

# クリプトスポリジウム症・ジアルジア 症等の原虫性下痢症

## 目 次

I	検査法の概要	1
	診断手順一覧	
II	形態学的診断法	5
	顕微鏡の取り扱い	
	《クリプトスポリジウム症の診断》	10
	1. 検査材料の採取	
	2. 濃縮・精製	
	3. 観察	
	《ジアルジア症の診断》	22
	1. シストの検査法	
	2. 栄養型虫体の検査法	
	《サイクロスポラ症、およびイソスポラ症の診断》	25
	1. 検査の概要と臨床材料	
	2. オーシストの検査法	
III	遺伝子検査法	26
	1. 原虫検査における遺伝子検査法ポイント	
	2. 主な試薬と実験器具	
	3. DNA の抽出と精製	
	4. 制限酵素処理と電気泳動	
	5. 塩基配列決定	
	《クリプトスポリジウムの PCR》	32
	1. 各種プライマーによる PCR	
	2. 単個のオーシストを用いた PCR	
	《ジアルジアの遺伝子型別を目的とした PCR》	47
	《サイクロスポラの検出・同定を目的とした PCR》	54
IV	免疫学的検査法	55
	引用文献	56
	参考資料	59

# I 検査法の概要

はじめに

原虫類の寄生に起因する主要な消化器疾患としてクリプトスポリジウム症、ジアルジア症、赤痢アメーバ症、サイクロスポラ症およびイソスポラ症等々が知られている。これらのうち、前3疾患は平成11年4月1日に施行(平成15年10月16日一部改正、平成15年11月5日施行)された感染症法(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)において、5類感染症の全数把握疾患として病原体サーベイランスの対象疾患に位置付けられている。病原体としてのクリプトスポリジウム属パルバム(遺伝子型がI型、II型のもの)は、感染症法に基づく四種病原体として適正な管理が求められている(平成18年12月8日一部改正、平成19年6月1日施行)。クリプトスポリジウム等は強い塩素耐性を有し水系感染が問題となることから、水道におけるクリプトスポリジウム等検査法が整備されている(健水発第0330006号、平成19年3月30日、厚生労働省健康局水道課長通知)。糞口感染することから性的接触や食品を介した感染経路もあり、食中毒事件票における食中毒病因物質の分類『その他』の欄には「クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、アニサキス等」と例示されている(平成11年12月28日付衛食第166号、衛乳第248号、衛化第66号、厚生省生活衛生局食品保健課長、乳肉衛生課長、食品化学課長通知)。

しかし、統計上はクリプトスポリジウム等原虫症の国内の報告は工業先進国を含む海外諸国での報告に比べて桁違いに少なく、検査診断の重要性が指摘される<sup>1)</sup>。

原虫性下痢症の診断にあたっては、感染症法の施行当初より顕微鏡による検便検査、すなわち形態学的な検査が第1選択であった。抗原検出と遺伝子検出は有用性が報告されており、平成23年4月1日に届出基準に加えられた(平成23年3月4日付け健感発0304第1号厚生労働省健康局結核感染症課長通知)。報告数の少ない、しかし実際の患者数が多いと想定される原虫性下痢症の検査診断の機会を増やすには、複数の検査法が整備されていることが有用と考えられ、また適切な検査診断が行われれば、顕微鏡検査法に限定する理由はない。一方、事前に試薬の備蓄や使用期間の制限からコストの上昇

を招いたり、難しい糞便由来の PCR に偽陰性の恐れがあったり、特定の原虫に特化した検査では他の寄生虫卵が検出できなかったり等々の理由から、当面は顕微鏡検査が主に使用され、顕微鏡検査の重要性は現在も大きく変化していないと考えられる。本マニュアルでは、顕微鏡検査を中心に説明し、製品取扱説明書や論文に詳細が記述されているその他の検査法については参考に留めた。

顕微鏡検査は、多分に経験や習熟度が問題となる領域といえる。ところがわが国では原虫性下痢症は比較的稀な疾患で、経験を積むことが難しい分野である。本マニュアルの作成にあたってはこの点を最大限に考慮し、初心者であっても本マニュアルを参照しながら実務がこなせるよう心がけた。なお、赤痢アメーバ症の診断法については別のマニュアルにまとめられている。

原虫感染に起因する下痢症(赤痢アメーバ症を除く)は、いずれもさまざまな程度の非血性水様下痢を主症状としており、臨床所見からの区別は困難である。以下のケースでは原虫性下痢症を検討対象とすべきである。

1. 原因細菌やウイルスなどが検出されない下痢症の場合
2. 下痢症、特に海外旅行者の下痢症で、既知の腸管病原体を検出した症例にあつてなお説明のできない腹部症状を持続する場合
3. 集団下痢症にあつて通常の原因体が検出されない場合
4. 免疫不全宿主にあつて長期間持続する原因不明の下痢症の場合

#### 検査の進め方

顕微鏡検査による原虫検査の基本は、主に患者便を検査試料とし、試料中に原虫(オーシスト、シスト、場合によって栄養型虫体)を顕微鏡下で検出することによる。検査手技としては、検査試料をそのまま試料とする直接塗抹法と、(オー)シストを濃縮・精製することで検出感度を高める集嚢子法とに分けられる。また、得られた試料を無染色のまま観察する方法(直接観察法)と、染色法(蛍光抗体法等)とも分けることができる。これらの組み合わせのうちで最も簡便な方法は直接薄層塗抹法+蛍光抗体染色法で、この方法は少量の糞便材料を直接スライドグラスに取って生理食塩水など等張液で希釈し、蛍光抗体試薬と混合して蛍光顕微鏡観察するものである。蛍光抗体で染色される(オー)シスト

以外に、自家蛍光を発する虫卵の検出、微分干渉顕微鏡下では運動性を有する栄養型虫体の検出にも有効である。しかしながら、この方法では微量の検査試料しか扱えないことや、食物残渣など夾雑物が多量に含まれる標本から極めて小さな(オー)シストを検出しなくてはならず、(オー)シストの特徴的な内部構造を観察するのが困難となり、十分な検査精度が保証されない難点がある。したがって、原虫性下痢症の確定診断にあたっては集嚢子法の併用が必須と考える。

集嚢子法には遠心沈殿法、浮遊法、免疫磁気ビーズ法等があるが、本マニュアルでは遠心沈殿法を一義的に選択するよう推奨している。その理由は、遠心沈殿法では検査試料の調製段階でホルマリン水を用いた希釈・固定が行われることから、検査担当者への感染事故が回避できる利点があるからである。その他、糞便中の未消化の脂肪分が除去されることにより観察が容易となる利点もある。

分子疫学的な解析のための PCR の試料調製など高度な精製が必要な際には、浮遊法、免疫磁気ビーズ法が有用である。ちなみに、現時点における PCR 等の遺伝子検査法は、顕微鏡法検査による診断の後に、感染経路の特定等の分子疫学的解析に用いられている。

便中の病原体抗原検出では、主に患者便を検査試料とし、原虫由来の抗原を ELISA 法、イムノクロマト法により検出する。

ところで、原虫性下痢症の検査方法は原虫種の如何を問わず基本的に同じ方法が適用される。したがって、本マニュアルではクリプトスポリジウムの検出方法を中心に説明し、ジアルジア他の原虫の検査に関しては特筆すべき点について虫種別に項を立てて説明した。また、各検査機関にあつては顕微鏡の整備状況に格差があるものと推測される。そこで、別表に顕微鏡の整備状況に応じて選択すべき基本的な検査法をまとめておいた。なお、これら原虫類の(オー)シストは糞便中に常に排出されるとは限らないことから、可能ならば日を置いて 3 回程度の繰り返し検査が推奨される。また、検査の実施に制限がある機関では、確定診断に際して国立感染症研究所はじめ他の関係機関の協力を要請することも選択肢の1つと考えられよう。

〔別表〕

### 原虫性下痢症の診断手順

顕微鏡の 整備状況	基本的手順	手 順 の 概 説
蛍光装置 + 微分干渉装置 + 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 + 蛍光抗体染色（湿式）	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. 蛍光抗体法（湿式）で染色 <sup>注1</sup> 3. 蛍光顕微鏡下でスクリーニング <sup>注2</sup> 4. 微分干渉顕微鏡で確認
蛍光装置 + 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 + 蛍 光 抗 体 染 色 + 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. 蛍光抗体法（湿式）で染色 <sup>注1</sup> 3. 蛍光顕微鏡下でスクリーニング <sup>注2</sup> 4. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認
微分干渉装置 + 生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 + ネガティブ染色 + 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. ネガティブ染色標本でスクリーニング 3. 微分干渉顕微鏡で確認 4. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認
生物顕微鏡	遠 心 沈 殿 法 + ネガティブ染色 + 抗酸染色/ヨード染色	1. 遠心沈殿法で精製濃縮 2. ネガティブ染色標本でスクリーニング 3. 別途作製の抗酸染色/ヨード染色標本 で確認

注1 クリプトスポリジウムおよびジアルジアの同時染色用蛍光抗体試薬が市販されている。FITCの特異蛍光はB励起下で観察。

注2 サイクロスポラおよびイソスポラに対する蛍光抗体試薬は開発されていないが、両原虫のオーシスト壁は自家蛍光を有するので蛍光顕微鏡下でスクリーニングすることができる。自家蛍光はUV励起下で観察。

## II 形態学的診断法

### 顕微鏡の取り扱い

顕微鏡による検査は経験・習熟を必要とするかもしれないが、検鏡時間は一般的な遺伝子増幅時間に比べて短く、今もなお迅速な検査法である。本試験方法で用いる顕微鏡には、蛍光装置、微分干渉装置、20、40、100 倍の対物レンズがあることが望ましい。このほか、粒子サイズ測定のために、接眼・対物スケールあるいは測定機能付きの顕微鏡カメラ等を付属させる。良好な像を得るには装置のおよそ全てを操作することが必要である。指で回せるところは調整が必要な場所、六角レンチを使うネジは観察では調整しない場所と区分すると理解しやすい。

10 倍の対物レンズなら、対物レンズとプレパラートはぶつからずにフォーカス合わせを行うことができる。一旦フォーカスが合えば、他の倍率に変更してもフォーカスは微調整で済む。対物レンズの 60 から 100 倍、時に 40 倍が油浸オイルを使用する油浸レンズで、対物レンズに OIL の刻印があれば油浸レンズと見分けることができる。油浸レンズでは光学解像度が格段に高くなり、細部を観察できる。油浸オイルを一度使用すると試料から取り除けないので、油浸オイルに代わってアニソールを使用することがある。アニソールは容易に試料からふき取ることができる。油浸オイル等の使用後は、レンズペーパーでレンズからオイルを拭きとる。レンズペーパー以外の紙は、細かな石が入っていてレンズ等を傷つけるので使用しない。エタノールは接着剤を溶かしてレンズ等を壊す恐れがあることから使用せず、所定のレンズクリーナーを使用する。

陥りやすい誤りの一つは、光量を開口絞りで調整することで、本来、光量は光源電圧とその直後の減光フィルターで調整する。開口絞りは、コントラスト、解像度、焦点深度の調整に使用する。開口絞りを絞るとコントラストは増すが、解像度が低下して像は汚くなる。より詳細に言えば、焦点深度が深くなり、見える範囲が深く厚くなるから物が折り重なって見えづらくなる。従って、観察・写真撮影にはなるべく開口絞りを開け、絞るのはわずかに留める。

試料を観察する際、フォーカスを合わせた後に、試料に光を当てるコンデンサーレンズの高さと中心位置を調整し、より高い解像度が得られるようにする。明視野観察、微分干渉観察に必要で、蛍光観察には関係しない。この調整方法は発明者（アウグス

ト・ケーラー1866～1948)の名前からケーラー照明と呼ばれている。

### 〈ケーラー照明法〉

- (1) 顕微鏡に染色標本をのせて焦点を合わせる。
- (2) 視野絞りを絞り、視野に絞りの影を確認する。その際、開口絞りを適度に絞ると、視野絞りの影が見やすくなる。
- (3) コンデンサーを上下して、視野絞りの影が最もシャープに見える位置に合わせる。
- (4) 視野絞りの開口部を視野の中心に位置させる(センタリング)。
- (5) 視野絞りを開ける。その際、開口率を 80%程度に設定すると対物レンズのもつ解像力がほぼ完全に引き出される。
- (6) 対物レンズをかえた場合には視野絞りを絞って、絞りの影が明瞭に見えることを確認する。

### ① 蛍光顕微鏡装置

落射型と透過型の2種類があり、現行の顕微鏡の多くは落射型である。落射型は不透明な支持体上の標本でも観察が可能である。個々の蛍光色素は、特有の励起波長の照射により、励起光より長波長の蛍光を発する。したがって、染色に用いた蛍光色素にあわせて、励起波長と観察波長が選択される。

### ② 微分干渉装置

微分干渉装置はポラライザー(偏光板)、DIC用コンデンサー、DICプリズム、DIC用対物レンズ、アナライザー(偏光板)からなり、それらが生物顕微鏡に組み込まれる。光源として偏光が用いられ、光線が標本を通過する際に標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差(あるいは色の差)に変換する装置で、像としては物の左上が明るく右下に影がある、といった見え方をする。プリズムの調整で影の強弱や色調を調整したり、影の方向を逆にして左上に影があつて右下が明るい状態に変化させたりすることができる。装置の組み合わせが決まっており、そのとおりに使用しないと微分の効果が得られず、単なる明視野観察になってしまう。



## <FITC 蛍光染色試料における顕微鏡の使い方の例>

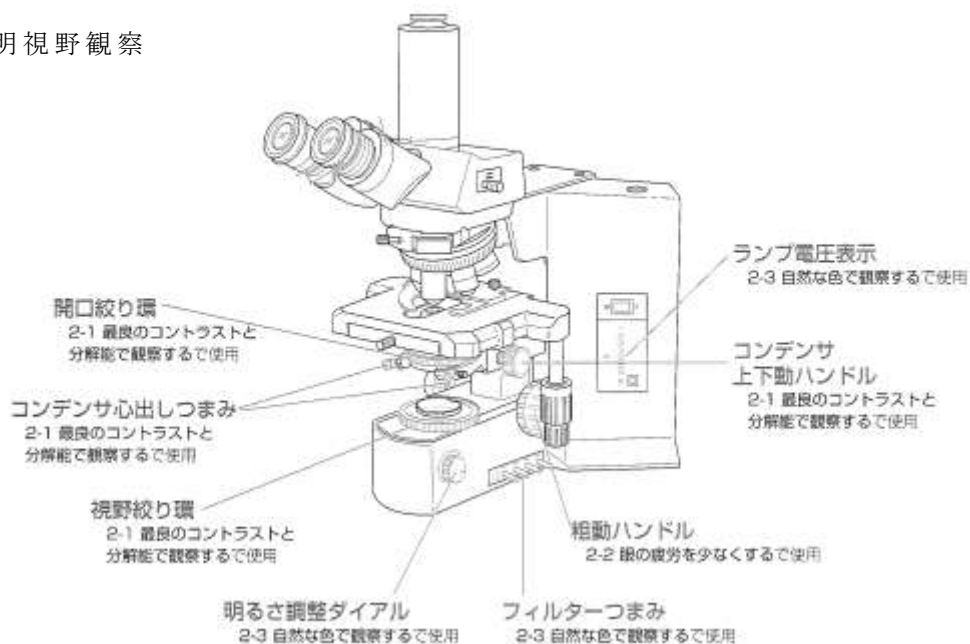
1. 10 倍対物レンズでフォーカスを合わせる
  - (1) 高圧水銀ランプと本体（ハロゲンランプ）の電源を入れ点灯を確認、蛍光シャッターが閉じていることを確認
  - (2) スライドをステージに乗せる
  - (3) ハロゲンランプの明るさを調整し、明視野、あるいは微分干渉観察を行う
  - (4) フォーカスをあわせる（泡、大きな粒子、カバーガラスのふちであわせやすい）
  - (5) 接眼レンズの目の幅、視度、椅子の高さを調整
2. 20 倍対物レンズでスライドを精査する
  - (1) 対物レンズを 20 倍に切り替え、フォーカスを確認する
  - (2) 蛍光観察 B 励起に切り替える
    - ① ハロゲンランプを消す
    - ② 微分干渉のフィルター、偏光板と DIC プリズムを外す
    - ③ 蛍光フィルターを B 励起フィルターに切り替え
    - ④ 蛍光シャッターを開ける
  - (3) スライドを精査し、アップルグリーンに光る  $5\mu\text{m}$ （クリプトスポリジウム）ないし  $10\mu\text{m}$ （ジアルジア）の粒子を探す
    - ① 微動ハンドルを動かしてフォーカス面上下方向にも注意を払う
    - ② G 励起で粒子が赤色に光らない、植物ではないことを確認する
    - ③ DAPI 染色していれば U 励起でフォーカスを移動しながら核を観察
    - ④（サイクロスポラ、イソスポラ、その他の虫卵は U 励起で精査し、赤痢アメーバ栄養体とシスト並びにジアルジア栄養体は微分干渉像を精査する）
3. 40 倍対物レンズを使用して、微分干渉で内部構造を観察する
  - (1) 蛍光シャッターを閉じ、B 励起蛍光フィルターを外す
  - (2) 微分干渉のフィルター、偏光板と DIC プリズムを入れる
  - (3) 対物レンズを 40 倍に切り替え、対応するコンデンサーに切り替える
  - (4) ハロゲンランプのスイッチを入れ、光量を調整、フォーカス確認
  - (5) コンデンサーの高さを調整する（ケーラー照明）
    - ① 視野制限絞りを絞る
    - ② 視野に見える絞りのふちを見て（見にくい場合は開口絞りを少し絞り）、はっきり見える位置にコンデンサー高さ、中心を合わせる
    - ③ 視野制限絞りを視野一杯より少し大きく開く
  - (6) 解像度を得るために開口絞りを開ける
  - (7) フォーカスを移動しながら内部構造を観察
  - (8) 対象が規定の大きさであることを確認
  - (9) 必要に応じて DIC プリズムを調整し、影の強さと方向を変える
4. （必要により）60、100 倍対物レンズを使用して内部構造を観察

