

クリプトスポリジウム・オーシストおよび ジアルジア・シストプレパラートからの DNA を用いた nested PCR 法

慶野昌明 熊田裕子 河野裕子 愛沢重樹
理化学グループ

要 旨

クリプトスポリジウム分離株の遺伝子型は、浄水施設が効果的な工程管理を行うために有益な情報ではあるが、少数オーシストの PCR 増幅率が保証されないことを考慮すると、汚染の有無の判定に際しては、偽陰性結果を防止するために試料全量を形態的観察に供する必要があると思われる。以上のことから、クリプトスポリジウム・オーシスト/ジアルジア・シスト陽性プレパラートの、DNA テンプレート源としての有用性を評価するため、プレパラートから抽出した(オー)シスト DNA を用いて nested PCR を実施した。PCR 陽性となる最少の(オー)シスト数は6個であったが、十分な数の(オー)シストを有していたと考えられるプレパラートからの PCR 増幅に再現性の乏しさが認められた。カバーガラスの使用と不十分な粗 DNA 回収操作に起因したものと考えられることから、方法の一部を変えることにより、PCR 増幅率が向上するのか確認することが今後の課題である。

キーワード：クリプトスポリジウム，ジアルジア，PCR，プレパラート

はじめに

環境水中のクリプトスポリジウム・オーシストとジアルジア・シスト検査における形態学的観察法は、その迅速性の点から、浄水施設における水質モニタリング検査に利用されている。現行の「水道におけるクリプトスポリジウム等の対策に関する研究会」が提案した方法¹⁾では、検出された原虫の生存性や感染性等に関する詳細な解析は求められていないことから、浄化した水道水中に形態観察で(オー)シストが確認された場合、その分離株の、ヒトからの分離例報告の有無に関わりなく、直ちに給水停止等の措置が取られている。その際、観察後のプレパラートは通常廃棄処分されているものと思われる。一方、浄水施設におけるリスク管理の観点から、分離株の遺伝子型は、安全な飲料水を供給するための工程管理に有益な情報であると考えられる。遺伝子検査のルーチン検査への応用に際しては、我が国の河川水中の(オー)シスト数が少ない¹⁾ことや少数のオーシストから抽出した DNA を用いた PCR 増幅率が保証されない²⁾ことを考慮して、まず形態観察を実

施し、そこで陽性と判定された試料を遺伝子検査に供することが偽陰性診断を防ぐ上で重要と考えられる。以上のことから、陽性プレパラートの、DNA テンプレート源としての有用性を評価するため、研究会の方法で作製したプレパラートから DNA を抽出し、nested PCR を行う方法について検討した。

材料および方法

感染研から分与されたクリプトスポリジウム・オーシストおよびジアルジア・シスト浮遊原液を TE buffer を用いてそれぞれ適当に希釈し、50 μ L 中にオーシストとシストの両方を 20, 15, 10 および 5 個ずつ含む(推定)浮遊液を作成した。各浮遊液をマイクロチューブ内で直接蛍光抗体試薬(30 μ L)および DAPI 染色液(27 μ L)を用いて染色し、一辺が約 15mm 四方になるように裁断した PTFE ろ紙に(オー)シストを吸着後、ろ紙をスライドガラスに移して封入した。形態観察によりオーシストとシストの数を記録した後、プレパラート上の(オー)シストから DNA を抽出した。DNA 抽出には市販の DNA 抽出キ

ット (DNeasy Tissue Kit, QIAGEN) を用いたが、次の前処理工程を追加した。まず、カバーガラスを外し、プレパラートから取り出したろ紙を用いてカバーガラスの裏面に付着した封入剤をふき取り、180 μ L の ATL buffer が入った 1.5mL スクリューキャップチューブに入れ、凍結 (液体窒素, 3分)・解凍 (100 $^{\circ}$ C, 3分) を 15 回反復した。続いて超音波細胞破壊処理を 15 分間行った。前処理後の proteinase K による消化工程以降の操作は説明書の animal tissue protocol に準拠した。DNA 溶出に用いた AE buffer 量は 50 μ L とした。クリプトスポリジウムの PCR 法としては Xiao らの方法³⁻⁵⁾に、また、ジアルジアの DNA 増幅には Sulaiman らの方法^{6, 7)}に準拠したが、反応液量を 50 μ L (原著では 100 μ L) とし、また、抽出した DNA の収量が少ないことを想定して、テンプレート量を primary PCR で 10 μ L, nested PCR では 5 μ L とした (原著では 0.25-2 μ L)。図 1 に実験の流れを示す。

