

り省略した。

従来、クリプトスポリジウム等の病原性微生物の水試料からの濃縮にはディスクフィルター法やカプセルフィルター法、遠心沈殿法などが適用されているが、手間がかかる、コストがかかるなどの問題があり、満足できるものではない。今回開発した装置は小型・軽量・低コストであり、操作も簡単なので採水現場での使用が可能で、多量の水試料を検査室まで搬送する必要がなくなる。また、同一容器を用いて遠心操作やシヨ糖浮遊法による濃縮ができる利点を有する。今回の試験では、添加したオーシストの回収率は精製水でも濁度水でも80%以上を示し、本装置の有効性が証明された。早期に商品化して日常の水質検査に適用できるようにしたい。

実際の検査方法として、濃縮・補足物を最初に加熱する工程を加えた。これにより病原性微生物を不活化して検査室内感染の防止するとともに、オーシストのDAPI染色性を高めることができる。また、4分画について個々に染色して鏡検する手技を採用した。この方法では鏡検するフィルターの枚数は増えるが、抗クリプトスポリジウム抗体および抗ジアルジア抗体による蛍光染色、あるいは両原虫に対応する免疫磁気ビーズ法では検出できない他種の病原性微生物（サイクロスポーラのオーシストやエキノコックスの虫卵など）もPTFE膜上であれば鏡検による検出が可能になる。

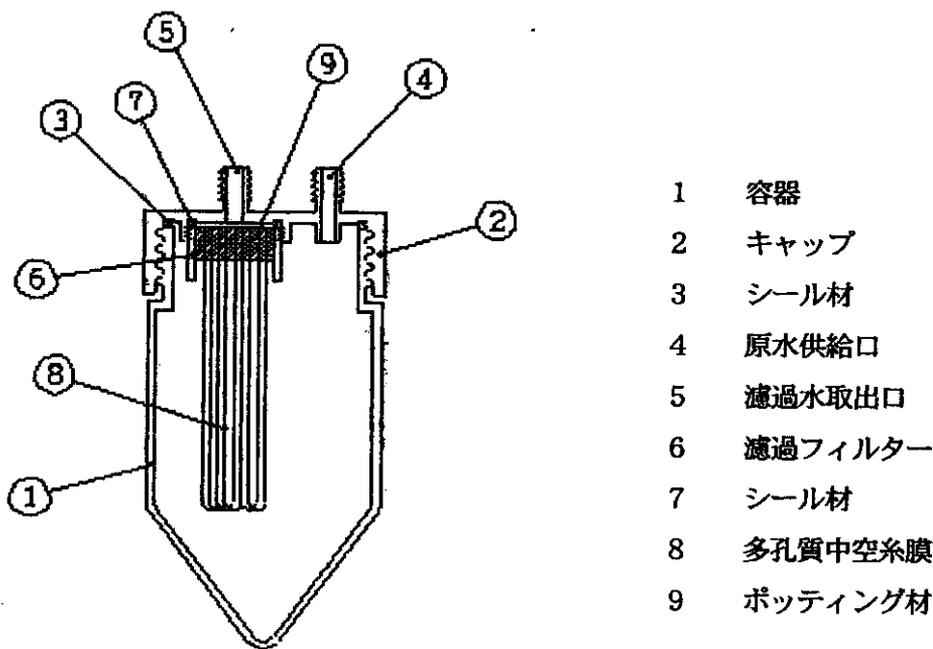


図1

## 研究発表

### 1. 論文

- ・ Kanjo Y, Kimata I, Iseki M, Miyanaga S, Okada H, Bannno C, Matsumoto M, Shimada Y (2000) : Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. *Wat Sci Tech*, 34 (4), (in press)
- ・ Wu Z, Nagayo I, Matsuo A, Uga S, Kimata I, Iseki M, Takahashi Y (2000) : Specific primer for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molecul Cell Prob*, 200 (14), (in press)
- ・ Yamamoto N, Urabe K, Tkaoka M, Nakazawa K, Goto A, Kobayashi S, Haga M, Fuchigami H, Kimata I, Iseki M (2000) : Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *J J A Inf D*, 74 (6), (in press)
- ・ 木俣 勲、井関基弘、村上 隆 (1999) : 水中に存在する *Cryptosporidium* オーストの電子制御装置による除去と不活化. *水処理生物学会誌*, 35 (1), 59-66.
- ・ 増田剛太、味澤 篤、根岸昌功、今村顕史、井関基弘、遠藤卓郎 (1998) : 下痢便からのクリプトスポリジウムの検出, 駒込病院での成績. *臨床寄生虫学会誌*, 10 (1), 72-74.

### 2. 学会発表

- ・ Iseki M, Kimata I, Uni S, Oga Y (1999) : 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.
- ・ Kanjo Y, Kimata I, Iseki M, Miyanaga S, Okada H, Bannno C, Matsumoto M, Shimada Y (1999) : Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. IWSA/IAWQ/I.O.A Conference; Minimising Risk from *Cryptosporidium* and other Waterborne Particles, Paris, April 19-22, 1999.
- ・ 木俣 勲、井関基弘、浦上逸男 (1999) : 紫外線照射によるクリプトスポリジウムのオーストの不活化. 第55回日本寄生虫学会西日本支部大会.
- ・ 宮永聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) : マウス感染試験による *Cryptosporidium parvum* のオースト不活化効果評価. 第33回日本水環境学会.
- ・ 松本みどり、島田 豊、河野 孝、貫上佳則、宮永聡子、坂野千絵、木俣 勲、井関基弘 (1999) : オゾン及び O<sub>3</sub>/UV 併用処理による *Cryptosporidium* の不活化効果. 第50回全国水道研究発表会.
- ・ 宮永聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) : 動物感染試験による *Cryptosporidium parvum* の不活化評価. 第50回全国水道研究発表会.
- ・ 国友新太、佐々木賢一、五十嵐千秋、黒川憲一、鴻野 卓、木俣 勲、井関基弘 (1999) : 加圧処理によるクリプトスポリジウムの不活化. 第50回全国水道研究発表会.
- ・ 宮永聡子、坂野千絵、貫上佳則、木俣 勲、井関基弘、松本みどり、島田 豊、河野 孝 (1999) : *Cryptosporidium parvum* のオースト不活化評価方法. 第36回日本下水道研究発表

会.

- ・松本みどり, 島田 豊, 河野 孝, 貫上佳則, 宮永聡子, 木俣 勲, 井関基弘 (1999): 促進酸化処理による *Cryptosporidium* オーシストの不活化効果. 第36回日本下水道研究発表会.
- ・Wu Z, Nagayo I, Matsuo A, Uga S, Kimata I, Iseki M, Takahashi Y (2000): Specific primer for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. 第69回日本寄生虫学会.
- ・Kimata I, Iseki M, Urakami I (2000): Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ultraviolet irradiation and methods suitable for evaluation of effects. 第69回日本寄生虫学会.
- ・坂本照正, 木俣 勲, 井関基弘, 八木正一 (2000): 病原性微生物の検査方法に関する検討—新開発カートリッジによる多種同時検出へのアプローチ. 第51回全国水道研究発表会.

### 3. 著書

- ・井関基弘 (1999): クリプトスポリジウム症—最新の動向と治療. 長谷川修ら編, 治療トピックス100, 南山堂, P. 398-403.
- ・井関基弘, 木俣 勲 (1999): 新興原虫感染症—クリプトスポリジウム症とサイクロスポーラ症. 中山宏明ら編, 現代感染症事情, 医歯薬出版, p. 398-403.
- ・井関基弘 (1999): クリプトスポリジウム症. 大鶴正満ら監修, 日本における寄生虫学の研究 (6), 目黒寄生虫館, p. 571-585.
- ・井関基弘 (1999): クリプトスポリジウム症とサイクロスポーラ症. 竹田美文ら編, エマージングディゼイズ, 近代出版, p. 335-372.
- ・井関基弘 (1999): クリプトスポリジウム症. 日本医師会編, 感染症の診断・治療ガイドライン, 医学書院, p. 108-111.
- ・井関基弘 (1999): クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 山崎修道編, 感染症予防必携, 日本公衆衛生協会, p. 103-105, 128-130.
- ・井関基弘, 木俣 勲 (2000): クリプトスポリジウム症. 柴孝也編, 感染症治療ガイド, 南山堂, p. 534-545.

### 4. 総説

- ・井関基弘, 木俣 勲 (1999): クリプトスポリジウム症—免疫不全患者における病態と治療の問題点. 日本医事新報, No.3925, 7-13.
- ・井関基弘 (1999): 免疫不全患者における慢性クリプトスポリジウム症と免疫療法の可能性. 感染・炎症・免疫, 29 (1), 44-45.
- ・井関基弘, 木俣 勲 (1999): クリプトスポリジウム症. 検査と技術, 28 (2), 108-114.
- ・井関基弘, 木俣 勲 (1999): クリプトスポリジウム症. *Medical Practice*, 16 (11), 1793-1795.

分担研究報告書 5

クリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出方法の  
改良について

分担研究者 遠藤卓郎、黒木俊郎、平田 強

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）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

クリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出方法の改良について

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部  
黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所 細菌病理部  
平田 強 麻布大学環境保健学部  
協力研究者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部  
野原 郁子 水道技術研究センター  
泉山 信司 池田理化つくばテクニカルセンター

研究要旨：本研究では水道水中のクリプトスポリジウム等原虫類検出方法の検討・改良を行った。本検査は試料水の濃縮、オーシスト類の分離・精製、特異蛍光抗体染色、鏡検の行程に分かれる。そこで、これらの工程のうち特に重要な試料水の濃縮および検査の特異性を決定付ける蛍光抗体染色について検討を加えた。また、検査法の自動化や即時性を高めるためにフローサイトメーターによるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法を検討した。

試料水の濃縮方法として現在提案されている方法はもっぱらフィルターによるろ過濃縮である。しかしながら、この方法では濃縮試料のフィルターからの回収というステップが必須となり、化学薬品によるフィルターの溶解など本来的には避けることが望まれる工程が含まれている。また、濃縮に要する時間が長く、検査法全体への影響は無視できないものである。本研究で検討した連続ローター法は高い回収率が見込まれ、作業時間の短縮も期待できるものであることが示された。問題点としては、市販品に適当なローターがなく、試作ローターの市販化が必須であることと、設備に際しては初期投資が必要な点である。

蛍光抗体試薬に関しては、現在市販されている試薬のほとんどが輸入品であるという事態が続いている。国産の試薬の開発に向けて単クローン抗体の開発を行った。また、単一の単クローン抗体による染色では検出された粒子に対して別の方法（微分干渉顕微鏡）での確認作業が必須となっている。ところが、微分干渉顕微鏡による観察は技術的に難しく、かなりの経験を有するという問題が指摘されている。これを解消すべく、蛍光抗体法の精度を高めるために二重染色法の検討を行った。二重染色法では蛍光顕微鏡下で2種類の抗体によるオーシストの確認ができるため、その精度が著しく向上する。さらに、非特異反応によって染め出される粒子を排除することにも有効であることが示された。加えて、二重染色法はフローサイトメーターへの応用が可能で、その解析精度を飛躍的に向上させることができた。将来的には検査法の自動化に有力となる方法であるものと期待される。

なお、本研究の成果であるオーシストと紛らわしい植物プランクトンの鑑別方法についてはすでに暫定対策指針の検査法の補遺として厚生省を通じて関係機関に通達されている。

A. 研究目的

水道水におけるクリプトスポリジウム等の原虫類汚染はわが国の水道水の安全対策に新たな問題を提起している。現在、水道事業体ではクリプトスポリジウム当の原虫汚染調査が行われているが、迅速で信頼性の高い検査方法が望まれている。ところで、本検査は試料水の濃縮、オーシスト類の分離・精製、特異蛍光抗体染色、鏡検の行程に分かれる。従って、本検査法の改良に際しては工程ごとの精度や迅速

性を個々に検討し、それらを積み上げていく必要がある。その中で、濃縮工程が時間的にも精度的にも検討を有するところとなっている。本研究では連続ローターを用いた濃縮法を検討した。また、蛍光抗体染色法の精度および感度は用いる単クローン抗体の特異性に依存しており、試験方法全体に与える影響は極めて大きい。この点に関しては、特異性の高い単クローン抗体を得ることが検出感度を高めることにつながる。従って、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詳細に解析した。得られた単クローン抗体については原虫類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。

単クローン抗体は単一の抗原を認識することから原理的に非特異反応は起きないものとされているが、実際的には如何なる抗体でも非特異反応が避けられないことが経験上知られている。そこで、精度を向上するための工夫としては2種類の単クローン抗体を用いた二重染色法を検討した。オーシストであることの検証を単一の単クローン抗体で行うのではなく、複数の抗体で行うことで精度を高めるといえるものである。また、この作業では個々の単クローン抗体がそれぞれ非特異反応を示しても同一の異物に対して共通して非特異反応を起こす確立はきわめて低いことが想定されることから、二重染色された粒子を選択的に観察することで非特異反応を示す粒子を排除することができるものと期待される。

## B. 研究方法および成果

### 1. 試料水の濃縮のための連続ローターの試験製造

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、検鏡の行程からなる。このうち、試料水の濃縮行程は一般的にはフィルターろ過、あるいは遠心濃縮が用いられる。それぞれに長・短両面を有するが、遠心沈殿法は試料水中の濁質の多寡に影響されない点と、不要な低比重の微粒子を当初から排除することができるという利点がある。しかし、通常の遠心沈殿機では一度に多量の試料水を処理することができず、遠心操作を繰り返して長時間を要する決定的な欠点がある。連続遠心機は運転中の遠心機に連続的に試料を注入することができる

よう考案されたもので、連続ローターと称する特有の形状のローターと試料水の注・排水口が装備された装置である。市販の装置は多量の沈渣を回収する目的で設計されており、水道水中のオーシスト等を対象とした試料の濃縮には不向きとなっている。本研究では連続ローターの小型化を目指して改良を加えた。

ところで、遠心機内の質量  $m$  の粒子に負荷される遠心力  $F$  ( $\text{gcm/sec}^2$ ) は次式で表される。

$$F = m \omega^2 x = 1.117 \times m n^2 x \times 10^{-5} g \quad \dots (1)$$

ここで、 $n$  は1分間の回転数 (rpm)、 $x$  は中心からの距離 (cm)、 $\omega$  は回転数 ( $\text{rad/sec}$ )  $= 2\pi n/60$  である。仮に、半径 10cm のローターで1分間 10,000 回転 (10,000rpm) させれば 11,000 g の遠心力が得られる。

連続ローターの場合の回転負荷時間はローター内の滞留時間となり、試料水の注入速度に依存 (反比例) する。従って、連続ローターの小型化に際しては、回転半径が小さくなることと内容積 (ローター内に貯えられる液量) が小さくなることで試料の滞留時間が短くなるという2点を想定し、設計思想に反映させる要があった。表1、2は通常の遠沈機および連続ローターを用いた運転状況と遠沈上清の濁度との関係を示したものである。当初の試作品として作製した連続ローターの規格は内容積が 80mL、最大半径が 5.8cm で、最大回転数 17,000rpm 耐用に設計した。ちなみに、このローターを用いて試料水を 333ml/分、250ml/分、167ml/分 (10L の試料水を遠心濃縮するのに要する時間がそれぞれ 30分、40分、60分に相当) で注入した場合、試料水がローター内で遠心力の作用を受けている平均の時間は計算上 0.24分、0.32分、0.48分と計算される。これらの表に示された濁度と  $F$  値の関係を同一グラフ上にプロットしたものが図1である。

表1 スィング型ローターを用いて得られた遠沈上清の濁度

運 転 条 件 (g/min)	濁 度		
	3min	6min	10min
130	0.80	0.60	0.50
500	0.31	0.20	0.16
1100	0.18	0.11	0.09

表2 連続ローターを用いて得られた遠沈上清の濁度

運 転 条 件 (g/min)	濁 度		
	0.24 min	0.32 min	0.48 min
1400	0.90	0.72	0.52
2700	0.69	0.49	0.41
5600	0.40	0.29	0.21

図1 遠心力と遠心時間の積算値と濁度

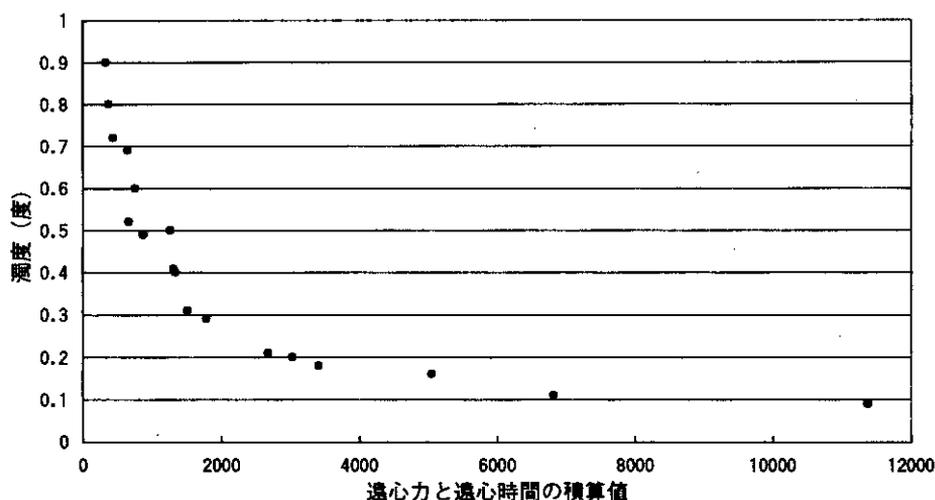


表3 遠心機の遠心力とオーシストの回収率

回 転 数 (rpm)	遠 心 力 (g/min)	添加オーシスト数 (個/ml)	回収率 (%)
1000	112	$1.8 \times 10^4$	64
1500	250	$2.3 \times 10^4$	82
2000	450	$2.5 \times 10^4$	89
2500	700	$2.3 \times 10^4$	82
3000	1005	$2.4 \times 10^4$	86

理論的  $F$  値と上清濁度との関係は同一曲線上に分布していることが示され、連続ローターにより負荷される遠心力は上記の(1)式で計算できることが示された。

次いで、クリプトスポリジウムオーシストの沈降に要する  $F$  を通常の遠沈機で求め、計算上これに合うように連続ローターの運転条件を設定してその可否を検証した。以下の表はスイング式ローター(最大半径11cm)を用い、各回転数(rpm)10分間運転をして得られた結果である。

遠心力が130gでは、オーシストの回収率は64%と低率であったが、280g以上の遠心力で80%以上の回収率を得ることができた。河川水などではオーシストが水中の軽い濁質に付着している可能性もあることから、安全を見越して280g(1,500rpm)よりも大きい遠心力を必要とするものとした。この条件を(1)式に代入して下記の値を得る。

$$F_1 = 1.117 \times mn^2 \times 10^5 = 1.117 \times 1,500^2 \times$$

$10 \times 10^5 \div 2,500$

上記の値をにつき連続ローターに当てはめて回転数を計算すると、30分で10 l を処理するには計算上 13,000rpm、60分で処理するには

9,400rpm の回転数が必要となる。そこで、回転数を10,000 rpmから15,000 rpmの範囲で、表4 に示す運転環境でオーシストの回収率を求めた。

表4 連続ローターを用いたクリプトスポリジウムオーシストの回収率

実験番号	回転数	チューブ材質	回収率 (%)
1	10,000	硬質ビニール	67
2	13,000	硬質ビニール	74
3	13,000	硬質ビニール	81
4	15,000	シリコン	53
5	15,000	シリコン	23
6	15,000	シリコン	43
7	15,000	シリコン	25
8	13,000	シリコン	31
9	13,000	シリコン	55

表4 に示すように、オーシストの回収率は理論値にそっていることが示された (80%)。その一方で試料水の注入経路に用いられる管系の素材が回収率に大きく影響することが副次的に示された。

以上の結果から、本研究で開発された連続ローターは充分使用に耐えるものであることが証明された。また、本方法の濃縮に要する時間は過濃縮に比べてむしろ短く、さらに化学薬剤による処理 (メンブランフィルター溶解に用いられるアセトン等) を行う必要もないことから、積極的に普及を図るに足るものと判断された。

#### 蛍光抗体試薬 (蛍光色素標識特異単クローン抗体) の作成

クリプトスポリジウムのオーシスト検査は濃縮方法に加え、蛍光抗体染色法に用いられ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検出感度およびその精度 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。その結果、染色特性の良好

な9クローンを手し、その中からさらに選択を重ねて使用に足る2クローンを選択した。

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。これらのオーシストに対する染色特性の評価は蛍光 (FITC) 標識を行った後の標品を用いて行った。解析にはフローサイトメーターを用い、ヒストグラム上で染色粒子 (オーシスト) の FITC 蛍光強度のピークの高さ、幅、tailing 幅を比較し、高く幅が狭く tailing の極力ない標品を特異性の高いものと判定した。

典型例として C-1 単クローンによって得られた結果を図2 a に示すが、FITC 強度のヒストグラムは10、20、30、40 (X軸: 単位は任意) の位置に周期的に4つのピークが認められる。このことは標本中に10の蛍光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を示している。また、図2 b 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わし、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 2 b におい

ては周期的に分布する粒子塊のほかには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示されている。

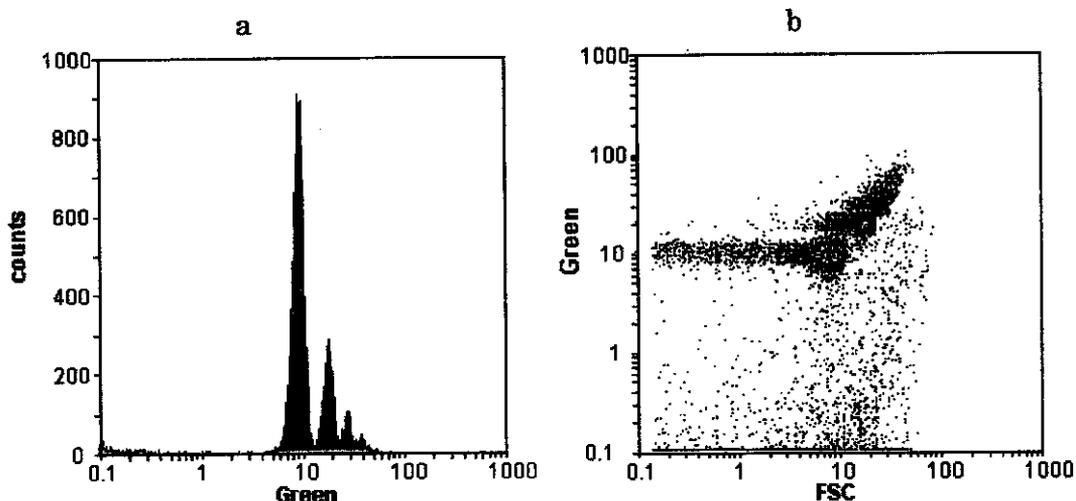


図 2 フローサイトメーターによる C-1 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
**a**: 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。10、20、30、40 と蛍光強度を持つ粒子の存在が示されている。**b**: 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。蛍光強度が 2 倍から 4 倍に増加するに従い、粒子サイズも 2 から 4 倍に増加する関係が示されている。

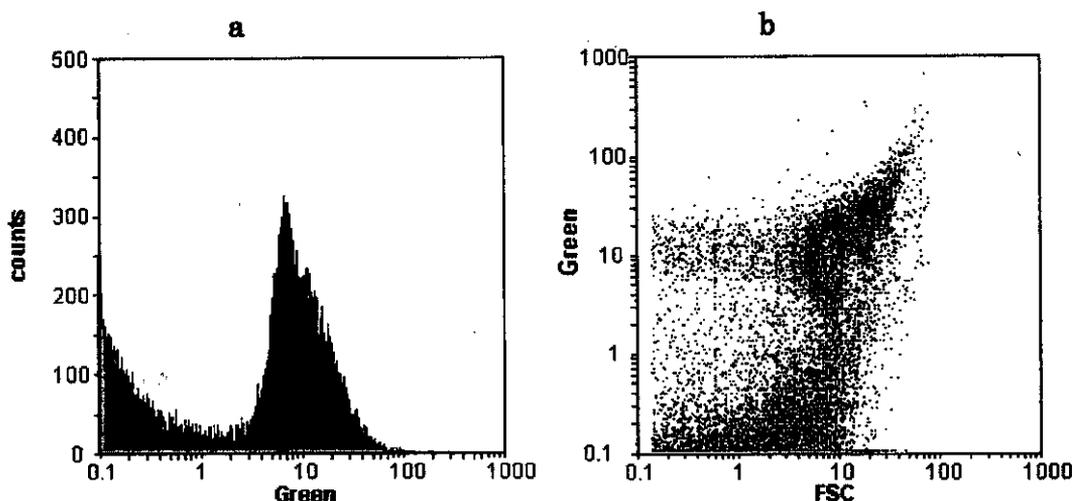


図 3 フローサイトメーターによる C-2 単クローン抗体の染色特性 (単位は任意)。  
**a**: 抗体により染色された粒子 (オーシスト) の示す蛍光強度の分布。  
**b**: 染色粒子の蛍光強度と粒子サイズの相関。

同様に C-5 クローン抗体も上記の特性を示し、C-1 クローン同様に優れた染色特性が証明された。

一方、図 3 には C-2 単クローン抗体を用いて行った染色結果を示した。C-2 クローン抗体

による染色結果は明らかに非特異反応が観察される。FITC 強度のヒストグラムでは幅の広いピークが 1 つ見られるのみで、周期的に現れるはずの他のピークが埋没している。図 2b では非特異反応を示す多数の粒子が検出されて

いる。

上記の方法で選択された単クローン抗体の特異性評価のために原虫類6属11種、藻類5属5種に対する交差反応性を検討した。評価方法は表5に示す原虫類等をスライドガラスに塗抹・乾燥し、蛍光抗体染色を行った。交差反

応の有無は顕微鏡下で観察により判定した。その結果、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さないことを確認した。

表5 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. maxima</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>Chloccocum botryoidea</i>

## 蛍光抗体染色標本の観察

### 蛍光フィルター選択と観察上の注意

#### I 蛍光顕微鏡用フィルター

蛍光顕微鏡の使用に際しては、目的の蛍光を効率的に観察するために励起フィルターとバリアフィルターの選択、組み合わせが重要となる。

#### 1. フィルターの種類

**帯域透過フィルター:**決められた波長域の光のみを透過するように設計されたフィルター

で、目的に応じて励起フィルター、バリアフィルターの両方に用いられる。狭い波長域のみを透過することから狭帯域フィルターとも呼ばれる。

**長波長透過フィルター:**決められた波長よりも長い波長域にある光を透過するように設計されたフィルターで、バリアフィルターに用いられる。広い波長域を透過することから広帯域フィルターとも呼ばれる。

**短波長透過フィルター:**決められた波長よりも短い波長域にある光を透過するように設計されたフィルターで、励起フィルターに用いられる。これも広帯域フィルターである。

このほかに多重励起用のフィルターも開発されている。

#### 2. 各種の蛍光色と観察用フィルターの関係

1) FITC 染色像観察: FITC は励起光として 468-505nm 付近の光を吸収して 501-541nm 付近の緑色蛍光を発する蛍光色素である。したがって、観察には 490nm よりも短波長側の光に対して透過特性を有する励起フィルターと、515nm よりも長波長側の光を透過するバリアフィルターの組み合わせ、すなわち B 励起フィルター系 (Blue Excitation) が用いられる。バリアフィルターとしてはロングパスフィルターとバンドパスフィルターのどちらも選択することができるが、観察像はフィルターの種類によって著しく異なる。ロングパスフィルターでは緑色から赤色までの色帯の蛍光を観察することができるのに対して、バンドパスフィルターでは緑色一色の像となる。

ところで、B 励起光は FITC のみならず植物の含有する赤色系の蛍光色素クロロフィルやフィコピリン系の色素も励起する。したがって、バリアフィルターにロングパスフィルターを選択した場合、標本中に植物プランクトンがいればこれらの赤色自家蛍光も観察される。

2) DAPI 染色像観察: 核染色に用いられ DAPI は 359nm 付近の光を吸収して、461nm の蛍光 (青色) を放出する色素である。したがって、観察には UV 励起フィル

ター系 (UltraViolet Excitation)、すなわち励起フィルターに 365nm 以下の紫外光を透過する短波長透過フィルター、バリアフィルターには 420nm よりも長波長側の光を透過するロングパスフィルターが用いられる。

- 3) 植物プランクトンの赤色自家蛍光観察：植物プランクトンにはフィコエリスリン、フィコシアニン等のフィコピリン系色素、あるいはクロロフィル系色素を含有しており、486-575nm 付近の光を吸収し、568nm 以上の橙色から赤色蛍光を発する。観察には G 励起フィルター系 (Green Excitation) が用いられる。したがって、励起フィルターに 546nm 付近に透過性を有するバンドパスフィルター、バリアフィルターには 590nm よりも長波長の光を透過するロングパスフィルターが用いられる。

#### 検査用蛍光抗体試薬の選択

クリプトスポリジウムオーシスト検査用キットは数社から発売されている。いずれもオーシスト壁に対する単クローン抗体を用いた試薬で、間接蛍光抗体染色試薬と直接蛍光抗体染色の 2 種類がある。後者の直接蛍光抗体染色試薬は糞便検査用に開発されたものが多いが、水道水等からのオーシスト検出にも用いることができる。

試薬キットによってはエバンス青やエリオクローム黒などの色素 (赤色蛍光) をカウンター染色剤<sup>注1)</sup>として添加していることがある。その場合はオーシスト壁を除く夾雑物が染色され、B、G 励起下でいずれも赤色蛍光を発する。嚢子壁に傷がある場合や縫合線が開列している場合には内部構造が染色されて赤色の蛍光を発することがある。したがって、今後はカウンター染色剤の使用を控えることが望ましい。

また、かつてオーシストの生死判定用として PI 染色<sup>注2)</sup>が行われたことがあったが、生死判定にも効果的とは言えない。通常のオーシスト検出試験においてはカウンター染色剤と同様の理由で使用を控えることが望ましい。

注1) また、市販のクリプトスポリジウム検出用蛍光抗体試薬キットの中には非特異反応を抑えるためにカウンター染色用の色素を用いている製品があるが、カウンター染色剤にはもっぱら赤色系の蛍光色素が用いられている。

注2) 細胞の生死判定 (核酸染色) に Propidium Iodide (PI) が用いられることがあるが、PI は 536nm 付近の光を吸収して、617nm の赤色蛍光を放出する色素であることから、観察には G 励起系フィルターが用いられる。

#### 蛍光抗体試薬に非特異反応を示す植物プランクトンとの分別点

市販のクリプトスポリジウム蛍光抗体試薬は試料中に混在する藻類等の植物プランクトン粒子と非特異反応を示す例が知られている。稀に、微分干渉顕微鏡による内部構造観察においても酷似するものがあり、オーシストとの判別が極めて難しいことがある。このような場合には通常の B 励起フィルター系による観察と並行して G 励起フィルター系での蛍光像観察を行うことが推奨される。

多くの植物プランクトンは細胞小器官内にクロロフィルやフィコピリン系 (フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン等)、その他の色素を含有しており、G 励起下で橙色から赤色の蛍光 (自家蛍光) を発する。したがって、形態的に類似していても粒子の内部が赤色系の蛍光を発することが確認できればオーシストを否定することができる。注意点

1. 標本作製過程でアセトン処理や熱処理等が加えられると植物系色素の蛍光は減衰・変性する可能性がある。
2. 植物由来の自家蛍光 (赤色) を並行して観察するためにはカウンター染色剤の含有されていない試薬キットを用いること、PI による二重染色を行わないことが必須条件となる。
3. 長時間の励起光照射により植物プランクトンの自家蛍光も減衰するので注意すること。ところで、バリアフィルターにロングパスフィルターを用いた場合、同時に青から赤までの蛍光色が観察される場合もある。

表. クリプトスポリジウムオーシストと植物プランクトン等との分別点

	観察される蛍光色		
	青 (UV 励起)	緑 (B 励起)	赤 (G 励起)
Oocyst	× DAPI 染色時には核が染色される	○ オーシスト壁が染色される	×
Algae 等	△ 一部の細胞で内容が蛍光を発することあり	△ 一部の細胞で内容が蛍光を発することあり	○ 細胞の内容が蛍光を発する

クリプトスポリジウムのオーシストと紛らわしい植物プランクトンの分別観察方法

単一単クローン抗体を用いた染色において、クリプトスポリジウムオーシストと紛らわしい植物プランクトンの分別観察に際した注意点を示す。

試料/観察条件

- a. 暫定法に準拠して蛍光抗体染色標本作製
- b. 以下の一般的な (広帯域) FITC 観察用フィルターを組み合わせを使用
  - ┌ B 励起 (励起波長 450~490nm)、
  - └ ダイクロイックミラー (510nm 以下をカット)、
  - └ バリアフィルター (515~) 520nm 以下をカット)

観察結果 (図 1、2)

1. 大きさ・形状がオーシストと酷似する粒子で、粒子の外周の蛍光色は FITC の特異蛍光 (青リンゴ色) からやや黄色を帯びた緑色を呈する (図 4a)。
2. 粒子の内部構造が弱いながら黄色の蛍光を発する (図 4a)。

微分干渉顕微鏡観察で内部構造がオーシストのそれに似る (図 4b)。

鑑別方法

1. 上記のような場合には、G 励起フィルター系を用いて植物プランクトンとの分別を行わなければならない。植物プランクトンであればクロロフィルやフィコビルリン系の色素を含有することから、G 励起フィルター系で粒子の内部構造が赤色蛍光を発する (図 4c)。

2. 陽性対象の観察によりオーシスト像を確認する。

オーシストの検出試験に際しては必検出用試薬キットに含まれる陽性対象 (ホルマリン固定オーシスト) を染色し、B 励起フィルター系、及び G 励起フィルター系で観察する。正しい反応が起きていればオーシストは B 励起下でオーシストの外周が青リンゴ色の FITC 特異蛍光を発する。前述の例とは異なり、オーシストの内部構造が緑色から黄色の蛍光を発することはない。また、G 励起下では一切の蛍光は観察されない<sup>注1)</sup>。

注1. ただし、市販の蛍光抗体試薬によっては非特異反応を押さえるためにカウンター染色剤 (Counter Stain) が含まれているものがあり、オーシスト壁に傷がある場合や縫合線が開いている場合にはカウンター染色剤による内部構造が染色され、B 励起、G 励起のいずれの条件においても赤色の蛍光を発することある点に注意する (IV 検査用蛍光抗体試薬の選択 参照のこと)。

本標本は標本作製の行程でアセトンが用いられていることと長時間にわたり励起光に曝露されたために蛍光が減衰・変性し、B 励起フィルター系による観察では細胞内容は僅かに黄色を呈するのみとなっている。これに非特異反応による FITC が重なって図 4a が得られたものと解釈される。

図 4c に示すように、同一粒子は G 励起フィルター系での観察でその細胞内容が赤色蛍光を呈していることから植物プランクトンと判定できる。

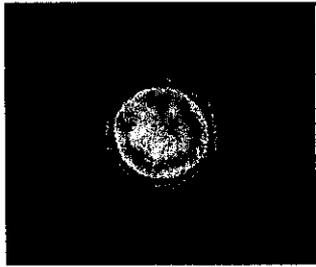


図 4a B 励起



図 4b 微分干渉像



図 4c G 励起

蛍光標識単クローン抗体を用いた二重染色方法

単クローン抗体にそれぞれ FITC および赤色蛍光色素 Texas Red を標識し、同時二重染色用試薬を作製した。

単クローン抗体を用いた二重染色

単クローン抗体は単一の抗原決定基を認識するもので、これを用いた蛍光抗体染色では原理的に非特異反応が起きないものと理解されている。しかしながら、1) 抗原基の種類によっては生物種の範囲を超えて分布する、2) 市販の単クローン抗体は特異免疫グロブリン (Immuno-globulin) を単離精製せず粗精製の状態で用いている可能性があり、試薬中に含まれる不純物によって非特異反応が惹起される可能性がある。また経験上、抗体の特異性の如何に関わらず非特異反応が認められることも事実で、市販の抗体試薬ではいずれもある種の藻類やその他の微粒子に非特異反応が認められている。

この問題の解決に向けた試みとしてクリプトスポリジウムのオーシストを 2 種の標識単クローン抗体で異なった色調で二重染色 (FITC (緑色) / Texas-Red (TR; 赤色)) し、検出

特異性の向上を図った。原理的には、同一の試料に対して異なった 2 種類の単クローン抗体を用いた場合、それぞれの抗体が単独で非特異反応を生じたとしても、同一の異物粒子がいずれの単クローン抗体にも反応する確立はきわめて少ないものと期待される。

操作手順

C-1 及び C-5 単クローン抗体を用い、それぞれの抗体が別の抗原決定基を認識していることの確認試験を行った。

まず、同一抗体による染色阻害実験を行った。オーシストを非標識の C-1 あるいは C-5 単クローン抗体で所定時間処理し、その後それぞれの蛍光標識抗体を用いて相同の抗体で処理されたオーシストを染色した。この結果、いずれの標本においても著しい染色阻害が認められることを確認した。次いで、未標識 C-1 単クローン抗体で処理されたオーシストを蛍光標識 C-5 で、逆に未標識 C-5 抗体で処理されたオーシストを標識 C-1 抗体で染色し、染色阻害が起きないことを確認した。最後に、異なった蛍光色素標識の C-1 (FITC) および C-5 (TR) 単クローンを用いて二重染色を行った。その結果を図 4、5 に示す。

### 《Cp 二重染色》

エッペン tube  
 | Cp オーシスト 10 μl  
 | 抗体液 50 μl  
 25°C、15min  
 |  
 10000\*g、1min  
 |

抗体液	1/50	1/100	
*1/10 Texas Red	10 μl	5 μl	
	ヤギ血清	5 μl	5 μl
	PBS(-)	10 μl	15 μl
	FITC C-1	25 μl	25 μl
	(total)	50 μl	50 μl

上清をとり、PBS 300  $\mu$ l  
沈渣を浮遊させる  
|  
10000\*g、1min  
|  
上清をとり、PBS 300  $\mu$ l  
沈渣を浮遊させる  
|  
10000\*g、1min  
|  
上清をとり、退色防止剤1滴  
よく混和する  
|  
観察

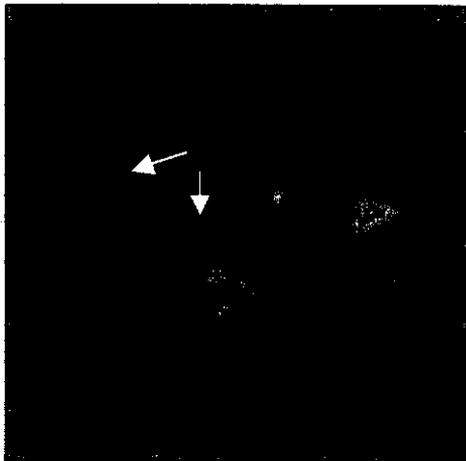


図5 FITC 標識 C-1 単クローン抗体及び TR 標識 C-5 単クローン抗体による二重染色標本の B 励起像 (励起波長 450~490nm; バリアフィルター 520nm 以下カット)。

画面左側に位置する 2 個のオーシスト (矢印) はリング状に FITC の蛍光を発している。中央やや下方の赤色の大きな粒子は植物プランクトンで、フィコエリスリン系の色素による自家蛍光を示す。画面右側の非生物の小顆粒は C-1 単クローン抗体と非特異反応を示し、緑色蛍光を発している。画面右側の黄色系の蛍光を発する非生物の粒子 (三角形) も観察される。

図5、6 で明らかなように、2 種類の蛍光抗体試薬を用いて同時二重染色を行うと抗体との反応はオーシスト壁に限局されるため、B 励起、G 励起のいずれの観察条件であってもリング状に蛍光を発する (図5、6 矢印)。観察条

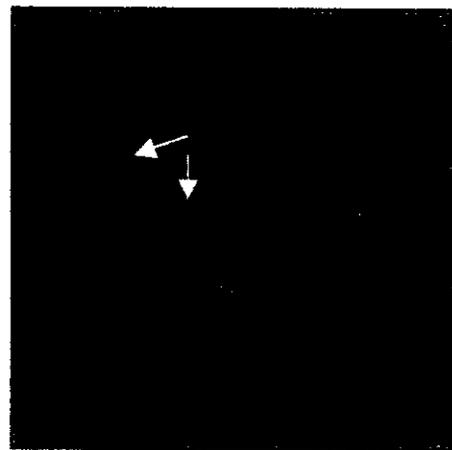


図6 FITC 標識 C-1 単クローン抗体及び TR 標識 C-5 単クローン抗体による二重染色標本 G 励起像 (励起波長: 546 nm; バリアフィルター: 590 nm 以下カット)。

画面左側に位置する 2 個のオーシスト (矢印) はリング状に TR の赤色蛍光を発している。中央やや下方の植物プランクトンは図4 同様にフィコエリスリン系の色素による自家蛍光を示す。図5 の右側で緑色蛍光を発していた小顆粒は C-5 単クローン抗体とは非特異的に反応せず、従ってこの画面では観察されない。一方、画面右側の非生物粒子は赤色蛍光を発しているように観察される。

件を換えて観察することでオーシストの染色特性を確認することができる。これに対して他の粒子は全く別の観察結果を示す。画面中央下の植物プランクトンは植物性色素を含むことから、上記のいずれの観察条件でも粒子内部が

橙～赤色の自家蛍光を発することが観察され、オーシストの染色結果とは著しく異なっていた。また、今回作製された単クローン抗体においても非特異反応は避けられず、非特異的な染色結果として図5の中央に小さな緑色の顆粒が観察されている。しかしながら、この粒子に対する非特異反応は C-5 単クローン抗体では見られず、図6ではこの粒子は確認できなかった。また、画面右側の三角形の粒子はいずれの観察条件でも蛍光を発するが FITC あるいは TR とは異なる蛍光を示しており、形態的にもオーシストと見誤ることはないことは明らかである。

#### フローサイトメーターによる二重染色のオーシスト標本の検出

フローサイトメーターの検出特異性は一義的に用いる蛍光抗体試薬の特異性に依存するが、現在入手可能な蛍光抗体試薬はいずれもある種の藻類やその他の微粒子に非特異反応を示すことが知られている。この問題を解決に向けた試みとしてクリプトスポリジウムのオーシストを2種の標識単クローン抗体で二重染色 (FITC (緑色) / R-phycoerythrin (RPE; オレンジ色)) し検出特異性の向上を図った。

クリプトスポリジウムオーシストは新鮮なオーシストとホルマリン固定標本を用いた。陰性対象として正常マウスの糞便希釈液を用いた。試料を上記のフローサイトメーター用の二重染色用試薬で染色し、フローサイトメーターによるオーシスト検出を試みた。

今回の実験で用いたフローサイトメーターは検知機 (フォトマル) が6個装備されており、1つの粒子に対して最大で6つのパラメーターを

特定することができるが、本研究では前方散乱光、側方散乱光、FITC 蛍光および RPE に関する計4つのパラメーターを検知した。その際、クリプトの集団を粒子の大きさ (前方散乱光)、あるいは粒子内構造 (側方散乱光) による解析からだけでは判別できなかった。図・a・d には二重に蛍光標識された標品の解析結果を示した。図・7a には検知された粒子の前方散乱光 (FSC) と FITC 強度の相関を示した。図・7b には同一の解析結果を前方散乱光と RPE 強度の相関を示した。それぞれの図において四角の枠で囲んだ部分 (gate1, 2) がオーシストの分布域である。図・7c には同一の解析結果がオレンジ色と緑色の相関で示されている。図中には非特異反応によって染色された多数の粒子 (異物) が直線的に分布している。これに沿って緑色オレンジ色の双方に強く染色された (等価に特異的に染色された) 粒子塊が認められるが、この集塊のほとんどがオーシストと考えられる。この図に対して図・7a および図・7b のオーシスト領域 (gate1, 2) に限局する粒子を抽出、すなわち大きさ等粒形による選別を行うことで図・7d の結果を得る。このカラムに示されている粒子は両方の単クローン抗体に特異反応を示した粒子で、形状もオーシストと一致する粒子、すなわちクリプトスポリジウムのオーシストが選択的に抽出された結果である。同様の方法で陰性対象試料を処理した場合、個々の蛍光染色ではオーシスト領域に粒子 (擬陽性粒子) が存在したが、図・8a で示すように混入粒子塊が示されているのみで、オーシストの分布領域には特異的に染色された粒子はごく少数が散在する程度であった。また、粒形のパラメーター (FSC、SSC) を加味するとこの領域にはまったく粒子が検出されることが示された (図・8b)。すなわち、二重染色により非特異反応を完全に防ぐことができた。

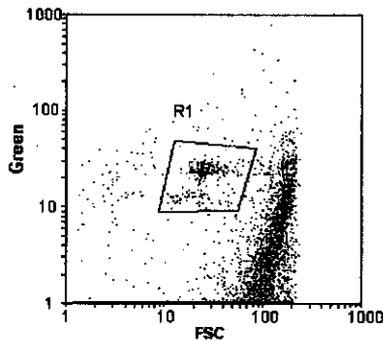


図7a FSC/FITCによるフローサイトメーター解析像

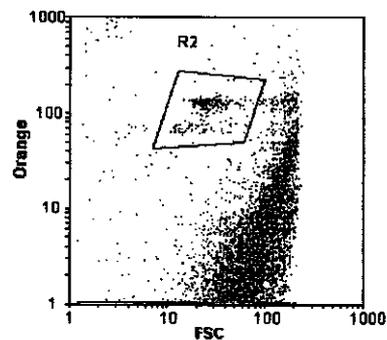


図7b FSC/RPEによるフローサイトメーター解析像

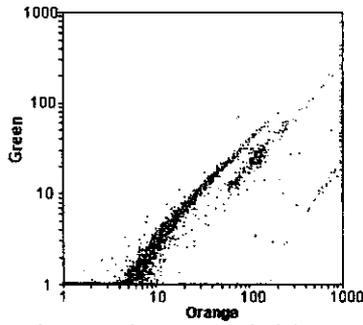


図7c FITC/RPEによるフローサイトメーター解析像

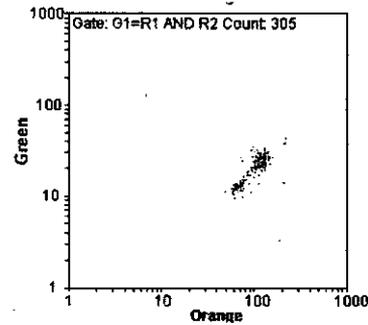


図7d Gated R-PE/FITCによるフローサイトメーター解析像

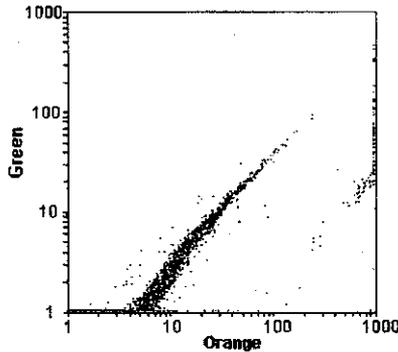


図8a FITC/RPEによる陰性対象のフローサイトメーター解析像

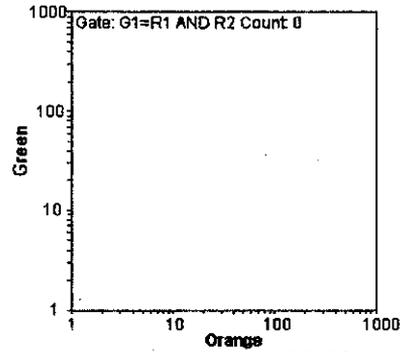


図8b Gated R-PE/FITCによる陰性対象のフローサイトメーター解析像

以上の結果から、複数の蛍光標識単クローン抗体を用いた重複染色によってフローサイトメーターにおけるクリプトスポリジウムオーシストの解析能力を著しく改善させることができた。今後は実用化に向けて実験の例数を重ねる必要がある。

#### D. まとめ

本研究ではクリプトスポリジウムオーシストの検査法を検討し、改善方法や新たな検査方法の提案を行った。

本件左方においては試料水の濃縮工程が労力、時間共に最も多くの問題を抱えている。本研究では連続ローターを用いた連続遠心沈殿法の導入を提案した。本方法は必ずしも新しい

方法ではないが、市販のローターに適当なものがないこともあって現在にいたるまでわが国では導入しているところはない。市販のローターはすべて大容量の沈渣を集めるために設計されており、大量の試料水から少量の沈渣を得るための装置を新たに設計する必要があった。本法の普及は今後この製品が市販化されるかにかかっている。

現在わが国で市販されている蛍光抗体試薬はほとんどのものが輸入品である。本研究で行った単クローン抗体の作製は国産の試薬の開発を促す意味でも重要である。また、新たに提案した二重染色法は検査法の精度を高める上で重要な手法と考えられる。今後は本方法を試験的に導入し、現場サイドのデータによる確認を行い、実用・普及を図るべきものとする。

分担研究報告書 6

遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究

分担研究者 西尾 治

## 研究課題：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：遺伝子操作法による原虫の検出法に関する研究

国立公衆衛生院 衛生微生物学部 ウイルス室長 西尾 治

### 研究要旨

クリプトスポリジウム遺伝子診断法(PCR)の開発を平成9年度から継続している。PCR法は昨年度に比べDNAの抽出、PCRの前加熱処理に改良を加えたことにより、検出感度が高くなった。平成9年度はクリプトスポリジウムの外壁蛋白部分で、昨年度および本年度は18S ribosomal RNA(18S rDNA)をコードしている位置を中心に3組のプライマーを選定した。Set A および set B プライマーを用いることによりヒトおよび各種動物からクリプトスポリジウムが極めて高率に検出され、これらのプライマーは有用であると考えられた。確認試験として、ハイブリダイゼーションの開発を行い、全てが目的とするプローブに陽性を示し、標的の遺伝子が増幅されていたことが確認された。この結果は遺伝子配列と一致し、開発したハイブリダイゼーション法は確認試験に用いられると考えられた。

ウシ、ヒト、ブタおよびマウスの遺伝子配列を明らかにしたところ、ParvamとMuris.では配列が異なっていた。Parvamはヒト、ウシおよびブタで極めて類似していたものの、マウスとは少し異なっていた。今後感染ルートの解明のためにヒトを含め各種動物のクリプトスポリジウムの遺伝子配列を広範囲に調べ、基礎的データの蓄積を継続して行う必要がある。

### A. 研究目的

クリプトスポリジウムによる水道水汚染が世界的な問題となっている。わが国においても水道水汚染による健康被害例が起きている。クリプトスポリジウムの診断は蛍光抗体法および微分干渉による形態観察で行われている。蛍光抗体法、特に微分干渉法による診断は時として困難を来すことがある。ヒトから検出されたクリプトスポリジウム原虫はヒトのみならずウシ、イヌ、ネコ等に感染することが知られている。またブタ、ヒツジ、ネズミ、鳥類等の動物にもクリプトスポリジウム感染が起きている。

顕微鏡を用いた形態学的診断あるいはクリプトスポリジウムに対するポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による診断では動物種を明らかにできない。

クリプトスポリジウムの感染源の疫学的解析あるいは由来動物、感染ルートの解明には分子疫学的解析が不可欠であるが、わが国では遺伝子配列の解明は殆ど行われていない。

遺伝子診断として PCR 法の確立と、遺伝子配列を決定し分子疫学的解析を行うこととした。平成 9 年度本研究でヒトとウシについてクリプトスポリジウムの外殻蛋白をコードしている DNA の配列を調べ、ヒトとウシでは殆ど違いが見られなかったことを報告した。

昨年度および本年度は検出感度を上げる目的で DNA の抽出法、PCR の前加熱処理を改良するとともに、ヒト、ウシ、ブタおよびネズミのクリプトスポリジウムの 18S rRNA をコードしている遺伝子配列を決定し、分子疫学的解析に寄与することとした。

## B. 研究方法

材料：本研究にはヒトおよび各種動物から得られたクリプトスポリジウムを用いた。さなわち *C. parvum* はヒト 4 件、ウシ 16 件、ブタ 5 件、メンヨウ 2 件、ネコ 4 件、ネズミ 1 件の計 32 件で、*C. muris* は ウシ 5 件、ネズミ 1 件、計 6 件、合計 38 件を用いた

### 1. PCR 法について

#### 1) クリプトスポリジウム原虫から DNA の抽出法

クリプトスポリジウム DNA の抽出は浮遊法で集め、3,000rpm, 15 分間遠心し ペレットを磷酸緩衝液に再浮遊させた。この操作を 2 回行った。凍結融解 5 回 (-70°C に凍結し、ついで 60°C の温水に入れ、急速解凍した。その後 2 倍濃度の Lysis buffer (50mM Tris-HCL, 20mM EDTA, pH8.0, 0.5% Saekosyl) を等量加え、Proteinase K (1mg/ml) を加え、50°C, 90 分間、98°C, 5 分間行い、その後 on ice した。次いで等量のフェノール、クロロフォルム、イソアミルアルコールを加え、10 分間混合した後、3,000rpm. 10 分間遠心し、その上清を新しいチューブに取った。それにクロロフォルムを等量加え、10 分間混合した後、3,000rpm. 10 分間遠心し、その上清を新しいチューブに取り、エタノールを 2.5 倍量と、0.1 量の 3M 酢酸ナトリウムを加え、-70°C 以下に 30 分置き、その後 15,000rpm. 30 分間遠心し、液層を除いた。その後 70% エタノールを 500  $\mu$ l 加え、15,000rpm. 30 分間遠心し、液層を除いた後、乾燥させた後、T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> を加え、56°C, 10 分間加熱処理し DNA を溶解し、使用時まで -40°C に保存した。

#### 2) プライマーとプローブの設定

図1 プライマーとプローブの位置

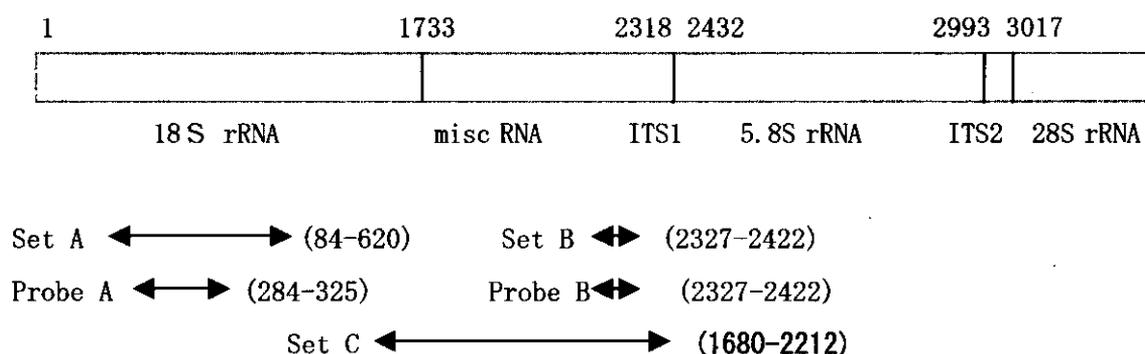


表1. プライマーの核酸配列

---

Set A {Cryba+84 : 5' AAC TGC GAATGGCTCATTAT-3'
CrybaR-620:5' -ACA GAA ATC CAA CTA CGA GC-3' }
Set B {CrybaR+2327:5' -ACT TTA AGT AAT GGA TGT CTT-3'
CrybaR-2422:5' -GTT AAT AGA CAC TGA TAT AAA-3' }
Set C {CryFR+001:5' -AGG AGA AGT CGT AAC AAG GT-3'
CryFR-532:5' -TGC TAT TTG CGT TGA GAG AT-3' }

---

PCR に用いたプライマーは18S の rRNA をコードしている部分のスタートを1として、3組を設定した。Set Aは18S rRNA の部分、set Bは5.8S RNA、set Cは18S RNA から misc RNA の部分である。プローブは set Aは284-325の部分で、set Cはプライマーと同じ位置で設定した。

### 3) PCR による遺伝子増幅

PCR による遺伝子増幅は図2 に示した方法で行った。その概略はPCR の混合液の調整は、*Taq*を除いたものを作製し、それを98℃、10分間の加熱処理を行った。その後 *Taq* を加え、図2. に示した条件で増幅を行った。PCR 産物の確認は1.5 から3%のアガロースゲルを用い電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、写真撮影し判定した。

図2. PCR 液の調整と増幅