

(65) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法による水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型判別手法の開発

Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in water by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

真砂 佳史^{*}、小熊 久美子^{*}、片山 浩之^{*}、大垣 眞一郎^{*}

Yoshifumi MASAGO^{*}, Kumiko OGUMA^{*}, Hiroyuki KATAYAMA^{*} and Shinichiro OHGAKI^{*}

ABSTRACT; A new genotyping method of *Cryptosporidium*, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by DNA sequencing, was developed to genotype *Cryptosporidium* spp. in river water. The DGGE method could successfully discriminate nine species of *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. sp. strain 938*, *C. andersoni*, *C. serpentis* and *C. saurophilum*. The sequential combination of the QProbe PCR method for quantification; and the DGGE method and DNA sequencing for genotyping, enabled the simultaneous quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in the same water sample. This method was applied to analyze *Cryptosporidium* in the Koyama River, a tributary of the Tone River, both for the total concentration of organisms, and for their genotype. Seven *Cryptosporidium* genotypes (*C. andersoni*, *C. sp. strain 938*, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. sp. PG1-26*, *C. sp. t03*, *C. sp. t04*) were found in 11 positive samples (positive ratio = 69%). A bovine specific species, *C. andersoni*, was found most frequently (7 samples). The genotypes infectious to human accounted for only 16% of the concentration of all genotypes. These results showed that this detection method could provide valuable information on *Cryptosporidium* in river water both in the quantity and in the genotypes, which is essential for the precise assessment of waterborne risk to human health.

KEYWORDS; *Cryptosporidium*, genotyping, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

1. 研究の背景

1984年に、テキサス州で最初のクリプトスポリジウムによる感染症患者が報告されて¹⁾以来、クリプトスポリジウムによる大規模な感染症集団発生が世界各地で発生している。これまでに発生した中で最も大きな被害を出したのは、1993年3月にアメリカ合衆国ウィスコンシン州ミルウォーキー市で発生した事例である²⁾。この事例では、人口161万人のうち403,000人が発症したと報告されている²⁾。この集団発生による経済的な損失は総計9,620万ドルに達したと試算されている⁴⁾。後の調査により、この集団発生の原因となったのは、ヒトに特異的に感染する*C. hominis* (*C. parvum* genotype I)であったことが示されている⁵⁾。国内でも、1996年に埼玉県越生町全町民13,800人中8,800人以上が感染したという事例が報告されている⁶⁾。本事例も、ミルウォーキー市の事例と同様に、水道水が*C. hominis*により汚染されたことが原因となって発生したことが確認されている⁷⁾。

クリプトスポリジウムの分類に関しては、2004年の報告に限っても、その分類方法や総数がまちまちである⁸⁻¹¹⁾が、例えばXiaoら⁸⁾の分類法にしたがうと、現在クリプトスポリジウム属には13の種が存在して

* 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)

† 現在の所属：東北大学大学院工学研究科土木工学専攻

(Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

おり、その宿主は哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類と多岐にわたる。この中で、ヒトへの感染のほとんどは、*C. parvum* (*C. parvum* genotype II) または *C. hominis* によるものであるとされている。これ以外の種では、*C. meleagridis*^{7,12-17)}、*C. felis*^{15,18)}、*C. canis*^{15,18)}、*C. muris*¹⁹⁾、*C. sp. pig genotype*²⁰⁾、*C. sp. deer genotype*²¹⁾、*C. sp. monkey genotype*²²⁾がヒトに対して感染した例が報告されている。このように、一口にクリプトスポリジウムといっても、その中には多くの種が存在し、ヒトに対して感染力を持つ種はそのうちごく一部である。したがって、環境中、例えば水中のクリプトスポリジウムの動態を評価するにあたり、その種・遺伝子型について調査することが重要である。

これまでに、水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別のための手法が開発されてきた（例えば restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法^{23,24)}、single strand conformational polymorphism (SSCP) 法²⁵⁻²⁷⁾、クローニングシーケンシング法^{23,24,28,29)}）。しかし、これらの手法には、技術的、あるいは実用的な面で限界があることが指摘されている。例えば RFLP 法では、その識別能力が増幅領域内部に存在する制限酵素が切断する部位の数に依存しているため、識別可能な種・遺伝子型に限界が存在する³⁰⁻³³⁾。SSCP 法は、1 本鎖の状態で電気泳動を行うという特質上、単一の種が複数のバンドを形成する²⁵⁾ため、多数の種を対象とした判別手法の確立には至っていない。クローニングシーケンシング法は、1 つの試料から得られた多数のクローン DNA についてシーケンシングを行う必要があるため、多数の検体からの検出には非常に費用がかかる。現在、これらの問題を解決し得る新しい種・遺伝子型の判別手法の確立が望まれている。

