

機関番号：25406

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20760366

研究課題名（和文）FISH法の併用による水のクリプトスポリジウム試験の改良と水域対策への利用の検討

研究課題名（英文）Improvement and application of Cryptosporidium detection with Florescent in situ Hybridization

研究代表者

橋本 温 (HASHIMOTO ATSUSHI)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：30332068

研究成果の概要（和文）：

水のクリプトスポリジウム試験に FISH 法を併用し、試験精度および判別の容易性の向上を図ると共に、FISH 法による生育活性の評価について検討を行った。実験に供した 3 種類のプローブのうち、クリプトスポリジウム属を広く検出可能な 18S rRNA 遺伝子の領域を用いた DIAG-CRYR1 プローブでは、良好な染色性が得られた。本プローブを用いた FISH 法は、現行の公定法である蛍光抗体染色法および DAPI 染色法と併用することが可能であり、これらの併用によって顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムの判別の精度および操作性を著しく改善できると考えられた。

FISH 法による生育活性の評価については、核酸の減衰と細胞の生死にはタイムラグがあることから、加熱して死滅させたオーシストの染色性も 100 時間程度は維持されたが、これを考慮した上で、生育活性に関する有用な情報をえる手段として有効であった。

研究成果の概要（英文）：

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was applied for specific detection and distinction of *Cryptosporidium* oocysts by microscopic observation. High fluorescence was observed using the DIAG-CRYR1 probe targeting 18S rRNA partial sequences to distinguish *Cryptosporidium* spp from *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 oocysts. Combining FISH with fluorescence antibody staining, DAPI, and differential interference contrast observation was valuable for easy differentiation of *Cryptosporidium* oocysts by microscopic observation. Determination of *Cryptosporidium* variability by FISH was conducted. Heat inactivated oocysts declined FISH stainability until 100 hours in both PBS and filtrated sewage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：Cryptosporidium, FISH

1. 研究開始当初の背景

| 申請者はこれまでに水源水域や下水など、

各種水環境のクリプトスポリジウム汚染の実態や、水処理・消毒による除去・不活化、水環境から検出されたクリプトスポリジウムの遺伝子型の PCR・シーケンス法での同定と、遺伝子型データの汚染対策への利用について研究を展開してきた。

これらの研究を通じて、公定法である蛍光抗体染色法の問題点、すなわち、汚染源や人への感染性に関する有力な情報となる遺伝子型識別ができないこと、煩雑で精度が検査者の経験に依存すること、水域対策での利用価値が低いこと、について、改良の必要性を強く感じていた。

水のクリプトスポリジウム試験法に関する研究の動向は、PCR法をベースとして、遺伝子型を解析する“定性的な”方法への展開が見られる[Xiao et al., (2000)など]。申請者らは、水域の汚染対策に役立てるために必要な、クリプトスポリジウムの遺伝子型別の分布を“定量的”に把握する必要があると考え、個々のクリプトスポリジウムを顕微鏡下で単離して、遺伝子型解析する方法を実用化し、下水・河川水に適用した[Hashimoto et al., 2006, Hirata and Hashimoto 2006]。しかしながら、この方法は、水道事業体等でルーチン的に用いるには煩雑で、新たな設備などが必要となる。そこで、現行の公定法に容易に組み込むことが可能で、定量的な方法で判別性を高め、かつ遺伝子型の識別も可能である“FISH法”の併用を考え、本申請の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、クリプトスポリジウムの 18S rRNA 遺伝子を標的とする FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)法を用いて、水のクリプトスポリジウム検査法を「容易・正確に」かつ「種や遺伝子型の判別を可能に」することを目的とする。すなわち、公定法の蛍光抗体染色に FISH法を併用し、でオーシストの DNA または RNA を特異的に染色することで「クリプトスポリジウム属の判別」さらには「遺伝子型の判別」ができる試験法を実用化する。また、本法で河川等の汚染調査を実施し、得られた遺伝子型別の汚染状況を、GISを利用して地理的な情報と統合し、「汚染源対策など、水域の総合的なクリプトスポリジウム対策へ利用」する試みについても検討する。

