

# 最確数 (Most Probable Number) と Bio-PCR 法を応用した, MPR-PCR 法による 青枯病菌の高感度定量検出法

農研機構 中央農業総合研究センター いのうえ やすひろ なかほ かずひろ  
井上 康宏・中保 一浩

## はじめに

トマト、ナス、ピーマン等のナス科果菜類の栽培は産地化とそれに伴う施設化が進み、新鮮な生産物の安定供給と生産者の収入の安定化につながったが、反面、同一施設内での連作により、土壌伝染性病害である青枯病の発生が増大し問題となっている(図-1)。青枯病の病原細菌 *Ralstonia solanacearum* は感染した植物体内で増殖し、萎凋・枯死させ、その間に土壌に移行する。そして土壌中で長期間腐生的に生存し、深層部にも移行することから、輪作や土壌消毒を行っても青枯病菌を根絶することは困難であり、これが青枯病の防除が難しい要因となっている。また、ナス科果菜類での青枯病対策として抵抗性台木を利用した接ぎ木が導入されているが、台木の発病抑制機構は植物内での病原細菌の増殖と移行を抑制する「耐病性」であり(中保, 2013)、土壌中の青枯病菌密度(=感染圧)は台木を通して穂木へ感染する青枯病菌の頻度や菌量を考えるうえで重要な要素となっている。つまり、土壌中の青枯病菌密度を知ることでその後の発病をある程度予測できると考えられる。

これまで、青枯病菌の土壌からの検出には選択培地が広く用いられてきたが、選択培地上に生じた集落のどれが青枯病菌かを見分けることは難しく(図-2)、判別には経験が必要であった。また、検出感度も低く、選択培地で青枯病菌が検出されない圃場でも青枯病の発生が認められることが多々あり、さらなる検出感度の向上が必要とされていた。

そこで、青枯病菌の識別が容易で高感度検出が可能な、PCR 法を応用した手法の開発を考えた。設備やランニングコストといった汎用性を考え、培養方法などを最適化した Bio-PCR 法をベースにその問題点である定量性を最確数 (Most Probable Number) で補い、培養

方法などの最適化を行うこととし、MPR-PCR 法 (INOUE and NAKAHO, 2014) を開発した。



図-1 トマト青枯病

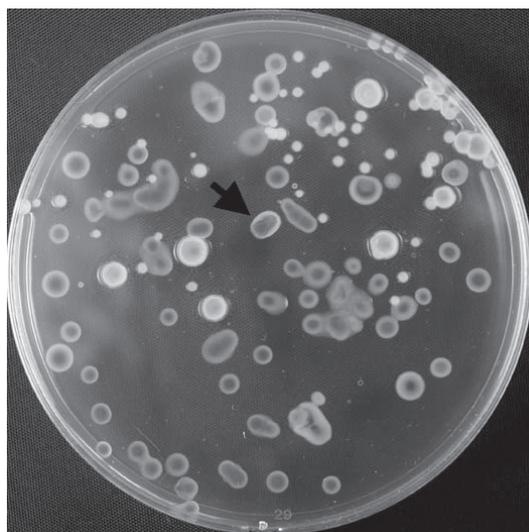


図-2 選択培地(改変 SMSA 培地)による土壌からの青枯病菌検出  
矢印の集落が青枯病菌。

Sensitive Quantitative Detection of *Ralstonia solanacearum* by the Most Probable Number-polymerase Chain Reaction (MPN-PCR) Method, that the MPN and the Bio-PCR Method were Applied.

By Yasuhiro INOUE and Kazuhiro NAKAHO

(キーワード: 青枯病, *Ralstonia solanacearum*, 最確数, 定量的検出)

