

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21989

研究課題名（和文）水処理工程・水環境におけるサイクロスポーラ原虫の未知動態解明

研究課題名（英文）Prevalence of Cyclospora cayetanensis during water treatment process and in aquatic environment

研究代表者

原本 英司（HARAMOTO, Eiji）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：00401141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、水系感染性の病原微生物であるサイクロスポーラ原虫の環境中での未知動態解明に資するため、本原虫を高感度・特異的で検出可能な定量PCR系を開発した。開発した定量PCR系を用いることで、既存の検出系よりも高感度でのサイクロスポーラ原虫遺伝子の検出が可能となり、下水処理場の流入水と放流水、灌漑用水からの定量検出に成功し、下水処理場での除去率が約99%であること等、サイクロスポーラ原虫の環境動態に関する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興病原微生物であるサイクロスポーラ原虫による感染事例は近年世界的に増加傾向にあるものの、下水処理工程での除去効果等をはじめとした水環境中での動態はほとんど明らかにされておらず、本原虫による水系感染症リスクを把握することを妨げている。本研究で開発した手法を用いることにより、水試料中のサイクロスポーラ原虫を定量することが可能となり、国内外の様々な水環境中におけるサイクロスポーラ原虫の動態解明に活用されること期待される。さらに、水試料のみならず、野菜等の食品からの検出にも応用されることも期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a quantitative PCR (qPCR) assay that can detect Cyclospora cayetanensis with high sensitivity and specificity in order to determine the prevalence of this protozoa in the aquatic environment. The developed qPCR assay was able to detect Cyclospora cayetanensis genes quantitatively in influent and effluent of wastewater treatment plants and irrigation water with higher sensitivity than an existing qPCR assay, providing the knowledge about the fate of this protozoa in the environment, such as that the mean reduction ratio during wastewater treatment was about 99%.

研究分野：環境工学

キーワード：サイクロスポーラ 原虫 健康関連微生物 水処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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 年に発見された新興病原微生物である (Ashford, 1979)。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原虫は、腸管内で増殖して水様性の下痢や嘔吐、発熱等の症状を引き起こし、オーシスト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原虫は、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原虫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 (Ortega and Sanchez, 2010)。

しかしながら、環境水中におけるサイクロスポーラ原虫の動態には未知の部分が多く、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。この原因として、世界的に広く研究されている原虫であるクリプトスポリジウムやジアルジアとは異なり、水試料中に低濃度で存在するサイクロスポーラ原虫を高感度で検出可能な手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、サイクロスポーラ原虫を高感度で検出可能とすることを目的とし、サイクロスポーラ原虫の遺伝子を高感度・特異的に増幅可能な定量 PCR 系を開発した。さらに、開発した定量 PCR 系を用いることにより、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原虫遺伝子の存在実態を調査した。

3. 研究の方法

(1) サイクロスポーラ原虫遺伝子の定量 PCR 系の開発

サイクロスポーラ原虫遺伝子の定量 PCR 系としては、Internal transcribed spacer 2 (ITS-2) 遺伝子領域を増幅対象とした既報の定性 PCR 系 (Lalonde and Gajadhar, 2008) で使用されているプライマーを基に、研究代表者らが SYBR Green 系での検出を可能としたものがある (Kitajima et al., 2014) が、プローブ系と比較して SYBR Green 系は特異性が低い点に課題があった。そこで、この SYBR Green 系の増幅領域周辺を対象に、サイクロスポーラ原虫 12 株の塩基配列をアライメントし、フォワードプライマー (19nt) と TaqMan MGB プローブ (17nt) を新たに設計した。リバープライマーは SYBR Green 系で使用するもの (22nt) と同一とした。この TaqMan MGB 系の増幅塩基配列長は 127bp である。

Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ, TP800) を用いた場合の TaqMan MGB 系の反応条件は次の通りとした。DNA 試料 2.5 μ L と PCR 反応液 22.5 μ L (Probe qPCR Mix (タカラバイオ) 12.5 μ L, プライマー濃度各 400nM, プローブ濃度 200nM) を混合し、95 $^{\circ}$ C で 30 秒の加熱に続き、95 $^{\circ}$ C で 5 秒と 60 $^{\circ}$ C で 30 秒からなる PCR サイクルを 45 回繰り返し、蛍光データを取得した。