- (1) スライドにアニソール（または油浸オイル）を一滴落とし、（ステージを下げながら）対物レンズを切り替え、（ステージを戻したら）対物レンズを少し左右に揺らしてなじませる
  - (2) 対応するコンデンサーに切り替える
  - (3) フォーカスを合わせる
  - (4) コンデンサー高さ調整（ケーラー照明）
  - (5) フォーカスを移動しながら内部構造を観察
  - (6) 必要に応じて DIC プリズムを調整し、影の強さと方向を変える
5. （必要により）写真を撮影する
- (1) 写真撮影装置を準備する
  - (2) 先に蛍光像を撮影する
    - ① 偏光板と DIC プリズムをはずし、蛍光フィルターを入れる
    - ② 撮影の感度、秒数は陽性コントロールで確認しておく、例えば標準感度で 1 秒のシャッター速度
    - ③ 撮影の XY 位置とフォーカスは微分干渉で合わせておく
    - ④ 光路をカメラ 100% に切り替える（ライブ像が得られるカメラなら、微分干渉像でフォーカスを合わせる）
    - ⑤ B 励起の撮影を実施、蛍光シャッターを開け、カメラのシャッターを押し、撮影完了後直ちに蛍光シャッターを閉じる（退色が早いので蛍光を当てる時間は秒単位に抑える）
    - ⑥ 必要により U 励起で同様に実施、核の観察にはフォーカスを若干ずらして、複数枚撮影する
  - (3) 次いで微分干渉像を撮影する
    - ① 画面を見ながら特徴ある像になるようフォーカスを合わせて撮影
    - ② さらにフォーカスをずらしながら沢山撮影  
（前後の情報が立体構造の把握に有用）  
（画面を見ながらフォーカスを合わせることができない撮影装置の場合、微動ネジをわずかに動かしながら、対象物の上から下までの断層写真を数十枚撮影し、後から必要な像を選別する）
    - ③ サイズ計測機能等を用いて対象の大きさを測定
  - (4) 写真のトリミングを行い、報告に備える  
（Word などに貼るのではなく、圧縮された tif や jpg ファイルで扱う）

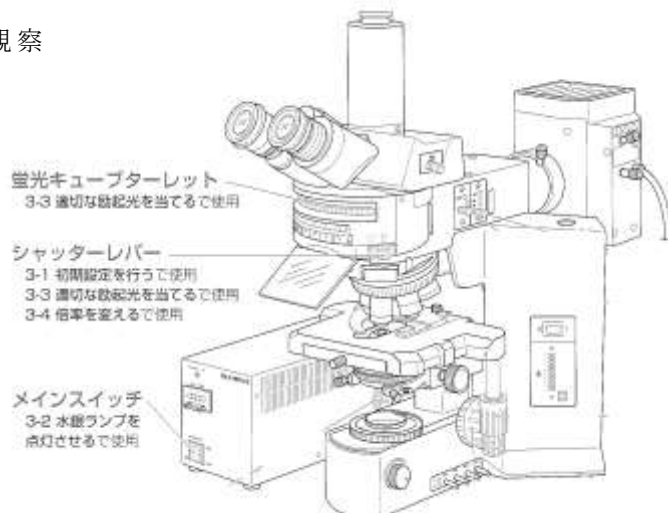
6. 顕微鏡の後片付け

- (1) 使用した油浸レンズをレンズペーパーで拭く
- (2) 本体（ハロゲンランプの電源）、高圧水銀ランプの電源を切る

A) 明視野観察



B) 蛍光観察



C) 微分干渉観察

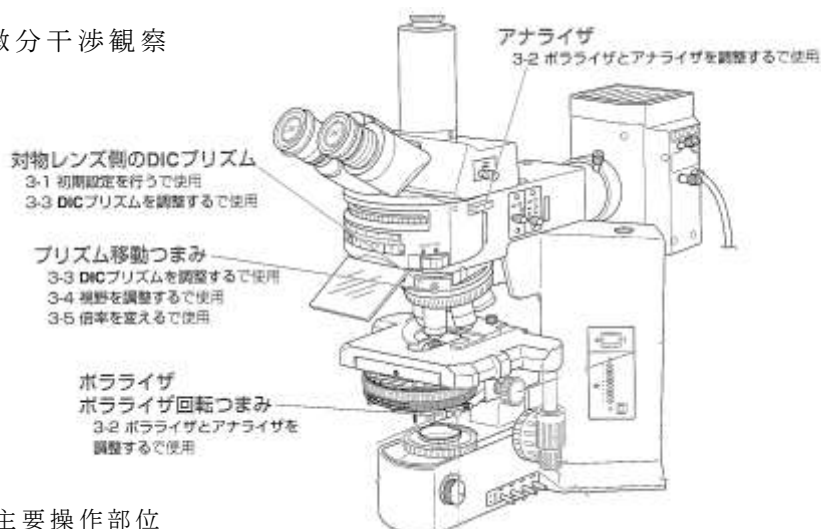


図 顕微鏡主要操作部位

顕微鏡フル活用術イラストレイテッド基礎から応用まで、稲澤譲治ら（秀潤社）より

## 《 クリプトスポリジウム症の診断 》

クリプトスポリジウム症はクリプトスポリジウム属原虫の感染に起因するもので、非血性水様下痢を主症状とする消化器症状を呈する疾患である。その他の症状としては、腹痛、倦怠感、食欲低下、悪心などで、軽い発熱を伴う例もある。下痢は一日数回程度から 20 回以上の激しいものまであり、数日から 2～3 週間持続する。抗生物質は無効であるが、免疫機能に異常がなければ自然治癒する。一方、エイズを初めとする免疫不全宿主には重症・難治性・再発性・致死性下痢症を発症させる。本症はエイズ診断の指標疾患の 1 つで、HIV 陽性者で本原虫感染による下痢が 1 カ月以上持続した場合はエイズと診断される。下痢の程度は軟便・泥状便から水様便までであるが、免疫不全の進行とともに重症化する傾向がある。重症例ではコレラに見られるような大量の水様便や失禁を伴う症例が報告され、直接死因となることもありえる。近年はエイズに対しては多剤併用療法 (HAART) による免疫機能の回復が行われる。

病原種は *Cryptosporidium parvum* (人獣共通寄生性の *C. parvum* ともつばらヒトから検出される *C. hominis*) が主であるが、*C. meleagridis* の感染も知られるようになった。免疫不全者では *C. baileyi* や *C. muris* の感染も考えられる。寄生部位は腸管、とくに小腸であるが、AIDS では膵臓、胆道、胆嚢、呼吸器への感染も報告されている。ヒト以外でも多くの哺乳類、特にその幼獣に感染が認められる。

クリプトスポリジウムの診断は検便によりオーシストを検出することによる。急性期の患者便には多数のオーシストが排出されるが<sup>2)</sup>、オーシストは小さいために通常の顕微鏡観察では見落とされる危険性が高い。したがって、遠心沈殿法 (MGL 変法) や浮遊法、密度勾配遠心法 (遠心浮遊法) によりオーシストの濃縮・精製を行い、さらに得られた試料を蛍光抗体染色、抗酸染色、ネガティブ染色などで染色して観察に供することが望まれる。多数排出されてい

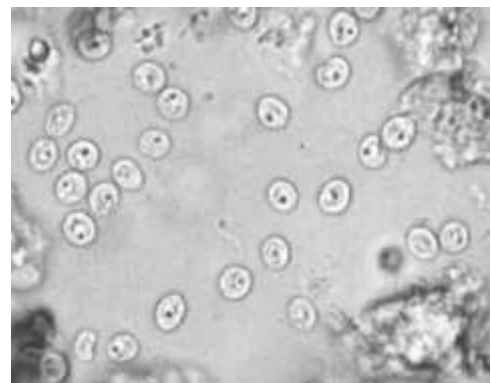


図 1 : ショ糖浮遊法により患者便から検出された *Cryptosporidium* のオーシスト

る場合は簡易迅速シヨ糖浮遊法<sup>3)</sup>、あるいは直接薄層塗抹法＋蛍光抗体染色により容易にスクリーニング可能である。最も高い検出感度が期待される方法は蛍光抗体染色で、簡便な染色用キットが市販されている(検査試薬として未承認のため保険適用外である)。

## 1. 検査材料の採取

患者の便材料を然るべき容器(試験管、蓋付き採便管等で、保存培地の入っていないもの)に数グラム程度採取する。検査までに時間を要する場合は検体を冷蔵庫保存する。長期間の保存が避けられない場合には、顕微鏡検査には10%ホルマリン水で固定(後述の遺伝子検査目的に試料を分割して冷凍保存)する。可能であれば、後述の集嚢子を行ってから保持するように努める。糞便量に余裕があればオーシストをできるだけ多く回収する。オーシストとして保存しておくことで遺伝子解析の結果、新規のタイプであった場合に、オーシストの形態的特徴を迅速に確認することができるし、遺伝子検査にも都合が良い。

### 検査材料の輸送上の注意

検査材料の輸送に際しては、内容物が漏出しないように適切に密閉し、冷蔵(4℃)あるいは冷凍(-20℃)で輸送する。クリプトスポリジウムと同定された後に、試験研究等を目的に生きた状態のクリプトスポリジウムを取り扱う場合、クリプトスポリジウムは四種病原体としての施設基準、保管、使用、運搬、滅菌等の基準(厚生労働省令)の遵守が求められ、事故の届出と災害時の応急措置は法律上の義務・直罰に該当する。都道府県公安委員会宛の運搬の届出には該当しない。

## 2. 濃縮・精製

### (1) 主な器具および試薬類

- ① 15 ml用 螺子蓋付きポリプロピレン製スピッツ管 (以下、スピッツ管)
- ② ピペット
- ③ ガーゼ
- ④ 綿棒

- ⑤ 60mmΦ程度のロート
- ⑥ 竹串、または割箸(以下、竹串)
- ⑦ 金属性ループ(直径6 - 7mmのニクロム線のループ)
- ⑧ 10%ホルマリン水溶液(以下、ホルマリン水)
- ⑨ 酢酸エチル(試薬特級)
- ⑩ 高比重液(本文中に記載)
- ⑪ ボルテックスミキサー
- ⑫ 遠心機
- ⑬ 簡易濃縮キット(本文中に記載)

**(2) 遠心沈殿法(MGL変法、あるいはFEA法)<sup>注1</sup>**

1. 糞便検体を少量(≦1g)スピッツ管に取る。
2. ホルマリン水を1ml加えて竹串で糞便塊を充分ほぐす。
3. 全量が5mlとなるようにホルマリン水を加え、ボルテックスミキサーで充分攪拌する。
4. 攪拌後、室温に20分間以上放置して固定する。
5. 再度、よく攪拌してからロートに4枚重ねのガーゼを敷き、試料液をろ過する。
6. ホルマリン水でガーゼ上のろ過残渣を軽く洗浄し、全量で8mlのろ液をスピッツ管に回収する。
7. ろ液に2mlの酢酸エチルを加え、密栓をして短時間激しく振盪・混和する。
8. 速やかに1,050×g(通常の卓上遠心機で2,500~3,000rpm程度に相当)、5分間遠心する。
9. 液層は上から酢酸エチル層、浮遊糞便層、希釈液層、沈渣の4液層に分離する。
10. 予め浮遊糞便層を竹串等で管壁から離し、上部の3液層を捨て、沈渣を回収する。さらに、スピッツ管内壁の付着物を綿棒で拭き取る。
11. 得られた沈渣を直接顕微鏡観察(400倍以上の倍率)、又は密度勾配遠心法等の試料に供する。

注1 本変法では、①バイオハザードの観点から、生理食塩水での洗浄工程を省略して

いる。また、②エチルエーテルに替えて、引火性の低い酢酸エチルを用いている。

### (3) 密度勾配遠心法(遠心浮遊法)

1. スピッツ管に比重 1.2 のショ糖液<sup>注1,2</sup>を 4ml程度取り、糞便を溶いた試料液<sup>注3</sup>を重層する。
2. 1,050×g で 10 分間 遠心し、比重の異なった 2 つの液層の界面付近を新しいスピッツ管に回収する。
3. 充分量の精製水を加えて希釈し、再度、遠心沈殿して沈渣を得る。
4. 沈渣を顕微鏡観察に供する。

注1 ショ糖 500g を精製水 650ml に溶解する。

注2 コロイド PVP 処理シリカーショ糖混合液(比重 1.10)を用いても良い。液の調整は、精製水 45mlにコロイド PVP 処理シリカ(Percoll またはそれと同等のもの)45mlと 2.5M ショ糖液 10ml(8.55g のショ糖を精製水に溶解して全量を 10ml としたもの)を加えて混合する。

注3 便材料に未消化の脂肪分が多量に含まれている場合には、検体をそのままでは浮遊法に供することができない。前処理として遠心沈殿法を行い、得られた沈渣を試料とする。

### (4) ショ糖浮遊法

1. 0.5 ~ 1g の糞便材料<sup>注1</sup>を比重1.2のショ糖液<sup>注2</sup>に溶く。
2. 試験管立てに立てた試験管に糞便液を満たす。その際、表面張力を利用して液面を試験管よりも盛り上げる(後に金属ループを使用する場合は、試験管上端より下1cm位まで満たす)。
3. 20分間程度、室温に静置する。
4. カバーガラス(あるいは金属ループ)を液最上面に接着して、液表面に浮遊してきたオーシストを回収する。
5. 直接、顕微鏡観察に供する<sup>注3</sup>か、回収液を充分量の精製水で希釈し、遠沈して沈渣を観察に供する。

- 注1 下痢便等で未消化の脂肪分が多量に含まれている場合には、前処理として遠心沈殿法を行い、得られた沈渣を試料とする。
- 注2 用いる高比重液の組成により飽和食塩水浮遊法、硫苦（硫酸マグネシウム）・食塩水浮遊法、シヨ糖液浮遊法などの名前で区別される。クリプトスポリジウムの検査では一般に比重1.2のシヨ糖液が用いられる。
- 注3 シヨ糖液中のオーシストは通常の顕微鏡像と著しく異なる。観察には通常の生物顕微鏡を用いる。

#### (5)簡易迅速シヨ糖浮遊法

1. スライドグラス上に少量の検体を置く
2. シヨ糖液を加えて混合する
3. カバーガラスを被せて数分間、静置する
4. カバーガラス付近に焦点を合わせて、浮いた粒子を観察する

#### (6)簡易濃縮キットと遠心浮遊法を組み合わせた方法

1. 糞便からの寄生虫卵などの簡易濃縮キット（VERITAS：Parasep；EVERGREEN：FECAL PARASITE CONCENTRATOR）に含まれる遠心チューブに、糞便約 1g（小指頭大）と蒸留水を適量加えボルテックスミキサーで十分攪拌後に遠心ろ過する。この操作で糞便中の挟雑物がキットのメッシュで除去され、オーシストは沈澱物中に回収される。
2. 沈澱物に少量のPBSを加え使い捨てピペットを用いてピペッティングしその0.5～1mlを15mlの目盛りつきプラスチック製遠沈管に入れ、さらに比重1.2のシヨ糖溶液を10mlまで加えピペッティングする。
3. キャップを外し、遠沈管を少し傾けて蒸留水を13ml程度まで使い捨てピペットを用いてゆっくりと重層する（シヨ糖層に直接蒸留水を滴下すると界面層が乱れるので、ピペット先端を管壁につけて蒸留水が管壁をつたってシヨ糖層に流れるようにする）。
4. 2,000回転10分間遠心するとオーシストなど寄生虫卵を含む層がシヨ糖層と水層の境界にできるので、水層とともにその層を回収し蒸留水を入れた別の15ml遠沈管に入れる。



