

## ◆ 水循環における水質リスク評価特集 ◆

リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムオーシストの  
定量検出法の開発

北村友一\* 鈴木 穰\*\*

## 1. はじめに

平成 8 年 6 月に、埼玉県越生町において水道水を原因とするクリプトスポリジウム感染症が発生した。この集団感染症の原因は、浄水場の取水地点上流に農村集落排水処理施設が位置しており、河川を介して排水処理施設の処理水と上水との間でクリプトスポリジウムの増殖循環系が形成されたことにより汚染が拡大したとされている。

近年、下水道の普及により、河川上流域に下水処理施設が建設されることが増え、また、下水処理水量の増加は、河川水や上水原水に占める下水処理水の割合を増加させている。公共用水域への負荷削減、上水道施設と下水道施設間における増殖循環形成の阻止、一旦形成された増殖循環の断ち切りのためには、下水処理施設においてクリプトスポリジウムを十分に安全なレベルまで除去するか不活化しなければならない。

クリプトスポリジウムは少ない個数で感染が成立し、水中ではオーシスト(強固な殻に守られている状態)と呼ばれる形態で存在している。オーシスト化したクリプトスポリジウムは塩素消毒に著しく耐性があり通常の病原細菌とは大きく異なる特徴を有している。これまでの病原細菌に対する不活化法では、不活化効果は期待できないことから、現時点では、下水処理過程においてオーシストを可能な限り除去することが重要である。下水処理過程でのオーシストの除去能力を向上するためには、前凝集や凝集剤添加活性汚泥法が有効であることが報告されている<sup>1)</sup>が、オーシストを除去するための処理を追加するかどうかを判断するには、流入下水中のオーシストを検出し定量することが重要となる。また、処理が適切に行われているかを確認するため、放流水中のオーシスト濃度の把握も重要である。通常、オーシストは、蛍光抗体染色を施した後、顕微鏡観察により検出されている。しかし、多くの夾雑物を含む下水試

料からオーシストを顕微鏡観察により検出することは困難であるのが現状である。さらに、クリプトスポリジウムによる感染リスクを評価する場合、水中に存在するオーシストの生死判定が重要となる。

著者らは顕微鏡観察を必要としない PCR 法による下水中のクリプトスポリジウムオーシストの迅速定量検出方法の開発を目指している。本稿はリアルタイム PCR 法によりクリプトスポリジウムオーシストを定量検出するための基礎的条件の検討と生存オーシストがリアルタイム PCR 法により検出可能かどうかを検討したものである。

## 2. リアルタイム PCR 法について

PCR(Polymerase chain reaction:ポリメラーゼ連鎖反応)法は試験管内で DNA を簡便に複製する方法であり、極微量の DNA を電気泳動法で十分に検出し、解析できる程度まで DNA 量を増やすことができる。原理は次のとおりである。DNA は高温(94℃)にすると二本の鎖がほどけて一本ずつばらばらになり、徐々に温度を下げると元通りの二本鎖に復元する性質をもっている。二本鎖がほどけたときに、複製したい標的とする DNA 領域の両端に結合する大量の DNA 断片(プライマーと呼ぶ)を入れ、温度を徐々に下げると(50℃程度まで)、プライマーはそれぞれの鎖上の相補的な配列の部位に優先的に結合する(アニーリングと呼ぶ)。そこに 72℃を至適温度とする DNA ポリメラーゼという耐熱性の酵素と四種類の塩基が存在し、かつ、温度を 72℃まで上昇させると、プライマーが結合した部分を起点としてそれぞれの鎖を合成していく。温度の上下(94℃→50℃→72℃→94℃)のサイクルを 40 回前後繰り返すだけで DNA 合成の連鎖反応が起こり、試験管内で短時間に DNA を 10 万倍に増やすことが可能となる。標的とする微生物の DNA 塩基配列が明らかであれば、極微量の DNA を検出または解析可能なレベルまで増幅することができる。従来、PCR により増幅された DNA は、電気泳動法によ

Development of Quantitative Detection Method of the *Cryptosporidium* oocysts with Realtime PCR

