

遺伝子検出法検討の詳細について

1. 提供した消耗品

遺伝子検出試薬：Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット、Loopamp ジアルジア検出試薬キット（栄研化学）、AMV 逆転写酵素（Roche）、TaKaRa CycleavePCR® Cryptosporidium Detection Kit、同 Giardia Detection Kit、PrimeScript RT reagent Kit（タカラバイオ）

標準試料：クリプトスポリジウムオーシスト（*Cryptosporidium parvum* H8 株）、ジアルジアシスト（*Giardia lamblia* WB 株、*Giardia* sp. カモシカ分離株）、冷凍、あるいは紫外線照射した精製標品

核酸抽出試薬：TE 緩衝液（10mM Tris-HCl (tris-hydroxymethyl- aminomethane, pH7.6)、1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)）、1M NaCl、10% (w/v) TritonX-100、1M DTT (dithiothreitol)、600mAnson-U/ml Proteinase K、RNase free 水等

その他消耗品：免疫磁気ビーズ、プラスチック反応チューブ、低吸着チューブ、フィルター付きチップ等

2. 実験条件

遺伝子検出法は LAMP 法あるいは RT-PCR 法を用いた。検証について、前回検討会で示したとおり、試料水を濃縮し、免疫磁気ビーズ法によりクリプトスポリジウム等を精製した。精製したクリプトスポリジウム等より凍結融解、Proteinase K 溶解処理によって核酸を抽出した。抽出核酸の一部を用いて遺伝子増幅反応を行い、増幅の有無を判定した。

検証の流れに関して多少の変更を行った。添加回収試験は 5 機関が実施したが、免疫磁気ビーズの後に添加するだけでなく、免疫磁気ビーズの直前、試料水への添加回収試験も行われ、濃縮精製を含む評価も行った。

また、実試料を用いた検討が 3 機関において実施された。河川水中からクリプトスポリジウム等を検出し、顕微鏡検査の結果と比較した。

【フロー】

- (1) 上水 20L、あるいは原水 10L を試料とし、濃縮する。（顕微鏡検査と同じ操作を行う。クリプトスポリジウム等は低濃度でも問題となることから、大容量の水試料を濃縮する必要がある）

(2) 免疫磁気ビーズ法による精製（オーシスト以外の夾雑物を除く。特に遺伝子増幅は夾雑物による反応阻害が生じるので、洗浄操作を徹底する）

(3) 核酸抽出

- 1) 凍結融解を繰り返し、クリプトスポリジウム等を破壊（オーシスト・シスト壁は物理化学的に安定で壊れ難いため、抽出開始時に物理的な破壊操作を行う）
- 2) Proteinase K 反応液 50 μ L を添加し酵素溶解反応（ $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ）（たんぱく質分解酵素で分解し、核酸を遊離させる）
- 3) 超音波処理（物理的破壊を徹底する）
- 4) 再加熱（溶解を徹底 $\sim 75^{\circ}\text{C}$ ）
- 5) 95°C で5分間の熱処理と急冷（核酸増幅を阻害してしまう Proteinase K 酵素を失活させ、特に LAMP 法では急冷により核酸を変性状態にして反応性を高める）
- 6) 遠心後、上清を核酸抽出液として、遺伝子検出に使用する（万一夾雑物が混入した場合には分離してから使用する）

(4) 遺伝子増幅反応（試薬 20 μ L に核酸抽出物 5 μ L を混合し、装置で反応させる）

(5) 判定（遺伝子増幅を濁度・蛍光を指標に装置で読み取り、標的遺伝子の存否を判断する）

3. 資料の編集方針

協力機関の検証作業の経過は電子メール等で泉山宛に連絡いただき、必要により技術的助言を行うことで検証が行われるように努めた。各機関において検証を行う際に、当該機関によって当初予定していた検証方法に修正を加えて実施した機関や機関の制約上検証内容が限定的な機関も存在しており、結果は必ずしも一律ではなくなったが、検証シートの書式に記入いただくことで表記の統一を図った。

各施設が作成した検証シートは事前に泉山宛に送付いただき、必要により表記の改善修正の助言は行ったが、内容の最終的な判断は各施設においてなされた。

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	東京都健康安全研究センター
所属	環境保健部
担当者名	猪又 明子

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	LAMP 法、RT-PCR 法
感度試験概要	—
添加回収試験概要	—
実試料試験概要	・約 100 試料について、顕微鏡法、LAMP 法、RT-PCR 法を比較した。20 ないし 50 μL に抽出した試料の 1 ないし 5 μL で遺伝子検査法実施した結果、1 μL の陽性率がより高く、阻害回避効果が認められたため、少ない 1 μL での反応が推奨されたと考えられた。 ・顕微鏡法、LAMP 法、RT-PCR 法は同等の結果が得られている。時に不一致となることもあったが、元々のオーシスト、シスト数が少ないことから、試料を分割する際の確率の問題が大きいと考えられた。糞便汚染の強い畜産排水試料からは顕微鏡陽性、遺伝子検査陰性となることがあり、若干阻害が生じたと考えられ、試料の前処理の重要性を改めて確認した。 ・顕微鏡法よりも遺伝子検査法の陽性率が高い傾向にあった。LAMP 法と RT-PCR 法で結果が一致することが多く、偽陽性ではないと考えられた。PCR 産物の塩基配列決定では、クリプトからはクリプト、ジアルジアからはジアルジアの塩基配列が得られた。

3. 実試料試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	・約 100 の種々の原水等試料を使用。 ・顕微鏡法では概ね不検出が多いが、時に数個、畜産排水からは数十から数百が検出された。
濃縮方法	PTFE フィルター法
精製方法	磁気ビーズ法

その他特記事項	
---------	--

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	Loopamp®クリプトスポリジウム検出試薬キット、ジアルジア検出試薬キット、逆転写用試薬(AMV)
使用した遺伝子増幅装置	LA-320C
反応条件	63℃1 時間
その他特記事項	・逆転写反応を行う場合と行わない場合を比較した。 ・試料量 1 μL あるいは 5 μL の使用の場合を比較した。 ・研究協力者に RT-PCR の実施を依頼し、結果を比較した。

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	PTFE
染色用試薬	EasyStain
その他特記事項	

検出結果一覧表

別紙参照

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	顕微鏡法と同等以上の感度が得られている。
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、多くの場合、顕微鏡法陽性からは陽性、陰性からは陰性の結果が得られた。 ・LAMP 法反応産物の電気泳動像は、同一のパターンを示し特異的な増幅であったと考えられた。まれに、異なるパターンがあったことから、詳細は検討すべきと考えられた。 ・特異性は高く、LAMP 法陽性試料から PCR 法でも陽性が得られ、塩基配列決定を行ないクリプトスポリジウムはクリプトスポリジウム、ジアルジアはジアルジアの配列が得られた。
再現性	・2 回繰り返して行なった遺伝子検査では、2 回ともほぼ同じ結果が得られ、再現性があった。
顕微鏡法との比較	・定性的にはほぼ遜色ない結果と考えられた。数は少ないが、一部試料では顕微鏡法と必ずしも 1 : 1 にはならず、顕微鏡法のみ、あるいは遺伝子検査法のみ陽性となった場合が見られた。

	この理由としては、サンプルの分割が均等でなかった、オーシストが古くなって核酸が分解してしまった、阻害物質が混入した等の理由が考えられた。複数の遺伝子検査法による確認、塩基配列による確認から、誤陽性ではなく、顕微鏡法との検査法原理の違いによる影響も考えられた。
実用性評価	・当初、磁気ビーズ精製後に塩酸解離を行わず、手順の省略を図っていた。途中で塩酸解離を行うこととなり、顕微鏡法と同様の手間が生じることとなったが、顕微鏡法と同じ操作なので、操作に問題は感じなかった。遺伝子検査法に慣れている衛生研究所の職員にとっては負担が顕微鏡法より少なく、好ましいと感じた。
その他特記事項	・ジアルジアの LAMP 法の RT 反応は当施設でのみ行っている。感度向上には RT 化が必要と考えているが、一方で偽陽性が生じる恐れもあり、より詳細な検討を行いたい。

No.	採水日	水の種類	水量	クリプトスポリジウム							ジアルジア						
				検鏡	LAMP法			qRT-PCR法			検鏡	LAMP法			qRT-PCR法		
					LAMP 5 μ L	RT- LAMP 5μL	RT- LAMP 1μL	1回目	2回目	配列決定		LAMP 5 μ L	RT- LAMP	1回目	2回目	配列決定	
1	2008/10/7	浅井戸	10L	0	—	—					—	—	—				
2		浅井戸	10L	0	—	—					—	—	—				
3	2008/10/1	表流水	10L/3	0	—	+	+		+	Cryptosporidium	—	—	—		—		
4		表流水	10L/3	0	—	+	+		+	Cryptosporidium		—	—		—		
5		表流水	10L/3	0	—	—	—		—			—	—		—		
6		表流水	10L/2	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
7		表流水	10L/2	0	—	—	—		—			—	—		—		
8	2008/10/8	表流水	10L	0	—	—	+		—		—	—	—		—		
9		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
10		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
11		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
12	2008/10/9	表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
13	2008/10/15	湧水	10L	0	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—		
14		湧水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
15		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
16		湧水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
17	2008/10/22	湧水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
18		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
19		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
20		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
21		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
22	2008/11/4	表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
23		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
24	2008/11/26	表流水	10L	0	—	+	—, +	+	+	Cryptosporidium	—	—	+	+	+	Giardia	
25		表流水	10L	0	—	+	—, —		±	Cryptosporidium	—	—	—		—		
26		表流水	10L	1	—	+	+	+	+	Cryptosporidium	—	—	—	—	—		
27	2008/12/1	表流水	10L	0	—	+	+	+	+	Cryptosporidium	—	—	—	—	—		
28		表流水	10L	0	—	+	+		+	Cryptosporidium	—	—	—		—		
29		表流水	10L	1	—	+	+		+	Cryptosporidium	—	—	—		—		
30		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
31		浄水	20L	0	—	—	—		—			—	—		—		
32	2008/12/9	浅井戸	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
33		浅井戸	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
34		表流水	10L	0	—	—	—		—		—	—	—		—		
35		伏流水	10L	0	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—		
36	2008/1/8	養豚場排水	5mL	7	—	+	+		—		—	—	—		—		
37		養豚場排水	5mL	7	—	+	—, —		—		—	—	—		—		
38		養豚場排水	5mL	7	—	+	+		—		—	—	—		—		
39		養豚場排水	5mL	7	—	+	+		±	Cryptosporidium		—	—		—		
40		養豚場排水	5mL	7	—	+	+		+	Cryptosporidium		—	—		—		
41	2008/2/27	表流水	5L/2	2	—	+	+	+	+	Cryptosporidium	2	—	+	+	+	Giardia	
41-2		表流水	5L/2	2	—	—	+	+	+	Cryptosporidium		—	+	+	+	Giardia	
42		表流水	5L	1	—	—	—, —	—	±	Cryptosporidium	5	—	—	+	+	Giardia	
43		表流水	5L/2	4.5	—	—	+	+	+	Cryptosporidium	10	—	+	+	+	Giardia	
43-2		表流水	5L/2	4.5	—	—	+		+	Cryptosporidium		—	—		+	Giardia	
44	2008/1/8	養豚場排水	5mL	10	—	—	+	—	±	Cryptosporidium	—	—	—	—	—		
45		養豚場排水	5mL	10	—	—	—, +		+	Cryptosporidium		—	—		—		
46		養豚場排水	5mL	10	—	—	—, +		—		—	—	—		—		
47		養豚場排水	5mL	10	—	—	—, —		+	Cryptosporidium	—	—	—		—		
48		養豚場排水	5mL	10	—	—	+		+	Cryptosporidium	—	—	—		—		
49	2009/1/27	表流水	10L	0	—	—	—		—						—		
50		表流水	10L	0	—	—	—		—						—		
51	2009/2/9	表流水	10L/2	0.5	—	—	—, —		—						—		
52		表流水	10L/2	0.5	—	—	+		+	Cryptosporidium					—		
53	2009/2/24	表流水	10L	1	—	+	+		+	Cryptosporidium					—		
54		浄水	20L	0	—	—	—		—						—		
55		浄水	20L	0	—	—	—		—						—		
56		浄水	20L	0	—	—	—	—	—					—	—		
57		浅井戸	10L	0	—	—	—	—	—					—	—		
58		浅井戸	10L	0	—	—	—		—						—		
59	2009/4/7	表流水	10L	3	—	—	+		+	Cryptosporidium					—		
60	2009/3/12	表流水	10L/4	133	—	—	+	+	±	Cryptosporidium				—	—		

