

(19)日本国特許庁(J P)

公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 221524

(P2002 - 221524A)

(43)公開日 平成14年8月9日(2002.8.9)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [®] (参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/06		C 1 2 Q 1/06	
G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533	
33/535		33/535	
//(C 1 2 Q 1/06		(C 1 2 Q 1/06	

審査請求 未請求 請求項の数 20 L (全 8 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 17261(P2001 - 17261)

(22)出願日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(71)出願人 000006655
新日本製鐵株式会社
東京都千代田区大手町2丁目6番3号
(72)発明者 加藤 敏朗
千葉県富津市新富20 - 1 新日本製鐵株式会
社技術開発本部内
(72)発明者 小野 芳朗
岡山県岡山市津島中2 - 1 - 1 岡山大学内
(72)発明者 三木 理
千葉県富津市新富20 - 1 新日本製鐵株式会
社技術開発本部内
(74)代理人 100077517
弁理士 石田 敬 (外3名)
最終頁に続く

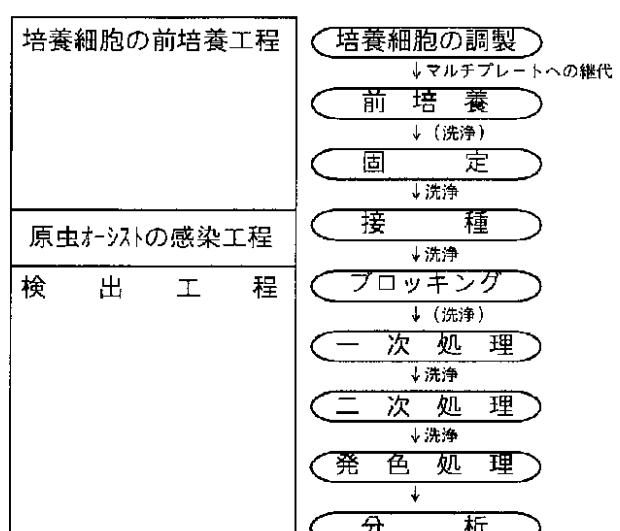
(54)【発明の名称】原虫類の生育活性評価方法

(57)【要約】

【課題】 原虫オーシストの生育活性を評価する方法と
して、オーシストの脱囊性を、顕微鏡観察によることなく簡便かつ正確に定量・評価するための方法を提供する
ものである。

【解決手段】 オーシストを含んだ供試試料を培養細胞
に接触させてから、脱囊させ、さらに培養細胞の表面に付着した感染性虫体の量を免疫学的な手法で検出・定量
することによって、供試試料中の脱囊性を保持した、す
なわち生育活性があるオーシストの量を定量評価でき
る。

図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】 メタノールもしくはエタノールを含んだアルコール溶液またはホルマリンを含んだ緩衝溶液で処理した培養細胞に被検水を接触させ、37±1で30分間～2時間保ち被検水中の原虫類のオーシストまたはシストを脱囊させ、脱囊により生じたスプロロゾイトを培養細胞の表面に付着させ、培養細胞の表面に付着したスプロロゾイトの量を酵素抗体法で検出・定量することを特徴とする原虫類の生育活性評価方法。

【請求項2】 原虫類の量を計測する酵素抗体法に用いる一次処理試薬として、検査対象の原虫類のスプロロゾイトを検出可能な抗体もしくは該抗体をビオチンまたはフルオレセインで標識した化合物を用い、さらには、原虫類の量を計測する酵素抗体法に用いる一次処理試薬と二次処理試薬の組み合わせとして、抗スプロロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗イムノグロブリン抗体、ビオチン化抗スプロロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋ストレプトアビジン、ビオチン化抗スプロロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋ストレプトアビジン・ビオチン複合体、ビオチン化抗スプロロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗ビオチン抗体、フルオレセイン化抗スプロロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗フルオレセイン抗体の中から選ばれる化合物の組み合わせを用いることを特徴とする、請求項1に記載の原虫類の生育活性評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、上・下水道分野において水系感染症の原因病原体の一種であるクリプトスパリジウムやジアルジア等の原虫類の検出方法に関する。本発明は被検試料中の生きている原虫類を簡便かつ精度良く検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】最近、クリプトスパリジウム (*Cryptosporidium*) やジアルジア (*Giardia*) 等の原虫による水系感染症の発生が上・下水道分野をはじめとして世界的に大きな問題となっている(総説として例えば、保坂三継(1998)「水系原虫感染症 - 原因生物と流行発生 -」, 用水と廃水, 第40巻, 第2号, 11頁; 金子光美(1998)「原虫類やその他の病原性微生物の検出とその除去技術」, 用水と廃水, 第10巻, 第4号, 32頁など)。当該原虫類は、環境中においてスプロロゾイト(sporozoite)と呼ばれる感染性虫体が、クリプトスパリジウムではオーシスト、ジアルジアではシストと呼ばれる胞子状の殻(以下、代表してオーシストと称する)で包まれた形態で存在しているため、塩素に対する抵抗性が高く、上・下水道分野で汎用されている塩素消毒では消毒が困難とされている(例えば、I. S. Campbell et al. (1982) Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium oocysts*, Veterinary Record, Vol.111, p414など)。ま

