

VII-25

PCR法による病原性微生物*Cryptosporidium*の簡易検出法に関する基礎的研究

東北学院大学大学院工学研究科 学生員○斎藤 公利
東北学院大学工学部 長内 大樹
東北学院大学工学部 小林 崇
東北学院大学工学部 山岸 貴史
東北学院大学工学部 正会員 遠藤 銀朗

1 はじめに

身近な環境（大気、土壌、河川、湖沼、海域等）の広範囲に亘って様々な環境問題が生じてきている。一方、多くの分野で資源のリサイクル利用の動きが見られる。水資源も例外ではなく、下水処理水等が流入する水域を水資源として利用する水道システムが多くなってきている。水道システムは、市民生活の安全に直接的に関わっているもので、もしこれらの水源が病原性微生物で汚染された場合、感染症の流行を招く可能性がある。そのため、これらの水源の衛生上のリスクの管理と安全性の確保の問題が重要となってきた。

最近、世界各国をはじめ我が国においても*Cryptosporidium*といった原虫による新たな感染症の脅威が生じている。この*Cryptosporidium*は塩素消毒に対し耐性があり、日本においては1996年6月埼玉県越生町で多数の感染症被害が発生し、厚生省は、暫定対策指針を策定し緊急的対策を講じた。しかしながら、その後も日本各地で水道水源で、*Cryptosporidium*の検出事例がみられていることから、さらなる恒常的な対策が必要となってきた。

そこで我々は、病原性原虫の中で最も重大な水質衛生上の危険性をもつものの1つと考えられる*Cryptosporidium parvum*をとりあげ、オーシストの脱糞法とPCR法を組み合わせることで生育活性のある*C. parvum*を簡便かつ定量的検出する方法の開発を目的とする研究を行ってきた。本発表では、基礎的研究としてPCR法による定量的検出の前処理法として利用可能な脱糞法と染色体DNA抽出法の確立・開発に関する研究の成果について報告する。

2 供試菌株

麻布大学の平田強教授に分与して頂いた、*Cryptosporidium parvum*を実験に使用した。

3 実験方法

(1) 従来法と新規開発法による*C. parvum*オーシストからのDNA抽出の比較実験

1) 従来法：チューブ中の*C. parvum*の脱糞後の集菌を遠心分離で行い、さらにプロテナーゼK処理後の集菌を遠心分離で行って、フェノール・クロロフォルム処理した後、エタノール沈殿によってDNAを含む核酸を回収する。RNase処理後さらにフェノール・クロロフォルム処理とエタノール沈殿を行って、核酸量を測定する。

2) 新規開発法：従来法による染色体DNA抽出・回収は、*C. parvum*のオーシストやスポロゾイドの比重と水の比重が近いために遠心分離の際、多くのロスが生じることが確認されている。そこで、タウロコール酸による脱糞後、滅菌フィルター（マイクロピュアーEZ、ミリポア社製）を利用し遠心（4℃、8000rpm、1min）してスポロゾイドを集菌する。その後、プロテナーゼKをマイクロピュアーEZに直接添加し3時間インキュベート後1M Tris-HClで洗浄する。洗浄後、DNA吸着フィルター（マイクロコン、ミリポア社製）を併用し、遠心（4℃、15000rpm、1min）によりDNAをフィルターに吸着回収する。その後DD-H₂Oを添加した後逆遠心（4℃、15000rpm、5min）で脱着しDNAを回収した後、フェノール・クロロフォルム処理後エタノール沈殿によってDNAを回収する。その後、RNase処理を行いさらにフェノール・クロロフォルム処理とエタノール沈殿を行って、核酸量を測定する。

(2) NaOHとタウロコール酸によるオーシストの脱糞法の比較実験

NaOHによる脱糞法とタウロコール酸による脱糞法とを比較した。

1) NaOHによる脱糞法 *C. parvum*を50mM NaOH中に50℃12時間インキュベートする。

2) タウロコール酸脱糞 HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) を用いて1.5%タウロコール酸・0.5%トリプシンを調製し、この溶液中でオーシストを37℃で1時間インキュベートする。

