

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25420559

研究課題名(和文) 界面活性剤を用いたクリプトスポリジウム高感度検出技術の開発と病原性判定への応用

研究課題名(英文) Detection of nucleic acids of Cryptosporidium oocyst by surfactant extraction treatment and its application for pathogenic evaluation

研究代表者

関川 貴寛 (SEKIKAWA, TAKAHIRO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：20511728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：上水道の残留塩素などによる消毒ではクリプトスポリジウムオーシストを不活化させることができないため、オーシストは先進諸国においても集団下痢症の原因になっている。強固なオーシストからの核酸抽出工程では、凍結融解や酵素処理、核酸精製など、高額な抽出精製キットまたは煩雑な操作を必要とするのが現状である。本研究では、免疫磁気分離(IMS)と界面活性剤抽出処理(SET)を併用したIMS-SET法によるDNA検出感度の評価および検討を行った。その結果、IMS-SET法を確立し、クリプトスポリジウム遺伝子検査法の簡便・高感度化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cryptosporidium oocysts are encased in a robust wall that is extremely resistant to environmental stressors such as chlorine used to disinfect potable water. Standard procedures used to extract DNA from oocysts such as the freeze-thaw method with DNA purification kit are time-consuming and expensive. Therefore, we developed the surfactant extraction treatment (SET) that efficiently extracts DNA from the oocyst. Furthermore, we evaluated the ability of SET to detect DNA directly from immunomagnetic bead-oocyst conjugates. As a result, the rate of DNA amplification using immunomagnetic separation-SET (IMS-SET) was greater than that using the standard procedures.

研究分野：資源環境工学

キーワード：クリプトスポリジウム 病原性原虫 リアルタイムPCR 界面活性剤 免疫磁気分離 核酸抽出 オーシスト 河川水

1. 研究開始当初の背景

病原性原虫のクリプトスポリジウムは宿主の体外では強固な殻を持つオーシストとして存在し、オーシストの内部には虫体(スポロゾイト)が存在してスポロゾイトが宿主への感染本体となる。上水道の残留塩素など塩素による消毒ではオーシストを不活化させることができないため、オーシストは先進諸国においても集団下痢症の原因になっている。わが国でもクリプトスポリジウムによる水系感染や水道水からの検出が報告されており、水道水の汚染防止および感染防止のために様々な対策が検討されている。

クリプトスポリジウムの主な検出方法は、厚生労働省の「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」に示されている蛍光抗体染色と微分干渉顕微鏡による検鏡法である。しかし、試料水中に存在する夾雑物の中から約 5 μm と極めて微小なオーシストを顕微鏡で検出、同定するには、熟練した技術が必要である。また、検査に長時間を要し、多数の検体を迅速に検査することが困難であることから、正確で再現性が高く簡便な代替検査方法が求められている。このような条件を満たす検査方法として、これまでに多数の遺伝子検査法が検討されており、「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」(平成 24 年 3 月 2 日付け健水発 0302 第 2~4 号 厚生労働省健康局水道課長)にて、「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」(平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330006 号 厚生労働省健康局水道課長通知)が一部改正され、「遺伝子検出法」の追加が通知された。

2. 研究の目的

近年、リアルタイム PCR 法および等温遺伝子増幅法である LAMP 法は集団感染などにおける感染経路や汚染源の特定に活用されているが、オーシストからの核酸抽出工程では、凍結融解や酵素処理、核酸精製など、高額な抽出精製キットまたは煩雑な操作を必要とするのが現状である。陰イオン界面活性剤は核酸抽出試薬としては優れていても核酸増幅酵素の阻害作用が強い物質であるため、核酸増幅工程の前に阻害物質を除去する必要がある。本研究では、凍結融解および市販の核酸精製キットを使わずに、界面活性剤のみを用いてオーシストから核酸を抽出する界面活性剤抽出処理 (Surfactant extraction treatment: SET) 法の確立を目指し、核酸抽出条件を検討した。