No.	採水日	水の種類	水量	クリプトスポリジウム							ジアルジア					
				検鏡	LAMP法			qRT-PCR法			検鏡	LAMP法		qRT-PCR法		
					LAMP 5 μ L	RT- LAMP 5μL	RT- LAMP 1μL	1回目	2回目	配列決定		LAMP 5 μ L	RT- LAMP	1回目	2回目	配列決定
61		表流水	10L/4	133	—	—	+		—						—	
62		表流水	10L/4	133	—	—	+		+	Cryptosporidium					—	
63		表流水	10L/4	133	—	—	+		+	Cryptosporidium					—	
64		表流水	10L/2	200	—	+	+	+	+	Cryptosporidium			—		—	
65		表流水	10L/2	200	—	—	—, —		+	Cryptosporidium					—	
66		表流水	10L/2	55	—	—	+		+	Cryptosporidium					—	
67		表流水	10L/2	55	—	—	—, —		±	Cryptosporidium					—	
68	2009/5/25	表流水	10L/3	0		—	—		—						+	Giardia
69		表流水	10L/3	0		—	—		—						+	Giardia
70		表流水	10L/3	0		—	—		—						—	
71	2009/8/23	浄水	20L	0		—	—		—						—	
72		浄水	20L	0		—	—		—						—	
73		浄水	20L	0		—	—		—						—	
74		表流水	10L/2	0		—	—		+						—	
75		表流水	10L/2	0		—	—		—						—	
76	2009/10/7	表流水	10L	0		—	—		—						—	
77	2009/10/14	表流水	10L	0		—	—		—						—	
78		湧水	10L	0		—	—		—						—	
79		湧水	10L	0		—	—		—						—	
80		湧水	10L	0		—	—		—						—	
81	2009/10/15	表流水	10L	0		—	—		—						—	
82		湧水	10L	0		—	—		—						—	
83	2009/10/20	表流水	10L	0		—	—		—						—	
84		表流水	10L	0		+	+		+	Cryptosporidium					—	
85		表流水	10L	0		—	—		—						—	
86		表流水	10L	0		—	—		—						—	
87		表流水	10L	0		—	—		—						—	
88	2009/10/21	湧水	10L	0		—	—		—						—	
89	2009/10/29	表流水	10L	0		—	—		—						—	
90	2009/11/4	表流水	10L	0		—	—		—						—	
91		表流水	10L	0		—	—		—						—	
92	2009/11/10	表流水	10L	0		—	—		—						—	
93		表流水	10L	0		—	—		—						—	
94		表流水	10L	0		—	—		—						—	
95		表流水	10L	1		—	+		+	Cryptosporidium					+	Giardia
96	2009/12/1	浄水	20L	0		—	—		—						—	
97		浄水	20L	0		—	—		—						—	
98		浄水	20L	0		—	—		—						—	
99		浄水	20L	0		—	—		—						—	
100	2010/2/9	表流水	10L	0		—	+		+	Cryptosporidium					+	Giardia
101		浄水	20L	0		—	—		—						—	
102		浄水	20L	0		—	—		—						—	
103		浄水	20L	0		—	—		—						—	

空欄: No data

RT-LAMPの5 μ Lと1 μ Lでは、阻害回避を目的に銹型量による結果の違いを比較検討した

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	神奈川県内広域水道企業団
所属	技術部水質管理センター
担当者名	勝山 志乃

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	LAMP 法、RT-PCR 法
感度試験概要	クリプト 0.0006 個、ジアルジア 0.06 個から陽性反応 (LAMP 法)
添加回収試験概要	—
実試料試験概要	水道原水、河川水を対象に、顕微鏡法、LAMP 法、RT-PCR 法を比較した。定性的に顕微鏡法とほぼ同等の結果が得られたが、一部試料では顕微鏡法と必ずしも 1:1 にはならず、顕微鏡法のみ、遺伝子検査法のみ陽性となった場合が見られた。理由としては、原虫数が少ないため、分割したそれぞれの試料に等しく原虫類がない場合が生じること、また、原水由来の阻害物質が遺伝子反応を阻害していることが考えられた。

3. 1 感度試験詳細

遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	Loopamp [®] RT-クリプトスポリジウム検出試薬 Kit、Loopamp [®] ジアルジア検出試薬 Kit、逆転写酵素 (AMV、Roche)
使用した遺伝子増幅装置	Loopamp リアルタイム濁度計
反応条件	63℃、60 分
その他特記事項	

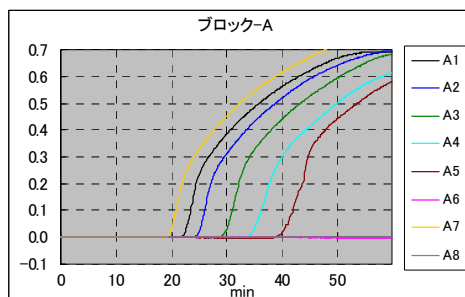
感度試験結果

Ch No.	コメント	Tt値
A1	Cry.6	23分54秒
A2	Cry.0.6	26分24秒
A3	Cry.0.06	31分24秒
A4	Cry.0.006	36分30秒
A5	Cry.0.0006	42分12秒
A6	Cry.0.00006	
A7	POS	21分18秒
A8	NEG	

Ch No.	コメント	Tt値
B1	Gia.6	36分30秒
B2	Gia.0.6	43分48秒
B3	Gia.0.06	52分54秒
B4	Gia.0.006	
B5	Gia.0.0006	
B6	Gia.0.00006	
B7	POS	23分48秒
B8	NEG	

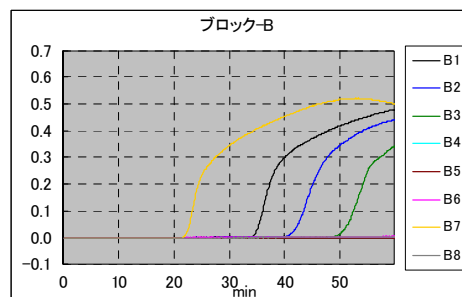
コメント:

S(Cryptosporidim)



測定日:

S(Giardia)



3.2 実試料試験詳細

試料水と試験法

項目	記入欄
試料水の概要	・原水の水系、採水地点、採水日等、検出結果表に記載 ・通常時のクリプト検出オーダーは地点によって異なり、ほとんどが0ないし10程度、排水流入などの多いところで$0 \sim 10^3$
濃縮方法	・PTFE フィルター法
精製方法	・磁気ビーズ法
その他特記事項	・研究協力者に RT-PCR の実施を依頼し、結果を比較した。

分析操作、遺伝子検出法

項目	記入欄
使用したキット名称等	Loopamp [®] RT-クリプトスポリジウム検出試薬 Kit、Loopamp [®] ジアルジア検出試薬 Kit、逆転写酵素 (AMV、Roche)
使用した遺伝子増幅装置	Loopamp リアルタイム濁度計
反応条件	63°C、60 分
その他特記事項	・試料によって、遺伝子反応阻害防止剤を添加した系としなかった系、遺伝子抽出試料の添加量を$5 \mu\text{l}$ (通常) の系と$1 \mu\text{l}$ の系、合計4系統の試験を実施。

顕微鏡観察法(比較対象)

項目	記入欄
観察用フィルター	PTFE (孔径 $1 \mu\text{m}$)
染色用試薬	EasyStain、DAPI 溶液
その他特記事項	

検出結果

表1 検出結果 クリプトスポリジウム

地点			採水 月日	検鏡 結果	LAMP								RT-PCR	
					阻害阻止剤なし				阻害阻止剤入り					
					5μl		1μl		5μl		1μl			
					Tt値	産物	Tt値	産物	Tt値	産物	Tt値	産物	結果	配列
クリプトスポリジウム	相模川水系	社家	4/6	0	—		47.10	+						
			5/6	0	—		—		—		—		—	—
			6/1	0	—		—		—		—		—	—
			7/1	0	—				—				—	—
			8/2	2	—		—		—		—		未実施	未実施
			9/1	2	—				—				未実施	未実施
		社家右岸魚道	4/6	13	—		41.20	+						
			5/6	13	—		44.42	+	34.48	+	29.12	+	+	クリプト
					—		—		—		—		—	—
			6/1	0	—		—		—		—		+	解析不能
			7/1	3	59.18	?			59.48	?			+	クリプト
		中津川	5/6	1	26.84	未実施	—						未実施	未実施
			7/1	6	—				—		42.48	+	+	クリプト
					—				—		49.00	+	—	—
		小鮎川	5/6	2	28.06	未実施	—						未実施	未実施
			5/6	251	31.36	+	24.24	+	26.12	+	23.3	+	+	クリプト
					27.60	+	25.12	+	24.00	+	23.00	+	+	クリプト
					7/1	3	47.42	+			49.12	+		
	9/1	0	37.84	未実施								未実施	未実施	
	酒匂川水系	飯泉	4/6	0	—		—		—		—			
			6/2	0	—		—		—		—		—	—
			7/1	0	—				—		—		—	—
			8/2	0	—		47.42	未実施	—				未実施	未実施
			9/1	0	—				—				未実施	未実施
		酒匂川	6/2	0	—		—		—		—		—	—
		狩川	6/2	0	—		—		—		—		—	—
		金瀬川	6/2	0	—		—		—		—		—	—
—					—		—		—		—		—	—

