

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

平成 21 年度厚生労働科学研究 (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
(微生物分科会)

研究代表者 松井佳彦 (北海道大学大学院工
学研究科)

研究分担者 泉山信司 (国立感染症研究所寄
生動物部)、遠藤卓郎 (国立感染症研究所細菌
第一部)、秋葉 道宏 (国立保健医療科学院水
道工学部)、松下 拓 (北海道大学大学院工学
研究科)

研究協力者 岸田直裕 (国立保健医療科学院
水道工学部)、片山浩之 (東京大学大学院工学
研究科)、森田重光 (麻布大学生命・環境科学
部)、浅見吉之、大谷喜一郎、勝山志乃 (神奈
川県内広域水道企業団)、猪又明子 (東京都健
康安全研究センター環境保健部)、黒木俊郎、
稲田貴嗣 (神奈川県衛生研究所)、溝口智子
(財)岐阜県公衆衛生検査センター生物臨床
検査課)、百田隆祥 (栄研化学 (株) 生物化学
研究所)、碓井圭名子 (タカラバイオ (株) 製
品開発センター)、大内一敏 (東洋濾紙 (株)
技術センター)

研究要旨

水道水の微生物学的な安全性は凝集沈殿ろ過と塩素消毒により担保されてきた。クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の混入による大規模な水系集団感染の経験を契機として、塩素消毒に大きく依存する微生物対策を改めて見直すことが求められている。

一般細菌に置き換わる指標としての従属栄養細菌測定が開始され、全国の測定値が徐々に明らかになりつつある。一般細菌に比べて高感度な試験が可能となったことで、不検出ではない、有意な測定値が得られている。

ウイルスではノロウイルス、インフルエンザウイルスの処理性を検証し、水道の安全性を確認した。

耐塩素性病原微生物対策として、試料水の濃縮方法、クリプトスポリジウムならびにジアルジアの迅速遺伝子検査法を開発した。rRNA の逆転写によってクリプトスポリジウムの高感度検出が可能となり、実用化に向けての道が開けた。一方、クリプトスポリジウム等検査が定期的に行われているが、検出状況を公表している 197 水道事業者中、24 事業者 (13%) において原水からの検出を確認した。畜産排水処理施設に着目し、病原性原虫の流出傾向を調査したところ、処理施設への流入水中のクリプトスポリジウム濃度は 24,000~960,000 oocysts/L、ジアルジア濃度は 3,900~810,000 cysts/L であり、検出率・濃度とも高かった。排水処理による両原虫の除去は平均で 2-3 log 程度であったが、処理に不良が生じると原虫の除去性能が著しく低下した。

A. 研究目的

微生物分科会では水道の微生物汚染に係る諸問題、すなわち従属栄養細菌、腸管系ウイルス、そして耐塩素性病原微生物を包括的に検討し、水道の微生物学的な安全性確保と向上を目指している。

平成 20 年 4 月より従属栄養細菌数の測定は水質管理目標設定項目に追加された。従属栄養細菌を一般細菌に代わる指標として活用するには、現状を明らかにし、活用方法の整理と実践が必要と考える。

腸管系ウイルスでは現行の浄水処理によって十分に不活化されることを示すことが、安全・安心につながる。ヒトノロウイルスは、未だ効率的な細胞培養系が確立されていないため、培養可能な病原性ウイルス (マウスノロウイルス) との比較から現行の処理による除去性能 (log removal) を求めた。トリインフルエンザウイルスは腸管で増殖して鳥間での水を介した糞口感染が指摘されることから、水道におけるインフルエンザウイルスの処理性について確認を行った。

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策ではモニタリングシステムの拡充に向けた濃縮方法と検出方法の開発検討を進めている。平成 19 年 4 月に適用となった指針で浄水を毎日 20 リットル以上採水して 14 日間の保存が推奨されているが、試料水そのものの保存には場所を要することから、水試料の濃縮とその保存方法について提案した。ここでは連続的に採水することで水質変化に対応したり、濃縮物として保存することで保存を容易にした。さらに浄水だけでなく原水試料の濃縮方法についても新たに検討を始めた。

現行の指針におけるクリプトスポリジウム等検査法は顕微鏡を主体とする検査法であるが、顕微鏡検査に比べて複数の試料を一括して処理が可能となる遺伝子検査法に期待が寄せられている。クリプトスポリジウム等に関しては排出源対策が重要であることから、相模川下流域及び社家取水口で検出されたクリプトスポリジウムの型別判定を行い、併せて、畜産施設からのオーシストの排出状況を調査した。

B. 研究方法

B1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌検査について、神奈川県内広域水道企業団の水源である酒匂川の河川水を用いて実施した。また、全国各地における従属栄養細菌の検出状況については各地の水道事業者がインターネット上で公表している水質検査結果を集計した。低濃度の残留塩素が存在する状況での従属栄養細菌増殖（リグロース）の可能性については、実験的に低濃度の残留塩素を保持した環境を作り、滞留水（保存水）における従属栄養細菌の挙動を追跡した。

B2 腸管系ウイルスに関する研究

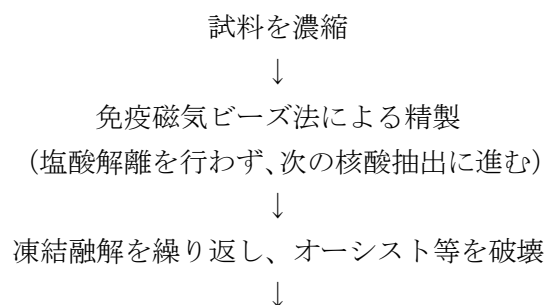
ヒトノロウイルスは細胞培養形が確立されていないことから、PCR によるマウスノロウイルスの評価系を応用して塩素に対する耐性

の評価を行なった。また、凝集・沈殿・ろ過による除去は、ヒトノロウイルスの外殻タンパク粒子（rNV-VLPs：バキュロウイルス-昆虫細胞で発現させたもの）を用いた添加実験により評価した。あわせて、大腸菌ファージ Qβ ならびに MS2 を用いて除去を求め、外殻タンパク粒子で得られた結果との比較した。インフルエンザウイルスはヒトインフルエンザ（H1N1 季節性）ならびにトリインフルエンザ（H5N3）を使用した。

B3 耐塩素性病原性微生物の研究

浄水試料の濃縮・保存を可能とする新規ろ過方法として、酸溶解性の粒状ハイドロキシアパタイトを用いたケーキろ過フィルターを開発し、性能評価を行った。試料水として国立感染症研究所内の水道蛇口水、神奈川県内広域水道企業団綾瀬浄水場計器室の浄水を使用した。ろ過水中に既知濃度の 3 μm 蛍光ビーズ、あるいはホルマリン固定オーシストを添加し、回収率を評価した。実地検証例として神奈川県内の 2 つの水道事業者、A 市；河川表流水を原水 15500m³/日浄水場、B 市：深井戸を水源とする浄水場の協力を得た。A 市では 20L、60L、及び B 市では 24 時間の連続濃縮を行った。一方、原水濃縮法としての応用には相模川河川水を用いて、ろ過水量等を確認した。原水適用装置モデルは、浄水用 37 mm サンプリングユニットではなく、90mm 径のフィルターホルダーにろ紙と粉体を使用した。

