HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	DNA修飾金ナノ粒子を用いた微生物核酸の簡易分析法の開発
Author(s)	中島, 芽梨
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第16352号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16352
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95061
Type	doctoral thesis
File Information	Meri_Nakajima.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2024 年度　北海道大学大学院工学院　環境創生工学専攻　博士論文

DNA 修飾金ナノ粒子を用いた
微生物核酸の簡易分析法の開発

北海道大学大学院　工学院　環境創生工学専攻
水環境保全工学研究室

中島　芽梨(ナカジマ　メリ)

概要 5

第 1 章　序論 8

第 1 節　研究背景 8

1-1　水環境工学分野における微生物分析の現状 *8*

1-2　様々な微生物分析法の特徴と問題点 *9*

1-3　DNA 修飾金ナノ粒子を用いた微生物核酸の簡易分析法 *12*

1-4　本研究の目的 *13*

第 2 節　金ナノ粒子を用いた簡易核酸分析法に関する既往の研究 14

2-1　金ナノ粒子の性質 *14*

2-2　DNA 修飾金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブ）を用いた核酸検出法 *16*

参考文献 24

第 2 章　金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法のメカニズムの検証 29

第 1 節　目的および概要 29

第 2 節　実験方法 29

2-1　金ナノ粒子プローブの作製 *29*

2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量 *31*

2-3　分析方法 *34*

第 3 節　暗視野顕微鏡観察による反応メカニズムの検証 36

3-1　本実験の目的 *36*

3-2　暗視野顕微鏡観察の概要 *36*

3-3　実験方法 *36*

3-4　5 nm 金ナノ粒子または 50 nm 金ナノ粒子の観察 *37*

3-5　50 nm 金ナノ粒子プローブの観察 *40*

3-6　50 nm 金ナノ粒子プローブを用いて作製した試料の観察 *41*

第 4 節　加熱ステップを行わない比色法の実験結果および考察 43

4-1　金ナノ粒子径が測定に与える影響 *43*

4-2　プローブ DNA の密度が測定に与える影響 *45*

4-3　試料溶液の反応時間が測定に与える影響 *46*

4-4　人工合成 DNA を用いた反応メカニズムの検証 *47*

4-5　活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA の定量 *49*

第 5 節　加熱ステップを導入した比色法の実験結果および考察 52

5-1　加熱ステップの導入が金ナノ粒子プローブの粒径分布に与える影響 *52*

5-2　スペーサー長さが測定に与える影響 *53*

5-3　プローブ DNA 密度が測定に与える影響 *59*

5-4　凝集剤（NaCl）濃度が測定に与える影響……60
5-5　金ナノ粒子プローブの種数が測定に与える影響……62
5-6　検出対象の核酸の交雑部位の外側の塩基が測定に与える影響……63
5-7　RNA を用いた反応メカニズムの検証……65
5-8　選択性の検証……66
5-9　ピーク分離解析による試料中要素の分画……67
第 5 節　小括……72
参考文献……73
第 3 章　紫外可視分光光度計を用いた検出法（比色法）の開発……76
第 1 節　紫外可視分光光度計……76
第 2 節　実験方法……76
2-1　金ナノ粒子プローブの作製……76
2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量……76
2-3　分析方法……77
2-4　ピーク分離による吸光スペクトルの解析方法……77
第 3 節　実験結果および考察……78
3-1　活性汚泥に含まれる全細菌の 16S rRNA の定量……78
3-2　活性汚泥に含まれるアンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量……79
3-3　検出範囲の拡大を目指したピーク分離による解析方法の導入……80
第 4 節　小括……81
参考文献……81
第 4 章　光導波路分光装置を用いた検出法（光導波路法）の開発……82
第 1 節　光導波路分光装置……82
第 2 節　実験方法……84
2-1　金ナノ粒子プローブの作製……84
2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量……85
2-3　分析方法……86
第 3 節　実験結果および考察……87
3-1　異なる凝集状態の金ナノ粒子の吸光スペクトルと散乱光スペクトルの関係……87
3-2　スペーサー長さが測定に与える影響……89
3-3　金ナノ粒子プローブ濃度が測定に与える影響……90
3-4　凝集剤（$MgCl_2$）濃度が測定に与える影響……92
3-5　加熱温度が測定に与える影響……94
3-6　試料の加熱ステップが測定に与える影響……95
3-7　活性汚泥中のアンモニア酸化細菌の定量……98

3-8　腸管出血性大腸菌の mRNA の検出 *99*
3-9　 Severe acute respiratory coronavirus 2 のゲノム RNA の検出 *101*
3-10　金ナノ粒子プローブセットの違いが測定に与える影響 *105*
3-11　総 RNA 濃度が測定に与える影響 *108*
第 4 節　小括 109
補足図表 110
参考文献 119
第 5 章　スマートフォンとペーパーチップを用いた検出法の開発 123
第 1 節　ペーパーチップを用いた核酸検出法 123
第 2 節　実験方法 123
2-1　金ナノ粒子プローブ（検出プローブ）の作製 *123*
2-2 核酸サンプルの抽出と定量 *123*
2-2　ペーパーチップの作製 *124*
2-3　分析方法 *125*
第 3 節　実験結果および考察 126
3-1　金ナノ粒子径が測定に与える影響 *126*
3-2　キトサン濃度が測定に与える影響 *128*
3-3　キャプチャーDNA の固定量が測定に与える影響 *130*
3-4　人工合成 DNA の検出 *132*
3-5　活性汚泥中の細菌の 16S rRNA の検出 *133*
第 4 節　小括 136
参考文献 137
第 6 章　総括 138
参考文献 141
謝辞 142

概要

水環境工学分野において微生物の分析は，浄水処理における微生物のリスク評価，下水処理を担う微生物の管理，下水疫学調査，病原体による水環境汚染の実態の把握や感染症拡大の防止などに有用である．現在，日本の水道事業においては，培養法による一般細菌や大腸菌数の測定が日常的に行われている．また一部ではイムノアッセイによる硝化細菌の測定や，定量 PCR 法による下水疫学調査なども行われている．しかし，培養法は安価であるが分析に数日要するため検出対象が限られる．イムノアッセイは簡便であるが半定量的であり，抗体産生に動物を利用するため倫理的な問題がある．PCR 法は高い感度と特異性を持ち，多種多様な微生物やそれらが持つ特定の機能遺伝子を検出可能であるが，分析に時間，労力，コストを要する．日本の水道事業は職員の減少や採算性の悪化といった問題を抱えており，上記のような微生物の核酸分析を日常的に行うことはほぼ不可能である．そこで本研究では微生物の核酸を対象とした簡易分析法を開発することを目的とした．このような簡易分析法を開発することで，微生物の網羅的な分析が可能になり，水処理システムの安定的や最適化，事業者のコスト低減に貢献できる．さらに，これまで分析されてこなかった微生物や機能遺伝子等について分析が可能になることで，新たな知見の収集に寄与することができると考えられる．本研究では，金ナノ粒子に検出対象の核酸と特異的に結合（交雑）するプローブ DNA を修飾した「DNA 修飾金ナノ粒子（以下，金ナノ粒子プローブ）」を用いる分析法を開発した．金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴という特徴的な光学特性を持つため，粒子の状態によって特定の波長の光を吸収または散乱する．そのため，2 つの金ナノ粒子プローブが 1 つの核酸に交雑すると，金ナノ粒子の分散状態が変化しその光学特性が変化する．これを光学的に分析することで特定の核酸を検出または定量することができる．

本論文は，これまでに報告されているような酵素を用いた前増幅などを行わずに，環境中の微生物が持つ核酸を直接検出可能かつ，簡易，迅速，低コストな核酸検出法を開発することを目的としたものである．

第 1 章　水環境工学分野において行われている微生物が有する核酸を対象とした分析法や DNA 修飾金ナノ粒子を用いた核酸分析法に関する既往の知見についてまとめ，本研究の背景，目的について論じた．

第 2 章　金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の反応メカニズムの詳細解明を行った．金ナノ粒子プローブと核酸の反応に影響を与える因子（粒子径，粒子とプローブ DNA 間のスペーサー長さなど）について最適化した．さらに，非検出対象の核酸の存在や，交雑部位の外側の塩基配列が分析に与える影響の検討，暗視野顕微鏡観察による粒子の分散状態の評価等を行った．これにより反応条件を最適化し，反応時の粒子の挙動を可視化することができた．

第 3 章　紫外可視分光光度計を用いた吸光スペクトル測定による分析法（比色法）を開発した．比色法の検出原理について，試料溶液中に検出対象の核酸が含まれない場合は，凝集剤である NaCl 溶液を添加することで金ナノ粒子プローブが凝集し，溶液は赤色から青色へと変化する．試料溶液中に検出対象の核酸が含まれる場合は，金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の交雑によって凝集が阻害され，溶液は赤色または赤紫色のまま，核酸が低濃度であるほど青色に近づいていく．溶液の吸光スペクトルを測定し，吸光度比（波長 620～700nm 付近の吸光度の値を波長 520 nm 付近の吸光度の値で除したもの，粒子径などによって変動する）を算出する．あらかじめ濃度既知のスタンダードを用いて検出対象の核酸濃度と吸光度比の値の相関式を作成し，これに濃度未知のサンプルの吸光度比の値を代入することで検出対象の核酸濃度を算出することができる．第 2 章にて最適化した条件のもとで，比色法を用いて下水処理場にて採取した活性汚泥中のアンモニア酸化細菌（AOB）のモニタリングを行った．従来法である逆転写定量 PCR 法（RT-qPCR 法）とほぼ同程度に定量可能であることが示された．また，比色法で用いる紫外可視分光光度計は，水質基準項目の測定に必要なためすでに処理場に設置されており，比色法は核酸の抽出が行えれば実処理場に導入可能であるといえる．比色法の分析コストは約 8 円/1 サンプルで，分析は核酸抽出後 5 分程度で完了した．

第 4 章　光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトル測定による分析法（光導波路法）を開発した．前章で開発した比色法は簡便さや分析時間の点で優れていたが，検出下限が高く，病原体や低濃度の核酸の検出が困難であるという課題があった．そこで，微量の物質を高感度で検出可能な光導波路分光装置を用いた分析法を開発することで高感度化を試みた．光導波路法の検出原理について，台形のスライドガラスのような導波路ガラス上に金ナノ粒子プローブが分散して存在している場合は，基底状態の散乱光が観察される．試料溶液中に検出対象の核酸が含まれている場合は，交雑によって金ナノ粒子が近接することで散乱光強度が増大する．測定条件の最適化を行ったのち，腸管出血性大腸菌 O157:H7 が持つ *eae* 遺伝子の mRNA や臨床検体中の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のゲノム RNA の検出を行った．SARS-CoV-2 のゲノム RNA の検出では，RT-qPCR 法の Ct 値から定義された陽性サンプルと陰性サンプル（Ct 値≧37）について，散乱光強度の低下やスペクトルのピーク波長のシフトから判別可能であった．また，光導波路法の検出下限は，これまでに報告されている金ナノ粒子プローブと CRISPR-Cas システムを利用した酵素を必要とする分析法などとほぼ同等であった（人工合成ゲノム RNA：1 copies/μL，臨床検体中ゲノム RNA：30 copies/μL）．また，独自の測定条件を確立したことで，既往の光導波路分光装置を用いた分析法と比較して検出感度が 1000 倍程度向上し，10 copies/μL 程度の非常に低濃度な核酸の検出に成功した．

第 5 章　ペーパーチップとスマートフォンを用いた画像撮影による分析法（ペーパーチップ法）を開発した．本法はイムノクロマト法の原理を応用して，検出ライン上に抗体ではな

く核酸であるプローブ DNA を固定したペーパーチップにより検出を行う．試料溶液中に検出対象の核酸が含まれる場合は，プローブ DNA・核酸・金ナノ粒子プローブの複合体が形成されることで検出ラインは赤色に呈色する．検出対象の核酸が含まれない場合は，金ナノ粒子プローブが検出ライン上を通過するため，色は変化しない．試料溶液を滴下したペーパーチップについて，スマートフォンで画像を撮影し，画像解析ソフト（ImageJ）を用いて滴下地点からの距離と平均輝度値のプロファイルについて分析した．検出対象である細菌の 16S rRNA を含む RNA サンプル（RNA），これを RNA 分解処理したもの（RNA-NC），核酸を含まないサンプル（Blank）で分析を行ったところ，RNA のみ検出ライン上にピークが見られた．また，RNA-NC と Blank のプロットはほぼ一致しており，ピークは検出ラインよりも下流側に存在し，金ナノ粒子プローブや非検出対象の核酸が検出ラインを通過していることが示された．よって，本研究で作成したペーパー分析チップは，検出ラインの色の変化から核酸を検出可能であることが示された．

第 6 章　本研究で得られた知見を総括としてまとめた．また本研究の課題と今後の展望についても示した．

第 1 章　序論

第 1 節　研究背景

1-1　水環境工学分野における微生物分析の現状

水環境中にはウイルスを含め様々な微生物が存在している．水環境工学分野において微生物の分析は，生物学的下水処理または廃水処理の運転管理(Sanz and Köchling 2007)をはじめ，環境水のモニタリングと汚染源の特定(Ramírez-Castillo et al. 2015; Lu et al. 2015)，飲料水の安全性の評価(WHO chronicle 2011)，下水疫学調査(Haramoto et al. 2020)などに有用である．他分野においても，医療機関での感染症の診断による適切な治療法の選択や院内感染の防止(Emori and Gaynes 1993)，食品工場や飲食店での食中毒の防止や原因の特定のための食品検査(Stephen J. Forsythe 2011)でも用いられており，微生物の分析は我々の生活に必要不可欠なものであるといえる．

現在，日本の上下水道事業においては，培養法による一般細菌や大腸菌数の測定が日常的に行われている．飲料水を介した水系感染症は糞便中に含まれる微生物やウイルスによって引き起こされる．このため水道法にて定められた水道水質基準では，糞便汚染の指標や塩素消毒が適切に行われているかの判定基準として，大腸菌と一般細菌の測定が義務付けられている(上水試験方法 2020 年度版，日本水道協会 2020)．また，水質汚濁防止法にて定められた一律排水基準では，水の汚染状態を示す生活環境項目において大腸菌群数の測定が義務付けられている(下水試験方法 上下巻 2012 年版，日本下水道協会 2012)．環境基本法にて定められた公共用水域の水質汚濁に係る環境基準及び地下水の水質汚濁に係る環境基準では，河川，湖沼，海域の大腸菌数の測定が義務付けられている．また一部では，下水処理でのラテックス凝集法を用いたイムノアッセイによる硝化細菌の測定(日本下水道協会 2012)や下水疫学調査での PCR 法による新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）等の検出も行われている(大石ほか 2021)．

生物学的下水処理または廃水処理は，沈殿による固形物と液体の分離，汚染物質（有機化合物，無機化合物，栄養素など）の生物学的分解，消毒など，いくつかの工程を経て行われる．活性汚泥法は最も一般的に行われている生物学的下水処理技術であり，細菌，古細菌，真菌，原生生物などの好気性および嫌気性微生物が汚染物質の中和に重要な役割を果たしている(Shchegolkova et al. 2016)．したがって，活性汚泥法における微生物群集の調査は，安定的な処理と，処理が破綻した際の対応策を立てるために必要不可欠である(Hatamoto et al. 2007; Miura et al. 2007)．活性汚泥法は，微生物間の複雑な相互栄養関係を有する非常に複雑なシステムであるため，微生物群集の調査は容易ではない．活性汚泥の微生物群集構造は，一般的にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いた 16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）の分析によって決定されている(Su et al. 2019)．16S rDNA 分析は微生物の系統分類や定量に使用できるが，細胞外 DNA や死細胞中の DNA が存在するため，微生物の活性を決定することはできない(Maza-Márquez et al. 2016a)．したがって，微生物の活性を明らかにするために，16S rDNA

に加えて 16S rRNA（16S ratio）が測定されてきた (Maza-Márquez et al. 2016). 活性汚泥における細菌の 16S rRNA の定量は, 一般的に定量的蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（qFISH）法，定量的 RNA メンブレンハイブリダイゼーション法，逆転写定量 PCR（RT-qPCR）法によって行われる(Kapoor et al. 2016). qFISH 法は，サンプルの固定，ハイブリダイゼーション，顕微鏡観察のステップからなる(Miura et al. 2007). qFISH 法による分析では，対象となる微生物の存在量は決定できるが，その活性を決定することはできない．RNA メンブレンハイブリダイゼーションと RT-qPCR 法は，RNA 抽出ステップを必要とするが，標的の 16S rRNA 量を定量することができる．しかし，これらの分析手法には，RNA 抽出後に手間と時間がかかる，高価な装置と十分な設備の整った研究室が必要である，といった欠点がある．

1-2　様々な微生物分析法の特徴と問題点

前述した微生物の分析法はそれぞれ優れた点を持つ一方，表 1 に示す通り，多くの問題点も存在する(Jasson et al. 2010). 培養法は微生物や細胞を任意の温度・時間条件で培養することで菌数を測定する手法である．しかし，培養法は安価であるが分析に非常に時間を要する．例えば一般細菌は，検水とあらかじめ加熱溶解させ 45～50 ℃に保った標準寒天培地を混合し，37 ℃で 22～26 時間培養した後，コロニー数を計測することで菌数を決定する(上水試験方法 2022 年版, 日本水道協会 2020). 下水処理において硝化を担う硝化細菌は, 25～27 ℃で 40～60 日間培養した後，最確数法（MPN 法）にて菌数を決定する(下水試験方法 上下巻 2012 年版, 日本下水道協会 2012). また，難培養性微生物や生きているが培養できない微生物（VBNC 菌；viable but non-culturable）は検出することができないという問題点がある．イムノアッセイは抗原（微生物が持つ特有のタンパク質）と抗体（抗原と特異的に結合する免疫グロブリン）が複合体を形成する抗原抗体反応を利用して，微生物を分析する手法である．イムノアッセイは簡便であるが定性的または半定量的であり，偽陽性も多い．例えば，下水処理において行われる硝化細菌のイムノアッセイ（ラテックス凝集法）は，抗原抗体反応によりラテックス粒子が凝集するまで 5 時間ほど静置したのち，菌数を決定する(日本下水道協会 2012). また，イムノアッセイは抗体産生に動物を利用するためコストが非常に高く，倫理的な問題がある．PCR 法または定量 PCR 法は，酵素である DNA ポリメラーゼを利用したポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction；PCR）により核酸を増幅することで検出・定量を行う手法である．PCR 法は高い感度と特異性を持ち，16S rRNA，機能遺伝子，mRNA など多種多様な対象を検出可能であるが，分析に時間，労力，コストを要する．例えば RNA の定量法である逆転写定量 PCR（RT-qPCR）法では，RNA 抽出後に，DNA 分解，逆転写による cDNA の合成，定量 PCR による分析を行う．用いる試薬やキットによって差はあるが，分析に要する時間はおよそ 3 時間程度である．また，高価な試薬や装置を必要とすること, DNA ポリメラーゼは冷蔵または冷凍保存が必須であることなど, 問題点も多い．しかし，前述のように，培養に基づく方法は VBNC 菌を検出できないこと，イムノアッセ

イは定量性やコスト，抗体産生に動物を用いるため倫理的な問題があることから，これらと比較して PCR 法は優位であると言える(Jasson et al. 2010).

表 1　主要な微生物分析法の特徴(Jasson et al. 2010 の Table. 4 より引用)，図中〇:ユーザーにとってポジティブな特性またはメリットとして認識される，図中—:ユーザーにとって明確なメリットやデメリットがなく中立である，図中 × :ユーザーにとってネガティブな特性またはデメリットとして認識される.

Characteristic	Molecular techniques	Immunological techniques	Microscopic techniques	Conventional methods
Specificity based upon	DNA or RNA sequence 〇	Antibody-antigen binding recently also phage ligands ×/—	Staining using physiological or taxonomic probes —/〇	Phenotypical tests (morphology, biochemical reactions) ×/—
Expression of sensitivity	1 genome/PCR reaction →10^2 – 10^3 CFU/mL 〇	10^4 – 10^5 CFU/mL 〇	1 cell/visual field →± 10^4 CFU/mL —/〇	1 CFU/25 g —/〇
Time to result	1-3 h —	10 min – 1 h 〇	5 – 30 min 〇	From 3 – 7 days ×
Differentiation of dead/viable cells	—/〇	—	—/〇	〇
Interference of food sample	×/—	〇	×	〇
Simultaneous multiparameter testing	〇 (Positive)	-	-	×
Reproducibility	〇	〇	〇	—
Potential for automation	〇	—	—	×
Labour-intensity	— (Neutral)	—	—	×
Cost of materials	× (Negative)	×	×	〇
Investment of equipment/infrastructure	×	—	×	〇

しかし図 1 に示すように，現在，日本の上下水道事業は職員の減少や高齢化，技術力の低下，人工減少による採算性の悪化といった問題を抱えており，PCR 法によって日常的に様々な微生物の核酸分析を行うことはほぼ不可能である(人工減少下における維持管理時代の下水道経営のあり方検討会 報告書，国土交通省 2020). 例えば下水処理システムにおいては，処理性や病原体汚染の評価は，それぞれ放流水質の物理化学的な分析や，大腸菌数を指標とした培養による分析が，基準として定められて行われている．しかしながら，処理を担う微生物や特定の病原体を対象とした項目基準は現在も定められていない．

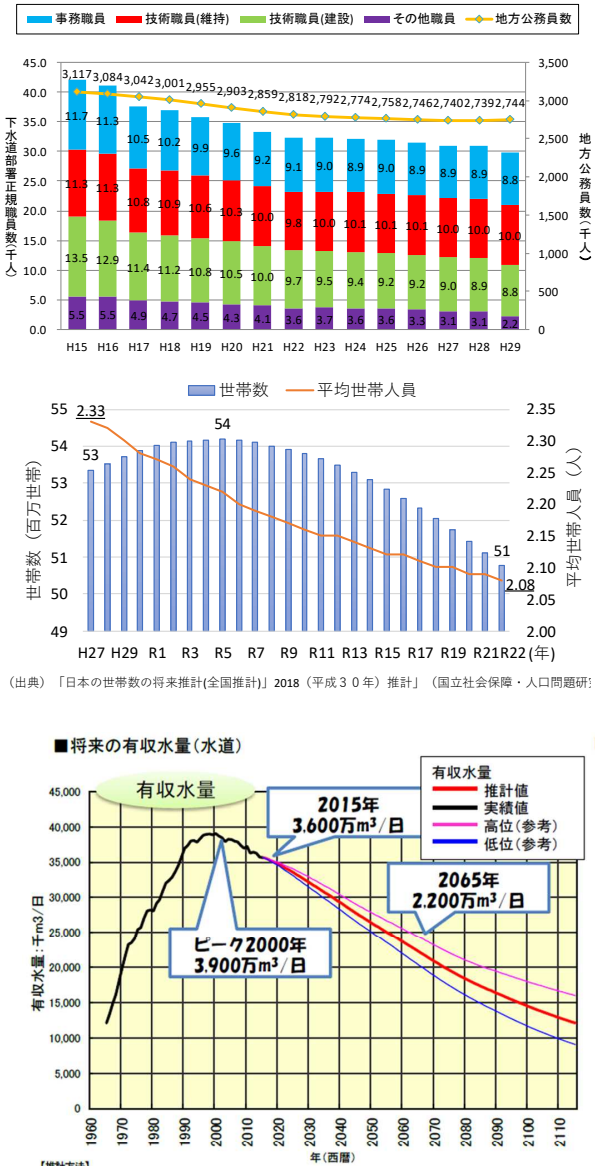


図１（A）下水道部門の職層別職員数の推移，（B）世帯数・平均世帯人数の将来値，（C）将来の有収水量（水道）

1-3　DNA 修飾金ナノ粒子を用いた微生物核酸の簡易分析法

上述の問題を解決するために，本研究では標的の微生物に特異的な遺伝子配列と相補鎖的な配列を持つ DNA を修飾した金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブと称す）を用いて微生物を分析することを試みた．

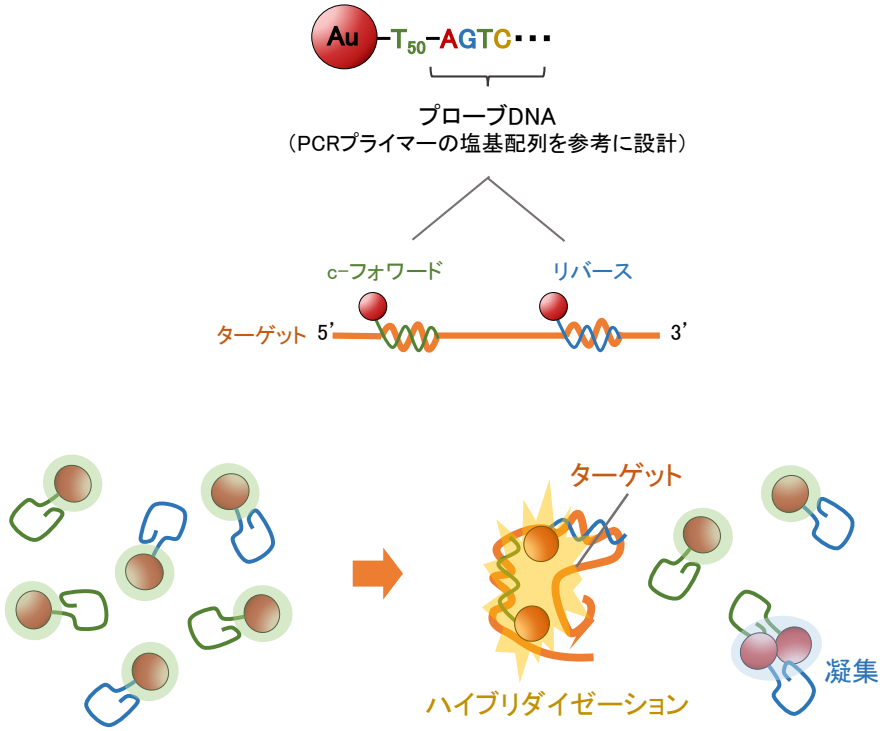


図 2　本研究で開発した核酸分析法の検出原理（A）金ナノ粒子プローブの概要，（B）金ナノ粒子プローブの分散状態の変化とそれに伴う光学特性の変化

図 2 に，本研究において開発した核酸分析法の分析メカニズムと使用する金ナノ粒子プローブの概要を示す．図 2A 中の c-フォワードプローブ DNA はフォワードプライマーに相補的な塩基配列のもの，リバースプローブ DNA はリバースプライマーと同じ塩基配列のものである．この 2 種のプローブ DNA の 5’末端にはチオール基が修飾されており，アルカンチオール化合物と金が反応することで形成される，Au-S 結合と呼ばれる共有結合と同程度に強い結合を介して金ナノ粒子表面に修飾される(Badia et al. 1996)．また，本研究で開発した分析法の反応メカニズムは以下の通りである．金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸を NaCl などの凝集剤とともに反応させた際に，検出対象の核酸を含まない試料においては，凝集剤により金ナノ粒子プローブが凝集する．一方，検出対象の核酸を含む試料においては，検出対象の核酸と金ナノ粒子プローブと交雑することで凝集が阻害され，交雑したプロー

ブは分散状態を保つ（図 2B）．そのため，検出対象の核酸の有無や濃度により，試料のスペクトルが異なる(Sardar et al. 2009)．具体的には，光を吸収・散乱する波長が変化し，スペクトルのシフトなどが観察される．この変化を光学的に分析することで，検出対象の核酸を検出または定量することができる．

金ナノ粒子プローブを用いた核酸検出法は，特に臨床診断 (Shi et al. 2014; Xia et al. 2010) や食品の安全 (Manzano et al. 2016) に関する分野において盛んに開発されてきた．しかし，臨床サンプルを用いた分析が行われていないため，この技術の実際のサンプルへの適用性は不明である (Jung et al. 2011)．これらの先行研究は，金ナノ粒子を用いた核酸分析法は簡易で迅速である一方，実サンプルへの適用が依然として困難であることを示している．我々の知る限り，これまでに薬品 (Shi et al. 2019)，重金属 (Zong et al. 2011)，有害な有機化合物 (Ma et al. 2019) がナノ粒子を用いて検出されているが，実際の環境サンプル中の核酸の定量に成功した研究は存在しない．

1-4　本研究の目的

第 1 節で述べたような問題を受け，本研究では微生物の核酸を対象とした簡易分析法を開発することを目的とした．このような簡易分析法を開発することで，微生物の網羅的な分析が可能になり，水処理システムの安定的や最適化，事業者のコスト低減に貢献できる．さらに，これまで分析されてこなかった微生物や機能遺伝子等について分析が可能になることで，新たな知見の収集に寄与することができると考えられる．例えば，活性汚泥システムをはじめとする廃水処理システム内には *Candidatus* Patescibacteria/Candidate phyla radiation（CPR）などの未培養微生物が普遍的に存在している(Kagemasa et al. 2022)．これらのバクテリアは一般的にゲノムサイズ（1 Mbp 以下）や細胞サイズ（およそ 0.2 μm）が小さく，代謝に関わる遺伝子をほとんど持たないため，宿主である微生物と共生または寄生的な生活環を持つことが報告されている(Rinke et al. 2013, Castelle et al. 2018)．活性汚泥システムでは *Ca.* Saccharimonadia，*Ca.* Paceibacteria，*Ca.* Gracilibacteria，未培養の系統群である ABY1 などが，処理システム中の宿主となる微生物と共生または寄生することでバルキングや発泡現象，活性汚泥フロックの形成に関わっている可能性が示唆されている(Batinovic et al. 2021, Nielsen et al. 2009, Xia et l. 2018)．しかしながらこれらの微生物は未培養であるため，培養法による分析が不可能であり，分離されていないためにその形態が不明であるものも多いため，ゲノムや特定の機能遺伝子を対象とした核酸分析法によって検出が行われている．よって，本研究を通してこのような処理に関わる未培養微生物を簡易に分析できるようになることで，廃水処理システムの安定化はもちろん，効率化，高度化に貢献できると考えられる(黒田ほか，2023).

本研究では，後述の金ナノ粒子に検出対象の核酸と特異的に結合(交雑)するプローブ DNA を修飾した「DNA 修飾金ナノ粒子（以下，金ナノ粒子プローブ）」を用いる分析法を開発し，環境由来サンプルに対する本分析法の適用可能性について検討した．

第 2 節　金ナノ粒子を用いた簡易核酸分析法に関する既往の研究

2-1　金ナノ粒子の性質

金ナノ粒子（AuNP）は，近年よく用いられているナノマテリアルの一つであり，高い費用対効果，高いモル吸光係数，特徴的な吸収スペクトル，表面修飾の容易さ，表面／体積比の大きさ，優れた光安定性といったユニークな特性を持つ(Sardar et al. 2009)ノ粒子の光学特性は，表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance，SPR）または局在表面プラズモン共鳴（Localized Surface Plasmon Resonance，LSPR）と呼ばれる電子の共鳴振動現象によるものである．SPR（LSPR）とは，金属ナノ粒子近傍の電波光の振動電場が，粒子自身が持つ自由電子と相互作用することで，ある特定の波長の光と共鳴するような電子の波（表面プラズモン）が粒子表面に生じる現象である（図 3A）．

金ナノ粒子の場合，可視光の RGB 成分のうち緑色の波長の光だけが粒子の表面プラズモンを振動し，エネルギーとして吸収される．また，青色の波長の光は波長が短く散乱してしまうため，通常の金ナノ粒子溶液は赤色を示す．SPR を生じる光の波長は，粒子の大きさや物理的形状，凝集状態に強く影響される（図 3B）一般に，金ナノ粒子の粒子表面はクエン酸などの保護剤で被覆されているが，時間経過や NaCl などの塩の添加によって金ナノ粒子の表面電荷が中和されることで，粒子が凝集，粒径が増大する．このとき粒径の増大に伴って，金ナノ粒子溶液の色は赤色から青色に変化する（図 3C）．

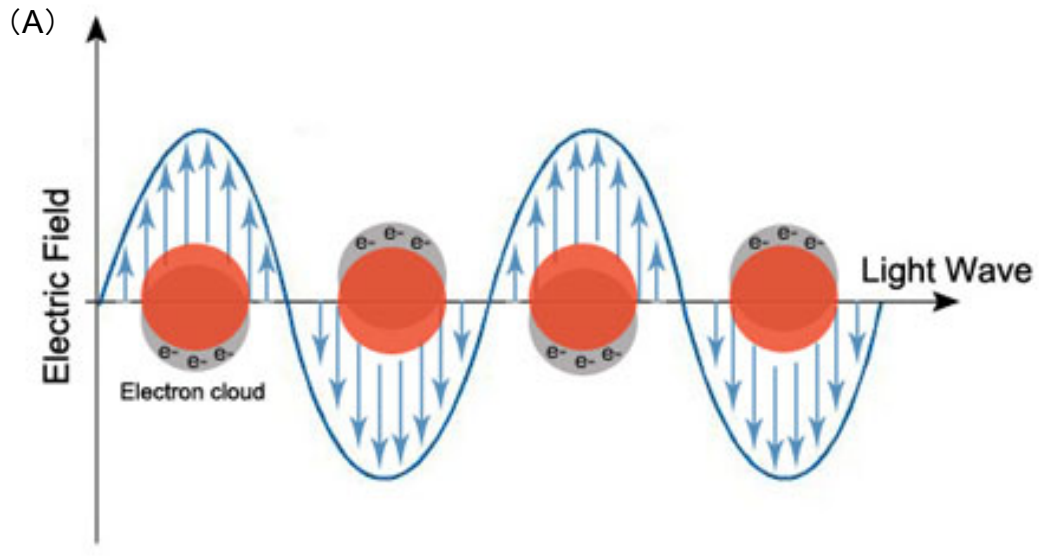
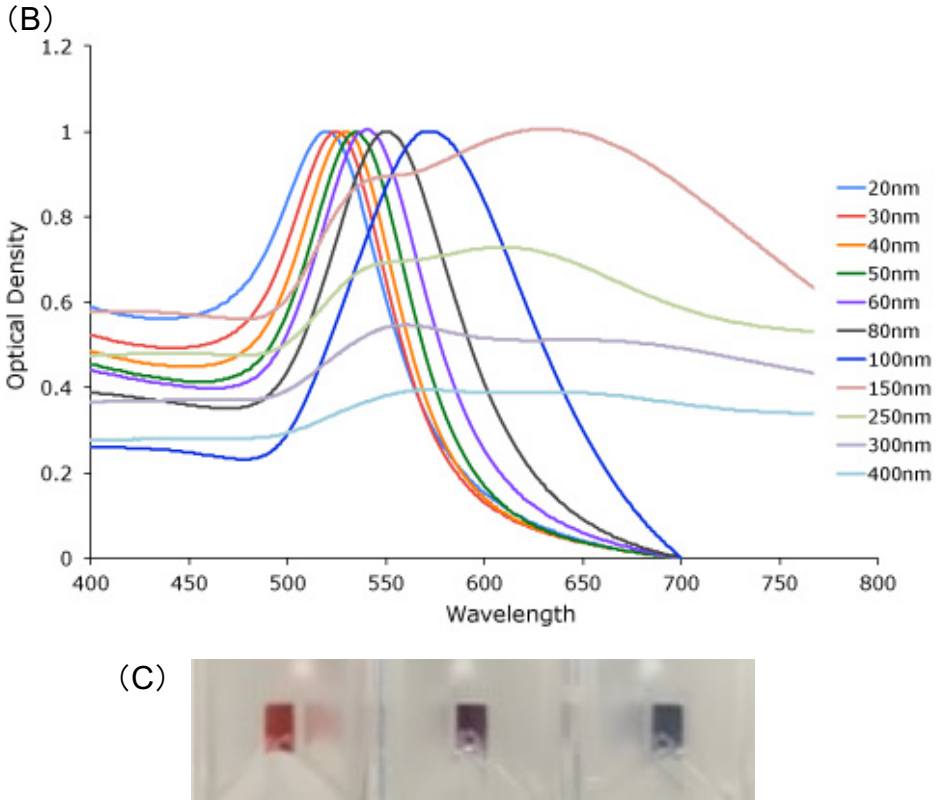


図 3　金ナノ粒子の光学的性質の概要
（A）局在表面プラズモン共鳴（LSPR：localized surface plasmon resonance）の原理（コスモバイオ株式会社，金ナノ粒子の特性・性質より引用）



（B）金ナノ粒子サイズに依存する表面プラズモン共鳴（コスモバイオ株式会社，金ナノ粒子の特性・性質より引用），（C）NaCl の添加による金ナノ粒子溶液の色調の変化（NaCl 最終濃度は，左：0 mM，中：36.4 mM，右：364 mM）

これまでに，様々な金ナノ粒子の合成方法が開発されてきた．最も古い液相中での金ナノ粒子の合成方法は，1857 年に Faraday によって報告された(Faraday 1857)．1951 年には Turkevich らによって，テトラクロロ金(III)酸とクエン酸ナトリウムを混合し，加熱によって粒子を得る合成方法（Turkevich 法）が提案された(John Turkevich, Cooper Stevenson, and Hillier 1941)1973 年には Frens がこの方法を改良し，様々な粒径に調整可能，かつ均一な粒径を持つ金ナノ粒子の合成が簡単に行えるようになった(Frens 1973)．現在はこの Turkevich 法や，還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを用いてトルエン溶液中で合成を行う Brust-Schiffrin 法などが一般的に行われている(Brust et al. 1994)．金ナノ粒子は，Au^{+}や Au^{3+}を含む溶液中に電子供与体である還元剤を加えてこれらのイオンを Au^{0} まで還元すること合成される．還元剤としては，クエン酸ナトリウムをはじめ水素化ホウ素，シュウ酸，ポリオール，過酸化水素，亜硫酸塩などが使用される．また，クエン酸ナトリウム，硫黄配位子，リン配位子，ポリマー，界面活性剤などは，分子の一端が金表面に吸着または化学的に結合することで被膜を形成し，粒子を安定的に分散させる機能を持つ．この中でも，クエン酸ナトリウムは還

元剤としても安定剤としても作用するために広く使用されている(Daruich De Souza, Ribeiro Nogueira, and Rostelato 2019)（図 4）.

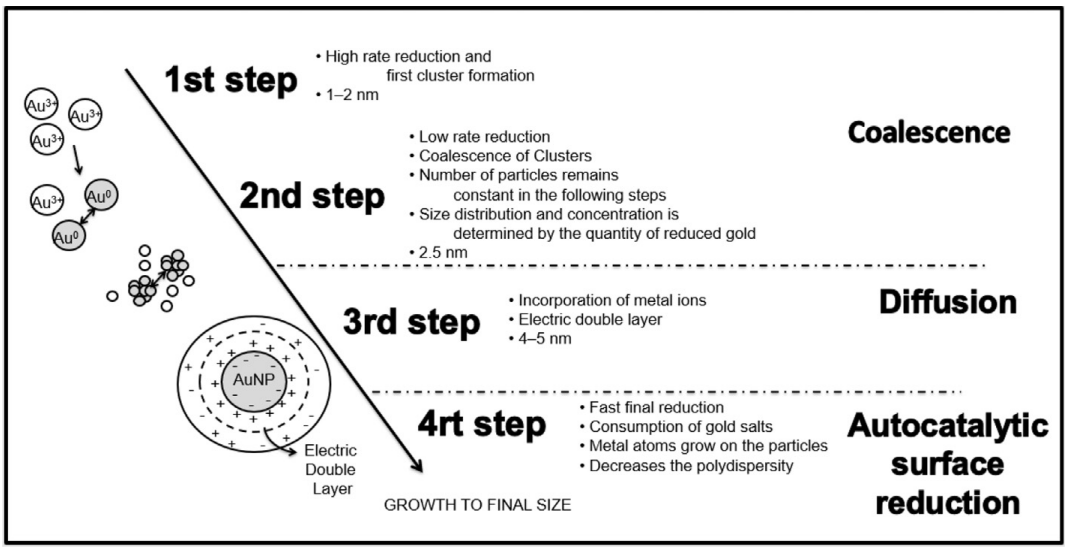


図 4　金ナノ粒子の合成ステップ（De Souza et al., 2019　Fig. 5 より引用）

粒子の合成後，粒子表面を被覆している安定剤分子は，配位子交換反応によって他の安定剤分子と置き換えることができる．オリゴヌクレオチド，ペプチド，ポリエチレングリコール（PEG）など，金表面に結合できる官能基（チオールや特定のペプチド配列など）を持つ生体分子は，金ナノ粒子溶液に直接添加することで，粒子表面の安定剤分子と置き換えることができる．金表面に結合できる官能基を持っていない生体分子も，EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-HCl）を用いて生体分子上のアミノ基と安定剤分子の遊離末端のカルボキシ基を結合させることで，粒子表面への修飾が可能である(Bartczak and Kanaras 2011; Jazayeri et al. 2016)．これまでに，様々なプロトコルが確立されており，生体分子のほとんどを金ナノ粒子に修飾することが可能である．しかし，金ナノ粒子への表面修飾に関する反応は非常に複雑であるため，修飾反応中の凝集や非特異的結合による影響を確認するために，作成した生体分子修飾金ナノ粒子の特性を評価する必要がある(Daruich De Souza, Ribeiro Nogueira, and Rostelato 2019).

2-2　DNA 修飾金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブ）を用いた核酸検出法

これまでに，様々な DNA 修飾金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブ）の作製方法が開発されてきた．最も古く基本的な方法は，金ナノ粒子とチオール修飾したプローブ DNA の混合溶液に凝集剤である NaCl 溶液を段階的に添加していき，粒子表面にプローブ DNA を修飾する”Salt-aging”法である．この方法は効率的にプローブ DNA を修飾することができるが，反

応の安定化に 1 日から 2 日程度要する，50 nm を超えるような粒径の大きい金ナノ粒子に対しては修飾効率が低下するため，NaCl 溶液の添加ステップを増やさなければならないという問題がある(Jin et al. 2003)．修飾効率の低さに対しては，Sait-aging 法においてドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤を添加することで，250 nm 以上の金ナノ粒子にも十分に DNA を修飾できることが報告されている(Hurst, Lytton-Jean, and Mirkin 2006)．しかしながら，使用する界面活性剤の種類によっては細胞毒性を持つ成分が含まれているため，作製したナノ粒子がドラッグデリバリーなど生体内での使用には適さないという問題がある．これらの問題を解決するために，チオール修飾したプローブ DNA 溶液を金ナノ粒子溶液に添加する際に，pH を 3 程度に調節する Low-pH 法が開発された(Zhang, Servos, and Liu 2012)．この方法では，プローブ DNA を高い効率で粒子に修飾することができ，反応時間も数分程度と非常に短い．しかしながら，基本的にそれぞれのラボで金ナノ粒子や金ナノ粒子プローブを作製していることや，プローブ DNA の修飾方法の違いによって，その品質にはばらつきがあることが示唆されている(Zhang, Servos, and Liu 2012)．

これまでに，様々な反応メカニズムによる金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法が開発されてきた．分散した金ナノ粒子プローブの基本となる反応メカニズムは，Cross linking assay (Mirkin et al. 1996; Elghanian et al. 1997a)と Non-cross linking assay (Soo et al. 2009; Heidari, Rezatofighi, and Rastegarzadeh 2021)の 2 つに分けられる．

Cross-linking assay は最も基本的な検出ストラテジーとして，1990 年代後半に Mirkin や Storhoff らの研究グループによって開発された．これは，金ナノ粒子に DNA を修飾しこれと交雑するオリゴヌクレオチドを用いて金ナノ粒子の架橋構造を構築する手法である(Mirkin et al. 1996; Elghanian et al. 1997a; Storhoff et al. 1998; Storhoff and Mirkin 1999; Storhoff et al. 2000)．この架橋構造により，金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸による高分子体が形成されるため，検出対象の核酸を含む溶液の色が赤色から紫色または青色に変化する．交雑するオリゴヌクレオチドが存在する場合は，架橋構造が形成されることで金ナノ粒子プローブは自己集合して集合体になる（図 5）．この集合プロセスは，熱変性によって元に戻すことができる(Mirkin et al. 1996)．このストラテジーが開発されたことで，DNA と DNA の相互作用の特異性を利用して，サイズや組成の異なる粒子間の相互作用を制御することで，コロイド凝集体の光学的，電子的，構造的な特性を自在に調節できる可能性が示された．

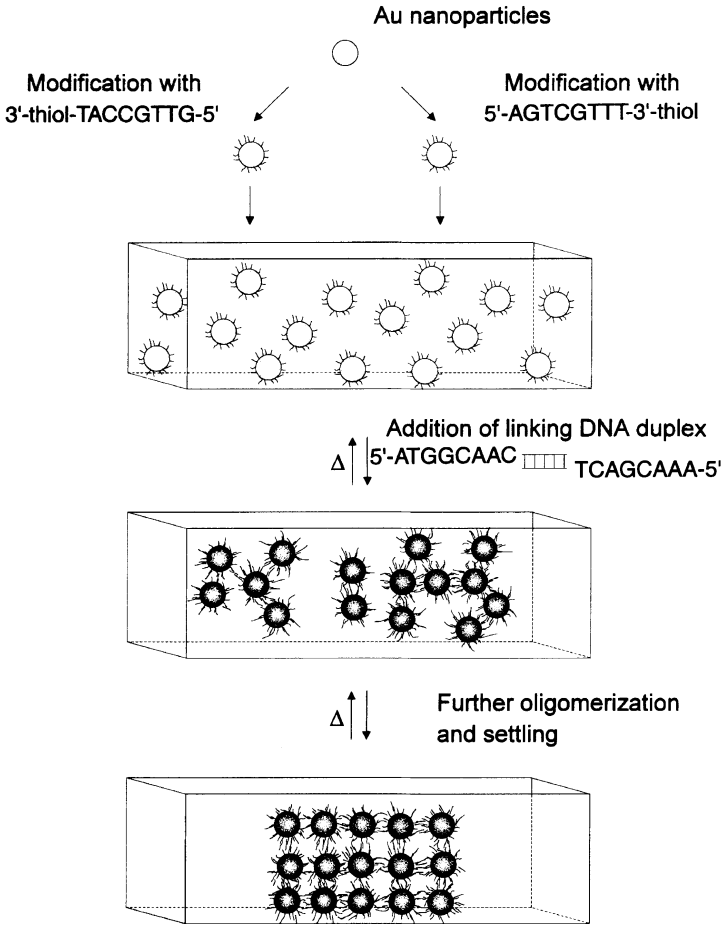


図 5　Cross linking assay の概略図（Mirkin et al., 1996，Fig. 1 より引用）

Mirkin と Storhoff らは，金ナノ粒子プローブ間を架橋するオリゴヌクレオチドの長さの違いにより，金ナノ粒子プローブの集合体の光学特性が異なることを明らかにした(Storhoff et al. 2000)（図 6）．金ナノ粒子プローブの集合体のプラズモン周波数は，オリゴヌクレオチドの長さに反比例した．また，金ナノ粒子に修飾された DNA の融解温度に近い温度でアニーリングすると，長いオリゴヌクレオチド（48 塩基対と 72 塩基対）を含む集合体は，短いオリゴヌクレオチド（24 塩基対）を含む集合体と同程度まで表面プラズモン共鳴によるピーク波長がレッドシフトした．アニーリング前とアニーリング後の集合体について，沈降速度，透過型電子顕微鏡，動的光散乱，紫外可視分光法による特性評価を行った結果，オリゴヌクレオチドの長さが，アニーリング下で形成される集合体のサイズを速度論的に制御しており，それによって光学特性を制御していることが示された(Storhoff et al. 2000).

