

PCR法による水試料及び糞便検体中クリプトスポリジウムの検出

福嶋 得忍, 日野 隆信, 水口 康雄

Detection of *Cryptosporidium parvum* in water samples and stool specimens by polymerase chain reaction.

Tokunin FUKUSHIMA, Takanobu HINO and Yasuo MIZUGUCHI

I. はじめに

近年, 諸外国と国内でクリプトスポリジウムの水系汚染による下痢症の集団発生が起こり, 汚染源として, クリプトスポリジウム感染下痢症患者の糞便やクリプトスポリジウムに感染した牛, 豚などの動物の糞便によって汚染された水道水や飲食物が指摘されている^{1,2)}。また, 海外渡航歴を有する下痢症患者の糞便からクリプトスポリジウムの検出される場合があり³⁾, クリプトスポリジウムの高精度かつ迅速な試験方法を確立し, クリプトスポリジウムの二次感染と環境中への拡散を防止する必要がある。環境水中のクリプトスポリジウムの検査は, 厚生省による「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」の暫定的な試験方法⁷⁾に従い実施されているが, 水道原水の検査においては, 水試料に緑藻類や自由生活原虫等の夾雑物が多く, 蛍光抗体法で染色した標本を蛍光顕微鏡を用いて観察する際に, クリプトスポリジウムのオーシストと試料水中の非特異蛍光を発する藻類との鑑別が困難な場合があり, より精度の高い試験方法の開発が待たれている。蛍光抗体法以外の検出法としてPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を応用した検出法が報告されており, クリプトスポリジウムの各種遺伝子を標的領域としたプライマーが検討されている^{8,12)}。

本報では, クリプトスポリジウム感染下痢症患者発生時の診断や感染経路の解明に役立つ試験方法を確立する目的で, 水試料中および糞便検体中のクリプトスポリジウムの検出にクリプトスポリジウム特異的熱ショック蛋白の遺伝子 (hsp70), およびクリプトスポリジウムの DNA の *Eco* RI 断片 (CPR1) を標的領域とするプライマーを用いた PCR法を適用し, 膜濾過法で濃縮後アセトン処理した水試料中, または下痢症患者のアセトン固定糞便検体中のクリプトスポリジウムの検出方法を検討したので報告する。

II. 材料および方法

1. 水試料の調製

濁度3.8, pH値7.5の河川水, または濁度0.0, pH値7.4の水道水 1Lに対し, 精製した未固定クリプトスポリジウム バルバム種のオーシスト (La-1 isolate, Waterborne Inc., LA) 1×10^6 個を添加して水試料とした。

2. 水試料中のオーシストの濃縮・精製

厚生省の暫定対策指針に示された暫定的な試験方法⁷⁾に従って, 加圧濾過法により水試料中のオーシストを濃縮し, 孔径1.0 μ m, 直径142mmのセルロース混合エステル製メンブレンフィルター (Toyo Roshi Kaisya, Ltd., Japan) 上に捕捉された濃縮物を 4℃の冷アセトンで一晩固定後, 比重1.10のパーコール (Pharmacia Biotech AB, Sweden)・蔗糖溶液を用いた密度勾配遠沈法でクリプトスポリジウムのオーシストを精製した。

3. 下痢症患者糞便検体中のオーシストの分離・精製

抗酸染色法による糞便検査で, クリプトスポリジウムの感染が疑われた下痢症患者の糞便検体を0.8%食塩水で約10倍に希釈し, 4℃の冷アセトンで一晩固定後, 比重1.10のパーコール・蔗糖溶液を用いた密度勾配遠沈法でクリプトスポリジウムのオーシストを精製した。

