



Title	核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属細菌の検出に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松永, 光司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15191号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87259
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Matsunaga_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 松永 光司

学位論文題名

核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属細菌の検出に関する研究

(Study in detection of arsenic and *Legionella* spp. in the environmental water using nucleic acids)

今日、さまざまな汚染物質から水環境や水資源を保護し保全する重要性が高まっている。汚染原因物質は主に重金属や病原性微生物が挙げられる。重金属は代表的な汚染物質であり、人の健康および環境に対して深刻な被害を引き起こす。例えば、ヒ素 (As) は同族のリンとよく似た物理化学的性質を示し、生物への毒性の由来となっている。As に汚染された水や食品を長期的に摂取し続けることで心臓血管や呼吸器疾患、皮膚、肺、肝臓、腎臓のがんや皮膚の角化症、色素異常などを患うことが多数報告されてきた。As は農薬、医薬品、ガラス製造、半導体等の人間の生産活動を通して環境に広がり、水質汚染の原因やヒトへの健康に影響を及ぼす。特に、飲用水源からヒトへの As 汚染の程度が低い場合でも、As 汚染された水源を利用して栽培された米や、As 汚染された水中で生きていた魚介類などの食物を食べることで曝露されることがある。As は大きく無機態 As と有機態 As に分類され、無機態 As は主に地下水や河川水等の環境水中に分布し、有機態 As は主に魚介類等の食品中に分布している。さらに無機態 As は大きく As(III) と As(V) の化学種が存在しており、毒性は As(III) のほうが As(V) よりも高く、分布は As(V) のほうが As(III) よりも広範囲に存在する。病原性微生物も重金属と同様に水質汚染の代表例であり、ヒトが摂取、感染することで様々な健康被害を引き起こす。例えば、レジオネラ属菌 (*Legionella* spp.:Lp) はもともと土壌や水環境に存在するグラム陰性桿菌であるが、エアロゾルを発生させる人工環境や循環水を利用した公衆浴場でも発生し増殖する。Lp はヒトに感染すると高熱や肺炎を引き起こすレジオネラ症を発症する。特に肺炎を発症した場合、有効な抗菌薬を投与しないと死亡することがある。2001 年から 2010 年にかけて発生した細菌性水系感染症のうち、最も多かったのは Lp によるものであると報告されている。一般的な重金属の分析方法は原子吸光分析法、誘導結合プラズマ質量分析法等が挙げられる。重金属の化学種を分けて分析したい場合は、液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析法がある。しかしながら、これらの分析法は前処理が煩雑で分析に時間がかかる、分析装置が大型かつ高価であるなどの欠点がある。また、As を対象としたほとんどの分析法は総 As を分析する方法であり、化学種毎に毒性の異なる As では、ヒトへの影響について正確に評価することは困難である。同様に一般的な水中の細菌の分析法には、寒天培地培養法、qPCR 法、イムノクロマト法が挙げられる。しかしながら、寒天培地培養法は、Lp を分析する際には培養時間が 4~14 日と長時間かかる、Viable but non culturable(VBNC) 状態の細菌は検出できないといった欠点がある。qPCR 法は細菌から DNA を抽出するプロセスが必要である、高価なリアルタイム PCR 装置、及び高価な PCR 試薬を用意する必要があるといった欠点がある。また、死菌も検出するため、寒天培地培養法との結果が一致しないことが多い。イムノクロマト法は寒天培地培養法や qPCR 法よりも簡易に分析が可能だが、1 サンプルあたりの分析コストが高く、サンプル濃縮のために多量のサンプルを要するといった欠点がある。上述した問題解決のため、本研究では製造コストが安価な核酸を用いた簡易分析法を開発することを目的とした。As(III) を対象とした簡

易分析法は、As(III) と特異的に結合する一本鎖 DNA(DNA アプタマー) に着目し、この性質を利用した簡易 As(III) 分析法を開発した。As(V) を対象とした簡易分析法は、酸化セリウムナノ粒子 (CeO₂NPs) が持つ、As(V) 及び DNA を表面に吸着させる性質と、蛍光色素が CeO₂NPs に吸着した際に蛍光を消光させる性質に着目し、これらの性質を利用した簡易 As(III) 分析法を開発した。Lp を対象とした簡易分析法は、先述した簡易 As(III) 分析法と同様に DNA アプタマーの性質を利用した簡易分析法の開発としたが、Lp 結合型 DNA アプタマーは開発されていないため、第一段階として Lp 結合型 DNA アプタマーの開発を実施した。

第 1 章では、研究背景、目的、これまでの先行研究についてまとめた。

第 2 章では、As(III) をターゲットとした簡易 As(III) 分析法の開発を行った。簡易 As(III) 検出法では、上述した As(III) 結合型 DNA アプタマー「Ars-3」と AuNPs を用いた手法である。サンプルに As(III) が存在しない場合は、Ars-3 が AuNPs 表面に吸着する。その後 NaCl を添加して AuNPs を凝集させようとしても、Ars-3 によって AuNPs 表面が保護された状態では AuNPs は分散状態を維持する。しかし、As(III) 存在下では Ars-3-As(III) 複合体を形成し、AuNPs 表面に吸着する Ars-3 の量が少なくなる。その後 NaCl を添加すると AuNPs は凝集する。AuNPs は凝集すると赤から青に色が変わるため、色の変化を観察することで As(III) を検出・定量する手法である。本章ではこの簡易 As(III) 分析法を開発、及び地下水中の As(III) 濃度を本手法で定量することを通して環境サンプルへの実用化を行った。しかしながら、2019 年に Zong らは Ars-3 が As(III) と結合しておらず、AuNPs 表面に As(III) が吸着することで AuNPs の色が変化することを指摘した。この指摘より、Ars-3、As(III)、AuNPs との相互作用について調査したので本章にて議論する。

第 3 章では、As(V) をターゲットとした簡易 As(V) 分析法を開発した。簡易 As(V) 分析法では上述した As(V) を特異的に吸着させる CeO₂NPs とフルオロセイン修飾一本鎖 DNA(FAM-labeled DNA) を用いた手法である。CeO₂NPs 表面に FAM-labeled DNA が吸着すると FAM の蛍光を消光させる性質を持つ。その後、As(V) を含むサンプルを添加すると、FAM-labeled DNA が脱着し、消光していた蛍光が回復する。この回復した蛍光強度を測定することで As(V) を検出・定量する手法である。本章では CeO₂NPs と FAM-labeled DNA を用いた簡易 As(V) 分析法を開発、及び地下水中の As(V) 濃度を本手法で定量することを通して環境サンプルへの実用化を行った。また、第 2 章の簡易 As(III) 分析法と組み合わせることで、As(III) と As(V) の濃度を化学種毎に定量した。

第 4 章では、DNA アプタマーを用いた簡易 Lp 分析法の開発にあたり、Lp 結合型 DNA アプタマーを開発した。従来の方法では、DNA アプタマーは SELEX 法と呼ばれる手法で開発されるが、本研究では SELEX 法よりも高い分離能を持ち、かつ短時間で開発可能な PectI 法によって Lp 結合型 DNA アプタマーを開発した。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章で得られた知見について結論としてまとめた。また、本研究での課題点及び今後の展望について述べた。