

クリプトスポリジウム等遺伝子検出法検討の必要性について

1. 顕微鏡検出法の課題について

「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号平成19年3月30日）では、クリプトスポリジウム等の検出方法は顕微鏡観察による検出法が示されている。また、米国や英国においても、同様の顕微鏡観察を主体とした検出法が用いられている。

しかしながら、顕微鏡検出法は、その技術の習得に多大な時間を要し、また分析者の個人差も生じやすいことから、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開発が課題となっていた。

また、H20年度の全国のクリプトスポリジウム検査の結果を見ると、多くの結果が不検出となっているが、顕微鏡検出法の再現性を考慮に入れると、特に、水道原水の取水口から上流部において下水処理水や畜産排水が含まれる場合において、原水中に含まれるクリプトスポリジウムが不検出という結果は過小評価の恐れが高い。

顕微鏡検出法に準じる検出法としてはPCR法等の核酸増幅法が選択肢として考えられている。これまでクリプトスポリジウムの検査法の検討の際にも取り上げられてきたが、DNAの増幅が夾雑物に阻害されることがあることや1個のクリプトスポリジウムが検出できる技術に達していないこと等が課題として残されており、研究成果を待って評価されるべきとされてきたところである。

2. 遺伝子検出法検討の必要性について

1) 遺伝子検出法の実用化状況

クリプトスポリジウム等の核酸増幅法については既に多数の検出法が報告（Smithら、2009：総説）されてきた。核酸検出法は、医療分野・食品分野では既に実用化されており、各種のウイルス性疾患の診断、遺伝子組み換え食品の検査、食料品等の産地特定などで盛んに用いられている。さらに、環境分野でもレジオネラ属菌検査での遺伝子検出法導入が果たされてきたところである（レジオネラ症防止指針第3版、(財)ビル管理教育センター、平成21年）。

これまで、環境試験には実用化されなかった理由としては感度及び核酸増幅の抽出方法と阻害にあると推察される。具体的に示すと、核酸増幅反応では5 μ L程度の核酸抽出液が反応に用いられるが、現行の試料水（上水20L、原水10L）からの核酸抽出液を5 μ L程度にまで濃縮することは技術的に問題がある（濃縮操作による誤差が大きくなる）。一方、50 μ L程度にまで濃縮した核酸抽出液の一部を用いるとした場合、クリプトスポリジウムの標的DNA量が少ないことから検出感度の不足が生じることに

ある。

2) 水道における遺伝子検出法適用に向けた検討状況

今般、厚生労働科学研究(「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(松井班))において、クリプトスポリジウム及びジアルジアに関する遺伝子検出法の検討を行ってきた。その成果として、ゲノム DNA ではなく、rRNA を鋳型として逆転写から増幅反応を行った結果、0.006 オーシストから検出可能とし、理論上、抽出試料の一部からでも検出が可能となった(Inomata ら、2009)。また、オーシスト等の濃縮、精製工程に磁気ビーズ法を適用することにより夾雑物が除かれ、精製度が高まり、阻害物質の除去も達成された。

RT-LAMP 法によるクリプトスポリジウム検査では、実際の河川試料から顕微鏡検出法と同等あるいはそれ以上の検出が得られている(Inomata ら、2009)。ジアルジアについても同様である(猪又ら、学会発表、松井班報告)。

これらの検出法の改良によって、クリプトスポリジウムの検出法として遺伝子検出法実用化に向けた課題が克服されつつあることから、今般、水道における微生物問題検討会において、クリプトスポリジウム等検出法として遺伝子検出法が妥当か検討することを提案する。

(参考) 遺伝子検出法と顕微鏡検出法の特徴の比較について

顕微鏡観察による検出法は技術の習得に多大な時間を要し、また分析者の個人差も生じやすいことから、精度管理に課題がある。一方、遺伝子検出法において、遺伝子増幅は試験の正確さがプライマープローブの設計に依存し、これを確認することに課題がある。2つの検出法の特徴とその比較について詳細を別添のとおり列挙した。

顕微鏡検出法と遺伝子検出法の特徴(長所・短所)