試料量はすべて10L。

斜線は試験を行わなかったもの。

?: バンドパターンが通常と異なるもの

: 検鏡のみ陽性

: LAMPのみ陽性

: RT-PCRのみ陽性

表2 検出結果 ジアルジア

地点			採水 月日	検鏡 結果	LAMP								RT-PCR	
					阻害阻止剤なし				阻害阻止剤入り					
					5μl		1μl		5μl		1μl			
					Tt値	産物	Tt値	産物	Tt値	産物	Tt値	産物	結果	配列
ジアルジア	相模川水系	社家	4/6	0	—		—		—		—			
			5/6	0	—		—		—		46.12	+	—	—
			6/1	0	—		—		—		—		—	—
			7/1	0	—		—		—		—		—	—
			8/2	0	—		—		—		—		未実施	未実施
			9/1	0	—		—		—		—		未実施	未実施
		社家右岸魚道	4/6	1	50.50	+	46.60	+						
			5/6	0	—		—		—		—		—	—
					—		28.48	+	—		39.48	+	—	—
			6/1	0	—		—		50.50	+	—		+	ジアルジア
			7/1	0	—		—		—		—		—	—
		中津川	9/1	0	—		—						未実施	未実施
			5/6	1	—		—		51.36	+	—		+	ジアルジア
			7/1	1	—				43.24	+	47.54	+	+	ジアルジア
			9/1	0	—								未実施	未実施
		小鮎川	5/6	4	43.36	+	39.60	+	40.12	+	41.00	+	+	ジアルジア
					36.48	+	—		38.18	+	—		+	ジアルジア
			7/1	5	45.12	+			35.24	+			+	ジアルジア
			9/2	0	—								未実施	未実施
	酒匂川水系	飯泉	4/6	0	—		—		—		—			
			6/2	0	—		—		—		—		—	—
			7/1	1	—				—		—		—	—
			8/1	0	—		—		—		—		未実施	未実施
			9/2	0	—								未実施	未実施
		酒匂川	6/2	2	—		—		—		—		+	ジアルジア
		狩川	6/2	0	42.20	+	43.30	+	38.40	+	39.50	+	+	ジアルジア
		金瀬川	6/2	0	—		—		—		—		+	ジアルジア
				—		—		—		—		—	—	

試料量はすべて10L。

斜線は試験を行わなかったもの。

: 検鏡のみ陽性

: LAMPのみ陽性

: RT-PCRのみ陽性

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・高い感度が得られ、クリプトスポリジウムに関しては 0.0006 個、ジアルジアに関しては 0.06 個相当から陽性反応が得られた。
検査法の特異性	・おおよそ陰性試料からは陰性、陽性試料からは陽性反応が得られ、特異性に問題は感じなかったが、顕微鏡法と若干の不一致は見られた。 ・アガロースゲル電気泳動によるバンドパターンの解析では、クリプトスポリジウムからはクリプトスポリジウムの、ジアルジアからはジアルジアのパターンが得られ、特異性に問題はないと考えられた。
顕微鏡法との比較	・繰り返しになるが、定性的に顕微鏡法とほぼ同等の結果が得られたが、一部試料では顕微鏡法と必ずしも1:1にはならず、顕微鏡法のみ、遺伝子検査法のみ陽性となった場合が見られた。理由としては、原虫数が少ないため、分割したそれぞれの試料に等しく原虫類がない場合が生じること、また、原水由来の阻害物質が遺伝子反応を阻害していることが考えられた。実試料でこうした比較試験を行うには、粘り強く丁寧に行うことが大切と感じた。
実用性評価	・遺伝子検査法はある程度の経験を積めば、誰にでも容易に実施可能であると考えられた。磁気ビーズ法までは顕微鏡法と同じ操作であり、水道事業体で使用することは可能と考えられた。 ・多検体処理に有用と考えられた。
その他特記事項	・遺伝子検査法は顕微鏡法より試料中に残る濁質に影響されるため、丁寧な操作が必要であった。 ・試料に混入する阻害物質等は完全には排除しきれないと考えられるため、操作に影響されない精製法、適用できる試料の種類が広い阻害物質阻止剤等の開発が望まれた。

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	財団法人岐阜県公衆衛生検査センター
所属	生物臨床検査課
担当者名	溝口 智子

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	LAMP 法
感度試験概要	—
添加回収試験概要	添加数 20～200 個程度、20L 試料水あるいは磁気ビーズ法前後に添加、遺伝子検査陽性を得た
実試料試験概要	—

3. 1 添加回収試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	蒸留水、水道水と施設排水（検査機関実験排水）、河川水（上流域の河川で大腸菌と嫌気性芽胞菌は不検出の試料）の各 20L、いずれもクリプトスポリジウム等が検出されたことはない
添加したクリプト	UV 照射クリプトスポリジウムオーシスト
添加濃度範囲	20～200 個程度
添加位置	濃縮前、磁気ビーズ法前、磁気ビーズ法後 （表には濃縮前に添加した結果を示した）
ろ過濃縮法	アセトン溶解法、PTFE フィルター法
精製方法	磁気ビーズ法
その他特記事項	・5 μ m の PTFE フィルターを用いてクリプトスポリジウムを回収できるかあわせて検討した。 ・アセトン溶解法と免疫磁気ビーズ法との組み合わせ使用に問題ないか検討した。

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	Loopamp®クリプトスポリジウム検出試薬キット、逆転写用試薬（AMV）
使用した遺伝子増幅装置	LA-320C

反応条件	63°C1 時間
その他特記事項	

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	PTFE
染色用試薬	EasyStain
その他特記事項	

検証結果

表 クリプトスポリジウム等試験法比較

#	試料	濃縮方法	顕微鏡法(個/10L)			RT-LAMP
			添加	回収	回収%	
1	河川水	アセトン溶解法	0	—	—	—
2	河川水	アセトン溶解法	0	—	—	—
3	河川水	アセトン溶解法	0	—	—	—
4	河川水	アセトン溶解法	0	—	—	—
5	排水	アセトン溶解法	65	49	(75%)	+
6	排水	アセトン溶解法	40	34	(85%)	+
7	排水	アセトン溶解法	75	37	(49%)	+
8	排水	アセトン溶解法	75	40	(53%)	+
9	水道水	PTFE フィルター法 A	64	55	(86%)	+
10	水道水	PTFE フィルター法 A	43	26	(61%)	+
11	蒸留水	PTFE フィルター法 A	89	88	(99%)	+
12	排水	PTFE フィルター法 A	258	222	(86%)	+
13	蒸留水	PTFE フィルター法 M	28	22	(79%)	+
14	蒸留水	PTFE フィルター法 M	58	29	(50%)	+
15	水道水	PTFE フィルター法 M	73	57	(78%)	+
16	排水	PTFE フィルター法 M	258	204	(79%)	+
17	排水	PTFE フィルター法 M	73	59	(81%)	+
18	排水	PTFE フィルター法 M	34	43	(126%)	+
19	排水	PTFE フィルター法 M	61	53	(87%)	+

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	—
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、添加していない陰性試料からは陰性、添加した陽性試料からは陽性反応が得られた
再現性	・繰り返し行なった試験で再現が得られた
顕微鏡法との比較	・定性的に同等の結果が得られた。 ・添加数を厳密にコントロールするのは難しかったが、20 個程度と少なくとも検出された。遺伝子検出法は高感度であるから、少ない試料からでも陽性が得られると期待された。
実用性評価	・磁気ビーズ法までは顕微鏡法と同じ操作なので、問題は感じなかった。磁気ビーズ法で塩酸解離を行わないプロトコルで実施したが、定量を目的に塩酸解離を行う方法に切り替えるのは煩雑と感じた。顕微鏡が苦手な人、面倒な人には遺伝子検出法のために塩酸解離を行っても煩雑さを気にしないかもしれないが、定量を目的としない LAMP 法には塩酸解離を行わない方法を残しても良いのではないかと思った。 ・遺伝子検出法は良好な方法と感じたが、LAMP 法は定性試験で回収率を評価しないので、事前に顕微鏡法で添加回収試験を行い、前処理の濃縮精製の評価が必要と考えられた。 ・遺伝子検出法は多検体処理に有用と考えられた。
その他特記事項	・5 μ m の PTFE フィルターを使用してもクリプトスポリジウムが抜けることはなく、検出された。 ・アセトン溶解法と磁気ビーズ法を組み合わせ使用したが、回収された。 ・結果に示さなかったが、ジアルジアの添加試験結果が安定せず、一部陽性反応が得られないことがあった。提供された UV 照射ジアルジアの鮮度低下、鑄型の分解が疑われ、膨張していたり、壁が薄かったり、中の構造物が縮んで壁との間に隙間が大きいなどの問題が生じていた。再現性よく検討するには活性の高いジアルジアシストが必要と考えられた。遺伝子検査法の感度試験では、ごく少数のシスト相当数から検出され、感度に問題はなかった。原理としては顕微鏡による形態観察に比べて分解に弱いと考えられた。

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	株式会社環境科学研究所
所属	分析事業部濃度分析課
担当者名	松田 信行

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	LAMP 法 及び RT-PCR 法
感度試験概要	・RT-LAMP 法および RT-PCR 法を用いて、クリプト、ジアルジア 6 ~0.0006 個の範囲で感度試験を行い、クリプト 0.006 個、ジアルジア 0.006 個から陽性反応を得た。
添加回収試験概要	・添加数 10 または 100 個程度、濃縮前に添加、遺伝子検査陽性を得た (DNA-LAMP 法)。 ・添加数 50 個程度、濃縮前に添加、遺伝子検査陽性を得た (RT-PCR 法)。
実試料試験概要	—

