

◆ 水質リスクマネジメント特集 ◆

PCR法による下水中のクリプトスボリジウムオーシストの検出方法の開発

北村友一* 鈴木 穂**

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ボ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ボ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、環境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。このように、下水処理水を含む環境水が上水に利用されることが多いといつある。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を断ち切るために、下水処理施設においてクリプトスボ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。

クリプトスボリジウムは少ない個数で感染が成立し、環境水中ではオーシスト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ボ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。著者らは下水中のオーシストを除去するための追加処理として、前凝集や凝集剤添加活性汚泥法が有効であることを明らかにしてきた。オーシストを除去するための追加処理を行う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。通常、オーシストの検出は、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

の夾雑物を含む流入下水中からオーシストを検鏡により検出することは困難であるのが現状である。

そこで、著者らは顕微鏡観察を必要としないPCR法による流入下水中のクリプトスボリジウムオーシストの検出と定量方法を研究している。本稿は、流入下水中のクリプトスボリジウムオーシストをPCR法により検出するためのオーシストの精製方法およびDNA抽出方法を検討したものである。

2. 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方法である。原理は以下のとおりである。DNAは高温(94°C)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き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(50°C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(アニーリング呼ぶ)。そこに72°C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°C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°C → 50°C → 72°C → 94°C)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の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。近年このPCR法は、大腸菌O157、サルモネラ菌、レジオネラ菌などの病原性細菌の検出にも利用されるこ

Development of Detection Method of the Cryptosporidium Oocysts in the Sewage by Polymerase Chain Reaction

とも多くなってきていている。クリプトスポリジウムに関しては、これまでのところ、クリプトスポリジウムをPCR検出するためのプライマーの開発に関する研究報告は多く存在するが、PCR法の下水への適用に関する研究は見られない。

3. 免疫磁気ビーズ法について

PCR法は酵素反応であり、反応を阻害する物質が含まれているとDNAの増幅も阻害される。下水中のクリプトスポリジウムオーシストのPCR検出を成功させるためには、下水中のクリプト

スポリジウムオーシストを高精度に分離精製する必要がある。著者らは、下水からのオーシストの分離精製は、粒径差と比重差によりオーシストを分離した後、さらに、免疫磁気ビーズによりオーシストを精製することで、クリプトスポリジウムオーシストのPCR検出は可能となると考えた。免疫磁気ビーズによるオーシストの精製原理は図-1に示すとおりである。クリプトスポリジウムオーシストの抗体が結合した約5μmの磁性ビーズを、オーシストが含まれる試料に入れオーシストと磁性ビーズを特異的に結合させる。その後、強力な磁石を使用しオーシストが結合している磁性ビーズを引き寄せ、オーシストを精製する。本法により夾雑物からのオーシストの高純度精製が可能であると考えられる。

4. 実験方法

検討方法は、実流入下水へのオーシストの添加回収実験から評価した。以下に実験方法を示す。

4.1 供試クリプトスポリジウムオーシスト

本実験で使用したクリプトspoリジウムオーシストは、当時大阪市立大学医学部医動物学教室(現在金沢大学)の井関基弘博士から分与されたHNJ-1株である。

4.2 DNA抽出方法の検討

オーシストからのDNAの抽出は、簡便なQiagen社製のDNeasy Tissueキットを使用した。しかし、本キットは、クリプトspoリジウム用に開発されたものではなく、抽出操作はクリプトspoリジウムオーシストからのDNA抽出に適する方法に修正する必要がある。本キットの抽出過程においてDNAの抽出に最も影響する抽出操作は、プロテナーゼKの処理温度と処理時間と考えられた。本キットの説明書²⁾中で推奨しているプロテナーゼKの処理温度と処理時間は、70°C、30分もしくは55°C、溶菌するまでとなっている。そこで、プロテナーゼKの処理条件を

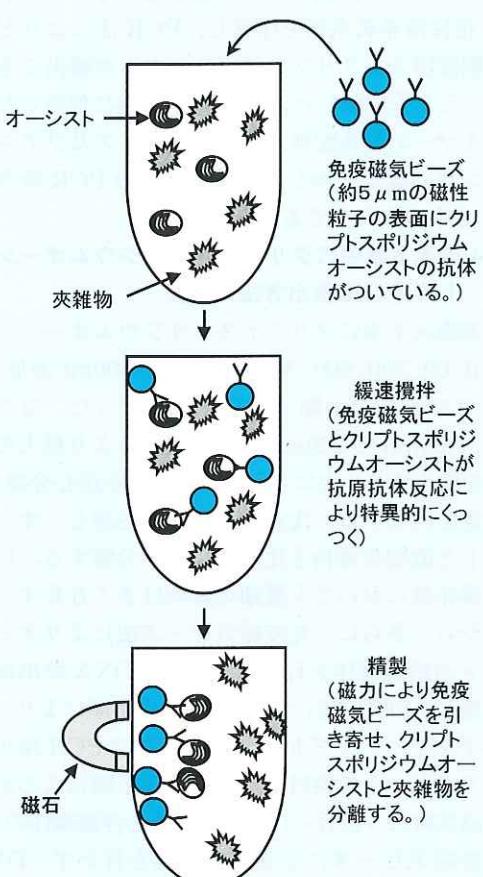


図-1 免疫磁気ビーズの原理

表-1 プライマーの種類

開発者	標的遺伝子	プライマー配列	増幅産物サイズ	アニーリング温度
Wu ³⁾	RAPDgene	5'-CTCCGGTTCGATGATGCAGATG-3' 5'-CGGCCCTGTAGAAATAAGTCA-3'	458bp	51 °C
Rochelle ⁴⁾	Hsp70gene	5'-AAATGGTGAGCAATCCTCTG-3' 5'-CTTGGCTGCTTACCACTGAC-3'	361bp	55 °C
Awad ⁵⁾	18SrRNA gene	5'-AGTGCTTAAGCAGGGCAACTG-3' 5'-CGTTAACGGAATTACCAGAC-3'	556bp	50 °C

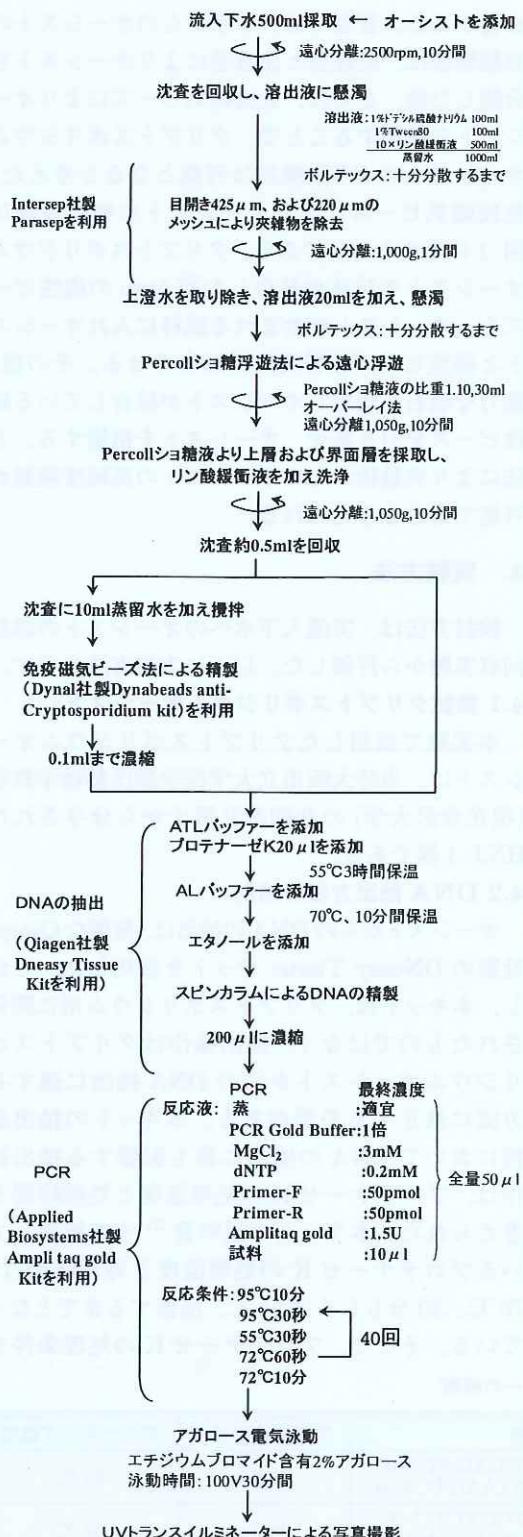


図-2 流入下水中のクリプトスポリジウムのPCR検出手順

70 °C、30分と55 °C、3時間の2条件からオーシスト内部のクリプトスポリジウムのDNAの抽出率が高くなる処理条件を検討した。実験ではオーシストの10倍段階希釈系列を作成し、PCR法によりどの希釈段階までクリプトスポリジウムを検出できるかを検討した。

4.3 プライマーの選択

これまでに、クリプトスポリジウムのPCR検出用のプライマーは数種類開発されてきている。本実験では、Wu³⁾, Rochelle⁴⁾, Awad-EL-Kariem⁵⁾らが開発したプライマーの中から検出感度の高いプライマーを検索した。実験では、オーシストの10倍段階希釈系列を作成し、PCR法によりどの希釈段階までクリプトスポリジウムが検出できるかどうかを評価した。表-1に本実験に使用したプライマーの塩基配列、増幅産物サイズ及びアンギングの温度を示した。本実験でのPCR条件は図-2中のとおりである。

4.4 流入下水中のクリプトスポリジウムオーシストのPCR検出方法の検討

実流入下水にクリプトスポリジウムオーシストを0, 60, 300, 600, 3000, 6000個/500ml添加し、図-2に示した手順により分析を行った。はじめに、425μmと220μmのメッシュにより粗大夾雑物を除去する。次にメッシュ通過液を遠心分離し、沈査を回収する。沈査は遠心浮遊処理し、オーシストと微細夾雑物を比重差により分離する。以上の操作後においても微細夾雑物は多く存在することから、さらに、免疫磁気ビーズ法によりオーシストの精製操作を行う。その後、DNA抽出操作を施し、PCRを行う。以上の操作手順により、流入下水中のクリプトspoリジウムがPCR検出できるかどうかを検討した。本操作手順による添加回収実験は5回行った。また、遠心浮遊操作の後、免疫磁気ビーズによる濃縮精製を行わず、DNAを抽出する手順において、クリプトspoリジウムがPCR検出できるかどうかも検討した。この添加回収実験は3回行った。

5. 実験結果

5.1 DNA抽出法方法の検討結果

写真-1はプロテナーゼKの処理温度と処理時間とPCR検出感度の関係を示している。なお、写真-1の結果は、Wuらのプライマーにより得ら

れたものである。写真からわかるように、プロテナーゼ K の処理を 55 °C、3 時間、施すことにより 70 °C、30 分間処理したものよりも検出感度が 100 倍程度向上することがわかった。この結果から、流入下水中のクリプトスピリジウムの PCR 検出におけるプロテナーゼ K の処理温度と処理時間は 55 °C、3 時間とした。

5.2 プライマーの選択結果

写真-2 は、5.1 実験において 55 °C、3 時間プロテナーゼ処理し、抽出した DNA を試料として、Wu, Rochelle, Awad-EL-Kariem らのプライマーの検出感度を見たものである。どのプライマーも検出感度は高く、全て 10^0 個のオーシストまで検出可能であった。写真-2 より、最も感度の高いプライマーは Wu らのプライマーであることが判断できるが、Wu らのプライマーを実下水試

料に適用した場合、標的以外の領域を增幅している可能性を示す非特異バンドがみられた。そこで最も非特異反応が少ない Rochelle らのプライマーを下水試料に適用することとした。

5.3 流入下水中のクリプトスピリジウムオーシストの PCR 検出結果

免疫磁気ビーズによる精製操作を挿入した場合の検出結果を写真-3 (a) に、免疫磁気ビーズ法による精製操作を施さない場合の検出結果を写真-3 (b) に示した。写真よりわかるように免疫磁気ビーズによる精製操作を追加することにより流入下水中のクリプトスピリジウムオーシストの PCR 検出は可能となることがわかった。免疫磁気ビーズによる精製操作を施した場合では、流入下水 500ml 当たり 60 個以上から検出されはじめ、確実に検出できる濃度は、流入下水 500ml

中 300 個以上となった。免疫磁気ビーズ法による精製操作を施さない場合ではクリプトスピリジウムを反映するバンドは検出できなかった。さらに、検出限界を把握するため、流入下水 500ml 当たり 30 個のオーシストを添加した条件による PCR 検出も試みた。しかし、本条件ではクリプトスピリジウムは検出できなかつた(写真-4)。

一連の検出操作を 5 または 6 回繰り返し行い、流入下水中のクリプトスピリジウムオーシスト数と検出確率の関係も調査した。この結果を図示すると図-3 となる。

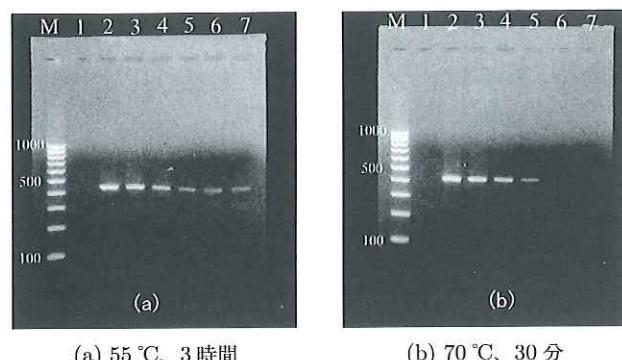


写真-1 クリプトスピリジウムオーシストの PCR 検出感度に及ぼす
プロテナーゼ K の処理温度と処理時間の関係
レーン M : 100-1000 マーカー、レーン 1 : ネガティブコントロール、
レーン 2 : 2.4×10^5 オーシスト、レーン 3 : 2.4×10^4 オーシスト、
レーン 4 : 2.4×10^3 オーシスト、レーン 5 : 2.4×10^2 オーシスト、
レーン 6 : 2.4×10^1 オーシスト、レーン 7 : 2.4×10^0 オーシスト

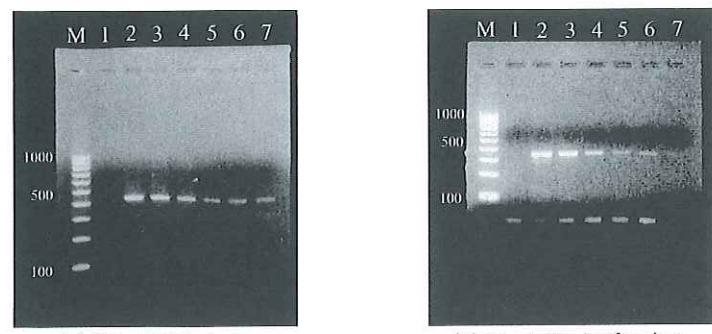
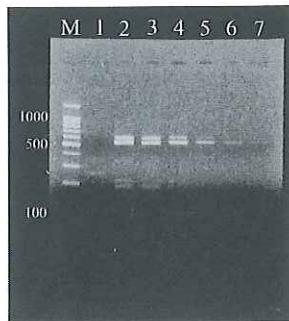


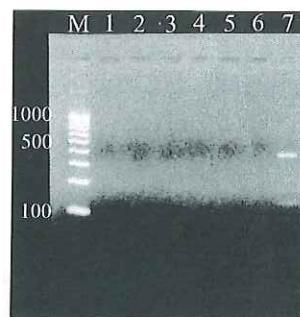
写真-2 プライマーの種類とクリプトスピリジウムオーシストの PCR 検出感度の関係
レーン M : 100-1000 マーカー、レーン 1 : ネガティブコントロール、レーン 2 : 2.4×10^5 オーシスト、
レーン 3 : 2.4×10^4 オーシスト、レーン 4 : 2.4×10^3 オーシスト、レーン 5 : 2.4×10^2 オーシスト、
レーン 6 : 2.4×10^1 オーシスト、レーン 7 : 2.4×10^0 オーシスト



(c) Awad のプライマー



(a) 磁気ビーズ法による精製操作を施した場合



(b) パーコール遠心浮遊法のみ

写真-3 流入下水中のクリプトポリジウムオーシストのPCR検出結果
 レーンM: 100-1000マーカー、レーン1: 0オーシスト/500ml、レーン2: 60オーシスト/500l、
 レーン3: 300オーシスト/500ml、レーン4: 600オーシスト/500ml、レーン5: 3000オーシスト/500ml、
 レーン6: 6000オーシスト/500ml、レーン7: ポジティブコントロール



写真-4 流入下水中オーシスト濃度30オーシスト/500mlの場合のPCR検出結果(免疫磁気ビーズによる精製操作: 有り、繰返し実験回数: 6回)
 レーンM: 100-1000マーカー、
 レーン1: 1回目、レーン2: 2回目、
 レーン3: 3回目、レーン4: 4回目、
 レーン5: 5回目、レーン6: 6回目、
 レーン7: ポジティブコントロール

6. 考察

流入下水中のクリプトポリジウムオーシストのPCR検出を成功させるためには、遠心浮遊操作の後に、免疫磁気ビーズ法による精製操作が必要であることがわかった。遠心浮遊操作の後においても、微細夾雑物は多く存在しており、これらの夾雑物はクリプトポリジウムのDNAの抽出またはPCR反応を阻害していることが推察された。

PCR検出の前処理に免疫磁気ビーズ法を適用した場合、流入下水中のクリプトポリジウムオーシストを確実に検出できるレベルは、流入下水500ml当たり300個以上であったが、顕微鏡観察による流入下水中のオーシストを検出できる濃度は、3~33個/l以上であり⁶⁾、現時点では、

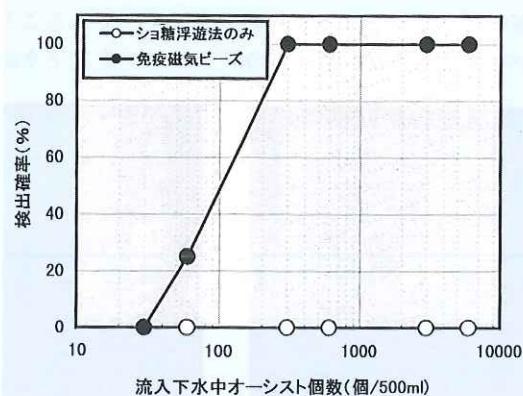


図-3 流入下水中のクリプトポリジウムオーシストの個数と検出確率の関係

顕微鏡観察法の検出感度が高いことになる。しかし、顕微鏡観察によるオーシストの判定は難しいことや検鏡作業は相当な労力を要することを考慮すると、流入下水中のオーシストのPCR検出方法の確立への期待は高いものと考えられる。

PCR法の検出感度をさらに向上させるためには、下水からのオーシストの抽出方法の改良とPCRの至適化が必要である。下水からのオーシストの抽出方法の改良点としては、分散効果の高い溶出剤や遠沈管のシリコン処理または磁気ビーズの改良が考えられる。PCR法の至適化としては、高感度検出可能プライマーの開発、反応液の組成、反応温度条件の至適化である。

流入下水中のオーシストのPCR検出に要する時間は約1.5日であった。内訳は次のとおりである。1日目午前中に流入下水からのオーシストの

抽出を行い、午後からDNA抽出を行う。その後、サーマルサイクターに試料をセットしPCRを開始する。翌日の午前中に電気泳動で確認する。本試験法のルーチン分析化は可能であり、下水処理場内の水質分析施設においても分析可能であると考えられる。ただし、PCR法において検出されたバンドが、クリプトスピロジウムのものかを確実に判断するには、DNAシーケンサーにより塩基配列を読みとり、クリプトスピロジウムのDNAであることを確認する必要がある。塩基配列の読みとりは、企業や研究所への委託でも対応可能であり、検査体制を整えて置く必要がある。

7. まとめ

流入下水中のクリプトスピロジウムオーシストのPCR検出は、以下の前処理操作を施すことにより適用できることがわかった。

- ①メッシュにより粗大夾雑物を除去する。
- ②メッシュ通過液沈渣をパーカールショ糖液により遠心浮遊処理する。
- ③免疫磁気ビーズ法による精製を行う。

本試験法では、流入下水 500ml当たり 60 オーシスト以上から検出されはじめ、流入下水 500ml当たり 300 オーシスト以上存在すれば確実に PCR 検出可能であった。

8. 今後の課題

流入下水、処理水、汚泥中のクリプトスピロジウムオーシストのPCR検出の検出感度の向上と定量方法を検討していく予定である。

参考文献

- 1) 下水道協会：下水道におけるクリプトスピロジウム検討委員会最終報告、平成 12 年 3 月
- 2) Qiagen : Dneasy™ Tissue Kit Handbook, 04/99
- 3) Z.Wu, I.Nagano, A.MAtsuo, S.Uga, I.kimata, M.Iseki and Tkahashi : Specific PCR primers for Cryptosporidium parvum with extra high sensitivity, Molecular and Celluar probes, Vol.14, pp.33-39, 2000.
- 4) Paul A.Rochelle, Donna M.Ferguson, Troy J.Handojo, Ricardo de Leon, Mic H.Stewart and Roy L.Wolfe : An Assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne Cryptosporidium parvum, Applied and Environmental Microbiology, Vol.63, No.5, pp.2029-2037, 1997.
- 5) F. M. Awad - EL - Kariem, D. C. Warhurst and V. McDonald : Detection and species identification of Cryptosporidium oocysts using a system based on PCR and endonuclease reaction, Parasitology, Vol.109, pp.19-22, 1994.
- 6) 諸訪守、鈴木穰：下水中等におけるクリプトスピロジウムの実態、第 1 回日本水環境学会シンポジウム講演集、日本水環境学会、p.123, 1998.

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) 研究員
Tomokazu KITAMURA

鈴木 穰**



同 材料地盤研究グループ(リサイクル) 上席研究員
Yuzuru SUZUKI