

DDW	34 $\mu$ l
10X Buffer	5 $\mu$ l
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ l
Primer (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
抽出 DNA	2 $\mu$ l

↓98℃, 10 分間置き直ちに on ice した

Taq 1.25 unit 加える

94℃, 3 分 1 回、94℃, 1 分、50℃, 1 分、

72℃, 2 分のサイクルを 40 回、72℃, 15 分を 1 回した後

4℃, hold

↓

アガロースゲル電気泳動

↓エチジウムブロマイド染色

写真撮影

## 2. マイクロトレイハイブリダイゼーション

プローブの作製はプローブ用の PCR (プライマー-set A では 284-325、プライマー-set B では 2327-2422) で増幅された PCR 産物を大腸菌に 0.8 から 1.5%アガロースゲルを用い目的とするバンドを切り出した。その操作法は以下の如く行った。

### 1) ゲルから DNA の抽出

ゲルからの DNA 抽出法は Gen Elute™ 分間 us EtBr Spin Columns を用いて行った。

すなわち、0.8%アガロースゲルを用い、PCR 産物を泳動し目的とするバンドを UV 照射下で切り出した。Spin Colum を 1.5ml のチューブに乗せ、それに 100  $\mu$  l の T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (pH8.0) を入れ、12,000 xg で 5 秒間遠心、チューブに溜まった液をすてた。Spin column に切り出したゲルを入れ、12,000 xg で 10 分間遠心し、Spin Column を取り除いた。チューブに溜まった液の中に抽出 DNA が含まれており、これをプローブ作製あるいはハイブリダイゼーションに用いた。

### 2) プローブの作製

Set A および B のプライマーを用いた PCR で増幅された DNA の遺伝子配列を決定できたものを用いた。Set A ではヒトおよびウシの *C. parvum* およびウシの *C. muris* を、set B ではウシの *C. parvum* を用いた。それぞれプローブ用プライマーを用いた PCR 法で行った。目的とするバンドを上記のゲルからの抽出法に従い DNA を抽出した。次に、抽出した DNA

(500ng/ml)を用いPCR法でプローブを作製した。

表2. プローブ作製用PCR調整

DDW		29 $\mu$ l
ビオチン-11-dUTP	(0.12mM)	2 $\mu$ l
dATP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
dCTP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
dGTP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
10X Buffer		5 $\mu$ l
Primer	(25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Primer	(25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
抽出DNA	(500ng)	4 $\mu$ l
Total		50 $\mu$ l

PCR条件は94°C 3分1回、94°C 1分、55°C 2分、74°C 3分を12回、74°C 10分1回、4°C保存で行った。PCR産物の精製は以下の様に行った。

### 3) プローブの精製

プローブの精製はPCR産物に2.5倍量のエタノールと1/10量の3M酢酸アンモニウムを加えた。-70°Cに30分置いた後、15,000 rpm、30分間遠心し液層を除いた。次いで70%アルコールを500  $\mu$  l入れ、15,000 rpm、30分間遠心し、液層を除き、乾燥させた。T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>を200  $\mu$  l加え、56°C 10分間置いた後、使用時まで-70°Cで保存した。これをプローブとして用いた。

### 4) マイクロプレートハイブリダイゼーション試験

抽出DNAを0.5mlのチューブに取り、1.5M NaCl buffer (3倍1.5M NaCl buffer:4.5M NaCl、30mMリン酸2ナトリウム、30mM EDTA、pH7.0)で500ng/ml程度の濃度に希釈し、98°C 5分間加熱処理後直ちにon iceした。マイクロトレイに固定化液(1.5M NaCl buffer)を85  $\mu$  l入れ、それに加熱処理したDNAを15  $\mu$  lずつ1検体当たり3ウエルに入れた。プレートにシールし、37°C恒温槽に重しをして沈めた。PBS-Tでプレートを3回洗浄後、プレートにハイブリ液(3倍1.5M NaCl buffer 1.35ml、DDW 1.26ml、ホルムアミド 4.5ml、10%Tween20 0.09ml)を各ウエルに80  $\mu$  lあて入れた。1検体当たりプローブコントロール、set Aプローブ、set Bプローブを各22  $\mu$  lずつ作製した。

図 2. トレイのレイアウト

		1	2	3	4	5	6	7
			N	P	検 体	検 体	検 体	検 体
			C	C	1	2	3	4
	A	○	○	○	○	○	○	○
プローブ対照	B	○	○	○	○	○	○	○
プローブA	C	○	○	○	○	○	○	○
プローブB	D	○	○	○	○	○	○	○

NC : 電気泳動の陰性コントロールのゲル、PC : 陽性コントロール

表 3. プローブの調整 (1 検体当たり)

T10E1	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l *
probe setA	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l
probe setB	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l

\* サケ DNA : DNA 量 10mg/ml のものを T10E1 で 100  $\mu$  g/ml に希釈し、それに 2 倍濃度の 1.5M NaCl buffer と混合した。

上記混合液 (プローブ) を 98°C、5 分間加熱処理、直ちに on ice し、プローブコントロール、set A プローブ、set B プローブをそれぞれの列に 10  $\mu$  l 入れ、42°C 恒温槽に重しをして沈め 1 夜置いた。シールを剥がし PBS-T で 3 回洗浄した。

ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-T で適宜希釈したもの) を全てのウエルに 100  $\mu$  l 入れ、室温 1 時間置き、プレートを PBS-T で 4 回洗浄した。

9) 全てのウエルに発色液 {TMB 1mg, DMSO 1ml, phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M dibasic sodium phosphate 25.7ml, 0.1M citric acid 24.3ml, 精製水 50ml, pH5.0), 30% H2O2 2  $\mu$  l} を 100  $\mu$  l 入れ、室温 15 分間置いた後、停止液 (4N H2SO4) を 50  $\mu$  l 入れ、15 分間遮光し、450nm で吸光度を測定した。

判定はコントロールに比べ OD 値が 2 倍以上、かつ 0.2 以上の差が認められた時に陽性とした。

### 3. 遺伝子配列の決定

分子疫学的解析はヒトからの 4 件、ウシ 5 件、ブタ 1 件およびマウスから 1 件、計 11

件のクリプトスポリジウムの 18S ribosomal RNA をコードしている gene の 106 番目から 478pb について遺伝子配列を ABI310 シークエンサーを用い、ダイターミナー法で遺伝子配列を決定し、UPGMA ソフトを用い系統樹を作製した。

## C. 研究結果

### 1). 加熱処理時間の検討

原虫の DNA は 2 本鎖で、PCR を行うには 1 本鎖にする必要がある。増幅する部分でループ等を作っていると PCR による増殖が悪いので、98℃による加熱時間を検討した。その成績は表 4 に示した。加熱時間は 10 分間が最も PCR による DNA の増幅が良く、以後の PCR ではこの時間での加熱処理をすることにした。

表 4. 加熱時間と PCR 産物量

時間	原液	1/10	1/100	1/1000
0 分間	+++	+	-	-
10 分間	+++	++	-	-
20 分間	+++	+	-	-
30 分間	++	+	-	-
60 分間	+	-	-	-

### 2) プライマーの検討

PCR に用いたプライマーは 18S ribosomal RNA をコードしている部分を中心に 3 組設定した。成績は図 3, 4 および 5 に示したとおりであった。

プライマー set A ではヒト、メンヨウ、ネズミからの *C. parvum* は全て検出された。しかしウシでは 16 例中 14 例 (88%)、ブタおよびネコは 1 例検出されなかった。ウシ、ネズミの *C. muris* は全て検出され、全体では 89%の検出率であった。

プライマー set B では *C. parvum* のヒト、メンヨウ、ネコ、ネズミは全て検出された。しかし、ウシは 81%、ブタは 80%で。ウシからの *C. muris* は全て検出されたが、ネズミの 1 例は検出されなかった。全体では 87%であった。Set A と B の両方で陰性は僅かに 1 例で、クリプトスポリジウムは 97%から検出された。