現在のクリプトスポリジウム検査では、水道原水を試料として採水し、減圧ろ過および免疫磁気分離 (Immuno-magnetic

separation: IMS) を用いて試料水中のオーシストを分離濃縮している。本研究では、クリプトスポリジウム遺伝子検出工程の簡便・高感度化を目指し、IMS と SET を併用した IMS-SET 法による DNA 検出感度の評価および検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 核酸の精製

任意の濃度の *Cryptosporidium parvum* のオーシスト (Iowa 株, Waterborne 社) から凍結融解処理 (-80 , 37 , 5 回) と核酸精製キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen 社) によって抽出・精製した核酸溶液を陽性対照とした。

(2) 界面活性剤抽出処理法 (SET 法)

オーシストを陰イオン界面活性剤 sodium dodecyl sulfate (SDS) 濃度 0.1% に調製した SDS 溶液に投入後、核酸抽出工程として加熱処理 (90 , 15 分間) を行った。SDS による遺伝子増幅阻害を抑制するために非イオン界面活性剤 Tween 20 の濃度 5% の遺伝子増幅試薬を調製し、リアルタイム PCR を行った。

(3) リアルタイム PCR および逆転写反応

DNA の検出はクリプトスポリジウム 18S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットと TaqMan プロブ (Miller *et al.*, 2006) 遺伝子増幅用試薬 (FastStart Essential DNA Probes Master mix, Roche Diagnostics 社)、リアルタイム PCR システム (LightCycler Nano, Roche Diagnostics 社) を用いて行った。また、RNA の検出は逆転写反应用試薬 PrimeScript RT Master Mix Kit (タカラバイオ) を用いて Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法で行った。

(4) IMS-SET 法

図 1 は免疫磁気分離 (IMS) と SET を併用した IMS-SET 法の工程フローである。クリプトスポリジウムに特異的な免疫磁気ビーズ (Dynabeads anti-Cryptosporidium, Thermo Fisher Scientific 社) を用いて試料水中のオーシストを濃縮した。その後、SET 法を用いて、オーシストが結合している磁気ビーズから直接核酸を抽出した。

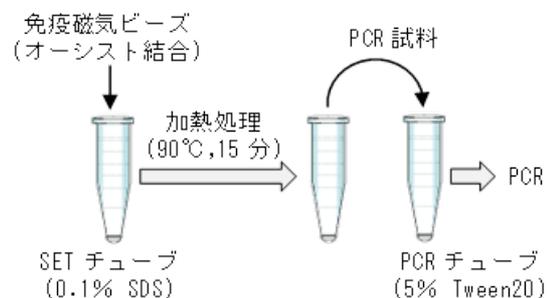


図 1 IMS-SET 法の工程フロー

4. 研究成果

本研究では、オーシストからの核酸抽出工程の簡略化および高感度検出を目的とし、SET 法によるクリプトスポリジウム 18S rRNA 遺伝子の抽出条件を検討した。オーシスト 1 個当たりの 18S rRNA のコピー数は明らかになっていないが、rDNA よりも格段に多く存在しているため、18S rRNA を指標にすることでオーシストを高感度に検出できる。我々は試料水中のオーシスト 1 個を再現性よく検出するため、18S rRNA 遺伝子を標的とし、rRNA については逆転写 PCR (RT-PCR) 法を用いた。

界面活性剤を逆転写 (RT) 試薬または PCR 試薬に添加し、核酸増幅に及ぼす影響を評価した。それぞれの Ct (Threshold Cycle) 値を表 1 に示した。オーシスト濃度は RT 試薬中 1 個になるように調製した。RT および PCR 両反応ともに Tween20 濃度 5% では阻害されなかったが、SDS 濃度 0.01% における両反応は影響を受けた。RT は反応阻害によって Ct 値 (38.0) が増加し、PCR は完全に阻害されて不検出 (ND) であった (表 1)。

表 1 界面活性剤が RT または PCR に及ぼす影響

	Ct 値 (平均 ± SD) (n=2)			
	SDS		Tween 20	
	0.001%	0.01%	0.1%	5%
RT	30.0 ± 0.0	38.0 ± 0.3	ND	29.8 ± 0.0
PCR	29.2 ± 0.0	ND	ND	29.1 ± 0.5

