

導電性中空糸膜を用いた病原性微生物
からの遺伝子抽出に関する研究

2001年3月

北海道工業大学大学院
菅原 俊継

目次

第1章	序論	1
第2章	病原性細菌・ウイルスによる感染症の診断法	8
2.1	感染症診断の流れ	9
2.2	感染症の代表的な診断法	10
2.2.1	培養法	10
2.2.2	鏡検法	12
2.2.3	抗原および抗体測定法	14
2.2.4	PCR法（遺伝子診断法）	17
第3章	遺伝子診断法における従来の核酸抽出法	18
3.1	核酸	19
3.1.1	DNAの構造と機能	19
3.1.2	RNAの構造と機能	21
3.1.3	ウイルスの核酸	22
3.2	従来の核酸抽出法	23
3.2.1	化学的抽出法	23
3.2.2	磁性粒子を用いた抽出法	25
3.3	導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌・細胞内物質の抽出	26
3.3.1	導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌	26
3.3.2	導電性中空糸膜を用いた電流通電による細胞内物質の抽出	27
第4章	導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した大腸菌 O157 遺伝子の抽出	29
4.1	細菌	30
4.1.1	細菌の構造と機能	30
4.1.2	供試細菌	32
4.2	細菌操作の基礎	35
4.2.1	細菌操作に使われる器具や培養基の滅菌および殺菌法	35
4.2.2	細菌数の計測法	36

4.3	導電性中空糸膜の概要	39
4.3.1	金属の被覆方法	39
4.3.2	膜構造	42
4.3.3	モジュール化	43
4.4	実験方法	44
4.4.1	導電性中空糸膜を用いた遺伝子の抽出法	44
4.4.2	PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法	46
4.4.3	ゲル電気泳動法	48
4.5	実験結果	50
4.5.1	大腸菌 O157 単独試料からの遺伝子抽出	50
4.5.2	SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を利用した遺伝子抽出	53
4.5.3	抽出サンプルの純度	55
4.5.4	他細菌が混合された試料からの遺伝子抽出	56
4.5.5	糞便試料からの遺伝子抽出	58
4.6	検討	61
4.6.1	電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出の機構	61
4.6.2	SDS の効果	63
4.6.3	従来の化学的抽出法との比較	64
第5章	電界効果を利用した導電性中空糸膜による大腸菌 O157 の遺伝子抽出	71
5.1	実験方法	72
5.1.1	電界効果を利用した遺伝子の抽出法	72
5.1.2	遺伝子の濃縮法	74
5.2	実験結果	76
5.2.1	電界効果を利用した単独試料からの遺伝子抽出	76
5.2.2	電界効果を利用した糞便試料からの遺伝子抽出	78
5.2.3	抽出後の遺伝子濃縮の効果	79
5.3	検討	81
5.3.1	電界効果を利用した遺伝子抽出法の機構	81
5.3.2	抽出後の遺伝子濃縮の有効性	83
5.3.3	従来法との比較	84
第6章	電界効果を利用した遺伝子抽出法のウイルスへの適用	88
6.1	ウイルス	89
6.1.1	ウイルスの構造と機能	89
6.1.2	ウイルスの培養と定量法	92
6.1.3	供試ウイルス	93

6.2 実験方法	96
6.2.1 電界効果を利用したウイルス遺伝子の抽出と濃縮法	96
6.2.2 導電性中空糸膜のウイルスに対する濃縮効果の測定法	97
6.3 実験結果	98
6.3.1 電気的および物理的抽出法の有効性	98
6.3.2 電界強度と印加時間の最適条件	101
6.3.3 導電性中空糸膜のウイルスの濃縮効果を利用した遺伝子抽出	102
6.3.4 抽出後の遺伝子濃縮の効果	103
6.4 検討	105
6.4.1 遺伝子の抽出条件に関する検討	105
6.4.2 ウイルス濃縮を含めた従来の化学的抽出法との比較	106
第7章 結論	109
謝辞	117
参考文献	119
研究業績	126

第 1 章

序論

有史以来人類は、地球を生命活動の場とする微生物と深く関わってきた。現在のバイオテクノロジーまたは生物工学と呼ばれる技術は、まさに微生物の様々な働きを利用し、化学工業、農林水産業、医薬品工業など多くの産業分野で活用されていることは衆知の事実である [1]。その一方で、人類に対して病原性を示す微生物も存在し、それらに感染することで我々は、様々な疾病に脅かされてきた。このような微生物の中には生命に関わる重大な感染症を引き起こすものも数多く存在し、そのような病原性微生物とは古くから争い続けてきた [2]。

近年、微生物学、免疫学、分子生物学、遺伝子工学などの発展に伴って、このような病原性微生物の感染症に対する診断技術や治療法が格段に向上したことで、適切な診断や治療が行われるようになり、感染症の驚異は大幅に減少した。

従来の診断法は、微生物学的な培養検査によって行なうのが主流であった。この培養による診断法は、多種類の培地や異なった培養法が必要で、確定診断を行うためには長時間を要する欠点があった。またウイルスは自己増殖機能を持たないため、培地上では増殖できず、生きた特定の細胞に感染し、その機能を利用して増殖する。したがって、ウイルス疾患の場合、感染可能な細胞の培養も必要であった。さらに、ウイルスの種類によっては、増殖効率の高い細胞が見出されていないものもあり、そのようなウイルスでは、培養による診断法が未だに確立されていないのが現状である。このように、培養法は多くの労力と、少なくとも3日以上の検査時間を要していた [3], [4]。特に診断に長時間を要する欠点は、病原性微生物に体内での増殖時間を与えることになり、ひいては症状の悪化を招いていた。例えば、大腸菌 O157 のように極めて毒性の高い毒素を産生する病原性微生物の場合には、診断の遅れが患者を死に致らせる危険性も指摘されていた。

このような背景から最近では、迅速かつ簡便な抗原および抗体を利用した免疫学的手法や、病原性微生物の遺伝子を直接検出する遺伝子工学的手法が頻繁に用いられるようになった [5]-[8]。前者は、微生物すなわち抗原と、

これに対応して体内で産生される抗体との非常に鋭敏な反応（抗原抗体反応）を利用した方法で、多くの微生物感染症に対して有効である。しかし、本法は病原性微生物を検体から直接検出するのではなく、感染の結果体内に生じた変化を捕らえるものであり、感染後、診断が可能になるまでに1ヶ月以上かかるような感染症では、その間、誤った診断が下されることもあった [9]-[11]。これに対して後者の遺伝子診断法は、検体中の病原性微生物から直接遺伝子を検出するため、原理的にそのような誤診を防ぐことができ、臨床学的価値の高い診断法とされている [12]-[14]。

一般に遺伝子診断は、1) 病原性微生物からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定の順序で行われる。遺伝子診断法が今日のように普及してきたのは、2) に挙げた遺伝子増幅技術が急速に進歩し、自動化されてきたことにある [15]-[17]。しかし、遺伝子診断において必要不可欠な1) の遺伝子抽出の自動化は、それらの4工程の中で最も遅れている [18]。現在、主に用いられている遺伝子抽出法は化学的手法であるが、その操作は繁雑であり、熟練を要すことから自動化が非常に難しい。また化学物質の中には有機溶媒が含まれているものもあり、取り扱いにも十分に注意を払わなければならない [19], [20]。

これまでに北海道工業大学大学院応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門（以後、当研究室と呼ぶ）では、ポリプロピレン性多孔質中空糸膜に金属を被覆した導電性中空糸膜に通電することで、膜に捕捉された細菌が殺菌されることを見出している。またその際、核酸などの細胞内物質の漏出が確認され、殺菌機構は通電による細胞膜破壊であることが示されている [21]。そこで、このような電流通電による殺菌の機構と細胞内物質の漏出現象の両者を考慮して、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法が遺伝子抽出の新しい方法になり得るものと考えた。

本論文では、第一の研究目的として導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法に基づいて、全く新しい遺伝子抽出の可能性を具体的にはじめて検討している。その際、我が国でも毎年のように報告されている大腸菌

O157による感染症（食中毒）は^[22]、その毒性の強さから迅速な診断が特に必要とされているため、大腸菌 O157 を供試細菌として選択した。最終的な目的は患者の糞便から直接大腸菌 O157 遺伝子を抽出することであるが、基礎的知見を得るためにまず大腸菌 O157 のみが入った試料、次いでこれに夾雑細菌が含まれた混合試料、最後に実際の糞便試料というように段階を踏んで検討した。最初の大腸菌 O157 のみの試料を用いた実験から、導電性中空糸膜に電流を流し、同時に蒸留水を吸引することで、膜に捕捉された大腸菌 O157 の遺伝子が簡単かつ迅速に蒸留水中に抽出されることをはじめて確認した。さらに、この抽出法の検出感度の向上を目指して、遺伝子抽出の際に界面活性剤を使用したところ、従来の化学的抽出法の抽出限界に近づけることができた。続いて混合試料、糞便試料について検討した結果、それらの試料中に大腸菌 O157 が 10^7 個/ml 以上含まれていなければ抽出されず、単独試料と比べて二桁の感度低下が認められた。このように導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、従来法に比べて迅速性・簡便性がともに極めて優れていた。その反面、実際の感染症患者から採取された糞便中の大腸菌 O157 含有量や実用化されている診断法の感度が 10^5 個/g 程度であることなどを考慮すると、 10^7 個/ml 程度の感度では大腸菌 O157 の検出が難しいものと予想された。

そこで、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出において、負の電荷を有する遺伝子の電氣的性質に着目し、さらなる感度の向上を目指した。具体的には、これまで殺菌基材として用いた導電性中空糸膜を、本研究では以下のように遺伝子抽出時の電極として利用した。まず導電性中空糸膜に捕捉された大腸菌 O157 を化学的に溶解することで、遺伝子を被っている細胞膜を破壊した。その後、導電性中空糸膜を陰電極として電界を印加することで、膜の中から負電荷の遺伝子を電氣的に取り出すことにした。このように、通電が可能であるという導電性中空糸膜の特徴を積極的に活用し、新たに遺伝子抽出用の電極として使用した結果、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出よりも 100 倍高い感度 (10^5 個/ml) が得られ、感度の向

上に成功した。

前述のように大腸菌 O157 に感染した患者の糞便には、最低 10^5 個/g の菌数が含まれており、また現在使用されている診断法もこの程度の感度であることから、導電性中空糸膜の利用法を全く別の観点から捕らえることで、実用的な感度にはじめて上げることができた。従来の化学的抽出法と比較するとこの抽出法は、使用する化学薬品や工程が少ないため簡便性に優れ、それに伴って抽出時間も半分に短縮できた。この時間短縮は体内の細菌の増殖、すなわち症状の軽減に寄与し、特に大腸菌 O157 のように生命に関わる感染症を引き起こす病原性細菌に対して非常に有効であり、治療効果の改善に大きく貢献するものと考えられる。また、膜の他に直流電源と吸引ポンプといった単純な装置で半ば自動的に遺伝子抽出が行われることから、全自動化の可能性をも有している。したがって、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は、極めて単純かつ安全で、自動化の可能性を有する全く新しい遺伝子抽出法として、将来普及することが期待される。

上記の大腸菌 O157 とは別に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) や肝炎ウイルスは、長い潜伏期間 (10 年程度) を経て徐々に免疫力の破壊や肝硬変を誘発し、やがて本人が体の異変に気付いたときには肝癌や AIDS (後天性免疫不全症候群) を発症し、死に至らしめる非常に恐ろしいウイルスである [23]-[27]。また発症するまでの間に、性行為によって二次感染を引き起こすことも多く、その広がりも凄まじい [23]-[25], [27]。これらのウイルスは、輸血や血液製剤によって感染することがほとんどである。HIV や肝炎ウイルスは血中に存在することから、近年、献血された血液の汚染検査が実施されるようになってきた。そのため、輸血や血液製剤による感染は年々減少傾向にある。しかし、PCR を用いた遺伝子診断法は、検査に使われる検体 (血液) 量が数十 μ l 程度と非常に少ないため、200 ml の血液バッグを検査の対象としたとき、その中には最低 10^4 個程度のウイルスが含まれていなければ検出されないことになる。このように従来の遺伝子診断は扱う検体量が非常に少ないため、感染初期などのウイルス量が少ない検体から

検出することは極めて困難であり、 10^4 個以下の数しか混入していない血液は、安全な血液として輸血や血液製剤に利用されることになる。このような状況を考慮すると、決して安全な輸血や血液製剤の投与が現在行われているとは言えない。そこで、導電性中空糸膜の最大の特徴である微粒子に対する高い捕捉能力を利用することで、これまで全く行われていなかった血中ウイルスの完全な除去が原理的に可能であり、安全な輸血や血液製剤の提供が可能になるのではないかと考えた。さらには、血中ウイルスを全て導電性中空糸膜に捕捉する可能性も高いため、検査時に扱われるウイルス量が従来法より遥かに多く、細菌と同様な抽出操作を行うことで、血液提供者のウイルス感染の有無を高感度で捕らえることができるものと期待した。このように病原性細菌の他に、完全な防御策がない HIV や肝炎ウイルスなどの病原性ウイルスへの導電性中空糸膜の適用を第二の目的として、本研究では、比較的危険性の低い単純ヘルペスウイルスを用いて、ウイルスに対する遺伝子抽出の有効性をはじめて検討した。検討の結果、ウイルスに対しても同様に遺伝子の抽出が確認され、導電性中空糸膜による方法は細菌およびウイルスの両者に適用可能である画期的な遺伝子抽出法であることが判明した。さらに導電性中空糸膜は、優れた捕捉能力を有しており、非常に小さなウイルスまでも膜に捕捉できることが明確となった。これらの知見から、本手法は、これまで無防備であった HIV や肝炎ウイルスに対して極めて有効な防御法であると同時に、導電性中空糸膜を遺伝子抽出用の電極として用いることで、従来の抽出法と同程度の感度で遺伝子抽出が可能であり、ウイルスの感染防御と遺伝子抽出の2つの機能を兼ね備えた世界的にも例がない斬新で画期的なウイルス感染防御法・遺伝子抽出法と言える。このように本論文で示した手法によって、従来法よりも遥かに安全な血液の提供ができ、HIV や肝炎ウイルス感染症の世界的根絶に大きく貢献できるものと確信する。

以上のように、これまで殺菌・濾過基材として使われてきた導電性中空糸膜を全く異なった視点から用いることで、病原性細菌やウイルスの遺伝

子抽出・感染防御について画期的な知見を得ることができた。また、この抽出法は、従来法に比べて使用する化学薬品や工程が少ないことから簡便性・迅速性に優れていた。さらに、膜の他に直流電源と吸引ポンプといった単純な装置で半ば自動的に遺伝子抽出が行われることから、全自動化の可能性をも有している。したがって本手法は、今後、微生物感染症の遺伝子診断や感染防御に大きく寄与するものと考えられる。

本論文は全7章で構成されており、次章以降では次のような内容が取り扱われている。第2章では、病原性微生物による感染症の一般的な診断法についてまとめた。第3章では、特にその中でも遺伝子診断法に着目し、本研究で検討している遺伝子抽出が、その診断法においてどのような位置づけであるのかを明らかにし、さらに従来の遺伝子抽出法と、本研究の基礎となった導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌、および細胞内物質の抽出について述べた。第4章は、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に基づく遺伝子抽出法の有効性を、最も迅速な診断が必要とされる病原性微生物の一つである大腸菌 O157 を用いて検討した。続く第5章では、導電性中空糸膜の利用法を電極として使用するという全く別の角度から捕らえることで、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出の感度向上を目指した。さらに第6章では、肝炎ウイルスや HIV の画期的な防御法・検出法を提案するため、単純ヘルペスウイルスを用いて、ウイルスに対する有効性を検討した。最後の第7章では、得られた知見を整理し、それらに基づいて本研究の結論を述べる。

第 2 章

病原性細菌・ウイルスによる感染症の診断法

我々の身のまわりには無数の病原性微生物が存在し，ヒトに限らず動物や植物に感染し，様々な病気を引き起こす．しかし，微生物学，免疫学，分子生物学，遺伝子工学などの発展に伴って，病原性微生物の検査技術も向上し，適切な診断・処置が行われるようになってきた．特にヒトの生命に関わる病原性微生物の検査技術の向上はめざましく，数多くの方法が見出されてきた．また多方面にわたって開発が進められてきたことから，その方法も多様である．この章では，そのような病原性細菌やウイルスによる感染症に着目し，実際に行われている代表的な診断法とその特徴について述べる．

2.1 感染症診断の流れ

一般的な病原性細菌・ウイルスによる感染症の診断は図 2-1 のように行われる [5], [28]。医師の診察による症状把握と炎症反応検査が第 1 段階の感染症診断であり，感染症か否かを判断する。感染症と判断した後，全身性か局所性か（どの部位か）を特定するために第 2 段階の検査が行われる。主に血液学的検査，生理機能検査，X 線，CT (computed tomography)，MRI (magnetic resonance imaging)，超音波といった画像診断，および内視鏡検査である。経験豊富な医師であれば，この段階で臨床診断を下せるが，確定のために第 3 段階の微生物学，免疫学，分子生物学，病理学的検査が行われる。ただし，定型的疾患は初診時で経験的に判断しやすいため，第 1 段階の医師の診察から第 3 段階の確定検査へ進む場合も少なくない。

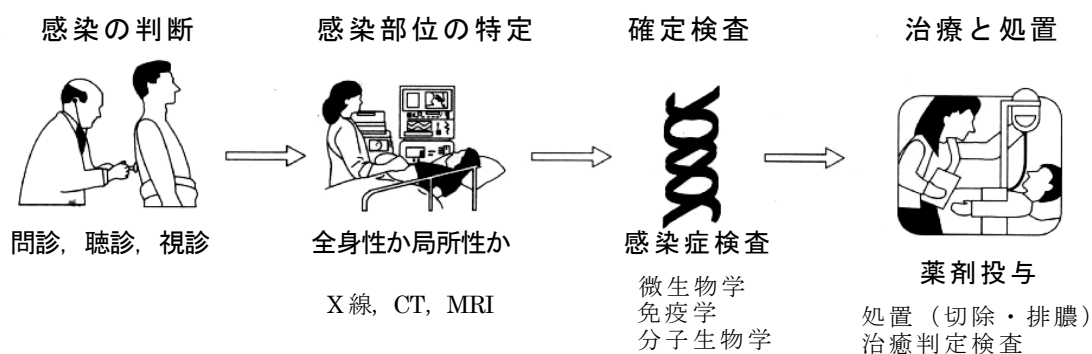


図 2-1 診断の流れ

2.2 感染症の代表的な診断法

医師により感染症と診断された場合、感染部位の特定を行った後、様々な方法によって感染症検査が行われる。まず、適切に採取した検体を肉眼および顕微鏡で観察し、確定検査を行うべきか否かを判断する。ここで得られる患者情報（症状、基礎疾患、治療歴など）は、検査を進めるうえで最も大切となる。多くの場合、確定検査が必要であり、培養法（分離培養、確認培養後の性状検査）、鏡検法（グラム染色、抗酸染色法）、免疫学的診断法（ラテックス凝集反応法、ELISA（enzyme linked immunosorbent assay；酵素結合免疫吸着測定）法、イムノクロマトグラフ法などによる抗原および抗体測定法など）、遺伝子工学的検査（PCR（polymerase chain reaction；ポリメラーゼ連鎖反応）法）などの様々な方法によって行われる。また検体の種類によっては、その特徴から特定感染症または微生物の種類も可能なことがある。例えば、明らかに血性下痢便なら腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）感染症、青緑色膿瘍物なら緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）感染症が疑われる。

ここでは、病原性細菌・ウイルスによる感染症検査の代表的なものについて概説する。

2.2.1 培養法 [22], [29]

病原性微生物に侵された病巣部あるいは糞便、尿、血液、髄液、喀痰などの検体、さらに食中毒などではその原因食品と思われるものから病原性微生物を分離し、同定する微生物学的検査（培養法）は古くから行われており、最も基本とされてきた。しかし、この方法は免疫学的、遺伝子工学的検査に比べて繁雑で、迅速性に劣る（少なくとも3日程度の検査期間を要す）ことから迅速な診断が要求される急性感染症には不向きな検査法といえる。

細菌およびウイルスでその手法が多少異なるため、両者を区別して以下に述べる。

(1) 細菌の場合

医師によって感染症が病原性細菌によるものと診断されたとき、まず予想される細菌のみをできる限り検体から選択的に増殖させる選択培地を用いて、その細菌に適した環境で増菌あるいは分離培養を行う。これによって生じたコロニー（細菌群）の中から疑わしいものを掻き取って純培養する。この場合も目的に応じて、液体培地や固形培地を用いる。純培養した細菌は表 2-1 の性状から同定される。

(2) ウイルスの場合

ウイルスは自己増殖する機能を有していない。そのため、生きた細胞内に寄生して、細胞の代謝酵素や材料、さらにタンパク質合成のために細胞のリボソーム（ribosome）を利用して自己成分を合成し増殖する。よって、ウイルスの増殖には生きた細胞が必要である。この生きた細胞として何を用いるかにより、ウイルス分離法は表 2-2 のように 3 つに大別される。ただし、必ずしも全ての種類のウイルスを増殖できるとは限らず、増殖効率の高い分離材料が見出されていないものも中にはあり、そのようなウイルスの培養は極めて難しい。また増殖が可能なウイルスであっても各々の分離材料が

表 2-1 病原性細菌の性状検査

性状	検査内容
コロニーの性状	大きさ、形、色、発育条件（O ₂ 呼吸か否か）
細菌の形態	大きさ、形、配列、鞭毛や芽胞および莢膜形成の有無など
生化学性状	栄養要求性、糖、アミノ酸の分解能、酵素産生能など
毒素産生性	動物や培養細胞に対する毒性など
化学的性状	細胞壁や脂質の構成成分など
免疫学的性状	細菌の抗原性など
遺伝学的性状	CG 含有量*、DNA や RNA の相同性

*C : cytosine (シトシン), G : guanine (グアニン)

異なることから、多くの種類の分離材料を準備しなくてはならないこともこの方法の特徴である。

なお分離されたウイルスは、感染後の培養細胞に見られる細胞変性効果（cytopathic effect : CPE）、抗血清を用いた中和試験、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、後述の抗原および抗体測定、あるいは接種された動物の症状、病理組織学的変化などにより同定される。

表 2-2 ウイルスの分離法

分離材料	例
培養細胞	サル腎細胞によるエンテロウイルス、単純ヘルペスウイルスの分離
発育鶏卵	8～13日齢発育鶏卵羊膜腔でのインフルエンザウイルスの分離
感受性動物	乳のみマウス脳内接種による日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルスの分離

2.2.2 鏡検法 [29], [30]

前述のような培養法を主体とした微生物学的検査は、全般的に迅速性、簡便性に問題を有しているものの、その中で鏡検法は簡単そして迅速に行えることから、有用な感染症検査の一つとして現在でも多用されている。ただし、鏡検法は光学顕微鏡によって行われることから、確認できる微生物の大きさに制限があり、その中でも直径 20～300 nm であるウイルスには適用されず、それよりも大きい（0.5～1.0 μm × 1.5～2.0 μm ）細菌に対して使われる。

鏡検法の中でも特にグラム染色と抗酸性染色は、感染検査において価値の高い鏡検法とされており、また免疫学的、遺伝子工学的検査に比べコストが低く、適応性が高い。

(1) グラム染色

現在、臨床検査で使用されているグラム染色法としては、Hucker 変法、Bartholomew & Mittwer 法 [31], [32] などがある。両者は、色素や試薬にわずかな違いがあるだけで同様に実施される。塗抹、乾

乾燥、固定した試料をクリスタル・バイオレットでまず全ての細菌を染色する。水洗後ルゴール液（ヨウ素・ヨウ化カリウム水溶液）をかけ媒染し、さらにアルコールで脱色する。グラム陽性と呼ばれる細菌群は脱色されず、クリスタル・バイオレットの青紫に染まったままであるが、グラム陰性と呼ばれる細菌群は脱色されて無色になる。このままではグラム陰性菌を顕微鏡で観察できないため、サフラニンによって赤く呈色する。一度クリスタル・バイオレットで染まったグラム陽性菌はサフラニンを加えても色調は変わらないため青紫のままとなる。

この方法は、検出細菌がグラム陽性か陰性であるかの判定を行い、次に形態の特徴を観察して同定することはできるが、それ以上に表2-3に示した緊急時の感染検査の有用性が評価されている。すなわち、グラム染色は細菌の存在を明らかにすることができる。その一方で、グラム染色性および形態特徴から菌種の推定が行われるため、形態やグラム染色性の類似した緑膿菌や腸内細菌に関しては熟練技師でも困難なことが多い。

(2) 抗酸性染色法

結核菌に代表される抗酸菌の細胞壁は脂質に富み水溶液色素に染まりにくい。一度染色されると酸、アルコールなどの脱色剤で脱色されにくいことを利用した染色法である。喀痰をスライドガラスに固定した後、石炭酸フクシンを加え加温染色する。その後、塩酸アルコールで脱色すると抗酸菌以外の細菌や上皮細胞、炎症細胞は脱色されるため、メチレンブルーを加えて青く染める。喀痰中の結核菌は赤く、その他の細胞は青く染色されることから結核菌が検出されやすくなる。

結核菌は抗酸菌の中でも抗酸性が特に強く、抗酸性染色された標本を煮沸水に浸すことで脱色されないが、非病原性抗酸菌は脱色されるため、同定がより確実に行える。しかし、この方法は抗酸菌の

染色法として開発されたため、抗酸菌以外の検出は難しい。

表 2-3 病原性細菌感染症の診断に対するグラム染色の適用

疾患	検体	成績
菌血症/心内膜炎	遠沈血液の白血球層	細胞内あるいは細胞外の細菌
	皮膚病巣	細胞内あるいは細胞外の細菌
髄膜炎	髄液の沈渣	細胞内あるいは細胞外の細菌
創傷感染	生検吸引	検体中における優性菌の存在
尿路感染	中間排泄尿	油浸1視野あたり1個以上の菌の存在
肺炎	喀出痰	多核白血球が優勢で扁平上皮細胞は通常みられない、優勢な菌の存在

2.2.3 抗原および抗体測定法 [9], [22], [29], [33]-[36]

抗原と抗体の反応は特異的であり、反応産物である抗原抗体複合物は定量的に形成される。試験管内で抗原抗体反応を行うことによって、微量の抗原の検出や抗原性による物質の同定が可能であり、また抗体の存在を定性的に知るだけでなく、血清中の特定の抗体量を、相対的に（抗体価として）また絶対的な量として測定することも可能である。現在、試験管内抗原抗体反応として、凝集反応法や標識抗体法などが用いられている。凝集反応は抗原が微粒子状であれば簡単に実施でき、肉眼で判定できるため、細菌の血清型別や血液型判定などに使われている。また抗体や抗原を標識し、その標識化合物の定量によって測定する標識抗体法は、感度と定量性に優れていることから、広く応用されている。ただし、抗体が形成されるまでに数ヶ月以上要すものもあり、そのような検査には不向きである。

(1) ラテックス凝集反応法

図 2-2 のようにラテックス凝集反応法は、ラテックス粒子に付与した細菌・ウイルス等の抗体を、検体中の細菌・ウイルスと反応させ、凝集塊を形成させる。目視で結果を判定できるため、特別な機器は必要ない。また、原因食品や糞便から直接検査できる場合もあるが、病原性微生物の量が多い急性期の検体を使用しないと検出は

困難であり，病原性細菌の検査では，通常分離培地上に発育した疑わしいコロニーを使って行うことが多い。

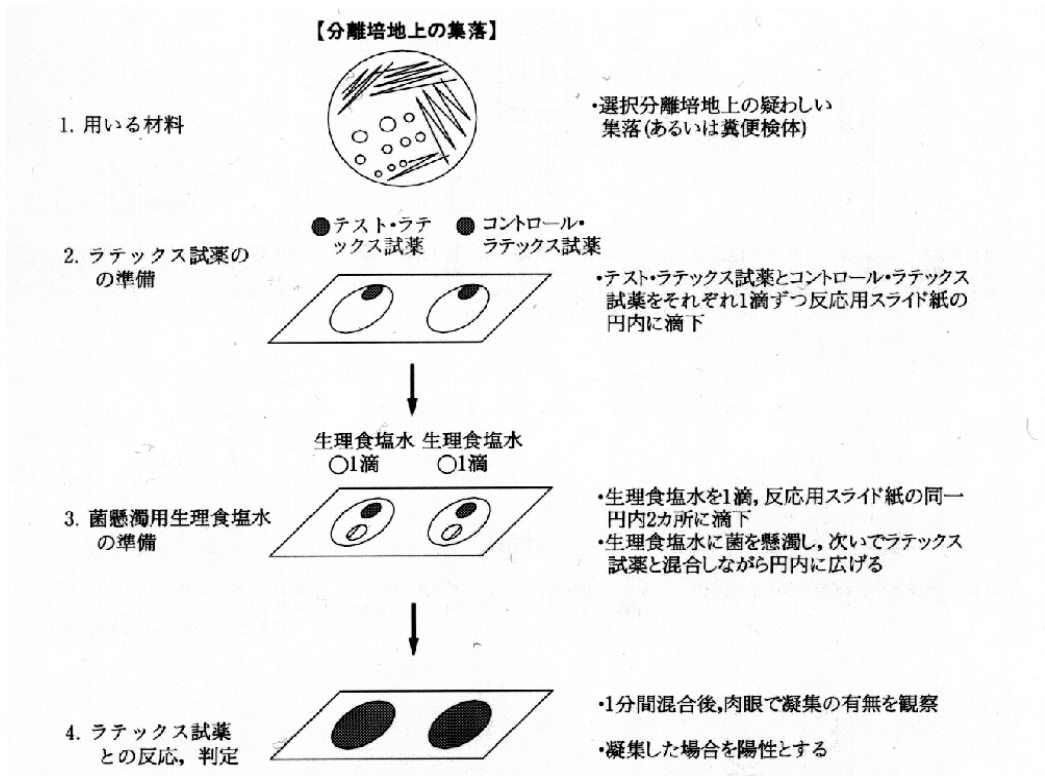


図 2-2 ラテックス凝集反応法の原理

(2) ELISA 法

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay ; 酵素結合免疫吸着測定) 法は血液，糞便等の検体中に存在する病原性微生物の抗原を検出する。その原理を図 2-3 に示す。抗体を固相(マイクロプレート，ガラスビーズ，試験管)に吸着させた後，検体を加える。検体中に病原性微生物の抗原があれば，固相に吸着した抗体に捕捉される。この病原性微生物の抗原を第 2 の抗体(検出抗体)で検出する。この場合，検出抗体を酵素で標識しておくのが一般的で，検出抗体が病原性微生物の抗原と反応したかどうかを酵素反応に変換して知ることができる。また，検出抗体を未標識とし，この抗体に対する抗体(抗免疫グロブリン抗体)を標識して，反応を行わせるサンドイッチ間接法も用いられている。

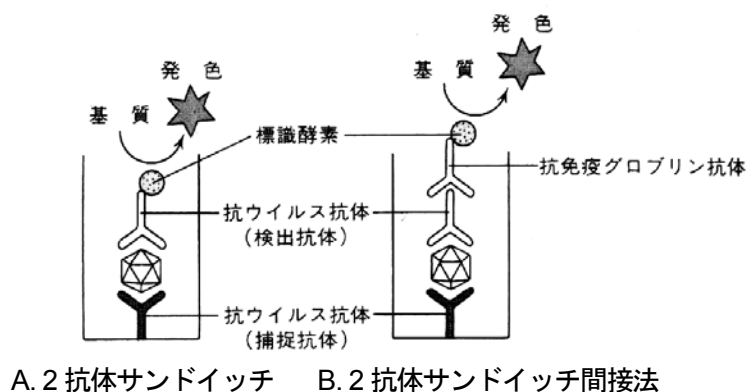


図 2-3 ELISA 法の原理

(3) イムノクロマトグラフ法

病原性微生物を抗原とする場合，この方法は原因食品や糞便から微生物を直接検出することが可能である．検体中の抗原，抗体のどちらを検出するかによって違いがあるが，両者はともに同じような原理である．図 2-4 は病原性微生物を抗原としたときのものである．濾紙でできている検体滴下部（吸収パッド）には，金などの金属コロイドやセレンなどの非金属コロイドを用いた着色粒子に抗体を結合させた標識物が乾燥付着されている．そこに検体を滴下すると，抗原は標識物（抗体）と抗原抗体複合体を形成して，毛細管現象によって濾紙上を上部に向かって拡散する．その結果，陽性判定領域（Test ライン）に固定されている検出抗体と結合して発色色素により陽性のラインが出現する．コントロール領域（Cont.ライン）には抗原の有無にかかわらずラインが現れる．

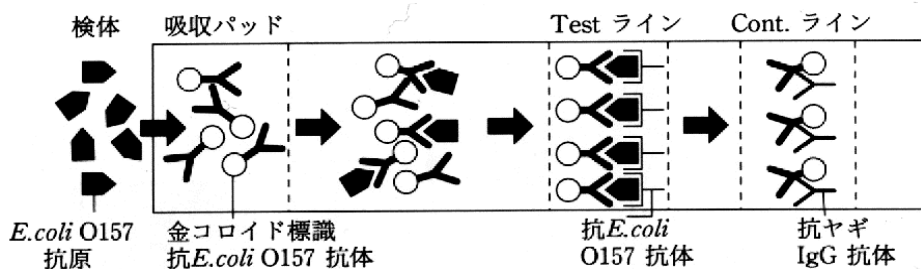


図 2-4 イムノクロマトグラフ法の原理

2.2.4 PCR法（遺伝子診断法）^{[37]-[40]}

感染症の診断に遺伝子工学的検査（遺伝子診断法）が用いられるようになった最も大きな要因は、試験管内で遺伝子の複製・増幅が可能になったことである。その中で最も代表的なものがPCR（polymerase chain reaction；ポリメラーゼ連鎖反応）法である。

