

(34) 消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法による
水中のクリプトスパリジウムの定量および種別判定手法の開発

Development of Quantification and Genotyping methods for *Cryptosporidium* in water by Quenching Probe PCR followed by RFLP

真砂 佳史*、小熊 久美子*、片山 浩之*、大垣 真一郎*

MASAGO Yoshifumi*, OGUMA Kumiko*,
KATAYAMA Hiroyuki* and OHGAKI Shinichiro*

ABSTRACT:

A new method was developed to quantify *Cryptosporidium* in water. Quenching Probe PCR (QProbe-PCR) technique could successfully amplify approximately 1280bp of *Cryptosporidium* 18S rDNA from a sample with as low as 60 [oocysts/tube] of *Cryptosporidium parvum* bovine genotype. QProbe-PCR showed high accuracy and high sensitivity compared to Real Time PCR with TaqMan probe.

QProbe-PCR has an advantage that the PCR products can be applied for molecular characterization. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used to distinguish *Cryptosporidium* species and genotypes. Five species (*C. parvum* bovine genotype, *C. parvum* human genotype, *C. meleagridis*, *C. felis* and *C. muris*) could be distinguished by the RFLP with restriction enzymes *Ssp* I, *Vsp* I and *Sph* I. The *Sph* I successfully differentiated *C. muris* calf genotype (also known as *C. andersoni*) and *C. muris* mouse genotype. Database-based analysis revealed that 8 species out of 10 could be distinguished by RFLP with these three restriction enzymes.

QProbe-PCR-RFLP techniques can provide information on the genotype as well as the quantity of *Cryptosporidium* from the same sample. This technique can be a useful tool for waterborne risk assessment of Cryptosporidiosis.

KEYWORDS; *Cryptosporidium*, Genotyping, Quenching Probe PCR (QProbe-PCR), Real time PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

1. はじめに

クリプトスパリジウムは水系感染性の病原微生物で、塩素消毒に対して非常に強い耐性を持つことが知られており、先進国においても水道水質管理における重大な問題とされている。1993年、米国 Wisconsin 州 Milwaukeeにおいて、水道水中のクリプトスパリジウムにより40万人以上が感染した事例¹⁾が報告されている。また国内においても、1996年6月に埼玉県越生町において町民約14,000人の7割以上が感染したという事例などがある²⁾。

現在、クリプトスパリジウムは分類学上13種存在するとされている³⁾。そのうちヒトに感染するのは、主に*C. parvum*と*C. hominis*であるが、他にも*C. muris*⁴⁾, *C. meleagridis*^{5,6)}, *C. felis*^{6,7)}, *C. canis*^{6,7)}が健常なヒトに感

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

染した例も報告されている。また、*C. parvum* の遺伝子型の差によるヒトに対する感染力の違いについての調査⁸⁾により、同じ *C. parvum* であっても、その遺伝子型により感染力が大きく異なることが明らかとなっている。以上より、水中のクリプトスピリジウムの検出においては、ヒトへの感染リスク評価の観点から、定量だけでなく、その種や遺伝子型に関する情報を同時に得ることが強く望まれている。

これまでに、水中のクリプトスピリジウムの定量や種の同定のため多くの手法が開発されてきた。クリプトスピリジウムの定量手法としては、蛍光抗体染色したオーシストを顕微鏡観察により検出・計数する手法⁹⁾や、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法¹⁰⁾¹¹⁾等が挙げられる。一方、種の同定手法としては、PCR-RAPD 法¹²⁾や PCR-SSCP 法¹³⁾、PCR-RFLP 法¹⁴⁾¹⁵⁾、シーケンシング法¹⁴⁾¹⁵⁾などが開発されている。定量と遺伝子型の判定を同一の試料から行う手法としては、顕微鏡観察により検出されたオーシストを顕微鏡下で摘出して PCR にかける手法が提案されている¹⁶⁾が、測定に多大な時間と労力を要するため、多数のサンプルに対して適用することは困難であると考えられる。

