

PCRによる *Cryptosporidium parvum* の 特異的検出法の開発と環境水への適用

保坂 三 継^{*}, 高田 千恵子^{*}, 落合 由 嗣^{**}

Development of a Specific Detection Method for *Cryptosporidium parvum* by PCR Applicable to Environmental Water

Mitsugu HOSAKA^{*}, Chieko TAKADA^{*}, and Yoshitsugu OCHIAI^{**}

Keywords: クリプトスポリジウム パルブム *Cryptosporidium parvum*, ポリメラーゼ連鎖反応 nested PCR, 糖蛋白質遺伝子 Cpgp40/15 gene, プライマー primer, 免疫磁気ビーズ法 immunomagnetic separation method, 濁度 turbidity

緒 言

Cryptosporidium(クリプトスポリジウム)属はほ乳類を宿主とする偏性細胞内寄生原虫であり, これのオーシストは塩素に対する耐性が大きく, 水道の塩素消毒では十分に不活化することが困難であることが知られている。とりわけ, *Cryptosporidium parvum* は小腸微絨毛に感染し, ヒトに激しい水様下痢を引き起こす¹⁾ ため, 水道水並びに水道原水, 河川水等における *C. parvum* オーシストの存在を調査することは, 本原虫による感染症の集団発生を防ぐうえで極めて重要な意義を持つ。

水中の *Cryptosporidium* 属のオーシストの検出には通常, 試料水をろ過濃縮・精製し, 蛍光抗体染色して観察する方法が用いられ, わが国の「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」でもこの方法が採用されている²⁾。しかし, 染色に用いるモノクローナル抗体によっては, 他の原虫及び藻類等の生物と交差反応を起こすことが報告されている³⁾。また, ヒトに対する感染性が異なる *Cryptosporidium* 属の他種のオーシストとの鑑別が困難である。以上のことから, ヒトへの感染と最も密接に関わっている *C. parvum* をより客観的に判定できる検出法の開発が望まれている。

標的遺伝子を検出する PCR 法は迅速かつ客観的な検出法であり, *Cryptosporidium* に対しても, Small subunit rRNA (SSU rRNA) 遺伝子などを標的とする PCR による検出法が開発され, 原水や浄水, 糞便等からの検出が試みられている⁴⁻⁷⁾。一方, PCR 法の問題点として環境中に存在するフミン質等の有機物が増幅反応を抑制することが報告されており⁸⁾、また SSU rRNA 遺伝子は原虫間で高い相同性を有するため, 本遺伝子に対する PCR で *Cryptosporidium* 属と近縁と考えられる非病原微生物を検出したことが報告されている⁹⁾。したがって PCR 法の検討

に際しては, *C. parvum* の種内で高度に保存された領域を標的として *C. parvum* を特異的に検出できること, さらに *C. parvum* は種内でも異なる宿主型が存在するため, その宿主型に応じてより多様性に富む遺伝子配列を標的とすることで, 増幅産物の分子疫学への応用が可能な方法であることが望ましい。

こうした課題への対応として, 筆者らは *C. parvum* のスポロゾイト外膜を構成する糖蛋白をコードする遺伝子 *Cpgp40/15* に着目した。*Cpgp40/15* 遺伝子の塩基配列は *C. parvum* 種内で多様性に富むことが報告されている¹⁰⁾。本研究では, *C. parvum* の既報の *Cpgp40/15* 遺伝子の塩基配列を比較して, nested PCR に用いるプライマーを新たに設計した。この nested PCR による *C. parvum* 検出法を確立するため, 検出感度及び種特異性について検討した。さらに, 河川水から懸濁物を濃縮回収した高濁度試料に *C. parvum* オーシストを添加して免疫磁気ビーズ法による回収操作を行い, 本検出方法の環境試料への適用性を検討した。

材料及び方法

1. 原虫類

Waterborne 社から購入した *C. parvum* Iowa 株, *C. muris* RN66 株, *Giardia lamblia* H3 株及び *G. muris* Roberts-Thompson 株を用いた。

2. DNA 抽出

プライマーの適用可能性と検出感度の実験に用いるゲノム DNA は, *C. parvum* Iowa 株のオーシストからフェノール・クロロホルム法で抽出し, エタノール沈澱で精製した¹¹⁾。その他の実験では, Johnson ら(1995)¹²⁾ の方法を一部変更した加熱・凍結処理法によって各種の原虫のゲノム DNA