オーシストからの核酸抽出は以下の手順で行った。



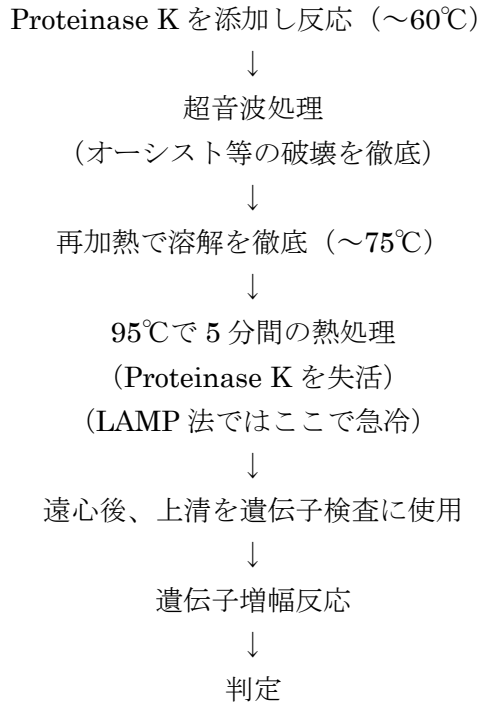


図 遺伝子抽出手順を中心とした遺伝子検査法の流れ

RT-LAMP 法の感度試験では、核酸抽出液 (600 個/5 μL) を 10 倍毎の連続希釈濃度で 0.00006 個/5 μL まで調整し、各濃度段階について 2 連の RT-LAMP 反応を行った。

検鏡法と RT-LAMP 法による環境水からのクリプトスポリジウム検出を比較した。環境水 20L を定法に従いフィルター濃縮した。濃縮液を 2 等分し、それぞれ免疫磁気ビーズによる精製を行った。一方を定法に従い検鏡法で、他方を核酸抽出に使用した。濃縮液の沈渣量が多い場合には、沈渣を 2～3 等分し、それぞれを免疫磁気ビーズで精製した。全ての環境水試料は磁気ビーズ精製後 -20℃ で冷凍保存し、後日まとめて核酸抽出を行った。核酸抽出液 20 μL より 5 μL を RT-LAMP に使用した。RT-LAMP により陽性となった増幅産物は電気泳動を行い、バンドパターンの異同により増幅産物がクリプトスポリジウム等であることを確認した。併せて、定量 PCR の反応系の構築を行なった。

全国のクリプトスポリジウム等検出状況は、

インターネット上で公表している 197 水道事業体の測定値を集計し、その解析を試みた。相模川水系のクリプトスポリジウムの遺伝子型別では、サンプルを中空糸膜+遠心分離法で濃縮し、DNA を精製した後、PCR 法で解析対象遺伝子 (18SrDNA, hsp70) を増幅し、既知のクリプトスポリジウム遺伝子配列情報に基づいて、クリプトスポリジウムの種及び株を同定した。養豚施設の汚染実態調査では、養豚舎内に排泄された糞便と母豚の直腸便を FEA 法により検査し。また、試料の一部から磁気ビーズ法によりクリプトスポリジウム等を精製し、18S rDNA 遺伝子の配列に基づく型別を実施した。畜産施設の排水処理評価では、畜産流入排水は 2L、畜産排水処理水は 10 L からクリプトスポリジウム等の検出を試みた。なお、調査対象施設では畜舎排水は活性汚泥法で処理がなされていた。施設への流入排水は遠心濃縮、排水は中空糸限外ろ過膜で加圧ろ過濃縮した。超音波処理後にショ糖密度勾配遠心法で精製したオーシストをセルロースフィルター上で蛍光抗体染色し、定法に従い顕微鏡で計数した。

C. 研究結果および考察

C1 従属栄養細菌の指標性に関する研究

酒匂川の河川水を取水する飯泉取水管理事務所で平成 17 年 8 月より平成 20 年 12 月まで 1 回/月の頻度で行った 41 回の試験結果より、同時に測定した他の項目と比較したところ、

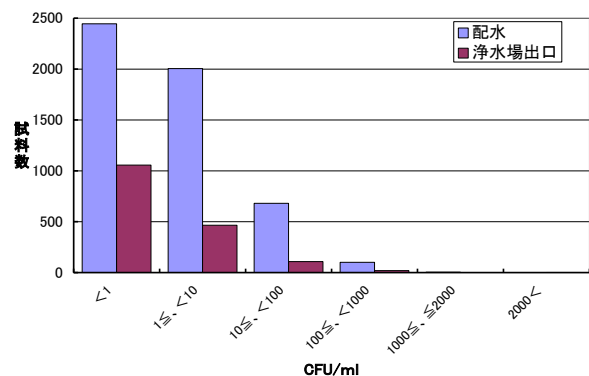


図 インターネット上で公開された従属栄養細菌の検出状況 (試料総数 6888)

従属栄養細菌は、一般細菌（正）、水温（正）、濁度（正）等と有意な関係が認められた。幾何平均値で比較すると、従属栄養細菌は一般細菌の約 28 倍の菌数が得られた。浄水処理工程でも一般細菌より多くの菌数が検出された。

全国的な検出状況はインターネット上で公表されている測定値を調査した。従属栄養細菌が水質管理目標設定項目となった平成 20 年 4 月以降、多くの水道事業体で試験が行われ、一部の結果は公開されている。その結果を集計したのが図 1 である。浄水場出口、給水栓などの浄水系試料では 100cfu/ml 未満がその大半を占めるが、最高値は 5900cfu/ml であった。水質管理目標項目の目標値 (2000cfu/ml) を超えた報告はこの 1 例のみであった。

十分塩素と接触した水道水を遊離残留塩素濃度を下げた状態で保存し、従属栄養細菌のリグロースが起こるか実験した。さらに誤接続等による汚染が生じた場合を想定し、低残留塩素状況下、あるいは塩素濃度は水質基準内ではあるが消毒に不利な場合の条件 (高 pH 値、濁質含有) についても検討した。具体的には、試料の遊離残留塩素をチオ硫酸ナトリウム溶液で遊離残留塩素を減らし、0.1、0.05、0.0mg/L とし、その後、時間経過とともに減少する残留塩素濃度を次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して保持した。その結果 0.05mg/L でも残留塩素が存在する場合には、極微量の原水を添加した場合を含めて、pH7.2 前後でも pH8.0 でも 10 日以内には従属栄養細菌の顕著な増殖は認められなかった。しかし、濁度 0.17 度を含む試料水で同様の実験を行ったところ、0.1、0.05mg/L の残留塩素では従属栄養細菌の増殖が認められ、残留塩素濃度が低下するほど増殖は早期に見られた。