## I 最確数法と Bio-PCR 法

表-1 最確数表

最確数法は検体をいくつかに分けて培養し、培養後に目的の菌が検出できたかどうかを調べ、最確数に当てはめて検体内の菌数を推計する方法である。例えば 1g のサンプルを三つ用意しそれぞれに菌がいるかいないか調査した結果、一つは菌がいて二つは菌がいなかったとき、10g の検体に菌はどのくらい存在したかを考えると、3～4 個いたと想像できる (図-3)。しかし、1g の検体三つの結果だけでは母数が少なく、その予測が正しいとは言えないため、3 段階、合計九つの結果を基に計算したものが最確数である (5 反復の 3 段階で行う方法もある)。最確数は表にまとめられており (表-1)、検出のプロファイル当てはめるだけで最確数が得られるようになっている。図-4 は青枯病菌の MPN-PCR での検出例であるが、1～0.01g のプロファイルは 3, 3, 2 であり最確数は 1,100 となる。つまり 10g 当たり 1,100 個の青枯病菌が存在したと推定できる。0.1～0.001g のプロファイルで見ると 3, 2, 1 であり最確数は 150 となる。つまり 1g 当たり 150 個の青枯病菌が存在したと推定できる。最確数法は河川や糞便中にある大腸菌数を計測するのに用いられる手法であり、最確数法を用いた用排水中の大腸菌検出方法は日本工業規格 (JIS K 0350-20-10: 2001) にもなっている。

Bio-PCR 法 (Iro et al., 1998) は、土壌から抽出した青枯病菌をいったん培養してから PCR によって菌を検出する方法であり、検出感度を高める方法として開発されたが、使用する培地や土壌によっては青枯病菌の生育が他の微生物に負けて検出できなくなることが問題であった。大腸菌では選択性の高い培地が存在するため、他細菌のコンタミネーションが少なく識別容易な培養ができるが、青枯病菌ではそれができない。しかし、Bio-PCR 法の培養条件を最適化し、確実に青枯病菌が検出できるようにすることで最確数法が利用でき、大腸菌と同様な定量的検出が可能となる。

## II MPN-PCR 法の構築

### 1 土壌からの青枯病菌の分離

まず、土壌と青枯病菌を分離するための溶液の分量であるが、最確数の利用を考え、乾燥重量換算で 10g (例えば水分含量 20% なら 12.5g) の土壌に溶液を加えて 50g とし、けん濁後の上清 5ml (おおよそ 5g) を土壌 1g 分の抽出液と換算することに定めた。抽出には 0.5% のスキムミルクを含む溶液を用いることにした。この溶液は土壌に含まれる PCR 阻害物質の抽出上清への混入

プロファイル	最確数	プロファイル	最確数
0, 0, 0	< 3	2, 0, 0	9.1
0, 0, 1	3	2, 0, 1	14
0, 0, 2	6	2, 0, 2	20
0, 0, 3	9	2, 0, 3	26
0, 1, 0	3	2, 1, 0	15
0, 1, 1	6.1	2, 1, 1	20
0, 1, 2	9.2	2, 1, 2	27
0, 1, 3	12	2, 1, 3	34
0, 2, 0	6.2	2, 2, 0	21
0, 2, 1	9.3	2, 2, 1	28
0, 2, 2	12	2, 2, 2	35
0, 2, 3	16	2, 2, 3	42
0, 3, 0	9.4	2, 3, 0	29
0, 3, 1	13	2, 3, 1	36
0, 3, 2	16	2, 3, 2	44
0, 3, 3	19	2, 3, 3	53
1, 0, 0	3.6	3, 0, 0	23
1, 0, 1	7.2	3, 0, 1	39
1, 0, 2	11	3, 0, 2	64
1, 0, 3	15	3, 0, 3	95
1, 1, 0	7.3	3, 1, 0	43
1, 1, 1	11	3, 1, 1	75
1, 1, 2	15	3, 1, 2	120
1, 1, 3	19	3, 1, 3	160
1, 2, 0	11	3, 2, 0	93
1, 2, 1	15	3, 2, 1	150
1, 2, 2	20	3, 2, 2	210
1, 2, 3	24	3, 2, 3	290
1, 3, 0	16	3, 3, 0	240
1, 3, 1	20	3, 3, 1	460
1, 3, 2	24	3, 3, 2	1,100
1, 3, 3	29	3, 3, 3	> 2,400

を低減でき、黒ボク土壌などでは土壌コロイドがキレートされて透明な上清を得ることができる。反面、土壌によっては十分量の上清が回収できないものや、濁りが取れないものがあり、土壌の種類によって多少のアレンジ



