

フローサイトメトリーを用いた *Cryptosporidium parvum* の迅速生死判定法の開発 A rapid determination of *Cryptosporidium parvum* by Flow Cytometry

9630104 石黒 稚加恵 指導教官 大瀧 雅寛

1. はじめに

1) 研究目的

近年、塩素処理に耐性を有する感染性原虫である *C.parvum* による水道原水汚染の問題が国際的に注目されてきており、その消毒手法の研究が進められている。これまでは検出法、生死判定法共に各国が定めた公定法が使用されていた。しかし、それらは測定者の顕微鏡観察による計測のため、作業者の肉体的負担と測定値に個人差が生じるなど、信頼性に問題があり、その簡便で再現性の高い手法が求められている。本研究は、フローサイトメトリーを用いて、生死判定法の一つである脱嚢法の測定を迅速に行う手法の開発を目指すものである。

2) 脱嚢法*1) の概説

脱嚢試験は消化管内に類似した条件で培養したときにオーシスト（外殻）がスポロゾイト（寄生体）を排出する能力を調べるもので、生育活性のないオーシストはスポロゾイトを排出できないとされている。従って脱嚢率が高いことは生存率が高いことを示す。脱嚢率は次の式で表される。

$$\text{脱嚢率(\%)} = (\text{脱嚢オーシスト} / \text{全オーシスト}) \times 100$$

3) フローサイトメトリーの原理*2)

図1に示すように試料中の粒子を一個ずつ通過させ、レーザー光をあてることにより、その散乱光や粒子が蛍光色素を含んでいる場合は特定の蛍光を発するので、それを検出する。散乱光にはFS

(Forward Scatter:前方散乱光)、SS (Side Scatter:側方散乱光) があり、FSは粒子のサイズ、SSは粒子の内部構造を表す。測定可能な対象となる粒子は数 μm ~数百 μm までである。

*3) 近年このフローサイトメトリーを用いた自然水中のクリプトスポリジウムの検出方法が検討されているが、共存物質との区別が難しいことや、前処理法の煩雑さから、応用するにはまだ問題点が多い。本研究は、ある程度高濃度で共存物質の少ない系でのクリプトスポリジウムの生死判定法にフローサイトメトリーを応用しようとするものであり、この条

件下では共存物質が少ないため、その影響が小さいと考えられ、再現性良く検出を行うことができると考えられる。また、*C.parvum* は直径 $5 \mu\text{m}$ 程度なので、測定可能なサイズであり、この方法を用いた場合、迅速な測定（一検体数分）が可能となり、測定者によるバラつきも解決できるなどの長所がある。

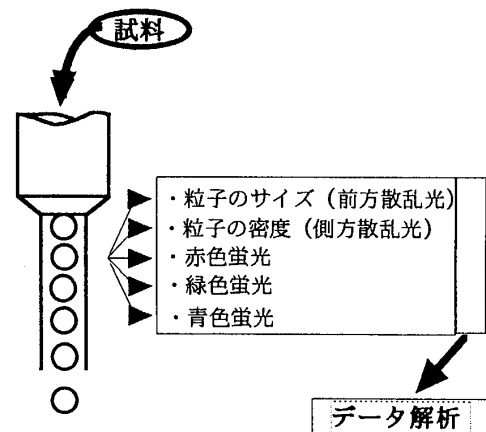


図1. フローサイトメトリーの原理

2. 実験方法

1) サンプル精製

サンプルは埼玉衛生研究所から分与された *C.parvum* を用いた。オーシストをシヨ糖浮遊遠心法により精製した後、血球計算盤にて濃度を測定した。

2) 脱嚢試料作成

デソキシコール酸ナトリウム 0.20 g と炭酸水素ナトリウム 0.44 g を HBSS 溶液 20 ml にそれぞれ溶かし、それぞれ 0.2 ml を精製後のオーシスト 2 ml に投入し、 37°C のインキュベーターで 2 時間培養した後、遠心分離 (2000 rpm , 10 分を 3 回) を行い上澄みをアスピレートし、脱嚢試料 0.4 ml を得た。作成した試料を $7 \mu\text{l}$ 採取し、位相差顕微鏡を使って倍率 $1,000$ 倍で脱嚢率をカウントした。

3) フローサイトメーターでの測定

脱嚢させた試料 (1.0×10^6 個/ml) と脱嚢していない試料 (1.5×10^6 個/ml) を 100 , 50 , 10 , 0% 脱嚢率試料になるようにブレンドし、それぞれフローサイトメーター (EPICS, ALTRA, ベックマンコールター) に供試した。検出器として FS (前方散乱)、SS (側方散乱) を使用した。