C2 腸管系ウイルスに関する研究

ノロウイルスに類縁のマウスノロウイルスを用いてウイルスの塩素耐性を評価した。その結果、3mg/L・min の遊離塩素消毒により

99.99% (4log) 以上不活化することを明らかにした。一方、塩素消毒におけるノロウイルス GII とマウスノロウイルスの遺伝子残存率が同程度であったことから、ノロウイルス GII も 3mg/L・min の遊離塩素消毒により 99.99% (4log) 以上不活化することが期待された。実務的には、最低 0.1mg/L の遊離塩素濃度 (水道法) を保った配水システムにおいては 30 分間の接触で 99.99% (4log) 以上のノロウイルス不活化が期待できるものと評価された。

凝集処理における rNV-VLPs の除去は、凝集剤添加濃度 40 mM-Al or -Fe において、0.7-1.2 log であり、凝集剤として PAC (pH 6.8) および塩化第二鉄 (pH 5.8) を用いた場合に 1 log 以上の除去が得られ、硫酸バンド (pH 6.8) を用いた場合の除去よりも高かった。また、凝集沈澱-急速砂ろ過処理においては、凝集剤として PAC (pH 6.8) および塩化第二鉄 (pH 5.8) を用いた場合に約 3 log 以上の除去が得られた。このとき、MS2 の除去は、rNV-VLPs の除去よりも高かったため、MS2 がヒトノロウイルスの代替指標とはならないと考えられた。一方、Q β の除去は、rNV-VLPs の除去と同程度、あるいはそれよりも低いことから、MS2 に比べては指標性が高いと考え

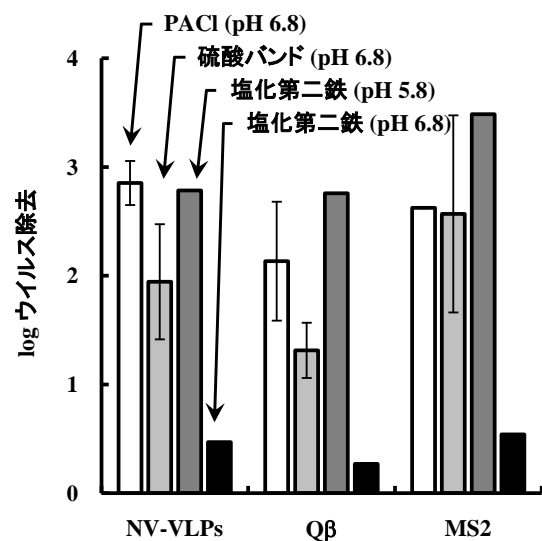
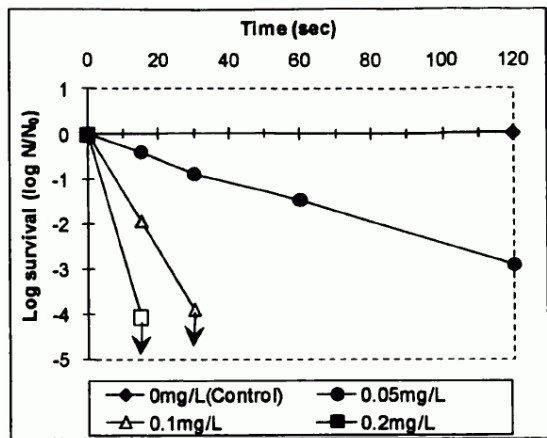


図1. 凝集沈澱-砂ろ過処理後のウイルスの除去率比較、いずれも凝集剤添加濃度は40 μ M-Al or Fe

られた。ただし、個々の処理単位における Qb と rNV-VLPs の処理性が異なったことから、Qb がヒトノロウイルスの最適な代替指標とはならないものと判断された。

インフルエンザウイルスの塩素消毒、モノクロラミン、紫外線による不活化を、細胞への感染性を指標として評価した。H1N1 型は 0.1mg/L の 30 秒間の接触時間で 4-log 以上の不活化が得られた。これは文献に報告されているトリインフルエンザ (H5N1) 消毒と遜色ない結果と考えられた (Rice ら、2007)。H1N1 型のモノクロラミン消毒では 0.4mg/L の 10



※ 白抜きは検出下限未満

図 塩素消毒によるインフルエンザウイルス (H1N1) の不活化

分間の接触時間で 2-log 以上が不活化された。H1N1 型ならびに H5N3 型の紫外線消毒では、4mWs/cm² の線量で 2-log 以上が不活化された。以上の結果、インフルエンザウイルスが他のウイルスと比較して、消毒処理に高い耐性を持つことは無かった。

C3 耐塩素性病原微生物の研究

ろ過水量の向上と有機溶媒を用いないろ過回収方法として酸溶解性ハイドロキシアパタイト粒子を用いたケーキろ過濃縮方法を開発した。35mm 程のプラスチック製使い捨て容器にアパタイト 1g を充填したケーキろ過で 200 ~ 600L 程度の水道水を通水することが可能であった。蛍光ビーズ、あるいはオーシストで 90% 以上の回収率が得られた。綾瀬浄水場の浄水では 400L 程度のろ過が実用的な範囲と思われた。神奈川県内の 2 つの水道事業体の協力のもとで実施した試験でも、期待通りのろ過結果を得た。なお、この実地試験では濃縮量と所要時間の関係及び濃縮産物の検鏡結果などから浄水処理上の課題も判明し、ろ過施設における凝集剤の未使用の実態とアルミニウム濃度の管理の関係、ろ過池の管理の重要性を改めて認識した。



図 直径 35mm 程のプラスチック製使い捨て容器を用いて作成した酸溶解性アパタイト粒子によるケーキろ過濃縮ユニット

クリプトスポリジウム等の迅速遺伝子検査法の開発では、RT-LAMP 法、Cycleave 法ならびに Universal Q プローブ法による RT-PCR の高感度検出系を確立した。RT (逆転写反応) を行わなかった従来の LAMP 法検出には 1 本の反応チューブに全ての試料を使用することが必要であったが、コピー数が多い rRNA を標的とした RT により、理論上 0.006 オーシストからの検出が可能となった。一方、ジアルジアは rDNA 遺伝子のコピー数が多かったことから RT 反応無しでも高感度検出が可能であった。RT 反応による高感度化は他の遺伝子検査法でも同様のことで、RT-LAMP 法に習い、高感度な 2 つの qRT-PCR 法を開発することができた。簡便な定性試験に利便性が期待される LAMP 法とは異なり、定量 PCR では必要に応じオーシスト・シスト数を求めることが可能となる。実際の河川試料を用いた場合において RT-LAMP 法により得られた結果の検証として増幅産物の解析を行い、何れも特異的な増幅であったことを確認した。

現在、ホームページ上でクリプトスポリジウムの検出状況を公表している水道施設は 197 事業体にのぼる。水源は表流水から地下水まで様々であるが、このうちクリプトスポリジウムを検出した事業体は 24 事業体 (13%) に留まり (最大値は 37 オーシスト/20 L)、報告の事業体が試験に熟練した施設に偏

