

膜汚過水濁度については、両系統とも高感度濁度計の検出下限値 (0.0001度) 以下だった。

砂汚過逆洗直後の初期漏出濁度は、系統間に大きな差異は見られなかった。しかし、逆洗後、汚過時間が進むにつれて、高塩基度 PAC 系砂汚過水濁度が従来型 PAC 系砂汚過水濁度より低くなり、高塩基度 PAC 系砂汚過水は、従来型 PAC 系砂汚過水より洗浄後の初期漏出濁度の清澄化が早くなった。同じ系統内において、各々の砂汚過塔間で砂汚過水濁度に差異はほとんどなかったことから、砂汚過塔の違いによる性能の差は小さいと考えられた。また、実験②の 4 条件においても、同様の傾向が得られた。このことから、系統間で見られた砂汚過水濁度の差異は、各砂汚過塔の性能の違いではなく、砂汚過までの前処理の違いにより生じたものであることが示された。また、高塩基度 PAC 系で見られた初期漏出濁度の清澄化が早い傾向は、原水濁度条件や凝集剤注入率の変更によらず、両系統の沈澱水濁度が同程度であったにもかかわらず、全ての条件で見られた。このことから、凝集剤の性状の違いが濁度以外の因子に影響を与えたことによって、この傾向が生じているものと推測された。

海老江らによると、初期漏出期～清澄期の汚層では、径の大きなフロックから順に抑留が進行し、汚層上部ほど至適凝集領域に近いゼータ電位を持つフロックが優先的に除去され、ゼータ電位が低く、凝集力が弱いフロックほど汚層から流出しや

すい¹⁹⁾としている。このことを考慮すると、高塩基度 PAC 系のフロックは従来型 PAC 系のフロックより粒径が大きく、ゼータ電位は至適凝集領域に近いことが考えられた。このことを検証するために、実験②で、沈澱水中フロックの粒径分布及びゼータ電位の測定を行った。

図-4に、実験②の各運転条件における24時間運転後の沈澱水中フロックの粒径分布を示す。高塩基度 PAC 系のほうが従来型 PAC 系より大きい粒径の粒子が多い分布の傾向が見られ、Wu らのジャーテストによる結果¹⁶⁾と同様の結果となった。前述したように高塩基度 PAC は、ポリマー (Al_b) 及びコロイド状態 (Al_c) のアルミニウム種の存在比が高いことから、架橋しやすいことがフロックの粒径が大きい一因と考えられた。沈澱水中フロックの粒径分布に差異がみられたのに対し、沈澱水中濁度は同程度であったことに対しては、何らかのフロックの性状違いに原因があるものと考えられる。

図-5に、実験②の各運転条件において、概ね 8 時間に 1 回採取した沈澱水中フロックのゼータ電位の測定結果を示す。ゼータ電位測定の結果、高塩基度 PAC 系のほうがゼータ電位の絶対値が小さくなり、至適凝集領域に近い傾向がみられた。両者のゼータ電位について t-検定 (有意水準 $\alpha = 0.05$) を行ったところ、凝集剤注入率 36mg/L の条件においては統計的に有意な差が見られた。

石川らは、コロイド滴定により、高塩基度

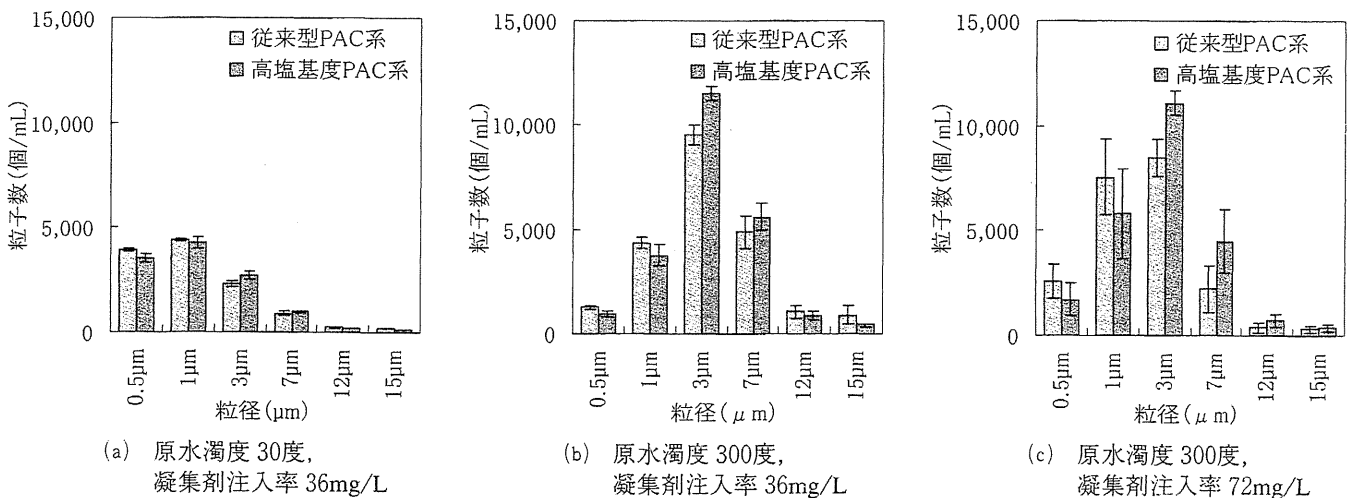


図-4 沈澱水に残留したフロックの粒径分布 (実験②)

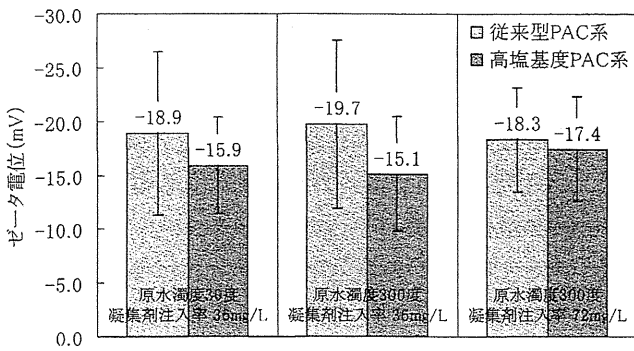


図-5 沈澱水に残留したフロクのゼータ電位 (縦線は標準偏差) (実験②)

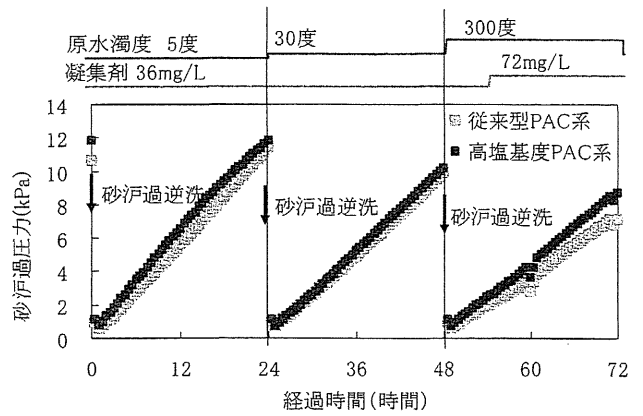


図-6 砂濾過圧力の経時変化 (実験①)

PACの荷電量が従来型PACより多いことを示している²¹⁾。また、Yanらは、塩基度の異なるPACを用いたジャーテストにより、pH7付近では塩基度が高いほどゼータ電位が高く¹⁵⁾、至適凝集領域に近くなることを示している。本研究結果は、これら既往の研究と整合していた。

以上のことから、高塩基度PAC系で砂濾過初期漏出の清澄化が早く、フロクが捕捉しやすい原因は、高塩基度PACの荷電量が多いことやポリマー及びコロイド状態のアルミニウム種が多いことにより、粒径が大きくゼータ電位が至適凝集領域に近いフロクが形成されたためと考えられた。

近年のクリプトスポリジウム等対策による低濁度管理においては、砂濾過逆洗直後の初期漏出濁度をいかに抑制するかが重要となっており、初期漏出水を捨水するなどの対策が求められている²¹⁾。高塩基度PACは初期漏出の清澄化が早いことから、高塩基度PACの使用により、捨水時間の短縮など、初期漏出濁度対策軽減化の可能性が示唆された。

(3) 砂濾過損失水頭の変化

図-6に、実験①における砂濾過圧力(一次圧力)の経時変化を示す。本実験装置は、砂濾過の二次圧が一定であるため、砂濾過圧力の経時変化は損失水頭の経時変化と同様と考えられる。

従来型PAC系と高塩基度PAC系で比較すると、設定原水濁度300度の条件(凝集剤注入率36mg/L及び72mg/L)では、高塩基度PAC系で砂濾過圧力上昇が大きい傾向が見られたが、原水濁度5度

及び30度の条件(ともに凝集剤注入率36mg/L)では、砂濾過圧力の上昇傾向に大きな差異は見られなかった。実験②の結果では、原水濁度300度の条件(凝集剤注入率36mg/L及び72mg/L)でも、砂濾過圧力の上昇傾向に凝集剤の塩基度の違いによる差異は見られなかったため、高塩基度PACの使用による砂濾過損失水頭上昇への影響は限定的と考えられた。