3. 1 感度試験詳細

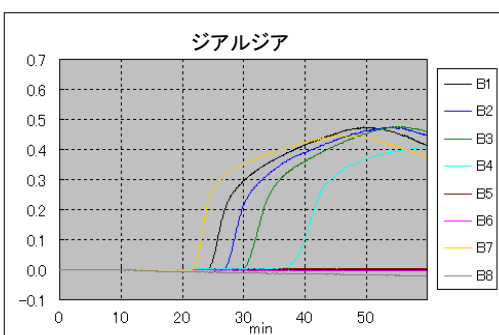
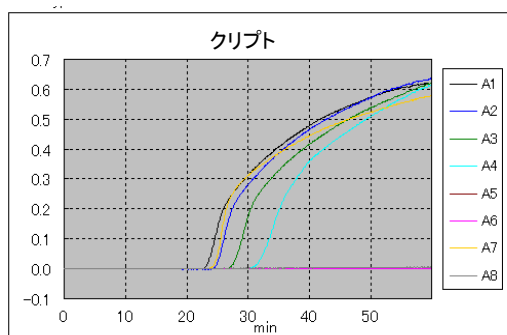
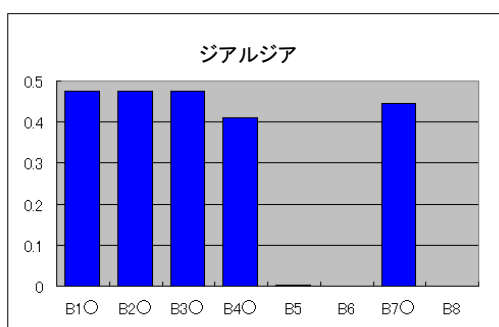
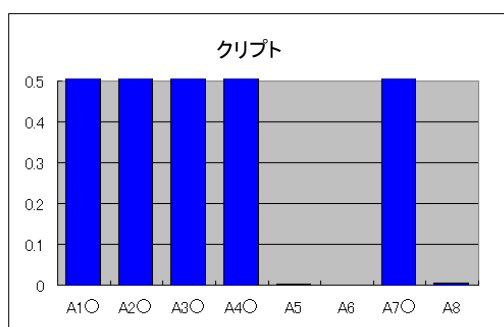
遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	・Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット(栄研化学) ・Loopamp ジアルジア検出試薬キット(栄研化学) ・PrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ) ・CycleavePCR Cryptosporidium Detection Kit ・CycleavePCR Giardia Detection Kit
使用した遺伝子増幅装置	RT-LAMP: LA-200 RT-PCR: Thermal Cycler Dice Real Time System
反応条件	RT-LAMP: 63℃、60min(クリプト、ジアルジア) RT-PCR: (95℃ 10sec) 1cycle → (95℃ 5sec→55℃ 10sec →72℃ 20sec) 50cycle(クリプト) (96℃ 30sec) 1cycle → (96℃ 10sec→60℃ 20sec) 50cycle(ジアルジア)
その他特記事項	オーシスト・シストは凍結標品だけでなく、添加回収用 UV 照射標品も使用し、核酸抽出前に濃度を顕微鏡下で確認した

反応結果一覧表

クリプト又はジアルジア (個/反応チューブ)	RT-LAMP		RT-PCR	
	クリプト	ジアルジア	クリプト	ジアルジア
6	+	+	+	+
0.6	+	+	+	+
0.06	+	+	+	+
0.006	+	+	+	+
0.0006	-	-	-	-

RT-LAMP 結果

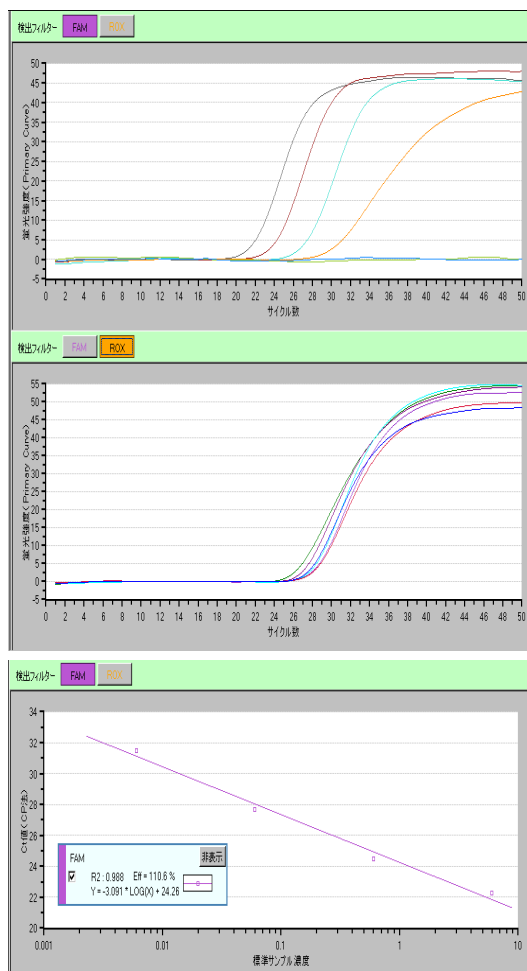


A1: 6
 A2: 0.6
 A3: 0.06
 A4: 0.006
 A5: 0.0006
 A6: 陰性コントロール
 A7: 陽性コントロール
 A8: -

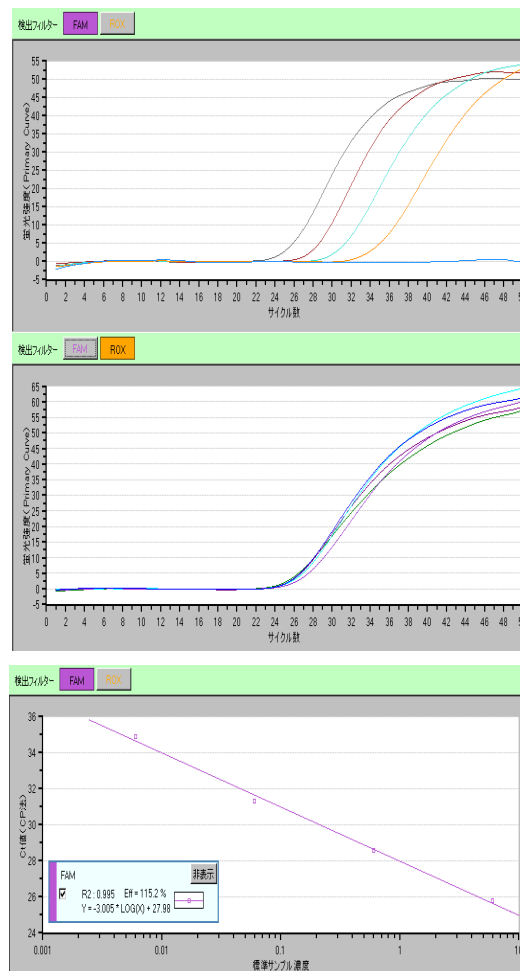
B1: 6
 B2: 0.6
 B3: 0.06
 B4: 0.006
 B5: 0.0006
 B6: 陰性コントロール
 B7: 陽性コントロール
 B8: -

RT-PCR の結果

クリプト



ジアルジア



3. 2 添加回収試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	・通常未検出の河川水試料、2種
添加したクリプト	UV 照射クリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシスト
添加濃度範囲	・10 または 100 個 (DNA-LAMP) ・50 個 (RT-PCR)
添加位置	濃縮前
ろ過濃縮法	アセトン溶解法
精製方法	磁気ビーズ法
その他特記事項	

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	・ Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット(栄研化学) ・ Loopamp ジアルジア検出試薬キット(栄研化学) ・ PrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ) ・ CycleavePCR Cryptosporidium Detection Kit ・ CycleavePCR Giardia Detection Kit
使用した遺伝子増幅装置	DNA-LAMP: LA-200 RT-PCR: Thermal Cycler Dice Real Time System
反応条件	DNA-LAMP: 63℃、60min(クリプト、ジアルジア) RT-PCR: (95℃ 10sec) 1cycle → (95℃ 5sec→55℃ 10sec →72℃ 20sec) 50cycle(クリプト) (96℃ 30sec) 1cycle → (96℃ 10sec→60℃ 20sec) 50cycle(ジアルジア)
その他特記事項	RT ではない LAMP 法でクリプトスポリジウム検出を実施

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	ウェルスライド
染色用試薬	EasyStain
その他特記事項	

検証結果

表.1 検鏡法によるオーシスト数と LAMP 法の判定結果

	10 個/10L		100 個/10L		未添加試料
	顕微鏡	LAMP	顕微鏡	LAMP	顕微鏡
1	6	+	56	+	0
2	2	+	63	+	0
3	5	+	38	+	0
4	1	+	44	+	0

表.2 検鏡法によるシスト数と LAMP 法の判定結果

	10 個/10L		100 個/10L		未添加試料
	顕微鏡	LAMP	顕微鏡	LAMP	顕微鏡
1	2	+	64	+	0
2	5	+	75	+	0
3	7	+	59	+	0
4	4	+	44	+	0

表.3 検鏡法によるオーシスト(シスト)数と RT-PCR 法の判定結果

	クリプト 50 個/10L		ジアルジア 50 個/10L		未添加試料
	顕微鏡	RT-PCR	顕微鏡	RT-PCR	顕微鏡
1	16	+	9	+	0
2	39	+	43	+	0

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・小数点以下の 0.006 個に相当するクリプトスポリジウム、ジアルジアから陽性反応が得られた。配布された冷凍標品だけでなく、UV 照射標品からも同程度に高感度であることを確認した。
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、未添加の試料からは陰性、添加試料からは陽性反応が得られた。
再現性	・繰り返して行なった試験では、ほぼ同じ結果が得られた
顕微鏡法との比較	・今回行った添加回収試験では、顕微鏡法と遺伝子検査法の判定結果に矛盾はなく、定性的に同等の結果が得られた。
実用性評価	・磁気ビーズ法までは顕微鏡法と同じ操作なので、問題は感じなかった。遺伝子検査法は顕微鏡法にかかる負担がないことから、好ましいと感じた。特に、一度に多数の検体を検査する際に遺伝子検査法は有用に感じた。
その他特記事項	

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	国立保健医療科学院
所属	水道工学部
担当者名	岸田直裕／秋葉道宏

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	・(RT-)LAMP/Cycleave RT-PCR (クリプト、ジアルジア) ・TaqMan RT-PCR/ Universal Qprobe RT-PCR/ ABC RT-PCR(クリプトのみ)
感度試験概要	・(RT-)LAMP(クリプト 6×10^{-3} 個、ジアルジア 6×10^{-2} 個から陽性反応) ・Cycleave RT-PCR(クリプト 6×10^{-4} 個、ジアルジア 6×10^{-3} 個から陽性反応) ・TaqMan RT-PCR(クリプト 7.5×10^{-5} 個から陽性反応) ・Universal Qprobe RT-PCR(クリプト 7.5×10^{-5} 個から陽性反応) ・ABC RT-PCR(クリプト $10 \sim 10^5$ コピーの範囲で検量線が描けた; $3.6 \times 10^{-4} \sim 10^0$ 個相当)
添加回収試験概要	—
実試料試験概要	・利根川水系の河川水に対し、顕微鏡検査と各種遺伝子検査 (RT-LAMP 、 TaqMan RT-PCR 、 Universal Qprobe RT-PCR、ABC RT-PCR)を実施した結果(クリプトのみ)、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果は定性的にはほぼ一致した。各種遺伝子検査法間で定性的な結果は完全に一致し、特異性の問題は確認されなかった。また、顕微鏡観察による推定値(蛍光観察のみ)と各種遺伝子定量手法の間には高い相関性が見られた($R^2=0.7 \sim 0.8$; $n=14$)。