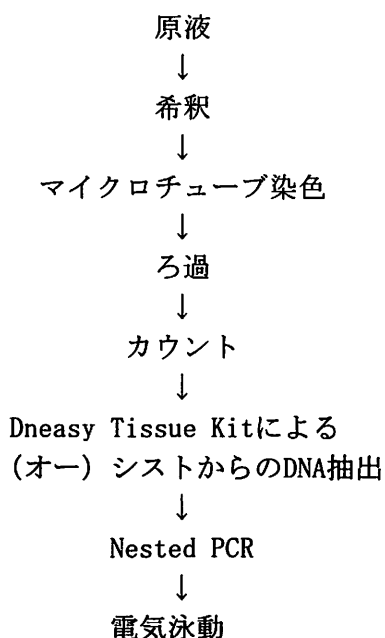


図 1 実験フローシート

結果および考察

ろ過後に PTFE フィルターに付着した染色クリプトスポリジウム・オーシスト数は 2 (1), 4 (1), 5 (2), 6 (2), 7 (1), 8 (2), 9 (3), 10 (1), 11 (1) および 13 (1)

個, ジアルジア・シスト数は 5 (2), 6 (1), 7 (2), 8 (1), 9 (1), 10 (2), 11 (2), 14 (1), 16 (2) および 22 (1) 個であった (文中および表 1 の () 内の数字はプレパラート枚数を表す)。これらのプレパラートのうち、クリプトスポリジウムの 18S small-subunit rRNA 遺伝子 (826bp) は 6, 7, 8, 9 (2) 個のオーシストを含むプレパラート由来の DNA を用いて増幅された (表 1)。ジアルジアの Triosephosphate Isomerase 遺伝子 (530bp) は 6, 11, 14 および 22 個のシストを含むプレパラートから抽出した DNA を用いて増幅された (表 1)。クリプトスポリジウムの PCR における変性、アニーリングおよび伸長反応サイクルを原法に基づいて 35 サイクルで実施したところ一部にかすかなバンドが認められたため (図 2-1), primary PCR のサイクル数を 45 サイクルに、nested PCR を 40 サイクルに延長した結果、明瞭なバンドが出現した (図 2-2)。Nichols ら⁸⁾も 50 サイクルで実施した nested PCR で良好な成績を得ている。同様に、ジアルジアの PCR におけるアニーリング温度を原法の 50 $^{\circ}$ C から 55 $^{\circ}$ C に上昇することによって、非特異的なバンドが消失すると共に、追加バンドが出現した (図 3-1, 3-2)。Sturbaum ら²⁾は 1, 2, 3, 4, 5, 7 および 10 個のオーシストからの PCR 増幅率は、それぞれ 38, 56, 76, 88, 92, 94 および 100%であったと報告している。PTFE フィルター上のオーシストから抽出した DNA を用いた我々の方法では検出限界が 6 個であったが、10 個以上のオーシストを含むプレパラートからは増幅が認められなかった (表 1)。一方 Nichols ら⁸⁾は、ポリカーボネートフィルターから抽出したオーシストの DNA を用いた nested PCR の検出限界は 2 から 3 個で、5 個以上では確実に増幅されたことを報告している。我々の成績と彼らの成績の差を生んだ一因としてプレパラート作製法の違いが考えられた。我々が用いた研究会による方法では、水分を含んだフィルター上に染色オーシストが置かれているが、それに対し Nichols らはフィルターにオーシストを捕捉させた後に空乾し、メタノール固定を施してから染色している。オーシス

