

クリプトスポリジウムのオーシスト検出のための  
直接蛍光抗体法用試薬の開発

分担研究者 井関基弘

大阪市立大学医学部医動物学研究室

井 関 基 弘

#### 【目的】

水試料からクリプトスポリジウムのオーシストを検出するための直接蛍光抗体法用の試薬を国内で開発することにより、染色手技の簡素化、操作時間の短縮、低価格供給をめざす。

#### 【これまでの経過】

まず、*C. muris* のオーシストでマウスを免疫し、その脾細胞をマウスミエローマ細胞 (SP 2) と融合させて各種モノクローナル抗体を作成し、その中からオーシスト壁と強く反応するものを選択した。抗体は IgM で、これに FITC を直接標識した。

平成 9 年度に行なった予備実験では、この抗体は *C. parvum*、*C. muris*、*C. baileyi* のオーシストすべてに反応し、赤痢アメーバや大腸アメーバ、ジアルジアのシスト、イソスポーラ、サイクロスポーラ、アイメリアなどのオーシストとの交叉反応は見られなかった。また、米国から輸入して現在広く使用されている「コンボキット」の間接蛍光抗体法試薬では検出できない *C. meleagridis* のオーシストも検出可能であった。

水道水など、夾雑物の少ない水試料に *C. parvum* のオーシストを添加して、メンブレフィルター上で染色した場合の染色性や検出率は、「コンボキット」の間接蛍光抗体法と同等であった。しかし、河川水や底泥、下水など、夾雑物が多い試料に添加して染色した場合には、オーシストの蛍光強度が弱くなり、検出率は間接蛍光抗体法試薬に比較して低下することが判明し、また、河川水等に含まれるある種の藻類との交差反応も「コンボキット」と同様に認められた。

これらのことから、さらに試薬の改良を進めることが必要になった。

なお、この試薬は患者や感染動物の糞便からのオーシスト検出には使用可能なので、体外診断薬としての実用化も並行して検討を進めた。

#### 【平成 10 年度の研究経過と成果】

蛍光強度を強めることと、非特異反応を低減することを目的に試薬の改良を試みた。

まず、抗体 1 分子あたりに標識する FITC 分子の数を増やした試薬を作成し、評価試験を実施した。その結果、従来と同じ希釈濃度における蛍光強度は著しく強くなったが、ブロッキングの条件を変えても藻類との非特異反応は低減されなかった。

次に、*C. muris* ではなく、新たに *C. parvum* のオーシストを用いてモノクローナル抗体を作成し、それに FITC を標識した試薬を試作して評価を試みた。蛍光強度は十分であるが、藻類との非特異反応はまだ軽減されなかった。

そこで、非特異反応を減らすために、抗体分子の Fc 部位を切断した F'ab 抗体に FITC

を標識した試薬を作成した。現在、その試薬について適性希釈濃度の選定やブロッキングの条件、染色時間設定等を検討しながら評価を進めているところである。

以上

【研究報告】

1. 木俣 勲・宇仁茂彦・井関基弘・大賀嘉信：クリプトスポリジウムのオーシスト検出用蛍光抗体試薬の開発. 感染症誌, 72 (増), 192. (1998)
2. 井関基弘・木俣 勲・宇仁茂彦・高橋三佳・松本昭子・大賀嘉信・大庭千早：クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した直接蛍光抗体法試薬の評価. 第 54 回日本寄生虫学会西日本支部大会 (1998 年 11 月)
3. ISEKI, M., I. KIMATA, S. UNI, Y. OGA : Evaluation of a newly developed direct immunofluorescent assay kit for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water specimens. 第 68 回日本寄生虫学会大会 (1999.4)

分担研究報告書 10

水試料からのクリプトスポリジウム等の  
検出法の検討

分担研究者 黒木俊郎、遠藤卓郎

## 分担研究報告書

### 水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の 原虫性疾患の監視と制御に関する研究

#### 水試料からのクリプトスポリジウム等の検出法の検討

分担研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所 細菌病理部  
遠藤卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部  
研究協力者 古川一郎 神奈川県衛生研究所 食品獣疫部

水試料からのクリプトスポリジウム等の原虫の検出および鑑別に有効な手段として利用されるDAPI染色では、核が染色されないオーシストが多数観察される。そこで、DAPI染色により染色されるオーシストの割合を増加するための処理法を検討した。塩酸、エタノール、アセトン、DMSOによる前処理とDAPIの染色時間を変えて染色されるオーシストの割合を調べたところ、アセトン処理後の染色時間を30分とした方法での割合が43%でもっとも高かった。さらに、前処理の染色への効果の判定法としてフローサイトメータを用いる方法を検討した。

#### A. はじめに

水試料からのクリプトスポリジウム等の検出には、FITCを用いた蛍光抗体染色法とDAPI染色を併用して用いる。DAPIはオーシスト内のスポロゾイトの核を青白色に染めるため、クリプトスポリジウムオーシストの鑑別に非常に有効な染色法である。例えば、平成9年度の本研究報告書において、河川水からのクリプトスポリジウム検出法の検討について報告したが、DAPI染色を施さない場合のオーシストの確定率は16.4%であったのに対して、施した場合は65%を越えた。しかし、核を有するオーシストがすべて染色されるのではなく、微分干渉顕微鏡下でオーシスト内部にスポロゾイトが観察されても核が染色されない場合がしばしばある。このような場合、スポロゾイトの形態が不明瞭であれば鏡検の結果は推定となってしまう。そこで、オーシスト鑑別の補助的手段としての利用されるDAPI染色により染色されるオーシストの頻度を高めるための処理方法の検討を行った。さらに、各種処理法のDAPI染色に与える効果を、簡便、迅速、正確に行う方法を検討するために、フローサイトメータによる測定法を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用*Cryptosporidium*株

大阪市立大学医学部 井関基弘教授より分与いただき、SCIDマウスに感染させて継代している*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。マウス糞便中からショ糖浮遊法で分離・精製したオーシストを実験に用いた。

## 1. 各種処理法のDAPI染色への効果の検討

### 1) 処理方法

クリプトオーシスト浮遊液を1.8mlのマイクロチューブで13,000rpm、3分遠心後上清を捨て、以下の液を加えて10分間室温で静置した。

(1) 精製水	DAPI染色5分
(2) 精製水	DAPI染色30分
(3) 0.1N塩酸	DAPI染色5分
(4) 95%エタノール	DAPI染色5分
(5) アセトン	DAPI染色5分
(6) アセトン	DAPI染色30分
(7) 10倍希釈DMSO	DAPI染色5分
(8) 50倍希釈DMSO	DAPI染色5分
(9) 50倍希釈DMSO	DAPI染色30分

### 2) 染色

Crypto a Glo (Waterborne社) を用いて、通常の方法にてセルロースアセテートメンブランフィルター上で蛍光染色を行った。DAPI染色5分の場合は、蛍光染色終了5分前に10 $\mu$ g/mlのDAPI溶液100 $\mu$ lを添加した。DAPI染色30分の場合は、抗体液にDAPI溶液を添加し30分間静置して染色を行った。染色後、メンブランフィルターとフィルター上の試料を40%、80%および92.5%のエタノール・グリセリン液で脱水して、DABCOグリセリン液で封入して標本を作製した。B励起下でFITCによる緑色の特異蛍光を、UV励起下でDAPIによる青色の特異蛍光を鏡検した。

## 2. フローサイトメータによる染色効果の判定の試み

フローサイトメータを用いてDAPIによるオーシストの染色の有無を測定する方法について検討した。DAPI染色を以下の2条件で行った。

- (1) DAPIが最終濃度1 $\mu$ g/mlになるようにオーシスト浮遊液に加え、5分間室温で静置した。
- (2) DAPIが最終濃度3 $\mu$ g/mlになるようにオーシスト浮遊液に加え、75 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、その後室温で1時間静置した。

上記2法で染色を行ったオーシストを測定試料とした。

染色を施したオーシストからの蛍光の検出には、PAS-III型フローサイトメータ (Partec社) を用いた。15mW空冷アルゴンイオンレーザー (488nm) で励起し、UV用バンドパスフィルターを用いてDAPIの特異蛍光を検出した。試料の流速は約2 $\mu$ l/sとし、青色蛍光、前方散乱光および側方散乱光を測定した。

## C. 研究結果

### 1. 各種処理法のDAPI染色への効果の検討

塩酸、エタノール、アセトンおよびDMSOといった4種の化学物質を用いて前処理を行い、DAPIの染色時間を5分間と30分間の2条件で染色を行ったところ、表に示したような結果が得られた。このうち、エタノールとアセトンによる前処理でDAPI染色に対する効果が見られた。特に、アセトン中に10分間静置した後にDAPIの染色時間を30分とした場合は、スポロゾイトの核が染色される割合が40%ほどでもっとも高かった。

前処理を施すと、縫合線が開放して中身が空になったオーシストが多くなる傾向が見られた。すなわち、精製水で処理した場合は10%ほどであったが、処理をしたオーシストでは20%前後に見られた。

表. クリプトスポリジウムオーシストに対する各種処理法のDAPI染色への効果

処 理 法	count数	球 形 <sup>a</sup>		縫合線開放 <sup>a</sup>	
		無染色	染色	中身空	染色
精製水 DAPI5分間	268	214 (79.8) <sup>b</sup>	27 (10.1)	24 (9.0)	3 (1.1)
精製水 DAPI30分間	245	178 (72.6)	32 (13.1)	32 (13.1)	3 (1.2)
0.1N塩酸 DAPI5分	224	163 (72.8)	17 (7.6)	44 (19.6)	0
95%エタノール DAPI5分	239	144 (60.3)	50 (20.9)	44 (18.4)	1 (0.4)
アセトン DAPI5分	306	172 (56.2)	72 (23.5)	61 (20.0)	1 (0.3)
アセトン DAPI30分	230	83 (36.1)	89 (38.7)	48 (20.9)	10 (4.3)
10倍希釈DMSO DAPI5分	344	203 (59.0)	41 (11.9)	95 (27.6)	5 (1.5)
50倍希釈DMSO DAPI5分	277	191 (69.0)	35 (12.6)	47 (17.0)	4 (1.4)
50倍希釈DMSO DAPI30分	269	115 (42.8)	28 (10.4)	115 (42.8)	11 (4.1)

a : オーシストの形態

b : オーシスト数 (%)

## 2. フローサイトメータによる染色効果の判定の試み

DAPIが最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ になるようにオーシスト浮遊液に加え、5分間室温で静置して染色したオーシストは、フローサイトメータにより1832個がカウントされ、このうち20.85%がDAPIにより染色され、79.15%は染色されていなかった。

DAPIが最終濃度 $3\mu\text{g/ml}$ になるようにオーシスト浮遊液に加え、 $75^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱し、その後室温で1時間静置して染色したオーシストでは、95.47%が染色されていた。

### D. 考察

水試料中のクリプトスポリジウムの検査において、FITCで標識したクリプトスポリジウム特異抗体による蛍光染色でオーシストを染色するとともに、DAPI染色によりオーシスト中のスポロゾイトの核が染色される。通常、FITCの緑色に染色された $5\mu\text{m}$ ほどの粒子について、微分干渉装置により形態を観察してクリプトスポリジウムオーシストの鑑別が行われる。しかし、この観察が困難な場合には、DAPI染色による核の観察は当該原虫の鑑別に補助的な役割を果たしており、有用な方法と考えられる。しかし、試料中のすべてのオーシストがDAPIにより染色されるわけではない。そこで、DAPIにより確実に核が染色される方法を検討することは、水試料中のクリプトスポリジウムの検査を簡便に、しかも正確に行うために重要であると考えられる。

検査において追加される操作を最小限にしながら、簡単でしかも確実な前処理法を見いだすことを目指して各種処理法を検討した。今回用いた各種化学物質による前処理と染色時間の条件では、染色されるオーシストの割合は最も高い場合でも40%ほどであった。無処理の場合に比べて染色される割合は増加したが、十分な結果ではなかった。アセトン等による処理の時間を延ばすことで染色される割合を増やすことが可能であると考えられることができるが、有機溶媒による処理ではオーシストの縫合線が開放して、オーシスト壁だけの空のオーシストが増えることが危惧される。何らかの別の方法をさらに検討する必要があるものと思われる。

DAPI染色への前処理法の効果を試行的にフローサイトメータを用いて検討したところ、極めて短時間に多量の粒子を測定することが可能であった。染色条件やフローサイトメータの測定条件の設定等について、さらに実験を重ねて検討する必要があるが、フローサイトメータを用いた測定は迅速、簡便、正確といった利便性を兼ね備えており、今後の活用が期待される。

### E. まとめ

水試料からのクリプトスポリジウムの検出を行う場合、FITCの特異蛍光を有する径 $5\mu\text{m}$ 前後の粒子について、1) スポロゾイトが認められる、2) 縫合線が認められる、3) DAPI染色によりスポロゾイトの核が認められる、とした形態上のいずれかの特徴が見られれば、クリプトスポリジウムのオーシストと確定することができる。したがって、DAPI染色により



クリプトスポリジウムのオーシストが確実に染色されれば、鑑別する上で非常に有用である。しかし、実際には実験系ではオーシストの10%前後がDAPIにより染色されるに過ぎない。そこで、DAPIによりオーシスト内のスポロゾイトを確実に染色することが可能な、迅速で簡便な検査方法を確立するために、各種処理法を検討した。各種処理法のうち、エタノールとアセトンによる処理がDAPI染色に効果があることが認められた。また、効果の判定を顕微鏡下で行うと多大な手間と時間を要するため、フローサイトメータによる測定法を検討したところ、極めて迅速、簡便、正確に測定を行うことが出来た。処理法について、さらに有効な方法を探ることが必要であるとともに、フローサイトメータによる測定法の活用が期待される。

クリプトスポリジウム汚染調査のための  
オーシストに対する単クローン抗体作製と  
蛍光抗体染色への応用

分担研究者 遠藤卓郎

## 分担研究報告

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

分担研究課題：クリプトスポリジウム汚染調査のためのオーシストに対する単クローン抗体作製と蛍光抗体染色への応用

主任研究者 国包 章一 国立公衆衛生院 水道工学部 部長

研究概要 クリプトスポリジウムのオーシスト検査は、試料水の濃縮、夾雑物からの分離・精製、特異蛍光抗体染色、検鏡の行程に分かれる。蛍光抗体染色法の精度および感度に関しては用いる単クローン抗体の特異性に依存している。したがって、より特異性の高い単クローン抗体を得ることが、翻って検出感度を高めることにつながる。本研究においては *Cryptosporidium parvum* のオーシストを抗原としてマウスを免疫し、特異性の高い単クローンの作製を試みた。蛍光標識単クローン抗体の染色特性評価はフローサイトメーターを用いて解析を行った。今回、染色特性の良好な2クローンを手に入れることができた。そのうちの1クローンにつき、さらに原虫類6属11種、藻類5属5種に対する交差反応性の有無を検討した。今回選択された単クローン抗体は *C. parvum* と同属の *C. muris* と *C. baileyi* に対しては交差反応性を示したが、他の原虫類等には非特異反応を示すことはなかった。現在、多くの河川水試料に対して試験的に使用し、その実用性を評価している。

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部 室長

方 法：

クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium parvum*)：

1989年に東京都の某病院で健常人(31歳、女性)のクリプトスポリジウム感染者から分離された株で、現在まで実験動物(免疫不全マウス)に感染させ、継代維持した。感染マウスの糞便より密度勾配遠心沈殿法でオーシストを分離・生成した。

単クローン抗体作製：

精製オーシストを凍結・融解を繰り返し破壊して得られた標品と、それをさらに超音波破碎した標品を等量混合し、Freund's Complete Adjuvant、あるいはIncomplete Adjuvant (DIFCO)と混合・乳化したものを抗原とした。

初回免疫は4週齢のBalb/cマウスに対して筋肉および腹腔に接種した。2週間後に追加免疫を、さらに2週間後(初回から1ヵ月後)に最終免疫を行った。抗原量は全量でオーシスト $10^6$ 個/headとし、初回：追加：最終免疫=4：2：1の割合に分割して接種した。

最終免疫から 3 日後に脾臓を摘出し、ポリエチレングリコール融合法により脾細胞とミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653, ATCC No.CRL.1580) と融合させ、培養した。培養上清中に分泌された抗体はオーシストの超音波破碎抗原を用いて EIA 法にて一次、次いで *C. parvum* オーシストの乾燥・塗抹標本を抗原として用いた間接蛍光抗体法により反応特性を検定した。特異抗体産生細胞のクローニングは限界希釈法により行った。得られた単クローン細胞を培養・増殖し、次いで Balb/c マウスの腹腔に移植して腹水を得た。ハイドロキシアパタイトカラムを用いて腹水から免疫グロブリン分画を精製し、単クローン抗体を得た。

蛍光色素 (FITC; fluorescein-5-isothiocyanate) 標識単クローン抗体作製とその染色特性の比較:

単クローン抗体の蛍光標識は定法に沿って以下の要領で行った。得られた単クローン抗体はそれぞれ炭酸緩衝液 (pH9.5) で透析・置換し、これに蛋白量の 1/10 量となるように FITC Isomer 1 (Nordic Immunology 社) を添加し、静かに攪拌しながら 4℃で一晩反応させた。次いで、セファデックス G-25 のカラムを通し、蛍光標識画分を分画・収集し、直接蛍光抗体法の染色試薬とした。得られた蛍光抗体試薬を用いてオーシストを染色し、染色性の良否をフローサイトメーターにより前方散乱光 (FSC) 側方散乱光 (SSC) および FITC 強度 (Green) の測定を中心に解析した。

単クローン抗体の特異性の検定:

上記の方法により得られた単クローン抗体のうち、最も良好な染色特性を示すクローンを選択し、表 1 に示す原虫類の (オー) シスト壁、または藻類などに対する交差反応の有無を検定した。原虫類等をスライドグラスに塗抹・乾燥し、蛍光抗体染色を行った。交差反応の有無を顕微鏡下で観察した。

表 1 交差反応に用いた原虫類等の生物種

	学 名
原 虫	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>C. muris</i> , <i>C. baileyi</i> <i>Isospora belli</i> , <i>Cyclospora cayetanensis</i> , <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maaxima</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>G. muris</i> , <i>Entamoeba coli</i> , <i>E. histolytica</i>
藻 類	<i>Clorella ellipsoidea</i> , <i>Oocystis minuta</i> <i>Chlorococcus macrostigmatum</i> <i>Stichococcus obliquus</i> , <i>Chlococcum botryoidea</i>

## 結 果

現在までにクリプトスポリジウム・オーシスト壁に対する特異抗体産生クローンが 9 ク

ローン得られた。これらの細胞が産生する免疫グロブリンのクラスはすべて IgM クラスであった。単クローン抗体に対して定法に従って蛍光 (FITC) 標識を行った。得られた標識抗体を用いて *C. parvum* のオーシストに対する染色特性をフローサイトメーターにより解析した (図 1~5)。

図 1 に C-1 クローン由来の抗体の染色特性を示した。図 1a は試料中の染色粒子 (オーシスト) の FITC 蛍光強度 (Green) によるヒストグラムである。幅の狭い (鋭い) ピークが 10、20、30、40 (X 軸: 単位は任意) の位置に周期的に 4 本認められる。このことから、標本中には最も多い 10 の染色強度を持つ粒子のほかに、その 2 倍、3 倍および 4 倍の蛍光強度を示す粒子が存在することがわかる。また、図 1b には X 軸に前方散乱光 (FSC)、Y 軸には FITC の蛍光強度を取り、両者の相関を示した。FSC は粒子の形状、特に粒子サイズを表している。図では X 軸、Y 軸ともに 10 の位置からそれぞれ 20、30、および 40 の位置に直線的に粒子塊が分布している。すなわち、蛍光強度が 2~4 倍となるのに相関して粒子径 (FSC) も 2~4 倍と比例的に増大することがわかる。すなわち、20、30、および 40 の位置に分布する粒子はオーシストが 2 個~4 個集合してできた凝集塊である。また、図 1b においては周期的に分布する粒子塊のほかに僅かな粒子が散在する程度で、非特異反応がきわめて少ないことが検証された。

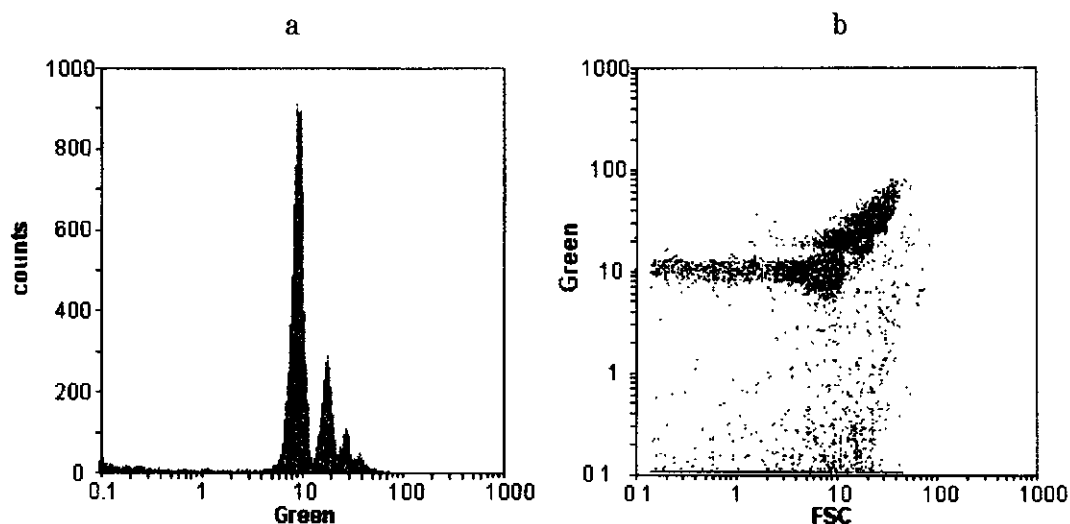


図 1 フローサイトメーターによる C-1 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
**a**: 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。10、20、30、40 と蛍光強度を持つ粒子の存在が示されている。**b**: 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。蛍光強度が 2 倍から 4 倍に増加するに従い、粒子サイズも 2 から 4 倍に増加する関係が示されている。

図 2 には C-5 クローン抗体による染色特性を示した。本抗体も C-1 クローン同様に優れた染色特性を示した。FITC に染色された粒子は周期的に分布する鋭いピークとして検出され

る。その違いは図 2b に示すように非特異的に染色された粒子数が C-1 クローン抗体に比べてわずかに多い傾向が認められる程度であった。これらの結果より、C-1 および C-2 クローン抗体を用いて作製された蛍光抗体試薬はともに優れた染色特性を持つことが示された。

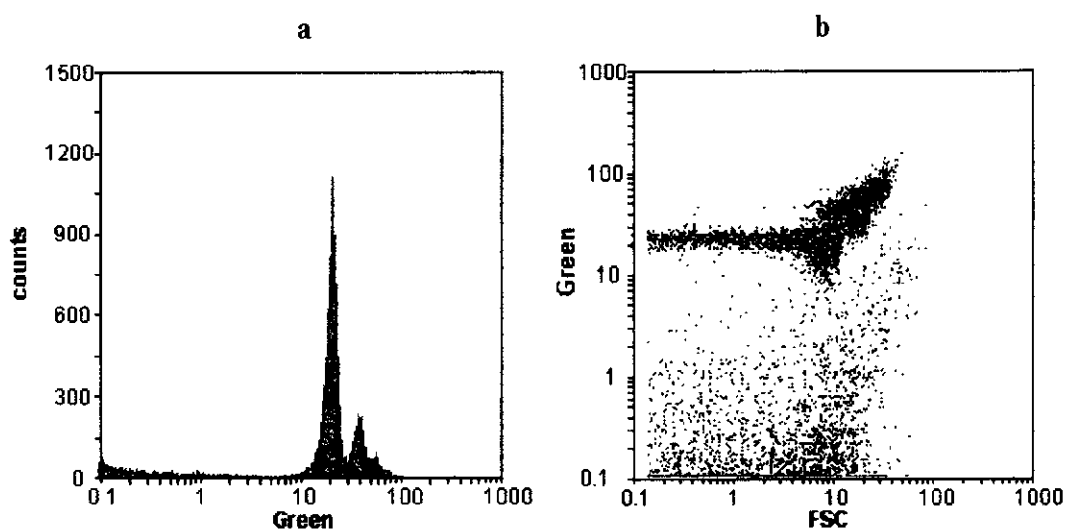


図 2 フローサイトメーターによる C-5 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。

a : 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。

b : 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。

一方、図 3~5 には C-2、C-4 および C-9 クローンが産生する抗体を用いて行った染色結果である。C-2 クローン抗体で染色した場合にはオーシスト以外の粒子が非特異的に染色されていることが観察される (図 3)。図 3a には鋭いピークが観察できず、幅の広いピークが 1 つ見られるのみで、このピークの中に周期的に現れるはずの他のピークが埋没している。また、非特異反応を示す多数の粒子が検出されている。図 4 には C-4 クローン抗体による染色結果を示した。ここでは染色された粒子の蛍光強度は高いものの、やはりピークの幅が広がってしまったために他のピークとの分別ができなかった。図 5 は C-9 クローン抗体を用いた染色結果であるが、染色強度が弱く、ピークの裾が広がっていること (図 5a)、非特異的に染色された粒子が多かった (図 5b)。これらの結果を総括すれば、C-1 および C-5 クローン由来の抗体に比べて C-2、C-4、および C-9 クローンの産生する抗体の染色特性は低いものと判断された。

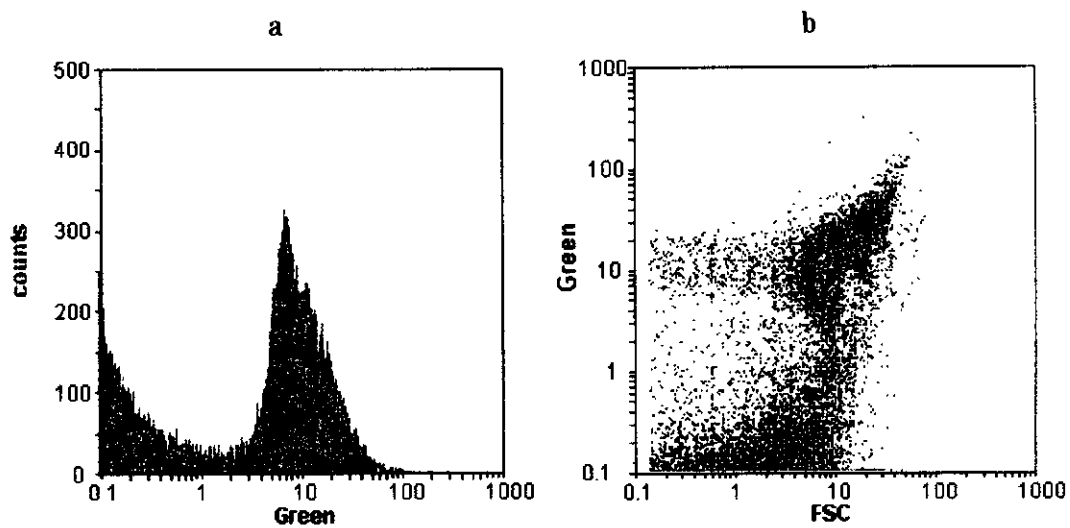


図3 フローサイトメーターによる C-2 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
 a : 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。  
 b : 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。

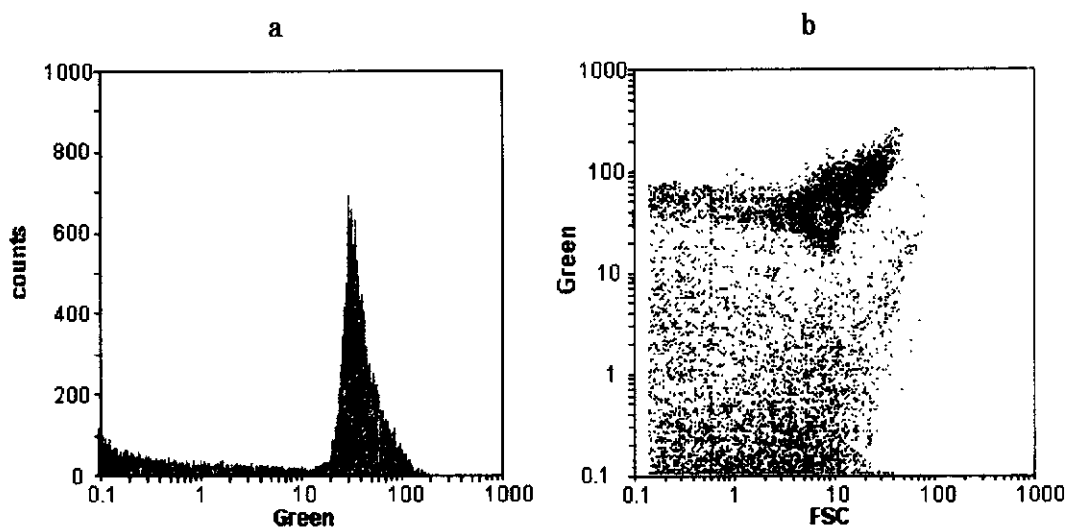


図4 フローサイトメーターによる C-4 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
 a : 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。  
 b : 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。

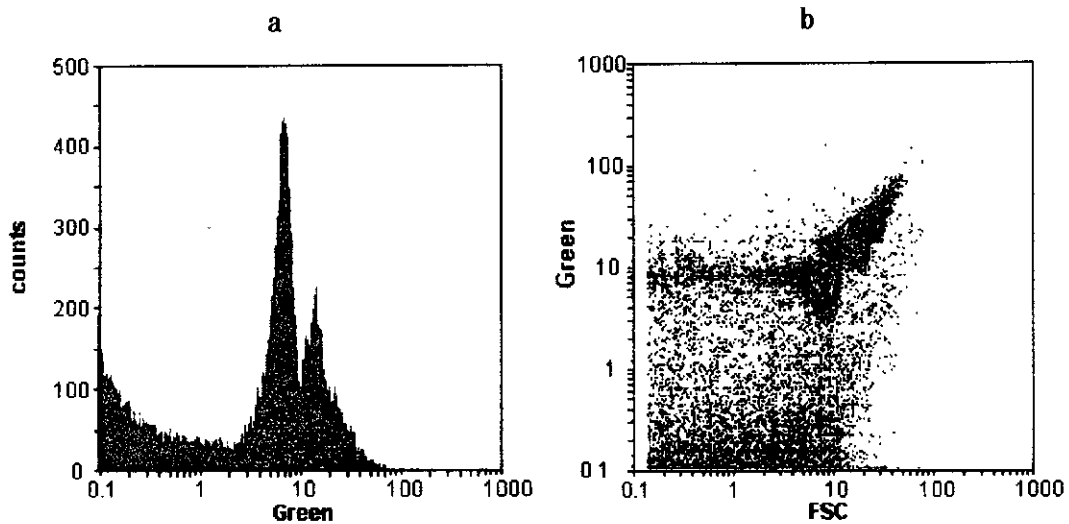


図5 フローサイトメーターによる C-9 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
 a : 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。  
 b : 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。

#### 交差反応の確認:

フローサイトメーターによる染色特性の解析から、非特異的な吸着が最も少なく(図 1a、b)、FITC 蛍光強度のピーク幅が狭い (高い特異性) C-1 クローン抗体を選択し、ヒトあるいは動物の寄生性原虫類 6 属 11 種 (*C. muris*, *C. baileyi*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *Giardia lamblia*, *G. muris*, *Entamoeba coli*, *E. histolytica*) の (オー) シスト、および 5 属 5 種の藻類に対して交差反応の有無を検討した。その結果、C-1 クローンは *C. parvum* 以外に同属の *C. muris* および *C. baileyi* に対して交差反応を示した。その染色強度は *C. parvum* での結果に比べて明らかに微弱であった。一方、その他の原虫類、あるいは藻類に対しては交差反応は認められなかった。また、河川水にクリプトスポリジウム・オーシストを添加したものを試料として行った染色試験でもおおむね良好な成績を得ており、実用化が期待できるものと判断された (図 6)。

#### 考 察

本研究では得られた標識単クローン抗体の染色特性を評価する目的でフローサイトメーターによる解析を試みた。本解析法では非特異的反応を半定量的に図示できることから、得られた単クローン抗体の実用性についての評価を定量的かつ視覚的に行うことができた。当面、抗-オーシスト抗体産生細胞が 9 クローン得られたが、その中で C-1、次いで C-5 クローンの染色特性が優れていた。そこで、C-1 クローンに関してさらに他の原虫種や藻類に



対する交差反応性を検定した。本抗体は分類学上 *C. parvum* と同属の *C. muris* および *C. baileyi* には交差反応を示し、*C. parvum* と同様の染色結果を得た。しかし、その他の原虫種や藻類に対しては交差反応を示さず、クリプトスポリジウムの検出試験に使用可能と判断された。また、河川水にオーシストを添加した試料を用いた染色試験でも良好な結果が得られている。今後は、水試料を用いた試験を幅広く行い、実用化の可能性について検討する。また、製品化の可能性についても検討中である。今後とも、より多種類の抗体産生クローンの分離と、染色特性の高い抗体の獲得を平行して行う予定である。

水道水におけるクリプトスポリジウム等の原虫類汚染防止対策として、すでに病原体の検出に関する試験が広く実施されている。現行の試験法は《試料水の濃縮》⇒《オーシストの分離・精製》⇒《蛍光抗体染色》⇒《顕微鏡観察》の手順で行われている。オーシストの確認には単クローン抗体を用いた蛍光抗体染色が行われ、顕微鏡下で蛍光染色された粒子の検出、次いで微分干渉顕微鏡による内部形態観察による確認が行われる。すなわち、この試験方法の精度は蛍光染色に用いる単クローン抗体の特異性に大きく依存している。それにもかかわらず、目下のところ国産の蛍光抗体染色試薬は限られており、ほとんどが輸入品に依存している現状である。

特異性が高く、オーシスト壁表面の異なった抗原を認識する複数の単クローン抗体を入手することはオーシストを試験方法の変更・改良には必須の条件である。たとえば、異なった 2 種類の単クローン抗体を用いて染色し、両方の抗体で蛍光染色された粒子をオーシストとして特定する方法が考えられる。それぞれの抗体がある程度の非特異反応を示しているとしても同一粒子（異物）が両方の抗体に非特異的に反応する確立は著しく低いものと期待されるからである。微分干渉顕微鏡観察を行うことなく蛍光抗体染色のみでオーシストの特定が可能となれば、検査時間の短縮やルーチン化に大きく貢献できる。ちなみに、このような多重染色は、蛍光顕微鏡観察のみならずフローサイトメーターによる測定にも応用可能で、機械化への可能性も模索したい。

分担研究報告書 1 2

家畜等及びと畜場搬入動物の  
クリプトスポリジウム汚染実態調査

分担研究者 遠藤卓郎

## 分 担 研 究 報 告

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

### 分担研究課題：家畜等及びと畜場搬入動物のクリプトスポリジウム汚染実態調査

主任研究者 国包 章一 国立公衆衛生院 水道工学部 部長

研究概要：平成9年12月から平成10年3月にかけて、関東以北を中心とした家畜（ウシ・ブタ）および愛玩動物（イヌ、ネコ）におけるクリプトスポリジウムの汚染実態調査を行った。ウシに関しては農場飼育およびと畜場搬入牛を対象とした。ブタはすべてと畜場搬入豚を対象とした。また、イヌ、ネコに関しては動物愛護センターに収容された個体から試料を得た。

検査法はショ糖浮遊法により集嚢子し、得られた試料に対して蛍光抗体染色を行った。観察は蛍光顕微鏡下で特異蛍光を発する粒子を検出し、微分干渉顕微鏡下で内部構造の確認を行った。

汚染実態の概略は、ウシで～20%（41/205）、イヌで～0.8%、ネコで～5.4%であった。今回の調査ではブタからの検出はなかった（0/80）。

東北地方の某県下の農場の汚染実態調査によれば、汚染は31農場のうち7農場に限られていたことから、今後の対策の一環として、積極的に汚染農場を特定し、そこでの農場の衛生管理や動物の淘汰を含めた集中的な清浄化対策が望まれよう。また、このような措置水源汚染対策として経済的にも効果的であると考えられる。

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部 室長

## 材 料 お よ び 方 法

### 調 査 期 間：

平成9年12月から平成10年3月にわたり、経済動物であるウシ（仔ウシを含む）、豚と愛玩動物の犬、猫におけるクリプトスポリジウムの感染率調査を行った。調査対象としたウシは飼育中のものと、と畜場に搬入されたものを対象とした。ブタはすべてと畜場搬入豚を調査した。イヌ、ネコは動物愛護センターに収容された動物を中心に調査した。

### 検 査 方 法：

ウシ・ブタに関しては直腸便を約100g、イヌ・ネコに関しては適当量を採取した。各々の動物につきわかる範囲で体調や便の性状などを記載した。検査の手技は以下のとおりである。

1. 直腸便約1gを10mlのスピッツ型の遠沈管にとる。
2. 50%ショ糖液（ショ糖500gを蒸留水650mlに溶解したもの）を適当量（5ml程度）加え、ミキサーでよく混合する。ついで10ml程度になるようにショ糖液を追加する。
3. 150メッシュの粗い金属製メッシュのろ過により糞便中の粗大ゴミを除去する。ろ液を新しい遠沈管に移し、ショ糖液を適当量加え、十分に混和する。
4. さらに、表面張力で液面が盛り上がるまで静かにショ糖液を加え、室温で20分静置する。
5. ショ糖液の表面に金属のループ（直径5mm程度）を接触させ、浮遊した粒子を回収する。
6. その一部をスライドグラスに取り、顕微鏡観察する。
7. 残りの試料を磷酸緩衝液で遠心洗浄し、沈渣に対して蛍光抗体染色（Waterborne社）を行う。

8. 蛍光顕微鏡および微分干渉顕微鏡観察により得られた沈渣内のオーシストを検出する。

## 結 果

### 経済動物における汚染調査：

31農場において仔ウシを含む飼育ウシ205頭を調査し、7農場(22.6%)、41頭(20.0%)にクリプトスポリジウム・パルバム(*C. parvum*)の感染が認められた(表1)。このうち感染牛は1ヵ月齢未満の仔ウシに集中しており、39頭中21頭(53.8%)に感染が認められた。1ヵ月齢を超えると、感染牛は166頭中20頭(12%)にまで低下した。

表1 某県下の農場およびその飼育牛における*C. parvum*の汚染調査結果

	検査数	陽性数	陽性率(%)
農 場	31	7	22.6
対 象 牛	205	41	20.0
1ヵ月齢以上	166	20	12.0
1ヵ月齢未満	39	21	53.8

*C. parvum* 以外にクリプトスポリジウム・ムリス(*C. muris*)の感染は2農場(6.5%)、7頭(3.4%)のウシで確認された(表2)。*C. muris*の感染は1ヶ月齢未満の仔ウシには認められず、感染牛はすべて1ヶ月齢以上であった。また、牧場によっては飼育動物に汚染がまったく認められない例も見られた(表3)。

表2 某県下の農場およびその飼育牛における*C. muris*の汚染調査結果

	検体数	陽性検体数	陽性率(%)
農 場 数	31	2	6.5
ウ シ	205	7 <sup>1)</sup>	3.4

1) 1ヵ月齢以上

表3 某県下のG農場におけるクリプトスポリジウム汚染調査結果

	検査頭数	陽性頭数
1ヵ月齢以上	159	0
1ヵ月齢未満	6	0
検査総数	165	0

一方、と畜場2施設において搬入牛の汚染調査を行ったが、そのうちの1施設では搬入された成牛148頭のうちの2頭から*C. muris*が検出された(表4)。参考として掲載した資料においても同様に成牛では*C. muris*の感染に限られることが示されている。その一方で、*C. parvum*は搬入仔ウシ5頭のうち1頭から検出され、ここでも*C. parvum*が幼牛に強い親和性を持つことが示された結果となっている。