

〈研究発表〉

クリプトスポリジウム自動測定装置の開発

金 京柱, 田中 良春

メタウォーター株式会社 R&D センター 先端水システム開発部 センサー開発 Gr (〒191-8502 東京都日野市富士町1番地, E-mail: kim-kyungju@metawater.co.jp, tanaka-yosiharu@metawater.co.jp)

概要

水系病原性原虫のクリプトスポリジウム・オーシストの検査において、蛍光抗体染色法は、抗原抗体反応を利用してクリプトを選択的に検出する手段として用いられている。本研究では、環境試料からクリプトを選択的に検出するための自動検出法として、蛍光抗体染色後フローサイトメトリー法を検討した。その結果、蛍光抗体標識法の条件として、反応温度を15℃以下、反応時間を1時間に設定することで測定に必要な蛍光強度が確保され、かつ共存粒子への非特異的吸着を防ぐことができ、精度良く測定可能であることが解った。

キーワード: クリプトスポリジウム、フローサイトメトリー、蛍光抗体染色、微生物検出

1. はじめに

クリプトスポリジウムは浄水処理で広く使われている塩素消毒に耐性があり、様々な国で集団感染の報告がある。安全な水を供給するためには適切な水処理システムはもちろん、クリプトスポリジウムによる汚染を常時監視する方法が必要である。

一般的に採用されている、環境水中のクリプトスポリジウムの検出手法は、大きく「濃縮工程」「精製工程」「標識工程」、「検出工程」の四つに分けられる。濃縮工程では膜を用いて10 L以上の試料を濃縮して回収する工程、精製工程ではIMS(免疫磁気分離)や密度勾配遠心法などで濃縮・回収物の中からクリプトスポリジウムを精製する工程が広く使われている。そして、検出過程では精製されたクリプトスポリジウムを蛍光抗体染色で染色した後で顕微鏡観察により定量することが多い。しかし、顕微鏡観察法は操作が煩雑で難しいことから、測定の簡易化や自動化が求められている。一方、自動測定装置の構成が可能なフローサイトメーターを用いてクリプトスポリジウムを分析する研究も報告されているが、フローサイトメーターで分析するための選択性を高めた蛍光抗体染色法についてはまだ報告されていない。本研究で検討された専用のフローサイトメーターの概要をFig. 1に示す。試料とシース液を約200 μmのフローセルに流し、光源(488 nm)からの光で、前方散乱光強度を測定する散乱光検出器と側方散乱緑色蛍光強度と赤色蛍光強度を測定する検出器を設けて試料水中の標識されたクリプトスポリジウムを測定する。

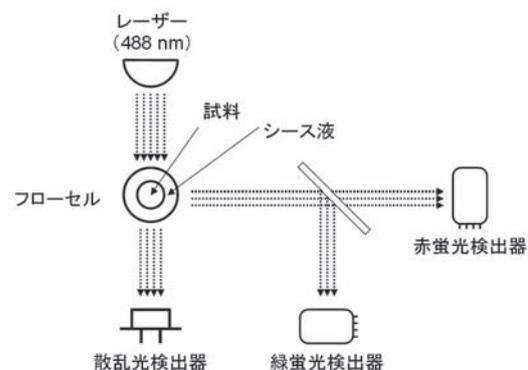


Fig. 1: Schematic diagram of prototype of flowcytometer for antibody stained *Cryptosporidium*

演者らは、耐塩素性病原虫による汚染リスクのさらなる低減化を目指し、クリプトスポリジウム自動測定装置の開発を進めている。本研究では、専用のフローサイトメーターを用いて、水試料中のクリプトスポリジウム検出にて重要な蛍光抗体標識法について新たな知見を得たので以下に報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

不活化された *Cryptosporidium parvum* oocyst (Waterborne 社製アイオワ株 (10⁶ oocyst/mL, USA) (以下、クリプトと記載) を用い、10³~10⁴ oocyst/mL の濃度でリン酸緩衝溶液 (PBS, pH 7.4) に添加した試料を標準試料とした。

1 L の河川水 (濁度 2.1) を孔径 3 μm の膜 (直径 90 mm、Track-Etched membrane、Whatman 社) でろ過し、捕捉した微粒子を、誘出液 (クリプト検査用 PET 溶液) を用いて回収した河川水濃縮液にクリプトを添

加した試料を河川水濃縮試料とした。
標準粒子として、緑色蛍光粒子 ($3\mu\text{m}$ および $5\mu\text{m}$ 、Green Fluorescent Microspheres、Duke Scientific 社) とクリプトレーサ 1 号 ((財) 水道技術研究センター) を用い、緑色蛍光強度と散乱光強度を標識されたクリプトの光特性を比較した。