4. クリプトスポリジウム オーシスト数の算定

水試料または糞便検体から精製した比重1.10以下の粒子を孔径1.0 μ m, 直径25mmのPTFE製メンブレンフィルター (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) 上に捕捉し, クリプトスポリジウムのオーシストとジアルジアのシストの同時検出間接蛍光抗体染色キットHYDROFLUOR Combo (EnSys Inc., NC) を用いて染色後, 粒子の染色性をB励起条件下, 落射型蛍光顕微鏡E8TE-FL-DIC-CRP (Nikon Co. Ltd., Japan) で観察し, さらに微分干渉装置を用いて粒子サイズの測定と微細構造の観察を行い, フィルター上のクリプトスポリジウムのオーシスト数を算定した。

5. DNAの抽出

ILabergeらの方法⁹⁾を一部改良してDNAを抽出した。すなわち, パーコール・蔗糖浮遊法で精製した比重1.10以下の粒子をLysis buffer (1% Sarcosyl/10mM EDTA/120mM NaCl/25mM Tris, pH7.5)に懸濁させ, 0.5mg/mlの濃度にProteinase K (Merck KGaA, Germany) を添加後, 液体窒素と65℃の温水を用いて凍結融解を10回繰り返した。さらに, 凍結融解処理を行った試料溶液にProteinase Kを追加 (0.5mg/ml)し, 55℃の恒温槽中に一晩静置した。融解した試料中のDNAをフェノール・クロロフォルム法で抽出後, エタノール沈澱法で濃縮を行い, TE buffer (10mM Tris/1 mM EDTA, pH8.0) に溶解して鋳型DNAとした。

6. PCR法によるクリプトスポリジウム特異的遺伝子の増幅

クリプトスポリジウムのhsp70遺伝子¹³⁾, またはCPR1領域¹⁴⁾に特異的なそれぞれの合成プライマー (Table 1)^{8,9)}, Cloned *pfu* DNA Polymerase (Stratagene Cloning Systems, CA)およびPCR Nucleotide Mix (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)

PCR法による水試料及び糞便検体中クリプトスポリジウムの検出

を用いてPCR溶液 (Table 2) を調製し, PCR Sprint Temperature Cycling System (HYBAID Limited, UK) を用いてTable 3 の反応条件で目的領域を増幅した。PCR増幅産物は, 2% アガロースゲルとTEA buffer (40mM Tris/2mM EDTA/19mM Acetic acid/pH8.1) を用いた電気泳動法で分離し, 泳動ゲルをエチジウムブロマイドで染色し, 増幅産物の塩基対数を調べた。PCR増幅の陰性対照として, 下痢症と診断された生後24日齢の黒毛和種仔牛の糞便から分離・精製したランブル鞭毛虫のシストのDNAを用いた。

7. DNA-DNAハイブリダイゼーション

アガロースゲル中の hsp70プライマーによる PCR増幅産物は, キャピラール法でナイロン膜 NYTRAN0.2 (Schleicher & Schuell, Germany) に固定した後, 今回新たに設計して合成したジゴキシゲニン標識 hsp70 DNAプローブ (Table 1) とのDNA-DNAハイブリダイゼーションを行なった。DNAプローブの反応バンドは, 化学発光基質CSPD (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) による Chemi-luminescence法で検出し, ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000 (Fujifilm Co., Japan) で画像解析を行った。

Table 1. Primer and probe for detection of *Cryptosporidium parvum* gene.

| Target region | Primer or probe | Sequence (5' — 3') | Base position |
|---------------------|-----------------|------------------------------------|---------------|
| hsp70* ¹ | F - primer | AGCAATCCTCTGCCGTACAGG | 2431-2451 |
| | R - primer | AAGAGCATCCTTGATCTTCT | 3020-3001 |
| | Probe | DIG - TTCTGCTCATCCTCACCTTGTATTCTCA | 2881-2852 |
| CPR1* ² | F - primer | GCCCACCTGGATATACACTTTC | 527-548 |
| | R - primer | TCCCCCTCTCTAGTACCAACAGGA | 884-861 |

*1 : GenBank Accession No. U11761. *2 : GenBank Accession No. M9574. DIG : Digoxigenin.