一方で、原水濁度と凝集剤注入条件で比較すると、凝集剤中のアルミニウム濃度と原水濁度の比(AL/T比)が最も大きい原水濁度5度、凝集剤36mg/Lの条件(AL/T比:0.38)で最も砂濾過圧力の上昇が大きくなり、続いて原水濁度30度、凝集剤36mg/Lの条件(AL/T比:0.06)となり、条件によって差異がみられた。AL/T比の小さい原水濁度300度の条件(凝集剤72mg/Lの場合はAL/T比:0.01)では、それぞれの運転期間が短いため一概に評価できないが、傾きから評価すると他の条件より砂濾過圧力の上昇は小さいものと考えられる。一般的にAL/T比が大きいほど損失水頭は大きくなる²⁰⁾が、本実験でもAL/T比が大きいほど砂濾過圧力上昇が大きくなる傾向を示した。

以上のことから、砂濾過圧力については、PACの塩基度の違いよりAL/T比の違いのほうが与える影響が大きかったため、高塩基度PACの使用は、従来型PACと比べても、砂濾過の操作性に大きな影響はないものと考えられた。

(4) 膜差圧の挙動

実験①における実験期間中の膜差圧挙動を図-7

に示す。膜差圧は、膜の一次圧と二次圧の差とし、25℃で補正した。

3 時間に 1 回膜の物理洗浄を実施しているため、設定した 3 時間毎に膜差圧の回復が見られている。従来型 PAC 系と高塩基度 PAC 系を比較すると、示したデータは 3 日間という短期的な挙動では、凝集剤（塩基度）の違いによる明確な差異は見られなかった。

図-7をもとに、3 時間に 1 回行っている物理洗浄の終了から次の物理洗浄の開始までの間に上昇した膜差圧をプロットしたものを図-8に示す。その結果、高塩基度 PAC 系膜差圧のほうが従来型 PAC 系膜差圧より、上昇幅が小さい傾向を示した。実験②では、膜モジュールを新しい膜モジュールに交換して行ったが、同じ傾向を示した。このことから、物理洗浄間で上昇した膜差圧で生じた差異は、膜モジュールの性能の違いによるものではなく、膜汚過までの前処理の違いにより生じた

ものと考えられた。

凝集条件により、膜差圧の挙動や膜のファウリングが影響を受けることが知られており²³⁾、膜汚過原水のアルミニウム濃度²⁴⁾やフロックのゼータ電位²⁵⁾及び粒径分布²⁶⁾が影響する可能性があるとの報告もある。本研究では、膜汚過原水である沈澱水において、高塩基度 PAC 系と従来型 PAC 系でこれらの項目に差異が生じていることから、物理洗浄間で上昇した膜差圧で生じた差異の原因は、沈澱水中フロックにおける、ゼータ電位や粒径分布などの物性の違いや残留アルミニウム濃度が影響しているものと考えられた。詳細については今後の検討課題と考えられる。

加藤らは、34 日間にわたる内圧式モノリス型セラミック膜を用いた実験で、高塩基度 PAC と従来型 PAC の膜汚過性を検討し、高塩基度 PAC は膜差圧上昇が抑制されることを示している²⁷⁾。酢酸セルロース膜を用いた本研究の結果や加藤らによる研究結果から考慮すると、高塩基度 PAC の使用による膜汚過性への負の影響はないものと推定されるが、今後は膜の材質や孔径の影響、長期的な膜汚過運転を行った場合のファウリングへの影響などについて、検討する必要があると考えられる。

3.3 アルミニウムの残留性

実験原水中の総アルミニウム濃度は原水濁度と共に上昇したが、溶解性アルミニウム濃度は 0.001mg/L 以下となり、定量下限値以下だった。

図-9に、実験①における従来型 PAC を使用した場合と高塩基度 PAC を使用した場合の沈澱水中総アルミニウム濃度と沈澱水中溶解性アルミニウム濃度の関係を示す。沈澱水中総アルミニウム濃度の分布は、両系統とも 100 μ g/L~500 μ g/L の範囲であった。高塩基度 PAC 系総アルミニウム濃度のほうが低くなる傾向もみられるが概ね同程度の分布を示し、沈澱水濁度と同様の傾向だった。その一方で、沈澱水中溶解性アルミニウム濃度の分布については、従来型 PAC 系沈澱水は 30 μ g/L~70 μ g/L の範囲だったのに対し、高塩基度 PAC 系沈澱水は 10 μ g/L 以下となり、高塩基度 PAC 系のほうが低くなった。

続いて、図-10に従来型 PAC を使用した場合と

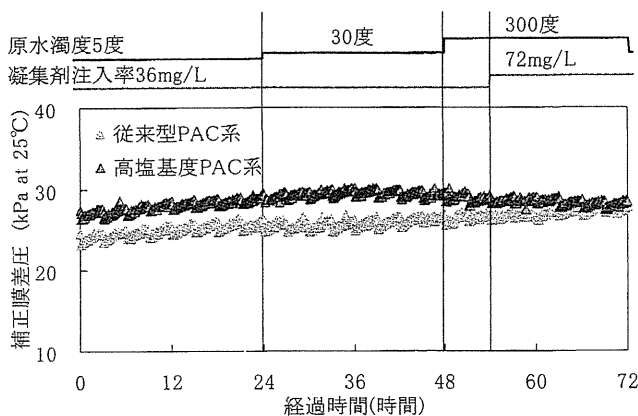


図-7 膜差圧の挙動 (25℃補正) (実験①)

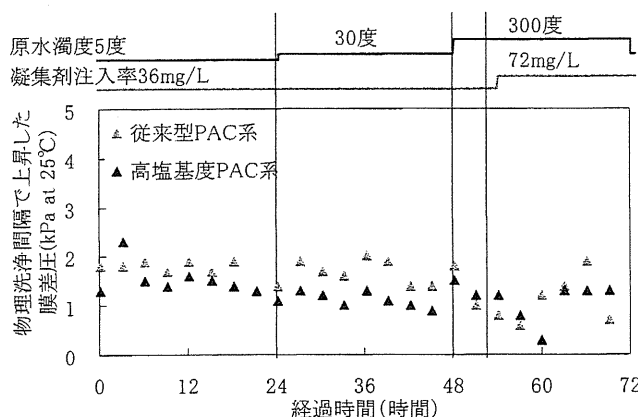


図-8 物理洗浄間隔で上昇した膜差圧 (実験①)

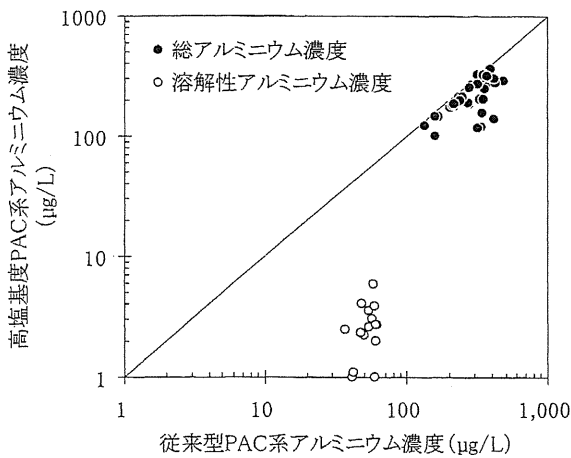


図-9 凝集剤による沈澱水中アルミニウム濃度の比較 (実験①)

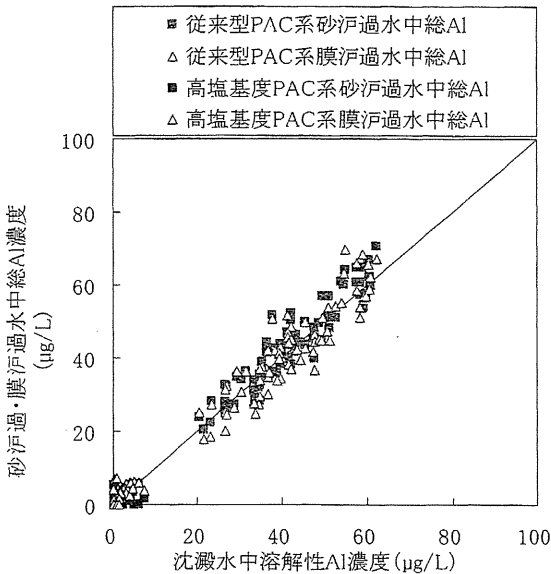


図-10 砂ろ過水中総アルミニウム濃度と膜ろ過水中総アルミニウム濃度の関係 (実験①)

高塩基度 PAC を使用した場合の沈澱水中溶解性アルミニウム濃度と砂ろ過水及び膜ろ過水中総アルミニウム濃度との関係を示す。砂ろ過水及び膜ろ過水中総アルミニウム濃度は20 $\mu\text{g/L}$ ~70 $\mu\text{g/L}$ の範囲で両者は同程度で、沈澱水中溶解性アルミニウム濃度と同程度だった。すなわち、砂ろ過及び膜ろ過により沈澱水中の懸濁態で存在するアルミニウムは除去できたが、溶解性のアルミニウムは除去できなかった。このことから、水道水中のアルミニウム濃度を低減するには、沈澱水中溶解性アルミニウム濃度を低減することが不可欠であ

ることが示された。

以上のことから、高塩基度 PAC は従来型 PAC と同一の運転条件において、残留アルミニウムの低減効果があるものと考えられた。

4. まとめ

地下水にカオリンを添加した実験原水について、パイロットスケールの実験装置にて、高塩基度 PAC の濁度の除去性とアルミニウムの残留性に関して検討した結果、以下の結論が得られた。

