

下水中の *Cryptosporidium parvum* オーシスト濃度と遺伝子型に関する汚染実態調査

Identification of genotype of Cryptosporidium parvum oocysts in raw sewage

平田 強, 森田重光, 内田明彦

麻布大学大学院環境保健学研究科

Tsuyoshi Hirata, Shigemitsu Morita, Akihiko Uchida

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: We tried to detect and identify a single *Cryptosporidium* oocyst in sewage and river water using PCR-RFLP or PCR direct sequence assay.

Prior to application to environmental samples, the ability of the PCR to amplify target DNA from one oocyst was examined using *C. parvum* HNJ-1 strain. Each oocysts isolated using glass capillary was transferred to PCR buffer containing 1% TX-100 within a PCR tube and then subjected to three freeze-thaw cycles.

Using two primer sets which amplify portion of the sequence encoding 18S rRNA or poly threonine, PCR amplification was observed in 10 of 10 samples by 18S rRNA based PCR and 47 of 53 samples by poly threonine based PCR. The results demonstrated that PCR amplification of a single oocyst was applicable in purified *C. parvum* oocyst.

Then, we tried to examine the applicability of single oocyst PCR to raw sewage and river water samples. PCR amplification was observed only one of 30 samples (16 samples of 18S rRNA and 14 samples of poly threonine based PCR, respectively) from raw sewage by 18S rRNA based PCR. The PCR product was sequenced and identified as 18S rRNA gene fragment of *C. parvum* isolate HCTX8 (genotype 2) by BLAST.

Trials were also carried out with a single oocyst from river water by poly threonine based PCR. Three of 10 samples from river water were positive. The three PCR products were analyzed by RFLP, and all RFLP patterns showed similarity to the RFLP pattern of *C. parvum* genotype 2. In addition, two of the three products were sequenced successfully and identified as poly threonine gene fragment of *C. parvum* genotype 2 by BLAST.

はじめに

水源水域を含む水環境のクリプトスポリジウム汚染は水質衛生上極めて重要な問題であり、水源環境の保全や汚染源対策、浄水処理等による飲料水の安全性確保策を展開するには水環境の汚染レベルを把握することが極めて重要である。現行の水のクリプ

トスポリジウム試験方法は、①ろ過、遠心分離などで多量の水試料を濃縮、②密度勾配遠心法による分離、③クリプトスポリジウムに特異的な蛍光抗体による蛍光抗体染色、④蛍光顕微鏡での形態観察と計数、の工程で行われる¹⁾。この工程うち、蛍光抗体染色に基づいた形態観察は検査者の主観や抗体のクロスリアクションなどの不確定要因があるのみなら

ず、クリプトスポリジウムの種や株、感染性の有無や汚染源に関する情報は得ることができない。一方で宿主域と形態観察によって行われてきた寄生性原虫の分類は、近年の遺伝子解析技術の進歩によって大きく変化しており、クリプトスポリジウムに関してもヒトへの感染性を有するとされる、*Cryptosporidium parvum* は3つの genotype に分類されることが報告され²⁾、さらにはヒトへの特異性の高い新しい種として *C. hominis*³⁾ が提案されている。このような背景から適正な汚染源対策や水域管理を行うために、水源水域をはじめとする水環境の汚染の調査についても形態観察に基づいた従来の限られた情報に加えて、分子生物学的な情報を取り入れて疫学的な解析を行うための手法の導入が重要であり、幾つかの実例が報告されている^{4,5)}。これらの報告では大量の水試料を濃縮し、その濃縮物よりDNAを精製して解析するという手法が用いられており、得られた解析結果は複数のオーシストによるものが混在しているものと考えられる。そこで本研究では河川、下水などから分離したクリプトスポリジウムオーシストの一細胞を顕微鏡下で単離して、PCR-RFLPもしくはPCR-Direct sequenceによって解析し、各オーシストの遺伝子型を解析して水環境のクリプトスポリジウム汚染の現状をよりの確に把握し、適正な水源管理や浄水処理、水域管理に役立てることを最終目的として、その手法の検討と調査を行った。

