

Table 1 *Tt* values of each diluted sample in the RT-LAMP assay.

	RNA concentration* (oocysts/LAMP test tube)			
	$6 \times 10^{-1}$	$6 \times 10^{-2}$	$6 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-4}$
<i>Tt</i> value (min)	22.0	23.7	27.5	41.8
	22.0	24.1	25.2	42.3
	22.3	24.4	28.2	42.0
	22.3	24.0	28.7	33.3
	22.1	24.6	28.5	50.4
	22.2	24.6	26.3	39.4
	22.2	24.2	28.2	31.2
	22.2	24.3	27.5	50.4
Average (min)	22.2	24.2	27.5	41.4
Coefficient of variation (%)	0.5	1.3	4.4	16.8

\*RNA concentration was converted to oocyst concentration in a LAMP test tube.

### 3.2 検鏡法、RT-LAMP従来法、RT-LAMP改善法による水試料からのクリプトスポリジウム検出

2008年1月～2010年2月に採取した養豚場排水放流水及びその下流の河川水、その他の環境水（表流水、湧水、浅井戸水、伏流水）、浄水について、検鏡法、RT-LAMP従来法、RT-LAMP改善法によりクリプトスポリジウム検出を行った。

問題の養豚場排水放流水及びその下流の河川水の結果をTable 2に示した。検鏡法の結果、養豚場A放流水では10オーシスト/5ml、養豚場B放流水では7オーシスト/5mlが検出された。RNA抽出は養豚場A、B放流水について、5mlずつ5回（A1～A5、B1～B5）行い、それぞれについてRT-LAMP従来法、RT-LAMP改善法でクリプトスポリジウム検査を行った。養豚場下流の河川水8試料については、濃縮液の沈殿物容量が0.5mlを超えた試料は2分割（S-1、S-2、及びK-1、K-2）あるいは4分割（K-1、K-2、K-3、K-4）後にそれぞれ免疫磁気ビーズ精製とRNA抽出を行ったため、検鏡法によるオーシスト数を分割数で除した値を表に示した（例：2分割の場合、検鏡法で9オーシスト検出された試料は4.5オーシストと表記）。養豚場排水放流水及びその下流の河川水26試料（分割試料数を含む）中、RT-LAMP従来法で陽性となったのは7試料（陽性率26.9%）、RT-LAMP改善法で陽性となったのは20試料（陽性率76.9%）であった。26試料のうち、No.13とNo.16は、検鏡法でのオーシスト数がそれぞれ1、0.5と少ないことから、RNA抽出試料にオーシ

ストが含まれなかった可能性が考えられた。検鏡法でのオーシスト数が2以上の23試料では、RT-LAMP従来法で7試料陽性（30.4%）であったのが、RT-LAMP改善法では19試料陽性（82.6%）となり、陽性率が著しく向上した。しかし、No.7の試料ではRT-LAMP従来法で陽性であったのがRT-LAMP改善法で陰性となった。この理由として、鑄型量が少ないために遺伝子増幅が遅れたり不安定になる等の不利な状況となったことや、試料を遺伝子検査に供するために凍結融解を繰り返したことからRNAが分解した可能性が考えられた。

採水後1ヶ月間冷蔵保存された検体（Table 2 Sample No.18-25）を参考試料として試験した場合、RT-LAMP従来法では多くの試料が陰性となった。一方、RT-LAMP改善法では、分割試料の少なくとも1試料が陽性となったことから、保存中のRNAの分解だけでなく遺伝子増幅阻害の影響も考えられた。

これらの結果から、沈殿物量の多い試料については免疫磁気ビーズ処理時に試料を分割し、それぞれの試料についてRT-LAMP反応を実施することで、検水の陽性率を高めることができると考えられた。また、養豚場排水放流水A、BのRT-LAMP改善法が各5検体中1検体不検出であったことから、阻害が強いと考えられる検体についても磁気ビーズ処理時に複数に分割し、それぞれについてRT-LAMP反応を実施することが有効であると考えられた。検査に使える核酸が少ないことから、複数試料について検査することの必要性はSmith & Nichols<sup>7)</sup>によっても指摘されている。なお、10lにわずか数オーシスト

Table 2 Detection results for *Cryptosporidium* oocysts in pigsty effluents and its downstream river water by conventional microscopic observation, original RT-LAMP and improved RT-LAMP

Sample No.	Date of sample collection	Sampling site	Water type	Water volume	Microscopic observation (number of oocysts)	Original RT-LAMP <sup>*1</sup>	Improved RT-LAMP <sup>*2</sup>
1	08Jan.2008	Pigsty A1	PE <sup>*3</sup>	5ml	10	- <sup>*5</sup>	+ <sup>*6</sup>
2		Pigsty A2	PE	5ml	10	-	+
3		Pigsty A3	PE	5ml	10	-	+
4		Pigsty A4	PE	5ml	10	-	-
5		Pigsty A5	PE	5ml	10	-	+
6		Pigsty B1	PE	5ml	7	+	+
7		Pigsty B2	PE	5ml	7	+	-
8		Pigsty B3	PE	5ml	7	+	+
9		Pigsty B4	PE	5ml	7	+	+
10		Pigsty B5	PE	5ml	7	+	+
11	27Feb.2008	S-1	RW <sup>*4</sup>	5l/2	2	+	+
12		S-2	RW	5l/2	2	-	+
13		N	RW	5l	1	-	-
14		K-1	RW	5l/2	4.5	-	+
15		K-2	RW	5l/2	4.5	-	+
16	09Feb.2009	S-1	RW	10l/2	0.5	-	-
17		S-2	RW	10l/2	0.5	-	+
18 <sup>*7</sup>	12Mar.2009	K-1	RW	10l/4	133	-	+
19 <sup>*7</sup>	9:00	K-2	RW	10l/4	133	-	+
20 <sup>*7</sup>		K-3	RW	10l/4	133	-	+
21 <sup>*7</sup>		K-4	RW	10l/4	133	-	+
22 <sup>*7</sup>	12Mar.2009	K-1	RW	10l/2	200	+	+
23 <sup>*7</sup>	12:00	K-2	RW	10l/2	200	-	-
24 <sup>*7</sup>	12Mar.2009	K-1	RW	10l/2	55	-	+
25 <sup>*7</sup>	15:00	K-2	RW	10l/2	55	-	-
26	07Apr.2009	K	RW	10l	3	-	+
Number of total samples (including divided samples)					18 (26)		
Number of positive samples (including divided samples)					-	7 (7)	15 (20)
Positive rate (including divided samples) (%)					-	38.9 (26.9)	83.3 (76.9)

\*1 Original RT-LAMP assay was performed using 5 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

\*2 Improved RT-LAMP assay was performed using 1 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

\*3 PE : pigsty effluent

\*4 RW : river water

\*5 - : negative

\*6 + : positive

\*7 *Cryptosporidium* RNA was extracted after 1 month conservation at 4°C.

の検出を求められることから確率的なばらつきは避けられず、このようなばらつきは経験的に検鏡法と大差ないと考えられた。

その他の表流水の結果をTable 3に示した。44試料中検鏡法で陽性となったのは4検体（陽性率9.1%）のみであ

ったが、RT-LAMP従来法では9検体（陽性率20.5%）、RT-LAMP改善法では11検体（陽性率25.0%）が陽性となった。RT-LAMP従来法が検鏡法よりも高感度であることは、われわれの既報<sup>8)</sup>の結果と同様であるが、RT-LAMP改善法は従来法よりも若干高感度であった。糞便汚染さ

Table 3 Detection results for *Cryptosporidium* oocysts in surface water by conventional microscopic observation, original RT-LAMP and improved RT-LAMP

Sample No.	Date of sample collection	Sampling site	Water volume	Microscopic observation (number of oocysts)	Original RT-LAMP <sup>1</sup>	Improved RT-LAMP <sup>2</sup>
1	01Oct.2008	OCO-1	10l/3	0	+ <sup>3</sup>	+
2		OCO-2	10l/3	0	+	+
3		OCO-3	10l/3	0	- <sup>4</sup>	-
4		OHO-1	10l/2	0	-	-
5		OHO-2	10l/2	0	-	-
6	08Oct.2008	MT	10l	0	-	+
7		OHK	10l	0	-	-
8		OHM	10l	0	-	-
9		OOG	10l	0	-	-
10	09Oct.2008	AM	10l	0	-	-
11		HO	10l	0	-	-
12		TK	10l	0	-	-
13		OHM	10l	0	-	-
14		OOT	10l	0	-	-
15		OTS	10l	0	-	-
16		ONP	10l	0	-	-
17	04Nov.2008	HIK	10l	0	-	-
18		HIM	10l	0	-	-
19	26Nov.2008	IKN	10l	0	+	+
20		IJH	10l	0	+	-
21		IYR	10l	1	+	+
22	01Dic.2008	YRS	10l	0	+	+
23		YR1,2	10l	0	+	+
24		YR3	10l	1	+	+
25		YR4	10l	0	-	-
26		IDY	10l	0	-	-
27	27Jan.2009	INY	10l	0	-	-
28		ITN	10l	0	-	-
29	24Feb.2009	IKN	10l	1	+	+
30	25May 2009	IKN-1	10l/3	0	-	-
31		IKN-2	10l/3	0	-	-
32		IKN-3	10l/3	0	-	-
33	10Jun.2009	IKN-1	10l/2	0	-	-
34		IKN-2	10l/2	0	-	-
35	07Oct.2009	AM	10l	0	-	-
36	14Oct.2009	MT	10l	0	-	-
37	15Oct.2009	HO	10l	0	-	-
38	20Oct.2009	OCO	10l	0	-	-
39		OHO	10l	0	+	+
40		OOT	10l	0	-	-