- 1) 高塩基度 PAC を使用した場合の凝集沈澱プロセスにおける濁度の除去性は、従来型 PAC を使用した場合と同等であった。
- 2) 高塩基度 PAC 系砂ろ過水は、従来型 PAC 系砂ろ過水より洗浄後の初期漏出濁度の清澄化が早くなった。
- 3) 高塩基度 PAC 系沈澱水中フロックは、従来型 PAC 系より粒径が大きく、ゼータ電位が至適凝集領域に近かった。これらによって、砂ろ過水初期漏出濁度の清澄化が早まるものと考えられた。
- 4) 膜ろ過水濁度は、高塩基度 PAC 系も従来型 PAC 系も、高感度濁度計の検出下限値以下だった。
- 5) 砂ろ過損失水頭及び膜差圧に対する高塩基度 PAC と従来型 PAC の使用の差異は限定的だったことから、高塩基度 PAC を使用することに関するろ過性への影響は小さいと考えられた。
- 6) 高塩基度 PAC 系沈澱水中に残留する溶解性アルミニウムは、従来型 PAC 系より低かった。また、砂ろ過水及び膜ろ過水には沈澱水中溶解性アルミニウムと同程度残留した。そのため、水道水中アルミニウムの低減には、沈澱水中溶解性アルミニウムの低減が不可欠であることが示された。
- 7) 高塩基度 PAC は、従来型 PAC と同一の運転条件にて、水道水中アルミニウムを低減できることが示された。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金 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括的研究」の一部として行わ

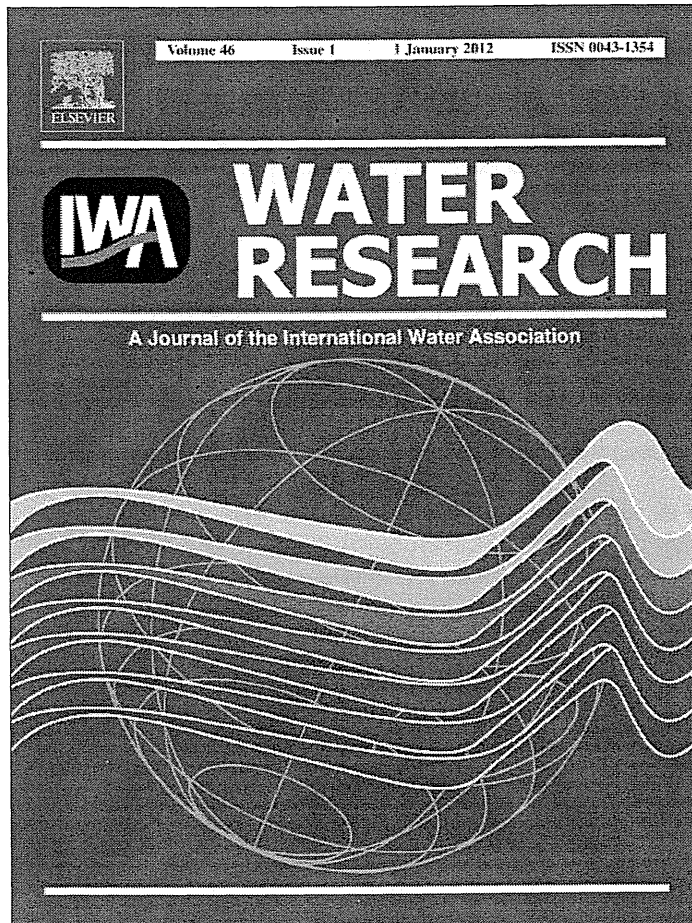
れた。本研究を遂行するにあたりご協力いただいた、平成21年度国立保健医療科学院水道工学研修の研修生である南方則之氏、堀野秀一氏、佐藤研一郎氏に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省健康局水道課：水道統計 施設・業務編（平成19年度）
- 2) Martyn C. N, Barker D. J. P, Osmond C: Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water, *Lancet*, Vol.1, pp.59-62 (1989)
- 3) McLachlan D. R. C, Bergeron C, Smith J. E: Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology*, Vol.46, pp.401-405 (1996)
- 4) Virginie R, Daniel C, Helene J. G, Dartigues J. F: Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study, *American Journal of Epidemiology*, Vol.152, pp.59-65 (2000)
- 5) 厚生労働省健康局水道課：第6回厚生科学審議会生活環境水道部会配付資料水質基準の見直し等について（案）
- 6) 眞柄泰基、伊藤雅喜、国包章一：厚生労働科学研究「最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究—無機分科会—」分担研究報告書、pp.19-24 (2005)
- 7) 内山恵、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基：PSIを用いたフロキュレーター設計の基礎的研究、水道協会雑誌、第72巻、第6号、pp.2-11 (2003)
- 8) 奥田哲士、Phengxay Deevanhxay、長谷川孝雄、西嶋渉、岡田光正：ポリシリカ鉄凝集剤を用いた凝集沈殿—急速汚濁処理の特性、水道協会雑誌、第73巻、第11号、pp.2-10 (2004)
- 9) 伊藤豊彰：水田の水環境保全機能 環境保全型水田農業におけるポリシリカ鉄凝集剤（PSI）浄水発生土資源化の可能性、用水と廃水、Vol.52、No.1、pp.76-82 (2010)
- 10) 海老江邦雄、東義洋、浅香博則、山木暁、萩下隆、凝集処理における攪拌条件の最適化に関する基礎的検討、第52回全国水道研究発表会論文集、pp.96-97 (2001)
- 11) 海老江邦雄、東義洋、山木暁：凝集沈殿の処理性改善に関する基礎的研究—GR値の上昇による濁度とSTIの低減化—、水道協会雑誌、第71巻、第9号、pp.11-21 (2002)
- 12) 佐藤文彦、巻木康宏、梶早苗、石原俊、松井佳彦：浄水中の残留アルミニウムを低減する新しいポリ塩化アルミニウム、第60回全国水道研究発表会論文集、pp.108-109 (2009)
- 13) 木村正興、大野浩一、松下拓、松井佳彦：高塩基度ポリ塩化アルミニウムを用いた凝集処理時におけるアルミニウム残留性の評価、第60回全国水道研究発表会論文集、pp.48-449 (2009)
- 14) 松井佳彦、伊藤雅喜、国包章一：無機物質分科会分担研究報告書、厚生労働科学研究「飲料水の水質リスク管理に関する総合的研究」研究報告書、pp.71-97 (2008)
- 15) Mingquan Yan, Dongsheng Wang, Jianfeng Yu, Jinren Ni, Marc Edwards, Jihui Qu: Enhanced coagulation with polyaluminum chlorides: Role of pH/Alkalinity and speciation, *Chemosphere*, Vol.71, No.9, pp.1665-1673 (2008)
- 16) WU Xiaohong, WANG Dongsheng, GE Xiaopeng, TANG Hongxiao, YE Changqing: Effect of speciation transformation on the coagulation behavior of Al13 and Al13 aggregates, *Water Science & Technology*, Vol.59, No.4, pp.815-822 (2009)
- 17) YAN Mingquan, WANG Dongsheng, QU Jihui, HE Wenjie, CHOW Christopher W. K., Relative importance of hydrolyzed Al (III) species (Al_a, Al_b, and Al_c) during coagulation with polyaluminum chloride: A case study with the typical micro-polluted source waters, *Journal of colloid and interface science*, Vol.316, No.2, pp.482-489 (2007)
- 18) 石川太了、木村正興、松井佳彦、松下拓、大野浩一：高塩基度 PACl を用いた凝集処理後の残留アルミニウム濃度とその温度影響、第61回全国水道研究発表会論文集、pp.236-237 (2010)
- 19) 海老江邦雄、土井克哉：定速砂汚濁における凝集フロクの汚濁内挙動と汚濁水質の改善、水道協会雑誌、第67巻、第10号、pp.25-35 (1998)
- 20) 汚濁処理上からみた合理的浄水方法、汚濁処理上からみた合理的浄水方法に関する研究総括報告書 (1980)
- 21) 厚生労働省健康局水道課、水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針
- 22) 加藤絵美、村田直樹、川瀬優治、青木伸浩、松井佳彦：高塩基度ポリ塩化アルミニウムによる膜汚濁性の検討、第61回全国水道研究発表会論文集、pp.248-249 (2010)
- 23) 前田智宏、木村克輝、渡辺義公：前凝集/MF 膜処理において凝集条件が膜ファウリングに及ぼす影響、第13回衛生工学シンポジウム論文集、pp.235-238 (2005)
- 24) 峯岸進一、池田啓一、渡辺義公、山村弘之：浄水処理における中空糸 UF 膜のファウリング物質の把握、水道協会雑誌、第71巻、第5号、pp.2-13 (2002)
- 25) 朴宰亨、滝沢智、片山浩之、大垣真一郎：生物汚濁前処理による精密ろ過膜のファウリング制御、水道協会雑誌、第71巻、第3号、pp.19-31 (2002)
- 26) 安藤由華、湯浅晶、李富生、松下拓：膜汚濁抵抗を抑制させるための凝集処理条件に関する検討、岐阜大学大学院修士論文 (2007)
- 27) 加藤絵美、村田直樹、川瀬優治、青木伸浩、松井佳彦：高塩基度ポリ塩化アルミニウムによる膜汚濁性の検討、第61回全国水道研究発表会論文集、pp.248-249 (2010)

(平成22年5月6日受付)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

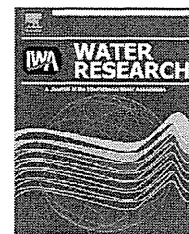


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR)

Naohiro Kishida^{a,*}, Ryo Miyata^b, Atsushi Furuta^{b,c}, Shinji Izumiyama^d, Satoshi Tsuneda^c, Yuji Sekiguchi^b, Naohiro Noda^b, Michihiro Akiba^a

^a Division of Water Management, Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, 2-3-6 Minami, Wako, Saitama 351 0197, Japan