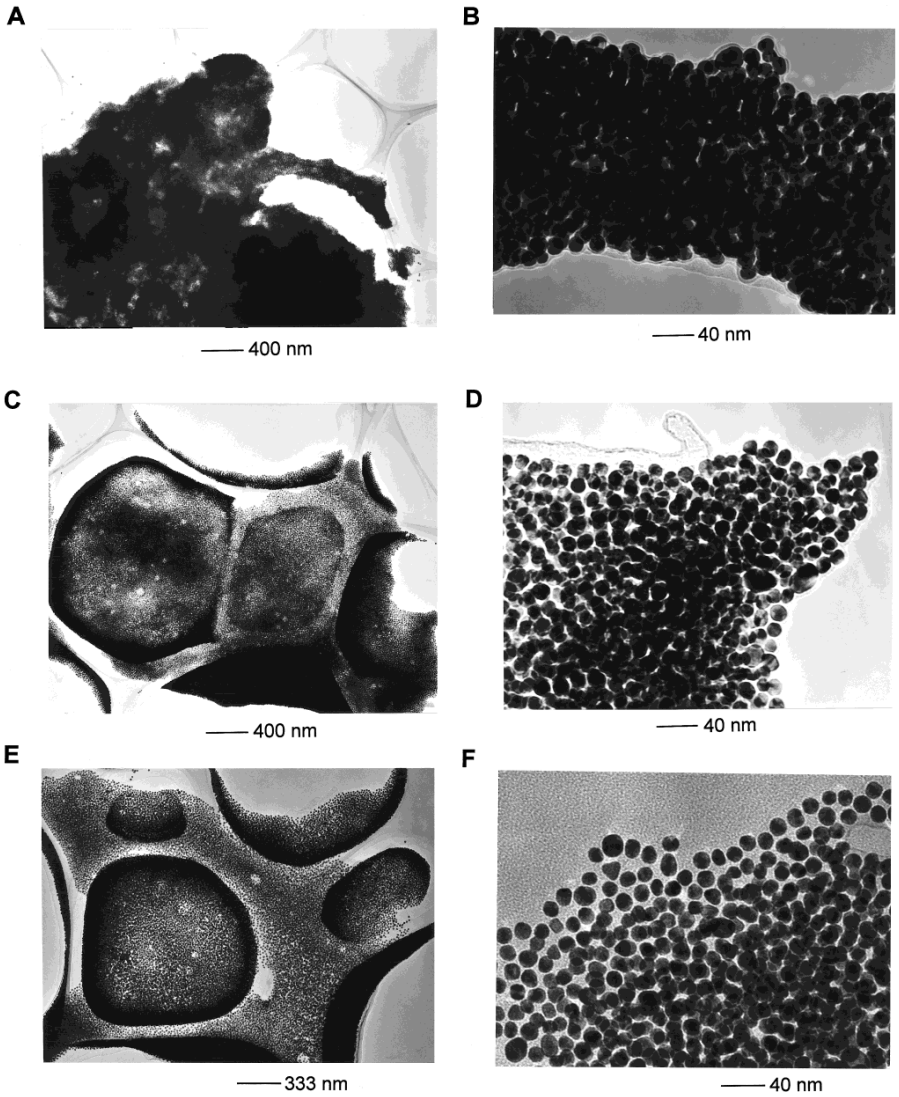


図 6　異なる長さのオリゴヌクレオチドによって架橋された金ナノ粒子プローブの集合体の TEM 観察像，（A）と（B）；24 base，（C）と（D）；48 base，（E）と（F）；72 base（Storhoff et al., 2000，Fig. 9 より引用）

また，Mirkin，Storhoff，Park らは，金ナノ粒子に修飾するプローブ DNA 配列の違いが集合体の形成へ与える影響について調査した．プローブ DNA に，金ナノ粒子と交雑部位の配列のスペーサーとしてポリアデニンまたはポリチミンを組み込んだ．金ナノ粒子への親和性の違いから，ポリアデニンスペーサーはポリチミンスペーサーに比べて，同じ長さのスペーサーを組み込んだ場合でも粒径が小さくなることが示された．また，ポリアデニンスペーサーを含む金ナノ粒子プローブの集合体は，ポリチミンスペーサーを含む金ナノ粒子プローブの集合体よりも粒子間の距離が小さくなり，表面プラズモン共鳴のピーク波長が長波長側に存在することが明らかとなった(Park et al. 2004)（図 7）．

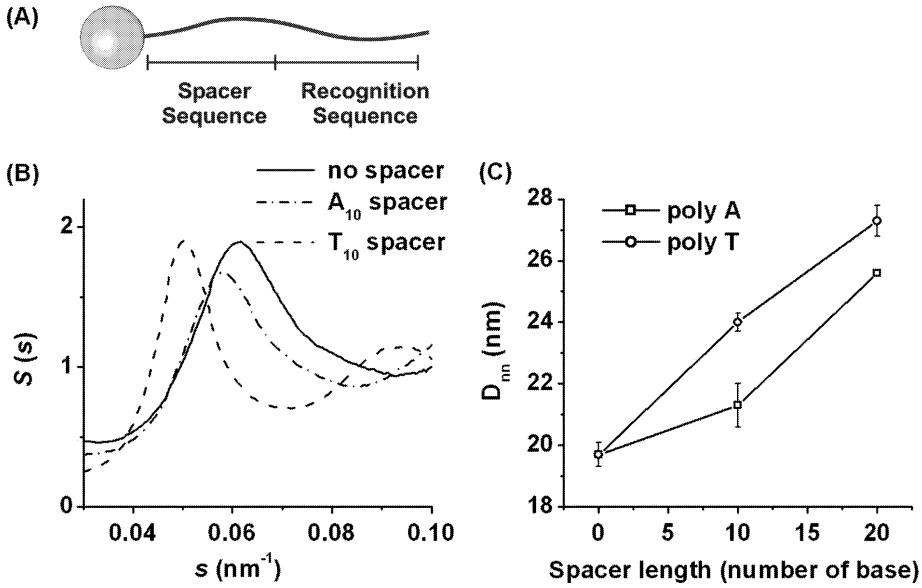


図 7　金ナノ粒子プローブ内のスペーサー配列が測定に与える影響（Park et al., 2004, Fig. 7 より引用），（A）スペーサーの位置，チミンスペーサーとアデニンスペーサーの（B）構造定数の違い，（C）スペーサー長さと粒径の関係

Cross-linking assay に続いて，架橋構造を形成しない Non-cross linking assay が開発された．Non-cross linking assay では，1 種類の金ナノ粒子プローブを用いるため，cross-linking assay のように金ナノ粒子プローブ間での架橋構造は形成されない．凝集剤である高濃度の塩を添加すると，交雑しなかった金ナノ粒子プローブが凝集するため，検出対象の核酸を含まない溶液の色が赤色から紫色または青色に変化する(Soo et al. 2009; Heidari, Rezatofighi, and Rastegarzadeh 2021)（図 8）．

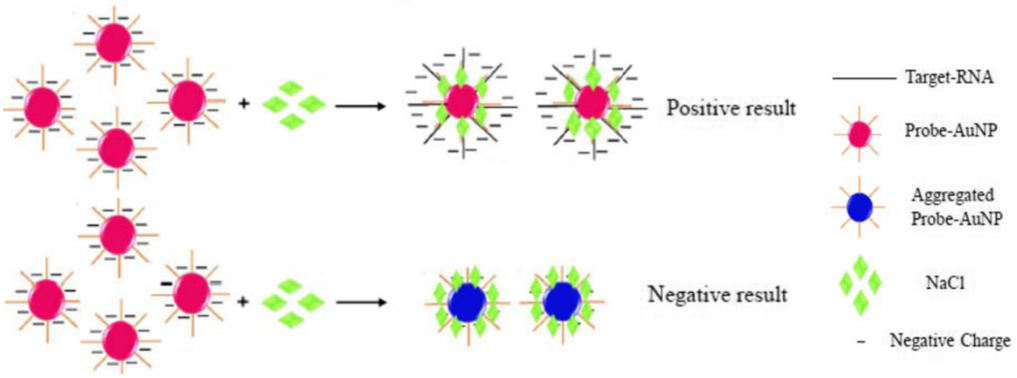


図 8　Non-cross linking による方法の概略（Heidari et al., 2021, Fig. 1 より引用）

さらに，発展的なシグナルを増幅させるためのアプローチとして，Shawky らは Non-cross linking による方法で交雑後の反応溶液にカチオン性金ナノ粒子を添加することで検出を行う方法を開発した (Shawky et al. 2017)．この方法では，金ナノ粒子プローブが検出対象の核酸と交雑している場合，カチオン性金ナノ粒子が負電荷を帯びている検出対象の核酸に分散した状態で付着するため，カチオン性金ナノ粒子と金ナノ粒子プローブの凝集が阻害され，溶液は赤色のままとなる．溶液中に検出対象の核酸が存在しない場合は，カチオン性金ナノ粒子は金ナノ粒子プローブのプローブ DNA に付着する．これにより，カチオン性金ナノ粒子と金ナノ粒子プローブが凝集するため，溶液は赤色から青色に変化する（図 9）．

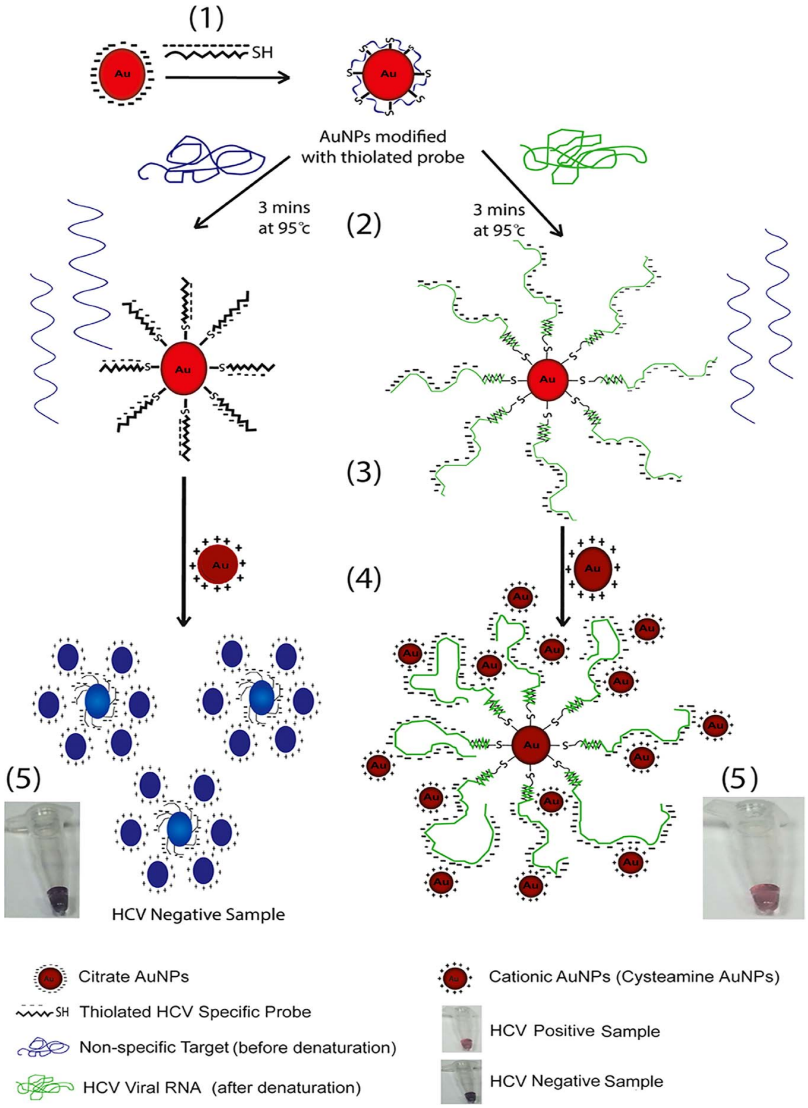


図 9　Non-cross linking assay をベースとしたカチオン性金ナノ粒子の添加による検出方法の概略（Shawky et al., 2017，Fig. 1 より引用）

検出対象の核酸の分子数が多い場合には，Non-cross linking assay の方が Cross linking assay よりも急速に凝集が起こるため，Non-cross linking assay は検出対象の核酸が豊富に存在する場合や PCR 法により検出対象の核酸を増幅できる場合に最適な検出方法であることが報告されている (G. Wang et al. 2017)．本研究で使用する環境サンプルには，多種多様な核酸が含まれていること，また，特に活性汚泥を由来とする核酸サンプルにはタンパク質などの夾雑物が多く含まれていることから，架橋構造による Cross linking assay は適していないと考えた．また，紫外可視分光光度計は，金ナノ粒子の粒径や分散状態を簡便に分析可能な装置であることから(Haiss et al. 2007)，金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法での光学的分析においても広く使用されている．この理由としては，光学的分析装置の中でも比較的安価で，ポータブル型のデバイスも販売されているため，設備が不十分な場所でのオンサイト分析が容易であることが考えられる．また，紫外可視分光光度計は，水質基準項目である色度や濁度などの分析に用いられるためすでに処理場に設置されており，これを用いる検出法は導入しやすいと考えられる．よって本研究では，Non-cross linking assay をベースとし，紫外可視分光光度計を用いた吸光スペクトル測定による分析法（以下，比色法）を開発することとした．

金ナノ粒子プローブを用いた核酸検出法は，特に臨床診断 (Shi et al. 2014; Xia et al. 2010) や食品の安全 (Manzano et al. 2016) に関する分野において盛んに開発されてきた．これまでに Mirkin や Storhoff らのグループは，Cross-linking assay により人工合成したオリゴヌクレオチドの検出やゲノム中の SNP 検出を行った(Bao et al. 2005; Zhao et al. 2010)．その他にも，人工合成したオリゴヌクレオチドや臨床サンプルから PCR 法により前増幅を行ったサンプルを用いた検出例が多数報告された（表 2）．Shawky らは，特定のナノ粒子で装飾されたクエン酸中の AuNP の凝集を誘導することによって，未増幅の臨床サンプル中の C 型肝炎ウイルスから抽出された RNA を定量する方法を開発した (Shawky et al. 2017)．Jung らは，金ナノ粒子を用いて *Chlamydia trachomatis* のプラスミドをリアルタイムで検出する比色法を開発した．しかし，臨床サンプルを用いた分析が行われていないため，この技術の実際のサンプルへの適用性は不明である(Jung et al. 2011)．最近では Bahavarnia らが，検出対象の核酸に特異的なプローブ DNA を金ナノ粒子で修飾した DNA 修飾金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブ）を用いて，*Acinetobacter baumannii* がもつ特異的な DNA 配列に基づいて作製した人工合成 DNA を検出した (Bahavarnia et al. 2020)．また，環境サンプルを模した実験系としては，Huang らによって純菌をスパイクした食品サンプルから抽出した DNA を用いた検出例がある(Thavanathan, Huang, and Thong 2015)．この手法は，金ナノ粒子プローブと，検出対象の核酸と交雑する DNA を固定した酸化グラフェンシートを用いて，*Salmonella enterica* の invA 遺伝子について分光光度計を用いた吸光スペクトル測定により分析した．しかし，検出限界が 1 nM（10^5 CFU/mL）と非常に高く，実際の食品中に *Salmonella enterica* が含まれる場合にも検出可能であるかは不明であるという問題があった．

よって，既往の研究が示す通り，金ナノ粒子を用いた核酸分析法は簡易で迅速である一方で，実環境サンプルへの適用が依然として困難であると言える．我々の知る限り，これまでに環境サンプルを対象として，薬品 (Shi et al. 2019)，重金属 (Zong et al. 2011)，有害な有機化合物 (Ma et al. 2019) がナノ粒子を用いて検出されているが，核酸の定量に成功した研究はほとんどない．

表 2　既往の研究における検出対象

検出対象	サンプル	Reference
Acinetobacter baumannii	**人工合成**したOMPA geneの配列（DNA）	Bahavarnia et al. *Heliyon*, 2020
Staphylococcus aureus	**人工合成**した*mecA* geneの配列（DNA）	Storhoff et al., *Nat. commun.,* 2004
Escherichia coli *Enterococcus faecalis* *Shigella dysenteriae* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus pneumonia*	**人工合成**した16S rRNA geneの配列（DNA）	Shi et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2014
Chlamydia trachomatis	純菌から**PCR法で増幅**したplasmidの配列（DNA）	Jung et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2011
Hepatitis C virus	人工合成したゲノムの配列（RNA） Clinical sampleから**RT-PCR法で増幅**したゲノムの配列（DNA）	Shawky et al. *Clin. Biochem*, 2017
Salmonella enterica	純菌を添加した食品サンプルから抽出し**PCR法で増幅**した *invA* geneの配列（DNA）	Thavanathan et al., *Int J Nanomedicine*, 2015

参考文献

- Badia, A, L Demers, L Dickinson, F G Morin, R B Lennox, and L Reven. 1996. ‘Gold-Sulfur Interactions in Alkylthiol Self-Assembled Monolayers Formed on Gold Nanoparticles Studied by Solid-State NMR’. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. Vol. 96. https://pubs.acs.org/sharingguidelines.
- Bahavarnia, Farnaz, Paria Pashazadeh-Panahi, Mohammad Hasanzadeh, and Nasrin Razmi. 2020. ‘DNA Based Biosensing of Acinetobacter Baumannii Using Nanoparticles Aggregation Method’. Heliyon 6 (7). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04474.
- Bao, Y. Paul, Martin Huber, Tai Fen Wei, Sudhakar S. Marla, James J. Storhoff, and Uwe R. Müller. 2005. ‘SNP Identification in Unamplified Human Genomic DNA with Gold Nanoparticle Probes.’ Nucleic Acids Research 33 (2). https://doi.org/10.1093/nar/gni017.
- Bartczak, Dorota, and Antonios G. Kanaras. 2011. ‘Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling’. Langmuir 27 (16): 10119–23. https://doi.org/10.1021/la2022177.
- Batinovic S, Rose JJA, Ratcliffe J, Seviour RJ, Petrovski S. Cocultivation of an ultrasmall environmental parasitic bacterium with lytic ability against bacteria associated with wastewater foams. Nat Microbiol 2021;6:703–711.
- Brust, Mathias, Merry1 Walker, Donald Bethell, David J Schiffrin, and Robin Whyman. 1994. ‘Synthesis of Thiol-Derivatised Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid-Liquid System’. J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.
- Castelle Cindy J, Brown Christopher T, Anantharaman Karthik, Probst Alexander J, Huang Raven H and Banfield Jillian F 2018. ‘Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations’. Nat Rev Microbiol 16: 629–645.
- Daruich De Souza, Carla, Beatriz Ribeiro Nogueira, and Maria Elisa C.M. Rostelato. 2019. ‘Review of the Methodologies Used in the Synthesis Gold Nanoparticles by Chemical Reduction’. Journal of Alloys and Compounds. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- Elghanian, Robert, James J Storhoff, Robert C Mucic, Robert L Letsinger, and Chad A Mirkin. 1997. ‘Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles’. Science 277:1078–80. https://www.science.org.
- Emori, T Grace, and Robert P Gaynes. 1993. ‘An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory’. Clinical microbiology reviews 6 (4): 428–42. https://journals.asm.org/journal/cmr.
- Faraday, Michael. 1857. ‘Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light’. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 47.

- Frens. 1973. ‘Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions’. Nature Physical Science 241:20–22.
- Haiss, Wolfgang, Nguyen T.K. Thanh, Jenny Aveyard, and David G. Fernig. 2007. ‘Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra’. Analytical Chemistry 79 (11): 4215–21. https://doi.org/10.1021/ac0702084.
- Haramoto, Eiji, Bikash Malla, Ocean Thakali, and Masaaki Kitajima. 2020. ‘First Environmental Surveillance for the Presence of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater and River Water in Japan’. Science of the Total Environment 737. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405.
- Hatamoto, Masashi, Hiroyuki Imachi, Akiyoshi Ohashi, and Hideki Harada. 2007. ‘Identification and Cultivation of Anaerobic, Syntrophic Long-Chain Fatty Acid-Degrading Microbes from Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludges’. Applied and Environmental Microbiology 73 (4): 1332–40. https://doi.org/10.1128/AEM.02053-06.
- Hurst, Sarah J., Abigail K.R. Lytton-Jean, and Chad A. Mirkin. 2006. ‘Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes’. Analytical Chemistry 78 (24): 8313–18. https://doi.org/10.1021/ac0613582.
- Jasson, Vicky, Liesbeth Jacxsens, Pieternel Luning, Andreja Rajkovic, and Mieke Uyttendaele. 2010. ‘Alternative Microbial Methods: An Overview and Selection Criteria’. Food Microbiology. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008.
- Jazayeri, Mir Hadi, Hamed Amani, Ali Akbar Pourfatollah, Hamidreza Pazoki-Toroudi, and Bijan Sedighimoghaddam. 2016. ‘Various Methods of Gold Nanoparticles (GNPs) Conjugation to Antibodies’. Sensing and Bio-Sensing Research 9: 17–22. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
- Jin, Rongchao, Guosheng Wu, Zhi Li, Chad A. Mirkin, and George C. Schatz. 2003. ‘What Controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?’. Journal of the American Chemical Society 125 (6): 1643–54. https://doi.org/10.1021/ja021096v.
- Turkevich, John, Stevenson Peter C, and James Hillier. 1941. ‘A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold’. Analytical Chemistry. Vol. 47.
- Jung, Cheulhee, Ji Won Chung, Un Ok Kim, Min Hwan Kim, and Hyun Gyu Park. 2011. ‘Real-Time Colorimetric Detection of Target DNA Using Isothermal Target and Signaling Probe Amplification and Gold Nanoparticle Cross-Linking Assay’. Biosensors and Bioelectronics 26 (5): 1953–58. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.088.
- Kagemasa S, Kuroda K, Nakai R, Li YY, Kubota K. 2022 ‘Diversity of *Candidatus* Patescibacteria in Activated Sludge Revealed by a Size-Fractionation Approach’. Microbes Environ 37:2. https:/doi: 10.1264/jsme2.ME22027.
- Kapoor, Vikram, Michael Elk, Xuan Li, Christopher A. Impellitteri, and Jorge W. Santo Domingo. 2016. ‘Effects of Cr(III) and Cr(VI) on Nitrification Inhibition as Determined by

SOUR, Function-Specific Gene Expression and 16S RRNA Sequence Analysis of Wastewater Nitrifying Enrichments'. Chemosphere 147: 361–67. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.119.

- Lu, Yonglong, Shuai Song, Ruoshi Wang, Zhaoyang Liu, Jing Meng, Andrew J. Sweetman, Alan Jenkins, et al. 2015. 'Impacts of Soil and Water Pollution on Food Safety and Health Risks in China'. Environment International 77: 5–15. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.010.
- Maza-Márquez, P., R. Vílchez-Vargas, N. Boon, J. González-López, M. V. Martínez-Toledo, and B. Rodelas. 2016a. 'The Ratio of Metabolically Active versus Total Mycolata Populations Triggers Foaming in a Membrane Bioreactor'. Water Research 92: 208–17. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.057.
- Mirkin, Chad A, Robert L Letsinger, Robert C Mucic, and James J Storhoff. 1996. 'A DNA-Based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials'. Nature 382 (15): 607–9.
- Miura, Yuki, Mirian Noriko Hiraiwa, Tsukasa Ito, Takanori Itonaga, Yoshimasa Watanabe, and Satoshi Okabe. 2007. 'Bacterial Community Structures in MBRs Treating Municipal Wastewater: Relationship between Community Stability and Reactor Performance'. Water Research 41 (3): 627–37. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.005.
- Nielsen, P.H., C. Kragelund, R.J. Seviour and J.L. Nielsen. 2009. 'Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge'. FEMS Microbiol. Rev. 33: 969–998.
- Park, So Jung, Anne A. Lazarides, James J. Storhoff, Lorenzo Pesce, and Chad A. Mirkin. 2004. 'The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization'. Journal of Physical Chemistry B 108 (33): 12375–80. https://doi.org/10.1021/jp040242b.
- Ramírez-Castillo, Flor Yazmín, Abraham Loera-Muro, Mario Jacques, Philippe Garneau, Francisco Javier Avelar-González, Josée Harel, and Alma Lilián Guerrero-Barrera. 2015. 'Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges'. Pathogens 4 307-334. https://doi:10.3390/pathogens4020307
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, et al. 2013 'Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter'. Nature 499: 431–437.
- Sanz, José L., and Thorsten Köchling. 2007. 'Molecular Biology Techniques Used in Wastewater Treatment: An Overview'. Process Biochemistry. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003.
- Sardar, Rajesh, Alison M. Funston, Paul Mulvaney, and Royce W. Murray. 2009. 'Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future'. Langmuir 25 (24): 13840–51. https://doi.org/10.1021/la9019475.
- Shawky, Sherif M., Ahmed M. Awad, Walaa Allam, Mohamed H. Alkordi, and Sherif F. EL-Khamisy. 2017. 'Gold Aggregating Gold: A Novel Nanoparticle Biosensor Approach for the

Direct Quantification of Hepatitis C Virus RNA in Clinical Samples'. Biosensors and Bioelectronics 92: 349–56. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.001.

- Shchegolkova, Nataliya M., George S. Krasnov, Anastasia A. Belova, Alexey A. Dmitriev, Sergey L. Kharitonov, Kseniya M. Klimina, Nataliya V. Melnikova, and Anna V. Kudryavtseva. 2016. 'Microbial Community Structure of Activated Sludge in Treatment Plants with Different Wastewater Compositions'. Frontiers in Microbiology 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090.
- Stephen J. Forsythe. 2011. The Microbiology of Safe Food. John Wiley & Sons.
- Storhoff, James J, Robert Elghanian, Robert C Mucic, Chad A Mirkin, and Robert L Letsinger. 1998. 'One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes'. Journal of the American Chemical Society, 1959–64. https://pubs.acs.org/sharingguidelines.
- Storhoff, James J., Anne A. Lazarides, Robert C. Mucic, Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, and George C. Schatz. 2000. 'What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?' Journal of the American Chemical Society 122 (19): 4640–50. https://doi.org/10.1021/ja993825l.
- Storhoff, James J., and Chad A. Mirkin. 1999. 'Programmed Materials Synthesis with DNA'. Chemical Reviews 99 (7): 1849–62. https://doi.org/10.1021/cr970071p.
- Su, Tao, Hiroyasu Satoh, Wataru Suda, Masahira Hattori, and Takashi Mino. 2019. 'Pyrosequencing Analysis of Bacterial Species Affected by Ethanol-Extract from Activated Sludge'. Journal of Water and Environment Technology 17 (1): 9–17. https://doi.org/10.2965/JWET.18-030.
- Thavanathan, Jeevan, Nay Ming Huang, and Kwai Lin Thong. 2015. 'Colorimetric Biosensing of Targeted Gene Sequence Using Dual Nanoparticle Platforms'. International Journal of Nanomedicine 10: 2711–22. https://doi.org/10.2147/IJN.S74753.
- Tian Shi, Hailu Fu, Liju Tan, and Jiangtao Wang. 2019. 'CdTe Quantum Dots Coated with a Molecularly Imprinted Polymer for Fluorometric Determination of Norfloxacin in Seawater'. Microchimica Acta 186 (362).
- Wang, Guoqing, Yoshitsugu Akiyama, Shota Shiraishi, Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda. 2017. 'Cross-Linking versus Non-Cross-Linking Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by DNA Hybridization: A Comparison of the Rapidity of Solution Color Change'. Bioconjugate Chemistry 28 (1): 270–77. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00410.
- Guidelines for Drinking-Water Quality, THIRD EDITION, incorporating the first and second addenda. Vol. 38.

- Xia, Y., X. Wen, B. Zhang and Y. Yang. 2018. ‘Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review’.. Biotechnol. Adv. 36: 1038–1047.
- Zhang, Xu, Mark R. Servos, and Juewen Liu. 2012. ‘Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a PH-Assisted and Surfactant-Free Route’. Journal of the American Chemical Society 134 (17): 7266–69. https://doi.org/10.1021/ja3014055.
- Zhao, Jiangqin, Shixing Tang, James Storhoff, Sudhakar Marla, Y. Paul Bao, Xue Wang, Eric Y. Wong, Viswanath Ragupathy, Zhiping Ye, and Indira K. Hewlett. 2010. ‘Multiplexed, Rapid Detection of H5N1 Using a PCR-Free Nanoparticle-Based Genomic Microarray Assay’. BMC Biotechnology. https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-74.
- Zong, Chenghua, Kelong Ai, Guo Zhang, Hongwei Li, and Lehui Lu. 2011. ‘Dual-Emission Fluorescent Silica Nanoparticle-Based Probe for Ultrasensitive Detection of $Cu2^{+}$’. Analytical Chemistry 83 (8): 3126–32. https://doi.org/10.1021/ac2001324.
- 国土交通省. 2020. ‘人口減少下における維持管理時代の下水道経営のあり方検討会　報告書’.
- 大石若菜, Zhu Yi fan, 丸尾知佳子, 斉藤繭子, 北島正章, 佐野大輔. 2021. ‘ウイルス感染症流行制御のための下水疫学調査のエッセンス’. 水環境学会誌 44 (5): 125–133.
- 黒田恭平，成廣隆，藤井直樹，中島芽梨，景政柊蘭，中井亮佑，佐藤久，久保田健吾，金田一智規. 2023. ‘Candidate phyla radiation (CPR)/*Candidatus* Patescibacteria の実態を廃水処理システムの視点から理解する’. 日本微生物生態学会誌 38 (1): 2-13.
- 日本下水道協会. 2012. 下水試験方法　上下巻　~2012 年版~.
- 日本水道協会. 2020. 上水試験方法　2020 年版.

第 2 章　金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法のメカニズムの検証

第 1 節　目的および概要

第 1 章 2-2　DNA 修飾金ナノ粒子（金ナノ粒子プローブ）を用いた核酸検出法で示した通り，作製した金ナノ粒子や金ナノ粒子プローブの品質の違いが分析結果に影響を与える可能性がある．本研究においても，自分たちで作製した金ナノ粒子プローブの品質を確認し，開発した分析法の反応メカニズムを検証することが必要である．先行研究においては，SEM または TEM 観察，動的光散乱光法による粒径分布の測定などによって，作製した金ナノ粒子の品質の確認を行っている(Nguyen, Kim, and Kim 2011; Storhoff et al. 2000)．本研究では，これらの品質チェックをクリアしている市販の金ナノ粒子を購入して使用するため，このステップは不要である．よって，自分たちでプローブ DNA を修飾した金ナノ粒子プローブを用いて，暗視野顕微鏡観察により粒子の分散状態の評価を行い，反応メカニズムの検証を行った．続いて，金ナノ粒子プローブと核酸の反応に影響を与える因子（粒子径，粒子とプローブ DNA 間のスペーサー長さなど），加熱ステップの導入について影響の程度を明らかにし，反応条件の最適化を行った．さらに，非検出対象の核酸の存在や，交雑部位の外側の塩基配列が分析に与える影響の検討等を行った．

第 2 節　実験方法

2-1　金ナノ粒子プローブの作製

金ナノ粒子プローブの作製は先行研究(J. Liu and Lu 2006; Zhang, Servos, and Liu 2012)を参考に行った．あらかじめ，ストック溶液として 100 mM 酢酸バッファー（pH 5.2）と 0.01 M HCl 溶液を作製した．100 mM 酢酸バッファー（pH 5.2）は，酢酸 0.107 mL と酢酸ナトリウム 0.677 g または酢酸ナトリウム三水和物 1.124 g を混合し，Milli-Q 水で 100 mL にメスアップした．撹拌後，pH が 5.2 であることを確認する．0.1M HCl 溶液は，濃塩酸（約 12 M）と Milli-Q 水を 1:119 の比率で混合し作製した．

使用するプローブ DNA は乾燥状態（ペレット）で届くため，ミニ遠心器でスピンダウン後，Nuclease-Free water を添加し十分にボルテックスした．Nuclease-Free water の添加量は付属の DNA データシートにしたがって算出した．溶解した 100 μM プローブ DNA 溶液から 10 μM プローブ DNA 溶液を作製し，小分けにして-20 ℃で冷凍保存した．

また，プローブ DNA にはチオール基が修飾されており，チオール基間におけるジスルフィド結合の形成を防止するために保護化されている．よって，還元剤を用いてこれを脱保護化することが必要である．本研究では還元剤として，トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン（TCEP）を用いて脱保護化を行った．TCEP 溶液は，水溶液の状態では不安定であるため金ナノ粒子プローブ作製時に用事調整した. 10 mM TCEP 溶液を TCEP 1～3 mg を測りとり，Milli-Q 水に溶解することで作製した．溶解に必要な Milli-Q 水の量は以下の式で算出した．

$$\frac{TCEP重量[mg]}{0.017199} \times 6 = Milli - Q水量[\mu L]$$

TCEP 溶液を作製後, 100 mM 酢酸バッファーと 10 mM TCEP 溶液を 9∶1 の割合で混合し, 脱保護化バッファーを作製した．脱保護バッファー27 μL に 10 μM プローブ DNA 溶液 3 μL を添加し，十分にボルテックス・スピンダウンした後，1 時間室温で静置した．その後，金ナノ粒子溶液 300 μL に 0.1 M HCl 溶液 3 μL と脱保護後のプローブ DNA 溶液 20 μL を添加し，ボルテックス・スピンダウンした後，15 時間以上室温で静置した．作製後の金ナノ粒子プローブは室温, 直射日光の当たらない場所で保管した．作製した金ナノ粒子プローブは, 最低 6 ヶ月程度は問題なく使用可能であった．

また第 2 章では，初めに人工合成した DNA ターゲットを使用して開発した核酸検出法の検出メカニズムを確認した後，環境サンプルから抽出した核酸サンプルについて分析を行った．第 2 章で使用したプローブ DNA と人工合成したターゲット DNA（Synthetic DNA; SD）の塩基配列を表 3 に示す．

表 3　第 2 章で使用したプローブ DNA と人工合成ターゲット DNA の塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Ref.
c341F	Universal bacterial 16S rRNA	CTG CWG CCN CCC GTA GG	17	(Herlemann et al. 2011)
T50-c341F		T_{50}- CTG CWG CCN CCC GTA GG	67	
805R		GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	21	
T50-805R		T_{50}-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	71	
cCTO189F A/B/C	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	CGA TCC CCT RCT TTY CTC C	19	(Hermansson and Lindgren 2001)
T25-cCTO189F A/B/C		T_{25}-CGA TCC CCT RCT TTY CTC C	34	
T50-cCTO189F A/B/C		T_{50}-CGA TCC CCT RCT TTY CTC C	59	
T75-cCTO189F A/B/C		T_{75}-CGA TCC CCT RCT TTY CTC C	94	
T100-cCTO189F A/B/C		T_{100}-CGA TCC CCT RCT TTY CTC C	119	
RT1R		GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	22	
T25-RT1R		T_{25}-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	47	
T50-RT1R		T_{50}-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	72	
T75-RT1R		T_{75}-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	97	
T100-RT1R		T_{100}-GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	122	
SD	c341F and 805R	GGA TTA GAT ACC CTF FTA GTC-T_{10}*)-CCT ACG GGA GGC AGC AG	48	(中島 et al. 2020)

*)T_n はチミンが n 個連なったものを表す.

2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量

DNA 抽出は NucleoSpin® Soil （MACHEREY-NAGEL Düren, Germany）を用いて行なった．プロトコル内 1 の Prepare sample で用いる Lysis buffer は，有機炭素を多く含むサンプルに適している SL2 と Enhancer SX を採用し，図 10 に示したプロトコルにしたがって DNA サンプルを抽出した．抽出後の DNA サンプルは-20 ℃で冷凍保存した．

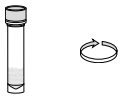
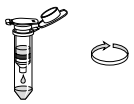
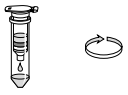
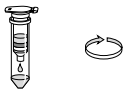
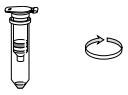
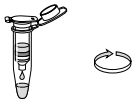
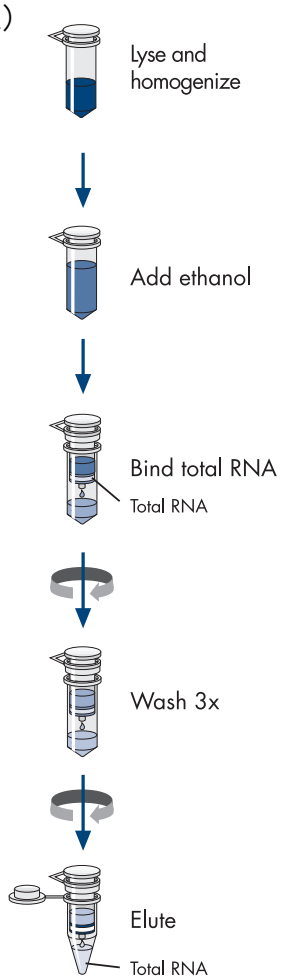
1	**Prepare sample**		MN Bead Tube Type A 250–500 mg sample material 700 µL SL1 **or** SL2
2	**Adjust lysis conditions**		150 µL Enhancer SX
3	**Sample lysis**		Horizontally vortex 5 min at RT or use other homogenizers according to manufacturers protocol
4	**Precipitate contaminants**		11,000 x *g*, 2 min 150 µL SL3 Vortex 5 s 0–4 °C, 5 min 11,000 x *g*, 1 min
5	**Filter lysate**		Load supernatant on NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (red ring) 11,000 x *g*, 1 min
6	**Adjust binding conditions**		250 µL SB Vortex 5 s
7	**Bind DNA**		Load 550 µL sample on NucleoSpin® Soil Column (green ring) 11,000 x *g*, 1 min Load remaining sample 11,000 x *g*, 1 min
8	**Wash silica membrane**		1st 500 µL SB 11,000 x *g*, 30 s 2nd 550 µL SW1 11,000 x *g*, 30 s 3rd 650 µL SW2 Vortex 2 s 11,000 x *g*, 30 s 4th 650 µL SW2 Vortex 2 s 11,000 x *g*, 30 s
9	**Dry silica membrane**		11,000 x *g*, 2 min
10	**Elute DNA**		30–100 µL SE RT, 1 min 11,000 x *g*, 30 s

図 10　NucleoSpin® Soil での DNA 抽出プロトコルの概要
（MACHEREY-NAGEL，NucleoSpin® Soil User manual より）

RNA 抽出は RNeasy® Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）または NucleoSpin® RNA（MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany）を用いて行なった．RNeasy® Mini Kit では，Lyse and homogenize にて酸処理したガラスビーズを用いたサンプルの機械的な破砕を行い，図 11A に示したプロトコルにしたがって RNA 抽出を行なった．抽出後の RNA サンプルは-20 ℃または-80 ℃で冷凍保存した．NucleoSpin® RNA では 1 の Homogenize sample にて MN Bead Tubes を用いたサンプルの機械的な破砕を行い，図 11B に示したプロトコルにしたがって RNA 抽出を行なった．抽出後の RNA サンプルは-20 ℃または-80 ℃で冷凍保存した．

（A）



（B）

1 **Homogenize sample**		30 mg
2 **Lyse cells**		350 µL RA1 3.5 µL ß-mercaptoethanol Mix
3 **Filtrate lysate**		11,000 x *g*, 1 min
4 **Adjust RNA binding conditions**		350 µL 70 % ethanol Mix
5 **Bind RNA**		Load sample 11,000 x *g*, 30 s
6 **Desalt silica membrane**		350 µL MDB 11,000 x *g*, 1 min
7 **Digest DNA**		95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
8 **Wash and dry silica membrane**	1st wash 2nd wash 3rd wash 1st and 2nd 3rd	200 µL RAW2 600 µL RA3 250 µL RA3 11,000 x *g*, 30 s 11,000 x *g*, 2 min
9 **Elute highly pure RNA**		60 µL RNase-free H_2O 11,000 x *g*, 1 min

図 11（A）RNeasy® Mini kit での RNA 抽出プロトコルの概要（QIAGEN，RNeasy® Mini Handbook Fourth Edition より），（B）NucleoSpin® Soil での DNA 抽出プロトコルの概要（MACHEREY-NAGEL，NucleoSpin® Soil User manual より）

RNA サンプルについては逆転写により cDNA を合成したのち，定量 PCR 法により濃度を定量した．DNA 分解は RQ1 RNase-Free DNase（Promega, WI, USA）を用いて行なった．逆転写による cDNA サンプルの合成は PrimeScript™ RT reagent kit（Perfect Real Time）（Takara Bio inc., Shiga, Japan）を用いて行なった．合成後の cDNA サンプルは，続けて定量 PCR 法を行う場合は 4℃で一時保存し，別日に行う場合は使用するまで-20 ℃で冷凍保存した．

定量 PCR 法は二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：TB Green）を PCR 反応系に加え，蛍光強度から PCR 反応によって増幅された増幅産物の濃度を定量するインターカレーター法を採用した（図 12）．定量 PCR の反応液は，TB Green® *Premix EX Taq™* II（TIi RNaseH Plus)（Takara Bio Inc., Shiga, Japan），または 300 bp を超える増幅サイズの検出対象の核酸の場合は MightyAmp™ for Real Time（TB Green® Plus）（Takara Bio Inc., Shiga, Japan）を用いて調整し，Applied Biosystems StepOne™ Rel-time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて定量を行った．検量線作製用のスタンダードとして，各検出対象の核酸の配列をアンピシリン耐性プラスミドベクターpEX-A2J2（2659 bp; Eurofins Genomics KK, Kyoto, Japan）に挿入したプラスミド DNA を段階希釈して用いた．

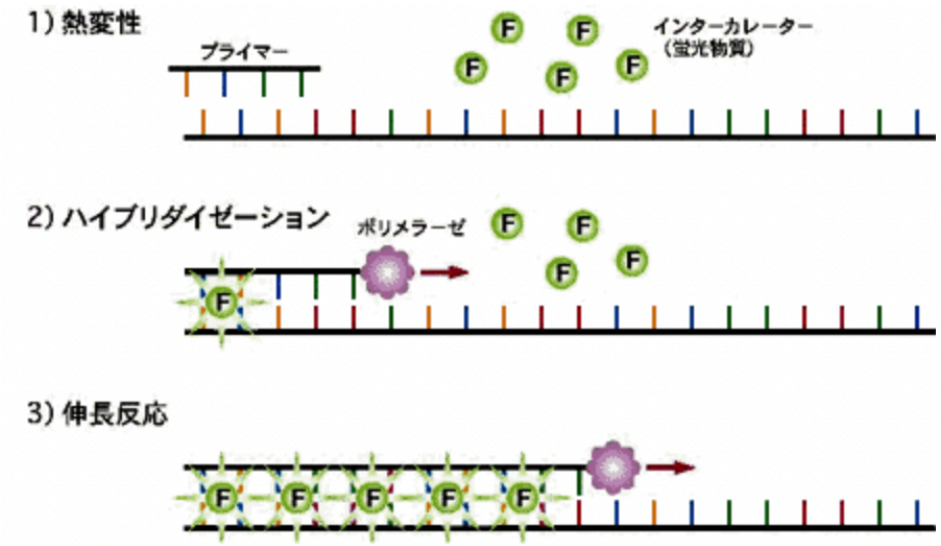


図 12　インターカレーター法の概要（タカラバイオ　リアルタイム PCR の原理より）

第 2 章で使用した PCR プライマーの塩基配列を表 4 に示す．第 2 章では，全細菌の 16S rRNA とアンモニア酸化細菌（Ammonia-oxidizing bacteria; AOB）の 16S rRNA を検出対象として分析を行った．抽出した RNA サンプルは逆転写により cDNA 合成を行った後，以下の条件で定量 PCR による検出対象の定量を行った．全細菌の 16S rRNA の定量：95℃ 2 分，95℃ 5 秒＋56℃ 30 秒＋68℃ 30 秒を 40 サイクル(Herlemann et al. 2011)，アンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量：98℃ 2 分, 98℃ 5 秒＋57℃ 30 秒＋68℃ 30 秒を 40 サイクル(Hermansson

and Lindgren 2001). 検出対象の核酸の濃度は，逆転写処理による希釈の影響を考慮して再計算した.

表 4　第 2 章で使用した PCR プライマーの塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Ref.
341F	Universal bacterial 16S rRNA	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17	(Herlemann et al. 2011)
805R		GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	21	
8F	Universal bacterial 16S rRNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	(Herlemann et al. 2011)
1492R		ACC TTG TTA CGA CTT	15	
CTO189F A/B	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	19	(Hermansson and Lindgren 2001)
CTO189F C		GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	19	
RT1R		CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	22	

2-3　分析方法

吸光光度法は, 試料中の目的成分を適当な試薬で光吸収物質に変え, 特定波長 λ における吸光度 A_λ を測定し, 目的成分を定量する方法である．微量分析に用いられ, 定量範囲は一般に 0.1 から 10 ppm 程度である．また, 測定機器が比較的安価であり, 操作が簡易, かつ短時間で定量できるといった利点がある. 一般的に強さ I_o の一定波長の光 (単色光) がモル濃度 c , 長さ l の溶液を通過した後, 光の強さが I となったとき, 以下の式で表されるランバート・ベールの法則が成立することが知られている.

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \quad (1)$$

式 (1) は両辺の対数をとって式を整理することにより, 以下のように表現される.

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon c l \quad (2)$$

ここで, ε は吸光係数と呼ばれる定数であり，とくに $c = 1$ (M), $l = 1$ (cm) であるときモル吸光係数と呼ぶ. 式 (2) は, 吸光度 A が光吸収物質のモル濃度 c に比例することを示しており, その吸光度の値から目的成分を定量することが広く行われている.

本研究で開発した分析法においては，検出対象の核酸濃度が低いほどピーク波長が長波長側へシフトする．分散状態の金ナノ粒子プローブのピーク波長（全細菌の 16S rRNA の場合は 522 nm）と凝集状態の金ナノ粒子プローブのピーク波長（ピークが見られない場合は分散状態+100 nm 付近，全細菌の場合は 620 nm）の吸光度の比（全細菌の場合は A_{620}/A_{522}）を算出する．あらかじめ作成した検量線（RT-qPCR 法での濃度と吸光度比の相関式）から，本法での濃度を算出した.

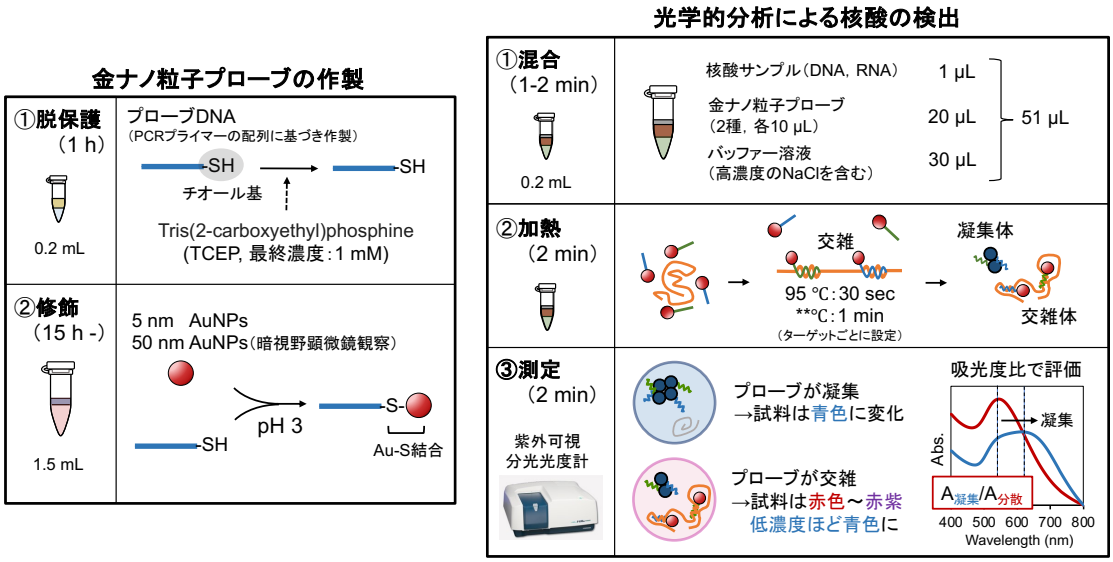


図 13　比色法の原理と分析の流れ（Nakajima et al., 2021）

第 3 節　暗視野顕微鏡観察による反応メカニズムの検証

3-1　本実験の目的

金ナノ粒子の分散状態の評価方法の一つとして顕微鏡観察が挙げられる．特に，金ナノ粒子の形状や粒径の確認には透過型電子顕微鏡観察（SEM）や走査型電子顕微鏡観察（TEM）が広く用いられている．しかし，これらの観察方法では観察する試料を真空状態で乾燥させる必要がある．乾燥操作によって金ナノ粒子の凝集状態が変化すると考えられるため，溶液中の粒子の挙動を観察する場合には，SEM や TEM による観察は適していない可能性がある．そこで本実験では，試料を乾燥させずに観察を行うことができる暗視野顕微鏡を用いて，様々な凝集状態の金ナノ粒子と金ナノ粒子プローブ，検出対象の核酸を含む試料中の金ナノ粒子プローブの分散状態の観察を行った．

3-2　暗視野顕微鏡観察の概要

暗視野顕微鏡観察とは，照射光が対物レンズに入射しない条件で試料への照射を行うことで，試料が散乱した光のみによる像を得る観察法のことである．暗視野顕微鏡観察は，観察対象に合わせた様々な顕微鏡（e.g. 光学顕微鏡，実体顕微鏡，正立・倒立顕微鏡）に，暗視野観察用のコンデンサー（照射光の集光状態を調節する機能を持つ）を組み合わせることで行うことができる．暗視野コンデンサーを調整し，照射光の開口数（N/A）が顕微鏡の対物レンズの開口数よりも大きくなるようにすることで，暗視野観察が可能となる（図 14）(R. Zsigmondy 1966; M. Hu et al. 2008).

