

VII-19 生存クリプトスポリジウムの分子生物学的検出方法の開発に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○小川 清恵
東北学院大学工学部		畑林 孝志
日本学術振興会	正 員	成田 勝
東北学院大学工学部	フェロー	遠藤 銀朗

1. はじめに

近代水道の発達と塩素消毒による衛生的な飲料水の供給は、下水道の整備による汚水の排除や医療保健体制の充実などと相俟って、コレラやチフスなど古典的な水系感染症の制圧に絶大な威力を発揮した。しかし、飲料水によって伝播し感染するすべての病原性微生物の問題が克服されたわけではない。特に近年は、従来からの制御対象であった細菌に加えて病原性のウイルスや原生動物などによる感染症が注目されてきている。

本研究においては、人間への感染性が非常に高く、これまでも特に大きな集団感染を引き起してきている病原性原生動物 *Cryptosporidium parvum*（以下 *C. parvum* とする）に注目し、環境水中か下水中に存在する脱嚢活性のある *C. parvum* を PCR 法を用いて簡便にかつ高感度に検出する方法の開発を行った。

2. *C. parvum* について

Cryptosporidium 属原生動物は宿主の組織細胞の内部に寄生して、その一生を過ごす寄生性の原生動物である。健康なヒトに感染して下痢症の原因となるのは小腸に寄生する小型の *C. parvum* である。*C. parvum* には特定の宿主に限定されずに、広い範囲の哺乳動物に感染することが確認されている。

Cryptosporidium 属原生動物による感染症(クリプトスポリジウム症)の感染経路はオーシストに汚染された生水、生野菜などの飲食物、汚染環境に接した手指、人から人への糞便汚染の伝播など多様である。おもな症状は 1 日平均 3 リットルにも及ぶ激しい水様下痢と腹痛、吐き気などであり、感染後 3~6 日の潜伏期間を経て現れ、2~12 日間程度続く。症状の発現と同時に糞便へのオーシストの排泄もはじまり、次の宿主への感染源となる。また、抗生物質による治療ができず、免疫力による自然治癒に頼らざるを得ない。

3. 実験方法

3-1 PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅

C. parvum オーシストからスポロゾイドを分離させるための脱嚢法と PCR 法を組み合わせる実験を行った。スポロゾイドの熱処理後に (1) 従来の PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅、(2) フェノール・クロロホルム処理を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅、(3) ガラスパウダー回収法を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅の 3 種類の方法で実験を行った。以下に実験手順を示す。

① 前処理

② タウロコール酸による脱嚢

③ 熱処理

④ (1) 処理なし

(2) フェノール・クロロホルム処理による DNA の回収

(3) ガラスパウダー回収法による DNA の回収

⑤ First-round PCR

⑥ Second-round PCR

⑦ 1.5%アガロースゲル電気泳動

3-2 PCR 増幅産物の塩基配列の決定

307bp の増幅された PCR 産物をクローニングし、PCR 産物の塩基配列を決定した。

3-3 PCR 産物の確認試験

PCR 産物の確認試験として、サザンハイブリダイゼーションを行った。

4. 実験結果

実験方法に示したプロトコールに従って 3 種類の方法で *C. parvum* の DNA を増幅させた。その結果、熱処理したスポロゾイトを何ら処理しない従来法による DNA の PCR 増幅 (図 1) では、*C. parvum* の DNA は増幅されなかった。フェノール・クロロホルム処理による DNA の精製を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅 (図 2) とガラスパウダー回収法による DNA の精製を取り入れた PCR 法による (図 3) では、標的とした *C. parvum* の DNA の増幅が確認できた。しかしながら、フェノール・クロロホルム処理を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅では、非特異的なバンドが多く見られたため、ガラスパウダー回収法を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅が最も優れた方法であるといえた。

得られた PCR 産物が *C. parvum* の DNA であることを確認するために行ったサザンハイブリダイゼーションの結果を図 4 の右に示した。この結果から分かるように、電気泳動によって確認された DNA 断片のバンドのサイズと同じ位置に検出シグナルが出現し、これらの DNA 断片が *C. parvum* の DNA であることを確認できた。

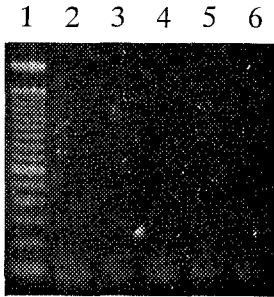


図 1 従来の PCR 法による *C. parvum* の DNA の増幅結果

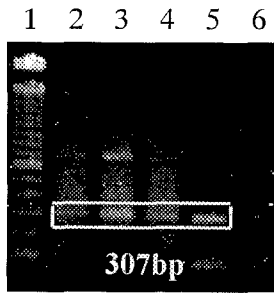


図 2 フェノール・クロロホルム処理を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA 増幅結果

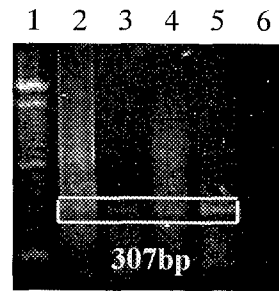
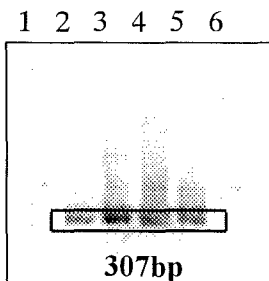
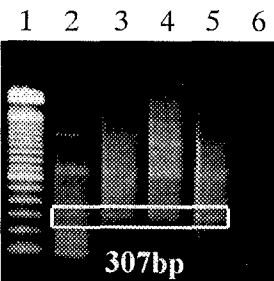


図 3 ガラスパウダー回収法を取り入れた PCR 法による *C. parvum* の DNA 増幅結果



- 1. 100bp DNA Ladder
- 2. 10 oocysts
- 3. 5 oocysts
- 4. 3 oocysts
- 5. 1 oocysts
- 6. negative control

図 4 サザンハイブリダイゼーションによる PCR 産物の確認結果

5. おわりに

脱糞させた *C. parvum* のオーシストの DNA を PCR 法によって増幅する方法として、スポロゾイトの熱処理後にガラスパウダー法によって DNA を回収・精製することによって、簡便かつ確実に標的とする *C. parvum* の DNA を増幅させることができた。また、このガラスパウダー回収法と PCR 法を組み合わせることにより、脱糞活性のある *C. parvum* をオーシスト 1 個のレベルで高感度に検出することができることが知られた。