方法

2.1 添加実験によるクリプトスポリジウムオーシスト1細胞からのPCR

1) オーシストの単離と前処理法

SCID マウスに感染させ、継代・維持している *C. parvum* HNJ-1 株および IOWA 株を用いて実験を行った。35 mm プラスチックシャーレ中の滅菌精製水に TX-100 を 1% 加え、蛍光抗体染色 (Easy stain, BTF, Australia) した供試オーシスト株を 10^2 - 10^3 個入れた。倒立型蛍光顕微鏡で観察し、クリプトスポリジウムと判定された粒子をガラスキャピラリーで単離して、オーシスト溶解液 23 μ l (10% TX-100 5 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 滅菌超純水 15.5 μ l) の入った 0.2 ml マイクロチューブ内に噴出した。1 チュ

ーブ内に入れるオーシスト数は1個から5個とし、それぞれについて検討を行った。オーシストの入ったマイクロチューブはディープフリーザーで -80°C の凍結と室温での融解を3回行ったのち、サーマルサイクラー (TP500, Takara, Japan) にセットし、 95°C , 60 min の加熱を行った。

2) PCR

凍結融解と 95°C , 60 min の加熱が終了した試料に PCR 反応液 25 μ l を加えた。PCR 反応液は 20 μ M に調整したプライマー溶液 (Forward および Reverse) それぞれ 2.5 μ l (最終濃度 1 μ M), 10 \times PCR buffer 2.5 ml, Taq ポリメラーゼ (HS taq, takara) 0.25 ml, NTPs 4 μ l, 滅菌超純水 13.25 μ l からなる。PCR 反応液を加えた試料はそれぞれのプライマーごとの温度条件とサイクル数で PCR 反応後、2% アガロースゲルで電気泳動し、特異領域の増幅を確認した。プライマーは *C. parvum* のゲノム上のポリスレオニン領域を標的とする cry44/cry373 (ctcttaatccaatcattaacaac), (agcagcaagatatgataccg)⁶⁾ のプライマーセットおよび 18S rRNA 領域の DIA GF / DIA GR (aagctcgtagttggattct), (taaggtgctgaaggagtaagg)⁴⁾ または 18SIF/18SIR (agtgacaagaaataacaatacagg), (cctgcttaagcactctaattc)⁷⁾ のセットを使用した。

2.3 下水および河川水より単離したクリプトスポリジウムオーシストの遺伝子解析

2.3.1 試料の濃縮とオーシストの単離

1) 下水試料のクリプトスポリジウムを用いた調査

下水試料は関東地方の S 下水処理場の流入下水を用いた。試料はプラスチック遠心管 (250 ml) に分注し、遠心分離器で 1,200 \times g, 10 min 遠心して上清を吸引除去した。沈殿物に界面活性剤添加 PBS を加えながら目開き 0.1 mm の金属メッシュで濾し、余分な夾雑物の除去と粒子の分散を行った。メッシュでろ過した試料 40 ml を遠心管 (50 ml) に取り、脱脂のため 10 ml の酢酸エチルを加えてよく振倒したのち、遠心分離して酢酸エチル層、水層を除去して沈殿物を集めた。沈殿物に再び界面活性剤添加 PBS を加えながら再び目開き 0.1 mm の金属メッシュで濾してよく分散させたのち、30 ml を遠心管 (50 ml) に分注して試料層の下層にシリンジとチューブを用いて比重 1.10 の percoll-シヨ糖溶液を入れ、1,200 \times g,

Table 1 Results of poly threonin gene and 18S-rRNA gene PCR for spiked 1 oocyst

Poly threonin	1 oocyst	2 oocyst	3 oocyst	5 oocyst
<i>C. parvum</i> HNJ-1	47/53	17/18	—	—
<i>C. parvum</i> JOEA	10/10	—	4/5	—
18S-rRNA				
<i>C. parvum</i> HNJ-1	10/10	—	—	7/10

No. of positive samples/No. of samples

10 min 遠心分離してショ糖浮遊法で精製した。精製した試料は精製水を加えてタッチミキサーで十分に攪拌したのち、複数本のIMS (L10チューブ, Dynal, Norway) に沈殿物量として0.5 mlを超えないように分注して、クリプトスポリジウム用の免疫磁性体分離ビーズ (anti-Cryptosporidium beads, Dynal, Norway) を100 ml, IMSバッファーAおよびB各1 ml, 精製水10 mlを加え、ミキサーでゆっくりと1時間反応させた。反応後ビーズを回収してクリプトスポリジウムオーシストを分離し、蛍光抗体を加え染色したのち、2.11) および2) に示した方法でオーシストを単離してPCRを行った。