プライマー set C では *C. parvum* のメンヨウ、ネズミからの *C. parvum* は 100%の検出率であったが、その他は低率であった。

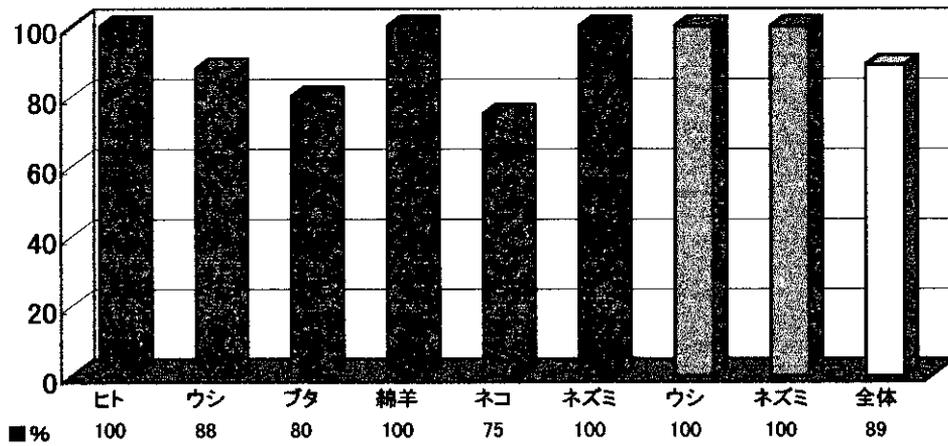


図3. プライマーセットAの検出率

■: *C. parvum*, ■: *C. muris*

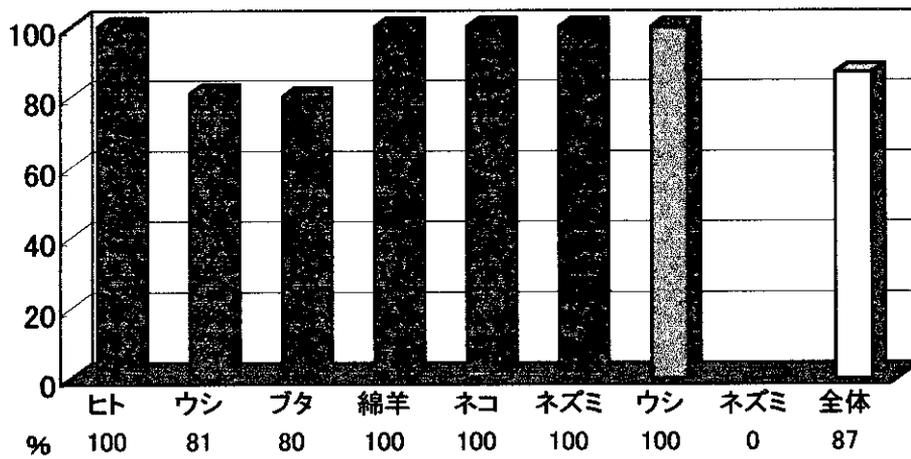


図4. プライマーセットBの検出率

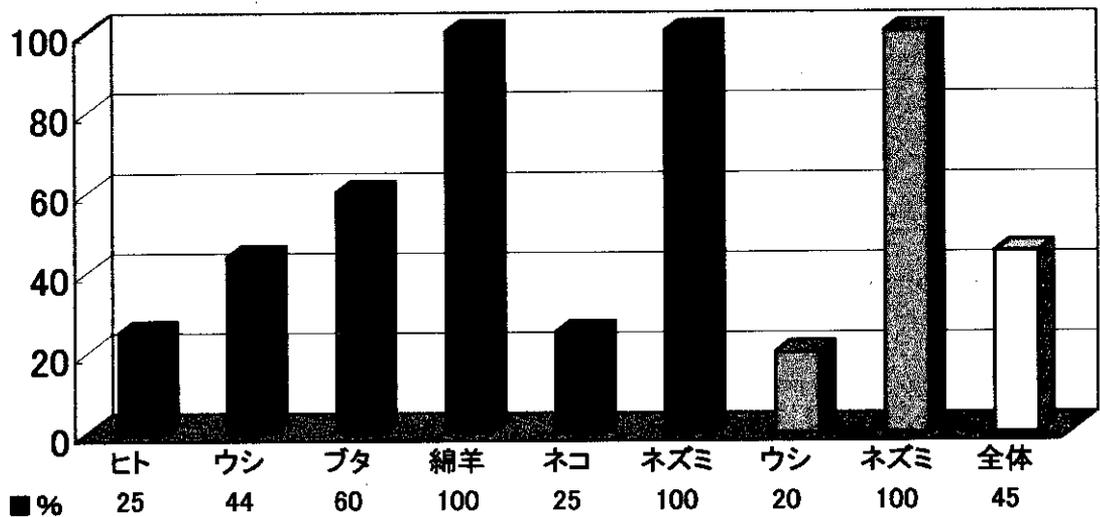


図5. セットCプライマーの検出率

### 3) ハイブリダイゼーション成績

PCRで増幅されたDNAが標的とするものであることの確認試験としてハイブリダイゼーションの開発を行った。プローブはset Aのプライマーの内側にプローブを、set Bでは同じ位置に設定した。Set AではヒトおよびウシからのC. parvumおよびウシのC. muris、set BではウシのC. parvumから作製した。

プライマーset Aを用いて増幅したものは全てset Aに対応するプローブ3種類のプローブと反応したが、set Bのプローブとは反応しなかった、逆にset BのPCR産物は全てset Bのプローブだけに反応した(表5)。

表5. ハイブリダイゼーション成績

PCR産物		setA産物	setB産物
プローブ			
setA	ヒト( <i>parvum</i> )	27/27	0/11
	ウシ( <i>parvum</i> )	27/27	0/11
	ウシ( <i>muris</i> )	27/27	0/11
setB	ウシ( <i>parvum</i> )	0/27	11/11

### 4) 遺伝子配列成績

ヒト4件、ウシ10件、ブタ1件、ネズミ1件からの18S rRNをコードしている部分の108から479bpを調べた系統樹を図6に示した。

大きくはネズミ/*C. parvum*, ウシ、2才(1998)/*C. muris*, その他の3つに分けられた。その他は小さくaとbに分けられ、ヒト/*C. parvum*/A県とS県が一つ(a)と、ヒト、ウシ、ブタの(b)と表しているものである。

図7には遺伝子配列をしめした。図6の(a)と(b)の間では2ヶ所の違いのみであった。(a)の配列を基にウシの*C. muris*を比較すると、20ヶ所異なっており、1個ドン*C. muris*の方が多い。