^b Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305 8566, Japan

^c Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162 8480, Japan

^d Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku, Tokyo 162 8640, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2011

Received in revised form

19 October 2011

Accepted 21 October 2011

Available online 29 October 2011

Keywords:

Cryptosporidiosis

Fluorescence quenching

Health-related water microbiology

Real-time PCR

ABSTRACT

We describe an assay for simple and cost-effective quantification of *Cryptosporidium* oocysts in water samples using a recently developed quantification method named alternately binding probe competitive PCR (ABC-PCR). The assay is based on the detection of 18S rRNA specific for *Cryptosporidium* oocysts. The standard curve of the ABC-PCR assay had a good fitting to a rectangular hyperbola with a correlation coefficient (R) of 0.9997. Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts in real river water samples were successfully quantified by the ABC-reverse transcription (RT)-PCR assay. The quantified values by the ABC-RT-PCR assay very closely resemble those by the real-time RT-PCR assay. In addition, the quantified concentration in most water samples by the ABC-RT-PCR assay was comparable to that by conventional microscopic observation. Thus, *Cryptosporidium* oocysts in water samples can be accurately and specifically determined by the ABC-RT-PCR assay. As the only equipment that is needed for this end-point fluorescence assay is a simple fluorometer and a relatively inexpensive thermal cycler, this method can markedly reduce time and cost to quantify *Cryptosporidium* oocysts and other health-related water microorganisms.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Members of the genus *Cryptosporidium* are protozoan parasites that can cause the gastrointestinal disease cryptosporidiosis (O'Donoghue, 1995). Cryptosporidiosis remains a public health

concern, as demonstrated by continued outbreaks of this disease (Nichols, 2008). Waterborne cryptosporidiosis is particularly important because *Cryptosporidium* oocysts are resistant to disinfectants such as chlorine commonly used for water treatment (Peeters et al., 1989; Carpenter et al., 1999).

* Corresponding author. Tel.: +81 48 458 6274; fax: +81 48 458 6275.

E-mail address: kishida@niph.go.jp (N. Kishida).

0043-1354/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2011.10.048

Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples has been carried out by direct microscopic visualization or enzyme immunoassays of obtained and/or cultured oocysts with or without fluorescent antibodies. However, these detection methods are labor-intensive, require a large number of oocysts for positive detection and are not suitable for high-throughput processing of samples (Ramirez and Sreevatsan, 2006). Instead of these conventional methods, molecular (nucleic acid-based) techniques have been developed for rapid detection of *Cryptosporidium* oocysts from water samples. In particular, real-time polymerase chain reaction (PCR) is widely used for the quantification of *Cryptosporidium* oocysts (Keegan et al., 2003; King et al., 2005; Miller et al., 2006; Garcés-Sánchez et al., 2009) because of its high rapidity, sensitivity and reproducibility. However, the real-time PCR requires highly specialized and expensive devices that combine a fluorometer and a thermal cycler for real-time fluorescence measurement. Therefore, other simpler molecular quantification techniques are strongly needed for the routine detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment plants, bathing facilities, and wherever water quality monitoring is needed.

In this study, we focused our attention on a recently reported novel molecular method for the quantification of nucleic acid sequences named alternately binding probe competitive PCR (ABC-PCR) (Tani et al., 2007) as an improved method for quantification of *Cryptosporidium* oocysts. This method is cost-effective because it does not require an expensive real-time fluorescence measurement device but requires a simple end-point fluorescence measurement device. We developed this ABC-reverse transcription (RT)-PCR assay for cost-effective quantification of *Cryptosporidium* oocysts, and applied the assay to the detection from real water samples collected from Japanese rivers. To investigate the validity of the ABC-RT-PCR assay, real-time RT-PCR assay and conventional microscopic observation were also performed, and quantification data were compared with each other.

2. Principle and characteristics of ABC-PCR

The principle of ABC-PCR is as follows: the alternately binding probe (hereafter called "ABProbe") is labeled at the 5' end with a green dye (BODIPY FL) and at the 3' end with a red dye (6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]) as shown in Fig. 1. These fluorescent dyes have a property of being notably quenched by an electron transfer to guanine at a particular position (Kurata et al., 2001; Torimura et al., 2001), and the green dye is quenched via the fluorescence resonance energy transfer (FRET) to the red dye when two fluorescent dyes are in proximity. The ABProbe hybridizes with the target and competitor in perfect match. The green fluorescence intensity reflects the ratio of the target and competitor (internal standard) DNAs, and the red fluorescence intensity reflects the ratio of the hybridized probe to the unbound probe. At the normal PCR using a thermal cycler, the target and competitor DNAs are coamplified with the same efficiency in the presence of the ABProbe. The number of copies of the target DNA can be calculated from the fluorescence intensity of the ABProbe at

the end-point of PCR. Therefore, this method does not require expensive real-time fluorescence measurement device, but only requires end-point fluorescence measurement using a simple fluorometer, so that the measurement cost can be markedly reduced. Moreover, false-negative results can be easily confirmed by measuring the fluorescence intensity of red dye at the end-point of PCR, because the intensity does not change if PCR reaction itself does not proceed and therefore neither target nor competitor DNAs are amplified.

3. Materials and methods

3.1. Sample collection and pretreatment

In total, 14 water samples were collected at 7 sites in tributary rivers of the Tone River basin in Japan where the surface water is utilized for the main production of drinking water for people living in the Tokyo metropolitan area from November to December 2009. Ten liters of water samples were concentrated by vacuum filtration with polytetrafluoroethylene membrane filters (pore size: 1 μm ; diameter: 142 mm, Advantec Toyo, Tokyo, Japan), and concentrated samples were eluted from the filter using a vortex mixer (Oda et al., 2002). Then they were purified through immunomagnetic separation (Dynabeads GC Combo, Life Technologies, California, USA). While the manufacturer recommended using 50 μL of 0.1 N HCl in the oocyst dissociation step, in our investigation the step was repeated once more to recover the oocysts. The neutralization procedure was performed in a 1.5 mL tube with 10 μL of 1 N NaOH. The final volume of concentrated sample solution was 110 μL . Half the volume of concentrated sample solution was used for the ABC-PCR and real-time PCR assays after nucleic acid extraction and reverse transcription, and the other half volume was used for a conventional assay based on microscopic observation.

3.2. RNA extraction and reverse transcription

Immediately after five freeze ($-80\text{ }^\circ\text{C}$) and thaw ($37\text{ }^\circ\text{C}$) cycles, the sample solution including *Cryptosporidium* oocysts was incubated at $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min using a heat block with the solution for nucleic acids extraction containing 10 mM Tris (tris-hydroxymethyl-aminomethane)-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 2 mM NaCl, 0.1% TritonX-100 (t-octylphenoxy-polyethoxyethanol), 2 mM DTT (dithiothreitol) and 1.5 mAnson-U/mL Proteinase K. The sample solution was sonicated for 2 min and incubated at $75\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. Then the solution was incubated at $95\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min to deactivate Proteinase K, and immediately cooled down on ice. Next, extracted RNA solution was subjected to reverse transcription using PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) with 2.5 μM of Crypt-374r primer shown in Table 1 to obtain cDNA. The reverse transcription reaction was performed using GeneAmp PCR system 9700 (Life Technologies, California, USA) with the following program: reverse transcription at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min and inactivation of enzyme at $85\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 s. Synthesized cDNA was used as template DNA in the ABC-PCR and real-time PCR assays.

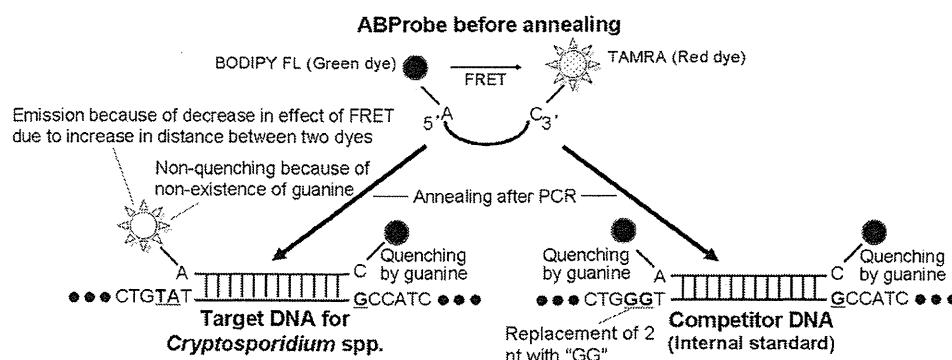


Fig. 1 – Schematic presentation of a novel ABC-PCR assay for calculating the ratio of the target to the competitor in competitive PCR. The target shown here is an example that possesses a T base at the 3' end of the probe binding site; however, the presence of A is also acceptable in this method. The competitor has the same sequence as the target, except that the underlined TA bases are replaced by GG bases. Fluorescence intensities reflect the ratio of target to competitor.

3.3. Oligonucleotide sequences

The sequences of primers and probes of the ABC-PCR and real-time PCR assays for the quantification of 18S rRNA of *Cryptosporidium* spp. are listed in Table 1. Primers with the same sequences were used for the ABC-PCR and real-time PCR assays, while the sequences of the ABProbe and TaqMan probe were a little different. A sequence of ABProbe was newly designed based on the sequence of the TaqMan probe used for the real-time PCR assay. The position of binding the ABProbe with 18S rRNA genes of *Cryptosporidium* spp. is displaced by 2 nt as shown in Table 1, because the nucleotide of ABProbe at the 3' end must be cytosine in order to quench the red fluorescence (TAMRA) as shown in Fig. 1. Specificity of real-time PCR and ABC-PCR assays was confirmed in silico predictions using a basic local alignment search tool (Altschul et al., 1990).