り確認されてきたが、この方法では、初期 DNA を定量することが難しいという欠点があった。これは、試料中の標的微生物の濃度把握が困難であることを意味している。近年、PCR により増幅された DNA が蛍光シグナルにより PCR 中にリアルタイムで検出できるようになってきた。このリアルタイム PCR 法を利用することにより試料中の初期 DNA を簡便に定量することが可能となった。即ち、既知試料について DNA の対数直線増殖領域の蛍光強度を連続測定し、ある蛍光強度に到達するサイクル数と初期 DNA 濃度の相関関係をスタンダードとすることにより、未知試料中の標的 DNA が定量される。リアルタイム PCR 法は、医学、生物、環境の分野において、微生物の定量検出や遺伝子の発現量の測定に利用され始めている。

PCR 中の DNA の蛍光標識方法には 2 種類ある。2 本鎖状態の DNA に特異的に結合するサイバークリーンという蛍光試薬を利用する方法 (以下サイバークリーン法) と、もう 1 つの方法は、PCR により合成された DNA の内部の塩基配列に特異的に結合する蛍光標識を利用する法 (以下ハイブリダイゼーションプローブ法) である。

### 3. クリプトスポリジウムを検出するための標的遺伝子とプライマー及びプローブの設計

現在までに、クリプトスポリジウムの様々な遺伝子の塩基配列は読み取られ、ジーンバンクに登

録されている。その中でもクリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子 (細胞が熱や重金属などストレスを受けたときに発現する遺伝子) の全塩基配列は決定されており、また、様々な株の塩基配列も登録されインターネット上で公開されている。そこで、著者らは、クリプトスポリジウムの PCR 検出には情報量が豊富にあるクリプトスポリジウム熱ショック蛋白質遺伝子を標的とすることとし、リアルタイム PCR 検出のためのプライマーとプローブを設計した。設計したプライマーとプローブおよびその塩基配列を図-1 及び表-1 に示した。

### 4. リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出実験

#### 4.1 実験方法

本実験ではロッシュ社製のリアルタイム PCR 装置 (lightCycler) を使用した。はじめに、サイバークリーン法の適用性を検討した。オーシストを 20,000 個, 6,666 個, 2,000 個, 666 個, 200 個, 66 個, 20 個, 6 個, 2 個, 0.6 個の 10 段階の希釈系列を作成し、これらの試料から前報の手順<sup>2)</sup>により DNA の抽出操作を行い、100 $\mu$ l の溶出液に DNA を抽出した。このうち 5 $\mu$ l 中に存在するクリプトスポリジウムの DNA についてサイバークリーン法によるリアルタイム PCR 検出を行った。サイバークリーン法の反応試薬には LC FarstStart DNA Master SYBR GreenI kit を使用した。本

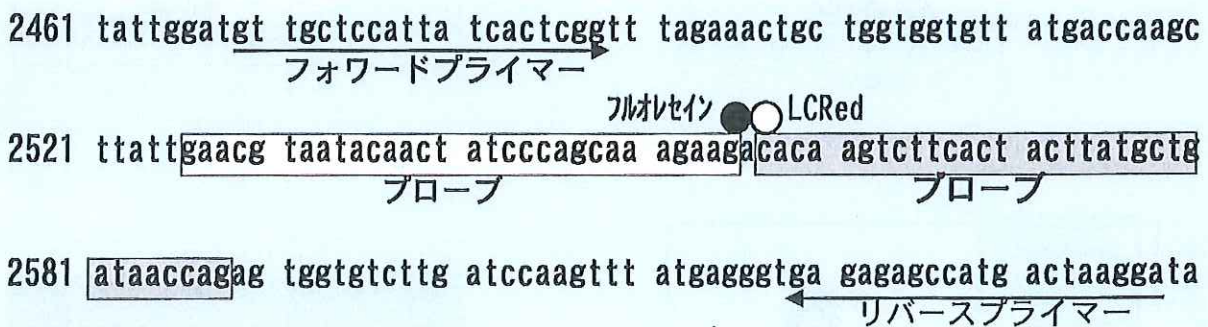


図-1 クリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子検出用のプライマー及びプローブの位置  
 ジーンバンク：アクセス番号 U11761, *Cryptosporidium parvum* KSU-1 heat shock 70 kDa protein (hsp70) gene, complete cds. より設計、増幅領域 DNA サイズ：171bp

表-1 クリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質の PCR 検出用プライマーとプローブの塩基配列

| プライマーの塩基配列  |  |
|---|--|
| フォワードプライマー  | : 5'-GTT GCT CCA TTA TCA CTC GG-3'     |
| リバースプライマー   | : 5'-TCC TTA GTA GTC ATG GCT CTC TC-3' |
| プローブの塩基配列   |  |
| 5'-GAA CGT AATACA ACT ATC CCA GCA AAG AAG-3'              | フルオレセイン                                |
| 5'-LCRed640-CAC AAG TCT TCA CTA CTT ATG CTG ATA ACC AG-3' | LCRed                                  |