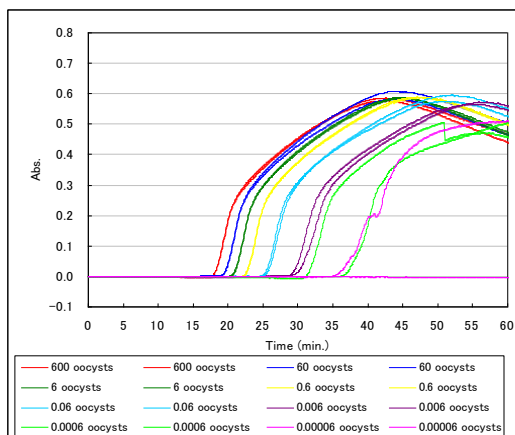


図 RT-LAMP の検出感度

る傾向が伺えることから改めて外部精度管理システムの必要性を検討する時期にあるものとする。なお、浄水から検出されている事例はなかったことを付記する。

相模川水系のクリプトスポリジウムの遺伝子型別では、社家取水口でブタ、ウシ、ヒト型の塩基配列が確認された。また、右岸から流入する小鮎川、中津川からはブタ型が、左岸から流入する貫抜川からはウシ型とヒト型が確認された。社家取水口では複数の型が確認されたが、過去の調査でクリプトスポリジウムが高濃度検出されているのは右岸側から流入する小鮎川と中津川であるので、社家取水口で検出されているクリプトスポリジウムはブタ型が多いと推測され、また、小鮎川と中津川で検出されているクリプトスポリジウムは上流の豚舎が排出源と考えられた。

養豚施設の調査からは 2 ヶ月齢のブタからクリプトスポリジウムが検出され、rRNA 遺伝子の一部配列の 97% が一致したことから、遺伝子型は pig genotype II および *Cryptosporidium suis* (要精査) と考えられた。いずれの遺伝子型もヒトからの検出例が報告されている。ジアルジアは 2~6 ヶ月齢の子ブタから検出され、遺伝子型は Assemblage E であることを、rRNA 遺伝子の一部配列から (100% 一致) 確認した。Assemblage E は主に有蹄類を宿主とするものであるが、ヒトからの検出例も報告されている。

畜産排水処理施設を調査した結果、流入排水中のクリプトスポリジウムオーシスト濃度は 24,000~960,000 oocysts/L、ジアルジアシスト濃度は 3,900~810,000 cysts/L であり、検出率・濃度とも高かった。畜産排水および処理水中濃度から排水処理による両原虫の除去を算出したところ、平均で 2-3 log 程度除去されることがわかったが、汚泥のバルキング (膨化: 汚泥が沈降しにくくなり、上澄水が得にくくなる現象) が生じて処理に支障をきたすと、原虫の除去が著しく低下すること

を確認した。家畜密度の高い流域において取水を行う場合、下水同様、畜産由来の原虫汚染について注意を払う必要があることが示された。

平成19年度調査結果

採取日	平成19年7月25日			
	社家 吸水井	小鮎川 第二鮎津橋	貫抜川	中津川 鮎津橋
採取量(L)	370	240	300	220
クリプトスポリジウム 検鏡法測定結果	0個/10L	0個/10L	1個/10L	3個/10L
遺伝子解析結果	ブタ・ウシ	不検出	ウシ・ヒト	ブタ
ジアルジア	1個/10L	0個/10L	0個/10L	0個/10L

採取日	平成20年2月27日			
	社家 吸水井	小鮎川 第二鮎津橋	貫抜川	中津川 鮎津橋
採取量(L)	210	140		150
クリプトスポリジウム 検鏡法測定結果	8/10L	18個/10L	流量が僅かであつた為未実施	2個/10L
遺伝子解析結果	ブタ・ウシ・ ヒト	ブタ		ブタ
ジアルジア	2個/10L	10個/10L		5個/10L

平成20年度調査結果

採取日	平成21年		
	2月9日	2月12日	2月16日
採取地点	社家吸水井		
採取量(L)	300	330	510
クリプトスポリジウム 検鏡法測定結果	1個/10L	未実施	0個/10L
遺伝子解析結果	ブタ	不検出	ブタ・その他
ジアルジア	0	未実施	0

E. 結論

従属栄養細菌の指標性に関する研究

従属栄養細菌は、一般細菌、水温、濁度との相関が認められた。一般細菌と比較すると、水温との関係は弱く、また菌数も浄水処理工程で多く検出されることから、水温の影響を強く受けない感度の高い指標と考えられた。

全国的な浄水系試料の検出状況は100cfu/ml 未満がその大半を占めたが、最高値は5900cfu/mlであった。

水道水の残留塩素濃度を下げた状態で保存し、従属栄養細菌を監視したところ0.05mg/lでも残留塩素が存在する場合には、従属栄養細菌の顕著な増殖は認められなかった。しかし、濁度0.17度の沈殿処理水を試料として同様の実験を行ったところ、0.1、0.05mg/lの残留塩素を含んでいても従属栄養細菌の増殖が認められた。

腸管系ウイルスに関する研究

遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法により発現させたrNV-VLPsは凝集沈殿-急速砂ろ過処理において、凝集剤としてPAC(pH 6.8)および塩化第二鉄(pH 5.8)を用いた場合に約3 log以上の除去が得られた。Qβの除去は、rNV-VLPsの除去と同程度、あるいは低かったため、MS2に比べて指標性があると考えられるものの個々の処理単位の凝集沈殿処理、急速砂ろ過処理におけるQβとrNV-VLPsの処理性が異なったことから、Qβであってもヒトノロウイルスの最適な代替指標とはならないことに注意が必要である。

ノロウイルスの塩素消毒による不活化の評価を行い、最低0.1mg/Lの遊離塩素濃度(水道法)を保った配水システムにおいては30分間の接触で4 log以上の不活化が期待できるものと評価された。

インフルエンザウイルスの消毒を、細胞への感染性を指標として評価した結果、インフルエンザウイルスが他のウイルスと比較して、消毒処理に高い耐性を持つことは無かった。

耐塩素性病原微生物の研究

簡便で効率的なクリプトスポリジウム等原虫類の試験のためのサンプル濃縮に、ハイドロキシアパタイト粒子のろ過濃縮法を開発し、所定のろ過性能が得られた。ケーキフィルターを大容量向けに大型化することで原水にも適用可能であることを確認した。

全国的なクリプトスポリジウム等検出状況を調査した結果、クリプトスポリジウムの検出を報告している事業者は24事業者であり、13%に過ぎなかった。検出状況は予想以上に低く個々の試験機関における精度管理の必要性が指摘されるものと判断された。

免疫磁気ビーズによるクリプトスポリジウムオーシストの分離・精製と組み合わせたRT-LAMP法により、検鏡法よりも高感度にクリプトスポリジウムを検出することが可能となった。ちなみに、ジアルジアは通常の(DNA

を標的とした) LAMP 法でも十分な感度が確保されていた。今回の改良により、クリプトスポリジウムの遺伝子検査は抽出試料の一部より 1 反応 (チューブ) で 1 個のオーシスト・シストが検出可能となり、実用に向けての道が開けた。LAMP 法とは別に、Cycleave 法ならびに Universal QProbe 法を用いた高感度な RT-PCR 法を構築した。