The chemically synthesized oligo-DNA with a length of 192 bp was used for standard DNA for the ABC-PCR and real-time PCR assays. The sequence of the standard DNA was a partial sequence of the 18S rRNA genes of *Cryptosporidium hominis* (Accession No. AF093489; nucleotide position: 188–379). The internal standard (competitor) DNA was also chemically synthesized. The sequence of the internal

standard DNA was different from the standard DNA sequence by 2 nt, i.e., AT to GG at the outside of the 5' end position at which the ABProbe annealed (nucleotide position: 272–273) in order to quench the green fluorescence (BODIPY FL) only when the ABProbe is annealed to the sequence of the internal standard DNA, as shown in Fig. 1.

3.4. ABC-PCR assay

The PCR mixture (20 μ L) consisted of 0.4 μ L of 50 \times TITANIUM Taq polymerase (Takara Bio, Tokyo, Japan), 2.0 μ L of 10 \times TITANIUM buffer, 200 μ M each of dATP, dCTP and dGTP, 600 μ M dUTP (Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan), 0.25 unit of uracil-DNA glycosylase (heat-labile; Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan), 75 nM Crypt-193f, 250 nM Crypt-374r, 200 nM Crypt-274Abp, 1 μ L of competitor DNA (internal standard) and 1 μ L of standard DNA or cDNA from water samples. PCR amplification was performed using Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) with the following program: an initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 2 min, 50 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 20 s, annealing at 60 $^{\circ}$ C for 20 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 20 s and final extension at 72 $^{\circ}$ C for 2 min. After the PCR amplification, the fluorescence intensity of each aliquot was measured at 95 and 60 $^{\circ}$ C using Light Cycler 480 (Roche

Table 1 – Nucleotide sequences of PCR primers and probes used to detect *Cryptosporidium* spp.

Name	Sequence (5' \rightarrow 3')	Location ^a	Used for	References
Primer				
Crypt-193f	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCA	193	Real-time PCR and ABC-PCR	Miller et al., 2006
Crypt-374r	CTCCCTCTCCGGAATCGAA	374	Real-time PCR, ABC-PCR and reverse transcription	
TaqMan Probe				
Crypt-276p ^b	CATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGG	276	Real-time PCR	Miller et al., 2006
ABProbe				
Crypt-274Abp ^c	ATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGAC	274	ABC-PCR	This study

a Corresponding nucleotide position of *Cryptosporidium hominis* 18S rRNA gene (Accession No. AF093489) of the 5' end.

b TaqMan probe oligonucleotides were labeled with 6-FAM at the 5' end and BHQ at the 3' end.

c Alternatively binding competitive probe oligonucleotides were labeled with BODIPY FL at the 5' end and TAMRA at the 3' end.

Diagnosics Japan, Tokyo, Japan). Excitation was performed at 450–495 and 522–555 nm, with 505–537 and 565–605 nm emission filters for green fluorescence and red fluorescence, respectively. Although a real-time fluorescence measurement device was used in order to analyze the fluorescence intensity at the end-point of PCR quickly in this study, a simple fluorometer can be also used for the same accuracy as has been reported in previous papers (Tani et al., 2007; Noda et al., 2008). Serial dilutions of the standard DNA (range: 10^1 – 10^5 copies per reaction) were used to make a standard curve. In addition, internal standard DNA with the concentration of 10^3 copies were added to each PCR mixture.

3.5. Data analysis of ABC-PCR assay

As shown in Fig. 1, the fluorescence intensity of the ABProbe changes as follows: (i) When the ABProbe is free in solution, its green fluorescence (G_1) is notably quenched by FRET to the red dye. (ii) When the ABProbe hybridizes with a target, its green fluorescence (G_2) is bright because the two fluorescent dyes are separate. (iii) When the ABProbe hybridizes with a competitor (internal standard), its green fluorescence (G_3) is darker than G_2 because its green fluorescence is quenched by guanine bases. (iv) When the ABProbe is free in solution, its red fluorescence (R_1) is bright. (v) When the ABProbe hybridizes with the target or competitor, its red fluorescence is similarly quenched by the guanine complementary to the modified cytosine ($R_2 = R_3$). Therefore, the red fluorescence intensity reflects the ratio of the unbound probe to the hybridized probe, and the green fluorescence intensity reflects the ratio of target to the competitor in the PCR products. The fluorescence intensities of the green dye (G_{60}) and red dye (R_{60}) at 60 °C represent the intensity after hybridization, whereas those of the green dye (G_{95}) and red dye (R_{95}) at 95 °C represent the intensity before hybridization. These fluorescence intensities fluctuate slightly from tube to tube because of differences in the reagent volume and/or unknown factors. Therefore, G_{60} and R_{60} were divided by G_{95} and R_{95} to normalize the non-PCR-related fluorescence fluctuations occurring from tube to tube. The fluorescence intensities measured from the green dye (G_{60}/G_{95}) and red dye (R_{60}/R_{95}) are the sum of the fluorescence intensities from the unbound probe (G_U or R_U), the hybridized probe with the target (G_T or R_T), and the hybridized probe with the competitor (G_C or R_C), expressed, respectively, as

$$G_{60}/G_{95} = G_U(1 - y) + G_T[X/(X + C)]y + G_C[C/(X + C)]y, \quad (1)$$

where y is the ratio of the bound probe to the total probe, and

$$R_{60}/R_{95} = R_U(1 - y) + R_T[X/(X + C)]y + R_C[C/(X + C)]y. \quad (2)$$

X and C are the starting quantities of the target and competitor, respectively. At this point,

$$R_T = R_C. \quad (3)$$

Therefore, Eq. (2) converts to

$$y = [R_U - (R_{60}/R_{95})]/(R_U - R_C). \quad (4)$$

Under this condition, Eq. (1) converts to

$$\begin{aligned} [(G_{60}/G_{95}) - G_U]/[R_U - (R_{60}/R_{95})] = & [(CG_C - CG_T)/(R_U - R_C)]/ \\ & \times (X + C) + (G_T - G_U)/ \\ & \times (R_U - R_C). \end{aligned} \quad (5)$$

This equation shows that $[(G_{60}/G_{95}) - G_U]/[R_U - (R_{60}/R_{95})]$ and X have a relationship indicated by a rectangular hyperbola. Therefore, the standard curves were obtained by fitting the data points to a rectangular hyperbola, and the number of copies of 18S rRNA of *Cryptosporidium* spp. in each sample was calculated using the standard curves.

3.6. Real-time PCR assay

The PCR mixture (20 μ L) consisted of 400 nM of each primer, 80 nM of the TaqMan probe, commercially available PCR mastermix (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe; Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan) and 2 μ L of standard DNA or cDNA from water samples. PCR amplification and fluorescence measurement was performed using LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan) with the following program: an initial denaturation at 95 °C for 10 min, 50 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing and extension at 60 °C for 30 s. Crossing point (C_p) values were determined automatically by LightCycler software using the second derivative maximum method.

3.7. Conversion of number of 18S rRNA molecules of *Cryptosporidium* spp. to number of *Cryptosporidium* oocysts

The number of 18S rRNA molecules in a standard *Cryptosporidium* oocyst was investigated by real-time RT-PCR, and the number was used for conversion of the number of copies of 18S rRNA molecules in water samples as determined by the ABC-RT-PCR and real-time RT-PCR assays to the number of *Cryptosporidium* oocysts. *Cryptosporidium parvum* oocysts (H8 strain, Yagita et al., 2001) which were maintained in our laboratory by passages in infected mice were used for the determination. *Cryptosporidium* oocysts were purified from the feces from the mice by a combination of discontinuous density sucrose gradient centrifugation and cesium chloride gradient centrifugation and enumerated with a hemacytometer. The RNA of purified and enumerated oocysts was extracted, and used as template RNA. The template RNA was prepared in 10-fold serial dilutions. Then cDNA was synthesized through reverse transcription. Next, the real-time PCR assay was performed in triplicate for each diluted cDNA solution using chemically synthesized oligo-DNA as standard DNA.

3.8. Microscopic observation

The conventional microscopic observation was performed by Japanese standard method for detection of *Cryptosporidium* oocysts in water supply systems (Ministry of Health, Labor and Welfare, 2007). After purification through immunomagnetic separation, *Cryptosporidium* oocysts were fixed on a membrane filter. The fixed sample was stained with Easy-Stain antibody stain (BTF, North Ryde, Australia), and

observed using an epifluorescent microscope (IX71; Olympus, Tokyo, Japan).

4. Results and discussion

4.1. Standard curve of ABC-PCR assay

We constructed a standard curve for the quantification of the 18S rRNA of *Cryptosporidium* spp. Various amounts of the DNA fragment encoding the partial 18S rRNA genes of *C. hominis* as target standard DNA, ranging from 10^1 to 10^5 copies in the presence of 10^3 copies of competitor DNA, were prepared. The DNA mixtures were amplified by PCR followed by measuring the fluorescence of the DNA mixtures. $[(G_{60}/G_{95}) - G_U]/[R_U - (R_{60}/R_{95})]$ values were plotted against the starting quantity of the target DNA (Fig. 2). The results show that $[(G_{60}/G_{95}) - G_U]/[R_U - (R_{60}/R_{95})]$ values obtained from triplicate samples closely match a rectangular hyperbola with a correlation coefficient (R) of 0.9997. The standard deviation (SD) of triplicate determinations was less than 0.008 for 10^1 to 10^5 copies. These results indicate that the ABC-PCR assay was quantitative and reproducible for the measurement of the number of copies of 18S rRNA of *Cryptosporidium* spp. Although the quantification range of the ABC-PCR assay is narrower than that of the real-time PCR assay, we can adjust the range by varying the addition quantity of internal standard DNA according to sample concentration, as written in our previous paper (Miyata et al., 2010).