2001 年、消光型蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法である Quenching Probe/Primer PCR 法（以下 QP-PCR 法）が開発された¹⁷⁾¹⁸⁾。QP-PCR 法とは、蛍光色素 BODIPY（グアニンと結合することにより蛍光が消える特徴を持つ）を 5'-あるいは 3'-末端に標識したプローブやプライマーを用いて PCR をを行い、試料全体の蛍光量が一定割合まで減少するのに必要なサイクル数を求めることで、試料中の対象 DNA 存在量を測定する手法である。QP-PCR 法は大きく分けて、BODIPY で標識したプローブを用いる Quenching probe PCR 法（以下 QProbe-PCR 法）と、BODIPY で標識したプライマーを用いる Quenching primer PCR 法（以下 QPrimer-PCR 法）の 2 種類がある。本手法は、既存のリアルタイム PCR 法で用いられている TaqMan PCR 法と比較して、より長い塩基配列に対して適用できるとされている。このことは、得られた PCR 産物の遺伝子解析に際して非常に優れた点であるといえる。

本研究では、クリプトスピリジウムの 18S rDNA を対象とした QProbe-PCR 法により、水中のクリプトスピリジウムを高精度・高感度で定量する手法を開発した。さらに、得られた PCR 産物を Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法に適用することで、検出されたクリプトスピリジウムの種の判別を行う手法を開発した。

2. 実験方法

2.1. QProbe-PCR 法による水中のクリプトスピリジウム定量手法の開発

(1) 供試したクリプトスピリジウムの種および鑄型 DNA 溶液の調整

QProbe-PCR の定量性評価のための添加オーシストには、*Cryptosporidium parvum* IOWA 株 (Waterborne, New Orleans, U.S.A.) を用いた。

添加 DNA 溶液は以下の手法で調整した。まずオーシスト濃縮液 100 μL に同量の 25% (w/v) Chelex 100 樹脂 (Bio-Rad, 東京) を添加し、凍結融解 (-80°C 5 分、95°C 5 分) を 5 回行って、オーシストから DNA を抽出した。次に、抽出液全量を、遠心式 MF 濾過ユニット (GHP Nanosep MF centrifugal device, 日本ポール, 東京) に移し、10,000 × g で 5 分間遠心分離して Chelex 100 および夾雑物を取り除いた。さらに、濾液全量を Microcon YM-100 (日本ミリポア, 東京) を用いて濃縮し、適量の超純水を加えて添加 DNA 溶液とした。

(2) 使用したプライマーおよびプローブ

Xiao ら¹⁴⁾¹⁵⁾が設計した、クリプトスピリジウムの幅広い種の 18S rDNA を增幅できるとされているプライマーを用いた。本来このプライマーは Nested PCR 用に設計されたものであり、Forward primer と Reverse primer がそれぞれ 2 つずつ存在するため、QProbe-PCR 法に適用できる組み合わせは合計 4 種類あることになる。そこで、予備実験として、それぞれの組み合わせに対して実際に PCR により鑄型 DNA を増幅し、産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。その結果、Inner-Forward プライマーと Outer-Reverse プライマーの組

み合わせが、一番効率良く鋳型 DNA を增幅でき、またプライマーダイマーの生成が少ないことが確認できたため、以降の評価ではこの組み合わせを用いた。

次に、QProbe-PCR 法で用いたプローブの設計を行った。QProbe-PCR 法は、蛍光色素 BODIPY がグアニンと結合することで蛍光が消光する現象を利用するため、プローブのどちらかの末端がシトシンである必要がある。そこで、以下の手順でプローブの設計を行った。はじめに、本プライマーと同じ配列部位を持つ遺伝子を、DDBJ データベース¹⁹⁾から NCBI-BLAST 2.0²⁰⁾により検索し、系統樹作成ソフト ClustalW 1.7²¹⁾を用いて、その全ての塩基配列に共通の部分を抽出した。次に、抽出した塩基配列の中から、プローブの Tm 値がプライマーの Tm 値より 5°C 程度高くなること、プローブが二次構造をとりにくいこと、プライマーダイマーを生成しにくいこと、以上 3 点を基準に、最適なプローブの塩基配列を決定した。Table 1 に選択したプライマーと、設計した Quenching Probe の塩基配列を示す。

Table 1. Primers for amplifying 18S rDNA of *Cryptosporidium* and Designed QProbe

Name	Sequence	Reference
Forward Primer	5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'	
Reverse Primer	5'- CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA -3'	14), 15)
QProbe	5'- CGA ACC CTA ATT CCC CGT TAC CC - BODIPY -3'	This study