SDS 濃度 0.01% の RT および PCR 試薬を用いて、反応阻害における Tween20 の添加効果を評価した結果、両反応ともに Tween20 による阻害抑制効果が確認された (データ掲載なし)。次に、RNA 抽出への SET 法の応用を試みた。SDS 濃度 0.1% でオーシストから核酸を抽出し、RT-PCR 法を用いて Tween20 の添加効果を評価した。Tween20 未添加では 18S rRNA の増幅は検出されなかったが、添加によって SDS による阻害は抑制された (表 2)。RT 試薬中の SET 産物濃度は 10%、SDS 終濃度は 0.01% であった。

表 2 SET 法を用いたオーシスト RNA 検出

	Ct 値 (平均 ± SD) (n=2)		
	Tween 20		
	0%	5%	
SET 産物	SDS		
10%	0.01%	ND	28.6 ± 0.3

SET 法による Ct 値 (28.6) は陽性対照の Ct 値 (29.8) とほぼ同じであったことから、SET 法の工程では 18S rRNA の回収ロスが生じていないことが示された。

IMS と SET を併用した IMS-SET 法の確立を目指し、免疫磁気ビーズが SET 法に及ぼす影響を評価した。その結果、免疫磁気ビーズは PCR 阻害作用を示さず、通常の SET 法と同様に Tween20 の添加によって PCR 阻害を抑制できることがわかった。また、IMS-SET 法を用いてオーシスト (10⁵ 個) の分離および DNA 検出性能を評価した結果、遠心分離法および凍結融解、核酸精製キットを用いた方法と同程度の性能であることがわかった (表 3)。

表 3 IMS-SET 法を用いたオーシストの分離および DNA 検出

オーシスト分離法 および DNA 抽出法	Ct 値 (平均 ± SE) (n=4)	
	Tween 20	
	0%	5%
IMS-SET	ND	25.3 ± 0.0
SD-SET	ND	25.3 ± 0.1
SD-F/T-Kit	25.6 ± 0.0	25.7 ± 0.0

SD: 遠心分離, F/T: 凍結融解, Kit: 核酸精製キット

静岡市水道水源の興津川取水口付近の表層水 10 L にオーシスト 10⁵ 個を添加して汚染水試料を調製した。IMS-SET 法を用いてオーシスト DNA の検出感度を検討した結果、DNA の回収率は 60% であった。また、蒸留水 10 L からの回収率は 80% であった (図 2)。

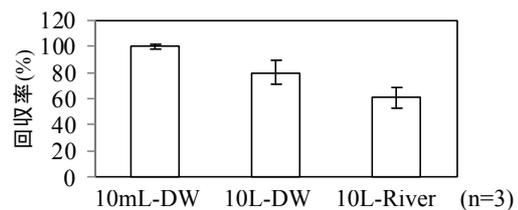


図 2 IMS-SET 法によるオーシスト汚染試料からの DNA 検出

DW: 蒸留水, River: 河川表層水

環境水に含まれている微細粒子や溶解物質は IMS の分離能低下および PCR 阻害を引き起こすことが報告されている (Fontaine *et al.*, 2003)。よって、河川表層水からの回収率が蒸留水に比べて 20% 減少したのは、表層水由来の物質が原因であると考えられる。オーシスト 100 個を添加した貯留池表層水 15 L を用いて IMS の性能を評価した結果、オーシスト回収率は 44% であった (Ehsan *et al.*, 2015)。本実験結果と同様に環境水からのオーシスト回収時に大きなロスが生じていた。

本研究によって、IMS-SET 法を確立し、クリプトスポリジウム検出の簡便・高感度化に成功した。しかし、IMS に影響を及ぼす物質の特定およびその対策技術の開発が今後の課題として残されている。

<引用文献>

Ehsan, A., Geurden, T., Casaert, S., Paulussen, J., De Coster, L., Schoemaker, T., Chalmers, R., Grit, G., Vercruyse, J., Claerebout, E. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in different water catchments in Belgium, *Environ. Monit. Assess.*, 187(2), 2015, 6