4.2. The number of 18S rRNA molecules in a *Cryptosporidium* oocyst

Fig. 3 shows the relationship between the number of *Cryptosporidium* oocysts and the number of copies of 18S rRNA molecules of *C. parvum* as determined by the real-time RT-PCR assay. The ratio of the oocyst number to copy number was independent of the initial concentration of template RNA because reverse transcription and cDNA amplification proceeded effectively under this experimental condition. It was found that one standard *Cryptosporidium* oocyst has approximately 32,700 copies of 18S rRNA molecules. This value was used for the calculation (conversion) of the number of *Cryptosporidium* oocysts from the number of gene copies in water samples as determined by the ABC-RT-PCR and real-time RT-PCR assays although this conversion ratio may vary a little depending on the activity of *Cryptosporidium* oocysts.

Meanwhile, it has been reported that each *Cryptosporidium* genome in one oocyst has 20 copies of 18S rRNA genes (Abrahamsen et al., 2004). Therefore, it is possible to detect *Cryptosporidium* oocysts without reverse transcription. However, the number of copies of rRNA genes is much lower than that of rRNA molecules. If we try to quantify *Cryptosporidium* oocysts without reverse transcription, labor-intensive high condensation of water samples may be needed. In addition, duplicate or triplicate examination is almost impossible if there is only one *Cryptosporidium* oocyst in the water sample. Hence, we added reverse transcription process to increase the sensitivity.

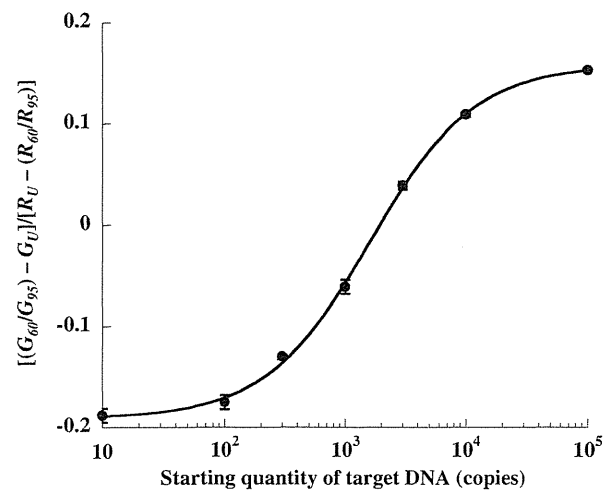


Fig. 2 – Typical standard curve. A fixed amount of the internal standard (10^3 copies) was coamplified with various amounts of the target standard DNA in triplicate. The standard curve was obtained by fitting the data points to a rectangular hyperbola. $y = -559.8/(x + 1602) + 0.1583$, and the correlation coefficient (R) was calculated to be 0.9997. The error bars represent the standard deviation (SD) of triplicate determinations per dilution.

4.3. Quantification of *Cryptosporidium* oocysts in water samples by ABC-RT-PCR assay

The number of copies of the 18S rRNA molecules of *Cryptosporidium* spp. naturally present in 14 water samples were quantified using ABC-RT-PCR and real-time RT-PCR. Then the copy number was converted to the number of *Cryptosporidium* oocysts using a conversion coefficient determined by the above mentioned experiment. As shown in Table 2 and Fig. 4, concentrations of *Cryptosporidium* oocysts in river water samples were successfully quantified by the ABC-RT-PCR assay. The quantified values by the ABC-RT-PCR assay are very closely resembling those by the real-time RT-PCR assay.

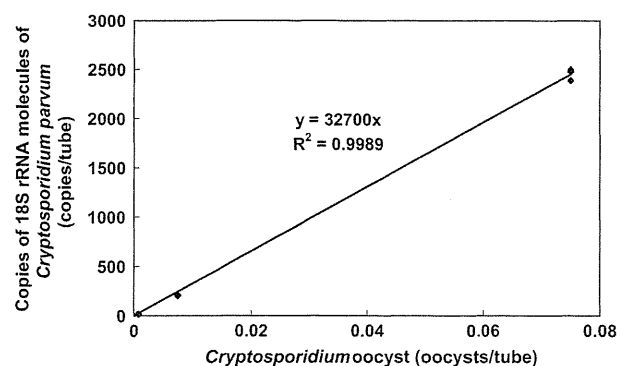


Fig. 3 – Relationship between the number of *Cryptosporidium* oocysts and the number of copies of 18S rRNA molecules of *Cryptosporidium* spp. as determined by real-time RT-PCR.

Table 2 – Three methods of quantifying *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples.

Sample	ABC-PCR (oocysts/10 L)	Real-time PCR (oocysts/10 L)	Microscopic observation (oocysts/10 L)
A	0.23	0.33	2
B	6.6	7.3	–
C	0.076	–	2
D	6.6	11	4
E	–	–	–
F	–	–	–
G	0.67	1.4	4
H	38	30	12
I	0.13	0.17	0
J	19	26	14
K	0.57	0.036	10
L	38	30	30
M	0.98	0.36	16
N	49	71	40

The coefficient of determination (R^2) value at the linear least squares method between the two PCR assays was 0.89. In addition, the quantified concentration in most water samples by PCR assays was comparable to that by conventional microscopic observation although the principle of quantification is different, and the conversion ratio of the number of

copies of 18S rRNA molecules to that of *Cryptosporidium* oocysts may vary a little depending on the activity of *Cryptosporidium* oocysts in river water samples. Therefore, it is considered that *Cryptosporidium* oocysts can be specifically determined by the ABC-RT-PCR assay. In addition, the fluorescence intensity of red dye at the end-point of PCR was significantly decreased in all samples (data not shown), which indicates false-negative results were not obtained in this study. Thus, *Cryptosporidium* oocysts in real water samples can be simply and accurately quantified using the ABC-RT-PCR assay. As the only equipment that is needed for this end-point fluorescence assay is a simple fluorometer and a relatively inexpensive thermal cycler, this method can markedly reduce time and cost to quantify *Cryptosporidium* oocysts. Moreover, this method can be easily applied to quantify many other health-related water microorganisms because it is very easy to design primers and ABProbes. If primers and probes of the real-time (TaqMan) PCR assay are published, in the ABC-PCR assay, the same primers can be used. The only thing that the users need to do is to modify the sequence of ABProbe a little bit from the TaqMan probe in the same manner in this study.

Meanwhile, a few data (Sample K and M in Table 2) quantified by two PCR assays were much smaller than those by microscopic observation. It is well known that environmental samples contain PCR inhibitors such as humic acids, and the number of target DNA is underestimated by quantitative PCR assays due to the existence of inhibitors. However, in the ABC-PCR assay, accurate quantification is attained regardless of the existence of PCR inhibitors because internal standard DNA is used, and the effect of PCR inhibition on quantification is canceled (Tani et al., 2007). In addition, sample purification using immunomagnetic separation was carefully performed. Therefore, PCR inhibition must not be the main reason for the underestimate. Another suspected reason is that not all *Cryptosporidium* oocysts in river water samples contain the same amount of the 18S rRNA molecules. Although it has been reported that the 18S rRNA molecules of *Cryptosporidium* oocysts are more stable than mRNA molecules like β -tubulin (Widmer et al., 1999); reportedly, the number of copies of 18S rRNA molecules in *Cryptosporidium* oocysts significantly decreased when those were inactivated by heat shock (95 °C

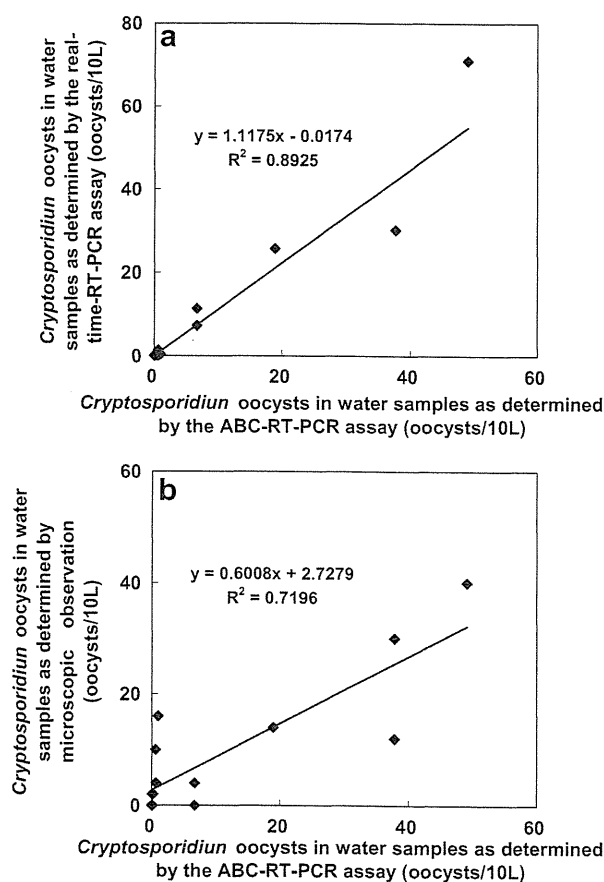


Fig. 4 – Relationship between the number of *Cryptosporidium* oocysts in water samples as determined by (a) ABC-RT-PCR and real-time RT-PCR (b) ABC-RT-PCR and microscopic observation.

for 4 h) (Fontaine and Guillot, 2003), which indicates that the number of copies of 18S rRNA molecules would reflect the viability of *Cryptosporidium* oocysts. Therefore, if dead or damaged *Cryptosporidium* oocysts existed in river water samples, both the number of copies of 18S rRNA molecules and the converted values of *Cryptosporidium* oocysts as determined by two RT-PCR assays would be small. It was reported that there were many dead (non-viable) *Cryptosporidium* oocysts in the effluent discharged from many swine wastewater treatment facilities that were one of the main pollution sources in river water (Jenkins et al., 2010), which indicates that dead *Cryptosporidium* oocysts exist in river water depending on the place and time. Hence, a few data (Sample K and M in Table 2) quantified by two RT-PCR assays would be much lower than those by microscopic observation.