以上の背景を受けて、本研究では、クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の類別に Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法を適用し、シーケンシング法と組み合わせることで、水中のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を判別する手法を開発した。そして、その手法を実河川水に対して適用することで、開発した手法の有用性を評価すると共に、国内の河川水中に存在するクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を調査した。

2. 実験手法

2. 1. DGGE 法による種・遺伝子型の類別力調査

(1) 供試したクリプトスポリジウムの種・遺伝子型

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* (Accession No.: AF161856)、*C. hominis* (同 AF093491)、*C. canis* (同 AF112576)、*C. meleagridis* (同 AF112574)、*C. felis* (同 AF112575)、*C. sp. strain 938* (同 AY120913)、*C. andersoni* (同 AB089285)、*C. serpentis* (同 AF093502)、*C. saurophilum* (同 AF112573) のゲノム DNA を用いた。分与されたゲノム DNA を、QProbe PCR 法で使用するプライマーで増幅し、DGGE 法に供する試料とした。PCR 条件は既報³³⁾にしたがった。DGGE 法によりこれら 9 種類のゲノム DNA を類別できるかどうかを調査するため、試験には、これら 9 種類のゲノム DNA を単独で使用した試料と、全てのゲノム DNA を混合した試料の両方を用いた。

(2) DGGE 法による種・遺伝子型の類別手法

DGGE 法で解析対象とする遺伝子増幅領域は、クリプトスポリジウムに対して特異的であるのと同時に、種・遺伝子型の差による遺伝子配列の違いが大きい領域である必要がある。本研究では、クリプトスポリジウムの 18S rRNA 遺伝子のうち 295bp (*C. parvum* IOWA 株の場合)を増幅するプライマー²⁸⁾を使用した(表 1)。この増幅領域は、シーケンシング法による種・遺伝子型の判別に適用例があり²⁸⁾、また QProbe PCR 法で増幅する領域の内部に位置するため、QProbe PCR 法で得られた増幅産物に対して適用することが可能である。

GC クランプは、Muyzer ら³⁴⁾のもの(表 1)を使用した。この GC クランプを、フォワードプライマーにつけたものと、リバースプライマーにつけたものをそれぞれ用意し、予備実験を行った。その結果、フォワードプライマーに GC クランプをつけた試料は、DGGE において明瞭なバンドを生成したのに対し、リバ

表1 DGGE に用いたプライマーおよび GC クランプの塩基配列

Name	Sequence	Position in 18S rRNA gene of <i>C. parvum</i> (AF164102)	Reference
フォワード	AGT GAC AAG AAA TAA CAA TAC AGG	445 – 468	28
リバーズ	CCT GCT TTA AGC ACT CTA ATT TTC	716 – 739	
GC クランプ	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC		34
	GGG GCG GGG GCA CGG GGG G		

ースプライマーに GC クランプをつけた試料は、バンドを生成しなかった。そこで、以下の実験では、フォワードプライマーの 5'末端に GC クランプをつけたものを用いた。

DNA の増幅には T3 Thermocycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany) または GeneAmp9600 (Applied Biosystems, 東京) を用いた。PCR 反応液 (50 μ L) の組成は、2.5[U] AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, 東京)、10 $\times$ PCR バッファー5[μ L]、dNTP 各 200[nM]、MgCl₂ 2[mM]、テンプレート DNA (QProbe PCR 産物) 1 [μ L]とし、各プライマー濃度は 500[nM]とした。温度条件は、94°C5 分の熱変性の後、94°C30 秒、60°C30 秒、72°C30 秒のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C5 分で伸長を行った。

ゲルの作成および電気泳動は、Dcode システム (Bio-Rad, 東京) を用いて行った。変性剤 (ホルムアミド、尿素) 濃度範囲は 5%~25%とし (変性剤濃度 100%とは、ホルムアミド 20[mL/50mL gel sol.]、尿素 7[M]に相当する)、泳動条件は、130[V]、60[°C]で 10[hour]とした。泳動後、ゲルを Vistra Green (GE healthcare, 東京) で染色し、蛍光イメージアナライザーFluorImager595 (GE healthcare, 東京) で画像を取り込み、付属のソフトウェアで画像解析を行った。