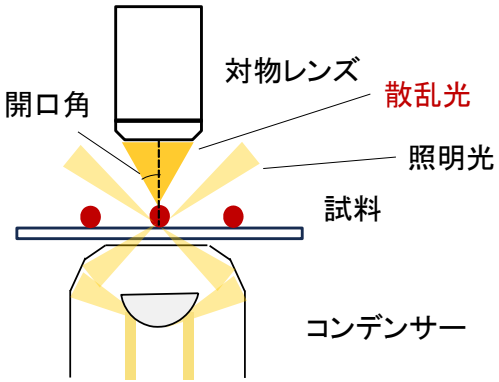


図 14　暗視野顕微鏡観察における顕微鏡とコンデンサーの概略図（廣井，2024 年度修士論文より引用）

3-3　実験方法

試料の作製には 5 nm または 50 nm の金ナノ粒子溶液（Gold nanoparticles 5 nm / 50 nm diameter, OD 1，stabilized suspension in citrate buffer, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を使用した．また，粒子の分散状態をコントロールするための凝集剤として NaCl 溶液を使用した．スライ

ドガラス及びカバーガラスは，洗剤溶解液に浸して 20 分間超音波洗浄したのち，アセトン溶液に浸して 20 分超音波洗浄し，5M 水酸化カリウム溶液を用いてオーバーナイトで浸漬処理を行ったものを使用した．

はじめに，金ナノ粒子溶液の分散状態を評価するために，5 nm または 50 nm 金ナノ粒子溶液に NaCl 溶液を添加した試料（凝集サンプル）と金ナノ粒子溶液に Milli-Q 水を添加した試料（非凝集サンプル）を作製し，サーマルサイクラーを用いて 95℃で 30 秒，59℃で 1 分加熱した．また，50 nm 金ナノ粒子に検出対象の DNA と交雑しないプローブ DNA を修飾したミスマッチプローブを作製し，交雑時との分散状態の違いを確認した．50nm 金ナノ粒子プローブに検出対象の DNA と NaCl 溶液を添加した試料（POS サンプル），ミスマッチプローブに検出対象の DNA と NaCl 溶液を添加した試料（NEG サンプル）を作製し，前述の条件で加熱した．加熱終了後，試料を室温で静置した．続いて，スライドガラス上に試料を 10μL 滴下し，カバーガラスをかけ乾燥を防ぐためにマニキュアで固定・保護した．顕微鏡観察では N/A を 0.6 に設定し，倍率 40 倍の対物レンズを用いた．対物レンズにスマートフォンを取り付け，試料の観察結果を 4032×3024 pixels の画像として取得した．計算上，取得した画像における 1 pixel は約 100 μm であった．

3-4　5 nm 金ナノ粒子または 50 nm 金ナノ粒子の観察

5 nm 金ナノ粒子を用いて作製した凝集サンプルまたは非凝集サンプルの観察結果を図 15 に示す．左が塩添加前，右が塩添加後である．本研究の観察条件において，5 nm 金ナノ粒子の濃度から算出した一視野上の金ナノ粒子数は約 10 万個ほどである．また，画像の総画素数が約 1200 万 pixel であることから，金ナノ粒子は画像の 100 pixel，つまり約 100 nm に 1 つの割合で存在すると考えられる．非凝集サンプルでは数個の粒子の散乱光しか観察されなかった（図 15A），が，凝集サンプルでは粒子数が増加した（図 15B）．これは，一粒子から発生する散乱光の弱さや顕微鏡の分解能の問題から，非凝集サンプルでは散乱光がほとんど観察できなかったと考えられる．凝集サンプルにおいては，金ナノ粒子が複数の粒子からなる凝集体となることで，散乱光強度が増大したため，観察できたと考えられる．

50 nm 金ナノ粒子を用いて作製した凝集サンプルまたは非凝集サンプルの観察結果を図 16 に示す．左が塩添加前，右が塩添加後である．本研究の観察条件において，50 nm 金ナノ粒子の濃度から算出した一視野上の金ナノ粒子数は約 1000 個ほどである．また，画像の総画素数が約 1200 万 pixel であることから，金ナノ粒子は画像の 1 pixel，つまり約 1 nm に 1 つの割合で存在すると考えられる．非凝集サンプル（図 16A），凝集サンプル（図 16B）ともに散乱光が観察された．しかし，凝集サンプルは非凝集サンプルに比べて粒子数が減少し，粒子が大きくなっているような様子が観察された．よって，凝集剤の添加によって金ナノ粒子の分散状態が変化することが顕微鏡観察によっても確認できた．

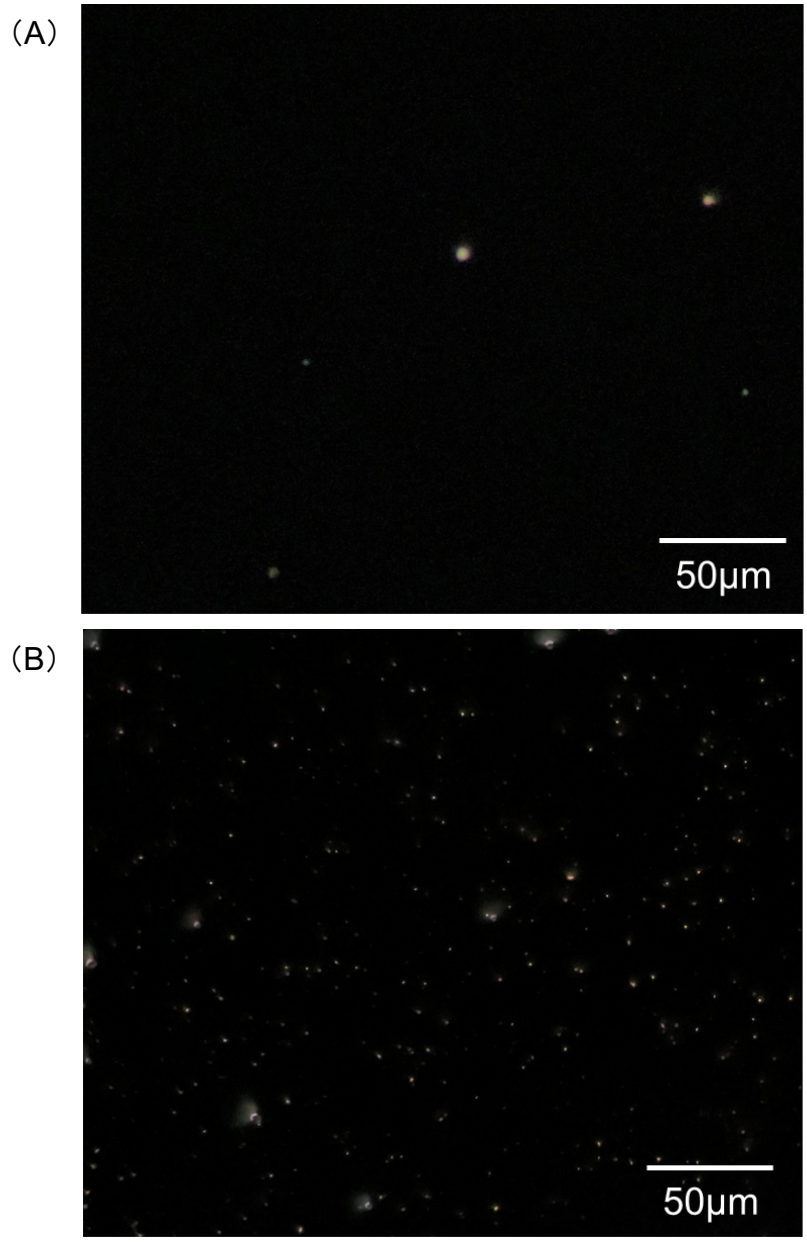
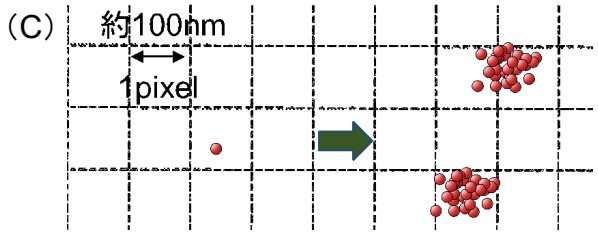


図 15　5 nm 金ナノ粒子の暗視野観察像，(A)非凝集サンプル，(B)凝集サンプル



(C) 非凝集/凝集サンプルにおける 5 nm 金ナノ粒子の分散状態の概略

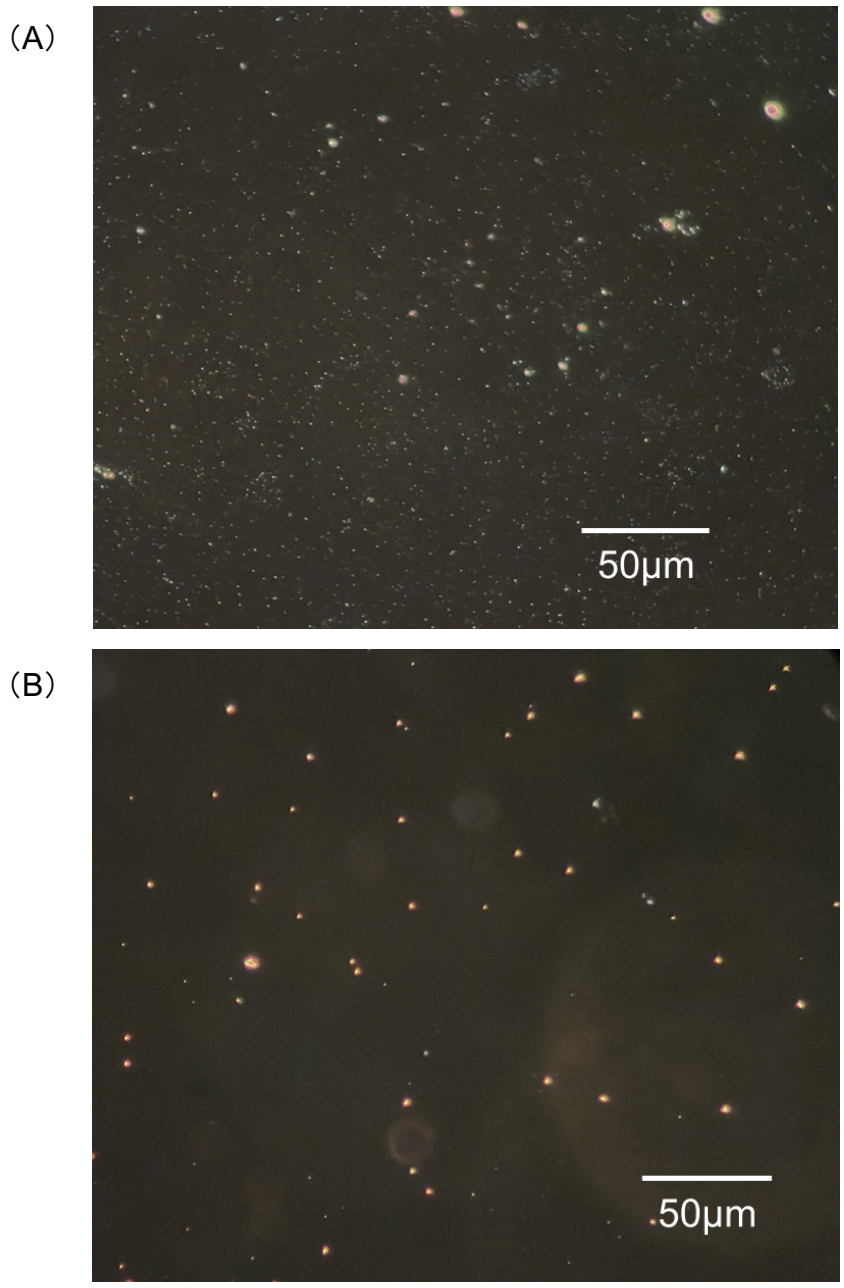
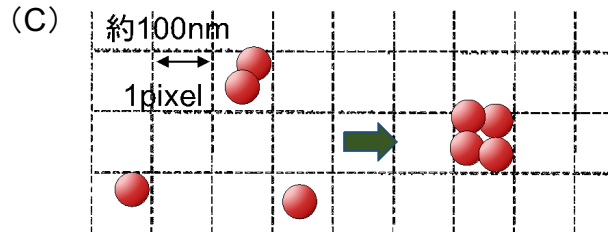


図 16　50 nm 金ナノ粒子の暗視野観察像，(A)非凝集サンプル，(B)凝集サンプル



(C) 非凝集/凝集サンプルにおける 50 nm 金ナノ粒子の分散状態の概略

3-5　50 nm 金ナノ粒子プローブの観察

50 nm 金ナノ粒子プローブの観察結果を図 17 に示す．複数の散乱光からなる集合体が多数存在しており，また集合体内に境目があることが観察された．金ナノ粒子プローブを作製する過程で凝集剤となりうる試薬等を用いて処理を行っていることから，金ナノ粒子自体の分散状態は不安定で凝集しやすい状態になっている．しかし，粒子表面に修飾されたプローブ DNA が粒子の近接を阻害しているため，集合体内に境目が形成されていると考えられる．

（A）

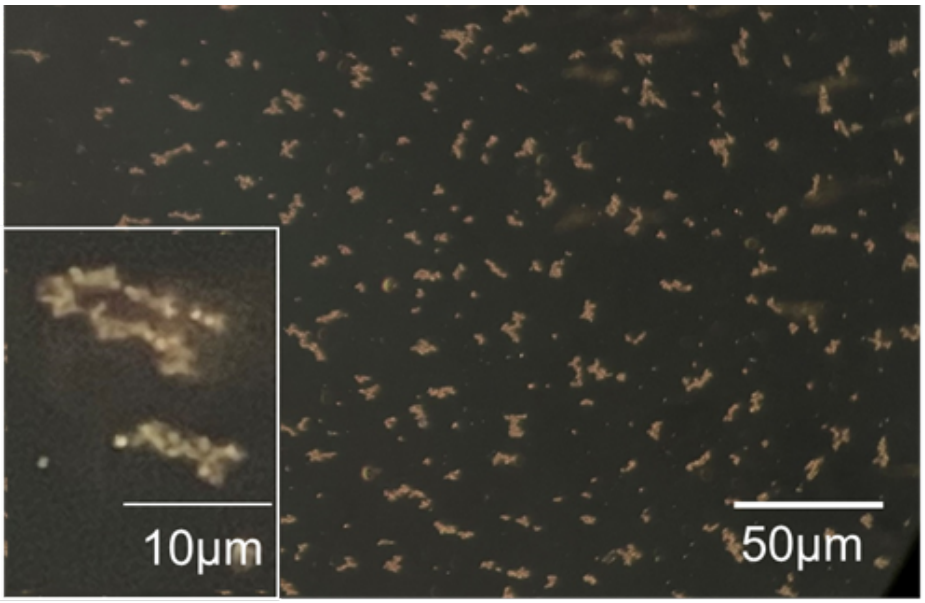
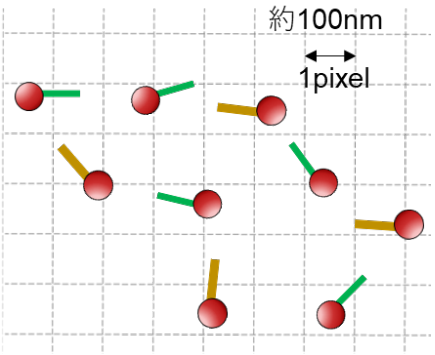


図 17　(A) 50 nm 金ナノ粒子プローブの暗視野観察像

（B）



（B）50nm 金ナノ粒子プローブの分散状態の概略

3-6　50 nm 金ナノ粒子プローブを用いて作製した試料の観察

50 nm 金ナノ粒子プローブを用いて作製した NEG サンプルと POS サンプルの観察結果を図 18 に示す. NEG サンプルでは集合体は観察できず, 散乱光の数は少なかった（図 18A）. この理由として, 金ナノ粒子プローブが凝集剤によって凝集しており, 散乱光中の粒子数が多くなったことが考えられる（図 18C）. POS サンプルでは散乱光の数が NEG サンプルよりも多かった（図 18B）. これは, 金ナノ粒子プローブと検出対象の DNA が交雑し, 凝集が阻害されたためであると考えられる（図 18C）. また, 観察された散乱光の数は, 50 nm 金ナノ粒子プローブの観察結果よりも少なかったため, 凝集剤の添加によってさらに金ナノ粒子プローブが近接し, 粒子数が減少したと考えられる.

以上より, 「ハイブリダイズ体が分散を保つ」という本研究の検出原理が正しいことが確認できた.

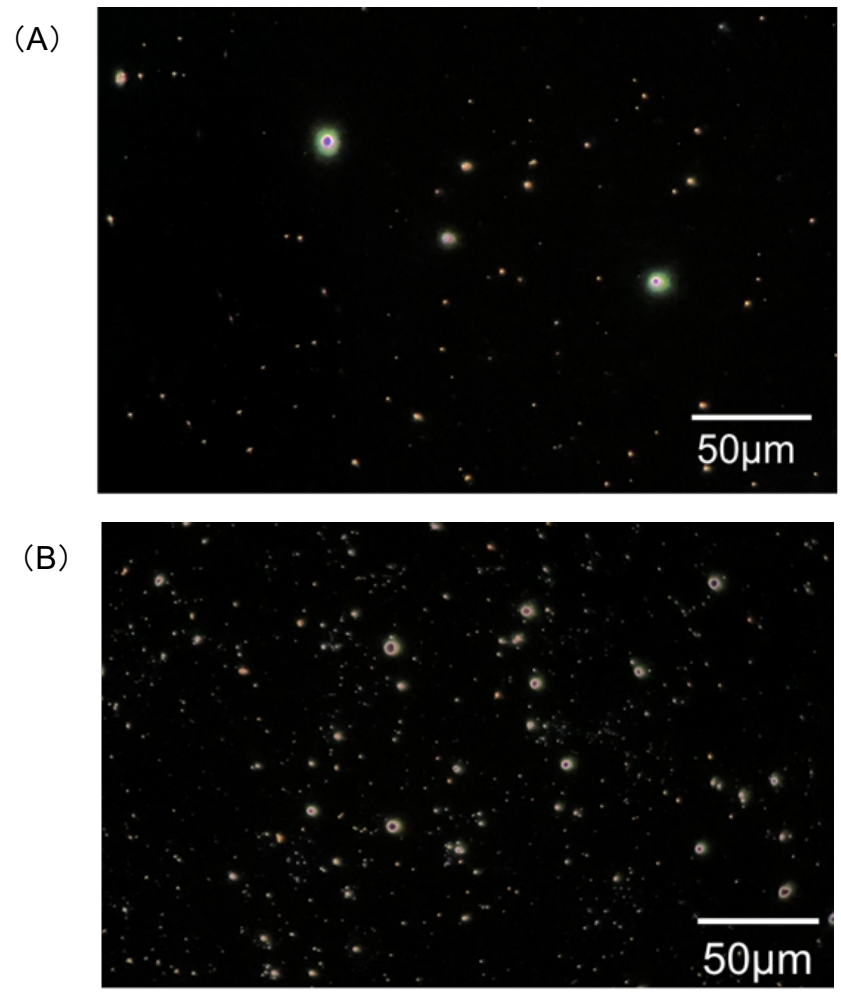
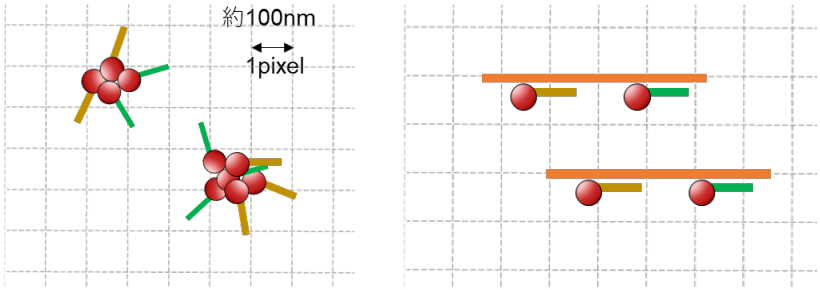


図 18　50 nm 金ナノ粒子プローブを用いて作製した試料の暗視野観察像
(A)POS サンプル, (B)NEG サンプル

（C）



（C）　POS/NEG サンプルにおける粒子の分散状態の概略

第 4 節　加熱ステップを行わない比色法の実験結果および考察

4-1　金ナノ粒子径が測定に与える影響

金ナノ粒子の直径が大きい場合は，金ナノ粒子がプローブ DNA と検出対象の核酸の交雑を阻害する，また小さい場合は容易に凝集し，測定結果に影響を与える可能性が示された（データは記載せず）．POS および NEG の吸光スペクトルを，NaCl 添加直後と 30 分後に測定した（図 19A）．金ナノ粒子プローブと交雑する人工合成 DNA（POS）とこれを含まない試料（NEG）の吸光スペクトルは，NaCl を含むバッファー溶液を添加直後に 528 nm, 537 nm に最大ピークを示した．NaCl を含むバッファーを添加してから 30 分後には，どちらもピークの吸光度は減少したが，NEG ではピークの長波長側へのシフトと吸光度の低下がより顕著であった. NaCl を含むバッファー溶液の添加直後と 30 分後の試料の吸光度比を計算すると，POS は 0.34，0.35，NEG は 0.49，0.56 となった（表 5 参照）．また，NEG のみ試料の色が赤色から暗紫色へ変化し，NEG のピークが長波長側へシフトしていることが見た目の色にも表れていた（図 19B）．

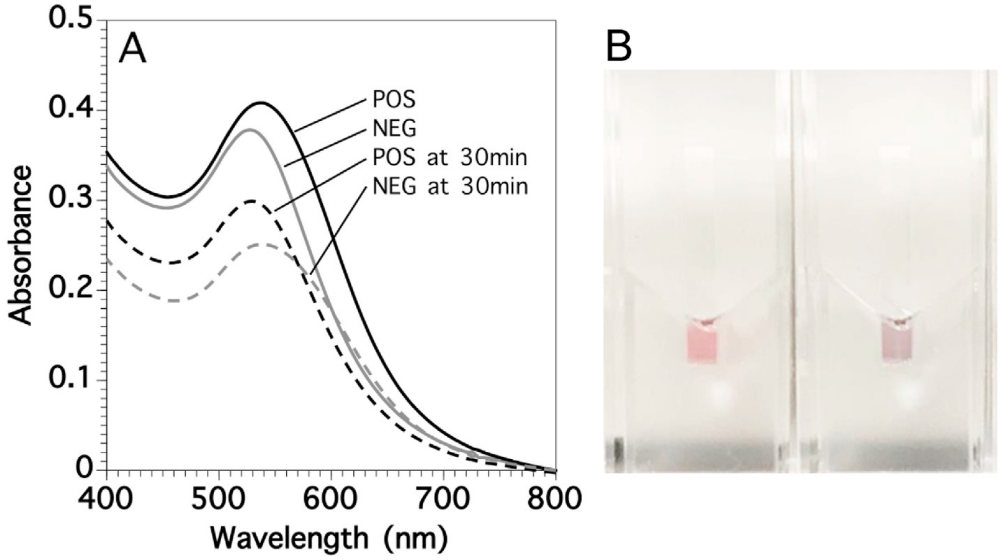


図 19（A）NaCl を含むバッファー溶液の添加直後と添加 30 分後の POS と NEG の吸光スペクトル
（B）POS と NEG の試料の色の違い，左：POS，右：NEG

HS-c341F と HS-805R を用いて作製した直径 5 nm と 30 nm の金ナノ粒子プローブ（それぞれ 5 nm c341F，5 nm 805R，30 nm c341F，30 nm 805R）を用いて，3 種類の試料（POS，NEG，T48）を作製した．各サンプルの，NaCl を含むバッファー溶液の添加直後と 30 分後の吸光度比と添加 30 分後の差を算出した（表 5）．直径 5 nm の金ナノ粒子プローブを用いた場合，0 時間後の吸光度比は，金ナノ粒子プローブの組み合わせによらず，ほぼ同じ値（0.34

～0.36）であった．c341F と 805R の直径 5 nm の金ナノ粒子プローブを個別に使用した場合，30 分間の差はそれぞれ 0.01 と 0.02 と極めて小さいが，c341F と 805R を混合した場合はかなりの差（0.06）となった．NEG では，金ナノ粒子プローブの組み合わせによらず添加 30 分間後の差は POS よりも大きかった．T48（チミンが 48 塩基連なったもの，金ナノ粒子プローブとはハイブリダイズしない）では NEG サンプルと同様の傾向を示した．一方，30 nm の金ナノ粒子プローブを用いた場合，POS の添加 30 分間後の差は NEG や T48 と同程度であった．

以上より，c341F と 805R を単独で使用しても凝集を防ぐことができ，人工合成 DNA の交雑部位は DNA の検出結果にほとんど影響しないことが示唆された．今回の結果は，先行研究(Chan et al. 2014)で得られた結果とは逆であった．しかし，2 つの金ナノ粒子プローブを混合し使用することで，POS では凝集が起こり測定不可能となった．これは，c341F と 805R が単一の人工合成 DNA 上で非常に近接しているためであると考えられる．2 つのヌクレオチドの平均距離を 0.34 nm と仮定すると，c341F，805R，人工合成 DNA の長さはそれぞれ 5.8 nm，7.1 nm，16.3 nm である．したがって，単一の人工合成 DNA 上の 2 つの金ナノ粒子プローブの中心間の距離は 10.5 nm 未満である．金ナノ粒子の二量体の形成は，試料の色調変化を引き起こす(J. Li et al. 2017)．3 直径 30 nm の金ナノ粒子プローブの POS も凝集したため，3 つの測定条件すべてにおいて POS と NEG の吸光度比にはほとんど差がなかった．

表 5　NaCl を含むバッファー溶液の添加直後と 30 分後の試料の吸光度比

Samples	Size of Au-nanoprobes and measurement conditions					
	5 nm c341F	5 nm 805R	5 nm Dual	30 nm c341F	30 nm 805R	30 nm Dual
POS						
0 min	0.34	0.36	0.35	0.19	0.18	0.43
30 min	0.35	0.38	0.42	0.24	0.24	0.73
Difference	**0.01**	**0.02**	**0.06**	**0.06**	**0.06**	**0.31**
NEG						
0 min	0.49	0.49	0.44	0.20	0.20	0.43
30 min	0.56	0.55	0.58	0.26	0.26	0.70
Difference	**0.07**	**0.07**	**0.14**	**0.06**	**0.05**	**0.27**
T48						
0 min	0.49	0.50	0.41	0.20	0.20	0.44
30 min	0.56	0.57	0.58	0.25	0.25	0.64
Difference	**0.07**	**0.08**	**0.17**	**0.05**	**0.05**	**0.21**

直径 30 nm の金ナノ粒子プローブを使用することは，いくつかの理由から人工合成 DNA のアッセイに適用できなかった．一つ目は，金ナノ粒子の直径が大きい場合，金ナノ粒子がプローブ DNA と人工合成 DNA との交雑を妨害しうることである．すでに述べたように，c341F と 805R の長さはそれぞれ 5.8 nm と 7.1 nm であり，直径 30 nm の金ナノ粒子よりはるかに小さいが，直径 5 nm の金ナノ粒子と比べれば小さいとは言えない．二つ目は，一般

的に直径の大きい金ナノ粒子は小さい金ナノ粒子に比べて NaCl 添加により凝集しやすいためである．よって，以降は直径 5 nm の金ナノ粒子を使用することとした．

4-2　プローブ DNA の密度が測定に与える影響

金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法において, 金ナノ粒子プローブ上のプローブ DNA と検出対象の核酸の交雑, および金ナノ粒子プローブの NaCl による凝集に対する安定性が, 測定結果に強い影響を与えることが報告されている(Jin et al. 2003)．一方で，プローブ DNA の密度が高すぎると，交雑効率が低下し，反応速度が遅くなる(Peterson, Heaton, and Georgiadis 2001)．また，ハイブリダイズしなかったフリーの金ナノ粒子プローブが凝集しにくくなるなどの不利な点がある．そこで，プローブ DNA の密度が測定に与える影響について検討した. 金ナノ粒子プローブの作製時に添加するプローブ DNA の濃度を 1 μM から 100 μM まで変化させることにより，金ナノ粒子表面のプローブ DNA の平均表面密度をコントロールした．添加するプローブ DNA の濃度が 1 μM の場合，NaCl を含むバッファー溶液添加前の人工合成 DNA を含むサンプル（POS）のピークの吸光度は 0.42，吸光度比は 0.35 となった（図 19）．NaCl を含むバッファー溶液の添加により，吸光度比は POS で 0.41，NEG で 0.49 に増加した．また，POS と NEG の吸光度比の差は 0.08 であった．添加するプローブ DNA の濃度が 10 μM の場合，NaCl 添加前の吸光度比は 0.35，POS は 0.42，NEG は 0.58 であった．したがって，POS と NEG の差は 0.16 であり，プローブ DNA 濃度 1 μM で作製した金ナノ粒子プローブよりも差が大きくなった．一方，プローブ DNA の濃度を 50 μM, 100 μM とさらに増加させると，その差はそれぞれ 0.08，0.005 に減少した．NEG の約 520 nm の吸光ピークは，プローブ DNA 濃度の上昇に伴い，増加した．

プローブ DNA の濃度を 1 μM から 10 μM へと変化させると，POS のピークの吸光度が増加する（すなわち凝集が少なくなる）ため（図 20A および 20B），プローブ DNA の密度が増加し，さらに多くの人工合成 DNA とハイブリダイズすることで金ナノ粒子プローブの凝集が阻害されたと考えられる．POS のピークの吸光度はプローブ DNA の濃度が 10 μM を超えても増加しなかった．これはおそらく，金ナノ粒子プローブ上のプローブ DNA の密度が飽和したのではなく，金ナノ粒子プローブ表面でハイブリダイズ可能な人工合成 DNA の存在量が減少したためである．一方，金ナノ粒子プローブ作製時のプローブ DNA 濃度をさらに上げると，NEG のピークの吸光度が増加した（図 20B および 20D）．これは，金ナノ粒子プローブ上のプローブ DNA の密度が高いため，NEG でも金ナノ粒子プローブの凝集が起こりにくくなったためと考えられる．また，POS と NEG のピークの差が小さいことから，100 μM のプローブ DNA を用いた場合，プローブ DNA の密度がほぼ飽和していることが示唆された．この場合のプローブ DNA のコピー数と金ナノ粒子数の比は 7.3 であった．直径 5 nm の金ナノ粒子の表面積（79 nm^2）と上記の比率から，プローブ DNA をすべて金ナノ粒子表面に固定することができた場合，プローブ DNA の密度は 9.3×10^{11} copies/cm^2 である. この値は, 直径 20 nm の金ナノ粒子に固定した 32 mer のプローブ DNA の密度(9.5×10^{11}

copies/cm^2）(Shawky et al. 2017)と同等，または直径 13 nm の金ナノ粒子に固定した 25 mer のプローブ DNA の密度（3.4×10^{13}copies/cm^2）(Zu et al. 2011)よりも低い値であった．本研究で使用した金ナノ粒子は 5 nm であり，これらよりも小さいことを考慮すると，本研究で金ナノ粒子に固定されたプローブ DNA の量は飽和していたと考えられる. 図 20 に示すように，本法の感度はプローブ DNA の濃度が 10 μM で最も差が大きくなった．したがって，本法のプローブ DNA の最適濃度は 10 μM である．また，この場合のプローブ DNA のコピー数と金ナノ粒子数の比率は 0.73 である．

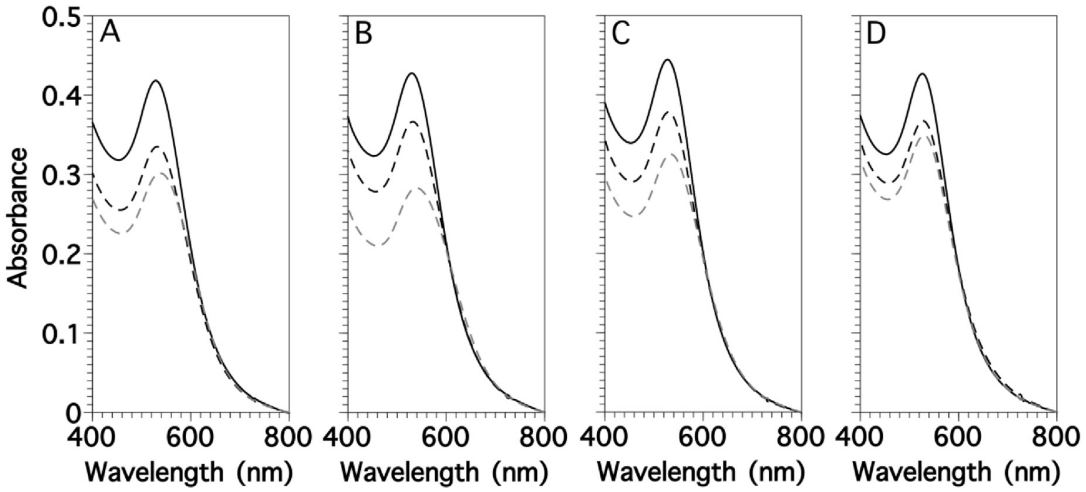


図 20　NaCl を含むバッファー溶液添加前の POS（実線），添加後の POS（黒破線），添加後の NEG（灰破線）の吸光スペクトル
プローブ DNA の濃度は（A）1 μM,　（B）10 μM,　（C）50 μM,　（D）100 μM

4-3　試料溶液の反応時間が測定に与える影響

図 21 は，NaCl 添加後の POS および NEG の吸光度比の時間経過を示したものである．NaCl 添加 1 分後，NEG の吸光度比の増加は 0.42 と急激であったが，POS の吸光度比の増加は 0.31 とわずかであった．その後，POS，NEG どちらも吸光度比は時間とともにわずかに増加し，約 25 分で安定した．したがって，最適な測定時間は NaCl を含むバッファーの添加から 30 分後とした．しかし，先行研究にはラベルフリーの DNA と非修飾の金ナノ粒子からなる測定によって PCR 増幅されたゲノム DNA の濃度を 10 分未満で測定した例が存在する(H. Li and Rothberg 2004)．一本鎖プローブ DNA，非修飾の金ナノ粒子，および正電荷の水溶性共役高分子電解質を用いた方法では，測定時間 10 分未満を達成した(Xia et al. 2010)．また，試料の加熱は測定時間の短縮に有効であることが報告されている(Shawky et al. 2017)．よって，本法の測定時間はさらなる短縮の余地があると考えられる．

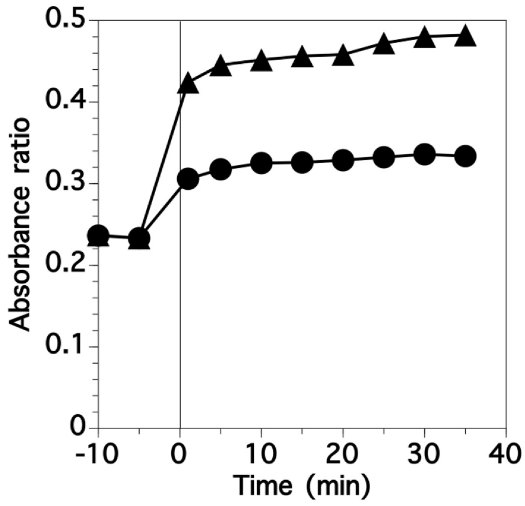


図 21　試料溶液の反応時間が測定に与える影響 ，NaCl 添加後の POS（●）および NEG（▲）の吸光度比の時間変化

4-4　人工合成 DNA を用いた反応メカニズムの検証

反応メカニズムを確認するため，全細菌の 16S rRNA の代わりに人工合成 DNA を用いて測定を行った．図 22A に，金ナノ粒子プローブ溶液（図中 Probe），人工合成 DNA を含む試料（図中 POS），人工合成 DNA を含まない試料（図中 NEG）の NaCl を含むバッファー添加 1 分後の吸光スペクトルをそれぞれ示す．金ナノ粒子プローブ溶液の吸光スペクトルの最大ピークから，金ナノ粒子プローブの状態を知ることができる．Probe の吸光スペクトルはプローブ DNA を固定していない 5 nm 金ナノ粒子溶液とほぼ同じであり（データ記載せず），金ナノ粒子への c341F の固定は，吸光スペクトルに影響を及ぼさないことが示された．Probe の吸光スペクトルの最大ピーク波長は 522 nm であった．POS ではピークの吸光度はわずかに減少したが，ピーク波長のシフトは見られなかった．POS および NEG サンプルに NaCl 溶液を添加すると，どちらも 1 分後に希釈および Na イオンによる金ナノ粒子プローブの凝集のため，ピークの吸光度が減少した．しかし，534 nm へのピークシフトを伴う吸光ピーク強度の低下と吸光スペクトルのブロードさは，527 nm にピークシフトした POS よりも NEG の方が顕著であった．その後，POS および NEG の吸光スペクトルを 5 分ごとに観察したところ，どちらも 522 nm のピークの吸光度が時間とともに減少し，約 25 分後にはこの値が安定した（図 22B）．吸光スペクトルの時間経過解析に基づき，522 nm と 620 nm の吸光度の比（A_{620}/A_{522}）を算出したところ，522 nm の吸光度が 620 nm の吸光度を上回り，522 nm の吸光度が 620 nm の吸光度を上回った．

以上より，POS では金ナノ粒子プローブに結合したプローブ DNA が人工合成 DNA とハイブリダイズし，人工合成 DNA は金ナノ粒子プローブを塩による凝集から保護することができた．このような保護は，おそらく人工合成 DNA が持つリン酸基の負の電荷による静電的反発力の増大によるものであると考えられる．一方，NEG では金ナノ粒子プローブは凝集から保護されなかった．したがって，金ナノ粒子プローブとハイブリダイズした検出対象の核酸は，NaCl などの塩による金ナノ粒子プローブの凝集を妨げるという，本法のメカニズムを検証する結果となった．

操作パラメーターを最適化した後，最適化されたアッセイ条件下で検量線を作成した．検出対象の核酸として 人工合成 DNA を連続希釈した金ナノプローブの吸光スペクトルを，NaCl 添加後 30 分で分析した (図 23A)．10 mM の人工合成 DNA を添加したサンプルの吸光スペクトルは，531 nm にピークを示した．人工合成 DNA 濃度が低下すると，約 520 nm のピークが減少してピーク波長が長波長側へシフトし，570 nm より長波長側で吸光度が増加した．吸光スペクトルから吸光度比を算出し，人工合成 DNA 濃度に対してプロットし，検量線を作製した（図 23B）．人工合成 DNA 濃度が 0.005 mM 以下のとき，吸光度比は比較的高く，約 0.45 で一定であった．人工合成 DNA 濃度が 0.005 mM から 10 mM に増加するにつれて，吸光度比は徐々に減少した．

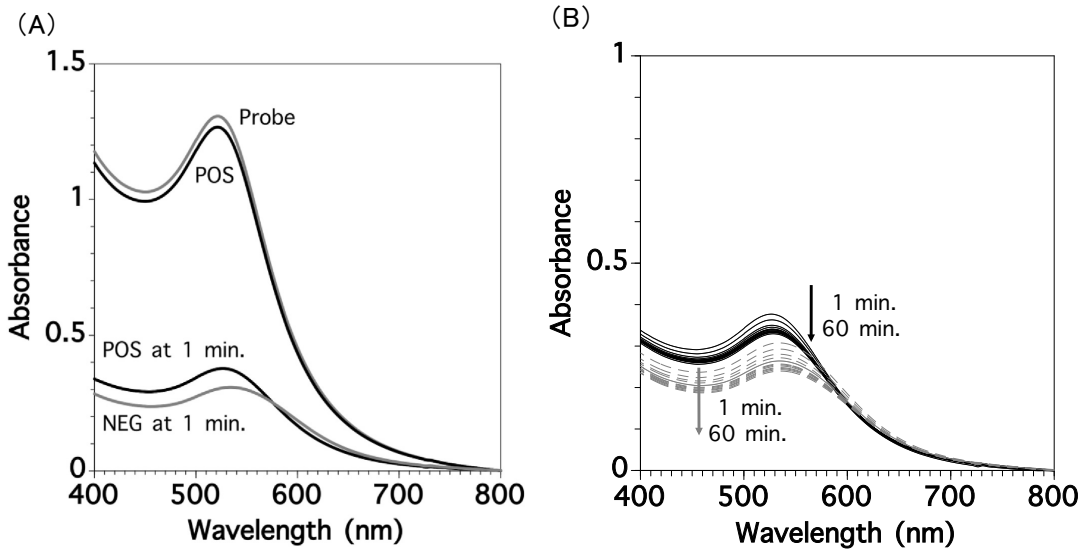


図 22　人工合成 DNA を用いた検出メカニズムの検証

（A）金ナノ粒子プローブ溶液（Probe），SD を含む試料（POS），SD を含まない試料（NEG）の NaCl を含むバッファー溶液を添加してから 1 分後の吸光スペクトル

（B）NaCl を含むバッファー溶液を添加してから 60 分後の POS（実線）および NEG（破線）の吸光スペクトルの時間変化

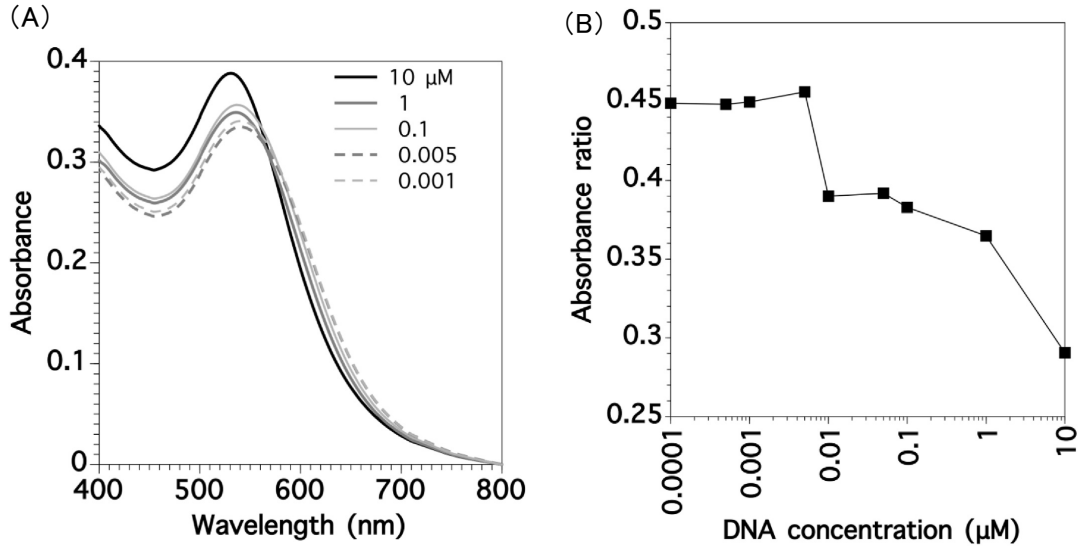


図 23　人工合成 DNA の検量線の作製
（A）人工合成 DNA 濃度の変化に伴う吸光スペクトルの変化
（B）人工合成 DNA の検量線

4-5　活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA の定量

本法の信頼性と実用性を検証するために，本法で測定した全細菌の 16S rRNA 濃度と RT-qPCR 法で測定した全細菌の 16S rRNA 濃度を比較した．3 つの活性汚泥サンプルから **2-2 核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量**にしたがって RNA サンプルを抽出した．人工合成 DNA の測定と同様に，RNA サンプルを希釈したサンプルを用いて NaCl を含むバッファーを添加してから 30 分後に試料の吸光スペクトルを測定した（図 24A）．全細菌の 16S rRNA を 50 μg/mL 添加したサンプルは 532 nm にピークを示した．全細菌の 16S rRNA の濃度が 5 mg/mL 以上では，全細菌の 16S rRNA の濃度が低下すると波長 500 nm と 750 nm の間の吸光度が増加し，吸光スペクトルが長波長側へシフトすることが確認された．一方，5 μg/mL から全細菌の 16S rRNA 濃度を下げると，ピークの吸光度は低下しさらにピークが 544 nm まで長波長側へシフトしたが，600 nm より長波長側で吸光度は変化しなかった．

3 つの活性汚泥サンプルについて，全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比の関係を解析した（図 24B）．全細菌の 16S rRNA 濃度が 5.0×10^7 copies/mL 以下の場合，吸光度比はおよそ 0.5 であった．一方，全細菌の 16S rRNA 濃度が 5.0×10^7 copies/mL 以上では，吸光度比はおよそ 0.5 から 0.3 へと減少した．3 つの活性汚泥サンプルから導出された相関式は $y=-0.125x+1.49$，決定係数は 0.84 であった．この相関式を全細菌の 16S rRNA 濃度を測定する際の検量線として用いた．また，検出限界（LOD）は 1.17×10^8 copies/mL と推定された．活性汚泥中の全

細菌の 16S rRNA 濃度は 6.5×10^{8} copies/mL から 1.2×10^{10} copies/mL であったため（図 24C），この値は 1 %から 18 %相当となる．また，本アッセイの検証として，他の活性汚泥およびアナモックスサンプルから抽出した全細菌の 16S rRNA 濃度について，あらかじめ作成した検量線を用いて算出し，図 24B のように RT-qPCR 法で求めた濃度と比較した．RNA サンプルではなく核酸を含まない Nuclease-Free water を用いて作製したブランクサンプルの値は 1.2×10^{8} copies/mL（図 24C）であり，検出下限を下回っていた．活性汚泥サンプルの全細菌の 16S rRNA 濃度は，RT-qPCR 法による測定値に対して 48%～208%の誤差があることが推定された．この誤差は，不純物イオンや有機物による影響であると考えられる．また，活性汚泥サンプルの全細菌の 16S rRNA 濃度は，活性汚泥サンプルの相関式を用いて高い精度（73%）で定量することができた．人工合成 DNA の測定結果（図 23A）と比較すると，吸光スペクトルの変化の様子が異なっていた．人工合成 DNA では，約 520 nm の吸光ピークが徐々に減少し，吸光スペクトルが長波長側へシフトしたのに対し，ピークの吸光度の低下は顕著ではなかったが，明確な赤方偏移が認められた（図 23A）．これは全細菌の 16S rRNA の交雑における金ナノ粒子プローブの凝集メカニズムが，人工合成 DNA とは異なることを示している．凝集の様子の違いは完全には解明されていないが，全細菌の 16S rRNA と人工合成 DNA の長さ（全細菌の 16S rRNA は約 1600 bp，人工合成 DNA は 48 bp），立体構造，自由度(J. H. Liu et al. 2019)，静電気的特性の違いなどの複合的な効果によって引き起こされると考えられる．また，RNA サンプルの全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比の関係は，人工合成 DNA のものと著しく異なっていた．全細菌の 16S rRNA の交雑効率は人工合成 DNA よりも非常に高かった．これは，人工合成 DNA の塩基長が短く一コピーあたりの負電荷が小さいため，金ナノ粒子プローブの凝集を防ぐためにより多くの人工合成 DNA が必要であったためであると考えられる．しかし，全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比には相関がみられ，全細菌の 16S rRNA 濃度が高くなると吸光度比が減少する傾向が見られた．

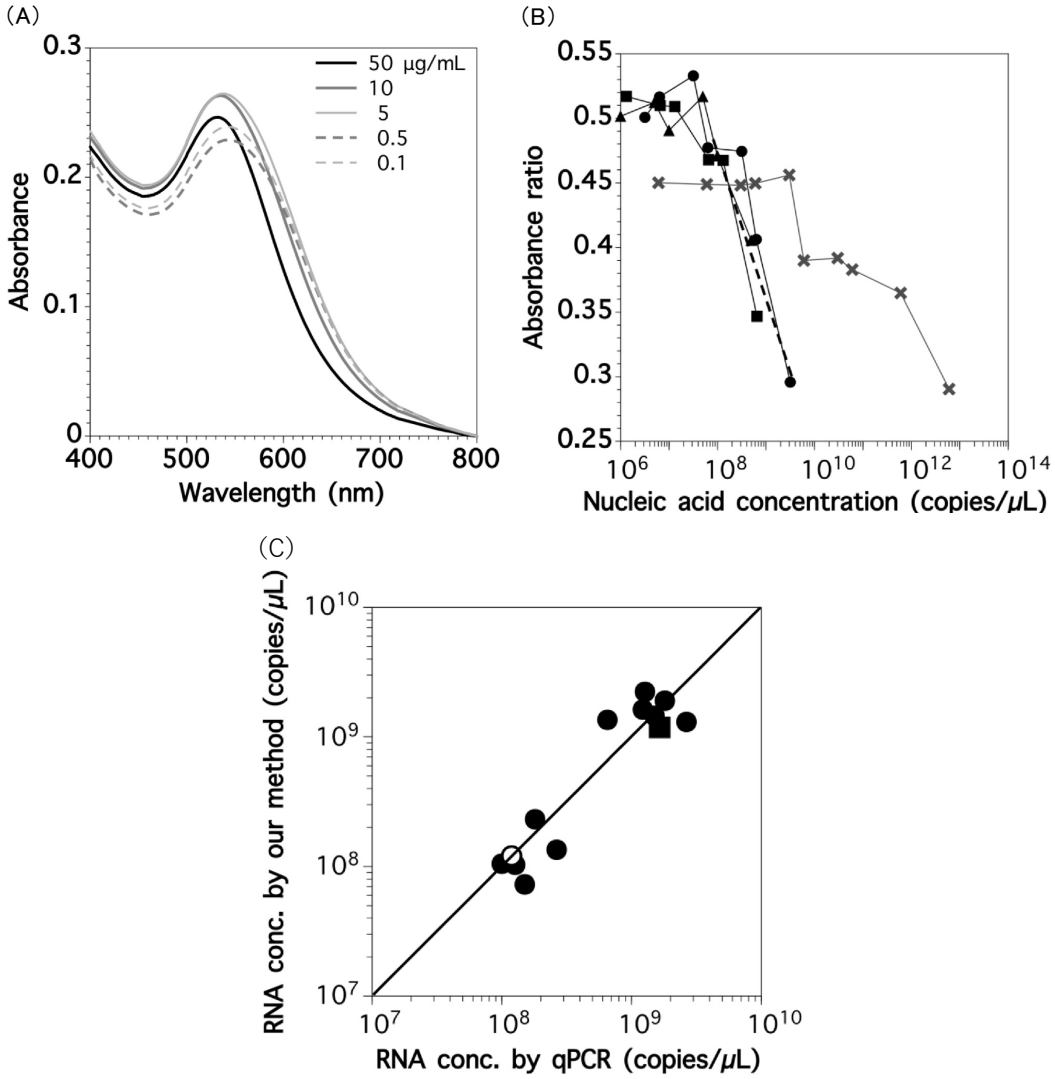


図 24　全細菌の 16S rRNA の検量線の作製，（A）全細菌の 16S rRNA 濃度の変化に伴う吸光スペクトルの変化，（B）3 つの AS サンプルを用いて作成した全細菌の 16S rRNA の検量線，全細菌の 16S rRNA の相関式（破線），SD の検量線（灰×），（C）本法での濃度と RT-qPCR 法での濃度の比較，AS サンプル（●），アナモックスサンプル（■），ブランクサンプル（○）

第 5 節　加熱ステップを導入した比色法の実験結果および考察

5-1　加熱ステップの導入が金ナノ粒子プローブの粒径分布に与える影響

比色法について，試料混合後の吸光スペクトル測定前に加熱ステップを導入すること，また測定条件を再検討することで感度や精度の向上，定量範囲の拡大を試みた．Elghanian らによると，金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の核酸を 0.1 M の NaCl 溶液中にて室温で一晩静置した場合と同等の変化を加熱（50℃で 5 分間）によって迅速に起こすことができる (Elghanian et al. 1997)．これは加熱によって，金ナノ粒子表面のプローブ DNA や検出対象の核酸の非特異的吸着や立体構造がほぐれ交雑効率が上がるため，また，分子の運動エネルギーが増大するため金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸の核酸が出会う確率が高くなるためであると考えられる．以上より，試料の加熱は交雑の促進に有効であり，加熱ステップを導入することで本法の測定時間を短縮できる可能性がある．よって，吸光スペクトル測定の前に加熱ステップを導入することで本法においても測定時間を短縮できるか検証した．金ナノ粒子プローブは全細菌の 16S rRNA を検出対象の核酸としたものでチミンスペーサーが 0 base のもの，NaCl 最終濃度は 2.9 M とした．加熱なしの場合と加熱ありの場合で使用した RNA サンプルは異なるため，全細菌の 16S rRNA の濃度も異なる．加熱ありの場合は，試料を作製後，95℃で 30 秒，62℃で 1 分加熱し，試料温度を室温に戻したのちに吸光スペクトルを測定した．NaCl 溶液の添加から吸光スペクトル測定まではおよそ 3 分程度であった．

図 25A に加熱なしの場合，図 25B に加熱ありの場合，それぞれの RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の吸光スペクトルを示す．図 25A 加熱なしは図 19B と同様のグラフである．POS のピークの吸光度は，加熱なしの POS-0 min（NaCl 溶液の添加直後に吸光スペクトルを測定した試料）が 0.43 と最も高く，加熱ありの POS が 0.40，加熱なしの POS-30 min 添加（30 分後）が 0.36 であった．また，加熱ありの POS は加熱から 30 分後も同様のスペクトルを示し，加熱直後にはすでに試料が安定化していた．（データ記載せず）．よって，加熱なしの POS-30 min のピークの吸光度に比べて加熱ありの POS のピークの吸光度が高いことから，凝集する金ナノ粒子プローブが減少している，つまり，加熱によって交雑効率がわずかに高くなったことが示された．また，加熱ありの場合は加熱なしの場合に比べて，2 つの金ナノ粒子プローブがハイブリダイズした検出対象の核酸の割合が増え，より強い表面プラズモン共鳴が起きたために，吸光度が高くなっている可能性も考えられる．

NEG のピークの吸光度は，加熱ありの NEG が 0.30 と最も高く，加熱なしの NEG-30 min が 0.23 であった．また，加熱ありの NEG はピークの波長が長波長側へ大きくシフトし，長波長領域の吸光度が増大していた．これは加熱なしに比べて POS と NEG の吸光度比の差が大きくなっている，つまり，検出範囲が拡大していることを示している．

したがって，加熱なしの場合は NaCl 溶液を添加してから 30 分後，試料が安定化してから測定を行う必要があったが(Nakajima et al. 2021)，吸光スペクトル測定の前に加熱ステップを導入することで, NaCl を添加してからおよそ 3 分程度で測定可能であることが示された．つまり，測定時間を短縮することができた．また，加熱することで POS と NEG の吸光度比の差が大きくなっており，検出範囲が拡大した(Nakajima et al. 2023).