Sample No.	Date of sample collection	Sampling site	Water volume	Microscopic observation (number of oocysts)	Original RT-LAMP <sup>1)</sup>	Improved RT-LAMP <sup>2)</sup>
41		OTS	10l	0	-	-
42		ONP	10l	0	-	-
43	29Oct.2009	TK	10l	0	-	-
44	04Nov.2009	HIK	10l	0	-	-
45		HIM	10l	0	-	-
46	10Nov.2009	OHK	10l	0	-	-
47		OHM	10l	0	-	-
48		OOG	10l	0	-	-
49		IKN	10l	1	-	+
50	09Feb.2010	IKN	10l	0	-	+
Number of total samples (including divided samples)				44 (50)		
Number of positive samples (including divided samples)				4 (4)	9 (10)	11 (12)
Positive rate (including divided samples) (%)				9.1 (8.0)	20.5 (20.0)	25.0 (24.0)

\*1 Original RT-LAMP assay was performed using 5 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

\*2 Improved RT-LAMP assay was performed using 1 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

\*3+ : positive

\*4 - : negative

れた試料に比べると、表流水の汚染は大きく希釈されており、阻害物質の存在量が少ないことから、改善効果が少なくなったものと考えられた。しかし、RT-LAMP改善法によって表流水中の阻害物質の影響が緩和されたことは変わらない。No.20の試料のみ、RT-LAMP従来法で陽性であったのがRT-LAMP改善法で陰性となった。この試料は検鏡法でクリプトスポリジウムが不検出であり、存在するオーシスト数が極めて少ない、あるいは存在するオーシストが壊れる途中で核酸が不安定であったと考えられた。

湧水 (9 検体)、浅井戸水 (4 検体)、伏流水 (1 検体)、浄水 (13 検体) からは、いずれの方法によってもクリプトスポリジウムは検出されなかった (Table 4)。これらの検体はクリプトスポリジウム汚染がほとんどないと考えられることから、RT-LAMP 反応に偽陽性は生じていないと考えられた。

RT-LAMP 法で陽性となった増幅産物のアガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物が *Cryptosporidium parvum* と同一のバンドパターンであることを確認した。泳動結果の一部を Fig. 1 (RT-LAMP 従来法) 及び Fig. 2 (RT-LAMP 改善法) に示した。

以上より、一連の増幅結果に偽陽性はなかったと判断した。RT-LAMP 改善法は養豚場排水放流水だけでなく、環境水全般について RT-LAMP 従来法よりも検出感度が

高く、これまでの検討では偽陽性も認められなかった。本法は検査に使用する RNA 抽出量を減らすだけで阻害が回避できる非常に簡便な改善法であり、検鏡法の結果との対比も得られていることから、RT-LAMP 改善法の実用性は十分にあると判断した。本研究に用いた環境水及び検討した核酸抽出方法は限られていることから、検査対象水の阻害物質濃度とクリプトスポリジウム濃度、用いる核酸抽出方法が変われば、最適な核酸抽出量は変化するものと考えられる。本研究で示した検鏡法との比較のみならず、さらなる核酸抽出法の最適化と、異なる配列を標的とした複数の遺伝子解析法を併用することにより、遺伝子検査法の信頼性の向上が図れると考えられる。顕微鏡による形態観察と遺伝子増幅による標的配列の検出とは原理が異なることから、必ずしも 1 : 1 対応はしないものの、遺伝子検査法はクリプトスポリジウム汚染の有無を明らかにする試験目的には十分に有用であると考えられた。今後、多くの検査機関において RT-LAMP 改善法を実施し、評価されることを望む。

#### 4. まとめ

検水中の遺伝子増幅阻害物質の影響を除去するために、RT-LAMP 反応に用いる RNA 抽出量を従来の 5  $\mu$ l から 1  $\mu$ l に低減した改善法を検討し、以下の知見を得た。

1) RT-LAMP の検出感度は  $6 \times 10^3$  オーシスト相当/RT-

Table 4 Detection results for *Cryptosporidium* oocysts in finished water, spring water, shallow well water and river-bed water by conventional microscopic observation, original RT-LAMP and improved RT-LAMP

Sample No.	Date of sample collection	Sampling site	Water type	Water volume	Microscopic observation (number of oocysts)	Original RT-LAMP <sup>1</sup>	Improved RT-LAMP <sup>2</sup>
1	01Dic.2008	YRS	FW <sup>3</sup>	20l	0	- <sup>7</sup>	-
2	24Feb.2009	HBT	FW	20l	0	-	-
3		OKD	FW	20l	0	-	-
4		SEY	FW	20l	0	-	-
5	23Aug.2009	HBT	FW	20l	0	-	-
6		OKD	FW	20l	0	-	-
7		SEY	FW	20l	0	-	-
8	01Dic.2009	OKD	FW	20l	0	-	-
9		SEY	FW	20l	0	-	-
10		YMZ	FW	20l	0	-	-
11	09Feb.2010	HBT	FW	20l	0	-	-
12		OKD	FW	20l	0	-	-
13		SEY	FW	20l	0	-	-
14	15Oct.2008	BRW	SP <sup>4</sup>	10l	0	-	-
15		SNT	SP	10l	0	-	-
16		OGG	SP	10l	0	-	-
17	22Oct.2008	SND	SP	10l	0	-	-
18	14Oct.2009	SNT	SP	10l	0	-	-
19		NKN	SP	10l	0	-	-
20		BRW	SP	10l	0	-	-
21	15Oct.2009	OGG	SP	10l	0	-	-
22	21 Oct.2009	SND	SP	10l	0	-	-
23	09Dic.2008	OH1	SW <sup>5</sup>	10l	0	-	-
24		OH2	SW	10l	0	-	-
25	24Feb.2009	OH1	SW	10l	0	-	-
26		OH2	SW	10l	0	-	-
27	01Dic.2008	AMZ	RB <sup>6</sup>	10l	0	-	-
Number of total samples				27			
Number of positive samples				0	0	0	
Positive rate (%)				0	0	0	

<sup>1</sup> Original RT-LAMP assay was performed using 5 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

<sup>2</sup> Improved RT-LAMP assay was performed using 1 $\mu$ l of *Cryptosporidium* RNA extract.

<sup>3</sup> FW : Finished water

<sup>4</sup> SP : Spring water

<sup>5</sup> SW : Shallow well water

<sup>6</sup> RB : River-bed water

<sup>7</sup> - : negative

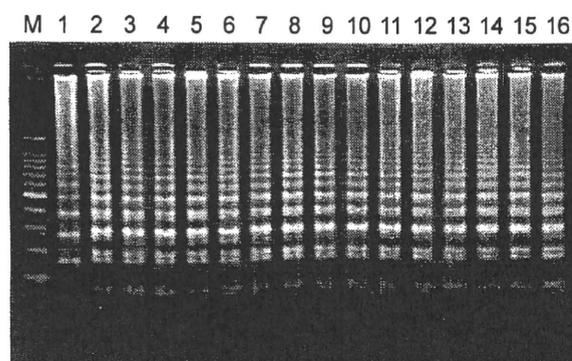


Fig. 1 Analysis of original RT-LAMP products of positive samples by agarose gel electrophoresis.

M : 100bp DNA ladder

- 1 : Positive control for LAMP reaction<sup>a</sup>
- 2 : Positive control for electrophoresis<sup>b</sup>
- 3 : Table 3 Sample No.1
- 4 : Table 3 Sample No. 2
- 5 : Table 3 Sample No.19
- 6 : Table 3 Sample No.20
- 7 : Table 3 Sample No.21
- 8 : Table 3 Sample No.22
- 9 : Table 3 Sample No.23
- 10 : Table 3 Sample No.24
- 11 : Table 2 Sample No.6
- 12 : Table 2 Sample No.7
- 13 : Table 2 Sample No.8
- 14 : Table 2 Sample No.9
- 15 : Table 2 Sample No.10
- 16 : Table 2 Sample No.11

<sup>a</sup>Positive control for the RT-LAMP assay made of RNA with an artificial sequence. The electrophoretic pattern of this positive control was different from that of *Cryptosporidium parvum* oocysts. If the electrophoretic pattern of samples was the same as lane 1, it was an evidence of contamination by the positive control.

<sup>b</sup>Positive control for electrophoresis which derives from nucleic acid of *Cryptosporidium parvum* oocysts. This positive control was not used in LAMP reactions.

LAMP反応であった。この検出感度から、RNA抽出液20  $\mu$ l中の鋳型RNA液1  $\mu$ lで1オーシストが検出可能と判断した(1オーシスト/20  $\mu$ l =  $5 \times 10^{-2}$ オーシスト相当/1  $\mu$ l)。  
2) RT-LAMP改善法は、検査した養豚場排水放流水、その下流の河川水、その他の表流水全てにおいて、RT-LAMP従来法よりも高感度であり、偽陽性も認められなかった。養豚場排水放流水やその下流の河川水のように阻害が強いと考えられる検体では、検体を複数に分割し、それぞれの試料についてRT-LAMP改善法を実施することで、陽性率を高めることが可能であった。

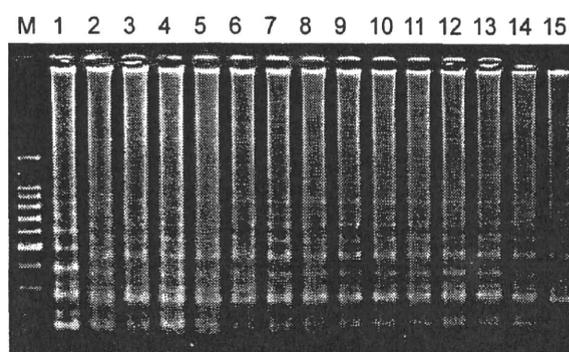


Fig. 2 Analysis of improved RT-LAMP products of positive samples by agarose gel electrophoresis.