ネズミ/*C. parvum*:Tを同様に見ると11ヶ所の違いが認められた。

さらに、図にはプローブ set Aの部分を示している。この部位がクリプトスポリジウムによる配列の違いが殆ど見られない部分であった。

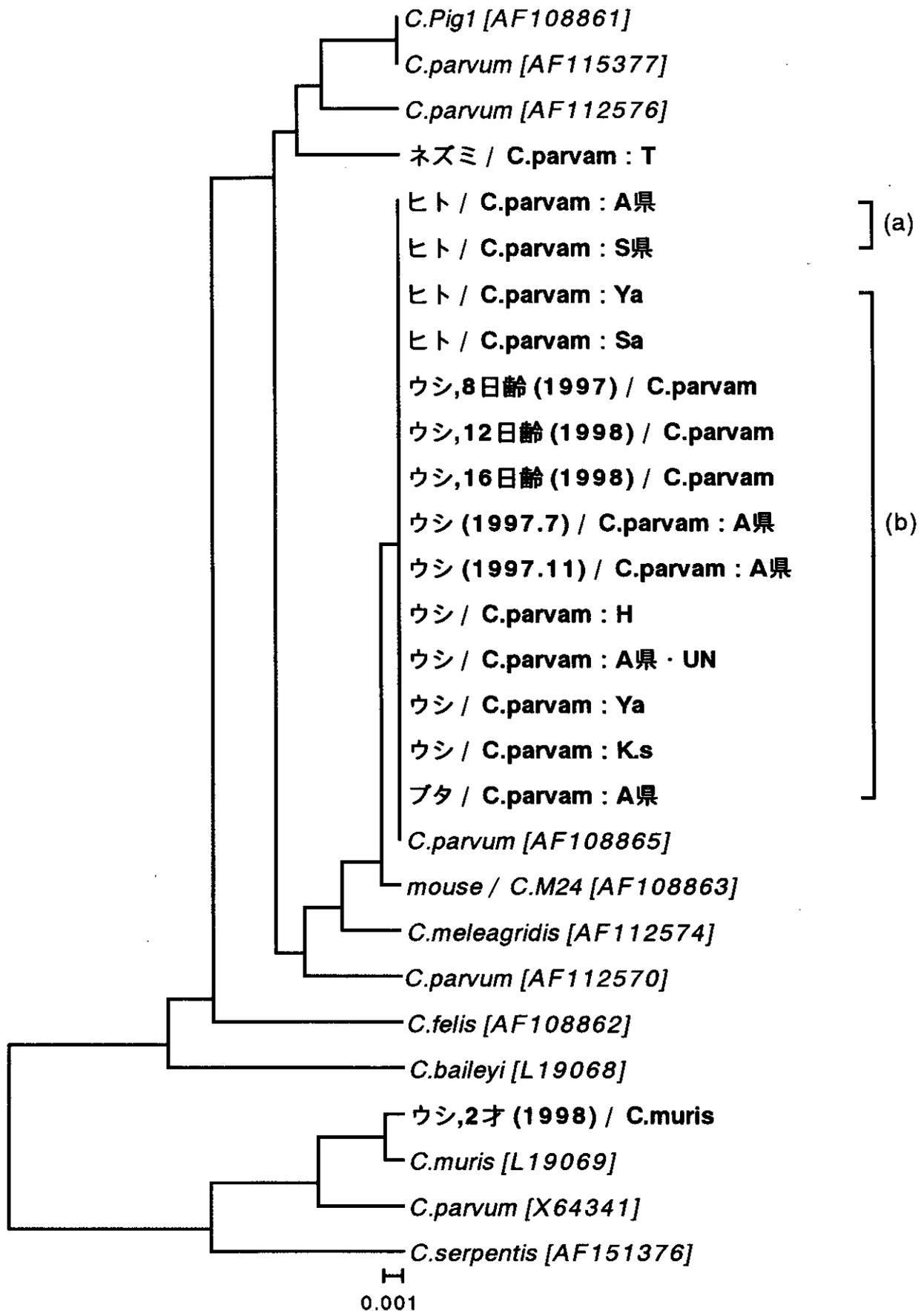


図6. 国内から検出されたCryptosporidiumの18S rRNA領域の系統樹

ウシ,2オ(1998)/C.muris	TATAGTTTAC TTGATAATC-	-AAAACCTACA TGGATAACCG TGGTAATTCT	48
C.muris[L19069]	.....	-AA.AC.G..	48
(a)	.....	TTT.CT.A..	49
(b)	.....	.TT.CT.A..	49
C.parvum[AF108865]	.....T	.TT.CT.A..	50
C.parvum[AF112576]	.....	.TT.CT.A..	49
ネズミ/C.parvam : T	.....	.TT.CT.A..	49

ウシ,2オ(1998)/C.muris	AGAGCTAATA CATGCGAAAA	AACCCCAACTT CGCGGAAGGG TTGTATTTAT	98
C.muris[L19069]	.....A.	A..CCA.... CGC....G..	98
(a)	.....A.	A..TCG.... TAT....G..	99
(b)	.....A.	A..TCG.... TAT....G..	99
C.parvum[AF108865]	.....A.	A..TCG.... TAT....G..	100
C.parvum[AF112576]	.....A.	A..CTG.... TTT....A..	99
ネズミ/C.parvam : T	.....T.	G..CTG.... TTT....A..	99

ウシ,2オ(1998)/C.muris	TAGATAAAGA ACCAATGAGC	TTGGTGATTC ATAATAACTT TACGGATCGC	148
C.muris[L19069]	.....GAGC	.....T..	148
(a)	.....ATAA	.....C..	149
(b)	.....ATAA	.....C..	149
C.parvum[AF108865]	.....ATAA	.....C..	150
C.parvum[AF112576]	.....ATTT	.....T..	149
ネズミ/C.parvam : T	.....ATTA	.....T..	149