実験での試薬の濃度を表-2 に示す。

次に、同試料を用いてハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムの DNA 検出を行った。ハイブリダイゼーションプローブ法の反応試薬は LC FastStart DNA Master Hybridization probes kit を使用した。反応試薬の濃度を表-3 に示した。サイバークリーン法、ハイブリダイゼーションプローブ法とも PCR 温度条件は同一とし、熱変成を 95 °C で 10 分行った後、PCR を 95 °C 15 秒、60 °C 15 秒、72 °C 6 秒で 50 サイクル行った。

従来の電気泳動法とリアルタイム PCR 法の検

表-2 サイバークリーン法の試薬濃度

| 試薬の種類                                | 濃度    |
|--------------------------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O                     | 適宜    |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 3mM   |
| Forward Primer                       | 0.5μM |
| Reverse Primer                       | 0.5μM |
| LC FastStart DNA Master SYBR Green I | 1×    |

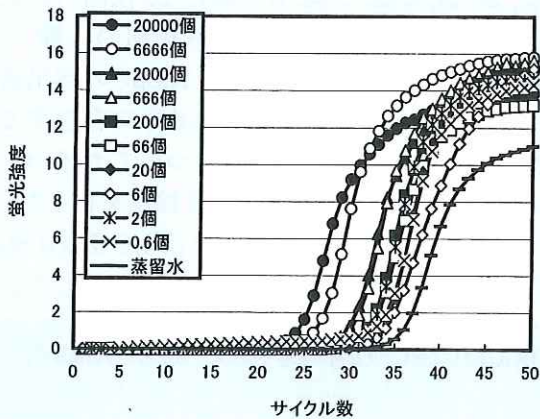


図-2 サイバークリーン法によるクリプトスポリジウムのリアルタイム PCR 検出結果

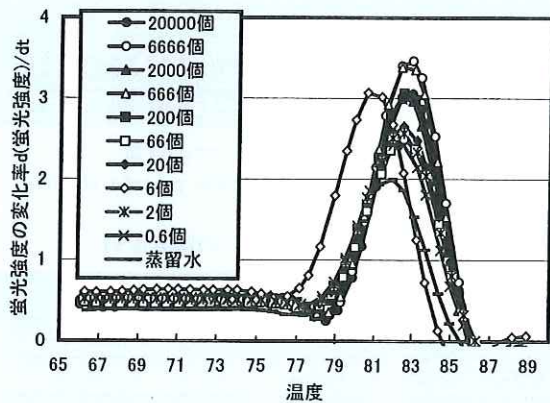


図-3 融解曲線サイバークリーン法による PCR 終了後、温度を 60 °C から 95 °C まで 1 秒間に 0.2 °C で上昇したときの、蛍光強度の変化率

出感度を比較するため、表-1 のプライマーを用いて、PCR を行い、増幅された DNA を電気泳動法で検出した。従来法の PCR 条件は、アニーリング温度をリアルタイム PCR 法と同じ 60 °C に変更した以外は前報<sup>2)</sup>と同じ条件で行った。

#### 4.2 実験結果

##### 4.2.1 サイバークリーン法によるクリプトスポリジウムの検出限界

図-2 は、サイバークリーン法によるリアルタイム PCR で検出した結果である。本図はサイクル数と蛍光強度の関係を示している。図よりすべての試料でサイクル数が進行すると共に蛍光強度も

表-3 ハイブリダイゼーション法の試薬濃度

| 試薬の種類                                | 濃度    |
|--------------------------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O                     | 適宜    |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 3mM   |
| Forward Primer                       | 0.5μM |
| Reverse Primer                       | 0.5μM |
| Fluorescein Probe                    | 0.2μM |
| LCRed Probe                          | 0.4μM |
| LC FastStart DNA Master SYBR Green I | 1×    |