(3) PCR 条件の決定と QProbe-PCR 法の定量性の評価

DNA の増幅および蛍光の検出には LightCycler (Roche Diagnostics, 東京) を用いた。QProbe PCR 法では、5'–3' エキソヌクレアーゼ活性のないポリメラーゼを使う必要があるため、DNA ポリメラーゼには KOD -Plus- (東洋紡、大阪) を用いた。反応液の総量は 20 μL とした。PCR バッファー、MgSO₄、dNTP はポリメラーゼに付属のものを使用し、Mg²⁺ 濃度は 1 mM、dNTP 濃度は各 200 nM とした。プライマー濃度は、Forward プライマーを 1000 nM、Reverse プライマーを 300 nM とし、また QProbe 濃度は 100 nM とした。

定量性の評価の前に、PCR の最適条件を決定するため、アニーリング温度を 55°C ~ 60°C の範囲で変化させて PCR を行い、検出精度と定量下限を調査した。その他の温度条件は、94°C 5 分の熱変性の後、94°C 30 秒、アニーリング時間 30 秒、68°C 60 秒のサイクルを 60 回行い、最後に 68°C 5 分で伸長を行った。

得られた最適条件を用いて、QProbe PCR 法の定量性評価を行った。各チューブへの添加 DNA 溶液は、2. 1. (1) で作成した DNA 溶液を、1 チューブあたり 6×10^3 ~ 6×10^9 [oocysts] となるように段階的に希釈して作成した。

(4) 閾値の決定方法

各サイクルで測定した蛍光強度の変化から検出サイクルを算出するため、以下の手順で、陽性と判定する消光率の閾値(Threshold line)を設定した。まず、各サイクルにおける蛍光の消光率のグラフを作成した。次に、閾値を 1% ~ 99% の範囲内で 1% 刻みで順に上げていき、それぞれの境界値から得られた検出サイクルを用いて検量線を作成した。そして、その中から最も高い相関係数を与える値を求め、最終的な閾値とした。この閾値は PCR を行う度に作成した。

2.2. RFLP 法および T-RFLP 法によるクリプトスピリジウムの種の判別

(1) 供試したクリプトスピリジウムの種

種の判別手法の評価には、国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎氏より分与していただいた *C. parvum* ウシ型 (Accession No.: AF161856)、同ヒト型 (同 AF093491)、*C. meleagridis* (同 AF112574)、*C. felis* (同 AF112575)、

C. muris、*C. sp. strain 938* (同AY120913) のゲノムDNAを用いた。これらの種は、*C. sp. strain 938*を除き全て健常なヒトへの感染が報告された種である。ただし、*C. muris*は、ウシ型かネズミ型かの情報は得られておらず、また*C. sp. strain 938*については、増幅部位の一部分の配列情報のみデータベースに登録されていた。

(2) 試料の準備

QProbe-PCRの増幅産物を、アガロースゲル電気泳動で観察したところ、鑄型DNA量が少ないサンプルでは十分な濃さのバンドを得ることができなかつた。そこで、RFLP法に適用する前に、同じプライマーで再度PCRを行って、産物を増幅した。この時のPCR反応液(50μL)の組成は、2.5U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, 東京)、10×PCRバッファー-5μL、dNTP各200nM、MgCl₂3mMとし、各プライマーコンセントラシヨンは500nMとした。温度条件は、94°C5分の熱変性の後、94°C30秒、57°C30秒、72°C60秒のサイクルを30回行い、最後に72°C5分で伸長を行つた。

(3) RFLP法によるクリプトスピリジウムの種および遺伝子型の判定

RFLP法は、PCRにより増幅されたDNAを制限酵素で切断し、その断片をアガロースゲル電気泳動により観察する手法である。そして、得られた断片長パターンをデータベースと照合することで、得られたDNAがどの種のものかを判別することができる。Xiaoら¹⁴⁾⁽¹⁵⁾は、制限酵素としてSspIとVspIを用いて、クリプトスピリジウムの種および遺伝子型のグループ分けを行つた。そこで、本研究で用いたプライマーセットにより得られるPCR産物を、これら2種類の制限酵素により切断することで、種および遺伝子型の判別を試みた。さらに、*C. muris*の遺伝子型(ウシ型、ネズミ型)の判別のため、StyIを用いたRFLPを併せて行つた。Table 2に、現在存在する13のクリプトスピリジウムの種のうち、18S rDNAの配列がデータベースに登録されている10種に対して、今回用いた3つの制限酵素で切断した場合に得られる断片長を示す。断片長パターンの類型化にあたり、断片長に5%以上の差があれば、アガロースゲル電気泳動により識別できるとした。

2.2. (2) 得られたPCR産物を、3種の制限酵素(SspI, VspI, StyI)でそれぞれ切断(37°C、2時間以上)した。切断後、アガロースゲル電気泳動により断片を観察した。そして得られたパターンをTable 2のデータベースと照合して、種の判定を行つた。