ウシ,2オ(1998)/C.muris	ATCTCTGATG CGACATATCA	TTCAAGTTTC TGACCTATCA GCTTTAGACG	198
C.muris[L19069]	...TCTG... C.	.....	198
(a)	--ATTA... T.	.....	197
(b)	--TTAA... T.	.....	197
C.parvum[AF108865]	--ATTA... T.	.....	198
C.parvum[AF112576]	--TTTT... T.	.....	197
ネズミ/C.parvam : T	--TTTT... T.	.....	197

ウシ,2オ(1998)/C.muris	GTAGGGTATT GGCCTACCGT	GGCTATGACG	GGTAACGGGG AATTAGGGTT	248
C.muris[L19069]	.....	...T...	.....	248
(a)	.....	...A...	.....	247
(b)	.....	...A...	.....	247
C.parvum[AF108865]	.....	...A...	.....	248
C.parvum[AF112576]	.....	...A...	.....	247
ネズミ/C.parvam : T	.....	...A...	.....	247

← Probe A

ウシ,2オ(1998)/ <i>C.muris</i>	CGATTCCGGA GAGGGAGCCT GAGAAACGGC TACCACATCT AAGGAAGGCA	298
<i>C.muris</i> [L19069]	.....	298
(a)	.....	297
(b)	.....	297
<i>C.parvum</i> [AF108865]	.....	298
<i>C.parvum</i> [AF112576]	.....	297
ネズミ/ <i>C.parvum</i> : T	.....	297

	Probe A	
ウシ,2オ(1998)/ <i>C.muris</i>	GCAGGCGCGC AAATTACCCA ATCCTGACAC AGGGAGGTAG TGACAAGAAA	348
<i>C.muris</i> [L19069]	.....G.C.....	348
(a)	.....A.T.....	347
(b)	.....A.T.....	347
<i>C.parvum</i> [AF108865]	.....A.T.....	348
<i>C.parvum</i> [AF112576]	.....A.T.....	347
ネズミ/ <i>C.parvum</i> : T	.....A.T.....	347

ウシ,2オ(1998)/ <i>C.muris</i>	TAACAATACA GGGC-CTAAC GGTCTGTAA TTGGAATGAG TGAAGTATAA	397
<i>C.muris</i> [L19069]	.....G.-C..AC G..C..... .GA.....	397
(a)	.....A.TT.-TT G..T..... .TA.....	396
(b)	.....A..T.-TT G..T..... .TA.....	396
<i>C.parvum</i> [AF108865]	.....A..T.-TT G..T..... .TA.....	397
<i>C.parvum</i> [AF112576]	.....A..T..AC A..T..... .TG.....	397
ネズミ/ <i>C.parvum</i> : T	.....A..T-.AT T..T..... .TA.....	396

ウシ,2オ(1998)/ <i>C.muris</i>	ACCCCTTTAC GAGTATCAAT TGGAGGGCAA GTCTGGTGCC AGCAGCCGCG	447
<i>C.muris</i> [L19069]	.....G.....	447
(a)	.....A.....	446
(b)	.....A.....	446
<i>C.parvum</i> [AF108865]	.....A.....	447
<i>C.parvum</i> [AF112576]	.....A.....	447
ネズミ/ <i>C.parvum</i> : T	.....A.....	446

ウシ,2オ(1998)/ <i>C.muris</i>	GTAATTCCAG CTCCAATAGC GTATATTAAT GT	479
<i>C.muris</i> [L19069]	.....	479
(a)	.....	478
(b)	.....	478
<i>C.parvum</i> [AF108865]	.....	479
<i>C.parvum</i> [AF112576]	.....	479
ネズミ/ <i>C.parvum</i> : T	.....	478

図7. 国内から検出されたCryptosporidiumの18S rRNA領域の遺伝子配列

#### D. 研究考察

平成9、10年度の本研究ではクリプトスポリジウムのPCR法が行えることを明らかにするとともに、外殻蛋白をコードしている遺伝子の配列をウシとヒトでは全く同一であることを報告している。

昨年度からPCR法によるクリプトスポリジウム原虫検出の感度を上げるために検討を行った。その結果原虫DNA抽出には凍結融解を5回行うことにより、外殻がほぼ壊され、次いでLysis bufferによって完全に破壊され可溶化し、その後Proteinase処理を行うことにより、DNAの抽出はほぼ完全に行われると考えられた。

また、クリプトスポリジウムのDNAは2本鎖であり、PCRを行うには1本鎖にしなければならない。そこでPCRの前処理利として加熱について検討を行ったところ、98℃10分間の加熱処理が最も有効であったので以後のPCRではこの加熱処理を行うことにした。この方法では数個のクリプトスポリジウムで検出が可能であった。

PCR用プライマーは18s rRNAをコードしている部分を中心に設定し、set AおよびBプライマーを用いることによりウシ、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタおよびマウスからのクリプトスポリジウムの殆ど全てが検出され、これらのプライマーは有用性が高いと判断された。