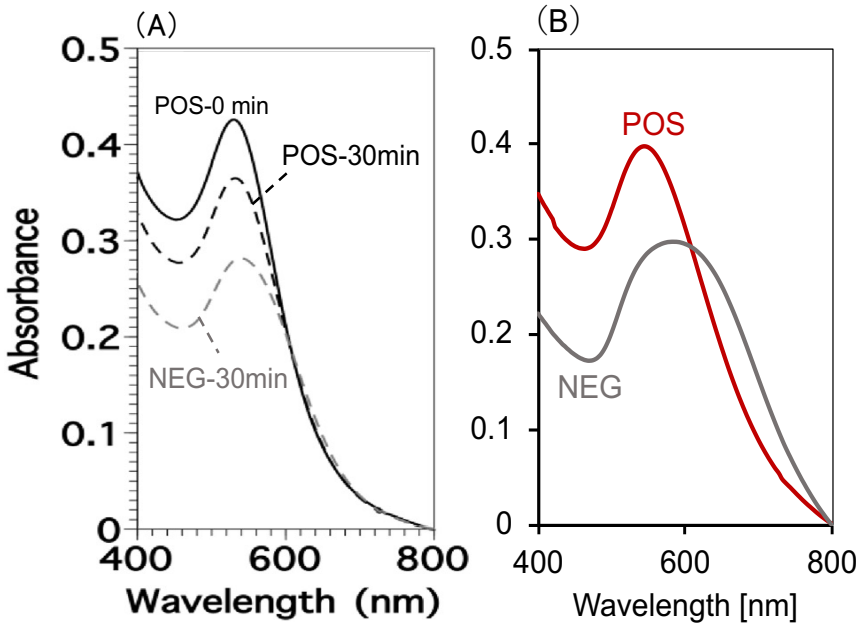


図 25　加熱ステップの導入が測定に及ぼす影響
RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の吸光スペクトル，（A）加熱なし，NaCl 溶液の添加直後または 30 分後に測定，（B）加熱あり，NaCl 溶液の添加からおよそ 3 分後に測定

5-2　スペーサー長さが測定に与える影響

プローブ DNA の検出対象の核酸とハイブリダイズする部位と金ナノ粒子の間にスペーサーを挿入することで，検出感度や精度を向上させ，定量範囲を拡大できることが報告されている(Jin et al. 2003)．そこで，スペーサーの長さが本法での測定に与える影響について確認するため RNA サンプルを用いて測定を行なった．使用した RNA サンプルに含まれる全細菌の 16S rRNA 濃度は 2.1×10^6 copies/μL であった

図 26A から図 26E に異なるスペーサー長さの金ナノ粒子プローブを用いて作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の吸光スペクトルを示す．POS のピークの吸光度は（A）0 base から（D）75 base ではおよそ 0.4 であったのに

対し，（E）100 base では 0.25 と急激に減少した．これは，スペーサーの長さが 100 base の場合は他の場合に比べて交雑効率の低下が著しいことを示している．この原因としては，先行研究でも報告されている通り，スペーサーが長いほど金ナノ粒子表面へのプローブ DNA の固定効率が低下しており(Barchanski et al. 2012)，交雑可能なサイトが少なくなっていること，交雑部位から金ナノ粒子までの距離が遠すぎるために検出対象の核酸による凝集の阻害が起こらないことが考えられる．NEG のピーク波長はスペーサーが短くなるほど長波長側へシフトした．NEG の吸光度ピークはスペーサーが長くなるほど大きくなる傾向が見られた．これは，スペーサーが長くなるほど金ナノ粒子表面のプローブ DNA が長くなり，金ナノ粒子プローブの凝集が物理的に阻害され安定性が増すためであると考えられる．

図 26F にスペーサの長さによる POS と NEG の吸光度比の変化を示す．吸光度比は，POS は 0.22 から 0.28，NEG は 1.06 から 1.29 の範囲で変化した．POS の吸光度比はチミンスペーサーの長さにかかわらず同程度の値を示した．NEG の吸光度比は 0 塩基から 50 塩基で減少し，75 塩基と 100 塩基では同程度の値であった．つまり，スペーサーの長さは DNA プローブの凝集状態に影響を与えていることが明らかとなった．これは Chan らの研究で示されているように，検出対象の核酸とプローブ DNA の交雑する部位の変化が測定結果に影響を与える(Chan et al. 2014)，つまり，本研究においてもスペーサーの長さによって交雑部位や交雑時の立体構造の変化が起こっていたと考えられる．この時の POS の吸光度比に大きな変化が見られなかったのは，検出対象の核酸である全細菌の 16S rRNA 濃度が高かったため，交雑効率も凝集のブロック効率もスペーサー長さに影響を受けなかったためであると考えられる．POS と NEG の吸光度比の差は 0 base から 100 base へ順に，0.42，0.34，0.26，0.11，0.07 であり，差が最も大きくなったのは 0 base の金ナノ粒子プローブを用いた場合であった．しかし，100 base は POS の吸光スペクトルが他と大きく異なるにもかかわらず，吸光度比はほぼ同程度であった．これより，吸光度比は必ずしも吸光スペクトルの性状を正

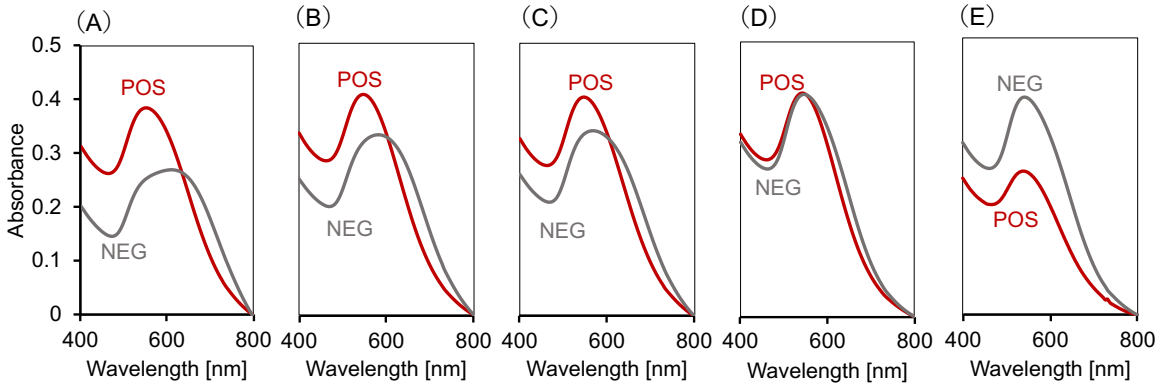


図 26　異なるスペーサー長さの金ナノ粒子プローブを用いて作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の吸光スペクトル
（A）0 base,　（B）25 base,　（C）50 base,　（D）75 base,　（E）100 base,

確に示しているとは言えないことが明らかとなった．よって，本法においては，吸光度比の算出に使用する二波長のみの測定ではなく，400 nm から 800 nm 程度の吸光スペクトルを測定することが望ましいと考えられる．

図 26F の結果から最適なスペーサー長さは 0 base であることが示されたが，より詳細な検討のために，POS と NEG の吸光度比の差が比較的大きかった 0 base，25 base，50 base の金ナノ粒子プローブを用いて検量線を作成し，定量範囲の違いについて検討した．RNA サンプルは全細菌の 16S rRNA 濃度が 4.3×10^6 copies/μL であった．この RNA サンプルを Nuclease-Free water で段階希釈し，スペーサー長さが 0 base，25 base，50 base の金ナノ粒子プローブを用いて測定を行なった．

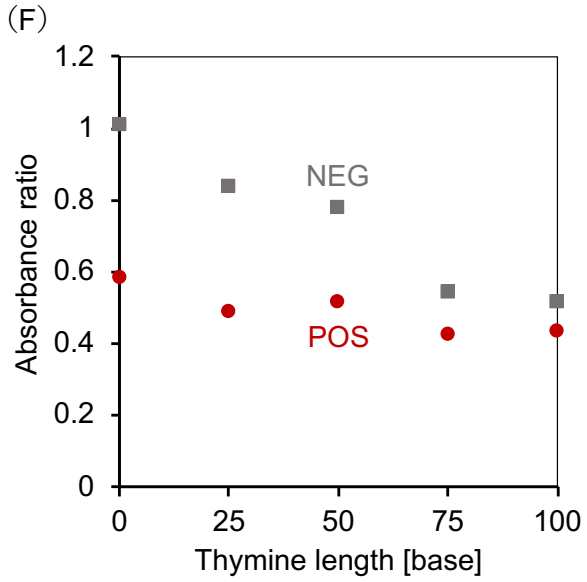


図 26　（F）スペーサーの長さと POS と NEG の吸光度比の関係

図 27A から図 27C に，異なるスペーサー長さの金ナノ粒子プローブを用いて測定した，全細菌の 16S rRNA 濃度の変化による吸光スペクトルの変化を示す．4.3×10^6 copies/μL の吸光スペクトルは（A） 0 base，（B） 25 base，（C） 50 base ともに同じような形状を示した．0 copies/μL（NEG）に着目すると，0 base が最もピーク波長が長波長側へシフトし，ピークの吸光度が小さく，スペクトルもブロードであった．530 nm の吸光度比は，0 base では 0.40（4.3×10^6 copies/μL）から 0.27（0 copies/μL）へ，25 base では，0.39（4.3×10^6 copies/μL）から 0.33（0 copies/μL）へ，50 base は 0.40（4.3×10^6 copies/μL）から 0.33（0 copies/μL）へと減少した．0 base の減少が最も大きく（0.13），25 base と 50 base の減少は同程度（0.06 または 0.07）であった．対して 630 nm の吸光度比は，0 base では，0.24（4.3×10^6 copies/μL）から 0.26（0 copies/μL）へ，25 base では，　0.22（4.3×10^6 copies/μL）から 0.30（0 copies/μL）

へ，50 base は 0.22（4.3×10^6 copies/μL）から 0.30（0 copies/μL）へと増加した．0 base の増加が最も小さく（0.02），25 base と 50 base の増加は同程度（0.08）であった．

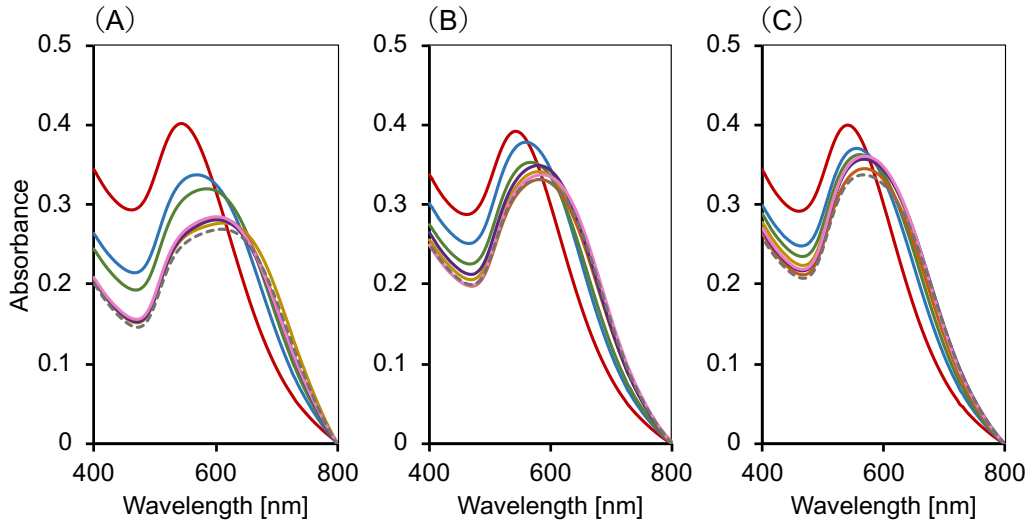


図 27　全細菌の 16S rRNA 濃度の変化による吸光スペクトルの変化，スペーサーの長さは（A）0 base，（B）25 base，（C）50 base，全細菌の 16S rRNA の濃度は 4.3×10^6（赤），8.7×10^5（青），4.3×10^5（緑），8.7×10^4（黄），4.3×10^4（橙），8.7×10^3（紫），4.3×10^3（桃），0（NEG，灰破線）

図 27D に全細菌の 16S rRNA 濃度と図 27 の（A）から（B）から算出した吸光度比の関係を示す．RNA サンプルに含まれる全細菌の 16S rRNA 濃度が 4.3×10^6 copies/μL であった．この RNA サンプルを Nuclease-Free water で段階希釈し，スペーサー長さが 0 base，25 base，50 base の金ナノ粒子プローブを用いて測定を行なった．図中の斜線のプロットが示すように，0 base は 4.3×10^4 copies/μL で，25 base は 8.7×10^3 copies/μL で吸光度比の逆転が見られた．50 base は NEG（図中の白抜きプロット）まで吸光度比の逆転は見られなかった．よって，0 base や 25 base では全細菌の 16S rRNA が低下するにつれて 50 base よりも凝集をブロックできなくなっていると考えられる．図 27（A）から（B）のスペクトルについても，0 base と 25 base は 530 nm の吸光度の低下や 630 nm の吸光度の変化が比較的急激であるのに対して，50 base はゆるやかに変化していた．したがって，POS と NEG の吸光度比の差が比較的大きく，検量線の定量範囲が広い，全細菌の 16S rRNA と金ナノ粒子プローブの交雑効率が高いことから，最適なチミンスペーサーの長さは 50 base であることが示された．

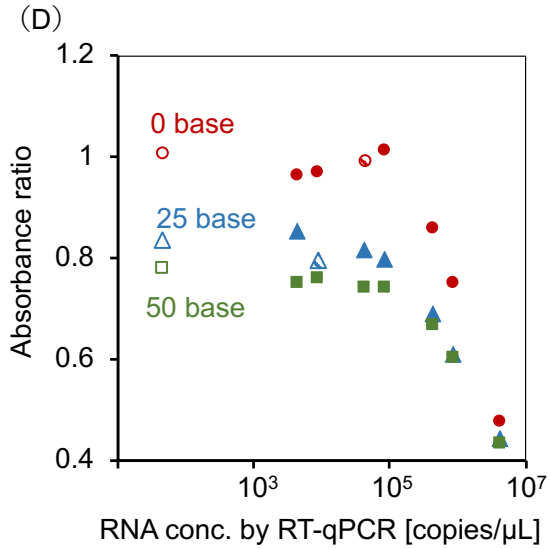


図 27　（D）スペーサー長さが 0 base（●），25 base（▲），50 base（■）の場合の全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比の関係，図中の白抜きは NEG を示す．また，図中の斜線は吸光度比の逆転が見られたプロットを示す．

Barchanski らによると，金ナノ粒子と交雑部位の間のチミンスペーサーを 10 から 20 へ変化させた場合，金ナノ粒子表面へのプローブ DNA の固定効率がおよそ 25 %低下する．これは，チミンスペーサーを長くする，つまりプローブ DNA を長くすることで，金ナノ粒子表面に固定されるプローブ DNA の偏向角（図 27E 参照）が大きくなり，スペーサーを長くすることで金ナノ粒子表面に固定されるプローブ DNA の本数が減少するためであると報告されている(Barchanski et al. 2012)．本法においても同様の現象が起こっていると考えられる．しかし，この研究では検出対象の核酸との交雑効率については検討されていない．本研究では検量線を作成することで，本法の測定条件において検出対象の核酸の定量に則したチミンスペーサーの長さを決定することができたと考えられる．具体的には，スペーサーの長さに起因するプローブ DNA の固定効率と金ナノ粒子表面に固定された時のプローブ DNA の立体的な自由度について，本法においては 50 base が最適な長さであった．

また，図 27F に 50 base の NEG を 3 回測定し，標準偏差から 3σ を算出したところ，0.01 であった．これより，本法を用いて全細菌の 16S rRNA を測定する場合の検出限界は 8.7×10^4 copies/μL であることが明らかとなった．

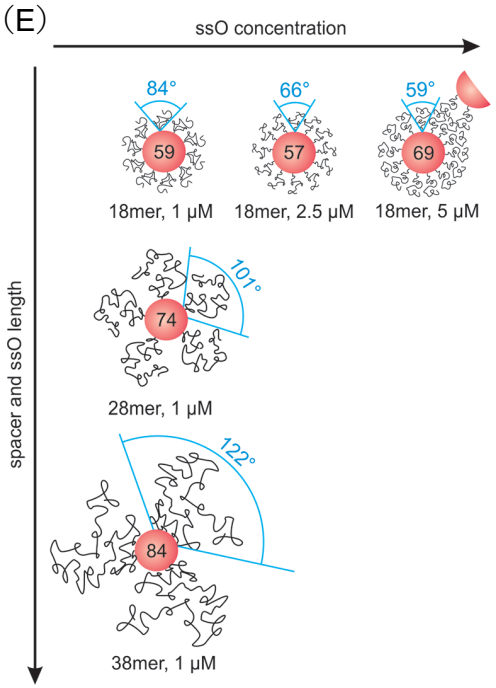


図 27（E）スペーサーの長さと固定時のプローブ DNA 濃度による プローブ DNA の偏向角の変化（Barchanski et al., 2012 より引用）

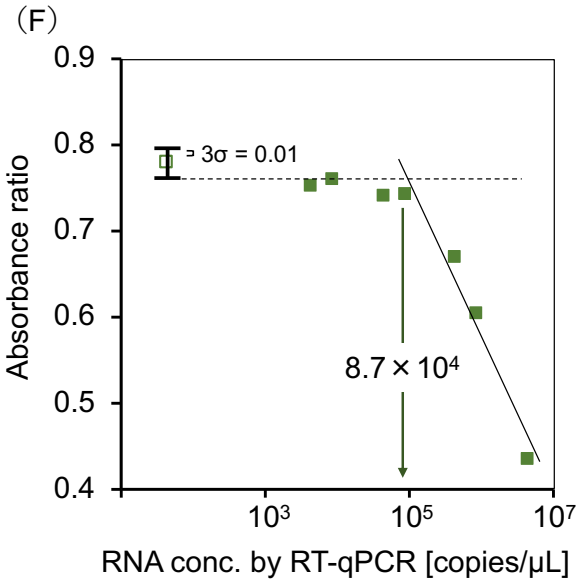


図 27（F）スペーサー長さが 50 base の場合の全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比の関係

5-3　プローブ DNA 密度が測定に与える影響

前項の結果より, 本法において最適なスペーサーの長さは 50 base であることが示された. このときのプローブ DNA の密度は 0.73(金ナノ粒子 1 個あたりに固定されたプローブ DNA の本数；プローブ DNA/AuNP）であったが，この条件が本当に最適であるかは不明であるため，最適なプローブ DNA の密度について検討した．チミンスペーサーが 50 base の金ナノ粒子プローブを用いて，RNA サンプルを含む試料（POS），Nuclease-Free water を含むサンプル（NEG）の測定を行い，吸光度比を算出した．プローブ DNA と金ナノ粒子の比率（Probe DNA/AuNP）は 0，0.51，0.73，1.10，1.40 と設定し，**2-1　金ナノ粒子プローブの作製**に記載したプロトコルにおいて，プローブ DNA の濃度を 1.5 μM（0.51），10 μM（0.73），15 μM（1.10），20 μM（1.40）とすることで調整した．また 0 は，プローブ DNA 溶液ではなくプローブ DNA 溶液の溶媒である Nuclease-Free water を使用することで作製した．RNA サンプルに含まれる全細菌の 16S rRNA 濃度は 1.2×10^6 copies/μL であった．

図 87 に異なるプローブ DNA 密度（金ナノ粒子あたりのプローブ DNA の本数，Probe DNA/AuNP）の金ナノ粒子プローブを用いた場合の吸光度の変化を示す．POS の吸光度比は 0 と 0.51 がほぼ同程度で，0.73 以上で減少した．NEG の吸光度比は 0.51 で一度増加し，0.73 以上で減少した．POS と NEG の吸光度比の差は，Probe DNA/AuNP が 0，0.51，0.73，1.10，1.47 の順に，0.31，0.36，0.37，0.20，0.05 であった．POS と NEG の差が最も大きかったのは 0.51 と 0.73 の場合（0.36）であった．POS では，金ナノ粒子の表面に固定されたプローブ DNA の本数が多いほど金ナノ粒子プローブ 1 個当たりの全細菌の 16S rRNA と交雑するサイトが増えるため，より凝集がブロックされ，吸光度比が減少すると考えられる．NEG では，金ナノ粒子の表面に固定したプローブ DNA の本数が多いほど金ナノ粒子プローブの凝集が物理的に凝集しづらくなるため，吸光度比が増大せず，0.73 を超えると急に凝集しづらくなり，POS サンプルとの差が小さくなると考えられる.よって，最適なプローブ DNA の密度はこれまでと同様の 0.73 であることが示された.

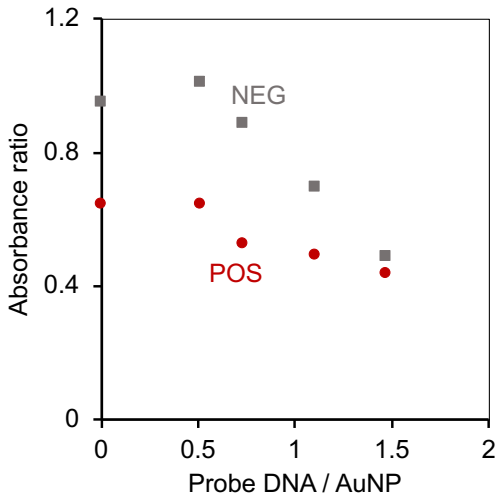


図 28　プローブ DNA 密度と POS と NEG の吸光度比の関係

5-4　凝集剤（NaCl）濃度が測定に与える影響

塩は金ナノ粒子の表面電荷を中和しその分散状態に影響を与えるため，金ナノ粒子の凝集剤として使用される．よって，金ナノ粒子プローブを用いた分析法において，凝集剤（本法では NaCl）の濃度は感度や定量範囲に影響を与える重要な要因である．そこで，本法において最適な NaCl 最終濃度について検討した．これまでの条件検討の結果から最適であると考えられる，チミンスペーサーが 50 base，プローブ DNA 密度は 0.73 の金ナノ粒子プローブを用いて，RNA サンプルを含む試料（POS），核酸を含まない Nuclease-Free water を含むサンプル（NEG）の測定を行い，吸光度比を算出した．試料の NaCl 最終濃度は 0.0，0.3，1.2，2.1，2.9 M と設定した．2.9 M では NaCl の飽和溶液（5 M）を用いるため，これが最大の NaCl 最終濃度である，RNA サンプルに含まれる全細菌の 16S rRNA 濃度は 4.3×10^6 copies/μL であった．

図 29 の（A）から（E）に異なる NaCl 最終濃度で作製した POS または NEG の吸光スペクトルを示す．ピーク波長は，0.0，0.3，1.2，2.1，2.9 M の順に，POS は 522 nm，536 nm，537 nm，540 nm，544 nm，NEG は 520 nm，543 nm，560 nm，574 nm，582 nm であった．よって，POS と NEG ともに NaCl 最終濃度が高くなるにつれてスペクトルのピーク波長が長波長側へシフトしたが，NEG のシフトの方が顕著であった．またピークの吸光度は，NaCl の最終濃度に関わらず POS は同程度であったのに対し，NEG は NaCl 最終濃度が高くなるにつれて減少し，スペクトルがブロードになる傾向が見られた．

図 29 の（F）に NaCl 最終濃度と吸光度比の関係を示す．POS, NEG ともに NaCl の最終濃度が高くなるほど吸光度比が増大した. NEG と POS の吸光度比の差は, 0.0，0.3，1.2，2.1，2.9 M の順に，-0.004，0.064，0.224，0.373，0.407 であり，NaCl の最終濃度が高くなるほど

吸光度比の差の値が大きくなった．前述の通り，2.9 M では NaCl の飽和溶液（5 M）を用いるため，本法における最適な NaCl 最終濃度は 2.9 M であることが示された．

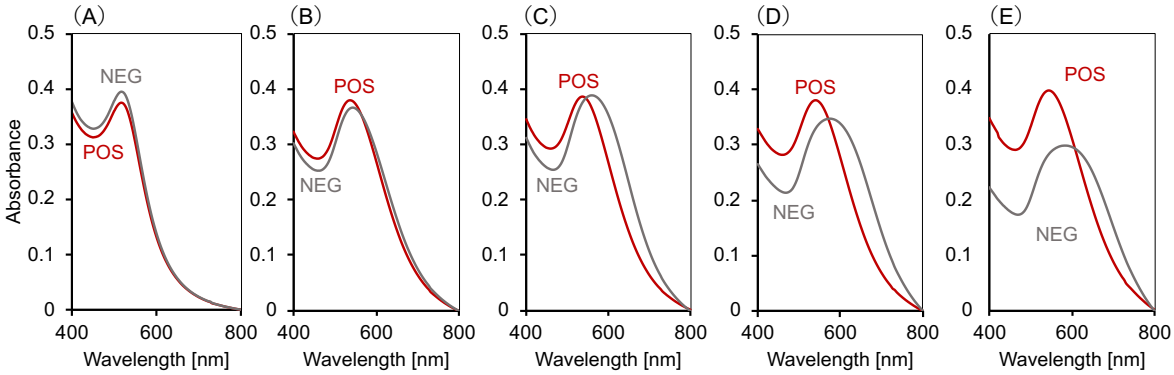
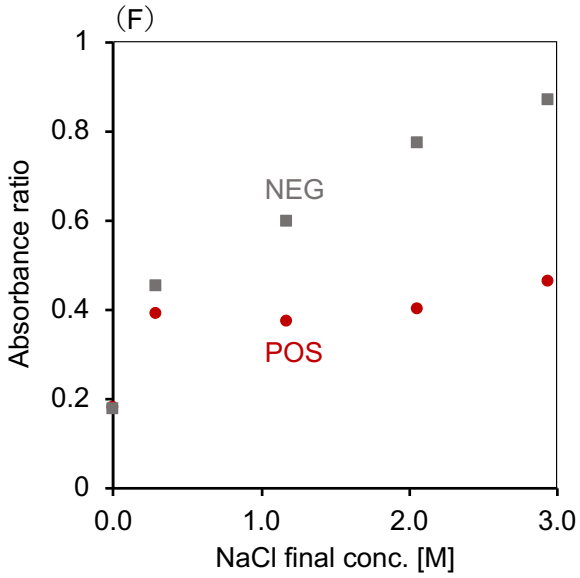


図 29　異なる NaCl 最終濃度で作製した POS または NEG の吸光スペクトル
NaCl 最終濃度は（A）0.0 M,　（B）0.3 M,　（C）1.2 M,　（D）2.1M,　（A）2.9 M,



（F）NaCl 最終濃度と POS と NEG の吸光度比の関係

5-5　金ナノ粒子プローブの種数が測定に与える影響

1 つの検出対象の核酸に 2 つの金ナノ粒子プローブが交雑する際，金ナノ粒子によって片方の金ナノ粒子プローブの交雑が阻害されている可能性が考えられる．また，FISH 法において蛍光色素が修飾されていないヘルパープローブを併用することで，交雑効率（測定感度）が向上するという報告がある(Fuchs et al. 2000)．以上より，2 種類の金ナノ粒子プローブのうちいずれかを金ナノ粒子が修飾されていないプローブ DNA に置き換えることで，交雑効率が変化するのではないかと考えた．

今回は，紫外可視分光光度計を用いた吸光スペクトル測定により検出対象の核酸を定量する比色法にて検討を行なった．比色法では，検出対象の核酸が存在する場合は交雑に金ナノ粒子プローブの凝集が阻害され試料は赤色のままとなり，検出対象の核酸が存在しない場合は金ナノ粒子プローブが凝集し試料が青紫へと変化する，つまり，吸光スペクトルがレッドシフトする．使用した金ナノ粒子プローブは，アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* の 16S rRNA 遺伝子の検出用 PCR プライマー（CTO189F A/B，CTO189F C，RT1R）を参考に設計した人工合成 DNA を金ナノ粒子で修飾し作製した．異なる条件にて混合した金ナノ粒子プローブ溶液と，活性汚泥から抽出した RNA サンプルを用いて作成した試料（RNA と称す）と核酸を含まない Nuclease-Free water を用いて作成した試料（Blank と称す）を n=2 で作製した．各条件の RNA と Blank の吸光度比（波長 550 nm と 650 nm の吸光度の比）の違いについて検討した．試料（RNA サンプルまたは Nuclease-Free water に金ナノ粒子プローブとバッファー溶液を添加したもの）を 95℃で 30 秒，59℃で 1 分加熱した後，紫外可視分光光度計（V630，JASCO）を用いて吸光スペクトルを測定した．

金ナノ粒子プローブを 2 種類（T50-cCTO189F と T50-RT1R，図 29 中 Au-F+Au-R），片方の金ナノ粒子プローブをプローブ DNA に置き換えた Au-T50-cCTO189 と HS-RT1R（図 29 中 Au-F+R），HS-cCTO189F と Au-T50-RT1R（図 29 中 F+Au-R）として試料を作製した．

図 30 に各条件での RNA または Blank の吸光度比の平均値を示す．Blank と RNA の吸光度比の差（Blank – RNA）は Au-F+Au-R が 0.16，Au-F+R が 0.05，F+Au-R が 0.05 であり，吸光度比の差が最も大きくなったのは Au-F+Au-R の金ナノ粒子プローブを 2 種類使用した場合であった．また，Blank の吸光度比は 2Au-F+Au-R が 0.73，Au-F+R が 0.51，F+Au-R が 0.49 であり，Blank の吸光度比が最も大きくなったのは Au-F+Au-R の金ナノ粒子プローブを 2 種類使用した場合であった．以上より，本実験において使用していたプローブ DNA である cCTO189F A/B/C と RT1R は FISH 法におけるヘルパープローブのような機能は持っていないことが明らかとなった．

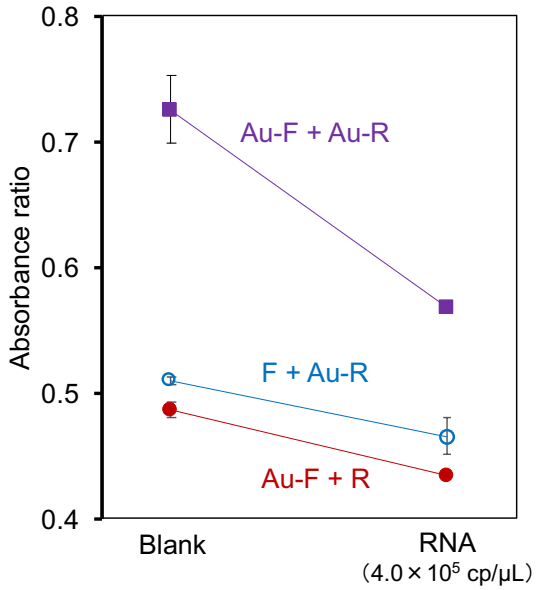


図 30　金ナノ粒子プローブが 2 種類（図中 Au-F＋Au-R），Au-T50-cCTO189F と HS-RT1R（図中 Au-F＋R），HS-cCTO189F と Au-T50-RT1R（図中 F＋Au-R）の場合の RNA または Blank の吸光度比の平均値

5-6　検出対象の核酸の交雑部位の外側の塩基が測定に与える影響

既往の金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法においては，粒子に修飾されたプローブ DNA と同じ長さのオリゴヌクレオチドを用いて様々な分析が行われてきた．よって，本研究のように環境サンプル中の核酸を検出対象とする場合は，検出対象の核酸のうち，プローブ DNA と交雑する部位の外側の塩基の配列や長さが測定結果に影響を与える可能性があると考えられる．よって，同じ交雑部位を持つが長さが異なる検出対象の核酸を用意し分析を行った．サンプルとして，大腸菌 *Escherichia coli* K12 株から抽出したゲノム全長を含む DNA サンプル，これを PCR 法で増幅した PCR 産物サンプル 2 種（Long と Short）を用いた．PCR 法で用いたプライマーセットはどちらも universal bacterial 16S rRNA の検出に使用されるものであり，Long は 8F と 1492R のセット，Short は 341F と 805R のセットを用いて増幅された．PCR 法での増幅後，アガロースゲル電気泳動によって増幅産物付近のバンドのみが確認できた．このバンドを切り出し，QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いて，プロトコルにしたがって精製を行った．Quant-it™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて濃度を測定し，増幅産物のサイズからコピー数に基づく濃度を算出した．それぞれのサンプルは Nuclease-Free water を用いて段階的に希釈した．

図 31 にゲノム DNA サンプル，PCR 産物サンプルである Long と Short について，それぞれの濃度と吸光度比（A_{650}/A_{550}）の関係を示す．ゲノム DNA サンプルについては濃度が 10^5 から 10^3 copies/μL へ低下していくにしたがって吸光度が低下し，スペクトルのピーク波長が長波長側へシフトした（図 31A）．Long と Short についてもゲノム DNA と同様に，濃度が 10^6 から 10^7 copies/μL へ低下していくにしたがって吸光度が低下したが，Long は 2.6×10^6 copies/μL の時点（図 31B），Short は 7.7×10^6 copies/μL の時点（図 31C）でスペクトルが変化しなかった．検出対象の核酸が短くなるほどスペクトルが急激に凝集方向に変化したことから，交雑部位の外側の塩基が短くなるほど，金ナノ粒子プローブを覆うことができなくなり，凝集を阻害できないと考えられる．また，図 31D より，ゲノム DNA が最も低濃度まで検出可能であり，交雑部位の外側に塩基が存在することで検出感度が高くなることが明らかとなった．以上より，交雑部位の外側に塩基が存在することで金ナノ粒子プローブが覆われると凝集が阻害され，検出感度が高くなることが示された．よって，金ナノ粒子プローブが検出対象の核酸のどの部位に交雑するかなどを考慮し，最適なプローブの選択が必要であるといえる．

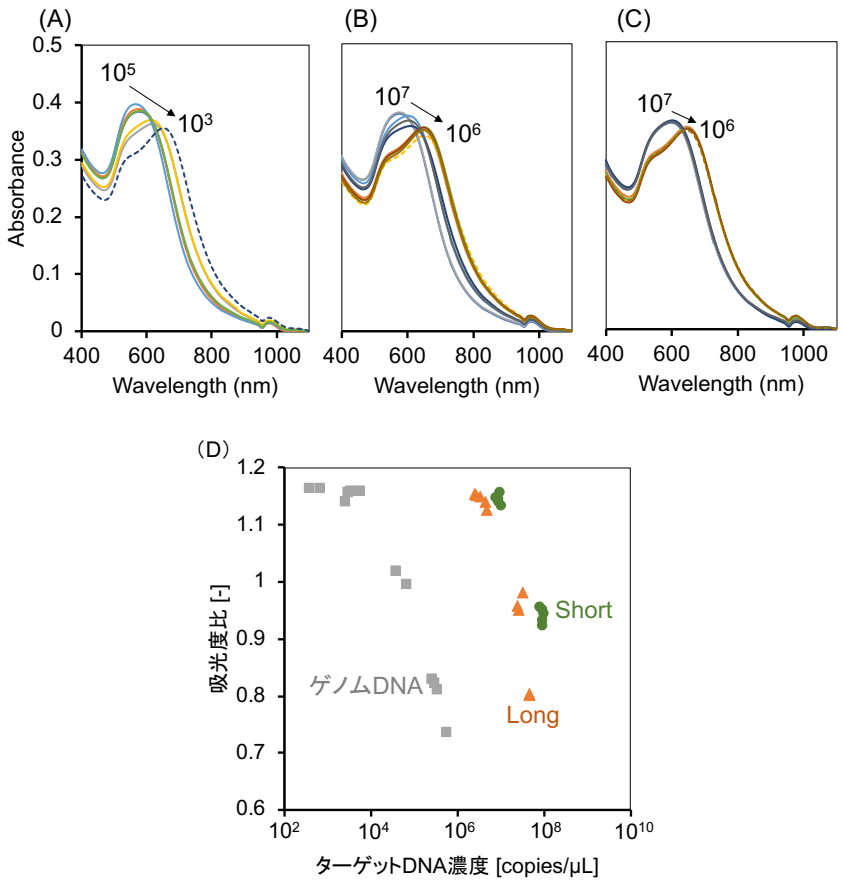


図 31　ゲノム DNA（A），Long（B），Short（C）の吸光スペクトル，（D）ゲノム DNA サンプル，PCR 産物サンプル（Long，Short）の濃度と吸光度比の関係

5-7　RNA を用いた反応メカニズムの検証

反応メカニズムを確認するため RNA サンプルを用いて測定を行なった．また，加熱ステップを導入した場合に NaCl 溶液の添加が測定結果に及ぼす結果についても検討した．使用した RNA サンプル中の全細菌の 16S rRNA 濃度は 2.1×106 copies/μL であった．

図 32A に直径 5 nm の金ナノ粒子溶液（図中 AuNP），金ナノ粒子プローブ（c341F）溶液（図中 Probe），金ナノ粒子プローブ溶液に Milli-Q 水と RNA サンプルを加えた試料（図中 POS-W），金ナノ粒子プローブ溶液に Milli-Q 水と核酸を含まない Nuclease-Free water を加えた試料（図中 NEG-W）の吸光スペクトルをそれぞれ示す．AuNP と Probe は 522nm にスペクトルのピークが存在した．先行研究と同様に，金ナノ粒子プローブ作製に使用した金ナノ粒子溶液と金ナノ粒子プローブ溶液のスペクトルはほぼ同じであった(Nakajima et al. 2021b; Zhang, Servos, and Liu 2012)．Probe の吸光度の値が AuNP の吸光度の値よりも小さくなったのは，プローブ DNA を修飾するプロセスでのバッファー溶液の添加による希釈が原因であると考えられる．AuNP と Probe と同様に，POS-W と NEG-W も 522 nm にスペクトルのピークが存在し，ピークのシフトは見られなかった．ピークの吸光度の値は，POS は 0.374，NEG は 0.396 であった．また，POS-W と NEG-W の吸光スペクトルには差が見られなかった．

図 32B に図 32A の直径 5 nm の金ナノ粒子溶液(図中 AuNP), 金ナノ粒子プローブ(c341F)溶液(図中 Probe)の吸光スペクトルに加えて, 金ナノ粒子プローブ溶液に NaCl 溶液と RNA サンプルを加えた試料（POS-NaCl），金ナノ粒子プローブ溶液に NaCl 溶液と Nuclease-Free water を加えた試料（NEG-NaCl）の吸光スペクトルを示す．POS-NaCl は 544 nm に，NEG-NaCl は 582 nm にスペクトルのピークが存在した．POS-NaCl と NEG-NaCl のスペクトルのピークは，AuNP や Probe よりも長波長側に存在した．また，POS-W や NEG-W に比べて，POS-NaCl と NEG-NaCl はスペクトルがブロードであり，最もブロードであったのは NEG-NaCl であった．ピークの吸光度の値は，POS-NaCl が 0.397，NEG-NaCl が 0.297 であった．NEG-NaCl は NaCl 溶液由来のナトリウムイオンにより金ナノ粒子表面の負電荷が中和，凝集が促進され，スペクトルが長波長側へシフトしたと考えられる．POS-NaCl は検出対象の核酸と金ナノ粒子プローブがハイブリダイズし，検出対象の核酸によって金ナノ粒子プローブの AuNP が覆われ凝集が阻害されたため，NEG-NaCl ほどピークがシフトしなかったと考えられる．

異なる検出対象の核酸濃度の RNA サンプルについて測定を行なったところ，POS-NaCl のピーク波長はおよそ 530 nm，NEG-NaCl のピーク波長は 580 nm 以降に見られたことから（データ記載せず），これ以降の実験では，波長 630 nm の吸光度の値を波長 530 nm の吸光度の値で除したものを吸光度比（A_{630}/A_{530}）と定義した．

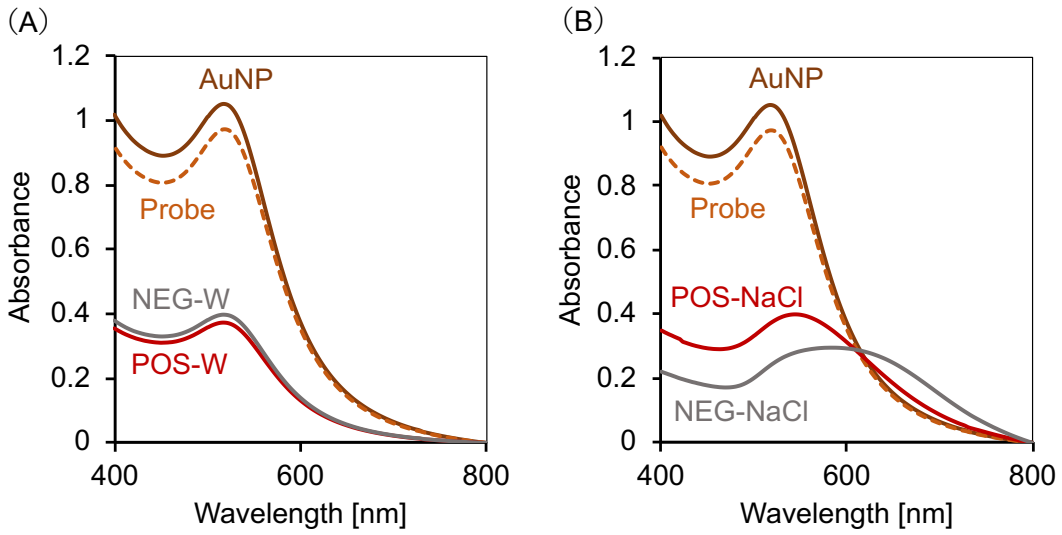


図 32　金ナノ粒子プローブと試料の吸光スペクトル
金ナノ粒子溶液（AuNP），金ナノ粒子プローブ溶液（Probe），金ナノ粒子プローブ溶液に RNA サンプルを加えた試料（POS），金ナノ粒子プローブ溶液に Nuclease-Free water を加えた試料（NEG）の吸光スペクトル，（A）AuNP，Probe，POS または NEG に Milli-Q 水を加えた試料（POS-W，NEG-W），（B）AuNP，Probe，POS または NEG に NaCl 溶液を加えた試料（POS-NaCl，NEG-NaCl）

5-8　選択性の検証

下水処理場にて採取した活性汚泥中のアンモニア酸化細菌（Ammonia-oxidizing bacteria; AOB）の 16S rRNA 濃度は，多少の変動はあるものの全細菌の 16S rRNA のうち 8 割を超えることはないことが，これまでの実験で明らかになっている．よって，活性汚泥にから抽出した RNA サンプルに，AOB の純菌から抽出した高濃度の RNA をスパイクすることで，比色法の選択性について検証した．S 県下水処理場処理場にて 2020 年 11 月 14 日から 12 月 15 日に採取した活性汚泥から抽出した RNA サンプル，RNA サンプルに AOB である *Nitrosomonas europaea* から抽出した RNA サンプルをスパイクしたスパイクサンプル（図 32A 中 spike）について比色法で測定を行った．同時に，RT-qPCR 法により全細菌の 16S rRNA と AOB の 16S rRNA ついて定量を行うことで，比色法の選択性について検証した．

図 33A に全細菌と AOB の 16S rRNA の濃度について，RT-qPCR 法または本法で測定した結果を示す．図 33A 中の赤いプロットが示す通り，本手法はどの処理場の活性汚泥でも全細菌の 16S rRNA 濃度によらず，RT-qPCR 法と同程度に定量可能であり，高い選択性を持つことが示された．　また，図 32B に，全細菌の 16S rRNA 遺伝子と AOB の 16S rRNA 遺伝

子，つまり DNA について同様の実験を行った結果を示す．図 33B では，比色法で測定した検出対象の濃度ではなく，吸光度比の値と遺伝子濃度の相関について示している．以上より，比色法は AOB の 16S rRNA または 16S rRNA 遺伝子のどちらが検出対象であっても高い選択性を持つことが示された．

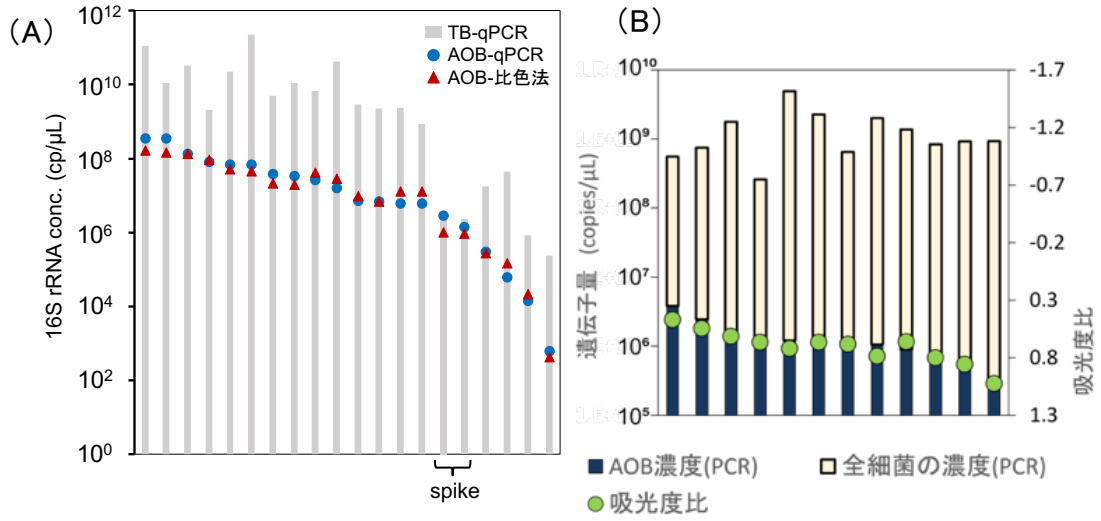


図 33　比色法で定量した濃度と RT-qPCR 法で定量した濃度の比較
(A)全細菌の 16S rRNA と AOB の 16S rRNA の検出
(B) 全細菌の 16S rRNA 遺伝子と AOB の 16S rRNA 遺伝子（DNA）の検出
（半田，2023 年度修士論文，2024）

5-9　ピーク分離解析による試料中要素の分画

金ナノ粒子プローブの凝集状態は，吸光スペクトルの測定，動的光散乱光法による粒径分布の測定，電子顕微鏡による観察などにより評価される．このうち，吸光スペクトル測定による評価は，最も簡便であるため一般的に行われている．吸光スペクトル測定において，金ナノ粒子プローブの凝集状態は，凝集が進むことで観察されるピーク波長の吸光度の値で表される．または，凝集によるピーク波長の吸光度の値を非凝集の金ナノ粒子プローブ波長の吸光度の値で除した，吸光度比（凝集ピーク波長における吸光度/非凝集ピーク波長における吸光度）で表される．これまで吸光スペクトル測定により分析を行う比色法では，吸光度比の算出による解析を行なっていた．本実験で新たにピーク分離解析を導入し，試料中の要素の分画（ピーク分離）を行うことで，金ナノ粒子プローブ・凝集・交雑の各成分を分離可能か，また，検出対象の核酸核酸の濃度と交雑のスペクトルの係数（詳細は実験方法に示す）に相関があるか，吸光度比による解析結果とどのような違いがあるかについて検討した．

図 34 に示す通り，試料溶液中には，分散状態の金ナノ粒子プローブ，凝集状態の金ナノ粒子プローブ，検出対象の核酸と交雑した金ナノ粒子プローブの 3 つの要素が含まれると仮

定した．交雑しなかった検出対象の核酸や非検出対象の核酸については，DNA や RNA のピーク波長は 260 nm 付近に存在しており，今回の測定波長範囲（400 nm から 1100 nm）における吸光度は 0 であるため，要素から除外した．また，プローブ DNA が修飾されていない金ナノ粒子や金ナノ粒子プローブに修飾されなかったプローブ DNA は，修飾効率が非常に高いことからほとんど存在しないと考えられるため，同様に要素から除外した．

試料の吸光スペクトルが前述の 3 つの要素の吸光スペクトルからなるとすると，試料の吸光スペクトルは以下のような線型結合式で表せる．

$$\boldsymbol{X}(\boldsymbol{\lambda}) = a \cdot \boldsymbol{D}(\boldsymbol{\lambda}) + b \cdot \boldsymbol{A}(\boldsymbol{\lambda}) + h \cdot \boldsymbol{H}(\boldsymbol{\lambda})$$

$\boldsymbol{X}(\boldsymbol{\lambda})$：試料の吸光スペクトル
$\boldsymbol{D}(\boldsymbol{\lambda})$：分散状態の金ナノ粒子プローブの基準スペクトル
$\boldsymbol{A}(\boldsymbol{\lambda})$：凝集状態の金ナノ粒子プローブの基準スペクトル
$\boldsymbol{H}(\boldsymbol{\lambda})$：検出対象の核酸と交雑した金ナノ粒子の基準スペクトル
a, b, h：各成分の係数

上記の式が濃度未知のサンプルを含む試料の測定で得られた吸光スペクトルに最も近くなるように，以下の式が最小値を取るように最小二乗法を用いて各係数を決定した．

$$\sum_{l=400}^{1100} [\boldsymbol{X}(\boldsymbol{\lambda}) - \{a \cdot \boldsymbol{D}(\boldsymbol{\lambda}) + b \cdot \boldsymbol{A}(\boldsymbol{\lambda}) + h \cdot \boldsymbol{H}(\boldsymbol{\lambda})\}]^2$$

係数の決定は，Excel のソルバーを GRG 非線形エンジンで解決するように設定し行った．GRG 線型エンジンは，なめらかな非線形関数の最大値と最小値を求めることができる．hを交雑成分の係数（交雑係数）とし，RT-qPCR 法で測定した検出対象の核酸濃度との相関関係について検討した．

