

VII-44

クリプトスポリジウム・オーシストのPCR法による検出に関する研究

東北学院大学工学部 フェロー ○遠藤 銀朗
東北学院大学工学部 小澤 隆之
日本学術振興会 特別研究委員(PD) 成田 勝
日本学術振興会 特別研究委員(PD) 松井 一彰

1. はじめに

衛生的な飲料水の供給や下水道の整備による汚水の安全な排除などにより、日本を含む先進国においてはコレラやチフスなどの古典的な水系感染症はほぼ完全に制圧されるようになってきている。しかしながら、近年は従来から対策対象であった病原細菌に加え、病原性のウイルスや原生動物などによる水系感染が重要な問題となってきている。それらの中でも、人間への感染性が非常に高く、我が国および諸外国においてこれまでに大規模な集団水系感染を引き起こしている病原性微生物として、原生動物の *Cryptosporidium parvum*（以下 *C. parvum* と記載する）を挙げることができる。

病原細菌とは違って、*C. parvum* は生体外で培養することが困難であること、夾雑物を多量に含む河川水や下水などから精製・抗体染色・顕微鏡観察によって識別することが困難であることなどにより、熟練した検査技師であっても原生動物の *C. parvum* の検出や定量は難しい。したがって、この水系感染原生動物による感染事例を無くするためには、従来用いられてきた *C. parvum* の検出方法よりもより簡単でかつより感度の高い検出方法の開発が待たれる。

本研究では、特定の生物の DNA を特異的に増幅して検出することができるポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（以下 PCR 法と記載する）を用いて、夾雑物や溶解性不純物を多く含む試料中に存在する *C. parvum* をより簡便にかつ精度よく検出するための方法の開発を行い、一定の成果を得ることができたので報告する。

2. *C. parvum* とクリプトスポリジウム症の概要

Cryptosporidium 属原生動物は宿主の組織細胞の内部に寄生して増殖を繰り返す原生動物である。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知られている。*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、腹痛および嘔吐などであり、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、抗生物質等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 蛍光抗体染色法による活性汚泥中の *C. parvum* オーシストの観察

PCR 法による *C. parvum* の高感度検出を試みるのに先だって、活性汚泥に混入している *C. parvum* オーシストを従来法である蛍光抗体染色と蛍光顕微鏡観察によって検出可能であるかどうかについて検証した。この実験では、*C. parvum* オーシスト染色用の特異的蛍光抗体として Easy-Stain キット (BIF 社、オーストラリア) を用いた。染色方法は試薬会社のマニュアルに従った。抗体染色後の活性汚泥および *C. parvum* オーシストは落射蛍光顕微鏡 (Axioskop-2 plus (カールツァイス、ドイツ)) を用いて観察し CCD カメラによって顕微鏡画像を撮影した。

3-2 PCR 法による *C. parvum* DNA の検出（検出限界と PCR 反応阻害防止方法の検討）

C. parvum オーシストから抽出した DNA をできるだけ精製することなく PCR 法 (r-Taq (宝酒造、京都) と hsp70 プライマー (キアゲン、東京)) を使用) によって増幅し検出するうえで、PCR 反応阻害防止剤の添加効果について調べた。本研究では PCR 反応阻害防止剤として AmpDirect (島津製作所、京都) を用いた。用いた実験手順は以下の通りである。

- ① 凍結融解処理による *C. parvum* オーシストからの DNA の溶出
- ② 凍結融解処理液を鋳型 DNA とした First-PCR 増幅 (AmpDirect を添加および無添加による PCR)
- ③ First-PCR 産物を鋳型 DNA とした Second-PCR 増幅 (nested-PCR、AmpDirect は無添加せず)
- ④ 1.5% 濃度アガロースゲル電気泳動による検出

3-3 PCR 法による活性汚泥中の *C. parvum* DNA の検出 (PCR 反応阻害防止方法の検討)

