

研究課題名:病原クリプトスポリジウムの簡易検出法の開発

研究担当者名:東和科学株式会社 ©白井 勝久、大田 美咲、原 弘之

成果を一言で言えば:

病原クリプトスポリジウムの遺伝子増幅による検出法について、家畜排せつ物等の実サンプルで検出できるように、増幅阻害の回避手段等を検討して、実用的な検出方法を開発した。

研究の概要:

PCR(Polymerase Chain Reaction)によるDNA検出法で病原性のクリプトスポリジウム(Cryptosporidium parvum)を特異的に検出し、NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)によるRNA検出法で生存C. parvumのみを検出する、病原性判定法及び生死判定法の基本技術を確認し、さらに家畜排せつ物等の実サンプルで検出できるように、増幅阻害の回避手段等を検討して排せつ物等の前処理法を確認する。汚水処理やコンポスト化等の家畜排せつ物処理に伴うクリプトスポリジウムの殺滅効果を簡便で迅速に評価できる遺伝子増幅法を開発し、クリプトスポリジウム問題の対策推進に貢献する。

成果の概要:

(1) 病原性判定法及び生死判定法の基本技術確立

PCR用のプライマー・プローブを検討・改良し、病原性のクリプトスポリジウム(Cryptosporidium parvum)の特異的高感度検出を確認した。マイクロプレート法によるDNA定量法を確認した。NASBA用のプライマー・プローブを検討・改良し、生存C. parvumのみの特異的高感度検出を確認した。マイクロプレート法によるRNA定量法を確認した。

(2) 排せつ物等の前処理法の確立

PCR/NASBA阻害の回避方法として電気泳動やカラム分画等を検討し、排せつ物等の前処理法として糞便等洗浄と除タンパク等を検討して、家畜排せつ物等の実サンプル中のクリプトスポリジウムを検出できる方法を開発した。C. parvum HNJ-1のオーシストを添加した糞便とコンポストの実サンプルについて、いずれのサンプルでも102個以上のオーシストは検出できることを確認した。

研究成果が畜産環境保全技術として実施に活用されると思われる場面:

簡便・迅速な本検出技術により①クリプトスポリジウム検査事業、②クリプトスポリジウム対策コンサルタント事業を行い、クリプトスポリジウム問題の対策推進に貢献する。

研究成果が畜産環境保全技術として実際に活用するための条件:

事業化には公定法化が重要であり、公定法への採用も今後の課題。

成果を反映した実証施設の有無:

なし

成果を活用した特許等の取得(出願)又は製品化の有無、学会発表等:

特許出願:3件、学会発表:日本水環境学会2001年会(2件)、日本生物工学会平成14年度大会(1件)

この成果に対する問い合わせ先・担当者:

東和科学株式会社 新技術開発部 部長 白井 勝久
TEL 03-3662-4991 FAX 03-3662-5974

研究装置の概略、研究構成の概略、成果をよく表現するデータの図表等:

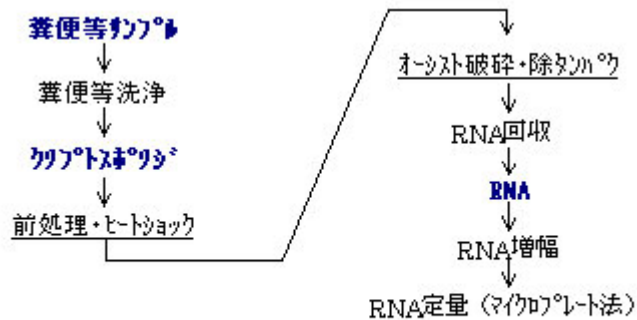


図1 実サンプルからのRNA検出法

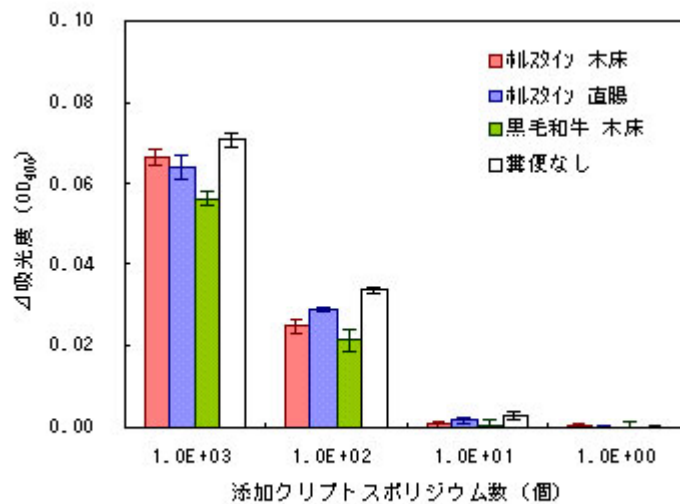


図2 クリプトスポリジウム添加糞便3種からのRNA検出

残された課題:

- ①クリプトスポリジウム検出法の改良(クリプトスポリジウム回収法、遺伝子回収法等)
- ②クリプトスポリジウム対策技術の評価(加熱試験等、実サンプルでの実証試験)