Table 2. RFLP database of *Cryptosporidium* species

Species	Host	Accession No.	RFLP in base pairs (sorted)				
			Ssp I	Type	Vsp I	Type	Sty I
<i>C. canis</i>	dog	AF112576	543, 417, 159, 105, 33, 20	A	623, 550, 104	a	712, 565
<i>C. parvum</i>	mammals	AF161856	543, 449, 159, 108, 12, 11	B	628, 550, 104	a	717, 565
<i>C. wrairi</i>	guinea pig	AF115378	543, 449, 159, 109, 11, 11	B	628, 550, 104	a	717, 565
<i>C. parvum*</i>	human	AF093491	543, 449, 159, 111, 12, 11	B	561, 550, 104, 70	b	720, 565
<i>C. meleagrididis</i>	turkey	AF112574	543, 449, 158, 108, 11, 11	B	549, 456, 171, 104	c	716, 564
<i>C. felis</i>	cat	AF112575	688, 426, 155, 33, 14	C	658, 395, 159, 104	d	747, 569
<i>C. baileyi</i>	chicken	AF093495	697, 572	D	620, 545, 104	a	709, 560
<i>C. serpentis</i>	snake	AF151376	816, 414, 33, 14	E	729, 548	e	714, 563
<i>C. muris</i>	mouse	AF093497	831, 448	F	731, 548	e	716, 513
<i>C. muris*</i>	calf	AF093496	829, 448	F	730, 547	e	562, 453, 262

*: "C. parvum human genotype" and "C. muris calf genotype" were renamed to be "C. hominis"²²⁾ and "C. andersoni"²³⁾, respectively.

3. 実験結果

3.1. QProbe-PCR 法による水中のクリプトスパリジウムの定量

アニーリング温度を変化させて、検出感度および定量下限を調査した結果、アニーリング温度が 57°C 以下のときは、初期添加量 6×10^3 [oocysts/tube] の試料の Ct 値が約 32 サイクル前後だったのに対し、それ以上では 40 サイクル前後まで低下し、また、低濃度の試料では産物の生成が見られなかった。一方、アニーリング温度が 57°C より低いときは、非特異産物の増幅により、プローブの消光率（対象 DNA の産物生成量）が低下した。以上の結果より、57°C の場合が、精度・感度両方の面から見て最適であると判断した。

Figure 1 に、この条件下における、各 PCR サイクルで測定した蛍光の減少量の、初期蛍光強度に対する割合を示す。図中の“Threshold Line”とは、2.1. (4) で述べた手法で作成した「閾値」を指す。また Figure 2 に、この図から得られた検出サイクルと添加した錆型 DNA 量の関係から得た検量線を示す。

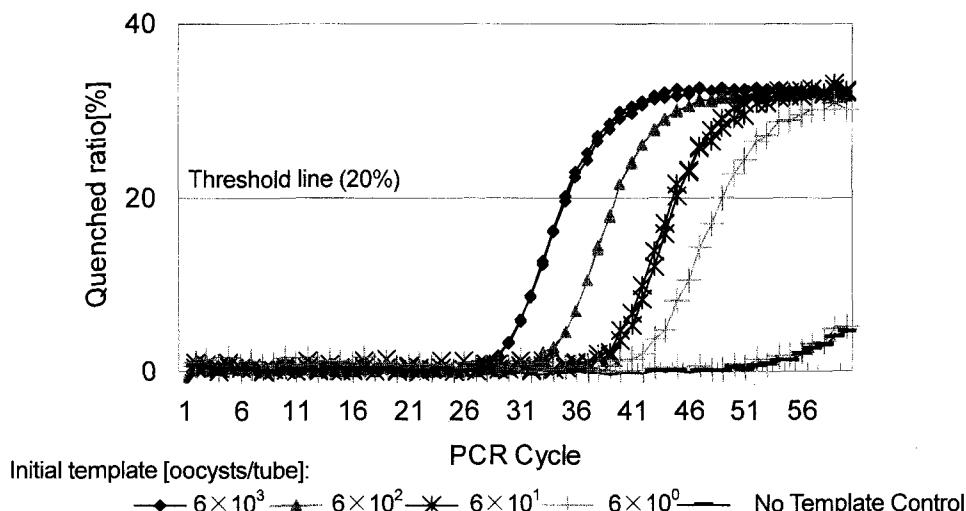


Figure 1. Amplification plots of *Cryptosporidium* 18S rDNA by QProbe-PCR with annealing temperature at 57°C ($n=2$ for each condition except NTC).

