

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年12月5日現在

機関番号：82602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21860094

研究課題名（和文）エンドポイント蛍光消光法を用いた水系病原微生物の簡便・正確定量法の確立

研究課題名（英文）Development of simple and accurate quantification method of waterborne pathogenic microorganisms using ABC-PCR

研究代表者

岸田 直裕 (KISHIDA NAOHIRO)

国立保健医療科学院

研究者番号：10533359

研究成果の概要（和文）：簡便・正確な病原微生物の定量法として、新規遺伝子定量法であるエンドポイント蛍光消光法に着目し、実用的な定量法の確立を試みた。水系病原微生物の代表例としてクリプトスポリジウムを選定し、定量系の検討を行った結果、再現性の高い検量線が作成可能であった。またその定量系を用い、実河川水中のクリプトスポリジウムを測定した結果、高価な装置を必要とするリアルタイム PCR 法による定量値と非常に近い値を得た。

研究成果の概要（英文）：We describe an assay for simple and accurate quantification of pathogenic microorganisms in water samples using a recently developed quantification method named alternately binding probe competitive PCR (ABC-PCR). *Cryptosporidium* spp. were selected as representative pathogenic microorganisms in this study. The standard curve of the ABC-PCR assay had a good fitting to a rectangular hyperbola. Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts in real river water samples were successfully quantified by the ABC-PCR assay. The quantified values by the ABC-PCR assay very closely resemble those by the real-time-PCR assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	0	1,080,000
2010年度	980,000	0	980,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000		2,060,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：水資源、水循環、遺伝子、病原微生物、クリプトスポリジウム

1. 研究開始当初の背景

衛生設備の整っていない発展途上国だけでなく、設備の整った先進国でも水系の感染症が発生しており、深刻な衛生問題となっていることから、水源における水系病原微生物の汚染実態を把握することは急務の課題である。しかしながら、病原性原虫等の一部の

微生物を除いて調査範囲が限定されているのが現状である。調査が遅れている要因の一つとして、検査法の複雑さ・煩雑さが挙げられる。リアルタイム PCR 法に代表される従来の水系病原微生物の定量法は、高価な装置を必要とし、さらに共存する阻害物質の影響で、正確な定量が困難であった。

2. 研究の目的

(1) 研究目的

新規遺伝子定量法として近年報告されたエンドポイント蛍光消光法を利用することで、高価な装置を必要とせず、さらに正確な測定が可能な水系病原微生物の新規定量法を確立することを目的とした。

本研究では、水系病原微生物の代表例としてクリプトスポリジウムを選定し、18S rRNA 遺伝子を対象としたエンドポイント蛍光消光法の定量系の確立を試みた。はじめにエンドポイント蛍光消光法用のプローブを設計し、標準遺伝子を用いて検量線を作成して定量系の有効性を確認した後、河川水中のクリプトスポリジウムの測定に構築した定量系を適用し、実用性を調査した。

(2) エンドポイント蛍光消光法の原理

エンドポイント蛍光消光法は図1に示すように、近傍にグアニン (G) が存在すると消光する蛍光色素を標識したプローブを用いる。BODIPY FL の蛍光は、プローブが標的遺伝子と結合した場合は、近傍に G が存在しないために消光せず、内部標準遺伝子と結合した場合は近傍の G の影響で消光する。このため、BODIPY FL の蛍光強度は標的遺伝子と内部標準遺伝子の比に依存して変化する。また、標的遺伝子と内部標準遺伝子は同一のプライマーアニーリングサイトを持つため、両者の増幅効率は同じである。従って、標的遺伝子と内部標準遺伝子由来の増幅産物量の比は初期遺伝子の比を反映することから、既知の内部標準遺伝子を添加することで、PCR 終了後のエンドポイントの蛍光強度より、初期遺伝子量を求めることができる。一方、TAMRA の蛍光はどちらの遺伝子に結合しても消光するように設計されているため、偽陰性の確認に利用することができる。