* 東京都健康安全研究センター環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 日本獣医畜産大学

表1. 使用プライマー

| プライマー名 | 塩基配列 |
|----------------------------|---------------------------------|
| gp40/15-51 ^{*1} | 5'-TCCGCTGTATTCTCAGCCCA-3' |
| gp40/15-31 ^{*1} | 5'-AGCAGAGGAACCAGCATCCTT-3' |
| gp40/15-52 ^{*2} | 5'-TGTTCTGTGAGGGCTCATC-3' |
| gp40/15-32 ^{*2} | 5'-GGCAAACAAATCGACGGTTGC-3' |
| SSUrRNA-51 ^{*1,3} | 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC-3' |
| SSUrRNA-31 ^{*1,3} | 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG-3' |
| SSUrRNA-52 ^{*2,3} | 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' |
| SSUrRNA-32 ^{*2,3} | 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3' |

*1 1st PCR用.

*2 nested PCR用.

*3 Xiao et al. (1999)による.

を抽出した。すなわち、各原虫のオーシスト及びシストを室温、1,200×gで10分間遠心沈殿し、沈渣を50 µLのTAEバッファーに再浮遊した。沸騰水中で3分間加熱後、-20℃に15分間放置した。この加熱・凍結操作を6回繰り返したのち、4℃、17,000×gで1分間遠心後、上清を回収した。得られた上清をPCRのテンプレートとして用いた。

3. PCR

Strongら(2000)¹⁰⁾が報告した*Cpgp40/15*遺伝子の塩基配列を参考にしてプライマーを設計した(表1)。gp40/15-51及びgp40/15-31は1st PCRに、gp40/15-52

及びgp40/15-32はnested PCRに用いた。図1には*C. parvum* Iowa株の*Cpgp40/15*遺伝子の塩基配列と各プライマーの結合位置、及びPCR産物のサイズ等を示した。また、PCR反応が正常に行われたことの確認のため、Xiaoら(1999)¹³⁾が設計したSSU rRNA遺伝子のプライマー(表1)も並行して用いた。

PCRは50 µLの反応系(1× Buffer 50 µL中に、dNTP mixture 0.2 mM, 各プライマー 0.5 µM, Ex Taqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2 unit, テンプレート 1 µLを含む)で行った。PCRのプログラミングは*Cpgp40/15*遺伝子及びSSU rRNA遺伝子とも同一条件とし、94℃で3分間変性した後、94℃で1分間変性、60℃で1分間アニーリング及び72℃で1分間の伸張反応を35サイクル行い、最後に72℃、7分間の伸張反応とした。反応後は、4℃で反応溶液を保存した。

4. 電気泳動

3%アガロースゲル中で増幅産物の電気泳動を行った。緩衝液としてTAEバッファーを用いた。泳動後、臭化エチジウム液(5 mg/L)で染色し、UVトランスイルミネーターで観察した。