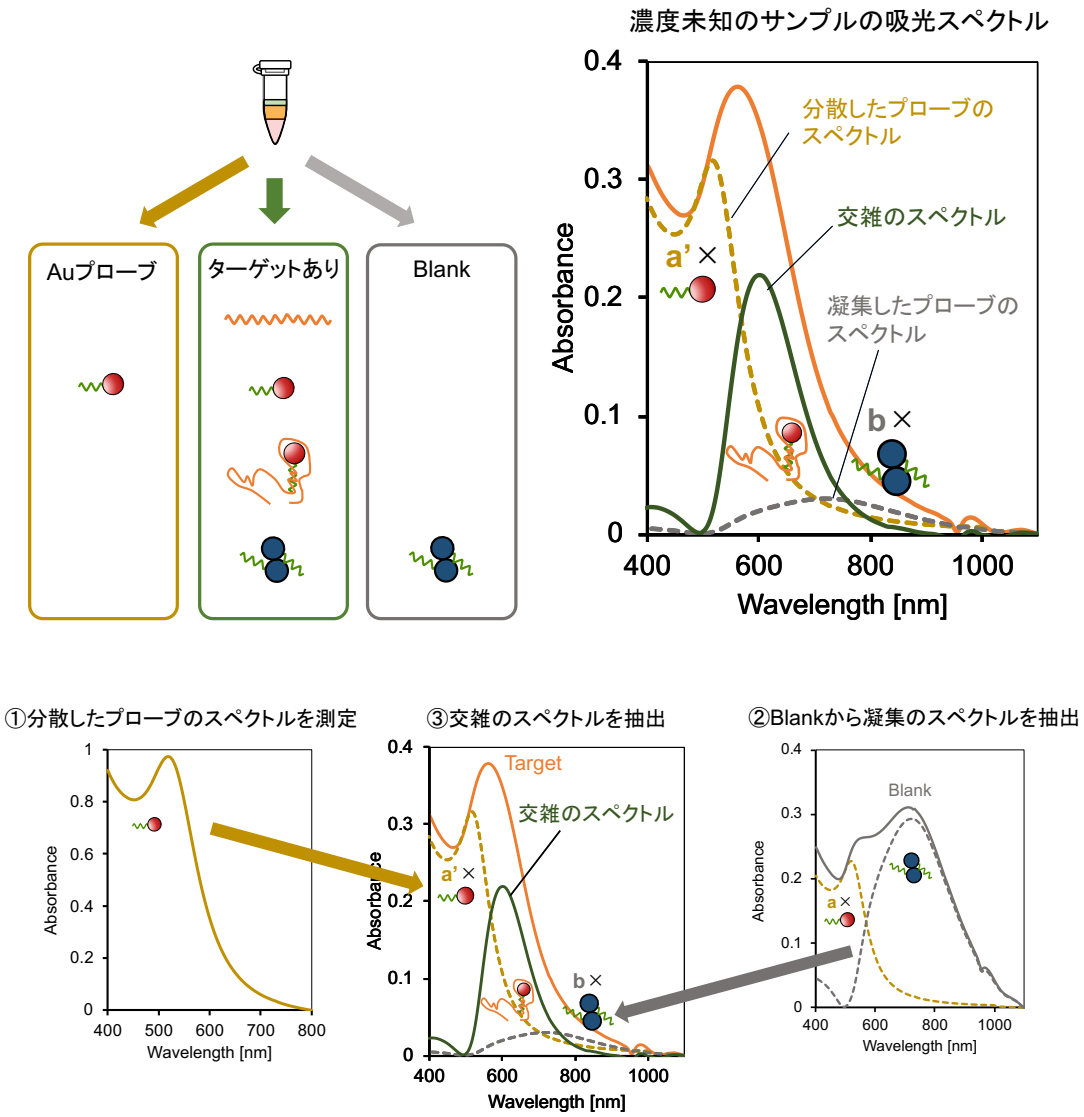


図 34　ピーク分離解析におけるピーク分離方法の概略

使用した金ナノ粒子プローブは，アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* の 16S rRNA 遺伝子の検出用 PCR プライマー（CTO189F A/B，CTO189F C，RT1R）を参考に設計した人工合成 DNA を金ナノ粒子で修飾し作製した. 複数の活性汚泥から 1/13 TY, 1/13 SK, 5/10 SK1，5/10 SK2 の 4 つの RNA サンプルを抽出した．これらを段階希釈し，金ナノ粒子プローブ（T50-cCTO189F）溶液と NaCl 溶液と混合して試料を作製した．また RNA サンプルの代わりに Nuclease-Free water を使用した Blank を作製した．試料を 95℃で 30 秒，59℃で 1 分加熱した後，紫外可視分光光度計（V630，JASCO）を用いて吸光スペクトルを測定した．吸光度比（A_{650}/A_{550}）の算出に加えて，以下のようにピーク分離を行なった．

最初に Blank のスペクトルから金ナノ粒子プローブのスペクトルを a 倍したものを引き，凝集した金ナノ粒子プローブのスペクトル（以下，凝集スペクトル）を得た．次に最も検出

対象の核酸が高濃度の RNA サンプルのスペクトルから，前述したピーク分離解析の方法にしたがって，金ナノ粒子プローブのスペクトルをa' 倍したものと凝集のスペクトルをb倍したものを引き，交雑した金ナノ粒子プローブと検出対象の核酸のスペクトル（以下，交雑スペクトル）を得た．その他の RNA サンプルについて，金ナノ粒子プローブ，凝集，交雑の 3 つのスペクトルを用いてピーク分離を行い．それぞれの係数（a“ ，b'，h）を算出した．各サンプルの交雑係数hと検出対象の核酸濃度の相関について検討した．

図 35 に検出対象の核酸濃度と交雑係数hの関係を示す．全てのサンプルで検出対象の核酸濃度が低下すると交雑係数hも小さくなる傾向が見られた．各サンプルのプロットの近似直線はそれぞれ y＝9×10-9x＋0.007（1/13 TY），y＝2×10-8x＋0.03（1/13 SK），y＝4×10-9x＋0.001（5/10 SK1），y＝8×10-9x＋0.010（5/10 SK2）であり，サンプル間でばらつきが見られた．

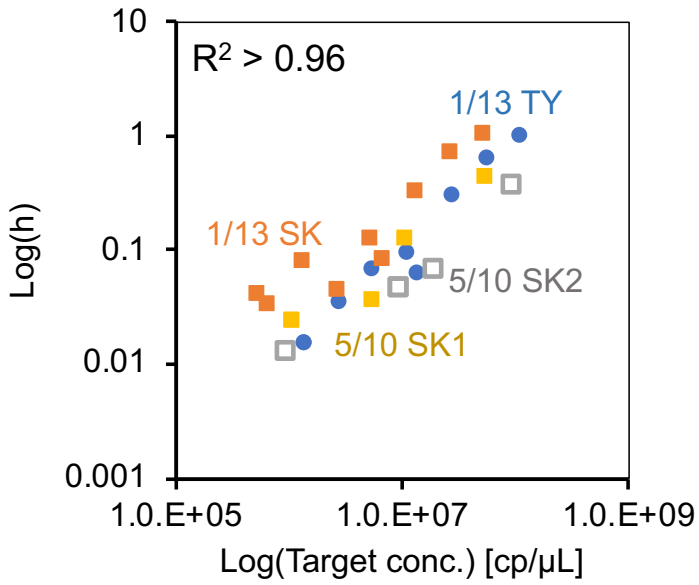


図 35　ターゲット濃度と交雑係数 h の関係

図 36 に検出対象の核酸濃度と吸光度比（A_{650}/A_{550}）の関係を示す．1/13 TY と 1/13 SK は 10^7 から 10^8 copies/μL の範囲で吸光度比の値が変化したが，5/10 SK1 と 5/10 SK2 は変化が極めて小さかった．これは，5/10 SK1 と 5/10 SK2，1/13 TY と 1/13 SK で使用した金ナノ粒子プローブの製造ロットが異なり，金ナノ粒子プローブの凝集しやすさに差があるためであると考えられる．しかし，図 35 より，交雑係数による解析では金ナノ粒子プローブのロットの違いによる差は見られなかった．よって，ピーク分離による解析では金ナノ粒子プローブのロットの違いによる測定結果の影響を小さくすることができるのではないかと考えられる．また，吸光度比による解析では，10^7 copies/μL 程度で吸光度比の値が Blank と同程

度になってしまった．しかし，交の係数による解析では，逆転はあるものの 10^6 copies/μL 程度まで係数と濃度に相関が見られた．よって，ピーク分離による解析は吸光度比による解析よりも定量範囲が広い可能性が示された．

ピーク分離解析により，吸光スペクトルから金ナノ粒子プローブ，凝集，交雑のスペクトルを分離することができた．ピーク分離により算出した交雑係数と検出対象の核酸濃度に相関が見られた．また，ピーク分離による解析では，金ナノ粒子プローブのロットの違いによる吸光スペクトルの若干の違い，つまり，測定結果のずれを補正できることから，ピーク分離による解析は吸光度比による解析よりも定量範囲が広い可能性が示された．

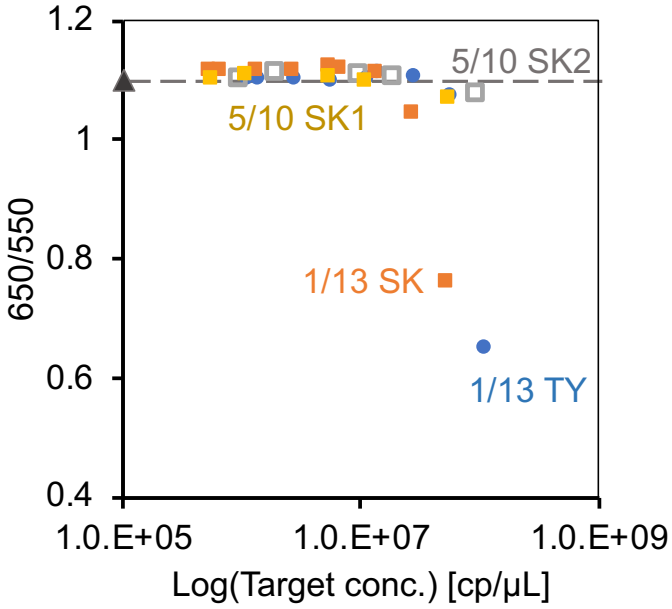


図 36　ターゲット濃度と吸光度比（A_{650}/A_{550}）の関係，図中▲は Blank

第 5 節　小括

本研究において，金ナノ粒子プローブと核酸の反応に影響を与える因子（粒子径，粒子とプローブ DNA 間のスペーサー長さなど）について，影響の程度を明らかにし，反応条件の最適化を行うことができた．さらに，非検出対象の核酸の存在や，交雑部位の外側の塩基配列が分析に与える影響の検討，暗視野顕微鏡観察による粒子の分散状態の評価等により，比色法の反応メカニズムが正しいことを検証することができた．

参考文献

- Barchanski, A., N. Hashimoto, S. Petersen, C. L. Sajti, and S. Barcikowski. 2012. 'Impact of Spacer and Strand Length on Oligonucleotide Conjugation to the Surface of Ligand-Free Laser-Generated Gold Nanoparticles'. Bioconjugate Chemistry 23 (5): 908–15. https://doi.org/10.1021/bc200462b.
- Chan, Wai Sing, Bone S.F. Tang, Maureen V. Boost, Chit Chow, and Polly H.M. Leung. 2014. 'Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Using a Gold Nanoparticle-Based Colourimetric Polymerase Chain Reaction Assay'. Biosensors and Bioelectronics 53 (March):105–11. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.027.
- Elghanian, Robert, James J Storhoff, Robert C Mucic, Robert L Letsinger, and Chad A Mirkin. 1997. 'Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles'. Science 277:1078–81. https://www.science.org.
- Fuchs, Bernhard M, Glöckner Frank O, Wulf Jörg, and Amann Rudolf. 2000. 'Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S RRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes'. Applied and environmental microbiology 66 (8): 3603–7. https://journals.asm.org/journal/aem.
- Herlemann, Daniel P.R., Matthias Labrenz, Klaus Jürgens, Stefan Bertilsson, Joanna J. Waniek, and Anders F. Andersson. 2011. 'Transitions in Bacterial Communities along the 2000 Km Salinity Gradient of the Baltic Sea'. ISME Journal 5 (10): 1571–79. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41.
- Hermansson, A., and P. E. Lindgren. 2001. 'Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR'. Applied and Environmental Microbiology 67 (2): 972–76. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.972-976.2001.
- Hu, Min, Carolina Novo, Alison Funston, Haining Wang, Hristina Staleva, Shengli Zou, Paul Mulvaney, Younan Xia, and Gregory V. Hartland. 2008. 'Dark-Field Microscopy Studies of Single Metal Nanoparticles: Understanding the Factors That Influence the Linewidth of the Localized Surface Plasmon Resonance'. Journal of Materials Chemistry 18 (17): 1949–60. https://doi.org/10.1039/b714759g.
- Jin, Rongchao, Guosheng Wu, Zhi Li, Chad A. Mirkin, and George C. Schatz. 2003. 'What Controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?' Journal of the American Chemical Society 125 (6): 1643–54. https://doi.org/10.1021/ja021096v.
- Li, Huixiang, and Lewis J. Rothberg. 2004. 'Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction'. Journal of the American Chemical Society 126 (35): 10958–61. https://doi.org/10.1021/ja048749n.
- Li, Jingjing, Qingyun Liu, Hongyan Xi, Xiangcong Wei, and Zhengbo Chen. 2017. 'Y-Shaped DNA Duplex Structure-Triggered Gold Nanoparticle Dimers for Ultrasensitive Colorimetric Detection of Nucleic Acid with the Dark-Field Microscope'. Analytical Chemistry 89 (23): 12850–56. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03391.

- Liu, Ju Hui, Kun Xi, Xi Zhang, Lei Bao, Xinghua Zhang, and Zhi Jie Tan. 2019. 'Structural Flexibility of DNA-RNA Hybrid Duplex: Stretching and Twist-Stretch Coupling'. Biophysical Journal 117 (1): 74–86. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.05.018.
- Liu, Juewen, and Yi Lu. 2006. 'Preparation of Aptamer-Linked Gold Nanoparticle Purple Aggregates for Colorimetric Sensing of Analytes'. Nature Protocols 1 (1): 246–52. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.38.
- Nakajima, Meri, Reiko Hirano, Yuki Nakaya, and Hisashi Satoh. 2023. 'Analysis of Unamplified 16S RRNA of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge by Spectrophotometry Using Gold Nanoprobes'. ACS ES and T Water 3 (9): 3113–20. https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00265.
- Nakajima, Meri, Reiko Hirano, Satoshi Okabe, and Hisashi Satoh. 2021. 'Simple Assay for Colorimetric Quantification of Unamplified Bacterial 16S RRNA in Activated Sludge Using Gold Nanoprobes'. Chemosphere 263. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128331.
- Nguyen, Dung The, Dong Joo Kim, and Kyo Seon Kim. 2011. 'Controlled Synthesis and Biomolecular Probe Application of Gold Nanoparticles'. Micron. https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.008.
- Peterson, Alexander W, Richard J Heaton, and Rosina M Georgiadis. 2001. 'The Effect of Surface Probe Density on DNA Hybridization'. Nucleic Acids Research. pp 29.
- R. Zsigmondy. 1966. Nobel Lectures, Chemistry 1922–1941. Elsevier Publishing Company.
- Shawky, Sherif M., Ahmed M. Awad, Walaa Allam, Mohamed H. Alkordi, and Sherif F. EL-Khamisy. 2017. 'Gold Aggregating Gold: A Novel Nanoparticle Biosensor Approach for the Direct Quantification of Hepatitis C Virus RNA in Clinical Samples'. Biosensors and Bioelectronics 9: 349–56. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.001.
- Storhoff, James J., Anne A. Lazarides, Robert C. Mucic, Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, and George C. Schatz. 2000. 'What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?' Journal of the American Chemical Society 122 (19): 4640–50. https://doi.org/10.1021/ja993825l.
- Xia, Fan, Xiaolei Zuo, Renqiang Yang, Yi Xiao, Di Kang, Alexis Vallée-Bélisle, Xiong Gong, et al. 2010. 'Colorimetric Detection of DNA, Small Molecules, Proteins, and Ions Using Unmodified Gold Nanoparticles and Conjugated Polyelectrolytes' PNAS 107. https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1005632107
- Zhang, Xu, Mark R. Servos, and Juewen Liu. 2012. 'Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a PH-Assisted and Surfactant-Free Route'. Journal of the American Chemical Society 134 (17): 7266–69. https://doi.org/10.1021/ja3014055.
- Zu, Yanbing, Aik Leong Ting, Guangshun Yi, and Zhiqiang Gao. 2011. 'Sequence-Selective Recognition of Nucleic Acids under Extremely Low Salt Conditions Using Nanoparticle Probes'. Analytical Chemistry 83 (11): 4090–94. https://doi.org/10.1021/ac2001516.

- 中島芽梨, 石田晃彦, 渡慶次学, 佐藤久. 2020. ‘下水中の細菌の 16S RRNA 検出用ペーパー分析チップの開発’. 分析化学 69 (12): 715–22.

第 3 章　紫外可視分光光度計を用いた検出法（比色法）の開発

第 1 節　紫外可視分光光度計

第 2 章において，紫外可視分光光度計を用いた分析法（比色法）を開発し，その反応メカニズムの検証や測定条件の最適化を行なった．第 3 章においては，比色法によって環境サンプルに含まれる核酸の検出または定量を行った．

第 2 節　実験方法

2-1　金ナノ粒子プローブの作製

金ナノ粒子プローブは，**第 2 章第 2 節 2-1　金ナノ粒子プローブの作製**の通りに行った．本実験では，5 nm の金ナノ粒子溶液 (Gold nanoparticles 5 nm diameter，OD 1，stabilized suspension in citrate buffer, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて金ナノ粒子プローブを作製した．第 3 章では，全細菌の 16S rRNA，アンモニア酸化細菌（AOB）の 16S rRNA を検出対象として分析を行った．使用したプローブ DNA は各検出対象の PCR プライマーセットを参考に設計した（表 6）．

表 6　第 3 章で使用したプローブ DNA の塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Base/bp	Ref
T50-c341F	Universal bacterial 16S rRNA	T_{50}-CTG CWG CCN CCC GTA GG	67	(Herlemann et al. 2011)
T50-805R		T_{50}-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	71	
T50-cCTO189F A/B/C	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	T_{50}-GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	9	(Hermansson and Lindgren 2001)
T50-RT1R		T_{50}-CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	72	

*)T_n はチミンが n 個連なったものを表す．

2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量

核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量は，**第 2 章第 2 節 2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量**の通りに行った．使用したプライマーセットは表 7 の通りである．抽出した RNA サンプルは逆転写により cDNA 合成を行った後，以下の条件で定量 PCR による検出対象の定量を行った．全細菌の 16S rRNA の定量：95℃ 2 分，95℃ 5 秒＋56℃ 1 分＋68℃ 30 秒を 40 サイクル(Herlemann et al. 2011)，アンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量：98℃ 2 分，98℃ 5 秒＋57℃ 30 秒＋68℃ 30 秒を 40 サイクル (Hermansson and Lindgren 2001)．検出対象の核酸の濃度は，逆転写処理による希釈の影響を考慮して再計算した．

表 7　第 3 章で使用した PCR プライマーの塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Ref.
341F	Universal bacterial 16S rRNA	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17	(Herlemann et al. 2011)
805R		GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	21	
CTO189F A/B	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	19	(Hermansson and Lindgren 2001)
CTO189F C		GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	19	
RT1R		CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	22	

2-3　分析方法

分析方法は，**第 2 章第 2 節 2-3　分析方法**と同様である．

2-4　ピーク分離による吸光スペクトルの解析方法

ピーク分離による解析は，**第 2 章第 4 節 5-9　ピーク分離解析による試料中要素の分画**の通り行った．

第 3 節　実験結果および考察

3-1　活性汚泥に含まれる全細菌の 16S rRNA の定量

本法を用いて活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA の検出を行うために，これまで最適化した条件で検量線（全細菌の 16S rRNA 濃度と吸光度比の相関式）を作成した．使用した RNA サンプルは検量線の作成に用いたものとは別のものを使用した．具体的には，創成川水再生プラザにて 2020 年 2 月 18 日に採取し，2 月 28 日まで実験室内で塩化アンモニウムを添加し培養した活性汚泥（n=8）から抽出し，原液または Nuclease-Free water にて 10 倍または 100 倍希釈したものを使用した．AOB の 16S rRNA 濃度は 7.5×145 から 4.2×10^{8} copies/μL であった．

図 37 に RT-qPCR 法での濃度と本法での濃度を比較した結果を示す．図中の灰色の部分が検量線の範囲よりも低濃度または高濃度の部分を表している．本法での濃度が RT-qPCR 法での濃度に近いほど，プロットは図中の点線（y=x）に近づく．16S rRNA 濃度が 5.8×10^{8} copies/mL-AS 以下の場合，吸光度比はおよそ 3.2 と高くなった．16S rRNA 濃度が高くなるにつれて，吸光度比は 3.2 から減少し，16S rRNA 濃度が 7.4×10^{8} copies/mL-AS を超えると 0.2 となった．検量線の傾きは-1.31（単位対数濃度あたりの吸光度比）であった．熱処理を行わなかった試料の吸光度比は 0.25 から 0.55 の範囲であり, 傾きは-0.11 であった(Nakajima et al. 2021)．このことは，加熱ステップを導入することで比色法の検出感度，すなわち検量線の傾きが有意に改善されることを示していた．

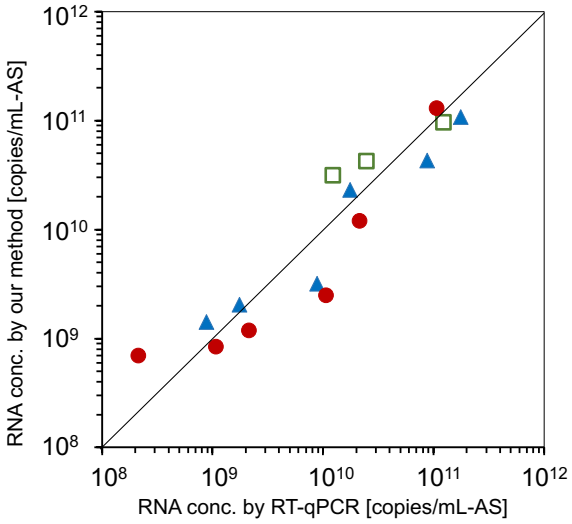


図 37　活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA の定量

3-2　活性汚泥に含まれるアンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量

本法を用いて活性汚泥中のアンモニア酸化細菌（AOB）の 16S rRNA の検出を行うために，これまで最適化した条件で検量線（AOB の 16S rRNA 濃度と吸光度比の相関式）を作成した．使用した RNA サンプルは検量線の作成に用いたものとは別のものを使用した．具体的には，創成川水再生プラザにて 2020 年 2 月 18 日に採取し，2 月 28 日まで実験室内で塩化アンモニウムを添加し培養した活性汚泥（n=8）から抽出し，原液または Nuclease-Free water にて 10 倍または 100 倍希釈したものを使用した．AOB の 16S rRNA 濃度は 7.5×10^5 から 4.2×10^8 copies/μL であった．

図 38 に RT-qPCR 法での濃度と本法での濃度を比較した結果を示す．図中の灰色の部分が検量線の範囲よりも低濃度または高濃度の部分を表している．本法での濃度が RT-qPCR 法での濃度に近いほど，プロットは図中の点線（y=x）に近づく．本法での濃度と RT-qPCR 法での濃度と同様の傾向を示したが，検量線の範囲より低濃度では過大評価，高濃度では過小評価した．RT-qPCR 法での濃度に対する本法での濃度の誤差（本法での濃度を RT-qPCR 法での濃度で除し，100 をかけたもの）は，検量線の範囲内の RNA サンプルでは 22.7 から 142.3 %，検量線の範囲より低濃度では 136.0 から 295.1 %，高濃度では 14.1 から 45.5 %であった．全ての NRA サンプルでは 14.1 から 295.1 %の誤差範囲で定量可能であった．以上より，本法は RT-qPCR 法とほぼ同程度に AOB の 16S rRNA 濃度を定量することができた．定量範囲は 7.5×105 から 4.2×10^8 copies/μL であった．誤差は検量線の範囲内の RNA サンプルでは 22.7 から 142.3 %，全ての RNA サンプルでは 14.1 から 295.1 %であった．

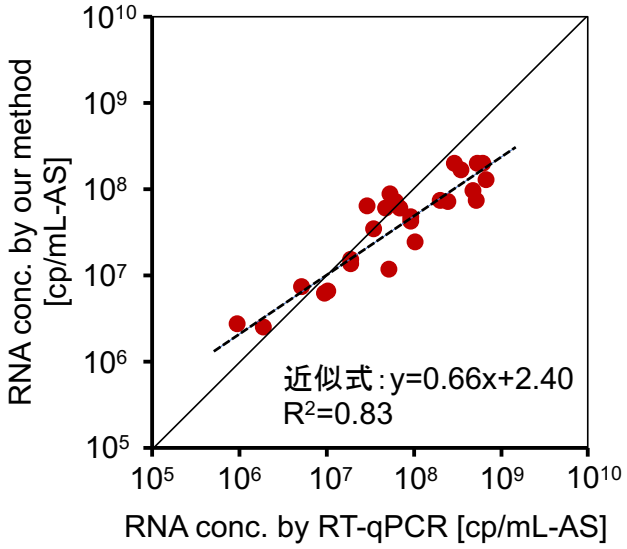


図 38　アンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量

3-3　検出範囲の拡大を目指したピーク分離による解析方法の導入

図 39 に，同じ吸光スペクトルについて吸光度比による解析またはピーク分離による解析を行った結果を示す．検出下限について，吸光度比による解析では 10^{6} copies/total-RNA 程度であったのに対し，ピーク分離による解析では 10^{3} copies/total-RNA 程度であった．つまり，ピーク分離による解析を導入することで，より低濃度の核酸を検出可能であることが示された．

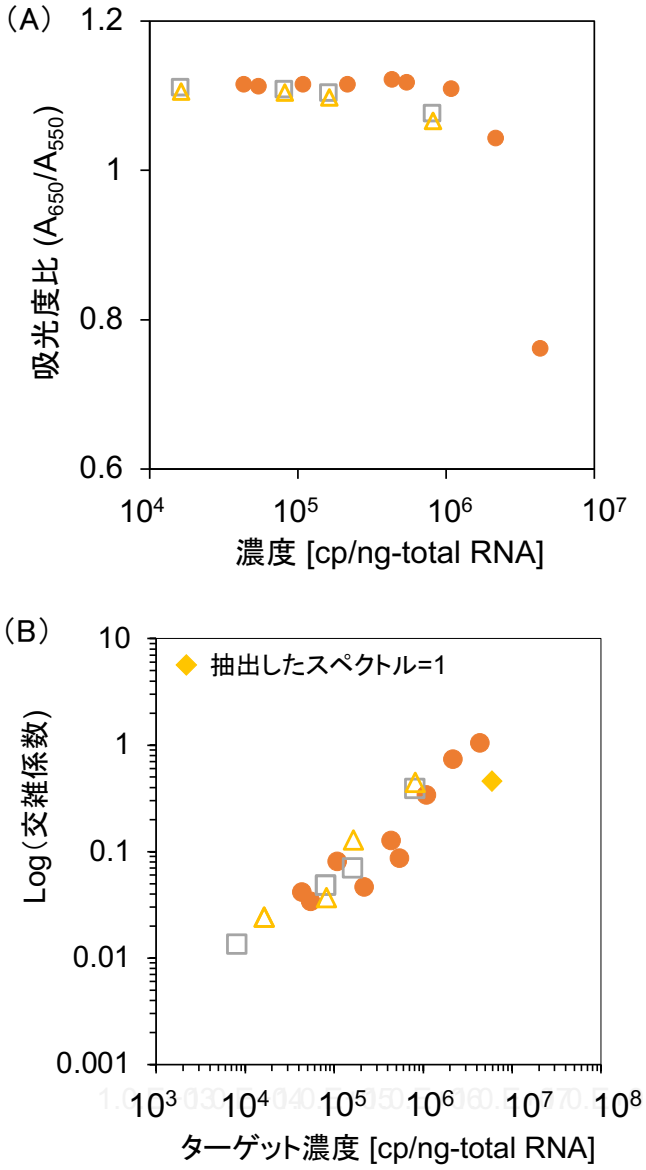


図 39　吸光度比による解析とピーク分離による解析の比較，(A)吸光度比による解析，(B)ピーク分離による解析

第 4 節　小括

本研究では，環境試料から抽出した 16S rRNA を増幅せずに分析することができる簡便で迅速な比色法を開発することとした．まず，検出方法の検証を行い，次に細菌の 16S rRNA と同一の配列を持つ人工合成 DNA の検出を試みた．その後，測定条件の最適化を行った．さらに，活性汚泥および嫌気性アンモニア酸化法（アナモックス）試料から抽出した全細菌の 16S rRNA 量を測定し，全細菌の 16S rRNA 量を算出した．得られた実験結果を基に，本法の推定されるセンシング機構，最適な操作条件を決定する化学，および環境工学の観点からの本法の重要性について議論した．本法は活性汚泥およびアナモックス試料から抽出した全細菌の 16S rRNA 濃度を定量することができた．我々の知る限り，本研究において初めて，金ナノ粒子プローブを用いた比色法により廃水処理プロセス中バイオマスの全細菌の 16S rRNA を定量化することができた．本研究での結果は，これまでの増幅に基づく核酸分析法とは対照的に，本法がシンプルでオンサイト分析可能な比色分析法となりうることを示している．

参考文献

- Herlemann, Daniel P.R., Matthias Labrenz, Klaus Jürgens, Stefan Bertilsson, Joanna J. Waniek, and Anders F. Andersson. 2011. ‘Transitions in Bacterial Communities along the 2000 Km Salinity Gradient of the Baltic Sea’. ISME Journal 5 (10): 1571–79. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41.
- Hermansson, A., and P. E. Lindgren. 2001. ‘Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR’. Applied and Environmental Microbiology 67 (2): 972–76. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.972-976.2001.

第 4 章　光導波路分光装置を用いた検出法（光導波路法）の開発

第 1 節　光導波路分光装置

第 3 章で開発した比色法は，すでに普及している紫外可視分光光度計を用いるため，実際の現場へ導入するハードルは低いと考えられる．しかしながら，比色法の定量下限は 10^4 copies/μL 程度であり(Nakajima et al. 2023)，非常に低濃度である病原微生物やウイルスの核酸分析には適していない．同様に，これまでに開発された比色分析法（10^{10} copies/μL）(Mollasalehi and Shajari 2021), Förster resonance energy transfer に基づく分析法（約 10^7copies/μL）(Zavoiura, Resch-Genger, and Seitz 2018)，および表面増強ラマン分光法に基づく分析法（約 10^5 copies/μL）(Ngo et al. 2018)の検出下限は，RT-qPCR（約 1 copies/μL）の検出下限よりも高い．したがって，これらの光学的分析によって未増幅の RNA を検出するためには検出下限の高さが課題のひとつである．

上記の課題を解消するために，光散乱に基づいて検出対象の DNA と金ナノ粒子プローブの交雑を検出する分析法が開発されてきた(Dhadwal et al. 2004; Stambaugh et al. 2021; Stimpson et al. 1995; Storhoff et al. 2004; Huertas, Fariña, and Lechuga 2016)．金ナノ粒子プローブの散乱光を用いた DNA 測定においては，吸光度に基づく分析法よりも 4 桁高い感度が得られた(Storhoff et al. 2004)．この分析法の検出感度は，検出対象の DNA にと交雑した金ナノプローブの距離による散乱光強度の増強に依存する．これまでに開発された光導波路を用いた分析法では, 臨床サンプル中に存在するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の mecA 遺伝子を検出でき(Storhoff et al. 2004)，また合成 DNA も高感度で検出可能であった(Stimpson et al. 1995)．しかし，これらの方法が RNA の検出に適用されたことはない(Dhadwal et al. 2004; Stambaugh et al. 2021; Huertas, Fariña, and Lechuga 2016).

そこで，ナノスケールで微量物質を光学的に分析することができる光導波路分光装置を用いた分析法（光導波路法）を開発することとした．

光導波路分光装置では，白色光を光導波路（導波路ガラス）に全反射条件を満たすように入射角を設定して，その導波路界面数 100 nm に生じるエバネッセント光（波）を利用し，プラズモン共鳴，固体表面，薄膜，極微量試料，生化学的試料の分光特性を測定することができる(高橋，棚上 2008). 光導波路の最大の特徴は，おおよそ波長オーダーからサブミリオーダーの厚みの光導波路へ白色光を入射し，全反射を繰り返し試料との相互作用の回数を増やすことで，高感度なスペクトル測定を実現できることである．

エバネッセント光の染み込み深さは一般にdpで表され，以下の式のように波長に正比例する．また，導波路と被測定環境の屈折率の比，全反射の角度等で決まる．

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n_1 (sin^2\theta - (\frac{n_2}{n_1})^2)^{1/2}}$$

dp：染み込み深さ
λ：波長
θ：入射角
n_1：導波路の屈折率
n_2：導波路に接している外側の屈折率

また，エバネッセント光の電場強度は以下の式で表される．よって，エバネッセント光の電場強度は界面から離れるにしたがって指数関数的に減少する．

$$E = E_0 e^{(\frac{-2X}{dp})}$$

E：電場強度
E_0：界面の電場強度
X：界面からの距離
dp：染み込み深さ

全反射が起こる入射角度はスネルの法則より算出することができる．

$$\sin\theta_{critical} = \frac{n_A}{n_B}$$

$\theta_{critical}$：臨界角（媒質 B から媒質 A への入射角）

媒質 B から媒質 A への入射角を θ_B とすると，$\theta_B > \theta_{critical}$ が全反射の起こる角度である．

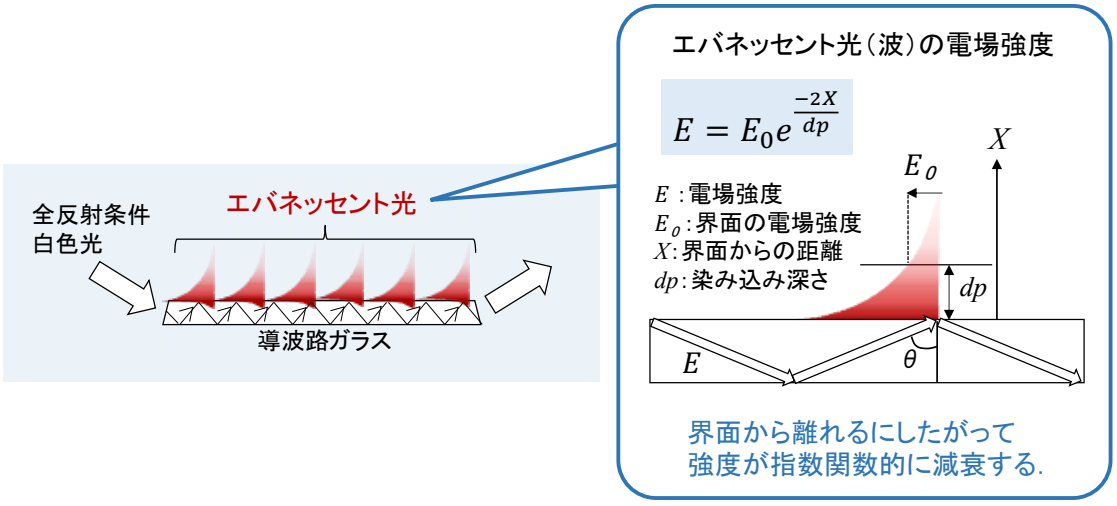


図 39　光導波路分光装置の概要

本研究室の光導波路分光装置（システム・インスツルメンツ）はキセノンランプを光源とする．図 40 に測定室内の様子を示す．アームの角度を調整することで入射光の角度を変更することができる．光ファイバー（写真内の赤または青のケーブル）を用いて写真内中央部分の試料台にセットした導波路ガラスへ白色光を入射する．中央の検出孔の下部に CCD 分光器が設置されており，これを検出器として散乱光スペクトルを測定する．

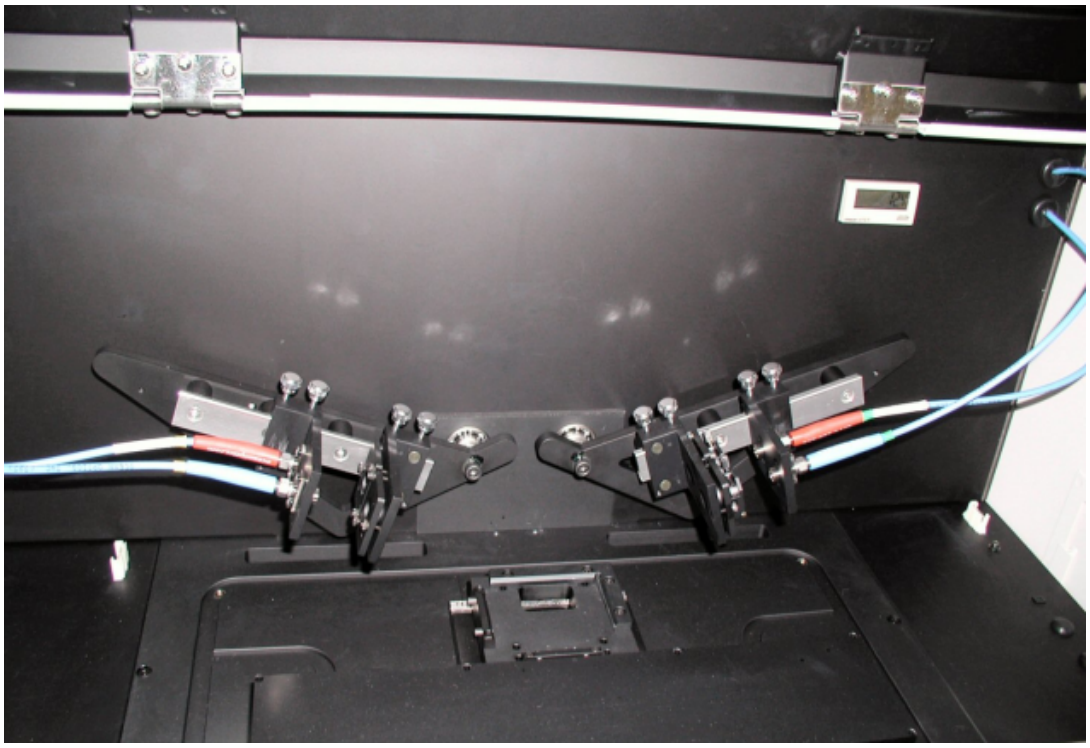


図 40　光導波路分光装置（SSPR6000，システムインスツルメンツ社）の測定室内の様子

第 2 節　実験方法

2-1　金ナノ粒子プローブの作製

金ナノ粒子プローブは,**第 2 章第 2 節 2-1　金ナノ粒子プローブの作製**の通りに行った．光導波路では，50 nm の金ナノ粒子溶液 (Gold nanoparticles 50 nm diameter，OD 1，stabilized suspension in citrate buffer, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて金ナノ粒子プローブを作製した．第 4 章では，全細菌の 16S rRNA，アンモニア酸化細菌（AOB）の 16S rRNA，腸管出血性大腸菌 Escherichia coli 0157:H7 が持つ *eae* 遺伝子の mRNA，SARS-CoV-2 のゲノム RNA を検出対象として分析を行った．使用したプローブ DNA は各検出対象の PCR プライマーセットを参考に設計した（表 8）．

表 8　第 4 章で使用したプローブ DNA の塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Ref.
T50-c341F	Universal bacterial 16S rRNA	T_{50}-CTG CWG CCN CCC GTA GG	67	(Herlemann et al. 2011)
T50-805R		T_{50}-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	71	
T50-cCTO189F A/B/C	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	T_{50}-GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	9	(Hermansson and Lindgren 2001)
T50-RT1R		T_{50}-CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	72	
T50-c-*eae*-O157:H7_F	Escherichia coli O157:H7 *eae* gene mRNA	T_{50}-CAA AAA TTT ATT ACC ATC CAC ACA GA	26	(Sharma 2006)
T50-*eae*-O157:H7_R		T_{50}-AAA TGG ACA TAG CAT CAG CAT AAT AGG CTT GCT	33	
T50-c-N_Sarbeco_F1	SARS-CoV-2 genomic RNA (Nucleocapsid gene)	T_{50}-GAT TGC GGG TGC CAA TGT G	19	(Shirato et al. 2021)
T50-c-N_Sarbeco_R1		T_{50}-GAG GAA CGA GAA GAG GCT TG	20	
T50-c-NIID_2019-nCOV_F2	SARS-CoV-2 genomic RNA (Nucleocapsid gene)	T_{50}-GTT CCT GGT CCC CAA AAT TT	20	(Shirato et al. 2021)
T50-NIID_2019-nCOV_R2		T_{50}-TGG CAG CTG TGT AGG TCA AC	20	

*)T_n はチミンが n 個連なったものを表す.

2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量

核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量は, **第 2 章第 2 節 2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量**の通りに行った．使用したプライマーセットは以下の通りであり，使用したプライマーセットは表 9 の通りである．抽出した RNA サンプルは逆転写により cDNA 合成を行った後，以下の条件で定量 PCR による検出対象の定量を行った．全細菌の 16S rRNA の定量：95℃ 2 分，95℃ 5 秒＋56℃ 30 秒＋68℃ 30 秒を 40 サイクル(Herlemann et al. 2011)，アンモニア酸化細菌の 16S rRNA の定量：98℃ 2 分，98℃ 5 秒＋57℃ 1 分＋68℃ 30 秒を 40 サイクル(Hermansson and Lindgren 2001)，O157:H7 が持つ *eae* 遺伝子の mRNA の定量：98℃ 2 分，98℃ 5 秒＋55℃ 30 秒＋68℃ 30 秒を 40 サイクル (Sharma 2006)．SARS-CoV-2 のゲノム RNA 検出の際の RNA 抽出と PCR 条件については後述する．検出対象の核酸の濃度は，逆転写処理による希釈の影響を考慮して再計算した．

表 9　第 4 章で使用した PCR プライマーの塩基配列

Name	Target	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Ref.
341F	Universal bacterial 16S rRNA	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17	(Herlemann et al. 2011)
805R		GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	21	
CTO189F A/B	Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	GGA GRA AAG CAG GGG ATC G	19	(Hermansson and Lindgren 2001)
CTO189F C		GGA GGA AAG TAG GGG ATC G	19	
RT1R		CGT CCT CTC AGA CCA RCT ACT G	22	
eae-O157:H7_F	Escherichia coli O157:H7 *eae* gene mRNA	TCT GTG TGG ATG GTA ATA AAT TTT TG	26	(Sharma 2006)
eae-O157:H7_R		AAA TGG ACA TAG CAT CAG CAT AAT AGG CTT GCT	33	
N_Sarbeco_F1	SARS-CoV-2 genomic RNA (Nucleocapsid gene)	CAC ATT GGC ACC CGC AAT C	19	(Shirato et al. 2021)
N_Sarbeco_R1		GAG GAA CGA GAA GAG GCT TG	20	
NIID_2019-nCOV_F2	SARS-CoV-2 genomic RNA (Nucleocapsid gene)	AAA TTT TGG GGA CCA GGA AC	20	(Shirato et al. 2021)
NIID_2019-nCOV_R2		TGG CAG CTG TGT AGG TCA AC	20	

2-3　分析方法

本法では 2 種の金ナノ粒子プローブが検出対象の核酸の核酸にハイブリダイズすることにより近接し，金ナノ粒子プローブの散乱光強度が増大する(Storhoff et al. 2004). という性質を利用して，検出対象の核酸を定量する．試料に検出対象の核酸が含まれる場合，金ナノ粒子プローブは検出対象の核酸とハイブリダイズし，金ナノ粒子が近接することで散乱光強度が増大する．検出対象の核酸が含まれない場合，金ナノ粒子プローブは分散状態であるため単一の金ナノ粒子の散乱光強度が測定される．あらかじめ作成した検量線（RT-qPCR 法での濃度と波長 500 nm 散乱光強度の相関式）から，本法での濃度を算出する．

2 種の金ナノ粒子プローブ溶液（各種 2 μL，計 4 μL），RNA サンプル 5 μL，MgCl2 溶液 1 μL をこの順によく混合し試料を作製する. 試料を 95℃で 30 秒, 37℃で 3 分加熱したのち，石英導波路上に任意の量を滴下し，散乱光スペクトルを測定した.