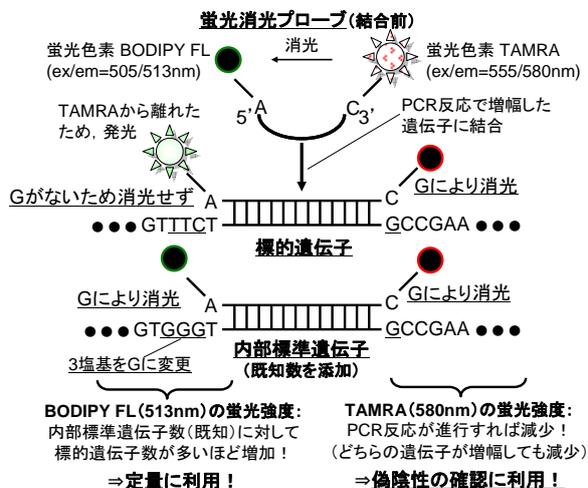


図1 エンドポイント蛍光消光法の原理

3. 研究の方法

(1) 河川水試料の採取と前処理

利根川本川および1次、2次支川より計14サンプルの河川水を採取して実験に供した。常法に従い、親水性 PTFE メンブレンフィルター法によって河川水 10L を約 10mL まで濃縮した後、免疫磁気ビーズ法による精製・濃縮操作を行い、約 110 μ L まで濃縮した。濃縮試料の半量 (約 55 μ L) を遺伝子検査法 (エンドポイント蛍光消光法、リアルタイム PCR 法) に供し、残りの半量を顕微鏡検査に供した。

(2) 核酸の抽出方法

遺伝子検査用試料からの核酸抽出は以下の方法で行った。試料を -80°C のドライバスと 37°C のヒートブロックを用いて5回の凍結融解を行った。次に溶解液を添加し (反応チューブ内溶解液終濃度: 10mM Tris-HCl (tris-hydroxymethyl-aminomethane, pH7.6), 1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 20mM NaCl, 0.1% (w/v) TritonX-100, 2mM DTT (dithiothreitol), 1.5m Anson-U/ml Proteinase K), 60°C で30分間溶解反応を行った。その後2分間の超音波処理を行い、さらに 75°C で10分間の追加反応を行った。この核酸抽出液を 95°C で5分間加熱し、Proteinase K を失活させた後、水中で急冷した。

(3) 逆転写反応

本研究では、検出感度を上昇させるために、クリプトスポリジウムオーシスト内部に多量に存在する 18S rRNA 分子を対象として逆転写反応を実施した。得られた多量の cDNA を用いて、エンドポイント蛍光消光法、リアルタイム PCR 法による定量を試みた。逆転写反応には、PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time; Takara) を用いた。逆転写プライマーには既報のリアルタイム PCR 系の Reverse プライマー (Miller et al., 2006, J. Microbiol. Methods) を使い、反応チューブ内濃度を $2.5 \mu\text{M}$ に調整した。サーマルサイクラーを用いて 37°C 、15 分間の逆転写反応を実施した後、 85°C で5秒間加熱し、酵素を失活させた。

(4) エンドポイント蛍光消光法

エンドポイント蛍光消光法に用いたプライマー・蛍光消光プローブは、既報のリアルタイム (TaqMan) PCR 系 (Miller et al., 2006, J. Microbiol. Methods) を参考に設計した。また、PCR 反応溶液の組成・温度条件も既報 (Tani et al., 2007, Anal. Chem.) に準じて反応させた。実験に供した標的遺伝子、内部標準遺伝子の配列の違いは、BODIPY FL が

結合する部位の外側 3 塩基がグアニンに変更されているのみである (図 1 参照)。検量線の作成は $10 \sim 10^5$ copies/well の範囲で作成した。

(5) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法に用いたプライマー・プローブ、反応条件は、既報のリアルタイム (TaqMan) PCR 系 (Miller et al., 2006, J. Microbiol. Methods) に準じた。リアルタイム PCR 装置として LightCycler® (Roche) を用いた。蛍光曲線の立ち上がり時間 (Crossing Point : Cp 値) は、リアルタイム PCR 装置に付属するソフトウェアを用いて Second derivative maximum 法 (2 次微分最大値法) で解析した。