5. 攪拌後に 2,500 回転 10 分間遠心し、沈澱物を 1.5ml のエッペンチューブに採取して再度蒸留水で遠心洗浄後、2.5%重クロム酸カリウム液などの保存液中で冷蔵保存する。

### (7)免疫磁気ビーズ法

本法は免疫反応を利用してクリプトスポリジウムとジアルジアを特異的に磁気ビーズと結合させ、磁力により回収する方法で、免疫磁気ビーズ法試薬と磁石等が必要となる。本法は精製度が高く、高感度な検出、核酸抽出用試料の精製に適している。水環境試料の検査用に、製品が市販されている。

## 3. 観 察

### (1) 器具および試薬類

- ① スライドグラス
- ② カバーグラス
- ③ ネイルエナメル(パラフィン類を溶かして用いても良い)
- ④ 生物顕微鏡(微分干渉装置付きが望まれる)
- ⑤ 蛍光顕微鏡(一般に落射型が便利)
- ⑥ 各種染色液(本文中に記載)
- ⑦ 燐酸緩衝生理食塩水 pH 7.2(PBS)
- ⑧ 市販の蛍光抗体試薬(検査用試薬として未承認のため、保険適用外)
- ⑨ DAPI 保存液:メタノール 1ml に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 2mg を溶解する。密閉容器に入れ、遮光して冷蔵庫に保管する。使用に際して DAPI 保存液 10 $\mu$ l を PBS 50ml に加えて混合する。
- ⑩ 水溶性封入剤

### (2) 直接観察

1. 糞便希釈液、又は精製試料<sup>注1</sup>をスライドグラスに少量取り、カバーグラスをかける。
2. カバーグラスの四縁を封じて<sup>注2</sup>、微分干渉顕微鏡<sup>注3</sup>で観察する。通常の生

物顕微鏡<sup>注4</sup>では他の粒子との区別は困難である。

- 注1 高比重シヨ糖液中のオーシストは微分干渉装置での観察には適さない。観察は通常の生物顕微鏡を用いるが通常の像とは著しく異なる。
- 注2 ネイルエナメル、またはパラフィン類を溶かしてシールする。周囲をシールすることで試料液の流れが止まり、観察が容易となる。
- 注3 微分干渉顕微鏡は一般の生物顕微鏡に微分干渉装置を組み込んだもので、光源には偏光が用いられる。標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差、または色の差に変換して可視化する顕微鏡である。顕微鏡観察に先立って、後述のケーラー照明法に準じた照明の調整が重要である。オーシストの内部構造の観察に適しているが、スクリーニングには適さない。標本作製上の注意点は被検物が重積しないこと、すなわちできるだけ希薄な標本作製すること。水道水等の検査では原虫の確定に用いられている。
- 注4 被写界深度を調整(コンデンサーの位置や開口絞りの調整)して、最適の像を得ること。

### <観察像>

オーシストは類円形(4.5~5.4 × 4.2~5.0 $\mu\text{m}$ )で、微分干渉顕微鏡像ではオーシスト内に4個のスポロゾイトや残体、その他に大小の顆粒が観察される。

高比重シヨ糖液中のオーシストの観察には通常の生物顕微鏡を用いるが、通常の像とは著しく異なる。コンデンサーの位置、開口絞りなどを適正に調整すると、屈折率の関係でオーシストは薄いピンク~オレンジ色に見える。その際、酵母などは緑色に見えるために識別が可能である。なお、シヨ糖液中のオーシストは内部構造の観察には適さない。内部構造の確認や染色標本作成にはシヨ糖液を精製水に置換する操作が必要となる。また、シヨ糖中のオーシストは長時間おくと収縮したり、壊れたり、特にホルマリン固定した材料はより早く見えづらくなったりすることがあり、観察に注意を要する。

### (3) 蛍光抗体染色

本法は免疫反応を利用してオーシスト壁を特異的に染色する方法で、観察には蛍光顕微鏡装置が必要となる。本法は感度が高く、スクリーニング法として優れている。染色方法には間接蛍光抗体染色法と直接蛍光抗体法の2つの方法がある。糞便等の試料では染色工程の少ない直接蛍光抗体法が便利なので、以下に説明する。

#### <湿潤試料の直接蛍光抗体染色(湿式)>

1. 精製材料を小試験管に取り、少量の PBS に希釈・混和する。
2. 必要量(市販キットにより異なるが、目安として試料の 1/10~20 量)の蛍光抗体試薬原液を添加し、遮光して室温で所定時間(15~30 分程度)反応させる。
3. 必要に応じて、染色終了 5 分前に適当量の DAPI 染色液を加えて反応を続ける。
4. 反応後、PBS で遠心洗浄(1,050×g で 5 分間程度)し、沈渣に水溶性封入剤を滴下する。
5. スライドグラスにとり、カバーグラスを掛けて、周囲をシールして顕微鏡観察に供する。
6. 蛍光顕微鏡<sup>注1</sup>(B 励起下)で FITC の特異蛍光(緑色)を示す粒子を観察する。
7. DAPI 染色を行った場合には UV 励起に切り替え、青色に染まったスポロゾイトの核(4 核)を観察する。

注1 広帯域(long pass)の蛍光フィルターを用いると夾雑物が他の色調を呈し、観察が容易である。

#### <乾燥標本の直接蛍光抗体染色(乾式)>

1. スライドグラスに糞便材料、または精製試料を薄く塗布して乾燥させる。
2. PBS で軽く洗浄した後、スライドグラスを湿箱に移し、試料部分に蛍光抗体試薬を滴下、遮光して室温で所定時間(15~30 分程度)反応させる。
3. 必要に応じて染色終了 5 分前に DAPI 染色液を加え、ピペットで静かに液を攪拌、反応を続ける。

4. 反応後、PBS で丁寧に洗浄、充分水を切ってから封入剤を滴下、カバーグラスをかける。
5. 蛍光顕微鏡 B 励起下で FITC の特異蛍光(緑色)を示す粒子を観察する。
6. DAPI 染色を行った場合には UV 励起に切り替え、青色に染まったスポロゾイトの核(4核)を観察する。

#### <観察像>

蛍光抗体染色像では緑色の特異蛍光を示す粒子<sup>注1</sup>として観察される。オーシストの染色パターンは基本的に辺縁部の蛍光のみで、中心部にはほとんど蛍光は認められない。したがって、全体としてはドーナツ状の染色像となる。

DAPI 染色を行った場合には、UV 励起下でオーシスト中にスポロゾイトの核が4核明瞭に観察される<sup>注2</sup>。

注1 市販の蛍光抗体試薬は一部の藻類等と交叉反応することが報告されており、環境試料では他の方法による確認が必要である。

注2 新鮮オーシストでは DAPI に染まらない場合がある。

#### (4) ネガティブ染色

蛍光顕微鏡がない場合の便宜的方法である。

#### <染色液>

ニューメチレン青	2.5g
シュウ酸カリウム・1水塩	8.0g
精製水	500ml

上記の2薬を精製水に溶解し、ろ過してから試薬瓶に移し、室温で保存する。

#### <手順>

1. スライドグラス上に糞便材料、または精製試料を少量取り、過剰のニューメチレン青染色液を加えて攪拌する<sup>注1,2</sup>。
2. カバーグラスをかけ四縁をシールしてから100～200倍で観察する。観察には

生物顕微鏡を用いる。開口絞り(コンデンサーに付属の絞り)を絞り込み、焦点をわずか上方にずらして観察すると、無色のオーシストは青い背景の中に(白く)浮かんでみえる。

3. オーシストらしい粒子が検出された場合には高倍率で観察する。
4. 陽性と判断された試料については別の方法<sup>注3</sup>でオーシストの確認を行う。

注1 試料に対して十分量の色素を加えると、過剰分の色素が残ってフィルター  
の役目をする。細菌等の混入が多いと色素が消費されてフィルター効果を  
失うことがある。18×18mmのカバーガラスに対して試料の量は10 $\mu$ l以下程  
度にする。

注2 沈渣の一部を別の試験管に取り、色素液と混和してからスライドガラスに移  
してもよい。

注3 微分干渉顕微鏡観察、抗酸染色、蛍光抗体染色法など。

#### <観察像>

細菌類、酵母、その他の食物残渣は濃青色に染色されるが、オーシストは染色されない。液中に過剰の色素が残ることで、青色の背景の中に無色のオーシストが浮いて見える。高倍率の観察ではオーシストの内部構造が不均一で、不明瞭ながらスポロゾイト等の内部構造が確認される。酵母や結晶様構造物等が同じく白く見える場合があるが、経験を積むと内部構造の違いから区別される。

#### (5) 抗酸染色

クリプトスポリジウムやサイクロスポラのオーシストは抗酸性を示すことから、抗酸染色が用いられてきた。以下に一例として Kinyoun の石炭酸フクシン染色法を紹介するが、抗酸染色法はいろいろ改良されており、各研究室で常用している方法があればその方法を踏襲すべきである。

#### <染色液>

☆ Kinyoun の石炭酸フクシン液

塩基性フクシン 4 g

95% エタノール	20ml
石炭酸	8ml
精製水	100ml

塩基性フクシンをエタノールに溶かし、これに石炭酸と精製水の混合液を加える。十分に攪拌した後、ろ過して褐色試薬瓶に保存する。

☆ Loeffler のアルカリ性メチレン青液

メチレン青	0.3g
95% エタノール	30ml
0.01% 水酸化カリ液	100ml

エタノールにメチレン青を溶かし、水酸化カリ液を加えて試薬瓶に保存する。

<手順>

1. スライドグラス上に糞便材料を直接、又は精製試料を薄く塗抹して風乾する。
2. メタノールで1～2分固定し、乾燥する。
3. Kinyounの石炭酸フクシン液を試料塗布面に載せて5分間染色する。
4. 50%エタノールで染色液を剥がすように洗浄する<sup>注1</sup>。
5. 精製水洗浄後、1%の硫酸水で約2分間、または標本から赤い色素が溶け出なくなるまで脱色する<sup>注2</sup>。
6. 水洗後、Loeffler のアルカリ性メチレン青染色液で1分間程度、後染色する。
7. 水洗、乾燥後にバルサム等で封入して観察する。

注1 染色液の表面には色素の酸化膜（不溶性）が形成されることがあり、酸化膜が標本上に付着しないように洗い流す。多量に付着した場合には50%エタノール液で漬け洗いする。

注2 目安として、標本に混在している細菌類の赤味がやや残る程度まで脱色すると良い。

<観察像>

オーシストは淡いピンクから赤色、さらに濃赤色に染まる。染色状況は一様で

はなく、馬蹄形に染まるものが多い。同時に染まらないオーシストも少なくない。後染色を強めに行うと赤の色調は低下するが、内部が顆粒状に染め出される。結果の判定は他の検査法で得られた結果を合わせて総合的に判断すべきである。ホルマリン処理されたオーシストは抗酸染色性が低下するとの指摘もあるが、不都合はないとも言われる。

## (6) ヨウ素・ヨウ化カリ染色

クリプトスポリジウムのオーシスト観察用に改良した染色方法を紹介するが、利用可能な顕微鏡が生物顕微鏡に限られている場合の便宜的な染色方法である。スクリーニング法としては推奨できない。染色と熱固定を同時に行うことでオーシスト内部とオーシスト壁の存在を観察することができる。

### <ヨウ素・ヨウ化カリ液>

ヨウ素	5g
ヨウ化カリ	10g
精製水	100ml

ヨウ化カリを水に溶かし、攪拌しながらヨウ素を徐々に加えて完全に溶解し、ろ過してから褐色試薬瓶に密閉保存する。(市販の希ヨードチンキで代替できる)

### <手順>

1. 精製試料を1.5ml用サンプルチューブ等に取り取る。
2. 試料量の1/2～1/3量のヨウ素・ヨウ化液を加えて、1～2分間熱湯に湯煎・振盪する。
3. 試料をスライドグラスに取り、カバーグラスをかけ、四縁をシールして観察する。

### <観察像>

オーシストの内部構造が褐色に染色される。熱処理によって色素が内部にまで浸透する。また、オーシスト壁と内部構造が分離するためにオーシスト壁が明瞭に観察できるようになる。酵母などでは細胞壁の分離は起こらないことから明瞭に区別される。

## 《 ジアルジア症の診断 》

ジアルジア症(ランブル鞭毛虫症)はジアルジア属原虫の感染に起因する消化器疾患で、主症状は激しい水様下痢から軟便を認め、少数寄生の場合はほとんどが無症状で糞便中に持続的にシストを排出する。本原虫の感染は患者糞便中に排出されるシストを経口摂取することによる。シストを排出するシスト保有者(無症状キャリアー)が他のヒトへの感染源として重要である。臨床的に他の下痢症と区別することは容易でない。

病原種は *Giardia duodenalis* (*G. lamblia*、*G. intestinalis* と synonym) である。寄生部位は腸管、特に十二指腸から空腸上部にかけてであるが、胆嚢や胆管粘膜にも寄生範囲が拡大することがある。本症のリスクファクターは発展途上国への渡航である。また、男性同性愛者もリスクグループを形成する可能性がある。

ジアルジア症の診断は糞便中の直径 10  $\mu$  m 前後の楕円形のシスト(嚢子)、または栄養型虫体(トロフォゾイト、栄養体)を検出することによる。シストの観察方法と栄養型虫体の観察方法は異なる。シストは一般に有形便に認められ、下痢便では栄養型虫体が検出される。また、十二指腸ゾンデ採取液中からも栄養型虫体が検出される。

### 1. シストの検査法

#### (1) 検査材料の採取

シストの検出を目的とした試料の採取方法はクリプトスポリジウムの検査材料の採取を参照のこと。

#### (2) 濃縮・精製

基本的にクリプトスポリジウムの検査法に準じ、遠心沈殿法(MGL変法)、密度勾配遠心法(遠心浮遊法)<sup>注1</sup>、簡易迅速シヨ糖浮遊法<sup>注1</sup>、免疫磁気ビーズ法の各方法が適用できる。一般的には遠心沈殿法による集嚢子が第1選択となる。

注1 ホルマリン等で長期に固定されたシストは浮遊法により回収しづらいことがある。



### (3) 観察

#### 1) 直接塗抹法および蛍光抗体染色法

クリプトスポリジウムの検査法に準じて行う。蛍光抗体試薬は直接法用の試薬が市販されている(検査試薬として未承認のため保険適用外である)。

#### <観察像>

シストは楕円形(8~12 × 6~8 $\mu$ m)で、成熟したシストでは4個の核を持つ。主に泥状便や有形便中に観察される。微分干渉顕微鏡像では核、鞭毛、軸糸、曲刺等が観察できる。

蛍光抗体法で染色されたシストは緑色の特異蛍光を示す粒子として観察される。その染色パターンは辺縁部の蛍光が強く、中心部にはほとんど蛍光が認められない。DAPI染色を行った場合には4核が観察される。

#### 2) ヨウ素・ヨウ化カリ染色法

利用可能な顕微鏡が生物顕微鏡に限られる場合の便宜法としてヨウ素・ヨウ化カリ染色が用いられている。

#### <染色液>

13頁(6)ヨウ素・ヨウ化カリ染色 を参照のこと。

#### <染色手順>

1. 糞便、または精製試料を1.5ml用サンプルチューブ等に取り。
2. 試料量の1/2~1/3量のヨウ素・ヨウ化液を加えて、攪拌する。
3. 試料をスライドグラスに取り、カバーグラスをかけ、周囲をシールして観察する。  
内部構造が褐色に染色され、核等が観察可能となる。

## 2. 栄養型虫体の検査法

### (1) 検査材料の採取

栄養型虫体の検出を目的とする場合には試料の採取後、速やかに検査を行う必要がある。試料の希釈は生理食塩水等の等張液を用いる。検査までに時間を

要する場合は検査材料を冷蔵保存すべきであるが、栄養型虫体の運動性が冷蔵状態でどの程度保持されるかは不明である。観察に際して温めて観察する。

#### <直接塗抹法>

1. 便を生理食塩水で希釈してスライドグラスに取り、カバーグラスをかける。
2. カバーグラスの周囲をシールしてから顕微鏡観察に供する。
3. 観察に際して、37℃程度に暖めると栄養型虫体の運動が活発となり検出し易い。