第 3 節　実験結果および考察

3-1　異なる凝集状態の金ナノ粒子の吸光スペクトルと散乱光スペクトルの関係

波長より小さいナノ粒子の散乱メカニズムを表すレイリー散乱の理論によると，ナノ粒子からの散乱光強度は粒径の 6 乗に比例するため，粒径が大きくなるにつれて散乱光強度は急激に増大する．これまで，本研究室では光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトルの測定を行ったことがなかったため，本研究室の光導波路分光装置で金ナノ粒子の散乱光スペクトルを測定できること，異なる凝集状態（粒径）の金ナノ粒子で散乱光スペクトルが変化することを確認し，吸光スペクトルと散乱光スペクトルの関係について検証と検討を行なった．直径 5 nm の金ナノ粒子溶液 35 μL に Milli-Q 水または異なる濃度の NaCl 溶液 25 μL を添加し，試料の NaCl 最終濃度が 0，18，３６，182，364，1818 mM となるように調整した．試料を 95℃で 3 分加熱したのち，吸光スペクトル測定を行なった．吸光スペクトル測定に用いた試料を回収し，石英導波路に 10 μL 滴下した．滴下から 30 分後に散乱光スペクトルを測定した．

図 41 に（A）各試料の吸光スペクトルと（B）NaCl 最終濃度と吸光度比（A630/A530）の関係を示す. 図 6-4-1 (A)より, NaCl 最終濃度が高くなるほどスペクトルがブロードになり，スペクトルが長波長側へシフトした．0 mM から 36 mM まではスペクトルがわずかに長波長側へシフトしたのみで，吸光度の低下は見られなかった．対して，182 mM より高い濃度ではスペクトルのシフトと吸光度の低下が顕著であった．また，ピークの吸光度（またはピークがはっきりしない場合は吸光度の最大値）は，0 mM が 0.71 であったのに対し，1818 mM では 0.31 であった．

図 41（B）より NaCl 最終濃度が高くなるにしたがって吸光度比が対数関数的に増加した．吸光度比の変化が対数関数的であったのは，粒径が大きくなると粒子数が減少し粒子濃度が低下するため，吸光度の変化が小さくなっているためであると考えられる．

図 41(C)に各試料の散乱光スペクトルを示す．本研究室の光導波路分光装置で測定した金ナノ粒子の散乱光スペクトルは波長 500 nm にピークを示した．光導波路分光装置の光源であるハロゲンランプのスペクトルとは形状やピーク波長が異なること，溶媒や Milli-Q 水を滴下した場合には散乱光強度が測定されないことから，図 6-4-1 (C)は金ナノ粒子特有のスペクトルであると考えられる．0 mM から 364 mM までは，NaCl 最終濃度が高くなるにつれて散乱光強度が増大した．しかし 1818 mM では散乱光強度が低下した．

図 41(D)に NaCl 最終濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．0 mM から 364 mM までは, NaCl 最終濃度が高くなるにしたがって波長 500 nm の散乱光強度が対数関数的に増加したが，1818 mM では 253.8 に低下した．1818 mM は散乱光スペクトル測定時に滴下した試料が白くなっていた．これは NaCl 濃度が高すぎたために，乾燥によって試料表面に NaCl が析出したものであると考えられる．NaCl の析出により，測定条件（試料の屈折率，乾燥状態）が変化し，光の散乱の状態も変化したのではないかと考えられる．

以上より，本研究室の光導波路分光装置を用いて金ナノ粒子の散乱光スペクトルを測定できること，異なる凝集状態（粒径）の金ナノ粒子で散乱光スペクトルが変化すること，を確認することができた．また，吸光スペクトルと散乱光スペクトルは NaCl 最終濃度の変化に対して同様の挙動を示したが，散乱光スペクトル測定は NaCl 濃度による試料表面の散乱状態の変化の影響を大きく受けることが明らかとなった．

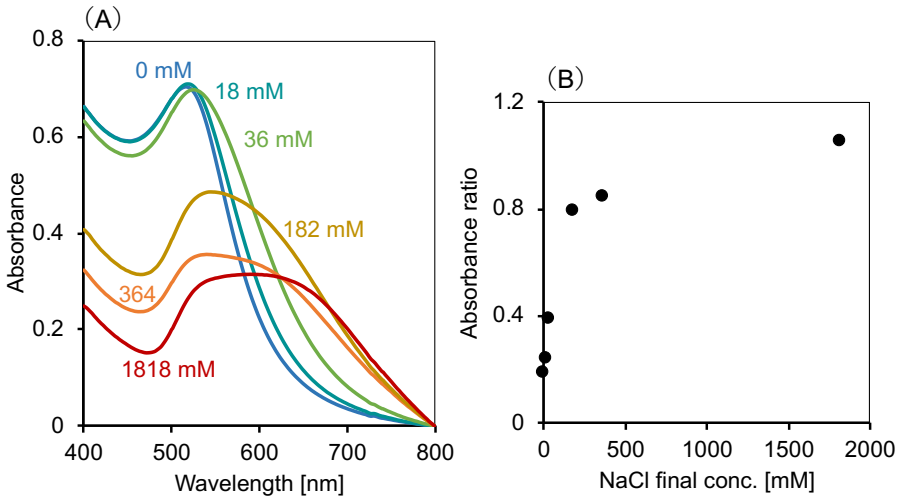
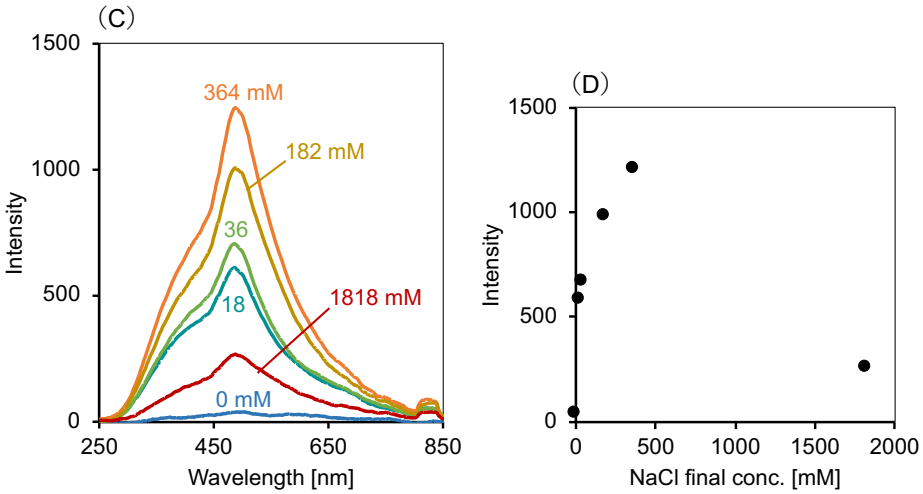


図 41　金ナノ粒子の凝集状態（NaCl 最終濃度）と吸光度の関係
（A）異なる NaCl 最終濃度になるよう調整した金ナノ粒子溶液の吸光スペクトル
（B）NaCl 最終濃度と吸光度比（A_{630}/A_{530}）の関係



（C）異なる NaCl 最終濃度になるよう調整した金ナノ粒子溶液の散乱光スペクトル
（D）NaCl 最終濃度と波長 500nm の散乱光強度の関係

3-2　スペーサー長さが測定に与える影響

比色法において，金ナノ粒子プローブを用いた測定ではスペーサーの長さが測定結果に大きく影響を与える．よって，同様に光導波路法においてもスペーサーの長さが測定に与える影響について検討した．

図 42（A）に異なるスペーサー長さの金ナノ粒子プローブを用いて作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含むサンプル（NEG）の散乱光スペクトルを示す．POS のピークの散乱光強度は，0 base が 125，25 base が 170，50 base が 180，75 base と 100 base が 187 であった．NEG のピーク波長はスペーサーの長さにかかわらず 50 程度であった．図 42（B）にスペーサーの長さと波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．POS と NEG の波長 500 nm の散乱光強度の差は，0，25，50，75，100 base の順に，71.7，112.2，115.5，116.2，109.3 であった．よって，0 base では POS と NEG の差が小さかったが，25，50，75，100 base ではそれほど差が見られなかった．

以上より，0 base で POS と NEG の散乱光強度の差が最も小さくなったが，25，50，75，100 base ではそれほど差が見られなかった．これより，以降の実験では比色法と同様に 50 base のスペーサーを採用することとした．

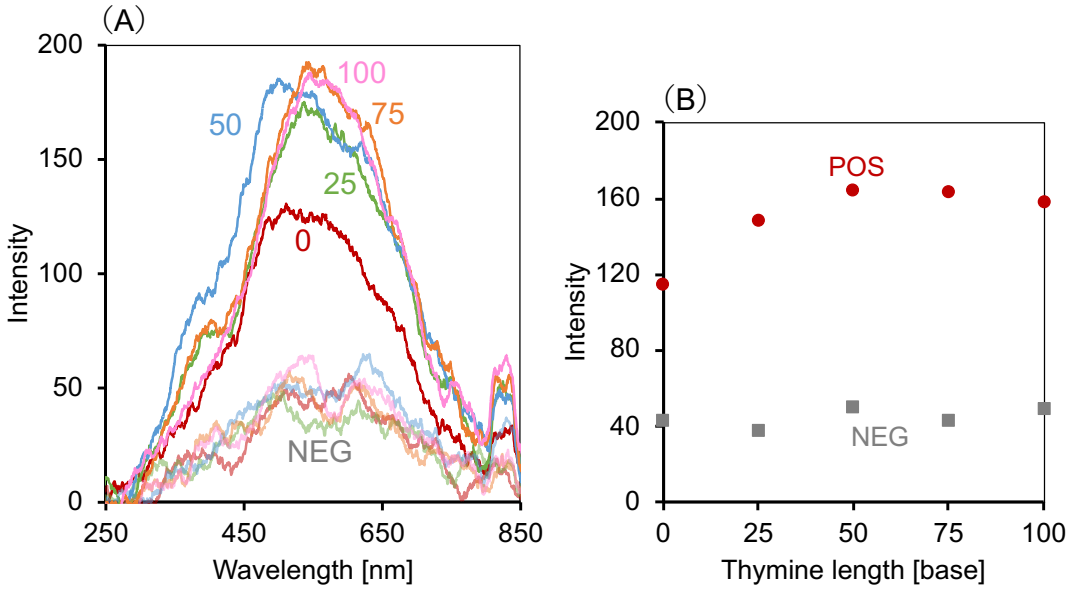


図 42　スペーサーの長さが測定に与える影響

（A）異なるスペーサー長さの金ナノ粒子プローブで作成した POS と NEG の散乱光スペクトル

（B）スペーサーの長さと波長 500 nm の散乱光強度の関係

3-3　金ナノ粒子プローブ濃度が測定に与える影響

金ナノ粒子から発生する散乱光は粒径が大きくなるほど増大する．よって光導波路法においてはシグナル（散乱光）を増大するために，粒径の増大にともなう交雑効率の低下を考慮した上で，より大きい金ナノ粒子を用いることが望ましいと考えられる．しかし，市販の金ナノ粒子の濃度は直径が大きくなるほど低下する．金ナノ粒子の濃度が低下すると散乱光強度は低下する．よって，遠心分離による金ナノ粒子プローブの濃縮を行うことで，散乱光強度の増大を試みた．また，これにより金ナノ粒子に固定されなかったフリーのプローブDNA が除去されるため，測定精度の向上にもつながると考えられる．

図 43（A）に異なる金ナノ粒子プローブ濃度で作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の散乱光スペクトルを示す．金ナノ粒子プローブの濃度は 249 pM（1.5×10^{8} 個/μL），437 pM（2.6×10^{8} 個/μL），249 pM（5.3×10^{8} 個/μL）と設定した．金ナノ粒子プローブは全細菌の 16S rRNA を検出対象の核酸とする T50-c341F と T50-805R を使用した．図中括弧内の数字は RNA サンプル中の検出対象の核酸（全細菌の 16S rRNA）の濃度を示している．RNA サンプル中の検出対象の核酸濃度が 1.3×107 copies/μL の場合，437 pM と 875 pM では散乱光スペクトルに大きな差は見られなかった．875 pM では 437 pM に比べて 500 nm から 650 nm の散乱光強度が高くなっており，ピークがわずかに長波長側へシフトしていた．これは金ナノ粒子プローブの濃度が高くなることで凝集が進んだためであると考えられる．よって，検出対象の核酸のコピー数に対して金ナノ粒子プローブが過剰になっていったとしても，散乱光スペクトルに大きな変化は見られないということが明らかになった．また，RNA サンプル中の検出対象の核酸濃度が 2.7×10^{9} copies/μL の場合，249 pM に比べて 437 pM の散乱光強度が増大していた．この時，金ナノ粒子プローブの数に対して検出対象の核酸のコピー数が過剰な状態である．よって，金ナノ粒子プローブの濃度が高いほど検出対象の核酸にハイブリダイズする金ナノ粒子プローブの数が増え，散乱光強度が増大したと考えられる．

図 43（B）に金ナノ粒子プローブ濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．散乱光強度は，249 pM では 53.5 から 98.8，438 pM では 54.5 から 196.7，875 pM は 67.5 から 124.5 の範囲で変化した．また，875 pM では検出対象の核酸の濃度が高くなるにつれて散乱光強度の増大が緩やかになっている，つまり，散乱光強度の増大が限界に近づいていた．これは，金ナノ粒子プローブの濃度が高すぎるために内部遮蔽（励起光が金ナノ粒子まで届かない）が起こり，交雑した金ナノ粒子プローブまで励起光が届いていないためであると考えられる．

以上より，最適な金ナノ粒子プローブ濃度は，検出対象の核酸の濃度の変化に対する散乱光強度の変化が最も大きく，検出範囲が最も広い 437 pM であることが示された．

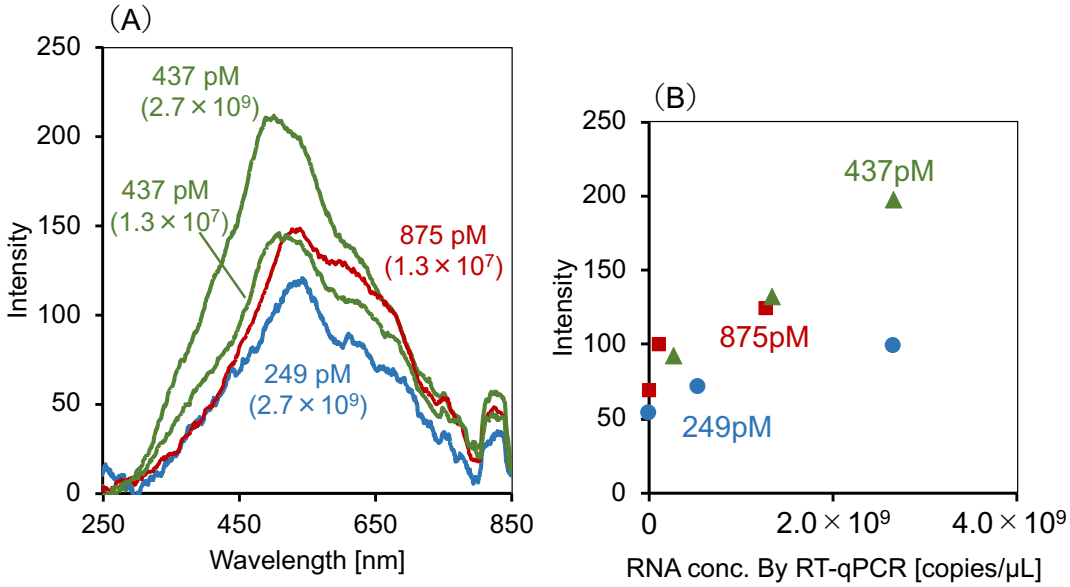


図 43　金ナノ粒子プローブ濃度が測定に与える影響

（A）異なる金ナノ粒子プローブ濃度で作製した POS の散乱光スペクトル

（B）金ナノ粒子プローブ濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係

3-4　凝集剤（$MgCl_2$）濃度が測定に与える影響

光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトルの測定において高濃度の NaCl 溶液を凝集剤として用いた場合，試料表面に NaCl が析出し測定に大きな影響を与えることが明らかとなった．また，光導波路法において交雑による金ナノ粒子プローブの近接による散乱光強度の変化を測定するため，比色法のようにハイブリダイズしなかった金ナノ粒子プローブを凝集させる必要はない．よって，光導波路法で交雑の促進を主目的として塩を添加する必要がある．以上の理由から，光導波路法では NaCl と比較してより低濃度で検出対象の核酸やプローブ DNA の負電荷を中和できる $MgCl_2$ を用いることとした．

図 44（A）と（B）に異なる $MgCl_2$ 濃度で作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の散乱光スペクトルを示す．（A）には 0.0，0.5，1.0 mM，（B）には 1.5，2.0，2.5 mM の POS（実線）と NEG（破線）のスペクトルを示す．これより，0.0 mM と 2.5 mM では NEG の散乱光強度が増大し，他の試料に比べて POS と NEG の差が小さかった．POS の散乱光強度は 0.0 から 1.5 mM にかけて増大し，1.5，2.0，2.5 mM では同程度となった．NEG の散乱光強度は 0.0 mM が 52.3，0.5 から 2.0 mM にかけては 45 から 50 程度，2.5 mM は 157.6 であった．

図 44（C）に $MgCl_2$ 最終濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．POS の波長 500 nm の散乱光強度は 0 から 1.5 mM にかけて増大し，1.5 mM より高濃度では減少した．2.0, 2.5 mM では滴下した試料表面が白くなっていた．よって，$MgCl_2$ 最終濃度が高くなると $MgCl_2$ が析出し，NaCl を使用した場合と同様に散乱光強度が低下したと考えられる．NEG の波長 500 nm の散乱光強度は，0 から 2.0 mM では 45 から 50 程度であったが，2.5 mM で 111.9 と 2 倍程度に増大した．この理由は不明であるが，RNA が含まれる POS と核酸を全く含まない NEG では滴下した試料中の金ナノ粒子プローブの位置関係や界面からの距離が異なるためではないかと考えられる．また，POS と NEG の散乱光強度の差は 0.0, 0.5, 1.0, 1.5，2.0，2.5 mM の順に 18.7，62.8，95.0，159.2，154.6，58.0 であり，1.5 mM で最も差が大きくなった．

以上より，最適な $MgCl_2$ 最終濃度は，POS と NEG の波長 500 nm の散乱光強度の差が最も大きい，1.5 mM であることが示された．

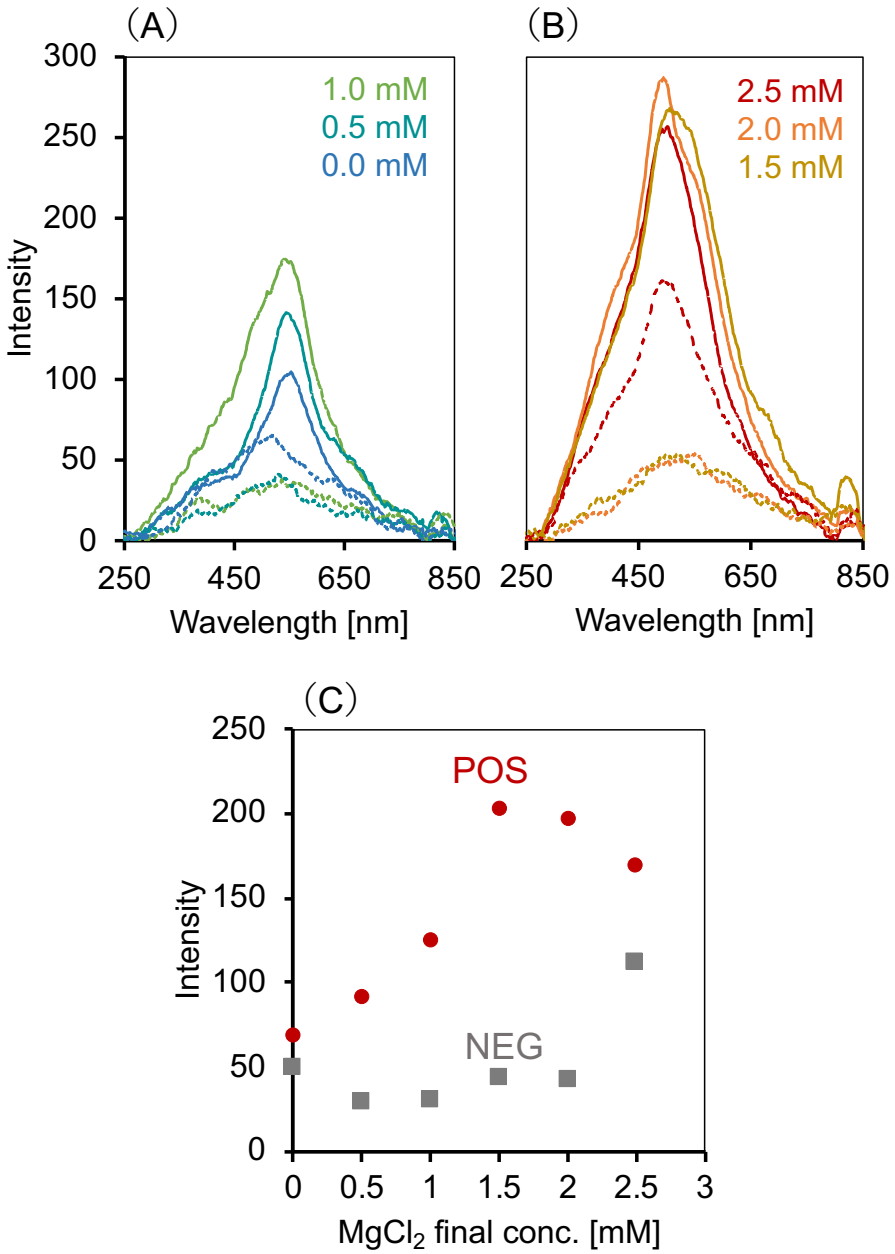


図 44　$MgCl_2$ 最終濃度が測定に与える影響，（A）異なる $MgCl_2$ 最終濃度で作製した POS（実線）と NEG（破線）の散乱光スペクトル，（B）$MgCl_2$ 最終濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係

3-5　加熱温度が測定に与える影響

これまで散乱光スペクトル測定前の加熱ステップにおいて，第一段階の温度は，PCR 法でも採用されている核酸の熱変性に最適な 95 ℃と設定していた．しかし，高温で加熱するほど金ナノ粒子プローブの凝集も促進されてしまうため，95 ℃が最適な温度であるかどうかは不明であった．そこで，加熱第一段階の温度を 95，75，55，37 ℃（加熱ステップの第二段階の温度と同じ）に変更し，測定結果への影響について検討した．

図 45（A）に異なる加熱温度で作製した RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の散乱光スペクトルを示す．POS の散乱光強度は，95，75，55，37 ℃の順に，183.6，125.2，105.4，76.8 であり，加熱温度が低下するにしたがって減少した．NEG の散乱光強度は 95，75，55，37 ℃の順に，35.3，57.8，52.3，65.4 であり，加熱温度と散乱光強度に相関は見られなかった．また，各温度において POS と NEG でピーク波長がわずかに異なっていたが，原因は不明である．図 45（B）に加熱温度と波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．POS の波長 500 nm の散乱光強度は加熱温度が高くなるにしたがって増大した．NEG の波長 500 nm の散乱光強度は，NEG の波長 500 nm の散乱光強度は 37 ℃が 47.1 と他の温度に比べて若干小さかったが，55 ℃以上では温度にかかわらず 48 程度であった．また，POS と NEG の散乱光強度の差は 95，75，55，37 ℃の順に 96.5，60.7，33.8，32.0 であり，95 ℃で最も差が大きくなった．

以上より，最適な加熱温度は，POS と NEG の波長 500 nm の散乱光強度の差が最も大きい，95℃であることが示された．

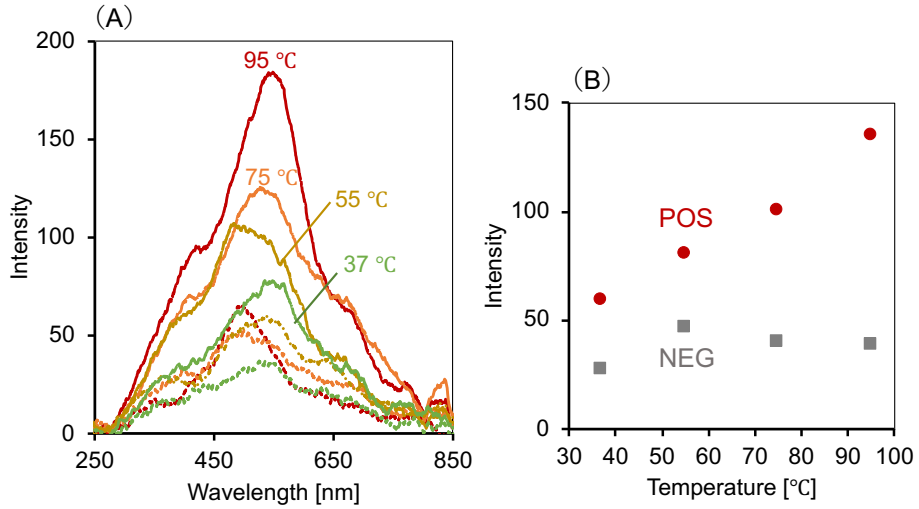


図 45　加熱温度が測定に与える影響，（A）異なる加熱温度で作製した POS（実線）と NEG（破線）の散乱光スペクトル，（B）加熱温度と波長 500 nm の散乱光強度の関係

3-6　試料の加熱ステップが測定に与える影響

光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトルの測定による核酸の定量はこれまでに例がない．先行研究においても，導波路ガラス上に滴下した試料の色の変化から検出対象の核酸を検出するにとどまっている（Strohoff et al., 2004）．その理由として，シグナルである散乱光が弱いことが挙げられる．よって，散乱光の増強を目指し，以下の仮説を立てた上で測定条件の最適化を行なった．励起光であるエバネッセント光の電場強度は図 46（A）内の左下の式で表される．この式は，界面から離れるにしたがってエバネッセント光の強度が指数関数的に減衰することを示している．

図 46（A）の右側部分のように，導波路ガラス上（界面）に試料がそのまま載っている状態では，金ナノ粒子プローブはこの部分のエバネッセント光のみを受け取ることができる．しかし，試料を乾燥または密着させることで，金ナノ粒子プローブはより強いエバネッセント光を受け取ることができるようになる．つまり，金ナノ粒子プローブを界面に近づけることで散乱光を増強できるのではないかと考えた．

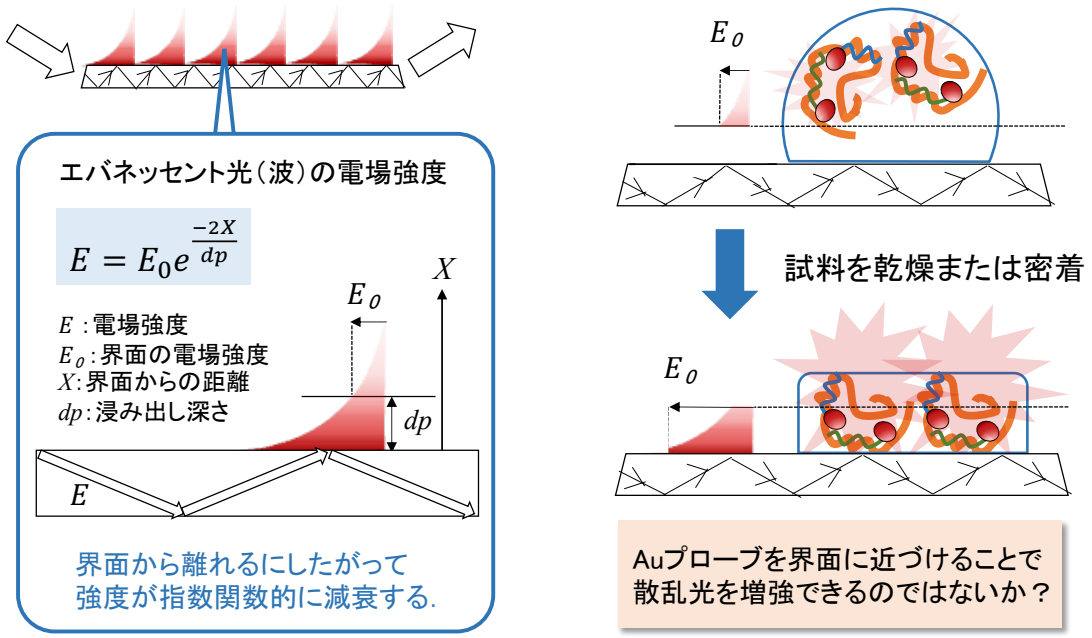


図 46　試料の乾燥ステップが測定に与える影響
（A）試料の乾燥または密着による散乱光強度の増大メカニズムに関する仮説

図 46（B）に石英導波路上に試料を滴下したのちの乾燥ステップなし（Wet）の場合と乾燥ステップあり（Dry）の場合の RNA サンプルを含む試料（POS）と Nuclease-Free water を含む試料（NEG）の散乱光スペクトルを示す．乾燥なしでは試料滴下直後に散乱光スペクトルを測定した．乾燥ありでは試料表面から 10 cm 離れた位置にドライヤーを固定し試料の乾燥を 1 分行ったのち，散乱光スペクトルを測定した．乾燥は乾燥なしの POS（POS-Wet）と

乾燥なしの NEG（NEG-Wet）の散乱光強度はどちらも 60 程度で差が見られなかった．乾燥ありの場合の POS（POS-Dry）の散乱光強度は 264.4，乾燥ありの場合の NEG（NEG-Dry）の散乱光強度は 102.9 であり，S/N 比（POS-Dry の波長 500 nm の散乱光強度/NEG-Dry の波長 500 nm の散乱光強度）はおよそ 2.5 であった．したがって，乾燥ステップの導入により散乱光強度を増大させることができた．

図 46C に図 46B を測定した際の石英導波路上の試料の様子を示す．POS-Wet は金ナノ粒子の発する散乱光と同様の緑色，NEG-Wet はオレンジ色であった．Strohoff らの研究では，検出対象の核酸が存在する場合はオレンジ色，検出対象の核酸が存在しない場合は緑色の光が観察され（図 46D），本研究とは逆の結果であった(Storhoff et al. 2004)．これは検出対象の核酸の違いと，それにともなうプローブ DNA の交雑部位の違いやハイブリダイズ後の立体構造の違い，塩濃度の違い，金ナノ粒子プローブ濃度の違いなど，測定条件やメカニズムの違いによるものであると考えられる（図 46E 参照）．また，POS-Dry は非常に強い黄色の光が観察され，NEG-Dry は赤色の光が観測された．

以上より，乾燥ステップの導入によって見た目にわかるほど散乱光強度を増大させることができた．また，現段階での本法の最適な測定条件は，白色光の入射角度：42.6 °，Integral 2000，Average 3, Boxcar 100，金ナノ粒子の直径：50 nm，チミンスペーサー：50 base，金ナノ粒子プローブ濃度：437 pM，$MgCl_2$ 最終濃度 ：1.5 mM，導波路ガラスに試料を滴下後に，ドライヤーで 1 分乾燥させる，とした．

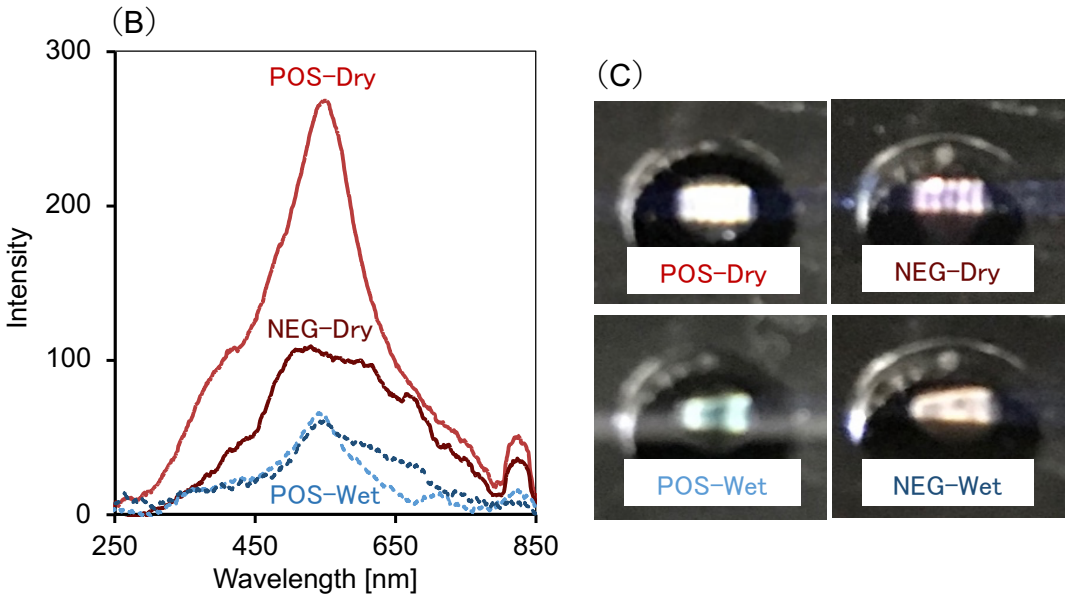


図 46（B）乾燥なし（Wet）と乾燥なし（Dry）の場合の POS（実線）と NEG（破線）の散乱光スペクトル，（C）（B）を測定した際の石英導波路上の試料の様子

（D）

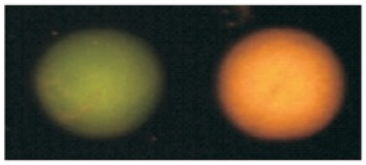


図 46（D）Storhoff らが撮影した導波路ガラス上の試料の様子,
Control はターゲットが存在しない場合（=POS），Target はターゲットが存在する場合（=NEG））（Storhoff et al., 2004）

（E）

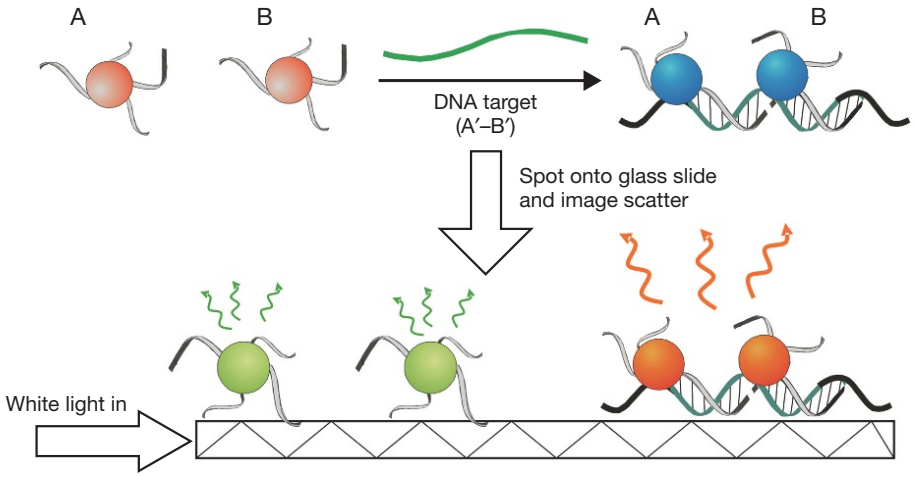


Figure 1 Colorimetric detection of nucleic acid sequences. Step 1: DNA-GNP probes (A and B) are hybridized to a DNA target in solution. Step 2: The samples are spotted onto a glass slide which is illuminated with white light in the plane of the slide. The evanescent induced scatter from the gold nanoparticles is visually observed. Individual 40- to 50-nm diameter gold probes scatter green light, whereas complexed probes scatter yellow to orange light because of a plasmon band red-shift.

（E）Storhoff らが開発した分析法のメカニズム，Target が存在しない場合は緑色の散乱光，Target が存在する場合はオレンジ色の散乱光が観察される．（Storhoff et al., 2004）

3-7　活性汚泥中のアンモニア酸化細菌の定量

本法を用いて活性汚泥中の AOB の 16S rRNA 濃度をモニタリングした．S 県下水処理場処理場にて 2020 年 11 月 14 日から 12 月 15 日に採取した活性汚泥（n=7）から抽出したものを使用した．

図 47 に全細菌と AOB の 16S rRNA の濃度について，RT-qPCR 法または本法で測定した結果を示す．これより，本手法はどの処理場の活性汚泥でも RT-qPCR 法と同程度に定量可能であるということが明らかとなった．そして，図中に赤い線で示した全細菌と AOB の 16S rRNA の割合の高低によらず AOB の 16S rRNA を定量可能であったことから，本手法は高い選択性を持つことが示された．また，測定に要する時間が RT-qPCR 法は 2 時間半以上であるのに対し本手法は 10 分程度であることから，本手法は RT-qPCR 法に代わる核酸モニタリング法となりうることが示された．以上より，本手法を用いることで下水処理場の活性汚泥中の AOB の 16S rRNA 濃度変化を短時間で簡便にモニタリングすることができた．

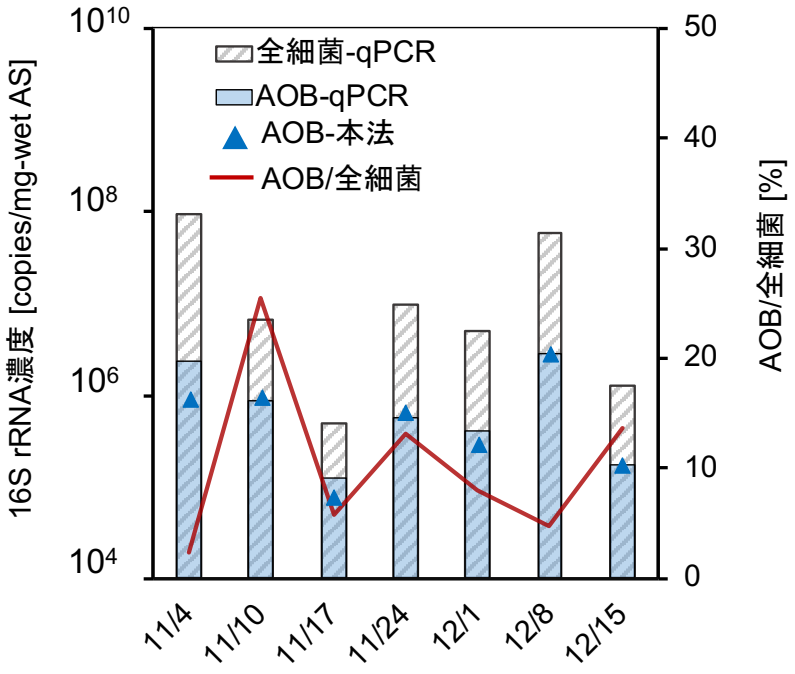


図 47　活性汚泥中の AOB の 16S rRNA 濃度のモニタリング

3-8　腸管出血性大腸菌の mRNA の検出

腸管出血性大腸菌感染症の原因菌は，ベロ毒素（Verotoxin=VT，または Shigatoxin =Stx と呼ばれている）を産生する大腸菌である．ベロ毒素は，培養細胞 の一種であるベロ細胞に対して致死的に作用することから，この名前が付けられている．ヒトを発症させる菌数はわずか 50 個程度と考えられており，二次感染が起きやすいのも少数の菌で感染が成立するためである．また，この菌は強い酸抵抗性を示し，胃酸の中でも生残する．知られている主な病原因子は，定着因子として attaching and effacing 病変を形成する Intimin と，ベロ毒素（抗原性の違いにより Stx1 と Stx2 がある）である．我が国においては，患者及び保菌者から検出される腸管出血性大腸菌の O 抗原による血清型は，O157 がもっとも多く，O26 と O111 がそれに次ぐ．Intimin は *eae* 遺伝子にコードされているため，腸管出血性大腸菌の検出には *eae* 遺伝子やその mRNA の検出が有効である(Sharma and Dean-Nystrom 2003; Sharma 2006). そこで，本法の病原体プロトコル確立の第一歩として，腸管出血性大腸菌 O157:H7 が持つ *eae* 遺伝子の mRNA の検出を行なった．使用した RNA サンプルは，本研究室において培養した腸管出血性大腸菌 *Escherichia coli* O157：H7 strain *sakai* から抽出した．RT-qPCR 法で定量された *eae* 遺伝子の mRNA の濃度は 1.2×10^5 copies/μL であり，これを Nuclease-Free water で希釈したものをサンプルとして使用した．

図 48A に各試料の散乱光スペクトルを示す．*eae* 遺伝子の mRNA の濃度が低下するにしたがって，散乱光強度も低下した．しかし，AOB と比較すると全体的に散乱光強度が高い傾向が見られた. *eae* 遺伝子の mRNA 濃度が 1.2×10^1 copies/μL でのピークの散乱光強度は 148.1 であったのに対し，AOB の 16S rRNA の濃度が 4.0×10^1 copies/μL でのピークの散乱光強度は 39.8 であった．これより，使用するプローブ DNA の種類や検出対象の核酸によって散乱光強度が変化する可能性が示唆された．この原因としては，プローブ DNA の種類や検出対象の核酸によって，交雑部位や交雑時の立体構造が異なることが考えられる．図 48B に *eae* 遺伝子の mRNA と波長 500 nm の散乱光強度の関係を示す．*eae* 遺伝子の mRNA 濃度と波長 500 nm の散乱光強度には強い正の相関が見られた（相関係数 0.99）．

以上より，本法を用いて *eae* 遺伝子の mRNA を検出することができた．また，*eae* 遺伝子の mRNA 濃度と散乱光強度に強い相関が見られたことから，検量線を作成することで濃度を定量することができる可能性が示された．

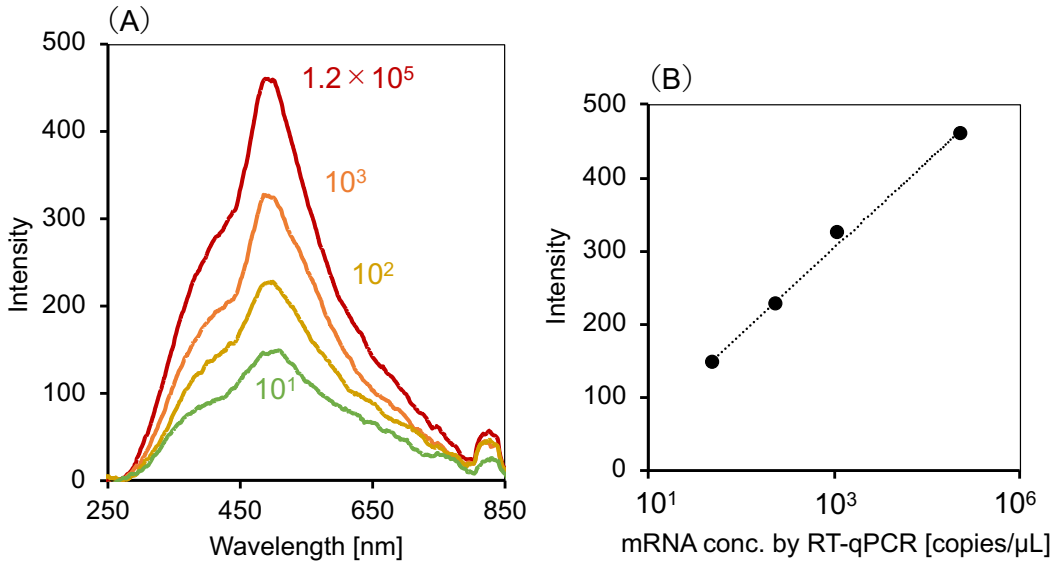


図 48　*eae* 遺伝子の mRNA の検出，（A）各試料の散乱光スペクトル，（B）*eae* 遺伝子の mRNA 濃度と波長 500 nm の散乱光強度の関係

3-9　Severe acute respiratory coronavirus 2 のゲノム RNA の検出

Severe acute respiratory coronavirus 2（SARS-CoV-2）は 2019 年に中国で初めて検出された．このウイルスは新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックの原因であり，中国の武漢から世界各国に急速に広がった．SARS-CoV-2 はヒト間で感染し，時には無症状でも感染し公衆衛生を脅かす．そのため，SARS-CoV-2 の感染を予防し，感染者の治療を容易にするためには，正確で迅速かつ安価な検出法が必要である．

RT-qPCR 法は，その特異性と正確性の高さから COVID-19 診断においてゴールドスタンダードとなっている(Ishige et al. 2020)．loop-mediated isothermal amplification（LAMP 法）(Loan Dao Thi et al. 2020), recombinase polymerase amplification（RPA 法）(El Wahed et al. 2021), reverse transcription–free exponential amplification reaction（RTF-EXPAR）など，多くの酵素を用いる COVID-19 検出法が開発されている 4. これらの手法や, CRISPR（clustered regularly interspaced palindromic repeat）/CRISPR-Cas 9 システムを用いた手法の一部は，極めて高い精度と感度を有している(Yu et al. 2023)．しかし，これらの手法は，酵素など室温での頑健性が低い試薬や，高価で複雑な装置，複雑な操作，熟練の技術を必要とするため，設備や人材，資金が不足している地域における迅速診断，大規模なマススクリーニング，個人のポイントオブケア（POC）診断への適用は困難である(Yager, Domingo, and Gerdes 2008).

前項までに示したように，本研究で開発した光導波路法は非常に低濃度の核酸を検出することができた．よって，他分野への応用を目的とした発展的な内容として，光導波路法の SARS-CoV-2 検出への適用可能性について検討した．人工合成した RNA スタンダードや，RT-qPCR 法により陽性（POS）または陰性（NEG）と定義された臨床サンプル由来の試料を用いて，検出限界や選択性などの分析性能を評価した．

金ナノ粒子プローブは第 2 章に示した通りに，50 nm 金ナノ粒子を用いて作製した．プローブ DNA は, 日本における SARS-CoV-2 の検出に一般的に使用されている N1 セットと N2 セットの PCR のプライマーに基づいて作製した(Shirato et al. 2021)（表 7 参照）．

核酸サンプルは, 市販で濃度既知の SARS-CoV-2 Standard（ポジティヴコントロール；PC），SARS-CoV-2 Negative（Exact Diagnostics）（ネガティブコントロール；NC），PC と NC の混合サンプル（PC+NC），これらを Nuclease-Free water にて希釈したものを使用した．PC には SARS-CoV-2 の Envelope 遺伝子，Nucleocapsid 遺伝子，ORF1ab 遺伝子，RdRP 遺伝子，S 遺伝子の配列を含む人工合成 RNA と，Human Genomic DNA が含まれていた．対して，NC には Human Genomic DNA のみが含まれていた．さらに，新型コロナウイルス感染症に感染した疑いのあるヒトの鼻咽頭ぬぐい液から抽出した臨床サンプルを使用した．（株式会社セルスペクトより提供）．臨床サンプルは，株式会社セルスペクトにて磁気ビーズによる精製を行い，冷凍便で本研究室にて輸送した後，RQ- RNase-Free DNase（Promega）を用いた DNA 分解処理，Nucleospin® RNA Clean-up（MACHEREY-NAGEL）を用いた RNA 精製を行なった．続いて，Power SYBR Green RNA-to-CTTM 1-Step Kit（Applied Biosystems）を用

いた 1 ステップ RT-qPCR 法を行い，SARS-CoV-2 のゲノム RNA 濃度を定量した．PCR 条件は，N1 セット（N_Sarbeco）と N2 セット（NIID-2019_nCoV）ともに以下の通りである．RT-qPCR 法の Ct 値から陽性サンプル（POS，n=5）と陰性サンプル（NEG，n=8，Ct≧37）と定義した．逆転写 48 °C 30 分, a AmpliTaq Gold DNA Polymerase Ultra-Pure のアクティベーション 95 °C 10 分を行ったのち，95 °C 30 秒, 95 °C 15 秒＋60 °C 1 分を 40 サイクル(Shirato et al. 2021).

図 49 に示した各試料の散乱光スペクトルより, 人工合成した RNA スタンダードである PC と NC，PC と NC の混合試料（PC+NC）を N2 セットの金ナノ粒子プローブを用いて検出することができた．PC と PC+NC の散乱光スペクトルは約 500 nm にピークを示したが，NC の散乱光スペクトルは 550 nm 以上の波長にピークを示した（図 49A）．PC および PC＋NC の散乱光スペクトルは約 500 nm にピークを示したのに対し，NC は 550 nm 以上の波長にピークを示した（図 49A）．PC および PC+NC のピークの散乱光強度は 216.2 か ra
529.1 であり，NC のピークの散乱光強度は 84.9 から 166.8 であった．これは，2 種類の金ナノプローブと人工合成 RNA の交雑後，ピークが長波長側にシフトして散乱光が増強されたことを示しており，我々の先行研究の結果を一致した(Satoh et al. 2022)．また，PC と PC＋NC の指数回帰式は，$y = 243.36\ e^{0.0027x}$ ($r2 = 0.644$; 図 S1)であった．

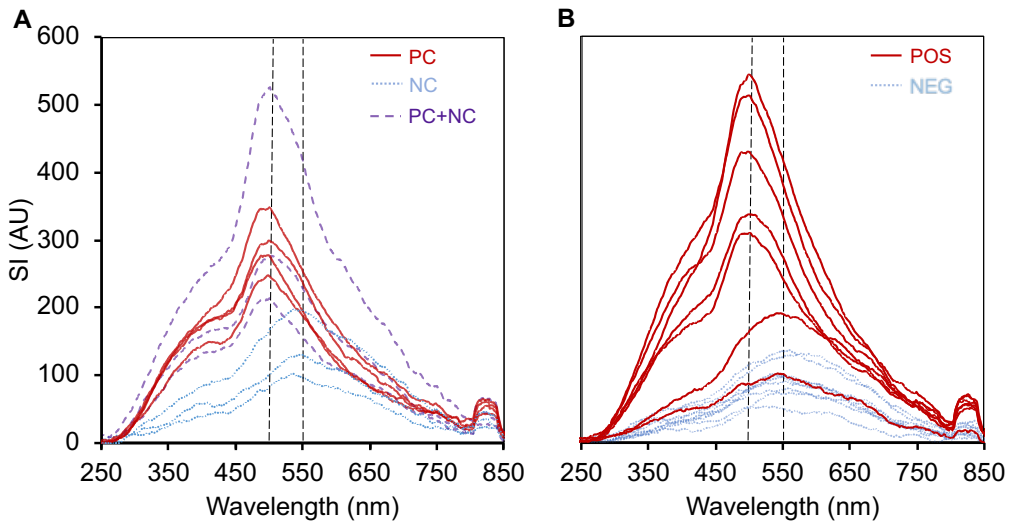


図 49　SARS-CoV-2 のゲノム RNA の検出，(A)人工合成ゲノム RNA の散乱光スペクトル，(B）臨床サンプル由来のゲノム RNA を含む試料の散乱光スペクトル

図＊に各試料の波長 500 nm における散乱光強度と SARS-CoV-2 のゲノム RNA 濃度の相関を示す．PC と POS ではゲノム RNA 濃度が低下するにつれて波長 500 nm の散乱光強度が

低下した． 特に，RNA 濃度が低い 2 つの POS サンプル（C_7 と C_9）は，約 550 nm の波長にピークを示した．POS と NEG の最大ピーク波長の違いは，金ナノプローブの光化学的特性が検出対象の核酸との交雑によって変化することを示唆している．PC と POS の散乱光強度とゲノム RNA 濃度には強い正の相関が見られた（相関係数は 0.87）．

図＊は，RT-qPCR によって決定された SARS-CoV-2 RNA 濃度と，図 2A および B に示した波長 500 nm における散乱光強度との関係を示している．NC および NEG サンプルの散乱光強度から決定されたカットオフ値は 183 であり，これがこれらのサンプルの最大散乱光強度であった．NC と NEG の値はすべてこの値を下回ったが，PC と PC＋NC の値はすべてこの値を上回った．POS 値も，2 つのサンプル（補足表 S1 の C_7 と C_9）の値を除き，この値を超えていた．これらのサンプルは，我々の方法では陰性と判定されたが，RT-qPCR では陽性であった（補足表 S1）．PC 群と NC 群（$p < 0.05$），PC 群と NEG 群（$p < 0.01$），POS 群と NEG 群（$p < 0.05$）の 500 nm における散乱光強度には，Kruskal-Wallis 検定により有意差が確認された．しかし，500nm における散乱光強度には，NC と NEG，NC と POS，PC と POS のサンプル間で有意差は認められなかった（図 50B；補足表 S1）．

本研究では，2 つの POS サンプル（表 S1 の C_7 と C_9）が偽陰性であった（補足表 S1）．RT-qPCR 法による分析では，偽陽性や偽陰性（Ct≧37）が正確な SARS-CoV-2 診断の大きな問題となる(Cohen, Kessel, and Milgroom 2020)．本研究では，C_7 と C_9 の Ct 値はそれぞれ 36.73 と 36.40 であり，装置の検出下限値（37；補足表 S2）に極めて近かった．我々の方法では，C_7 と C_9 の値はカットオフ値以下（すなわち陰性）であったが，PC の値はカットオフ値以上（すなわち陽性）であった（図 3）．この結果は，我々の方法が臨床サンプル中の合成 RNA 濃度に比べて標的 RNA 濃度を過小評価する傾向があることを示している．臨床サンプルには，精製後であってもヒト由来のコンタミが含まれている可能性がある．このような夾雑物により反応が阻害され，臨床サンプル中の RNA の濃度を過小評価した可能性がある．

以上より，本法は SARS-CoV-2 のゲノム RNA を検出できる可能性が示された．本法の検出限界は，人工合成 RNA サンプルで 1 copies/μL（1.66 aM），臨床サンプルで 30 copies/μL（49.8 aM）であった．この方法を用いると，臨床検体中の SARS-CoV-2 RNA は，臨床検体では 71.4%（5/7）の陽性的中率，100%（8/8）の陰性的中率，人工合成 RNA サンプルでは 100%の陽性的中率および陰性的中率で識別できた．しかし，陽性サンプル（POS）数が少ないこと，検出下限が極端に低いことから，本法の感度や精度，検出範囲については今後も慎重に検討を続ける必要がある．

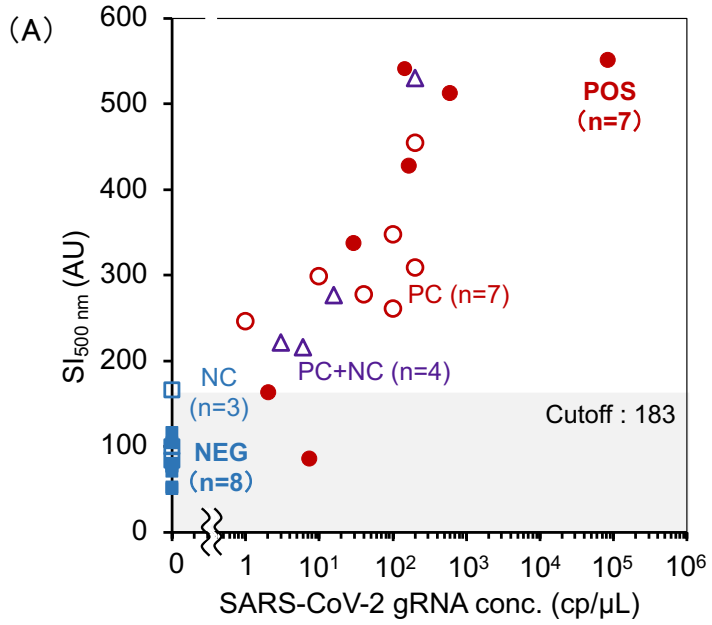
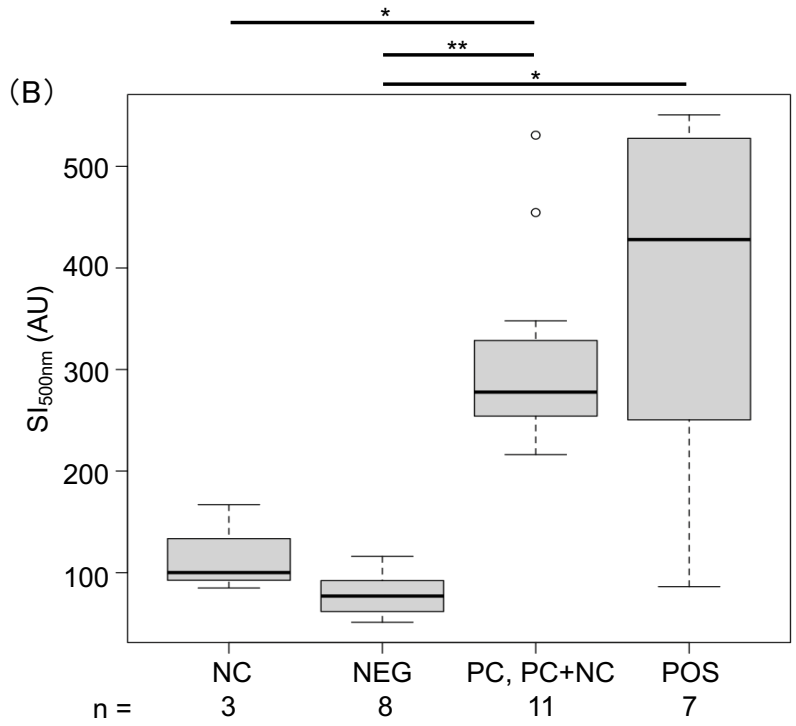


図 50　（A）波長 500 nm の散乱光強度とゲノム RNA 濃度の関係



（B）人工合成ゲノム RNA サンプルと臨床サンプルの Kruskal–Wallis test の結果

3-10　金ナノ粒子プローブセットの違いが測定に与える影響

N2 セットの金ナノ粒子プローブ（図 49）を用いた試料の散乱光強度は，N1 セットの金ナノ粒子プローブを用いた試料の散乱光強度よりもはるかに高かった（図 S2）．SARS-CoV-2 の nucleocapsid phosphoprotein 遺伝子(N 遺伝子), 大腸菌 O157:H7 の *eae* 遺伝子の mRNA, AOB の 16S rRNA，全細菌の 16S rRNA について，それぞれに特異的な金ナノ粒子プローブセット（表 S2）を用いて測定を行った．