3. 研究の方法

研究①「クリプトスポリジウム属判別用 FISH法の環境試料への適用」

広くクリプトスポリジウム属に特異的なプローブ(設計作成済み)を用いた FISH法の環境試料への適用法に関する研究を行った。

研究②「遺伝子型判別 FISH法の設計と環境試料への適用」

クリプトスポリジウムの各遺伝子型ごとの特有のプローブを設計、作成し、培養株での実験を経た上で、検討①で得られた本法の環境試料への適用方法などを基に、染色性に関する実証実験を行った。

研究③「下水・河川水の調査と水域対策への利用」

①、②で実用化した FISH法を下水および河川水に適用性を評価した。その基礎的な情報として、下水等に暴露したオーシストの FISH法による染色性とその経時変化について検討した。

4. 研究成果

3.1 FISH法の反応温度およびプローブ濃度の検討

Table 1 に示した、クリプトスポリジウム属に特異的な 18S rRNA 遺伝子の配列の一部に相補的な FISH用蛍光プローブ 2 種(DIAG-CRYR1 および DIAG-CRYF1)および *C. parvum* genotype 2 に相補的な FISH用蛍光プローブ 1 種(CRYG2)を用いて実験を行った。また、ポジティブコントロールとして真核生物共通プローブ(EUK)を、ネガティブコントロールとしてはそれぞれのプローブと同じ塩基長の Nonsense プローブを用いた。

はじめに、これらのプローブによる FISH法の反応条件を検討するために、本プローブで推奨される条件(製造メーカーの推奨条件:反応温度 37°C, プローブ濃度 50ng・220 μ l⁻¹)で実験を行った。

この反応条件では、クリプトスポリジウム属検出用のプローブのうち DIAG-CRYR1 を用いた場合にはオーシスト内部のスプロゾイトに顕微鏡観察で容易に識別可能な強い赤色の発光が観察された(Fig. 1)。一方、DIAG-CRYF1 プローブについては、顕微鏡下でようやく識別可能な程度の弱い発光が認められたものの、顕微鏡観察上実用的な染色性は認められなかった。遺伝子型識別を目的として設計した、*C. parvum* genotype 2 に特異的な配列を有する CRYG2 を用いた場合、この反応条件では染色が認められなかった。コントロール用プローブについては、ポジティブコントロールとして用いた真核生物共通の EUK プローブでは強い発光が認められ、ネガティブコントロール用プローブは発光が認められなかった。

より良好な反応条件について検討するために、ハイブリダイゼーションの反応温度を変化させた場合について検討を行った(Table 2)。ハイブリダイゼーションの反応温度は一般に高いほど非特異的な結合が増加する反面、プローブと標的配列との結合の可能性も

高くなり、結果として発光は強くなる。反応温度を 40 および 45°C と上昇させて同様に実験を行ったものの、37°C の条件で良好な染色性を得られなかった CRYF1 および CRYG2 の染色性を改善することはできなかった。また、温度条件を 30°C、25°C と低く設定した場合でも、37°C の条件で良好な染色性が確認された CRYR1 の染色性を損なうことはなかった。次いで、プローブの濃度を $100\text{ng}\cdot 220\mu\text{l}^{-1}$ と倍量にして、ハイブリダイゼーションの反応温度を 45°C で実験を行ったが、いずれのプローブも染色性に変化は認められなかった (Table 3)。

これらのことから、本研究で用いた 3 種類のプローブのうち、今回試験した条件で実用可能なプローブは、クリプトスポリジウム属を広く検出することが可能な DIAG-CRYR1 であり、プローブ濃度 $100\text{ng}\cdot \mu\text{l}^{-1}$ 、反応温度は正確性を考慮して 25°C を用いることが最適であった。

3.2. DAPI 染色および蛍光抗体染色との併用

最も良好な染色性が認められたクリプトスポリジウム属識別用のプローブ、DIAG-CRYR1 を用いて、FISH 法と蛍光抗体染色および DAPI 染色の 3 つの染色法の併用について検討した。FISH 法の反応条件は、プローブ濃度は反応液 220 μl 中で 100ng、反応温度 25°C とした。

FISH 法ののち、蛍光抗体染色と DAPI 染色を施した *C. parvum* オーシストの写真を Fig. 2 に示す。蛍光抗体染色 (a) ではオーシストに特徴的な辺縁が強調されたアップルグリーンの染色が確認されるものの、微分干渉像 (b) ではクリプトスポリジウムの判別の基本となるスポロゾイト様の構造が識別できるが、判別は容易ではなかった。さらに DAPI 染色 (c) を重ねるとスポロゾイトの核部分が染色され、その大きさや形態などがクリプトスポリジウム判別の一助となった。