PCR法は、検出対象である遺伝子の指定された領域を複製・増幅する技術である。試薬（酵素と遺伝子断片から構成される）と加熱冷却装置の性能や指定された遺伝子領域の配列などの条件によって異なるが、2時間程度でおよそ100万から1,000万倍に遺伝子を増幅することができる。この手法を用いることにより、これまで検出できなかった非常に微量な細菌やウイルスを迅速に検出できるようになり、感染症の診断に役立てられるようになった。特にウイルス感染症の場合、感染後、抗体が形成されるまでに長期間要すものもあり、抗体測定法ではその間偽陰性と診断されることがあるが、PCR法は遺伝子を直接検出するため誤診が極めて少ない。本研究でもこのPCR法を利用して細菌、ウイルスを検出しており、原理は4.4.2項で詳しく述べる。

第 3 章

遺伝子診断法における従来の核酸抽出法

現在，前章で紹介した遺伝子診断は，他の診断法に比べて迅速で確実な方法であることから臨床学的価値の高い診断法の一つとして多用されるようになってきた．その背景には遺伝子増幅技術の開発，そして自動化があった．一方，遺伝子診断にとって必要不可欠な細菌やウイルスからの遺伝子の抽出は複雑であり，それゆえに自動化も進んでおらず，未だ課題も多い．このようなことから本論文では，単純かつ自動化の可能性を有する全く新しい遺伝子抽出法に関する検討，開発を行っている．その際に，遺伝子である核酸の構造や機能，また従来の核酸抽出法を知っておく必要があり，この章ではそれらについて述べる．さらに，本研究の基礎となった導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌，細胞内物質の抽出についても述べる．

3.1 核酸 [41]-[45]

人間をはじめとする生物の生命活動のほとんどはタンパク質が担っており、その正確な情報維持、生合成は核酸によって行われる。すなわち核酸とは、タンパク質のアミノ酸配列の情報を維持しているものであり、タンパク質合成の鋳型でもある。この核酸は、酸性の高分子物質であり、また生理的 pH では多価陰イオンである。核酸には、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid : DNA) とリボ核酸 (ribonucleic acid : RNA) の2種類があり、それぞれは、以下に述べるような構造および機能を有している。

3.1.1 DNA の構造と機能

DNA は、細胞や生体を形成するための情報を維持している。次の世代に、この情報は正確に複製・伝達され、種の遺伝の継続性が維持される (ウイルスは種類によって RNA の場合もある)。特にその中でも生理的機能を持つ分子 (タンパク質や RNA) を合成するのに必要な情報を含んでいる部分が遺伝子 (gene) である。図 3-1 のように DNA は、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C) と呼ばれる四種類の塩基、

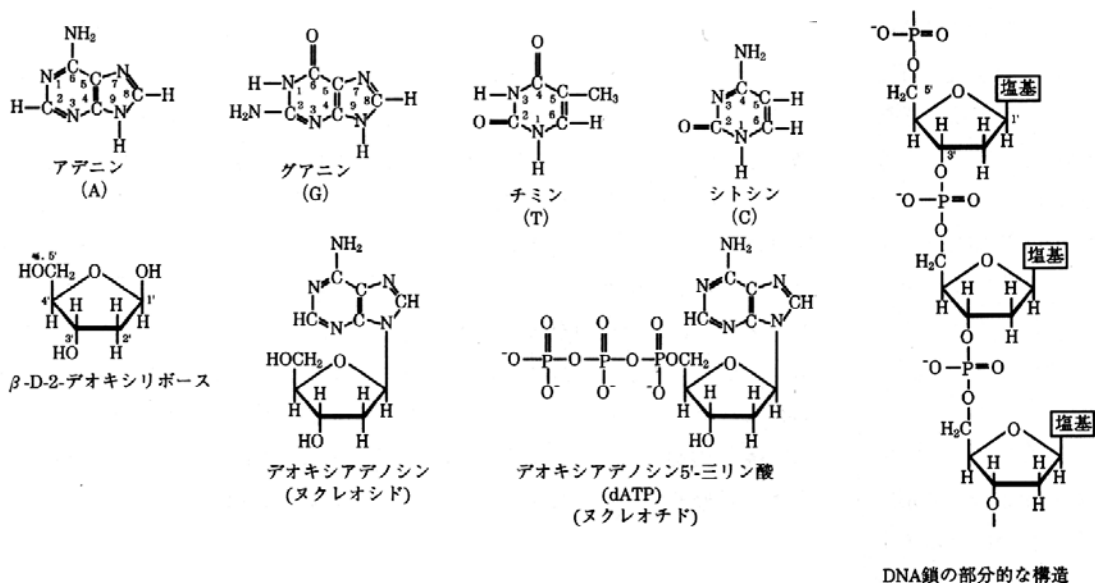


図 3-1 DNA 鎖の構成要素

デオキシリボースという5炭糖，およびリン酸により構成されている．塩基と糖が結合したものをヌクレオシドといい，それにリン酸が結合したものをヌクレオチドという．ヌクレオチドのリン酸と糖とが交互にリン酸ジエステル結合したポリヌクレオチドがDNAである．遺伝情報はDNA分子の塩基の並ぶ順序，すなわち塩基配列の中にコードされている．通常1本の分子鎖に対してA-T，C-Gという組み合わせにより対を形成し，右巻きの二重らせん構造をとる．このらせん構造は図3-2のように規則正しく3.4 nmごとに1巻きし，約2 nmの直径をもつ．また隣接するヌクレオチド間の距離は0.34 nmであり，1巻き当たり10個のヌクレオチドが存在する．相補的なDNA鎖の結合は，A-TおよびC-Gがそれぞれ2，3個の水素結合をとることによる．

遺伝情報が多ければ，それだけ情報をコードするDNAは大きくなる．一般に高等な生物ほど大きなDNAを有する．DNAの大きさは塩基対(base pair : bp)，あるいはダルトン (Da) で表される．本研究で使用した単純ヘルペスウイルス，大腸菌はそれぞれ約 1.7×10^5 bp， 4×10^6 bp程度であるが，我々人間はそれらよりも遥かに大きい約 3×10^9 bpのDNAを23対の染色体の中に持っている [46]．

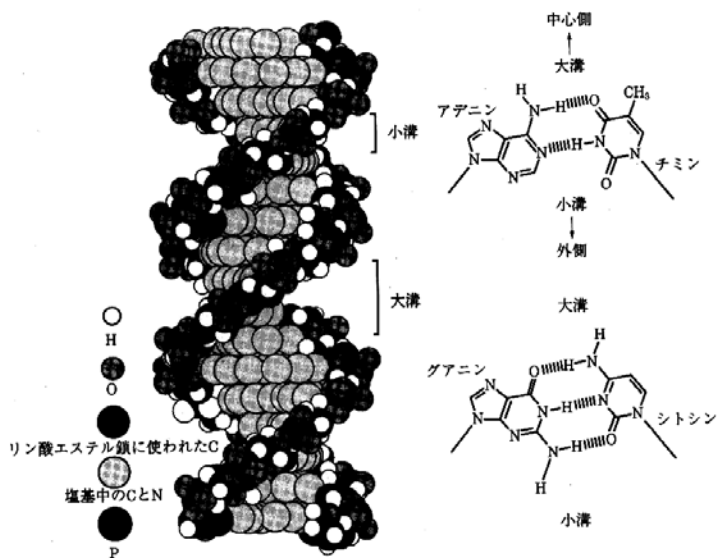


図 3-2 DNA の二重らせん構造

3.1.2 RNAの構造と機能

もう一つの核酸である RNA は、図 3-3 のように糖がデオキシリボースではなくリボース、4 種類の塩基のうちチミン (T) がウラシル (U) であること以外は DNA と同様な構造である。通常 RNA は DNA のような 2 本鎖ではなく 1 本鎖として存在する。DNA 上の遺伝情報から、生命活動の多くを担うタンパク質が正確に合成される際、RNA は伝令 RNA (messenger RNA : mRNA)、移転 RNA (transfer RNA : tRNA)、リボソーム RNA (ribosomal RNA : rRNA) という分子種として仲介する。mRNA は DNA の遺伝情報としてタンパク質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を運ぶ。tRNA は、mRNA にコードされた情報を読み取り、タンパク質合成において伸長中のアミノ酸の長鎖 (ポリペプチド鎖) に所定のアミノ酸を移す。rRNA はタンパク質と結合して、複雑なタンパク質合成装置であるリボソームを形成する。

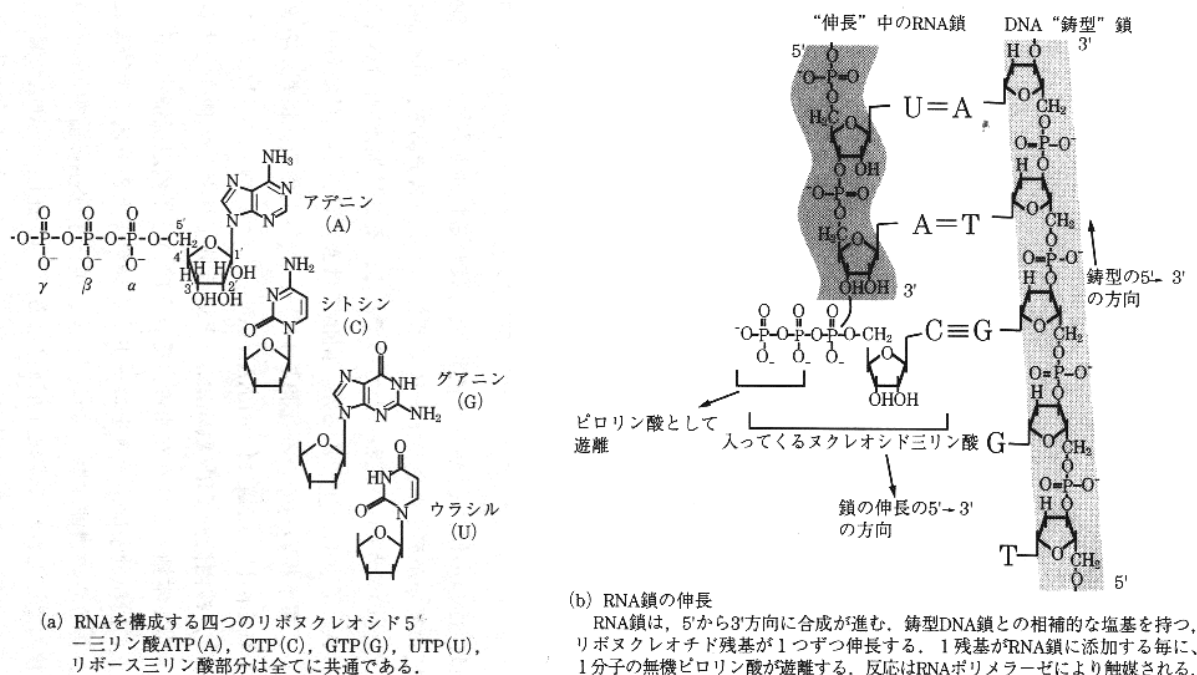


図 3-3 RNA 鎖の構成要素と構造

3.1.3 ウイルスの核酸

ウイルスは複製に必要な最小限の要素として核酸を有しているが、自己増殖できず宿主細胞と呼ばれる細胞に感染し、その機能を利用して増殖する。細胞生物は遺伝分子が必ず2本鎖DNAであるが、ウイルスの持つ核酸はDNAに限らずRNAの場合もある。さらにその核酸は、1本鎖であったり、2本鎖であったり多様である。RNAを核酸として持つウイルスでは、RNAが直接複製されるものやDNA合成の鋳型になるものがある。1本鎖RNAウイルスのRNAはmRNAと同じ鎖のプラス(+)鎖であるものと、mRNAの相補鎖であるマイナス(-)鎖であるものが存在する。

3.2 従来の核酸抽出法

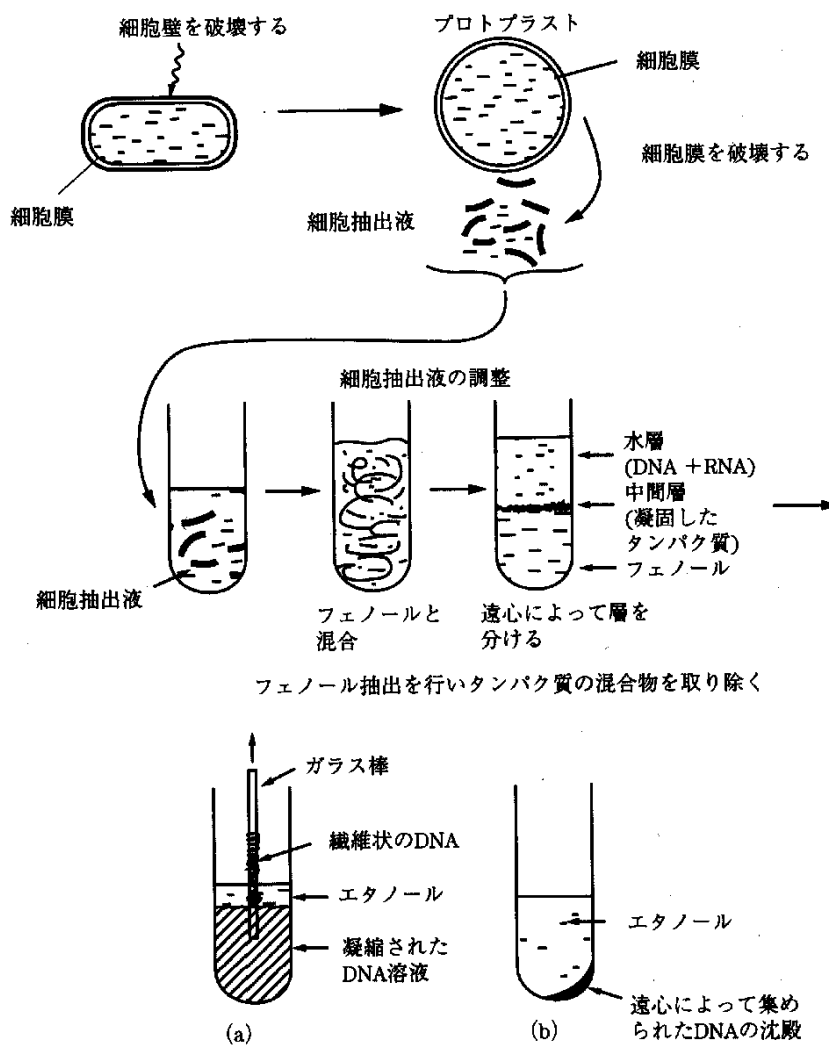
遺伝子診断法は、臨床学的価値の高い診断法で今後益々利用される方法と考えられている。この遺伝子診断に欠かせないプロセスである PCR (polymerase chain reaction) 法は、酵素反応などを利用して遺伝子断片を増幅するため、反応環境に検体由来のタンパク質や脂肪等が高濃度に存在すると反応阻害を引き起こす [38]。したがって、実際に PCR 法で遺伝子増幅を行うには、多くの場合、最初に検体からの遺伝子、すなわち核酸の抽出・精製が必要となる [18], [38], [47], [48]。従来用いられていた手法は、以下のような化学的抽出法が主流であるが、その操作は繁雑であり、マニュアル操作が多く自動化が進んでいなかった。このようなことから最近では多くの研究が行われており、自動化されたものもある。ここでは、従来の核酸抽出法の代表的なものとして化学的抽出法、磁性粒子を用いた抽出法の原理、特徴を述べる。

3.2.1 化学的抽出法 [20], [38], [41]

病原性細菌やウイルスから核酸を抽出する際、最も多く用いられているのが化学的抽出法であり、一般的に図 3-4 のように実施される。まず SDS (sodium dodecyl sulfate; ドデシル硫酸ナトリウム) などの界面活性剤を添加する。界面活性剤は、脂質分子を取り除き核酸を覆っている細胞膜やウイルス被膜を破壊することで細胞やウイルス粒子を溶解する。また核酸は塩基性タンパク質と非常に強く結合しており、界面活性剤はそれらのタンパク質を変性し、核酸から切り離す活性も持っている。これによって分解されたタンパク質と核酸を分離するために、次に水飽和フェノールやクロロホルムなどの有機溶媒が使われる。核酸抽出液と等量の有機溶媒を入れ、攪拌した後に遠心分離を行うことで水溶液（上層）と有機溶媒（下層）の2層に分かれる。核酸は水溶液層に残り、変性したタンパク質は中間層あるいは下層に分離される。この水溶液層のみを回収し、2~3倍量のエタノールあるいはイソプロパノールのようなアルコールと混ぜる。核酸

はこれらの有機溶媒に溶けないためゲル状の沈殿になる。これを遠心分離あるいはガラス棒で回収する。その後、乾燥させることでアルコールを除去し、適当な緩衝液に溶解する。

化学的抽出法は以上の工程にしたがって行われるが、多くの試薬、遠心分離工程が必要であり、多大な時間と労力を必要とする。また試薬には有機溶媒も使われており、その取り扱いに十分注意しなくてはならない。



エタノール沈殿によりDNAを回収する2つの方法。
 (a) 濃縮されたDNA溶液の上に100%エタノールを加える。繊維状のDNAがガラス棒を使って回収される。
 (b) DNA濃度が低い溶液に対しては、100%エタノールをDNA溶液1に対して2.5倍量加え、塩を最終濃度0.1Mになるように加えると塩析によりDNAが沈殿する。沈殿したDNAを遠心により集める。

図 3-4 核酸の化学的抽出法

3.2.2 磁性粒子を用いた抽出法 [18], [49], [50]

磁性粒子を用いた抽出法は、前項で述べた化学的抽出法と Boom 法 [50] を応用したものである。Boom 法は、シリカ粒子の入った高濃度の溶解液中（界面活性剤およびグアニジンイソチオシアネートなど）で細菌やウイルスの被膜を溶解すると同時に、核酸に親和性を示すシリカ粒子に核酸を濃縮し、70%エタノール等で洗浄後、低塩濃度溶液に置換することで核酸をシリカ粒子から離脱させる方法である。このように、Boom 法や化学的抽出法はともに遠心操作が必要であったり、有機溶媒を取り扱う煩わしさがあった。このような問題を解決するために考案されたのが磁性粒子による核酸抽出法である。

磁性粒子とは、化学的に安定性の高い酸化鉄 (FeO_3) とシリカ化合物（アモルファスシリカ、ガラス粉末、アルキルシリカ、アルミナなど）あるいはポリスチレン等の高分子ポリマーを混合して球状に成形したもので、大きさは1~10 μm 程度のものが市販されている。酸化鉄は強磁性体であるため磁場内では磁化されて磁極に集まってくる性質があり、一方で磁場を取り去ったときの残存磁気が極めて低いため、それによって相互に凝集することがほとんどなく、振盪することで容易に再懸濁できる特徴を持つ。シリカ化合物やポリスチレンは、シリカが核酸に対する親和性を持つことを利用したり、表面に $-\text{HN}_2$ 基などの官能基やストレプトアビジンなどを付け、それらを利用して目的とする核酸を抽出する役割を持つ [51]。処理工程としては、はじめに化学的抽出法と同じように界面活性剤で細胞やウイルス被膜を溶解する。その後、磁性粒子を入れ攪拌し核酸を捕捉させる。次に磁石によってその磁性粒子を回収し、数回洗浄を行い、適当な緩衝液に溶解する。このように、磁性粒子を用いた抽出法は、化学的抽出法のような有機溶媒の取り扱いや遠心操作が不要であることが特徴である [52]-[54]。

3.3 導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌・細胞内物質の抽出

本論文では、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出の検討を行っている。この抽出法は 3.1 および 3.2 節で述べた手法とは全く原理が異なり、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に基づく。ここでは、その基礎となった導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌および細胞内物質の抽出について簡単に述べる。

3.3.1 導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌 [21], [55]-[57]

一般の家庭用浄水器は、ポリプロピレン製の多孔質中空糸膜によって水中の不純物や細菌を取り除いている。しかし、それ自体に殺菌能力がないため膜内に細菌が蓄積され、それによる水の再汚染が懸念されていた。そ

表 3-1 導電性中空糸膜の通電効果

細菌	通電電流 (mA)	通電時間 (h)	殺菌効率 (%)
大腸菌 (非病原性)	DC 100	4	100.0
〃	DC 200	4	100.0
〃	50 Hz AC 100	4	25.9
〃	50 Hz AC 200	4	28.3
〃	50 Hz PC* 100	4	81.4
〃	50 Hz PC* 200	4	89.7
黄色ブドウ球菌	DC 100	2	93.1
〃	50 Hz AC 100	2	0.0
〃	50 Hz PC* 100	2	7.5
緑膿菌	DC 100	2	77.5
〃	50 Hz AC 100	2	2.3
腸炎ビブリオ	DC 200	0.5	61.0
〃	DC 200	1	98.7
〃	DC 200	2	99.3
〃	50 Hz AC 200	0.5	0.0
〃	50 Hz AC 200	1	74.0
〃	50 Hz AC 200	2	90.0

* PC : pulse current

ここで膜表面に金属を被覆した導電性中空糸膜を用い、膜自体に直接通電することにより、膜内部に捕捉されている細菌を殺菌する方法が提案された。

まず導電性中空糸膜を介して細菌懸濁液を吸引し、膜に細菌を人為的に捕捉させることで、細菌が蓄積された家庭用浄水器の多孔質中空糸膜を模擬した。次いでその膜に直接電流を流し、膜内の細菌を電氣的に殺菌することが試みられた。表 3-1 は、通電後、膜から回収された菌数を未通電の場合と比較して、どの程度殺菌されたのかを殺菌効率として表し、まとめたものである。この表からわかるように、導電性中空糸膜に直接電流を通電することで、大腸菌をはじめとする様々な細菌を殺菌できることが報告されている。その効果は、通電電流値が大きいほど、また時間が長いほど高い傾向を示していた。さらに、通電電流値が等しい場合も波形によって殺菌効率は異なり、直流電流が最も高く、次いで 50 Hz パルス、50 Hz 正弦波の順であることも確認されている。このように、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌は、電流値、時間、通電波形に依存することから、その機構は通電による細胞膜破壊の可能性が考えられていた。

3.3.2 導電性中空糸膜を用いた電流通電による細胞内物質の抽出

[21]

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌は、これまでにない濾過・殺菌機能の両者を兼ね備えた全く新しいものであり、実用化に向けてさらに研究が行われた。特に実用化の際には、少ないエネルギーで効率的に殺菌することが要求されるため、殺菌機構を明確にすることは重要であり、それらの検討が行われた。3.3.1 項で述べたように、殺菌効率は電流値、時間、通電波形に依存することから、通電による細胞膜破壊の可能性が高いと考えられていた。この推測に基づくと、細菌の内容物を被っている細胞膜が電流によって破壊された場合、その内容物は細胞外に漏出することが予想され、それに関して検討が行われた。

大腸菌（非病原性）懸濁液中に導電性中空糸膜を浸し、その後、膜を介

して懸濁液を吸引すると同時に、電流通電が行われた。そして、膜を介して吸引された溶液は、細胞内物質の含有量を調べるために回収された。細胞内物質として核酸とタンパク質が選択され、それらの含有量は、それぞれの特異吸収波長（260, 280 nm）で回収サンプル（1 ml）の吸光度を測定することによって定量された。未通電のものを1としたときの各通電条件における相対値を表 3-2 に示す。この細胞内物質の相対漏出量と先に述べた殺菌効果を比較すると、最も殺菌効果の高かった直流、次に 50 Hz パルス、50 Hz 正弦波の順に、また電流値が大きいほど各細胞内物質の漏出量も多いことが見出された。すなわち、殺菌効果および細胞内物質の漏出量は非常に相関しており、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の機構は、通電による細胞膜破壊であるものと考えられている。

これらの結果を別の視点からとらえると、導電性中空糸膜に直流電流を通電することで細胞内物質の抽出が可能であると言える。本論文で検討している遺伝子抽出は、この 3.3 節で紹介した電流通電による殺菌、細胞内物質の抽出に基づくものであり、それらの結果はこの研究においても非常に有用であるものと考えられる。

表 3-2 通電による細胞内物質の相対漏出量

通電電流	核酸 (260 nm)		タンパク質 (280 nm)	
	100 mA	200 mA	100 mA	200 mA
DC	12.40	16.95	10.06	14.38
50 Hz AC	2.12	3.36	1.88	2.47
50 Hz PC	5.69	7.48	5.00	6.88

第 4 章

導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を 応用した大腸菌 O157 遺伝子の抽出

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法は、様々な細菌に対して優れた殺菌効果を有していた。またその際、細胞内物質の漏出が確認されたことから、殺菌機構は通電による細胞破壊であることが示されてきた。本章では、その殺菌効果および機構に着目し、導電性中空糸膜の電流通電による殺菌を応用した全く新しい遺伝子抽出法の可能性を検討している。

病原性微生物の中でも特に毒性の高い大腸菌 O157 に感染すると、抵抗力の低い小児や高齢者などは死に致る危険性もあり、早期発見・診断が求められる。そこで本章では、臨床細菌検査において最も重要な病原性細菌の一つである大腸菌 O157 を供試細菌とし、導電性中空糸膜の遺伝子抽出の可能性と有効性について検討を行っている。

本章では検討の際に必要な大腸菌 O157 をはじめとする細菌の構造や機能、またその取り扱いについて述べ、さらに本研究で用いた導電性中空糸膜の概要も合わせて述べる。

4.1 細菌 [29], [42]-[44]

生命体を構成する基本単位は細胞である。細胞は、脂質二重層とタンパク質から構成される細胞膜 (cell membrane) または形質膜 (plasma membrane) と呼ばれる膜に囲まれている。また細胞には、核 (nucleus) を持つものと持たないものがある。前者は DNA を囲う膜 (核膜; nuclear membrane) が細胞の中に存在し真核細胞 (eukaryotic cell) と呼ばれる。後者は原核細胞 (prokaryotic cell) と呼ばれ、細胞には DNA を囲む膜がない。生物界には、このような細胞 1 つからなる単細胞生物と、人間のよ

うに約 60 兆個もの細胞から構成されている多細胞生物が存在する。

一方、微生物 (microorganism) とは、肉眼で見えず、顕微鏡下で観察可能な生物の総称である。これには原生動物 (原虫)、藻類のような 20~90 μm のものから、20~300 nm のウイルスに至るものまでである。微生物は最も単純な単一の細胞からなる単細胞生物と言えるが、その呼称が細胞構造に基づくものではないため、真核細胞のものもあれば、原核細胞のものもある。本論文で取り扱う細菌は、その細胞構造から分類すると原核細胞の単細胞生物となる。

4.1.1 細菌の構造と機能

細菌は、大きさ約 1~10 μm で、球菌 (coccus)、桿菌 (bacillus)、らせん菌 (spirillum) の 3 つの形をとるが (図 4-1), 図 4-2 のように基本的な構造は同じである。外側は 7 nm 程度の厚い細胞膜で覆われている。これは脂質二重層で、様々な分子の出入りを調節するタンパク質や酵素タンパク質を持つ。多くの細菌は厚さ 3~25 nm のしっかりした多糖類の細胞壁 (cell wall) でさらに囲まれており、これは機械的に傷ついたり、低濃度溶液中での浸透圧による破壊を防ぐものである。細菌には、真核細胞のような膜で覆われた細胞内構造はないが、細胞膜の一部が内側に折り込まれたメソソーム (mesosome) という多層構造をつくる場合がある。メソソームは DNA の複製、その他の酵素反応の起こる部位とされている。また、

細菌の細胞質（細胞の中身）は単なる一様な溶液ではなく，染色体（DNA 分子）が1つにまとまった核様体（nucleoid）を成す．細胞質は

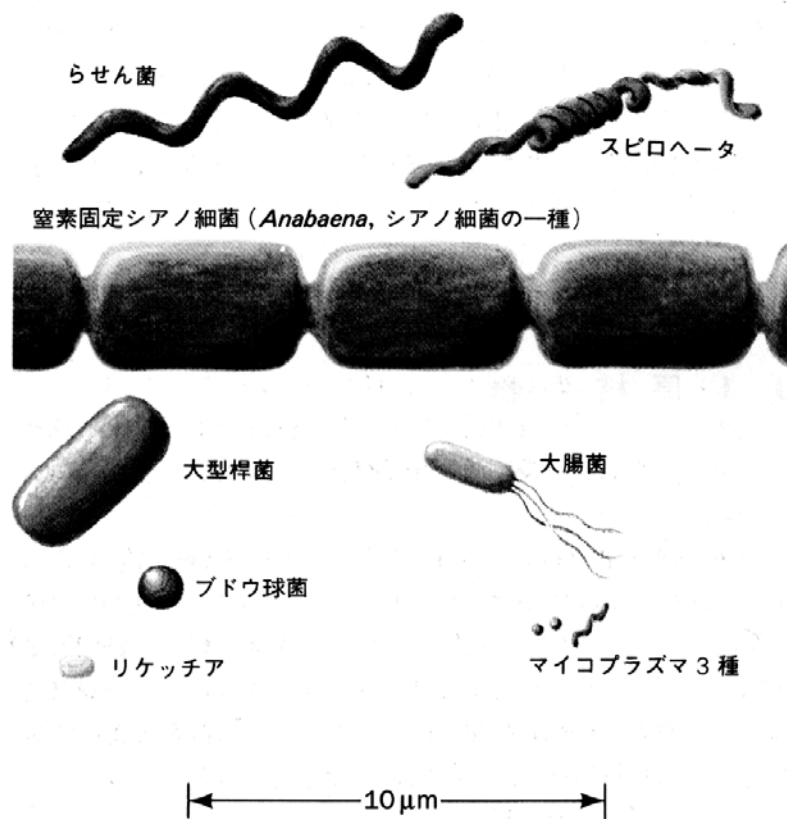


図 4-1 細菌の大きさや形状

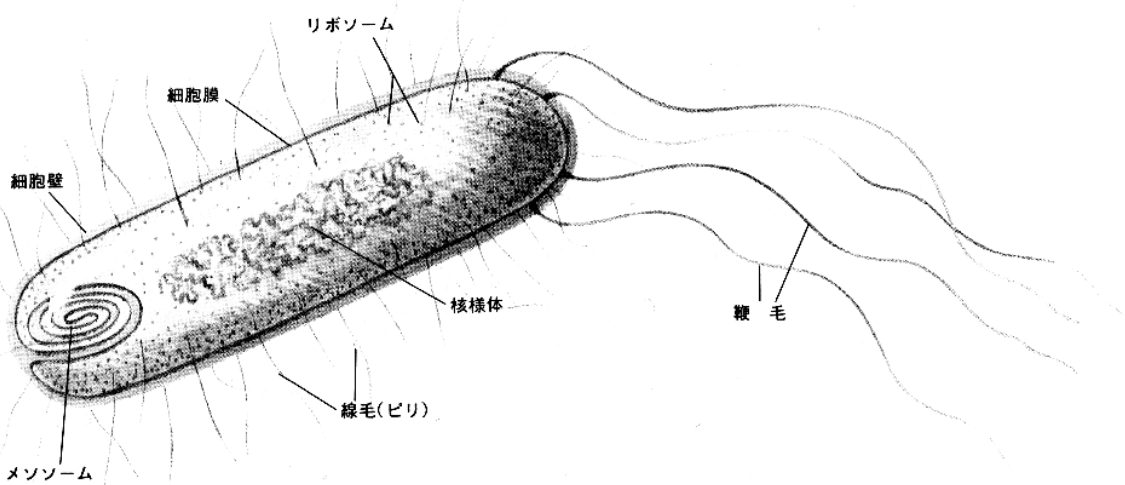


図 4-2 細菌の構造

いろいろな RNA, 特定の化学反応を触媒する可溶性の酵素タンパク質, タンパク合成を行う何千個もの粒子リボソーム (直径 25 nm) などを含む。細菌は鞭毛 (flagella) を持つものが多く, それで運動する。また細菌によっては線毛 (pili) を有するものがある。線毛は, 性的に結合したとき DNA の導管となったり, 宿主生物の細胞に付着する働きを持つ。

4.1.2 供試細菌

通常の大腸菌はヒトや動物の腸管に存在し, そのほとんどは無害である。健康な人であれば糞便 1 g 中に約 $10^6 \sim 10^8$ 個含まれている。大腸菌は, 大きさ $1.1 \sim 1.5 \times 2.0 \sim 6.0 \mu\text{m}$, 重さ約 2×10^{-12} g のグラム陰性桿菌である。DNA は 3×10^9 Da (約 4×10^6 bp), 約 3,000 種のタンパク質をコードしている。1 つの大腸菌に含まれる分子は, 表 4-1 のようにタンパク質, 核酸, 多糖, 脂質, その他の小分子やイオンを合わせると約 3,000~6,000 種であるとされている。

病原性大腸菌と呼称されている大腸菌は, 小腸に定着できるなどの特別な病原因子産生能を有し, 下痢を主症状とする腸管感染症を引き起こすものである。大腸菌 O157 (図 4-3) は, 病原性大腸菌の中でも腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC) に属するものであり, ベロ毒

表 4-1 大腸菌の分子組成

成分	重量%
水	70
タンパク質	15
DNA	1
RNA	6
多糖類とその他の前駆体	3
脂質とその他の前駆体	2
その他の有機小分子	1
無機イオン	1

素産生性大腸菌 (Verocytotoxin-producing *E. coli*; VTEC), あるいは志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) と呼ばれ, VT1 (vero toxin type 1) と VT2 の 2 種類のベロ毒素を産生する [22]. この毒素はフグ毒の 30~50 倍の毒性を示し, 血便を伴う激しい下痢を引き起こし, 抵抗力の低い小児や高齢者などでは溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) や脳症を合併し, 最悪の場合には死に致ることもある. さらに, 腸炎ビブリオやサルモネラなどは, およそ 10 万~100 万個以上の菌数を摂取しなければ発症しないが, 大腸菌 O157 は, わずか数百個程度の非常に少ない菌数で発症することも大きな特徴である.