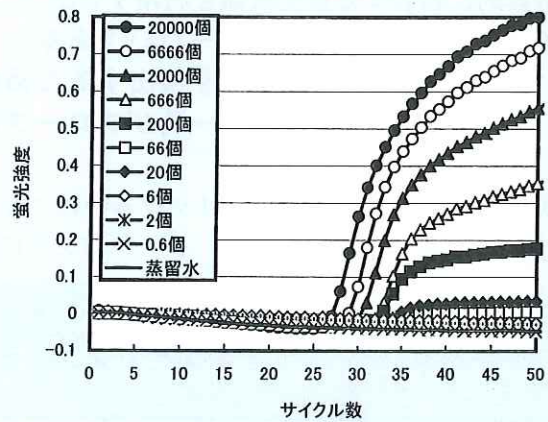


図-4 ハイブリダイゼーション法によるクリプトスポリジウムのリアルタイム PCR 検出結果

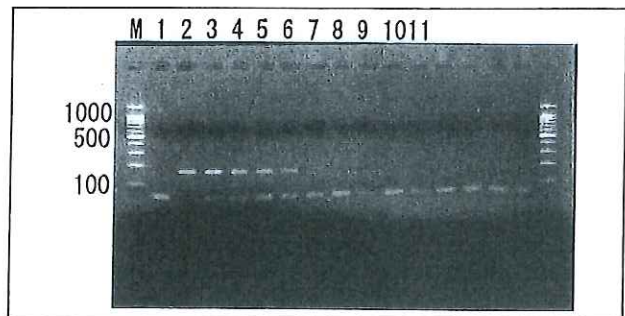


図-5 従来の電気泳動法によるクリプトスポリジウムの DNA 検出

M: 100~1,000bp マーカー、レーン 1: 蒸留水、レーン 2: 20,000 個、レーン 3: 6,666 個、レーン 4: 2,000 個、レーン 5: 666 個、レーン 6: 200 個、レーン 7: 66 個、レーン 8: 20 個、レーン 9: 6 個、レーン 10: 2 個、レーン 11: 0.6 個

増加していることがわかる。蛍光強度の増加は、クリプトスポリジウムを添加していない蒸留水の条件でも観察された。図-5の電気泳動の写真においても、蒸留水の条件(レーン1)において標的DNA以外のバンドが確認されていることから、PCR中にプライマーダイマー(プライマー同士が結合すること)が形成され、これにサイバークリーンが反応したためと考えられる。標的DNAとプライマーダイマーとの判別は、融解温度(DNAの2本鎖が一本鎖になる温度)から判別が可能となる。サイバークリーン法によるPCR終了後、温度を60℃から95℃まで温度を徐々に上昇すると、DNAが一本鎖になる温度域でサイバークリーン試薬も排除され、蛍光強度が減少する。図-3はこのときの蛍光強度の変化率を示したものである。一般的に、融解温度はDNAの塩基配列が同じであれば同じ温度となり、塩基配列が異なれば融解温度も異なる。図-3より試料中のオーシスト濃度が20,000個から66個までは、83℃付近に融解点が存在しているが、オーシストが66個以下で

は融解点は安定せず81~83℃付近にあることがわかる。融解点は微妙に異なっているが、1℃程度の融解温度の違いから、クリプトスポリジウムのDNAとプライマーダイマーを判別するのは困難であった。サイバークリーン法による正確な検出限界を判定することは困難であった。

#### 4.2.2 ハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムの検出限界

図-4はハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果である。図-4よりわかるとおり、ハイブリダイゼーションプローブ法はサイバークリーン法より特異性が高く標的遺伝子のみを検出することが可能となる。オーシスト数20個と66個の条件において蛍光強度は逆転したものの、オーシスト数20個と66個の条件の蛍光シグナルは検出された。しかし、オーシスト数20個以下では検出できなかったことから、オーシスト数20個以上から検出可能となることがわかった。

図-5は、同じ試料を従来法である電気泳動により検出したものである。その結果、オーシスト数200個以上でバンドが確認できたが、オーシスト数66個以下ではバンドは確認できなかった。従来法の検出限界を200個とすると、ハイブリダイゼーションプローブ法の検出限界は、従来法の電気泳動法より10倍程度高くなる。

#### 4.2.3 リアルタイムPCR法による定量限界

図-6はサイバークリーン法により蛍光強度が0.1に到達するまでに要したサイクル数とオーシストの個数の関係を示している。オーシスト数100個以上で、直線関係が得られることがわかった。図-7はハイブリダイゼーションプローブ法の場合である。ハイブリダイゼーションプローブ法の場合も、100個以上で直線関係が得られることがわかった。以上のことから、オーシスト数100個以上で定量可能となることがわかる。

