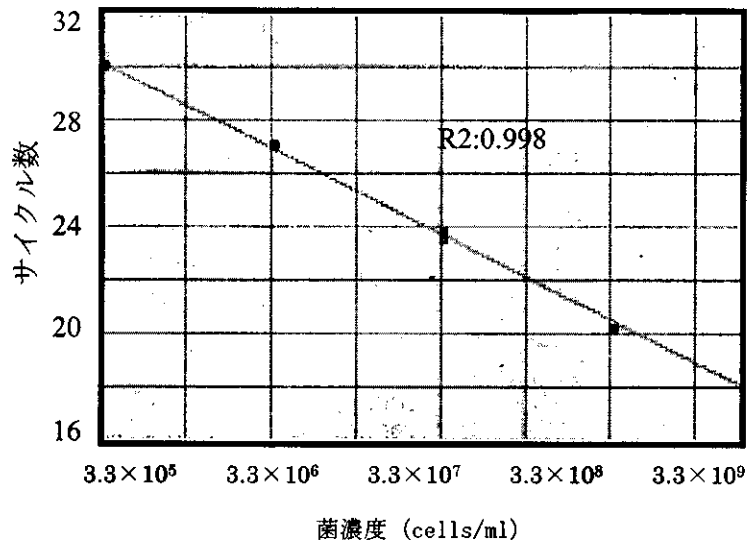


図5 大腸菌 DNA 希釈系列による検量線

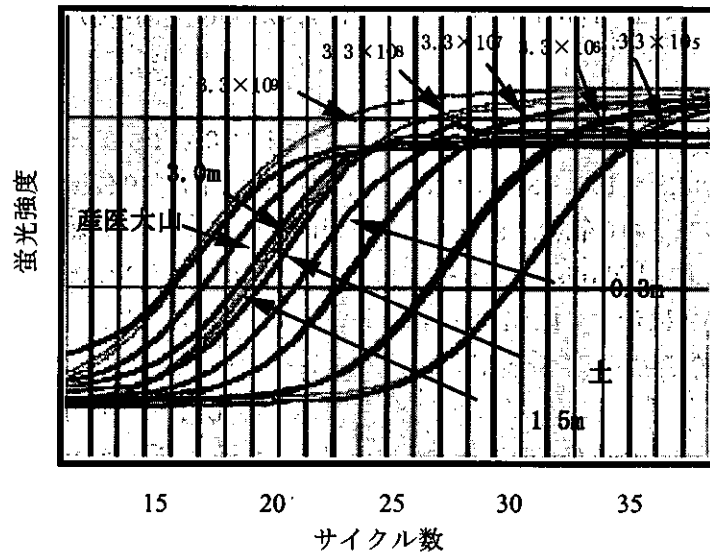


図6 CVC プライマーを用いた Real Time PCR の結果

表4 各サンプルの菌種の組成

Bacteria group	菌数	%	菌数	%
<i>Actinobacteria</i> -like	21	30.4	0	0
<i>Enterobacter</i> -like	3	4.3	0	0
<i>Pseudomonas</i> -like	4	5.8	0	0
<i>Streptococcus</i> -like	21	30.4	0	0
<i>Bacteroides</i> -like	0	0	63	30
Sulfate-reducing bacteria-like	0	0	33	15.7
Methanogenic bacteria-like	0	0	12	5.7
<i>Spirochaetales</i> -like	0	0	12	5.7
<i>Bacillus</i> -like	2	2.9	6	2.8
other bacteria	18	26.1	84	40
Total	69	100	210	100