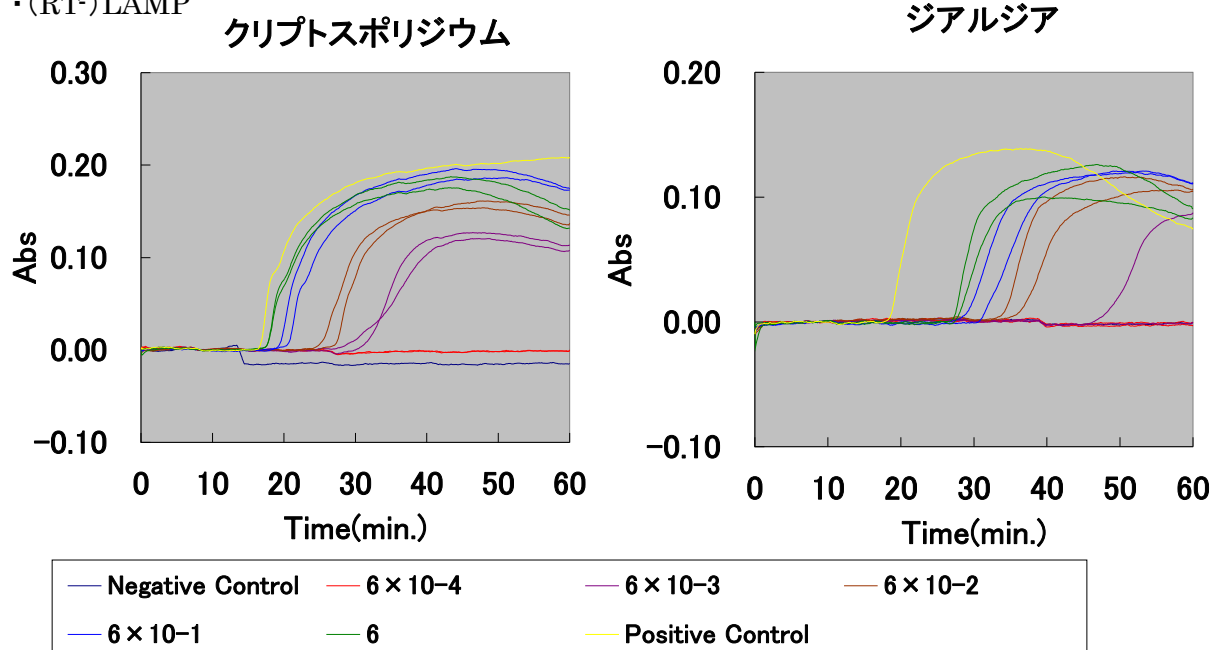
3. 1 感度試験詳細

遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	・RT-LAMP 法(クリプト):Loopamp クリプトスポリジウム検出試薬キット(栄研化学)+逆転写酵素(Roche) ・LAMP 法(ジアルジア):Loopamp ジアルジア検出試薬キット(栄研化学) ・Cycleave RT-PCR : CycleavePCR® Cryptosporidium /Giardia Detection Kit+PrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ) ・TaqMan RT-PCR:PrimeScript RT Reagent Kit(タカラバイオ)+LightCycler 専用リアルタイム PCR 試薬(Roche) ・Universal Qprobe RT-PCR:PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ) + TITANIUM Taq DNA Polymerase (Clontech)等 ・ABC RT-PCR:PrimeScript RT Reagent Kit(タカラバイオ) +TITANIUM Taq DNA Polymerase(Clontech)等
使用した遺伝子増幅装置	・(RT-)LAMP:Realoop-30(栄研化学) ・ABC-PCR : Mastercycler (Eppendorf) + LightCycler480 (Roche) ・その他:LightCycler2.0 or 480(Roche)
反応条件	・(RT-)LAMP 法:63℃ 60 分 ・Cycleave RT-PCR(クリプト):95℃ 10 秒、(95℃ 5 秒、55℃ 10 秒、72℃ 20 秒)×50 サイクル ・Cycleave RT-PCR(ジアルジア):96℃ 30 秒、(96℃ 10 秒、60℃ 20 秒)×50 サイクル ・TaqMan RT-PCR:95℃ 10 分、(95℃ 10 秒、60℃ 30 秒)×50 サイクル ・Universal Qprobe RT-PCR:95℃ 2 分、(95℃ 20 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒)×50 サイクル、72℃ 2 分 ・ABC RT-PCR:95℃ 2 分、(95℃ 20 秒、60℃ 20 秒、72℃ 20 秒)×50 サイクル、72℃ 2 分
その他特記事項	

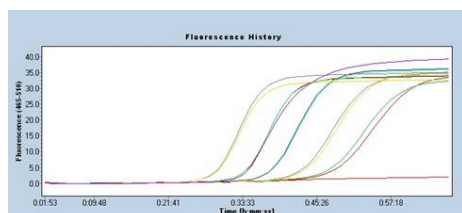
感度試験結果

・(RT-)LAMP

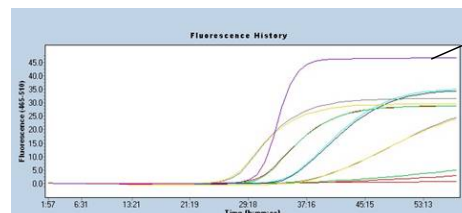


・Cycleave RT-PCR

FAM **クリプトスポリジウム**

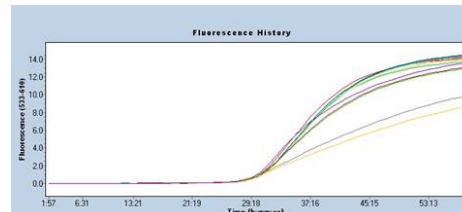
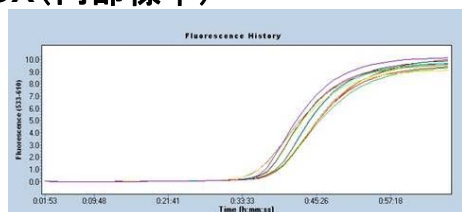


ジアルジア

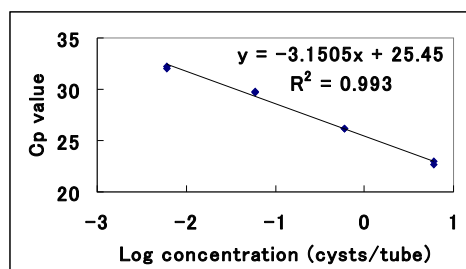
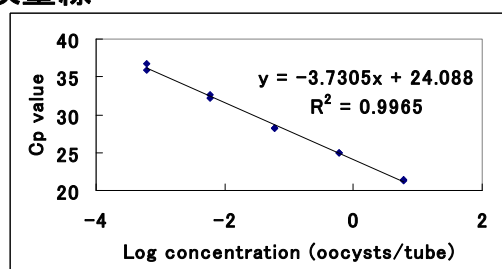


ポジコン

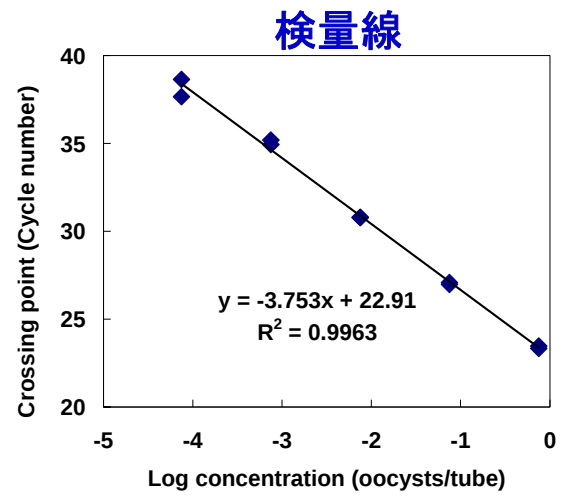
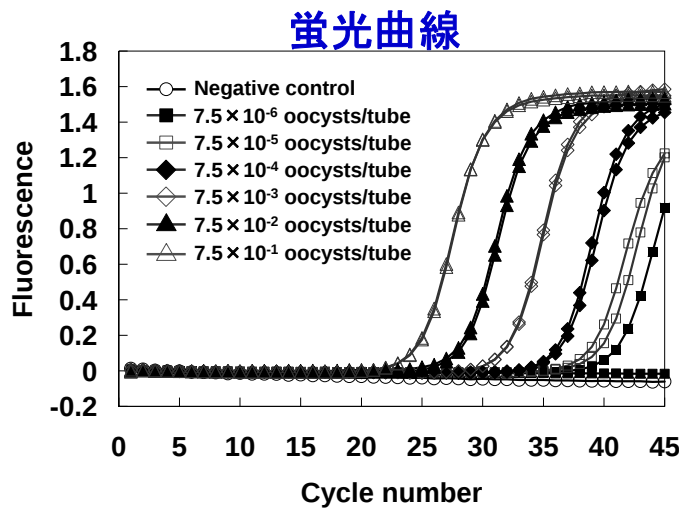
ROX (内部標準)



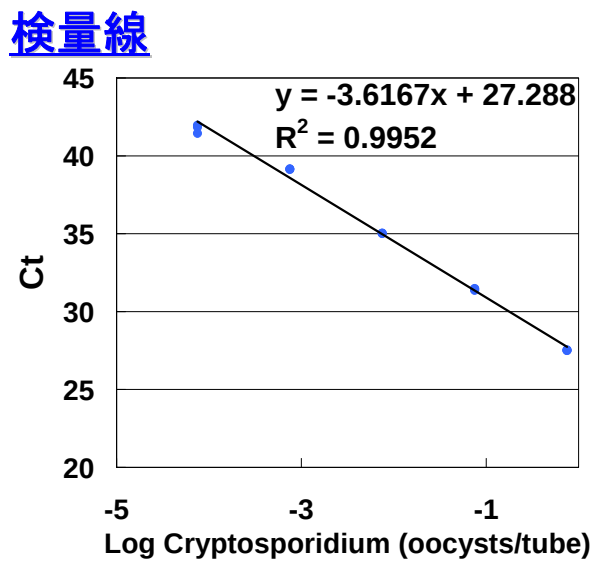
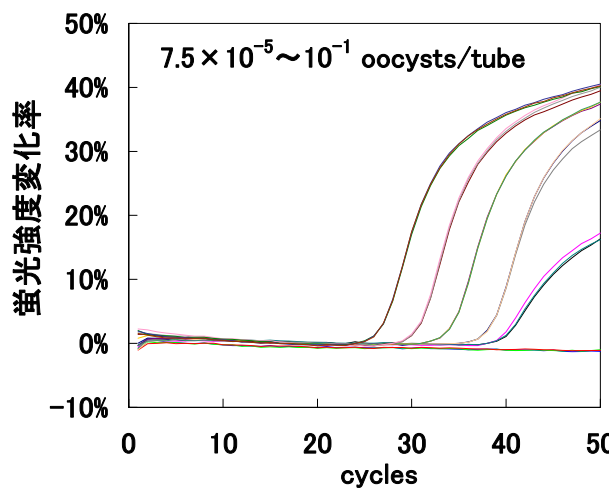
検量線