M : 100bp DNA ladder

- 1 : Positive control for LAMP reaction<sup>a</sup>
- 2 : Positive control for electrophoresis<sup>b</sup>
- 3 : Table 2 Sample No.1
- 4 : Table 2 Sample No.2
- 5 : Table 2 Sample No.3
- 6 : Table 2 Sample No.9
- 7 : Table 2 Sample No.10
- 8 : Table 2 Sample No.11
- 9 : Table 2 Sample No.12
- 10 : Table 2 Sample No.17
- 11 : Table 2 Sample No.22
- 12 : Table 3 Sample No.19
- 13 : Table 3 Sample No.29
- 14 : Table 3 Sample No.39
- 15 : Table 3 Sample No.50

<sup>a</sup>Positive control for the RT-LAMP assay made of RNA with an artificial sequence. The electrophoretic pattern of this positive control was different from that of *Cryptosporidium parvum* oocysts. If the electrophoretic pattern of samples was the same as lane 1, it was an evidence of contamination by the positive control

<sup>b</sup>Positive control for electrophoresis which derives from nucleic acid of *Cryptosporidium parvum* oocysts. This positive control was not used in LAMP reactions.

#### 謝 辞

本研究は平成19～21年度の厚生労働省科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(H19-健危-一般-012)の補助を受けて実施した。

#### 参考文献

- 1) 金子光美:水道の病原微生物対策,丸善,東京(2006)
- 2) Guillot, E. and Loret, J. F. : *Cryptosporidium*. Waterborne pathogens: Review for the drinking water industry, IWA Publishing, London UK (2010)
- 3) Yoder, J. S., Harral, C., and Beach, M. J. :

- Cryptosporidiosis surveillance -- United States, 2006 -- 2008, MMRW, Vol.59, No.SS-6 (2010)
- 4) Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G. K., Nichols, G., and Chalmers, R. M. : Review article: Outbreaks of water borne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003, *Epidemiol. Infect.*, Vol.134, 1141-1149 (2006)
  - 5) 埼玉県衛生部 : クリプトスポリジウムによる集団下痢症一越生町集団下痢症発生事件一報告書 (1997)
  - 6) 厚生労働省健康局水道課長通知 : 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日付健水発第0330006号 (2007)
  - 7) Smith, H.V. and Nichols, R.A. : *Cryptosporidium*: detection in water and food, *Exp Parasitol.* , Vol. 124 (1), 61-79 (2010)
  - 8) 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 Sci. Technol.*, Vol.60, 2167-2172 (2009)
  - 9) Lantz, P.G., Matsson, M., Wadstrom, T., and Radstrom, P. : Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 28, 159-167 (1997)
  - 10) Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K., and Madsen, M. : Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, 5125-5132 (2004)
  - 11) Kreader, C. A.: Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, 1102-1106 (1996)
  - 12) 百田隆祥, 小島禎, 池戸正成, 泉山信司, 遠藤卓郎: LAMP法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) を用いたクリプトスポリジウム及びジアルジアの高感度迅速検出, *水環境学会誌*. Vol.32, 321-324 (2009)
  - 13) Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T., and Endo, T. : Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan, *Parasitology Research*. Vol.87, 950-955 (2001)
- (受付 2010. 8. 23)  
(受理 2010.11.22)

# リアルタイムRT-PCR法を用いた河川試料水中の クリプトスポリジウムの高感度定量

High-Sensitive Quantification of *Cryptosporidium* in River Water Samples Using a Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

岸田直裕<sup>1</sup>、古川一郎<sup>2</sup>、黒木俊郎<sup>2</sup>、猪又明子<sup>3</sup>、泉山信司<sup>4</sup>、森田重光<sup>5</sup>、秋葉道宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立保健医療科学院水道工学部 / 〒351-0197 和光市南2-3-6

<sup>2</sup>神奈川県衛生研究所微生物部 / 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

<sup>3</sup>東京都健康安全研究センター環境保健部 / 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>4</sup>国立感染症研究所寄生動物部 / 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

<sup>5</sup>麻布大学生命・環境科学部 / 〒229-8501 相模原市淵野辺1-17-71

NAOHIRO KISHIDA<sup>1</sup>, ICHIRO FURUKAWA<sup>2</sup>, TOSHIRO KUROKI<sup>3</sup>,  
AKIKO INOMATA<sup>3</sup>, SHINJI IZUMIYAMA<sup>4</sup>, and MICHIIHIRO AKIBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health  
/ 2-3-6 Minami, Wako, 351-0197, Japan

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health  
/ 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, 253-0087, Japan

<sup>3</sup>Department of Environmental Health and Toxicology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
/ 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku Tokyo, 169-0073, Japan

<sup>4</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases  
/ 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo, 162-8640, Japan

<sup>5</sup>School of Environmental Science, Azabu University / 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 229-8501, Japan

## Abstract

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to the detection of *Cryptosporidium* oocysts. Firstly, the sensitivity and specificity of three primer pairs were compared, and the primer pair reported by Miller *et al.* (2006) was considered to be the most suitable one. Secondly, a reverse transcription reaction was added to the real-time PCR assay for increase in sensitivity. The real-time RT-PCR assay revealed that one oocyst contains the 27,400 copies of rRNA, and the quantification limit of the assay was as low as  $7.5 \times 10^{-4}$  oocysts/test tube, while that of normal real-time PCR assay was as low as  $2.4 \times 10^{-1}$  oocysts/test tube. Therefore, the *Cryptosporidium* oocysts can theoretically be detected in reproducible tests using the real-time RT-PCR assay even in water samples containing only one oocyst. Thirdly, the developed real-time RT-PCR assay was applied to detect *Cryptosporidium* oocysts in 14 real river water samples. The concentration was quantified by the real-time RT-PCR assay, and was correlated to the suspected value, but not to the confirmed value, determined by conventional microscopic observation.

**Key words:** Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium*, oocyst, real-time PCR, real-time RT-PCR

## 1. はじめに

クリプトスポリジウムは温帯・熱帯問わず世界中に広く分布しており、種々の動物の消化管に寄生し、ヒトに重篤な下痢症を引き起こす原虫として知られている<sup>1,2)</sup>。また、本原虫のオーシストは浄水処理で用いられる塩素等の消毒剤に対して高い抵抗性を持つために<sup>3,4)</sup>、しばしば水道を介した集団下痢症が発生し問題とされている。最も大規模な水系集団感染は、1993年に米国 Wisconsin 州 Milwaukee 市で発生した事例であり、推定感染者数40万人以上、確定患者数5千人以上と報告されている<sup>5-7)</sup>。我が国では1996年に埼玉県越生町の町民約7割が感染したとされる大規模な集団感染が発生している<sup>8)</sup>。近年では、2007年にアイルランドの Galway 市にて182人の患者発生が報告されており<sup>9)</sup>、クリプトスポリジウムによる水系集団感染は、先進国においても依然として深刻な問題の一つとなっている。このような背景から、浄水処理の徹底、汚染状況の調査が重要視されている。

現在、クリプトスポリジウムオーシスト（以下、オーシストという）の検査で主流となっているのは顕微鏡観察法であり、平成19年3月に厚生労働省健康局水道課より通知された試験法<sup>10)</sup>の中でも採用されているが、本手法は技術の習得に多大な時間を要し、また顕微鏡観察はオーシストの判定において個人差が生じる恐れも考えられることから、迅速に検出可能で分析者の負担が少なく、かつ再現性の高い検出法の導入が強く求められている。このような特徴を満たす検査法として、近年注目を集めているのが遺伝子検査法であり、平成22年3月に開催された「水道における微生物問題検討会（厚生労働省健康局水道課水質管理室 主催）」においても、クリプトスポリジウムの検査法が議題に上がり、遺伝子検査法の導入について議論されている。これまでにオーシストの定量を可能とするリアルタイムPCRの検出系は複数報告されているが<sup>11-13)</sup>、実用性に関する比較検討はほとんど実施されていない。また、糞便等の臨床試料と異なり、水環境中ではオーシストの存在は低濃度で、10l中にわずか1つのオーシストを検出しなければならないので、感度の問題が無視できない。

そこで本研究では、クリプトスポリジウムの実用的な定量検査系を確立することを目的とした。はじめに、これまでに報告された中から3つのリアルタイムPCR系に着目し、感度や特異性等の比較を行った。次に、最良のリアルタイムPCR系に逆転写反応（RT: Reverse transcription）を組み合わせたリアルタイムRT-PCR法を

考案し、定量感度の向上を試みた。rRNAを検出対象とした場合にRT反応による感度向上があることを経験しており<sup>14)</sup>、当該研究でも実施を試みた。最後に、構築したリアルタイムRT-PCR法を水環境試料中のオーシスト濃度の測定に適用し、顕微鏡観察を基本とする従来法と比較することで、構築した検査系の実用性を評価した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 試料

後述するリアルタイムPCR系の比較試験およびリアルタイムRT-PCR法の感度試験には、感染マウスの糞便より精製した*Cryptosporidium parvum* オーシスト（H8株）を用いた<sup>15)</sup>。マウスの糞便をショ糖浮遊法及び塩化セシウム浮遊法により精製した後、オーシスト濃度を血球計算盤計数で求めた。希釈調製した所定濃度のオーシスト液から核酸を抽出し、鋳型として用いた。この鋳型は、河川水試料からの検出の際の標準試料としても使用した。

