

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500381

研究課題名（和文） 電流検出型 DNA チップによる実験動物病原体の病原遺伝子探索と定量検出系の構築

研究課題名（英文） Specific and quantitative detection of LAMP products from pathogens of laboratory animals using a newly developed electrochemical DNA chip.

研究代表者

後藤 一雄 (GOTO KAZUO)

帝京大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：00205593

研究成果の概要（和文）：

*Helicobacter* を属および菌種レベルで特異に検知可能な「LAMP/PCR 増幅-DNA チップ検出系」を確立、再現よく短時間(1時間以内)に検知できることを確認した。野外材料(約600検体)を使った実用性評価でも、精度・感度・特異性などの点から、既存法(PCR法)と同等の特性が得られたのみならず、既存法では難しかった近縁菌種との区別が可能であった。以上の結果から、新しい実験動物微生物モニタリングシステムを構築できたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We developed a microfabricated electrochemical DNA chip for detection of LAMP/PCR products from 16S rRNA sequences of *Helicobacter* spp. This chip does not require DNA labeling, and the hybridization signal can be detected as an anodic current. The average anodic currents of 5 (*H.bilis*) and 8 (*H.hepaticus*) PCR positive samples derived from feces of spontaneously infected mice (Cp, Hb and Hh) were 27.9±7.2, 31.9±8.1, 29.3±10.1, and 27.6±3.0 nA, respectively. On the other hand, the average anodic currents of 27 (Hb) and 18 (Hh), PCR negative samples were 3.7±2.4 and -1.0±1.7, and nA, respectively. The anodic current increased with increasing concentrations of pathogens. For experimentally infected samples, the results of PCR/electrophoresis were in complete accord with those of this system when anodic currents of 8.5 (Hb) and 2.4 (Hh) nA were taken as the cut-off value. The results suggested that the electrochemical DNA chip system is useful for specific and quantitative detection of LAMP/PCR products.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物医学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ヘリコバクター、DNA チップ、LAMP 法、PCR 法

### 1. 研究開始当初の背景

実験動物の微生物学的検査には培養法、ELISA などによる抗体検査法の他 PCR 法などによる核酸検査法が用いられてきた。これまで我々は特に PCR 法をもちいた実験用マウス、ラットおよび細胞株の病原体検出システム確立を行い、日本における発生率の高い、*Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium piliforme*, Mouse hepatitis virus, Lactate dehydrogenase elevating viurs および *Helicobacter hepaticus* などの特異的プライマーを設計するとともにその有用性を検討してきた。しかし PCR 法は高感度検査が期待できる半面、機械化による大量検体の同時処理、PCR 産物の定量化の点で改良の余地があった。

### 2. 研究の目的

これまで我々は電流検出型 DNA チップを用いた核酸検出法の開発を行っており、本原理\*を実験動物の病原体核酸検出に応用すべく研究を行った。電流検出型 DNA チップとは 2 本鎖 DNA にヘキスト 33258 などのインターカレーターを挿入したものは電流を流すことができることを利用した検出法であり、(\*:J.Microbiol.methods. 2008. 69:93-99

Goto K., et., al.) 先にのべた PCR 法を改良できることが期待される。本研究では実験動物では広くその感染が確認されているヘリコバクターを対象としてその簡易検出を第一の目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

*Helicobacter hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. typhlonius*, *H. suncus*, *H. pylori*, および *Helicobacter* の近縁種である *Wolinella* および *Arcobacter* の基準株をもちいて、それぞれ LAMP 法および PCR 法の特異的プライマーおよびプライマーを設計し、それぞれの方法で核酸を増幅させた後、電流検出型 DNA チップをもちいて定量検出を試みた。LAMP 法では菌 DNA を 62°C40min 増幅させ、PCR 法においては *Helicobacter* 属および種特異的プライマーをもちいて核酸を増幅させ、それぞれの増幅産物を電流検出型 DNA チップを用いて検出を行った。電流検出型 DNA チップによる検出は、各菌種特異的プローブ(DNA チップ)が固定されているカセットに LAMP 法または PCR 増幅産物を注入しハイブリダイゼーションさせた後、洗浄後、電流が流れたものを陽性と判定した。この際、対象微生物の遺伝子配列解析から「特異的な遺伝子領域・配列」を再特定し、標的配列を選定、標的配列増幅プライマー候補の設計・合成と増幅プライマーの絞り込み、増幅条件設定、増幅設計に対応したプローブ候補の設計と合成、プローブの絞り込みと検出条件の最適化を行った。プローブは *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. typhlonius*, *H. pylori*, および *Helicobacter* 属検出を用い、これらの条件のもと疑似検体（菌種特異的プライマーをもちいて PCR 法ですでにどの菌種が陽性かあきらかな核酸検体、および野外材料として 650 検体のマウス糞便由来 DNA についても同様の検査を行い、従来法である PCR 法の結果と比較を行った。電流検出型

DNA チップにあてる検体は LAMP 法、PCR 法ともに *Helicobacter* 属特異的プライマーで増幅した増幅産物を検体として用いた。

#### 4. 研究成果

1) *Helicobacter* 属菌の共通検出 : LAMP 法により増幅した疑似検体を *Helicobacter* 属菌全般を検出するためのプローブおよび各菌種特異的プローブと反応させた結果、*H. ganmani* DNA は属特異的プライマーをもちいた PCR 法で陽性となり、この PCR 産物は属特異的プローブとのみ反応し電流検出が確認された。*H. muridarum* DNA および *H. rodentium* DNA も同様に他のプローブに反応せず、属検出用プローブとのみ反応し、電流検出が確認された。電流値はいずれも 50nA 以上であった (陰性は 5nA 以下)。