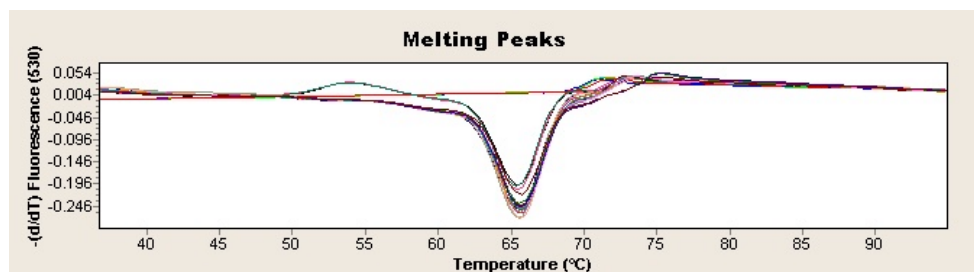
•TaqMan RT-PCR



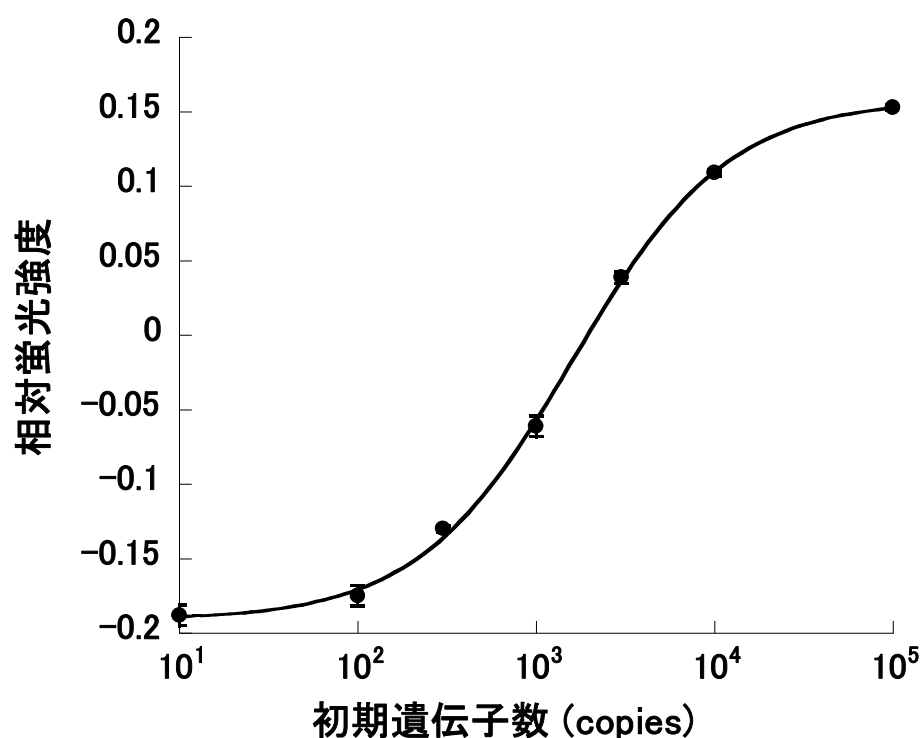
•Universal Qprobe RT-PCR



融解曲線解析



・ABC RT-PCR



3. 2 実試料試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	平成 21 年 11 月および 12 月に利根川本川および支川の 7 地点より各 2 サンプル、計 14 サンプルの河川水を採取した。一般的な水道原水と比べ、微生物汚濁の大きい水試料である。
濃縮方法	親水性 PTFE メンブレンフィルター法
精製方法	磁気ビーズ法
その他特記事項	クリプトスポリジウムのみ実施

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	3.1 と同様
使用した遺伝子増幅装置	3.1 と同様
反応条件	3.1 と同様
その他特記事項	Cycleave RT-PCR は未実施

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	PTFE
染色用試薬	EasyStain
その他特記事項	

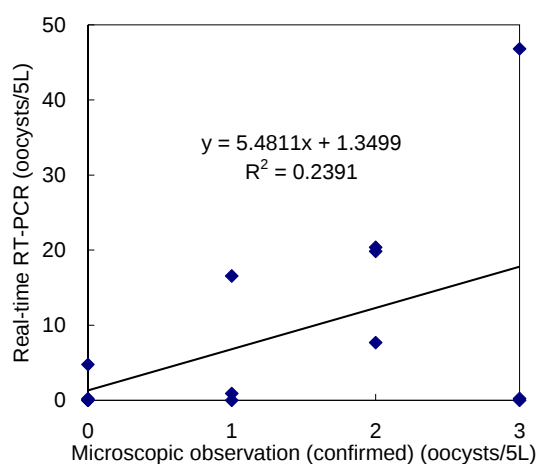
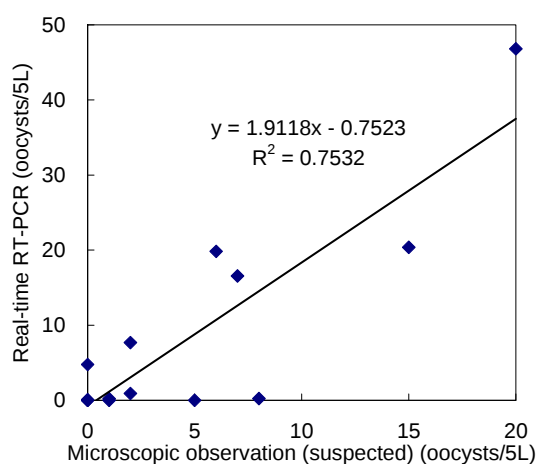
検出結果一覧表

サンプル	顕微鏡観察*	TaqMan PCR (Millerら、2006)	Universal QProbe PCR	ABC-PCR	LAMP
A	2	0.44	0.23	0.30	+
B	2	-	-	0.10	-
C	-	-	-	-.**	-
D	4	1.8	1.0	0.88	+
E	-	0.22	0.12	0.17	+
F	10	0.048	0.049	0.76	+
G	16	0.48	0.42	1.3	+
H	-	9.6	1.8	8.8	+
I	4	15	3.4	8.8	+
J	-	-	-	-.**	-
K	12	40	25	50	+
L	14	34	5.9	25	+
M	30	40	30	50	+
N	40	94	62	65	+

☆単位: oocysts/10L *蛍光観察のみ(推定値)

**下限値以下

☆TaqMan PCR、Universal QProbe PCR、ABC-PCRの増幅領域は同じだが、LAMP法とは大きく異なる。



4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・いずれの方法においても高い感度が得られ、小数点以下に相当するクリプトスポリジウム、ジアルジアから陽性反応が得られた。
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、顕微鏡陽性からは陽性、数は少ないが陰性からは陰性の結果が得られた。 ・顕微鏡法陰性で遺伝子検出法が陽性も見られたが、LAMP 法と各種 PCR 法で同様の定性的結果が得られており、偽陽性ではなく特異性に問題はないと考えられた。
再現性	・感度試験の2回繰り返して行なった試験では、低濃度試料を除き、ほぼ2回とも同じ結果が得られた。また、実試料へ適用した際は3回の繰り返し試験を実施したが、変動は少なかった。
顕微鏡法との比較	・遺伝子検査法と顕微鏡観察結果を定性的に比較すると、概ね一致したが、14 試料中 3 試料で試験結果が異なった。本検討では、10L の河川水を濃縮・精製した後、試料を2つに分離して遺伝子検査法と顕微鏡観察に供しているため、元のサンプル中のオーシスト濃度が低い場合は、偶然片方の検査試料にしかオーシストが入らない可能性があり、この確率の問題が2手法の定性的結果に差が生じた要因と考えられた。また、顕微鏡観察法では、フィルターろ過や染色工程においてオーシストが損失される作業があり、さらに検査者の判断がオーシスト同定に影響することが要因の一つかもしれない。 ・各種遺伝子定量法と顕微鏡観察の定量値に関しては、遺伝子検査法による定量値と顕微鏡観察推定値(蛍光観察のみ)との間に高い相関が見られたことから(寄与率 $R^2=0.7\sim0.8$)、遺伝子検査法による定量値は妥当なものであると考えられた。一方、顕微鏡観察確定値との間には明確な相関が見られなかった(寄与率 $R^2=0.2\sim0.3$)。顕微鏡観察によるオーシストの確定判断には、スポロゾイト等のクリプトスポリジウムに特徴的な内部構造を観察する必要があるが、フィルター上の夾雑物とオーシストの位置や角度によっては、明瞭な内部構造を観察できないこともあり、通常、確定値は推定値より低い値となる。このことが、確定値との相関が低い要因の一つであると考えられた。 ・サイト F、G で採取した2サンプルに関しては、遺伝子検査法の定量値が顕微鏡観察法の値より1オーダー以上低くなった。さらに、サイト F から採取したサンプルでは、定量値が 0.024 oocysts/5L と、極めて小さい値を示した。そうしたサンプルでは

	阻害の影響や元々の試料が分解されていたことが理由で、定量値が低くなった可能性が考えられた。
実用性評価	・磁気ビーズ法までは顕微鏡法と同じ操作なので、問題は感じなかった。遺伝子検査法は顕微鏡法にかかる負担がないことから、好ましいと感じた。特にサンプル数が多いときに、遺伝子検査法は操作が簡便であり、実用性が高いと感じた。
その他特記事項	・遺伝子検査法の特異性については、試験を行って実績を積みながら検証を続けるべきと考えられた。標的の原虫と近似した塩基配列を持つ微生物が存在する可能性は否定できず、複数の遺伝子検査法で相互に検証することが有用と考えられた。 ・万一水道を止める等の重要な判断を下す際には、実績のある顕微鏡検査法を実施することが安心と考えられる。遺伝子検査法が導入された後も、顕微鏡検査法の技術の伝承が当面の重要な課題であることには変わりはないと考えられた。

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	愛媛県立衛生環境研究所
所属	衛生研究課
担当者名	竹内潤子

2. 検証結果概要

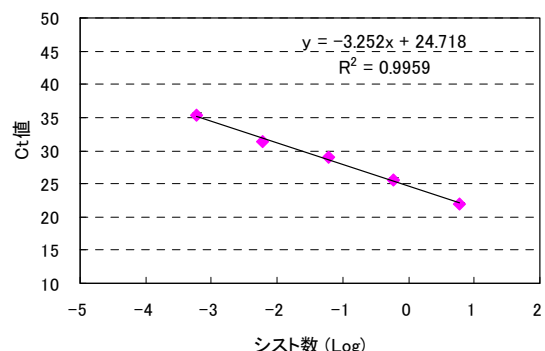
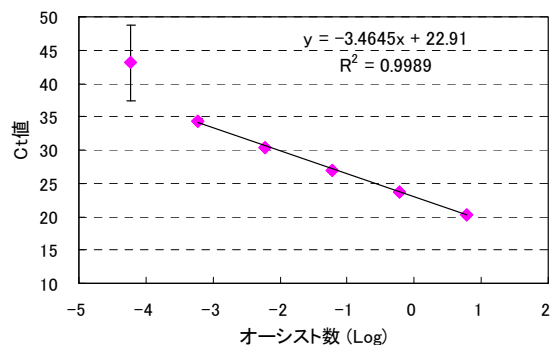
項 目	記 入 欄
試験方法	RT-PCR 法
感度試験概要	クリプト 0.0006 個、ジアルジア 0.0006 個から陽性反応
添加回収試験概要	添加数 30～40 個程度、磁気ビーズ法前後に添加、遺伝子検査陽性を得た
実試料試験概要	—