現行の試験方法では、主に Fig. 2 (a)~(c) の 3 点によってクリプトスポリジウムオーシストの判別を行う。このうち、蛍光抗体染色はクリプトスポリジウムオーシストを識別するためには非常に有用な手法ではあるが、共存する藻類との交差染色や藻類の自家蛍光 (3, 10) などもあり、機械的に染色性によって識別することはできず、非特異的に染色されたその他の生物性・非生物性の粒子と識別を行う必要がある。DAPI 染色については、核酸を特異的に染色するものであり、クリプトスポリジウムについての特異性は全くない。また、微分干渉像の観察は検査者の経験や主観的な要素、さらには夾雑物など検鏡用試料のコンディションなどが大きく影響する。このように、クリプトスポリジウムの試験の正確性は、最終的にはこの顕微鏡観察の正確性に大きく依存しており、検査結果の妥当性はもちろんのこと、検査者にかかる負担や検査者の

養成についても大きな問題点となっている。

本研究では Fig. 2 (d) に示すように、蛍光抗体染色および DAPI 染色に FISH 法を併用することで、スポロゾイト内のクリプトスポリジウムに特異的な配列の RNA が染色されて、G 励起で観察すると赤色の発光が観察された。現行の試験方法に FISH 法を付加することで、オーシスト壁の抗原性 (抗体の特異性) および内部・外部の形態の特異性に加えて、遺伝子の特異性と言う観点からのクリプトスポリジウムの判別が可能になった。このことは、水のクリプトスポリジウム検査法のオーシスト判別の精度を著しく向上させることになる。また、新たに FISH 法の工程が加わることで、検査に要する時間は増加するものの、その結果によっては、水道の給水停止などの大きな措置につながるクリプトスポリジウムオーシストの判別を、染色性と外部および内部形態で判定しなければならないという、検査者に係る大きな負担を、FISH 法による染色性という一つの客観的な結果を加えることによって軽減するものでもある。

水のクリプトスポリジウム検査に FISH 法を取り入れることについては、フローサイトメトリーを用いた検査の自動化を試みる検討などがなされている [Deere et al., 1998]。また、[Taguchi et al., 2006] は、クリプトスポリジウムオーシストを顕微鏡観察に用いるフィルターにろ過した上で、フィルター上で FISH 法を施す方法について検討している。この方法ではフィルターとプローブの非特異的な結合によるバックグラウンドなどによって、使用できるフィルターが PTFE メンブランフィルターに限られてしまい、水のクリプトスポリジウム試験に多用され、顕微鏡観察での検出率も良好なセルロースアセテートメンブランフィルターが使用できない。また、現行法との併用について、顕微鏡観察や操作性・識別性の向上に関する実際の現場での検査を考慮した検討がなされていないなど、現場でのルーチンの検査に用いるには検討すべき点があった。本研究で示した方法では、現行の方法に容易に付加することが可能で、蛍光抗体染色法でのクリプトスポリジウム試験を実施するための機器・機材をそのまま利用して、FISH 法にかかる 3 時間程度の操作と、汎用のハイブリダイゼーションオーブンを新たに導入するだけで実施することが可能である。このように容易に付加できる FISH 法を併用することで、水からのクリプトスポリジウム試験の精度の向上と同定識別の簡便性の向上に大きく役立つものと考えられる。さらには、今後の展開として、画像解析技術と併用することで、試験の容易化や判別の精度向上に寄与することも可能であると考えられる。

3.3 加熱および非加熱オーシストの染色性

FISH 法ではプローブと相補的な細胞内の RNA を特異的に検出する。細胞が死滅し、RNA が減少すれば染色性は低下することから、細胞の生育活性の評価に用いることが可能であり、クリプトスポリジウムオーシストの生育活性を評価するための検討もなされている [Smith et.al., 2004, Vesey, et.al., 1998]。

本研究では、クリプトスポリジウムオーシストの生育活性評価の実環境の試料への適用を視野に、下水あるいは PBS 中に懸濁させたウムオーシストを一定時間毎に FISH 法で染色し、その染色性の変化を調べた。

経過時間毎の FISH 法での染色性の変化を Fig. 3 に示した。ここでは、強い赤色蛍光が観察されたものを FISH 法で染色されたと定義し、染色されたオーシストの割合を染色率として示した。