トとフィルター間の摩擦係数は、水分の存在下の方が乾燥状態より小さくなるため、研究会の方法に基づいて作製したプレパラート上のオーシストの方が、カバーガラス取り外しの際に一緒に移動する傾向が高く、カバーガラスに付着した封入剤のふき取りが十分でなければオーシストの回収率が低下することが考えられた。また、市販の DNA 抽出キットを用いた抽出操作において、スクリュウキャップチューブからスピнкаラムにライセートを移す際に、チューブ内の PTFE フィルターとチューブ内壁面のリンス操作を行わなかったが(フィルターが材料となるような protocol は想定されておらず、説明書にリンス工程の記載が無かったため)、あるいはこれが微量の粗 DNA が回収されなかった原因の一つとも考えられた。クリプトスポリジウムと同様、

ジアルジア・シストについても、検出限界が 6 個で、それ以上の個数からの PCR 増幅の再現性においてバラツキがみられた(表 1)。研究会のプレパラート作製法は形態観察を前提としており、乾燥による PTFE フィルターの歪み防止と微分干渉装置によるオーシストの内部構造観察に必要なフィルターの透光性維持を目的としてカバーガラスが用いられている。このため我々は、研究会の方法を一部変更し、カバーガラスを使用しないプレパラートの、顕微鏡観察における実用性について検討した。その結果、封入剤を糊として用いることでカバーガラスを使用しなくとも数時間はフィルターに歪も生じず、フィルターの透光性および染色(オー)シストの輝度が維持されることを確認した。この方法でプレパラートを作製し、市販 DNA キットによる抽

表 1 プレパラート上の(オー)シスト数と DNA 増幅状況

Number of (oo)cysts	2	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	16	22
<i>Cryptosporidium</i> oocysts	1	1	2	2(1)	1(1)	2(1)	3(2)	1	1	1			
<i>Giardia</i> cysts			2	1(1)	2	1	1	2	2(1)		1(1)	2	1(1)

() : PCR +

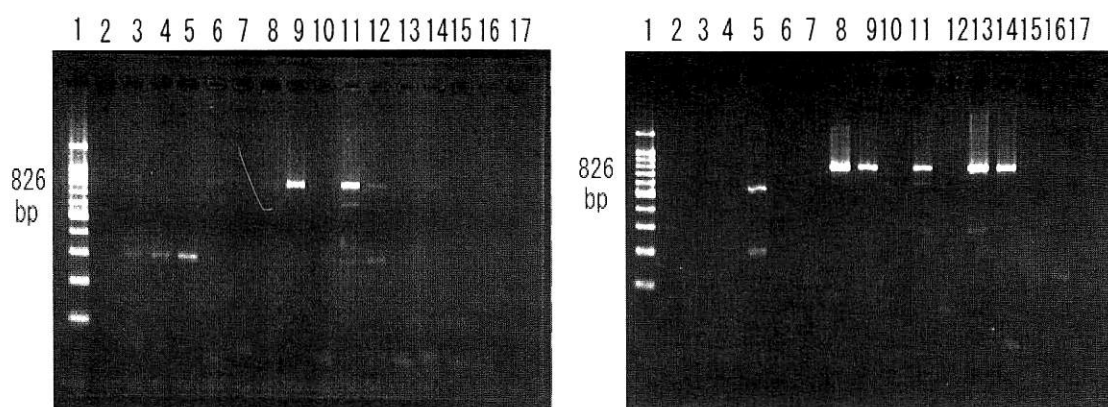


図 2-1

図 2-2

図 2 クリプトスポリジウム PCR産物電気泳動図

1:分子量マーカー 2:陰性コントロール 3:2 個 4:4 個 5:5 個 6:5 個 7:6 個 8:6 個 9:7 個 10:8 個 11:8 個 12:9 個 13:9 個 14:9 個 15:10 個 16:11 個 17:13 個