リアルタイムRT-PCR法による河川試料からのオーシストの検出には、利根川水系の河川水試料を用いた。平成21年11月および12月に利根川本川および支川の7地点より各2試料、計14試料の河川水を採取した。親水性PTFEメンブレンフィルター法<sup>16)</sup>によって、河川水10lを約10mlまで濃縮した後、免疫磁気ビーズ法<sup>10)</sup>による精製・濃縮操作を行い、約110 $\mu$ lまで濃縮した。濃縮試料の半量（約55 $\mu$ l）をリアルタイムRT-PCR法、RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法<sup>13)</sup>に供し、残りの半量を顕微鏡検査に供した。

### 2.2 核酸抽出方法

マウスの糞便から精製したオーシストおよび河川水試料からの核酸（DNAおよびRNA）の抽出は、-80℃と室温での凍結融解を5回行い、次に溶解液を添加し（反応チューブ内溶解液終濃度：10mM Tris-HCl (tris-hydroxy methyl-aminomethane, pH7.6), 1 mM EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid), 20mM NaCl, 0.1% (w/v) TritonX-100, 2 mM DTT (dithiothreitol), 1.5mAnson-U/ml Proteinase K), 60℃で30分間溶解反応を行った。その後2分間の超音波処理を行い、さらに75℃で10分間の追加反応を行った。この核酸抽出液を95℃で5分間加熱し、Proteinase Kを失活させた後、水中で急冷した。

## 2.3 リアルタイムPCR法

本研究では、Table 1に示す3つのリアルタイムPCR系を検討対象とした。プライマー濃度、プローブ濃度、PCR条件等の実験条件は既報に従った<sup>11-13)</sup>。また、リアルタイムPCR装置としてLightCycler® (Roche)を用いた。蛍光曲線の立ち上がり時間 (Crossing Point: Cp値) は、リアルタイムPCR装置に付属するソフトウェアを用いてSecond derivative maximum法 (2次微分最大値法) で解析した。

## 2.4 リアルタイムRT-PCR法

本研究では、逆転写反応とリアルタイムPCR法を別々に行う2ステップのリアルタイムRT-PCRを実施した。逆転写反応には、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time; Takara)を用いた。逆転写プライマーにはTable 1に示したReverseプライマーを用い、反応チューブ内濃度を2.5µMに調整した。サーマルサイクラーを用いて37℃、15分間の逆転写反応を実施した後、85℃で5秒間加熱し、酵素を失活させた。逆転写後の試料は方法2.3のリアルタイムPCR法と同様の操作で、遺伝子定量を行った。

## 2.5 複数のリアルタイムPCR系の比較試験

3つのリアルタイムPCR系の比較試験には、鑄型を $2.4 \times 10^{-1} \sim 2.4 \times 10^3$  oocysts/tubeまで10倍毎の連続希釈濃度で調製し、各濃度段階につき2連でリアルタイムPCR

法を実施した。PCR増幅産物は、1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動解析に供した。

## 2.6 オーシスト内部のrRNA遺伝子数の測定方法およびリアルタイムRT-PCR法の感度試験

オーシスト内部のrRNA標的配列のコピー数は、上述の精製オーシストより、人工合成遺伝子を標準試料として測定した。標準試料の人工合成遺伝子は、標的遺伝子配列 (Accession No.: AF161856の187-378まで) を合成し (つくばオリゴサービス (株))、バイオアナライザ (Agilent, 2100 bioanalyzer) を用いて濃度を測定した後、希釈調整した。 $10 \sim 10^5$  copies/tubeに調製した人工合成遺伝子を用いて検量線を作成し、オーシストからの核酸抽出液に対しリアルタイムRT-PCR法を実施することで、オーシスト内部のrRNA遺伝子数を測定した。鑄型を $7.5 \times 10^{-4} \sim 7.5 \times 10^{-2}$  oocysts/tubeの範囲で10倍毎の連続希釈濃度で調製し、各濃度段階につき3連で実施し (計9回)、1オーシストあたりの平均のrRNA遺伝子数を測定した。

また、リアルタイムRT-PCR法の感度試験は、 $7.5 \times 10^{-6} \sim 7.5 \times 10^{-1}$  oocysts/tubeの範囲で各濃度段階につき2連でリアルタイムRT-PCR法を実施した。

## 2.7 リアルタイムRT-PCR法と顕微鏡観察法による河川試料からの検出

濃縮・精製後の河川試料のうち半量に対し、核酸抽出を実施した後、構築したリアルタイムRT-PCR法を用い

Table 1 Nucleotide sequences of PCR primers and TaqMan probes used to quantify *Cryptosporidium* spp.

Amplification target	Function	Sequence (From 5' to 3') <sup>a</sup>	Length of PCR product	Reference
18S rRNA	Forward primer	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	295	Keegan <i>et al.</i> , 2003 <sup>11)</sup>
	Reverse primer	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC		
	TaqMan probe	ACCAGACTTGCCCTCC		
18S rRNA	Forward primer	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	295	King <i>et al.</i> , 2005 <sup>12)</sup>
	Reverse primer	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC		
	TaqMan probe	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC		
18S rRNA	Forward primer	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCA	182	Miller <i>et al.</i> , 2006 <sup>13)</sup>
	Reverse primer	CATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGG		
	TaqMan probe	CTCCCTCTCCGGAATCGAA		

<sup>a</sup> TaqMan probe oligonucleotides were labeled with 6-FAM at the 5'-end and the quencher (TAMRA or BHQ-1) at the 3'-end.

て三連で試験を行った。また、特異性を確認するため、異なるプライマーで別の領域 (Accession No.: L16996の413-611まで) を増幅するRT-LAMP法<sup>14)</sup>を同時に実施した。本法では、リアルタイムPCR法と同様に18S rRNA遺伝子を対象としているが、増幅される部位が大きく異なっている。RT-LAMP法の試薬にはLoopampクリプトスポリジウム検出試薬キット (栄研化学) を使用した。試薬キットには各5 pmolのアウタープライマーCryF3及びCryB3、各20pmolのルーブプライマーCryLF及びCryLB、各40pmolのインナープライマーCryFIP及びCryBIP、8 Uの*Bst* polymeraseが含まれている。さらに1.5UのReverse Transcriptaseを添加し、これにRNA抽出液5  $\mu$ lを加えて25  $\mu$ lとし、63°Cで60分間RT-LAMP反応を行った。濁度の連続測定にはLoopampリアルタイム濁度測定装置 (Realoop-30、モリテックス) を用いた。

顕微鏡観察用の試料は、定法<sup>10)</sup>に従い、親水性PTFEメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過し、染色操作を行った。すなわちはじめに、メンブレンフィルターの中央に撥水ペンで直径約15mmの円を描き、PBS (Phosphate Buffer Saline) で濡らした後、約200  $\mu$ lのブロッキング試薬 (10%ウシ血清アルブミン添加PBS溶液) をメンブレンフィルターの円内全面に行き渡るように滴下した。室温で約5分間作用させた後、残ったブロッキング試薬を吸引除去した。次に、濃縮・精製後の河川試料のうち、半量 (約55  $\mu$ l) を円内全面に行き渡るように吸引ろ過した後、約200  $\mu$ lのブロッキング試薬を滴下した。室温で約5分間作用させた後、吸引除去した。その後、メンブレンフィルターをスライドガラス上に移し、湿箱に入れ、60  $\mu$ lの蛍光抗体染色液 (EasyStain™、BTF) を円内全面に行き渡るように滴下し、室温で25分間反応させた。さらにDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色液 (0.4 mg/l) 100  $\mu$ lを滴下し、5分間反応させた後、吸引ろ過し、PBS約10mlを用いてろ過洗浄した。最後に、スライドガラス上にメンブレンフィルターを載せ、市販の蛍光試料用水性封入剤 (Fluoprep、BioMerieux) を用いて封入処理を行い、プレパラートを作製した。

作製したプレパラートを微分干渉装置付き倒立型蛍光顕微鏡 (IX71、OLYMPUS) により観察した。はじめに、B励起光下200倍で観察し、アップルグリーン色の蛍光を発する4~6  $\mu$ mの類円形の蛍光粒子を探索した。G励起光下で赤色の蛍光を発していないことを確認した粒子は、UV励起光下1000倍で観察し、スポロゾイトの核の有無を観察した。さらに1000倍の微分干渉像でオーシストの内部構造の有無を観察した。蛍光観察によってオーシスト

壁のみ観察できたものを推定数 (Suspected) とし、さらに核やその他のクリプトスポリジウムオーシストに特徴的な内部構造が観察されたものを確定数 (Confirmed) とした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 複数のリアルタイムPCR系の比較

検討した3つのリアルタイムPCR系のいずれにおいても、 $2.4 \times 10^{-1} \sim 2.4 \times 10^3$  oocysts/tubeの範囲で蛍光曲線の立ち上がりが確認され、初期オーシスト濃度 (Log値) とCp値との間に良好な線形関係が見られた (Fig. 1)。一方、 $2.4 \times 10^{-2}$  oocysts/tube以下の濃度では、蛍光曲線の立ち上がりは確認されなかった。他の2系と比較すると、Millerら<sup>13)</sup>のPCR系は試料毎の変動が少なかった。また、アガロース電気泳動で増幅産物を確認すると、Keeganら<sup>11)</sup>とKingら<sup>12)</sup>のPCR系では、プライマーダイマーあるいは未反応のプライマーが低分子の領域に認められ (Fig. 2)、効率の良い増幅が行われているか疑問が持たれた。一方、Millerらの系<sup>13)</sup>においては、このようなバンドは確認されなかった。また、蛍光曲線の立ち上がり時の傾きが大きく、少ないサイクルで飽和に達し、増幅と検出の効率が比較的高いことが推測された。さらに、PCR終了時の蛍光強度は試料間の変動が小さく強度が揃っており、初期濃度に依存することなく反応が最後まで進行していることが示唆された。特に低濃度のオーシストからの増幅が他の2系と比較すると良好であった。これらのことから、比較した3つのPCR系の中では、Millerらの系が良好と判断された。