PCRでは増幅されたDNAが目的とするものであることを確認しなければならない。そこで簡便なマイクロプレートハイブリダイゼーションによる確認試験を開発した。Set Aで増幅されたDNAは全てset Aのプロープに、プライマーset Bで増幅されたDNAはset Bのプロープに特異的に反応した。このことから、今回用いたプライマーは目的の遺伝子を特異的に増幅しており、このことはシーケンスでも確認している。今回開発したマイクロプレートハイブリダイゼーションは簡便で、1日で結果が得られ、確認試験として用いることができると判断された。また今回プロープset Aと選定して位置は各種クリプトスポリジウムによる配列の違いが殆ど無く最も適していると考えられた。

Set Aプライマーで増幅されたDNAのうち、ヒト、ウシ、ブタおよびマウスの遺伝子配列を決定した。その結果、3つのグループに分けられた。これらは1)マウスのみ、2)ヒトのみと3)ヒト、ウシおよびブタのグループであった(このグループないには極めて少ない違いも認められている)。このことから1)と2)ではある程度の分子疫学的解析が可能であるものの、3)のグループではヒト、ウシ、ブタとの間では区別を行い難い。今後さらに広い範囲の遺伝子配列を調べ動物種別の特徴ある配列を明らかにしなければならないと考えている。

特にクリプトスポリジウムによる健康被害が起こった時には、その感染ルートの解明が感染拡大阻止に不可欠である。分子疫学的解析が解明の手段となりうる。従って今後も日本および諸外国のヒトおよび各種動物のクリプトスポリジウムの遺伝子配列をさらに広範

困に明らかにし、基礎的データを集積しておくことが肝要であり、継続して行う必要がある。

#### E. 研究まとめ

ヒトおよび各種動物由来のクリプトスポリジウム検出用 PCR 法を確立した。また PCR 産物の確認試験として簡便なマイクロプレートハイブリダイゼーション法とプローブを開発し、その検査法も確立した。ヒト、ウシ、ブタおよびブタの遺伝子配列は 3 に分けることができ、感染経路等の分子疫学的解明にある程度寄与できると考えられた。今後動物種特異の配列を明らかにしなければならないと考えている。

#### F. 学会発表

西尾 治、秋山美穂、加藤由美子、鈴木 博、斎藤寛史、林留美子、山田靖治：PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出について、74 回日本感染症学会総会、p111、平成 12 年 4 月、20 日、福岡

## 資料

### クリプトスポリジウムの PCR 法による検出とマイクロプレートハイブリダイゼーションによる確認試験

国立公衆衛生院 衛生微生物学部 ウイルス室 西尾 治

#### 1 器具・試薬

サークルサイクラー、超遠心器、冷却遠心器(10,000rpm)マイクロ冷却遠心器(15,000rpm)、マイクロピペット(2, 20, 200, 1000 $\mu$ l)、ホモジナイザー、ボルテックス、恒温器、ヒートブロック、電気泳動装置、UV照射写真撮影装置、UV防御メガネ、マイクロプレートリーダー、マイクロチューブ 1.5ml、1.0ml、0.5ml、ELISA用マイクロプレート、マイクロプレート用シール。

Proteinase K、ショ糖、NaCl、エタノール、フェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコール、Gen Elute<sup>TM</sup> 分間 us EtBr Spin Columns、Tris、HCL、EDTA、Saekosyl、Taq polymerase、dNTPs、プライマー、エチレンプロマイド、電気泳動用アガロース、リン酸2ナトリウム、DDW、ホルムアミド、Tween20、サケ精子 DNA、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ、ウシア ルブミン、磷酸緩衝液、TMB、DMSO、dibasic sodium phosphate、citric acid、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、

#### 2. PCR 法について

##### 1) クリプトスポリジウム原虫から DNA の抽出法

- (1). 浮遊法でを集める
- (2). 3,000rpm, 15 分間. 遠心、ペレットを PBS(-)に再浮遊(この)操作を2回行う)
- (3). 凍結融解 5 回 (-70℃に凍結し、ついで 60℃の温水に入れ、急速的に融解する)
- (4). 2 倍濃度の Lysis buffer (50mM Tris-HCL, 20mM EDTA, pH8.0, 0.5% Saekosyl)に Proteinase K (1mg/ml)を加え、50℃, 90 分間、更に 98℃、5 分間. その後 on ice(5). 等量のフェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコールを加え、10 分間混合した後、3,000rpm. 10 分間. 遠心し、その上清を新しいチューブに取る
- (6). クロロフォルムを等量加え、10 分間混合した後、3,000rpm. 10 分間.遠心し、その上清を新しいチューブに取る
- (7). エタノールを 2.5 倍量と、0.1 量の 3M 酢酸ナトリウムを加え、-70℃以下に 30 分間置き、その後 15,000rpm. 30 分間.遠心し、液層を除く
- (8). 70% Etoh を 500 $\mu$ l 加え、15,000rpm. 30 分間.遠心し、液層を除く
- (9). 乾燥(10). T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> を加え、56℃, 10 分間. 加熱処理をし、その後 on ice, 使用時まで-40℃保存

## 2)PCR 法

PCR の混合液調整は *Taq* を除いたものを作製し、それを 98℃, 10 分間の加熱処理を行う。この操作を行うことにより増幅効率が高くなった。その後 *Taq* を加え、図に示した条件で増幅を行った。PCR 産物の確認は 1 から 3%のアガロースゲルを用い電気泳動を行い、次いでエチレンブロマイドによる染色、写真撮影を行って判定を行う。