5. Conclusion

In this study, we developed an ABC-RT-PCR assay for simple and cost-effective quantification of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. The following are the main outcomes of this study.

- (1) The standard curve of the ABC-PCR targeting 18S rRNA of *Cryptosporidium* spp. had a good fitting to a rectangular hyperbola with high correlation coefficient, and standard deviation of triplicate determinations was low. The ABC-PCR assay was quantitative and reproducible for the measurement of number of copies of 18S rRNA genes of *Cryptosporidium* spp.
- (2) Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts in river water samples were successfully quantified by the developed ABC-RT-PCR assay. The quantified values by the ABC-RT-PCR assay very closely resembled those by the real-time RT-PCR assay.
- (3) Most quantified values by the ABC-RT-PCR assay were comparable to those by microscopic observation. However, a few values quantified by the ABC-RT-PCR assay were much smaller than those by microscopic observation, which indicates that dead or damaged *Cryptosporidium* oocysts, which have only a small number of copies of 18S rRNA molecules, exist in river water depending on the place and time. In this case, the sensitivity of the ABC-RT-PCR assay would be lower than that by microscopic observation.
- (4) As the only equipment that is needed for the ABC-RT-PCR assay is a simple fluorometer and a relatively inexpensive thermal cycler, this method can markedly reduce time and cost to quantify *Cryptosporidium* oocysts in water samples.

Acknowledgments

This study was financially supported by a Grant-in-Aid for Research Activity Start-up (21860094), Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

REFERENCES

- 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., Kapur, V., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304 (5669), 441–445.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), 403–410.
- Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J., Beach, M.J., 1999. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases* 5 (4), 579–584.
- Fontaine, M., Guillot, E., 2003. Study of 18S rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat-inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *FEMS Microbiology Letters* 226 (2), 237–243.
- Garcés-Sanchez, G., Wilderer, P.A., Munch, J.C., Horn, H., Leubhn, M., 2009. Evaluation of two methods for quantification of *hsp70* mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Research* 43 (10), 2669–2678.
- Jenkins, M.B., Liotta, J.L., Lucio-Forster, A., Bowman, D.D., 2010. Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain watersheds of Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (17), 5757–5763.
- Keegan, A.R., Fanok, S., Monis, P.T., Saint, C.P., 2003. Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5), 2505–2511.
- King, B.J., Keegan, A.R., Monis, P.T., Saint, C.P., 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7), 3848–3857.
- Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kurane, R., 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Research* 29 (6), e34.
- Miller, W.A., Gardner, I.A., Atwill, E.R., Leutenegger, C.M., Miller, M.A., Hedrick, R.P., Melli, A.C., Barnes, N.M., Conrad, P. A., 2006. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). *Journal of Microbiological Methods* 65 (3), 367–379.
- Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, 2007. *Methods for the Detection of Cryptosporidium Oocysts, Giardia Cysts and Indicator Microorganisms in Water Supply Systems* Tokyo, Japan (in Japanese).
- Miyata, R., Adachi, K., Tani, H., Kurata, S., Nakamura, K., Tsuneda, S., Sekiguchi, Y., Noda, N., 2010. Quantitative detection of chloroethene-reductive bacteria *Dehalococcoides* spp. using alternately binding probe competitive Polymerase Chain Reaction. *Molecular and Cellular Probes* 24 (3), 131–137.
- Nichols, G., 2008. Epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, second ed. IWA Publishing, London, UK, pp. 79–118.
- Noda, N., Tani, H., Morita, N., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T., Tsuneda, S., Sekiguchi, Y., 2008. Estimation of single-nucleotide polymorphism allele frequency by alternately binding probe competitive polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta* 608 (2), 211–216.
- Oda, T., Ito, H., Yano, H., Rai, S.K., Kawabata, M., Inoue, M., Uga, S., 2002. Use of hydrophilic polytetrafluoroethylene (HPTFE) membrane in detecting *Cryptosporidium* oocysts from source

- water. *Japanese Journal of Water Treatment Biology* 38 (3), 153–158.
- O'Donoghue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal of Parasitology* 25 (2), 139–195.
- Peeters, J.E., Mazás, E.A., Masschelein, W.J., Villacorta Martiez de Maturana, I., Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (6), 1519–1522.
- Ramirez, N.E., Sreevatsan, S., 2006. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology* 136 (3–4), 201–213.
- Tani, H., Kanagawa, T., Kurata, S., Teramura, T., Nakamura, K., Tsuneda, S., Noda, N., 2007. Quantitative method for specific nucleic acid sequences using competitive polymerase chain reaction with an alternately binding probe. *Analytical Chemistry* 79 (3), 974–979.
- Torimura, M., Kurata, S., Yamada, K., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kanagawa, T., Kurane, R., 2001. Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base. *Analytical Science* 17 (1), 155–160.
- Widmer, G., Orbach, E.A., Tzipori, S., 1999. β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (4), 1584–1588.
- Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T., Endo, T., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitology Research* 87 (11), 950–955.

環境水中のクリプトスポリジウム検出を 目的としたRT-LAMP改善法の実用性評価

Validation for an Improved Reverse Transcription-loop-mediated Isothermal Amplification
Assay for Detection of *Cryptosporidium* in Water Samples

猪又明子¹, 百田隆祥², 泉山信司³, 勝山志乃⁴, 岸田直裕⁵, 秋葉道宏⁵, 遠藤卓郎⁶

¹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

²栄研化学株式会社生物化学研究所 / 〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町大字野木143

³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

⁴神奈川県内広域水道企業団水質管理センター / 〒243-0424 海老名市社家4587

⁵国立保健医療科学院水道工学部 / 〒351-0197 和光市南2-3-6

⁶国立感染症研究所細菌第一部 / 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

AKIKO INOMATA¹, TAKAYOSHI MOMODA², SHINJI IZUMIYAMA³,
SHINO KATSUYAMA⁴, NAOHIRO KISHIDA⁵, MICHIIHIRO AKIBA⁵,
and TAKURO ENDO⁶

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

²Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical Co.,LTD.
/ 143 Nogi, Nogimachi, Shimotsugagun, Tochigi 329-0114, Japan

³Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases
/ 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan

⁴Water Quality Management Center, Kanagawa Water Supply Authority
/ 4587 Shake, Ebina, 243-0424, Japan

⁵Department of Water Supply Engineering, National Institute
of Public Health / 2-3-6 Minami, Wako, 351-0197, Japan

⁶Department of Microbiology I, National Institute of Infectious Diseases
/ 1-23-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan

Abstract

An improved reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay which uses 1μL of RNA extract was evaluated. The original RT-LAMP assay using 5μL of RNA extract showed generally high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples; but in some types of water such as pigsty effluents and its downstream river water, this assay failed to detect *Cryptosporidium*. This failure may be caused by substances in those water samples which block gene amplification. To eliminate the effect of gene amplification-blocking substances, we decreased the quantity of the RNA extract used for the RT-LAMP assay from 5μL to 1μL. The detection limit of the improved RT-LAMP assay was as low as 6×10^{-3} oocysts/LAMP test tube, which theoretically enables us to detect even one *Cryptosporidium* oocyst in a water sample. This improved RT-LAMP assay succeeded in detecting *Cryptosporidium* oocysts much more sensitively not only in pigsty effluents but also in other water samples as well.