(6) オーシスト内部の rRNA 分子数の測定方法

$10 \sim 10^5$ copies/tube に調製した人工合成遺伝子を用いて検量線を作成し、オーシストからの核酸抽出液に対しリアルタイム RT-PCR 法を実施することで、オーシスト内部の rRNA 分子数を測定した。鋳型を $7.5 \times 10^{-4} \sim 7.5 \times 10^{-2}$ oocysts/tube の範囲で 10 倍毎の連続希釈濃度で調製し、各濃度段階につき 3 連で実施し (計 9 回)、1 オーシストあたりの平均の rRNA 分子数を測定した。得られた分子数は、定量遺伝子数 (コピー数) をクリプトスポリジウムオーシスト数に変換するのに使用した。

(7) 顕微鏡観察法

顕微鏡観察用の試料は、親水性 PTFE メンブレンフィルターを用いて観察した。試料を吸引ろ過したメンブレンフィルター上で、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色液と蛍光抗体染色液 (Easy Stain, BTF) による染色を行った後、スライドガラス上にメンブレンフィルターを載せ、カバーガラスをかけてプレパラートを作製した。作製したプレパラートを微分干渉装置付き蛍光顕微鏡により観察し、計数した。

4. 研究成果

(1) エンドポイント蛍光消光法による検量線の作成

図 2 に示すように、内部標準遺伝子数を 10^3 copies 添加した場合、18S rRNA 遺伝子数が $10 \sim 10^5$ copies の範囲において、直角双曲線型の理想的な検量線を作成することができた。サンプル間の蛍光値の変動も小さく (標準偏差 : 0.008 以下)、再現性が高いことがわかる。

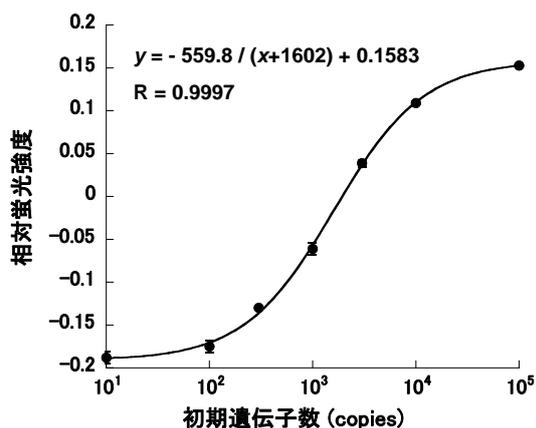


図 2 検量線 (内部標準遺伝子数= 10^3 copies ; エラーバーは標準偏差を示す。)

(2) クリプトスポリジウムオーシスト内の 18S rRNA 分子数

リアルタイム PCR 法を使用して、濃度既知の合成遺伝子を使った検量線を作成し、一方、濃度調整したクリプトスポリジウムオーシスト抽出試料に対してはリアルタイム RT-PCR を行い、オーシスト内の rRNA 分子から逆転写反応で得られる cDNA を定量した。その結果、1 オーシストあたり約 32,700 コピー (n = 9) の標的配列、すなわち rRNA 分子が存在することが判明した。オーシスト内の rRNA 遺伝子 (DNA) 数は 20 コピー (=ゲノム上 5 コピー×オーシスト内 4 スポロゾイト) であると報告されており、逆転写反応を追加してオーシスト内部の rRNA 分子を cDNA に変換することで、標的のコピー数を大幅に増大させ、高感度化が可能であることが明らかとなった。

(3) エンドポイント蛍光消光法を用いた河川水中のクリプトスポリジウムオーシスト数の定量

エンドポイント蛍光消光法を用いて、河川水中のクリプトスポリジウムオーシスト数を測定した結果、14 試料中 12 試料より、クリプトスポリジウム由来の 18S rRNA 遺伝子が検出され、その遺伝子量を定量することが可能であった。また、上記 (2) の検討で得られたクリプトスポリジウム内部の 18S rRNA 分子数の値を用いてクリプトスポリジウムオーシスト数に定量値を変換した結果、図 3 に示すとおり、エンドポイント蛍光消光法による定量値は、高価な測定装置を必要とするリアルタイム PCR 法の定量値に非常に近い値を示した。さらに、図 4 に示すとおり、多くのサンプルで、エンドポイント蛍光消光法による定量値は、顕微鏡観察法の定量値と近い値を示した。