5. 制限酵素処理

*Cpgp40/15*のnested PCR増幅産物を制限酵素HindⅢとXhoⅠ(宝酒造)を用いて切断し、生成するフラグメントを調

1 GATAACAAAT TTTTATACAT TCGGCTCGAC CCTTCTATAG GTGATAATTA GTCAGTCTTT
 61 AATAAGTAGG CAACTAAGGA CAAAGGAAGA TGAGATTGTC GCTCATTATC GTATTACTCT
 121 CCGTTATAGT CTCCGCTGTA TTCTCAGCCC CAGCCGTTCC ACTCAGAGGA ACTTTAAAGG
 181 ATGTTCTGTG TGAAGGCTCA TCATCGTCA CGTCATCATA ATCATCATCA TCATCATCAT
 241 CATCATCAAC ATCAACCGTC GCACCAGCAA ATAAGGCAAG AACTGGAGAA GACGCAGAA
 301 GCAGTCAAGA TTCTAGTGGT ACTGAAGCTT CTGGTAGCCA GGGTTCTGAA GAGGAAGGTA
 361 GTGAAGACGA TGGCCAAACT AGTGCTGCTT CCCAACCCAC TACTCCAGCT CAAAGTGAAG
 421 GCGCAACTAC CGAAACCATA GAAGTACTC CAAAAGAAGA ATGCGGCACT TCATTTGTAA
 481 TGTGGTTCGG AGAAGGTACC CCAGCTGCGA CATTGAAGTG TGGTGCCTAC ACTATCGTCT
 541 ATGCACCTAT AAAAGACCAA ACAGATCCCC CACCAAGATA TATCTCTGGT GAAGTTACAT
 601 CTGTAACCTT TGAAAAGAGT GATAATACAG TTAATAATCAA GGTTAACGGT CAGGATTTC
 661 GCACTCTCTC TGCTAATTCA AGTAGTCCAA CTGAAAATGG CGGATCTGCG GGTCAGGCTT
 721 CATCAAGATC AAGAAGATCA CTCTCAGAGG AAACCAGTGA AGCTGCTGCA ACCGTCGATI
 781 TGTTTGCCTT TACCCTTGAT GGTGGTAAAA GAATTGAAGT GGCTGTACCA AACGTCGAAG
 841 ATGCATCTAA AAGAGACAAAG TACAGTTTGG TTGCAGACGA TAAACCTTTC TATACCGGCG
 901 CAAACAGCGG CACTACCAAT GGTGTCTACA GGTTGAATGA GAACGGAGAC TTGGTTGATA
 961 AGGACAACAC AGTTCCTTTG AAGGATGCTG GTTCCTCTGC TTTTGGACTC AGATACATCG
 1021 TTCCTTCCGT TTTTGCAATC TTTGCAGCCT TATTCGTGTT GTAAGAAAT

| PCR | プライマー(*) | 結合位置 | PCR産物の大きさ |
|--------|------------|-----------------|-----------|
| 1st | gp40/15-51 | 132-152(下線部分) | 870bp |
| | gp40/15-31 | 1001-981(下線部分) | |
| nested | gp40/15-52 | 182-202(二重下線部分) | 607bp |
| | gp40/15-32 | 788-768(二重下線部分) | |

(*)表1参照.

図1. *Cytopsporidium parvum* Iowa株の*Cpgp40/15*遺伝子の塩基配列とPCR増幅領域

べた．反応条件は各酵素に添付の説明書に従った．なお SSU rRNA 遺伝子の増幅産物についても制限酵素 *Vsp* (宝酒造)を用いて同様に処理した．

6. PCRによる高濁度試料からの検出実験

平成 14 年 1 月に多摩川の関戸橋地点で採取した河川水を孔径 5.0 μm の親水性 PTFE メンブランフィルター(アドバンテック)でろ過した．メンブラン上に捕捉された懸濁物をリン酸塩緩衝液(PBS)中に剥離・回収し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した．この濃縮懸濁物中に *Cryptosporidium* のオーシストがないことを蛍光抗体染色法で確認したのち, 河川水 0.24 L 分あるいは 1.2 L 分の懸濁物濃縮物(湿重量はそれぞれ, 約 0.05 g と 0.3 g)を滅菌蒸留水で 3 回洗浄し, 50 mL 遠心沈殿管内の滅菌蒸留水 50 mL に再懸濁させ, 高濁度試料とした．濁度は前者で 140 度, 後者で 700 度であった．この懸濁液に推定 600, 200, 100 又は 50 個の *C. parvum* オーシストを加え, 室温で一晩穏やかに撈拌した．これを免疫磁気ビーズ(Dynabeads GC-Combo, Dynal)で処理してオーシストを精製・回収し, PCR による検出及び蛍光抗体染色法による計数に供した．また撈拌せずに混合後直ちに回収する実験も行った．PCR は各条件ごとに 3 連の反応系で行った．実験は同一条件について 2 回もしくは 3 回繰り返した．

7. 蛍光抗体染色

磁気ビーズ法による精製試料を直径 25 mm, 孔径 0.2 μm の親水性 PTFE メンブランフィルター(アドバンテック)上で間接免疫蛍光染色キット(Hydrofluor Combo Kit, Ensys Inc.)及び 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を用いて蛍光染色した．蛍光粒子をオーシストと判定する基準は保坂ら(2002)¹⁴⁾に従った．