実験開始時点では、生存オーシストおよび死滅オーシストの両者ともに、すべてのオーシストから強い蛍光が観察された。生存オーシストを用いた系では、PBS に懸濁させた場合には 144 時間経過後でも染色性に変化は認められなかったものの、下水に懸濁させた系では染色性が低下して、144 時間後には 24% のオーシストしか染色されなかった。本研究で用いた下水は、顕微鏡下での識別を容易にするために、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過滅菌したものであるが、クリプトスポリジウムオーシストの FISH 法による染色性が低下し、下水中で徐々に不活化が進行することが示された。

85 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱して死滅させたオーシストを用いた系においても、死滅直後(実験開始時)にはすべてのオーシストが染色された。また、24 時間後においても、PBS 中に懸濁させた系では 8 割が、下水中に懸濁させた系でも 7 割が染色された。一方、100 時間を超えると下水、PBS 両系ともに染色性はほとんど失われた。

RNA は細胞の死滅後、徐々に分解されることから、FISH 法の染色性が細胞の生死を示すと考えられるが、本研究で示すようにオーシストの加熱による死滅と RNA の減衰にはタイムラグがあり、死滅直後のオーシストを生存と判定する可能性が考えられる。同様のことが PBS 中での FISH 法の染色の変化を調べた報告でも示されており [Smith et.al., 2004]、この特性を十分に考慮する必要はあるが、

FISH 法は現行の試験方法ではほとんど評価することのできなかつた生育活性について、限定的ではあるが情報を得ることが可能であり、本法を併用することで、クリプトスポリジウムの識別性の向上だけでなく、生育活性に関する情報をも得ることができる。

3.4 現行の試験方法との併用

本研究で用いたクリプトスポリジウムの検出用の 3 種類のプローブのうち、良好な染色性を得ることができた DIAG-CRYR1 は GenBank のデータベース検索では、ヒトへの感染性を有さない *C. muris* や *C. andersonii* などの大型種を除いたクリプトスポリジウム属に広い相補性を示している [平田, 2006]。また、DIAG-CRYR1 は、*C. parvum* については、登録してあるそのほとんどと相補性を有しており、人獣共通に感染するとされる *C. parvum* genotype 2 については登録されているそのすべてに相補性を示していた [平田, 2006]。さらには、本プローブと同一の配列をプライマーセットとした semi-nested PCR 法で、河川および下水から単離したクリプトスポリジウムを検査した場合に、*C. parvum* genotype 1, *C. parvum* genotype 2, *C. meleagridis* など、人に固有あるいは人獣共通に感染するクリプトスポリジウムを幅広く検出できることが報告されている [Hashimoto et.al., 2006]。このように、本プローブはクリプトスポリジウム属を広く特異的に検出できる可能性があることが、遺伝子情報データベースおよび実際の環境分離株の PCR による検出によって実証されている。DIAG-CRYR1 プローブを用いた FISH 法と蛍光抗体染色法の併用は、現行では主に形態観察と抗体の特異性に依存していたクリプトスポリジウム試験を、属レベルではあるが、遺伝子レベルでの判別を可能にし、さらには限定的ではあるが、生育活性に関する情報を得るためのツールともなる。このことは、クリプトスポリジウムの試験を実施する上で大きな問題であった、顕微鏡観察による形態の判別という、検査者の主観的要因が大きく関与する判別の手法に、遺伝子の一致性という客観的な基準を与えることになり、判別の容易化と精度向上、それに付随して検査者の負担の軽減や検査者の養成する上での問題を大きく改良すると考えられる。さらには、生育活性に関する情報についても限定的なものではあるが得ることができる。

Table 1 Tested FISH probe sequences

Probes	Sequences	Target organisms
EUK	5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'	Universal for Eukaryotes
DIAG-CRYR1	5'-CCAATCTCTAGTTGGCATAG-3'	<i>Cryptosporidium</i> spp.
DIAG-CRYF1	5'-GCTCGTAGTTGGATTCTGTAA-3'	<i>Cryptosporidium</i> spp.
DIAG-CRYG2	5'-TAAATATATAGTAATATGAATTATGTT-3'	<i>C. parvum</i> genotype 2