1)、2)共に脱糞が終了後、オーシストからのDNA抽出の2)と同様にDNAを回収し、RNase処理をした後にフェノール・クロロフォルム処理とエタノール沈殿を行って、核酸量を測定する。また、これらの方法によって脱糞したものを感染力のある*C. parvum*と仮定し、感染力のある*C. parvum*の検出にどちらが適するかを検討することを目的として、*C. parvum*を熱処理（100℃、2分間）で生存活性を失わせた後に同様な方法で測定した。

(3) プロテナーゼK処理条件の検討

本研究で新規開発手法を用いた場合、最適な染色体DNA抽出のためのプロテナーゼK処理時間を検討する。そのために、プロテナーゼK処理を1, 2, 3, 4, 5時間として行ったものについて、上記の方法によって抽出・回収後できた核酸量を測定した。

4 実験結果

(1) 従来法と開発手法によつてのオーシストからの抽出・回収できたDNA（核酸量）をTable1に示した。

Table 1	
サンプル	核酸量 (μg/ml)
従来法	6.3
開発手法	10.0

(2) オーシストをNaOH脱糞法とタウロコール酸脱糞法を行う新規開発法による抽出・回収できたDNA（核酸）量をTable2とTable3に示した。

Table 2 (生存 <i>C. parvum</i> を用いた場合)	
サンプル	核酸量 (μg/ml)
NaOH 脱糞	12.1
タウロコール酸脱糞	8.2

Table 3 (熱処理で生存活性を失わせた <i>C. parvum</i> の場合)	
サンプル	核酸量 (μg/ml)
NaOH 脱糞	7.3
タウロコール酸脱糞	2.6

(3) プロテナーゼKの処理の時間を変化させた場合の新規開発手法による *C. parvum* オーシストからのDNA（核酸）の抽出・回収量の結果をTable4に示した。

Table 4		
Time(hr)	核酸量 (μg/ml)	
	RNase未処理	RNase処理
1	41.8	6.7
2	46.1	9.4
3	178.6	14.5
4	46.0	18.2
5	47.4	17.2

5 おわりに

本研究の結果より、*C. parvum* から染色体DNAの高率回収に我々が開発した手法が有用であり従来法を大幅に改善できることが分かった。遠心分離法によつてオーシストやスポロゾイドを回収するのではなく、チューブ内のフィルター上でプロテナーゼK処理を行い、直接フィルターにDNA吸着させたことがDNA回収率を高めることに有効であったと考えられる。

NaOHとタウロコール酸によるオーシストの脱糞法を比較した結果、タウロコール酸による脱糞法が、NaOHによる脱糞法より短時間で脱糞することができ、かつ生存している *C. parvum* のみの染色体DNAを選択的に抽出・回収するうえで有効であることが分かった。また、胃や十二指腸を通過して小腸で脱糞し感染する *C. parvum* は、胆汁酸の主成分であるタウロコール酸を用いて脱糞させることで、人間の小腸および十二指腸と同じ条件を与えることが出来ると考えられるため、人間に感染しうる *C. parvum* の染色体DNAを選択的に検出するのに役立つと考えられる。このことは、*C. parvum* の真の感染リスク評価するうえで重要であると考えられる。

プロテナーゼKの処理の時間については、本研究で開発した方法による *C. parvum* オーシストからのDNA（核酸）の抽出・回収量の結果、脱糞したスポロゾイドをプロテナーゼKで処理する時間は、3時間が適切と考えられた。

今後は最適なPCR組成・条件を明らかにし、PCR法を用いた成育活性のある *C. parvum* を簡便にかつ定量的に検出する方法の開発につなげていきたい。

最後に、本研究を行うにあたって、実験材料として新鮮な *C. parvum* のオーシストを御提供頂いた麻布大学の平田強教授に深く感謝申し上げます。