#### <十二指腸ゾンデ採取液からの検出方法>

1. 十二指腸ゾンデ採取液をスピッツ管に取り、1,050×g（汎用遠沈機で約2,500rpm）5分程度遠心して沈渣を得る。粘稠性が高い場合にはPBS等で希釈洗浄するとよい。
2. 沈渣をスライドグラスに取り、カバーグラスを掛け、周囲を封じてから顕微鏡観察に供する。

#### <ギムザ染色>

1. 沈渣をスライドグラス上に薄く塗布し、速やかに風乾する。
2. 充分乾燥させた後に、メタノール固定（2～3分間）する。
3. 薄い液で染色し、風乾後、バルサム等で封入し、顕微鏡観察に供する。

#### <観察像>

栄養型虫体は体長 15～17μm、幅 5～7μm で左右対称の洋梨型で、運動中の原虫は“木の葉が舞うようにヒラヒラ”とした動きを呈する。固定染色標本では 2核、4対8本の鞭毛、吸着円盤等が観察される。猿の面容に似た特徴的な形態を有することから、モンキーフェイスと形容される。

## 《 サイクロスポラ症、およびイソスポラ症の診断 》

サイクロスポラ症およびイソスポラ症は、*Cyclospora cayetanensis* および *Isospora belli* の感染に起因する消化器疾患である。いずれも臨床的には他の下痢症との区別は容易でない。寄生部位は腸管、特に十二指腸から空腸上部にかけてである。

サイクロスポラ症は、1996 年から続けて米国で中南米産のラズベリーを介した比較的規模の大きな分散型集団感染 (Diffuse Outbreak) が発生したことで有名となった。イソスポラはとくにエイズを初めとする免疫不全宿主に発症するはげしい下痢症の原因微生物として重要である。

いずれの原虫種においても患者の糞便に混じって排出されたオーシストは環境中で一定の発育 (スポロゾイト形成) をして感染性を有するようになる。この点はクリプトスポリジウムやジアルジアとは大きく異なる。

### 1. 検査の概要と臨床材料

診断は糞便中のオーシストを検出することによる。サイクロスポラのオーシストは直径  $8\mu\text{m}$  の球形で、内部には多数の顆粒が観察される。かつてこの原虫は "Cyanobacterium-like body" と呼ばれたことがあり、形態的に藻類に似る。

イソスポラのオーシストは長径  $20\sim 33\mu\text{m}$  短径  $10\sim 19\mu\text{m}$  のフットボール型を呈する。新鮮便中に検出されるオーシストは単細胞である。このオーシストは大きいことから見落とすことは稀である。

### 2. オーシストの検査法

基本的にクリプトスポリジウムの検査法に準じる。

これら2種の原虫に関しては蛍光抗体試薬が開発されていない。しかしながら、オーシスト壁はUV 励起下でいずれもネオン青色の自家蛍光を発することから、蛍光顕微鏡観察による検出が第一選択となる。

なお、サイクロスポラのオーシストは抗酸染色で陽性に染まる。

### Ⅲ 遺伝子検査法

遺伝子検査法は、すでに各種の病原体検索に用いられている。原虫類の検査においても同様に、疫学的調査への利用が進んでいる。ここでは原虫検査における遺伝子検査法のポイント、特に原虫あるいは検査材料の特性から生ずる問題点について紹介する。

#### 1. 原虫検査における遺伝子検査法のポイント

遺伝子検査法の利点は、種間あるいは種内の遺伝学的変異を知ることができることで、これを利用することで汚染源の特定などといった疫学的に重要な情報を得ることが期待できる。

腸管寄生性原虫類への適用に際しての問題点は、壊れにくい(オー)シストからの核酸抽出である。また、糞便材料では目的外の核酸の混入が避けられないことや、PCR反応の阻害要因も多く含まれていることが問題となる。いずれにせよ、前処理としての試料精製が重要となる。また、反応に際してはテンプレートの濃度範囲を広く取るなど、確実に反応を得るための工夫が必要となる。

現行の解析法は、検出された原虫を解析対象としてさらに詳細な情報を得ることを目的としているもので、検出を目的とするのはまだ一般的ではない。一方、水環境試料中の検査を目的とした検査試薬が市販されている。この場合は免疫磁気ビーズ法により徹底して反応阻害物質を除き、その上で逆転写反応を行って rRNA 分子を標的とした高感度な増幅が行われている。その他、細胞培養と RT-PCR を応用した方法などが開発されている。詳細は文献等を参照されたい。

#### 2. 主な試薬と実験器具

遺伝子検査に共通する実験器具と試薬類、および各操作に必要なものに分けて示した。

##### [共通するもの]

- ① 0.5ml(又は0.2ml)PCR チューブ
- ② 1.5ml 遠心チューブ
- ③ 疎水性フィルター付きピペットチップ

- ④ 微量ピペット(10、200、1000 $\mu$ l)
- ⑤ 微量高速冷却遠心機
- ⑥ 恒温水槽
- ⑦ 滅菌精製水 (DW/MiliQ 水など)、
- ⑧ TE バッファー(10mM, Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0 )

#### [核酸抽出用]

- ① 加熱用ブロックヒーター(1.5ml チューブ対応)
- ② 3M 酢酸ナトリウム
- ③ TE 飽和フェノール:フェノールを加熱・融解し、等量の TE バッファーを加え、混合し、その後静置して、水層を除く。この操作をもう一度繰り返し、得られたフェノールを TE 飽和フェノールとする。
- ④ フェノール/クロロホルム混液  
(TE 飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)
- ⑤ 10% SDS
- ⑥ TritonX-100
- ⑦ 10mg/ml proteinase K
- ⑧ エタノール
- ⑨ ミネラルオイル
- ⑩ 核酸抽出精製キット

#### [PCR ならびに DNA 電気泳動用]

- ① サーマルサイクラー
- ② 電気泳動装置
- ③ Taq DNA polymerase キット
- ④ 抗 Taq 抗体
- ⑤ プライマー
- ⑥ 制限酵素/専用バッファー
- ⑦ アガロース
- ⑧ TBE バッファーあるいは TAE バッファー
- ⑨ 泳動用サンプルバッファー
- ⑩ DNA サイズマーカー
- ⑪ エチジウムブロマイド溶液 (EtBr)

### 3. 核酸の抽出と精製

原虫類の(オー)シスト壁は硬く壊れにくく、界面活性剤の存在下での加熱処理、超音波処理、凍結融解等が行われている。核酸の抽出と精製には市販キットも利用される。

#### (1) DNA 精製キットを用いた方法

オーシストを多数認める場合には検体の少量を、あるいはキットの規定量を、市販の DNA 分離キット(例:QIAamp DNA Stool Mini kit)に用いる。

精製した DNA 試料を用いて PCR を行ったが DNA 増幅が見られない、ということがある。これは DNA 試料中にまだ PCR 阻害物質が混入しているためと考えられ、DNA 精製用のカラムやガラスパウダー等で再度精製をする場合もある。

## (2) SDS を用いた基本的抽出方法

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) は基本的な抽出用試薬として各種材料に利用されており、(オー)シスト壁の溶解にも有効である。ただし、SDS はその後の PCR 反応に阻害的なために、十分な除去が必要となる。

### <手順>

1. 20 $\mu$ l の試料を 160 $\mu$ l の TE buffer に浮遊し、さらに 20 $\mu$ l の 10% SDS を PCR チューブに入れ、軽く混和する。
2. ミネラルオイル (2 滴) で液面をシールする<sup>注1</sup>。1.5ml の遠心チューブを用いる時は蓋をロックする。
3. 100 $^{\circ}$ C のヒートブロックあるいは沸騰水中で 15 分間、加熱する<sup>注2</sup>。
4. 室温にて 5 分間ほど冷却し、3,000rpm 程度で数秒、遠心する。
5. オイルの混入がないように、ピペットで水層部分を取り 1.5ml 遠心チューブに回収する。
6. 10mg/ml Proteinase K 溶液を全量の 1/20 となるよう加えて軽く混和し、数秒遠心する。
7. 60 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱処理する。
8. 室温で 5 分間冷却する。
9. 400 $\mu$ l のフェノール/クロロフォルム混液を加え、チューブを転倒混和する。完全に白濁するまで、穏やかに混和する<sup>注3</sup>。
10. 12,000 $\times$ g、室温で 5 分間遠心する。
11. 水溶液部分を新しい遠心チューブに 300 $\mu$ l 程度回収する<sup>注4</sup>。
12. 400 $\mu$ l のクロロフォルムを加え、全体が混ざるまで遠心チューブを転倒・混和する<sup>注5</sup>。
13. 12,000 $\times$ g、室温で 5 分間遠心する。
14. 水溶液部分を新しい遠心チューブに回収する。

15. 約 400 $\mu$ l の上清に 40 $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウムと冷 99.5%エタノール 1ml を加え、2~3 分間混和する。
16. 12,000 $\times$ g、室温で 15~20 分間遠心する。
17. 上清を捨て、冷 70%エタノールを 1ml 加え、2~3 回遠心チューブを転倒・混和する<sup>注6</sup>。
18. 12,000 $\times$ g、室温で 5 分間遠心する。
19. 上清を捨て、再び冷 99.5%エタノール 1ml を加え 2~3 回遠心チューブを転倒する。
20. 12,000 $\times$ g、室温で 5 分間遠心する。
21. 上清を捨て、さらに 3,000rpm 程度で数秒、遠心する。
22. 管底に残ったエタノールを除き沈殿を自然乾燥させる<sup>注7</sup>。
23. 100 $\mu$ l の TE バッファーを加え、沈殿を溶かす。
24. -20 $^{\circ}$ Cで保存する。

注1 オイルを滴下後 3,000rpm程度で数秒遠心し管壁のオイルを落とす。オイルでシールすることで水分の気化を防ぎ、DNA により PCR チューブ内が汚染されることを防ぐ。

注2 加熱時は内圧の上昇で必ずフタは開くので、固定して開かないようにする。

注3 有機溶媒を混ぜると直ちに白濁するが、水層とすぐに分離してしまうので、全体的に白濁が維持されるように遠心チューブを 1 秒毎程度に転倒する。3 分間ほど続ける。

注4 上からゆっくりと吸引・回収し、界面付近の浮遊物を回収しないように注意する。

注5 初めの数秒間強くチューブを振盪する。その後緩やかに 2 分間ほど転倒混和を続ける。

注6 上清はピペットで除去する。チューブの底まで徹底的にエタノールを除去する必要はない。50 $\mu$ l ほど残して 70%エタノールを加える。

注7 沈殿を取らないように気をつけて、エタノールは 10 $\mu$ l ほど残しても問題ない。むしろ乾燥しすぎに注意する。

### (3) TritonX-100 を用いた簡易抽出法

非イオン系の界面活性剤は一般に SDS より穏やかな作用を示し、PCR を阻害しない (TritonX-100 は終濃度 2% まで添加可能)。したがって、抽出後の界面活性剤除去工程を省略することができる利点がある。充分量の精製 (オー) シストが入手可能な場合には便利な方法である。手順としては、精製 (オー) シストを 10% Triton-X100 を含む 200  $\mu$ l の TE バッファーに浮遊し、100°C のヒートブロックあるいは沸騰水中で 15 分間、加熱する。3,000rpm 程度で数秒間、遠心分離した上清をテンプレートとして使用する。

### (4) 免疫磁気ビーズ法、凍結融解、ProteinaseK、超音波処理の組み合わせ

免疫磁気ビーズ法を用いることで阻害物質を徹底して除き、精製した試料から核酸を抽出する<sup>4)</sup>。免疫磁気ビーズとクリプトスポリジウム等が結合した状態で、界面活性剤添加の PBS で夾雑物がなくなるまで繰り返し洗浄を行う。塩酸処理で解離したクリプトスポリジウム等を回収後、水酸化ナトリウムで中和し、さらに TE バッファーで遠心洗浄する。得られた試料を凍結融解 (5 回)、ProteinaseK 溶解処理、超音波処理、加熱失活処理を行い、RNA を含む核酸抽出物を得る。

## 4. 制限酵素処理と電気泳動

### (1) 電気泳動

電気泳動の操作手順は常法に準じて行う。

### (2) PCR 産物の制限酵素解析

PCR 産物を一度精製してから制限酵素処理をすると酵素処理時間を短縮することができ、結果も良好となる。精製にはカラム法等が使用可能で、PCR 産物の収量が少ない時には積極的に濃縮を行うべきである。以下に制限酵素処理の一例を示す。

<手順>

1. PCR 産物を電気泳動し、DNA 増幅とその量を確認する。
2. 必要により PCR 産物を精製する。



3. 0.5ml の PCR チューブ内で 17 $\mu$ l の DNA 液と 2 $\mu$ l の制限酵素用バッファー保存溶液 (10 倍濃度)、そして 1 $\mu$ l の制限酵素を加え、2 時間、37 $^{\circ}$ C で保温する。
4. 反応後、常法に従って電気泳動する。

## 5. 塩基配列決定

精製後の PCR 産物を BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit などを用いてサイクルシーケンス反応を行う。シーケンスを正確に読み取るため、両方向からのシーケンスを解読する (反応には PCR で用いた forward、reverse のプライマーを用いる)。反応産物は BigDye XTerminator 精製キットなどを用いて過剰の蛍光物質を除去し、シーケンサーにセットする。この試薬は反応産物に 2 種類の専用試薬を加えて、混ぜて、そのままシーケンサーにセットするだけなので、セット前のヒートショックが不要であり多数検体を処理する場合には作業時間を大幅に短縮できる。

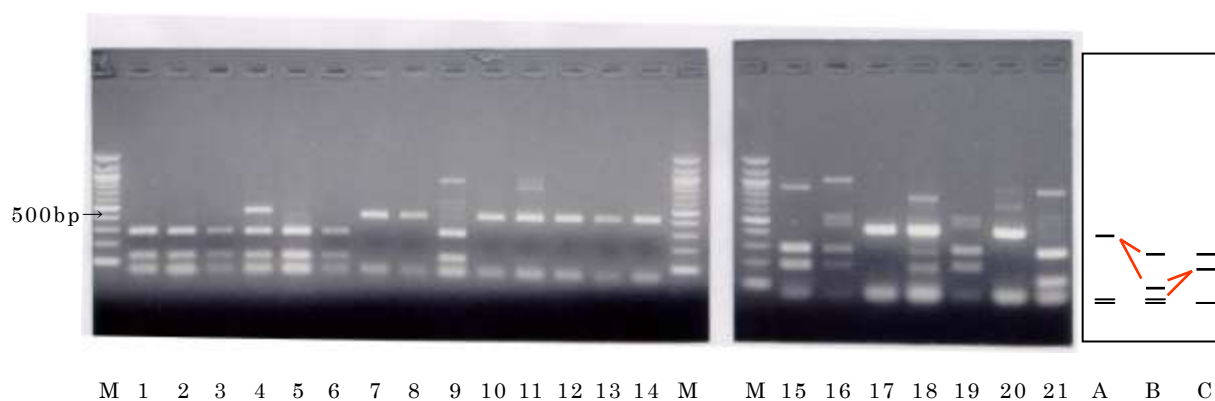


図. 2 PCR/RFLP 解析の例

cry373 および cry44 プライマーによる PCR 産物を *Rsa* I で制限処理した。3 種類の泳動パターンが見られる。パターンの模式図を写真右に示した。レーン 1~6 および 9 はウシ型 (模式図では B)、レーン 7、8、10~14、17、18、20 はヒト型 (同じく A)、レーン 15、16、19 は *meleagridis* 型 (C) であった。レーン 21 は 9 と同じ産物である。レーン M には 100-bp ラダーを使用した。レーン 1~6 はウシより分離された *C. parvum*、レーン 7~20 はヒトより分離された *C. parvum* を用いている。

## 《 クリプトスポリジウムの PCR 》

臨床例の主な原因種は、ヒトから検出されることが多い *C. hominis* (あるいは *C. parvum* genotype I)、人獣共通寄生性の *C. parvum* (あるいは *C. parvum* genotype II) の 2 種であるが、オーシストの観察で両種を区別することはできない。さらに以下の表に示したように、本来動物を宿主とする種または遺伝子型のヒト感染例も報告されており、その同定には遺伝子検査を要する。本検査マニュアルでは国内の患者から検出例が多い<sup>5)</sup> *C. parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis* の 3 種の型別が可能な SSU rDNA (小亜粒子リボソーム RNA 遺伝子) と COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein 遺伝子) の PCR-直接塩基配列決定、あるいは RFLP 法<sup>6-8)</sup> と、GP60 (60-kDa glycoprotein 遺伝子) の配列の比較による *C. parvum* と *C. hominis* のサブタイプ型別<sup>9、10)</sup>、その他の方法について、紹介する。