2.2 蛍光抗体標識法の検討

蛍光抗体 (FITC、EasyStain、BTF 社、Australia) を用い、標識条件を検討した。2 mL の河川水濃縮試料に蛍光抗体の最終添加濃度を $40\mu\text{L/mL}$ とし、 $3\sim 37^\circ\text{C}$ の温度条件で 30 分間攪拌反応後、緑色蛍光強度と散乱光強度をフローサイトメーターで測定することで反応温度を評価した。また、反応温度および反応時間を評価するために 10 mL の PBS 試料に $40\mu\text{L/mL}$ の蛍光抗体を最終添加濃度として添加し、 $4\sim 24^\circ\text{C}$ の温度条件で $30\sim 270$ 分間、標識反応を行った後、自動測定装置用に試作した光学検出器で測定した。蛍光標識抗体を $0\sim 80\mu\text{L/mL}$ の濃度で添加した試料を 4°C で 1 時間攪拌 (150rpm) し、上記光学検出器を用い、添加量による影響を検討した。標識されたクリプトは顕微鏡 (BX-61、オリンパス社製) を用いて確認した。

2.3 測定および評価

フローサイトメーター (FCM) は FACS Calibur、BECTON DICKINSON 社製を用いた。試料は蛍光抗体標識後の試料 2 mL を設定時間ごとに測定した。FCM 測定は前方散乱光強度と緑色蛍光強度をそれぞれ 5.5 (Amplifier、FSC) と 400 (Detector、FL1) の設定で、 $60\mu\text{L/min}$ の速度で行った。また、Fig. 1 に示したように、試作した光学検出器 (専用フローサ

イトメーター) を用い FCM と比較検討を行った。専用のフローサイトメーターはクリプト相当径の粒子による前方散乱光の光強度に相当する粒子を検出、これらの粒子のうち蛍光標識抗体により標識されあらかじめ定められた蛍光強度の緑色光を発光し、かつ赤色の散乱光を同時に発光しない粒子をクリプトとして計数する。

2.4 直線性の検討

検討された蛍光抗体標識法と試作した専用フローサイトメーターを評価するために、約 $0\sim 250$ oocysts のクリプトを添加した PBST (0.01%) と濃縮河川水 20 mL に $1.5\mu\text{L/mL}$ の蛍光抗体を終濃度 $15\mu\text{L/mL}$ となるように添加し、 5°C 、1 時間の反応条件で標識されたクリプトを顕微鏡と専用フローサイトメーターで計数して比較した。

3. 結果と考察

3.1 クリプトの光学特性

まず、ネズミと牛から生産されたクリプトの光特性を比較したが、散乱光強度および蛍光抗体標識後の緑色蛍光強度で大きな差異は認められなかった。しかし、本研究では *C. parvum* が牛から由来することを考慮し牛から生産されたクリプトを使用して検討を行った。クリプトレーサと $3\mu\text{m}$ 緑粒子を用い、クリプトの散乱光強度特性を FCM と試作光学検出器で比較した。FCM と試作光学検出器ともにクリプトレーサと $3\mu\text{m}$ 緑色蛍光粒子の間でクリプトの信号が分布していることが確認され、クリプトの大きさ (平均 $4\mu\text{m}$) が散乱光強度で反映されていると考えられた。さらに、 $3\mu\text{m}$ と $5\mu\text{m}$ の緑色蛍光粒子を FCM で散乱光と緑色蛍光