#### 3.2 オーシスト内部のrRNA遺伝子数とリアルタイムRT-PCR法の感度試験結果

良好と判断されたMillerらのリアルタイムPCR系を使用して、濃度既知の合成遺伝子を使った検量線を作成し、一方、濃度調整したオーシスト抽出試料に対してはリアルタイムRT-PCRを行い、オーシスト内のrRNAから逆転写反応で得られるcDNAを定量した。その結果、1オーシストあたり約27,400コピー (n=9, 標準偏差=1,930) の標的配列、すなわちrRNAが存在することが判明した。オーシスト内のrDNA遺伝子数は20コピー (=ゲノム上5コピー×オーシスト内4スポロゾイト) と計算されるが<sup>16)</sup>、逆転写反応を追加してオーシスト内部のrRNAをcDNAに変換することで、標的のコピー数を大幅に増大させ、高感度化が可能であることを改めて確認し

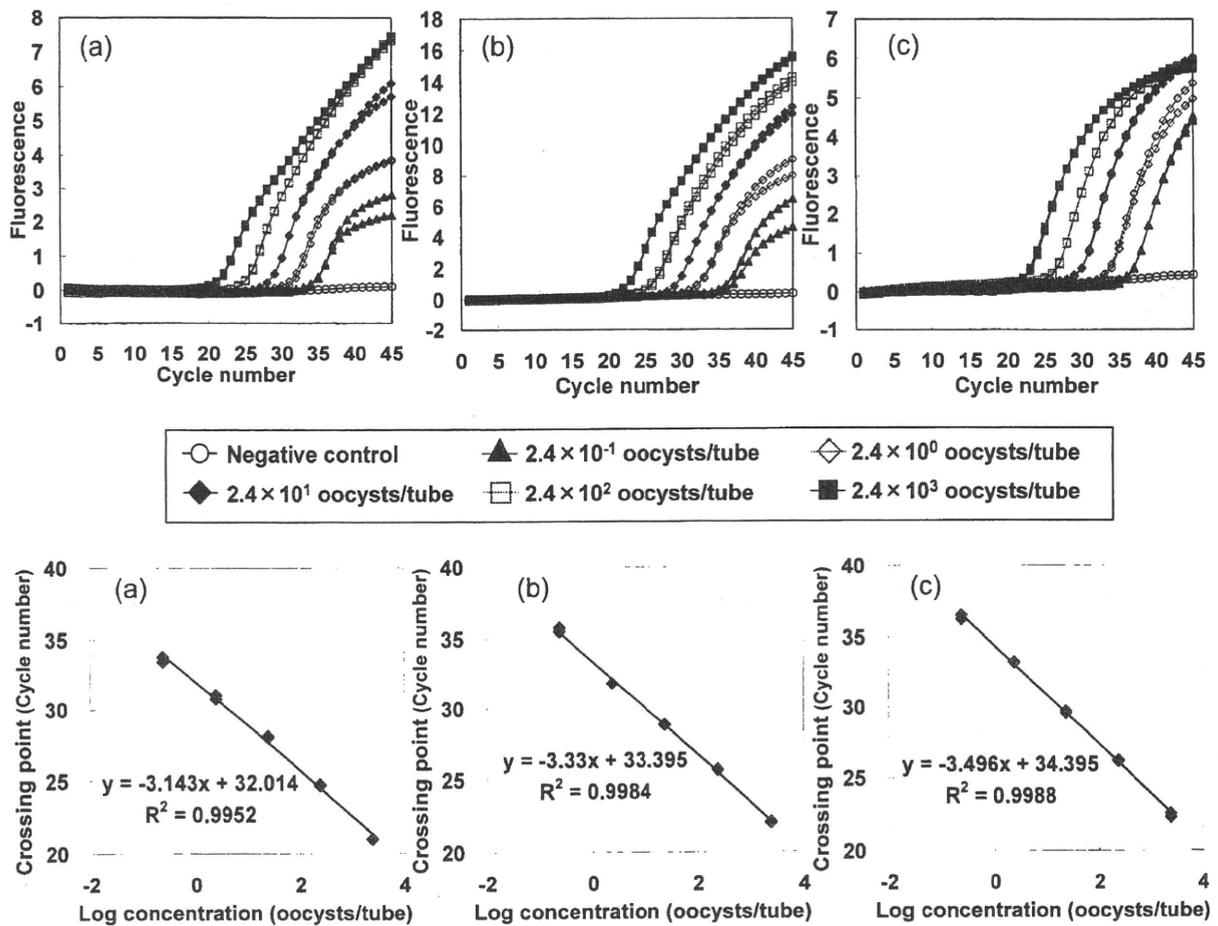


Fig. 1 Amplification plots and standard curves of the real-time PCR assays reported by (a) Keegan *et al.*<sup>11)</sup>, (b) King *et al.*<sup>12)</sup>, (c) Miller *et al.*<sup>13)</sup> using 10-fold serial dilution of template DNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

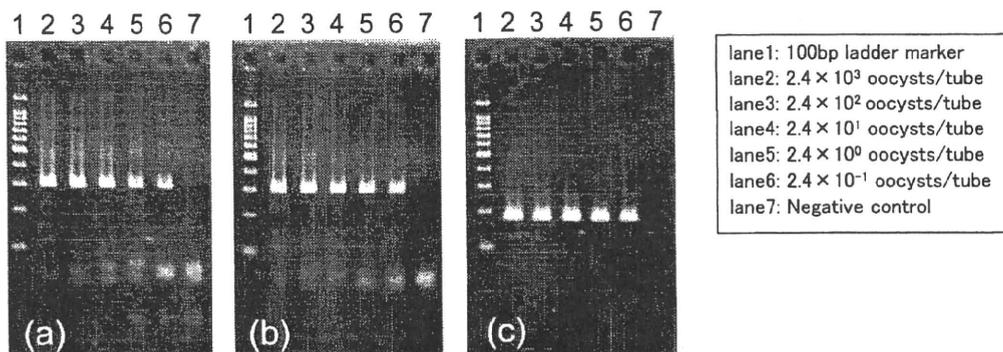


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of the real-time PCR assays reported by (a) Keegan *et al.*<sup>11)</sup>, (b) King *et al.*<sup>12)</sup>, (c) Miller *et al.*<sup>13)</sup> using 10-fold serial dilution of template DNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

た。

実際に $7.5 \times 10^{-6} \sim 7.5 \times 10^{-1}$  oocysts/tubeの範囲で段階希釈した試料をリアルタイムRT-PCR法に供した結果、 $7.5 \times 10^{-5}$  oocysts/tubeの極めて低濃度からも遺伝子増幅を確認できた (Fig. 3, 4)。 $7.5 \times 10^{-6}$  oocysts/tubeでは、2連で実施した試験のうち、一方では、増幅が確認されなかった。 $7.5 \times 10^{-5}$  oocysts/tubeの濃度では2反応とも蛍光曲線の立ち上がりは確認されたものの、Table 2に示すように他の希釈段階に比べてCp値のばらつきは大きかった (変動係数: 1.81%)。一方、 $7.5 \times 10^{-4}$  oocysts/tube以上の濃度では、Cp値が安定していた (変動係数: 0.07-0.52%)。このことから、本研究で開発したリアルタイムRT-PCR法の定量下限は $7.5 \times 10^{-4}$  oocysts/tubeであると判断した。

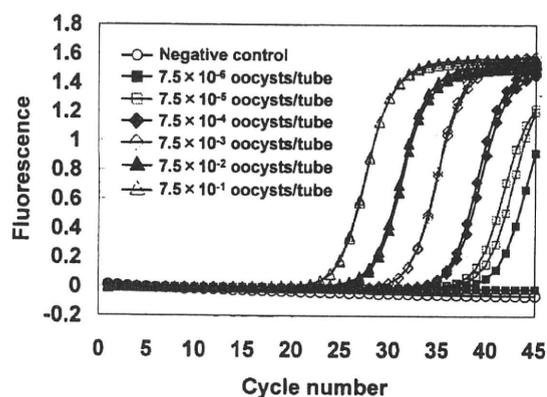


Fig. 3 Quantification limit of the real-time RT-PCR assay using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

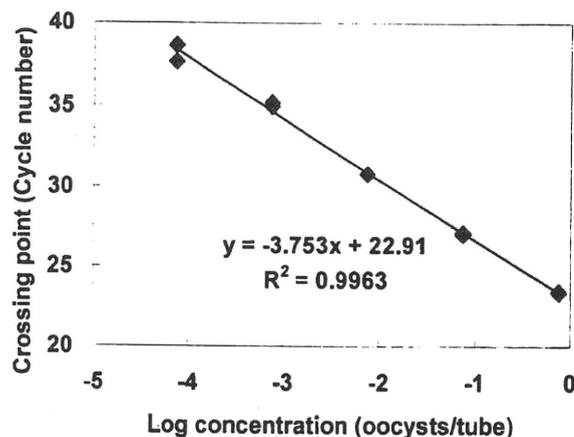


Fig. 4 Standard curve of the real-time RT-PCR assay using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