このように, 大腸菌 O157 による感染症は, その広がりや症状の激しさから, 被害を最小限に抑えるには迅速な診断が極めて重要である. したがって, 本研究では, 病原性細菌の中でも特に食中毒の原因菌として代表的な大腸菌 O157 (*Escherichia coli* O157:H7) を選択し, 使用した. また, 通常糞便中に含まれる細菌として非病原性大腸菌 AHU 1714 株 (*Escherichia coli* AHU 1714) を用いた. これらの細菌を使用するにあたって, 普通寒天培地に保持された大腸菌 O157 または非病原性大腸菌 AHU 1714 株を一白金耳ほど普通ブイヨン培地に接種し, 37°C 一定に保たれた恒温器中で一晚培養した. その後, 生理食塩水で 2 回洗浄し, 一

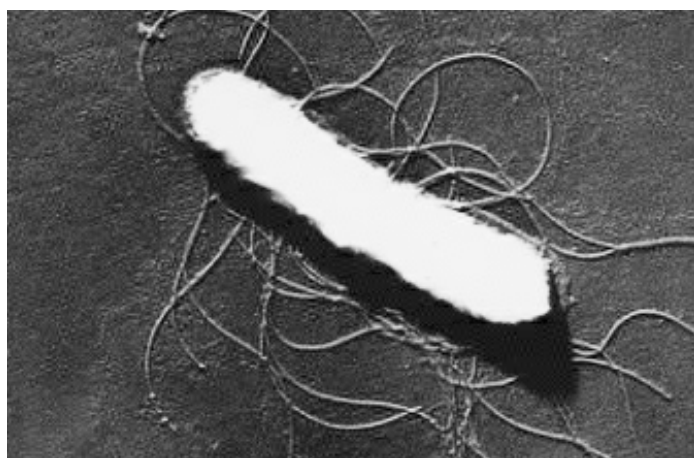


図 4-3 大腸菌 O157 の電子顕微鏡写真

定の菌数になるように再び生理食塩水で調整した。以後、それらが大腸菌 O157 懸濁液、非病原性大腸菌懸濁液と呼ぶ。

なお、大腸菌 O157 は札幌医科大学微生物学教室から分与を受けた。

4.2 細菌操作の基礎

微生物を取り扱う際最も重要なことは、目的とする微生物以外の微生物が実験結果に影響を及ぼさないようにすること、すなわち汚染されないことである。微生物は空气中、実験者の皮膚、衣服、呼気などあらゆるところに存在していることから、細菌学的な操作を行い正確な結果を導くには、常に無菌状態を保たなければならない。したがって、実験に用いる器具や培養基はあらかじめ完全に滅菌されていなければならない。また細菌学的な操作は常に無菌状態で行う必要がある [20], [29]。

4.2.1 細菌操作に使われる器具や培養基の滅菌および殺菌法

細菌操作に用いる器具、培養基は雑菌による汚染を防ぐために、全て滅菌してから用いることが必要である。以下に種々の滅菌法について述べるが、各々の特徴を考慮し、対象物によって最も適切な方法を選択しなければならない [20]。

(1) 火炎滅菌法

ガスバーナーの酸化炎の部分で赤熱させて滅菌する方法である。

細菌を操作する際に用いる白金線や白金耳に対して使用する。また、培地の入った試験管やフラスコの栓を開閉する際にも、この方法で管口部を滅菌する。

(2) 乾熱滅菌法

乾熱滅菌器を用い、乾燥空气中において 160℃で 120 分間、あるいは 180℃で 90 分間加熱することによって滅菌する方法。

ガラス器具、陶器類、金属製品などの熱に安定な固体を滅菌するのに用いる。

(3) 高圧蒸気滅菌法

加圧水蒸気中（通常は大気圧+約 1 気圧で 120℃の条件を使用）で滅菌を行う方法である。15 分程度の処理で、細菌芽胞も完全に殺すことができ、現在用いられている滅菌法において最も信頼性が高

い.

培養基などの滅菌に用いるが、加水分解されやすい物質やプラスチックなどの湿熱に弱い物質には適用できない。

(4) 濾過滅菌法

細菌の通過を妨げるのに十分な直径の孔を持つ濾過体を通して、滅菌を行う方法である。

通常はセルロース系の素材でできた直径 0.45 μm 程度の孔を持つメンブランフィルタを使用して、加熱すると分解するような培養基の滅菌に用いる。ただし、孔より小さいウイルスなどは取り除くことができないことを留意しておく必要がある。

(5) 薬品による殺菌・消毒

実験器具類、手指、実験台表面などの殺菌および消毒に用いられる。一般的に 1% 逆性石鹼液や 70% エタノールなどを用いる。

4.2.2 細菌数の計測法 [20], [29]

一般に細菌数の測定には、次のような測定法がある。それぞれ迅速に結果が得られる方法、精度は高いが時間のかかる方法などがあり、目的に応じて選択する必要がある。

(1) 検鏡法

細菌懸濁液をそのまま、あるいは適宜に希釈したものを光学顕微鏡で観察し、一定容積中の細菌数を数えることにより、原液中の細菌数を算出する。これにはペトロフ・ハウッサーあるいはヘルバー計数板が使われるため、菌数計算板法とも呼ばれる。この方法は生菌、死菌を含めた全菌数を計測することになる。

(2) 濁度(吸光)法

細菌懸濁液の濁度や吸光度を測定することによって、細菌数を調べる方法である。散乱光および透過光の強さは、細菌の大きさや形

状などに依存するが、均一の懸濁液を仮定すれば、菌体量は濁度あるいは吸光度と一定関係にあることを利用している。この方法は、短時間に多くの試料を処理できることが特徴である。実際に生菌数と結び付けるためには、あらかじめ検量線を作成する必要がある。菌株によって、また同じ菌株でも培養条件によって濁度（吸光度）と生菌数の関係が変動する。

(3) 培養法

死菌は含めず生菌だけを計測する方法で、1個の集落は1個の生菌に由来するという仮定に基づく。求めた菌数は集落形成単位（colony forming unit : CFU）で表す。

a) 混積培養法

菌液を適当に希釈（通常10倍段階希釈）して、その一定量（通常1 ml）をシャーレの中に入れる。次いであらかじめ溶解し43～45℃に保温しておいた寒天培地約20 mlをシャーレに注ぎ、試料とよく混和した後静置して平板に固まらせる。培養後生じた集落数に希釈率を乗じて生菌数を算出する。

b) 平板塗抹法

希釈した菌液の一定量（通常0.1 ml）を寒天平板の表面に均等に塗抹した後培養する。生じた集落数より生菌数を算出する。寒天培地1枚当たり50～300個のコロニー数が出現するくらいが信頼のおける計数值である。

c) メンブランフィルタ法

細菌を通さず、液体成分を通すメンブランフィルタ（membrane filter）を用いる方法であり、水質検査等試料中の菌数が少ない場合に用いられる。試料を濾過したメンブランフィルタを寒天平板の上に置いて培養し、メンブランフィルタ上に形成された集落数を数える。

通常、大腸菌の菌数を計測するには、上記の方法のうち濁度法か混釈培養法のどちらかが使われる。しかし、本研究で取り扱う細菌数は広範であるため、それによって生じる誤差が少ない混釈培養法を用いた。

4.3 導電性中空糸膜の概要

多孔質中空糸膜は、液体や空気などの混合物質を濾過することによって、それらに含まれる目的とする物質を分離するための濾過基材である。現在、この多孔質中空糸膜は高純度水、無菌水、血液の浄化、火力・原子力発電所の復水および排水の濾過など、医療、工業分野において広く利用され、さらには一般家庭用の浄水器にも用いられている。しかし、この多孔質中空糸膜は、それ自体に殺菌能力がないため、膜内に細菌が蓄積し、それによる再汚染が懸念されるようになってきた。そこで当研究室では、3.3.1項で述べたように、この膜に金属を被覆した導電性中空糸膜に電流を流すことで、膜に捕捉された細菌が殺菌されることを見出している。従来の研究では、導電性中空糸膜を、殺菌能力が付与された濾過基材として使用することを目的に研究が進められ、その有効性を示す多くの知見が得られた。本研究では、それらの知見をもとに、導電性中空糸膜を全く新しい遺伝子抽出基材として利用することを試みた。

ここでは、本研究で用いた導電性中空糸膜の特徴となっている金属の被覆方法、また膜の構造、実験に際して行ったモジュール化の方法について述べる。

4.3.1 金属の被覆方法 [58], [59]

一般に金属をメッキする方法として電気メッキ、蒸着、スパッタリング、また本研究で用いている無電解メッキなどがある。それらの中でも、ポリプロピレン製の多孔質中空糸膜表面に金属を被覆する方法としては、蒸着やスパッタリングといった方法がこれまでに用いられてきた。しかし、これらの方法は、金属をポリプロピレンに付着させているだけで、金属層と多孔質中空糸膜との接着強度が低く、金属層が膜から剥離しやすいという問題があった。そこで本研究では、多孔質中空糸膜表面上に金属を被覆する方法として、これまでに行われていなかった無電解メッキ法を採用した。

無電解メッキ法は、化学還元メッキ法と置換メッキ法に大別される。両

表 4-2 金属被覆の操作手順と各条件

処理	薬品	温度 (°C)	時間 (min)	pH
エッチング	40%クロム酸 (CrO ₃) と 40%硫酸 (H ₂ SO ₄) の混 合溶液	60	2	---
中和 (1)	5%塩酸 (HCl)	室温	1 ^{注)}	---
中和 (2)	15%コンデライザーSP	40	3	---
触媒付与	キャタリスト C	40	3	---
アクセセル	5%塩酸	45	2	---
ニッケルメッキ (化学還元メッキ)	トップケミアロイ B	60	5	6.6~6.8
Au メッキ (置換メッキ)	10~20% OPC ムデンゴールド	75~80	10	5.5~6.2
乾燥	---	60	30~60	---

注) 残留しているエッチング液が中和するまで行い、その目安が1分。

ではパラジウムとすずの合金がコロイド状に膜表面に付与されているため、45°Cの5%塩酸に2分間浸すことですずを溶解し、触媒金属として良好なパラジウムのみを膜に存在させた。表中にはこの操作をアクセセルと記述した。5%の塩酸から取り出した膜を水で洗い、次いで pH が 6.6~6.8 に調整されたトップケミアロイ B-1 と呼ばれる無電解ニッケル・ホウ素合金メッキ液 (60°C) に5分程度浸し、ニッケル・ホウ素合金を膜表面に被覆した。この操作ではメッキ液中のホウ素化合物が還元剤となり、触媒であるパラジウム表面で還元反応が生じ、これを取り巻くようにニッケル・ホウ素合金の析出が起こる。なお、析出した合金の組成はニッケルが99%以上、ホウ素が1%未満であることから、以後、この操作で被覆された金属はニッケルと考える。このようにニッケルを被覆した膜は、ニッケル自体の電気抵抗が比較的高いため優れた導電性が得られなかった。そこで、さらに電気抵抗の低い金属 Au を被覆することによって導電性を向上させた。Au の被覆には OPC ムデンゴールドと呼ばれる浸漬無電解金メッキ液を

10～20%に薄め、pH を 5.5～6.2 に調整し、75～80℃に加温したものをを用いた。この溶液にニッケルが被覆された膜を 10 分程度浸漬して Au を被覆した。先に被覆されたニッケルは Au よりイオン化傾向が高いため、Au が置換メッキによって膜表面に被覆される。

以上のような無電解メッキ法を採用することで、触媒金属のパラジウムが膜に化学的に結合し、それを取り囲むように金属が被覆されているため、これまでの蒸着やスパッタリングによるものと比べて、金属層の接着強度が大幅に向上した。さらに金属の被覆量を、エッチング液およびメッキ液の濃度と温度、処理時間などによって容易に調節でき、また被覆金属の種類も選択できることから、導電率をも簡単に制御できる。その結果、従来のは 100 Ω/cm 程度の比抵抗であったのに対し^{[60], [61]}、本研究で用いた導電性中空糸膜は 0.1～1 Ω/cm 程度まで低下させることができ、接着強度と導電性がともに改善された。

4.3.2 膜構造

本研究で用いた導電性中空糸膜は、前項のようにポリプロピレン製の多孔質中空糸膜表面に無電解メッキ法により金属 Au を化学的に被覆したものである。膜の電子顕微鏡写真を図 4-4 に示す。本膜の形状は図 4-4 (a) のように円筒状である。図 4-4 (b) は図 4-4 (a) の斜線部を拡大したものであり、膜の内側がポリプロピレン層、外側は薄い金属 (Au) 層の 2 層構造になっていることがわかる。膜厚は約 300 μm で、そのうち外側の 10～15% (数十 μm) が金属層である。また膜の表層は、多孔質中空糸膜本来のポリプロピレン繊維に沿って金属が被覆されているため、ポリプロピレン層はもとより、金属層も図 4-4 (d) のようにスポンジ状のポアが形成されている。そのポアサイズは 0.1 μm である。

導電性中空糸膜はこのような構造から、従来の多孔質中空糸膜の特長であった広い有効膜面積 (534 cm²/cm)、微粒子に対する高い捕捉能力に加え、無電解メッキ法により金属を被覆したことからポリプロピレン層と金

属層との接着強度が向上し、それに伴い高い導電性を有している。

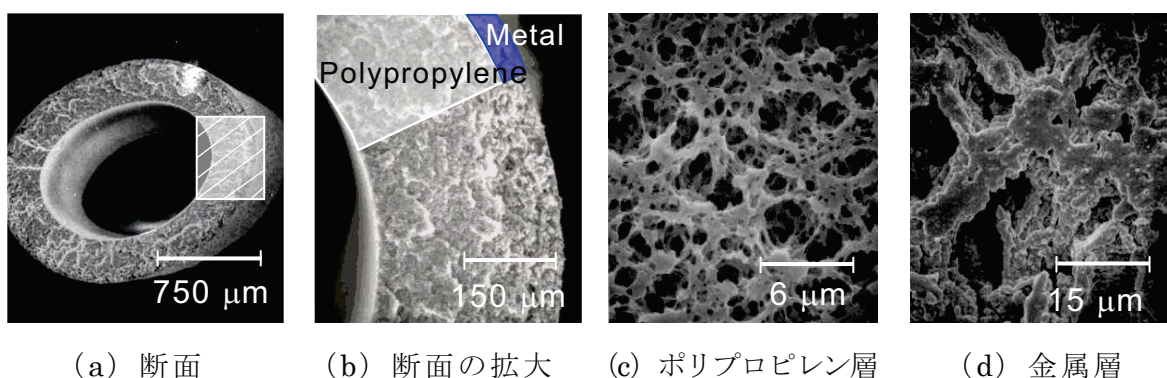


図 4-4 導電性中空糸膜の電子顕微鏡写真

4.3.3 モジュール化

導電性中空糸膜そのものの形状では直接使用することは難しいため、できる限り溶液の吸引や通電処理などの実験操作が円滑に行えるように、導電性中空糸膜を図 4-5 のようにモジュール化した。具体的には次のように行った。

まず導電性中空糸膜を 2 cm の長さに切断し、その両端に通電用のリード線を、融点が 68℃である低融点ハンダを用いて固定した。その際、10%塩酸溶液をディップ液として使用した。次に、膜の一端には溶液を吸引する際に必要な吸引用ノズルを差し込み、エポキシ樹脂で固定した。もう一端は、懸濁液が必ず膜を介して吸引されるようにエポキシ樹脂で封じた。

このようにモジュール化されたものを以後、導電性中空糸膜モジュールと呼ぶことにする。なお、この膜モジュールの有効長は約 1 cm である。

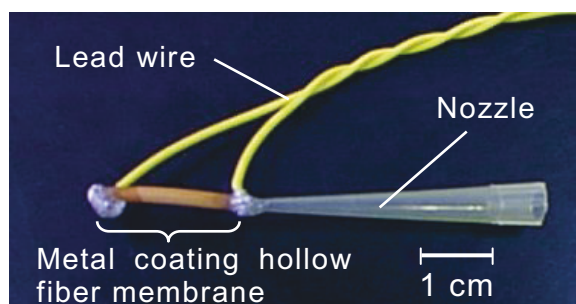


図 4-5 導電性中空糸膜モジュール

4.4 実験方法

一般的に微生物感染症の遺伝子診断は、1) 検体からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅 (PCR)、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定といった工程で行われる。現在、その中でも特に重要、かつ必要不可欠な遺伝子抽出は複雑であり、自動化が進んでいないことから、本論文では導電性中空糸膜を用いた全く新しい遺伝子抽出法の検討を行っている。まず微生物感染症の中でも、特に迅速な診断が求められる大腸菌 O157 による感染症の診断を目的とし、その有効性を検討した。

4.4.1 導電性中空糸膜を用いた遺伝子の抽出法

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出の最終的な目的は、患者の糞便から直接遺伝子を抽出することである。そこで、4.5.1 および 4.5.2 項で、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用できるか、4.5.4 項において、糞便試料を想定し目的以外の細菌が混入したサンプルからの標的遺伝子の抽出が可能かどうか、4.5.5 項では、糞便試料から標的遺伝子を抽出できるかどうかというように段階的に検討を進めた。最初の基礎的検討では大腸菌 O157 のみが含まれた単独試料を、次いで行われた糞便試料を想定した検討では大腸菌 O157 以外の細菌も存在する混合試料を、4.5 節の最後に行われた検討では糞便試料を用いた。これらはそれぞれ次のように準備した。

単独試料は、大腸菌 O157 懸濁液を生理食塩水で 10 倍段階希釈することにより、菌濃度 $10^8 \sim 10^5$ CFU/ml のものを 3 ml 用意した。また 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml の大腸菌 O157 懸濁液 1.5 ml と、 10^{10} , 10^9 , 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml を全ての組み合わせで混合し、3 ml の混合試料を 9 種類用意した。糞便は健康な成人から採取され、1 g 当たり 10 ml の生理食塩水を添加した。このように希釈された 10%糞便溶液 0.9 ml に 10^9 , 10^8 , 10^7 CFU/ml の大腸菌 O157 懸濁液 0.1 ml を加えることで、大腸菌 O157 が 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU 含まれたものを 1 ml 準備した。その

後、これに 2 ml の生理食塩水を添加し 3 ml の糞便試料を調製した。このような各々の試料から、以下に示す手順で遺伝子抽出を行った。

まず試験管に用意したサンプル 3 ml 中に、シリコンチューブを介してペリスタポンプに接続した導電性中空糸膜モジュールを浸し、0.6 ml/min の速度で試料を全て吸引することで導電性中空糸膜モジュールに菌を捕捉した。その後、図 4-6 に示すように、滅菌蒸留水 3 ml が入った試験管に膜モジュールを入れ、膜に電流を流すと同時に滅菌蒸留水を全て吸引した。この通電処理と 2 度目の吸引は、膜に捕捉された菌の細胞膜を破壊して細胞内から遺伝子を抽出し、それを試験管に回収するためである。なお、3.3 節で述べたように導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果

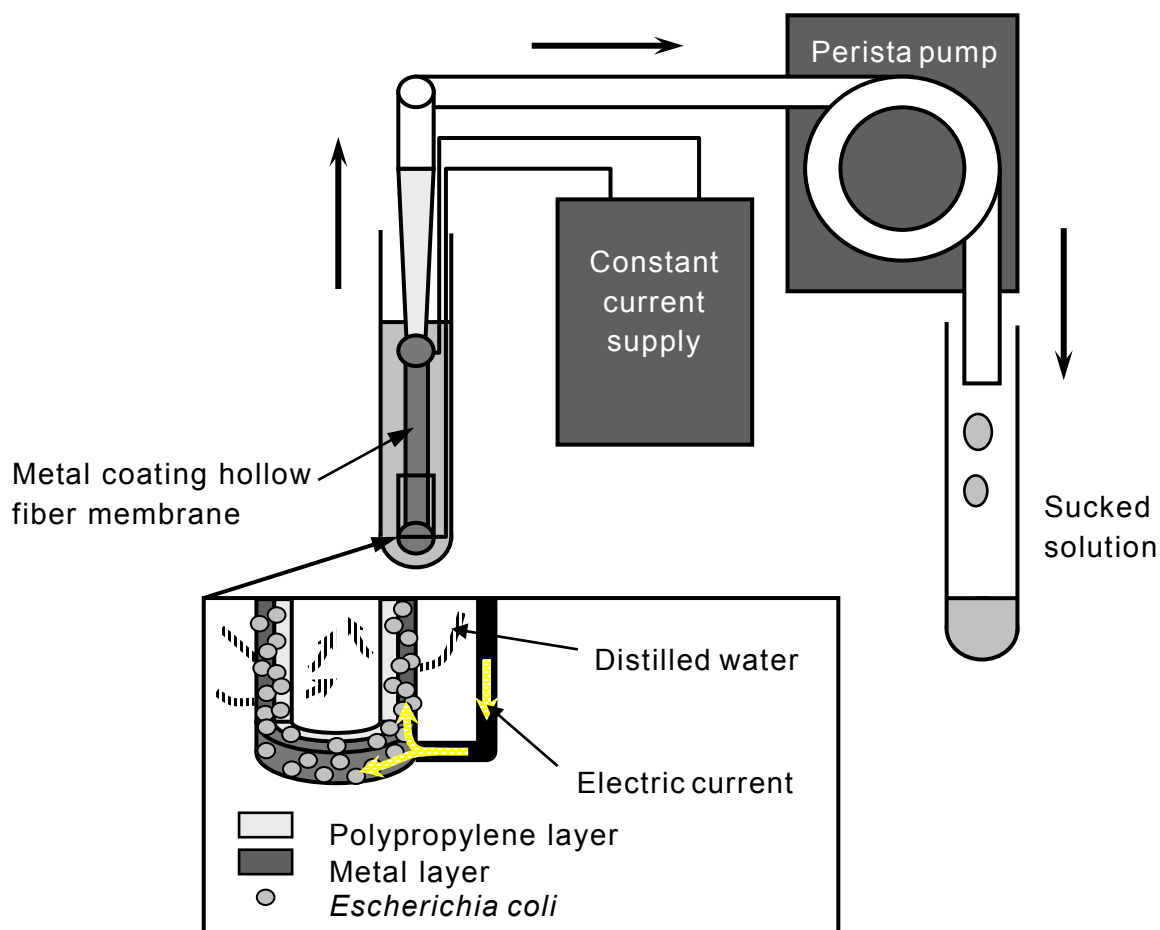


図 4-6 導電性中空糸膜の電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出の概略

は、直流電流が最も高かったため、通電電流は直流とし、大きさは 100, 200, 300, 400, 500 mA のいずれかを選択した。また通電時間は、蒸留水 3 ml を全て吸引できる 5 分とした。これとは別に、遺伝子抽出における通電の効果を確認するために、通電を行わず、それ以外は同じように処理したのも用意した。

4.4.2 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法 [41], [42], [62], [63]

4.4.1 項の遺伝子の抽出操作後、一般的な遺伝子診断工程である PCR (polymerase chain reaction) により遺伝子の増幅を行った。ここで PCR の原理を簡単に説明する。

PCR は新しいクローニングの手法であり、遺伝子のある部位の塩基配列が判明すれば、他のものが混入していても、ごく微量な特定の DNA 断片を直接クローニングできる。まず図 4-7 に示すように、2 本鎖の DNA は加熱することによって分子運動が活発になり、二重らせん構造を保持する水素結合などが切断されることを利用して、2 本鎖 DNA を 1 本鎖にする。これを変性 (denaturation) という。この熱処理によって DNA が十分に変性した後、温度を 50~60°C に下げる。PCR 反応液中には目的とする部位の両末端に相補的な合成オリゴヌクレオチドが、変性 DNA に対して大過剰の量で加えられているため、1 本鎖の DNA は相補的な相手を見つけられず、それにかわって相補的な合成オリゴヌクレオチドが結合 (annealing) する。次に、この結合した合成オリゴヌクレオチドがプライマー (primer) となって、そこから酵素によってデオキシヌクレオシド三リン酸 (deoxynucleoside triphosphate : dNTP) が連結され、DNA 鎖の伸長・合成が行われる。ここで使用される酵素は耐熱性の DNA ポリメラーゼと呼ばれ、温泉で生息する細菌 *Thermus aquaticus* 由来の Taq ポリメラーゼが主に使われている。Taq ポリメラーゼは 72°C になると DNA 合成を開始する。以上の変性と合成のサイクルを繰り返すことによって、目的とする部位を効率良く合成し、増幅することができる。

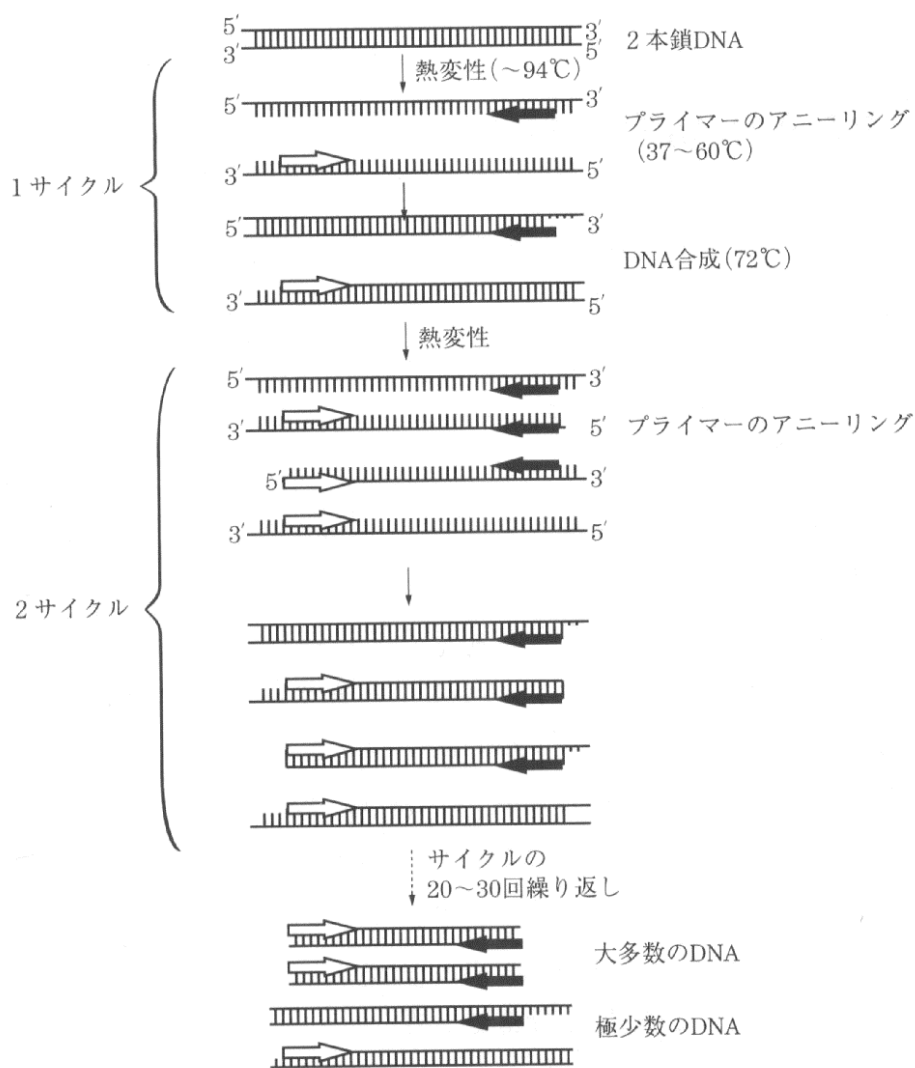


図 4-7 PCR の原理

抽出操作後、回収サンプル 3 ml のうち 5 μ l を、PCR 反応液 45 μ l に入れ、表 4-3 に示す条件で PCR を行った。なお、標的とした遺伝子は、大腸菌 O157 を含む腸管出血性大腸菌のみが特異的に産生するベロ毒素 (VT1) をコードする遺伝子とした。PCR で使われた 2 つのプライマーは、VT1-53 (5'-AACAGCGGTTACATTGTCTGG-3')、および VT1-34 (5'-TCTCTTCTTCTCAGTGCGCA-3') である。これによって増幅される遺伝子断片の分子サイズは 774 bp となる。

表 4-3 本研究の PCR 条件

条件	
熱変性	94°C, 1分
アニーリング	55°C, 1分
伸長 (合成)	72°C, 3分

} 30 サイクル

4.4.3 ゲル電気泳動法 [42], [64], [65]

DNA や RNA をゲル電気泳動にかけると、その大きさに基づいて分離される。中性付近の pH では各ヌクレオチドのリン酸基が負の電荷を持つため、DNA や RNA 分子全体は強く負に帯電する。そのため電気泳動槽に電界を印加すると陽極の方向へ移動する。小さな DNA 分子はゲル中を大きな分子よりも速く移動するため、種々の大きさの DNA 断片をゲル電気泳動で分離することができる。ゲルによって分子のランダムな拡散が妨げられるため、種々の大きさの DNA 断片の混合物を電気泳動すると、同じ大きさの断片はバンドとして他の大きさの断片と分離されていく。このバンドの幅は、電気泳動を開始するとき試料を注ぐ孔の幅と同等である。ゲル電気泳動の分解能は非常に高く、500 塩基程度までの 1 本鎖 DNA の場合には、1 塩基の差を確実に検出することが可能である。

分離された DNA バンドの検出には通常 2 つの方法が用いられる。DNA が放射性標識されていれば、オートラジオグラフィによって DNA バンドを検出することができる。この場合には、ゲルと写真フィルムを暗室で適当な時間だけ密着させて、フィルムを感光させる。フィルムを現像すれば DNA バンドの写真像を得ることができる。一方、DNA が放射性標識されていない場合には、ゲルを蛍光色素エチジウムの入った溶液で処理する。一般に色素にはエチジウム・ブロマイド (ethidium bromide: EtBr) が使用される。この色素の分子構造は図 4-8 に示すように平板状で、DNA の塩基対の間に入り込む。この結合によってエチジウムは DNA 内に集積し、内在性の蛍光の強度が上昇する。その結果、この色素で処理したゲルに紫外線を照射して観察すると、DNA バンドはオレンジ色のバンドとして検出

される。

本研究では，DNA や RNA のゲル電気泳動で一般的に用いられる 3% アガロースゲルを使ってゲル電気泳動を行った。なお，ゲルの孔に注入した PCR 産物の量は，約 10 μ l である。その後，ゲルを 1% エチジウム・ブロマイド溶液に 15 分程度浸して遺伝子バンドを染色し，それをトランスイルミネータにより可視化して，標的遺伝子の検出状況を確認した。

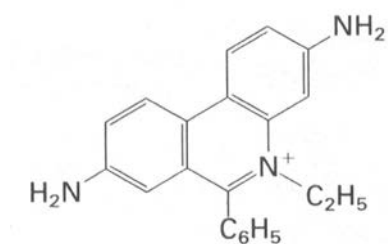


図 4-8 エチジウム・ブロマイドの構造

4.5 実験結果

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用できるか否かを、大腸菌 O157 単独試料、混合試料、最後に実際の糞便試料を用いて順次検討した。得られた結果を以下に述べる。

4.5.1 大腸菌 O157 単独試料からの遺伝子抽出

最初に、大腸菌 O157 のみが含まれた単独試料を用いて 4.4.1 項のように遺伝子抽出操作を行い、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用できるかどうか基礎的な検討を行った。その際の通電電流は、まず従来の電流通電による殺菌法に基づいて、効果が認められた DC 100, 200 mA と、さらに効果が期待される 300 mA を選択し、通電時間を 5 分とした。また、通電と同時に行った蒸留水の吸引時の最大圧力は、図 4-9 のように 210~280 mmHg の範囲であった。それぞれの条件における遺伝子抽出結果を図 4-10 に示す。

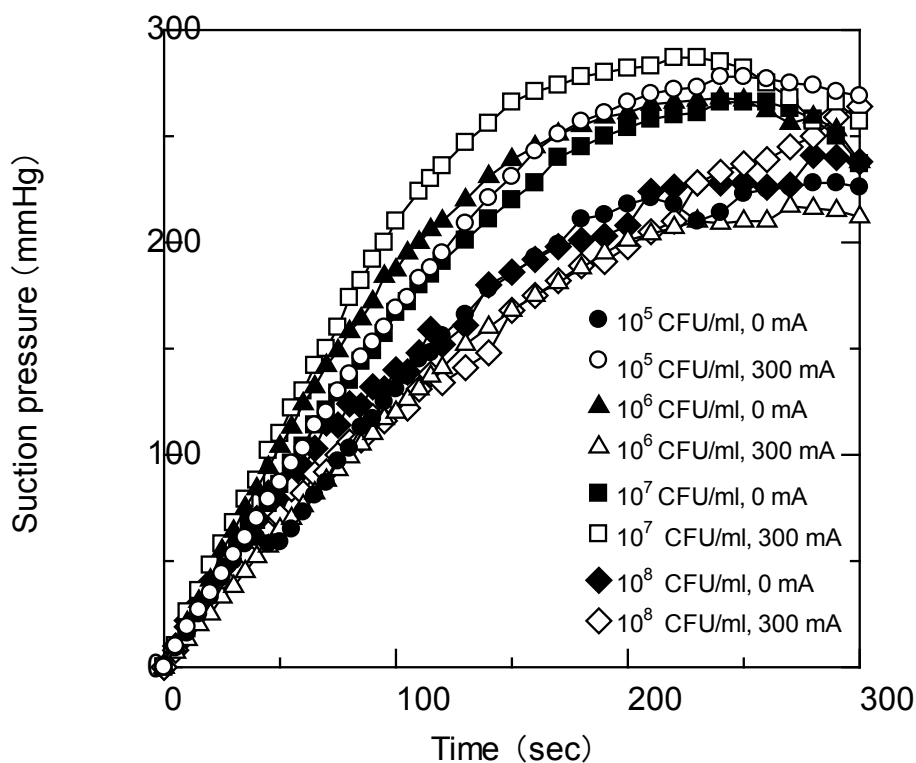
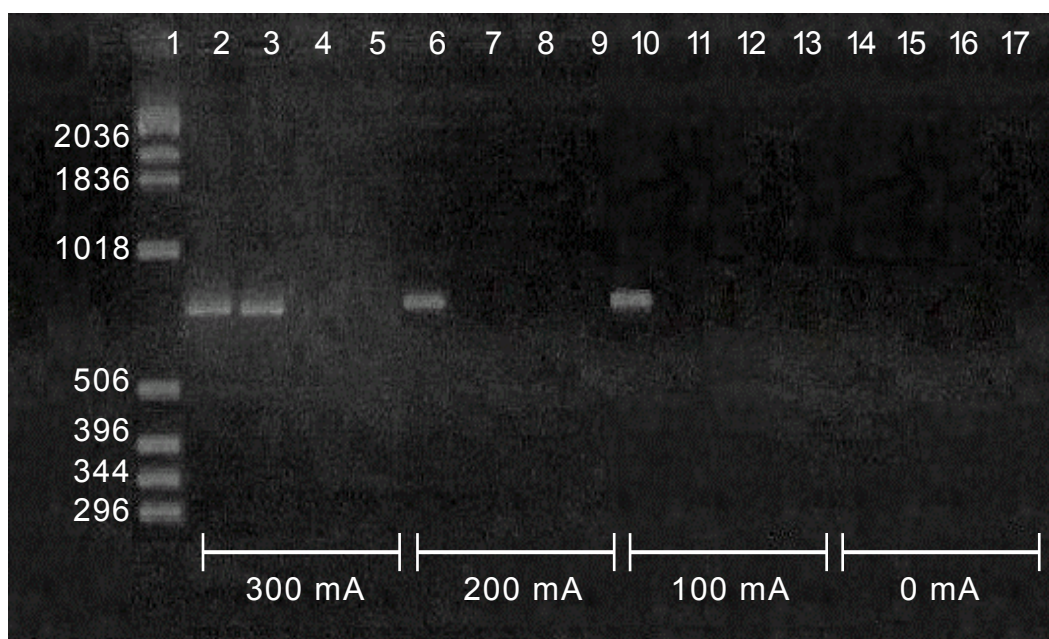