Table 2. Reaction mixture for PCR-based detection of *Cryptosporidium parvum* gene.

| Component of reaction mixture | Amount per reaction (μ l) |
|--|--------------------------------|
| F-Primer (12.5 pmol/ μ l) | 1.0 |
| R-Primer (12.5 pmol/ μ l) | 1.0 |
| Template DNA | 1.0 |
| 10X Reaction Buffer | 5.0 |
| dNTP Mixture | 1.0 |
| <i>pfu</i> DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) | 0.5 |
| dH ₂ O | 40.5 |
| Total | 50.0 |

Table 3. Cycling parameters of PCR amplification for *Cryptosporidium parvum* gene.

| Reaction step | Target region (size of PCR product) | |
|---------------|-------------------------------------|------------------|
| | hsp70 (590 bp) | CPR1 (358 bp) |
| Denaturation | 94°C, 7 minutes | 94°C, 7 minutes |
| Denaturation | 94°C, 45 seconds | 94°C, 60 seconds |
| Annealing | 55°C, 30 seconds | 45°C, 60 seconds |
| Extension | 72°C, 45 seconds | 72°C, 60 seconds |
| Extension | 72°C, 7 minutes | 72°C, 2 minutes |

III. 結果

1. PCRプライマーセットの比較

精製したクリプトスポリジウムのオーシスト (La-1 isolate) から抽出したDNAを鋳型として、hsp70またはCPR1プライマーによるPCR増幅の特異性を検討した結果、hsp70プライマーによる増幅産物には理論値590bpの単一バンドが認められたが、CPR1プライマーによる増幅産物には理論値358bpのほか複数のバンドが認められた。陰性対照のジアルジアのシストのDNAを鋳型とすると、hsp70プライマーによる増幅では、590bpの弱いバンドの他、複数の弱いバンドが認められた。また、CPR1プライマーによる増幅では、358bpのバンドは認められず、他の複数のバンドが認められた(Fig.1)。hsp70プライマーによる増幅産物のDNA-DNAハイブリダイゼーションで、La-1 isolate から抽出したDNAを鋳型とした増幅産物の590bp断片は、hsp70 DNAプローブと特異的に反応した。陰性対照のランブル鞭毛虫のシストから抽出したDNAを鋳型とした増幅産物は、hsp70 DNAプローブと反応しなかった(Fig. 2)。

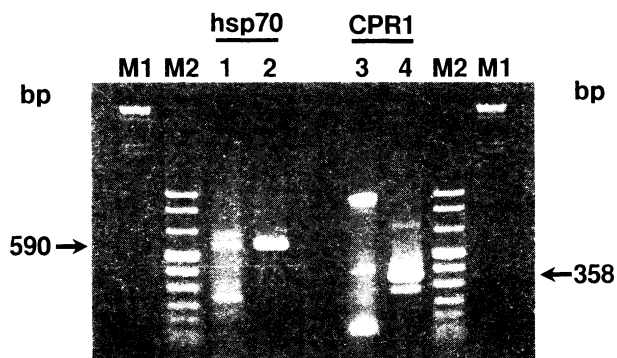
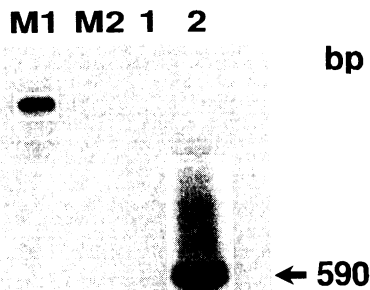


Fig. 1. Ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis of amplification products obtained with hsp70 or CPR1 primers. M1 : DIG-labeled size markers. M2 : Non-label size markers. 1 & 3 : DNA from viable cysts of *G. lamblia*. 2 & 4 : DNA from viable oocysts of *C. parvum*.



obtained with hsp70 primers and hybridizing with DIG-labeled hsp70 DNA probe. M1 : DIG-labeled size markers. M2 : Non-label size markers. 1 : DNA from viable cysts of *G. lamblia*. 2 : DNA from viable oocysts of *C. parvum*.