PCR 反応阻害防止剤 AmpDirect を用いることによって夾雑物・他種微生物を多量に含む活性汚泥中の *C. parvum* オーシストをできるだけ直接的に PCR 法によって検出することが可能かどうかを調べるために、活性汚泥に *C. parvum* オーシストを加え PCR 法により検出する実験を行った。実験手順は 3-2 と同様である。

4. 実験結果および考察

4-1 蛍光抗体染色法による *C. parvum* オーシストの検出結果

Easy-Stain を使用しオーシストを蛍光抗体染色後、落射蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、オーシスト単独ではこれを確認することができた。しかし、活性汚泥に含まれるオーシストは、それ以外の物質および微生物の一部までもが Easy-Stain によって染色されており、識別は非常に困難であった。この結果から、蛍光抗体染色法は活性汚泥や下水のような夾雑物を含む水に含まれる *C. parvum* オーシストの検出には適さないと考えられた。

4-2 PCR 法による *C. parvum* DNA の検出結果 (検出限界と PCR 反応阻害防止方法の検討結果)

オーシスト 420 個、210 個、84 個、21 個、4.2 個の凍結融解液を鋳型として 1 回および 2 回 PCR 増幅を行った結果、何れの個数の場合でも阻害防止剤 AmpDirect を使用することによって DNA が増幅でき検出が可能であった。また 420 個、210 個、84 個では AmpDirect を使用しない場合には、オーシストから溶出した阻害物質の影響のため、PCR 法によって DNA は増幅できず検出することができなかった。Fig. 1 および Fig. 2 にこれらの PCR 増幅結果を示す。

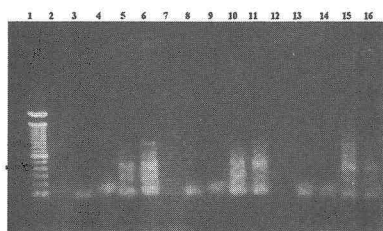


Fig. 1 オーシスト 420 個、210 個、84 個の PCR 増幅結果

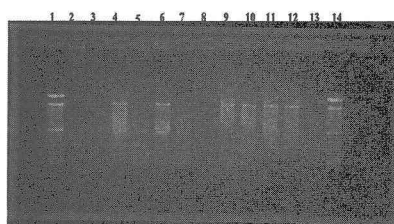


Fig. 2 オーシスト 21 個、4.2 個の 2 回目 PCR 増幅結果

4-3 PCR 反応阻害防止剤 Ampdirect を使用した PCR 法による活性汚泥中の *C. parvum* DNA の検出結果

活性汚泥 4 μ l にオーシスト数 21 個を加えて PCR を行った結果、および活性汚泥量 20 μ l にオーシスト数 4.2 個を加えて PCR 増幅を行った結果、活性汚泥量の少ない場合に DNA の検出に成功した。また活性汚泥量が多くオーシスト数が 4.2 個と少ない場合でも、Ampdirect を使用した場合は DNA を検出することができた。Fig. 2 にこの PCR 増幅結果を示す。

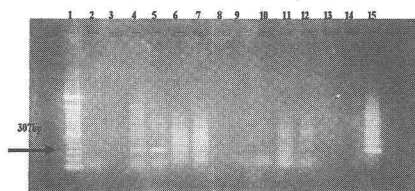


Fig. 2 活性汚泥 4 μ l にオーシスト数 21 個加えた場合と、活性汚泥 20 μ l にオーシスト数 4.2 個加えた場合の PCR 増幅結果

5. 結論

本研究によって得られた結論は記の通りである。

- ・ 蛍光抗体染色法は活性汚泥や下水のような夾雑物を含む水中の *C. parvum* オーシストの検出には適さないと考えられた。
- ・ 活性汚泥のような PCR 阻害物質を多量に含む試料中のオーシストであっても、適切な PCR 阻害防止剤を使用することによって PCR 法による高感度な検出可能であることが知られた。