図 1 プライマーとプローブの位置

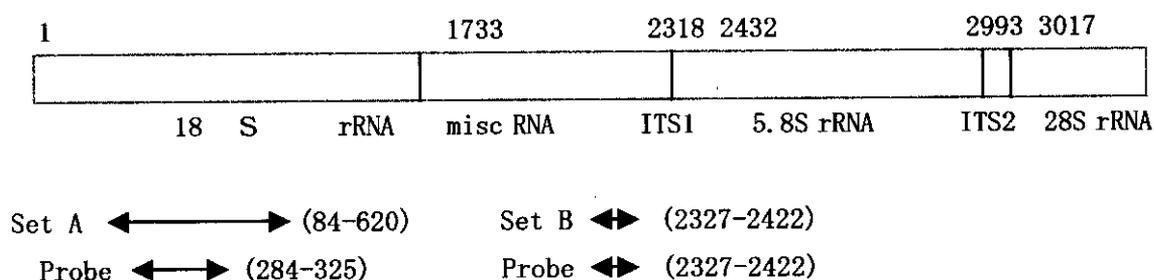


表 1. プライマーの核酸配列

Set A {Cryba+84 : 5' AAC TGC GAATGGCTCATTAT-3'
CrybaR-620:5' -ACA GAA ATC CAA CTA CGA GC-3' }
Set B {CrybaR+2327:5' -ACT TTA AGT AAT GGA TGT CTT-3'
CrybaR-2422:5' -GTT AAT AGA CAC TGA TAT AAA-3' }

図 2. PCR 法試薬調整

DDW	30 μl
10X Buffer	5 μl
2.5mM dNTPs	4 μl
Primer	1 μl
Primer	1 μl
抽出 DNA	2 μl

↓ 98℃, 10 分間 on

Taq 1.25 unit 加える

94℃, 3 分間 1 回  
94℃, 1 分間  
50℃, 1 分間 } 40 回  
72℃, 2 分間 }  
72℃, 15 分間 1 回  
4℃, hold

↓

電気泳動で判定

### 3. マイクロトレイハイブリダイゼーション

#### 1) マイクロトレイハイブリダイゼーション用プローブの作製

プローブの作製はプローブ用の PCR (プライマーA では 284-325、プライマーB では 2327-2422) で増幅された PCR 産物を 0.8 から 1.5%アガロースゲルを用い目的とするバンドを切り出す。その操作法は以下の如く行う。

- (1). ゲルからの DNA 抽出法 (Gen Elute™ 分間 us EtBr Spin Columns を用いる方法)
  - (1). 0.8% から 1%アガロースゲルを用い、PCR 産物を泳動し、ゲルをラップに乗せ、目的とするバンドを UV 照射下で切り出す (フナコシのフナゲルチップを用いると良い)
  - (2). Spin Colum を 1.5ml のチューブに乗せ、それに 100  $\mu$ l の TE (pH8.0) を入れる  
↓ 12,000 xg で 5 秒間遠心、チューブに溜まった液をすてる
  - (3). Spin colum に切り出したゲルを入れる  
↓ 12,000 xg で 10 分間遠心し、Spin Colum を取り除く
  - (4). チューブに溜まった液の中に抽出 DNA が含まれている。これをプローブ作製あるいはハイブリダイゼーションに用いる

#### 2) プローブの作製

目的とするバンドを上記のゲルからの抽出法に従い DNA を抽出した。次に、抽出した DNA (500ng/ml) を用い PCR 法でプローブを作製する。

表2. プローブ作製用 PCR 調整

DDW		29 $\mu$ l
ビオチン-11-dUTP	(0.12mM)	2 $\mu$ l
dATP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
dCTP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
dGTP	(1.25mM)	2 $\mu$ l
10X Buffer		5 $\mu$ l
Primer	(25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Primer	(25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
抽出 DNA	(500ng)	4 $\mu$ l
Total		50 $\mu$ l

94°C 3分 1回、  
 94°C 1分、55°C 2分、74°C 3分 12回、  
 74°C 10分 1回  
 4°C 保存

### 3) プローブの精製

- (1) PCR 産物に 2.5 倍量のエタノールと 1/10 量の 3M 酢酸アンモニウムを加える
- (2) -70°C に 30 分置いた後、15,000 rpm、30 分間遠心し液層を除く
- (3) 次いで 70% アルコールを 500  $\mu$  l 入れ、15,000 rpm、30 分間遠心
- (4) 、液層を除き、乾燥
- (5) T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> を 200  $\mu$  l 加え、56°C 10 分間置いた後、on ice  
 使用時まで -70°C で保存する。これをプローブとして用いる

### 2) マイクロプレートハイブリダイゼーション試験

(1) . 抽出 DNA を 0.5ml のチューブに取り、1.5M NaCl buffer#1 でバンドの濃度を見て適宜希釈する。

↓ 98°C、5 分間加熱処理、直ちに on ice

(2). マイクロトレイに固定化液#2 を 85  $\mu$  l 入れ、それに加熱処理した DNA を 15  $\mu$  l ずつ 1 検体当たり 3 ウェルに入れる