1. はじめに

クリプトスポリジウムはヒトに感染すると下痢を主訴とするクリプトスポリジウム症を引き起こす原虫である。クリプトスポリジウム症に効果的な治療法はまだ知られておらず、免疫による自然治癒に依存するため、免疫不全者ではしばしば致死的となる^{1,2)}。

クリプトスポリジウムの汚染源は主に下水処理場や畜舎であり、これらの放流水が流入した水道原水中よりクリプトスポリジウムが適切な浄水処理で除去されないと、水道水に混入する恐れがある。水道水を介したクリプトスポリジウムの集団感染は1980年代から米国や英国で報告され始め、それ以降毎年報告されている^{1,3,4)}。わが国では1996年に埼玉県越生町で水道水を介した初めての集団感染が発生し、8,812人が感染する大事故となったことが知られている⁵⁾。

水試料からのクリプトスポリジウムオーシストの主な検出方法は、厚生労働省の「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について⁶⁾」に示されている蛍光抗体染色と微分干渉観察による検鏡法である。しかし、水試料中に存在する夾雑物の中から約5 μ mと極めて微小なオーシストを顕微鏡で検出、同定するには、熟練した技術が必要である。また、検査に長時間を要し、多数の検体を迅速に検査することが困難であることから、正確で再現性が高く簡便な代替検査方法が求められている。このような条件を満たす検査方法として多数の遺伝子検査法が検討されているが、未だ実用化には至っていない⁷⁾。

そうした中で、著者らはクリプトスポリジウムのrRNAを標的とした逆転写Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)法を開発し、環境水からのクリプトスポリジウム検出において検鏡法と同様か、あるいはより高感度な検出が可能であることを報告した⁸⁾。しかし、その後様々な環境水についてRT-LAMP法検査を行ったところ、養豚場排水放流水及びその下流の河川水において、検鏡法でクリプトスポリジウムが検出されるにもかかわらずRT-LAMP法で陰性となることを経験した。この原因として、養豚場排水に含まれる強い遺伝子増幅阻害物質、すなわち糞便等の影響が考えられた。

糞便等は強力な遺伝子増幅阻害物質として知られており⁹⁻¹¹⁾、クリプトスポリジウム等は糞便中に排出されることから、糞便による阻害への対策が必須となる。その一方で、複雑な精製操作は試料のロスと煩雑な作業の増加を招く。そこで、RT-LAMP法の検出感度が 6×10^{-3} オー

シスト相当/反応チューブと極めて高い⁸⁾ことから、阻害物質の影響を回避するために、RT-LAMP反応に用いるRNA抽出量を従来の5 μ lから1 μ lに低減するという、極めて単純だが効果的と考えられる改善策を試行し、その結果を評価した。

前提として、RNA抽出量を従来の1/5量に減らしても十分に検出可能であることが求められるため、本研究で改めてRT-LAMP法の検出感度を確認することとした。次いで、問題の養豚場排水放流水及びその下流の河川水検体、その他の環境水（表流水、湧水、浅井戸水、伏流水）検体、浄水検体について、検鏡法、RT-LAMP従来法（RNA抽出量5 μ l）及びRT-LAMP改善法（RNA抽出量1 μ l）によりクリプトスポリジウム検出を行った。各検査法の結果を比較することでRT-LAMP改善法の実用性を評価したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 RNA抽出方法

クリプトスポリジウムオーシストのRNA抽出は先の報告と同様に行った⁸⁾。すなわち、*Cryptosporidium parvum* オーシストを-80℃のドライバス（Micro Cool MC-100, TOMY）と37℃のヒートブロック（Dry Bath Incubator, Fast Gene）で1分間ずつ5回の凍結融解を行い、次に溶解液（10mM Tris-EDTA (pH7.6), 20mM NaCl, 0.1% TritonX-100, 2mM 1,4-Dithiothreitol, 1.5mAnson-U/ml Proteinase K）20 μ lを添加し、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RNA抽出液を95℃で5分間加熱してProteinase Kを失活させた後、水中で急冷した。

2.2 RT-LAMP法

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⁸⁾。試薬キットにはアウタープライマーCryF3及びCryB3各5 pmol、ルーブプライマーCryLF及びCryLB各20pmol、インナープライマーCryFIP及びCryBIP各40pmol、*Bst* polymerase 8Uが含まれている。これらのプライマーは*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium serpentis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium saurophilum* 及び*Cryptosporidium hominis*の遺伝子を全て増幅し、一方*Giardia intestinalis*, *Giardia muris*及び細菌10菌種には反応し

ないことを確認している¹²⁾。さらにReverse Transcriptase (Roche) 1.5Uを添加し、1本のチューブ内で逆転写反応とLAMP反応を実施した。RT-LAMP従来法ではRNA抽出液5 μ l、RT-LAMP改善法ではRNA抽出液1 μ lと蒸留水4 μ lを20 μ lの増幅反応試薬に加えて計25 μ lとし、63 $^{\circ}$ 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(LA-320C, 栄研化学)を用いた。陽性対照として試薬キットに付属のものを用いた。これは増幅産物のアガロースゲル電気泳動パターンがクリプトスポリジウムとは異なるように配列が設計されており、陽性対照のコンタミネーションを判別できるものとなっている。陰性対照にはキットに付属の純水を用いた。

2.3 RT-LAMP法の検出感度試験

Cryptosporidium parvum オースト(H8株)は、感染マウスの糞便からショ糖浮遊法及び塩化セシウム浮遊法により精製した¹³⁾。血球計算盤で計数して所定濃度のオースト液を調製した後、前述の方法でオーストからRNAを抽出した。この抽出RNAを感度試験用の鋳型として 6×10^{-1} オースト相当/5 μ lから 6×10^{-4} オースト相当/5 μ lまで10倍毎の連続希釈濃度に調製し、各濃度段階につき8連でRT-LAMP反応を行った。

2.4 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

養豚場排水放流水及びその下流の河川水10検体、その他の環境水(表流水、湧水、浅井戸水、伏流水)57検体、浄水13検体についてクリプトスポリジウム検査を行った。なお、これらの検体の一部には既に報告したものが含まれている⁸⁾。養豚場排水放流水は10ml、養豚場下流の河川水は10l又は20l、その他の環境水は20l、浄水は40lを検水量とした。養豚場排水放流水は検水量が10mlと少ないことから、5連で試験を行うこととし、他は1試料ずつ行った。浄水は孔径1 μ mのポリカーボネートフィルター、その他の試料は孔径5 μ mのPTFEフィルターを用いてろ過濃縮を行った後、フィルター上に捕捉された懸濁物を剥離させて5mlの濃縮液を得た。濃縮液の半量2.5mlをそれぞれ検鏡法とRNA抽出とに用いた。各検体は採水後冷蔵し、概ね3日以内に検鏡法による検査を行った。多くは検鏡法と同時に遺伝子検査用試料の精製を行ったが、養豚場下流河川水の一部の試料については冷蔵で1カ月保存した後に精製操作を行い、参考試料として使用した。

検鏡法は厚生労働省「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」⁸⁾に準拠し、一部改良を加えた方法で行った。すなわち、水試料濃縮液から免疫磁気ビーズ(Dynabeads GC Combo, Invitrogen)を用いてクリプトスポリジウムオーストを捕捉、精製した後、塩酸により免疫磁気ビーズからクリプトスポリジウムを解離した。濃縮液の沈殿物容量が0.5mlを超える場合は、沈殿物量が0.5ml以下になるように試料を分けてから免疫磁気ビーズ法を行った。塩酸解離後のクリプトスポリジウム試料を水酸化ナトリウムで中和し、100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱処理した。これを観察用PTFEフィルターでろ過し、直接蛍光抗体染色(EasyStain, BTF)及びDAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)染色を行った。染色後のフィルターを封入してプレパラートを作成し、落射蛍光及び微分干渉観察により、クリプトスポリジウムの同定及び計数を行った。

遺伝子検査用試料として各濃縮液の残り半量2.5mlを用い、免疫磁気ビーズ法によりクリプトスポリジウムの精製を行った。上澄液を除去し、オーストと免疫磁気ビーズとを結合させたまま前述の方法で核酸抽出した。直ちに抽出操作をしない場合は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

LAMP法で陽性となった増幅産物各1 μ lについて、2%アガロースゲルによる電気泳動を行い、*Cryptosporidium parvum*オーストのバンドパターンとの比較により、クリプトスポリジウム由来の増幅であることを確認した。

3. 結果及び考察

3.1 RT-LAMP法の検出感度

鋳型RNAを1反応あたり 6×10^{-1} オーストから 6×10^{-4} オースト相当まで10倍毎に連続希釈し、8連でRT-LAMP法を行った結果をTable 1に示した。オースト濃度が低下するに従い、LAMP反応の陽性判定値(移動平均の微分値が0.07)を越えるのに必要な時間である T_t 値は大きくなった。鋳型RNA濃度 6×10^{-4} オーストでは8回の T_t 値の変動係数(CV値)が16.8%と大きく、 6×10^{-3} オースト以上の濃度ではCV値0.5~4.4%であったことから、再現性のある検出感度は 6×10^{-3} オースト/LAMP test tubeと判断した。この検出感度は著者らが以前に各濃度段階2連で行った結果⁸⁾と同じであった。この検出感度から、RT-LAMP改善法に使用する鋳型RNA量を20 μ l中の1 μ lに減らした場合でも、検水中1オーストを確実に検出できるものと判断した(1オースト/20 μ l = 5×10^{-2} オースト相当/1 μ l)。

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

	RNA concentration* (oocysts/LAMP test tube)			
	6×10^{-1}	6×10^{-2}	6×10^{-3}	6×10^{-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により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 & Nichols⁷⁾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 ^{*1}	Improved RT-LAMP ^{*2}
1	08Jan.2008	Pigsty A1	PE ^{*3}	5ml	10	- ^{*5}	+ ^{*6}
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 ^{*4}	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 ^{*7}	12Mar.2009	K-1	RW	10l/4	133	-	+
19 ^{*7}	9:00	K-2	RW	10l/4	133	-	+
20 ^{*7}		K-3	RW	10l/4	133	-	+
21 ^{*7}		K-4	RW	10l/4	133	-	+
22 ^{*7}	12Mar.2009	K-1	RW	10l/2	200	+	+
23 ^{*7}	12:00	K-2	RW	10l/2	200	-	-
24 ^{*7}	12Mar.2009	K-1	RW	10l/2	55	-	+
25 ^{*7}	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 5μl of *Cryptosporidium* RNA extract.*2 Improved RT-LAMP assay was performed using 1μl 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論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⁸⁾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 ¹⁾	Improved RT-LAMP ²⁾
1	01Oct.2008	OCO-1	10l/3	0	+ ³⁾	+
2		OCO-2	10l/3	0	+	+
3		OCO-3	10l/3	0	- ⁴⁾	-
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	-	-