

殺人アメーバの早期発見のための高感度検出

High sensitive detection of fatal pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*

佐藤彩^A, 安川洋生^B

SATO Aya^A, YASUKAWA Hiro^B

富山大学大学院^A, 岩手大学応用生命科学系^B

【キーワード】殺人アメーバ *N. fowleri*, 高感度検出, PCR 法

1. はじめに

殺人アメーバ *N. fowleri* は川や湖, 土壌等に棲息し, 致死率 95% 以上の原発性アメーバ性髄膜脳炎 (PAM) を引き起こす。感染死亡者の約 8 割が小中学生である。PAM の治療法はなく, 日本での棲息も確認されていることから, 野外観察や課外授業での児童生徒が感染する可能性が排除できない。課外授業を安全に行うためには *N. fowleri* 感染予防のための早期発見が重要だが, 従来法では迅速な検出が出来ないのが現状である。

演者らは, 迅速で簡便な *N. fowleri* 高感度検出法を構築するために, PCR 法を用いた *N. fowleri* 検出法を構築した。また本大会では, 理科教育の高度化に貢献するため, PCR 法をはじめとした様々な生命科学技術について紹介する。

2. 材料と方法

2.1. 次世代シーケンサによる全ゲノム解析法

国立感染研の保管株 *N. fowleri* kurume を次世代シーケンサ HiSeq2000 (illumina) を用いて全ゲノム解析した。得られた塩基配列のデータを BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) により解析した。また, 次世代シーケンサの結果にもとづき, *N. fowleri* KUL 及び *N. fowleri* NF66 (国立感染研の保管株) を PCR 法で解析した。

2.2. 高感度検出のための PCR 法

全ゲノム解析より得られた塩基配列からプライマーを設計し, PCR 法にて *N. fowleri* 高感度検出を行った。 *N. fowleri* kurume ゲノム DNA をサケ精子 DNA 溶液で 5.0×10^2 pg ~ 5.0×10^7 pg に調製した。これを鋳型として PCR 法を行い (Fig. 1), PCR 法にて検出可能な *N. fowleri* ゲノム DNA の最小濃度を調べた。



3. 結果と考察

3.1. *N. fowleri* 固有遺伝子の探索

次世代シーケンサによる解析から, *N. fowleri* が新規遺伝子をコードしていることを見出した (Fig. 2)。BLAST を用いて解析したところ, 当該遺伝子は他の生物にはなく *N. fowleri* に固有の新規遺伝子であると思われる。

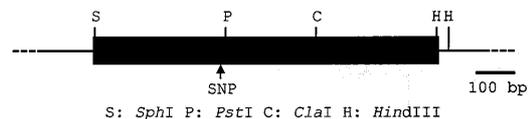


Fig. 2. *N. fowleri* から見つかった新規遺伝子の制限酵素地図

3.2. PCR 法を用いた *N. fowleri* の高感度検出

調製した *N. fowleri* ゲノム DNA を鋳型として PCR 法を行った結果, 0.5 pg のゲノム DNA まで検出することができた (Fig. 3)。

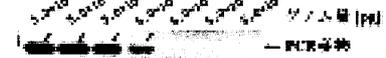


Fig. 3. *N. fowleri* の高感度検出

この反応系には

計算上, 4 個体分の *N. fowleri* ゲノム DNA が含まれている。以上の結果から, *N. fowleri* がわずかでも存在すれば PCR 法で容易に検出出来ることが示めされた。更に条件検討を行うことで高感度な検出が出来ると思われる。

4. まとめ

PCR 法による検出法は, 短時間で結果が分かるため *N. fowleri* の検出・同定に有効な方法である。安全な課外授業を行うための事前検査として, この検出法の利用が期待される。

また, 生命科学技術は日々目覚ましい進歩を遂げており, PCR 法をはじめとした様々な手法が将来的に理科教育現場に導入されていくことが予想される。これらの生命科学技術は, 生徒の理科教育への関心を高めるだけでなく, 理科教育の高度化に貢献出来ると思われる。