

## ◆ 水の安全特集 ◆

# 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

北村友一\* 森田弘昭\*\*

## 1. はじめに

流入下水中のクリプトスポリジウムオーシストのほとんどは、最初沈殿池と活性汚泥処理により汚泥中に移行する。下水汚泥は緑・農地に肥料として再利用されている場合もあり、下水汚泥の衛生学的安全性の評価が求められている。

汚泥中のオーシストの検出は、非常に困難であるのが現状である。これは、クリプトスポリジウムが外界で増殖しないため、培養法による検出が適用できることや多くの夾雑物の中からオーシストだけを分離精製することが非常に難しいためである。現在、オーシストの検出は、計数法により行っており、その検出作業は次の行程からなる。蔗糖浮遊法やフルイ分離による汚泥からのオーシストの分離精製 → 蛍光抗体法によるオーシストの染色 → 顕微鏡観察。この検出作業の中でもっとも熟練を要し、また、時間を費やす作業は顕微鏡観察である。夾雑物が多いと検鏡作業に1週間近くかかることもあり、検鏡者の肉体的負担も大きく、簡便で高精度の検出方法の開発・改良が望まれている。著者らは、検鏡作業を簡便・短時間かつ高精度にするために、フローサイトメトリー・セルソーター(以下FCCS)を用いた蛍光抗体法によるクリプトスポリジウムオーシストの迅速検出法の開発を目指している。本稿では、クリプトスポリジウムオーシストのFCCSによる迅速検出に関して、これまでの検討結果を報告する。

## 2. クリプトスポリジウムについて

クリプトスポリジウム感染症は、オーシスト(囊胞体)により汚染された水の摂取による経口感染により生ずる。摂取されたオーシストが小腸に達するとオーシストから虫体(スプロゾイド)が脱囊し、腸粘膜上皮細胞の微絨毛に侵入する。そこで無性生殖と有性生殖を繰り返しながら急速に増殖するため、腸粘膜上皮細胞が破壊され、腹痛と激しい水溶性下痢を引き起こす。腸内で増殖した

オーシストは下痢とともに排出される。スプロゾイドはオーシスト中で様々な環境に耐えながら次の宿主に摂取されるのを待っている。環境中ではこのオーシストを検出することになる。以上のようにクリプトspoリジウムは寄生虫であり、生細胞内のみで分裂増殖することから、試験管培養困難な病原微生物である。クリプトspoリジウムのオーシストの顕微鏡像を写真-1に示した。

## 3. 蛍光抗体試薬について

蛍光抗体法により病原微生物を検出するためには、検出しようとする病原微生物の抗体が必要となる。この抗体の性能が病原微生物の検出に大きく影響する。一般に抗体の作成は次の手順で行われる<sup>1)</sup>。まず、ウサギやマウスなどの実験動物に抗原(病原微生物)を投与し、実験動物が免疫された後、脾臓を取り出し、脾細胞を分離する。次に、この脾細胞と骨髄種細胞と融合させ<sup>注1)</sup>、融合した細胞だけを選択培養する。この融合細胞の中から抗体生産性のある細胞を検索し、増殖させることにより、目的とする特異抗体が得られる。この抗体に蛍光標識を付けることにより、抗原に特異的に反応する蛍光抗体試薬が得られる。以上の方針により目的微生物の蛍光抗体試薬は得られるが、非常に手間がかかるため、今回の実験では、市販されているクリプトspoリジウム用の蛍光抗体試薬を用いることにした。本試薬は、間接蛍光抗体染色試薬<sup>注2)</sup>であり、1次抗体試薬がオーシスト壁表面に対する抗体である。2次抗体試薬には、緑色の蛍光を発する試薬であるフルオレセイン・イソチオシアネート fluorescein isothiocyanate(以下FITCという)が付いており、1次抗体試薬に特異的に反応する。写真-2に汚泥中のクリプトspoリジウムオーシストの微分干渉像を、写真-3に