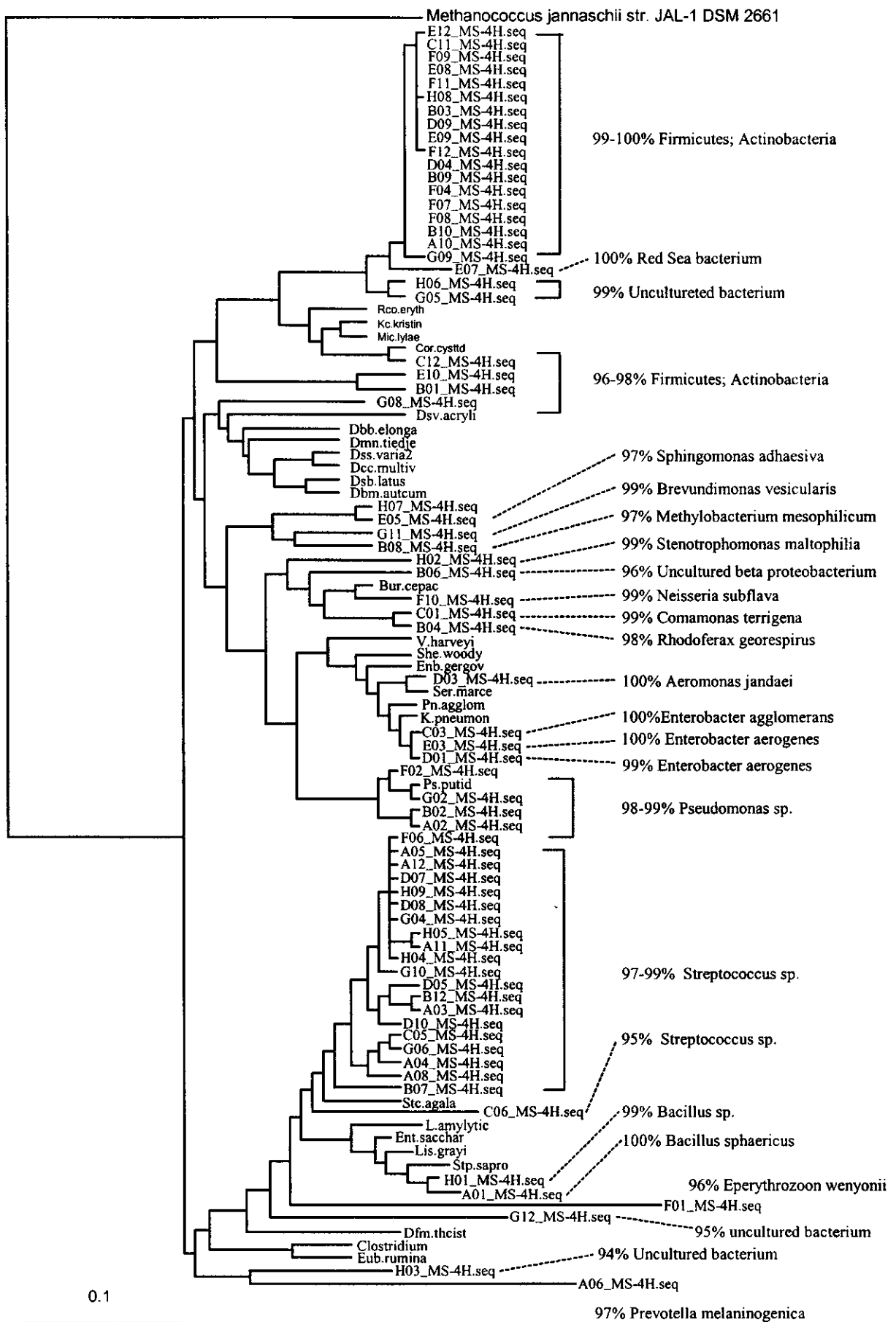


図7 山土から得られたクローンの系統樹 (MS-2)