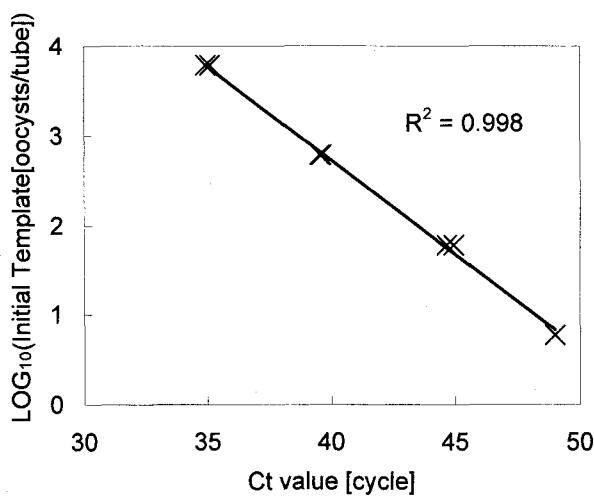


Figure 2. Standard line for QProbe PCR derived from amplification plots in Figure 1.

Figure 1において、初期添加 DNA 量 6×10^3 ~ 6×10^4 [oocysts/tube]の試料については、全て鑄型 DNA を検出することができた。しかし、 6×10^0 [oocyst/tube]の試料は、2 つのうち 1 つからのみ産物由来の消光を検出できた。以上より、今回の試験における本手法の検出下限は 6×10^1 [oocysts/tube]であるといえる。また、Figure 2を見ると、今回行った濃度域全域において、検量線の決定係数が 0.998 と非常に高かった(有意確率 $p < 0.001$)。したがって、本手法により、初期 DNA 添加量を、非常に精度良く測定することができたといえる。

以上の結果より、今回開発した 18S rDNA をターゲットとした QProbe-PCR 法により、水中のクリプトス・ポリジウムを高精度・高感度で定量できることが示された。

3.2. RFLP 法による種および遺伝子型の判別

Figure 3 に、実際にアガロースゲル電気泳動により得られた断片長パターンを示す。*Ssp* I および *Vsp* I の *C. muris*、および *Sty* I の *C. meleagridis*、*C. felis*、*C. sp. strain 938* では、切断されずに残った産物のバンドが 1280bp 付近に薄く見られた。また、全ての制限酵素に対する *C. meleagridis* の断片長パターンにおいて、予想より短い領域に 2 本（約 350bp と約 230bp 付近）のバンドが見られた。これに関しては、制限酵素を加えていない系（No enzyme control, Figure 3d）においても同じ長さのバンドが見られたことから、PCR で生じた非特異産物に由来するバンドであると判断した。

C. parvum ウシ型、ヒト型および *C. meleagridis* は、*Ssp* I の切断に対して同じような断片長パターン（534bp, 449bp, 159bp, Type B）を示した（Figure 3a）。一方 *C. felis* と *C. muris* は、それぞれ他とは異なるパターン（そ

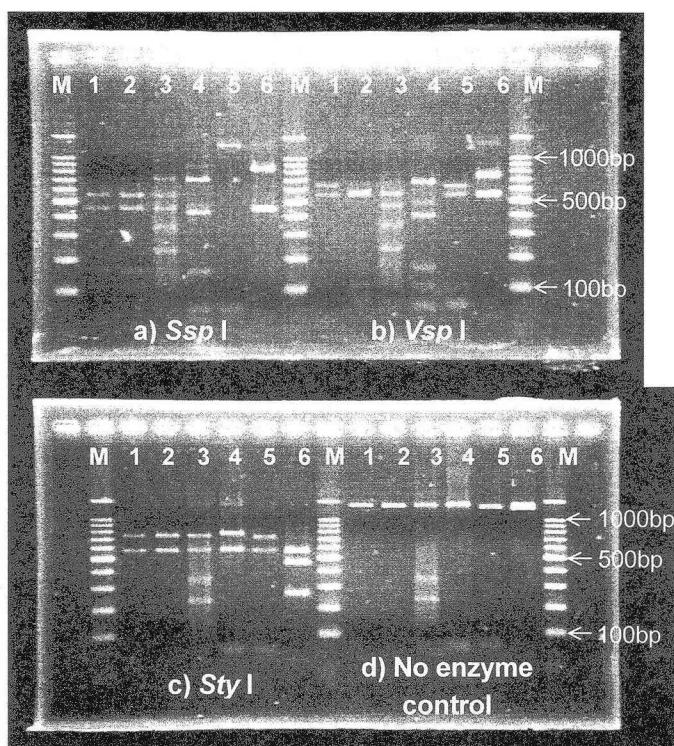


Figure 3. Restriction fragments patterns of *Cryptosporidium* spp. by agarose gel (2%) electrophoresis.

- | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 1: <i>C. parvum</i> bovine genotype | 2: <i>C. parvum</i> human genotype | 3: <i>C. meleagridis</i> |
| 4: <i>C. felis</i> | 5: <i>C. sp. strain 938</i> | 6: <i>C. muris</i> |
| M: 100bp DNA Ladder | | |

それぞれ Type C、Type F) を示しており、今回用いた種の中での判別が可能であった。*C. sp. strain 938* に関しては、今回増幅した領域全域についての塩基配列が得られていないため、理論上の断片長パターンはわからないが、一部の塩基配列に関する情報から、少なくとも 33bp の断片が存在することが予想された。*Ssp I* の断片長パターン (Figure 3 a)) を見ると、1250bp 付近にバンドが見られるだけで、33bp の断片はプライマーダイマーと重なって確認できなかった。以上より、この株に関しては、33bp の断片を生じている可能性はあるが、それ以外の場所では切断されないことがわかった。

Figure 3b) の *Vsp I* による切斷断片長パターンを見ると、*C. parvum* ウシ型と *C. sp. strain 938* で同様のパターン (628bp, 550bp、Type c) が見られた他は、それぞれ独自のパターンを示した。

Sty I による切斷断片長パターン (Figure 3c) は、長い方の断片長が種によって多少異なるものの、*C. muris* を除く全ての種で似ていた (707~747bp と 564~569bp)。*C. muris* は、全ての種で共通な断片長である約 560bp のバンドの他に、450bp 付近と 260bp 付近にバンドが見られた。Table 2 の *C. muris* のウシ型とネズミ型の断片長パターンと比較することにより、この *C. muris* はウシ型である可能性が高いと考えられる。

以上より、制限酵素 *Ssp I*、*Vsp I* を用いた RFLP 法により、遺伝子配列がわかっている 4 つの種または遺伝子型 (*C. parvum* ヒト型、ウシ型、*C. meleagridis*、*C. felis*) をそれぞれ区別することができた。また、新たに *Sty I* を用いることで、*C. muris* の遺伝子型（ウシ型、ネズミ型）の判定が可能であることがわかった。

4. 考察

4.1. QProbe-PCR 法によるクリプトスピリジウムの定量について

本研究で開発したクリプトスピリジウムの 18S rDNA を対象とした QProbe-PCR 法は、非常に高い精度 (決定係数 $R^2=0.998$) を持っていることが明らかとなった。また定量下限については、今回の試験結果から 6×10^1 [oocysts/tube] としたが、 6×10^0 [oocysts/tube] の試料からも定量性のある検出結果が得られていること、また、今回はそれ以下の添加量では試験していないことから、実際の定量下限はより低い可能性もある。

比較のため、同じ塩基配列のプライマーおよびプローブを使用して、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法による定量を試みた。このとき、PCR 反応液の作成には PCR Master Mix を使用し、温度条件は QProbe-PCR 法と同じとした。その結果、初期添加量 6×10^3 ~ 6×10^0 [oocysts/tube] のいずれの試料からも蛍光を検出することができなかった。また、他の遺伝子配列に対する TaqMan プローブを用いた手法²⁴⁾²⁵⁾の定量下限は、およそ 5 [oocyst/tube] であった。したがって、今回開発した QProbe-PCR 法は、検出精度・検出感度の両方の面において、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と同等であるといえる。

さらに、一般に、TaqMan プローブを用いた手法は、増幅する塩基配列の長さをあまり長くできないと言われている。実際、QProbe 法で用いた増幅部位に対して、TaqMan プローブを用いた手法では意味のある蛍光が得られなかつた。一方、QProbe-PCR 法を用いた本手法は、約 1280bp の DNA を対象にすることができた。これは、以下の 2 つの面で優れた特徴であるといえる。まず、得られた PCR 産物を、今回行った RFLP 法やその他の遺伝子工学的手法に適用することで、遺伝子配列に関する情報を得られるという点である。本研究では、この点に関して、RFLP 法によりクリプトスピリジウムの種や遺伝子型の判定を行えることを示した。次に、プローブの設計に際し、TaqMan プローブの配列を決定する場合と比較して、配列選択の自由度が高いという点が挙げられる。これにより、二次構造のとりにくさやダイマーの生成しにくさの面で、より優れたプローブを設計しやすくなる。今回作成した系において 1280bp の長さの配列を対象にできたのも、この特徴に負うところが大きいと考えられる。