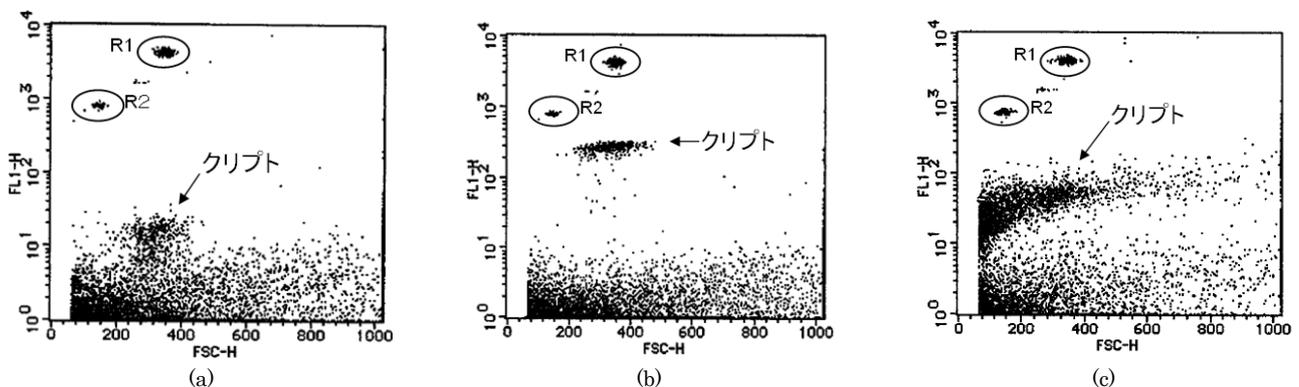


Fig. 2: Flowcytogram of forward scattered light to fluorescence character of FITC-stained *Cryptosporidium parvum* oocysts from concentrated river water. (a) After inoculation of FITC-antibody, (b) after 30-min-staining at 4°C , (c) after 30-min-staining at 37°C . R1 and R2 show the groups of $5\mu\text{m}$ and $3\mu\text{m}$ of green fluorescence standard particles.

を測定した結果、散乱光でも緑色蛍光でも標識されたクリプトを比較することが可能であることが解った。

3.2 蛍光抗体標識時のクリプトの散乱蛍光強度の変動特性

河川水濃縮試料を用いたときの蛍光抗体標識クリプトの蛍光散乱光強度の変動について、標識時間と温度での比較を Fig. 2 に示した。蛍光抗体を添加した直後 (a) からクリプトの緑蛍光強度が強くなる傾向が認められた。さらに、蛍光抗体染色する際、河川試料水中の夾雑物の影響が、4℃ (b) のときに 37℃より少ない傾向が認められた。これは低い温度ほど抗体の選択性が高くなり、夾雑物への非特異的な吸着も少なくなることを示すと考えられた。

3.3 蛍光抗体標識条件の最適化

抗体標識の温度条件を変えて、緑蛍光粒子 (3 μm) と標識クリプトの緑色蛍光強度比を FCM で測定および比較した結果を Fig. 3 に示した。蛍光強度比が 0.3 を超えることで標識クリプトを特定し易くなった。15℃以下の温度で標識したクリプトは 0.3 以上の蛍光比が観察された。これは、他の抗体研究で報告されているように低温で抗体の選択性が高くなることが原因と考えられた²⁾。

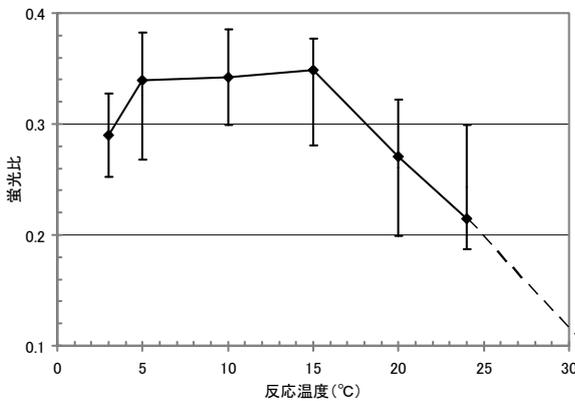


Fig. 3: Relationship between the fluorescence intensity of antibody stained *Cryptosporidium* oocysts and the reaction temperature. The results were obtained from FCM. The error bar shows the width of FITC-stained *Cryptosporidium* wave form.

Fig. 4 には、試作光学検出器で測定したクリプトの緑色蛍光強度比を反応温度と反応時間で示した。標識クリプトの蛍光強度は染色時間に比例して増加した。15℃以下の反応温度と 270 分の反応時間で蛍光比は 0.7 以上になり高い蛍光強度が得られることが解った。しかし、20℃以上の温度からは減少し、270 分の染色時間でも 0.6 以下の蛍光比になった。夾雑物の妨害との関係を考慮して蛍光抗体染色の条件は 15℃、1 時間が良いと考えられた。

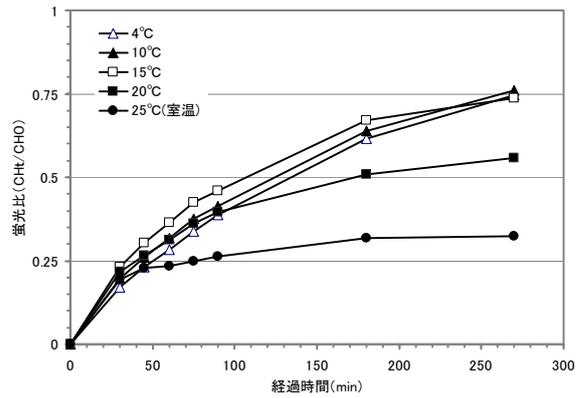


Fig. 4: Change of fluorescence intensity of antibody stained *Cryptosporidium* oocysts by the reaction temperature and reaction time. The results were obtained from prototype of flowcytometer for *Cryptosporidium*.

また、標識クリプトの蛍光強度は蛍光抗体の添加量に比例して上昇した。Fig. 5 に添加量と S/N 比との関係を示す。添加量と S/N 比も比例関係が認められたが、0.3 以上の蛍光比が得られる 15~20 μL/mL の添加量 (20 mL の試料) が適当であると考えられた。

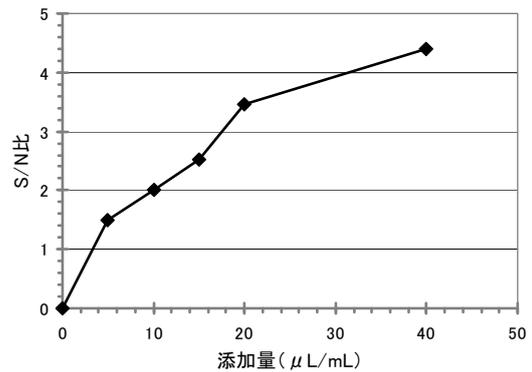
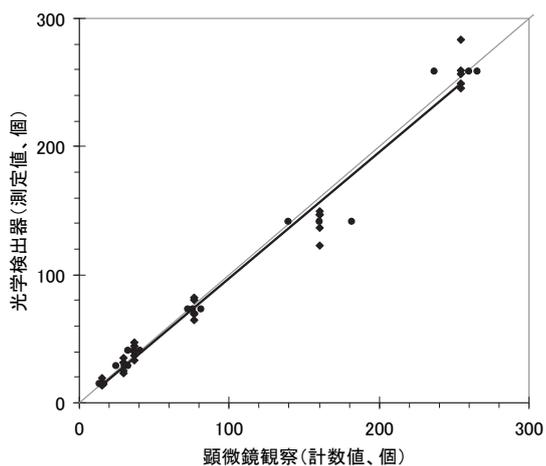


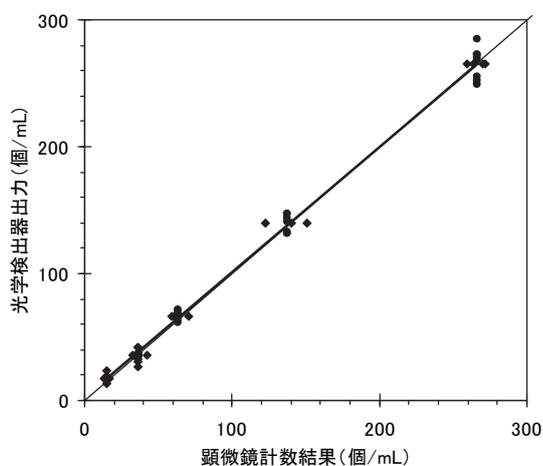
Fig. 5: Relationship between the injection amount of FITC-antibody and the S/N ratio. The S/N ratio was increased as the injection amount of FITC antibody.

3.4 光学検出器の直線性検討

Fig. 6 に PBST と濃縮河川水の試料について、顕微鏡下での計数値と専用のフローサイトメーターで計数値の相関を (a)、(b) に示した。PBST の結果 (a) では顕微鏡観察による計数値と専用のフローサイトメーターの計数値がほぼ一致した (slop=0.99, r²=0.9998)。また、河川水濃縮試料 (b) でも高い相関関係 (slop=0.92, r²=0.9924) が得られた。これらの結果から検討した反応条件を適用して専用のフローサイトメーターを用いてクリプトを測定することが可能だと考えられた。



(a)



(b)

Fig.6: Comparison of microscopic direct count (MDC) and measured count from prototype of flowcytometer of FITC-stained *Cryptosporidium*.

4. 結論

クリプト自動測定装置のための蛍光抗体標識の条件を詳細に検討の結果、実際の河川試料では、通常知られる温度条件（30～37℃）よりも低い条件の 15℃以下とし、反応時間は1時間程度、蛍光抗体の添加量は 15～20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ とすることで測定精度が向上することが解った。また、検討した蛍光抗体標識法を試作された専用フローサイトメーターに適用し、顕微鏡計数結果と比較を行った結果、ほぼ一致した結果を得ることができた。今後、水系が異なる河川水を用い、蛍光抗体標識時の夾雑物との非特位結合の影響度の確認など、さらに検討を進め自動測定装置の完成度を向上させる所存である。

参考文献

- 1) 田中良春,他 (2008) 原水用クリプトスポリジウム自動測定装置の開発. 学会誌「EICA」、13 (2/3)、p.65-68.
- 2) M. Katagiri, et al. (1999) Effects of methanol and temperature on enzyme immunoassay with monoclonal antibodies specific to the insecticide etofenprox. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(11), p.1988-1990.