図 4-9 遺伝子抽出時の吸引圧力

通電を行わずに抽出したサンプルからは、全ての菌濃度において遺伝子バンドが確認されなかった。これは、通電を行わなかった場合、膜を介して吸引された溶液中に遺伝子が含まれていないことを示している。一方、通電を行って抽出したサンプルにおいて、506 bp から 1,018 bp 間の同じ位置に遺伝子バンドが確認された。標的とした遺伝子は、サイズが 774 bp の VT1 遺伝子断片であり、図 4-10 のように、確認できる全ての遺伝子バンドは、サイズが約 774 bp である。これより、確認された遺伝子バンドは標的とした VT1 遺伝子断片であることがわかる。ここで抽出条件について見ると、菌濃度 10^8 CFU/ml の場合、全ての電流値において遺伝子が抽出された。これに対して、菌濃度を一桁下げて 10^7 CFU/ml としたときは、100, 200 mA では確認されず、300 mA のみで確認された。さらに

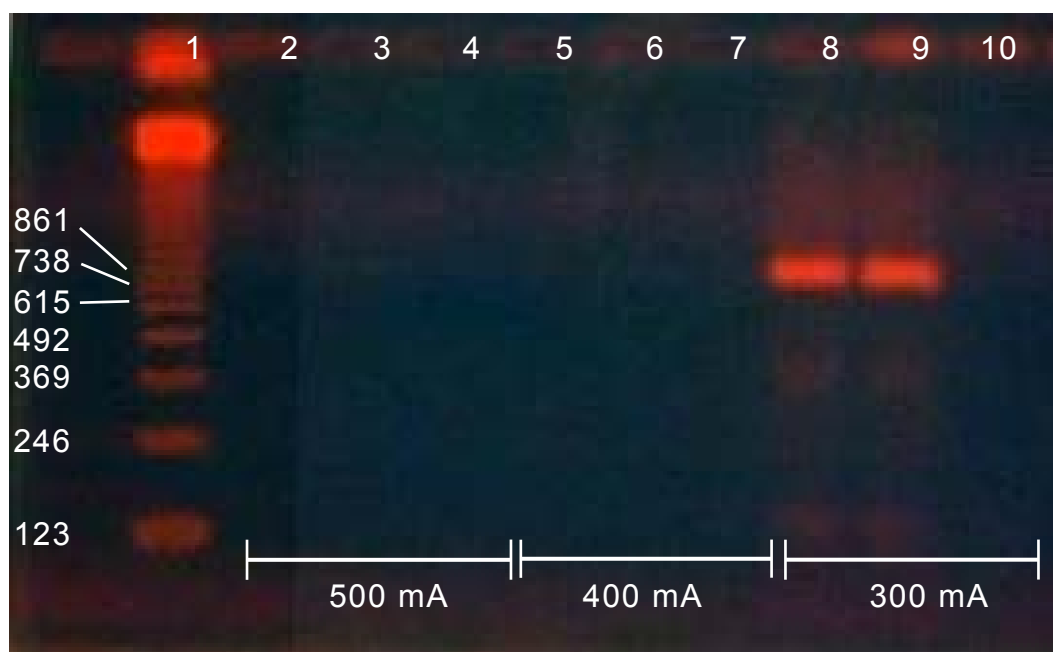


Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; DC 300 mA, 6~9; DC 200 mA, 10~13; DC 100 mA, 14~17; 0 mA, 2, 6, 10 and 14; 10^8 CFU/ml, 3, 7, 11 and 15; 10^7 CFU/ml, 4, 8, 12 and 16; 10^6 CFU/ml, 5, 9, 13 and 17; 10^5 CFU/ml

図 4-10 大腸菌 O157 からの VT1 遺伝子の抽出

菌濃度を 10^6 CFU/ml に下げると、全ての電流値で確認できない結果となった。

以上の結果から、導電性中空糸膜に通電を行うことで、膜に捕捉された細菌の遺伝子を抽出できることがはじめて明らかになった。また、遺伝子の増幅で使用した PCR は、抽出された遺伝子を鋳型として新たな遺伝子を合成することから、抽出された遺伝子は比較的断裂せずある程度原形を保っているものと考えられる。さらに抽出感度には電流値依存性が見られ、ここでは、電流値が大きいほど、膜に捕捉された菌数が少なくても遺伝子の抽出が行えた。この知見は、従来に行われた導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果が電流値に依存するという結果と非常に類似しており、この全く新しい遺伝子抽出法は、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に基づくことは明らかである。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~4; DC 500 mA, 5~7; DC 400 mA, 8~10; DC 300 mA, 2, 5 and 8; 10^8 CFU/ml, 3, 6 and 9; 10^7 CFU/ml, 4, 7 and 10; 10^6 CFU/ml

図 4-11 遺伝子抽出に対する電流値の依存性

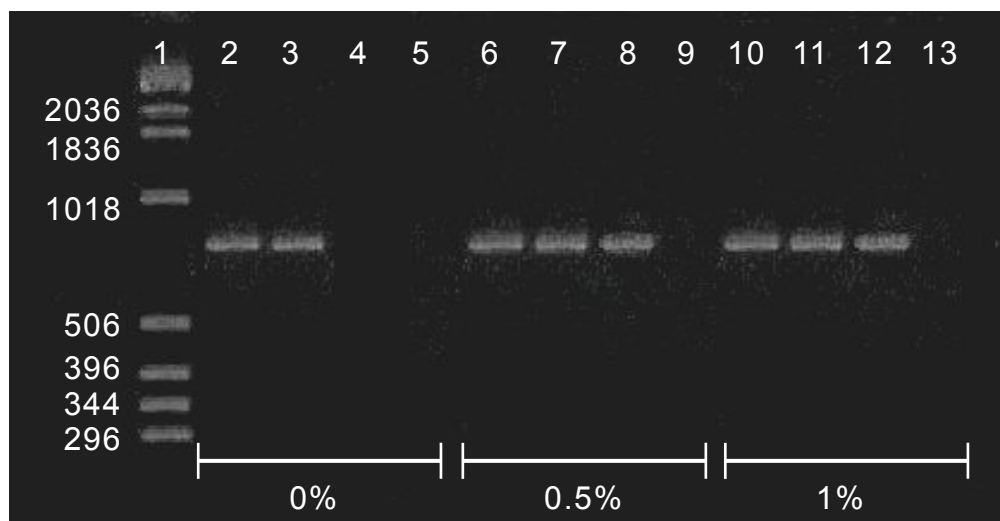
次に、遺伝子の抽出感度は電流値が大きいほど高い傾向となったため、通電電流値を 400 mA および 500 mA に上げて同様に遺伝子抽出を試みた。菌濃度 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml について、それぞれ抽出操作を行ったが、図 4-11 に示すように、400 および 500 mA 通電では遺伝子バンドが全く現れなかった。このため、遺伝子を比較的効率良く抽出できる電流値は、約 300 mA であることがわかった。

4.5.2 SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を利用した遺伝子抽出

細菌の細胞膜を軟化させる陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を大腸菌 O157 懸濁液に添加することで、遺伝子抽出の感度向上をさらに図った。

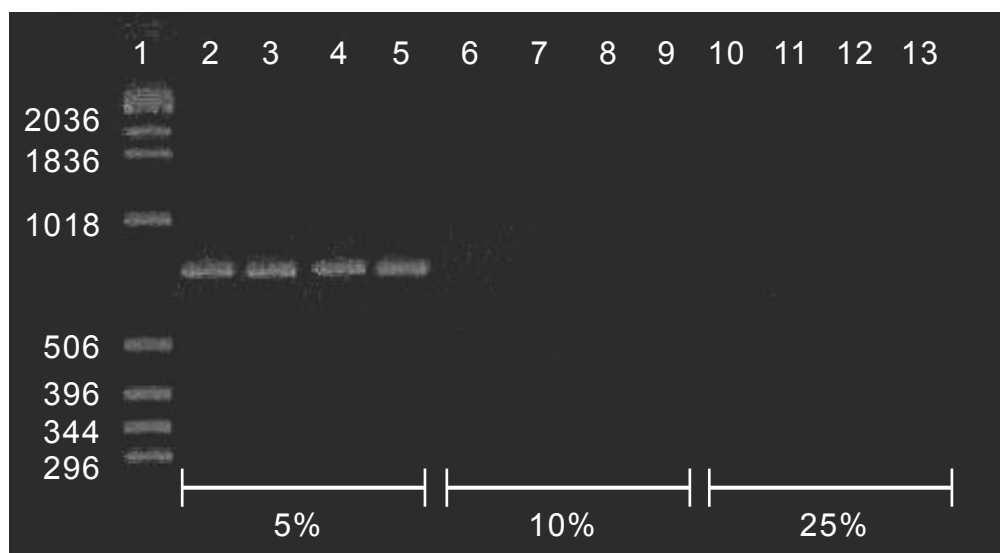
まず、0.5, 1, 5, 10, 25%の濃度の SDS 溶液を用意した。次に、大腸菌 O157 懸濁液 3 ml に、任意の濃度の SDS 溶液を 1 ml 加えた。この SDS 溶液の添加後は、先と全く同様に遺伝子抽出操作を行った。ただし、通電電流値は前項の結果から 300 mA とした。

図 4-12 および図 4-13 に示すように、SDS 溶液を添加しなかったもの (0%) と比較すると、無添加時の抽出限界は 10^7 CFU/ml であったが、SDS 濃度 0.5% および 1% の溶液を加えた場合、 10^6 CFU/ml まで向上した。さらに濃度を上げて 5% の SDS 溶液を使用すると、 10^5 CFU/ml まで抽出可能となった。これに対して、SDS 溶液の濃度を 10, 25% としたとき、その効果は認められず、むしろ逆に抽出感度が低下した。また、図 4-14 は通電を行わず、吸引のみ行ったときの結果である。この図のように、SDS が加えられた大腸菌 O157 懸濁液の場合、未通電でも遺伝子が抽出された。最も低濃度の大腸菌 O157 懸濁液 (10^7 CFU/ml) から標的遺伝子が抽出された SDS 濃度は、1% および 5% であった。この結果から、SDS は明らかに遺伝子の抽出を促進することが示された。



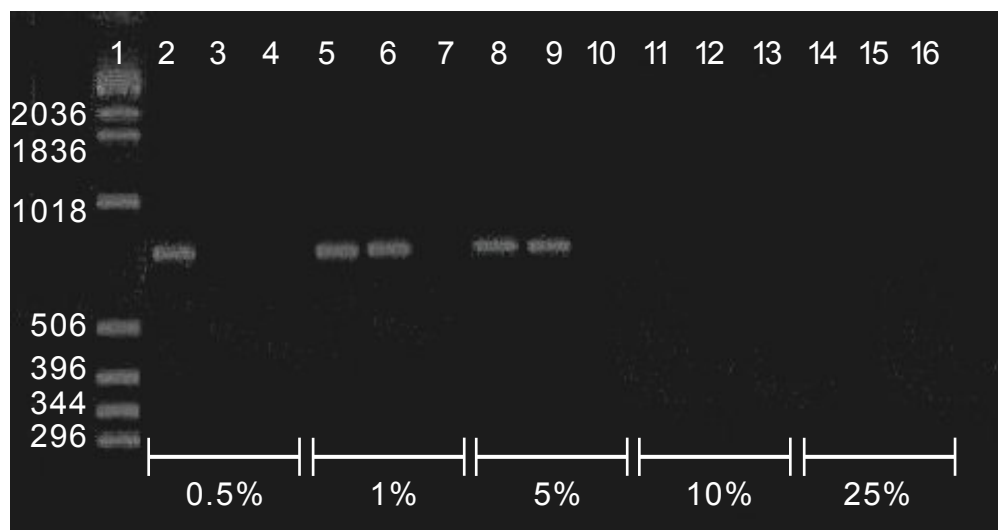
Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 0% SDS, 6 ~9; 0.5% SDS, 10~13; 1% SDS, 2, 6 and 10; 10^8 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^7 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^6 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^5 CFU/ml. (DC 300 mA)

図 4-12 SDS を用いたときの VT1 遺伝子の抽出 (0~1% SDS)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 5% SDS, 6 ~9; 10% SDS, 10~13; 25% SDS, 2, 6 and 10; 10^8 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^7 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^6 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^5 CFU/ml. (DC 300 mA)

図 4-13 SDS を用いたときの VT1 遺伝子の抽出 (5~25% SDS)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~4; 0.5% SDS, 5~7; 1% SDS, 8~10; 5% SDS, 11~13; 10% SDS, 14~16; 25% SDS,2, 5, 8, 11 and 14; 10^8 CFU/ml, 3, 6, 9, 12 and 15; 10^7 CFU/ml, 4, 7, 10, 13 and 16; 10^6 CFU/ml. (0 mA)

図 4-14 SDS を用いた未通電時の抽出結果

以上のように、5%の SDS 溶液を大腸菌 O157 懸濁液に添加することで、 10^5 CFU/ml まで抽出可能となり、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法の抽出感度をさらに 100 倍向上させることに成功した。

4.5.3 抽出サンプルの純度

上述の遺伝子抽出法によって得られたサンプルの純度は、吸光度によって知ることができる。核酸（遺伝子）、タンパク質の特異吸収波長である 260 nm と 280 nm で吸光度を測定し、260 nm 時の吸光度 (A_{260}) が 280 nm 時の吸光度 (A_{280}) の 1.8 倍未満 ($A_{260}/A_{280} < 1.8$) であるとき、サンプル中にはタンパク質などの遺伝子以外のものが多く含まれていることを意味する [41]。

そこで最も感度の優れていた 5% SDS, 300 mA の条件で抽出されたサンプルが、どの程度の純度を有しているのかをこの方法によって検討した。また比較のため 100, 200, 400, 500 mA 通電時の吸光度も測定した。結

果を表 4-4 に示す. 260 nm による吸光度測定はサンプル中の遺伝子含有量を表しており, 100 から 300 mA までは, 電流値が増すにつれて遺伝子の抽出量は多くなることがわかった. したがって 100~300 mA 通電の間で, 300 mA 通電が最も高感度であることが理解できる. また, 400, 500 mA 通電では, 遺伝子の抽出量が若干の増加しか認められないのに対して, タンパク質の抽出量はそれ以上の割合で増していた. そのため, サンプル純度の指標 A_{260}/A_{280} が 1.8 未満となり, 純度の低下が認められた. また, 300 mA 通電までは 1.8 以上であり, 純度が高いとされる値が得られた. したがって, 5% SDS, 300 mA の条件で遺伝子抽出を行った場合, 抽出感度が最も高く, さらに多量に高純度の遺伝子サンプルが得られることが示された.

表 4-4 抽出サンプルの吸光度

電流値 (mA)	吸光度		A_{260}/A_{280}
	260 nm (A_{260})	280 nm (A_{280})	
100	0.083	0.042	1.98
200	0.208	0.113	1.84
300	0.470	0.250	1.80
400	0.473	0.267	1.77
500	0.476	0.275	1.73

SDS 濃度 ; 5%, 菌濃度 ; 10^8 CFU/ml

4.5.4 他細菌が混合された試料からの遺伝子抽出

実際の糞便 1g 中には細菌が 10^{11} 個程度と非常に多く存在することから [20], 次いで糞便試料を模擬した混合試料からの遺伝子抽出を試み, その有効性を確かめた. ここでは, 常に糞便中に含まれている細菌として非病原性大腸菌を用いた. 通常の微生物感染症の診断では, 糞便は 10 倍に希釈されるため, 実際の細菌濃度は 10^{10} 個/ml となる. よって, 10^{10} , 10^9 , 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml と, 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml

表 4-5 混合試料からの VT1 遺伝子の抽出

通電電流値：300 mA, SDS 濃度：5 %

大腸菌 O157 (CFU/ml)	非病原性大腸菌 (CFU/ml)		
	10 ¹⁰	10 ⁹	10 ⁸
10 ⁸	— *	— *	+
10 ⁷	— *	— *	+
10 ⁶	— *	— *	—

+：抽出可，—：抽出不可

* 試料の吸引開始直後に目詰まりが発生

の大腸菌 O157 懸濁液 1.5 ml を全ての組み合わせで混合し，3 ml の混合試料を 9 種類用意した．その後，同じように抽出操作を行った．このときの電流値と SDS 濃度は，4.5.1 および 4.5.2 項の結果から，それぞれ 300 mA, 5% とした．

非病原性大腸菌懸濁液の菌濃度が 10¹⁰，10⁹ CFU/ml の場合，導電性中



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; O157-10⁸ CFU/ml, 3; O157-10⁷ CFU/ml, 4; O157-10⁶ CFU/ml. (AHU 1714-10⁸ CFU/ml, 300 mA, 5% SDS.)

図 4-15 混合試料からの遺伝子抽出

中空糸膜に捕捉される菌数が多すぎるため、吸引開始直後に目詰まりが起こり、混合試料を吸引できなくなることが多かった。すなわち、本システムにおいて遺伝子を抽出する際に必須である通電と蒸留水の吸引まで至らないことがほとんどであった。また、細菌の捕捉が行われたとしても、その後の蒸留水の吸引が不可能であった。そのため表 4-5 には、VT1 遺伝子が抽出されなかった“－”の記号で表記した。しかし、 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液が混合された試料では、目詰まりの発生がなく、図 4-15 に示すように 10^8 または 10^7 CFU/ml の大腸菌 O157 懸濁液を混ぜた試料から遺伝子が抽出された。大腸菌 O157 の単独試料の結果より、抽出感度は劣るものの、混合サンプルからも標的遺伝子を抽出できた。

4.5.5 糞便試料からの遺伝子抽出

導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、大腸菌 O157 の単独試料、さらに混合試料からの遺伝子抽出が可能であったことから、次に本章の最終的な目的である糞便からの遺伝子の直接抽出を行った。前述のように大腸菌 O157 が接種された糞便試料 3 ml 中に導電性中空糸膜モジュールを入れ、同様に吸引を開始した。しかし、混合試料でも見られたように、吸引直後、糞便由来細菌や固形分によって導電性中空糸膜に目詰まりが発生し、試料の吸引自体ができなくなった。その結果、VT1 遺伝子の抽出まで至らな

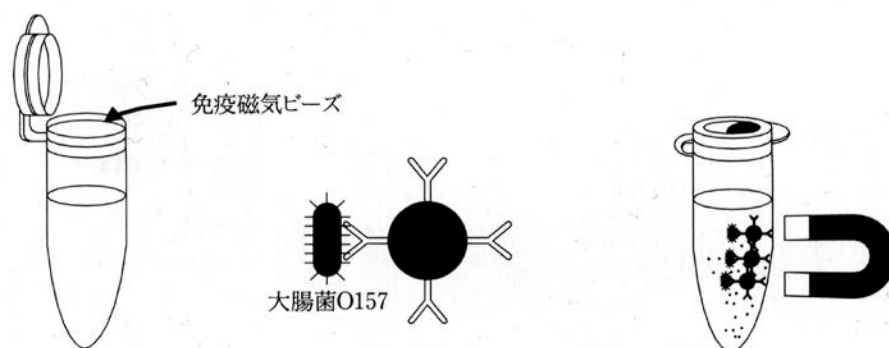
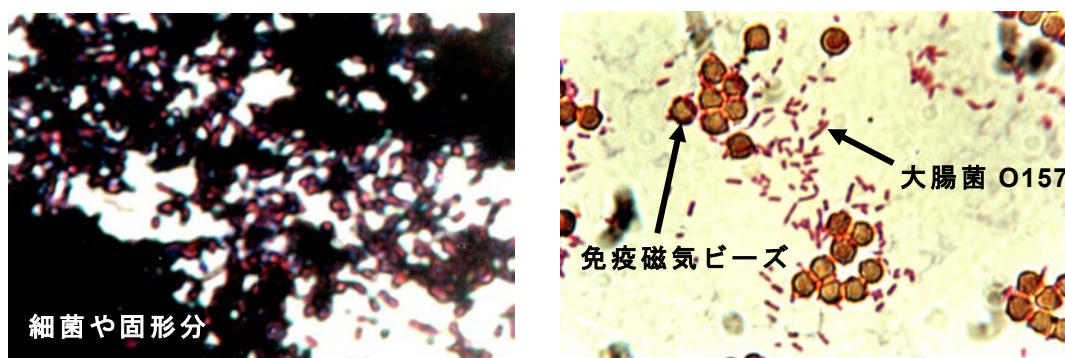


図 4-16 免疫磁気分離の原理



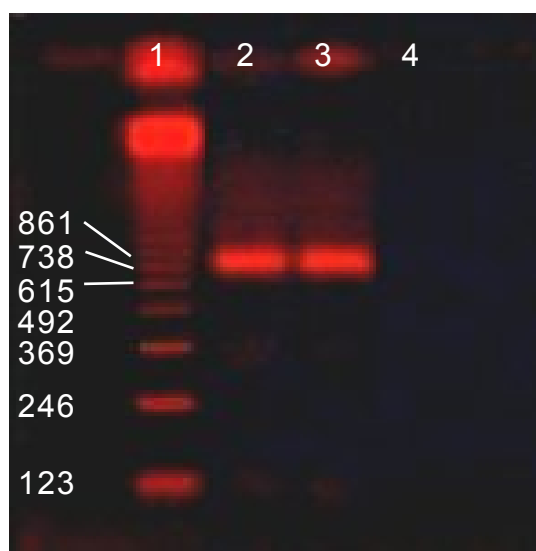
(a) 処理前

(b) 処理後

図 4-17 免疫磁気分離前後の糞便試料

かった．そこで，前処理として，糞便試料から大腸菌 O157 を特異的に分離することができる免疫磁気分離（免疫磁気ビーズ；VERITAS 社）^[33]を行った．

免疫磁気分離の概略を図 4-16 に示す．免疫磁気ビーズは，大腸菌 O157 と特異的に結合する抗 O157 抗体が被覆されている金属（酸化鉄）微粒子である．まず，この免疫磁気ビーズを糞便試料に添加し，混和する．その後，抗原抗体反応により大腸菌 O157 のみが免疫磁気ビーズに捕捉される．反応が終了



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^8 CFU, 3; 10^7 CFU, 4; 10^6 CFU. (300 mA, 5% SDS.)

図 4-18 免疫磁気分離を利用した糞便試料からの遺伝子抽出

した後、磁石を近づけ大腸菌 O157 と免疫磁気ビーズの複合体を集める。この状態で、糞便中の細菌や固形分などの大腸菌 O157 (免疫磁気ビーズ) 以外のものを全て取り除く。実際には、糞便試料 1 ml に対して免疫磁気ビーズを VERITAS 社の推奨する 20 μ l だけ添加し、以上の抗原抗体反応、免疫磁気ビーズの回収を、それぞれ 10 分ずつ行い、糞便試料から大腸菌 O157 のみを分離した。このように分離されたものに生理食塩水 3 ml を加え、これまでと同様に 5% SDS 溶液を 1 ml 入れ、吸引した後、再び蒸留水の吸引と同時に 300 mA 通電を行った。このような前処理を行うことで、図 4-17 のように糞便中の細菌や固形分は取り除かれ、 10^7 CFU の大腸菌 O157 が含まれていれば、糞便試料からでも標的遺伝子の抽出が可能であることが示された (図 4-18)。

4.6 検討

導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は、電流通電による殺菌に基づく従来にはなかった画期的な手法といえる。本節では、この抽出法の原理等を述べ、さらに従来 of 化学的抽出法と対比し、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法の有効性を明らかにする。

4.6.1 電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出の機構

導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法の感度には、電流値依存性が見られた。この知見は、当研究室で検討されてきた導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果が、電流値に依存するという結果 [21], [55]-[57] と類似している。このことから、この全く新しい遺伝子抽出法は、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法と密接に関連していることは明らかである。従来 of 電流通電による殺菌の機構は、次のように考えられている。まずポンプの吸引によって細菌が捕捉される過程で、細菌は導電性中空糸膜の金属層に接触し、細胞膜の一部に微小な物理的破壊が生じる。この局所的な細胞膜破壊を起こした部分は他の損傷のない部分よりも電気抵抗が低くなり、細菌に流れる電流はその部位に集中する。直流電流の場合には一方向に電流が流れ続けるため、また、吸引ポンプによる機械的な圧力のため細胞膜の自己修復機能 [66], [67] が十分に働かず、細胞膜破壊が進むとされている。そのため、細菌は形状を維持できなくなり殺菌される。

本手法は、以上のような機構が考えられている殺菌法を応用した画期的な遺伝子抽出法である。すなわち、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出の機構は、通電によって細胞膜破壊（殺菌）が生じ、さらに吸引圧力が加わることによって一段と細胞膜破壊が加速され、その結果、細胞外に遺伝子が漏出する。

また、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に関して、これまでに得られた多くの知見に、ある共通点が見られた。その共通点とは、菌種を問わず、通電電流値が大きいほど殺菌される菌数は多くなることである

[21]. [55]-[57]. 本研究でも、同じように 100, 200 mA より 300 mA の方が、より多くの細菌の細胞膜が破壊され、それに伴って遺伝子の漏出量が増加した。しかし、300 mA より大きな 400, 500 mA では、4.5.3 項の結果からわかるように 300 mA 通電時と同様の遺伝子量が含まれているにもかかわらず遺伝子バンドが確認されなかった。これは、400, 500 mA では PCR 増幅が行われなかったことを意味している。つまり、何らかの原因によって遺伝子が断裂されたものと考えられ、その要因は、膜に通電した電流値が大き過ぎたために細胞膜のみならず、細胞内成分である遺伝子までもが物理的に破壊された可能性が高い。

ここまでは電流の効果を主に考えてきたが、もう一つの因子である吸引圧力の効果について次に検討する。検討に先立って、導電性中空糸膜のような微細孔を細菌などの有形物質が通過する場合、その濃度によって粘性が変化し、それに伴って吸引圧力に変化が生じることが予想された。そこで、本抽出システムにおける吸引時の圧力変化を調べた。その結果、図 4-9 に示したように最大吸引圧力は 210~280 mmHg であった。しかし、この図からでは菌濃度や通電の有無による圧力上昇などの傾向を捕らえることはできなかった。これは 4.3.3 項で述べた通り、導電性中空糸膜を実験用として 2 cm ずつ使用しており、それぞれの膜で通電用リード線をハンダ付けする際などに微妙に構造の違いが生じる可能性があり、この違いが強く現れた結果ではないかと推測される。また、前述の実験は、それぞれ別々のモジュール化された導電性中空糸膜を使って数回ずつ行ったが、全てにおいて同じ結果が得られていることから、210~280 mmHg の吸引圧力の変化は、抽出感度に大きく影響していない。ただし、この程度の吸引圧力自体は、直接細胞膜破壊を誘発するものではないが、通電などによって局所的な破壊が発生した細胞膜には有効に作用する。このことは、SDS 無添加時の未通電では遺伝子が抽出されず、5% SDS が添加されたときのように細胞膜構造が乱された場合には、その吸引圧力だけでも菌濃度 10^8 , 10^7 CFU/ml において遺伝子の抽出が確認されていることから裏付けら

れる．すなわち，ポンプによる吸引圧力は局所的な細胞膜破壊を一層促進させる働きを担っていると言える．したがって，抽出感度は主に通電によって細胞膜が破壊された菌数に大きく影響するものと考えられる．

4.6.2 SDS の効果 [19], [43], [68], [69]

抽出感度の向上を目指して，陰イオン界面活性剤である SDS 溶液を単独試料に添加したところ，添加していないものより 1/100 の菌濃度（ 10^5 CFU/ml）まで検出が可能となった．これは，SDS が以下のように細菌に作用したためと推測される．

細菌の細胞膜をはじめとする生体膜は，タンパク質と脂質から成る．それらの割合は細胞によって異なり，大腸菌ではタンパク質が 75% (wt/wt)，リン脂質が 25% である [19]．それらには，疎水性部位（非極性部位）と親水性部位（極性部位）があり，図 4-19 のように親水部位を外側に向けた二重層構造をとる．隣接するリン脂質は，互いのリン脂質分子の炭化水素鎖が van der Waals 力によって，また膜内タンパク質とリン脂質は，膜内タンパク質の疎水部位とリン脂質の疎水部位とが互いに結合し合う疎水力（疎水効果）で強く結合されている．しかし，界面活性剤も疎水性部位と親水性部位を持つ両親媒性分子で，特に疎水性部位はリン脂質の炭化水素鎖に親和性があるため，界面活性剤が存在すると，界面活性剤分子はリン脂質二重層に入り込む．また膜内タンパク質の疎水性部位と界面活性剤分子の疎水性部位が疎水力によっても結合する．さらに SDS のような陰イ

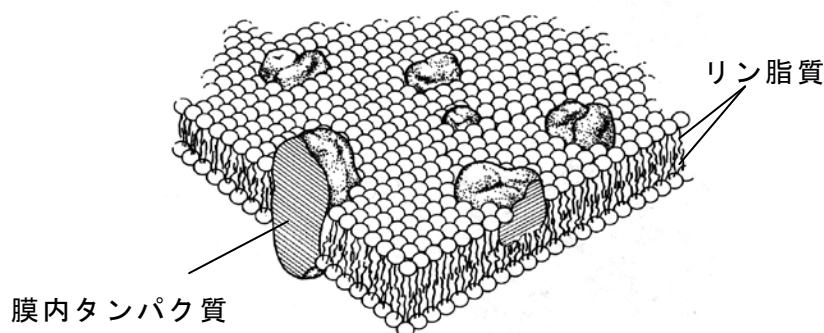


図 4-19 生体膜モデル

オン界面活性剤は、その電荷のためタンパク質内のイオン結合や水素結合を切断する働きがある [68]。このように界面活性剤は、リン脂質二重層の中に入り込むため膜構造が維持できなくなり、リン脂質と膜内タンパク質を可溶化させる。このため、膜の透過性が増し、細胞内成分の漏出を引き起こすとされている [43], [69]。このような SDS の作用に加えて、さらにポンプによる吸引圧力が細胞膜に加わり、膜破壊が一段と促進されたものと考えられる。また界面活性剤は、濃度が増すにしたがって大きく作用するため [69]、低濃度の SDS 溶液 (0.5, 1%) を加えたものより、濃度の高い 5% SDS 溶液を添加した方が、遺伝子の抽出感度が優れていた。しかし、5% SDS 溶液よりさらに効果的に作用すると考えられる 10, 25% SDS 溶液添加において、遺伝子バンドが確認されなかった。これは PCR によって遺伝子断片が増幅されなかったことを示している。PCR は、4.4.2 項で述べたように非常に少量の特定遺伝子 (DNA) 断片を化学的に合成・増幅させるものであり、反応環境下にタンパク質や脂質等が高濃度に存在すると反応阻害を引き起こすことが知られている [38]。したがって、細胞膜に大きく作用する高濃度の SDS 溶液添加時には、遺伝子以外に多量の膜タンパク質も同時に抽出され、その混入により PCR 増幅が困難になったものと考えられる。

4.6.3 従来の化学的抽出法との比較

生物材料から遺伝子を抽出する際、現在最も多く用いられている化学的抽出法と、導電性中空糸膜による遺伝子抽出法を比較することで、本手法の有効性を明確にする。ただし、本研究で用いた免疫磁気分離は、化学的抽出法においてもよく用いられる。これは、その中で使用される試薬の効果が、糞便によって損なわれるためである。また、免疫磁気分離を利用しない場合にも、一度必ず分離培養によって糞便の中から菌を分離しなくてはならない。したがって、ここでは同じ工程である免疫磁気分離工程は比較の対象としない。

化学的抽出法の中で最も単純なインスタジーンマトリックス (BIO-RAD 社) を用いた抽出法と、導電性中空糸膜を利用した抽出法の工程および所要時間を図 4-20 に示す。まず、抽出工程について見ると、インスタジーン法は、遠心による集菌から始まり、インスタジーンマトリックス添加後のインキュベーション、攪拌、さらに 2 回目のインキュベーション、攪拌、最後に遠心による遺伝子の分離というように多くの工程を必要とする。これに対して、本手法は SDS 溶液を添加して細胞膜を軟化させた後、細菌懸濁液を吸引することで導電性中空糸膜に菌を捕捉させ、その後、蒸留水を吸引すると同時に通電を行うだけで遺伝子の抽出が行われ、従来法に比べて非常に工程の少ない抽出法と言える。また所要時間に着目すると、インスタジーン法は 50~60 分を要すのに対し、本手法は 10 分程度で遺伝子の抽出が可能であり、化学的抽出法に比べると約 5 分の 1 の時間となる。大腸菌は、最も適した条件で約 20 分に一度細胞分裂を起こすことから [29]、この時間短縮は、体内に入り込んだ細菌の増殖数を一桁小さくすることができ、結果として症状の悪化を防ぐことにつながる。このように、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は簡便性・迅速性に優れた全く新しい画期的な手法であり、大腸菌 O157 をはじめとする様々な病原性細菌による感染症の早期診断に大きく寄与する。それによって、感染症を患った多くの人々の命を救うことが可能になる。さらに、従来法は夾雑物質の混入に対して細心の注意を払わなくてはならないが [19], [20]、導電性中空糸膜を用いた抽出法は、膜が濾過機能を有しているため、除タンパクなどの極めて優れた特性があること、抽出工程が少ないことから従来法に比べて夾雑物質の汚染が少ないという利点がある。また、遺伝子抽出には導電性中空糸膜の他に電流源とポンプといった装置が使われているため、人手をほとんど必要としない。このことから、今後、抽出工程の自動化が期待できる。