図-3 三つの結果から全体量を予測

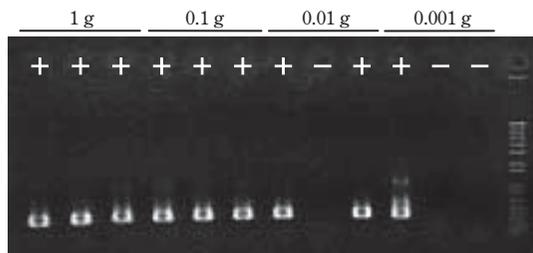


図-4 土壌からの青枯病菌のMPN-PCRでの検出例

は必要である。

## 2 培養方法の検討

次に培養方法を 35°C で 24 時間静置と定め、培養液の組成を検討した結果、表-2 に示すように、①土壌抽出液には青枯病菌の養分となる成分が含まれており、一晩でおよそ 10<sup>6</sup> 倍まで菌数が増加できる、②培養液中に混入した微生物は青枯病菌の増殖を 1/1,000 程度まで抑制する、③培養液に青枯病菌の生育に影響を与えない抗生物質を加えることで増殖が 10 倍回復することが明らかとなった。この結果から培養液は緩衝溶液に抗生物質を加えたものを用いることにした。後述の通り、選択培地でも 1g 当たり 1,000 個以上であれば検出可能であるため、MPN-PCR 法ではそれ以下を定量化できるように、1~0.001g 区 (土壌抽出液 5ml~5μl を 10~20 倍希釈したもの) をそれぞれ 3 本作製して培養することにした。1~0.01g の結果を用いると 1g 当たり 0.3~240 個 (10g 当たり 3~2,400 個)、0.1~0.001g の結果を用いると 1g 当たり 3~2,400 個までの菌数を推計できる。推計の際、1~0.01g の結果と 0.1~0.001g の結果の大きいほうを採用するように定めた。

## 3 PCR による青枯病菌の検出

表-2 から考えると、50 ml の培養液の初期菌量が 1 個だった場合、24 時間後でも青枯病菌は 10<sup>4</sup> cfu/ml (= 10 cfu/μl) 程度にしか増殖できず、実際に検出限界がその程度である既報のプライマーを用いると検出が不安定になる。そこで、nested PCR を行うことにした。この方法は標的となる遺伝子領域の外側と内側にそれぞれ特異的プライマーセットを設計し、外側のプライマーセットと内側のプライマーセットを用いて 2 回 PCR 増幅

表-2 青枯病菌の増殖に対する土壌抽出液と微生物および抗生物質の影響

培養前	緩衝溶液	土壌抽出液 <sup>b)</sup> (滅菌) <sup>c)</sup>	土壌抽出液	土壌抽出液 + 抗生物質
19.0 ± 4.0 <sup>a)</sup>	3.9 ± 7.6 × 10 <sup>3</sup>	1.1 ± 0.25 × 10 <sup>7</sup>	6.2 ± 1.6 × 10 <sup>4</sup>	1.4 ± 0.6 × 10 <sup>5</sup>

a) 単集落形成数 (cfu)/10 ml.

b) 土壌抽出液は緩衝溶液 (1 mM HEPES-HCl, pH7.0) で 10 倍に希釈した。

c) 0.22 μm フィルターを過した。

INOUE and NAKAHO (2014) より改変。

させるもので、検出感度を高めることができる。この方法を用いた結果、培養液の 5~10 μl を PCR に直接使用し、その中に 1 個でも青枯病菌が存在すれば検出できるようになった。最後に各培養サンプルの増幅の有無を確認し、最確数表に当てはめて土壌 1g 中の菌密度を推計する。MPN-PCR のフロー図を図-5 に示す。

## III MPN-PCR 法の利点と改善点

表-3 に土壌からの青枯病菌検出手法の比較を示す。選択培地 (HARA and ONO, 1983; ELPHINSTONE et al., 1996) は簡便で特別な設備が必要なく低コストで、生きた青枯病菌が得られるのが利点である。一方で、土壌中の微生物の量にもよるが、例えば 10g の土を 100 ml の溶液で抽出した場合、その 10 μl 分を平板培地に塗布するケースが多く、この場合は 1g 当たり青枯病菌 1,000 個以上でないと検出できない。使用する平板培地の数を増やすことで検出感度を高めることができるが、前述の条件で 1g 当たり 1 個の青枯病菌を検出する場合、1 サンプルにつき 1,000 枚の培地が必要となり、現実的ではない。リアルタイム PCR (WELLER et al., 2000; CHEN et al., 2010) を用いた検出の利点は、1 日で定量的な結果が出せることである。しかし、専用の機器と高額な専用試薬が必要であり、PCR 反応を阻害する物質の除去と検出感度向上のために土壌から DNA を抽出する作業も必要であり、手間と費用が必要となる。検出感度は土壌 1g 中の 1 個の菌体から DNA を確実に抽出できれば 1g 当たり 1 個以上 (実際にはその数倍感度は低下する) となるが、死