ただし、本手法は、既存の TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と同様、試料中のクリプトスピリジウムの DNA を測定対象としているため、検出されたクリプトスピリジウムの生死や、ヒトへの感染力を評価することはできない。

4.2. RFLP 法による種の判別について

制限酵素 *Ssp* I、*Vsp* I を用いた RFLP 法により、ヒトへの感染例が報告されている 5 つの種または遺伝子型 (*C. parvum* ヒト型、ウシ型、*C. meleagridis*、*C. felis*、*C. muris*) を識別することができた。また、*Sty* I を用いることで、*C. muris* の遺伝子型（ウシ型、ネズミ型）の判定することができることがわかった。そこで、今回用いなかつたその他の種 (*C. canis*、*C. wrairi*、*C. baileyi*、*C. serpentis*、*C. muris* ネズミ型) についても、*Ssp* I、*Vsp* I、*Sty* I による RFLP 法により、種ごとの識別が可能であるかを調べた。

Table 2 の切断パターンの類型を見ると、10 種のうち、*C. parvum* と *C. wrairi* を識別することはできないものの、残りの 8 種については、断片長パターンからの種の判定が可能であることがわかった。したがって、この 3 種の制限酵素を用いた RFLP 法により、現存する種の多くを判別することができると考えられる。

4.3. 本手法の適用可能性について

本研究で開発した、QProbe-PCR 法と RFLP 法を組み合わせた手法により、純粋な系において、試料中に存在していたクリプトスピリジウムの存在量と、その種および遺伝子型を、同時に測定することが可能であることが示された。既存の手法では、これらの情報を同時に得ることは不可能とされていた。例えば TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法では、定量評価は可能であるが、得られる增幅産物が短いため、種や遺伝子型の判別を行うことができない。また PCR-RFLP 法などの既存の種の判別手法では、鑄型 DNA を、定量的でない PCR 法により増幅するため、定量的な情報を得ることができない。

本手法の限界として、多数の種が同一試料に含まれていた場合、断片長パターンの相違が見極めにくくなり、全ての種を識別できない可能性が懸念される。しかし、実河川水および湖沼水試料に対して行ったクリプトスピリジウム検出結果²⁴⁾を見ると、陽性であった 25 試料のうち、複数の種または遺伝子型が含まれていたのは 10 試料で、それらは全て 2 種類の混合であった。Table 2 の切断パターンから考えると、2 種の混合であった場合は、理論的には、どの組み合わせであってもそれぞれを識別できると思われる。

また、本手法も、PCR を用いる他の手法と同様に、PCR バイアス等により、試料中に存在する全ての種を、元の存在割合を保ったまま検出することは不可能である。したがって、仮に試料水中に多数の種が存在した場合でも、その中で優占している種のみを検出してしまう可能性がある。しかし、一般に水道水源中のクリプトスピリジウム濃度は非常に低く、同一試料から多数のオーシストが検出されることは稀なため、このようなことが発生する確率は低いと考えられる。

以上より、今回開発した手法を水道水源に適用すれば、試料中のクリプトスピリジウムの存在量についての情報と、その種あるいは遺伝子型についての情報を同時に得ることができる。水道水摂取による感染リスクを評価するうえで非常に重要な手法を得たといえる。

謝辞： 本研究を行うにあたり、クリプトスピリジウムの DNA を分与してくださった国立感染症研究所 寄生動物部の遠藤 卓郎、八木田 健司の両氏、および QProbe-PCR 法の手法確立にあたり多大な協力を頂いた環境エンジニアリング株式会社の十川 英和、藏田 信也の両氏に深く謝意を表する。

なお本研究は、厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「クリプトスピリジウム等による水系感染症に係わる健康リスク評価及び管理に関する研究」(代表・国包章一) の補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. and Davis, J.P.: A Massive Outbreak In Milwaukee Of *Cryptosporidium* Infection Transmitted Through The Public Water-supply, *New England Journal of Medicine*, Vol. 331, Iss. 3, pp. 161-167, 1994.
- 2) 埼玉県衛生部：「クリプトスピリジウムによる集団下痢症」—越生町集団下痢症発生事件—報告書, 1997.
- 3) Xiao, L.H., Fayer, R., Ryan, U. and Upton, S.J.: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public