注1) 異種細胞をポリエチレングリコールなどの化学薬品下に置くと、異種細胞の細胞膜の融合が生じ、雑種細胞を作ることができる。

注2) 蛍光抗体試薬には、直接蛍光抗体試薬と間接蛍光抗体試薬がある。直接蛍光抗体試薬は、特異抗体に蛍光標識を結合させたもの。間接蛍光抗体試薬は1次抗体試薬と2次抗体試薬からなる。1次抗体試薬は検出したい微生物の特異抗体であり、2次抗体試薬は、1次抗体に特異的に結合する試薬である。この2次抗体試薬に蛍光標識がついている。

間接蛍光抗体染色試薬により染色を施したオーシストの蛍光像を示す。写真-2,3 中のオーシストは同一のものである。写真-2 では夾雜物が多いためオーシストを見つけだすことが難しいが、写真-3 より、オーシストを蛍光抗体染色することにより、オーシスト壁が緑色の蛍光を発するため検出し易くなることが分かる。因みに写真-1 は、夾雜物が存在しない状態である。

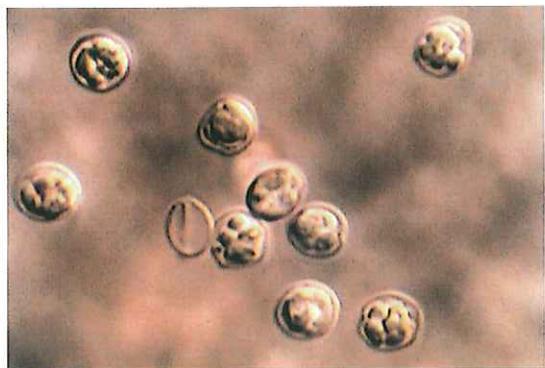


写真-1 クリプトスボリジウムのオーシスト  
(オーシストの直径は約 $5\mu\text{m}$ であり、その内部には、**スポロゾイト**と呼ばれる虫体が4匹存在する。)

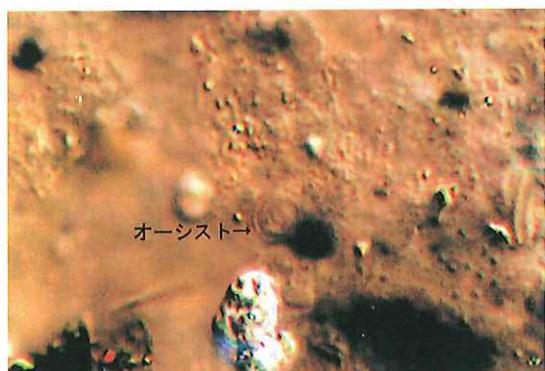


写真-2 汚泥中のクリプトスボリジウムオーシストの微分干渉像

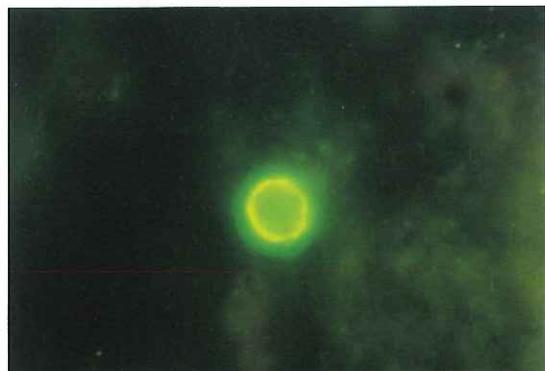


写真-3 間接蛍光抗体染色したクリプトスボリジウムのオーシスト蛍光像

#### 4. 測定装置について

FCCS にはいくつかの種類があるが、ここでは著者らが実験に使用している FCCS の測定原理について簡単に説明する。図-1 に FCCS の概略図を示した。蛍光抗体染色を施した微生物は、シース液(細胞を包み込む液)と共に、フローセル内を層流状態で流れる。このサンプル流がレーザーセンシングゾーンを追加した際、微生物に当たったレーザー光は、散乱光と蛍光の2種類の光線となる。散乱光のうちレーザー入射と同一直線上の光線を、前方散乱光、直角方向の光線を側方散乱光と呼ぶ。前方散乱光は、微生物の大きさに関する情報を示し、側方散乱光は、微生物の核、顆粒などの微生物内部構造に関する情報を反映する。蛍光は、蛍光抗体染色した表面抗原や核の量に関する情報を示している(図-2)。これらの情報はモニターにリアルタイムで表示される。さらに、このように分析された微生物の内、ある特徴を有する微生物群を分取することができる。