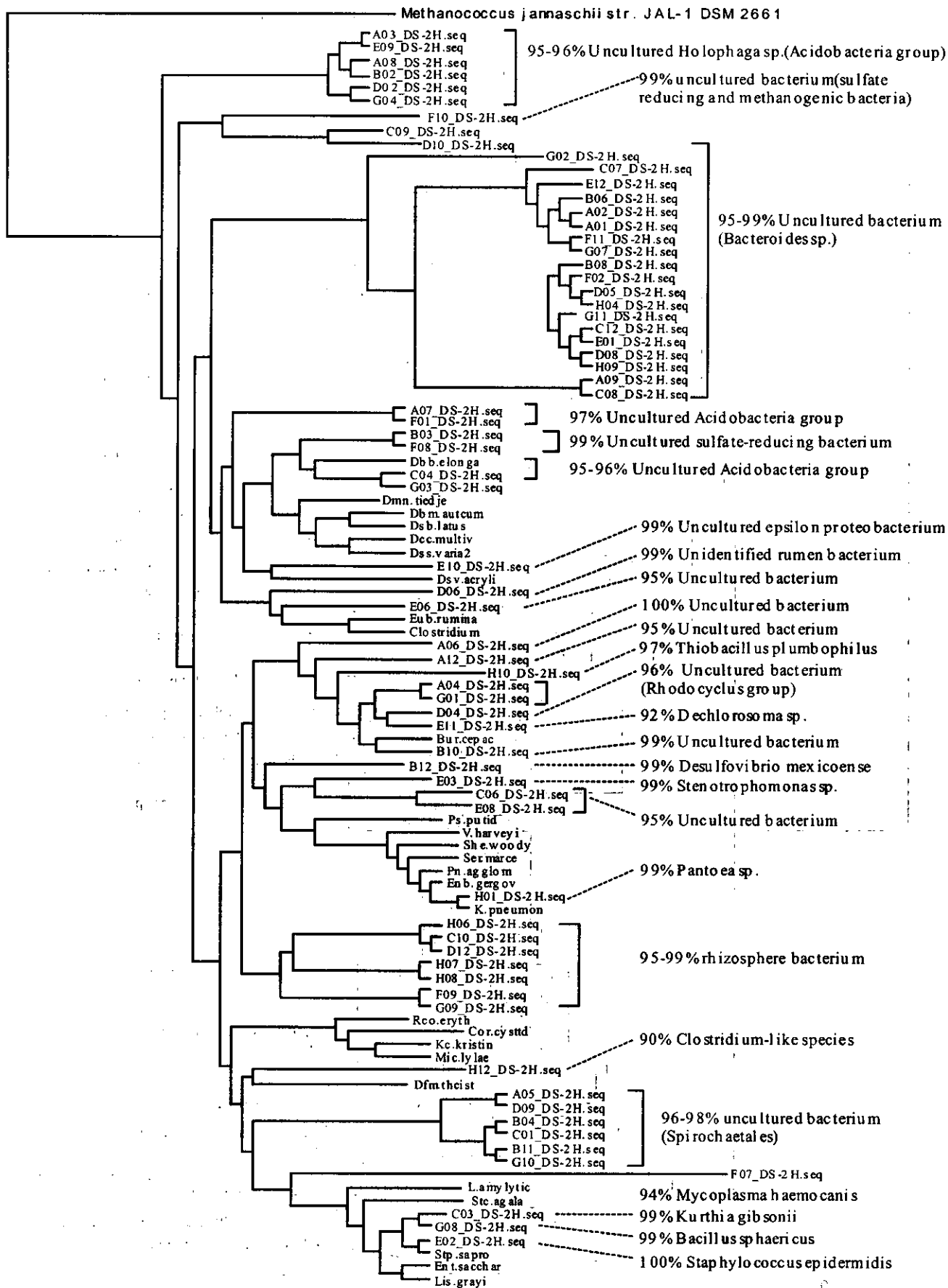


図8 不法投棄現場の土（深さ3m）から得られたクローンの系統樹（DS-2）

D 考察

理化学検査結果は、鉄が深度の深い所で少なく、マンガンは逆に深い所で多くなるという結果が得られた。また硫酸イオンが深い所で非常に多く、鉄と硫酸イオンは硫化水素発生に深く関わっていることから、今後様々なサンプルを調査することで、鉄及び硫酸イオンの含有量と硫化水素ガス発生との相関が明らかになると考えられた。また一定の深さの土壤の検査だけでは理化学検査結果と硫化水素発生の相関を考察するには不十分であると考えられた。深度別の染色法ではどの深のサンプルでも、同程度の約 10^9 の菌が存在した。しかし、好気培養で増殖する菌数は、その約 0.1~1% であった。嫌気培養では、さらにその 1000 分の 1 から、10 万分の 1 であり、予想通り深いところの土壤の方が菌数が多かった。蛍光染色法による全菌数と Real Time PCR 法による全菌数の計測結果を比較すると、Real Time PCR 法ではいずれも蛍光染色法による全菌数よりも低い結果となった。16S rDNA のコピー数は大腸菌で 7 コピーであり、一般に生育の遅い環境微生物は、コピー数が少ないと言われている。この結果は、環境中には大腸菌よりも 16S rDNA のコピー数が少ない微生物が多いことを反映していると考えられる。