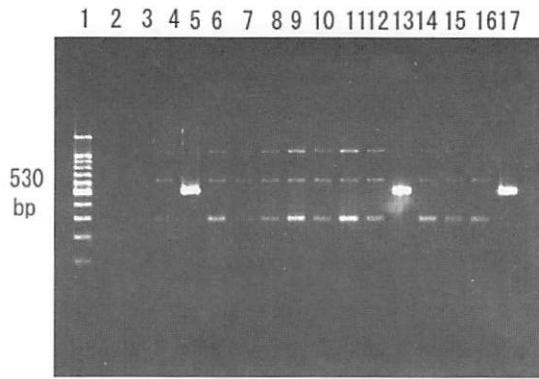


図 3-1

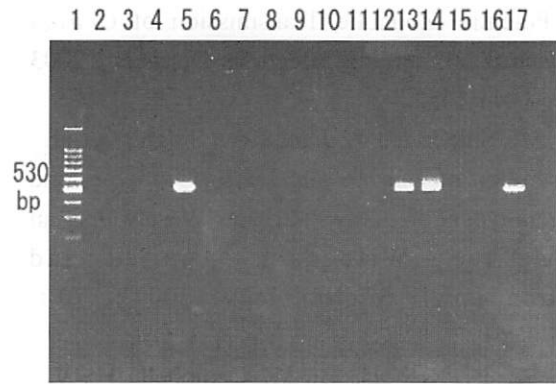


図 3-2

図 3 ジアルジアPCR産物電気泳動図

1:分子量マーカー 2:陰性コントロール 3:5個 4:5個 5:6個 6:7個 7:7個 8:8個 9:9個 10:10個 11:10個 12:11個 13:11個 14:14個 15:16個 16:16個 17:22個

出手順のライセート移行の工程に PTFE フィルターとチューブ内壁面のリンス操作を加えることにより、6 個以上の（オー）シストを含むプレパラートから抽出した DNA を用いた PCR 増幅の再現性が改善されるのか、追加試験として確認する必要がある。また、6 個以下の（オー）シストからの PCR 増幅は認められなかったが、これが上記と同じ手技上のミスに因るものなのか、それともこの DNA 抽出法に固有の検出能力に起因しているのかについての検証も同様に今後の検討課題である。DNA 抽出操作における改善の他に、今回の予備実験で得られた結果が示すように、PCR 条件の最適化についての検討も必要と思われた。分離（オー）シスト株の遺伝子型を調べることで、汚染源となった動物種（ヒトも含む）が特定される³⁻⁶⁾ 可能性があり、より効果的な水源の環境保護対策が期待できるかもしれない。また、判定決定までに時間的猶予が許されているという場合のみに限定されるが、形態的観察で判断が付かないようなケースへの、診断の補助を目的とした遺伝子検査の応用の可能性も考えられる。今回の実験では nested PCR 法を用いたが、診断補助を目的とする場合には、リアルタイム PCR 法⁹⁾ の採用により、検査時間の短縮を図ることが必要であると考えられる。プレパラート上の（オー）シストからの、簡便で信頼性の高い DNA 抽出法が開発されれば、浄水場等の現場において実施されている原虫

のルーチン検査への遺伝子検査の導入が容易となると思われる。

引用文献

- 1) クリプトスポリジウム—解説と試験方法一。東京：日本水道協会，2003；1-232.
- 2) G. D. Sturbaum, C. Reed, P. J. Hoover, et al. Species-Specific, Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Detection of Single *Cryptosporidium parvum* Oocysts, Applied and Environmental Microbiology 2001；67：2665-2668.
- 3) L. Xiao, L. Escalante, C. Yang, et al. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus, Applied and Environmental Microbiology 1999；65：1578-1583.
- 4) L. Xiao, U. M. Morgan, J. Limor, et al. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species, Applied and Environmental Microbiology 1999；65：3386-3391.
- 5) L. Xiao, K. Alderisio, J. Limor, et al. Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool, Applied and Environmental Microbiology 2000；66：5492-5498.
- 6) I. M. Sulaiman, R. Fayer, C. Bern, et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization

and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*, *Emerging Infectious Diseases* 2003 ; 9 : 1444-1452.

7) I. M. Sulaiman, J. Jiang, A. Singh, et al. Distribution of *Giardia duodenalis* Genotypes and Subgenotypes in Raw Urban Wastewater in Milwaukee, Wisconsin, *Applied and Environmental Microbiology* 2004 ; 70 : 3776-3780.

8) R. A. B. Nichols, B. M. Campbell, H. V. Smith. Identification of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters by Using a Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assay, *Applied and Environmental Microbiology* 2003 ; 69 : 4183-4189.

9) R. A. Guy, P. Payment, U. J. Krull. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage, *Applied and Environmental Microbiology* 2003 ; 69 : 5178-5185.