図 51 に示す通り，乱光強度が 150 を下回るグループ（N1 セット，AOB の 16S rRNA，全細菌の 16S rRNA）と 150 を上回るグループ（N2 セット，*eae* 遺伝子の mRNA）の 2 つのグループに分けられた．散乱光強度は検出対象の核酸の長さやプローブ DNA の長さ（補足表 S2 参照），交雑部位の 2 次元構造やプローブセット間の距離（図 S3; 表 S2 参照）とは相関がなかった．しかし，N1 セット（図 S3A のオレンジ色でマークした部分）と AOB 16S rRNA（図 S3D の緑色またはオレンジ色でマークした部分）の交雑部位は多分岐ループ内にあり，全細菌 16S rRNA の交雑部位の距離は 400 塩基以上であった．このセルフフォールディング構造と物理的な距離は，検出対象の核酸と交雑した 2 つの金ナノ粒子プローブの凝集をさらに妨害し，散乱光強度を低下させる可能性があると考えられる．

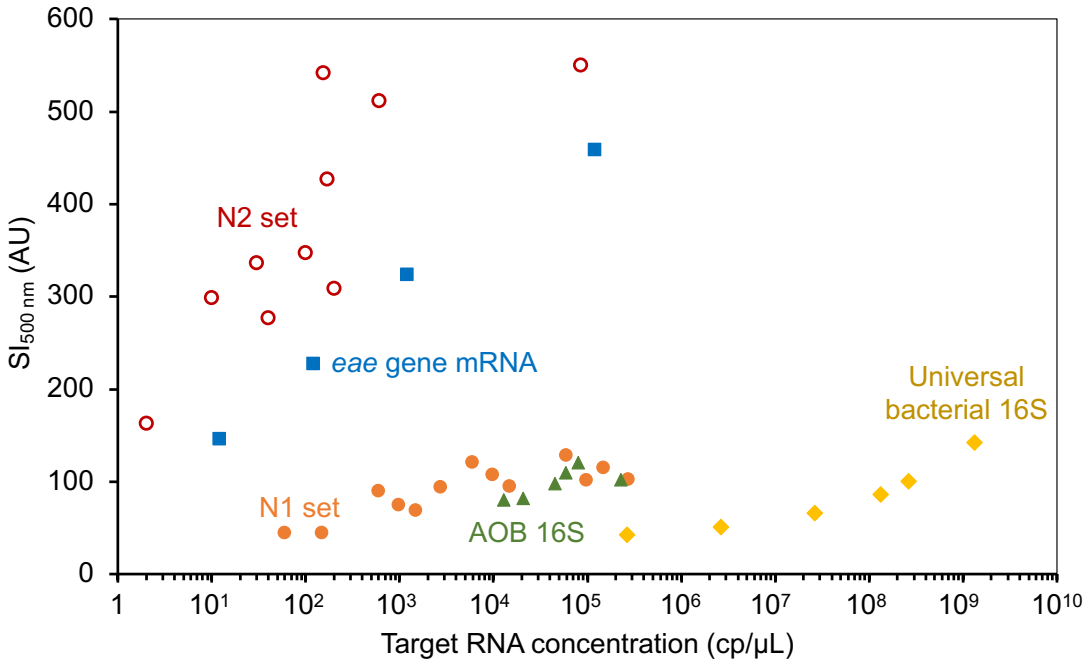


図 51　使用する金ナノ粒子プローブセットと検出対象の組み合わせによる散乱光強度の違い

金ナノ粒子プローブが交雑した検出対象の RNA は，加熱が終了し試料が常温に戻る過程で元の立体構造あるいは金ナノ粒子プローブを巻き込んだ状態で任意の立体構造をとる可

能性が考えられる．よって，検出対象の RNA の違い，つまり立体構造の違いによって図 51 のように散乱光強度が異なるのではないかと考えた．よって，検出対象の RNA の三次元の立体構造の予測を行い，構造の違いと散乱光強度の相関について検討した．

検出対象の RNA の配列は補足資料 Table S2 の Target Sequence Reference に示したものを使用した．あらかじめ，対応するプローブ DNA が交雑する部位が RNA 内の別の配列部分と塩基対を形成しないように，交雑部分の配列をグアニンに置き換えた．この編集した配列を用いて，MXfold2(Sato et al. 2021)により配列の二次構造を予測した．予測された二次構造を確認し，プローブ DNA の交雑部位が RNA 内の別の配列部分と塩基対を形成していた場合は，手動で二次構造の情報を変更した．次に，得られた二次構造の情報を用いて RNAComposer(Sarzynska et al. 2023)を用いて三次元の立体構造を予測した．得られた立体構造について，分子グラフィックツールである The PyMOL Molecular Graphics System (Version 3.0, Schrödinger, LLC.）を用いて，プローブ DNA が交雑する部位の色を赤色（フォワードプライマーの相補的な配列を持つプローブ DNA が交雑する部位）または黄色（リバースプライマーと同じ配列を持つプローブ DNA が交雑する部位）に変更した．

図 52 に，金ナノ粒子プローブセットが交雑した場合の各検出対象の三次元立体構造を示す．図 51 では，SARS-CoV-2 のゲノム RNA を含む同じサンプルを検出した場合でも，N1 セットは N2 セットよりも散乱光強度が小さくなった．N1 セット（図 52A）は 2 箇所の交雑部位を隔てるような立体構造を取っていたのに対し，N2 セット（図 52B）は 2 箇所の交雑部位が接するような立体構造を取っていた．また，その他の検出対象についても，2 箇所の交雑部位が離れている，あるいは隔てるような立体構造であるほど散乱光強度が小さくなる可能性があることが示唆された（図 52）．しかし，実際のプローブ DNA には金ナノ粒子が修飾されており，この影響を考慮して RNA の立体構造を予測することは技術的に非常に困難である．よって，本研究において予測した構造もあくまで参考にとどまっており，今後もより詳細な立体構造の予測に取り組むことが必要である．

また，検出範囲を広げ，検出限界を下げるためには，散乱光強度の改善が必要である．Fuchs らは，非標識のヘルパープローブを使用することで，蛍光標識プローブが検出対象の 16S rRNA へアクセスしやすくなること，ヘルパープローブは，交雑反応において検出対象でないオリゴヌクレオチドと相互作用しないことを報告した(Fuchs et al. 2000)．我々の方法におけるヘルパープローブの使用は，交雑部位への金ナノプローブのアクセス性を高めるだけでなく，標的 RNA の二次元および三次元構造を制御することによって散乱光強度を高め，それによって検出範囲を拡大し，検出限界を高める可能性がある．Nykypanchuk らは，金ナノ粒子とプローブ DNA 間のスペーサーの特性が，金ナノ粒子の集合組織を制御することを報告した(Nykypanchuk et al. 2008)．スペーサーが長いと，金ナノ粒子プローブはアモルファスの凝集体ではなく，粒子間で距離を保った秩序的な結晶構造になる(Nykypanchuk et al. 2008)．さらに Park らは，ポリチミンは金との親和性が比較的低く，ポリチミンのスペーサーは粒子間の間隔を広げると報告した(Park et al. 2004)．本研究で使用した金ナノプローブ

はポリチミンスペーサーを有しており，長距離秩序を持つ結晶構造の形成が容易であった．我々の以前の研究でも示唆された通り(Satoh et al. 2022)，長いポリチミンスペーサーは散乱光強度を増加させる可能性があることが明らかになった．

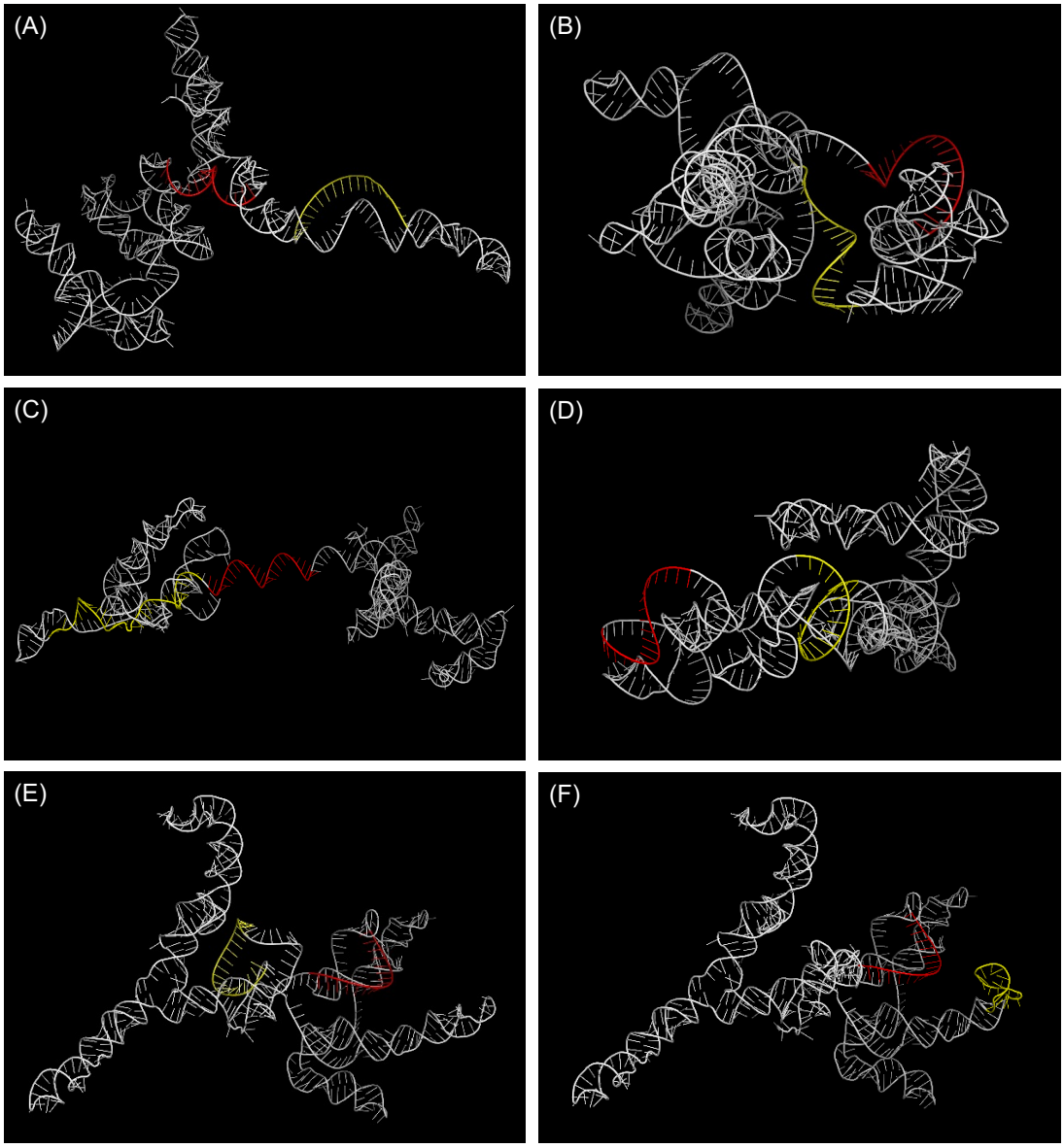


図 52 MXfold2（ https://ws.sato-lab.org/mxfold2/ ） と RNAComposer（https://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/）を用いて予測した検出対象の核酸の三次元立体構造，赤色部分または黄色部分に，フォワードプライマーに相補的な配列のプローブ DNA またはリバースプライマーと同じ配列のプローブ DNA が交雑する．SARS-CoV-2 のゲノム RNA の構造；（A）N1 セット，（B）N2 セット，（C）*eae* 遺伝子の mRNA，（D）AOB の 16S rRNA，全細菌の 16S rRNA の構造；（E）341F と 805R，（F）341F と 518R（参考）．

3-11　総 RNA 濃度が測定に与える影響

図 53 は，PC，NC，PC＋NC，NC と 48 塩基のポリチミン（T48）の混合物（NC＋T48），および T48 を含むブランクサンプルの総 RNA 濃度と，N2 セットプローブを用いて測定した波長 500 nm の散乱光強度との関係を示している．PC および PC + NC サンプルは希釈して調製したため，一見，総 RNA 濃度と相関があるように見える．NC サンプルの散乱光強度は，総 RNA 濃度の増加とともに減少した．しかし，NC+T48 サンプルの散乱光強度はブランクサンプルと同程度であった．我々のこれまでの研究結果(Satoh et al. 2022)と同様に，総 RNA 濃度が極端に低い場合，あるいはサンプル中にオリゴヌクレオチドが存在しない場合, 散乱光強度は増大した. 一方, 総 RNA 濃度が極端に低くない場合（NC+T48 および T48）には，散乱光強度の増大は観察されなかった.

上記のような現象は，光導波路分光装置の特性によるものと思われる．エバネッセント波は, 導波路スライド表面からわずか数百ナノメートルしか伸びておらず, スライド表面からの距離が長くなるにつれて指数関数的な減衰を示した．総 RNA 濃度が極めて低い場合，強いエバネッセント波の存在下で金ナノ粒子プローブが表面に過剰に付着するため，散乱光強度が増加した．一方，総 RNA 濃度が極端に低くない場合（NC＋T48 および T48），非検出対象の核酸が金ナノ粒子プローブの表面への付着を阻害し，散乱光強度は増加しなかった. あるいは, 総 RNA 濃度が極端に低い条件下での交雑から得られる結晶構造とは異なる，結晶のような組織構造が生成しているのかもしれない. 非検出対象の核酸は，この結晶様組織構造の生成を妨げ，散乱光強度の増加を妨げる可能性がある．したがって，非検出対象の核酸の添加は，総 RNA 濃度が極端に低いサンプルにおいて，交雑に由来しない散乱光強度の増加を抑制することができる．しかしながら，非検出対象の核酸を添加することで交雑反応が阻害される可能性があるため，非検出対象の核酸の添加は本方法の精度を低下させる可能性がある．非検出対象の核酸などの存在は，開発した方法による交雑に起因する結晶化を阻害し，反応効率や分析の感度に影響を与える．将来的には，先行研究で報告されているような，non-enzymatic isothermal amplification による手法(Mohammadniaei et al. 2021)，catalyzed hairpin assembly として知られるシグナルを増幅する能力を持つ enzyme-free DNA circuits による手法(B. Li, Ellington, and Chen 2011)，金ナノ粒子プローブを銀染色により増強する手法(Y. F. Wang et al. 2003)，などを分析ステップに導入することで改良を行う必要がある．また，原子間力顕微鏡や X 線小角散乱を用いて，分析に最適な結晶構造を決定する必要がある．我々の方法は，RNA 検出対象の核酸と酵素の逆転写を必要とせず，時間，試薬コスト，室温での頑健性の点で，既存の酵素ベースの SARS-CoV-2 検出法より優れている（表 S4 参照）．しかしながら，分析前に RNA 抽出を行う必要があるため，検出対象の菌体を直接捕捉可能な DNA アプタマーなどと組み合わせた新たな分析システムの考案が必要である.

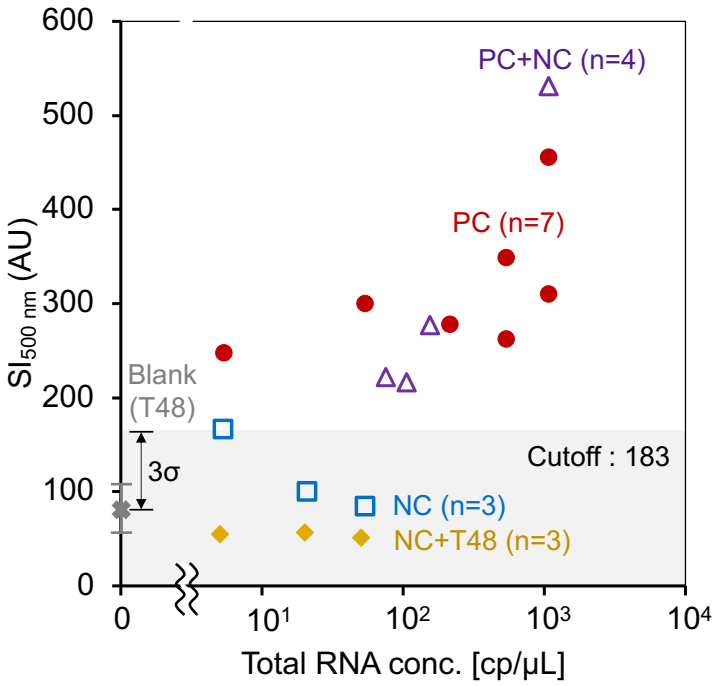


図 53　総 RNA 濃度と散乱光強度の関係

第 4 節　小括

測定条件の最適化と乾燥ステップの導入により散乱光を増強することで，光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトル測定により核酸を定量可能な光導波路法を開発した．本法を用いて活性汚泥中の AOB の 16S rRNA 濃度をモニタリングすることができた. また本法は，病原体である O157:H7 がもつ *eae* 遺伝子の mRNA や SARS-CoV-2 のゲノム RNA を検出・定量可能であった．　光導波路法は，既存の光導波路を用いた核酸検出法の中でも最も検出限界が低く, 既存の酵素を用いた方法に匹敵する検出限界で, 臨床サンプル中の SARS-CoV-2 RNA を検出することができた．この手法は，金ナノ粒子に修飾するリガンドを変えることで様々な RNA を検出することができる．さらに，本手法のような簡便，迅速，安価で非酵素的な RNA 検出法は，いつでもどこでも病原体を分析できるパーソナルな POC システムの開発を促進することができる．しかし，光導波路分光装置は大型であり，生産台数が少ないため高価である，広く普及している装置ではないためにメンテナンスができる技術者が限られる，測定に正確なピペッティング技術を要する，といった問題点もある．したがって実際の水処理場や途上国において，本法を用いたオンサイト分析を行うことは難しい．よって，簡易な光導波路システムの開発や装置の小型化を行うことで上記の課題をクリアすることが必要である．

補足図表

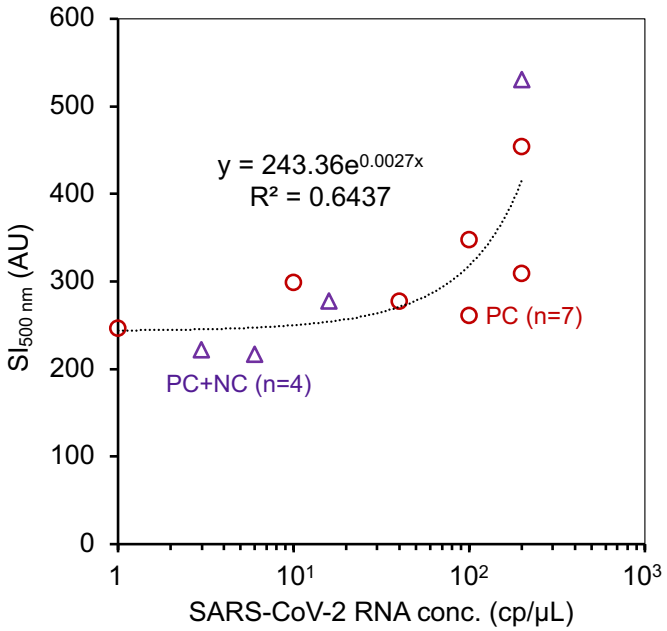


Fig. S1. Calibration curve for severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) genomic RNA determined using the N2 set Au-nanoprobes. ○, positive control (PC); ∆, PC + negative control (NC).

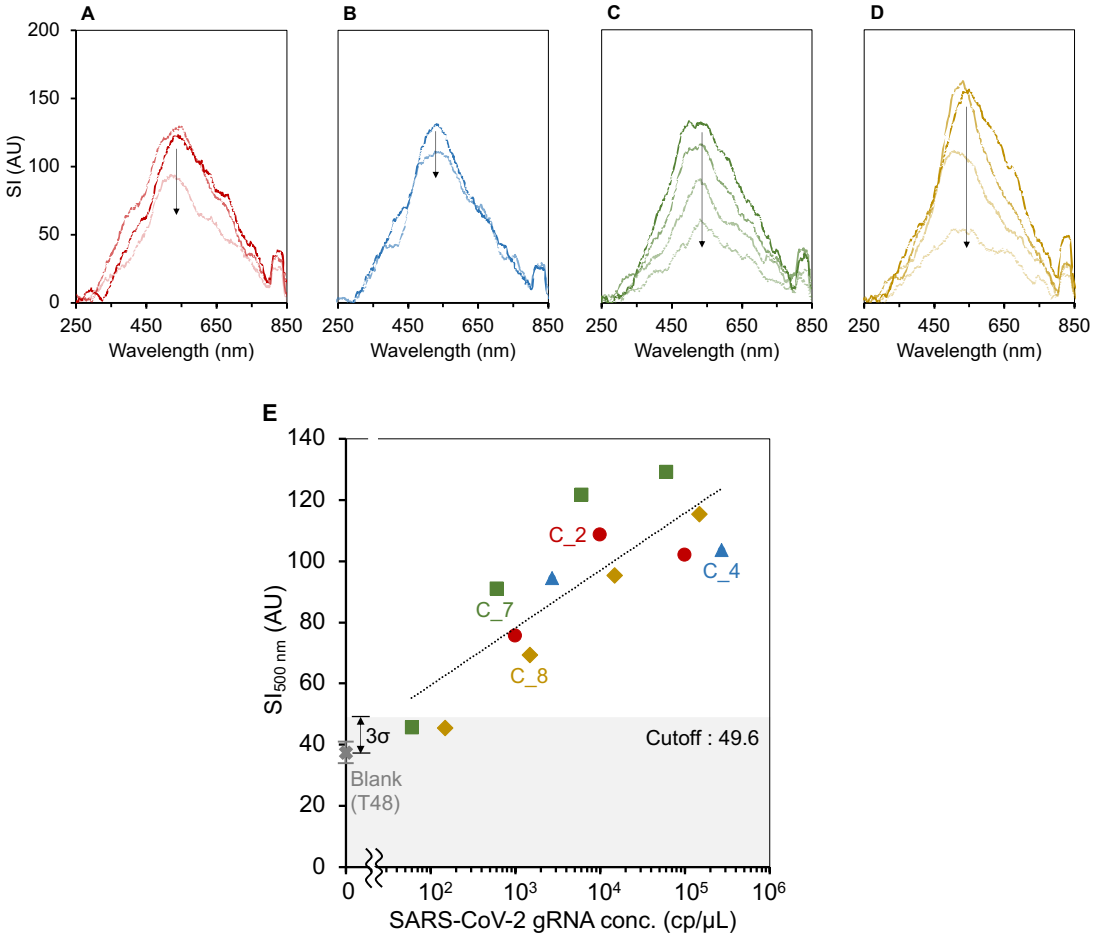


Fig. S2. Scattered light spectra of positive (POS) samples using the N1 set Au-nanoprobes. (A) C_2. (B) C_4. (C) C_7. (D) C_8. Scattered light intensity decreased as the target concentration decreased. (E) Relationship between SARS-CoV-2 genomic RNA concentration and scattered light intensity at 500 nm calculated from the results shown in (A), (B), (C), and (D). C_2 (●), C_4(▲), C_7 (■), C_8(◆), and Blank (T48, ×).

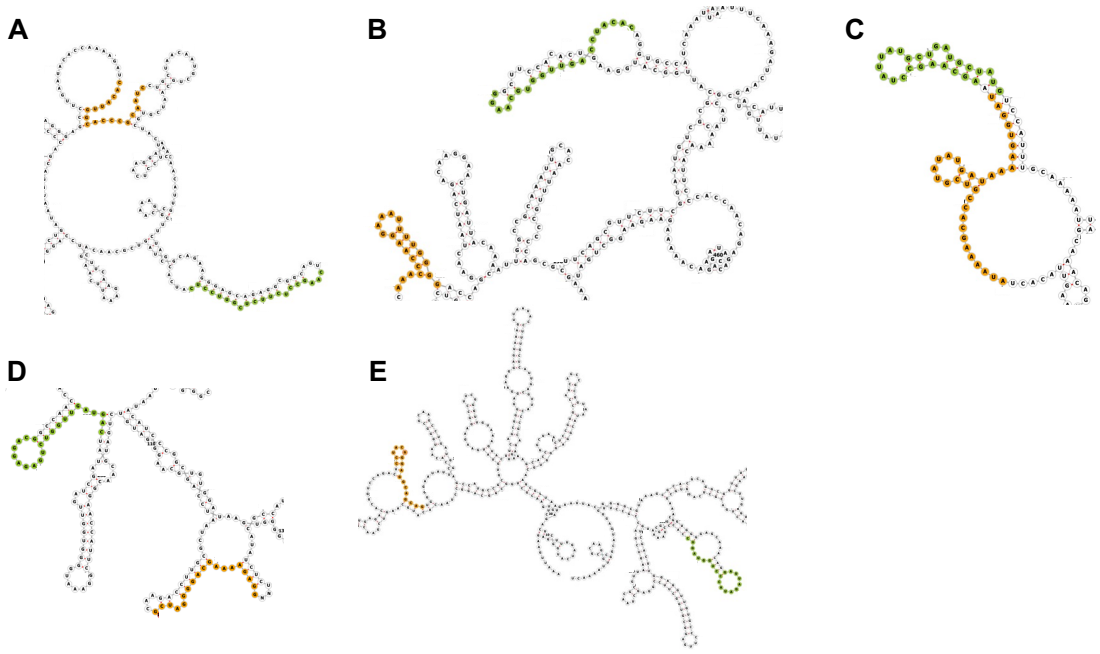


Fig. S3. Partial two-dimensional structures of various RNA targets. Hybridization sites are marked in orange (complementary forward primer) and green (reverse primer). (A) N1 set. (B) N2 set. (C) *eae* gene mRNA. (D)16S rRNA of ammonia-oxidizing bacteria. (E) Universal bacterial 16S rRNA. The sequence of each target RNA was obtained from GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), and the two-dimensional structure of each RNA target was predicted using the MXfold Server(Akiyama et al., 2018).

Table S1 : The dataset of scattered ligth intensity (SI) and the results of Kruskal–Wallis test followed by Steel-Dwass test

Dataset									Kruskal–Wallis test followed by Steel-Dwass test			
Sample	Category	SI at 500 nm			Average	Standard deviation	Results of RT-qPCR	Results of this method	Pair	t	*p*	
PC_1	Positive	305.51	312.653	309.644	309.269	2.928148562	N/A	N/A	NC:NEG	1.6329932	0.35996464	NS
PC_2	Positive	345.292	346.981	351.622	347.965	2.676243262	N/A	N/A	NC:PC	2.5690465	0.04999804	*
PC_3	Positive	273.277	279.431	280.56	277.756	3.200493816	N/A	N/A	NC:POS	1.7094086	0.31867097	NS
PC_4	Positive	303.175	299.245	295.594	299.338	3.095628854	N/A	N/A	NEG:PC	3.6331804	0.00159467	**
PC_5	Positive	241.904	251.423	246.794	246.707	3.886602372	N/A	N/A	NEG:POS	3.0089153	0.01396174	*
PC_6	Positive	457.344	454.666	451.676	454.562	2.315119579	N/A	N/A	PC:POS	0.9509502	0.77722552	NS
PC_7	Positive	264.654	262.22	257.737	261.537	2.864854737	N/A	N/A				
PC+NC_1	Positive	532.4	532.568	527.285	530.751	2.45179159	N/A	N/A				
PC+NC_2	Positive	275.989	277.908	277.52	277.139	0.828456798	N/A	N/A	POS	C_1 to C_9		
PC+NC_3	Positive	215.009	214.163	219.56	216.244	2.370066244	N/A	N/A	NEG	C_10 to C_7		
PC+NC_4	Positive	225.555	220	219.938	221.831	2.633387299	N/A	N/A				
NC_1	Negative	83.999	84.798	85.801	84.866	0.737233116	N/A	N/A	*	$p < 0.05$		
NC_2	Negative	101.117	99.867	99.211	100.065	0.790616637	N/A	N/A	**	$p < 0.01$		
NC_3	Negative	167.01	165.888	167.715	166.871	0.752317752	N/A	N/A				
C_1	Positive	422.098	434.165	427.617	427.96	4.932298923	Positive	Positive	Kruskal-Wallis test p.value = 0.000328			
C_2	Positive	330.534	344.041	337.274	337.283	5.514213332	Positive	Positive				
C_3	Positive	506.233	514.784	516.147	512.388	4.387669161	Positive	Positive				
C_6	Positive	539.334	540	549.366	542.9	4.580229689	Positive	Positive				
C_7	Positive	160.111	166.576	164.194	163.627	2.669603341	Positive	Negative				
C_8	Positive	553.239	546.333	552.696	550.756	3.135379722	Positive	Positive				
C_9	Positive	80.932	96.545	81.18	86.219	7.302286537	Positive	Negative				
C_10	Negative	115.746	114.813	117.336	115.965	1.04158629	Negative	Negative				
C_11	Negative	77.724	78.012	75.816	77.184	0.974441378	Negative	Negative				
C_12	Negative	76.667	77.712	75.637	76.672	0.847122581	Negative	Negative				
C_13	Negative	51.98	50.246	51.071	51.099	0.708179356	Negative	Negative				
C_14	Negative	71.405	71.203	70.452	71.02	0.410015447	Negative	Negative				
C_15	Negative	104.827	105.556	102.289	104.224	1.400244979	Negative	Negative				
C_16	Negative	80.3	81.031	78.819	80.05	0.920185126	Negative	Negative				
C_17	Negative	52.222	51.809	53.268	52.433	0.614036372	Negative	Negative				

エラー! 参照元が見つかりません。

Table S2 : Combination of target RNA, sample, and primer set used as probe DNA

Target RNA	Sample	Primer name	Sequence 5'→3'	Length (mer)	Target length (mer)	Position	Distance between primers
SARS-CoV-2 genomic RNA (N)	Human nasopharyngeal swab	N_Sarbeco_F1*	CACATTGGCACCCGCAATC	19	29903	28723-28741	91
		N_Sarbeco_R1*	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	20		28831-28850	
SARS-CoV-2 genomic RNA (N)		NIID_2019-nCOV_F2**	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	20		29142-29161	120
		NIID_2019-nCOV_R2**	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	20		29280-29299	
Escherichia coli O157:H7 eae gene mRNA	*Escherichia coli* O157:H7 str.sakai	eaeO157:H7-forward	TCTGTGTGGATGGTAATAAATTTTTG	26	2805	2572-2540	2
		eaeO157:H7-reverse	AAATGGACATAGCATCAGCATAATAGGCTTGCT	33		2599-2574	
Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	Activated sludge	CTO189f A/B/C	CGATCCCCTGCTTTYCTCC	19	1384	173-191	76
		RT1r	CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	22		267-288	
Universal bacterial 16S rRNA	Activated sludge	341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	17	1541	340-356	429
		805r	GACTACCAGGGTATCTAATC	20		785-804	

* N1 set
** N2 set

Table S2 : Combination of target RNA, sample, and primer set used as probe DNA

Target RNA	Target sequence Ref.	Primer Ref.
SARS-CoV-2 genomic RNA (N)	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome (NC_045512	Sirato et al., 2021
SARS-CoV-2 genomic RNA (N)	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome (NC_045512	
Escherichia coli O157:H7 eae gene mRNA	Escherichia coli enterohemorrhagic strain DEC 3a gamma intimin (eae) gene, complete cds (AF08118	Sharma, 2006
Ammonia-oxidizing bacterial 16S rRNA	Nitrosomonas europaea 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequence (M96399.1)	Hermansson et al., 2001
Universal bacterial 16S rRNA	Escherichia coli 16S ribosomal RNA, complete sequence (J01859.1)	Herlemann et al., 2011

* N1 set
** N2 set

エラー! 参照元が見つかりません。

Table S3 : The results of RT-qPCR for clinical samples

			N.Sarbeco (N set 1)									
Sample	ID	Number	Cr	Cr Mean	Cr SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Tm1	Tm2	Tm3	Positive/Negative
PCR standard	STD_10^7	1	15.09791851	15.05702972	0.057824802	N/A	N/A	N/A	81.15135956	N/A	N/A	N/A
		2	15.01614189			N/A			81.15135956	N/A	N/A	N/A
	STD_10^6	1	17.52555656	17.50276566	0.032229863	N/A	N/A	N/A	81.15135956	N/A	N/A	N/A
		2	17.47997665			N/A			81.15135956	N/A	N/A	N/A
	STD_10^5	1	20.49023247	20.58051682	0.127682701	N/A	N/A	N/A	81.15135956	N/A	N/A	N/A
		2	20.67080307			N/A			81.15135956	N/A	N/A	N/A
	STD_10^4	1	23.82557678	23.83944321	0.019610086	N/A	N/A	N/A	81.15135956	N/A	N/A	N/A
		2	23.85330963			N/A			81.15135956	N/A	N/A	N/A
	STD_10^3	1	27.19595337	27.05581284	0.198188648	N/A	N/A	N/A	81.15135956	N/A	N/A	N/A
		2	26.9156723			N/A			81.15135956	N/A	N/A	N/A
	STD_10^2	2	30.61048126	30.6234169	0.018293755	N/A	N/A	N/A	81.30066681	N/A	N/A	N/A
		1	30.63635254			N/A			81.30066681	N/A	N/A	N/A
PCR negative control	NTC	2	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	67.8632431	61.59244156	N/A	N/A
		1	Undetermined			N/A			67.8632431	61.59244156	N/A	N/A
Clinical sample	C_1	1	36.92714691	36.92714691	N/A	7.60.E-01	7.60.E-01	2.69.E-01	81.44996643	74.73125458	N/A	Positive
		2	Undetermined			N/A			77.86665344	67.26602173	N/A	
	C_2	1	23.09035873	23.1430378	0.074499443	1.97.E+04	1.89.E+04	1.04.E+03	81.15135956	N/A	N/A	Positive
		2	23.19571686			1.82.E+04			81.00205994	N/A	N/A	
	C_3	1	28.09636688	27.96543121	0.185172349	4.98.E+02	5.51.E+02	7.46.E+01	81.15135956	N/A	N/A	Positive
		2	27.83449364			6.03.E+02			81.15135956	N/A	N/A	
	C_4	1	25.08996201	25.97364426	1.249716759	4.53.E+03	2.88.E+03	2.33.E+03	81.00205994	N/A	N/A	Positive
		2	26.85732841			1.24.E+03			81.00205994	N/A	N/A	
	C_5	1	25.75057602	25.76169586	0.015727181	2.79.E+03	2.77.E+03	3.19.E+01	81.00205994	N/A	N/A	Positive
		2	25.77281761			2.74.E+03			80.85275269	N/A	N/A	

		NIID_2019-nCoV (N set 2)									
Sample	ID	Cr	Cr Mean	Cr SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Tm1	Tm2	Tm3	Positive/Negative
PCR standard	STD_10^7	19.39909935	19.34678841	0.073978849	N/A	N/A	N/A	82.64300537	N/A	N/A	N/A
		19.29447746			N/A			82.64300537	N/A	N/A	
	STD_10^6	21.85225868	21.85241699	0.000223884	N/A	N/A	N/A	82.49369812	68.01055908	N/A	N/A
		21.8525753			N/A			82.49369812	68.60780334	N/A	
	STD_10^5	24.91580772	25.02029419	0.147766173	N/A	N/A	N/A	82.64300537	68.30918121	N/A	N/A
		25.12478065			N/A			82.49369812	68.15986633	N/A	
	STD_10^4	28.44880295	28.26570892	0.258932771	N/A	N/A	N/A	82.64300537	68.60780334	N/A	N/A
		28.08261681			N/A			82.64300537	68.7571106	N/A	
	STD_10^3	31.64292336	31.77170944	0.182131037	N/A	N/A	N/A	82.79232025	68.01055908	N/A	N/A
		31.90049553			N/A			82.64300537	68.15986633	N/A	
	STD_10^2	35.41104507	35.70783234	0.41972056	N/A	N/A	N/A	82.9416275	67.8612442	N/A	N/A
		36.0046196			N/A			82.9416275	68.45848846	N/A	
PCR negative control	NTC	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	68.15986633	61.5901947	90.40716553	N/A
		Undetermined			N/A			68.30918121	88.46612549	91.7509613	
Clinical sample	C_1	34.61388779	34.45215988	0.228717804	1.50.E+02	1.7.E+02	2.71.E+01	82.49369812	68.45848846	N/A	Positive
		34.29043198			1.89.E+02			82.34439087	68.30918121	N/A	
	C_2	36.85916138	36.92044067	0.086664706	3.11.E+01	3.0.E+01	1.81.E+00	82.49369812	67.71193695	N/A	Positive
		36.98172379			2.85.E+01			82.34439087	67.71193695	N/A	
	C_3	32.50771713	32.64422607	0.193055496	6.59.E+02	6.0.E+02	8.13.E+01	82.49369812	68.60780334	N/A	Positive
		32.78073883			5.44.E+02			82.34439087	68.01055908	N/A	
	C_4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		N/A			N/A			N/A	N/A	N/A	
	C_5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		N/A			N/A			N/A	N/A	N/A	

PCR standard	STD_2*10^5	20.56661797	20.61755562	0.072036721	N/A	N/A	N/A	82.04543304	N/A	N/A	N/A
		20.66849327			N/A			82.19465637	N/A	N/A	
	STD_2*10^4	23.75689316	23.80769348	0.071843855	N/A	N/A	N/A	82.04543304	N/A	N/A	N/A
		23.85849571			N/A			82.19465637	N/A	N/A	
	STD_2*10^3	27.02309227	27.05340958	0.042875145	N/A	N/A	N/A	82.04543304	N/A	N/A	N/A
		27.08372688			N/A			82.19465637	N/A	N/A	
	STD_2*10^2	30.52814293	30.77510452	0.349257797	N/A	N/A	N/A	82.19465637	N/A	N/A	N/A
		31.02206802			N/A			82.04543304	N/A	N/A	
PCR negative control	NTC	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	67.12294769	77.41946411	N/A	N/A
		Undetermined			N/A			67.719841	61.45240021	87.71598053	
Clinical sample	C_6	34.03028107	34.48791504	0.647194862	1.95.E+01	1.5.E+01	6.41.E+00	82.19465637	67.86907196	N/A	Positive
		34.94555283			1.04.E+01			82.04543304	67.86907196	N/A	
	C_7	Undetermined	36.73146439	N/A	N/A	3.1.E+00	N/A	66.97371674	82.49311066	N/A	Positive
		36.73146439			3.08.E+00			82.34388733	67.42139435	N/A	
	C_8	20.61829948	20.76358032	0.205456778	1.85.E+05	1.7.E+05	2.36.E+04	82.34388733	N/A	N/A	Positive
		20.90885925			1.52.E+05			82.19465637	N/A	N/A	
	C_9	36.86341095	36.39635468	0.660520017	2.82.E+00	4.1.E+00	1.78.E+00	82.04543304	66.82449341	N/A	Positive
		35.92929459			5.33.E+00			82.04543304	67.57061768	N/A	
	C_10	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.55.E+01	90.71086121	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.90.E+01	85.62197113	N/A	N/A	
	C_11	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.97.E+01	88.7651062	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.97.E+01	N/A	N/A	N/A	
	C_12	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.85.E+01	84.00826263	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.75.E+01	70.26184082	N/A	N/A	
	C_13	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.74.E+01	86.07099152	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.87.E+01	N/A	N/A	N/A	
	C_14	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.89.E+01	85.02328491	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.89.E+01	87.71739197	N/A	N/A	
	C_15	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.72.E+01	N/A	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		7.01.E+01	85.77164459	N/A	N/A	
	C_16	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	7.10.E+01	N/A	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.89.E+01	84.72393799	N/A	N/A	
	C_17	Undetermined	N/A	N/A	N/A	N/A	6.73.E+01	N/A	N/A	N/A	Negative
		Undetermined			N/A		6.97.E+01	77.24028015	N/A	N/A	

Table S4 : Comparison of SARS-CoV-2 RNA detection assay characteristics

Assay strategy	Targets	Reverse transcription	Enzyme	Detection limit for clinical samples	Time	Reagents cost	Robustness at room temp.	Reference
RT-qPCR	N	○	○	25 copies/reaction	90 min <	High ($5/unit*)	Low	Ishige et al., 2020, *Minhas
RT-LAMP	N	○	○	Ct < 30 for RT-qPCR	20 - 40 min	High	Low	Dao et al., 2020
RPA	N	○	○	100 copies/reaction	<15 min	High	Low	Wahed et al., 2021
Cas12a-assisted RTF-EXPAR based end-point fluorescent	Orf1ab	○	○	3.80 copies/µL	40 min	High	Low	Hang et al., 2022
CRISPR-Cas chiral biosensor (CENSOR)	Orf1ab	○	○	0.5 aM	240 min	High	Low	Yu et al., 2023
Molecular electromechanical system (MolEMS)	Orf1ab	×	○	0.2 - 1 copies/µL	<4 min	High	Low	Wang et al., 2022
Light-scattering evanescent wave (LSEW) biosensor	N	×	×	30 copeis/µL (49.8 aM)	5 min	Low ($0.8/unit)	High	This study

参考文献

- Cohen, Andrew N, Bruce Kessel, and Michael G Milgroom. 2020. 'Diagnosing SARS-CoV-2 Infection: The Danger of over-Reliance on Positive Test Results False Positive Test Results Impact Clinical and Policy Decisions'. MedRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080911.
- Dhadwal, Harbans S., Paul Kemp, Josephine Aller, and M. Megan Dantzler. 2004. 'Capillary Waveguide Nucleic Acid Based Biosensor'. Analytica Chimica Acta 501 (2): 205–17. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.035.
- Fuchs, Bernhard M, Glöckner Frank O, Wulf Jörg, and Amann Rudolf. 2000. 'Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S RRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes'. Applied and environmental microbiology 66 (8): 3603–7. https://journals.asm.org/journal/aem.
- Herlemann, Daniel P.R., Matthias Labrenz, Klaus Jürgens, Stefan Bertilsson, Joanna J. Waniek, and Anders F. Andersson. 2011. 'Transitions in Bacterial Communities along the 2000 Km Salinity Gradient of the Baltic Sea'. ISME Journal 5 (10): 1571–79. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41.
- Hermansson, A., and P. E. Lindgren. 2001. 'Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR'. Applied and Environmental Microbiology 67 (2): 972–76. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.972-976.2001.
- Huertas, César S., David Fariña, and Laura M. Lechuga. 2016. 'Direct and Label-Free Quantification of Micro-RNA-181a at Attomolar Level in Complex Media Using a Nanophotonic Biosensor'. ACS Sensors 1 (6): 748–56. https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00162.
- Ishige, Takayuki, Shota Murata, Toshibumi Taniguchi, Akiko Miyabe, Kouichi Kitamura, Kenji Kawasaki, Motoi Nishimura, Hidetoshi Igari, and Kazuyuki Matsushita. 2020. 'Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 RNA by Multiplex RRT-PCR for Molecular Diagnosis of COVID-19 by Clinical Laboratories'. Clinica Chimica Acta 507: 139–42. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.023.
- Li, Bingling, Andrew D. Ellington, and Xi Chen. 2011. 'Rational, Modular Adaptation of Enzyme-Free DNA Circuits to Multiple Detection Methods'. Nucleic Acids Research 39 (16). https://doi.org/10.1093/nar/gkr504.
- Dao Thi, Viet L, Konrad Herbst, Kathleen Boerner, Matthias Meurer, Lukas PM Kremer, Daniel Kirrmaier, Andrew Freistaedter, et al. 2020. 'A Colorimetric RT-LAMP Assay and LAMP-Sequencing for Detecting SARS-CoV-2 RNA in Clinical Samples'. Science Translational Medicine 12:7075. https://www.science.org.

- Mohammadniaei, Mohsen, Ming Zhang, Jon Ashley, Ulf Bech Christensen, Lennart Jan Friis-Hansen, Rasmus Gregersen, Jan Gorm Lisby, et al. 2021. 'A Non-Enzymatic, Isothermal Strand Displacement and Amplification Assay for Rapid Detection of SARS-CoV-2 RNA'. Nature Communications 12 (1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-25387-9.
- Mollasalehi, Hamidreza, and Elmira Shajari. 2021. 'A Colorimetric Nano-Biosensor for Simultaneous Detection of Prevalent Cancers Using Unamplified Cell-Free Ribonucleic Acid Biomarkers'. Bioorganic Chemistry 107. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104605.
- Nakajima, Meri, Reiko Hirano, Yuki Nakaya, and Hisashi Satoh. 2023. 'Analysis of Unamplified 16S RRNA of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge by Spectrophotometry Using Gold Nanoprobes'. ACS ES and T Water 3 (9): 3113–20. https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00265.
- Ngo, Hoan T., Elizabeth Freedman, Ren Abelard Odion, Pietro Strobbia, Agampodi Swarnapali De Silva Indrasekara, Priya Vohra, Steve M. Taylor, and Tuan Vo-Dinh. 2018. 'Direct Detection of Unamplified Pathogen RNA in Blood Lysate Using an Integrated Lab-in-a-Stick Device and Ultrabright SERS Nanorattles'. Scientific Reports 8 (1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-21615-3.
- Nykypanchuk, Dmytro, Mathew M. Maye, Daniel Van Der Lelie, and Oleg Gang. 2008. 'DNA-Guided Crystallization of Colloidal Nanoparticles'. Nature 451 (7178): 549–52. https://doi.org/10.1038/nature06560.
- Park, So Jung, Anne A. Lazarides, James J. Storhoff, Lorenzo Pesce, and Chad A. Mirkin. 2004. 'The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization'. Journal of Physical Chemistry B 108 (33): 12375–80. https://doi.org/10.1021/jp040242b.
- Satoh, Hisashi, Meri Nakajima, Reiko Hirano, and Yuki Nakaya. 2022. 'Highly Sensitive and Homogeneous Detection of Unamplified RNA Based on the Light Scattering Properties of Gold Nanoparticle Probes'. Biosensors and Bioelectronics: X 12: 100249. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100249.
- Sato, Kengo, Manato Akiyama, Yasubumi Sakakibara. 2021. 'RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration'. Nat Commun 12, 941. https://doi: 10.1038/s41467-021-21194-4.
- Sarzynska, J., Popenda, M., Antczak, M., Szachniuk, M. 'RNA tertiary structure prediction using RNAComposer in CASP15, PROTEINS'. Structure, Function, and Bioinformatics, 2023, 91(12):1790-1799. https://doi.org/10.1093/nar/gks339.
- Sharma, Vijay K. 2006. 'Real-Time Reverse Transcription-Multiplex PCR for Simultaneous and Specific Detection of RfbE and Eae Genes of Escherichia Coli O157:H7'. Molecular and Cellular Probes 20 (5): 298–306. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.03.001.

- Sharma, Vijay K., and Evelyn A. Dean-Nystrom. 2003. 'Detection of Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 by Using a Multiplex Real-Time PCR Assay for Genes Encoding Intimin and Shiga Toxins'. Veterinary Microbiology 93 (3): 247–60. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00039-7.
- Shirato, Kazuya, Yuriko Tomita, Hiroshi Katoh, Souichi Yamada, Shutetsu Fukushi, Shutoku Matsuyama, and MakotoTakeda. 2021. 'Performance Evaluation of Real-Time RT-PCR Assays for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Developed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan'. Japanese Journal of Infectious Diseases 74 (5): 465–72.
- Stambaugh, Alexandra M., Matthew A. Stott, Gopikrishnan G. Meena, Manasi Tamhankar, Ricardo Carrion, Jean L. Patterson, Aaron R. Hawkins, and Holger Schmidt. 2021. 'Optofluidic Amplification-Free Multiplex Detection of Viral Hemorrhagic Fevers'. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics 27 (4). https://doi.org/10.1109/JSTQE.2020.3024239.
- Stimpson, Don I, Joanell V Hoijer, Wangting Hsieh, Cynthia Jou, Julian Gordon, Tomas Theriaults, Ronald Gambles, and John D Baldeschwielert. 1995. 'Real-Time Detection of DNA Hybridization and Melting on Oligonucleotide Arrays by Using Optical Wave Guides'. Genetics 92:6379–83. https://www.pnas.org.
- Storhoff, James J., Adam D. Lucas, Viswanadham Garimella, Y. Paul Bao, and Uwe R. Müller. 2004. 'Homogeneous Detection of Unamplified Genomic DNA Sequences Based on Colorimetric Scatter of Gold Nanoparticle Probes'. Nature Biotechnology 22 (7): 883–87. https://doi.org/10.1038/nbt977.
- Wahed, Ahmed Abd El, Pranav Patel, Melanie Maier, Corinna Pietsch, Dana Rüster, Susanne Böhlken-Fascher, Jonas Kissenkötter, et al. 2021. 'Suitcase Lab for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay'. Analytical Chemistry 93 (4): 2627–34. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04779.
- Wang, Ye Fu, Dai Wen Pang, Zhi Ling Zhang, Hu Zhi Zheng, Jun Ping Cao, and Jun Tao Shen. 2003. 'Visual Gene Diagnosis of HBV and HCV Based on Nanoparticle Probe Amplification and Silver Staining Enhancement'. Journal of Medical Virology 70 (2): 205–11. https://doi.org/10.1002/jmv.10379.
- Yager, Paul, Gonzalo J. Domingo, and John Gerdes. 2008. 'Point-of-Care Diagnostics for Global Health'. Annual Review of Biomedical Engineering 10:107–44. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160524.
- Yu, Zhicai, Li Pan, Xiaowei Ma, Tianming Li, Fukai Wang, Donglei Yang, Min Li, and Pengfei Wang. 2023. 'Detection of SARS-CoV-2 RNA with a Plasmonic Chiral Biosensor'. Biosensors and Bioelectronics 237 (October). https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115526.

- Zavoiura, Oleksandr, Ute Resch-Genger, and Oliver Seitz. 2018. ‘Quantum Dot-PNA Conjugates for Target-Catalyzed RNA Detection’. Bioconjugate Chemistry 29 (5): 1690–1702. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00157.
- 高橋浩三, 棚上照男. 2008. ‘光導波路分光法の基礎と電気化学への応用’. Review of Polarography 54 (3): 269–79.