2. アセトン固定オーシストから抽出したDNAの反応性

hsp70プライマーを用いたPCR増幅で、La-1 isolateのアセトン固定オーシスト100個から抽出したDNAは、生のオーシスト

100個から抽出したDNAと同様、590bpの単一バンドが認められた。また、アガロースゲルのエチジウムブロマイド染色で、アセトン固定オーシストと生オーシストでは増幅産物590bpのバンドの染色強度に差は認められなかった。アセトン固定オーシスト10個のDNAでは590bpのバンドが明瞭に認められたが、アセトン固定オーシスト1個のDNAでは認められなかった(Fig. 3A)。DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果、アセトン固定オーシスト100個または10個のDNAは、生オーシスト100個のDNAと同様に590bpのバンドが特異的に反応し、アセトン固定オーシスト1個のDNAでは反応バンドが認められなかった (Fig. 3B)。

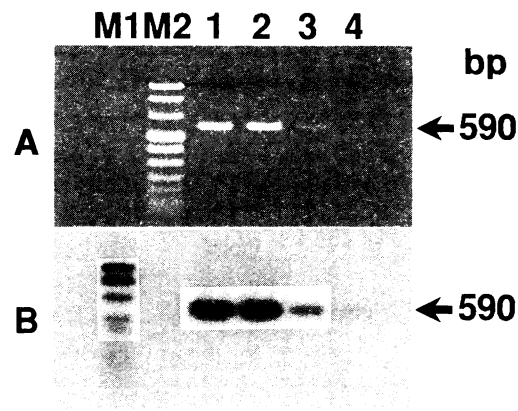


Fig. 3. Detection of specific hsp70 gene in DNA from aceton-fixed oocysts of *C. parvum*. (A) Ethidium bromide-stained amplification products obtained with hsp70 primers. (B) Southern blot of the gel in panel A hybridized with DIG-labeled hsp70 DNA probe. M1 : DIG-labeled size markers. M2 : Non-label size markers. 1 : Viable 100 oocysts. 2 : Aceton-fixed 100 oocysts. 3 : Aceton-fixed 10 oocysts. 4 : Aceton-fixed 1 oocyst.

3. アセトン処理した水試料中のクリプトスポリジウムの検出

クリプトスポリジウムのオーシスト (La-1 isolate) を添加した河川水、または水道水の膜濾過濃縮後アセトン処理した試料中のDNAの hsp70プライマーによる PCR増幅産物は、陽性対照のアセトン固定クリプトスポリジウムのオーシストのDNAと同様にアガロース電気泳動ゲルのエチジウムブロマイド染色で理論値590bpの単一バンドが認められた(Fig. 4)。

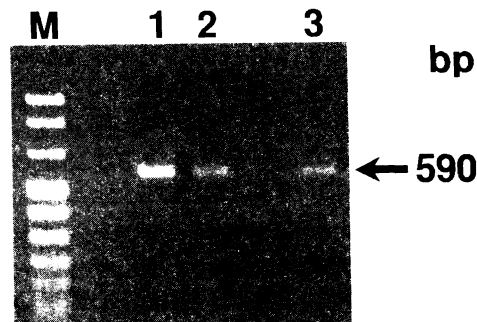


Fig. 4. Ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis of amplification products obtained with hsp70 primers. M : Non-label size markers. 1 : DNA from *C. parvum* oocysts in river water. 2 : DNA from *C. parvum* oocysts in drinking water. 3 : DNA from aceton-fixed *C. parvum* oocysts for positive control.