3. 1 感度試験詳細

遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	CycleavePCR Cryptosporidium Detection Kit CycleavePCR Giardia Detection Kit PrimeScript RT reagent Kit
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice Real Time System
反応条件	クリプト 95℃10 秒後、95℃5 秒 55℃10 秒 72℃20 秒を 50 回 ジアルジア 96℃30 秒後、96℃10 秒 60℃20 秒を 50 回 共通の逆転写反応 37℃15 分、85℃5 秒
その他特記事項	2 本ずつ反応を行ない、再現性のある濃度範囲を確認した

反応結果(検量線)



3. 2 添加回収試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	①伏流水+地下水(7月6日採水) ②地下水(7月8日採水)
添加したクリプト	UV 照射クリプトスポリジウムオーシスト、ジアルジアシスト
添加濃度範囲	①クリプト 30.3 個/50 μ l(28~33) ジアルジア 39.7 個/50 μ l(38~41) ②クリプト 31.3 個/50 μ l(30~33) ジアルジア 39.3 個/50 μ l(38~41)
添加位置	磁気ビーズ法前、ならびに磁気ビーズ法後
ろ過濃縮法	PTFE フィルター法
精製方法	磁気ビーズ法
その他特記事項	試料 1 は顕微鏡で陰性を確認、試料 2 は顕微鏡と遺伝子検査法で陰性を確認した

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	CycleavePCR Cryptosporidium Detection Kit CycleavePCR Giardia Detection Kit PrimeScript RT reagent Kit
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice Real Time System
反応条件	クリプト 95°C10 秒後、95°C5 秒 55°C10 秒 72°C20 秒を 50 回 ジアルジア 96°C30 秒後、96°C10 秒 60°C20 秒を 50 回 共通の逆転写反応 37°C15 分、85°C5 秒
その他特記事項	オーシスト、シスト数を検量線から定量した

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	PTFE
染色用試薬	EasyStain
その他特記事項	

検証結果

検体①(伏流水+地下水)

	クリプトスポリジウム			ジアルジア		
	添加前	ビーズ前	ビーズ後	添加前	ビーズ前	ビーズ後
顕微鏡検査	0	23	28	0	28	31
qRT-PCR	—	20.7	29.0	—	23.9	45.5
添加量 (50 μ Lあたり平均)		30.3			39.7	

検体②(地下水)

	クリプトスポリジウム			ジアルジア		
	添加前	ビーズ前	ビーズ後	添加前	ビーズ前	ビーズ後
顕微鏡検査	0	24	28	0	29	33
qRT-PCR	0	23.2	27.0	0	38.9	41.8
添加量 (50 μ Lあたり平均)		31.3			39.3	

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・高い感度が得られ、クリプト0.0006個、ジアルジア0.0006個から陽性反応が得られた。
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、陰性対照からは陰性、陽性対照からは陽性反応が得られた。
再現性	・感度試験では、低濃度でCt値の変動が大きくなったが、それより高濃度側での変動は小さく、RT-PCRに再現性があった。 ・磁気ビーズ法前と後で添加回収試験を行ったが、いずれも同等のオーシスト数、シスト数が定量され、磁気ビーズ法を含む作業範囲で再現性が得られた。
顕微鏡法との比較	・添加回収試験の結果、定性的にも定量的にも顕微鏡法と同等の結果が得られた。
実用性評価	・磁気ビーズ法までは顕微鏡法と同じ操作であり、従来法との間に操作性の差はみられなかった。 ・市販のキットを使用するため、遺伝子検査の経験が少なくても、感度よく検出ができ、顕微鏡観察ほどの熟練は必要ないと思われる。なお、本実施担当者はリアルタイムPCRの経験があまり無く、経験者の指導下で実施したことを申し添えます。
その他特記事項	・免疫磁気ビーズ、遺伝子検査試薬が高価である。

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	神奈川県衛生研究所
所属	微生物部 細菌・環境生物グループ
担当者名	黒木俊郎、稲田貴嗣、古川一郎

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	RT-PCR 法
感度試験概要	クリプトスポリジウム 7、0.7、0.07、0.007、0.0007 個相当のサンプルについて感度試験を実施し、すべて陽性の結果が得られた。
添加回収試験概要	添加数 5000、500 個程度、磁気ビーズ法前に添加
実試料試験概要	—

3. 1 感度試験詳細

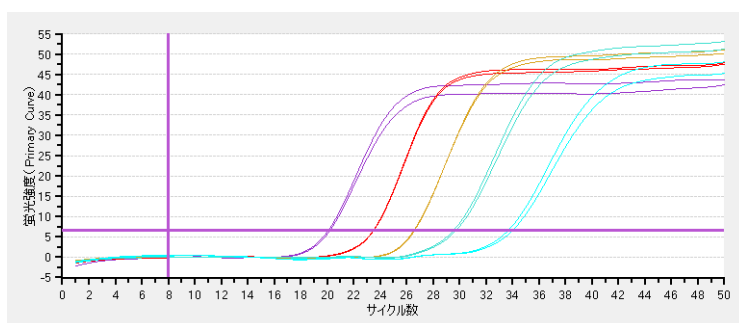
遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	PrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ) Cycleave PCR® <i>Cryptosporidium</i> Detection Kit(タカラバイオ)
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System(タカラバイオ)
反応条件	95℃、1 分→95℃×5 秒、55℃×10 秒、72℃×20 秒、50 サイクル
その他特記事項	

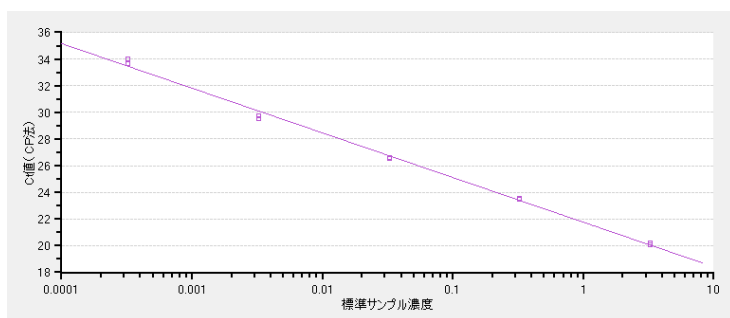
反応結果一覧表

<感度試験結果>

増幅曲線



検量線



3.2 添加回収試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	・相模川水系小出川、中島橋、10月5日採水 ・通常時のクリプト検出オーダー: 陰性
添加したクリプト	UV 照射クリプトスポリジウムオーシスト
添加濃度範囲	・1 試験管あたり 5000、500 個をそれぞれ添加
添加位置	磁気ビーズ法前
ろ過濃縮法	アセトン溶解法
精製方法	磁気ビーズ法
その他特記事項	ビーズ処理後のオーシスト数 5000、500 個 (蛍光染色で確認) ビーズ処理による回収率は良好な結果が得られた。

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ) Cycleave PCR® <i>Cryptosporidium</i> Detection Kit (タカラバイオ)
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System (タカラバイオ)
反応条件	95°C、1 分→95°C×5 秒、55°C×10 秒、72°C×20 秒、50 サイクル
その他特記事項	RT 反応 tube にオーシスト 50 および 5.0 個相当

顕微鏡観察法 (比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	セルロースアセテート
染色用試薬	AquaGlo
その他特記事項	

検証結果

サ ン プ ル	Real-Time PCR 結果
①添加回収サンプル 1(添加量 50 oocysts/RT-tube)	+
②添加回収サンプル 2(添加量 5.0 oocysts/RT-tube)	+
③陽性対照(DNA 抽出から同じ操作、56000 oocysts /ml)	+
④Kit 添付陽性対照	+
⑤陰性対照	—

注) 添加回収サンプルの添加量は、ビーズ処理後のオーシスト数から算出

4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・高い感度がえられ、小数点以下の 0.0007 個に相当するクリプトスポリジウムから陽性反応が得られた
検査法の特異性	・特異性に問題はなく、陰性対照からは陰性、添加試料と陽性対照からは陽性反応が得られた
再現性	
顕微鏡法との比較	
実用性評価	・遺伝子検査法にも課題はあり、検出キットが高価である ・RNA の取り扱い(RNA 専用器材の準備)、夾雑物の除去等、RT 反応を阻害する要素を可能な限り除去することが重要と思われた
その他特記事項	

遺伝子検出法検証作業 結果整理票

1. 検証実施機関

項 目	記 入 欄
機関名	東京都水道局
所属	水質センター検査課生物係
担当者名	金見 拓、角田徳子、中東寛和

2. 検証結果概要

項 目	記 入 欄
試験方法	RT-PCR 法
感度試験概要	クリプトスポリジウム 0.00012 個相当の well から陽性反応 ジアルジア 0.0009 個相当の well から陽性反応
添加回収試験概要	クリプトスポリジウムの添加回収試験を 2 地点の濃縮試料を用いて試験した。 回収率は、RT-PCR 法で原水添加：31%・62%、ビーズ前添加：73%・100%、ビーズ後添加：110%・131%、検鏡法は原水添加：35%・39%、ビーズ前添加：43%・50%、ビーズ後添加：77%・90%であった。 2 地点の結果の数値の並びは RT-PCR 法と同じ順でそれぞれ対応しており、RT-PCR 法での回収率は顕微鏡と同等もしくはそれ以上の数値が得られた。
実試料試験概要	—