第 5 章　スマートフォンとペーパーチップを用いた検出法の開発

第 1 節　ペーパーチップを用いた核酸検出法

ペーパー分析チップとは，紙を基材とした簡易分析チップである(渡慶次 2011)．核酸の検出には，検出対象の核酸の核酸と特異的に結合する異なる 2 種類の DNA を設計する(J. Hu et al. 2014)．一方はチップに固定し（キャプチャーDNA と称す），もう一方には金ナノ粒子を修飾する（検出プローブと称す）．検出対象の核酸の核酸と検出プローブを混合してハイブリダイズさせ，これをキャプチャーDNA を固定したチップに滴下し，溶媒で展開し，キャプチャーDNA が固定された検出ラインに検出プローブと結合した検出対象の核酸核酸をハイブリダイズさせることで，検出ラインに金ナノ粒子を捕捉する．金ナノ粒子は濃い赤色を呈するので検出対象の核酸核酸の有無は肉眼でも容易に判別できる．よって，下水中の細菌を簡便に検出することを目指し，ペーパーチップとスマートフォンとによる分析法を開発することとした．

第 2 節　実験方法

2-1　金ナノ粒子プローブ（検出プローブ）の作製

金ナノ粒子プローブ（以下，検出プローブと称す）は，第 2 章第 2 節 **2-1　金ナノ粒子プローブの作製**の通りに行った．本実験では，5 nm の金ナノ粒子溶液（Gold nanoparticles 5 nm diameter，OD 1，stabilized suspension in citrate buffer, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて検出プローブを作製した．本実験では，Universal bacterial 16S rRNA 検出に使用する PCR プライマーセット（341f と 805r）のうち，805r を検出プローブの作製に使用するプローブ DNA として，341f に相補的な配列を持つ c341f を検出ライン上に固定するキャプチャーDNA として使用した．検出プローブの作製に使用したプローブ DNA（HS-805R）の配列を表 10 に示す．

2-2　核酸サンプルの抽出と定量

核酸サンプルの抽出は，**第 2 章第 2 節 2-2　核酸サンプルの抽出と定量 PCR 法による検出対象の定量**の通りに行った．はじめに，キャプチャーDNA およびプローブ DNA と完全に相補的な塩基配列を持つ合成 DNA（Synthetic DNS; SD，表 10 参照）の検出を試みた．次にネガティブコントロール（NC）系として，プローブ DNA とはハイブリダイズするがキャプチャーDNA とはハイブリダイズしない合成 DNA（SD-NC，表 10 参照），チミンが 48 塩基連なった T48（表 10 参照），Blank（Nuclease-Free water）を用意し，本ペーパーチップが検出対象の核酸の核酸を検出可能であることを確認した．続いて，下水処理場にて採取した活性汚泥から，RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて RNA サンプルを抽出した．抽出した RNA サンプルの濃度を Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit (Thermo Fisher

Scientific, MA, USA)を用いて定量したところ，85 nM であった．抽出した RNA サンプル，RNA サンプルを Ribonuclease (DNase free) Solution (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) で RNase 処理した RNA-NC，RNA など核酸を含まない Blank（Nuclease-Free water）を調整し，分析に使用した．

2-2　ペーパーチップの作製

ペーパー分析チップは Cao らの方法を参考に，グルタルアルデヒドカップリングによって検出ライン上にキャプチャーDNA を固定した (Cao et al. 2015)．純セルロース製クロマトグラフィー用ペーパー角型 1 Chr（Whatman）を縦 4 cm，横 1 cm の短冊状に切り，中央部分を検出ラインとした．検出ラインに濃度 0.01 %（w/v）でキトサンを含む 1 %酢酸緩衝液を 1.5 µL 滴下し，16 時間乾燥させた．その後，検出ラインに 3 %グルタルアルデヒド溶液を 1.5 µL 滴下し，シャーレ内で 2 時間静置した．検出ラインを 100 µL のカップリングバッファー（組成：1.5 %（w/v）マンニトール，0.15 %（v/v）グリセリン，0.01 %（v/v）Tween20）で 3 回洗浄した．検出ラインに濃度 10 µM でキャプチャーDNA（NH_2-c341F，表 10 参照）を含む Nuclease-Free water を 1.5 µL 滴下し，シャーレ内に 2 時間静置することでキャプチャーDNA をチップ上の検出ラインに固定した．検出ラインを濃度 0.1 %（v/v）で Tween20 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 9.2）100 µL で 3 回洗浄し 30 分間乾燥させた．作製したチップは使用するまで暗所にて室温で保管した（図 54）．

表 10　本実験で使用した DNA の塩基配列

Name	Sequence (5'→3')	Length (mer)
NH_2-c341F	NH_2-CTG CWG CCN CCC GTA GG	17
HS-805R	HS-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC	21
SD	GGA TTA GAT ACC CTF FTA GTC-T_{10}*)-CCT ACG GGA GGC AGC AG	48
SD-NC	GGA TTA GAT ACC CTF FTA GTC-T_{10}*)-TTT TTT TTT TTT TTT TT	48
T48	T_{48}*)	48

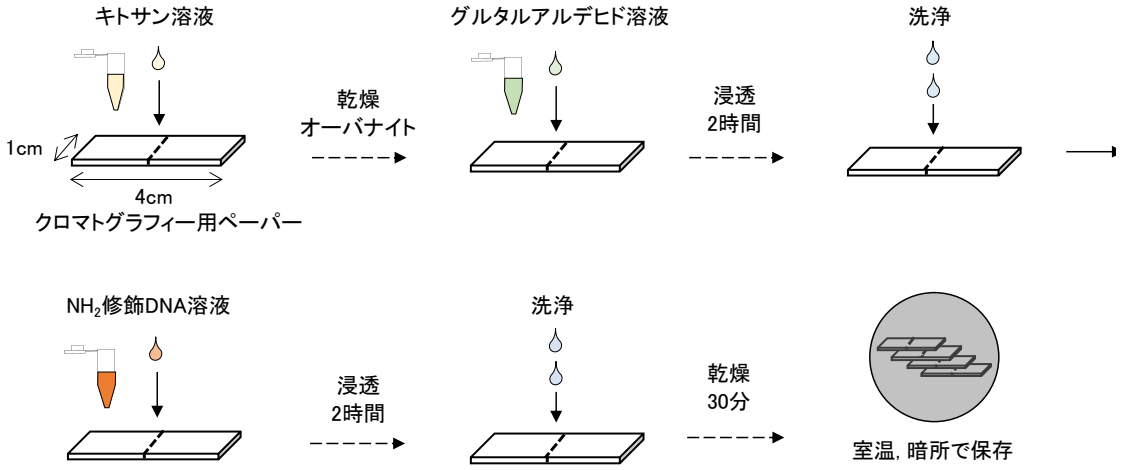


図 54　ペーパーチップの作製方法

2-3　分析方法

全ての実験において検出プローブ量は 10 μL, 検出対象の核酸 DNA 濃度は 10 μM, 量は 0.2 μL，交雑を促進する目的で添加した NaCl 溶液濃度は 5 M，量は 0.2 μL とし，これら全てを混合し，このうちの 3 μL を検出ラインの左側 5 mm 地点に滴下した．検出ラインの左端から 1 % Tween20 溶液で展開した．展開後のチップをスマートフォン（iPhone7，Apple Inc.）のカメラで真上から撮影し RGB 画像を取得した．取得した RGB 画像を ImageJ(Rasband 1997)を用いてグレースケール画像に変換した．RGB をグレースケールに変換したのは，金ナノ粒子自体は赤色を呈するものの検出ライン上で濃縮した場合には青に変色するため，人の眼が感じる色の強さにより近いグレースケールの値で定量評価するためである．画像の検出ラインを中心に縦 100 pixel，横 600 pixel の範囲を選択し（縦 5 mm，横 30 mm に相当），検出ラインからの距離と平均輝度値の関係を解析した．輝度値（Brightness value，B）は 0 から 255 の値で表され，値が大きいほど白に，小さいほど黒に近いことを表す．縦方向の 100 pixel の B を平均したものを平均輝度値（Average brightness value，AB）とした．検出ラインから左に 100 pixel の地点における AB（AB_{-100}）と検出ラインにおける AB（AB_0）の差（$AB_{-100} - AB_0$）を ΔAB と定義した．サンプルおよび展開液を滴下した地点は検出ラインから左に約 150 pixel の地点である．検出ラインに検出プローブが残存するほど色が濃くなり，AB0 が小さくなるので ΔAB は大きくなる．ブランクの ΔAB に対するサンプルの ΔAB の比（$R = \Delta AB_{Sample}/\Delta AB_{Blank}$）を算出した．Blank と比較してサンプルの検出ラインの色が濃いほど R の値は大きくなる．検出結果を Blank の値で標準化するのは，実験ごとに変化する光量などの画像取得条件の影響を排除するためである．

はじめに，金ナノ粒子の直径が分析に及ぼす影響ついて検討するため，直径 5 nm と 10 nm の金ナノ粒子を用いて検出プローブを作製した．キトサン濃度が分析に及ぼす影響ついて検討するため，キトサンの濃度を 0.005 %または 0.01 %（w/v）としてチップを作製した．キャプチャーDNA 密度が分析に及ぼす影響ついて検討するため，検出ラインに DNA 濃度 10 μM のキャプチャーDNA 溶液 1.5 μL を 1 回または 3 回滴下しチップを作製した．これら三種の実験は個別に行った．その他の実験条件は上述の通りであるが，検出プローブおよび検出対象の核酸 DNA を検出ライン上に滴下し，検出ライン上に 1 % Tween20 溶液を滴下することで展開した点は異なる．

第 3 節　実験結果および考察

3-1　金ナノ粒子径が測定に与える影響

直径 5 nm または 10 nm の金ナノ粒子で作製した検出プローブを使用した分析の結果を図 55 に示す．5 nm の場合は人工合成 DNA のみ検出ラインが細く赤色で染まり，その他のサンプルでは検出ラインの色は薄い紫色であった（図 55A）．一般に金ナノ粒子は互いの距離が離れていると赤色に，距離が近づくと薄い紫色を呈する．また，10 nm の場合は 5 nm の場合の人工合成 DNA よりも検出ラインが濃い赤色を呈し，全てのサンプルにおいて幅や色に顕著な差は見られなかった（図 55B）．AB を求めたところ，5 nm の場合は-300 から-100 にかけて AB が減少した（図 55C）．10 nm の場合は-300 から-100 にかけて AB が増加した（図 55D）．-100 から 0 にかけては 5 nm の場合は AB が 10 程度しか減少しなかったのに対し，10nm の場合は 30 程度減少した．この理由として，直径 10 nm の検出プローブが直径 5 nm の検出プローブよりも検出ラインにより多く残存したことが考えられる．5 nm の場合の人工合成 DNA サンプルの AB をその他の NC サンプルと比較すると，ピーク形状がよりシャープであることがわかる（図 55C）．これは検出プローブがハイブリダイズによって検出ラインに高密度に捕捉されたためと考えられる．R 値は人工合成 DNA および人工合成 DNA-NC 検出時では金ナノ粒子の直径によらず同程度であったが，T48 分析時は 5 nm の場合で 0.67，10 nm の場合で 1.01 であった（図 55E）．分析はネガティブコントロールの結果とポジティヴコントロールの結果の差がより顕著であることが望ましいので，今後の分析では直径 5 nm の金ナノ粒子を検出プローブに用いることとした．本研究では 5 nm よりも小さい金ナノ粒子を修飾した検出プローブは検討しなかった．

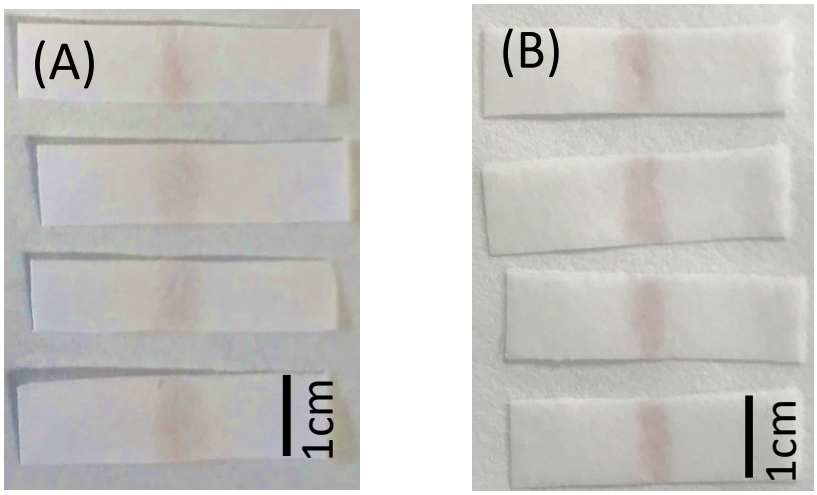
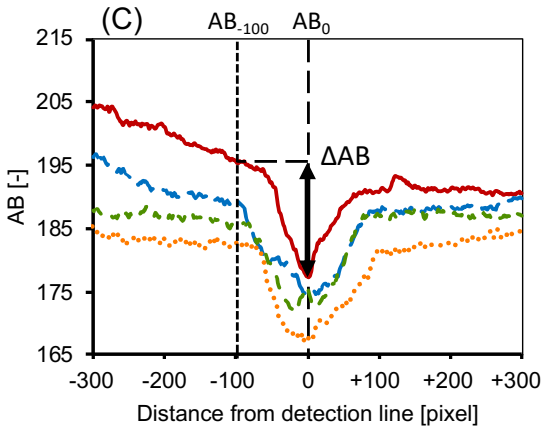
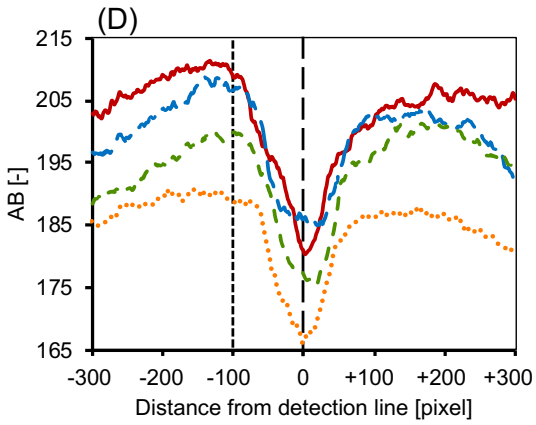
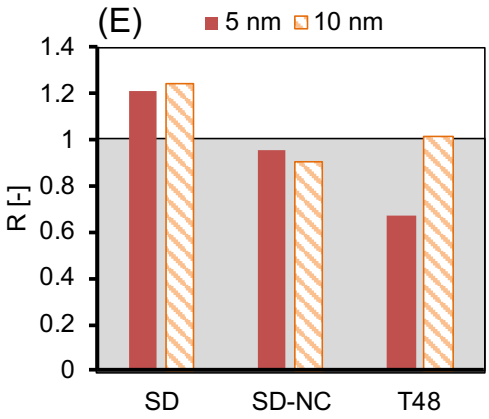


図 55　金ナノ粒子の直径が分析結果に及ぼす影響
スマートフォンで撮影した分析チップの画像，（A）直径 5 nm，（B）直径 10 nm





検出ラインからの距離と平均輝度値の関係，（C）直径 5 nm，（D）直径 10 nm
実線，長破線，破線，点線はそれぞれ SD，SD-NC，T48，Blank を表す．



（E）SD，SD-NC，T48 の R 値（ブランクの ΔAB に対するサンプルの ΔAB の比）

3-2　キトサン濃度が測定に与える影響

濃度 0.005%または 0.01%（w/v）のキトサンを用いて作製したチップを使用した分析結果を図 3-4-2 に示す．0.01%の場合は人工合成 DNA のみ検出ラインが赤色で，その他のサンプルは薄い紫色であった（図 56A）．0.005%の場合はすべてのサンプルの検出ラインが濃い赤色で，サンプル間で色の差は見られなかった（図 56B）．AB を求めたところ，0.005%の場合（図 56C）も 0.01%の場合（図 56D）も-300 から-50 にかけて AB が減少した．-50 から 0 にかけて 0.005%の場合は AB が 30 程度減少したのに対し，0.01%の場合は 10 程度しか減少しなかった．この結果から 0.005%の場合は 0.01%の場合よりも検出ラインに検出プローブが多く残存していることがわかった．R 値は 0.005%の場合はキトサン濃度によらず 1 程度であった（図 56E）．一方，0.01%の場合は分析対象が人工合成 DNA の場合 1.21，人工合成 DNA-NC の場合 0.95，T48 の場合 0.67 であり，人工合成 DNA の場合に検出ラインの色が最も濃いことが分かった．これに対し，キトサンの濃度が 0.05%以上の場合は検出ラインが黄色に着色し検出プローブの画像解析に著しく影響を与えた（データは記載せず）．よって本研究ではキトサン濃度を 0.01%に設定した．

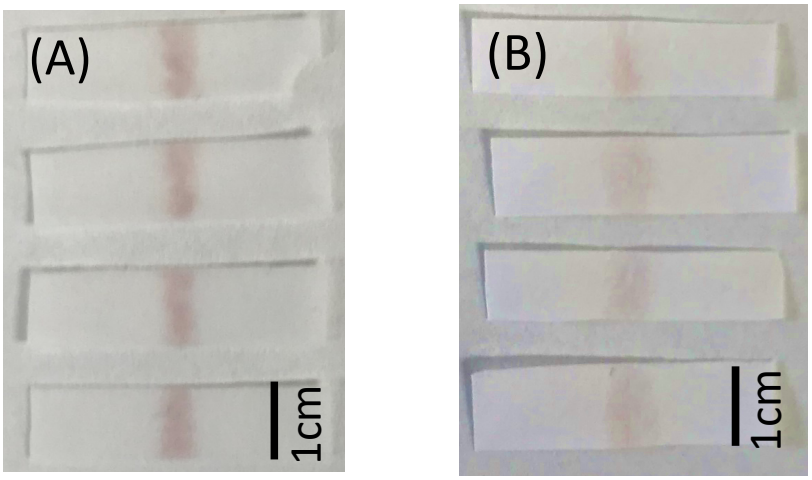
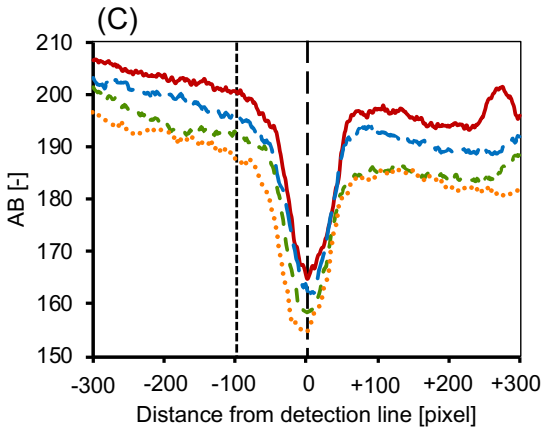
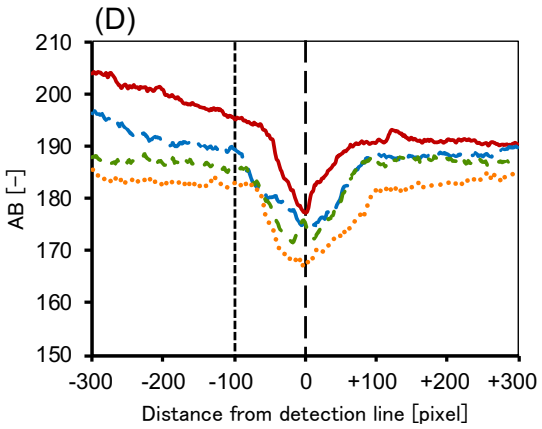
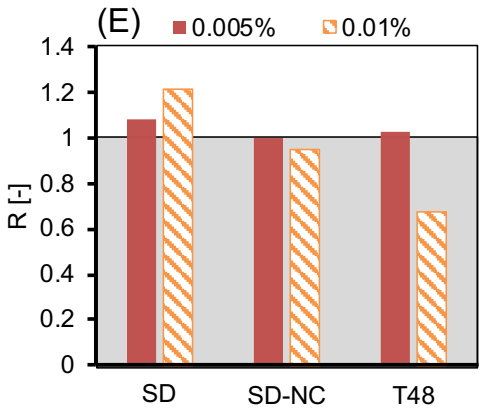


図 56　キトサン濃度が分析結果に及ぼす影響
スマートフォンで撮影した分析チップの画像，（A）0.005 %，（B）0.01 %





検出ラインからの距離と平均輝度値の関係，（C）0.005 %，（D）0.01 %
実線，長破線，破線，点線はそれぞれ SD，SD-NC，T48，Blank を表す．



（E）SD，SD-NC，T48 の R 値（ブランクの ΔAB に対するサンプルの ΔAB の比）

3-3　キャプチャーDNA の固定量が測定に与える影響

キャプチャーDNA 溶液の滴下量を 1.5 μL または 4.5 μL とした時のペーパー分析チップの画像と解析結果を図 56 に示す．1.5 μL の場合は人工合成 DNA でのみ検出ラインが細く赤色で，その他のサンプルでは薄い紫色であった（図 57A）．しかし，4.5 μL の場合は人工合成 DNA でのみ検出ラインが細く紫色で，その他のサンプルは赤色であった．また，1.5 μL よりも全体的にラインが細く色が濃かった（図 57B）．検出ラインからの距離と AB の関係のグラフより，1.5 μL の場合（図 57C）は 4.5 μL の場合（図 57D）と比べて全体的に AB が小さかった．これは，取得した画像の明度の違いによるものであると考えられる．また，1.5 μL，4.5 μL の場合ともに-300 から-50 にかけて AB がわずかに減少し，-50 から 0 にかけて 1.5 μL の場合は AB が 1.5 程度減少し，4.5 μL の場合は 20 程度減少した．1.5 μL の場合，人工合成 DNA のピークは人工合成 DNA-NC，T48，Blank のそれよりもピークがシャープであった．4.5 μL の場合は 1.5 μL の場合に比べて全てのサンプルのピークがシャープであった．つまり，4.5 μL の場合は 1.5 μL の場合よりもサンプルによらず検出ライン付近に検出プローブが多量に残存した．R 値は人工合成 DNA および T48 検出時は 1.5 μL の場合で 1.21 および 0.67，4.5 μL の場合で 0.89 および 0.97 であった（図 56E）．よって，キャプチャー DNA の滴下量は人工合成 DNA と T48 の R 値の差が最も大きい 1.5 μL がより適していた．

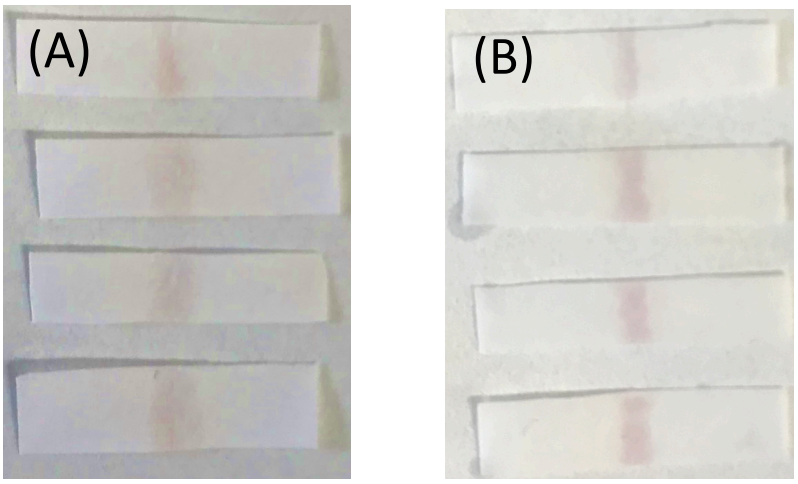
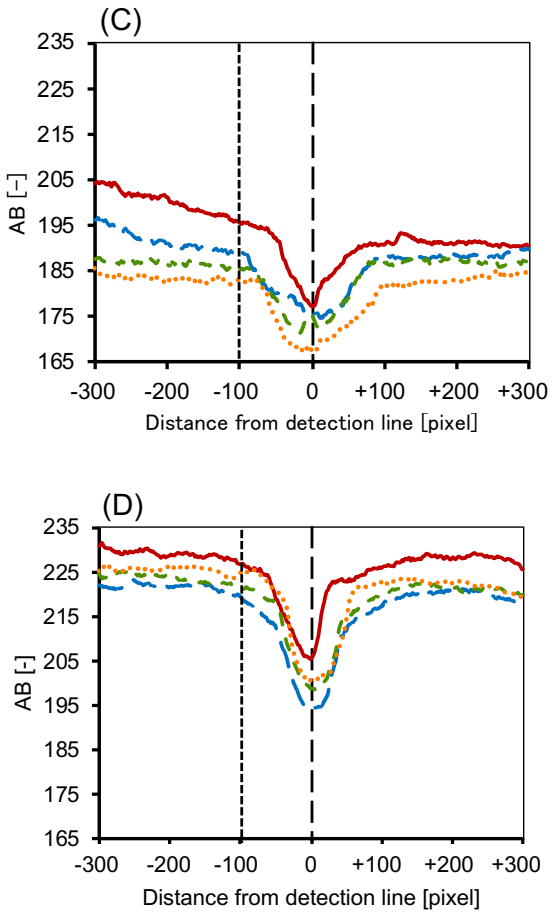
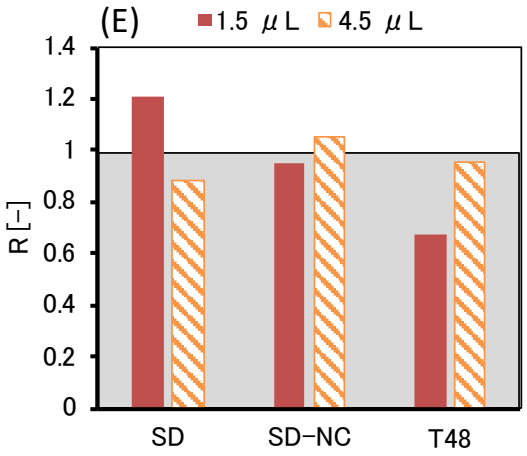


図 57　キャプチャーDNA の固定量
スマートフォンで撮影した分析チップの画像，（A）1.5 μL，（B）4.5 μL



検出ラインからの距離と平均輝度値の関係，（C）1.5 μL，（D）4.5 μL
実線，長破線，破線，点線はそれぞれ SD，SD-NC，T48，Blank を表す．



（E）SD，SD-NC，T48 の R 値（ブランクの ΔAB に対するサンプルの ΔAB の比）

3-4　人工合成 DNA の検出

上述の実験で明らかにした最適条件に従ってチップと検出プローブを作製し改めて人工合成 DNA を分析した．人工合成 DNA 分析時のチップの画像と画像解析結果を図 57 に示す．検出ラインの色は，人工合成 DNA のみが赤紫色で，その他のサンプルは非常に薄い紫色であった（図 58A）．AB を求めたところ，人工合成 DNA 分析のチップには 0 の地点に ΔAB が約 1.5 のシャープなピークが見られた．これに対し，その他のサンプルは+25 から +50 の間に，ΔAB が約 5 のブロードなピークが見られた（図 58B）．すなわち人工合成 DNA-NC，T48，Blank の分析では検出プローブが検出ラインを通り過ぎた．ピークの ΔAB が小さいことから一部の検出プローブは地点 50 よりも先に展開されたと考えられる．R 値は人工合成 DNA 分析チップで 363，人工合成 DNA-NC 分析チップで 36，T48 分析チップで 53 であった（図 58C）．これより，人工合成 DNA はその他のサンプルに比べて検出ラインの色が非常に濃いことが分かった．以上の結果から，本手法は検出プローブとキャプチャー DNA の両方とハイブリダイズする DNA を検出可能であることが明らかとなった．

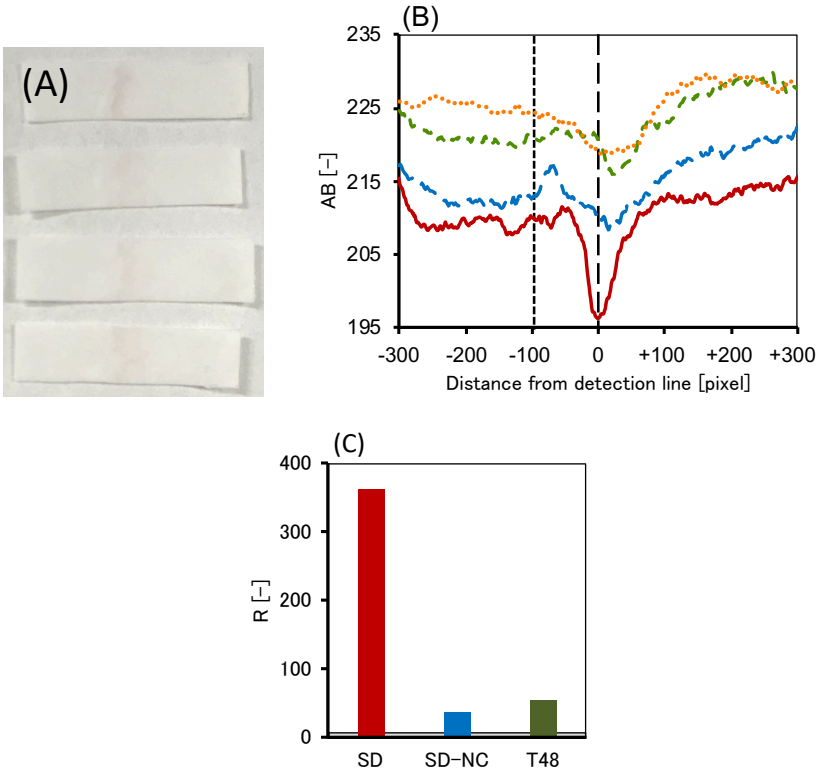


図 58　SD，SD-NC，T48 の検出結果
（A）スマートフォンで撮影した分析チップの画像，（B）検出ラインからの距離と平均輝度値の関係．

3-5　活性汚泥中の細菌の 16S rRNA の検出

最後に活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA の検出を試みた．精製 RNA サンプル分析時のチップの画像と画像解析結果を図 59 に示す．検出ラインの色は，精製 RNA サンプル分析時は濃い赤色，RNA-NC 分析時は RNA よりも薄い赤色，Blank は薄い紫色であった（図 59A）．AB を求めたところ，精製 RNA サンプルを分析したチップには地点 0 にピークが見られたが，その他のサンプルの場合は+20 付近にピークが見られた（図 59B）．これは RNA-NC と Blank にはハイブリダイズする対象の核酸が存在しないため，上述したように，検出プローブが検出ラインを通り過ぎたことで説明できると考えられる．R 値は精製 RNA サンプルで 2.59，RNA-NC で 1.20 であった（図 59C）．精製 RNA サンプルの R 値が NC のそれよりも高くなったことから，本手法は活性汚泥中の全細菌の 16S rRNA を検出可能な技術であることが明らかとなった．RNA-NC の R 値が 1.0 を超えた理由として，RNA が完全には分解されなかったこと，分解はされたものの残存した RNA がキャプチャーDNA や検出プローブにハイブリダイズし検出プローブの流動性を低下させたこと，Ribonuclease が検出プローブに吸着し流動性を低下させたこと等が考えられる．

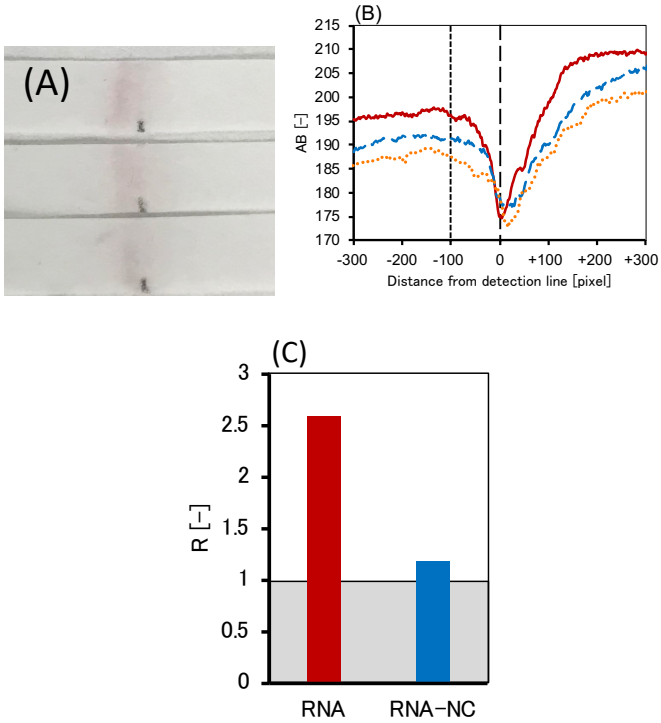


図 59　RNA，RNA-NC の検出結果 ，（A）スマートフォンで撮影した分析チップの画像，（B）検出ラインからの距離と平均輝度値の関係．実線，長破線，点線はそれぞれ RNA，RNA-NC，Blank を表す，（C）RNA，RNA-NC の R 値（ブランクの ΔAB に対するサンプルの ΔAB の比）

表 11 に，検出プローブとペーパー分析チップを用いて微生物の核酸濃度を測定した既往の研究をまとめた．検出限界値は 1 nM のオーダー，定量範囲は 20 から 2500 nM であった(Rivas et al. 2018; Tsai et al. 2013; Teengam et al. 2017)．シグナルを増強した場合には検出限界値は 1 オーダー低下した(Rohrman et al. 2012; J. Hu et al. 2013)．本研究で測定したサンプルの核酸濃度は 85 nM であり，検出限界値や定量範囲は求めていないが，既往の研究を参考にすると，85 nM よりも 1 オーダー低い数 nM の検出が可能であったと予想される．

ペーパー分析チップ法と定量 PCR 法を比較すると，RNA の抽出作業は同様であるが，定量 PCR 法では RNA の逆転写，高額で化学的に不安定な酵素，高価なリアルタイム PCR 装置が不可欠であるのに対し，ペーパー分析チップ法で用いる検出プローブやペーパー分析チップのコストは 1 分析当たり 19 円であった．RNA 抽出後の分析時間は，定量 PCR 法は 3 時間程度であるのに対しペーパー分析チップ法は 10 分程度である．一方，検出プローブやペーパー分析チップの作製には 24 時間を要した．さらに，PCR 法では核酸を増幅する事により感度を高めているのに対し，ペーパー分析チップ法では検出ラインに金ナノ粒子を集積する事で感度を高めている．本研究では検出ライン上の金ナノ粒子の密度を測定できなかったため，これを解明することは今後の研究課題である．

表 11　核酸を検出対象とした比色分析による lateral flow assay とペーパーチップを用いた分析法の分析性能のまとめ

Assay	Target	Linearity/nM	Determination limit/nM	Reference
Conventional assays				
	Neisseria meningitidis	N.D.	4.4	(Rivas et al. 2018)
	Mycobacterium tuberculosis	N.D.	2.6	(Tsai et al. 2013)
	MERS-CoV, MTB and HPV	20−1000 (MERS-CoV), 50−2500 (MTB) 20−2500 (HPV)	1.53 (MERS-CoV) 1.27 (MTB) 1.03 (HPV)	(Teengam et al. 2017)
	Total bacteria in activated sludge	N.D.	85	This study
Assays with signal enhancement				
	HIV-1 RNA	1.7−5.3 × 10^4	0.17	(Rohrman et al. 2012)
	Human immunodeficiency virus type 1	N.D.	0.1	(J. Hu et al. 2013)

第 4 節　小括

本研究において，下水中の細菌が持つ核酸を検出可能なペーパー分析チップを開発した．本研究の分析条件では，検出プローブの金ナノ粒子の直径は 5 nm が，キャプチャーDNA を固定するためのキトサンの濃度は 0.01%が，キャプチャーDNA の固定は DNA 濃度 10 μM の溶液 1.5 μL をチップに 1 回滴下するのが最適なチップ作製条件であった．この条件でチップを作製し合成 DNA を分析した．ターゲットが検出プローブとキャプチャーDNA の両方とハイブリダイズする DNA の場合にのみ検出ラインの赤色が濃くなり，ターゲットを検出できることが分かった．さらに，活性汚泥から市販のキットを用いて RNA を精製し分析した．合成 DNA と同様に全細菌の 16S rRNA を含むサンプルでのみ検出ラインの赤色が濃くなり，全細菌の 16S rRNA を検出できたことが分かった．

ペーパー分析チップ法と定量 PCR 法を比較すると，RNA の抽出作業は同様であるが，定量 PCR 法では RNA の逆転写，高額で化学的に不安定な酵素，高価なリアルタイム PCR 装置が不可欠であるのに対し，ペーパー分析チップ法で用いる検出プローブやペーパー分析チップのコストは 1 分析当たり 19 円であった．RNA 抽出後の分析時間は，定量 PCR 法は 3 時間程度であるのに対しペーパー分析チップ法は 10 分程度である．一方，検出プローブやペーパー分析チップの作製には 24 時間を要した．さらに，PCR 法では核酸を増幅する事により感度を高めているのに対し，ペーパー分析チップ法では検出ラインに金ナノ粒子を集積する事で感度を高めている．本研究では検出ライン上の金ナノ粒子の密度を測定できなかったため，これを解明することは今後の研究課題である．

参考文献

- Cao, Rong, Liyun Guan, Miaosi Li, Junfei Tian, and Wei Shen. 2015. 'A Zero-Step Functionalization on Paper-Based Biosensing Platform for Covalent Biomolecule Immobilization'. Sensing and Bio-Sensing Research 6 (December):13–18. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.09.002.
- Hu, Jie, Shu Qi Wang, Lin Wang, Fei Li, Belinda Pingguan-Murphy, Tian Jian Lu, and Feng Xu. 2014. 'Advances in Paper-Based Point-of-Care Diagnostics'. Biosensors and Bioelectronics. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.075.
- Jie Hu, Lin Wang, Fei Li, Yu Long Han, Min Lin, Tian Jian Luand Feng Xu. 2013. 'Oligonucleotide-linked gold nanoparticle aggregates for enhanced sensitivity in lateral flow assays'. Lab on Chip.
- Lourdes Rivas, Philippa Reuterswärd, Reza Rasti, Björn Herrmann, Andreas Mårtensson, Tobias Alfvén, Jesper Gantelius, Helene Andersson-Svahn 2018. 'A vertical flow paper-microarray assay with isothermal DNA amplification for detection of Neisseria meningitidis'. Talanta. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.070.
- Rasband, W.S. 1997. 'ImageJ'. Bethesda, Maryland, USA, : National Institutes of Health.
- Brittany A. Rohrman, Veronica Leautaud, Elizabeth Molyneux, Rebecca R. Richards-Kortum1. 2012. 'A Lateral Flow Assay for Quantitative Detection of Amplified HIV-1 RNA'. PLOS One.
- Prinjaporn Teengam, Weena Siangproh, Adisorn Tuantranont, Tirayut Vilaivan, Orawon Chailapakul, and Charles S. Henry. 2017. 'Multiplex Paper-Based Colorimetric DNA Sensor Using Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid-Induced AgNPs Aggregation for Detecting MERS-CoV, MTB, and HPV Oligonucleotides'. Analytical Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00255
- Tsung-Ting Tsai, Shu-Wei Shen, Chao-Min Cheng and Chien-Fu Chen. 2013. 'Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles'. Science and Technology of Advanced Materials. https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/4/044404
- 渡慶次学. 2011. '紙を使った分析・診断チップの現状と可能性'. 機能紙研究会誌 50:43–46.

第 6 章　総括

水環境工学分野においては，コストや技術面から処理を担う特定の微生物や水系感染症の原因となる病原体について日常的に分析することが困難である．本論文では，核酸を対象とした分析法の検出対象の多さや検出下限の低さに着目し，金ナノ粒子に検出対象の核酸と特異的に結合（交雑）するプローブ DNA を修飾した「DNA 修飾金ナノ粒子（以下，金ナノ粒子プローブ）」を用いる分析法を開発した．

第 2 章では，暗視野顕微鏡観察による粒子の分散状態の評価と，金ナノ粒子プローブと核酸の反応に影響を与える因子の最適化，非検出対象の核酸の存在や，交雑部位の外側の塩基配列が分析に与える影響の検討等を行うことで．本分析法の反応メカニズムが正しいことを検証し，反応条件を最適化した．

第 3 章では，紫外可視分光光度計を用いた吸光スペクトル測定による分析法（比色法）を開発した．比色法を用いて下水処理場にて採取した活性汚泥中のアンモニア酸化細菌（AOB）のモニタリングを行ったところ，従来法である逆転写定量 PCR 法（RT-qPCR 法）とほぼ同程度に定量可能であることが示された．また，比色法で用いる紫外可視分光光度計は，水質基準項目の測定に必要なためすでに処理場に設置されており，比色法は核酸の抽出が行えれば実処理場に導入可能であるといえる．比色法の分析コストは約 8 円/1 サンプルで，分析は核酸抽出後 5 分程度で完了した．

第 4 章では，光導波路分光装置を用いた散乱光スペクトル測定による分析法（光導波路法）を開発した．測定条件の最適化を行ったのち，腸管出血性大腸菌 O157:H7 が持つ *eae* 遺伝子の mRNA や臨床検体中の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のゲノム RNA の検出を行った．SARS-CoV-2 のゲノム RNA の検出では，RT-qPCR 法の Ct 値から定義された陽性サンプルと陰性サンプル（Ct 値≧37）について，散乱光強度の低下やスペクトルのピーク波長のシフトから判別可能であった．また，光導波路法の検出下限は，これまでに報告されている金ナノ粒子プローブと CRISPR-Cas システムを利用した酵素を必要とする分析法などとほぼ同等であった（人工合成ゲノム RNA：1 copies/μL, 臨床検体中ゲノム RNA：30 copies/μL）．また，独自の測定条件を確立したことで，既往の光導波路分光装置を用いた分析法と比較して検出感度が 1000 倍程度向上し，10 copies/μL 程度の非常に低濃度な核酸の検出に成功した．

第 5 章では，ペーパーチップとスマートフォンを用いた画像撮影による分析法（ペーパーチップ法）を開発した．検出対象である細菌の 16S rRNA を含む RNA サンプル（RNA），これを RNA 分解処理したもの（RNA-NC），核酸を含まないサンプル（Blank）で分析を行ったところ，RNA のみ検出ライン上にピークが見られた．また，RNA-NC と Blank のプロットはほぼ一致しており，ピークは検出ラインよりも下流側に存在し，金ナノ粒子プローブや非検出対象の核酸が検出ラインを通過していることが示された．よって，本研究で作成し

たペーパー分析チップは，検出ラインの色の変化から核酸を検出可能であることが示された．

本論文で開発した分析法は，酵素による前増幅をせずに，実環境サンプル中の微生物の核酸について，特に光導波路法は非常に低濃度まで検出可能であった．既往の金ナノ粒子プローブを用いた核酸分析法は，人工合成した核酸や前増幅を行ったサンプルの検出にとどまっていたため，本論文が環境サンプル中の低濃度の核酸を直接検出した初めての例である．また，光導波路法については，既往の金ナノ粒子プローブと酵素による増幅を組み合わせた手法と同等の検出下限を持ちながら，簡便さ，分析時間の長さ，コストの点について優れていた．

表 12 に，第 1 章で示した主要な微生物分析法の特徴(Jasson et al. 2010)と本研究で開発した分析法の特徴(Nakajima et al. 2021; 2023; Satoh et al. 2022; 中島ほか 2020)を示す．本研究で開発した分析法は，コストや分析時間，測定操作に熟練の技術を要しないという長所があった．しかしながら，比色法については検出下限が比較的高く病原体や低濃度の核酸の定量には適さない，光導波路法については装置が大型・希少であり導入コストが高い，ペーパーチップ法については定量分析には向かないといった課題がある．よって，これらの課題を解決するために，比色法においては低濃度の核酸の定量を目指した金増感などと組み合わせた新たな分析ストラテジーの考案，光導波路法においては装置の小型化や簡易化に取り組む．また，全ての分析法において現状は核酸抽出が必要である．今後は，本分析法が許容できる夾雑物の量やサンプルの性質に応じた核酸抽出の簡易化，特定の微生物を特異的に捕捉できる一本鎖 DNA（DNA アプタマー）の探索と本分析法への導入などを行うことで，核酸抽出を簡略化または省略し，本分析法のアクセシビリティを高めることが必要である．

さらに，第 1 章でも述べたように，上下水処理において処理を担う微生物や特定の病原体を対象とした項目基準は現在も定められていない．本分析法をさらに洗練し，様々な微生物について従来法と合わせて分析を行うことで知見を収集していく．将来的には，処理を担う微生物や特定の病原体を直接分析できるようなプラットフォームを整備し，さらなる水処理の効率化や衛生学的安全性の向上を目指す．

表 12　主要な微生物分析法の特徴(Jasson et al. 2010 の Table. 4 より引用)と本研究で開発した分析法の特徴

Characteristic	Molecular techniques	Immunological techniques	Microscopic techniques	Conventional methods	比色・光導波路・ペーパー
Specificity based upon	DNA or RNA sequence ○	Antibody-antigen binding recently also phage ligands ×/—	Staining using physiological or taxonomic probes —/○	Phenotypical tests (morphology, biochemical reactions) ×/—	DNA or RNA sequence —/○
Expression of sensitivity	1 genome/PCR reaction →10^2 – 10^3 CFU/mL ○	10^4 – 10^5 CFU/mL ○	1 cell/visual field →± 10^4 CFU/mL —/○	1 CFU/25 g —/○	10^3 - 10^4 / 1 - 10 / — cp/μL — ・ ○ ・ —
Time to result	1-3 h —	10 min – 1 h ○	5 – 30 min ○	From 3 – 7 days ×	5 – 10 min ○
Differentiation of dead/viable cells	—/○	—	—/○	○	×
Interference of food sample	×/—	○	×	○	×/—
Simultaneous multiparameter testing	○	—	—	×	○
Reproducibility	○	○	○	—	○
Potential for automation	○	—	—	×	—
Labour-intensity	—	—	—	×	○
Cost of materials	×（約600円/1回）	×	×	○	○ ・ ○ ・ ○（約20円/1回）
Investment of equipment/infrastructure	×	—	×	○	○ ・ × ・ ○

参考文献

- Jasson, Vicky, Liesbeth Jacxsens, Pieternel Luning, Andreja Rajkovic, and Mieke Uyttendaele. 2010. ‘Alternative Microbial Methods: An Overview and Selection Criteria’. Food Microbiology. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008.
- Nakajima, Meri, Reiko Hirano, Yuki Nakaya, and Hisashi Satoh. 2023. ‘Analysis of Unamplified 16S RRNA of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Activated Sludge by Spectrophotometry Using Gold Nanoprobes’. ACS ES and T Water 3 (9): 3113–20. https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00265.
- Nakajima, Meri, Reiko Hirano, Satoshi Okabe, and Hisashi Satoh. 2021. ‘Simple Assay for Colorimetric Quantification of Unamplified Bacterial 16S RRNA in Activated Sludge Using Gold Nanoprobes’. Chemosphere 263 (January). https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128331.
- Satoh, Hisashi, Meri Nakajima, Reiko Hirano, and Yuki Nakaya. 2022. ‘Highly Sensitive and Homogeneous Detection of Unamplified RNA Based on the Light Scattering Properties of Gold Nanoparticle Probes’. Biosensors and Bioelectronics: X 12 (December):100249. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100249.
- 中島芽梨, 石田晃彦, 渡慶次 学, 佐藤久. 2020. ‘下水中の細菌の 16S RRNA 検出用ペーパー分析チップの開発’. 分析化学 69 (12): 715–22.

謝辞

本論文を作成するにあたり，指導教官である水環境保全工学研究室 佐藤久 教授には，日頃より大変熱心なご助言とご指導をいただきました．学部 4 年生で研究室に配属されテーマを決定する際に，「本論文の研究テーマは研究室でも初めて取り組むものであるので，修士課程あるいは博士課程まで進んでも満足のいく成果はあげられないかもしれない．」と言われたことを今でもよく覚えています．しかしながら，卒業までに特許を取得し，いくつか論文を執筆し学会賞もいただけたことは，非常に幸運であったともに，佐藤先生の学生の自主性に任せる気風と，何より指導力の高さがあってこそと思っています．この場を借りて心より深く感謝の意を表します．

研究についてはもちろんのこと，学生生活に関しても日頃より丁寧なご助言をいただきました，同研究室 中屋佑紀 助教，実験補助やサンプリング等で大変お世話になりました セルスペクト株式会社 平野麗子 実験補助員，ならびに 北海道大学 谷内翔 技術職員にも厚く御礼申し上げます．

本研究は JSPS 科研費 22KJ0123 の助成を受けたものです．さらに，日本学術振興会 特別研究員 DC1 として採用いただいたことで，在学中は経済的な不安を抱えることなく研究に専念することができました．心より御礼申し上げます．

セルスペクト株式会社，札幌市下水道河川局には，貴重なサンプルをご提供いただきました．心より感謝申し上げます．

北海道大学大学院 理学研究院 化学部門の三浦篤志 准教授には，暗視野顕微鏡観察の際に装置をお借りし，ご助言をいただきました．この場を借りて御礼申し上げます．

北海道大学大学院 工学研究院 応用化学部門の渡慶次学 教授，石田晃彦 助教には，ペーパーチップを用いた分析法についての論文（下水中の細菌の 16S rRNA 検出用ペーパーチップの開発）執筆に関してご助言をいただきました．心より御礼申し上げます．

東北大学大学院 環境科学研究科 先端環境創成学専攻 水資源システム学分野（兼務：工学研究科 土木工学専攻）の久保田健吾 准教授には，環境工学分野および分子生物学分野における手法開発に関してコメントとご助言をいただきました．心より感謝申し上げます．

国立研究開発法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 微生物生態工学研究グループの成廣隆 研究グループリーダー，黒田恭平 主任研究員には，分子生物学的・情報科学的技術の習得のための技術研修でご指導いただきました．私は卒業研究と並行して，「廃水処理システム内の未培養微生物の分離とその生態解明」に関する研究を行ってきました．微生物の培養経験もなく初めは苦労しましたが，お二人をはじめ産総研の皆様に多大なご支援をいただき，論文の執筆を行うことができました．また，この研究を通して得られた知識や技術によって，本論文をさらに良いものとすることができました．心より感謝と御礼を申し上げます．

学位審査にあたり，北海道大学 環境工学部門の岡部聡 教授，木村克輝 教授，押木守 准教授，応用化学部門の渡慶次学 教授には，貴重なご助言とご意見をいただきました．この場を借りて御礼申し上げます.

金ナノ粒子グループの田代尚之 くん，半田久純 くん，廣井楓夏 さん，佐成航太 くんをはじめ，水環境保全工学研究室の先輩・同期・後輩の皆様には，研究だけでなく日常生活の様々な場面で大変お世話になりました．心から感謝いたします.

この他にも，家族や友人をはじめ，沢山の方々のご支援をいただいて本論文を作成することができました．本論文作成にご協力いただいた全ての皆様に改めて深く御礼申し上げるとともに，皆様の今後益々のご活躍をご祈念申し上げ，謝辞とさせていただきます.

2025 年 2 月
水環境保全工学研究室　博士後期課程 3 年
中島芽梨