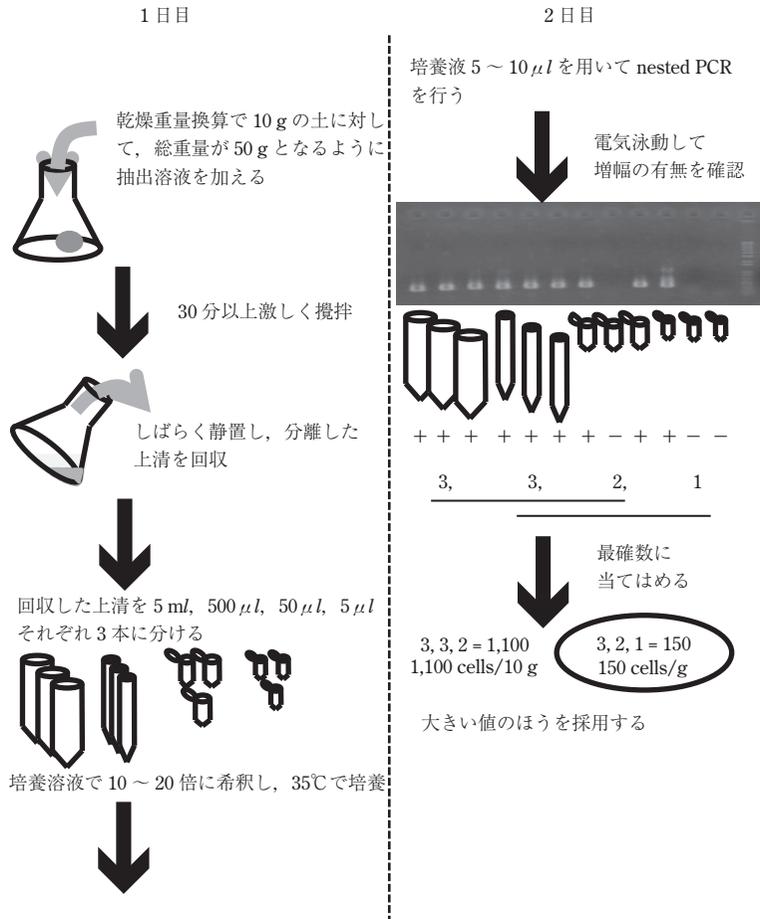


図-5 MPN-PCR法のフロー図

菌のDNAを検出する場合も想定されるなどの問題がある。MPN-PCRの利点は1g当たり0.3個の青枯病菌を検出できる感度の高さと定量性にある。また、PCRで青枯病菌の存在を確認した培養液から生きた菌を得ることも可能である（ただし、培養前の青枯病菌数が少ないサンプルからは培養液を選択培地に塗布しても青枯病菌の集落を得るのは難しい）。欠点として、サーマルサイクラーが必要なことと、PCRの検出感度を高めるために行っている nested PCRが簡便性を損ない、ランニングコストを押し上げていることが挙げられる。また、MPN-PCR法用に作成した *phcA* プライマーはレース1の青枯病菌（トマトなど）の検出に利用できるが、レース3の青枯病菌（ジャガイモ）の検出には利用できず、汎用性に問題があった。そこで、既報の *fliC* 遺伝子領域のプライマー（SCHÖNFELD et al., 2003）の外側に新たなプライマーを設計してレース3の青枯病菌でも対応できるようにするとともに、現在、nested PCRを簡略化する

表-3 土壌からの青枯病菌検出手法の比較

	検出感度	定量性	設備	費用	簡便性
選択培地	×~△ <sup>a)</sup>	○	○	○~△	○~×
Real time PCR	△	○	×	×	△
MPN-PCR	○	○	△	△	△