精製されたオーシストを用いた場合は、単個のオーシストからでも DNA 増幅は可能である。この場合、マニピュレーション等は技術的な熟練を要する。多量のオーシストを DNA 抽出に用いた場合は、阻害物質の混入を避けるため DNA を希釈して用いた方がよい。また、複数の種類による重複感染など、同一試料中に異なる遺伝集団が混在する可能性もあるので注意が必要である。

表 ヒトから検出されている *Cryptosporidium* の種と遺伝子型

種名・遺伝子型名	宿主	寄生部位	ヒトの症例
種			
<i>C. andersoni</i>	ウシ	胃	稀
<i>C. bovis</i>	ウシ	腸	稀
<i>C. baileyi</i>	ニワトリ	ファブリキウス嚢, 気管	稀
<i>C. canis</i>	イヌ	腸	稀
<i>C. cuniculus</i>	ウサギ	腸	稀
<i>C. fayeri</i>	コアラ、カンガルー	腸	稀
<i>C. felis</i>	ネコ	腸	稀
<i>C. hominis</i>	ヒト、稀に他の哺乳動物	腸	多い
<i>C. meleagridis</i>	シチメンチョウ、オカメインコ	腸	比較的多い
<i>C. muris</i>	ネズミ	胃	稀
<i>C. parvum</i>	ヒト、家畜、野生哺乳動物	腸	多い
<i>C. suis</i>	ブタ	腸	稀
<i>C. ubiquitum</i>	シカ、ウシ、ヒツジ		稀

遺伝子型			
Pig II	ブタ		稀
Chipmunk	シマリス		稀
Horse	ウマ		稀
Monkey	サル	腸	稀
Mouse	アカネズミ、ハタネズミ		稀
Skunk	スカンク		稀

網かけはヒトでの症例が多い寄生種  
宿主は代表的な動物を示す

## 1. 各種プライマーによる PCR

### < Xiao et al, (1999)のプライマー >

Xiao et al, (1999)のプライマーは SSU rDNA 遺伝子の一部領域を増幅する<sup>8)</sup>。増幅は nested PCR にて行い、First、Second PCR とともにサイクル数は 30 回、840-bp 前後の産物が増幅される。DNA polymerase は一例として TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (HS)を使用し、PCR Bufferと dNTP は同 Taq に添付されているものを使用する。

### < 反応液の組成 >

	First PCR	Second PCR
精製水	28.75 $\mu$ l	29.75 $\mu$ l
10 x Ex Taq Buffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Forward primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Reverse primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
反応液総量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Second PCR のテンプレートは First PCR 産物

### < プライマー >

**First PCR (forward) : 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'**

**First PCR (reverse) : 5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'**

**Second PCR (forward) : 5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'**

**Second PCR (reverse) : 5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'**

<温度条件>

**Frist PCR と Second PCR 共通**

**95°C5 分, 94°C30 秒→55°C30 秒→72°C1 分を 30 サイクル, 72°C7 分**

塩基配列決定により、データベース(DDBJ/GenBank/EMBL)の登録配列との比較により、詳細な型別が実施できる。

PCR-RFLP では制限酵素 *SspI* と *VspI* (別名 *PshBI*) を使用する。SSU rDNA の PCR-RFLP で second PCR の産物に非特異な増幅を認める場合は、RFLP パターンの判定を感わず結果となることがあるので、QIAquick Gel Extraction kit などを用いて特異サイズの産物を切り出し精製する。

SSU rDNA の PCR 泳動像を図 3 に示した。First(second)PCR のサイクル数やテンプレート量が多いと特異サイズ以外の産物も増幅され、その後の RFLP 処理で特異サイズを切出して精製する必要がある。下痢症例では多数のオーシストが排出されているので、そうした検体の SSU rDNA の PCR ではテンプレート量、反応サイクル数を少なめにした方が良い。SSU rDNA を制限酵素 *SspI* で処理した場合(図 4A)、3 種はともに約 450-bp、250-bp、110-bp の切断パターンを認め

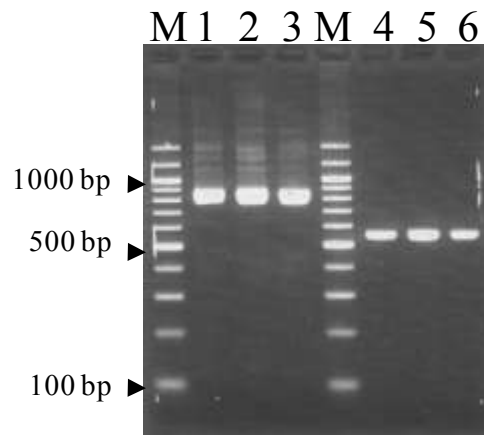


図 3: SSUrDNA と COWP の PCR 電気泳動像。SSUrDNA では約 840-bp (A)、COWP では約 550-bp (B) の産物が増幅される。レーン 1、4、*C. hominis* ヒト由来株；レーン 2、5、*C. parvum* ヒト由来株；レーン 3、6、*C. meleagridis* ヒト由来株。レーン M、サイズマーカー (100-bp ラダー)。ゲルは 3%濃度 (NuSieve 3:1 Agarose 使用)

明確に区別できないが、*VspI* の RFLP パターン(図 4B)は各々異なり 3 種の鑑別が可能である。RFLP パターンは当初報告された<sup>7,8)</sup>切断パターン(以下の表)と同様である。

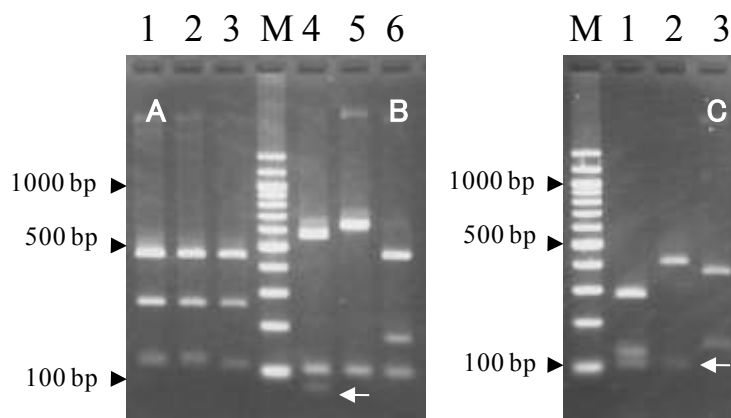


図 4: SSUrDNA の *SspI*(A)、*VspI*(B)による RFLP パターンと COWP の *RsaI*(C)による PCR-RFLP パターン。B の矢印は *C. hominis* の *VspI* 処理で微かに認められる 70-bp の切断産物。C の矢印は *C. parvum* の *RsaI* 処理で微かに認める 106-bp の切断産物。レーン 1、4、*C. hominis* ヒト由来株；レーン 2、5、*C. parvum* ヒト由来株；レーン 3、6、*C. meleagridis* ヒト由来株。レーン M、サイズマーカー(100-bp ラダー)。ゲルは 3%濃度(NuSieve 3:1 Agarose 使用)。

表 *C. parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis* の PCR-RFLP パターン

種	SSUrDNA		COWP
	<i>SspI</i>	<i>VspI</i>	<i>RsaI</i>
<i>C. parvum</i>	<b>449/254/108/12/11</b>	<b>628/104/102</b>	<b>413/106/34</b>
<i>C. hominis</i>	<b>449/254/111/12/11</b>	<b>561/104/102/70</b>	<b>284/129/106/34</b>
<i>C. meleagridis</i>	<b>449/254/108/11/11</b>	<b>456/171/104/102</b>	<b>373/147/34</b>

RFLP パターンは原著論文<sup>7,8)</sup>から引用

太字のサイズは電気泳動像で認められる切断産物のサイズ

SSU rDNA の PCR-RFLP は 2 種類の制限酵素を必要とするが、PCR の感度が高いこと、および多くの種と遺伝子型で当該サイズの産物が増幅されそのシーケンスの系統樹解析でも鑑別できることから海外では広く用いられている。しかし PCR-RFLP 法では種または遺伝子型により同様のパターンを示す場合があり(例えば *C. hominis* とサル型、マウス型とフェレット型などは同様のパターンを示す)、さらに RFLP パターンは全ての種と遺伝子型で確認されてはいないので<sup>11)</sup>、この手法による鑑別には限界がある。一方、後述の COWP の PCR-RFLP は制限酵素 1 種類を用いて種鑑別を行う方法であるが、SSU rDNA のそれと同様に異種(遺伝子型)間で同様のパターンを示す場合があり(*C. parvum* とマウス型、*C. hominis* とサル型など)、また人体寄生例のある *C. canis*、*C. baileyi*、*C. muris* などでは PCR 増幅が弱い場合がある<sup>7)</sup>。しかしサル型やマウス型などの人体寄生は極めて稀であることを考慮すれば、国内で検出される頻度が高い *C. parvum*、*C. hominis*、*C. meleagridis* を鑑別する上で SSU rDNA または COWP の PCR-RFLP 法は有用性のある鑑別法と考えられる。

#### < Spano et al, (1999)のプライマー >

COWP を増幅するプライマーと PCR のサイクル反応を以下に示した。反応液の組成は前述の通りで(Xiao et al, (1999))、553bp の増幅産物が得られる。RFLP では *RsaI*(別名 *AfaI*)を使用し、詳細は上述のとおりである。

#### <プライマー>

**cry-15 :5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3'**

**cry-9 :5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3'**

#### <温度条件>

**95°C5 分, 94°C30 秒→55°C30 秒→72°C1 分を 40 サイクル, 72°C7 分**

#### < Peng et al, (2001)のプライマー >

GP60(あるいは CPGP60、CPGP40/15)を増幅するプライマーと PCR のサイクル

反応を以下に示した<sup>9)</sup>。反応液の組成は前述と同じで(Xiao et al, (1999))、増幅は nested PCR にて行い、サイクル数は First、second PCR ともに 35 回。

<プライマー>

*C. parvum*、*C. hominis* 増幅用

**AL3531 (First PCR, forward) : 5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3'**

**AL3534 (First PCR, reverse) : 5'-GCA GAG GAA CCA GCA TC-3'**

**AL3532 (Second PCR, forward) : 5'-TCC GCT GTA TTC TCA GCC-3'**

**AL3533 (Second PCR, reverse) : 5'-GAG ATA TAT CTT GGT GCG-3'**

*C. meleagridis* 増幅用

**AL3531 (First PCR, forward) : 5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3'**

**First PCR, reverse : 5'-AAT TCG CAC GAA AGA TTT CC-3'**

**AL3532 (Second PCR, forward) : 5'-AAG GAT GTT TCT GTT GAG-3'**

**AL3533 (Second PCR, reverse) : 5'-TGC AAC CAA ACT GTA C-3'**

<温度条件>

*C. parvum*、*C. hominis* 増幅用、*C. meleagridis* 増幅用共通

**95°C5 分, 94°C30 秒→55°C30 秒→72°C1 分を 35 サイクル, 72°C7 分**

シーケンスを解読する際、泳動後に非特異な増幅産物を認める場合はアガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを精製する。非特異産物を認めなくともプライマーダイマーや過剰なプライマーを除去するために、QIAquick PCR Purification Kit などを用いて精製する。

シーケンスの波形を Sequencher などのソフトで確認し、DNA databank (DDBJ/GenBank/EMBL) に登録されている代表的な *C. parvum*、*C. hominis* の GP60 サブタイプファミリーのデータと比較し系統樹解析に用いるシーケンスの範囲を決める。検体シーケンスと各サブタイプファミリーのシーケンスを Fasta 形式または clustal 形式に保存し、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) が提供する ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) の解析配列データに upload させる。“より詳細な設定”の「TYPE」で DNA を選択し、「ALIGN」はデフ

オルトのまま、「TREE」の DISTANCE は適宜選択 (Kimura または Tamura-Nei など)、OUTPUTTREE は phylip distance を選択する。「BOOTSTRAP」を ON にし、DISTANCE は TREE での設定に合わせる。以上の操作で入力内容の送信をすると、10 数分ほどで解析データがメールで送られてくる。データは query.aln、query.dnd、query.dst、query.ph、query.phb と続き、系統樹の作成には最後の query.phb を用いる。「query.phb」直下の片括弧から最後までを選択・テキスト形式で保存しそれを njplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Njplot.html>) など描画ソフトで開いて系統樹を作成する (図 5)。同様の解析はフリーソフト ClustalX ver 2、MEGA5 などを用いても可能である。

今回示したプライマーによる GP60 の second PCR では、550-bp 前後の産物を認める (図 6)。GP60 を増幅させるプライマーペアは他にも幾つか報告されているが、今回のものを含めこれらのプライマーが全ての *C. parvum*、*C. hominis* 分離株の GP60 を増幅できるわけではないので、増幅できない場合は他のプライマーペア<sup>11,12)</sup>で試みる。解読されたシーケンスは図 7 に示したように、TCA または TCG のトリヌクレオチドの繰り返し配列が認められ、またその配列の直後に ACATCA が 1 つまたは 2 つ (ない場合もある) 続く。これらトリヌクレオチド、ACATCA の繰り返し配列のコピー数によりサブタイプが決まる<sup>12)</sup>。すなわち、図 7 では TCA (二重下線) が 15 個、TCG (波線) が 2 個、ACATCA が 1 個あるので、A15 (A は TCA を指す) G2 (G は TCG を指す) R1 (R は ACATCA を指す) となり、系統樹解析などでサブタイプファミリーが IIa の場合、IIaA15G2R1 と表わされる。*C. parvum* と *C. hominis* には多数のサブタイプファミリーが報告されており、*C. parvum* では少なくとも 12 のサブタイプファミリー (IIa、IIc: 人獣共通寄生性; IIb、IIe、IIe~III: ウシ、ヒト、野生動物などに特異的) が、また *C. hominis* では少なくとも 7 つのサブタイプファミリー (Ia~Ig) が報告されている<sup>13)</sup>。分離株がどのサブタイプファミリーに含まれるか、あるいは新規のファミリーなのかを決定するためには、解読されたシーケンスデータを基に系統樹解析を行う必要がある (FASTA または BLAST を用いた相同性検索によりサブタイプファミリーを予想することも可能である)。



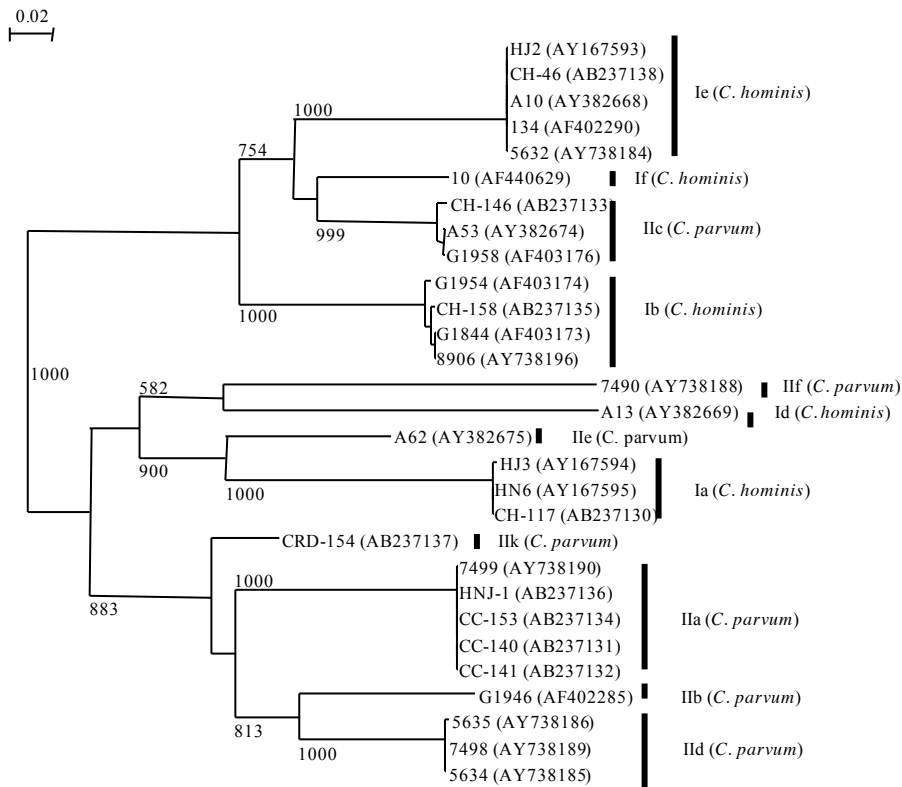


図 5: GP60 のシーケンスデータに基づく、分子系統樹の例

*C. parvum*、*C. hominis* は複数のサブタイプファミリーに分類され、さらに各ファミリーには多数のサブタイプが存在する。分離株名の後の括弧内は DNA databank に登録されている accession numbers