結果及び考察

1. *Cpgp40/15* 遺伝子を標的とした PCR 産物の確認と検出感度

今回用いたプライマーによる *Cpgp40/15* の 1st PCR と nested PCR の結果を図 2 に示した．それぞれのプライマーによる PCR で, 予想される増幅領域に一致する大きさ(1st PCR で 870 bp, nested PCR で 607 bp)の産物が得られた．SSU rRNA 遺伝子の増幅も正常であり, PCR 反応が問題なく行われたことが示された．ついで, 増幅産物が予定領域のものであることを確認するため, 増幅産物を制限酵素で処理してフラグメントの大きさを調べた．今回のプライマーによる *Cpgp40/15* 遺伝子の nested PCR 産物は, 制限酵素 *Hind* III により 143bp と 464bp のフラグメントに, また *Xho* I により 381bp, 139bp 及び 87bp のフラグメントに切断されると予想された．図 3 に示したように, それぞれの制限酵素によって nested PCR 産物を処理した結果, 上記の大きさのフラグメントが観察された．このことから, 今回のプライマーにより, *Cpgp40/15* 遺伝子の予

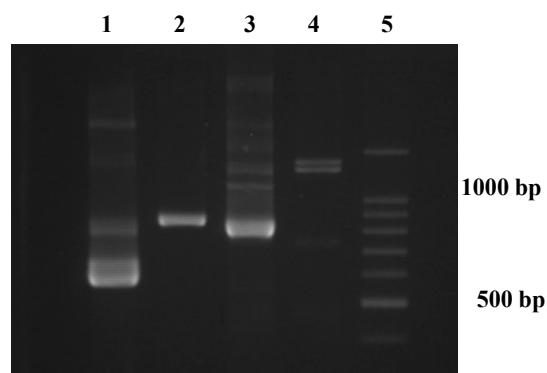


図2. 各プライマーによるクリプトスポリジウム遺伝子のPCR結果

1: *Cpgp40/15* の nested PCR, 2: *pgp40/15* の 1st PCR, 3: SSU rRNA 遺伝子の nested PCR, 4: SSU rRNA 遺伝子の 1st PCR, 5: サイズマーカー

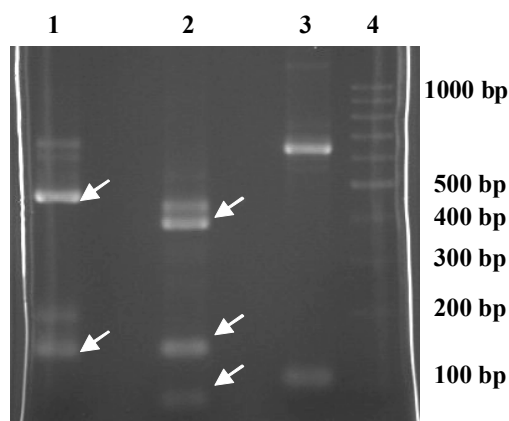


図3. nested PCR 増幅産物の制限酵素切断フラグメント

1: *Cpgp40/15* 増幅産物の *Hind* III 処理による 2 つのフラグメント(矢印), 2: *Cpgp40/15* 増幅産物の *Xho* I 処理による 3 つのフラグメント(矢印), 3: SSU rRNA 遺伝子増幅産物の *Vsp* I 処理, 4: サイズマーカー

想通りの領域が増幅されていることが確認された．

今回開発した nested PCR の検出感度を検討するため, 3×10^6 個のオーシストより抽出したゲノム DNA を段階希釈して nested PCR を試みた．抽出されたゲノム DNA の総量は 1.7×10^{-6} g であり, 1 オーシストあたりの DNA 量は約 5×10^{-13} g と求められた．抽出されたゲノム DNA の 10 倍希釈による段階希釈で行った nested PCR の結果を図 4 に示した．ゲノム DNA 量で 5×10^{-13} g, すなわち 1 オーシストに相当する DNA 量まで増幅産物が認められた．これは SSU rRNA 遺伝子を標的とした場合と同じ検出感度であった． 5×10^{-13} g 以下の DNA 量に対する検出感度についてはさらに細かい希釈段階による検討が必要であるが, 環境中での *C. parvum* の最小存在単位は 1 オーシストであり, 今回開発した PCR 法が *C. parvum* の最小量に対応した検出感度を持つことが示された．