今回の検討では、DNAを抽出した試料100 $\mu$ lの内5 $\mu$ l中(1/20)にクリプトスポリジウムのDNAが存在するかどうかを見たものである。さらに、検出限界と定量限界を向上する方法としては、抽出されたDNAが含まれる試料100 $\mu$ lを、さらに10 $\mu$ l程度まで濃縮し、この試料中のDNAをリアルタイムPCR検出することにより、検出限界と定量限界は向上するものと考えている。

今後は、検出限界と定量限界の向上を目指すと共に、実試料への適用性を検討したいと考えてい

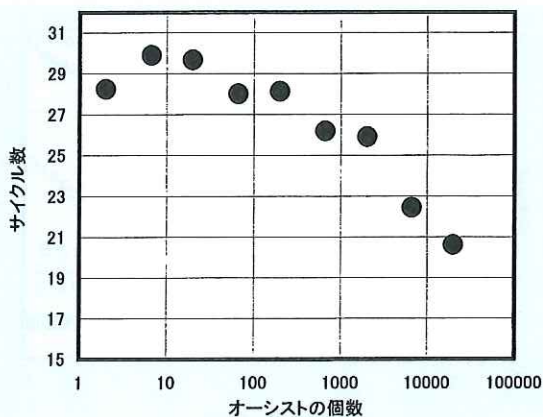


図-6 サイバークリーン法による検量線  
(オーシストの個数と蛍光強度が0.1に達するまでに要するサイクル数の関係)

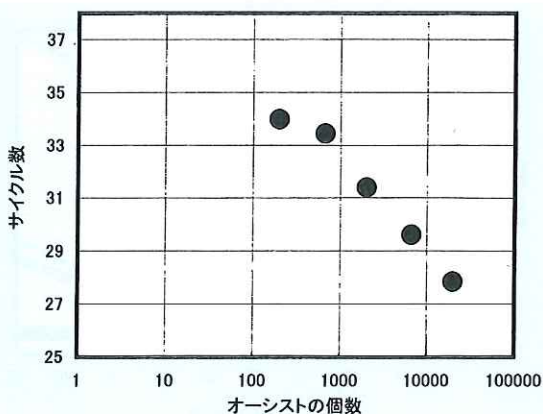


図-7 ハイブリダイゼーションプローブ法による検量線  
(オーシストの個数と蛍光強度が0.08に到達するまでに要するサイクル数の関係)

る。また、著者らは、細胞培養法によりクリプトスポリジウムの感染性を評価<sup>3)</sup>しているが、細胞中のクリプトスポリジウムの検出にも適用できるものと考えている。

### 5. 生存クリプトスポリジウムオーシストの検出方法の検討

標的を DNA としている場合、検出されたクリプトスポリジウムの生死は判定できない。生存クリプトスポリジウムの検出は、生細胞においてのみ発現されるメッセンジャー RNA (以下 mRNA とする) を標的とすることにより可能になると考えられている<sup>4)</sup>。そこで、リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子の mRNA の検出を試みた。

#### 5.1 実験方法

新鮮なクリプトスポリジウムオーシストを 10,000 個、1,000 個、100 個、10 個の 4 段階に 10 倍希釈し、それぞれの試料に熱ストレスを 45℃ 20 分間与えた。その後、凍結融解法でクリプトスポ

リジウムを破壊し、東洋紡社製の MagExtractor RNA キットにより RNA の抽出を行った。RNA 抽出液には DNA の混入もあると考えられるため、DNase (DNA 分解酵素) で DNA を分解した後、RT (Reverse Transcription の略で RNA を DNA に逆転写する反応)-PCR 法による検出を試みた。なお、RT-PCR 法において DNA を検出していないことを確認するため、同試料の PCR もおこなった。

次に、50%のキッチンハイター (主成分は次亜

表-4 RT-PCR 法の反応試薬濃度 (ハイブリダイゼーションプローブ法)

| 試薬の種類                                | 濃度     |
|--------------------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O                     | 適宜     |
| Mn(Oac) <sub>2</sub>                 | 3.25mM |
| Forward Primer                       | 0.5μM  |
| Reverse Primer                       | 0.5μM  |
| Fluorescein Probe                    | 0.2μM  |
| LCRed Probe                          | 0.4μM  |
| LC FastStart DNA Master SYBR Green I | 1×     |