2. 2. 小山川における現地調査

(1) 調査地点の概要

測定試料は、小山川中流部の高橋 (埼玉県深谷市大字矢島) にて採取した。調査は、2004 年 8 月から 10 月までの 3 ヶ月間に合計 4 回行った。各測定日に 1 時間半間隔で連続的に 4 つの試料を採取することで、合計 16 の試料を得た。小山川は、利根川の支流のひとつで、武蔵水路の取水口である利根大堰の上流約 15km の地点で利根川右岸に流入している。試料採取地点の上流側に位置する市町村 (埼玉県本庄市、上里町、美里町、児玉町、神川町、岡部町) の市町村の人口は合計 156,000 人であった (平成 15 年 6 月)。

(2) 河川水の濃縮および夾雑物の除去

試料水を、ポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュール (孔径 0.1[μ m]、有効濾過面積 4,000[cm²]、三菱レイヨン、東京) で濾過した。濾過時間は約 1 時間とし、濾過速度は、U.S.EPA^{35,36)}が推奨している 2 [L/min]という上限を超えていないことを確認した。これにより、およそ 30~70[L]の河川水を膜に通水し、その中に含まれている懸濁物質を回収することができた。

得られた懸濁液を遠心分離 (1,050 $\times$ g、10 [min]) により濃縮し、高密度 Percoll-ショ糖溶液を用いた密度勾配遠心法と免疫磁気ビーズ法を組み合わせた手法 (PS-IMS 法)³⁷⁾により精製した。本手法は、八木ら³⁸⁾の手法を改変したもので、大容量の水試料に対して適用しても、高いオーシスト/シスト回収率を得ることができるとされている。免疫磁気ビーズを用いたクリプトスポリジウムの精製には、U.S.EPA により定められた手法³⁶⁾に従い、Dynabeads CG-Combo Kit (Dynal Biotech, Oslo, Norway) を用いた。

(3) DNA 抽出および濃縮

25% (w/w) の Chelex 100 樹脂 (Bio-Rad, California, U.S.A.) 懸濁液 100 [μL] を、精製済みの試料 100[μL] に添加し、凍結融解 (-80℃、95℃、5 回) によりオーシストからゲノム 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, Pall, 東京) に移し、10,000×g で 5 分間遠心分離して Chelex 100 樹脂および夾雑物を取り除いた。濾液を DNA 精製キット (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, 東京) で精製したのち、液全量を遠心式フィルターユニット (Microcon YM-100, Millipore, 東京) に移し、500×g で 25 分間遠心分離した。最後に、フィルター部分に 10[μL] の超純水を加えてから上下逆向きにセットし、500×g で 3 分間遠心分離して濃縮 DNA を得た。最終液量は約 10[μL] となった。

(4) クリプトスポリジウムの検出、種・遺伝子型の判別

QProbe PCR 法により、試料中のクリプトスポリジウム濃度を定量した。実験条件は既報³³⁾にしたがった。ただし、プライマー濃度をフォワードプライマー濃度 600[nM]、リバープライマー濃度 200[nM] に変更した。その結果、検出下限は 0.83[oocyst/tube]、定量下限は 2.5[oocyst/tube] にそれぞれ改善された。

DGGE 法は、2. 1. (2) で示した手法で行った。必要に応じて PCR と DGGE を繰り返し、DGGE で単一のバンドが観察されるまで、DNA の精製を行った。得られた DNA 断片を、Montage PCR m96 プレート (Millipore, 東京) で精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 東京) を用いたシーケンシング反応を行った。反応後の液を Montage SEQ プレート (Millipore, 東京) で精製してシーケンシングに供した。シーケンシングは、ABI 3100 (Applied Biosystems, 東京) で行った。

(5) ポアソン分布を基にした最尤法 (MPN 法) による種・遺伝子型ごとの濃度推定

(4) で示した手法は、ある試料中に存在する全ての種・遺伝子型を合わせた濃度と、その試料中に存在する種・遺伝子型を検出できるが、個々の種・遺伝子型の濃度を知ることができない。そこで、以下の手法で、河川水中のそれぞれの種・遺伝子型の存在濃度を推定した。