2) 河川水より分離したクリプトスポリジウムオーシストによる手法の検討

下水からオーシストを分離し、PCRを行った結果、陽性のバンドを得ることが極めて困難であった。そこで、恒常的にクリプトスポリジウムの検出される河川水を用いてPCRおよび濃縮分離手法の検討を行った。

河川水はK川より80Lを採水し、研究室に持ち帰りUF中空糸膜モジュール (ダイヤセンメンブランシステムズ) でろ過濃縮した。ろ過後、界面活性剤を加えたPBS100 mlを膜モジュールに加え、よく振とうしたのちプラスチック遠心管に回収した。回収した試料は1,200 × g, 10 min 遠心分離したのち上清をアスピレーターで吸引除去した。沈殿物に精製水を加えてタッチミキサーで十分に攪拌したのち、IMS法で精製し、蛍光抗体染色したのち、2.11) および2) に示した方法でオーシストを単離してPCRを行った。

2.4 増幅産物の解析

PCRで得られた増幅産物の解析は塩基配列のシーケンスとBLASTによるホモロジーの検索を行った。また、ポリスレオニン領域のプライマーを用いた増幅産物は*Rsa* I切断パターンによるRFLPも行い、簡

易的に解析した。

結果と考察

3.1 添加実験によるクリプトスポリジウムオーシスト1細胞からのPCR

ポリスレオニン領域を標的とし、*C. parvum* HNJ-1株1オーシストを鋳型としてPCRを行った53回のうち47回(89%)で、目的の518bp付近にバンドが得られた。また、同様に*C. parvum* IOWA株を用いた場合では10試料中10試料で518bp付近の増幅が確認された。添加するオーシスト数を2個とするとHNJ-1株では陽性率は高くなり、2オーシストを添加した18回の試験のうち17回で陽性の結果が得られた (Table 1)。添加実験に用いたオーシストは*C. parvum*を感染させたSCIDマウスの糞便からショ糖浮遊法を繰り返して精製し、他の夾雑物を極力排除し、使用時まで冷蔵保存したものであり、マウスへの感染試験ではその感染力に減衰の認められない新鮮なものである。このような培養株を用いた純粋系では1オーシストからのPCRによる目的遺伝子の増幅が可能であった。

一方、18S rRNA領域のプライマーであるDIAGF/DIAGRを用いた場合には*C. parvum* HNJ-1株オーシストを用いた実験36回のうち、目的の435 bp付近に陽性のバンドが得られたのは26回で、PCR陽性率はポリスレオニンより若干低く、72%であった。本プライマーを用いたPCRでは、様々なPCRの反応温度、ポリメラーゼやプライマーの濃度など多くの検討を行ったが、陽性のバンドが得られたケースでも非特異なバンドやスメアが発生し、以降のシーケンス解析などに不都合な場合が多く、環境試料への使用にはさらなる条件の改良が必要であった。

3.2 下水から分離されたクリプトスポリジウムの調査

下水試料は2002年9月より2003年3月まで11回

Table 2 Number of *Cryptosporidium* oocysts from raw sewage

Sampling date	Vol. (liters)	oocyst (s)
9/2	4	8
9/10	4	7
9/18	4	0
9/25	4	13
10/8	1	2
1/15	4	22
1/18	1	1
2/13	4	7
2/25	4	5
3/11	2	1
3/25	2	5

にわたって1~4Lをサンプリングし、オーシストを単離した。単離したオーシストは全数で66個と極めて少数であった (Table 2)。このうち、10月までに単離した30オーシストについて、18S rRNA領域のDIAGF/DIAGR (16オーシスト) またはポリスレオニン領域のCry44/Cry373 (14オーシスト) のプライマーを用いて1オーシストでPCRしたが、18S rRNA領域のプライマーを用いた1試料のみ、目的の435 bp付近に増幅産物が得られた。増幅に成功した1試料はシーケンスを行い、塩基配列のホモロジーの検索を行った結果、米国でヒトからの分離例が報告されている。*C. parvum* isolate HCTX8 (genotype 2) と高い相同性が認められた (393bp中387bp (プライマー含まず, 以下同) (98%) が一致, E value = 0.00)。