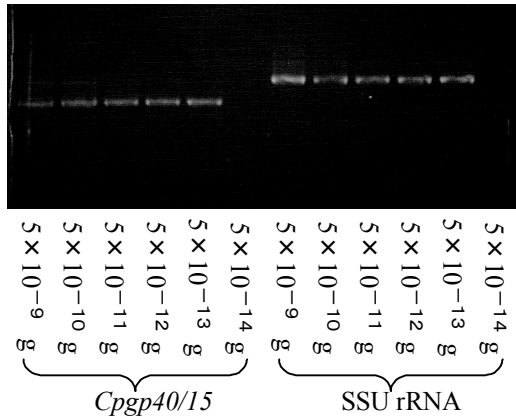


図4. 抽出したゲノムDNAによる nested PCRの検出感度

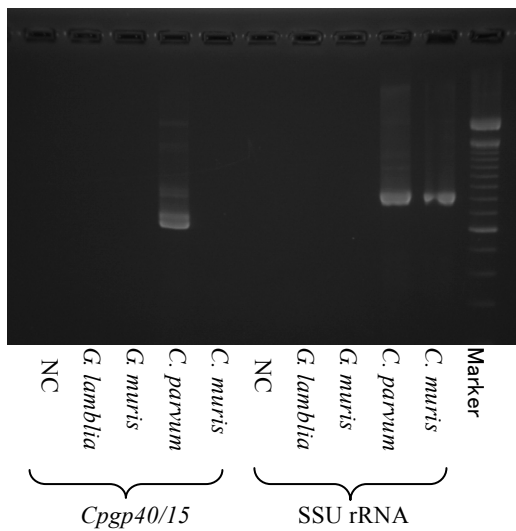


図5. 各種原虫に対するCpgp40/15とSSU rRNA 遺伝子を標的としたnested PCRによる増幅結果(NC: ネガティブコントロール)

2. Cpgp40/15 遺伝子を標的とした PCR の種特異性

今回開発した nested PCR の種特異性を検討するため、*C. parvum*、*C. muris*、*Giardia lamblia* 及び *G. muris* のゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行った結果を図5に示した。

Cpgp40/15 遺伝子に対する nested PCR では *C. parvum* のみ増幅産物を得られたが、*C. muris*、*G. lamblia* 及び *G. muris* では増幅されなかった。一方、SSUrRNA 遺伝子では *Giardia* 属の2種では増幅されなかったが、*C. muris* で *C. parvum* と同じ大きさの PCR 産物が増幅された。このことは、SSU rRNA 遺伝子を標的とした PCR は *Cryptosporidium* 属と近縁と考えられる非病原微生物の検出¹⁶⁾に加えて、ヒトへの感染性が異なる *Cryptosporidium* 属の他種のオーシストと *C. parvum* のオーシストとの鑑別において問題となると考えられる。このように、*Cpgp40/15* 遺伝子を標的とした nested PCR は *C. parvum* に対して高い特異性を有していることから公衆衛生上重要な *C. parvum* の検出に有用であり、また河川等の汚染源の推定等に際して分子疫学的情報を提供するものと期待される。

3. PCR 法による高濁度試料からのオーシスト検出

濁度 140 度及び 700 度の高濁度試料で一晩攪拌した場合の結果を表2に示した。PCR 及び蛍光抗体染色のいずれの検出法でも、Lowery ら(2000)⁵⁾と同様に濁度及びオーシスト添加量に依存した結果が得られた。すなわち、PCR 法では、濁度 140 度の場合、推定 600 オーシストの添加では全試行の全反応系で遺伝子を検出できた。推定 200 オーシスト及び 100 オーシストの添加では、3 回の試行のうちそれぞれ 2 回で検出された。特に 200 オーシストで陽性と判