社家取水口で検出されるクリプトスポリジウムは、人への感染報告が少ないブタ型が多いと推定されたが、同時に人への感染リスクの高いヒト型やウシ型も検出された。畜産施設の汚染状況の調査からは依然として多量のクリプトスポリジウムのオーシストおよびジアルジアのシストが排出されている現状が確認された。畜産排水処理では両原虫が平均で 2-3 log 程度除去されていたが、汚泥のバルキングが生じると、原虫の除去が著しく低下した。病原性原虫は現行の排水規制では規制対象となっていないことから、家畜密度の高い流域において取水を行う場合、畜産由来の原虫汚染について注意を払う必要があることを改めて認識した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. and Ohno, K., Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Research*, accepted.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳, 浦崎稔史, 大野浩一, 遺伝子組換えノロウイルス外套タンパク粒子 (rNV-VLPs) を用いたヒトノロウイルスの浄水処理性評価, *環境工学研究論文集*, 46, 415-422, 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y.,

Urasaki, T. and Ohno, K., Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q β and MS2, during the aluminum coagulation process, *Water Research*, 43(3), 605-612, 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K., Comparison of removal performance of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophage Q β and MS2, in a coagulation-ceramic microfiltration system, *Journal of Membrane Science*, 326, 564-571, 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K., Effects of reversible and irreversible membrane fouling on virus removal by a coagulation-microfiltration system, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 57(7), 501-506, 2008.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Ohno, K. and Kobuke, M., Virus removal in a hybrid coagulation-microfiltration system - Investigating mechanisms of virus removal by a combination of PCR and PFU methods, *Water Science and Technology: Water Supply*, 7(5-6), 2007.

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 Science and Technology*, 60 (8), 2167-2172, 2009.

Kuroki T, Izumiyama S, Yagita K, Une Y, Hayashidani H, Kuro-o M, Mori A, Moriguchi H, Toriba M, Ishibashi T, and Endo T, Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in snakes in Japan. *Parasitol Res.* 103(4):801-805, 2008

高木正明, 鳥海宏, 遠藤卓郎, 山本徳栄, 黒木俊郎, プール水を介したクリプトスポリジウム症集団発生事例, *感染症誌*, 82, 14-19, 2008

2. 学会発表

Urasaki, T., Matsushita, T., Shirasaki, N., Oshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus VLPs in drinking water treatment process, *Proceedings of The 3rd IWA-ASPIRE Conference*, Taipei, Taiwan, 18-22 October 2009.

Matsushita, T., Shirasaki, N., Oshiba, A., Urasaki, T., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus by a coagulation-ceramic MF hybrid system, *Proceedings of Euromembrane 2009 Conference*, Montpellier, France, 6-10 September 2009.

Matsushita, T., Shirasaki, N., Kobuke, M., Matsui, Y. and Ohno, K., Effective removal of virus by ceramic microfiltration with in-line coagulation pretreatment, *Proceedings of Euromembrane 2009 Conference*, Montpellier, France, 6-10 September 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Oshiba, A. and Ohno, K., Evaluation of norovirus removal performance in a coagulation-ceramic microfiltration process by using

recombinant norovirus VLPs, *Proceedings of 5th IWA Specialised Membrane Technology Conference for Water and Wastewater Treatment*, Beijing, China, 1-3 September 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Urasaki, T. and Ohno, K., Application of recombinant norovirus VLPs to evaluate norovirus removal performance in a coagulation-sedimentation-rapid sand filtration process, *Proceedings of Nanoparticle and Particle Separation 2009*, Durham, USA, 3-5 June 2009.

Matsushita, T., Shirasaki, N., Urasaki, T., Oshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus during conventional drinking water treatment process -application of recombinant NV-VLPs to laboratory-scale experiments, *Proceedings of 15th International Symposium of the Health-Related Water Microbiology Group*, Naxos, Greece, 31 May-5 June 2009.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳, 浦崎稔史, 大野浩一, 遺伝子組換えノロウイルス外套タンパク粒子(rNV-VLPs)を用いたヒトノロウイルスの浄水処理性評価, 第46回環境工学研究フォーラム, 2009.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, ウイルス外套タンパクを用いたヒトノロウイルスの浄水処理性評価, 第12回日本水環境学会シンポジウム, 2009.

大芝淳, 白崎伸隆, 浦崎稔史, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理におけるノロウイルスの処理性評価, 第60回全国水道研究発表会, 2009.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M., Urasaki, T. and Ohno, K., Coagulation-ceramic microfiltration hybrid system effectively removes virus that is difficult to remove in conventional coagulation-sedimentation-sand filtration process, Proceedings of ICOM2008, Honolulu, Hawaii USA, 12-18 July 2008.

Shirasaki, N., Kobuke, M., Urasaki, T., Matsushita, T., Matsui, Y., and Ohno, K., Difference in behaviors of two indicator bacteriophages for waterborne pathogenic viruses during drinking water treatment process, and their effective removals by using coagulation-ceramic microfiltration hybrid system, Proceedings of IWA regional conference-membrane technologies in water and waste water treatment, Moscow, Russia, 2-4 June 2008.

白崎伸隆, 浦崎稔史, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, ノロウイルス外套タンパク (NV-VLPs) を用いたノロウイルスの浄水処理性評価, 第 45 回環境工学研究フォーラム, 2008.

浦崎稔史, 白崎伸隆, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理過程におけるバクテリオファージの処理性比較, 第 16 回衛生工学シンポジウム, 2008.

浦崎稔史, 白崎伸隆, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理におけるバクテリオファージの処理性の違い, 第 59 回全国水道研究発表会講演集, 2008.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K., Effects of reversible and irreversible membrane fouling on virus

removal by a coagulation-microfiltration system, Proceedings of IWA International Conference on Particle Separation (PS 2007), Toulouse, France, 9-12 July 2007. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Ohno, K., Kobuke, M., Virus removal in a hybrid coagulation-microfiltration system -Investigating mechanisms of virus removal by a combination of PCR and PFU methods, Proceedings of IWA 4th International Conference on Membranes for Water and Wastewater Treatment, Harrogate, UK, 14-17 May 2007.

小泓誠, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 凝集 MF 膜処理によるウイルス除去に与えるファウリングの影響, 第 15 回衛生工学シンポジウム, 167-170, 2007.

小泓誠, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, ファウリングが凝集 MF 膜処理におけるウイルス除去に与える影響, 第 58 回全国水道研究発表会講演集, 172-173, 2007.