ある種・遺伝子型の河川水中の存在濃度は、時間によらず一定で、 x [oocyst/100L] であるとする。また、濃縮および精製操作における回収率は考慮せず、また検出下限は 1[oocyst/sample] であるとする。このとき、ある試料 (検査水量 V [L]) 中から、その種・遺伝子型が検出される確率 $P_{positive}$ 、および検出されない確率 $P_{negative}$ は、ポアソン分布の確率分布関数より、それぞれ以下の式 (1) で計算できる。

$$P_{positive}(x, V) = 1 - \exp\left(-\frac{x \times V}{100}\right), \quad P_{negative}(x, V) = \exp\left(-\frac{x \times V}{100}\right) \quad \text{式 (1)}$$

ただし、 x : 河川水中のクリプトスポリジウム濃度 [oocyst/100L]、 V : 試料水量 [L]

最尤法の原理により、河川水中に存在する、ある種・遺伝子型の濃度の推定値は、下式 (2) の $-LN$ の値を最小にする x に等しい。

$$-LN = -\sum_{i=1}^n \ln(F(x, V_i)) \quad \text{式 (2)}$$

ただし、 V_i : i 番目の試料の試料水量 [L]、 n : 試料数 (ここでは $n=16$)

$$F(x, V_i) = \begin{cases} P_{positive}(x, V_i) & \text{when the } i \text{ th sample was positive for } \textit{Cryptosporidium} \\ P_{negative}(x, V_i) & \text{when the } i \text{ th sample was negative for } \textit{Cryptosporidium} \end{cases}$$

この操作を、小山川の試料から検出された全ての種・遺伝子型に対してそれぞれ行い、個々の存在濃度の推定値を算出した。

3. 実験結果

3. 1. DGGE 法による種・遺伝子型の類別能力の評価

図1に、DGGE により得られたゲルの画像を示す。全ての配列が、変性剤濃度がおおよそ 8%~20%のところにバンドを生成した。全てのバンドが作成した変性剤濃度域にあったことと、バンドの生成位置が濃度域全体に分散していたことから、この実験条件が、本研究で評価対象とした DNA 領域に対する DGGE 法として適していることが確認された。

ほとんどの種は、明瞭な1本のバンドを生成したが、*C. andersoni* は、明瞭な1本のバンドのみが見られた試料（レーン7）と、1本の濃いバンドと、2本の薄いバンドの計3本を生成した試料（レーン8）が見られた。小山川で得た試料においても同様の傾向が見られたことから、この種については、同じ塩基配列ではあるが、なんらかの要因で3本のバンドを生じることがあることが示された。

それぞれの種・遺伝子型のバンドの位置を見ると、いくつかの種が近い位置（変性剤濃度）にバンドを生成したことがわかる。たとえば、*C. parvum*、*C. hominis*、*C. canis* が非常に近い位置にバンドを生成した。しかし、9 種類を混合した試料（レーン11）を見ると、それぞれが違う位置にバンドを生成していることから、仮に同一試料にこれらの種・遺伝子型が混在していても、それを類別することが可能であるといえる。

以上より、本研究で開発した DGGE 法により、今回使用した 9 種類の種・遺伝子型をそれぞれ他の種由来のバンドと識別することが可能であるといえる。

3. 2. 小山川における調査結果

表2に、各試料の検査水量、QProbe PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出結果、および検出された