4. アセトン固定した糞便検体中のクリプトスポリジウムの検出

蛍光抗体法染色法と微分干渉顕微鏡法でクリプトスポリジウムのオーシスト数を算定した結果、糞便1mg中の数は、検体1で40個、検体2で1000個、検体3で2個であり、検体2で最も多かった。検体1と検体2から精製した粒子のDNAのhsp70プライマーによる増幅産物は、陽性対照の生のクリプトスポリジウム パルバムのオーシスト (La-1 isolate) の DNAと同様、アガロース電気泳動法で理論値590bpの単一バンドが認められた。また、オーシスト数の多い検体2はオーシスト数の少ない検体1に比べ、590bpのバンドの強度が強かった。オーシスト数の最も少ない検体3は、590bpのバンドは認められず、約340bpのバンドが認められた (Fig.5A)。DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果、アガロース電気泳動法で認められた検体1と検体2の590bpのバンドは、陽性対照と同様、hsp70 DNAプローブと特異的に反応した。検体3で認められた約340bpのバンドは反応しなかった (Fig. 5B)。

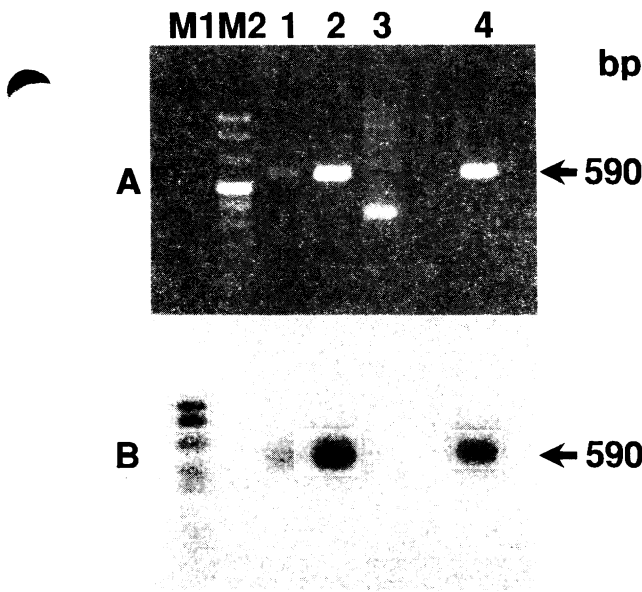


Fig. 5. Detection of hsp70 gene of *C. parvum* oocysts in acetone-fixed stool specimens. (A) Ethidium bromide-stained amplification products obtained with hsp70 primers.

(B) Southern blot of the gel in panel A hybridized with DIG-labeled hsp70 DNA probe. M1: DIG-labeled size markers. M2: Non-label size markers. 1 to 3: DNA of stool specimens from 3 diarrheal patients. 4: DNA from viable oocysts of *C. parvum* for positive control.

IV. 考察

水試料中、または下痢症患者糞便中のクリプトスポリジウムの検出方法として、蛍光抗体染色法や抗酸染色法が適用されているが、夾雑物が多くオーシスト数が少ない水試料や不顕性感染者の糞便検体の場合は、検出精度と検出感度に問題が生じるおそれがある。クリプトスポリジウム感染下痢症患者の集団発生を防止するための予防対策として、水試料や下痢症患者の糞便から高精度にオーシストを検出し、二次感染と環境中への拡散を防止することが重要である。

今回、蛍光抗体染色用にアセトンで前処理した試料を遺伝子検査にも利用する目的で、アセトン固定したクリプトスポリジウム

のオーシストからクリプトスポリジウム特異的遺伝子を検出する方法を検討した。その結果、アセトン処理した濃縮水試料とアセトン固定糞便検体から抽出したDNAから、1回のPCRでクリプトスポリジウム特異的hsp70遺伝子を検出することが出来た。DNA-DNAハイブリダイゼーションに用いた新規設計のhsp70 DNAプローブは、クリプトスポリジウム特異的hsp70プライマーによるPCR増幅産物の590bpと特異的に反応したことから、特異性に優れ、*in situ hybridization*法による*Cryptosporidium parvum*の直接検出のためのDNAプローブとしても有用と考えられる。