なお、通常のリアルタイムPCR法においても、先述のように $0.24$  oocysts/tubeの濃度から検出可能であったが、試料水中のオーシストDNAの全量を1反応チューブに濃縮することは極めて困難であり、一方、試験水量を増やすのは負担が大きく、DNA検査で10lの水試料中の1オーシストを検出するのは実用的ではないと考えられた。一般に遺伝子検査では、試料液量として5 $\mu$ l程度を使用することが多いが、免疫磁気ビーズ法による通常の精製・濃縮を実施しても、100 $\mu$ l程度までしか濃縮することができず、この場合は1 oocyst/100 $\mu$ l = 0.05 oocysts/5 $\mu$ lとなり、検出下限を下回る。仮に濃縮ができたとしても使用可能なDNA抽出液量には限りがあり、繰り返し試験や同じ濃縮抽出試料からジアルジア検査も実施したいことを考えると、感度はできるだけ高いことが望まれる。また、阻害物質が濃縮されて偽陰性になる恐れも否定できない。これまでにクリプトスポリジウム等の遺伝子検出は多数報告されていたが、低感度で複数のオーシストを必要としたり、試料を極限まで濃縮する必要があったり、コンタミネーションが心配されるNested-PCRを必要としたりしていた<sup>17)</sup>。当該研究のリアルタイムRT-PCR法はこれまでに報告された従来の遺伝子検査法<sup>17)</sup>と比べ、定量感度が著しく高く、より実用的な検査法であると考えられた。

RNAからの検査法としては、hsp70のmRNAを対象としたRT-PCR法も開発されているが<sup>18)</sup>、本研究で開発したrRNAを対象としたリアルタイムRT-PCR法と比べて、検出感度は2オーダー以上低く、また、オーシスト由来のmRNAはrRNAと比較して分解速度が高いことが報告されている<sup>19)</sup>。このため、浄水場等の現場で安定してオーシストを検出するためには、当該研究のようなrRNAの検出が適していると考えられる。また、高感度な遺伝

Table 2 Cp values of each diluted sample in the real-time RT-PCR assay

<i>Cryptosporidium</i> oocyst concentration (oocysts/tube)	Cp value	Coefficient of variation (%)
$7.5 \times 10^{-1}$	23.33, 23.47	0.42
$7.5 \times 10^{-2}$	26.98, 27.08	0.26
$7.5 \times 10^{-3}$	30.77, 30.80	0.07
$7.5 \times 10^{-4}$	34.93, 35.19	0.52
$7.5 \times 10^{-5}$	37.66, 38.64	1.81
$7.5 \times 10^{-6}$	39.88, —	—

子検出法を使用することで試料を全て使わずに済み、残りの試料からジアルジアの検査を行ったり、別の遺伝子増幅を行ったりすることも可能と考えられる。

### 3.3 実試料への適用

新しく構築したリアルタイムRT-PCR系を河川水試料に適用した結果、河川試料中のオーシスト濃度を定量することが可能であった (Table 3)。3回の測定値間の変動も小さく、リアルタイムRT-PCR法の定量値は安定していた。また、陰性試料が少なかったものの、リアルタイムRT-PCR法とは異なる増幅領域でプライマーが設計されているRT-LAMP法とも定性的な検出結果が一致したことから、偽陰性・偽陽性等の特異性の問題が生じている可能性は低いと考えられた。

リアルタイムRT-PCR法と顕微鏡観察結果を定性的に比較すると、概ね一致していることがわかるが、14試料中3試料で試験結果が異なった。本研究では、2.1節で述べたように、10Lの河川水を濃縮・精製した後、試料を2つに分離してリアルタイムRT-PCR法と顕微鏡観察に供しているため、元の試料中のオーシスト濃度が低い場合

は、偶然片方の検査試料にしかオーシストが入らない可能性があり、この確率の問題が2手法の定性的結果に差が生じた要因と考えられた。また、顕微鏡観察法では、フィルターろ過や染色工程においてオーシストが損失される作業があり、さらに検査者の判断がオーシスト同定に影響することが要因の一つかもしれない。

リアルタイムRT-PCR法と顕微鏡観察の定量値に関しては、Fig.5に示すように、リアルタイムRT-PCR法による定量値と顕微鏡観察推定値との間に高い相関が見られたことから (寄与率 $R^2=0.75$ )、新しく構築したリアルタイムRT-PCR法による定量値は妥当なものであると考えられた。一方、顕微鏡観察確定値との間には明確な相関が見られなかった (寄与率 $R^2=0.24$ )。顕微鏡観察によるオーシストの確定判断には、スポロゾイト等のクリプトスポリジウムに特徴的な内部構造を観察する必要があるが、フィルター上の夾雑物とオーシストの位置や角度によっては、明瞭な内部構造を観察できないこともあり、通常、確定値は推定値より低い値となる。リアルタイムPCR法と顕微鏡観察法の結果を比較するためには、正確な推定および確定判定を行う必要があり、今後の課題と考え

Table 3 Quantification and detection of *Cryptosporidium* oocyst in river water samples.

Time of sample collection	Sampling site <sup>*1</sup>	Microscopic observation (oocysts/5L)		Real-time RT-PCR (oocysts/5L)		RT-LAMP
		Suspected <sup>*2</sup>	Confirmed <sup>*2</sup>	Average	CV (%) <sup>*3</sup>	
Nov-09	A	1	0	0.22	6.6	+ <sup>**</sup>
	B	1	1	- <sup>**</sup>	-	- <sup>**</sup>
	C	0	0	-	-	-
	D	2	1	0.91	4.3	+
	E	0	0	0.11	7.6	+
	F	5	3	0.024	23	+
	G	8	3	0.24	14	+
Dec-09	A	0	0	4.8	3.6	+
	B	2	2	7.7	0.71	+
	C	0	0	-	-	-
	D	6	2	20	13	+
	E	7	1	17	4.3	+
	F	15	2	20	17	+
	G	20	3	47	14	+

<sup>\*1</sup> Sampling sites A and B are located in Tone River and C, D, E, F, G are located in tributary rivers of Tone River.

<sup>\*2</sup> Definition of "suspected" and "confirmed" oocysts is written in section 2.7.

<sup>\*3</sup> Coefficient of variation (n = 3)

<sup>\*\*</sup> + = positive, - = negative

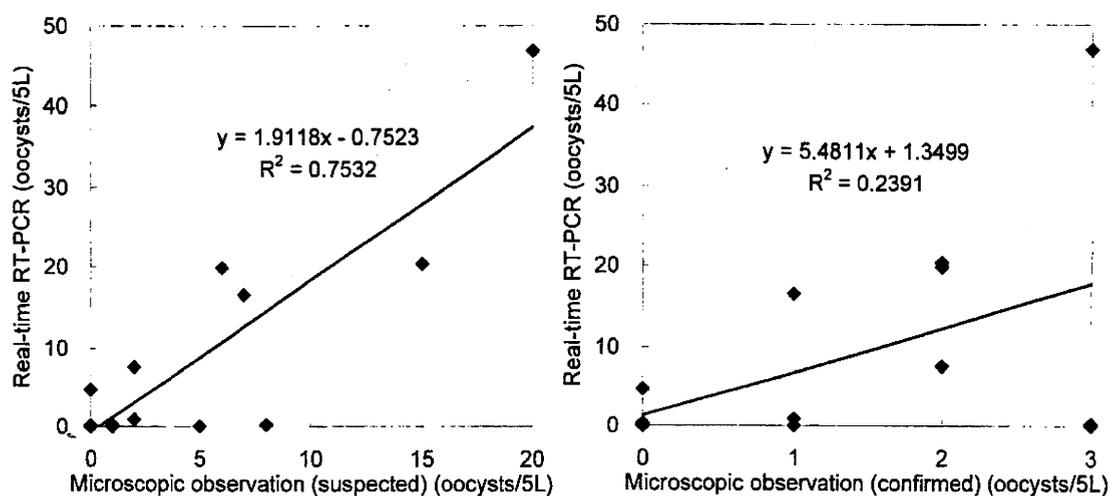


Fig. 5 Correlation of *Cryptosporidium* oocyst concentration in river water samples determined by the real-time RT-PCR assay, compared with that determined by conventional microscopic observation (Left: suspected value, Right: confirmed value).

られた。

また、11月にサイトFおよびGで採取した2試料に関しては、リアルタイムRT-PCR法の定量値が顕微鏡観察法の値より1オーダー以上低くなった。さらに、サイトFから採取した試料では、定量値が0.024 oocysts/5Lと、極めて小さい値を示した。本研究では、免疫磁気ビーズ法によって試料の精製を行っているが、PCR阻害物質を完全に除去することは困難であるので、一部の試料で阻害の影響が出ることで、定量値が低くなった可能性が考えられる。mRNA遺伝子を対象とした既報のRT-PCR法においても<sup>20)</sup>、河川水試料では、井戸水等の清澄な試料に比べ、検出感度が低くなることが報告されている。今後は同じ系統の河川水のみでなく、湖沼水等も含めたより多くの試料に対して検討を進め、顕微鏡観察法とリアルタイムRT-PCR法の定量値を比較していく必要があると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では、水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度を定量可能な、高感度かつ実用的なリアルタイムRT-PCR法を確立した。得られた成果を以下に列挙する。

1) 既報の3つのリアルタイムPCR系を比較した結果、MillerらのPCR系は、他の2系と比較して、試料毎の蛍光曲線の挙動の変動が小さく、増幅効率も高いことが推測された。特に低濃度のオーシストからの増幅が良好であると考えられた。さらに他の2系と異なり、非