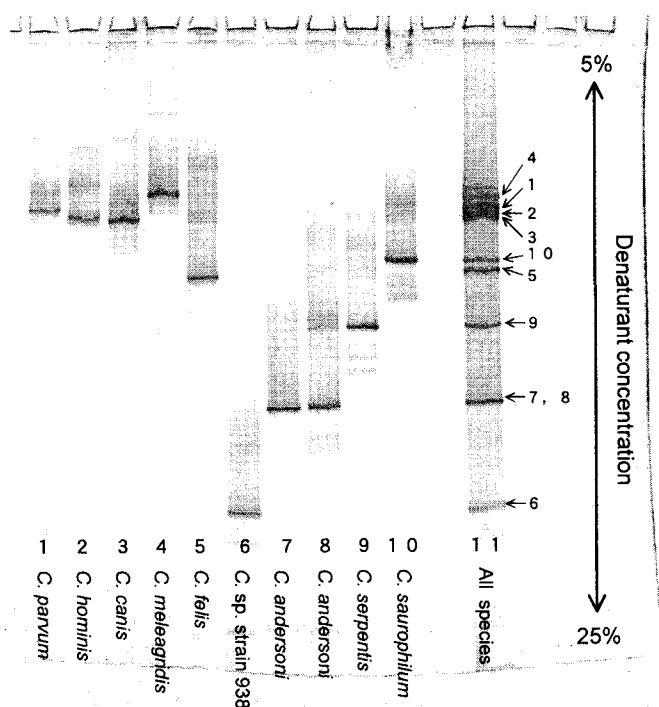


図1 DGGE法による種・遺伝子型の類別（DGGEゲル写真）

（種名の上の数字は本文中のレーン番号を示す。

レーン11右側の数字は、それぞれのレーン番号の試料と同じであることを示す。）

表2 小山川でのクリプトスポリジウム調査結果

採水開始時間	検査水量 [L]	検出結果 ^a	検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型 ^b			
8/3 11:00	45.2	—				
8/3 12:30	32.0	—				
8/3 14:00	43.3	+	<i>C. hominis</i> ^c	C. sp. 938		
8/3 15:30	33.5	+	C. sp. 938			
8/26 11:00	56.3	—				
8/26 12:30	43.1	—				
8/26 14:00	37.8	—				
8/26 15:30	65.1	+	<i>C. andersoni</i>			
9/16 10:30	41.6	+	<i>C. andersoni</i>			
9/16 12:00	47.4	+	<i>C. parvum</i> ^c	C. sp. 938		
9/16 13:30	47.4	+	<i>C. andersoni</i>			
9/16 15:00	66.1	+	C. sp. PG1-26			
10/27 10:45	30.9	59	<i>C. andersoni</i>	C. sp. 938	C. sp. t03	C. sp. t04
10/27 12:15	53.4	+	<i>C. andersoni</i>			
10/27 13:45	23.8	+	<i>C. andersoni</i>	<i>C. parvum</i> ^c		
10/27 15:15	44.9	14	<i>C. andersoni</i>			

a —：非検出、+：検出、ただし濃度は定量下限（2.5[oocysts/sample]）以下のため不明、数値：検出、定量下限以上（値は濃度 [oocysts/100L]）

b それぞれの種の遺伝子配列：

C. parvum (AF164102)、*C. hominis* (AY204231)、*C. andersoni* (AB089285)、

C. sp. 938 (AY120913)、*C. sp. PG1-26* (AY271721)、*C. sp. t03* (AB231612)、*C. sp. t04* (AB231613)

c 網掛け部は、ヒトへの感染が報告されている種を示す。

クリプトスポリジウムの種・遺伝子型を示す。クリプトスポリジウムは、16 試料中 11 試料から検出された（試料陽性率 69%）。また DGGE-シーケンシング法により、合計 7 種類の遺伝子配列が検出された。そのうち 3 種類は既存の 3 つの種（*C. parvum* (AF164102)、*C. hominis* (AY204231)、*C. andersoni* (AB089285)）の遺伝子配列と一致した。2 種類（*C. sp. 938* (AY120913)、*C. sp. PG1-26* (AY271721)）は、まだどの種にも分類されていない遺伝子型であり、残りの 2 種類（*C. sp. t03* (AB231612)、*C. sp. t04* (AB231613)）は、*C. sp. 1665* と相同性の高い（共に 97%）未知の配列であった。同一試料に複数の種・遺伝子型が含まれていたのは陽性 11 試料中 4 試料で、そのうち 3 試料は 2 種類の遺伝子配列、残りの 1 試料では 3 種類の遺伝子配列が検出された。最も多く検出されたのは、ウシに特異的に感染するとされる *C. andersoni*（7 試料、44%）で、以下 *C. sp. 938*（4 試料、25%）、*C. parvum*（2 試料、13%）の順となった。*C. hominis*、*C. sp. PG1-26*、*C. sp. t03*、*C. sp. t04* の近縁種はそれぞれ 1 試料ずつからのみ検出された。ヒトへの感染が報告されている種・遺伝子型では、*C. parvum* と *C. hominis* の 2 種類が、計 3 試料（19%）から検出された。

