

厚生科学研究補助金（水道水の安全性の確保に関する研究事業）

（総括）研究報告書

クリプトスポリジウムの遺伝子指紋ライブラリー
の作製

（主任研究者 高橋優三 岐阜大学医学部 教授）

平成 11 年 3 月

厚生科学研究補助金（水道水の安全性の確保に関する研究事業）

（総括）研究報告書

クリプトスポリジウムの遺伝子指紋ライブラリーの作製

（主任研究者 高橋優三 岐阜大学医学部 教授）

研究要旨

クリプトスポリジウムの遺伝子指紋ライブラリーを作製ならびに、遺伝子指紋に使える標的遺伝子を増幅するための PCR 用プライマーを設計した。標的遺伝子として選んだのは、反復配列遺伝子である。その結果、特異性に優れ最高の感度を持つクリプトスポリジウム (*C. parvum*) 用の PCR プライマーが完成した。今後、水道の原水のクリプトスポリジウム混入検査、感染源の同定等に応用が可能である。

A. 研究目的

水道水等の飲料水の経口摂取により、腸管に感染し、免疫不全の患者に致死的な病害を与えるクリプトスポリジウムの感染源の推定を行うための基礎として遺伝子指紋ライブラリーを作製する。ならびに、遺伝子指

紋に使える標的遺伝子を増幅するための PCR 用プライマーを設計する。

B. 研究方法

日本各地よりクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum* と *C. muris*) の株を採取した。神戸では、神戸

大学の宇賀助教授の協力により子牛から3株を得た。大阪では大阪市立大学の井関助教授の協力により患者から4株を得た。岐阜では、畜産研究所の協力により子牛から3株を得た。ヨーロッパでは、イタリア最高衛生研究所のポジオ博士の協力により患者から3株を得た。

クリプトスポリジウムの遺伝子を純粹に取り出すためには、最初にクリプトスポリジウムのオーシストを、宿主細胞や腸内雑菌の混入を完全になくした状態で採取せねばならない。これにはかなりの技術的な工夫が必要であった。結局、蔗糖浮遊の後に immunobeads 法で分離精製するのが最適とされた。また、完成されたプライマー

を用いて PCR する場合のテンプレート遺伝子としては、オーシストをアルカリ処理の後に酸で中和するかまたは、熱処理後に蛋白分解酵素処理で十分に目的が達せられる事が判明した。

これらの株から通常の方法で遺伝子を取り出し、数種類の便宜的なプライマーを用いて AP-PCR 法により繰り返し配列遺伝子を増幅し、電気泳動のパターンより多型性と保存性のある領域を検索した。これにより日本とヨーロッパのクリプトスポリジウムの株に共通し、しかも多量に存在する遺伝子が検出できた。これを通常の方法で塩基配列を決定し、その中でプライマーとして最適と思われる部分の繰り返し配列遺伝子を利用して *C. parvum* と

C. muris を区別する PCR プライマーを複数合成する事ができた。

また上記の自家及び他家の PCR プライマーを複数選び、感度の高い RFLP 法、PCR-SSCP 法、AFLP 法などを用いて遺伝子の多型性の検出を試みた。

C. 結果

今回の研究での大きな成果は、上記の過程で非常に感度の高い *C. parvum* 用の PCR プライマーができた事である。その塩基配列は 5' CTCCGTTTCGATGATGCAGATG-3'、5CGGCCCTGTAGAAATAAGTCA-3' であり、増幅遺伝子は 433 bp である。

このプライマーの感度は、今まで報告されてきたいかなる *C. parvum* 用の PCR

プライマーより感度が高い。定量的実験によれば 1ヶのオーシストを 1回の PCR 反応と通常の電気泳動で検出できる。

C. parvum および *C. muris* の同じ種間での株による繰り返し配列遺伝子の多型性がわずかに存在するが、これを利用して株を区別する PCR プライマーについては、現在のところ、完成していない。そこで RFLP 法、PCR-SSCP 法、AFLP 法などを用いて感度の高い遺伝子の多型性検出を試みている。RFLP 法では、これに適した自家及び他家の PCR プライマーを複数選び、逐一検討中である。PCR-SSCP 法に関しては、上記の高感度 PCR プライマーによる増幅産物につき実験中である。AFLP 法は感度が高すぎ、

遺伝子指紋にあまりにも差があり実用的価値を、現在の段階では見いだしていない。

D. 考察

クリプトスポリジウムの感染は極少数の経口摂取によっても成立する事、ならびに水道の原水のように多量の検体から検出するため、クリプトスポリジウム原虫検出の目的には可及的に鋭敏な PCR プライマーが求められていた。*C. parvum* を検出する PCR プライマーはすでに多くの研究者によって発表されているにもかかわらず、検出感度に関しては改善の余地があった。今回の PCR プライマーは、1 回の反応で 1 ヶのクリプトスポリジウムのオーシスト