(2) 下水処理場におけるサイクロスポーラ原虫遺伝子の存在実態調査

本研究では、2011 年 8 月から 2012 年 7 月に毎月 1 回ずつ米国内の 2 ヶ所の下水処理場で採取した流入水と放流水 (各 24 試料, 48 試料)、2017 年 2 月 ~ 2018 年 7 月に米国内の 6 ヶ所の下水処理場で採取した流入水 (12 試料) と放流水 (10 試料)、灌漑用水 (4 試料) を濃縮して得た DNA 抽出液を使用し、開発した TaqMan MGB 系を適用し、サイクロスポーラ原虫遺伝子の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) サイクロスポーラ原虫遺伝子の定量 PCR 系の開発

設計した定量 PCR 系 (TaqMan MGB 系) は、標準試料 (人工合成プラスミド DNA) の 10 段階希釈列を用いた実験により、高感度・高定量性が得られることが確認された。また、顕微鏡

観察によりサイクロスポーラ原虫のオーシストが高濃度で検出された糞便試料から得た DNA 抽出液に対して陽性反応を示した。一方, 11 種類の原虫 (*Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria acervulina*, *Toxoplasma gondi*, *Tyranosoma cruzi*, *Cryptosporidium hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Eimeria maxina*, *Eimeria tenella*) の DNA 抽出液のいずれとも反応せず, サイクロスポーラ原虫に特異的であることが確認された。これらの結果に基づき, サイクロスポーラ原虫に対する高感度・特異的な定量 PCR 系の開発に成功したと判断した。

(2) 下水処理場におけるサイクロスポーラ原虫遺伝子の存在実態調査

2011 年 8 月～2012 年 7 月に採取した下水試料に対し, 開発した TaqMan MGB 系を適用した結果を表 1 に示す。一部の試料は SYBR Green 系 (Kitajima et al., 2014) でも測定した。TaqMan MGB 系を用いた場合, 流入水および放流水それぞれ 24 試料中 8 試料 (33%) からサイクロスポーラ原虫遺伝子が検出された。一方, SYBR Green 系による陽性率は, 流入水が 7% (1/14), 放流水が 6% (1/18) であり, TaqMan MGB 系よりも大幅に低い値であった。この結果より, 開発した TaqMan MGB 系が高感度であり, 下水試料中のサイクロスポーラ原虫遺伝子の検出に適用可能であることが示された。

次に, 2017 年 2 月～2018 年 7 月に採取した下水・灌漑用水試料 (計 26 試料) に手法を適用した結果, 表 2 に示すようにすべての試料からサイクロスポーラ原虫遺伝子の検出に成功した。流入水中の平均濃度は 7.9×10^4 copies/L, 放流水の平均濃度は 6.8×10^2 copies/L であり, 下水処理工程において平均約 $2 \log(99\%)$ の除去率が得られていることが明らかとなった。灌漑用水からは平均 3.7×10^2 copies/L の濃度で検出されており, 下水処理場でのさらなる除去率の向上等の対策が今後必要となってくることを示唆された。

表 1 開発した TaqMan MGB 系と SYBR Green 系によるサイクロスポーラ原虫遺伝子の検出結果の比較

試料	陽性試料数/測定試料数 (陽性率)	
	TaqMan MGB 系	SYBR Green 系
流入水	8/24 (33%)	1/14 (7%)
放流水	8/24 (33%)	1/18 (6%)
計	16/48 (33%)	2/32 (6%)

表 2 下水および灌漑用水からのサイクロスポーラ原虫遺伝子の検出結果

試料	陽性試料数/測定試料数 (陽性率)	濃度 (copies/L)		
		幾何平均	最小	最大
流入水	12/12 (100%)	7.9×10^4	1.3×10^4	7.9×10^6
放流水	10/10 (100%)	6.8×10^2	5.1×10^1	2.3×10^4
灌漑用水	4/4 (100%)	3.7×10^2	2.8×10^1	4.2×10^3

参考文献

1. R. W. Ashford (1979) Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **73**(5):497–500.
2. M. Kitajima, E. Haramoto, B. C. Iker, C. P. Gerba (2014) Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Sci. Total Environ.* **484**:129–136.
3. L. F. Lalonde, A. A. Gajadhar (2008) Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(14):4354–4358.
4. Y. R. Ortega, R. Sanchez (2010) Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**(1):218–234.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	アリゾナ大学			
ネパール	トリブバン大学			