特異産物の生成も確認されなかったことから、MillerらのPCR系が最も実用的であると考えられた。

- 2) オーシスト内部に大量に存在するrRNAを逆転写反応によってcDNAに変換させることで、増幅対象となるDNA数を1000倍以上増加させることが可能であった。Millerらが報告した系に逆転写反応を組み合わせてリアルタイムRT-PCR法とすることで、感度を大幅に上昇させ、 $7.5 \times 10^{-4}$  oocysts/tubeから定量可能な高感度な検査系を構築することに成功した。
- 3) リアルタイムRT-PCR法は、特異性の問題を生じることなく、実河川試料からオーシストを定量することが可能であり、顕微鏡観察法と同様の定量結果が得られた。リアルタイムRT-PCR法による定量値と顕微鏡観察による推定値との間には高い相関が見られた ( $R^2 = 0.75$ ,  $n = 14$ )。

#### 5. 謝辞

本研究は平成19~21年度の厚生労働省科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(H19-健危-一般-012)の補助を受けて実施した。

#### 引用文献

- 1) 上村 清、井関基弘、木村英作、福本宗嗣：寄生虫学テキスト第3版、文光堂、34-35、東京 (2008)
- 2) 黒木俊郎、泉山信司、遠藤卓郎：クリプトスポリジ

- ウムの最近の知見、モダンメディア、51 (4)、75-80 (2005)
- 3) Crapenter, C., Fayer, R., Trout, J., and Beach, M. J.: Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*, *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 579-584 (1999)
  - 4) Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W., Villacorta Martiez de Maturana, I., and Debacker, E.: Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Appl. Environ. Microb.*, 55, 1519-1522 (1989)
  - 5) Cicirello, H. G., Kehl, K. S., Addiss, D. G., Chusid, M. J., Glass, R. I., Davis, J. P., and Havens, P. L.: Cryptosporidiosis in children during a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin: clinical, laboratory and epidemiologic findings, *Epidemiol. Infect.*, 119, 53-60 (1997)
  - 6) Corso, P. S., Kramer, M. H., Blair, K. A., Addiss, D. G., Davis, J. P., and Haddix, A. C.: Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin, *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 426-431 (2003)
  - 7) MacKenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., Kazmierczak, J. J., and Davis, J. P.: Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission, *Clin. Infect. Dis.*, 21, 57-62 (1995)
  - 8) 埼玉県衛生部：クリプトスポリジウムによる集団下痢症—越生町集団下痢症発生事件—報告書 (1997)
  - 9) Pelly, H., Cormican, M., O'Donovan, D., Chalmers, R., Hanahoe, B., Cloughley, R., McKeown, P., and Corbett-Feeney, G.: A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report, *Euro Surveill.*, 12, pii=3187 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3187> (2007)
  - 10) 厚生労働省健康局水道課：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 (健水発第0330006号) (2007)
  - 11) Keegan, A. R., Fanok, S., Monis, P. T., and Saint C. P.: Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* Disinfection, *Appl. Environ. Microb.*, 69, 2505-2511 (2003)
  - 12) King, B. J., Keegan, A. R., Monis, P. T., and Saint C. P.: Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity, *Appl. Environ. Microb.*, 71, 3848-3857 (2005)
  - 13) Miller, W. A., Gardner, I. A., Atwill, E. R., Leutenegger, C. M., Miller, M. A., Hedrick, R. P., Melli, A. C., Barnes, N. M., and Conrad, P. A.: Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*), *J. Microbiol. Meth.*, 65, 367-379 (2006)
  - 14) 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 Sci. Technol.*, 60, 2167-2172 (2009)
  - 15) Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T., and Endo, T.: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan, *Parasitol. Res.*, 87, 950-955 (2001)
  - 16) Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Konfortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., and Kapur, V.: Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*, *Science*, 304, 441-445 (2004)
  - 17) Smith, H. V. and Nichols, R. A.: *Cryptosporidium*: detection in water and food, *Exp. Parasitol.*, 124, 61-79 (2010)
  - 18) Nam, S. and Lee, G.: A new duplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts, *Biomed. Environ. Sci.*, 23, 146-150 (2010)
  - 19) Widmer, G., Orbach, E. A., and Tzipori S.:  $\beta$ -Tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability, *Appl. Environ. Microb.*, 65, 1584-1588 (1999)
  - 20) Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., and Sandery, M.: Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription-PCR, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 3385-3390 (1999)

(受付 2010. 5.19)

(受理 2010. 9.21)

## Source of *N*-nitrosodimethylamine in river waters of the upper Tone River basin in Japan

K. Kosaka, K. Fukui, M. Asami and M. Akiba

### ABSTRACT

The presence of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) in the Hirose River and its tributaries, located in the upper Tone River basin, in the Kanto region of Japan, was investigated. NDMA was detected at high levels in the Arato River, one of the tributaries of the Hirose River, at high concentrations (up to 2,100 ng/L). Due to the confluence of the Arato River, NDMA concentration in the Hirose River increased (up to 61 ng/L). The NDMA in the Arato River was due to industrial discharge from a livestock processing plant located near the river. There were three discharges at the plant, with NDMA concentrations of 78, 11, and 33,000 ng/L. The industrial discharges from the livestock processing plant did not contain significant amounts of NDMA precursors on chloramination. On the other hand, sewage effluent was shown to contain NDMA precursors. The amounts of NDMA precursors in the sewage effluent that were rapidly transformed into NDMA were considered to be lower than those slowly transformed into NDMA.

**Key words** | Arato River, chloramination, drinking water source, Hirose River, *N*-nitrosodimethylamine, Tone River basin

K. Kosaka (corresponding author)  
K. Fukui  
M. Asami  
M. Akiba  
Department of Water Supply Engineering,  
National Institute of Public Health,  
2-3-6 Minami,  
Wako, Saitama 351-0197,  
Japan  
E-mail: kosaka@nipih.go.jp

### INTRODUCTION

*N*-nitrosodimethylamine (NDMA) is a potent carcinogen (United States Environmental Protection Agency [US EPA] 1993). Although no longer used directly in industry, NDMA has been used in the past in a wide range of products, e.g. as an intermediate of unsymmetrical dimethyl hydrazine (UDMH), as an additive of gum products and polymers, and in solvents in the plastics industry (Najm & Trussell 2001). It has also been reported that NDMA was contained in various foods (e.g. meat, meat products, fish, fish products, beer, and milk; San Francisco Public Utilities Commission 2007). At present, NDMA is not listed as a federal standard item in drinking water regulation in the USA. However, NDMA is listed as a contaminant in Contaminant Candidate List 3 (US EPA 2008). The World Health Organization (WHO) Guidelines for drinking water quality (WHO 2008) specifies a target value of NDMA in drinking water of 100 ng/L. In Japan, NDMA was listed as an item for monitoring in 2009, and a target value of 100 ng/L was set

in April 2010 (Water Supply Division, Health Bureau, Ministry of Health, Labour, and Welfare 2010).

The occurrence of NDMA in drinking and wastewaters has been investigated in detail in the USA and Canada (Najm & Trussell 2001; Mitch *et al.* 2003; Charrois *et al.* 2007; California Department of Public Health 2009). NDMA concentrations in river water have also been reported (Schreiber & Mitch 2006; Plumlee & Reinhard 2007). NDMA is known to be a chloramination disinfection byproduct (Mitch *et al.* 2003; Mitch & Sedlak 2004; Chen & Valentine 2006). However, NDMA is also formed during ozonation (Andrzejewski *et al.* 2008; Schmidt & Brauch 2008; Asami *et al.* 2009b; Tateishi *et al.* 2009).

In Japan, the occurrence of NDMA in drinking and environmental waters has been reported, mainly focusing on two basins located in the Kansai and Kanto regions, i.e. the Yodo and Tone River basins, respectively. The river waters in both basins are used as sources for the local water

supplies. In the case of the Yodo River basin, NDMA is derived mainly from upstream sewage effluents (Kosaka *et al.* 2009a; Tateishi *et al.* 2009). Some sewage effluents were also shown to contain NDMA precursors on ozonation. One sewage effluent, which contained NDMA at high concentrations (several hundred nanograms per liter) employed ozonation. On the other hand, there have been no reports of high concentrations of NDMA precursors on ozonation in the case of the Tone River basin (Asami *et al.* 2009b). NDMA was frequently detected at levels of several nanograms per liter in raw water from the middle stretches of the Tone River basin (Kosaka *et al.* 2009b). The raw waters also contained NDMA precursors on chloramination. The sources of NDMA precursors were shown to include sewage effluents in the upper Tone River (Kosaka *et al.* 2009b), as reported previously (Schreiber & Mitch 2006). Among the samples analyzed in this previous study, NDMA concentrations were relatively high in the Hirose River, one of the tributaries of the upper Tone River. However, the origin of NDMA in the river has not been determined.

The present study was performed to investigate the occurrence and concentration of NDMA in the upper Tone River basin, focusing on the Hirose River and its tributaries. In addition, NDMA formation on chloramination was also investigated in the present study.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and solutions

Ultrapure water purified with a Gradient A10 water purification system (Millipore, Bedford, MA) was used in this study. Distilled water purchased from Kanto Chemical (Tokyo, Japan) was used to prepare the mobile phase for use in ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS). NDMA and NDMA-*d*<sub>6</sub> were purchased from Supelco (Bellefonte, PA), and C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada), respectively. Chloramine solution was prepared by mixing ammonium chloride solution and hypochlorite solution at a molar ratio of 1.2 of nitrogen to 1 of chlorine (Mitch & Sedlak 2002). Fresh chloramine solution was prepared on each experimental day.

### Sampling

Figures 1 a and b show a map of the Tone River basin and schematic of the sampling area with sampling points, respectively. The samples collected were surface waters (i.e. Hirose River, its tributaries, and channels), sewage effluent (i.e. S1), and industrial discharge (i.e. I1, I2, and I3). The Hirose River is one of the tributaries of the Tone River, and is located in the upper Tone River basin. River waters of the Tone River basin are used as sources for the water supply in the Tokyo Metropolitan Area. The Hirose River is used as the source water after the confluence with the Tone River. Connections and pathways of some channels (i.e. C4–C6) are not shown in the figure for ease of representation. Sampling was conducted in May–July 2009. All were grab samples, and those at several sampling points were collected on different days. The samples were filtered with 0.7- $\mu$ m GF/F filters (Whatman, Florham Park, NJ), and the filtrates were used. Table 1 shows the basic water quality parameters of some samples.

