

VII-26

蛍光顕微鏡による *Cryptosporidium* の計数と 分子生物学的検出方法に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○入間 孝
東北学院大学工学部		柴田 徳幸
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と下水道の整備による汚水の排除などにより、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。しかしながら、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。近年は従来からの制御対象であった細菌に加え、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こしている病原性原生動物 *Cryptosporidium parvum* (以下 *C. parvum* と記載する) に注目し、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目的とした。

2. *C. parvum* およびクリプトスポリジウム症について

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* 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) 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その感染経路は多様である。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、腹痛および吐き気などであり、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 落射蛍光顕微鏡による *C. parvum* オーシストの計数

PCR 法による *C. parvum* の高感度検出を試みるためには、実験に用いた *C. parvum* の正確な数を知る必要がある。今回我々が用いた *C. parvum* の検体試料 1000 μ L 中にオーシストがどのくらい存在するのかわかり、落射蛍光顕微鏡を用いて計数した。計数方法は顕微鏡観察中の視野をランダムに変え、10 画面で観察した。それぞれの画面から 1 画面あたりのオーシスト数の平均を出し、視野の面積と染色膜の面積との比から、膜上全体のオーシスト数 (検体試料 1000 μ L あたりのオーシスト数) を計算した。

3-2 PCR 法による *C. parvum* DNA の検出と検出限界

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、*C. parvum* の検出とその検出限界を検討した。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処理
- ③ ガラスパウダー法による DNA 回収

④PCR 法による DNA 増幅

⑤1.5% 濃度のアガロースゲル電気泳動

4. 実験結果および考察

4-1 落射蛍光顕微鏡による *C. parvum* オーシストの計数結果

落射蛍光顕微鏡を用いて、*C. parvum* オーシストを観察でき、オーシストの計数方法を確立できた。*C. parvum* オーシストの計数の結果、検体試料 1000 μ L あたり 15108 個のオーシストの存在を確認することができた。Fig. 1 に落射蛍光顕微鏡による *C. parvum* オーシストの観察結果を示す。

4-2 PCR 法による *C. parvum* DNA の検出と検出限界結果

オーシスト数を 100 個、50 個、20 個、10 個、5 個および 1 個とそれぞれ設定し 3 回ずつ PCR 増幅を行った結果、オーシスト数 100 個と 50 個では 3 回とも標的とする 307bp に DNA バンドが見られ DNA 検出に成功した。オーシスト数 20 個と 10 個では、3 回 PCR 増幅を行ったうち、2 回が DNA 検出に成功した。また、オーシスト数 5 個では 3 回とも成功した。しかしながら、オーシスト数が 1 個の場合、3 回とも DNA 検出に失敗した。したがって、今回我々が行った PCR 法による *C. parvum* の DNA の検出限界はオーシスト数 5 個までであった。またオーシスト数 1 個での DNA 検出がなされなかった原因として、DNA 回収時のロスや、PCR 増幅のための試薬調製時の操作ミス、または希釈した 1 個のオーシストが何らかの理由から脱糞しなかったためと考えられた。Fig. 2 にオーシスト数 5 個を用いた場合の PCR 増幅結果を示し、Table 1 に PCR 増幅による *C. parvum* の DNA 検出結果を示す。

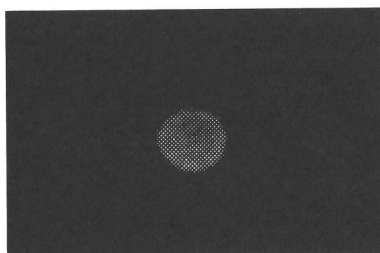


Fig.1 落射蛍光顕微鏡による
C. parvum オーシストの観察結果

Table 1 PCR 増幅による *C. parvum* の DNA 検出結果

オーシスト数(個)	100	50	20	10	5	1
実験回数						
1	○	○	○	○	○	×
2	○	○	○	○	○	×
3	○	○	×	×	○	×

○ : 検出 × : 検出されず

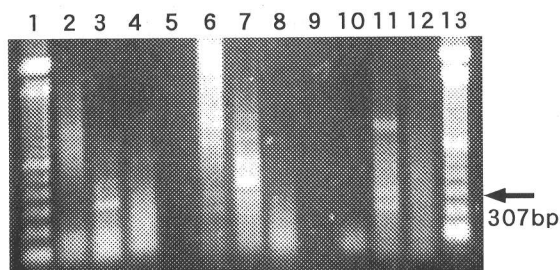


Fig.2 オーシスト5個を用いた場合のPCR増幅結果

Lane 1 : 100bp DNA Ladder

2 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR増幅結果

3 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR産物 (307bp)

4 : DNAなしネガティブコントロール

5 : Blank

6 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR産物 (307bp)

7 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR産物 (307bp)

8 : DNAなしネガティブコントロール

9 : Blank

10 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR増幅結果

11 : *Cryptosporidium* 属原生動物のPCR産物 (307bp)

12 : DNAなしネガティブコントロール

13 : 100bp DNA Ladder

5. おわりに

PCR 法によって *C. parvum* の高感度検出を試みた結果、*C. parvum* のオーシスト 5 個までを検出することができた。