図 2 に、ポアソン分布に基づいた最尤法（MPN 法）により推定した、個々の種・遺伝子型の濃度を示す。最も濃度が高かったのは、検出数が最も多かった *C. andersoni*（16 試料中 7 試料から検出）で、1.3 [oocysts/100L] であった。次いで、*C. sp. 938*（同 4 試料）の 0.63 [oocysts/100L]、*C. parvum*（同 2 試料）の 0.30 [oocysts/100L] の順となった。全ての種を合わせたクリプトスポリジウム濃度は 2.8[oocysts/100L] であったのに対し、ヒトに対する感染力のある種のみ濃度は 0.44[oocysts/100L] であり、全体の約 16% であった。

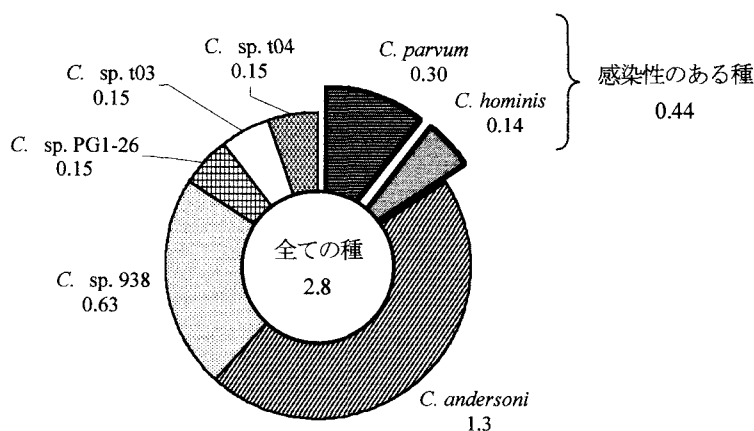


図2 小山川における種・遺伝子型ごとの存在濃度
(ポアソン分布を基にした最尤法 (MPN 法) での推定結果、単位 [oocysts/100L])

4. 考察

4. 1. 小山川におけるクリプトスポリジウムの存在状況

本研究では、自然由来のクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を類別する手法として、DGGE 法を初めて適用した。その結果、河川水中に存在するクリプトスポリジウムの種・遺伝子型を、精度よく検出、判別することができた。また、定量値として、検出されたクリプトスポリジウム全体の濃度だけではなく、個々の種・遺伝子型ごとに、その存在濃度を推定することができた。これにより、以下の知見を得ることができた。

小山川において、ウシに特異的に感染する *C. andersoni* が、クリプトスポリジウム全体の約半数を占めることが明らかとなった。これにより、この地域におけるクリプトスポリジウムの汚染源として、ウシが重要な位置を占めることが示唆された。

また、これまでまだ種として分類されていない遺伝子型が4種類 (*C. sp. 938*、*C. sp. PG1-26*、*C. sp. t03*、*C. sp. t04*) 検出され、濃度に換算して全体の3分の1程度を占めることがわかった。これらの遺伝子型に関しては、*C. sp. 938* がヘビ³⁹⁾、*C. sp. PG1-26* がブタ⁴⁰⁾から検出されたという報告がある程度で、宿主特異性や、ヒトへの感染性に関する情報はまだ得られていない。残り2つ (*C. sp. t03*、*C. sp. t04*) は、これまでに報告されていない新しい種である可能性がある。さらに、同一試料に複数 (最大4種類) の種・遺伝子型が混在していたことをあわせて考えると、小山川におけるクリプトスポリジウムによる汚染が、様々な起源により発生する複合的なものである可能性が示された。

さらに、クリプトスポリジウム症患者からの単離株の大部分を占める *C. parvum* や *C. hominis* が、河川水中においては約16%しか存在していないことが示された。これは、クリプトスポリジウムによる水系感染症のリスクを評価する上で、重要な知見である。現在クリプトスポリジウム検出手法として広く用いられている顕微鏡観察^{35,36)}や、定量PCR法^{33,42-45)}では、検出されたクリプトスポリジウムの種・遺伝子型に関する情報を得ることができない。このような定量結果を基にした感染症リスク評価においては、検出されたクリプトスポリジウムが等しくヒトに対する感染性を持つ、と仮定することが多い。しかし、今回の調査において、ヒトに対する感染性を持つクリプトスポリジウムが、全体の6分の1程度しか存在しなかったことから、リスク評価に用いるデータを収集するにあたっては、定量だけではなく、DGGE法やクローニング、RFLP法のような、種・遺伝子型を判別する手法を組み合わせることが重要であることが示された。