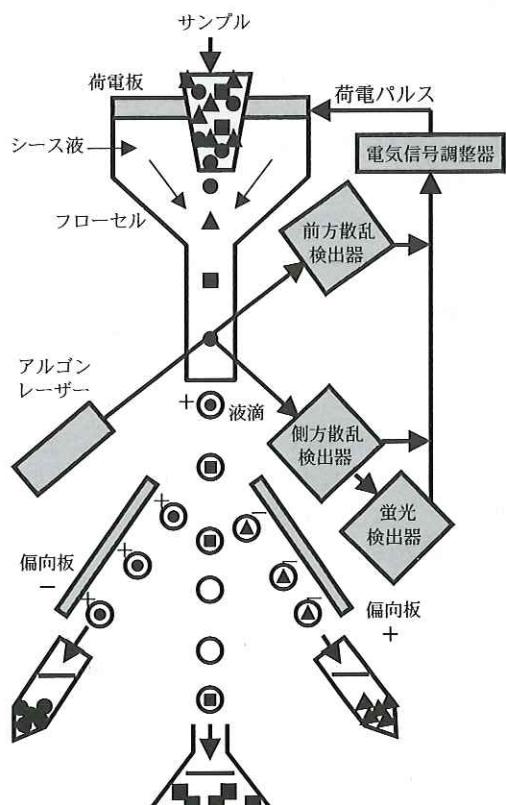


図-1 フローサイトメトリーセルソーター (FCCS) の概要図

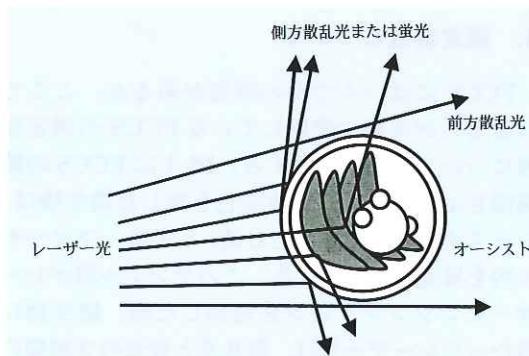


図-2 オーシストがレーザー光を通過したときの散乱光の様子

その原理は次のとおりである。フローセル全体に振動を与えると、水流が液滴状態に変換する。レーザー光により蛍光を発した分取しようとする微生物が、液滴となる瞬間に、シース液全体に正または負の電荷を強制的にかける。微生物の含まれる液滴は帯電したまま落下する。正極と負極の偏向板を通過すると、正に荷電した液滴は、負極の偏向板の方に、負に荷電した液滴は、正極の偏向板に引き寄せられる。荷電されていない液滴はそのまま垂直に落下する。このようにして、異なる情報を有する微生物を分取することができる。本装置の特徴をまとめると次にとおりである。

- (1) 数分で数万個の細胞を測定できる。
- (2) 客観性、定量性が高い。
- (3) 複数の生物学的情報を同時に取得できる。
- (4) 特定の微生物の分取が可能となる。

## 5. 測定試験

実際にクリプトスボリジウムのオーシストをFCCSで解析するとどのような情報が得られるのか、また、検出可能かどうかを検討した。さらに、オーシストの他に汚泥等の夾雑物が多く存在する場合、どのような影響が生じるかを探った。

### 5.1 実験方法

本実験に用いたクリプトスボリジウムのオーシストは、間接蛍光抗体試薬中の陽性コントロール用オーシストを使用した注3)。種は *parvum* 注4) である。

オーシストの蛍光抗体染色は、図-3に示した手順により行った。この染色手順は、間接蛍光抗体

試薬の染色マニュアルを参考に決定した。この染色手順により蛍光抗体染色を施したオーシストと蛍光抗体染色していないオーシストをそれぞれ FCCS により解析することにした。次に、汚泥中にオーシストを添加し、オーシストの含まれる汚泥に蛍光抗体染色を施した場合の分析も行った。なお、使用した汚泥は、フローセルの目詰まりを防ぐため目開き 22μm のフルイを通したものである。対照として蒸留水にオーシストを同濃度添加した場合も検討した。

FCCS の励起光のレーザーには、FITC の付いた 2 次抗体試薬の吸収波長である 495nm に近い、アルゴンレーザー (中心波長 488nm) を用いた。このレーザー光線に照射されたオーシストの前方散乱光と側方散乱光及び FITC 蛍光強度の違いから、オーシストの情報を解析した。

### 5.2 測定結果

オーシストを蛍光抗体染色しなかった場合の、側方散乱強度と前方散乱強度のヒストグラムを図-4(a) に、側方散乱強度と FITC 蛍光強度のヒストグラムを図-4(b) に示した。また、蛍光抗体染色を行った場合の側方散乱強度と前方散乱

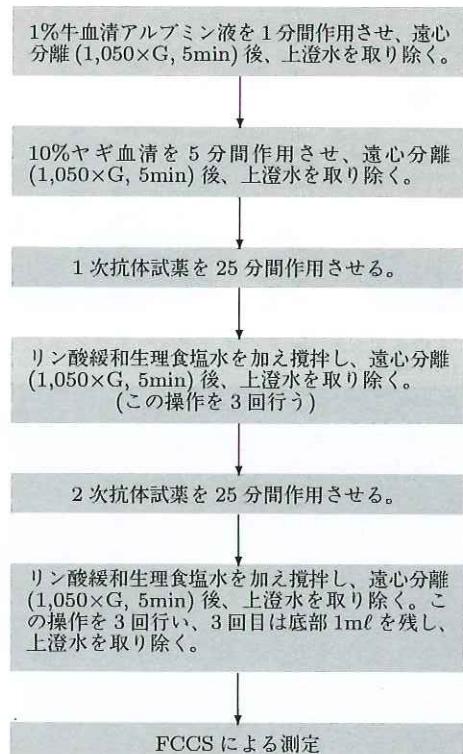
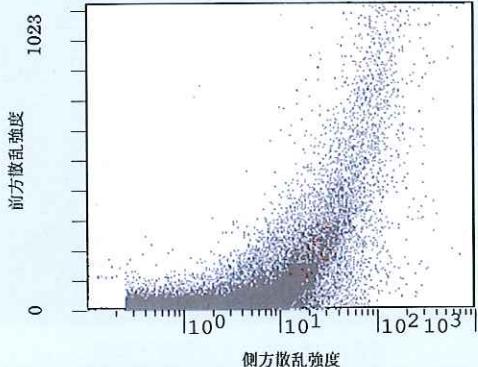