表2. 河川懸濁物濃縮試料への添加・回収実験による *C. parvum* オーシストのPCR 及び蛍光抗体染色法による検出

| | | 上段: PCR反応(3連による試験結果) | | | |
|------------------|------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 下段: 蛍光抗体染色による検出オーシスト数と回収率(%) | | | |
| 添加オーシスト数 | | 600 | 200 | 100 | 50 |
| 河川懸濁物濃縮試料濁度 140度 | 第1試行 | +, +, + 312(52%) | +, +, + 76(38%) | +, +, - 58(58%) | - , - , - 17(34%) |
| | 第2試行 | +, +, + 318(53%) | - , - , - 125(63%) | - , - , - 47(47%) | - , - , - 18(36%) |
| | 第3試行 | NT NT | +, +, + 117(59%) | +, - , - 67(67%) | NT NT |
| | 平均検出数(回収率) | 315(53%) | 106(53%) | 57(57%) | 18(36%) |
| 河川懸濁物濃縮試料濁度 700度 | 第1試行 | +, +, - 89(15%) | +, - , - 38(19%) | - , - , - 30(30%) | - , - , - 13(26%) |
| | 第2試行 | - , - , - 134(22%) | - , - , - 39(20%) | - , - , - 35(35%) | - , - , - 15(30%) |
| | 第3試行 | NT NT | - , - , - 62(31%) | - , - , - 19(19%) | NT NT |
| | 平均検出数(回収率) | 116(19%) | 46(23%) | 28(28%) | 14(30%) |

NT: 試験せず

表3. 攪拌を伴わない河川懸濁物濃縮試料への添加・回収実験による *C. parvum* オーシストのPCR及び蛍光抗体染色法による検出
 上段：PCR反応(3連による試験結果)
 下段：蛍光抗体染色による検出オーシスト数と回収率(%)

| 添加オーシスト数 | 100 | 100 |
|-------------|--------------------|--------------------|
| 河川懸濁物濃縮試料濁度 | 140度 | 700度 |
| 第1試行 | +, +, + 91(91%) | +, -, - 71(71%) |
| 第2試行 | +, +, + 87(87%) | +, +, + 52(52%) |
| 平均検出数(回収率) | 89(89%) | 62(62%) |

定された試行では、3連のPCR反応系の全てで増幅が認められた。一方、濁度700度の場合、推定600オーシスト及び200オーシストの添加では、それぞれ1回ずつ、一部のPCR反応系で検出できた。蛍光抗体染色法によるオーシストの計数値は、濁度140度では、推定添加量に対して34~67% (平均51%)であったのに対し、濁度700度では15~35% (平均25%)であった。これらの結果はこれまでの研究^{5,9,15-17)}で示された回収率よりも低いものであった。その要因の1つとして、オーシストと懸濁物との相互反応によって免疫磁気ビーズ法による回収効率への影響が考えられた。そこで、推定100オーシストを上記と同じ濁度の試料に添加後、ただちに磁気ビーズ法により回収する実験を2回繰り返した。結果を表3に示した。PCR法ではいずれの濁度においても2回とも検出された。また濁度700度の1回目の試行を除いて、PCRの全反応系で増幅が認められた。蛍光抗体染色法による計数値も、濁度700度では52~72% (平均62%)、濁度140度では87~91% (平均89%)と、高い回収率を示した。すなわち、PCR及び蛍光抗体染色法とも一晚の攪拌を行った場合(表2)よりも高い検出結果となり、攪拌過程が免疫磁気ビーズ法によるオーシストの回収効率と、それに続くPCRによる検出感度を低下させる要因となることが示された。このことは、高濁度においては長時間のオーシストと懸濁物との接触によって、オーシストが懸濁物に被覆され、オーシスト壁外面に分布するエピトープと免疫磁気ビーズの抗体との結合が妨害される可能性を示唆すると考えられる。今後、添加・回収実験による検出結果を的確に評価するためには、

用いる河川水懸濁物の量に加えて、懸濁物の性状や懸濁物との接触時間、接触強度などの条件を考慮する必要がある。

4. PCR法による高濁度試料からの *C. parvum* 検出感度

表2及び表3で示した蛍光抗体染色によるオーシスト計数値とPCRによる検出結果との関係を総括して図6に示した。懸濁物量及び攪拌条件の有無に関わらず、オーシスト数がほぼ50個以上で3連のPCR反応系の一部又は全部で増幅産物が得られた。このことは、最低50個の *C. parvum* オーシストを免疫磁気ビーズ法によって回収できれば、高濁度の河川水や水道原水からでもPCR法による検出が可能であることを示している。

今回用いたPCR法では回収オーシストから最終的に50µLのDNA抽出液を得た後、1反応系あたり1µLのDNA抽出液をテンプレートとして加えている。したがって回収オーシストが50個の場合、1反応系あたり1個のオーシストに相当するDNA量を加えていることになる。これは、図4で示した検出下限と一致する。すなわち、今回開発したPCR法は、免疫磁気ビーズ法と組み合わせることによって、高濁度の河川水等の環境水に対しても、本PCR法の検出下限である1オーシストの検出感度を保っていることがわかった。この検出感度はこれまでに報告された他の研究者によるPCR法による検出感度に匹敵する^{9,18)}。