次いで、両者の遺伝子抽出感度を比較するが、まず感染症の診断には、実際にどの程度の感度が求められるのかを知る必要がある。ただし、病原

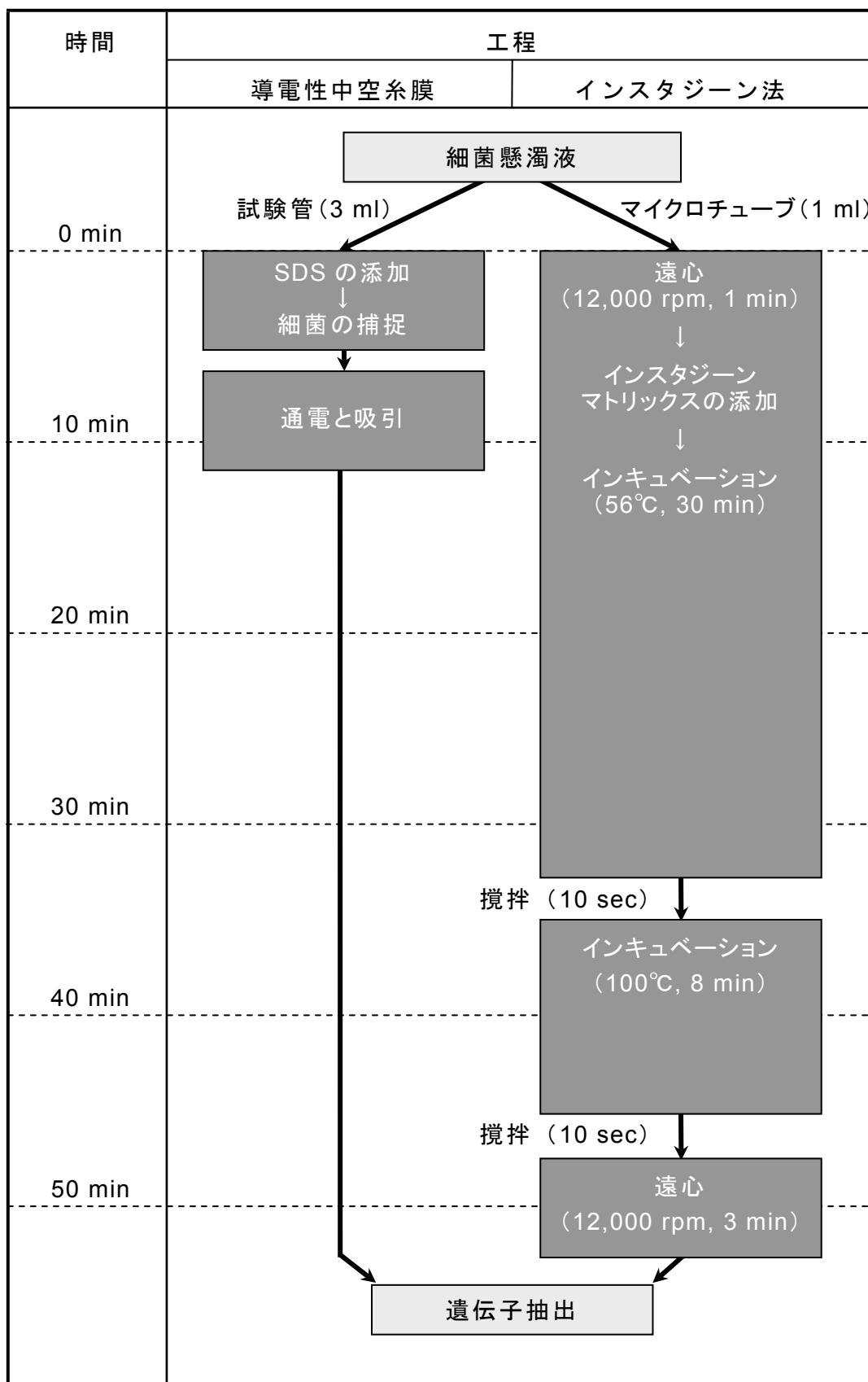


図 4-20 導電性中空糸膜を用いた抽出法とインスタジーン法の比較

性細菌による感染症の進行は、患者の年齢、体調、抵抗力などによって大きく異なる。また、発症後の糞便中には最低 10^5 個/g 程度の菌数が含まれているとされているが [70]、患者によってはそのときの症状と保菌数が伴わないことも多い。したがってここでは、現在、大腸菌 O157 の感染症の診断で用いられているラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法の感度を参考にする。

ラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法の感度は、表 4-6 に示すように、ともに 10^5 CFU/ml 程度である [33]。一方、電流通電による殺菌を応用した導電性中空糸膜による遺伝子抽出とインスタジーン法は、大腸菌 O157 単独試料において各々 10^5 , 10^4 CFU/ml であった。ラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法と比較すると、単独試料の場合、インスタジーン法はもとより、本手法も実用的レベルの感度を有していることがわかる。しかし、PCR 法の一工程を担っている遺伝子抽出としてインスタジーン法と比べると、一桁ほど劣っていることがわかる。ここで、抽出された遺伝子が含まれている溶液の総量と、そのうち PCR に使用された量について考える。抽出された遺伝子は、インスタジーン法の場合、抽出剤であるインスタジーンマトリックス 200 μ l 中に存在する。一方の導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出では、3 ml の蒸留水の中にある。PCR では、このうちの 5 μ l だけを用いて遺伝子増幅が行われる。これを考慮すると、同量の遺伝子が抽出されていても、実際に PCR に使用される遺伝子量が両者で異なることがわかる。すなわち、インスタジーン法では抽

表 4-6 主な診断法の検出感度

診断法	感度 (CFU/ml)
・ PCR 法	
インスタジーン	10^4
導電性中空糸膜	10^5
・ ラテックス凝集反応法	10^5
・ イムノクロマトグラフ法	10^5

出された遺伝子の 1/40, 本手法においてはそれよりもさらに一桁以上少ない 1/600 しか PCR に使用されなかった. このため, 単独試料でインスタジーン法より抽出感度が低下したのは, 主に PCR に使用された遺伝子量に起因する. 次に, 導電性中空糸膜のポアサイズと DNA (遺伝子) の長さについて考える. 導電性中空糸膜のポアサイズは前述のように 0.1 μm であり, それ以上の直径を持つ微粒子は膜に捕捉される. また, 導電性中空糸膜は, 一旦細菌などを捕捉すると, 確実にそのポアは塞がれ, 溶液やその中に含まれる物質の通過をさらに妨げる. その証拠として, 1 度目の細菌を捕捉する際の最大吸引圧力 (50~110 mmHg) と, 通電と同時に行われた 2 度目の吸引時の最大圧力 (210~280 mmHg) を比較すると, 後者の方が明らかに高かった. 一方, 大腸菌の DNA は約 4×10^6 bp のサイズである. 塩基間の距離は 0.34 nm であることから, これを長さに換算すると 1.36 mm になる. 通常 DNA は, 超らせん (supercoil) と呼ばれる DNA の 2 本鎖がさらにコイル状となって細胞内に格納されているため, 長さ 1.36 mm の大腸菌の DNA は直線的な状態では存在しないものの, 直径 1 μm 程度の超らせん DNA であることが調べられている [44]. インスタジーン法より感度が低下したのは, 主に PCR に使用された遺伝子量によるが, これらを考慮すると, 通電処理によって抽出された DNA が, 導電性中空糸膜のポアに捕捉された可能性も少なからず考えられた. そこで, PCR 増幅された約 500 bp の遺伝子 (線状 2 本鎖 DNA ; 長さ 0.18 μm) が入った溶液 3 ml を, 導電性中空糸膜を介して吸引し, 吸引前後の遺伝子量を比較することで, 導電性中空糸膜に遺伝子を通すだけで捕捉されるか否かを検討した. 核酸の特異吸収波長である 260 nm の紫外線によって吸引前後の溶液の吸光度を調べた結果, 吸引後 20%程度 (0.386 から 0.310 に) 減少していた. このため, 抽出された遺伝子が膜に捕捉されることも一つの要因として考えることができる.

他の細菌が含まれた混合試料および糞便試料からの遺伝子抽出は, 単独試料の場合よりも感度低下が認められた. 3 ml の混合試料は, 大腸菌 O157

懸濁液 1.5 ml と非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml を混合して作成しているため、大腸菌 O157 懸濁液そのものを 3 ml 使用した単独試料よりも菌数が半減している。このように、対象とする大腸菌 O157 の絶対量が半分に減少しているという事実は、明らかに感度低下を引き起こす一つの原因である。その他に、次の要因が挙げられる。まず蒸留水を最後まで吸引することができた混合試料 (10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液が混合された試料) について考えると、非病原性大腸菌の濃度は常に一定であるが、大腸菌 O157 の濃度は試料によって異なる。混合した大腸菌 O157 懸濁液の濃度が 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml の場合、その占める割合はそれぞれ 1/2, 1/10, 1/100 となる。これらの割合は、導電性中空糸膜に捕捉されたときも同様であり、単独試料では大腸菌 O157 の占める有効膜面積が 100%であったものが、非病原性大腸菌が存在するため同じように減少する。したがって、全ての大腸菌 O157 が電流の作用を受けなくなり、VT1 遺伝子の抽出量の低下につながった可能性がある。

糞便に大腸菌 O157 を混ぜた糞便試料では、原理的に糞便試料から大腸菌 O157 のみを特異的に分離することができる免疫磁気分離を利用しても、 10^7 CFU/ml の濃度の試料までしか遺伝子は抽出されなかった。これは、混合試料と同じように、 10^7 CFU/ml の糞便試料 1 ml を用いて免疫磁気分離を行った後、3 ml の生理食塩水で再浮遊されたものを使用しているため、単独試料と比べて大腸菌 O157 の絶対量が 1/3 に減少したことが一要因である。またもう一つの原因として、免疫磁気分離工程における大腸菌 O157 の損失がある。免疫磁気分離前後の菌数を調べてみると、処理後の菌数はおよそ 1/10 に減少していた。これは、免疫磁気ビーズが大腸菌 O157 を特異的に捕捉するものではあるが、その全てを捕捉できなかったことや、大腸菌 O157 以外の細菌や固形分を取り除く際に、多少の菌数の損失などが考えられる。この他に、免疫磁気分離後の試料には、免疫磁気ビーズ（直径 2.8 μm ）も含まれており、混合試料のときと同様にそれが導電性中空糸膜に捕捉され、結果的に電流の作用を受ける大腸菌 O157 の数が減ったも

のと推測される。

以上の検討より，導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出は，従来の化学的抽出法に比べて操作が簡単であり，さらにほとんど人手を必要としないことから自動化の可能性を有している。これは従来にはなかった画期的な抽出法である。ただし，目的以外のものが混入した場合，感度低下が認められたことから，その改善が必要とされる。したがって，次の第5章では，遺伝子抽出における導電性中空糸膜の利用法を別の角度からとらえ，さらなる感度の向上を目指した。

第 5 章

電界効果を利用した導電性中空糸膜による 大腸菌 O157 の遺伝子抽出

前章の結果から，導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用することで，細菌の遺伝子を抽出できることが確認された．しかし，目的以外の細菌などが混入した場合，抽出感度の低下が認められた．そこで本章では，導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出において，膜の利用法を別の角度からとらえ，また負の電荷を有する遺伝子の電氣的性質を利用し，さらなる感度向上を目指した．

5.1 実験方法

導電性中空糸膜の電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、大腸菌 O157 単独試料において、現在の診断で用いられているラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法と同程度の感度を有していた。しかし、他の細菌が混ざった混合試料や糞便試料の場合には、遺伝子の抽出感度の低下が確認された。本章では導電性中空糸膜を殺菌基材として使用せず、核酸（遺伝子）のリン酸基が中性 pH の溶液中で負に帯電するという電気的性質を考慮して、導電性中空糸膜を陰電極として用いることで、膜内の遺伝子を電界効果によって取り出すという全く別の角度からの利用法を考えた。さらに前章で述べたように、抽出された遺伝子量に対して PCR (polymerase chain reaction) に使用される量が少ないことも感度低下の一要因であったため、抽出された遺伝子の密度を高めること（以後、遺伝子の濃縮と呼ぶ）も試みた。以下に、それらの手順について述べる。

5.1.1 電界効果を利用した遺伝子の抽出法

まず大腸菌 O157 を導電性中空糸膜に捕捉させるため、大腸菌 O157 の入った試料 4 ml のうち 3 ml を吸引した。第4章では、試料 3 ml を残さず最後まで吸引することで細菌を捕捉していたが、この方法では吸引後、導電性中空糸膜の内部圧力が極端に陰圧となっていた。この状態で、後に続く細胞膜破壊を行った場合、その圧力によって遺伝子が導電性中空糸膜の奥（内部）に入り込み、抽出されにくくなることが考えられた。そこで試料を 1 ml 増やして 4 ml とし、そのうちの 3 ml を無理なく吸引（圧力調製）することで、最終的に膜内外の圧力差を極力抑えるようにした。吸引後、細胞溶解液（1% SDS と 10 mM NaOH の混合溶液）に 10 秒間浸し、膜に捕捉された大腸菌 O157 の細胞膜を化学的に破壊した。以後、この操作をアルカリ法^[71]という。細胞膜を溶解した後、図 5-1 に示すように、陽極領域が緩衝液（TAE buffer ; 0.48% Tris, 0.07% EDTA, 1.14% 酢酸）で満たされたセルを用いて、導電性中空糸膜が陰極になるように電界を印

加し、同時に捕捉の際に膜を介して吸引された溶液 1.5 ml を膜の内側から外側に押し出すことで、負に帯電する遺伝子を電氣的、物理的に抽出した。ただし電界強度は 1, 2, 4 V/cm, 印加時間は 5, 10, 15 分のいずれかを選択した。以上の操作によって導電性中空糸膜から抽出された遺伝子は、陰極領域と陽極領域の間に半透膜が存在するため、陰極領域のみに存在する。ここでは、遺伝子が含まれている陰極領域中の溶液約 1.5 ml のうち 5 μ l を用い、4.4.2 項で述べた PCR 条件、およびプライマーによって遺伝子を増幅した。その後、ゲル電気泳動・染色を第 4 章と全く同じように行い、遺伝子抽出の有無を視覚的に確認した。

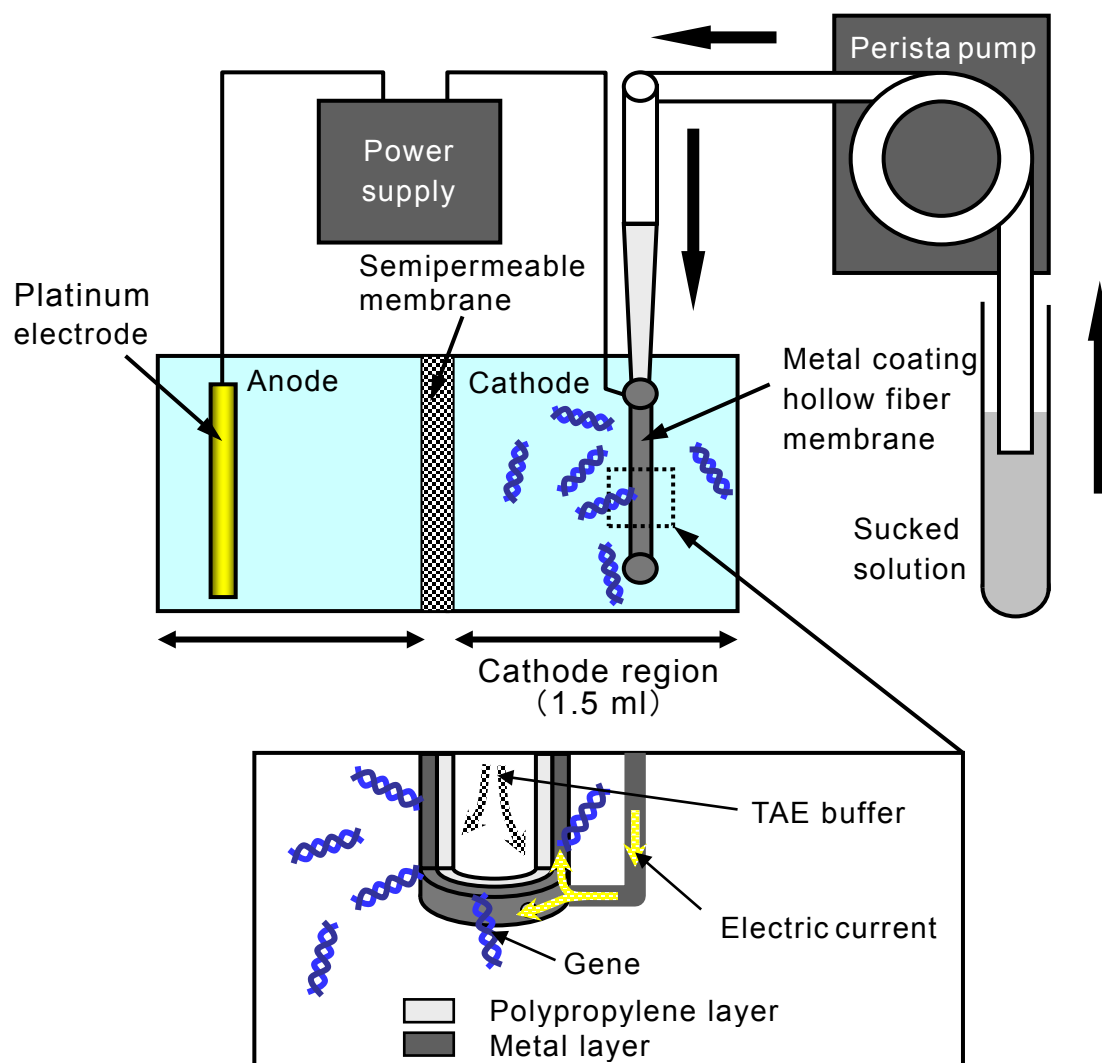


図 5-1 電界効果を利用した遺伝子抽出の概略

以上のように、導電性中空糸膜に大腸菌 O157 を捕捉した後、膜を介して吸引された溶液を逆に膜の内側から外側へ押し出し、同時に電界を印加することで遺伝子を溶液中に抽出した。そのため、本章の単独試料および糞便試料は、全て電気泳動用緩衝液 (TAE buffer) で洗浄、希釈したものをを用い、電界印加によって溶液の pH が極力変化しないようにした。

5.1.2 遺伝子の濃縮法

4.6.3 項で述べたように、PCR に使用されるサンプル量はわずか 5 μ l である。すなわち、前項の操作によって遺伝子は 1.5 ml 中に抽出されるが、そのうちの 0.3% 程度 (1/300) しか使われないことになる。そこで、遺伝子の抽出後、新たに以下のような遺伝子濃縮操作を付加することで、感度の向上を目指した。

図 5-2 に示すように、半透膜で 3 つの領域に仕切られたセルの抽出領域 (中央) において、同様に強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで遺伝子抽出を行った。ただし、中央の領域には、グリセリンが 1% 添加さ

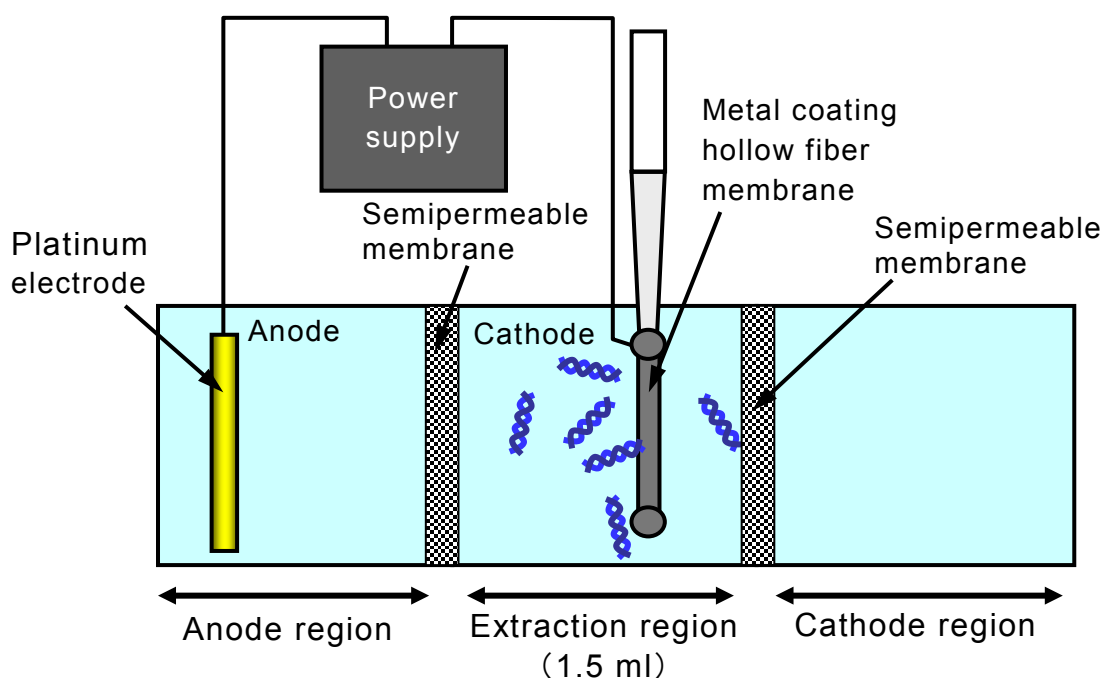


図 5-2 遺伝子抽出の概略

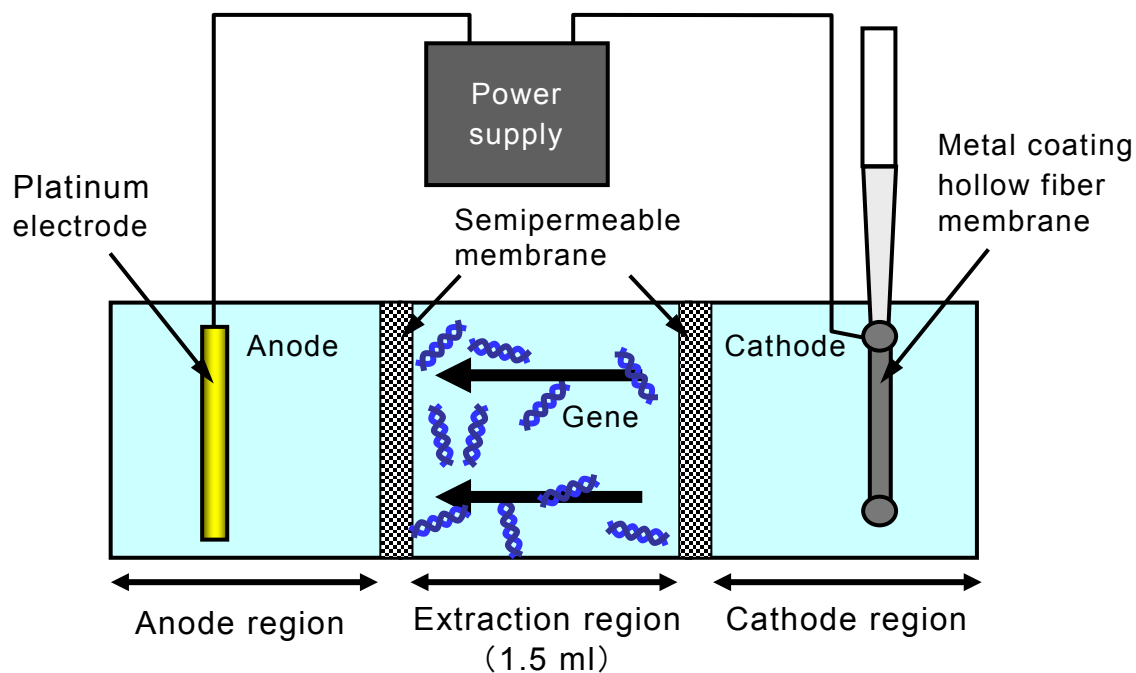


図 5-3 遺伝子濃縮の概略

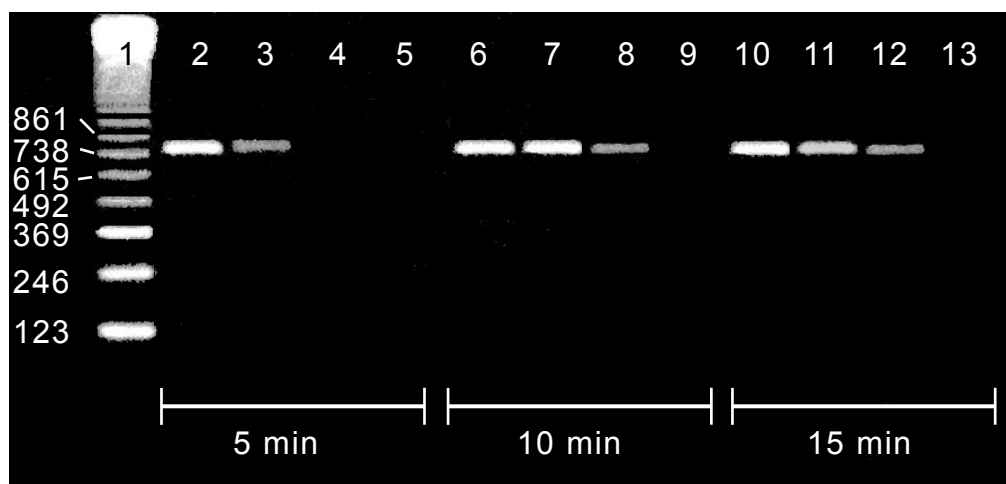
れた電気泳動用緩衝液 (1.5 ml) を用いたため、溶液を押し出す物理的な抽出操作は行わなかった。その後、図 5-3 のように導電性中空糸膜を陰極領域に移し、これを陰極、白金線を陽極として、強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加した。この操作によって、中央の領域に存在する遺伝子は電界の影響を受け、原理的に陽極側の半透膜近傍に濃縮される。最後に、半透膜の近傍から溶液 5 μ l を採取し、これを抽出サンプルとして分析を行った。

5.2 実験結果

負の電荷を有する遺伝子の電氣的性質を考慮し、これまでとは全く異なった発想のもとに、導電性中空糸膜を用いた新たな遺伝子抽出の可能性を検討した。従来の導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出は、大腸菌 O157 単独試料において 10^5 CFU/ml, 混合試料および糞便試料では 10^7 CFU/ml の抽出感度であった。この電界効果を利用した新たな遺伝子抽出法は、これらの抽出感度よりも優れているかどうか、また抽出後の遺伝子濃縮が有効であるか否かを以下に示す。

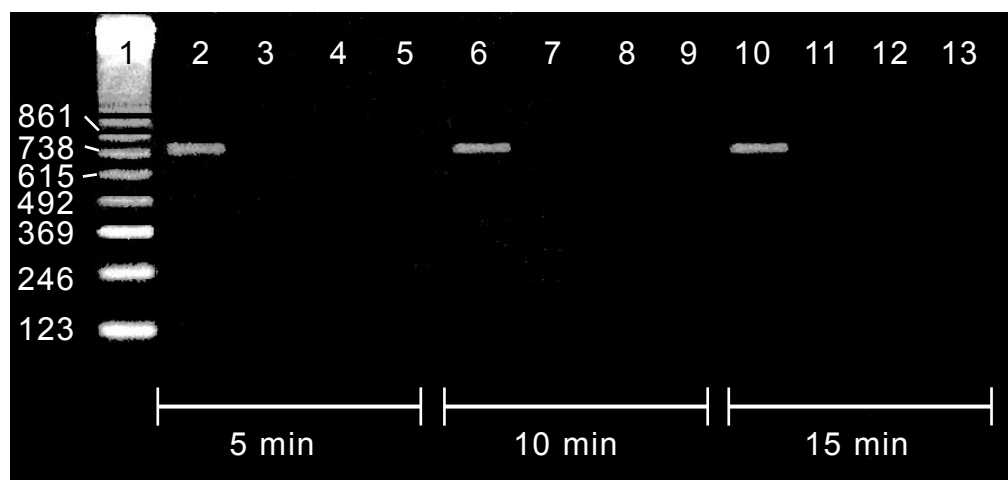
5.2.1 電界効果を利用した単独試料からの遺伝子抽出

最初に、電気泳動用の緩衝液で洗浄、希釈された単独試料を用いて 5.1.1 項のように大腸菌 O157 を捕捉し、アルカリ法によって細胞膜を溶解した後、膜を陰電極として電界を印加することで、VT1 遺伝子を導電性中空糸膜から取り出せるかどうか基礎的な検討を行った。結果を図 5-4 および図 5-5 に示す。



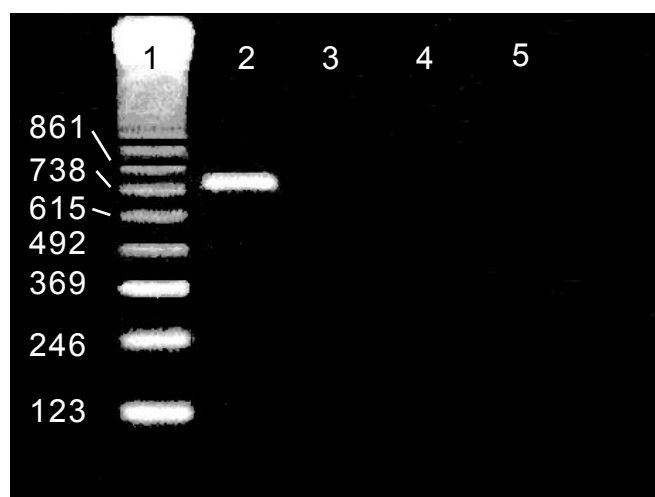
Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 5 min, 6~9; 10 min, 10~13; 15min, 2, 6 and 10; 10^6 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^5 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^4 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^3 CFU/ml.

図 5-4 単独試料からの遺伝子抽出 (2 V/cm)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 5 min, 6~9; 10 min, 10~13; 15min, 2, 6 and 10; 10^6 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^5 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^4 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^3 CFU/ml.

図 5-5 単独試料からの遺伝子抽出 (4 V/cm)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml, 5; 10^3 CFU/ml. (10 min)

図 5-6 単独試料からの遺伝子抽出 (1 V/cm)

強度 2 V/cm の電界を印加した場合、図 5-4 のように印加時間 5 分で 4×10^5 , 10^6 CFU/ml の大腸菌 O157 単独試料を吸引したのから遺伝子バンドが認められた。これまでと全く同じ条件、プライマーによって VT1 遺伝子の 774 bp の部位を増幅していることから、確認された遺伝子バンドは VT1 の遺伝子断片であることがわかる。さらに印加時間を 10 分および 15 分とすると 4×10^4 CFU/ml においても遺伝子バンドが認められ、印加時間と遺伝子の抽出効率に相関性が見られた。次に図 5-5 の電界強度 4 V/cm の結果を見ると、それぞれの印加時間によって抽出感度に差はなく 4×10^6 CFU/ml の場合のみ遺伝子バンドが観察された。強度 2 V/cm の結果と比較すると抽出感度は二桁低下していた。以上の結果から、電界を印加する際の最適時間は 10 分であることが示されたものの、電界強度は明確にならなかった。そこで、印加時間を 10 分とし、強度を 2 V/cm よりも低い 1 V/cm とした。その結果、図 5-6 に示すように、 4×10^6 CFU/ml までしか確認されず、4 V/cm のときと同様に 2 V/cm の抽出感度より低かった。

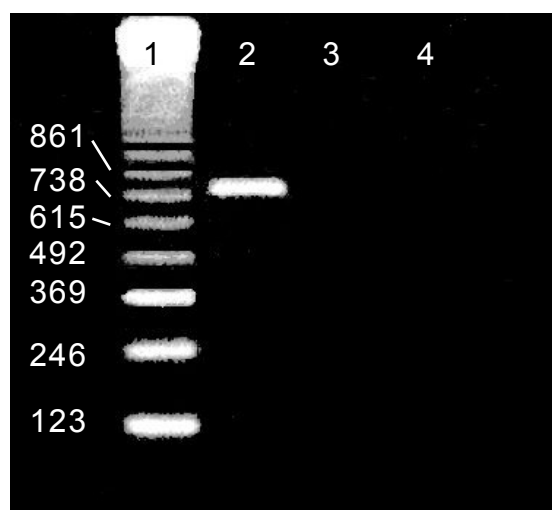
遺伝子の電気的性質を考慮して、これまでとは全く異なった導電性中空糸膜の利用法を検討した結果、以下の知見が得られた。まず、化学的に細胞膜を破壊し、その後溶液を押し出すと同時に、導電性中空糸膜に電界を印加することで、膜に捕捉した大腸菌 O157 の遺伝子を物理的、そして電気的に取り出せることがはじめて示された。また、最も効率よく遺伝子が抽出される電界強度および印加時間は、それぞれ 2 V/cm, 10 分という基礎的な知見が得られた。

5.2.2 電界効果を利用した糞便試料からの遺伝子抽出

5.2.1 項で得られた基礎的知見に基づいて、今度は大腸菌 O157 が接種された糞便試料からの遺伝子抽出を試みた。その際の抽出条件は、前項の結果を参考に電界強度を 2 V/cm, 印加時間を 10 分とした。ただし、ここで

も導電性中空糸膜の目詰まりを抑制するため、あらかじめ免疫磁気分離によって一度洗浄してから遺伝子抽出操作を開始した。

糞便試料からの遺伝子抽出は、単独試料のように 4×10^4 CFU/ml までは抽出されなかったが、大腸菌 O157 の濃度が 4×10^6 CFU/ml である試料から標的遺伝子を抽出できた (図 5-7)。このように、単独試料からの遺伝子抽出と比較すると感度低下は認められたものの、第4章の電流通電による殺菌を応用した抽出法と比べた場合、10 倍の感度向上が認められた。したがって、導電性中空糸膜を陰電極として利用した全く新しい遺伝子抽出法は、電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出より有効な手法であり、病原性細菌による感染症の遺伝子診断に一層寄与するものと考えられる。



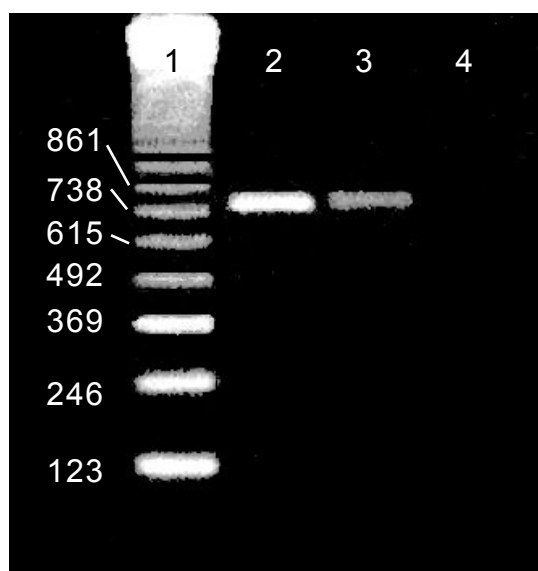
Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml.

