

河川から単離したクリプトスポリジウムオーシストの遺伝子解析

阿南高専	正会員	○橋本	温
麻布大学大学院		杉本	ひとみ
麻布大学		森田	重光
麻布大学	正会員	平田	強

1. はじめに

水環境のクリプトスポリジウム汚染レベルの把握は水質衛生上重要な事項であるが、現行のクリプトスポリジウム試験方法はサンプルを蛍光抗体染色し、その染色像の顕微鏡による形態観察によって判別・計数するものである。一方で、クリプトスポリジウムは蛍光抗体染色による形態観察では識別不可能な、宿主特異性の異なる多数の種や Genotype が報告されており^{1,2)}、現行の試験方法で判定した汚染レベルはヒトへの感染性や飲料水の安全性の観点からは安全側に偏った評価となっている。水環境汚染のレベルを的確に把握し、汚染レベルの評価と汚染源対策などの流域管理を適正に行うためには種や Genotype ごとの汚染レベルの把握が有効と考えられる。そこで本研究ではクリプトスポリジウムオーシストを単離し、ポリスレオニン領域および 18S rRNA 領域を標的とする PCR-RFLP 法による Genotype 解析を行う方法について検討を行うとともに、クリプトスポリジウムの汚染が確認されている河川を対象に調査を行った。

2. 方法

2.1 添加実験に用いたオーシスト

添加実験には麻布大学の動物実験施設で SCID マウスにて継代されている *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株および *Cryptosporidium parvum* Iowa 株を用いた。

2.2 河川水の採水と濃縮

クリプトスポリジウムによる汚染が確認されている、関東地方の K 川を調査対象とした。河川水 80L を採水し、UF 中空糸膜モジュール(株ダイセンメンブランシステムズ製)でろ過した。ろ過後、モジュールに界面活性剤加 PBS を加え、振倒して誘出し、誘出液を IMS 法(DYNABEADS, DYNAL 社)にて精製して蛍光抗体染色した後、シャーレに移して倒立型蛍光顕微鏡でオーシストを検出した。検出したオーシストはガラスキャピラリーで単離し、溶解液(PCR buffer および TX-100)50 μ l の入ったマイクロチューブに 1 個~5 個ずつ入れた。

2.3 オーシストの溶解と PCR-RFLP

オーシストの入ったマイクロチューブは-80℃-室温の凍結融解を 3 回行い DNA を溶出させた。凍結融解した試料にポリスレオニン領域をコードするプライマー(Cry44 および Cry373)¹⁾または 18S-rRNA 領域をコードするプライマー(18SiF および 18SiR)²⁾を含む PCR 反応液(PCR buffer, Taq ポリメラーゼ)50 μ l を加え、サーマルサイクラーで反応させた。反応後、アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを確認した。ポリスレオニン領域の PCR では RFLP を行うため、目的の 518bp 付近のバンドを確認して切り出し、ガラスパウダー(Gene Clean kit, TaKaRa)で精製したのち制限酵素 *Rsa* I を加え、37℃で 1 時間反応させ、再びアガロースゲルで電気泳動し、断片の切断パターンを確認した。

3. 結果および考察

3.1 *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株および Iowa 株による添加実験

Genotype2 であることが既知である *C. parvum* HNJ-1 株を用いて本法の陽性率の確認と RFLP パターンの確認を行った。*C. parvum* HNJ-1 株 1 オーシストを単離し、ポリスレオニン領域を標的とした PCR 法では 53 回の試験のうち 47 回で 518bp にバンドが得られ、陽性率は 89%であった。また、制限酵素 *Rsa* I での切断パターンは

キーワード クリプトスポリジウム, PCR-RFLP, genotype

連絡先 〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木 265 阿南工業高等専門学校建設システム工学科 TEL0884-23-7194

Genotype2を示した。また、同様に IOWA 株を用いた場合には 10 試料中 10 試料で増幅が確認された(表 1)。

3.2 河川分離株の PCR

河川分離株の PCR の結果を表 2 に示した。単離したオーシスト 1 個を用いた場合には 10 試料中 3 試料で 518bp に増幅産物が見られた。これは培養・精製した *C. parvum* HNJ-1 株を用いた場合の陽性率 89% よりも低く、河川水由来の PCR 反応の阻害物質の影響、環境中でのオーシストの DNA の現存状態および検出できない *Cryptosporidium* 株の存在の 3 つの可能性によるものが考えられた。一方で、PCR に用いるオーシストを増加することで陽性率は高くなり、3 オーシストを用いた PCR では 5 試料中 4 試料で、5 オーシストでは 5 試料中 5 試料で陽性となった。また、一細胞あたりのコピー数が多い 18s-rRNA 領域をコードする部位を標的とした PCR では河川分離株 1 オーシストを用いた 10 試料のうち 5 試料で特異な増幅が観察され、3 および 5 オーシストを用いた PCR では全ての試料で陽性のバンドが得られた。