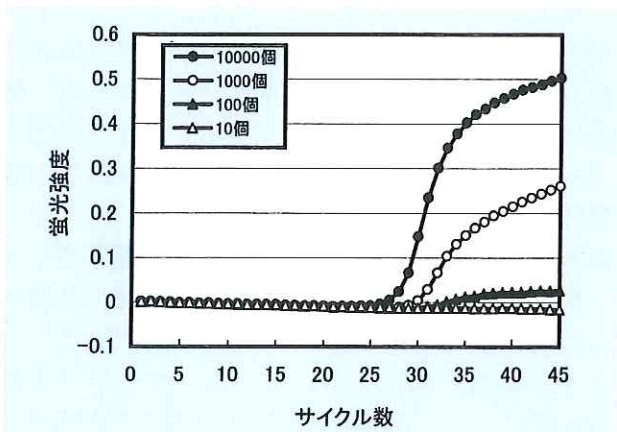


図-8 RT-PCR 法によるクリプトスポリジウムのリアルタイム PCR 検出結果

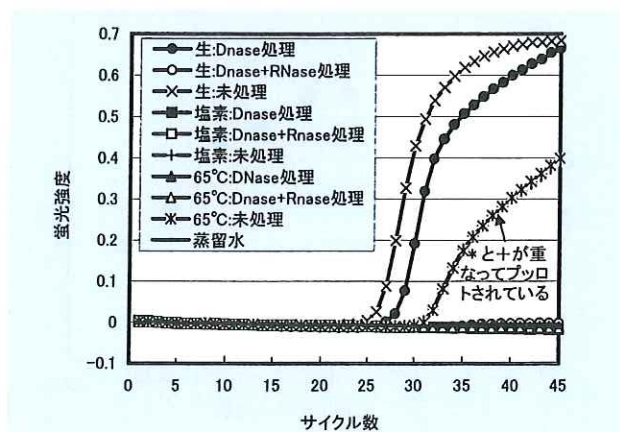


図-10 不活性処理を施したクリプトスポリジウムの RT-PCR 検出結果

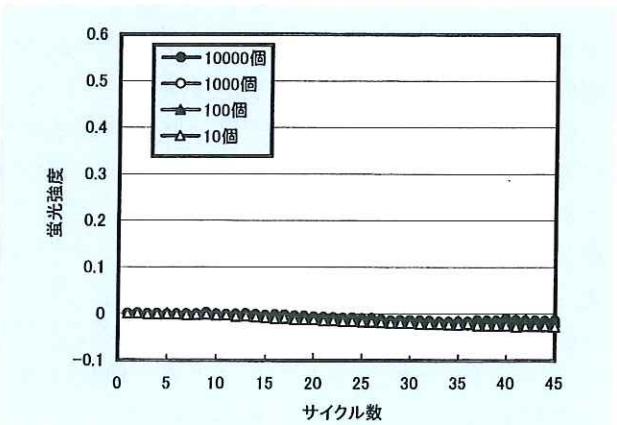


図-9 PCR 法によるクリプトスポリジウムのリアルタイム PCR 検出結果

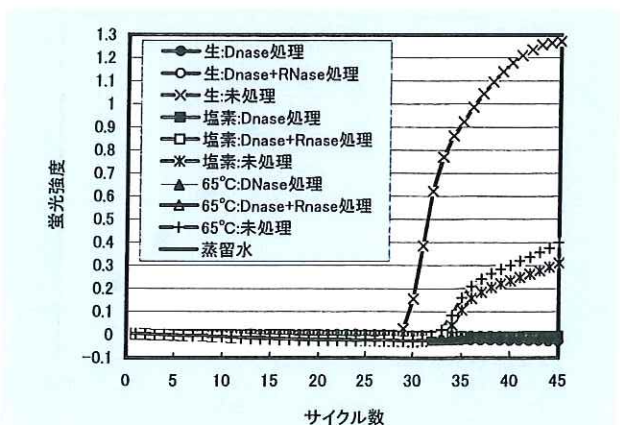


図-11 不活性処理を施したクリプトスポリジウムの PCR 検出結果

表-5 不活性化処理を施したオーシスト RT-PCR および PCR 検出結果

|        | 不活性化処理方法               | DNase | DNase+RNase | 未処理 |
|--------|------------------------|-------|-------------|-----|
| RT-PCR | 不活性化処理なし               | +     | -           | +   |
|        | 塩素処理(50%のキッチンハイター中で一晚) | -     | -           | +   |
|        | 65℃で30分間加熱             | -     | -           | +   |
| PCR    | 不活性化処理なし               | -     | -           | +   |
|        | 塩素処理(50%のキッチンハイター中で一晚) | -     | -           | +   |
|        | 65℃で30分間加熱             | -     | -           | +   |

塩素酸ナトリウム) 中に一晚(約 15 時間)と 65℃で 30 分間不活性化処理を施したオーシストと、さらに、対照として不活性化処理を施していないオーシストを 45℃ 20 分間の条件で mRNA を誘導発現した後、前述の RNA 抽出キットを用い、RNA を蒸留水 30μl に抽出した。その後、RNA 抽出液を 10μl ごと 3 等分し、1 つの試料には RNA のみを検出するため DNase 処理を施し、2 つ目の試料には DNase 処理で陽性になった試料が RNA であることを再確認するため DNase+RNase (RNA 分解酵素) 処理を施し (RNA なら陰性となる)、3 つ目の試料は未処理とし、それぞれ 3 試料について RT-PCR と PCR を行った。なお、RT-PCR 法はハイブリダイゼーションプローブ法とし、4.1 と同じプライマーおよびプローブを使用した。RT-PCR に用いた試薬は、ワンステップ(一本のチューブ中で RT と PCR を行う方法) 反応試薬である LC RNA Master Hybridization probe kit を使用した。反応試薬の濃度を表-4 に示す。RT-PCR の温度条件は、RT 反応を 61℃ 20 分間行った後、続けて、熱変成を 95℃ 2 分行い、PCR を 95℃ 5 秒、60℃ 15 秒、72℃ 6 秒で 45 サイクル行った。

5.2 実験結果

図-8 は、4 段階 10 倍希釈したオーシストの RT-PCR 法による検出結果である。図-9 は同試料を PCR 検出した結果である。図-8, 9 より RT-PCR 法では、オーシスト数 100 個以上から蛍光シグナルが検出され、PCR 法では、オーシスト濃度に関係なく、蛍光シグナルが検出されないことがわかる。このことから、RT-PCR で検出された DNA は、mRNA を反映していると考えられる。

図-10 は、塩素と加熱による不活性化処理を施したオーシストおよび不活性化処理を施していないオーシストを RT-PCR により検出した結果である。図-11 は同試料を PCR 検出した結果である。表-5 は本実験結果を一覧表にしたものである。不活性化処理を施したオーシストの RT-PCR (DNase 処理有り) は陰性となっており、表-1 のプライマーお

よびプローブを用い RT-PCR を行うことにより生存クリプトスポリジウムオーシストを検出することが可能となった。今後は DNA と mRNA の区別が付くプライマーやプローブを設計する必要がある。さらに、生存クリプトスポリジウムオーシストの正確な定量方法を検討する必要がある。

6. まとめ

リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出では、ハイブリダイゼーション法を用いることにより特異性の高い検出が可能となることがわかった。ハイブリダイゼーション法では、オーシスト数 20 個以上から検出可能であり、100 個以上で定量可能となることがわかった。また、mRNA を標的とすることにより生存クリプトスポリジムの検出も可能となることがわかった。

参考文献

- 1) 諏訪守、鈴木穰：下水処理のクリプトスポリジウム除去効果およびその向上、下水道協会誌, Vol.39, No.474, pp.135-144, 2002.
- 2) 北村友一、鈴木穰：PCR 法による下水中のクリプトスポリジウムオーシストの検出方法の開発、土木技術資料, 43-9, pp.22-27, 2001.
- 3) 北村友一、鈴木穰：耐塩素病原性原虫のクリプトスポリジウムの感染性評価手法と不活性化方法の開発、土木技術資料, グラビア, pp.22-27, 2001.
- 4) Christine Kaucner and Timothy Stinear : Sensitive and Rapid Detection of Viable Giardia Cysts and Cryptosporidium parvum Oocysts in Large-Volume Water Samples with Wound Fiberglass Cartridge Filters and Reverse Transcription-PCR Appl. Envir. Microbiol. 1998 64: 1743-1749.

北村友一\*



独立行政法人土木研究所  
材料地盤研究グループ  
リサイクルチーム研究員  
Tomokazu KITAMURA

鈴木 穰\*\*



同 材料地盤研究グループ  
リサイクルチーム  
上席研究員  
Yutaka SUZUKI