猪又明子, 保坂三継, 泉山信司, 百田隆祥, 大谷喜一郎, 遠藤卓郎, 環境水中の原虫類検出を目的とした LAMP 法の検討, 第 59 回全国水道研究発表会, 平成 20 年 5 月 28~30 日, 仙台市

猪又明子, 百田隆祥, 泉山信司, 遠藤卓郎: RT-LAMP 法による水試料からのクリプトスポリジウム高感度検出. 日本水処理生物学会第 46 回大会, 平成 21 年 11 月 11~13 日, 高知市

石井孝明, 金田聖子, 吉田伸広, 森田重光, 平田強, Cryptosporidium オーシストおよび Giardia シストの精製方法の検討, 日本水環境学会年会 (2009.3)

泉山信司、大内一敏、遠藤卓郎、粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発、第59回全国水道研究発表会、平成20年仙台市

粒子のろ過回収方法および水質の管理方法」
特許公開2008-39481

2. 実用新案登録

3. その他

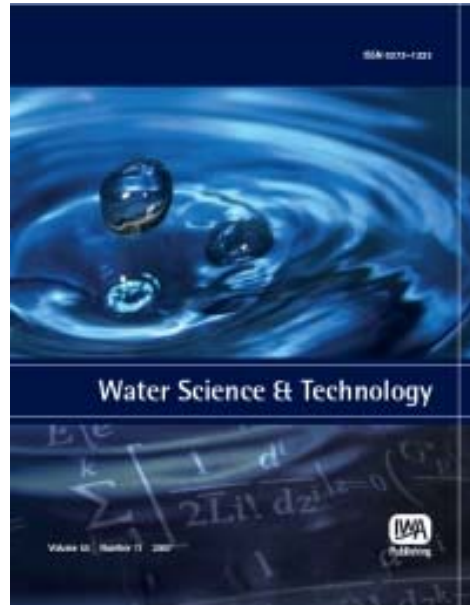
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

遠藤卓郎、泉山信司、「水中浮遊粒子のろ過回収用フィルタならびにこれを用いた水中浮遊

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.**



This article was originally published by IWA Publishing. IWA Publishing recognizes the retention of the right by the author(s) to photocopy or make single electronic copies of the paper for their own personal use, including for their own classroom use, or the personal use of colleagues, provided the copies are not offered for sale and are not distributed in a systematic way outside of their employing institution.

Please note that you are not permitted to post the IWA Publishing PDF version of your paper on your own website or your institution's website or repository.

Please direct any queries regarding use or permissions to wst@iwap.co.uk

Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples

A. Inomata, N. Kishida, T. Momoda, M. Akiba, S. Izumiyama, K. Yagita and T. Endo

ABSTRACT

We describe a novel assay for simple, rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples using a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). The assay is based on the detection of 18S rRNA specific for *Cryptosporidium* oocysts. The detection limit of the developed RT-LAMP assay was as low as 6×10^{-3} oocysts/test tube, which theoretically enables us to detect a *Cryptosporidium* oocyst and perform duplicated tests even if water samples contain only one oocyst. The developed RT-LAMP assay could more sensitively detect *Cryptosporidium* oocysts in real water samples than the conventional assay based on microscopic observation.

Key words | Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium*, LAMP, oocysts, RT-LAMP

A. Inomata

Department of Environmental Health and Toxicology,
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho,
Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan
E-mail: Akiko_inomata@member.metro.tokyo.jp

N. Kishida

M. Akiba

Department of Water Supply Engineering,
National Institute of Public Health,
2-3-6 Minami, Wako, Saitama 351-0197,
Japan
E-mail: kishida@niph.go.jp;
akiba@niph.go.jp

T. Momoda

Biochemical Research Laboratory,
Eiken Chemical CO., LTD,
Nogi 143, Nogi-machi, Shimotsugagun,
Tochigi 329-0114, Japan
E-mail: takayoshi_momoda@eiken.co.jp

S. Izumiyama (corresponding author)

K. Yagita

T. Endo

Department of Parasitology,
National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjuku,
Tokyo 162-8640,
Japan
E-mail: izmym@nih.go.jp;
kyagi@nih.go.jp;
tendo@nih.go.jp

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). Waterborne outbreaks have been reported in not only developing countries but also developed countries. The most notorious outbreak occurred in Milwaukee, Wisconsin in 1993 where more than 400,000 suspected and 5,000 confirmed cases of clinical cryptosporidiosis (MacKenzie *et al.* 1995; Cicirello *et al.* 1997; Corso *et al.* 2003).

Although detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples was traditionally carried out using either direct microscopic visualization of oocysts by staining techniques and fluorescent antibodies or enzyme immunoassays or cell culture, 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 & Sreevatsan 2006). Instead of these conventional methods, molecular (nucleic acid based) techniques have been developed for rapid detection of *Cryptosporidium* oocysts from water samples. Most molecular techniques are based on polymerase chain reaction (PCR) (Monis & Saint 2001; Hirata & Hashimoto 2006; Masago *et al.* 2006). PCR is sometimes combined with cell culture (cell culture-PCR) (Di Giovanni *et al.* 1999). However, these techniques require a high precision instrument (thermal cycler) to amplify target nucleic acids and elaborate methods such as gel electrophoresis for detection of amplified products. Therefore, simpler detection 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.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification technique that relies on an autocycling strand displacement DNA synthesis performed by the *Bst* DNA polymerase large fragment (Notomi *et al.* 2000). A large amount of DNA can be synthesized in a short time (15–60 min). LAMP enables nucleic acid amplification under isothermal conditions ranging from 60 to 65°C, and therefore, LAMP can be performed using a simple incubator or a water bath instead of a thermal cycler (Tani *et al.* 2007). Furthermore, gel electrophoresis is not needed because the LAMP method synthesizes a large amount of DNA so that the products can be detected by simple turbidity (Ohtsuka *et al.* 2005). Thus, LAMP is faster and simpler to perform than PCR. Recently, we have developed the LAMP assay for rapid detection of *Cryptosporidium* oocysts (Momoda *et al.* 2009). The detection limit of the assay was 0.8 oocysts/LAMP test tube, and the sensitivity of the assay was enough to detect even one oocyst. However, it is too difficult to extract and concentrate all target DNA to one test tube because the sample volume of the LAMP assay is usually only 5 µL. Therefore it is necessary to develop a more sensitive assay to obtain stable results even if only one

oocyst exists in water samples. To increase the sensitivity, we focused on rRNA in *Cryptosporidium* oocysts because the number of target (18S) rRNA is much greater than that of target rDNA. We were not sure of the amount of ribosomes in a *Cryptosporidium* oocyst, but expected a large quantity of rRNA. At least some bacterial cells have several thousand of ribosomes per cell (Fegatella *et al.* 1998), and approximately 80 percent of the total RNA in rapidly growing mammalian cells (e.g., cultured HeLa cells) is rRNA (Lodish *et al.* 2000). Moreover detection of nucleic acid sequences would theoretically be a good indicator of which cells are living, since the nucleic acid in a dead cell in a fresh water environment is likely to be degraded by endogenous and environmental nucleases within a relatively short turnover time (Paul *et al.* 1989).

In this study, we developed a one-step reverse-transcription LAMP (RT-LAMP) assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts, and applied the assay to the detection from real water samples collected from surface water and ground water.