比較項目	顕微鏡検出法	遺伝子検出法	顕微鏡検出法と遺伝子検出法の長短
試料待機	1~2日の内に検査を終えないと、精度に悪影響する恐れ	精製後は冷凍保存待機が可能	遺伝子検出法の方が保存期間長い
イニシャルコスト、機器の品質との関係	蛍光微分干渉顕微鏡は300万円程度高解像を得るには高価な対物レンズを必要とする	LAMP法の目視判定では特別な装置が不要。リアルタイムPCRでは200万程度の装置必要。 他の検査に使用できる機器が主で機器の品質に価格の影響は少ない。	イニシャルコストは若干遺伝子検出法の方が安い。 機器の品質との関係では遺伝子検出法の方が影響少ない。
ランニングコストと試薬期限	蛍光試薬(EasyStain)が1回1812円(80回145000円)で試薬の使用期限がある。他にフィルターなど消耗品がある。	LAMPは1回2600円程度。Cp用が62400/48回、ジアルジア反応も同額。他に溶解液やチューブ消耗品等がある。試薬は冷凍保存で安定。	大きな差は無いが、蛍光試薬は輸入、LAMP試薬は国産。いずれの方法でも磁気ビーズに使用期限がある。
検出の前処理	蛍光抗体染色に30分、封入を含めて1時間弱	核酸抽出に1時間程度	いずれも並行処理可能だが、核酸抽出の方が労力と習熟を要しない。
試料の使用量	全量	一部	遺伝子検出法では高感度検出を行うので、一部検査で間に合う
追試	同じ標本を繰り返し観察するか、最初の試料採取濃縮に戻って作業を行う。	同じ試料から実施可能	遺伝子検出法の方が同じ試料から実施することが確実である。
確認	写真を撮影したり、クロスチェックを実施する	増幅産物の解析を行う	遺伝子検出法は実績が少ないので、目的とする配列の増幅を確認することが推奨される。
回収率	内部標準としてColorSeedを添加することで、濃縮段階からの回収率を求めることが可能	内部標準は容易ではなく回収率を求めることは困難。 外部標準を用意して、平行して処理を行い、操作に間違いが無いことを確認するのが現実的。	ColorSeedは内部標準により回収率を求めることは可能だが10回分107,000円と高価なのが難。 遺伝子増幅反応の阻害の有無は、外部標準を用意して別の反応チューブにより確認が可能。
検出の労力	1試料の観察に10~30分程度、あるいはそれ以上時間を要する	1試料に5分程度か	核酸増幅は複数を並行して反応させることが可能
迅速性	精製なしの蛍光染色に限れば早いですが、通常の作業を行うと1日を要する	精製なしの試験は行えないので、必ず通常の作業を行い、1日を要する	核酸増幅は複数を並行して反応させることが可能
検出の熟練	顕微鏡観察に習熟を要する	核酸の取り扱いに習熟を要する	それぞれの熟練を要する
夾雑物の影響	受ける	受ける	夾雑物が多ければいずれも検出精度感度が低下する
生存性	観察時点の活性は問われないが、浮遊法では活性がないと、回収されない恐れがある。ホルマリン等の固定処理により検査時期を遅らせることが行われるが、付着などによる回収率低下が気になる。	核酸が分解されずに残っていることが必要で、ある程度の活性を有したものを検出することになる。ホルマリン固定した試料は検査に不適當。	浮遊法による回収はいずれの検査法でも影響を受ける。磁気ビーズのみの精製を行うと、顕微鏡検査は生死関係なく検出が可能となる。遺伝子検査がより強く活性の影響を受けることになる。
定量性	数として表現する	定量PCR法であれば数として表現できる。LAMP法ならMPN法の実施が必要。	顕微鏡検出法では数として表現できるが、回収率や判定の問題から定量性がよいとは限らない。一方、核酸試験法はオーシストの活性の影響を受ける可能性がある。
定性性	熟練度に依存する傾向	定性的な検出は可能	数が多ければいずれの試験においても安定するが、負担を減らすために試料の量は減らすには、高感度な検出系が望ましい