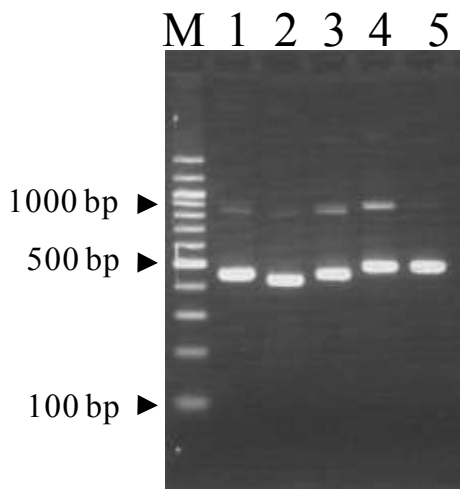


図 6: GP60 の second PCR 電気泳動像。レーン 1-3、*C. parvum* ヒト由来株；レーン 4、5、*C. hominis* ヒト由来株。レーン M、サイズマーカー（100-bp ラダー）。Second PCR では約 550-bp 前後の産物が増幅されるが、そのサイズは株によって若干異なるので、泳動像を見ただけでも GP60 領域で異なる株かどうか分かる。ゲルは 3% 濃度（NuSieve 3:1 Agarose 使用）

CCAGCCGTTCCACTCAGAGGAACTTTAAAGGATGTTCCCTG  
 TTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATC  
ATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCA  
 AATAAGGCAAGAAGCTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAG  
 ATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGA  
 AGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGCTGCT  
 TCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTA  
 CCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCAC  
 TTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCG  
 ACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCTA  
 TAAAAGACCAAACAGATCC

図 7: GP60 の second PCR 産物のシーケンス(419-bp)。トリヌクレオチド(TCA: 二重下線、TCG: 波線)と ACATCA(破線)の繰り返し配列数でサブタイプが決まる

以上のことから分離株のサブタイプを決定するためには、①分離株が *C. parvum* か *C. hominis* かを確かめ、②GP60 の系統樹解析または相同性検索により、分離株のサブタイプファミリーを決定する、③GP60 のトリヌクレオチドなどの繰り返し配列のコピー数を検索してサブタイプを決定する。*C. meleagridis* でも遺伝子型別が試みられ GP60 あるいは HSP (heat shock protein) 70 のシーケンスの比較で少なくとも 6 つのタイプに分類されている<sup>14)</sup>。

#### < Johnson et al, (1995) のプライマー >

Johnson et al, (1995) のプライマー [CPB-DIAGF、CPB-DIAGR] は *C. parvum*、*C. muris*、*C. bailey*、*C. wrairi*、*C. meleagridis* の少なくとも 5 種について 18S リボソーム RNA 遺伝子内の 435bp を増幅する<sup>15)</sup>。塩基配列決定により分離株の遺伝子型別ができる。

#### < 反応液の組成 >

試 薬	容 量
滅菌精製水	13.1μl
10 × Taq 用 buffer	2.5μl

dNTPs	2.0μl
20μM primer	0.5μl × 2
TaqDNA polymerase	0.2μl
Taq Start (抗 Taq 抗体)	0.2μl
50mM MgCl <sub>2</sub>	1.0μl
精製 DNA 溶液	5.0μl
計	25.0μl

DNA ポリメラーゼは、最も汎用されている TaqDNA polymerase を使用しているが、非特異的反応を抑える等の目的から、他種の DNA polymerase を使用することもある。また、同じ TaqDNA polymerase でもメーカーにより至適 Mg<sup>++</sup>濃度に違いが見られる。酵素については予備実験として至適 Mg<sup>++</sup>濃度を調べておいた方がよい。なお、本法では非特異反応を抑える目的で抗-TaqDNA polymerase 抗体を使用したホットスタート法を採用した。TaqDNA polymerase と抗体は予め別の PCR チューブ内で混ぜ、5 分間室温に置き、その後他の試薬とともに混合する。

#### <プライマー>

**CPB-DIAGF : 5' - AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG -3'**

**CPB-DIAGR : 5' - TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG -3'**

#### <手順>

1. 用意する PCR チューブの本数は試験に要する本数+陽性、陰性対照各 1 本とし、精製 DNA 溶液を除いた試薬類を全本数分混合し、反応液とする。
2. 各々の PCR チューブに 20μl の反応液を分注する。
3. 陰性対照には滅菌精製水を、陽性対照および試験群の PCR チューブには DNA 試料を各 5μl ずつ加える。
4. PCR チューブの底を軽くたたいて混合し、軽く遠心する。
5. 必要に応じてミネラルオイルを 1 滴落とし、再び軽く遠心する。
6. PCR チューブをサーマルサイクラーにセットする。
7. 以下の温度プログラムで PCR 反応を行う。

Step 1 :	98 °C	5 分	} Step 2~4 を 40 回反復
Step 2 :	94 °C	30 秒	
Step 3 :	55 °C	30 秒	
Step 4 :	72 °C	1 分	
Step 5 :	72 °C	7 分	

8. 2%アガロースで電気泳動する。EtBr で染色、DNA 増幅を確認する。

PCR の一般的な注意点であるが、目的が検出・同定にあるので試料間の相互汚染は必ず避けなければならない。具体的な注意事項として、

- フィルター付きのピペットチップを使用する。
- ゲルへのサンプル添加用に専用のピペッターを用意する。
- 手順の最後に DNA 溶液を取り扱う。
- 同時に複数の PCR チューブの蓋を開けない。
- 試薬類は小分けして保存する。
- 陰性、陽性コントロールをつける。特に、PCR では、DNA 増幅産物そのものがテンプレート DNA として多量に生産されるため、非常に汚染しやすい環境がつくられることに注意する。
- PCR チューブと蓋との隙間や蓋の裏面等に飛散した DNA は、ピペット操作の際に汚染の原因となるので DNA を含む反応液を攪拌したら必ず短時間の遠心 (3,000rpm 程度) を励行する。

#### <Awad-El-Kariem et al,(1994)のプライマー>

[CRY-RF、CRY-RR2] は *C. parvum*、*C. muris*、*C. bailey* の 3 種類について 18S リボソーム RNA 遺伝子内の 539bp を増幅する<sup>16)</sup>。Mae I -RFLP により分離株の種の同定ができる。

#### <プライマー>

**CRY-RF : 5' - AGT GCT TAA AGC AGG CAA CTG -3'**

**CRY-RR2: 5' - CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC -3'**

#### 温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分	
Step 2 :	94 °C	30 秒	} Step 2~4 を 40 回反復
Step 3 :	53 °C	30 秒	
Step 4 :	72 °C	30 秒	
Step 5 :	72 °C	5 分	

#### < Carraway et al.(1997)のプライマー >

[CRY-44、CRY-373] は *C. parvum* のポリスレオニン遺伝子内の 518bp を増幅する<sup>17)</sup>。*Rsa* I -RFLP により分離株はヒト型、ウシ型、*meleagridis* 型に分けることができる。ページ 26 の図 1 に例を示した。

#### < プライマー >

**CRY-44** 5' - CTC TTA ATC CAA TCA TTA CAA C-3'  
**CRY-373** 5' - AGC AGC AAG ATA TGA TAC CG-3'

#### 温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分	
Step 2 :	94 °C	30 秒	} Step 2~4 を 40 回反復
Step 3 :	53 °C	1 分	
Step 4 :	72 °C	30 秒	
Step 5 :	72 °C	5 分	

#### < Spano et al.(1998)のプライマー >

[Cp.E、Cp.Z] は *C. parvum* の Thrombosporidin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1) 遺伝子内約 1,200bp を増幅する<sup>18)</sup>。*Rsa* I -RFLP により分離株はヒト型と動物型に分けることができる。

#### < プライマー >

**Cp.E:** 5' -GGA TGG GTA TCA GGT AAT AAG AA-3'  
**Cp.Z:** 5' -CAA CTA GCC CAG TTC TGA CTC TCT GG-3'

#### 温度条件

Step 1 :	94 °C	3 分	
Step 2 :	94 °C	50 秒	}

Step 3 :	55 °C	30 秒	} Step 2~4 を 35 回反復
Step 4 :	72 °C	60 秒	
Step 5 :	72 °C	10 分	

### <市販製品等>

環境試験用のリアルタイム PCR 試薬、LAMP 試薬が販売されており、これらは rRNA 分子の逆転写により、1 個未満に相当するクリプトスポリジウムの鑄型量から、高感度な検出が可能となっている。糞便試料への適否については不明であるが、キットに付属の陽性対照が使用可能であること、性能が製造元により管理されていること、PCR 産物の塩基配列決定を委託することで検査環境の汚染が防止できる利点がある。

## 2. 単個のオーシストを用いた PCR

単個のオーシストの PCR は蛍光抗体で染色された疑わしい粒子の確定、また、複数の種または株による重複感染の可能性を判断するうえで有効な手段である。オーシストの単離は micro-manipulation 法 (手製の  $\leq 20 \mu\text{m}$   $\phi$  程度の先細ピペットを用いて顕微鏡下でオーシストを釣る)、あるいは限界希釈法が用いられる。精製 DNA を用いた PCR と異なる点は、界面活性剤による DNA 抽出と PCR による増幅を同一チューブ内で行うことである。ここでは、Johnson のプライマーを用いたリボソーム RNA 遺伝子領域を増幅する例を示す。

### <反応液の組成>

	A 液	B 液
精製水	15.5 $\mu\text{l}$	11.0 $\mu\text{l}$
10 × Taq用 buffer	2.5 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$
10% Triton X-100	5.0 $\mu\text{l}$	—
dNTPs	—	4.0 $\mu\text{l}$
20 $\mu\text{M}$ primer	—	2.5 $\mu\text{l}$ ×2
TaqDNA polymerase	—	0.25 $\mu\text{l}$
抗Taq抗体	—	0.25 $\mu\text{l}$
50mM MgCl <sub>2</sub>	—	2.0 $\mu\text{l}$
単離オーシスト	2.0 $\mu\text{l}$	—
計	25.0 $\mu\text{l}$	25.0 $\mu\text{l}$

### <手 順>

1. オーシスト浮遊液(低濃度に調整)を 60mm 径シャーレに入れる。
2. キャピラリーガラスピペットを加工して micro-manipulation 法によりオーシストを単離・吸引する。
3. 別のシャーレを用意し、その水の中にキャピラリーの内容を吹き出し、オーシストであることと単個であることを確認する。
4. あらためてオーシストを micro-manipulation により回収し、PCR 用チューブに移す。
5. A 液を入れ、軽く遠心し、ミネラルオイルを 1 滴加える<sup>注1</sup>。
6. -80℃と室温の間で凍結融解を 3 回繰返す。
7. サーマルサイクラー、ヒートブロックなどを用いて 15 分間、100℃の加熱処理をする。
8. 室温で 5 分間冷却した後、遠心する<sup>注2</sup>。
9. B 液を加え軽く遠心する。PCR チューブごとにピペットチップは交換する。オイル上に水分が残っていないことを確認する。
10. チューブをサーマルサイクラーにセットする。
11. 以下の温度プログラムで PCR 反応を行う。

Step 1 :	98 °C	5 分	}	Step 2~4 を 40 回反復
Step 2 :	94 °C	30 秒	}	
Step 3 :	55 °C	30 秒	}	
Step 4 :	72 °C	1 分	}	
Step 5 :	72 °C	7 分	}	

12. 生成産物を 2%アガロースで電気泳動、EtBr で染色し、DNA 増幅を確認する。

注1 オイルを重層することで、加熱による気化を防止することができる。25μl の抽出用溶液が少量でも気化して液量が減少すれば、バッファーとしてのイオン濃度が高まり、DNA ポリメラーゼの活性に影響を与える。

注2 オイルでシールされてはいるが、チューブ内は抽出された DNA が充満しており、極めて汚染しやすい状況になっていると考えて取り扱う。加熱されたチューブを冷却し遠心することで DNA との接触を最小限にする。

<単離用マイクロキャピラリーの作り方>

1. 市販の 10 $\mu$ l 用のガラス製キャピラリーピペットを用意する。
2. 両手の親指と人指し指で両端をつまみ、キャピラリーピペットを回転させながら中央部を幅 2cm くらいにわたって加熱する。
3. 自然に折れ曲る程度に柔らかくなったら、炎から離すと同時に両端を 10cm ほど引き伸ばす。この時、引き伸ばされたキャピラリーピペットの先に 120° 程度の角度がつくように両手首を外側に開くように引くとよい。また、キャピラリーピペットを引きちぎることなく、細い管（マイクロキャピラリー）が形成されるようにすることが重要である。
4. 引き伸ばされ細くなったキャピラリーピペットの中央部付近を、手で折る。
5. マイクロキャピラリーの先端部分は、角度のついた部分から先端までが 2～3cm となるように調整する。
6. 吸引用チューブにマイクロキャピラリーを差込み、水中で空気を噴き出す。微小な気泡が連続して出てくるものを選択し、使用する。



## 《 ジアルジア の遺伝子型別を目的とした PCR 》

*Giardia* はヒト以外の他の哺乳類、鳥類、両生類にも見られ、由来宿主、トロフォゾイトとシストの形態学的差異から、これまでに 6 種類が確定種として知られている(*G. muris*、げっ歯類;*G. microti*、マスカラット、野ネズミ;*G. agilis*、両生類;*G. ardeae*、サギなど鳥類;*G. psittaci*、インコなど鳥類;*G. duodenalis*、ヒト、家畜、野生哺乳動物)<sup>19, 20)</sup>(表 1)。その中の *G. duodenalis* (*G. lamblia*、*G. intestinalis* はシノニム)はヒトに寄生する種として認識されており、臨床由来株や動物由来株の遺伝子解析から現在までに少なくとも 8 つの遺伝子型 (assemblages A-H) に分類されている<sup>19, 20)</sup>。すなわち、assemblages C と D はイヌに寄生し、E は反芻動物、ブタ、F はネコ、G はマウス、ラット、H はハイイロアザラシに寄生する宿主特異的な遺伝子型である(表 1)。

表 ジアルジアの種類と遺伝子型

種名・遺伝子型名	宿主
<i>G. agilis</i>	両生類
<i>G. ardeae</i>	鳥類
<i>G. microti</i>	マスカラット、野ネズミ
<i>G. muris</i>	げっ歯類
<i>G. psittaci</i>	鳥類
<i>G. duodenalis</i>	
Assemblage A ( <i>G. duodenalis</i> )*	ヒト、霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ、フェレット、有袋類、げっ歯類、野生哺乳動物
Assemblage B ( <i>G. enterica</i> )*	ヒト、霊長類、イヌ、ウマ、ウシ、ビーバー、マスカラット、ウサギ
Assemblage C ( <i>G. canis</i> )*	イヌ、野生イヌ科動物
Assemblage D ( <i>G. canis</i> )*	イヌ、野生イヌ科動物
Assemblage E ( <i>G. bovis</i> )*	反芻動物、ブタ
Assemblage F ( <i>G. cati</i> )*	ネコ
Assemblage G ( <i>G. simondi</i> )*	マウス、ラット
Assemblage H	アザラシ

\*:最近提唱されている種名

ヒトには A と B が見られ、A にはヒトと他の哺乳動物から検出される AI と主に

ヒトから検出される AII、有蹄動物(ウシ、ネコ、シカなど有蹄動物)とヒト(症例は少ない)に見られる AIII の 3 つのサブタイプが知られている。また B には人獣共通寄生性と考えられる BIII、主にヒトから検出される BIV の 2 つのサブタイプがある。ヒトと他の哺乳動物から検出される *G. duodenalis* はその形態学的特徴では区別できないため、感染経路、感染源、事例間の因果関係などを調査する際に、分離株の遺伝子型別は必要不可欠である。*G. duodenalis* を遺伝子型別する簡便な方法として PCR 産物の制限酵素切断パターン(PCR-RFLP)も利用されているが、それらは少数の遺伝子領域についてのみ行われ、さらに多くの遺伝子型でのパターンは明らかではない。また *G. duodenalis* は遺伝的に多様であるため、異なる遺伝子型が同じ RFLP パターンを示すこともある。このことから現在 *G. duodenalis* の遺伝子型別は、複数の遺伝子領域をターゲットとした分子系統樹解析などで試みられている<sup>20)</sup>。