3.結果と考察

1) 顕微鏡観察による実脱糞率の確認

表1に顕微鏡観察にてカウントした実脱糞率結果を示す。

表1. 顕微鏡による実脱糞率結果

から	49	脱糞数/全カウント数 =75/85 脱糞率88%
脱糞しかけ	18	
残体	04	
破裂	04	
内部(完全体)	10	

これにより、実脱糞率が88%であるから混合試料の脱糞率も88%、44%、8.8%、0%となる。

4) フローサイトメーターによる設定範囲内粒子数測定結果

フローサイトメーターによる測定結果は図2、3に示す通りである。RR:1の領域はオーシスト内のスポロゾイトが脱糞により抜け出したもの、RR:2は脱糞していないオーシスト(すなわち生育活性のないもの)と脱糞したオーシストの殻が存在するものと考えられる。

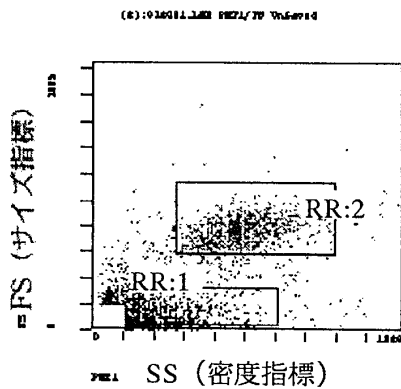


図2 88%脱糞率試料のフローサイト測定結果

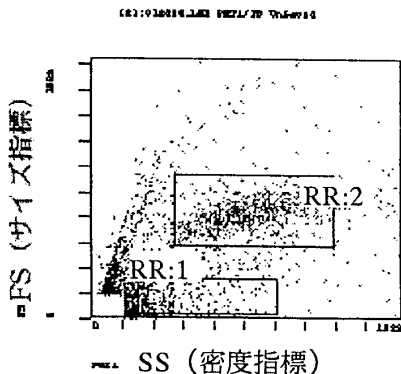


図3 0%脱糞率試料のフローサイト測定結果

表2は各試料のカウントした粒子数を示す。オーシストの殻を示す数とスポロゾイトの数との比率が

脱糞率を示すと考えられるので、それぞれの脱糞率の試料をRR:1/RR:2の値で比較した。

表2. フローサイトメーターによる設定範囲内粒子数測定結果(5000粒子カウントしたうちの数)

理論脱糞率	RR:1/RR:2
88%	1752/1130=1.55
44%	673/2216=0.304
8.8%	740/2030=0.364
0%	516/1576=0.327

RR:1 脱糞したスポロゾイトを示す領域

RR:2 完全なオーシストを示す(殻も含む)領域

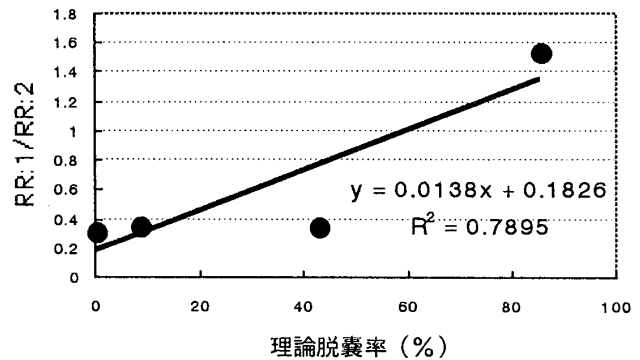


図4. フローサイトメーターによる測定結果

図4は、表2を図示したものである。44%のデータは外れているものの88%と0%、8.8%において有意な差が生じており、フローサイトメーターで脱糞率を推定できる可能性が示された。但し、図2、3の左下に見える部分はゴミか残体の一部と考えられ、この誤差をどう処理するかが今後の課題である。

3) 結論

フローサイトメーターの測定結果から大まかな脱糞率の推定ができる可能性が示された。さらに再現性を出すためには、ノイズをいかに減らすかが今後の課題となる。そのために、スポロゾイトをDNA染色した上でフローサイトメーターで観測する等の改良が必要であると考えられる。

4) 参考文献

- *1) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課「水道のクリプトスポリジウム対策~暫定対策指針の解説」
- *2) 「Flow Cytometry Reference Manual」 coulter社
- *3) 「Using Flow Cytometry to Detect Protozoa」 Rebecca M.Huffman J.AWWA, Vol.89, pp.104, 1997