今後、回収オーシストがさらに少量でも検出できる方法を検討するとともに、遺伝子型がウシ型(人獣共通感染型)のIowa株を用いて今回開発したPCR法をヒト型の *C. parvum* で実施して、ウシ型との差異を比較検討し、水環境中に出現するオーシストの遺伝子型による分別、さらにオーシストの排出源推定のための情報を蓄積する必要がある。

結 論

- 1) *Cpgp40/15* 遺伝子を標的とする nested PCR により、ヒトへの感染性が明らかな *C. parvum* を特異的に検出できた。
- 2) 本法による検出下限はゲノムDNAとして 5×10^{-13} g であり、これは環境中でのクリプトスポリジウムの存在単位である1オーシストに相当した。

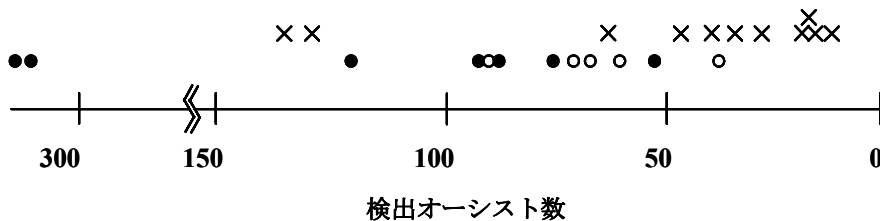


図6. 免疫蛍光抗体法で検出された *C. parvum* オーシスト数とPCR法による検出結果の関係

● : PCRの全反応系で検出 ○ : PCRの一部の反応系で検出
 × : 全反応系で不検出

3) 本法は河川水等の濁度の高い環境水においても, 免疫磁気ビーズ法で回収・精製したオーシストに対して, 実質的に1オーシストに相当する検出下限を保持していた。

4) 今後, より少ない回収個数での検出方法の確立並びにヒト型の *C. parvum* への本法の適用について検討する必要がある。

文 献

- 1) 保坂三継: 用水と廃水, **40**(2), 11-24, 1998.
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知: 平成8年10月4日付衛水第248号(平成10年6月一部改正, 平成13年11月一部改正), 1996.
- 3) Rodgers, M. R., Flanigan, D. J., and Jakubowski, W.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **61**, 3759-3763, 1995.
- 4) Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5492-5498, 2000.
- 5) Lowery, C. J., Moore, J. E., Millar, B. C., et al.: *J. Med. Microbiol.*, **49**, 779-785, 2000.
- 6) Morgan, U. M., Pallant, L., Dwyer, B. W., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 995-998, 1998.
- 7) Xiao, L., Singh, A., Limor, J., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1097-1101, 2001.
- 8) Ijzerman, M. M., Dahling, D. R., and Fout, G. S.: *J. Virol. Methods.*, **63**, 145-153, 1997.
- 9) Sturbaum, G. D., Klonicki, P. T., Marshall, M. M., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2991-2996, 2002.
- 10) Strong, W. B., Gut, J., and Nelson, R. G.: *Infect. Immun.*, **68**, 4117-4134, 2000.
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E., F., and Sambrook, J.: *Molecular cloning: A laboratory Manual.*, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 12) Johnson, D. W., Pieniazek, N. L., Griffin, D. W., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **61**, 3849-3855, 1995.
- 13) Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **65**, 3386-3391, 1999.
- 14) 保坂三継, 落合由嗣, 矢野一好, 他: 用水と廃水, **44**, 295-303, 2002.
- 15) Bukhari, Z., McCuin, R. M., Fricker, C. R., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **64**, 4495-4499, 1998.
- 16) McCuin, R. M., Bukhari, Z., Sobrinho, J., et al.: *J. Microbiol. Methods*, **49**, 779-785, 2001.
- 17) Rochelle, P. A., De Leon, R., Johnson, A., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **65**, 841-845, 1999.
- 18) Sturbaum, G. D., Reed, C., Hoover, B.H., et al.: *Appl. Envir. Microbiol.*, **67**, 2665-2668, 2001.