しかしながら、Real Time PCR 法と蛍光染色法の全菌数の相違は、最大で約 5 倍（土）最小で約 2 倍（3.0m）であり、オーダーを越える相違はなかった。コピー数の問題から、実数としての利用は不可能であるが、大腸菌に換算した菌数として用いれば環境中の細菌数を迅速に調べる手法として利用出来ると考えられる。

好気培養で増殖する菌のほとんどが *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属の菌であり、嫌気培養で増殖する菌種は、主に *Desulfotomaculum* 属、*Clostridium* 属であった。しかし培養不能菌も含む菌種は、深度の浅い土壤では *Acinetobacter*, *Streptococcus*, 深いところでは *Bacteroides*, Sulfate reducing bacteria などの嫌気性菌が主であった。培養可能菌からの菌種の決定と、PCR 法による菌種の決定では違いが見られた。また、培養できる菌は 1% 以下で、従来の報告に一致するものであり、遺伝学的手法によ

る菌叢解析は土壤微生物叢をより厳密に把握する手法であると考えられた。理化学検査結果及び、微生物叢を比較することは、硫化水素ガス発生のメカニズムを考察する上で非常に有益な情報を提供するものと思われるが、今後様々なサンプルを調査し、データの蓄積が必要である。

今回は、硫化水素ガス発生から 1 年経過した土壤サンプルを用いた。そこで、ガス発生時の土壤についても調べる必要がある。また深度の深いサンプルは硫化水素ガスが発生した問題の土壤のみである。健康な土壤の深度の深いところでも同様の菌種が存在するか否かは、検討しなければならない。

E 結論

これまで様々な微生物検査に用いられてきた培養法ではあるが、今回の調査において、培養できる菌は全菌数の 1% 以下で、また培地上で集落を形成した菌と土壤から抽出した DNA を鋳型にした PCR 産物から遺伝子配列を決定した場合とでは菌の種類が異なった。つまり培養可能な菌は、サンプル中の極限られた菌であり、遺伝学的手法による菌叢解析は、従来行われてきた培養法よりも現場土壤の菌叢をより反映した結果が得られることが明らかになった。

今回遺伝学的手法を用いて、廃棄物処分場や不法投棄現場といった汚染土壤を対象として調べる基礎を構築した。遺伝学的手法は純培養した菌や、研究室レベルの比較的クリーンなサンプルには絶大な効果を発揮してきたが、さまざまな物質が多種多様に含まれる土壤等の環境サンプルには適用するのは困難であった。つまり PCR 阻害等の問題があり遺伝学的手法に辿り着くまでの大きな障害となっていた。今回確立した汚染土壤からの高純度 DNA 調製法は、今後汚染土壤や、様々な環境サンプルに遺伝学的手法を取り入れる上で非常に有効な方法になると考えられる。また、Real Time PCR 法で全菌数を測定する手法も確立した。現在、硫酸還元菌やメタン生成菌定量用のプライマーについても検討中であるが、これらの手法を用いれば、多大な時間と労力を必要とする培養をしなくても迅速に硫酸還元菌等の難培養菌の菌数

と菌叢における割合を知ることが出来る。今後も継続して様々な環境に対応出来る遺伝学的な微生物叢の解析方法を検討していく必要が有る。

さらに迅速且つ簡便な遺伝学的な微生物叢解析方法として DNA マイクロアレイ法を確立する為には、汚染土壌を含めた廃棄物処分場土壌中に分布する細菌叢を広く把握する必要が有る。更に多くのサンプルを収集し、理化学的検査と共に、16S rRNA 遺伝子の配列に基づく遺伝学的な菌叢の調査が必要である。

F 健康危険情報

G 研究発表

H 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得（出願予定）

廃棄物処分場土壌からの高純度 DNA 抽出法