#### <手順>

クリプトスポリジウムの種同定を目的とした PCR(27 頁)を参照。

#### <Homan et al.(1998)のプライマー>

[GDH1、GDH4]はジアルジアの Glutamate dehydrogenase(GDH)遺伝子内 768bp を増幅する<sup>21)</sup>。Dde I -RFLP により分離株は 2 つの genotype ( Polish type および Belgian type )に分けることができる。GDH、 $\beta$ -giardin、TPI の PCR 泳動像を図 8 に示した。どの PCR でも非特異な増幅を認めることがあり、シーケンス反応を行うためには特異産物の切り出し精製が必要である。

#### <プライマー>

**GDH1: 5'-ATC TTC GAG AGG ATG CTT GAG-3'**

**GDH4: 5'-AGT ACG CGA CGC TGG GAT ACT-3'**

#### <反応液の組成>

	First PCR	Second PCR
精製水	28.75 $\mu$ l	29.75 $\mu$ l
10X Ex Taq Buffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

dNTP Mixture (2.5mM each)	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Forward primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Reverse primer (5 $\mu$ M)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
反応液総量	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

GDH は First PCR のみ行い、後述の $\beta$ -giardin、TPI では Nested-PCRを行う。Second PCR のテンプレートは First PCR 産物を使用する

<温度条件>

95°C5分, 94°C30秒→55°C30秒→72°C1分を 35 サイクル, 72°C7分

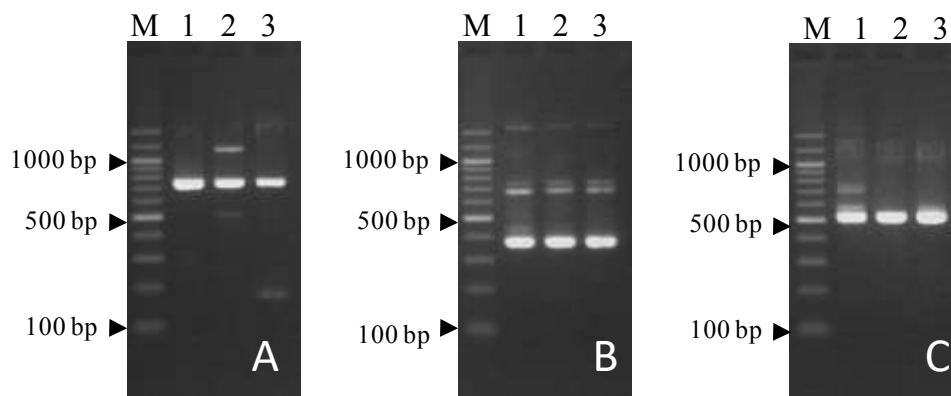


図 8 : GDH、 $\beta$ -giardin、TPI の PCR 電気泳動像。GDH では約 760-bp (A)、 $\beta$ -giardin では約 380-bp (B)、TPI では約 530-bp (C) の産物が増幅される。レーン 1~3、*G. duodenalis* ヒト由来株；レーン M、サイズマーカー (100-bp ラダー)

電気泳動後に非特異な増幅産物を認める場合は、特異サイズの産物を切り出し精製する。精製後の PCR 産物の塩基配列を決定する。解読されたシーケンスの波形を Sequencher などのソフトで確認し、さらに DNA databank (DDBJ/GenBank/EMBL) に登録されている代表的な *G. duodenalis* 各遺伝子型のデータと比較して系統樹解析に用いるシーケンスの範囲を決める。検体シ

一ケンスと *G. duodenalis* 各遺伝子型のシーケンスを Fasta 形式または clustal 形式に保存し、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) が提供する ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) 等を利用し、アライメントと系統樹を作成する(図 9)。分離株の遺伝子型 (assemblage レベル) を同定する場合は、今回示した遺伝子領域のどれか 1 つを解析すれば可能であるが、感染源や感染経路、事例間の因果関係を調査する際には疫学情報の分析も必要であり、さらに *G. duodenalis* は遺伝的にとても多様 (特に assemblage B) であるため、1 つの遺伝子領域の部分シーケンスが完全に一致したとしても他の領域のシーケンスは異なる場合があることから、変異が多いとされる GDH、 $\beta$ -giardin、TPI など複数の領域のシーケンスを比較した方が良い。

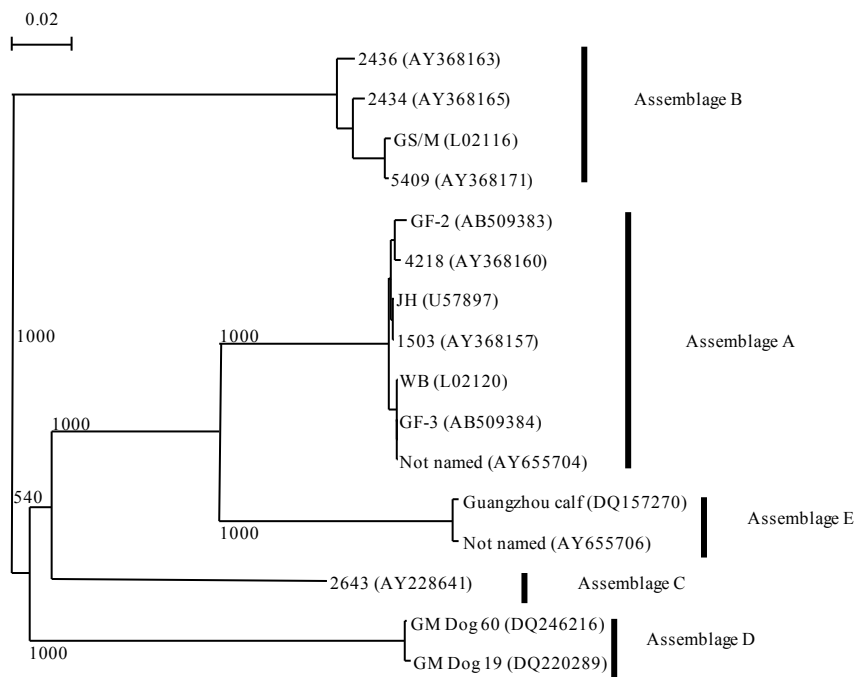


図 9 : PCR で増幅された TPI の部分シーケンス (512-bp) のデータを基に構築された、分子系統樹の例

< Homan et al. (1998) のプライマー [P1F, P3R] [B1F, B3R] >

Homan ら(1998)のプライマー[P1F, P3R] および[B1F, B3R]はそれぞれ Polish type 株 および Belgian type 株の Glutamate dehydrogenase 遺伝子内 800bp および 1500bp を増幅する<sup>21)</sup>。Dde I -RFLP により各 genotype をいくつかの subtype に分けることができる。

< プライマー >

**P1F: 5'-CTG CAG GGG CAA GGC GTA GAT-3'**

**P3R: 5'-CCA CCG TGC CAG TCT TCT GGG-3'**

温度条件

Step 1 :	94 °C	7 分	}	Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	55 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	2 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

< プライマー >

**B1F: 5'-CTG CAG TAA CAC TGG CAA G-3'**

**B3R: 5'-CTG CAG AGT TCT CCG CAG CG-3'**

温度条件

Step 1 :	94 °C	7 分	}	Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分		
Step 3 :	55 °C	1 分		
Step 4 :	72 °C	1 分		
Step 5 :	72 °C	7 分		

< Caccio et al, (2002) のプライマー >

$\beta$ -giardin を増幅する。反応液の組成は GDH (Homan et al. (1998)) と同じで、first PCR で 753bp、second PCR で 385bp の増幅産物が得られる<sup>22)</sup>。

< プライマー >

**First PCR**

**G7(forward):5'-AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC-3'**

**G759(reverse):5'-GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC-3'**

**Secound PCR**

**G376 (forward):5'-CAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AA-3'**

**G759 (reverse):5'-GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC-3'**

<温度条件>

**95°C5分, 94°C30秒→65°C30秒→72°C1分を30サイクル, 72°C7分**

<Sulaiman et al, (2003)のプライマー>

TPIを増幅する。反応液の組成はGDH(Homan et al.(1998))と同じで、first PCRで605bp、secound PCRで530bpの増幅産物が得られる<sup>23)</sup>。

<プライマー>

**First PCR**

**AL3543 (forward):5'-AAA TIA TGC CTG CTC GTC G-3'**

**AL3546 (reverse):5'-CAA ACC TTI TCC GCA AAC C-3'**

**Secound PCR**

**AL3544 (forward):5'-CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT-3'**

**AL3545 (reverse):5'-GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC-3'**

<温度条件>

**95°C5分, 94°C30秒→50°C30秒→72°C1分を35サイクル, 72°C7分**

<Hopkins et al, (1997)のプライマー>

SSU rDNAを増幅し、292bpの産物が得られる<sup>24)</sup>。反応液は、高GC用バッファーを使用するか、終濃度5%でDMSOを添加しなければ産物が得られない。

<プライマー>

**RH11 (forward):5'-CAT CCG GTC GAT CCT GCC-3'**

**RH4 (reverse):5'-AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G-3'**

＜温度条件＞

**96℃2分, 96℃20秒→59℃30秒→72℃30秒を40サイクル, 72℃7分**

＜Read et al, (2002)のプライマー＞

SSU rDNAを増幅し、174bpの産物が得られる<sup>25)</sup>。反応液は、高GC用バッファーを使用するか、終濃度5%でDMSOを添加しなければ産物が得られない。

＜プライマー＞

**GiarF (forward):5'-GAC GCT CTC CCC AAG GAC-3'**

**GiarR (reverse):5'-CTG CGT CAC GCT GCT CG-3'**

＜温度条件＞

**96℃2分, 96℃20秒→55℃30秒→72℃30秒を35サイクル, 72℃7分**

＜市販製品等＞

環境試験用のリアルタイムPCR試薬、LAMP試薬がクリプトスポリジウムと同様に販売されており、1個未満に相当するジアルジアの鋳型量から、高感度な検出が可能となっている。糞便試料への適否については不明であるが、キットに付属の陽性対照が使用可能であること、性能が製造元により管理されていること、PCR産物の塩基配列決定を委託することで検査環境の汚染が防止できる利点がある。

## 《 サイクロスポラの検出・同定を目的とした PCR 》

*Cyclospora cayetanensis* は 食品由来感染症の病原体として知られる。大きさ 8-10 $\mu$ m、ほぼ真球型で自家蛍光をもつ。迅速確定診断には自家蛍光観察と合わせ、PCR による同定が可能となった。

### <手順>

クリプトスポリジウムの種同定を目的とした PCR(27 頁)を参照。

### < Relman et al.(1996)のプライマー >

[F1E、R2B]および[F3E、R4B]は small subunit リボソーム RNA 遺伝子領域を対象に nested PCR を行う目的で設計されている<sup>26)</sup>。[F1E、R2B]は約 600bp を増幅し、[F3E、R4B]はその内側約 300bp を増幅する。オーシストが多数精製された場合は、[F1E、R2B]を用いた PCR で結果が得られる。

### <プライマー>

**F1E :5'-GGA ATT CCT ACC CAA TGA AAA CAG TTT-3'**

**R2B :5'-CGG GAT CCA GGA GAA GCC AAG GTA GG-3'**

### 温度条件

Step 1 :	95 °C	3 分	} Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分	
Step 3 :	50 °C	1 分	
Step 4 :	72 °C	2 分	
Step 5 :	72 °C	7 分	

### <プライマー>

**F3E: 5'-GGA ATT CCT TCC GCG CTT CGC TGC GT-3'**

**R4B: 5'-CGG GAT CCC GTC TTC AAA CCC CCT ACT G-3'**

### 温度条件

Step 1 :	95 °C	3 分	} Step 2~4 を 30 回反復
Step 2 :	94 °C	1 分	
Step 3 :	60 °C	1 分	
Step 4 :	72 °C	2 分	
Step 5 :	72 °C	7 分	



## IV 免疫学的検査法

ELISA 法、イムノクロマト法等の免疫学的検査法は、すでに各種の病原体検査に用いられている。原虫類の検査においても同様で、前述の蛍光抗体染色も免疫学的検査法の一つと言える。なお、本マニュアルでは、顕微鏡観察による形態の確認を基本にしているので蛍光抗体染色の詳細は、II 形態学的診断法において紹介している。

クリプトスポリジウム、ジアルジアの検査を目的とした ELISA 法、イムノクロマト法は、複数の製品が海外で発売され、報告も複数なされており、所定の性能が得られると考えられる<sup>27)</sup>。他に原虫では赤痢アメーバの検出にも使用される。ELISA 法は検査センターにおけるスクリーニング、イムノクロマト法は臨床における迅速診断に有用と考えられる。一方、使用期限を考えると試薬の常備を避けたり、少数の検査や原虫の網羅的検査には経済性に難が生じたりすることから、本マニュアルでは紹介に留める。蛍光抗体法は、水道クリプトスポリジウム等検査を目的に、試薬の保有と使用の頻度が高いと考えられ、少数の検査にも対応できる。

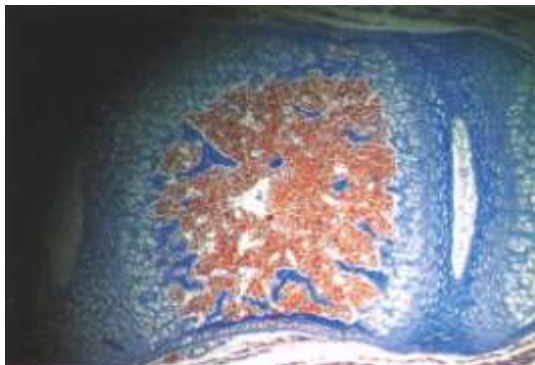
## 引用文献

- (1) 八木田健司、泉山信司、国内外におけるクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の発生動向の現状と比較、第 68 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2008 年 10 月 4 日浜松市
- (2) 山本徳栄, 砂押克彦, 山口正則, 他. クリプトスポリジウム症患者におけるオーシスト排出数の推移と排出期間. *Clin Parasitol* 16: 53-57, 2005.
- (3) 井関基弘. 新しい腸管寄生原虫の検査. *検査と技術* 25: 335-341, 1997.
- (4) Inomata, A., Kishida, N., Momoda, T., Akiba, M., Izumiyama, S., Yagita, K. and Endo, T. Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples, *Water Science and Technology*, 60 (8), 2167-2172, 2009.
- (5) Yagita K, Izumiyama S, Tachibana H, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol Res* 87: 950-955, 2001.
- (6) Spano F, Putignani L, McLauchlin J, et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 150: 209-217, 1997.
- (7) Xiao L, Limor J, Morgan UM, et al. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl Environ Microbiol* 66: 5499-5502, 2000.
- (8) Xiao L, Morgan UM, Limor J, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65: 3386-3391, 1999.
- (9) Peng MM, Matos O, Gatei W, et al. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *J Eukaryot Microbiol* 2001 (Suppl.): 28S-31S, 2001.