現行の蛍光抗体染色と顕微鏡観察に基づく試験方法で、クリプトスポリジウム様の顕微鏡観察像が確認された粒子は、本河川のケースではその 30-50% でポリスレオニン領域または 18s-rRNA 領域を標的とした PCR でクリプトスポリジウムに特異な増幅産物が認められ、*Cryptosporidium* sp. であることが確認され、さらにポリスレオニン領域での PCR より、ヒトへの感染性を有する可能性の高い *Cryptosporidium parvum* に特異性の高い遺伝子を有していることが明らかになった。

3.3 RFLP 法による遺伝子型分類

ポリスレオニン領域での PCR の増幅産物はさらに RFLP を行った。1 オーシストを用いてポリスレオニン領域のプライマーで行った PCR で陽性のバンドが得られた 3 試料の増幅産物を *Rsa* I で消化した。試験した 3 試料すべてがその切断パターンから *Cryptosporidium parvum* genotype 2 と識別された(Fig. 1)。*Cryptosporidium parvum* genotype 2 はヒトのみでなく、牛・豚なども宿主とする広い宿主領域を持つタイプであることからヒトへの感染性のある種の水域汚染が確認されるとともに、汚染源としては家畜などの排水の可能性も示唆された。本調査で得られた遺伝子型の情報と従来の顕微鏡観察による汚染レベルの情報を合わせ、汚染源管理や水域の保全へ適用して行くことが今後の課題である。

4. まとめ

クリプトスポリジウムの培養株の PCR および PCR-RFLP 法について、1 オーシストを用いた手法の検討を行った。また、河川分離株の調査では *Cryptosporidium parvum* genotype 2 による汚染が観察された。

参考文献

- 1) Carraway et al., (1997) *Infection and Immunity*, 65:3958-3960.
- 2) Morgan et al., (1997) *J Parasitol*, 83(5):825-830

表1 培養株2種のポリスレオニン領域のPCR陽性率

	1oocyst	2oocysts	3oocysts
<i>Cryptosporidium parvum</i> HNJ-1	47/53	17/18	-
<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA	10/10	-	4/5
	positive/negative		

表2 河川分離株のPCR陽性率

プライマー	1oocyst	3oocystst	5oocysts
Poly threonin	3/10	4/5	5/5
18s	5/10	5/5	5/5
	positive/negative		

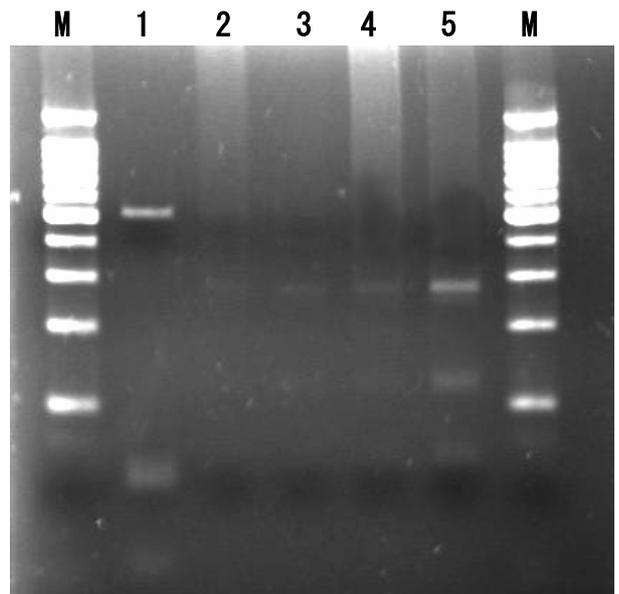


図1 河川水分離株の PCR-RFLP

M:100bp ladder, 1:*C. parvum* HNJ-1 株のポリスレオニン領域 PCR 増幅産物, 2:1 の *Rsa* I 消化産物, 3-5:河川分離株の *Rsa* I 消化産物