下水から分離したクリプトスポリジウムの遺伝子型を解析することは汚染源対策やクリプトスポリジウムの疫学について重要な情報をもたらすものである。今回の検討ではPCRで目的の増幅産物を得ることが極めて困難で、PCRによる特異配列の検出や増幅産物の解析ができたのは1サンプルについてのみであった。したがって、陽性率を向上させるための分離精製方法の検討やPCRの条件の最適化を行った上で、さらなる情報の積み上げが必要である。そこで、クリプトスポリジウムオーシストが高濃度に存在するk川河川水を対象に濃縮分離・PCRの手法の

検討を行った。

3.3 河川から分離したクリプトスポリジウムによる検討

クリプトスポリジウムが常時検出される河川水を用いて手法の検討と調査を行った。ポリスレオニン領域のPCRでは河川水より単離したオーシスト1個を用いた実験10回のうち3回で518bpに特異的な増幅産物が見られた。培養・精製した*C. parvum* HNJ-1株を用いた場合では57回中43回 (陽性率89%) で特異的なバンドが確認されたのに対して、河川分離株では、陽性率は30%となった。これは①河川水由来の阻害物質によってPCR反応が阻害された、②環境に放出されたオーシストのDNAの保存状態が悪い、③使用したプライマー (*C. parvum* に特異と言われている) で検出できない*Cryptosporidium* 株の存在、3つの可能性によることが考えられた。一方でPCRに用いるオーシストの数を増やすことで陽性率は高くなり、3オーシストの場合は5試料中4試料、5オーシストでは5試料中5試料で陽性となった (Table 3)。1オーシストを用いて陽性の結果が得られた3試料の増幅産物は*Rsa I*で消化するとともに、同一試料をシーケンスした。*Rsa I*の消化パターン⁶⁾は3試料ともヒトを含む広い宿主域を有する*C. parvum* genotype 2と合致した (Fig.1)。このうち2試料について増幅産物の一部分のシーケンスに成功し、配列の明らかになった部分のホモロジー検索の結果、*C. parvum* polythreonine protein gene (genotype 2) と高い相同性 (230bp中220bp (95%), E = 8e-84および362bp中359bp (99%), E = 0.0) が示され、RFLPの結果と一致した (Table 4)。

一細胞あたりのコピー数が多い18S rRNA領域を標的としたPCRではDIAGF/DIAGAのプライマーセットを用いた場合、多数の非特異領域のバンドやスメアが観察されたため、18S rRNA領域の別の部位を標的とする18SIF/18SIRを用いてPCRを行った。河川水分離株1オーシストを用いた10試料のうち5試料で特異な増幅が観察され、3および5オーシス

Table 3 Results of PCR from river water samples

Primer set	1 oocyst	3 oocysts	5 oocysts
Poly threonin	3/10	4/5	5/5
18S-rRNA(18SIF/R)	5/10	5/5	5/5