Fontaine, M., Guillot, E. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples, *J. Microbiol. Methods*, 54(1), 2003, 29-36

Miller, W.A., Gardner, I.A., Atwill, E.R., Leutenegger, C.M., Miller, M.A., Hedrick, R.P., Melli, A.C., Barnes, N.M., Conrad, P.A. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*), *J. Microbiol. Methods*, 65(3), 2006, 367-379

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2件)

Sekikawa T., A new immunomagnetic bead separation-surfactant extraction treatment protocol for rapid and sensitive quantitative PCR-detection of *Cryptosporidium parvum* DNA, *Wat. Sci. Tech.: Water Suppl.*, 査読有, 17(1), 2017, 161-168
DOI:10.2166/ws.2016.125

Sekikawa T., Toshiki K., A new method for efficient detection of *Cryptosporidium* RNA by real-time reverse transcription-PCR with surfactants, *Wat. Sci. Tech.:Water Suppl.*, 査読有, 15(5), 2015, 1061-1068
DOI:10.2166/ws.2015.063

[学会発表](計9件)

Sekikawa T., A new method for *Cryptosporidium* DNA detection by immunomagnetic bead separation and surfactant extraction treatment (IMS-SET), IWA Microbial Ecology in Water Engineering & Biofilms joint specialist conference (Copenhagen, Sweden), 2016年9月

関川貴寛、界面活性剤抽出処理を用いた環境水中のクリプトスポリジウム検出法、第50回日本水環境学会年会(徳島市)、2016年3月

Sekikawa T., An improved method for extracting DNA from *Cryptosporidium* oocysts using immunomagnetic separation and surfactant extraction treatment, 6th International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology (Barcelona, Spain), 2015年9月

Sekikawa T., Toshiki K., Detection of *Cryptosporidium* oocyst RNA by surfactant extraction treatment and RT-PCR: Inhibition of reverse transcription by SDS and its suppression using nonionic surfactants, 6th Congress of European Microbiologists (Maastricht, The Netherlands), 2015年6月

関川貴寛, 謝小毛, 大西徳幸, 熱応答性磁性ナノ粒子を用いたクリプトスポリジウム遺伝子検査法の開発, 第49回日本水環境学会年会(金沢市), 2015年3月

Sekikawa T., Toshiki K., A new method for sensitive detection of *Cryptosporidium* RNA by surfactant extraction treatment and one-step RT-PCR, 3rd International Fecal Sludge Management Conference (Hanoi, Vietnam), 2015年1月

Sekikawa T., A novel method for simple and sensitive detection of *Cryptosporidium parvum* by surfactant extraction treatment (SET) and quantitative reverse transcription-PCR, 5th International *Giardia* & *Cryptosporidium* Conference (Uppsala, Sweden), 2014年5月

関川貴寛, 界面活性剤抽出処理とRT-LAMP法を用いたクリプトスポリジウムRNAの高感度検出, 第34回日本食品微生物学会学術総会(東京都江戸川区), 2013年10月

⑨ Sekikawa T., Simple and sensitive detection of the 18S rRNA gene from *Cryptosporidium parvum* oocysts by surfactant extraction treatment, First EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology (Stresa, Italy), 2013年9月

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 刺激応答性磁性ナノ粒子を用いた遺伝子検査方法
発明者: 関川貴寛, 謝小毛, 大西徳幸
権利者: 静岡県立大学法人, JNC 株式会社

種類：特許
番号：特願 2015-51077
出願年月日：平成 27 年 3 月 13 日
国内外の別：国内

名称：刺激応答性磁性ナノ粒子を用いた検出
対象を検出する方法
発明者：関川貴寛，謝小毛，大西徳幸
権利者：静岡県公立大学法人，JNC 株式会社
種類：特許
番号：特願 2015-51076
出願年月日：平成 27 年 3 月 13 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://env-eng.u-shizuoka-ken.ac.jp/env-eng/>

6．研究組織

(1)研究代表者

関川 貴寛 (SEKIKAWA, Takahiro)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号：20511728