- health, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 17, Iss. 1, pp. 72-97, 2004.
- 4) Katsumata, T., Hosea, D., Ranuh, I.G., Uga, S., Yanagi, T. and Kohno, S.: Short report: Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 62, Iss. 1, pp. 70-72, 2000.
 - 5) Pedraza-Diaz, S., Amar, C.F.L., McLauchlin, J., Nichols, G.L., Cotton, K.M., Godwin, P., Iversen, A.M., Milne, L., Mulla, J.R., Nye, K., Panigrahl, H., Venn, S.R., Wiggins, R., Williams, M. and Youngs, E.R.: *Cryptosporidium meleagridis* from humans: Molecular analysis and description of affected patients, *Journal of Infection*, Vol. 42, Iss. 4, pp. 243-250, 2001.
 - 6) Xiao, L.H., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H. and Lal, A.A.: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru, *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 183, Iss. 3, pp. 492-497, 2001.
 - 7) Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J. and McLauchlin, J.: Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium 'dog type'* from patients in England, *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 50, Iss. 3, pp. 293-296, 2001.
 - 8) Messner, M.J., Chappell, C.L. and Okhuysen, P.C.: Risk assessment for *Cryptosporidium*: A hierarchical Bayesian analysis of human dose response data, *Water Research*, Vol. 35, Iss. 16, pp. 3934-3940, 2001.
 - 9) U.S. EPA: Method 1623: *Cryptosporidium* and Giardia in water by Filtration / IMS / IFA, 2001.
 - 10) Higgins, J.A., Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L.H., Lal, A.A., Kerby, S. and Jenkins, M.C.: Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 47, Iss. 3, pp. 323-337, 2001.
 - 11) Fontaine, M. and Guillot, E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 214, Iss. 1, pp. 13-17, 2002.
 - 12) Morgan, U.M., Constantine, C.C., O'Donoghue, P., Meloni, B.P., Obrien, P.A. and Thompson, R.C.A.: Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Humans and Other Animals Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 52, Iss. 6, pp. 559-564, 1995.
 - 13) Gasser, R.B., Zhu, X.Q., Caccio, S., Chalmers, R., Widmer, G., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Pozio, E. and Browning, G.F.: Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions, *Electrophoresis*, Vol. 22, Iss. 3, pp. 433-437, 2001.
 - 14) Xiao, L.H., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. and Lal, A.A.: Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 8, pp. 3386-3391, 1999.
 - 15) Xiao, L.H., Escalante, L., Yang, C.F., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R. and Lal, A.A.: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 4, pp. 1578-1583, 1999.
 - 16) 杉本 ひとみ, 橋本 温, 森田 重光, 平田 強: 下水から単離した *Cryptosporidium* オーストの遺伝子型の解析, 第38回日本水環境学会年会講演集, p. 106, 2004.
 - 17) Torimura, M., Kurata, S., Yamada, K., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kanagawa, T. and Kurane, R.: Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base, *Analytical Sciences*, Vol. 17, Iss. 1, pp. 155-160, 2001.
 - 18) Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y. and Kurane, R.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, Iss. 6, pp. e34, 2001.
 - 19) Miyazaki S., Sugawara H., Gojobori T., Tateno Y.: DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in XML, *Nucleic Acids Research*, Iss. 30, Vol. 1, pp. 13-16, 2003.
 - 20) Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, pp. 3389-3402, 1997.
 - 21) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.: CLUSTALW, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
 - 22) Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A. and Xiao, L.H.: *Cryptosporidium hominis* n. sp (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 49, Iss. 6, pp. 433-440, 2002.
 - 23) Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R. and Blagburn, B.L.: *Cryptosporidium andersoni* n. sp (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 47, Iss. 1, pp. 91-95, 2000.
 - 24) Fontaine, M. and Guillot, E.: Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 214, Iss. 1, pp. 13-17, 2002.
 - 25) Fontaine, M. and Guillot, E.: An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples, *Journal Of Microbiological Methods*, Vol. 54, Iss. 1, pp. 29-36, 2003.
 - 26) Xiao, L.H., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T.K., Gradus, S. and Lal, A.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, Iss. 3, pp. 1097-1101, 2001.