図 5-7 糞便試料からの遺伝子抽出 (2 V/cm, 10 min)

5.2.3 抽出後の遺伝子濃縮の効果

PCR に使用される遺伝子量が多いほど、最終的な PCR 産物中に含まれる複製遺伝子量が多いことは、その原理から理解できる。そこで、1.5 ml 中に抽出された遺伝子の電気的性質を利用して、新たに陽極側の半透膜近傍に濃縮することを試みた。

まず図 5-2 の遺伝子抽出領域で強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで、導電性中空糸膜から遺伝子を取り出し、その後、膜を陰極領域に移して再び強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加し、遺伝子の濃縮を行った。その結果、図 5-8 に示すように 4×10^6 CFU/ml、さらにこれまで確認されなかった 4×10^5 CFU/ml の糞便試料においても遺伝子バンドが観察された。このように、抽出後に行われた遺伝子濃縮操作によって、さらに感度は 10 倍改善され、付加されたこの操作が本抽出法において極めて有効な手段であることを見出した。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml.

図 5-8 抽出後の遺伝子の濃縮 (2 V/cm, 10 min)

5.3 検討

電界効果を利用した導電性中空糸膜による遺伝子抽出法は、これまでの電流通電による殺菌を応用した抽出法と全く原理が異なる。ここではその抽出機構を述べ、次いで従来の化学的抽出法、および電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と対比し、電界効果を利用した抽出法の有効性を明確にする。

5.3.1 電界効果を利用した遺伝子抽出法の機構

電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、導電性中空糸膜に通電を行うことで、捕捉された細菌細胞膜の局所的な破壊（殺菌）を電氣的に誘発し、さらに吸引圧力によって膜破壊が促進される。細胞膜破壊された細菌から、この吸引によって同時に遺伝子が抽出されるという機構であった。

本章で述べた遺伝子抽出法は、この機構とは全く異なり、以下のように考えている（図 5-9）。まず導電性中空糸膜に捕捉された大腸菌 O157 は、細胞溶解液（1% SDS 溶液と 10 mM NaOH）に 10 秒間浸されることで、化学的に細胞膜が溶解される。これは、4.6.2 項で示した SDS の作用に加えて、アルカリ溶液である 10 mM NaOH によっても促進される。その後、

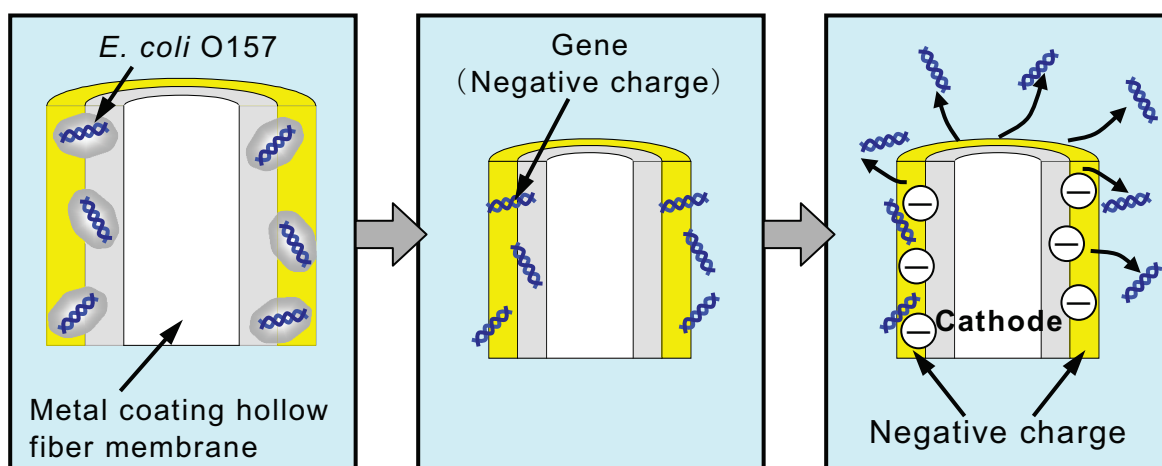


図 5-9 電界効果を利用した遺伝子抽出法の機構

導電性中空糸膜を陰電極として電界を印加すると、遺伝子は負に帯電しているため導電性中空糸膜から電氣的反発力によって緩衝液中に漏出される。このように、本章で述べた抽出法は、導電性中空糸膜を新たに電極として用い、さらに遺伝子の電氣的性質を利用した全く新しい抽出法である。

本章で示した電界効果を利用した抽出法の感度は、以上のような機構から、電界の印加時間と強度に依存することがわかる。まず抽出感度の印加時間依存性は、電界強度 2 V/cm で行われた抽出結果に反映されている。強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加したときの検出感度は 10^5 CFU/ml であったが、その 2 倍の 10 分にすると 10^4 CFU/ml まで抽出され、印加時間が長いほど抽出感度は向上する傾向にあった。電界強度 2 V/cm の場合、印加時間が 5 分というのは、結果から推察すると、遺伝子が導電性中空糸膜から抽出されるのに不十分な時間であり、膜内に残存する。それに対して印加時間を 2 倍の 10 分に延長すると、5 分では抽出されなかった膜内の遺伝子も抽出されるため、感度が向上するものと考えられる。これに基づくと、それよりも長い 15 分とした場合、さらに感度が向上すると思われたが、10 分時の結果と変わらないことから、導電性中空糸膜の中に存在するほとんどの遺伝子は 10 分以内に抽出されたものと推測される。よって、導電性中空糸膜の中に遺伝子が存在する限り、遺伝子の抽出量（感度）は電界印加時間に依存する。

次に、抽出感度と電界強度に着目する。この抽出法は、導電性中空糸膜の金属層と遺伝子との間に働く静電力を利用しているため、電界強度が高いほど効率が良いものと予想し、 2 V/cm を基準とし、その 2 倍の 4 V/cm についても行った。しかし、抽出感度は 4 V/cm の方が低く予想に反した結果が得られた。そこで 2 V/cm の $1/2$ の電界強度 1 V/cm で遺伝子抽出を試みた。その結果、 1 V/cm よりも 2 V/cm の方が抽出感度は高かった。これらの結果から、遺伝子抽出量（感度）は、ある値まで電界強度に依存して上昇し、それを越えると逆に低下すると言える。また、その閾値は 2 V/cm 前後であることもわかる。ここで、強度 4 V/cm の電界を印加したときに

見られた感度低下の原因を考える。まず、電流通電による殺菌法を利用した遺伝子抽出の 400, 500 mA 通電において生じたと考えられる遺伝子の断裂が、一つの可能性として挙げられる。しかし、4 V/cm の電界を印加した時の泳動電流値は 25~30 mA で、電流通電による殺菌法を利用した遺伝子抽出より一桁以上小さいことがわかる。したがって、電流で遺伝子が断裂した可能性は低い。次に、導電性中空糸膜と遺伝子の間に働く静電力に着目する。抽出感度が最も高かった 2 V/cm 印加は、印加時間が長いほど遺伝子抽出量は増したことから、遺伝子が静電力によって導電性中空糸膜の中を少しずつ移動し、膜の外に出てくることが推測される。しかし、2 V/cm よりも大きい 4 V/cm 印加では、電界印加直後、さらに大きな静電力が働くため、一度に多くの遺伝子が膜のポアに集中して移動し、結果的にポアが塞がれるものと考えられる。このため、遺伝子は膜の外に出られず、それが感度低下につながったものと考えられる。

5.3.2 抽出後の遺伝子濃縮の有効性

PCR はサイクル数の増加にともなって、最初の遺伝子数の 2, 4, 8 倍というように 2^n 倍に遺伝子を増幅させる。この原理から、産生される最終的な遺伝子数は、PCR に用いられる初期の遺伝子数、すなわちサンプル中の遺伝子数に影響されることがわかる。前述のように、PCR に使用されるサンプル量は 5 μ l と制限があることから、5.1.1 項の方法によって 1.5 ml の緩衝液中に抽出された遺伝子を、全てその 5 μ l 中に濃縮することで、原理的に 300 倍の感度向上が望める。そこで 5.1.2 項では、抽出操作後、遺伝子を電界効果によって陽極側の半透膜近傍に極力濃縮し、そこから 5 μ l を採取して PCR 増幅を行った。糞便試料を使った検討において、この濃縮操作の有無で感度に差異が生じ、濃縮を行った方が 10 倍の感度向上が認められ、 10^5 CFU/ml まで検出可能となった。全ての遺伝子を 5 μ l 中に濃縮すると 300 倍の感度向上が原理的に可能であるが、ここでは 10 倍の向上しか確認されなかったことから、半透膜近傍の約 150 ml の緩衝液中に

濃縮されたものと推測される。このように、遺伝子抽出後に付加された濃縮操作は、10分程度の時間を必要とするが、その見返りとして感度は10倍ほど改善された。以上のように、遺伝子抽出後の濃縮操作は感度向上のための非常に有効な手段である。

5.3.3 従来法との比較

従来の化学的抽出（インスタジーン）法、および第4章で述べた導電性中空糸膜の電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と、本章の電界効果を利用した導電性中空糸膜の遺伝子抽出法の工程、所要時間を図5-10にまとめる。

電界効果を利用した遺伝子抽出法は、1) 細菌の捕捉後、2) 細胞膜の溶解、3) 電界印加、4) 再度電界印加といった工程で行われる。またその所要時間は約30分である。前章で述べた細菌の捕捉、SDSの添加、通電・吸引の3工程を約10分間で行う電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と対比すると、1工程多く、また時間も20分程度長い。しかし、現在最も多用されている7工程、50～60分を要すインスタジーン法と比べると、工程および所要時間がともに優れており、迅速で画期的な抽出法と言える。

また抽出感度に着目すると、濃縮操作が含まれない場合でもインスタジーン法と同様であり、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法よりも10倍程度高い。電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は3mlの蒸留水中に遺伝子が抽出されていたが、本章の抽出法では緩衝液1.5ml中に抽出された。PCRの原理から、この溶液量の減少は感度向上の一要因であることが理解できる。それに加えて、遺伝子の抽出方向の違いも関係しているものと思われる。4.6.3項で述べたように、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法では、膜の外側（金属層）から内側（ポリプロピレン層）に向かって遺伝子を取り出すため、遺伝子は、細菌などが捕捉されたことによって小さくなったポアをいくつも通過しなければならない。

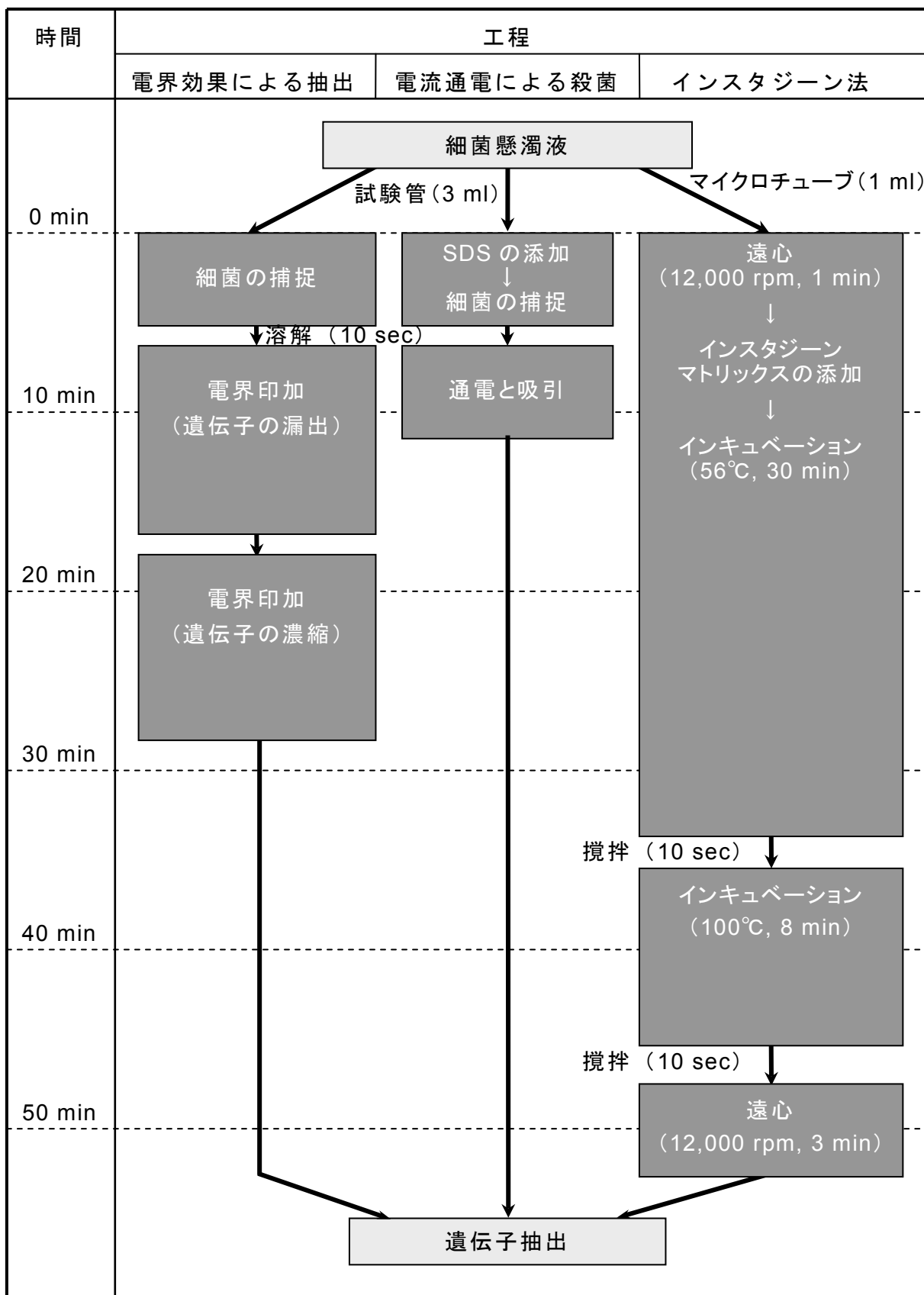


図 5-10 従来法との比較

これに対して、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、膜の外側に向かって抽出されることから、小さくなったポアを数多く通過する必要がない。したがって、遺伝子は前者よりも後者の方が膜に捕捉されず、抽出されやすいものと考えられ、それが感度向上につながった可能性もある。従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に関する知見を違う角度からみると、細菌もこれと同じような傾向を示すことがわかった。まず、以下のような殺菌効率を検討する際の細菌回収操作に着目した。電流通電による殺菌効率は、通電群と未通電群の生菌数を調べ、その後両者を比較することで検討された。そこでは、通電後、導電性中空糸膜モジュールのノズルに注射器を接続し、膜の内側から外側に向かって生理食塩水を注入することで、膜から細菌を押し出した。その後、この操作によって押し出された菌数（生菌数）が混釈培養法で測定された。以上の操作を、異なった観点から捕らえると、膜の内側から外側に向かって生理食塩水を注入することで、同時に膜内の細菌が必ず押し出されることがわかる。その割合は、未通電の場合、膜に捕捉された細菌の 10%程度であることが報告されている^[21]。次に、細菌懸濁液を吸引（細菌を捕捉）する際の細菌捕捉率に注目した。細菌捕捉率は、菌種を問わず 100%であることが調べられている。つまり、導電性中空糸膜を介して細菌懸濁液を膜の外側から内側へ吸引したとき、膜を通過する細菌が全くいないことを示している。これらの知見を考慮すると、細菌も膜の内側よりも外側に押し出されやすい傾向が見られ、本章で述べた抽出感度も同様に遺伝子の抽出方向に影響していると考えることができる。

電界効果を利用した遺伝子抽出法は、前章の遺伝子抽出法と同様に糞便試料を使用した場合、大腸菌 O157 単独試料よりも二桁の感度低下が認められた。これは、4.6.3 項で述べたように、糞便試料の中に含まれる細菌の絶対数が単独試料と比べて 1/3 であることと、糞便試料の前処理で行われた免疫磁気分離による細菌数の損失（約 90%減）が主な原因である。しかし、濃縮処理の追加により、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出

法よりも時間を必要とするが、その損失を補うことができた。

以上のように、遺伝子の電氣的性質を考慮して、これまでとは全く違った発想のもとに、この新たな遺伝子抽出法の可能性が検討された。本章で得られた知見から、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、従来の化学的抽出法に比べて迅速性、簡便性ともに優れた画期的な手法であることが示された。また前章の電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と比較した場合、工程と時間が多少多いものの、抽出感度の向上が確認された。抽出後の遺伝子濃縮も含めると 100 倍の感度向上が確認され、飛躍的な改善がなされた。このように、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、大腸菌 O157 をはじめとする生命に関わる感染症を引き起こす病原性微生物に対して極めて有効であり、感染症を患った多くの人々の命を救うことに貢献できる。さらに、導電性中空糸膜の利用法が全く異なるとはいえ、遺伝子を抽出・濃縮する際に必要なセルが追加されたこと以外は、何ら装置構成に変わりがないため、将来自動化の可能性も有している。

第 6 章

電界効果を利用した遺伝子抽出法の ウイルスへの適用

HIV（ヒト免疫不全ウイルス）や肝炎ウイルスは、AIDS（後天性免疫不全症候群）や肝癌といった致命的な感染症を引き起こすことが知られている。現在、このような血中に存在するウイルスの検査には PCR 法が用いられているが、先に述べたように検体（血液）量が極めて少ないため、血液中のわずかなウイルスの混入は検出できていなかった。したがって、現在実施されている輸血や血液製剤の投与は、決して安全であるとは言えない。

そこで、本章では導電性中空糸膜の特徴である微粒子に対する高い捕捉能力を利用することで、世界的にも全く行われていなかった血中ウイルスの完全な除去を行い、安全な輸血や血液製剤の提供を目指し、また同時にこの膜から、大腸菌 O157 の遺伝子抽出と同様にウイルス遺伝子の抽出が可能かどうかをはじめ検討した。

ここで、ウイルスは前章まで扱った細菌と機能や構造が全く異なるため、それらについても記述する。

6.1 ウイルス

ウイルスは、DNAまたはRNAを有するものの細胞形態を持たないため、原核細胞、真核細胞のどちらにも属さない微生物である。このため、これまで述べてきた原核細胞の単細胞生物である細菌とは構造や機能等が大きく異なる。まずこの節では、それらウイルスの特徴をまとめ、そのうえで6.2節からウイルス遺伝子の抽出の可能性を検討していく。

6.1.1 ウイルスの構造と機能 [29], [42], [44]

ウイルスは、他の微生物とは大きく異なり、細胞壁、細胞膜、細胞質、核もしくは核様体を持たず、大きさも20~300 nmと著しく小さい微生物である。ウイルスの基本構造は、遺伝物質である核酸を中心として、その周囲がカプシド (capsid) と呼ばれるタンパク質の殻で包まれている。核酸はRNAかDNAのいずれか一方を有し、1本鎖あるいは2本鎖である。ウイルスの種類によっては、この外側にさらに脂質と糖タンパク質から成るエンベロップ (envelope) という被膜がある。さらに、ある種のウイルスのエンベロップ表面には糖タンパク質の突起物であるスパイク (spike) が存在し、動物赤血球表面に結合する性質がある。ウイルスに

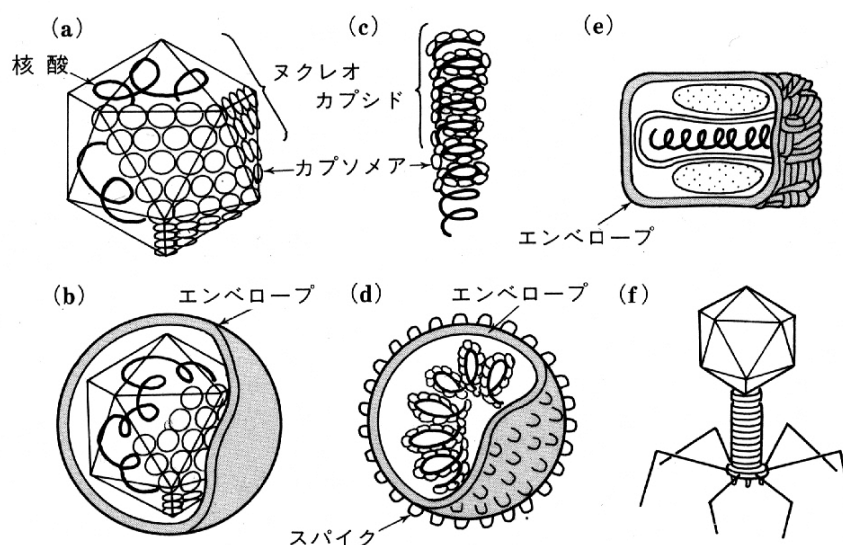


図 6-1 ウイルスの基本構造

は、この他に図 6-1 のような 4 つの形状をなしているものがある。その基本的な構造は核酸とカプシドが組み合わされたヌクレオカプシド (nucleocapsid) である。

ウイルスはその構造からわかるように、細胞質や核を持たず、タンパク質や核酸の合成に必要な場と材料を欠いている。そのためウイルスは、人工培地上で自己増殖できないため、感受性のある細胞に感染し、細胞の代謝酵素や材料、さらにタンパク質合成のためにリボソームを利用して自己成分を合成し増殖する。

ウイルスの増殖過程は、図 6-2 に示すように 1) 吸着 (adsorption), 2) 侵入 (penetration), 3) 脱殻 (uncoating), 4) 素材の合成 (synthesis of viral components), 5) 組み立て (成熟: maturation), 6) 細胞外への放出 (release) から成る。ウイルスが細胞に感染するときの第 1 段階目の吸着は、ウイルスがブラウン運動によって細胞表面に接近し衝突することから始まる。この繰り返しで、ウイルス表面のタンパク質や糖タンパク質が、レセプター (receptor) と呼ばれる細胞膜の特定部位に結合する。レセプターに結合したウイルスは、細胞の食作用によって取り込まれるか、ウイルス表面のエンベロープと細胞膜が融合し、ウイルスのヌクレオカプシドが細胞質内に侵入する。その後、ヌクレオカプシドからタンパク質が取り除かれ、裸の核酸になる (脱殻)。多くのウイルスでは、細胞のリソソーム (lysosome) と言われるタンパク質分解酵素によって起こる。脱殻したウイルス核酸の遺伝情報が mRNA に転写され、素材が合成される。DNA ウイルスの場合、DNA の一部が RNA ポリメラーゼ (細胞が持っている酵素) によって mRNA に転写され、その mRNA によってウイルス核酸の複製に必要な酵素 (DNA ポリメラーゼ) が合成される。その酵素を用いて、親ウイルス DNA を鋳型として多数の子ウイルス DNA が複製される。次に子ウイルス DNA から転写された mRNA によって、ウイルスの構成タンパク質 (カプシドタンパク質) が作られる。RNA ウイルスの場合、基本的に DNA ウイルスと同様であるが、親 RNA から mRNA へ

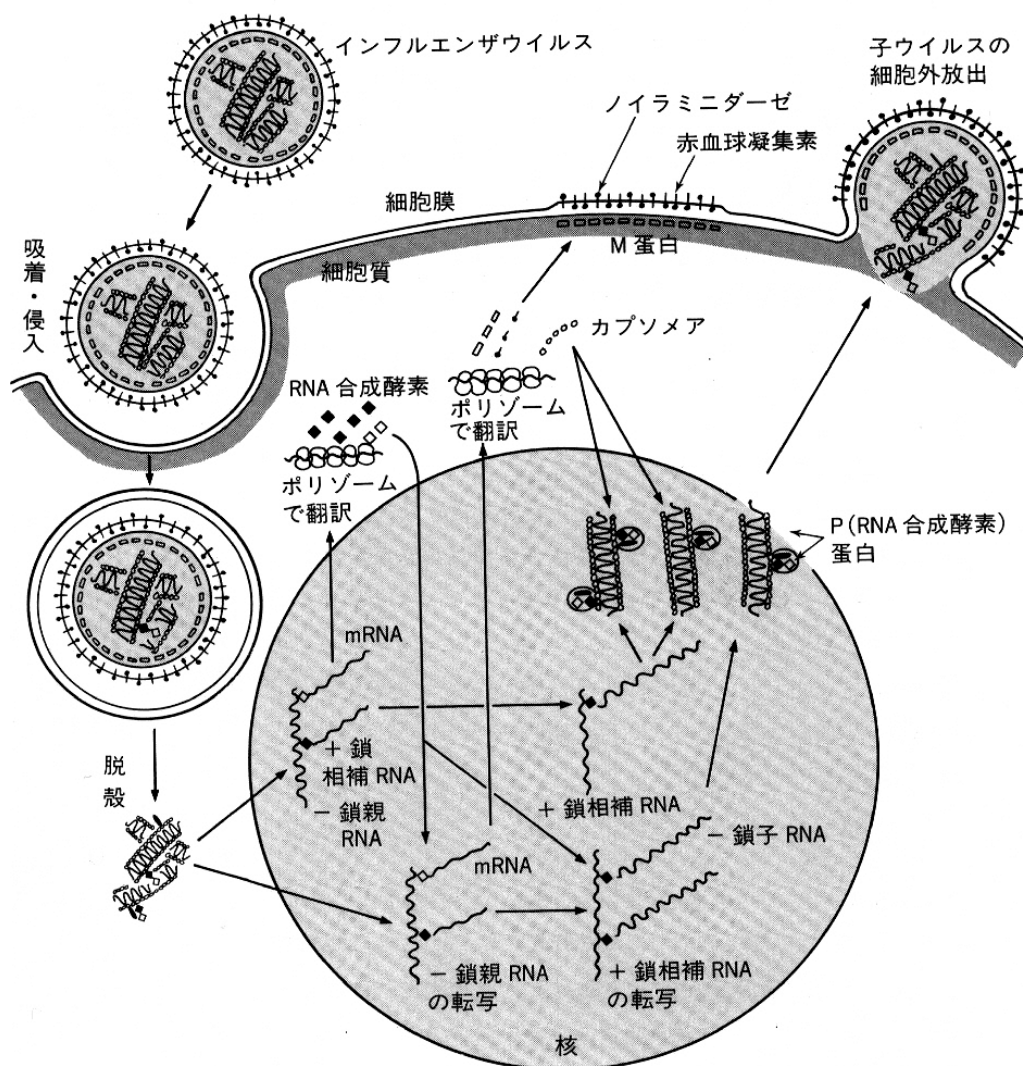


図 6-2 インフルエンザウイルス (+鎖 RNA) の細胞内増殖過程

の転写の過程がウイルスによって異なる。親ウイルス RNA が+鎖 RNA のものは、直接それが mRNA となり RNA ポリメラーゼが作られる。その RNA ポリメラーゼを用いて、まず相補的な-鎖 RNA が作られ、これを鋳型として+鎖 RNA が多数できる。また-鎖 RNA を持つウイルスは、それを鋳型として細胞の RNA ポリメラーゼによって+鎖 RNA (mRNA) が作られ、その後+鎖 RNA のものと同様な過程で-鎖 RNA が合成される。ここで生合成されたウイルス核酸とカプシドタンパク質が組み合わされウイルス粒子 (ヌクレオカプシド) ができる。細胞の破壊によって、あるいは

エンベロープを持つ RNA ウイルスは、ウイルスタンパク質（エンベロープタンパク質）で置き換えられた細胞膜を被って、またエンベロープを持つ DNA ウイルスの場合には、核膜を被って細胞外に遊離する。このようにウイルスが細胞内で増殖すると、多くの場合、細胞は破壊されて死滅する。これがウイルスの病原性に結びつく。

1個の細胞に1個のウイルスが感染して、上述の過程で増殖する時間は、ウイルスの種類と細胞の種類で異なるが、一般に10時間前後であり、産生される子ウイルス数は数百～数千個である。

6.1.2 ウイルスの培養と定量法 [29], [42]

ウイルスは、前述のように生きた細胞内に寄生して増殖する。したがってウイルスを増殖させるには、生きた細胞が必要となる。ただし、ウイルスが感染できる細胞の種類は一般的に限定されており、最も適するものを選択しなければならない。細菌だけに感染するウイルスは、バクテリオファージ (bacteriophage) と呼称される。また動物細胞、あるいは植物細胞に感染するウイルスは、それぞれ動物ウイルス (animal virus)、植物ウイルス (plant virus) と総称される。人間を含む動物に感受性を示す動物ウイルスの培養には、一般に孵化鶏卵、培養細胞、そして動物そのものが使われる。

ウイルスの量を測定するには、物理的手法と生物学的手法がある。物理的手法は、ウイルス浮遊液に一定量のラテックス粒子を混ぜ、電子顕微鏡でウイルス数を計測する方法である。この方法は、感染性・非感染性を区別することができず、さらに簡便さに欠けるため、通常は用いられない。一方の生物学的手法にはいくつかの方法があり、ウイルスの種類によって使い分けられる。エンベロープ表面に赤血球凝集素を有するウイルスの場合には、ウイルス浮遊液を段階希釈して赤血球浮遊液と混合し、何倍希釈まで赤血球凝集を示すか調べ (赤血球凝集反応; hemagglutination test), 相対的なウイルス濃度を測定する。これを赤血球凝集価

(hemagglutination titer : HA titer) という。また、段階希釈したウイルス浮遊液を動物、孵化鶏卵、培養細胞に接種し、それらの 50%が感染する希釈ウイルス液の倍率を調べ、それを 50%感染量 (50% infectious dose : ID₅₀) として表す。もう一つの方法は、プラーク検定法 (plaque assay) である。これは単層培養細胞にウイルス浮遊液を接種し、寒天 (agar) またはメチルセルロース (methyl cellulose) を含む培地を重層して培養する。1 個のウイルスが感染した 1 個の細胞から、子ウイルスが放出されるが、寒天またはメチルセルロースがあるため拡散できず、隣接する細胞のみに再感染し、感染死滅した細胞集団ができる。これがプラークで、染色によって未感染細胞と区別でき、プラーク数を計測し、プラーク形成単位 (plaque-forming unit : PFU) で表す。

電界効果を利用した遺伝子抽出法のウイルスに対する有効性を検討するにあたって、単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus type I : HSV) を用いた。また HSV の培養には、それに対して優れた感受性を示す Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞) を選択した。HSV の培養と定量法は、次の 6.1.3 項で簡単に説明する。

6.1.3 供試ウイルス [29]

第 5 章で述べた抽出法を、後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome : AIDS)、肝癌といった致命的な感染症を引き起こすヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) や肝炎ウイルス (hepatitis virus) の検出に適用することを最終的な目的としている。まず、その抽出法のウイルスに対する有効性を確認するために、本研究では、リスクの高いそれらのウイルスを使用しなかった。それにかわり、B 型肝炎ウイルスと同様な DNA ウイルスとして、比較的危険性が低く、培養が容易な単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV) を用いて検討を行うことにした。なお、HSV (HSV-HF RK-14) は神奈川県立衛生短期大学から分与を受けた。

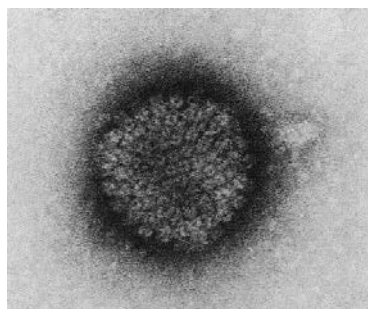


図 6-3 HSV の電子顕微鏡写真

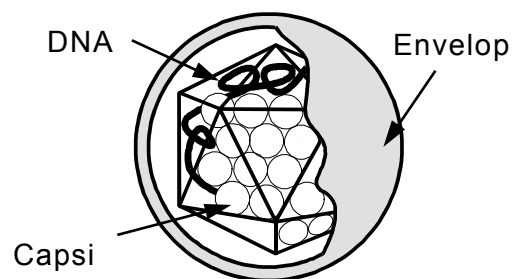


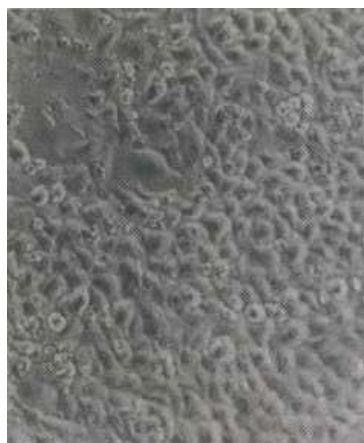
図 6-4 HSV の構造

図 6-3 に HSV の電子顕微鏡写真を示す。HSV は、図 6-4 のようにカプシド配列が正 20 面体を形成し、その中心に核酸（2 本鎖 DNA）を有する正 20 面体ヌクレオカプシド構造を成している。さらにその外側がエンベロープで被われている。大きさは外径 150~200 nm である。HSV がヒトに感染すると口内炎や角膜炎を引き起こし、抵抗力が低下した状態では全身性感染を起こすことがある。