4. 2. クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別における DGGE 法の有用性

DGGE 法の最大の利点は、本手法が遺伝子群集解析に広く適用されていることからわかるように、多数の遺伝子配列を含む試料を、個々の遺伝子配列ごとに類別できる点にある。特に、同一の遺伝子配列が複数の試料に連続して存在する場合には、生成したバンドの位置を確認するだけで、その種・遺伝子型を判断することが可能である。また、RFLP 法と異なり、試料中に未知の遺伝子配列が含まれていた場合でも、それを既知のものと識別することが容易である。したがって、今回のように、得られる遺伝子配列が未知であるような場を対象とした調査を行う場合には、特に適した手法であると考えられる。実際、小山川における調査の結果、新しい遺伝子配列が検出され、また同一試料に最大 3 種類の種・遺伝子型が混在している場合でも、それぞれを判別することができた。

一方、DGGE 法の欠点としては、RFLP 法と比較して時間を要する点が挙げられる。しかし本研究での調査のように、迅速に結果を出すことが必要ではない場合は、この点に関しては問題ない。次に、DGGE 法により得られたバンドの位置だけでは、その遺伝子配列がどの種・遺伝子型によるものであるのかが判断できないことが挙げられる。これはすなわち後段にシーケンシングが必要である、ということの意味している。確かにシーケンシングにより最終的な結果を得るまでにはさらに時間が必要であるが、遺伝子配列を解読することで、試料に含まれる全ての種・遺伝子型の判別が可能であり、また未知の遺伝子配列を検出することも可能であることを考慮すると、より詳細な結果が得られるという点で、優れた性質であるということもできる。さらに、DGGE 法に適用できる塩基長には制限があり、最大で 500bp 程度であるとされている⁴¹⁾。この点は、プライマーの設計や選択の際に、種による配列の差が十分にある領域を増幅部位とすることで解決できる。実際に本研究では、約 300bp を増幅対象としたプライマーを選択して、多くの種を類別できることを示した。

以上より、クリプトスポリジウムの種・遺伝子型の判別に DGGE 法を適用することで、先に述べた RFLP 法よりも精度が高く、またクローニングとシーケンシングを組み合わせた手法よりも経済的な調査結果を得ることができることが示された。

謝辞

本研究を行うにあたり、クリプトスポリジウムの 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、泉山 信司の諸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「クリプトスポ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) D'Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., Gustafson, T.L., Current, W.L., Rhodes, M.M., Gary, G.W. and Zajac, R.A.: A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, Vol. 103, Iss. 6, pp.886-888, 1985.
- 2) 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.
- 3) MacKenzie, W.R., Schell Wl Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Hoxie, N.J., Kazmierczak, J.J. and Davis, J.P.: Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin - recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 21, Iss. 1, pp. 57-62, 1995.
- 4) Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P. and Haddix, A.C.: Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9, Iss. 4, pp. 426-431, 2003.
- 5) Sulaiman, I.M., Lal, A.A. and Xiao, L.H.: A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 48, pp. 24S-27S, 2001.
- 6) 埼玉県衛生部: 「クリプトスポリジウムによる集団下痢症」一越生町集団下痢症発生事件一報告書, 1997.
- 7) Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. and Endo, T.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitology Research*, Vol. 87, Iss. 11, pp. 950-955, 2001.