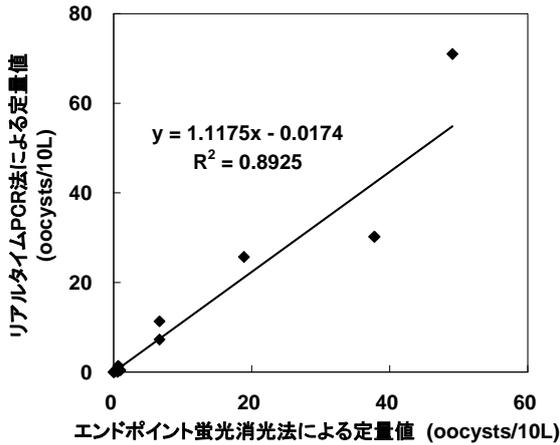


図 3 河川水中のクリプトスポリジウムオーストの定量結果の比較（エンドポイント蛍光消光法とリアルタイム PCR 法）

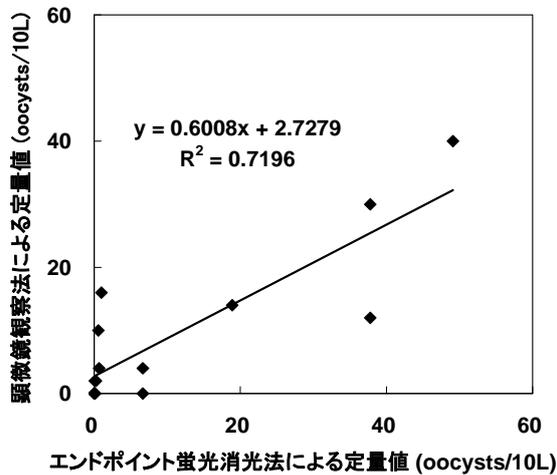


図 4 河川水中のクリプトスポリジウムオーストの定量結果の比較（エンドポイント蛍光消光法と顕微鏡観察法）

また、非検出 (<10 copies) であったサンプルも陽性サンプル同様に、TAMRA の蛍光強度が大きく減少していたことから、遺伝子増幅反応自体が阻害され、偽陰性が発生している可能性は低いことを確認した。このように、エンドポイント蛍光消光法では、ターゲットの病原微生物の定量のみでなく、偽陰性の発生有無を簡便に確認することも可能である。

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 1 件）

① Kishida N., Miyata R., Furuta A.,

Izumiyama S., Tsuneda S., Sekiguchi S., Noda N. and Akiba M. “Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR)” *Water Research*, 査読有, Vol. 46, No. 1, 2012, pp. 187-194. (doi:10.1016/j.watres.2012.03.010)

〔学会発表〕（計 3 件）

① Kishida N., Miyata R., Furuta A., Izumiyama S., Morita S., Tsuneda S., Sekiguchi Y., Noda N., Akiba M. Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source by alternately binding probe competitive polymerase chain reaction (ABC-PCR). The 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology; 2011 Sep.; Rotorua; New Zealand.

② 岸田直裕, 秋葉道宏, 泉山信司, 宮田亮, 野田尚宏, 関口勇地, 古田篤史, 常田聡. 新規遺伝子定量手法 ABC-PCR 法を用いた水中の病原微生物の定量. 第 44 回日本水環境学会年会; 2010 年 3 月; 福岡.

③ 岸田直裕, 今野祥頭, 秋葉道宏, 猪又明子, 泉山信司. 水道クリプトスポリジウム検査への遺伝子検査法導入に関する研究. 第 4 回保健医療科学研究会; 2010 年 12 月; 和光.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 直裕 (KISHIDA NAOHIRO)

国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官

研究者番号：10533359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし