

## 〈研究発表〉

### 光遮断フローサイトメーターによる耐塩素性病原虫の測定法の開発

金 京柱, 山口 太秀, 田中 良春

メタウォーター株式会社 R&Dセンター 環境システム開発部 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, E-mail:  
yamaguchi-dabide@metawater.co.jp, E-mail: tanaka-yosiharu@metawater.co.jp)

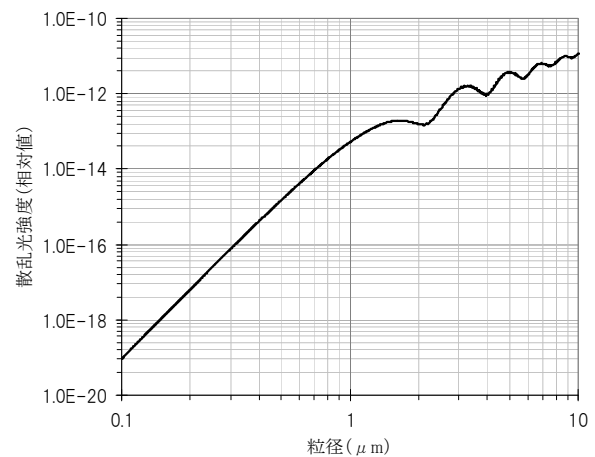
#### 概要

水中のクリプトスポリジウムおよびジアルジアの測定は顕微鏡による検査が一般的で、検査に時間が掛かり、測定操作も難しく、迅速に浄水処理プロセスに反映させることが難しい。このため、迅速かつ再現性の高い自動測定装置が求められている。我々は、光遮断検出方式で、上記耐塩素性病原虫を検出する装置の開発を進めている。検討の結果、光遮断方式により、3~15 $\mu\text{m}$ の粒径範囲で、粒径と光遮断信号レベルに比例関係があることが認められ、さらに、蛍光抗体染色によりそれぞれの蛍光散乱光を測定することで両者の同時検出が可能になった。

キーワード: クリプトスポリジウム、ジアルジア、光遮断フローサイトメーター、蛍光抗体染色、微生物検出

#### 1. はじめに

水系病原微生物であるクリプトスポリジウムとジアルジアの検査方法は、試料水の濃縮・回収精製工程と蛍光抗体法による標識、顕微鏡で計数する工程で構成されている。この検査は、高い熟練度と時間を要する作業である。このため、水系病原虫による汚染に迅速に対応可能とする常時監視可能な装置が求められている。自動測定法として、フローサイトメトリー法を用いた研究も進んでいる<sup>1)</sup>。しかしながら、一般にフローサイトメーターでの蛍光粒子の検出は、前方散乱光の強度を測定するので、**Fig. 1**に示したシミュレーション結果のように3 $\mu\text{m}$ 以上の粒子の場合、粒子径と散乱光強度の関係は線形関係が低く、正確な測定が難しい。クリプトスポリジウムやジアルジアのような5 $\mu\text{m}$ 以上のサイズの病原虫を計数するには、微粒子カウンタ等に応用されている、光遮断方式の検出器をフローサイトメーターに適用することにより、前方散乱光方式の課題を解決することが期待できると考える。そこで、演者らは、クリプトスポリジウムとジアルジアの同時計測が可能な光遮断フローサイトメーターの開発を**Table 1**に示した目標仕様で進めている。本研究では、開発中の光遮断フローサイトメーターについて、これまでの検討結果を報告する。



**Fig. 1:** A simulation results of the relationship between light scattered intensity and particle diameter.

**Table 1.** Development goal specification of light obscuration-flow cytometer for *Cryptosporidium* and *Giardia* simultaneous detection.

項目	目標仕様
方法	蛍光抗体を用い、選択的に標識した後、フローサイトメトリー方式で直接計数する。
検出精度	顕微鏡測定値との相関が $r^2=0.9$ 以上
測定時間	1 時間以内

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

標準試料として、PSL 粒子 (3.2~14.8  $\mu\text{m}$ 、DYNOSPHERS<sup>®</sup>、JSR 株式会社) を用い、試作機の光遮断特性を検討した。また、緑色蛍光粒子 (3  $\mu\text{m}$ 、Green Fluorescent Microspheres、Duke Scientific 社) を用い、緑色蛍光強度の評価に使用した。不活化された *Cryptosporidium parvum* oocyst (以下、クリプトと記載) と *Giardia lamblia* cyst (以下、ジアルジアと記載) (Waterborne 社製、USA) を、リン酸緩衝溶液 (PBS、pH7.4) に添加し、それぞれ 100 個/mL の濃度に調製した混合試料を同時測定の評価に使用した。

### 2.2 試作機 (光遮断フローサイトメーター) の評価

Fig. 2 に実験装置の概要を示す。光遮断フローサイトメーターからの光遮断信号と緑色蛍光強度のアナログ信号出力を専用の信号変換回路で増幅し、オシロスコープ (DLM6500、YOKOGAWA 社) で測定した波形をパソコンに取り込み解析した。

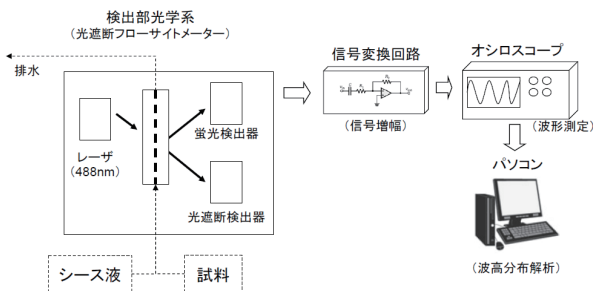


Fig. 2: Diagram of experimental apparatus of light obscuration flowcytometer.

粒子サイズと試作機の光遮断信号レベルの直線性を調べるため、純水に 100 個/mL 程度になるように調製した標準試料を測定し、得られた光遮断信号レベルと比較した。

### 2.3 同時測定 の 検討

蛍光抗体にて標識したクリプトとジアルジア (各々、100 個/mL) の混合試料を試作機にて測定し、緑色蛍光と光遮断信号の波高分布を評価することで、同時測定を検証した。実試料の標識は、20mL の試料に蛍光抗体 (FITC、EasyStain、BTF 社、Australia) を最終添加濃度が 15  $\mu\text{L/mL}$  なるように添加し、15 $^{\circ}\text{C}$  で 50 分間反応させた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 光遮断フローサイトメーターの基本性能の確認

ジアルジア検出を想定し、光遮断信号レベルの上限の値 (約 12V) で 14.8  $\mu\text{m}$  PSL 粒子が測定できるように信号変換回路を調整し、最終的に測定範囲を 3~15  $\mu\text{m}$  とした。

測定範囲内の PSL 粒子の波高分布を光遮断フローサイトメーターで測定し、光遮断信号レベルと測定した粒子のサイズとの比較を行った。結果を Fig. 4 に示す。5.1  $\mu\text{m}$  PSL 粒子測定時の S/N 比は 10 以上であり、また、PSL 粒子のサイズ毎に分離した波高分布が認められた。

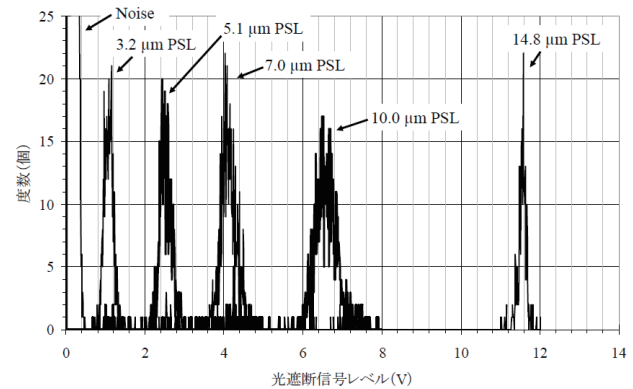


Fig. 4: Pulse height distributions of the light obscuration signals in the measurement of various sized PSL particles.

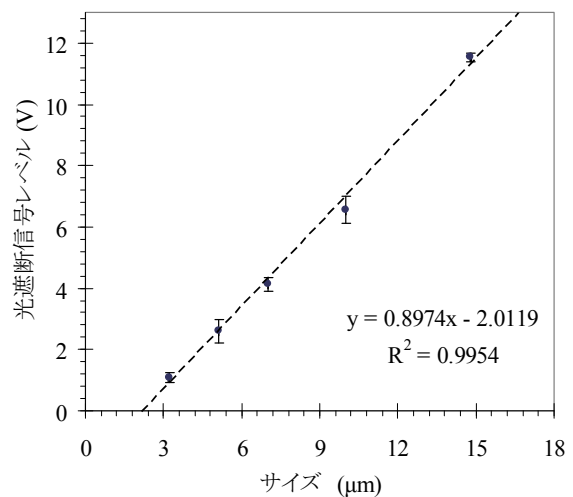


Fig. 5: Relationships between size and light obscuration signal in prototype flowcytometer. Error bars show the standard deviation (The sample number were 40).

### 3.2 光遮断フローサイトメーターの直線性の確認

Fig. 5にPSL粒子のサイズと光遮断信号レベルの関係を示す。標準粒子のサイズと出力信号は、高い相関関係 ( $r^2=0.99$ ) があることが認められ、粒子サイズ  $3\ \mu\text{m}$  以上から  $15\ \mu\text{m}$  までの範囲で良好な直線関係を得ることが出来た。

これらの結果から、約  $5\ \mu\text{m}$  サイズのクリプトと約  $10\ \mu\text{m}$  サイズのジアルジアの同時測定が期待できると考えられた。

### 3.3 実試料の測定

光遮断フローサイトメーターを用い、クリプトとジアルジアの混合試料を測定した。同時に測定したクリプトとジアルジアの波高分布を Fig. 6 に示す。光遮断信号レベルは、クリプトで  $1.1\sim 2.2\ \text{V}$ 、ジアルジアで  $2.8\sim 8.1\ \text{V}$  の範囲にそれぞれ分離されて分布していた。

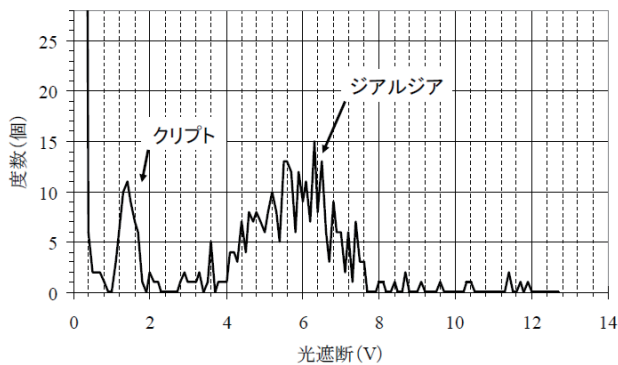


Fig. 6: Pulse height distributions of the light obscuration signals in the measurement of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts.

また、ジアルジア光遮断信号レベルは、クリプトと比較して広い範囲で分布していた。これは、ジアルジアが長径  $7\sim 10\ \mu\text{m}$ 、短径  $12\sim 15\ \mu\text{m}$  の楕円形の形状であることが<sup>2)</sup>光遮断信号レベルに反映されたことによると考えられる。

標識した混合試料の測定結果を Fig. 7 に示す。蛍光抗体を添加し  $15^\circ\text{C}$  で、50 分間標識したときに得られた混合試料の緑蛍光強度は  $8\ \text{V}$  付近で検出された。標識前後でクリプト、ジアルジアの光遮断信号レベルの変動は無かった。

今後、詳細を検討し、光遮断と緑蛍光で閾値を決定することで、クリプトとジアルジアの同時検出が可能と考えられる。

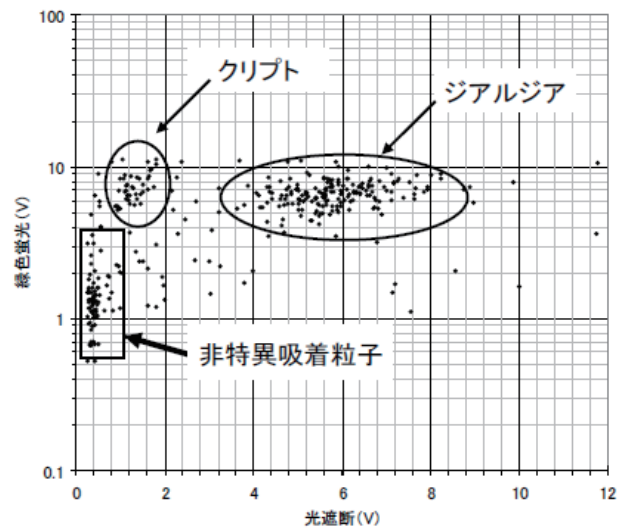


Fig. 7: Flowcytogram of light obscuration signal to fluorescence intensity of FITC-stained *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts.

## 4. 結論

光遮断フローサイトメーターを開発した。

PSL 標準粒子溶液にて基本性能を評価した結果、粒子径  $3\sim 15\ \mu\text{m}$  の測定範囲で粒子サイズと光遮断の信号との間に高い直線関係 ( $R^2=0.995$ ) を得ることができた。

さらに、不活化クリプトとジアルジアの同時測定を確認した。

今後、光遮断フローサイトメーターを実用化することを計画している。

## 参考文献

- 1) 北村友一、他 (1999) フローサイトメトリーセルソーターによる汚泥中のクリプトスポリジウムオーシストの迅速検出方法の開発、土木技術資料、41-9、p.32-37.
- 2) 金京柱、他 (2010) クリプトスポリジウム自動測定装置の開発、学会誌「EICA」、15 (2・3)、p.17-20.
- 3) 日本水道協会:クリプトスポリジウムー解説と実験方法ー、日本水道協会、(平成 15 年) .