を検出できるものであり、これは文献で検索した限りでは、最高のレベルである。

E. 結論 = 特異性に優れ最高の感度を持つクリプトスポリジウム (*C. parvum*) 用の PCR プライマーが完成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Z. WU, I. NAGANO, E. POZIO and Y. TAKAHASHI
Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates.
Parasitology 118 211-218
1998

Hisao Yoshikawa, Isao Nagano, Zhiliang Wu, Eu hian Yap, Mulkit Singh, Yuzo Takahashi
Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers.
Molecular and Cellular Probes, 12 153-159 1998

Z. WU, I. NAGANO and Y. TAKAHASHI . The detection of *Trichinella* with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences

of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glycoproteins. *Parasitology* 117, 173-183 1998

Isao Nagano, Miyuki Kunishima, Yoshihiro Itoh, Zhiliang Wu, and Yuzo Takahashi. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, 42, 371-376, 1998

Z. WU, I. NAGANO, and Y. TAKAHASHI. Differences and similarities between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* in morphology of stichocyte granules, peptide maps of excretory and secretory (E-S) products and messenger RNA of stichosomal glycoproteins. *Parasitology* 116, 61-66, 1998

2. 学会発表

T. spiralis と *T. pseudospiralis* の差に関する研究 高橋優三, 吳志良, 長野功 第67回日本寄生虫学会総会 1998年4月 神戸市

Tutorial system as an educational method for parasitology Yuzo Takahashi 第67回日本寄生虫学会 1998年4月 神戸市

STAGE AND SPECIES SPECIFIC EPI TOPE INSIDE *TRICHINELLA*. Boireau P, Wu Z, Fabien JF, Liu Mingyuan, Soul C, Takahashi, Y 9th

International Conference on Parasitology 1998 August Chiba

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *TRICHINELLA* Wu Z, Nagano I and Takahashi Y 9th International Conference on Parasitology 1998 August Chiba

ミトコンドリアCOI遺伝子領域のPCR-RFLPによる旋毛虫種の同定 長野功・吳志良・高橋優三 第54回日本寄生虫学会西日本支部大会・第53回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会 1998年11月 米子市

旋毛虫のES抗原(43KD)が宿主ナース細胞核に存在する. 松尾篤 徐東 高橋優三 DD Despommier 第54回日本寄生虫学会西日本支部大会・第53回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会 1998年11月 米子市

IS THERE GENE FLOW IN *TRICHINELLA* ISOLATES: AN RFLP ANALYSIS Wu, Z, Nagano, I, Takahashi, Y. 第54回日本寄生虫学会西日本支部大会・第53回日本衛生動物学会西日本支部大会合同大会 1998年11月 米子市

旋毛虫の筋肉幼虫のcDNAライブラリー作成とその遺伝子産物に関する研究 高橋優三、長野功、吳志良 第39回日本熱帯医学会大会 1998年11月 沖縄市

Increased expression of myogenin in the muscle tissue infected with *T. spiralis* as revealed by quantitative RT-PCR Zhiliang Wu Isao Nagano

Yuzo Talahashi 第68回日本寄
生虫学会大会 1999 4月 栃木
県南河内町

Developmental
Characteristics of
Stichocytes of *Trichinella*.
Yuzo Talahashi, Atsushi
Matsuo, Xu Don, Zhiliang Wu,
Isao Nagano 第68回日本寄生虫
学会大会 1999 4月 栃木県南
河内町

旋毛虫のcDNAクローニングとそ
の発現蛋白の解析 Isao
Nagano, Zhiliang Wu, Yuzo
Takahashi 第68回日本寄生虫学
会大会 1999 4月 栃木県南河
内町

19980600

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Detection of verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction.

Nagano I, Kunishima M, Itoh Y, Wu Z, Takahashi Y.

Microbiol Immunol. 1998;42(5):371-6.

The detection of Trichinella with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glycoproteins.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y.

Parasitology. 1998 Aug;117 (Pt 2):173-83.

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of Trichinella isolates.

Wu Z, Nagano I, Pozio E, Takahashi Y.

Parasitology. 1999 Feb;118 (Pt 2):211-8.

A panel of antigens of muscle larvae of Trichinella spiralis and T. pseudospiralis as revealed by two-dimensional western blot and immunoelectron microscopy.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y.

Parasitology. 1999 Jun;118 (Pt 6):615-22

Stage-specific epitopes of Trichinella spiralis and Trichinella T5

P.Boireau, Z. WU, J.F.Fabien...

Monduzzi Editore S.p.A. Bologna(Italy)

Genomic polymorphism among Blastocystis hominis strains and development of subtype-specific diagnostic primers.

Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y.
Mol Cell Probes. 1998 Jun;12(3):153-9.

Immunocytochemical Analysis of Antigenic Substances in Trichinella pseudosprralis at the Muscle Stage

Dong XU.

Acta Sch Med Univ Gifu 47 P.11-18 1999