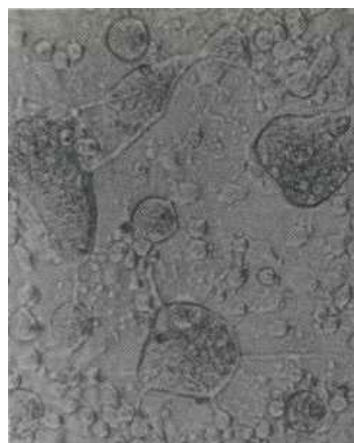
HSV の培養には、先に述べた Vero-BV 細胞を用いた。まず、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) が 5% 含まれた RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 培地 30 ml で、Vero-BV 細胞を培養瓶に単層培養した。続いてこの培養瓶に、凍結保存された HSV 浮遊液を 50 μ l 接種し、37°C に保温された CO₂ インキュベーター内で Vero 細胞に HSV を 1 時間吸着させた。その後、接種した HSV 浮遊液を取り除き、FBS が 1 % 含まれた RPMI 1640 培地を 50 ml 入れ、37°C の CO₂ インキュベーター内で約 2 日間培養した。培養後、HSV の感染によって発生する細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) を確認した後 (図 6-5)、この培養液を遠心分離し、HSV が含まれた上澄みを回収することで、HSV 浮遊液を得た。

HSV の定量は次のように行った。この際にも Vero 細胞を使い、HSV が感染することで発生する CPE を利用した定量法で測定を行った。まず HSV を含んだ溶液を 2 倍段階希釈した。次に、あらかじめ Vero 細胞が単層培養されたマイクロプレート (96 穴) に、段階希釈されたそれぞれの溶液を 50 μ l 接種し、37°C で 1 時間吸着させた。その後、希釈液を取り除き

1% FBS RPMI 1640 培地を 0.2 ml 入れ，CO₂ インキュベータ（37℃）内で 48 時間培養した．培養後，CPE がどの希釈段階まで現れているのかを光学顕微鏡で観察した．本研究では，この操作を数回行い，全てにおいて CPE が現れる最終希釈段階を 100%組織培養感染価（100% tissue culture infectious dose: TCID₁₀₀）として表した．TCID₁₀₀ は，活性を有する HSV 量が多ければ大きな値となり，逆に少ないと小さな値になる．



(a) 正常細胞



(b) HSV 感染細胞

図 6-5 Vero 細胞に対する HSV の細胞変性効果（CPE）

6.2 実験方法

前章の抽出法を，HIV や肝炎ウイルスの検出に適用することを最終的な目的とし，本研究では，HSV を用いて基礎的な検討を行った．以下に，それらの方法について述べる．

6.2.1 電界効果を利用したウイルス遺伝子の抽出と濃縮法

大腸菌 O157 に対して有効性が示された前章の抽出法をウイルスに適用し，ウイルス遺伝子の抽出が可能かどうかを検討した．実験手順および装置は前章とほぼ同様である．まず 6.1.3 項のように培養された HSV を電気泳動用緩衝液で適宜希釈し，HSV 濃度が $5 \times 10^3 \sim 10^6$ TCID₁₀₀/ml の浮遊液を 4 ml 用意した．そのうちの 3 ml だけ導電性中空糸膜を介してペリスタポンプで吸引（平均速度；約 0.6 ml/min）し，浮遊液中の HSV を膜に捕捉（濃縮）した．続いて，その膜を，ウイルス溶解液（1% SDS と 10 mM NaOH の混合溶液）に 10 秒間浸し，化学的にウイルス被膜（エンベロープおよびカプシド）を溶解した．その後，導電性中空糸膜をセルの抽出領域にセットして，膜が陰極になるように電界を印加し，同時に HSV を濃縮する際に膜を介して吸引した溶液を逆に押し出し，膜の中から負の電荷を持つ HSV 遺伝子を抽出した．ただし電界強度は 2, 4 V/cm，印加時間は 5, 10, 15 分のいずれかを選択した．抽出後，導電性中空糸膜を陰極領域に移し，再び膜を陰極として強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで，遺伝子を濃縮した．ただし，前章では遺伝子を半透膜近傍の緩衝液に濃縮していたが，感度は 10 倍しか改善されなかったため，ここでは半透膜自体に遺伝子を捕捉させ（以後，遺伝子の濃縮と呼ぶ），感度の向上を図った．その後，半透膜の一部分を切り取り，それを PCR 反応液の中に入れ，標的遺伝子の増幅を行った．PCR 条件は 4.4.2 項で示したものと全く同様である．使用したプライマーは，UL41-52（5'-CG-GCCCTGCGTCTGGCGCATCTGTT-3'）と UL41-32（5'-CCTCCAGG-AGCAGCAGAAGCATAGG-3'）であり，これらによって

525 bp の遺伝子断片が多量に得られた。最後に、ゲル電気泳動法によって分画し、遺伝子の抽出状況を視覚的に確認した。

6.2.2 導電性中空糸膜のウイルスに対する濃縮効果の測定法

従来のウイルス濃度を高める操作（以後、ウイルス濃縮と呼ぶ）は、超遠心機によって数時間行われており、迅速性を欠いていた。導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、最初にウイルスを捕捉する必要があるが、これを異なった観点から捕らえると、導電性中空糸膜にウイルスを濃縮していることになる。細菌と同じようにウイルスに対しても、浮遊液中のその全てを膜に濃縮することが可能ならば、従来法より遥かに迅速性に優れた画期的なウイルス濃縮法と言える。

そこで、図 6-6 に示す HSV 濃縮操作前の浮遊液中の HSV 含有量と、導電性中空糸膜を介して吸引された溶液中の HSV 含有量を 6.1.3 項の方法で測定した。その後、両者の値を比較することで、導電性中空糸膜の HSV に対する濃縮効果を検討した。

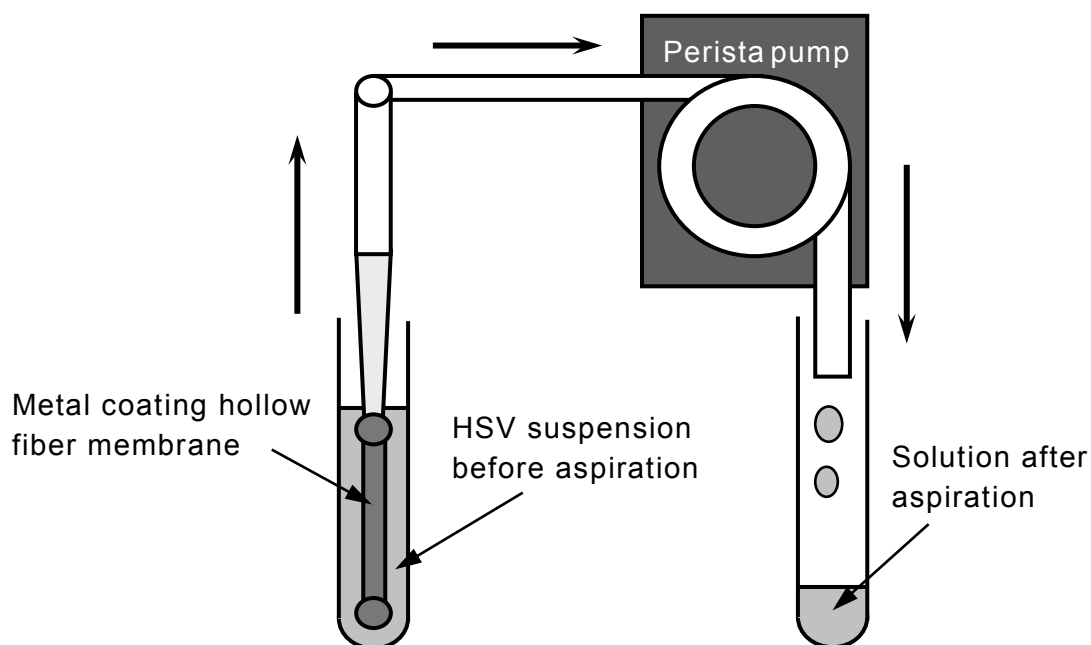


図 6-6 HSV に対する濃縮効果を調べる際に使用された溶液

6.3 実験結果

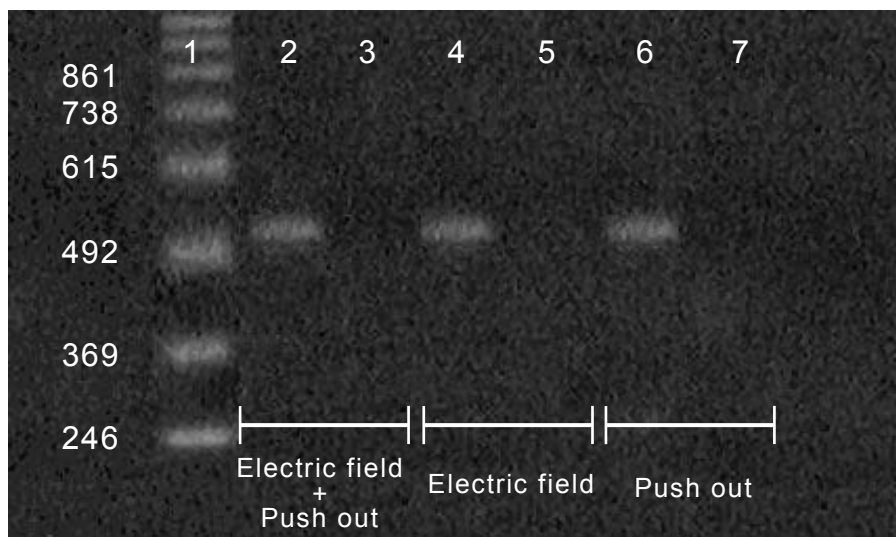
電界効果を利用した遺伝子抽出法をウイルスに適用し、細菌と同様にその有効性が示されるかどうか、また導電性中空糸膜をウイルス濃縮基材として利用できるか否かを検討した。ウイルスを用いた検討は、前章の大腸菌 O157 の遺伝子抽出に基づくものであり、実験手順と装置は前章と全く同様である。ただしウイルスは、細菌と比べて大きさ、構造、遺伝子の長さなどが異なるため、改めて遺伝子の抽出条件を探った。

6.3.1 電気的および物理的抽出法の有効性

最初に、大腸菌 O157 のときと同様に、前章の方法によって HSV 遺伝子を導電性中空糸膜から取り出せるかどうかの基礎的な検討を行った。5×10⁴および 10⁵ TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液を吸引した後、溶液 1.5 ml を押し出すと同時に、強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加した。その後、セルの陰極領域中の溶液 1.5 ml 中 5 μl だけ PCR に用い、その中に遺伝子が含まれているかどうかを確認した。結果を図 6-7 (lane 2 および 3) に示す。この図のように、HSV 濃度が 5×10⁵ TCID₁₀₀/ml である浮遊液を吸引したとき、492~615 bp の間に遺伝子バンドが認められた。本研究では、HSV 遺伝子の 525 bp の部位を PCR で増幅しているため、確認された遺伝子バンドは HSV の遺伝子断片であることがわかる。これより、大腸菌 O157 の遺伝子が抽出可能であった第 5 章の遺伝子抽出法は、ウイルスに対しても適用できることを見出した。

遺伝子の抽出は、これまでと同様に、溶液を押し出す物理的手法と、電界を印加する電気的手法の両者で行われた。導電性中空糸膜に溶液を注入することで膜内の細菌が押し出されるという事実は、従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法に関する研究で確認されている。同様に、この抽出法で細菌の遺伝子を抽出する場合、電気的手法はもとより、溶液を押し出す物理的手法も、有効であるものと考えられる。一方、この抽出法はウイルス遺伝子をも抽出できることが判明したものの、ウイルスの大

きさ、構造、遺伝子の長さなどが細菌と全く異なるため、物理的および電気的手法の両者の有効性を判断することは困難であった。そこで、これらを明らかにする以下の検討を行った。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4, 6;
 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5, 7; 5×10^4
 TCID₁₀₀/ml.

図 6-7 核酸の化学的抽出法

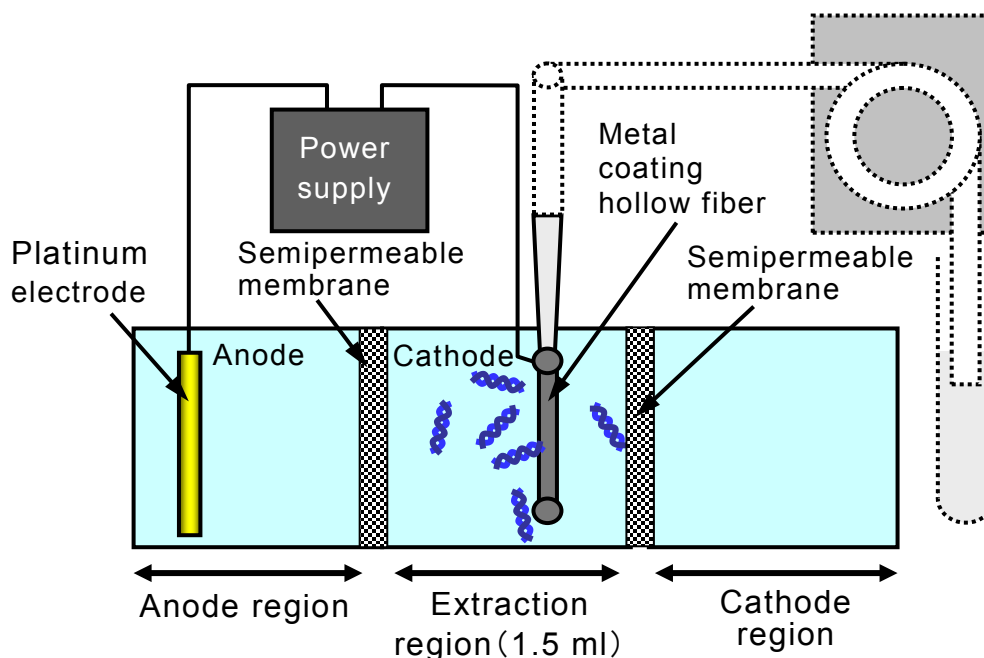


図 6-8 電氣的抽出法

図 6-8 のように溶液の押し出しは行わず、2 V/cm の電界を 5 分間印加することによって、電氣的に遺伝子を抽出した。図 6-7 の lane 4 および 5 のように、両者を利用した先の抽出法と変わらない 5×10^5 TCID₁₀₀/ml で遺伝子バンドが認められた。これより、電氣的手法は、HSV 遺伝子の抽出において有効な手段であることが明確になった。

次いで、HSV の濃縮と溶解を前述のように行った後、電界を印加せずに、濃縮の際に膜を介して吸引した溶液を、セルの陰極領域に収まる量 (約 1.5 ml) だけポンプによって押し出した (図 6-9)。その結果が図 6-7 の lane 6 と 7 である。電氣的に遺伝子を抽出したときと同じように、ウイルス濃度が 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の場合のみ、遺伝子バンドが認められた。この結果から、ポンプで溶液を押し出すことによって、導電性中空糸膜に濃縮した HSV の遺伝子が物理的に膜から抽出されることもわかった。

以上のように電氣的手法あるいは物理的手法のどちらか一方で抽出した場合、ともに 5×10^5 TCID₁₀₀/ml まで抽出できたことから、それぞれ有効な抽出法であることが明らかになった。したがって、一桁以上の抽出感度の向上は認められないものの、両方を組み合わせた方が、どちらか一方で

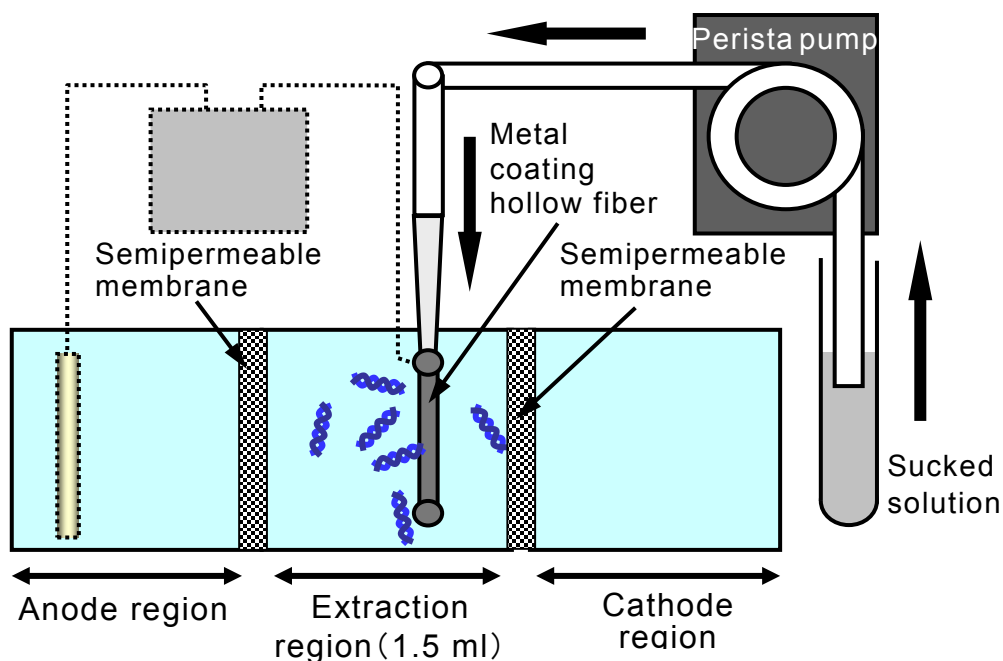


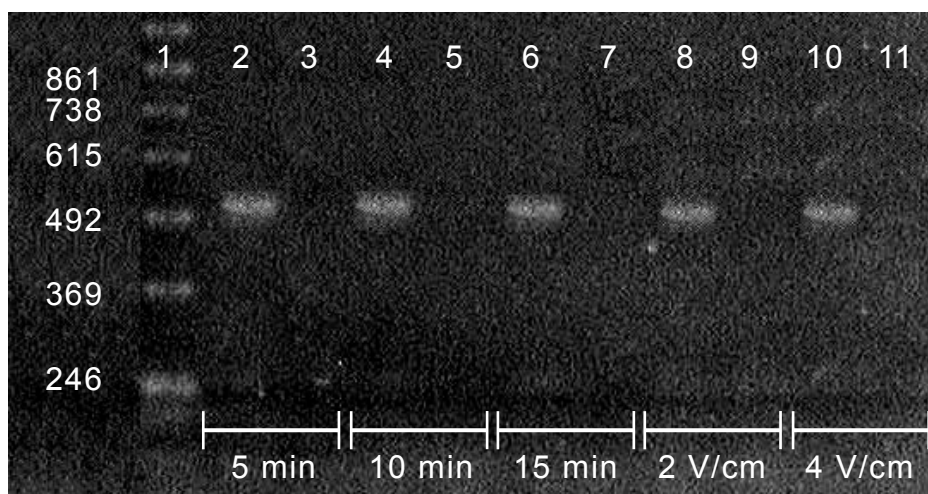
図 6-9 物理的抽出法

抽出するよりも有効であると考えられ、以下の実験では、溶液を押し出すと同時に電界を印加することで遺伝子抽出を行った。

6.3.2 電界強度と印加時間の最適条件

前項の結果より、強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加することによって、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液を吸引した導電性中空糸膜から HSV 遺伝子が確実に抽出されることがわかった。そこで、電界強度 2 V/cm、印加時間 5 分を基準として、遺伝子抽出の最適条件を検討した。

まず、電界強度を 2 V/cm 一定とし、5 分の 2 倍あるいは 3 倍の値である 10、15 分間だけ電界を印加し、HSV 遺伝子の抽出を行った。その結果、図 6-10 の lane 2 から 7 のように、印加時間を 5、10、15 分と変化させても 5×10^5 TCID₁₀₀/ml までしか遺伝子は抽出されなかった。次に、電界強度について検討するため、印加時間を 5 分間一定とし、2 V/cm またはその 2 倍の 4 V/cm の電界を印加した。図 6-10 の lane 8 から 11 のように、両者はともに 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の場合のみ遺伝子の抽出が認められた。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4, 6, 8, 10; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5, 7, 9, 11; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml, 2~7; 2 V/cm, 8~11; 5 min.

図 6-10 遺伝子抽出の最適条件

以上のように電界強度 2 V/cm、印加時間 5 分を基準とし、それよりも 2

倍あるいは3倍の時間、または電界強度でHSV遺伝子を抽出したが、抽出感度に顕著な差異は見られなかった。したがって、本抽出システムにおいて、最も効率良く遺伝子が抽出される電界強度および印加時間は、それぞれ2 V/cm、5分であることがわかった。

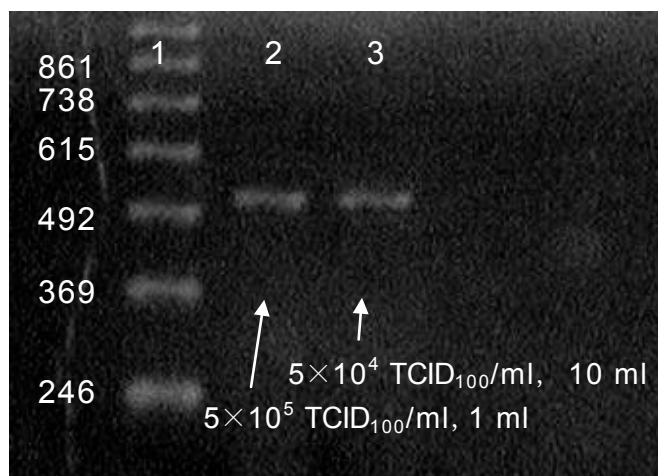
6.3.3 導電性中空糸膜のウイルスの濃縮効果を利用した遺伝子抽出

導電性中空糸膜のHSVに対する濃縮効果を調べるために、HSV浮遊液および膜を介して吸引された溶液中のHSV濃度を測定した。吸引前の浮遊液中のHSV濃度は、表6-1に示すように 5×10^6 TCID₁₀₀/mlであったのに対して、膜を介して吸引した後には1 TCID₁₀₀/ml未満となっていた。つまり、HSV浮遊液を導電性中空糸膜に通すことによって、浮遊液中のHSV全てが、膜の中に濃縮されることがわかった。つまり、従来法では扱う検体量が数十 μ lと非常に少ないため、血中のわずかなウイルスの検出は極めて困難であったが、導電性中空糸膜のウイルス濃縮効果を利用することで、ウイルス密度を高め、わずかなウイルス量であっても検出可能な画期的手法であることが示された。

そこで、これまで遺伝子が抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/mlのHSV浮遊液を10倍量吸引し、膜内のHSV量を10倍にすることで、 5×10^5 TCID₁₀₀/mlのときと同じようにHSV遺伝子が抽出されるかどうかを調べた。ただし、 5×10^5 TCID₁₀₀/mlのHSV浮遊液の吸引量は1 ml、 5×10^4 TCID₁₀₀/mlの場合はその10倍量の10 mlとした。また、電界強度および印加時間は前項の結果から2 V/cm、5分とした。これまでの浮遊液の吸

表 6-1 吸引前後の溶液中のHSV濃度

ウイルス濃度 (TCID ₁₀₀ /ml)	
吸引前	5×10^6
吸引後	< 1



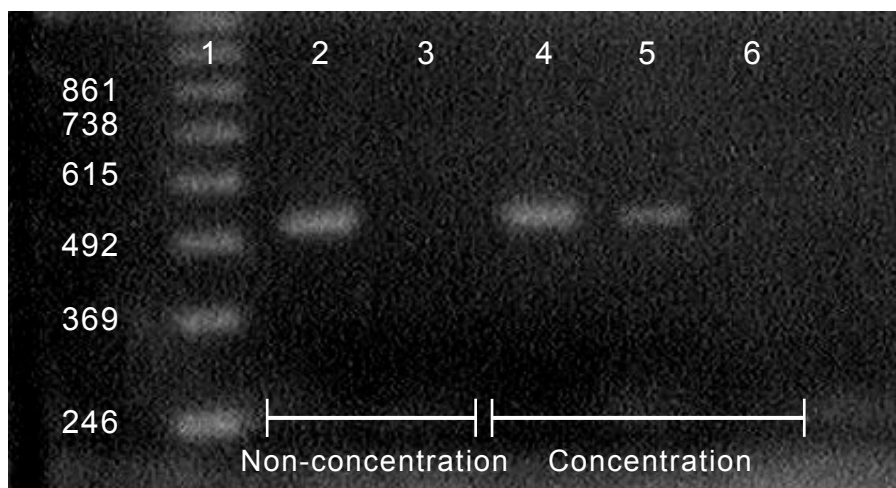
Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml. (2 V/cm, 5min)

図 6-11 膜の濃縮効果を利用した遺伝子抽出

引量が 3 ml であり, 1 ml に減らしたことによって膜に濃縮される HSV の絶対量は 3 分の 1 に減少したものの, 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の場合, 図 6-11 の lane 2 のように, HSV 遺伝子の抽出が認められた. 次に, これまで抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/ml の浮遊液を 10 ml 吸引し, HSV 遺伝子の抽出を試みた結果, 図 6-11 の lane 3 のように遺伝子バンドが確認された. これは, 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の浮遊液を 1 ml 吸引したときと同じように, 膜に 5×10^5 TCID₁₀₀ の HSV が濃縮されたことを示している. この結果から, 導電性中空糸膜は, 遺伝子抽出とウイルス濃縮という 2 つの機能を兼ね備えた全く新しい基材であると言える.

6.3.4 抽出後の遺伝子濃縮の効果

前項まで, 抽出後, 遺伝子の濃縮操作を行わず, 陰極領域の溶液 1.5 ml のうち 5 μ l を PCR に使用していた. 前章の大腸菌 O157 の場合, 抽出の後に加された遺伝子濃縮操作は, 感度の向上をもたらした. HSV についても, その操作による遺伝子の濃縮効果を確認した. 前章の結果を参考にすると, 半透膜近傍の緩衝液に遺伝子を濃縮したとき, 感度は 10 倍程



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml, 6; 5×10^3 TCID₁₀₀/ml. (2 V/cm, 10min)

図 6-12 抽出後の HSV 遺伝子の濃縮効果

度しか改善されなかったことから，ここでは 6.2.1 項で述べたように，半透膜自体に遺伝子を捕捉（濃縮）させ，それをサンプルとした．

HSV の濃縮と溶解を先と同様に行った後，抽出領域に導電性中空糸膜をセットした．次に導電性中空糸膜を陰極として，強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加し，電氣的に導電性中空糸膜から遺伝子を抽出した．ただし，抽出領域には，グリセリンが 1% 添加された電気泳動用緩衝液（1.5 ml）を用いたため，溶液を押し出す物理的な抽出操作は行わなかった．その後，導電性中空糸膜を陰極領域に移し，強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで，抽出領域に存在する遺伝子を陽極側の半透膜表面に濃縮した．最後に，半透膜の一部分を切り取り，それを PCR 反応液の中に入れ，標的遺伝子の増幅を行った．

その結果，図 6-12 のように 5×10^5 TCID₁₀₀/ml，さらにこれまで抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/ml においても遺伝子バンドが認められた．このように，濃縮を行わなかったときに比べて感度は 10 倍ほど改善された．したがって，ウイルス遺伝子に対しても，抽出後の遺伝子濃縮は有効であることが明確となった．

6.4 検討

遺伝子と導電性中空糸膜の間に働く静電力を利用した抽出法は、細菌ばかりでなくウイルス遺伝子の抽出にも適用可能であることが示された。さらに、数時間の超遠心によるこれまでのウイルス濃縮を、導電性中空糸膜によって簡単かつ迅速に行えることがわかった。導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出の最大の特長は、このウイルス濃縮であり、以下にそれらについて検討する。

6.4.1 遺伝子の抽出条件に関する検討

電界効果を利用した抽出法を HSV に適用し、再度、遺伝子の抽出条件を検討した。前章の大腸菌 O157 の場合、最も感度が高かった電界強度と印加時間は、それぞれ 2 V/cm, 10 分であった。一方、HSV では 2 V/cm, 5 分となった。両者の抽出条件を比べると、電界強度はともに 2 V/cm であるが、印加時間は HSV の方が短い結果となった。この相違は、両者の DNA (遺伝子) のサイズに関係しているものと考えられる。3.1.1 項で述べたように、HSV および大腸菌の DNA サイズは、それぞれ 1.7×10^5 bp (約 57.8 μm), 4×10^6 bp (約 1.36 mm) 程度であり、HSV の DNA の方が一桁以上小さいことがわかる。導電性中空糸膜は非常に小さなポアが形成されており、膜に電界が印加されたとき、DNA は、4.4.3 項で示したゲル電気泳動時のように、そのポア中を通過してこなければならない。この抽出法によって DNA が断裂せず、そのままの形で抽出された場合、サイズの小さい HSV の DNA の方が、そのポア内を速く移動する。したがって、HSV 遺伝子を抽出するときの方が電界印加時間は短く、また 5 分以上加えても多くの DNA は 5 分で抽出されるため感度が変わらないものと推測される。以上のことより、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、強度 2 V/cm の電界を 5 分または 10 分間印加することで、ウイルス・細菌を問わず遺伝子の抽出が可能である。

6.4.2 ウイルス濃縮を含めた従来の化学的抽出法との比較

導電性中空糸膜は、遺伝子抽出とウイルス濃縮の2つの機能を兼ね備えており、特に後者のウイルス濃縮は従来法より遥かに優れている。ここでは、遺伝子抽出前のウイルスの濃縮工程も含め、従来の化学的抽出法との比較・検討を行う。

ウイルスは、細菌と比べて大きさ、質量が非常に小さいため、細菌のように比較的安価で入手し易い低速遠心（数千 rpm）によって、それを濃縮することができない。したがって、図 6-13 のように、一般的にウイルス濃縮は高価な超遠心（数万 rpm）によって、数時間行われる。さらに、一度に取り扱う検体の量と数にも制限がある。それに対して、導電性中空糸膜によるウイルス濃縮は、非常に短時間で効率良く行うことができる。本研究では、ウイルス浮遊液の濃縮速度を約 0.6 ml/min とし、3 ml を 5 分で吸引（ウイルス濃縮）したが、これはポンプの吸引速度に依存する。そのため、ポンプによって濃縮時間を変更することができ、さらなる時間短縮も可能である。また、6.2.2 項からわかるように、導電性中空糸膜には HSV を少なくとも 10^7 個まで濃縮できるため、ウイルス濃縮量がその値に達するまで検体の吸引が可能であり、検体量を多く扱うことができる。すなわち 6.3.3 項で示されたように、検体量を多く扱うことで、より多くのウイルスが導電性中空糸膜に濃縮され、それが検出感度の向上につながる。一度感染すると体内からの排除が困難である HIV や肝炎ウイルスによる感染症は、輸血や血液製剤の接種が主な感染様式であることから、検体をこの手法により検査することで微量のそれらの混入も見逃さずに検出できる。したがって、より安全な輸血や血液製剤の提供が可能となり、飛躍的にそれらからの感染を防止でき、世界的な流行を抑止するものと考えられる。

以上のウイルス濃縮工程を含めて従来の化学的抽出法（インスタジーン法）と比較すると、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、所要時間が 1/4 であり、工程も 4 つ少ない 4 工程で行われ、非常に迅速で簡便な全く新

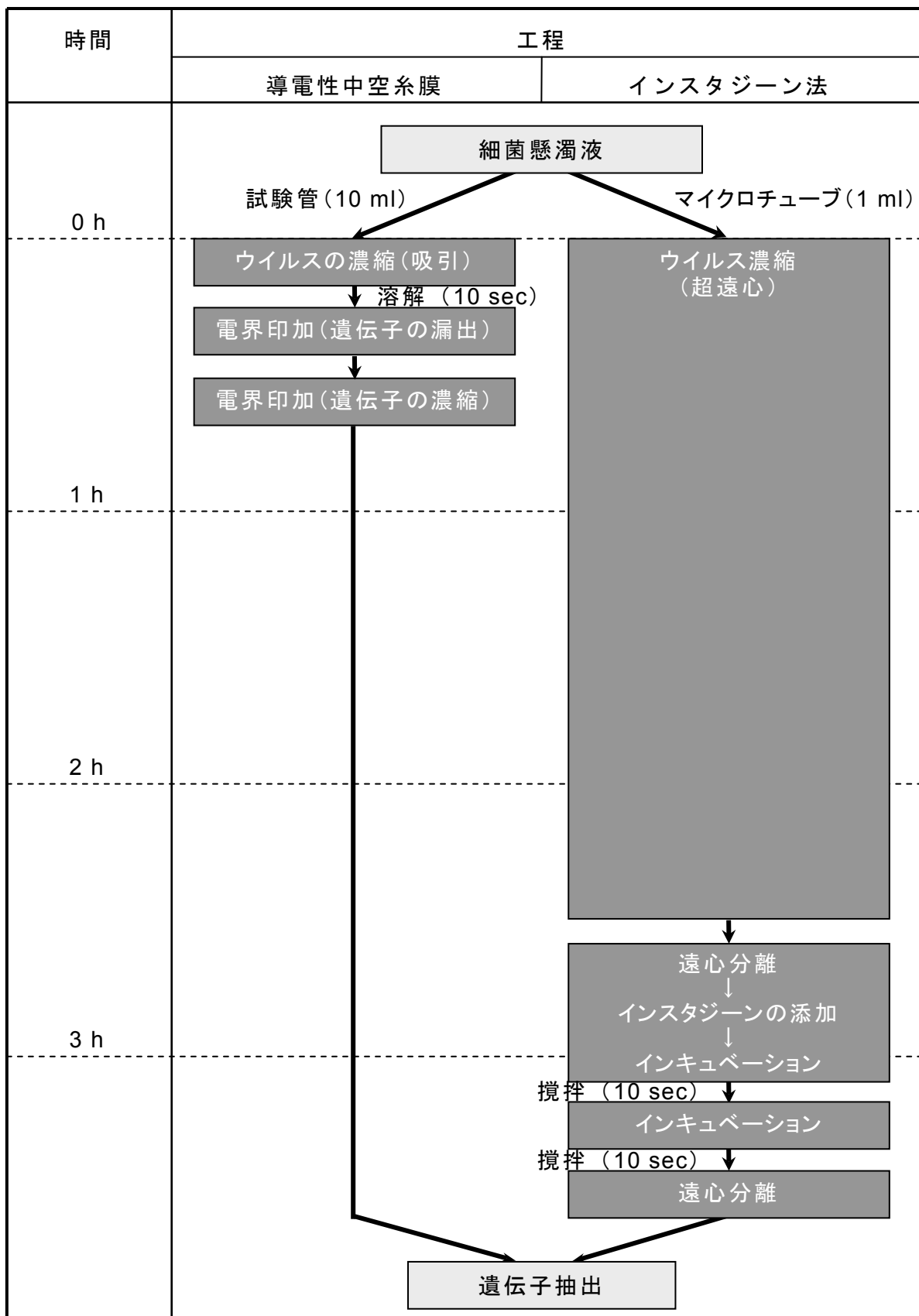


図 6-13 導電性中空糸膜を用いた抽出法とインスタジーン法の比較

しいウイルス濃縮・遺伝子抽出法であることがわかる。しかし、その感度は、導電性中空糸膜のウイルス濃縮を利用しない場合、6.3.4項のように 5×10^4 TCID₁₀₀/ml と、目標の抽出感度 (10^2 TCID₁₀₀/ml) より二桁ほど小さい。そこで、本章で用いた 2 つのプライマーによる PCR 増幅の検出限界を調べたところ、 10^4 TCID₁₀₀/ml であった。つまり、HSV 濃度が 10^4 TCID₁₀₀/ml より低い場合、遺伝子がたとえ抽出されていても、PCR によって HSV 遺伝子を検出 (増幅) することはできないということが判明した。これを考慮すると、PCR 限界まで遺伝子抽出が認められており、本抽出は感度も優れていることがわかる。なお、PCR の感度は、標的遺伝子の増幅部位、長さを決めるプライマーに依存するものであり、プライマーの検討によって、さらなる感度向上が期待できる。