2) *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. typhlonius* および *H. pylori* の種分類 : *Helicobacter* 属共通プライマーを用いて LAMP 法で増幅させた増幅産物を電流検出型 DNA チップと反応させた結果、*H. hepaticus* DNA は *H. hepaticus* プローブおよび *Helicobacter* 属プローブとのみ反応 (それぞれ 65nA および 55nA) し、他のプローブとの反応は見られなかった (5nA 以下)。同様に *H. bilis* DNA, *H. pylori* DNA および *H. typhlonius* DNA はそれぞれの種プローブおよび属プローブとのみ反応し電流値 50nA 以上を示したが、他菌種のプローブとは反応せず (10nA 以下) それぞれのプローブの特異性が示された。

3) *Helicobacter* 近縁種 DNA を検体として用いた場合 : *Arcobacter*, *Campylobacter* および *Wolinella* DNA を *Helicobacter* 属共通プライ

マーを用いて LAMP 法で増幅させたのち電流検出型 DNA チップと反応させた結果、いずれも電流値 10nA 以下を示し、*Helicobacter* 属と *Helicobacter* 近縁種との間において増幅段階で十分な特異性のあることが示された。

4) 野外材料を用いた本検出系の評価 :

650 検体の野外材料をもちいて従来法である PCR 法とその結果を比較したところ 623 検体 (95.8%) で一致した結果が得られた。一致しなかった検体のうち 25 検体は DNA チップで偽陽性、1 検体は DNA チップで検出できず、残りの 1 検体は *Helicobacter* 菌種が今回設定した菌種の DNA チップで用意されていない菌種である可能性が示唆された。

以上の結果から電流検出型 DNA チップをもちいた *Helicobacter* 検査においては従来法である PCR 法とほぼ同等の感度および特異性が得られ、簡便検査法としての有用性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Goto, K., et., al. Morphological and sequence analysis of mycoplasma sp. isolated from the oral cavity of a house musk shrew (*Suncus murinus*). 2010. *J. Vet. Med. Sci.* 109-111. (査読あり)

2. Ito, M., Goto, K., et., al. Molecular phylogeny of the subfamily gerbillinae with emphasis on species living in the Xinjiang-Uygur autonomous region of China and based on the mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase subunit II genes. 2010. *Zoological Sci.* 27:269-278. (査読あり)

3. Goto, K., et., al. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice. 2009. *Exp.*

Anim. 58:135-140. (査読あり)

4. Hayashimoto, N., Goto, K., et., al. Isolation and identification procedure for *Staphylococcus aureus* in laboratory mice and rats by combined use of chromogenic X-SA agar and specific polymerase chain reaction. 2009. *J.Vet.Med.Sci.* 71:27-32. (査読あり)

5. Goto, K., et., al. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: Self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS. 2009. *Exp. Anim.* 58:47-52. (査読あり)

6. Sugawara, A., Goto, K., et., al. characteristic karyotype abnormalities including robertsonian translocations found in eight mouse embryonic stem cell lines. 2008. *Chromosome Sci.* 11:29-36. (査読あり)

7. Hayashimoto, N., Goto, K., et., al. Study of a *Bordetella* Hindi isolate from a laboratory mouse. 2008. *Comp.Med.* 58:440-446. (査読あり)

8. Hayashimoto, N., Goto, K., et., al. Isolation of *Streptobacillus moniliformis* from a pet rat. 2008. *J.Vet.Med.Sci.* 70:493-495. (査読あり)

9. Hayashimoto, N., Goto, K., et., al. Experimental infection studies of *Pasteurella pneumotropica* and V-factor dependent *Pasteurellaceae* for F344-rnu rats. 2008. *Exp.Anim.* 57:57-63. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

1. A Joint FELASA-Scand-LAS Symposium (June 14<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2010 Helsinki, Finland) Clinical and Histopathological evaluation of *Dermatophagoides farinae* induced dermatitis and typhlitis in NC/Nga mice orally administered *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*.

Goto, K., et., al.

2. 後藤一雄, わが国の実験用マウスにおけるマウスノロウイルスの汚染状況, 第147回日本獣医学会学術集会, 2009 4月2日, 宇都宮市

3. 堀内秀紀, 後藤一雄, 他, 電流検出型 DNAチップを用いた実験動物感染症モニタリングシステムの開発, 第31回日本分子生物学会総会, 2008年 12月9-12日, 神戸市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヘリコバクター属の微生物由来の核酸を特異的に増幅するためのプライマーセット、前記微生物を検知および/または分類するための方法

発明者: 後藤一雄 他

権利者: (財) 実験動物中央研究所

種類:

番号: 特願 2008-309082

出願年月日: 平成 20 年 12 月 3 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 一雄 (GOTO KAZUO)

帝京大学・医療技術学部・准教授

研究者番号: 00205593

(2) 研究分担者

林元 展人 (HAYASHIMOTO NOBUHITO)

実験動物中央研究所・実験動物研究部・

研究員

研究者番号: 30332208

保田 昌彦 (YASUDA MASAHIKO)

実験動物中央研究所・実験動物研究部・

研究員

研究者番号: 40353479

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: