

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630223

研究課題名(和文) 環境水中のサイクロスポーラ原虫の高感度定量・遺伝子解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for quantification of Cyclospora cayetanensis in environmental water

研究代表者

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：00401141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サイクロスポーラ原虫の遺伝子を特異的かつ高感度で検出することが可能な定量PCR系を開発した。サイクロスポーラのITS-2遺伝子領域を特異的に増幅するプライマーとSYBR Green 1を用いた定量PCR系により、1000000～100コピー/反応のサイクロスポーラの人工合成プラスミドDNAを高い精度で定量することができた。さらに、開発した定量PCR系を用いることにより、米国アリゾナ州の2ヶ所の下水処理場で採取した流入水の25% (6/24)と放流水の13% (3/24)から最大12000コピー/Lの濃度でサイクロスポーラ遺伝子を検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a highly specific and sensitive quantitative PCR (qPCR) assay for Cyclospora cayetanensis genomes. SYBR Green-based qPCR assay targeting ITS-2 gene of C. cayetanensis could detect quantitatively as low as 100 copies/reaction of artificially synthesized plasmid DNA containing the target sequence for C. cayetanensis. The developed qPCR assay was successfully used to detect indigenous C. cayetanensis genomes in 6 (25%) of 24 influent and 3 (13%) of 24 effluent samples collected monthly during a year at two wastewater treatment plants in Arizona, U.S.A., with the highest concentration of 12000 copies/L.

研究分野：水環境工学

キーワード：健康関連微生物 サイクロスポーラ

1. 研究開始当初の背景

サイクロスポーラ原虫 (*Cyclospora cayetanensis*) は、直径 8~10 μ m の球形構造をした腸管寄生性コクシジウム類の一種であり、1979年に世界で初めて発見された新興病原微生物である (Ashford (1979) *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **73**:497-500)。水や食品等を介して経口的にヒトの体内に侵入したサイクロスポーラは、腸管内で増殖して水様性の下痢や嘔吐、発熱等の諸症状を引き起こし、オーシスト (接合子嚢) として糞便中に大量に排出される。オーシストは非常に高い環境耐性を有するため、下水中に排出されたサイクロスポーラは、下水処理を経た後でも、一部は感染力を保持したまま河川や海域に放出されていると考えられている。海外では、汚染された飲料水や果物類、牡蠣等に起因したサイクロスポーラの集団感染事例が多数報告されており、原因不明とされている事例や散発的な事例も含めると、本原虫による水系感染症の発生は看過できない問題であると言える (Ortega and Sanchez (2010) *Clin. Microbiol. Rev.*, **23**:218-234)。

しかしながら、環境水中におけるサイクロスポーラの存在実態は未だ明らかにされておらず、水からの検出事例は世界的に見ても数例に限られている。この最大の原因として、クリプトスポリジウムやジアルジアとは異なり、環境水中に低濃度で存在するサイクロスポーラを対象とした標準的な検出法が確立されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、サイクロスポーラを高感度で検出可能とすることを目的とし、サイクロスポーラの遺伝子の特異的に増幅可能な定量 PCR 系の開発を試みた。さらに、開発した定量 PCR 系を用いることにより、米国アリゾナ州の 2ヶ所の下水処理場で採取した水試料中におけるサイクロスポーラ遺伝子の存在実態を調査した。

3. 研究の方法

(1) サイクロスポーラ遺伝子の定量 PCR 系の開発

高感度かつ特異的なサイクロスポーラ遺伝子の定量 PCR 系の開発には、既報の定性 PCR 系 (Lalonde and Gajadhar (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**:4354-4358) で使用されているプライマー (表 1) を用いた。プライマーは Internal transcribed spacer 2 (ITS-2) 遺伝子領域から設計されており、サイクロスポーラに特異的であることが確認されている (Lalonde and Gajadhar (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**:4354-4358)。

プライマーによる増幅領域 116bp の塩基配列 (*C. cayetanensis* strain CY9, アクセス番号 AF301386) を含む人工合成プラスミド (Takara Bio) を作製し、 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 50, 20, 10, 5, 1 コピー/ 5μ L と

なるように TE バッファーで希釈したものを標準試料として使用した。

定量 PCR 系には SYBR Green I を使用し、以下の通り反応に供した。まず、DNA 試料 5 μ L と PCR 反応液 20 μ L (SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) 12.5 μ L, プライマー各 10pmol 含有) を混合した。この混合液を Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara Bio) にセットして定量 PCR 反応 (95 30 秒 (95 5 秒 55 30 秒) \times 45 回) と融解曲線解析 (95 15 秒 60 30 秒 95 15 秒) を実行し、蛍光データを取得した。

プラスミド DNA を用いた実験では、各試料について PCR チューブを 3 本使用した。下水試料を用いた実験では、各試料について PCR チューブを 2 本使用し、2 本のチューブが両方とも 40 以下の Ct 値 (蛍光強度が指数関数的に増幅している PCR サイクル数) を示した場合にのみ陽性と判断した。

表 1 サイクロスポーラ遺伝子の定量 PCR 系で使用したプライマーの塩基配列 (Lalonde and Gajadhar (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**:4354-4358)

プライマー名	塩基配列 (5' -3')
CCITS2-F	GCAGTCACAGGAGGCATATATCC
CCITS2-R	ATGAGAGACCTCACAGCCAAC

(2) 下水処理場におけるサイクロスポーラ遺伝子、クリプトスポリジウムおよびジアルジアの存在実態調査

下水試料の採取

2011年8月から2012年7月に毎月1回ずつ、米国アリゾナ州の2ヶ所の下水処理場において流入水と放流水を採取した (計 48 試料)。A 処理場は標準活性汚泥法、B 処理場は散水床法が導入されており、塩素消毒の後に放流されている。採取した試料は滅菌済みの容器に採取して冷蔵状態で実験室に輸送し、12時間以内に測定作業に供した。

原虫の濃縮

下水試料 (流入水 100mL, 放流水 1,000mL) を混合セルロース膜 孔径 0.45 μ m 直径 90mm, Merck Millipore) でろ過した後、既報 (Katayama *et al.* (2008) *Water Res.*, **42**:1441-1448) に従ってウイルスを濃縮した。その後、混合セルロース膜をフィルターホルダーから剥がし、半分切断した膜を用いて原虫を誘出液 25mL 中に回収した。誘出液を遠心 (2,000 \times g, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清を除去して沈渣に PBS () 10mL を添加し、再び遠心 (2,000 \times g, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) して得られた沈渣に PBS () 10mL を添加して原虫濃縮液とした (Haramoto and Otagiri (2013) *Food Environ. Virol.*, **5**:46-51)。

クリプトスポリジウムおよびジアルジアの検出

Dynabeads GC-Combo (Life Technologies) を用いた免疫磁気ビーズ法によって原虫濃縮液中のクリプトスポリジウムとジアルジアを 110 μ L に精製した。その際、Dynabeads MPC-1 マグネット (Life Technologies) からの廃液約 20mL (濃縮液と PBS ()) をサイクロスポーラの検出用に回収した。

精製試料の半量 (55 μ L) を親水性 PTFE 膜 (孔径 1.0 μ m, 直径 25mm, Advantec) でろ過し, EasyStain (BTF) を用いた直接蛍光抗体染色法に供した後, 蛍光顕微鏡 (BX60, Olympus) でクリプトスポリジウムとジアルジアを計数した。

一連の検出操作で原虫の損失は生じなかったと仮定し, 計数結果から元の下水試料中の原虫の濃度を算出した。

サイクロスポーラ遺伝子の検出

Dynabeads MPC-1 マグネットからの廃液を遠心 (2,000 $\times g$, 10 分, 4) して上清を除去し, 沈渣を 2.0mL チューブに移し入れた後, 液量が約 1.5mL となるように PBS () を添加し, サイクロスポーラ濃縮液を得た。

この濃縮液から 200 μ L を分取した後, 凍結融解 (-80 10 分, 56 5 分) を 10 回繰り返す, QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出液 200 μ L を得た。その後, Amicon Ultra-0.5 (Merck Millipore) を用いた濃縮操作によって約 30 μ L に減容した。

サイクロスポーラ遺伝子の定量 PCR は前述の手順にしたがって実施した。

4. 研究成果

(1) サイクロスポーラ遺伝子の定量 PCR 系の開発

既報の定性 PCR 系で使用されているプライマー (Lalonde and Gajadhar (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**:4354-4358) と SYBR Green I を組み合わせた定量 PCR 系の検出感度と定量性について, サイクロスポーラの人工合成プラスミド DNA を用いて評価した。

表 2 に示すように, プラスミド DNA 濃度が 50 コピー/反応以上の場合, 3 本の PCR チューブすべてから陽性反応が得られた。20 コピー/反応の場合, 3 本中 2 本の PCR チューブから陽性反応が得られた。これらのチューブの T_m 値 (PCR 産物の半量が 1 本鎖に解離する温度) は 86.6 ~ 89.0 であり, 特異的な産物が生成していることが確認された。

$10^6 \sim 10^2$ コピー/反応の範囲内において, プラスミド DNA 濃度の対数値と平均 Ct 値との関係から得られる検量線の相関係数は -0.999 であり, 傾き (-3.436) から増幅効率は 95.5% と算出された。50 コピー/反応の場合には検量線の相関係数が低下していたことから, 本研究で開発した定量 PCR 系の定量下限は 10^2 コピー/反応であると判断した。

表 2 定量 PCR 系によるサイクロスポーラのプラスミド DNA の検出結果

プラスミド DNA 濃度 (コピー/反応)	定量 PCR 結果 (陽性チューブ数 / 測定チューブ数)	平均 Ct 値
10^6	3/3	18.95
10^5	3/3	22.02
10^4	3/3	25.37
10^3	3/3	28.76
10^2	3/3	32.76
50	3/3	32.68
20	2/3	33.35
10	0/3	-
5	0/3	-
1	0/3	-
0	0/3	-

(2) 下水処理場におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの存在実態調査

米国アリゾナ州の 2 ヶ所の下水処理場で採取した下水試料からのクリプトスポリジウムとジアルジアの検出を試みた。クリプトスポリジウムは, 2012 年 4 月と 7 月に B 処理場以外のすべての流入水 (22 試料) から検出され, その平均濃度は, A 処理場では 7.4×10^1 oocysts/L, B 処理場では 1.0×10^2 oocysts/L であった。放流水からのクリプトスポリジウムの陽性率は, いずれの処理場においても 83% であり, 平均濃度は, A 処理場では 1.3×10^1 oocysts/L, B 処理場では 1.2×10^1 oocysts/L であった。

ジアルジアの陽性率と検出濃度はクリプトスポリジウムよりも高い値であった。ジアルジアはすべての流入水 (24 試料) から検出され, その平均濃度は, A 処理場では 4.8×10^3 cysts/L, B 処理場では 6.4×10^3 cysts/L であった。放流水においては, 2012 年 7 月に A 処理場で採取した 1 試料を除く 23 試料がジアルジア陽性となり, A 処理場では 3.3×10^1 cysts/L, B 処理場では 1.9×10^2 cysts/L の平均濃度を示した。

いずれの下水処理場においても, ジアルジアの除去率 (対数値) はクリプトスポリジウムよりも有意に高く (t-test, $P = 0.014$), 下水処理工程でのクリプトスポリジウムの除去効率が低いことが分かった。

(3) 下水処理場におけるサイクロスポーラ遺伝子の存在実態調査

本研究で新たに開発した定量 PCR 系を用いることにより, 下水試料中のサイクロスポーラ遺伝子の検出を試みた結果を表 3 に示す。サイクロスポーラ遺伝子は, A 処理場で採取

表3 下水試料からのサイクロスポーラ遺伝子の検出結果

採水年月	A 処理場		B 処理場	
	流入水	放流水	流入水	放流水
2011.08	+	-	-	-
2011.09	-	-	+	-
2011.10	-	-	-	+
2011.11	-	-	-	-
2011.12	+	-	-	-
2012.01	-	-	-	-
2012.02	-	-	-	-
2012.03	-	-	-	-
2012.04	-	+	-	+
2012.05	-	-	+	-
2012.06	+	-	-	-
2012.07	-	-	+	-
陽性率	25%	8%	25%	17%

+ : 陽性, - : 陰性

した流入水3試料(25%)と放流水1試料(8%), B処理場で採取した3試料(25%)と放流水2試料(17%)され, 流入水中の最大濃度は 1.2×10^4 コピー/Lであった。同じ処理場の流入水と放流水の両方からサイクロスポーラ遺伝子が検出された月がなかったため, 下水処理場におけるサイクロスポーラ遺伝子の除去率は算出できなかった。

なお, 免疫磁気ビーズ法で得られた精製試料の半量を用い, 定性PCR系(Nested PCRまたはSemi-nested PCR)によってクリプトスポリジウムとジアルジアの遺伝子の検出を試みた結果, クリプトスポリジウムは全48試料のいずれからも検出されず, ジアルジアは48試料中17試料(35%)から検出された。使用したPCR系が異なるため単純な比較はできないものの, サイクロスポーラ遺伝子の陽性率(19%)が両者の中間の値であったことより, サイクロスポーラオーシストはある程度以上の高濃度で下水試料中に存在していたことが示唆される。

しかしながら, 免疫磁気ビーズ法が開発されていないサイクロスポーラに対しては, 試料中の様々な共存物質からのオーシストの精製ができないことからDNA抽出や定量PCRの際に大きな阻害反応が生じていた可能性は否定できない。今後, より効率的なオーシストの回収・精製方法を検討することが求められる。

本研究で開発したサイクロスポーラ遺伝子の定量PCR系を用いることにより, 米国の下水試料中におけるサイクロスポーラの存在実態を世界で初めて明らかにすることができた。今後の研究では, 定量PCR系の検出

感度をさらに向上させるための改良を試みると共に, 世界中の様々な水環境中におけるサイクロスポーラの存在実態を明らかにしていくことが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Masaaki Kitajima, Eiji Haramoto, Brandon C. Iker, Charles P. Gerba (2014) Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona, *Science of the Total Environment*, Vol. 484, pp. 129-136. [査読あり]
DOI : 10.1016/j.scitotenv.2014.03.036

6. 研究組織

(1)研究代表者

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号 : 00401141

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

北島 正章 (KITAJIMA, Masaaki)
Singapore-MIT Alliance for Research and Technology