第 7 章

結論

現在、病原性微生物による感染症の診断には、迅速性に優れた遺伝子診断法が多用されるようになってきている。この方法は、検体中の病原性微生物から直接遺伝子を抽出するため、原理的に従来のような細菌培養を必要とせず、また各々の病原性微生物特有の遺伝子を単離、検出することによりその特定が簡便かつ迅速に行える長所がある。

遺伝子診断法には、病原性微生物からの遺伝子抽出が必要不可欠であり、現在それには、化学的手法が主に用いられている。しかし、その操作は複雑であり、それゆえに自動化が進んでおらず、未だマニュアル操作に頼っている。さらに化学物質の中には有機溶媒が含まれているものもあり、取り扱いにも注意を払わなければならない。

このような背景から、これまでに北海道工業大学大学院応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門で検討されてきた導電性中空糸膜の電流通電による殺菌の機構と細胞内物質の漏出現象の両者に着目し、それを遺伝子抽出にはじめて応用することで、従来には無かった全く新しい遺伝子抽出法を見出せるものと確信し、本研究ではその可能性について検討した。

本章では、得られた結果を総括し、本研究の結論とする。

第4章 “導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した大腸菌 O157 遺伝子の抽出” に関して

- 1) 大腸菌 O157 のみが含まれた単独試料を用いた基礎的な検討で、導電性中空糸膜に電流を流すことで、膜に捕捉された細菌の遺伝子が抽出されることを見出した。
- 2) 遺伝子の抽出感度は、従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果と同様に、電流値依存性が確認され、DC 100, 200, 300 mA の中で 300 mA 通電時が最も優れた感度 (10^7 CFU/ml) を有した。しかし、それ以上大きな 400, 500 mA 通電では、遺伝子の収量がほとんど変わらず、逆に PCR (polymerase chain reaction) によって

遺伝子が増幅されなかった。これより、大電流通電は遺伝子を断裂する可能性がある。以上の事実から、この遺伝子抽出法は、通電によって細胞膜破壊（殺菌）が生じ、さらに吸引圧力が加わることによって一段と膜破壊が促進され、遺伝子が細胞外に漏出する現象を利用したものである。

- 3) 大腸菌 O157 懸濁液の吸引前に、それに界面活性剤である SDS を添加したところ大幅な感度の向上が確認された。これは、SDS の持つ細菌細胞膜の軟化作用を利用したものであり、その濃度の増加に伴って抽出感度が改善された。最も抽出感度の改善が認められた SDS の濃度は 5% であり、300 mA 通電では 10^5 CFU/ml まで抽出が可能になった。またそれ以上の濃度では、PCR の阻害を引き起こし、逆効果であることが判明した。
- 4) PCR は反応環境下にタンパク質などが多量に存在すると、それが原因となって遺伝子 (DNA) の増幅が行われなくなる。したがって、抽出されたサンプルの DNA 純度も抽出感度に大きく影響する。そこで電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出を、SDS の入った単独試料に適用し、その後抽出されたサンプルの DNA 純度を調べた。光学的手法によって 100 mA から 300 mA 通電まで、純度が高いとされる結果が得られた。2) の知見を考慮すると、300 mA 通電までは、遺伝子の断裂が少なく、比較的もとの形で抽出されていることがわかった。
- 5) 実際の糞便には多くの細菌が含まれているため、大腸菌 O157 の他に別の細菌が混入している混合試料からの遺伝子抽出を試みた。大腸菌 O157 単独試料と比べて抽出感度は二桁ほど低下したものの、 10^7 CFU/ml まで検出可能であった。
- 6) 大腸菌 O157 が接種された糞便試料を用いて同様に遺伝子抽出操作

を行った。しかし、試料の吸引直後、導電性中空糸膜に糞便中の多量の細菌や固形分のために目詰まりが発生し、試料の吸引自体ができなくなった。そこで前処理として免疫磁気分離工程を付加した。その結果、目詰まりが解消され、混合試料と同様に大腸菌 O157 の濃度が 10^7 CFU/ml 以上の試料から遺伝子の抽出が認められた。

- 7) 従来の化学的抽出法と比較すると、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、抽出工程数およびその所要時間がともに少なく、簡便性と迅速性に優れた手法であることが判明した。また、電源とポンプといった単純な装置で半ば自動的に遺伝子を抽出できることから、自動化の可能性を有した全く新しい抽出であることが示された。一方、その抽出感度は、混合試料や糞便試料において従来の診断法より二桁程度劣っていた。
- 8) 2), 3), 6) より、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出において最も良い感度が得られる SDS の濃度と電流値は、それぞれ 5%, 300 mA であることがわかった。その際の感度は、大腸菌 O157 のみの試料で 10^5 CFU/ml, 混合試料と糞便試料は 10^7 CFU/ml であった。

第5章 “電界効果を利用した導電性中空糸膜による大腸菌 O157 遺伝子の抽出” に関して

- 9) 抽出感度に課題のあった導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出において、負の電荷を有する遺伝子の電気的性質を考慮し、また膜の利用法を単なる電極として、これまでとは異なった観点から使用した。大腸菌 O157 単独試料を用いた場合、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出より 10 倍高い感度 (10^4 個/ml) が得られ、感度向上に成功した。
- 10) 電界効果を利用した遺伝子抽出の感度は、導電性中空糸膜に印加す

る電界強度と印加時間に依存し、それぞれ 2 V/cm, 10 分が最適条件であることが確認された。また、この知見から、導電性中空糸膜の中に入り込んだ遺伝子を静電力で効率的に引き出す画期的な方法であることが明確であり、従来の遺伝子抽出法には無かった全く新しい手法と言える。

- 11) 糞便試料を用いた場合、大腸菌 O157 単独試料と比べると感度低下が認められたものの、電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出より 10 倍程度向上した。
- 12) さらに PCR の原理を考慮して、糞便から遺伝子を抽出した後、新たに遺伝子濃縮操作を付加した結果、従来の診断法と等しい 10^5 個/ml まで抽出可能であることを見出した。この遺伝子濃縮操作は、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出において極めて有効な手段である。
- 13) 電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と対比すると、1 工程多く、また時間も 20 分程度長い。しかし、それを補うように抽出感度は飛躍的に改善（100 倍）された。また、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法よりも工程や時間では多少劣るが、従来の化学的抽出法と比較した場合には、工程数が少なく、その所要時間も約半分で済む。この電界効果を利用した遺伝子抽出は、膜の利用法が全く異なるものの、セルが追加された以外は装置構成には変わりがないため、将来自動化の可能性を十分有している。

第 6 章 “電界効果を利用した遺伝子抽出法のウイルスへの適用” に関して

- 14) 大腸菌 O157 に対して有効性が示された電界効果を利用した遺伝子抽出法を、単純ヘルペスウイルス（HSV）に適用した結果、同様にウイルスに対しても有効であることがはじめて確認された。

- 15) HSV の遺伝子抽出において、その条件を改めて検討したところ、HSV の遺伝子の抽出時間（電界印加時間）は、大腸菌 O157 よりも短かく 5 分であることがわかった。この知見を抽出機構に基づいて考えると、HSV の DNA は大腸菌 O157 よりも一桁以上小さいため、同じ電界強度（2 V/cm）でも抽出時間が短い。
- 16) 導電性中空糸膜は、HSV に対して 100%の捕捉能力（濃縮効果）を有していることがはじめて明らかとなった。このため導電性中空糸膜は、遺伝子抽出とウイルス濃縮の両者の機能を兼ね備えた全く新しい遺伝子抽出・ウイルス濃縮基材である。
- 17) 従来のウイルス濃縮は、超遠心機によって数時間実施されており、このウイルス濃縮工程を含めると、導電性中空糸膜による遺伝子抽出は、従来の化学的抽出法よりも所要時間が約 1/4 に短縮され、工程も 4 つ少ないことがわかった。このように、病原性ウイルスによる感染症の診断に対して特に本抽出法の有効性が示された。
- 18) 抽出感度は、PCR の検出限界である 10^4 TCID₁₀₀/ml とほぼ一致し、本手法はウイルス遺伝子の抽出感度にも優れていた。

本研究ではこのように、これまで殺菌・濾過基材として使われてきた導電性中空糸膜を全く異なった観点から捕らえることで、病原性細菌・ウイルスの遺伝子抽出が可能であるという全く新しい知見を得ることができた。また、この抽出法は、従来法に比べて簡便性・迅速性に優れ、さらに、単純な装置で半ば自動的に遺伝子抽出が行われることから、自動化の可能性をも有している。微生物感染症は時間の経過に伴って症状が悪化し、特

にその中でも大腸菌 O157 の毒性は極めて強いため、溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの致命的な疾患を引き起こす。このように一刻を争う感染症の場合には、早期発見・診断が極めて重要であり、本手法はこのような検査に大きく貢献する。

またウイルスに対しては、従来法より遥かに短時間で濃縮でき、さらに多くの検体量を扱うことが可能なため、検体中の微量なウイルスをも捕らえることができる。従来の血液検査は、非常に微量の検体（血液）しか扱われていないため、感染初期のようにわずかな量しか含まれていないものは完全に捕らえることができなかつた。もしそのような血液が輸血や血液製剤に使われた場合、次々と二次感染を引き起こし、世界中に蔓延することになる。AIDS や肝炎はまさにその代表的なものであり、世界的な広がりを見せている。このように一度体内に侵入すると完全な排除が困難で、最終的に致命的な疾患を引き起こすウイルスに対しても本手法の有効性が示され、それらの世界的な蔓延防止に大きく貢献できる。

このように、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は、微生物感染症の早期診断、さらには微量のウイルスの検出が可能な世界的にも全く例がない斬新で画期的なものである。そのため、本研究で得られた知見は極めて重要である。

今後の課題としては次のようなことが挙げられる。この抽出法によって細菌やウイルス遺伝子を簡単かつ迅速に抽出できることが示されたものの、臨床検査への適用を考えた場合、満足する抽出感度ではない。その感度が改善されるほど、病原性微生物の早期発見・診断が可能であり、より多くの微生物感染症患者に貢献できることは言うまでもない。本手法の感度が最低 1 桁、さらに 2 桁改善されれば感染症の遺伝子診断にさらに大きく寄与することは間違いない。本研究では、この抽出法自体の感度よりも、PCR に使用されたプライマーの感度に問題があり、それに関する検討が必要である。また供試細菌、ウイルスはともに 1 種類しか用いていない。抽出機構を考慮するとそれらの性質や構造によって、感度に大きな差は生じない

ものと考えられる。しかし、導電性中空糸膜のポアサイズは $0.1 \mu\text{m}$ であり、B型肝炎ウイルス（大きさ 42 nm ）のようにそれよりも小さな病原性微生物を対象とする場合、濃縮効率の低下、それによる感度低下が予想される。したがって、遺伝子抽出に使われる導電性中空糸膜のポアサイズの検討も求められる。また、実際の血液などの臨床材料からのウイルス遺伝子の抽出が挙げられる。前述のように PCR は、検体由来のタンパク質や脂質等が抽出サンプルに含まれていると、それらが阻害物質となって遺伝子増幅が行われない。ウイルス感染症の診断は、血液を臨床材料とすることがほとんどであり、実際の血液を用いてその有効性を検討する必要がある。これらを克服した上で最後に、抽出システムの自動化がある。非常に単純な装置構成であるが、自動化の際には、検体間および機器・施設の汚染防止も考慮しなければならない。

以上のように、プライマーの感度改善、さらには小さな病原性微生物や実際の血液検査への適用が可能となれば、斬新かつ画期的な遺伝子抽出装置が構築でき、微生物感染症の遺伝子診断に大きく寄与するものと確信する。

謝辞

本研究は，北海道工業大学大学院 工学研究科 応用電子工学専攻 生体電子・システム工学部門において，修士課程での 2 年間と博士後期課程の 3 年間にわたって継続的に行われたものである。

研究の内容が，工学と微生物学の両分野にまたがる学際的で非常に難しい研究であるにもかかわらず，5 年間にわたって，導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出に関する研究に従事できるよう数々のお力添えを頂いたのが有澤準二教授である。長いようで短かくもあったこの 5 年間で，常日頃より研究に限らず公私にわたって数多くの懇切丁寧なご指導を賜り，また研究を進めるにあたり多大なご配慮を頂いたことに心から感謝申し上げます。

本学 応用電子工学専攻 情報伝送・電子機器工学部門の初田健教授には，専攻分野が異なるにも関わらず，お忙しい中機会がある度にご激励を頂き，また本論文をまとめるにあたりご査読頂いたことを，ここに深く感謝する。

本学応用電子工学専攻 生体電子・システム工学部門の三澤顕次教授には，研究者としてのあり方や，投稿論文の作成ならびに学会発表などにおいて，多大かつ有益なご指導・ご鞭撻を賜り，また本論文のご査読を頂いた。ここに深く感謝する。

本学教養部の木村主幸教授には、本学に入学してからクラス担任および部活動の顧問という立場から、さらに大学院に進学後は本研究に対し生物学的見地から熱心なご指導やご督励を頂いた。本学は工学部のみであるため、微生物学に関する知識は非常に乏しいものであった。しかし、先生のご指導により、本研究のような学際的研究をまとめることができたことに、改めて感謝する。

今年度、本学に来られた木村浩一助教授には、札幌医科大学 微生物学教室に在職されていた頃から、藤井暢弘教授とともに微生物の分与やその操作、分析機器などについてご教授頂いた。また本学に在職されて一年という非常に短い期間であったが、本研究に対して貴重なご意見やご助言を多数賜った。両先生に厚く御礼を申し上げる。

当部門の北間正崇助教授ならびに清水久恵助手には、本学の先輩という立場からも、日頃から研究に対する数々のご督励を頂いた。ここに御礼申し上げます。

また公私ともに充実した学生生活を送るために、ご協力頂いた当部門の諸先輩、大学院生および学部生の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究で用いた導電性中空糸膜をご提供頂いた日幸工業株式会社青木伸一社長に感謝する。

参考文献

- [1] 古崎新太郎：バイオセパレーション，コロナ社（1993）
- [2] 日本発酵工学会編：微生物工学－基礎と応用－，産業図書（1983）
- [3] Y. Suzuki, C. Katsukawa, A. Tamaru, C. Abe, M. Makino, Y. Mizuguchi & H. Taniguchi：“Detection of kanamycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by searching mutations on the 16S ribosomal RNA gene”，*J. Clin. Microbiol.*, 36, pp. 1220-1225（1998）
- [4] 山里一英，宇田川俊一，児玉徹，森地敏樹編：微生物の分離，R & D プランニング（1990）
- [5] 山中喜代治：“迅速診断をどのように活用するか”，*臨床と微生物*, 27-suppl., pp. 589-592, 近代出版（2000）
- [6] 玉造滋，白鳥康史，加藤直也：“Single-tube, single enzyme RT-PCR 法による IFN 治療患者の HCV-RNA モニタリング”，*肝胆膵*, 30, pp. 921-925（1995）
- [7] 藤野達也，八橋弘，浜田るみこ：“アンプルコア HCV による HCV-RNA 測定の臨床的意義”，*医学と薬学*, 35, pp. 223-228（1996）
- [8] 青木正和，片山透，山岸文雄：“PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット（アンプルコアマイコバクテリウム）による臨床検体からの抗酸菌迅速検出”，*結核*, 69, pp. 7-19（1994）
- [9] 山下順香，柴田弘俊，出口松夫：“HIV-1, 2 抗体測定法”，*検査と技術*, 27-13, pp. 1481-1487, 医学書院（1999）

- [10] 北村聖：“HIV 関連検査の進歩”，日本 ME 学会雑誌，12-10，pp. 11-16（1998）
- [11] 飯野四郎：C 型肝炎最前線，日本医事新報社（2000）
- [12] 山田雅哉，井上和明，与芝真：“C 型肝炎の診断プロトコル”，Medical Technology，28，pp. 6-18（2000）
- [13] Wilber JC：Hepatitis C and G viruses. Manual of Clinical Microbiology 7th ed., American Society for Microbiology, pp. 1043-1052（1999）
- [14] Murray PR：Hepatitis C viruses. Pocket Guide to Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, p. 309（1998）
- [15] Weier HU, Gray JW：“A programmable system to perform the polymerase chain reaction”，DNA, 7, pp. 441-447（1998）
- [16] Foulkes NS, Pandolfi de Rinaldis PP, Macdonnell J, Cross NC, Luzzatto L：“Polymerase chain reaction automated at low cost”，Nucleic Acids Res, 16, pp. 5687-5688（1988）
- [17] Oste C：“Polymerase chain reaction”，Bio Techniques, 6, pp. 162-167（1988）
- [18] 小幡公道：“磁性粒子を用いた核酸自動抽出装置”，日本 ME 学会雑誌，12-2，pp. 15-24（1998）
- [19] Donald Voet, Judith G. Voet 著，田宮信雄，村松正実，八木達彦，吉田浩訳：ヴォート生化学（上），東京化学同人（1996）
- [20] 日本生物工学会編：生物学実験書，培風館（1995）
- [21] 葛西扶美夫：“導電性多孔質中空糸膜を用いた電気殺菌と遺伝子抽出に関する研究”，北海道工業大学大学院博士論文（1998）
- [22] 内村眞佐子：“便からのペロ毒素の検出法”，検査と技術，28-3，pp. 231-236，医学書院（2000）
- [23] 白阪琢磨：“HIV 治療の取り組み”，日本 ME 学会雑誌，12-10，pp. 3-10（1998）

- [24] 西山宏幸：“HIV”，臨床と微生物， 27-suppl., pp. 693-698, 近代出版 (2000)
- [25] 木村哲：“感染症症候群. 後天性免疫不全症候群 (AIDS)”，日本臨牀， 23 (別)， pp. 42-47 (1999)
- [26] 服部信：総説 最新の肝疾患検査，SRL 宝函， 22， pp. 1-8 (1998)
- [27] 茶山一彰，熊田博光：“感染症症候群. C型肝炎ウイルス感染症”，日本臨牀， 23 (別)， pp. 55-57 (1999)
- [28] 平潟洋一：“感染症診断の進め方”，臨床検査， 42， pp. 1213-1227 (1998)
- [29] 東匡伸，小熊恵二編：シンプル微生物学，南江堂 (1992)
- [30] 小松方，相原雅典：“グラム染色”，臨床と微生物， 27-suppl., pp. 752-758, 近代出版 (2000)
- [31] 小栗豊子：“感染症の迅速検査としての塗抹検査—グラム染色—”，臨床微生物検査ハンドブック， pp. 8-12, 三輪書店 (1996)
- [32] Kruczak Filipov P and Shively RG：“Gram stain procedure.”，Clinical Microbiology Procedures Hndbook , 1 , American Society for Microbiology (1992)
- [33] 高井信子：“腸管出血性大腸菌 O157”，臨床と微生物， 27-suppl., pp. 612-620, 近代出版 (2000)
- [34] 柏木征三郎，林純，青山巖：“イムノクロマトグラフィー法を利用した血中抗 HIV-1/2 抗体検出用キット「ダイナスクリーン・HIV-1/2」の基礎的，臨床的検討”，新薬と臨床， 48， pp. 111-118 (1999)
- [35] 竹田多恵，山形匡子：“イムノクロマトグラフィー市販キットを用いた *Escherichia coli* O157 患者の迅速診断”，感染症学雑誌， 72， pp. 834-839 (1998)
- [36] 栗岡隆顕：“腸管出血性大腸菌 O157 および Vero 毒素の ELISA 検出キット(オーソ社 *E. coli* O157 およびオーソ VT1/VT2)に対する臨床的評価”，臨床と微生物， 24， pp. 123-130 (1997)

- [37] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N : “Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia”, *Science*, 230, pp. 1350-1354 (1985)
- [38] 広瀬徹 : “ウイルス量をどう測るか—RT-PCR 法とその応用—”, *日本 ME 学会雑誌*, 12-10, pp. 17-26 (1998)
- [39] David HP, Thomas FS, Fred CT and Thomas JW eds. : “In vitro nucleic acid amplification techniques”, *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications.*, pp. 51-87, American Society for Microbiology (1993)
- [40] 三浦俊昭, 玉造滋 : “DNA 診断”, *検査と技術*, 27-12, pp. 1425-1432, 医学書院 (1999)
- [41] 半田宏 : わかりやすい遺伝子工学, 照晃堂 (1997)
- [42] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell 著, 野田春彦, 丸山工作, 石川統, 須藤和夫, 山本啓一, 丸山敬, 三井恵津子訳 : 分子細胞生物学 (上), 東京化学同人 (1997)
- [43] 山科郁男監修, 川寄敏祐編集 : レーニンジャーの新生化学 (上), 廣川書店 (1998)
- [44] Donald Voet, Judith G. Voet 著, 田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 吉田浩訳 : ヴォート生化学 (下), 東京化学同人 (1996)
- [45] 西庄勇 : “遺伝子の診断と治療”, *日本 ME 学会雑誌*, 12-2, pp. 3-14 (1998)
- [46] 小林猛著, 化学工学会監修 : バイオプロセスの魅力, 培風館 (1996)
- [47] Ausubel FM, Brent R, Kingston RF, Moore RR, Seidman JG, Smith JA, Struhl K : *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience (1987)
- [48] Berger SL, Kimmel AR : “Guide to molecular cloning techniques”, *Methods Enzymol*, 152, pp. 215-304 (1987)

- [49] Miyachi H, Matsukawa A, Ohshima T, Fusegawa H, Hiroshi T, Impraim C, Ando Y : “ Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of Hepatitis C Virus using the Internal Control” , Clin. Chem. Lab. Med., 36 (1998)
- [50] Boom WR, Sol CJA, van der Noordaa J : “Rapid and simple method for purification of nucleic acids”, Journal of Clinical Microbiology, 28, pp. 495-503 (1990)
- [51] Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, Second Edition, Dinal A. S. Oslo (1995)
- [52] Hornes E, Korsnes L : “Magnetic DNA hybridization properties of oligonucleotido probes attached to superparamagnetic beads and their use in the isolation of poly(A)mRNA from eukaryotic cells” , Genet. Anal. Tech. Appl., 7, pp. 145-150 (1990)
- [53] Hawkins TL, O’Conner-Morin T, Roy A, Santillan C : DNA purification and isolation using a solid-phase, Nucleic Acids Res, 22, pp. 4543-4544 (1994)
- [54] Jakoben KS, Breivold E, Hornes E: Purification of mRNA directly from crude plant in 15 minutes using oligo dT microspheres, Nucleic Acids Res, 18, p. 3669 (1990)
- [55] L. Concha, K. Kimura, J. Arisawa, K. Misawa and O. Igarashi : “Electrical sterilization on *Vibrio paraphaemolyticus* and *V. cholerae* using metal coating hollow fiber membrane” , Technical report of IEICE, MBE97-111, pp. 1-7 (1997)
- [56] 菅原俊継 : “導電性膜を用いた薬剤耐性日和見感染菌に対する電気殺菌の効果に関する研究”, 北海道工業大学大学院修士論文 (1998)
- [57] 葛西扶美夫, 岸田英樹, 木村主幸, 三澤頭次, 五十嵐治, 有澤準二 : “導電性中空糸膜を用いた水の電気殺菌”, 医用電子と生体工学, 36-1, pp. 15-21 (1998)

- [58] 神戸徳蔵, 伊勢秀夫共著: 無電解メッキ・電鍍 —金属メッキ技術 (5) —, pp. 1-6, 慎書店 (1976)
- [59] 逢坂哲彌, 後藤文男: “無電解めっきの基礎と応用”, 表面, 23-3, pp. 138-148 (1985)
- [60] C.Guizard, F.Legault, N.Idrissi, A.Larbot, L.Cot, C.Gavach : “ Electronically conductive mineral membranes designed for Electro-Ultrafiltration”, J.Mem. Sci., 41, pp.127-142 (1986)
- [61] Ih-Houng Loh, Richard A.Moody : “Electrically conductive membranes —Synthesis and application—”, J.Mem.Sci., 50, pp.31-49 (1990)
- [62] 磯野一宏: “Thermal Cycler”, 日本 ME 学会雑誌, 12-2, pp. 38-43 (1998)
- [63] Kawasaki ES, Wang AM : Detection of gene expression, Erlich HA ed., PCR Technology, Principles and Applications for DNA amplification, Stockton Press, pp. 89-97 (1989)
- [64] 宮西節子: “遺伝子検査に用いられる主な電気泳動”, 検査と技術, 27-13, pp. 1519-1523, 医学書院 (1999)
- [65] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular Cloning, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- [66] U. Zimmermann & P. Scheurich : “High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields” , Planta, 151, pp. 26-32 (1981)
- [67] U. Zimmermann, P. Scheurich, G. Pilwat & R. Benz : Cells with manipulated functions —New perspectives for cell biology, medicine, and technology—, Angew. Int. Ed. Engl., 20, pp. 325-344 (1981)
- [68] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell 著, 野田春彦, 丸山工作, 石川統, 須藤和夫, 山本啓一, 丸山敬, 三井恵津子訳: 分子細胞生物学 (下), 東京化学同人 (1997)
- [69] 森崎久雄, 服部黎子: 界面と微生物, pp. 46-48, 学会出版センター (1988)

- [70] Hidetoshi Okamoto, Emiko Takano, Tatsuhiko Sugao, Kazuo Kage, Eiichi Okamoto, Naoyuki Nishimura and Kunihiro Ueda : “Direct amplification of Escherichia coli O157 vero toxin genes from human faeces by the polymerase chain reaction” , Ann. Clin. Biochem., 36, pp. 642-648 (1999)
- [71] Benjamin Lewin 著, 菊池韶彦ほか訳 : 遺伝子, 東京化学同人 (1996)

研究業績

1. 原著論文

- 1.1 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 五十嵐治, 有澤準二: “導電性中空糸膜を用いた大腸菌 O157 の遺伝子抽出”, 医用電子と生体工学 (日本 ME 学会論文誌), 38 巻 4 号, pp. 291-297 (2000 年)
- 1.2 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜による大腸菌 O157 からのベロ毒素遺伝子の抽出”, 膜学会論文誌, 第 26 巻 1 号, pp.46-51 (2001 年)
- 1.3 菅原俊継, 船木貞幸, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜による実糞便試料からの大腸菌 O157 の遺伝子抽出”, 電気学会論文誌, 投稿中

2. 国際会議

- 2.1 Toshitsugu Sugawara, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji Arisawa and Osamu Igarashi: “Electro-bactericidal effect of the metal coating flat sheet membrane on *Pseudomonas aeruginosa*”, Proceedings of the Fifth International Conference on Inorganic Membranes, pp. 242-245 (1998)

- 2.2 Toshitsugu Sugawara, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji Arisawa and Osamu Igarashi: “Study on electro-bactericidal effect of the metal coating flat sheet membrane for *Pseudomonas aeruginosa*”, Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Vol. 20, No. 2, pp.1068-1071 (1998)
- 2.3 Toshitsugu Sugawara, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, Junji Arisawa and Osamu Igarashi: “*Pseudomonas aeruginosa* sterilized electrically by the metal coating flat sheet membrane”, The 1999 International Congress on Membranes & Membrane Processes, (1999)
- 2.4 Kazuyuki Kimura, Toshitsugu Sugawara, Kenji Misawa, Junji Arisawa and Osamu Igarashi: “Gene collection of *Echerichia coli* O-157 by the metal coating hollow fiber membrane”, The 1999 International Congress on Membranes & Membrane Processes, (1999)

3. 研究会

- 3.1 菅原俊継, 酒井正勝, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治 : “薬剤耐性菌に対する導電性膜の通電殺菌効果”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE97-112, pp. 9-14 (1997)
- 3.2 酒井正勝, 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治 : “空気中の黄色ブドウ球菌に対する導電性膜の殺菌効果”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE97-94, pp. 7-12 (1997)
- 3.3 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治 : “導電性膜を用いた微生物制御法の可能性”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE98-101, pp. 17-22 (1998)

- 3.4 菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた電気殺菌機構の検討”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE99-33，pp. 71-76（1999）
- 3.5 菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いたウイルス制御に関する基礎的検討”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE99-105，pp. 17-22（1999）
- 3.6 菅原俊継，海老川慎，木村浩一，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた電気泳動法によるウイルス遺伝子の抽出”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2000-76，pp. 67-72（2000年）
- 3.7 安田真之助，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性フィルタに捕捉された細菌に対する電流刺激の影響”，電子情報通信学会技術研究報告，MBE2000-77，pp. 73-78（2000年）

4. 研究紀要

- 4.1 木村主幸，菅原俊継，酒井正勝，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“日和見感染起因菌に対する導電性膜の通電殺菌効果”，北海道工大研究紀要，第26号（1998）
- 4.2 有澤準二，酒井正勝，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，五十嵐治：“空気中の浮遊微生物に対する導電性膜の殺菌効果”，北海道工大研究紀要，第26号（1998）
- 4.3 木村主幸，菅原俊継，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性膜によるウイルスの不活化の可能性”，北海道工大研究紀要，第27号（1999）
- 4.4 木村主幸，菅原俊継，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜のウイルス制御への応用”，北海道工大研究紀要，第28号（2000）

- 4.5 木村主幸，菅原俊継，佐々木裕樹，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を利用した電気殺菌機構に関する検討”，北海道工大研究紀要，第 28 号（2000）
- 4.6 菅原俊継，海老川慎，木村浩一，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いたウイルスの遺伝子抽出に関する基礎的検討”，北海道工大研究紀要，第 29 号（2001）

5. 学会発表

- 5.1 菅原俊継，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性中空糸膜による黄色ブドウ球菌の通電殺菌”，平成 8 年度電気関係学会北海道支部連合大会，p. 291（1996）
- 5.2 菅原俊継，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性中空糸膜による黄色ブドウ球菌の通電殺菌効果”，医用電子と生体工学，35-Suppl.，p. 536（1997）
- 5.3 菅原俊継，酒井正勝，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性膜による通電殺菌の基礎的検討”，第 36 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p. 20（1997）
- 5.4 酒井正勝，菅原俊継，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性膜を用いた空気中微生物殺菌に関する基礎的検討”，第 36 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p. 20（1997）
- 5.5 菅原俊継，酒井正勝，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性膜による緑膿菌の通電殺菌”，平成 9 年度電気関係学会北海道支部連合大会，p. 258（1997）
- 5.6 酒井正勝，菅原俊継，木村主幸，有澤準二，三澤顕次，五十嵐治：“導電性膜の空気中での通電殺菌効果”，平成 9 年度電気関係学会北海道支部連合大会，p. 259（1997）

- 5.7 菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性膜を用いた通電殺菌システムの基礎的検討”，医用電子と生体工学，36-Suppl.， p. 708（1998）
- 5.8 菅原俊継，佐々木裕樹，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性平膜を用いた空気中に浮遊する黄色ブドウ球菌の電気殺菌”，平成10年度電気関係学会北海道支部連合大会， p. 328（1998）
- 5.9 佐々木裕樹，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた大腸菌からの遺伝子回収”，平成10年度電気関係学会北海道支部連合大会， p. 329（1998）
- 5.10 菅原俊継，佐々木裕樹，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性膜を用いた微生物制御に関する基礎的検討”，医用電子と生体工学，37-Suppl.， p. 179（1999）
- 5.11 佐々木裕樹，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた遺伝子の検出感度に関する検討”，医用電子と生体工学，37-Suppl.， p. 178（1999）
- 5.12 菅原俊継，佐々木裕樹，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“ウイルスに対する導電性中空糸膜の通電効果”，第38回日本エム・イー学会北海道支部大会， p. 17（1999）
- 5.13 佐々木裕樹，菅原俊継，船木貞幸，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた微生物からの遺伝子回収に関する基礎的検討”，第38回日本エム・イー学会北海道支部大会， p. 16（1999）
- 5.14 菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜による単純ヘルペスウイルスの不活化”，平成11年度電気関係学会北海道支部連合大会， p. 449（1999）

- 5.15 菅原俊継，安田真之助，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた電気殺菌法のウイルスへの応用”，医用電子と生体工学，38-Suppl.，p. 361（2000）
- 5.16 安田真之助，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性フィルタを用いた緑膿菌に対する通電殺菌”，医用電子と生体工学，38-Suppl.，p. 360（2000）
- 5.17 船木貞幸，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた O-157 を含む糞便試料からのペロ毒素遺伝子の回収”，医用電子と生体工学，38-Suppl.，p. 362（2000）
- 5.18 菅原俊継，海老川慎，木村浩一，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“電気泳動法を利用した導電性中空糸膜のウイルス遺伝子抽出”，第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p. 16（2000）
- 5.19 船木貞幸，菅原俊継，木村浩一，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いた大腸菌 O157 からのペロ毒素遺伝子抽出法に関する検討”，第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p. 16（2000）
- 5.20 安田真之助，菅原俊継，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性フィルタを用いての通電殺菌機構の検討”，第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会，p. 16（2000）
- 5.21 海老川慎，菅原俊継，木村浩一，木村主幸，三澤顕次，有澤準二，五十嵐治：“導電性中空糸膜を用いたウイルス遺伝子の抽出に関する基礎的検討”，平成 12 年度電気関係学会北海道支部連合大会，p. 336（2000 年）