蛍光抗体染色法による検査でクリプトスポリジウム陽性の下痢症患者糞便検体3例中1例で、hsp70プライマーによるPCR増幅産物のサイズが理論値590bpではなく約340bpであった理由は不明であるが、hsp70 DNAプローブと反応しなかったことから、パルバム以外の種であった可能性、あるいは糞便検体中の因子によってPCR増幅が阻害された可能性が考えられ、さらに検討が必要である。

V. まとめ

アセトン処理した濃縮水試料、およびアセトン固定した下痢症患者の糞便検体から、1回のPCRでクリプトスポリジウム特異的熱ショック蛋白の遺伝子 (hsp70) を検出することが出来た。また、クリプトスポリジウム特異的hsp70遺伝子検出用の合成DNAプローブが完成した。従来の蛍光抗体染色法と今回のPCR法を組み合わせた試験方法は、クリプトスポリジウム感染下痢症患者発生時の診断や感染経路解明に役立つと思われる。

謝辞

本研究にあたり、下痢症患者の糞便検体を分与して頂いた千葉大学医学部付属病院検査部細菌室に深謝いたします。

引用文献

- 1) 塩田 恒三 (1998) : 家畜・野生動物におけるクリプトスポリジウム感染の実態—環境水汚染源としての意味—。化学療法の領域, 14(2), 248-254.
- 2) 山本 徳栄, 中川 善雄, 羽賀 道信 (1998) : 水道水によるクリプトスポリジウムの集団感染例—国内および海外の事例—。化学療法の領域, 14(2), 255-263.
- 3) 北澤 弘美, 国包 章一, 眞柄 泰基 (1999) : 水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア実態調査結果の解析。水道協会雑誌, 68 (4), 22-31.
- 4) Ronald Fayer, Earl J. Lewis, James M. Trout, Thaddeus K. Graczyk, Mark C. Jenkins, James Higgins, Lihua Xiao and Altaf A. Lal (1999) : *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerging Infectious Diseases, 5(5), 706-710.
- 5) Norishige Yamamoto, Ken-ichi Urabe, Masatoshi Takao-ka, Kiyooki Nakazawa, Atsushi Gotoh, Michinobu

- Haga, Hiroshi Fuchigami, Isao Kimata and Motohiro Iseki (2000): Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama prefecture, Japan, in 1996. 感染症学雑誌, 74(6), 518-526.
- 6) 増田 剛太 (1998): クリプトスポリジウム症—臨床症状と疫学—. 化学療法の領域, 14(2), 243-247.
- 7) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」平成10年6月19日付.
- 8) Timothy Stinear, Anita Matusan, Kate Hines and Michael Sandery (1996): Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol., 62(9), 3385-3390.
- 9) I. Laberge, A. Ibrahim, J. R. Barta and M. W. Griffiths (1996): Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 62(9), 3259-3264.
- 10) Irshad M. Sulaiman, Lihua Xiao, Chunfu Yang, Lilian Escalante, Anne Moore, Charles B. Beard, Michael J. Arrowood and Altaf A. Lal (1998): Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. Emerging Infectious Diseases, 4(4), 681-685.
- 11) Paul A. Rochelle, Ricardo De Leon, Mic H. Stewart and Roy L. Wolfe (1997): Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. Appl. Environ. Microbiol., 63(1), 106-114.
- 12) Ming Qi Deng and Dean O. Cliver (1998): Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by a simplified randomly amplified polymorphic DNA technique. Appl. Environ. Microbiol., 64(5), 1954-1957.
- 13) Khramtsov N. V., Tilley M., Blunt D. S., Montelone B. A. and Upton S. J. (1995): Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form Hsp70. J. Eukaryot. Microbiol., 42(4), 416-422.
- 14) Nicola C. Lally, G. David Baird, S.J. McQuay, Frank Wright and Joanna J. Oliver (1992): A 2359-base pair DNA fragment from *Cryptosporidium parvum* encoding a repetitive oocyst protein. Molecular and Biochemical Parasitology, 56, 69-78.