- 8) 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.
- 9) Fayer, R.: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, Vol. 126, Iss. 1-2, pp. 37-56, 2004.
- 10) Ramirez, N.E., Ward, L.A. and Sreevatsan, S.: A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, Vol. 6, Iss. 8, pp. 773-785, 2004.
- 11) Carey, C.M., Lee, H. and Trevors, J.T.: Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, Vol. 38, Iss. 4, pp. 818-862, 2004.
- 12) McLaughlin, J., Amar, C., Pedraza-Diaz, S. and Nichols, G.L.: Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, Iss. 11, pp. 3984-3990, 2000.
- 13) Pedraza-Diaz, S., Amar, C. and McLaughlin, J.: The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 189, Iss. 2, pp. 189-194, 2000.
- 14) Pedraza-Diaz, S., Amar, C.F.L., McLaughlin, J., Nichols, G.L., Cotton, K.M., Godwin, P., Iversen, A.M., Milne, L., Mulla, J.R., Nye, K., Panigrahi, 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.
- 15) 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.
- 16) Chalmers, R.M., Elwin, K., Thomas, A.L. and Joynton, D.H.M.: Infection with unusual types of *Cryptosporidium* is not restricted to immunocompromised patients. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 185, Iss. 2, pp. 270-271, 2002.
- 17) Hajdusek, O., Ditrich, O. and Slapeta, J.: Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, Vol. 122, Iss. 3, pp. 183-192, 2004.
- 18) Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J. and McLaughlin, 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.
- 19) 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.
- 20) Xiao, L.H., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A.A. and Gilman, R.H.: Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 185, Iss. 12, pp. 1846-1848, 2002.
- 21) Ong, C.S.L., Eisler, D.L., Alikhani, A., Fung, V.W.K., Tomblin, J., Bowie, W.R. and Isaac Renton, J.L.: Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: First report of human infections with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, Iss. 3, pp. 263-268.
- 22) Mallon, M.E., MacLeod, A., Wastling, J.M., Smith, H. and Tait, A.: Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 3, Iss. 3, pp. 207-218, 2003.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Gasser, R.B., Abs, E.L.-Osta Y.G. and Chalmers, R.M.: Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, Iss. 5, pp. 2719-2730, 2003.
- 27) Gasser, R.B., Abs, E.L.-Osta Y.G., Prepens, S. and Chalmers, R.M.: An improved 'cold SSCP' method for the genotypic and subgenotypic characterization of *Cryptosporidium*. *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 18, Iss. 5, pp. 329-332, 2004.
- 28) Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A. and Thompson, R.C.A.: Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *Journal of Parasitology*, Vol. 83, Iss. 5, pp. 825-830, 1997.
- 29) Ward, P.I., Deplazes, P., Regli, W., Rinder, H. and Mathis, A.: Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. *Parasitology*, Vol. 124, Iss. 4, pp. 359-368, 2002.
- 30) Sulaiman, I.M., Xiao, L.H. and Lal, A.A.: Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, Iss. 10, pp. 4431-4435, 1999.

- 31) 阿部仁一郎、木俣 勲、井関 基弘: 分子生物学的手法を用いた *Cryptosporidium* の種および遺伝子型鑑別法の比較と文献的考察. 感染症学雑誌, Vol. 76, Iss. 10, pp. 869-881, 2002.
- 32) Jiang, J.L. and Xiao, L.H.: An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp.. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, Vol. 50, pp. 542-547, 2003.
- 33) 真砂佳史, 小熊久美子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 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ポリジウムの定量および種別判定手法の開発. 環境工学研究論文集, Vol. 41, pp. 311-319, 2004.
- 34) Muyzer, G., Dewaal, E.C. and Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, Iss. 3, pp. 695-700, 1993.
- 35) U.S.EPA: USEPA Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/IFA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC EPA 821-R-98-010, 1999.
- 36) U.S.EPA: USEPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA 821-R-99-006, 1999.
- 37) 真砂 佳史, 片山 浩之, 大垣 眞一郎: 大容量の河川水からの *Cryptosporidium* および *Giardia* の濃縮・精製手法の検討, 第 53 回全国水道研究発表会梗概集, pp. 632-633, 2002.
- 38) 八木 正一, 中西 正治, 小田 琢也, 山本 稔, 井上 亘: クリプトスポリジウム試験分離精製操作法の比較検討, 第 52 回全国水道研究発表会梗概集, pp. 628-629, 2001.
- 39) Xiao, L.H., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X.C. and Fayer, R.: Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, Vol. 32, Iss. 14, pp. 1773-1785, 2002.
- 40) Ryan U.M., Samarasinghe B., Read C., Buddle J.R., Robertson I.D. and Thompson R.C.A.: Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, Iss. 7, pp. 3970-3974, 2003.
- 41) Cotton, R.G.H.: Current Methods of Mutation Detection. *Mutation Research*, Vol. 285, Iss. 1, pp. 125-144, 1993.
- 42) MacDonald, L.M., Sargent, K., Armson, A., Thompson, R.C.A. and Reynoldson, J.A.: The development of a real-time quantitative-PCR method for characterisation of a *Cryptosporidium parvum* in vitro culturing system and assessment of drug efficacy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Vol. 121, Iss. 2, pp. 279-282, 2002.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) Higgins, J.A., Trout, J.M., Fayer, R., Shelton, D. and Jenkins, M.C.: Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. *Water Research*, Vol. 37, Iss. 15, pp. 3551-3560, 2003.