### Chloramination

In the present study, NDMA formation on chloramination was investigated by two procedures. The analytical methods for drinking water described by the Japan Water Works Association (2001) describe the formation potentials of disinfection byproducts of chlorination as 1–2 mg/L of chlorine at 24 h. These conditions were used as a reference for chloramination conditions in this study. That is, the chloramination conditions were as follows: reaction time, 24 h; chloramine concentration at 24 h,  $3.0 \pm 0.5$  mg/L; pH 7.0 (5 mM phosphate buffer); temperature, 20°C. These chloramination conditions were designated as chloramination I. Mitch & Sedlak (2004) proposed experimental conditions to evaluate total NDMA precursors on chloramination. Based on their study, chloramination conditions were set as follows: chloramine dose, 2 mM (140 mg/L), reaction time, 10 days; pH 7.0 (5 mM phosphate buffer); temperature, 20°C. These chloramination conditions were designated as chloramination II. Chloramination I was considered only to evaluate the amounts of NDMA precursors rapidly transformed into NDMA on chloramination.

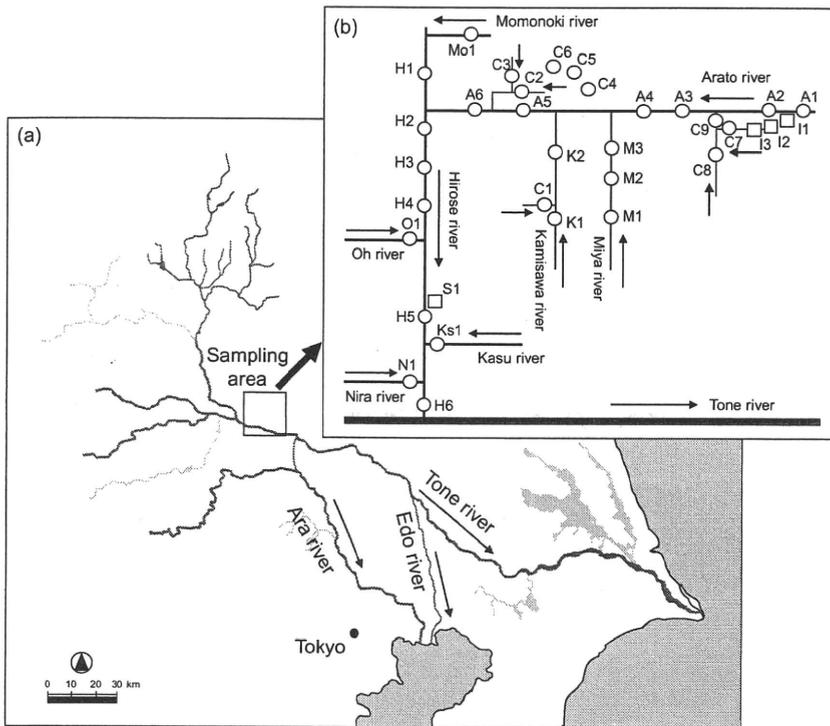


Figure 1 | (a) Map of the Tone River basin and (b) schematic of sampling area with sampling points.

Residual chloramine was quenched by sodium thiosulfate (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan).

### Analysis

NDMA concentration was determined by solid-phase extraction (SPE) followed by UPLC/MS/MS. NDMA-*d*<sub>6</sub> was used as an internal standard. The details of the analytical procedures were described elsewhere (Asami *et al.* 2009b; Kosaka *et al.* 2009a). Two Sep-Pak<sup>®</sup> Plus AC-2 cartridges (400 mg × 2; Waters, Milford, MA) were used for SPE, and

one Sep-Pak<sup>®</sup> Vac Florisil<sup>®</sup> cartridge (1 g; Waters) was used for cleanup. A mixture of dichloromethane and diethylether (1:1 v/v) was used for elution. Sample volume was generally 500 mL, but these were reduced for samples containing NDMA at high concentrations. The concentration factor was 2,500 for a sample volume of 500 mL. Separation was performed using an ACQUITY UPLC system (Waters) with a BEH C18 column (2.1 mm × 150 mm; Waters), and detection was performed using an ACQUITY TQD tandem mass spectrometer (Waters) operated in the electrospray ionization (ESI) positive-ion mode. The multiple reaction

Table 1 | Basic water quality parameters of the Arato River at A3, sewage effluent and industrial discharge

Sampling point	pH	DOC (mg/L)	UV <sub>260</sub> <sup>*</sup>	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)	DON (mg-N/L)
A3 <sup>†</sup>	7.7	1.8	0.052	1.7	0.37	3.4	0.72
S1	7.3	3.4	0.073	0.70	0.12	9.1	0.10
I1	7.5	25	0.21	8.7	<0.02	<0.02	6.1
I2	7.9	2.4	0.067	6.3	1.3	4.6	0.35
I3	7.6	6.3	0.11	68	15	31	0.46

<sup>\*</sup>Absorbance at 260 nm.

<sup>†</sup>Sampling day of A3 was 16 July 2009.

monitoring (MRM) transitions were  $m/z$  74.9 to 43.1 (quantification) and  $m/z$  74.9 to 57.9 (confirmation) for NDMA and  $m/z$  81.0 to 46.0 for NDMA- $d_6$ . The detection limit of NDMA was 1.0 ng/L, which was calculated by repetition analyses (number of repetitions ( $n$ ) = 5) of known concentration (2 ng/L) in different ultrapure water samples (Asami *et al.* 2009b).

Chloramine concentration was determined by titration using *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine and ferrous ammonium sulfate (APHA *et al.* 2005). Dissolved organic nitrogen (DON) concentration was calculated by subtracting nitrate, nitrite, and ammonia concentrations from dissolved nitrogen (DN) concentration. Nitrate and nitrite concentrations were determined by ion chromatography (IC) (DX-500; Dionex, Sunnyvale, CA). Ammonia concentration was determined spectrophotometrically with phenol (Japan Water Works Association 2001). DN concentration was determined using a TN analyzer (TNM-1; Shimadzu, Kyoto, Japan) connected to an organic carbon analyzer (TOC-V CPH; Shimadzu). Dissolved organic carbon (DOC) concentration was determined using the TOC-V CPH. Absorbance at 260 nm (i.e.  $UV_{260}$ ) was determined using a spectrophotometer (U-2800; Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan). pH was determined using a pH meter (PHM240 Meter Lab; Radiometer analytical, Lyon, France). Chlorate concentration was determined by IC (ICS-2000; Dionex) coupled with MS/MS (API 3200QTrap; Applied Biosystems, Foster, CA). Analytical conditions of IC/MS/MS were described elsewhere (Kosaka *et al.* 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Occurrence of NDMA in the upper Tone River basin

Table 2 shows NDMA concentrations in the samples. Some samples were extracted and analyzed two or three times (i.e. repetition analyses), and the relative standard deviations (RSDs) were 0.9–19%. Figures 2 and 3 show profiles of NDMA concentrations in the Hirose River and one of its tributaries, the Arato River (Figure 1 b), respectively.

In the Hirose River, NDMA concentration at H1 was low (1.0 ng/L), but increased after the confluence of the Arato River and the concentration of NDMA at H2

was 4.6–61 ng/L. NDMA concentrations decreased downstream and were 1.9–22 ng/L. Sewage effluent containing NDMA (95 ng/L) flowed into the Hirose River, but did not affect NDMA concentration in the river. This was considered to be because the flow rate of the sewage effluent was much lower than that of the Hirose River. NDMA concentration in the Hirose River at H6, just before confluence with the Tone River, was 1.9 ng/L.

NDMA concentrations in the Arato River and its tributaries were investigated to identify the sources of NDMA around H2 in the Hirose River. NDMA concentration in the upstream region (A1) of the Arato River was 2.3 ng/L. The NDMA level increased markedly at A3 (i.e. 370–2,100 ng/L), and decreased gradually in the downstream region. However, NDMA concentration was still high just before confluence with the Hirose River (12–130 ng/L). On the other hand, NDMA concentrations in the Miya and Kamisawa Rivers were 1.3–3.7 ng/L. These results indicated that the NDMA source in the Arato River was located between A2 and A3, and the amounts of NDMA discharge from this point fluctuated. NDMA concentrations in some channels around the Arase River, C2 and C5, were also high because these channels contained water from the Arato River.

There was a plant upstream of A2, from which there were three industrial discharges (i.e. I1, I2, and I3). Therefore, the NDMA concentrations at the three industrial discharge points were investigated. Among the three industrial discharges, I3 was only discharged after treatment (i.e. biological treatment). NDMA concentrations at I1, I2, and I3 were 78, 11, and 33,000 ng/L, respectively. Thus, NDMA was present at high levels in these discharges, particularly at I3. The discharge at I1 flowed directly into the Arato River between A1 and A2. However, NDMA concentration did not change markedly between A1 and A2, as described above. The discharges at I2 and I3 flowed into the channel. This channel (i.e. C7) was confluent with other channels (i.e. C8), and the confluent (i.e. C9) flowed into the Arato River between A2 and A3. Due to the high-level discharge from I3, NDMA concentrations in the channels were high (2,600–9,300 ng/L). These results suggested that the NDMA in the Arato River was mainly due to industrial discharge at I3. The plant is related to livestock processing, and feedstuff and fertilizer are