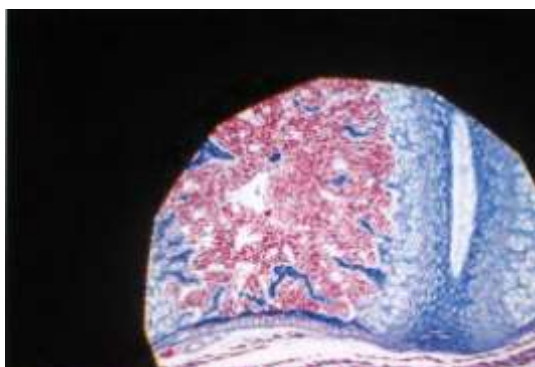
- (10) Peng MM, Wilson ML, Holland RE, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol Res* 90: 175-180, 2003.
- (11) Zhou L, Singh A, Jiang J, et al. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: Implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J Clin Microbiol* 41: 5254-5257, 2003.
- (12) Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol* 43: 2805-2809, 2005.
- (13) Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol* 165: 187-199, 2009.
- (14) Glaberman S, Sulaiman IM, Bern C, et al. A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. *J Eukaryot Microbiol* 2001 (Suppl): 19S-22S, 2001.
- (15) Johnson, D. W., N. J. Pieniazek, D. W. Griffin, L. Misenerand, and J. B. Rose. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3849-3855.
- (16) Awad-El-Kariem, F. M., D. C. Warhurst, and V. McDonald. 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitol.* 109:19-22.
- (17) Carraway, M., S. Tzipori, and G. Widmer. 1997. A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts. *Infec. Immun.* 65:3958-3960.
- (18) Spano, F, L. Putignani, S. Guida, and A. Crisanti. 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (Thrombosporidin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium* -1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp. Parasitol.*

- 90:195-198.
- (19) Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health 213: 321-333, 2010.
  - (20) Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev 24: 110-140, 2011.
  - (21) Homan WL, Gilsing M, Bentala H, et al. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. Parasitol Res 84: 707-714, 1998.
  - (22) Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol 32: 1023-1030, 2002.
  - (23) Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis 9: 1444-1452, 2003.
  - (24) Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. J Parasitol. 1997 Feb;83(1):44-51.
  - (25) Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Parasitol. 2002 Feb;32(2):229-31.
  - (26) Relman, D. A., T. M. Schmidt, A. Gajadhar, M. Sogin, J. Cross, K. Yoder, O. Sethabutr, and P. Echeverria. 1996. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. J. Infec. Dis. 173:440-445.
  - (27) 小林正規、鈴木淳、竹内勤、化学療法領域、腸管感染症の全て、III 寄生虫・ウイルスを原因とする腸管感染症 3.腸管原虫症の迅速診断、2007、Vol.23, S-1, 141-147

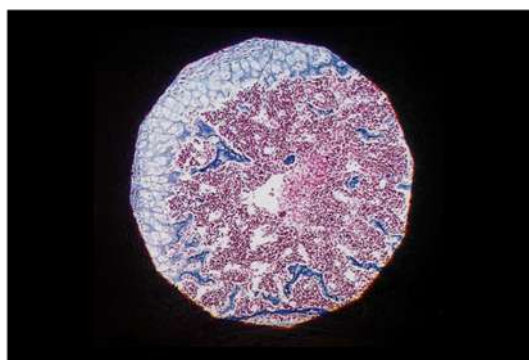
<参考資料>



1. 標本にフォーカスを合わせる



2. 視野制限絞りを絞ったら、コンデンサーの上下方向を合わせると、絞りの縁が明瞭に見えるようになり、コンデンサー高さの調整ができた（そのフォーカスに適したコンデンサーの位置に調整した）



3. コンデンサーの中央を合わせた（芯出し）

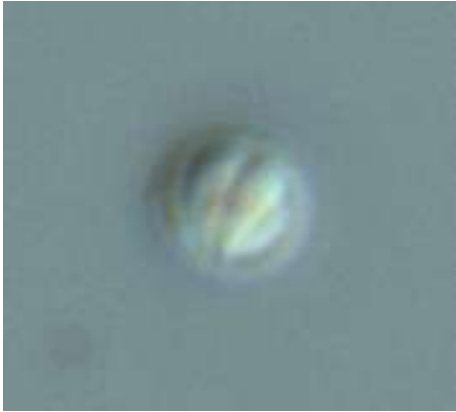


手で操作しているコンデンサーの  
芯出し用の調整ネジ  
後ろに高さ調整の黒のノブ（←）

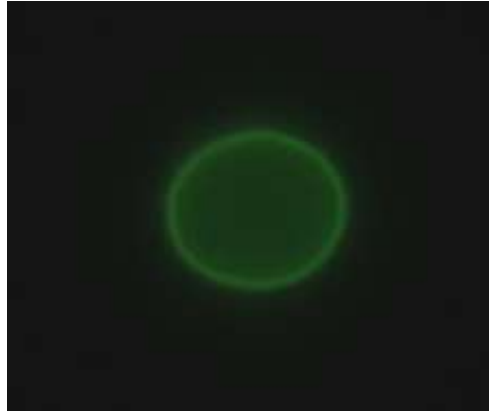
参考資料 1 ケーラー照明の操作

顕微鏡観察の基礎知識、H.G.カピッツァ、Carl Zeiss、1994より抜粋

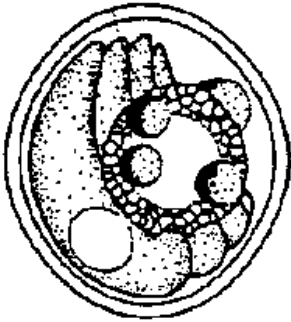
A) オーシスト微分干涉像



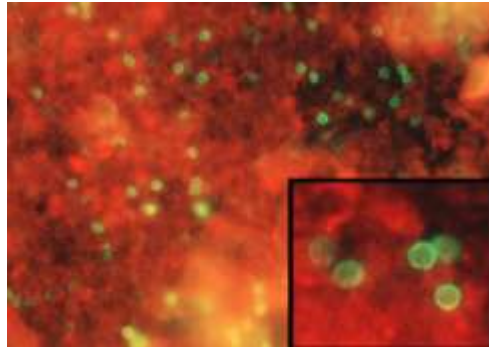
B) オーシスト蛍光像



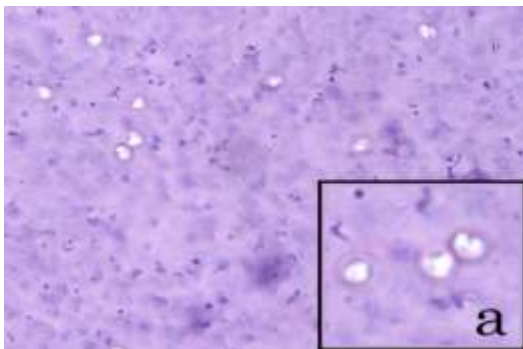
C) オーシスト模式図



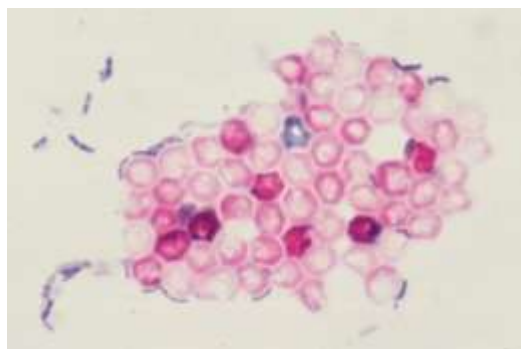
D) オーシスト蛍光像(対比染色)



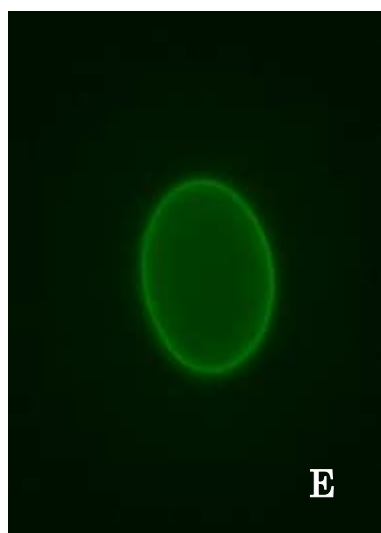
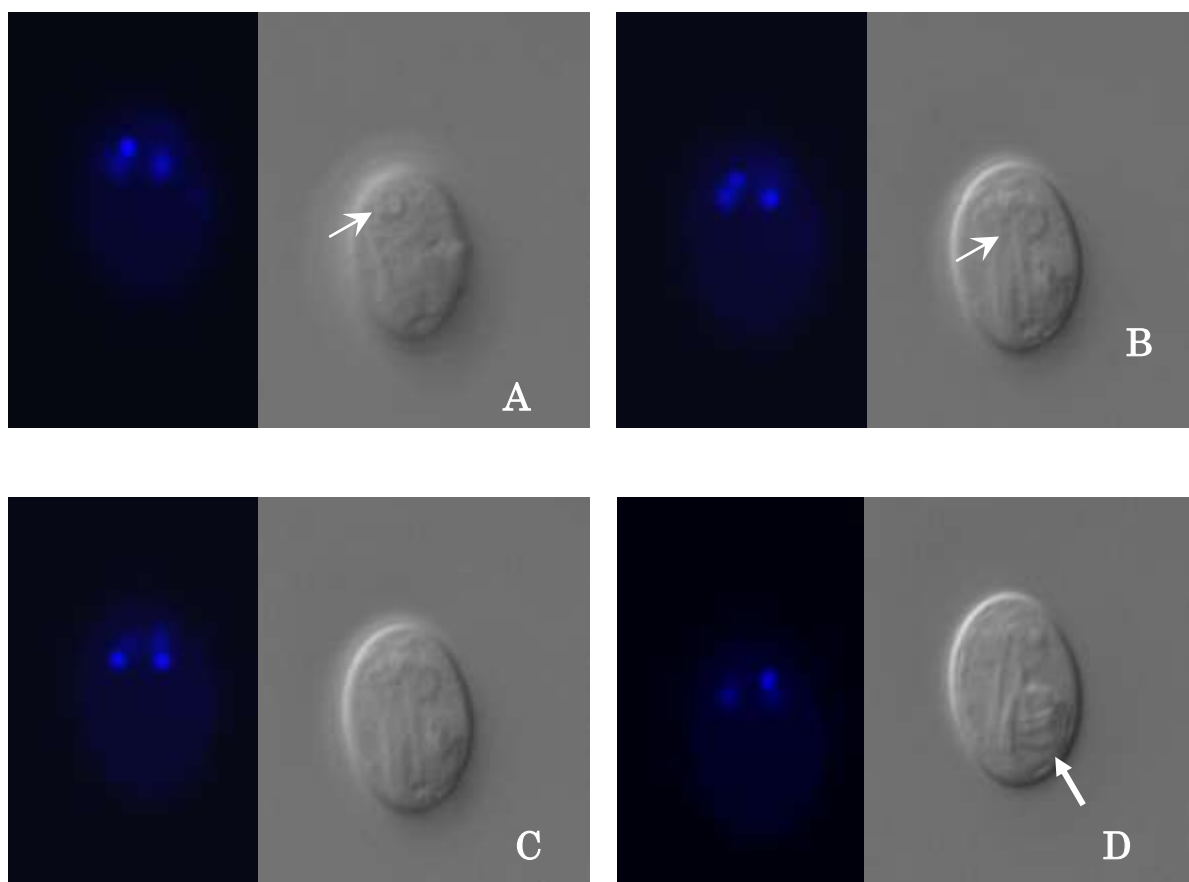
E) ネガティブ染色



F) 抗酸染色

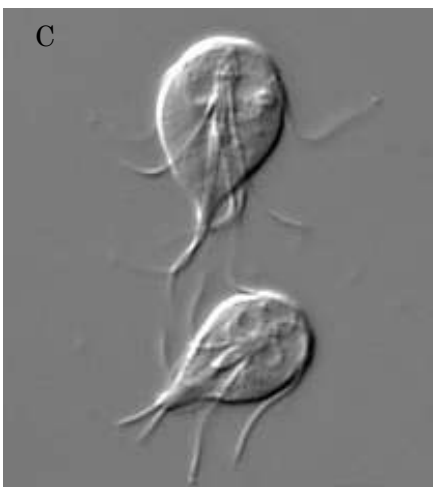
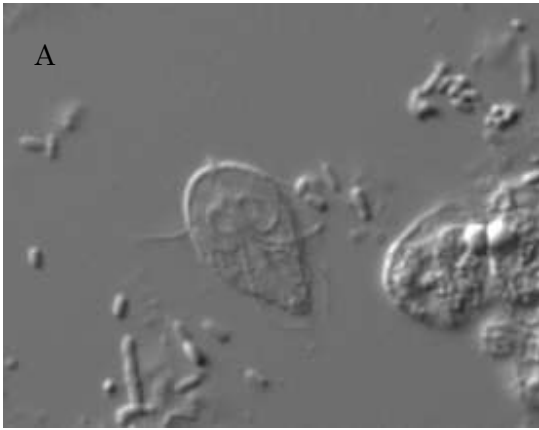


参考資料 2 各種クリプトスポリジウムオーシスト像



参考資料 3 ジアルジア顕微鏡像

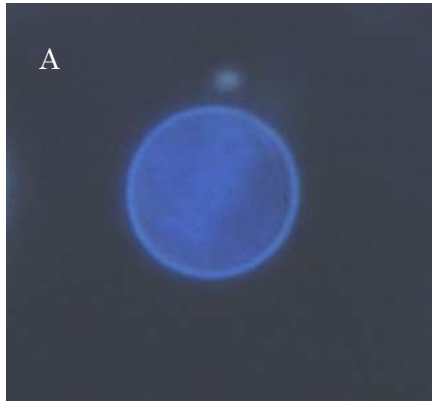
- A) 左側 DAPI 染色像で 1 個の核が良く見えて、右側微分干渉像ではその核 (→) が 1 個見える
- B) フォーカスを変えると DAPI 染色像では 3 核が見える一方、微分干渉像では最初の A での核は見えなくなり、別の 1 つがはっきり見えるようになった。軸糸 (→) が中央縦方向に走るのが見え始めた
- C) さらにフォーカスを変えると、DAPI 染色像では 2 核が良く見える
- D) さらにフォーカスを変えると、DAPI 染色像では今までよく見えなかった 4 つ目の核が見えるようになり、微分干渉像では曲刺 (→) が良く見える
- E) FITC 蛍光像



参考資料 4 ジアルジア栄養体

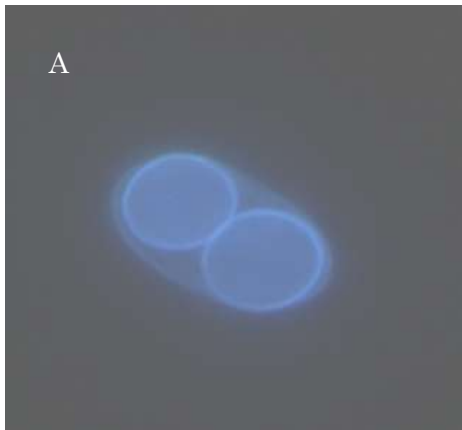
A) 下痢便中に検出されたジアルジア栄養体、B) 同じく栄養体と、形成途中のシスト (→)、C) 培地で培養した栄養体 (ここまで無染色の微分干渉像)、E) 培養した栄養体のギムザ染色像 (明視野観察)





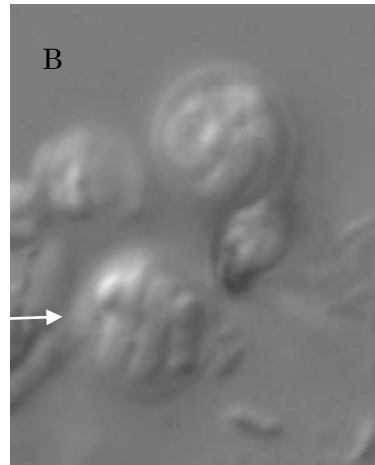
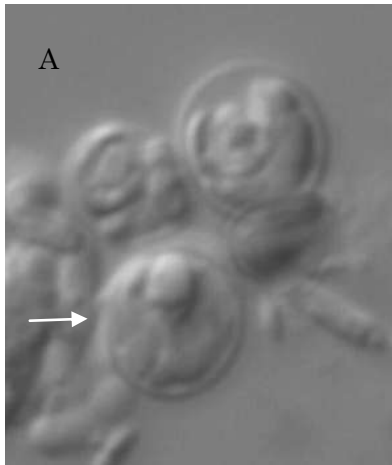
参考資料 5 *Cyclospora cayetanensis* のオーシスト

- A) UV 励起蛍光像、無染色でオーシスト壁がネオン青の自家蛍光を発する
- B) 微分干渉像 (8~10 $\mu\text{m}$ )



参考資料 6 *Isospora belli* のオーシスト

- A) UV 励起蛍光像、オーシスト壁及びスポロシスト壁が無染色でネオン青の自家蛍光を発する
- B) 微分干渉像 (10~19 $\times$ 20~23 $\mu\text{m}$ )



参考資料 7 クリプトスポリジウムオーシストのフォーカス面の微調整

- A) オーシストは立体物なので向きによっては内部構造の見やすさが異なり、オーシストの中心にフォーカスが合うとスポロゾイトが見えづらい (→)
- B) オーシスト上部にフォーカスがあると、特徴的なスポロゾイトが見える (→)



参考資料 8 開口絞りの調整 (ジアルジア例)

- A) 開口絞りを絞って被写界深度が深いと、シスト内の構造が重なりあった解像度の低い像になり、内容が不明瞭
- B) 開口絞りを開けて被写界深度が浅いと、フォーカス面の狭い範囲のみ観察可能となり、解像度の高い微細構造が鮮明な像が得られる



参考資料 9 赤色自家蛍光の例

G 励起で赤く光る粒子の蛍光像

## 執筆者一覧

- 阿部仁一郎 : 大阪市立環境科学研究所微生物保健担当  
吉田 永祥 : 堺市衛生研究所ウイルス検査担当  
鈴木 淳 : 東京都健康安全研究センター  
黒木 俊郎 : 神奈川県衛生研究所企画情報部  
八木田健司 : 国立感染症研究所寄生動物部  
泉山 信司 : 国立感染症研究所寄生動物部