METHODS

RT-LAMP assay

The RT-LAMP assay was performed in 25 µL of the total reaction mixture with a Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) containing 5 pmol (each) of outer primers CryF3 and CryB3, 20 pmol (each) of loop primers CryLF and CryLB, 40 pmol (each) of inner primers CryFIP and CryBIP, 1.5U of reverse transcriptase (Roche) and 5 µL of extracted RNA samples. Sequences of these primers are shown in Table 1. The reaction mixture was incubated at 63°C for 60 min, and turbidity was continuously monitored using a Loopamp real-time turbidimeter (LA-320C; Eiken Chemical CO., LTD., Tokyo, Japan). Positive and negative controls for the RT-LAMP reaction were included in every reaction. The positive control was made of RNA with an artificial sequence, which enables one to distinguish the RT-LAMP products between the artificial sequence and the real *Cryptosporidium* sequence by banding patterns on the gel after electrophoresis. The artificial sequence had all primer sequences

Table 1 | Primer oligonucleotides used for RT-LAMP

Primer name	Sequence (5' → 3')	Location*	Reference
CryFIP	TACTTAACTC ATTCCAATTA GAAAACCCAG GGAGGTAGTG ACAAG	502	Momoda et al. 2009
CryBIP	ATAAACCCCT TTACAAGTAT CAATTTATAC GCTATTGGAG CTGG	502	
CryF3	GCGCAAATTA CCCAATCC	413	
CryB3	ACTACGAGCT TTTTAACTGC	611	
CryLF	CCAAAAAGTC CTGTATTG	477	
CryLB	GAGGGCAAGT CTGGTG	528	

*Corresponding nucleotide position of *Cryptosporidium parvum* 18S rRNA gene (Accession No. L16996) of the 5' end.

and the *Eco* RI restriction enzyme site. After an oligo DNA synthesis of the artificial sequence with a T7 RNA polymerase binding site, the positive control was made by using the T7 RNA polymerase (Stratagene). The negative control was the pure water included in the kit.

RNA extraction

Immediately after five freeze (−80°C) and thaw (37°C) cycles, the sample solution including *Cryptosporidium* oocysts was incubated at 60°C for 30 min using a heat block with the solution for nucleic acids extraction (TE: 20 mM, NaCl: 0.1%, TrironX-100: 2 mM, DTT: 0.2 µg/mL, Proteinase K: 6 mAnson-U/mL). After that, the sample solution was sonicated for 2 min and incubated at 75°C for 10 min. Then, the solution was incubated at 95°C for 5 min to deactivate Proteinase K. Finally, the extracted RNA solution was immediately cooled down with ice.

Sensitivity test of RT-LAMP assay

Cryptosporidium parvum oocysts (H8 strain, Yagita et al. 2001) which was maintained in our laboratory by passages in infected mice were used for a sensitivity test of the RT-LAMP assay. Oocysts were purified from the feces 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 as 10-fold serial dilutions to obtain final concentrations of 6×10^{-5} – 10^2 oocysts/5 µL. Then, the RT-LAMP assay was performed in duplicate for each diluted sample.

Detection of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples by conventional microscopic observation and RT-LAMP

Twenty-two surface water samples and nine ground water samples were collected in two Japanese area (Tokyo Metropolitan, Miyagi prefecture). Twenty liters of water samples were concentrated to 5 ml by vacuum filtration with 5 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filters (90 mm diameter, Omnipore, Millipore). Typically between 1 to 3 filters, or a maximum 10 filters were required to process the entire 20 L sample. Half the volume of concentrated sample solution, namely 2.5 ml of the concentrate which was equivalent to 10 L of water sample, was used for conventional assay based on microscopic observation, and the other half volume was used for the RT-LAMP assay.

The conventional assay was performed by Japanese standard method for detection of *Cryptosporidium* in water supply systems (Ministry of Health, Labour & Welfare 2007). After purification through immunomagnetic separation (IMS) (Dynabeads GC Combo, Invitrogen), *Cryptosporidium* oocysts were separated from magnetic beads using hydrochloric acid, and fixed on a membrane filter. The fixed sample was stained with EasyStain antibody stain (BTF), and observed using an epifluorescent and differential interference contrast microscope.

RNA extraction was performed while *Cryptosporidium* oocysts were captured by magnetic beads. After the washing step in a 1.5 ml tube, the *Cryptosporidium* and beads complex were subjected for RNA extraction in a 20 µl solution. Then, the RT-LAMP assay was performed for the extracted RNA samples. To confirm the results, 1 µL

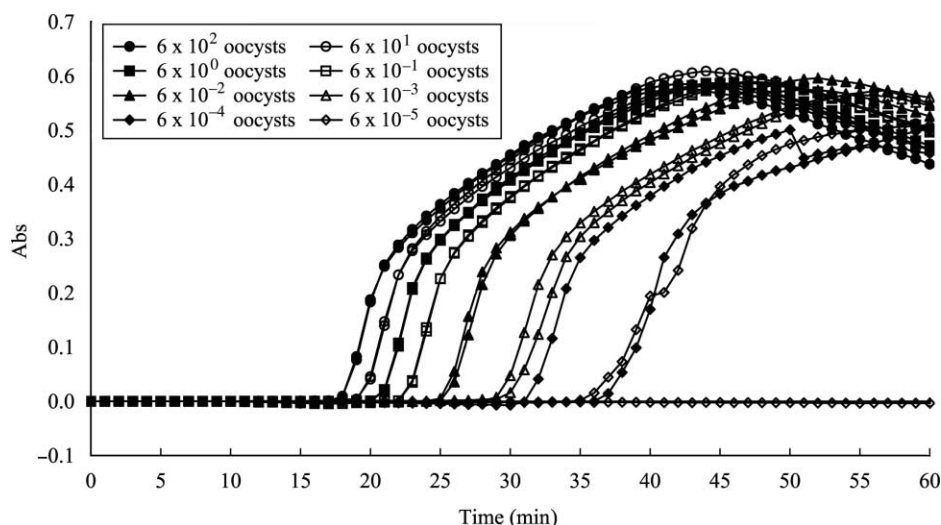


Figure 1 | Detection limit of the RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

aliquots of RT-LAMP products of positive samples were electrophoresed on a 2% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer), followed by staining with ethidium bromide and visualization on a UV transilluminator.

RESULTS AND DISCUSSION

Sensitivity of RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts

Figure 1 shows sensitivity test results for the developed RT-LAMP assay using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts. Threshold time (T_t), which is defined as the time at which the differential calculation value, exceeds 0.07, increased with the decrease in the template RNA concentration. The T_t value of each diluted sample is listed in Table 2. T_t values were unstable when oocysts concentration was 6×10^{-4} oocysts/LAMP test tube or less. When the concentration was 6×10^{-5} , one turbidity curve did not increase. On the other hand, T_t values were stable in duplicated tests when the concentration was 6×10^{-3} oocysts/LAMP test tube or more. Therefore, we judged the detection limit that shows reproducible results to be 6×10^{-3} oocysts/LAMP test tube. This value is much less than the detection limit by normal LAMP assay. In our previous study, the detection limit of the LAMP assay was investigated by almost the

same method, and the limit was shown as 0.8 oocysts/LAMP test tube. Thus, we succeeded in improving in sensitivity for the detection of *Cryptosporidium* oocysts.