3. 1 感度試験詳細

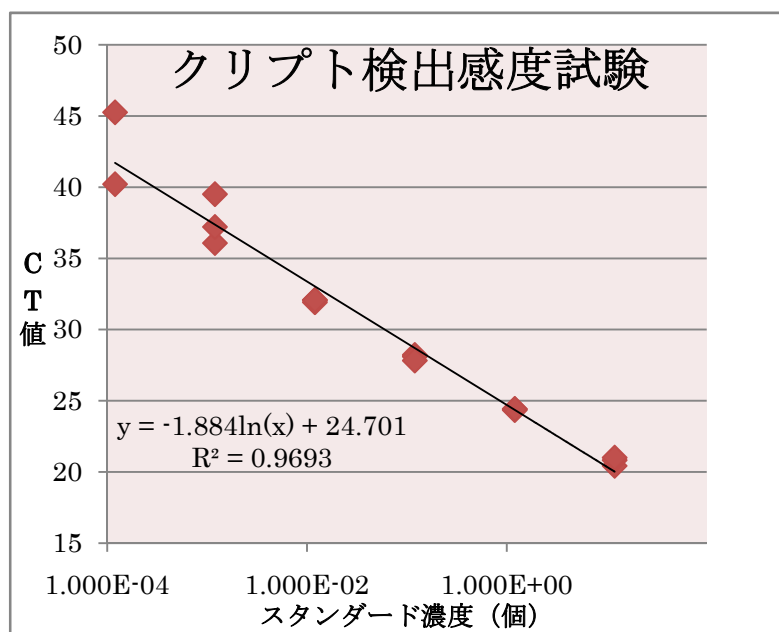
遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	TaKaRa CycleavePCR® Cryptosporidium Detection Kit、 Giardia Detection Kit PrimeScript RT reagent Kit
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System
反応条件	(クリプトスポリジウム) 初期変性[Hold 95℃, 10 秒] 3StepPCR[95℃_5 秒→55℃_10 秒→72℃_20 秒(検出)]×50cycle (ジアルジア) 初期変性[Hold 96℃, 30 秒] 2StepPCR[96℃_10 秒→60℃_20 秒(検出)]×50cycle
その他特記事項	—

反応結果一覧表

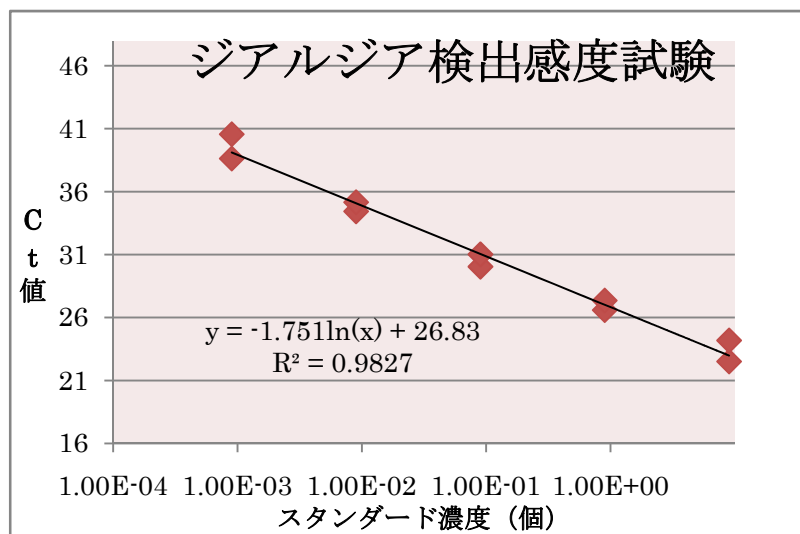
・クリプトスポリジウムの感度試験

Ct値(CP)	濃度	定量値
20.42	1.20E+01	1.23E+01
24.34	1.20E+00	1.17E+00
28.21	1.20E-01	1.15E-01
31.92	1.20E-02	1.24E-02
36.07	1.20E-03	1.03E-03
40.21	1.20E-04	8.61E-05
20.82	1.20E+01	9.65E+00
24.41	1.20E+00	1.12E+00
28.1	1.20E-01	1.23E-01
32.07	1.20E-02	1.13E-02
37.21	1.20E-03	5.20E-04
45.26	1.20E-04	4.17E-06
21	1.20E+01	8.66E+00
24.42	1.20E+00	1.11E+00
27.82	1.20E-01	1.45E-01
32.07	1.20E-02	1.13E-02
39.51	1.20E-03	1.31E-04



・ジアルジアの感度試験

Ct値(CP)	STD	定量値
22.51	9.00E+00	8.99E+00
26.59	9.00E-01	8.19E-01
30.04	9.00E-02	1.08E-01
34.43	9.00E-03	8.20E-03
38.63	9.00E-04	6.96E-04
24.18	9.00E+00	3.37E+00
27.35	9.00E-01	5.24E-01
31.02	9.00E-02	6.07E-02
35.16	9.00E-03	5.34E-03
40.56	9.00E-04	2.24E-04



3. 2 添加回収試験詳細

試料水と試験法

項 目	記 入 欄
試料水の概要	荒川本川および支川の河川水。 支川上流側には豚舎があり、糞尿を一定期間貯留したのちに放流している模様で、平成 22 年 4 月以降、平時のオーシスト濃度は 2～49 個/2L、6 回の顕微鏡検査は全て陽性であった。本川は 0～2 個/10L、2 回に 1 回は不検出であった。
添加したクリプト	<i>C. parvum</i> 5.6 × 10 ⁵ /ml を希釈して添加(感染研より供与)
添加濃度範囲	58.6 個/L 相当
添加位置	原水添加・磁気ビーズ前・磁気ビーズ後の 3 パターン
ろ過濃縮法	PTFE メンブランフィルター法(φ 90mm)
精製方法	免疫磁気ビーズ精製
その他特記事項	

分析操作、遺伝子検出法

項 目	記 入 欄
使用したキット名称等	Cycleave® PCR Cryptosporidium Detection Kit PrimeScript RT reagent Kit
使用した遺伝子増幅装置	Thermal Cycler Dice® Real Time System
反応条件	初期変性[Hold 95°C, 10 秒] 3StepPCR[95°C_5 秒→55°C_10 秒→72°C_20 秒(検出)] × 50cycle
その他特記事項	—

顕微鏡観察法(比較対象)

項 目	記 入 欄
観察用フィルター	PTFE フィルター(φ 25mm)
染色用試薬	Easy-Stain C&G FITC と DAPI 染色液
その他特記事項	—

検証結果

・各試料水の Ct 値と定量値

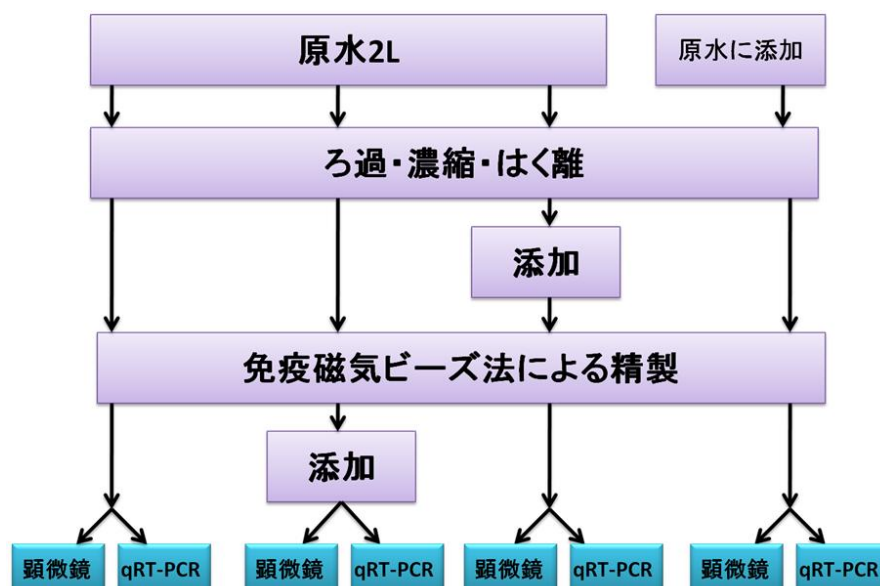
		Ct値	定量値
①荒川本川 河川水	添加前	不検出	不検出
	原水添加	28.73	7.36E-02
	ビーズ前	27.17	1.81E-01
	ビーズ後	26.56	2.58E-01
②荒川支川 河川水	添加前	31.08	1.90E-02
	原水添加	26.25	3.08E-01
	ビーズ前	26.73	2.34E-01
	ビーズ後	27.56	1.45E-01

・検鏡法と qRT-PCR 法による回収率比較

①荒川本川河川水(畜舎排水等の影響をあまり受けていないと思われる)					
		クリプトスポリジウム			
		添加前	原水添加	ビーズ前	ビーズ後
検鏡	検出個数(個)	0	21	25	53
	回収率(%)		35.8	42.7	90.4
qRT-PCR	検出個数(個)	0	18.4	42.58	64.4
	回収率(%)		31.4	72.7	109.9
添加量(平均個数)		58.6個			

②荒川支川河川水(畜舎排水等の影響を受ける可能性があると思われる)					
		クリプトスポリジウム			
		添加前	原水添加	ビーズ前	ビーズ後
検鏡	検出個数(個)	0	23	29	45
	回収率(%)		39.2	49.5	76.8
qRT-PCR	検出個数(個)	4.7	36.15	58.38	77
	回収率(%)		61.7	99.6	131.4
添加量(平均個数)		58.6個			

・原虫類添加のタイミング



4. 検証結果に基づいた遺伝子検出法の評価

項 目	記 入 欄
検査法の感度	・高い感度が得られ、クリプトスポリジウムについては供与頂いた STD 試料から小数点以下の 0.00012 個/well 相当から陽性反応が得られた。また、ジアルジアについては 0.0009 個/well 相当からの検出が可能であった。
検査法の特異性	・荒川本川河川水では、陰性対照からは陰性、添加試料からは陽性反応が得られ、例数は少ないが特異性に問題なかった。畜舎排水の影響を受ける支川では、未添加の試料からも遺伝子検査陽性が得られた。この時、顕微鏡陰性であったが、同時期に実施した顕微鏡検査では 2 個または 6 個/2L の結果が得られており、一つにはサンプリング時のばらつきにより、顕微鏡検査試料にオーシストが入らなかったことが考えられた。添加試料の遺伝子検出結果は、高めの回収率が得られており、元から含まれていたオーシストと添加分が合算されたことが伺えた。
再現性	・クリプトスポリジウムについて これまで 7 回程度行った試験で、キットに付属の陽性対照はいずれも 0.6～1.2 個/well の範囲に収まっていた。 ・ジアルジアについて これまで 3 回程度行った試験で、キットに付属の陽性対照は 1.9～2.7 個/well 程度の範囲に収まっていた。・また検量線についてはいずれの試験においてもクリプト、ジアルジアともに概ね 0.99 以上の相関係数が得られている。 ・複数の試験者により複数回抽出および反応試験を行ない、試験者間での結果に大きな乖離が無いことを確認した。
顕微鏡法との比較	・添加回収試験については、RT-PCR 法が顕微鏡法と比較し、ほぼ同等もしくは若干高めの回収率を示した。
実用性評価	・試験法に戸惑い等は感じない。 ・感度や再現性も比較的良好だと感じている。 ・磁気ビーズ精製までの工程は検鏡法と同じため、作業量低減等のメリットは今のところ感じられないが、多量の検体を試験する際には時間短縮等の効果が期待できるものと思われる。(現在多量のサンプルは取り扱っていない) ・添加回収試験では、添加する原水による違いおよび添加のタイミングにより差がみられた。添加原水の水質および濃縮精製過程における減少によるものと考えられる。顕微鏡法と比較し概ね遺伝子検出法で良好な回収率を示している。
その他特記事項	・特になし