#1 : 3 倍 1.5M NaCl buffer : 4.5M NaCl、30mM リン酸 2 ナトリウム、30mM EDTA、pH7.0

#2 : 固定化液 : 3 倍濃度 1.5M NaCl buffer 3.0ml、DDW 6.0ml

図 3. トレイのレイアウト

		1	2	3	4	5	6	7
			N	P	検 体	検 体	検 体	検 体
			C	C	1	2	3	4
	A	○	○	○	○	○	○	○
プローブ対照	B	○	○	○	○	○	○	○
プローブA	C	○	○	○	○	○	○	○
プローブB	D	○	○	○	○	○	○	○

↓プレートにシールし、37°C恒温槽に重しをして沈めて置く

- (3). PBS-T でプレートを 3 回洗浄する
- (4). プレートにハイブリ液#3 を各ウエルに 80  $\mu$ l あて入れる
- (5). 1 検体当たり、プローブコントロール、プローブ A、プローブ B を各 22  $\mu$ l ずつ作製する

#3 : 3 倍 1.5M NaCl buffer 1.35ml、DDW 1.26ml、ホルムアミド 4.5ml、10%Tween20 0.09ml

表 3. プローブの調整 (1 検体当たり)

T10E1	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l *
プローブ A	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l
プローブ B	11 $\mu$ l + サケ精子 DNA	11 $\mu$ l

\* サケ精子 DNA : DNA 量 10mg/ml のものを T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> で 100  $\mu$ g/ml に希釈し、それに 2 倍濃度の 1.5M NaCl buffer と混合したもの

- (6). 上記混合液 (プローブ) を 98°C、5 分間加熱処理、直ちに on ice し、プローブコントロール、プローブ A、プローブ B をそれぞれの列に 10  $\mu$ l 入れる

↓42℃ 恒温槽に重しをして沈め、6時間以上あるいは1夜置く

(7). シールを剥がし、PBS-Tで3回洗浄する。PBS-Tは42℃に暖めておく

(8). ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (1%BSA+PBS-T で適宜希釈したもの) を全てのウェルに100 $\mu$ l入れる

↓室温1時間置く (弱く振動させるとよい)。

(9) プレートをPBS-Tで4回洗浄する。

(10) 全てのウェルに発色液#4を100 $\mu$ l入れる。

#4 : TMB 1mg, DMSO 1ml, phosphate-citrate buffer 9ml (0.2M dibasic sodium phosphate 25.7ml, 0.1M citric acid 24.3ml, 精製水 50ml, pH5.0), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 $\mu$ l.

↓室温15分間 (プレートは遮光しておく)

(11) 停止液 (4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を50 $\mu$ l入れ、15分間遮光する

(12) 450nmで吸光度を測定する

(13) 判定 コントロールに比べOD値が2倍以上、かつ0.2以上の差が認められた時に陽性とする

分担研究報告書 7

野生動物、特に鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの  
疫学調査および迅速診断・鑑別

分担研究者 笹井和美

## 分担研究報告書

研究課題：野生動物、特に鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの疫学調査および迅速診断・鑑別

分担研究者： 笹井 和美 大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科助教授

研究協力者： 高見 一利 大阪市天王寺動植物公園事務所 獣医師、  
松林 誠 大阪女子学園短期大学食物学科 助手

### 1. *Cryptosporidium baileyi* 株の輸入

当初、共同研究者の米国農務省 Fayer 博士より *C. baileyi* 株の分与を受ける予定であったが、米国で維持されている *C. baileyi* 株の継代と維持がうまくいっておらず、今日現在まで株を得ていない。

そこで、昨年末に、ハンガリー獣医科大学の Varga 博士および韓国の Chonbuk National 大学の Rhee 博士より、*C. baileyi* 株の分与を受け、現在、継代中である。

注)

分与を受けた、*C. baileyi* 株を Merifluor キット (Meridian Diagnostics, Inc 社製の直接蛍光抗体法) および、Hydrofluor-Combo キット (Strategic Diagnostics Inc 社製の間接蛍光抗体法) で染色したところ、両株とも陽性であった。

Hydrofluor-Combo キットのスペックシートには *C. baileyi* 株は陰性であると記されているが、今回入手した株は陽性を示した。また、Merifluor キットのスペックシートには *C. parvum* 以外のクリプトスポリジウムとの交差性については記載されていないが、Fayer 博士らの報告 (1996 年) から *C. muris*, *C. serpentis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi* 株と交差すると考えられるが、*C. baileyi* に関する記載は現在のところない。

Varga I, Dept. Parasitol. & Pathol., Univ. Facult. Vet. Sci., Hungary.

Rhee JK, Bio-Safety Res. Inst., Vet. Sch., Chonbuk National Univ., Korea.

### 2. 野生鳥獣に寄生するクリプトスポリジウムの調査および迅速診断・鑑別に関する研究

#### 研究 A. 野生鳥獣に寄生するクリプトスポリジウムの疫学調査

下痢を主徴とする野生鳥類の糞便における、クリプトスポリジウムオーシストの陽性率を調査する。

サンプル総数 105例

(平成11年4月より平成12年4月までの13カ月間に大阪府下で鳥獣保護獣医師によ