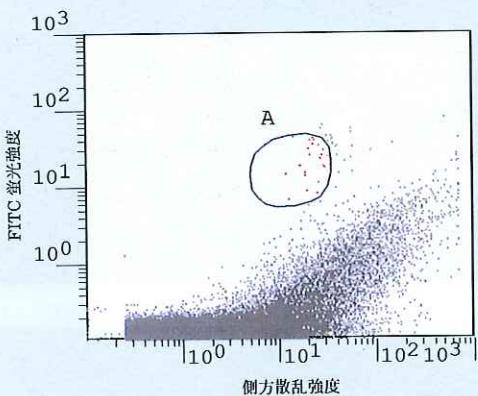
図-3 オーシストの間接蛍光抗体染色の手順

注3) 陽性コントロール用オーシストとは、蛍光抗体染色が失敗なく行えたかどうかを判断するための陽性試料のこと。

注4) クリプトスボリジウムには、様々な種類がある。*parvum*, *muris*, *bayleyi* など。



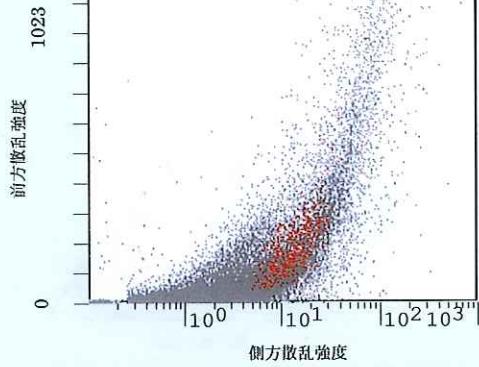
(a) 側方散乱強度と前方散乱強度



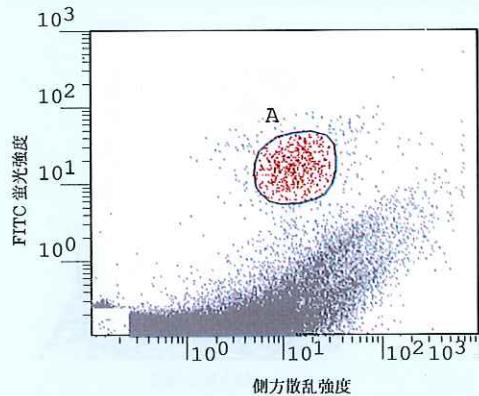
(b) 側方散乱強度と FITC 蛍光強度

図-4 蛍光抗体染色しない場合のオーシストのヒストグラム  
強度のヒストグラムを図-5(a)に、側方散乱強度及びFITC 蛍光強度のヒストグラムを図-5(b)に示した。図-4(a)と図-5(a)を比較すると、ヒストグラムのパターンに違いは見られず、側方散乱強度と前方散乱強度の関係からオーシストを識別することは、困難であることが分かる。図-4(b)と図-5(b)を比較し、顕著な違いが見られた領域を解析画面上で目視で囲んだ。この領域をA領域とし、A領域内の点を赤色に変更した。図-4,5(a)中の赤色の点は図-5(b)中のA領域内の点に相当する。このA領域内にプロットされている点がオーシストを反映していると判断し、A内の部分の粒子を分取した。分取した粒子を顕微鏡により観察した結果、間違なくオーシストであった。以上のことから、側方散乱強度と FITC 蛍光強度の関係からオーシストを検出できることが分かった。

次に、汚泥中にオーシストを添加し、汚泥と共に蛍光抗体染色した場合の結果を図-7に示した。



(a) 側方散乱強度と前方散乱強度



(b) 側方散乱強度と FITC 蛍光強度

図-5 蛍光抗体染色した場合のオーシストのヒストグラム  
本図は側方散乱強度と FITC 蛍光強度及び粒子のカウント個数の関係である。図-6は蒸留水にオーシストを添加した場合の結果である。オーシストの他に汚泥が大量に存在する場合、汚泥の蛍光バックグランドが高くなり、オーシストの蛍光ピークと重なることが分かった。しかし、側方散乱強度の違いから、汚泥粒子とオーシストを区別することができる事が分かる。汚泥中のオーシストを分取し、検鏡した結果、オーシストの他に非特異反応<sup>注5)</sup>を起こした粒子も多く観察された。Veseyら<sup>2)</sup>は、環境中の微生物を蛍光抗体染色し、FCCSにより検出する場合には、非特異反応を防ぐブロッキング剤を使用する必要があると述べている。検出感度を向上させるためには、ブロッキング剤を探索するとともに非特異反応の少

注 5) 非特異反応とは、抗原抗体反応によりオーシストだけが蛍光抗体染色されるはずだが、オーシスト以外の物質が蛍光抗体染色される現象をいう。

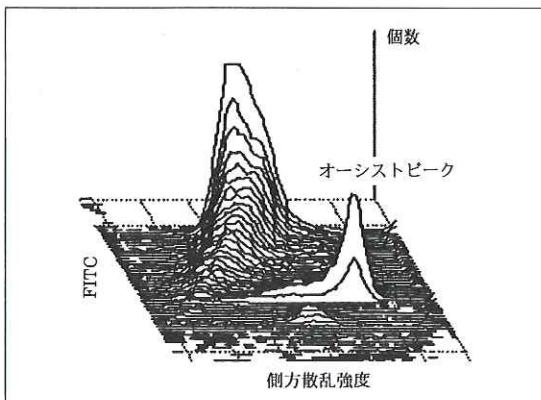


図-6 蒸留水にオーシストを添加した場合の側方散乱強度と FITC 蛍光強度及び検出個数の 3 次元情報

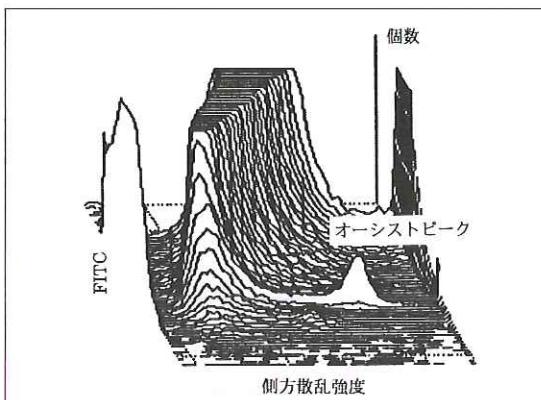


図-7 汚泥中にオーシストを添加した場合の側方散乱強度と FITC 蛍光強度及び検出個数の 3 次元情報

ない蛍光試薬を開発する必要がある。

## 6. 死細胞の検出の可能性について

環境中の病原微生物を定量する場合、感染力のある病原微生物数を把握することが重要となる。病原微生物を蛍光抗体染色した場合、生死に関係なく染色され検出される可能性がある。ここでは、染色特性のことなる試薬を用いることにより、細胞の生死判定の可能性と FCCS による死オーシスト(内部のスプロゾイトが死んでいる状態)の検出、及び死オーシストの除去の可能性について検討した。

死オーシストを見分ける方法は、スプロゾイトの細胞膜の透過性の違いから判断できることが報告されている<sup>3)</sup>。この方法は、細胞膜が破壊されているスプロゾイトを死細胞と判断する方法であり、細胞膜透過性のある核染色試薬である DAPI(4,6 diamidino-2-phenylindole) と細胞膜透過性のない試薬である PI(Propidium Iodide) を用いた



写真-4 オーシストの微分干渉像

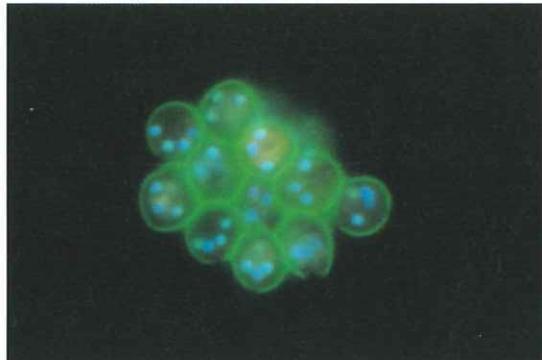


写真-5 B 効起によるオーシストの蛍光像

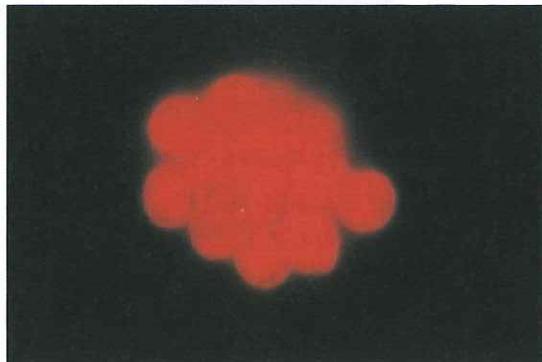


写真-6 G 効起によるオーシストの蛍光像

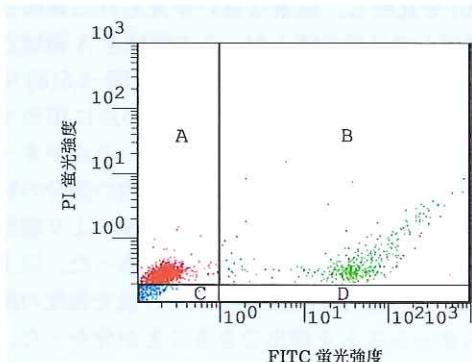


図-8 FITC 蛍光強度と PI 強度の関係

二重染色法から判定される。スプロゾイトの生死判定の原理は次とおりである。まず、スプロゾイトを DAPI で染色すると、生死に関係なく細胞中に取り込まれ核が染色される。次に、PI で染色すると、細胞膜が破壊されているスプロゾイトの核のみが染色される。以上の方法により、全スプロゾイトのうち死スプロゾイトの割合が判定できる。DAPI は、UV 励起下で青色に見え、PI は、G 励起下で赤く観察できることから、蛍光色の違いから生死判定が可能となる。つまり DAPI(+)PI(+) は死細胞、DAPI(+)PI(-) は生細胞となる。

オーシストを FITC、PI および DAPI で染色した結果を写真-4~6 に示す。染色方法は、Cambell<sup>3)</sup> らの方法を参考に行った。なお、ここで使用したオーシストは、ホルマリン処理されたものであり、不活化された(死オーシスト)ものである。写真-6 では、スプロゾイトの核が PI により染色されている様子は確認しにくいが、顕微鏡下では核染色されていることが確認できた。PI により核染色されたスプロゾイトは細胞膜が破壊されていることから死細胞と判定できる。このように死オーシストの蛍光特性は異なることが分かった。

著者らの使用している FCCS には、UV レーザーが装着されていないため、DAPI の励起波長が検出できない。そこで FITC と PI の染色特性的違いからオーシストの FCCS による生死判定が可能かどうかを検討した。

なお、測定試料には夾雑物が若干含まれていた。測定結果を図-8 に示した。図-8 は、FITC 蛍光強度と PI 蛍光強度のヒストグラムである。2 重染色を行った場合の染色パターンを考慮し、図-8 を目視で 4 つの領域に分けた。領域 A は FITC(-)PI(+)、領域 B は FITC(+)PI(+)、領域 C は FITC(-)PI(-)、領域 D は FITC(+)PI(-) となる。オーシストのはほとんどは、FITC に染まることから、B 領域が死オーシストを反映し、D 領域が生オーシストを反映する。今回の試料は死オーシストのみであったため、D 領域には点がなかった。A、C 領域内の点は夾雑物と考えられる。また、FITC に比べ PI の蛍光強度は弱くなることが分かった。FCCS で確実に生死判定する場合は、PI(+) と PI(-) を明確に区別する必要があることから、PI の蛍光強度を高める必要があるこ

とが分かった。今後、PI 濃度を検討する必要がある。さらに、新鮮なオーシストに対して本法が適用できるかどうかを検討することも必要となる。

## 7.まとめ

以上、蛍光抗体染色したクリプトスピリジウムオーシストの FCCS による検出方法について検討してきた。結果を要約すると以下のとおりである。

- (1) FCCS によるクリプトスピリジウムオーシストの検出は、オーシストを蛍光抗体染色し、側方散乱強度と FITC 蛍光強度の関係から、容易に検出できることが分かった。
- (2) 汚泥中のオーシストも検出できることが分かったが、検出感度を向上させるためには、非特異反応を防ぐブロッキング剤を使用し、蛍光バックグランドを低下させる必要があった。
- (3) FCCS による死オーシストを検出できる可能性はあった。

今後は、非特異反応を抑えるブロッキング剤や優れた蛍光抗体試薬を探査し、検出感度の向上を目指す必要がある。さらに、汚泥が共存する条件での FCCS による細胞の生死判別の方法についても検討していく予定である。

## 参考文献

- 1) 大西 巍、高橋哲郎、吉田芳哉：蛍光抗体法による微生物の迅速測定法、計測自動制御学会論文集、Vol.34, No.4, pp.293-298, 1998.
- 2) Graham Vesey, Joe Narai, Nicholas Ashbolt, Keith William, Duncan Veal : Detection of specific Microorganisms in Environmental Sample Using Flow Cytometry, Method in Cellbiology Flow Cytometry Second Edition Part B, Vol.42, pp.489-522, 1994.
- 3) A.T.Campbell, L.J.Robertson, H.V.Smith:Viability of Cryptosporidium parvum Oocysts : Correlation of in Vitro Excystation with Inclusion or Exclusion of Fluorogenic Vital Dyes, Applied and Environmental Microbiology, Vol.58, No.11, pp.3488-3493, 1992.

北村友一\*



建設省土木研究所下水道部  
汚泥研究室研究員  
Tomokazu KITAMURA

森田弘昭\*\*



同 汚泥研究室長  
Hiroaki MORITA