<sup>a)</sup> 使用する培地の枚数によって異なる。

方法について検討を行っている。

#### IV MPN-PCR法の利用

MPN-PCR法を開発した目的は土壌中の青枯病菌密度からその後の発病を予測するための基礎的知見を得るためであり、現在、農林水産省の農林水産業・食品産業科学技術推進事業「革新的接ぎ木方によるナス科野菜の複合土壌病害総合防除技術の開発」において、筆者だけでなく各参画機関で、トマト、ナス、ピーマンの青枯病発

生圃場の土壌菌密度調査に利用している。また, 青枯病菌に対する土壌消毒の効果判定にも有用なため, 内閣府の戦略的イノベーション創出プログラム次世代農林水産業創造技術「持続可能な農業生産のための新たな総合的作物保護技術の開発」内の課題「新規土壌還元消毒技術の開発」において, 土壌消毒効果の評価に用いている。これまで北海道から沖縄県まで, トマト, ウコン, クルクマやキクなどの青枯病が発生している 17 道県の圃場から様々な種類の土壌を採集し, 病原細菌の検出を試みた結果, MPN-PCR 法は地域や土壌の種類にかかわらず適応できることが明らかになっている。

### おわりに

MPN-PCR 法を用い, 土壌中の青枯病菌の菌密度とトマト青枯病発生の関係についてこれまで多くのデータが収集できている。本稿は手法の紹介となったが, いずれ報告できればと考えている。また, nested PCR の簡略化という改善点があるため, 今後も改良のための研究は行う予定である。折角開発した手法なのでなるべく多く

の方に利用していただきたいと考えており, 本稿を読んで興味をもたれた方で土壌採集の方法やアレンジ方法についての質問・相談があればご連絡いただきたい。なお, 本研究は農林水産省の農林水産業・食品産業科学技術推進事業「革新的接ぎ木方によるナス科野菜の複合土壌病害総合防除技術の開発」の助成を受けて行うとともに, 前述の 17 道県の方々には土壌の送付や採集に付き合っていただくなど, 様々なご支援を受けた。この場を借りてお礼申し上げる。

### 引用文献

- 1) CHEN, Y. et al. (2010): J. Microbiol. Biotechnol. **20**: 193 ~ 201.
- 2) ELPHINSTONE, J. G. et al. (1996): Bull. OEPP/EPPO Bull. **26**: 663 ~ 678.
- 3) HARA, H. and K. ONO (1983): Bull. Okayama Tob. Exp. Stn. **42**: 127 ~ 138.
- 4) INOUE, Y. and K. NAKAHO (2014): Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**: 4164 ~ 4177.
- 5) ITO, S. et al. (1998): J. Phytopathol. **146**: 379 ~ 384.
- 6) 中保一浩 (2013): 最新農業技術 土壌施肥 vol.5, 農山漁村文化協会, 東京, p. 12 ~ 17.
- 7) SCHONFELD, et al. (2003): Appl. Environ. Microbiol. **69**: 7248 ~ 7256.
- 8) WELLER, S. A. et al. (2000): *ibid.* **66**: 2853 ~ 2858.

## 第二刷 農薬と食の安全・信頼

梅津 憲治 著

—Q & A から農薬と食の安全性を科学的に考える—

A5判 本文282頁, 価格 2,800 円(税別)



本書は農薬が有する多面的な側面のうち, 主に「人の健康とのかかわり」に焦点を当て, 農薬や残留農薬の人の健康に対する影響について科学的に分かりやすく解説しています。著者が取り組んできた農薬に関する講演や講義で, 実際に一般消費者や学生から寄せられた農薬の安全性に対する素朴な質問と著者の答え (Q & A) を各章のはじめに置き, それに関連する本文を読み進めていただけるように構成してあります。農薬はどのような安全性試験を経て農薬登録され, 適正使用されているのかなどの基本的な内容から, 残留農薬のヒトに対する健康影響やリスクコミュニケーションの取り組みまでを詳述。農薬の研究開発から試験研究機関, 技術普及・流通・卸, 農業生産法人など植物防疫の関係者にとって必携の一冊です。

一般社団法人 日本植物防疫協会 支援事業部 出版担当

〒114-0015 東京都北区中里2-28-10

TEL 03-5980-2183, FAX 03-5980-6753

e-mail: order@jppa.or.jp

振替 0 0 1 1 0 - 7 - 1 7 7 8 6 7 番