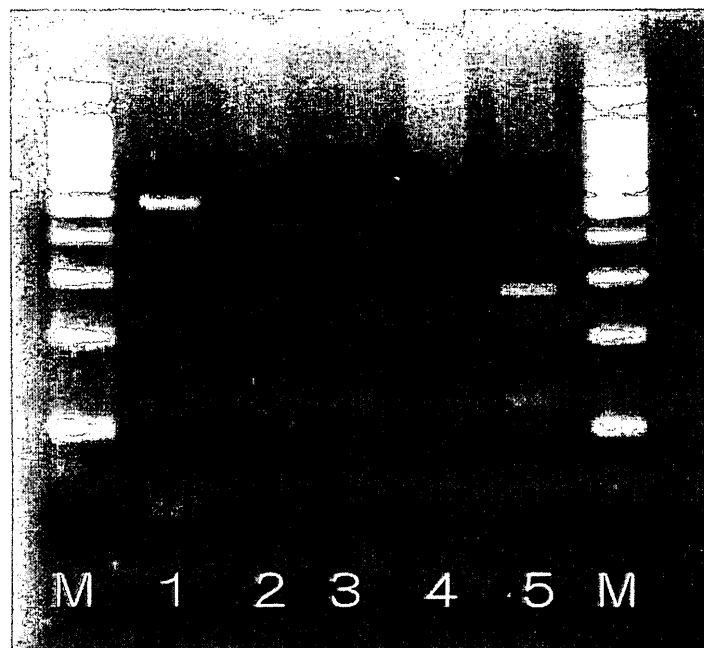


Fig.1 PCR amplification and RFLP pattern of poly threonin gene of *Cryptosporidium* obtained from river M: Size marker 100bp ladder; Lane 1: 518bp fragment of *C. parvum* HNJ-1; Lane 2: Restriction fragment of *C. parvum* HNJ-1 (genotype 2); Lane 3-5: Restriction fragment of *Cryptosporidium* obtained from river

Table 4 RFLP and BLAST result for poly threonin gene sequences isolate from river water samples

	No. of <i>Rsa</i> I restriction site	Identities between genotype 2	E value
Genotype 1	2	—	—
Genotype 2	3	—	—
Isolate from River 1	3	99% (359/362)	0.00E+00
Isolate from River 2	3	95% (220/230)	8.00E-84

トを用いたPCRでは全ての試料で陽性のバンドが得られた。1オーシストを用いた5試料のうち3試料はシーケンスで塩基配列が明らかになり、ホモロジー検索の結果、広く *Cryptosporidium* spp. に保持されている18S rRNA領域の一部と一致した。

本河川のケースでは現行の蛍光抗体染色と顕微鏡観察に基づく試験方法でクリプトスポリジウム様の顕微鏡観察像が確認された粒子の30～50%から、2種のプライマーを用いたPCRでクリプトスポリジウムに特異な増幅産物が認められ、*Cryptosporidium* sp. であることが確認された。さらにポリスレオニン領域でのPCR-RFLPおよびシーケンスにより、ヒトへの感染性を有する可能性の高い *C. parvum* に特異的な遺伝子を有し、かつ genotype 2 であることが示された。

まとめと今後の展開

水環境のクリプトスポリジウム汚染レベルの測定は蛍光抗体染色法に基づいた形態観察で行われているが、適切な汚染源対策や水源環境の管理および浄水処理のためには遺伝子型別の汚染レベルの把握が必要である。培養株を用いた純粋な系では1オーシストを用いて高感度にPCRで標的遺伝子の増幅が可能であった。しかしながら下水分離株ではPCR陽性の結果を得ることができず、陽性となったのは30試料のうちわずか1試料のみだけであった。この1試料についてのシーケンスとホモロジー検索の結果、*C. parvum* isolate HCTX8と相同性が高かったが、さらにデータを積み上げるためには手法の検討が必要であった。そこで、入手が容易な、クリプトスポリ

ジウムが常時検出される河川水を用いて手法の検討と調査を行った。

河川分離株では現行の蛍光抗体染色と顕微鏡観察に基づく試験方法で、クリプトスポリジウム様の顕微鏡観察像が確認された粒子は、本河川のケースではその30～50%でポリスレオニン領域または18S-rRNA領域を標的としたPCRでクリプトスポリジウムに特異な増幅産物が認められ、*Cryptosporidium* sp.であることが確認された。さらに、ポリスレオニン領域でのPCRより、ヒトへの感染を有する可能性の高い*C. parvum*に特異的の高い遺伝子を有していることが明らかになった。

今後は試験方法の改良を進めると共に、下水を中心にデータの収集を試みる予定である。

参考資料

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知, 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針, 1998.
- 2) Pieniazek, N. J. *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 3 444-449, 1999.
- 3) Morgan-Ryan, U. M. *et al.*, *Jour. of Eukaryote Microbiology*, 49, 6, 433-440, 2002.
- 4) Jonson, D. W. *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 11, 3849-3855, 1995.
- 5) Xiao. L. *et al.*, *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3, 1097-1101, 2001.
- 6) Carraway, M. *et al.*, *Infection and Immunity*, 65: 3960, 1997.
- 7) Morgan, M.U. *et al.*, *Jour. of Parasitology*, 83, 5, 825-830, 1997.