Table 2 Hybridization temperature and fluorescence intensity

Probes	Hybridization temperature				Calculated optimal temp (°C)
	25°C	30°C	37°C	45°C	
EUK	N.T	+++	+++	+++	27
DIAG-CRYR1	++	++	++	++	33
DIAG-CRYF1	+	+	+	+	39
DIAG-CRYG2	-	-	-	-	37
Non sense	-	-	-	-	-

+++ : High fluorescence intensity

++ : Medium fluorescence intensity (can be easily identified under the microscope)

+ : Weak fluorescence

- : No fluorescence

Table 3 Probe concentration and fluorescence intensity

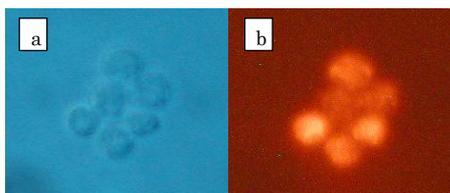
Probes	Probe concentration (ng·220 μ l ⁻¹)	
	50	100
EUK	+++	+++
DIAG-CRYR1	++	+++
DIAG-CRYF1	+	+
DIAG-CRYG2	-	-
Non sense	-	-

+++ : High fluorescence intensity

++ : Medium fluorescence intensity (can be easily identified under the microscope)

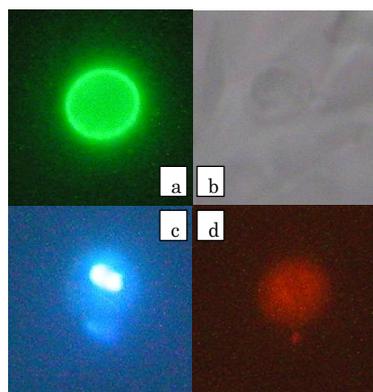
+ : Weak fluorescence

- : No fluorescence

**Fig.1** Photographs of FISH stained *C. parvum* HNJ1 oocysts ($\times 200$)

a: Differential interference contrast observation

b: Rhodamine fluorescence observation

**Fig.2** Combination of fluorescent antibody stain and FISH ($\times 1,000$)a: anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody (FITC)

b: Differential interference contrast

c: DAPI

d: FISH (Rhodamine)

クリプトスポリジウムには宿主特異性の異なる様々な遺伝子型が存在することが明らかになっており[Yagita et.al., 2001], それぞ

れの遺伝子型を識別して検出できる FISH 用プローブを用いれば、容易に水試料中の遺伝子型ごとのクリプトスポリジウムの分布を知ることができる。本研究では遺伝子型の識別を試みるために、*C. parvum* genotype 2 に特異的な配列に相補的な CRYG2 プローブを用いて検討を行った。本プローブの配列は GenBank データベースより *C. parvum* genotype 2 (GenBank Accession: AB089290) に特異的であることが確認され、供試クリプトスポリジウム株である、*C. parvum* HNJ-1 genotype 2 についても本配列を有していることが PCR-シーケンス法によって確認されている[Hashimoto et.al., 2006]。しかしながら、今回検討した条件では本プローブでは *C. parvum* HNJ-1 genotype 2 オーストを実用的なレベルで染色することはできなかった。このような遺伝子型識別用のプローブを用いた FISH 法は、水試料のクリプトスポリジウムの遺伝子型ごとの分布などの汚染源に関する情報や、検出されたクリプトスポリジウムのヒトへの感染性に関する情報などを得ることができ、水のクリプトスポリジウム対策の極めて重要なツールとなりうると思われることから、プローブの標的とする遺伝子配列の位置を変更するなどの改良を行い、遺伝子型識別のできる FISH 用プローブを作成することは極めて重要である。

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 3 件)

- 1) 橋本温, 森田重光, 平田強 (2009) FISH 法—蛍光抗体染色法を併用したクリプトスポリジウムの判別の容易化, 水環境学会誌, 32(5), 267-272, 査読有
- 2) 橋本温 (2008) 水道におけるクリプトスポリジウム対策, 環境技術, 37, 57-58, 査読無
- 3) 橋本温, 金子光美 (2008) オゾン・紫外線による微生物の不活化, 月刊「水」, 新年増刊号, 56-61, 査読無

[学会発表] (計 1 件)

- 1) 橋本温: "水道におけるクリプトスポリジウム対策" 日本水道協会中国四国地方支部技術講習会. (2008). ホテルクレメント徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 温 (HASHIMOTO ATSUSHI)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号: 30332068