Evaluation of RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples

Table 3 shows the detection results of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples. Two out of 31 water samples were positive in conventional microscopic observation, and these two samples were positive in the RT-LAMP assay, too. Hence, false-negative results were not observed in the RT-LAMP assay. However, 5 more samples were positive in

Table 2 | T_t values of each diluted sample in the RT-LAMP assay

RNA concentration* (oocysts/LAMP test tube)	T_t value (min)	Standard deviations
6×10^2	19.8, 19.8	0.00
6×10^1	21.3, 21.2	0.07
6×10^0	22.5, 22.6	0.07
6×10^{-1}	24.3, 24.3	0.00
6×10^{-2}	27.4, 27.1	0.21
6×10^{-3}	31.3, 32.3	0.71
6×10^{-4}	39.4, 33.2	4.38
6×10^{-5}	39.0, N.D.†	–

*RNA concentration is converted to oocysts concentration in a LAMP test tube.

†Not detected.

Table 3 | Detection results of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples by conventional microscopic observation and RT-LAMP

Sample No.	Sample type	Microscopic observation ¹ *	RT-LAMP ²
1	Surface water	–	+
2	Surface water	–	–
3	Shallow well water	–	–
4	Shallow well water	–	–
5	Surface water	–	–
6	Surface water	–	–
7	Surface water	–	–
8	Surface water	–	–
9	Surface water	–	–
10	Spring water	–	–
11	Spring water	–	–
12	Surface water	–	–
13	Spring water	–	–
14	Spring water	–	–
15	Surface water	–	–
16	Surface water	–	–
17	Surface water	–	–
18	Surface water	–	–
19	Surface water	–	–
20	Surface water	–	–
21	Surface water	–	+
22	Surface water	–	+
23	Surface water	+	+
24	Surface water	–	+
25	Surface water	–	+
26	Surface water	+	+
27	Surface water	–	–
28	Shallow well water	–	–
29	Shallow well water	–	–
30	Surface water	–	–
31	River-bed water	–	–

* +, Positive; –, Negative.

the RT-LAMP assay. Firstly, false-positive results by contamination of positive control in the RT-LAMP assay were considered as the reason. However, it was found by electrophoresis that the contamination did not occur, and RT-LAMP products of these five samples were amplified nucleic acid of *Cryptosporidium* oocysts as shown in Figure 2. Secondly, decreased sensitivity can be

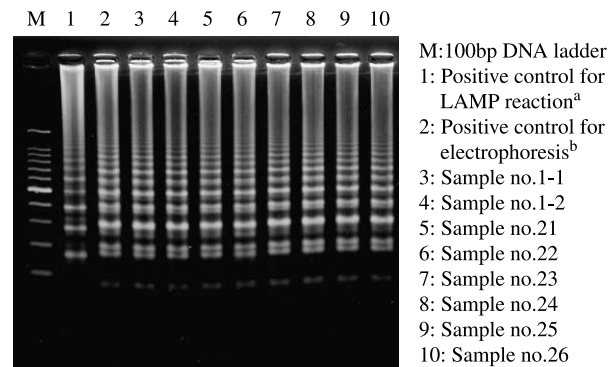


Figure 2 | Analysis of RT-LAMP products of positive samples by agarose gel electrophoresis. ^aPositive control for the RT-LAMP assay made of RNA with an artificial sequence. Electrophoretic pattern of this positive control is different from real *Cryptosporidium* oocysts. If the electrophoretic pattern of samples is the same as lane 1, it is an evidence of contamination by the positive control. ^bPositive control for electrophoresis which derives from nucleic acid of real *Cryptosporidium* oocysts. This positive control is not used in LAMP reactions.

caused by failure to separate all oocysts from magnetic beads, insufficient staining and incomplete detection by microscopic examination. Because of these reason, *Cryptosporidium* oocysts would be more sensitively detected in the RT-LAMP assay than the conventional microscopic observation.

CONCLUSIONS

We successfully developed a one-step RT-LAMP assay for the rapid and highly sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts. The detection limit is as low as 6×10^{-3} oocysts/test tube. Even if water samples contain only one *Cryptosporidium* oocyst, the oocyst can be detected using the developed RT-LAMP assay. Additionally, duplicated tests are possible in this assay. The RT-LAMP assay sensitively detects *Cryptosporidium* oocyst in real water samples. Use of the RT-LAMP assay instead of conventional assay based on microscopic observation will greatly decrease the labor needed for the detection of *Cryptosporidium* oocyst.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (H20-Kenki-ippan-012).

REFERENCES

- Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J. & Beach, M. J. 1999 Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* **5**(4), 579–584.
- Cicirello, H. G., Kehl, K. S., Addiss, D. G., Chusid, M. J., Glass, R. I., Davis, J. P. & Havens, P. L. 1997 *Cryptosporidiosis* in children during a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin: clinical, laboratory and epidemiologic findings. *Epidemiol. Infect.* **119**(1), 53–60.
- Corso, P. S., Kramer, M. H., Blair, K. A., Addiss, D. G., Davis, J. P. & Haddix, A. C. 2003 Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.* **9**(4), 426–431.
- Di Giovanni, G. D., Hashemi, F. H., Shaw, N. J., Abrams, F. A., LeChevallier, M. W. & Abbaszadegan, M. 1999 Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8), 3427–3432.
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S. & Cavicchioli, R. 1998 Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11), 4433–4438.
- Hirata, T. & Hashimoto, A. 2006 Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts isolated from sewage and river water. *Water Sci. Technol.* **54**(3), 197–202.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. 2000 Processing of rRNA and tRNA. In: *Molecular Cell Biology*, 4th edition, W. H. Freeman and Company, New York. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.section.2975> (accessed 10 June 2009).
- MacKenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., Kazmierczak, J. J. & Davis, J. P. 1995 Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.* **21**(1), 57–62.
- Masago, Y., Oguma, K., Katayama, H. & Ohgaki, S. 2006 Quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in river water by quenching probe PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Water Sci. Technol.* **54**(3), 119–126.
- Methods for the Detection of Cryptosporidium, Giardia and Indicator Microorganisms in Water Supply Systems* 2007 Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan.
- Momoda, T., Kojima, T., Ikedo, M., Izumiyama, S. & Endo, T. 2009 Sensitive and rapid detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Jpn Soc. Water Environ.* **32**(6), 321–324.
- Monis, P. T. & Saint, C. P. 2001 Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. *Water Res.* **35**(7), 1641–1648.
- Nichols, G. 2008 Epidemiology. In: Fayer, R. & Xiao, L. (eds) *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2nd edition. IWA Publishing, London, UK, pp. 79–118.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000 Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**(12), e63.
- O'Donoghue, P. J. 1995 *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* **25**(2), 139–195.
- Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. & Hara-Kudo, Y. 2005 Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11), 6730–6735.
- Paul, J. H., Jeffrey, W. H., David, A. W., DeFlaun, M. F. & Cazares, L. H. 1989 Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of Southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(7), 1823–1828.
- Peeters, J. E., Mazas, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(6), 1519–1522.
- Ramirez, N. E. & Sreevatsan, S. 2006 Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet. Parasitol.* **136**(3–4), 201–213.
- Tani, H., Teramura, T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T. & Noda, N. 2007 Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* **79**(15), 5608–5613.
- 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. *Parasitol. Res.* **87**(11), 950–955.