た、当該原虫は極めて少数個の飲用によって疾病を起こしうる危険な病原体であり、飲用水や食品の汚染に由來した甚大な流行感染をも懸念されている。甚大な流行感染の発生を未然に防ぐために原虫類を確実に駆除できる消毒技術の開発が強く求められているが、対策技術を確立するためには原虫類を生死を判別・定量する手法が必要不可欠である。

【0003】原虫類は寄生性であるため、細菌、酵母、カビなどの微生物のように栄養塩類を添加した培地では培養できないため、培養法では原虫の生育活性を判定できない。原虫類の生死を評価する方法としてはバイタル染色法、脱囊試験法、動物実験法、培養細胞法等が考案されている。

【0004】バイタル染色は、複数種の蛍光色素でオーシストを染色し、顕微鏡観察で染色の有無を観察・計数する方法であり、例えばDAPI[4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate]とPI[propidium iodine]の2種類が用いられている。感染性虫体を内包したオーシストはその生死に拘わらずDAPIで染色され、一方、生きているオーシストにおいてはPIをオーシストの外へ排出するため染色されないという原理に基づく方法である。したがって、これら2種類の蛍光色素で染色した後に顕微鏡観察すれば、供試試料中のオーシスト全数(すなわちDAPIで染色される粒子数)と生存オーシスト数(すなわちPIで染色されない粒子数)を計測できる。

【0005】脱囊試験法は、上・下水道分野において最も汎用されている原虫類の生死判別試験法である。当該試験法は、生きているオーシストはある種の物理的ないし化学的な処理をすると殻内部の感染性虫体が外殻を破って出てくる現象(脱囊)に着目し、脱囊したオーシストの数を顕微鏡観察で計数する方法である。動物実験法は、マウス等の小動物へ被検試料を経口的に接種し、1週間から1ヶ月程度の間にわたって継続的に飼育し、排泄された糞便から原虫類のオーシストを精製して顕微鏡観察等で計測して被検試料中の生育活性のある原虫類濃度を推定する方法、もしくは該小動物の消化器官を摘出し、病理学的な観察によって発症の有無を判定し被検試料中の生育活性のある原虫類濃度を推定する方法である。

【0006】動物実験法に代わる原虫類の検査方法として培養細胞法が提案されている(例えば、公開特許公報特開2000-214168; K. M. Woods et al.(1995) "Development of a microtitre ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* in vitro" FEMS Microbiol. Lett., vol.128, p89)。これらの方法は、原虫類のオーシストが培養細胞に寄生することができ、さらに細胞内で増殖したオーシストを酵素抗体法や免疫染色法などで検出できるという原理に基づく。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】バイタル染色法と脱囊試験法は顕微鏡観察によらねば定量評価ができないため、操作の煩雑さ、効率の悪さ、データ精度の悪さ等の欠点があり、また、動物実験法については、判定に長時間を要することや小動物の個体差が結果に大きく影響することに加え、動物保護の観点からも好ましい方法とはいえない。

【0008】一方、原虫類の生死を定量的に判別する方法としては、培養細胞法が有望であるが、従来の方法は、原虫類を接種した後の培養細胞をさらに数日間培養しなければならないため、検査結果を得るのに数日を必要とする。原虫類を接種した後の細胞培養を必要としない培養細胞法が考案されている（例えば、A. Joe et al. (1998) "Attachment of Cryptosporidium parvum sporozoites to Human Intestinal Epithelial Cells" Infection and Immunity, vol.66, No.7, p3429）。しかしながら、培養細胞へは精製した感染性虫体を接種しなければならず、原虫類のオーシストの脱囊工程および感染性虫体の精製工程を経なければならない。また、検出できる感染性虫体の数が1検査当たり 1×10^5 から 2×10^6 であり検出感度が極めて低いという欠点もある。

【0009】本発明では、原虫類の生育活性を評価する従来技術が抱える前記の問題点を克服した、簡便、迅速、高精度な原虫類の生育活性を評価する方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】衛生学的な見地からは、オーシスト内部の感染性虫体が生きていたとしてもオーシストの殻を破って出てこなければ（すなわち、脱囊しない）、疾病を引き起こすリスクは低いため、脱囊性の程度を検出・定量すれば、生育活性を判断することができる。

【0011】生育活性がある原虫類のオーシストは脱囊すること、かつ、外殻を破ってでてきた感染性虫体は培養細胞の表面に付着することに着目すれば、培養細胞の表面に付着した感染性虫体を免疫学的な手法で定量検出できる。さらに、原虫類のシストまたはオーシストを培養細胞に接触させた後に当該シストまたはオーシストを脱囊させることができれば、培養細胞に接触させる前に予め脱囊処理や感染性虫体を精製することなく簡便に検出ができる。すなわち、前記した課題は下記の(1)～(2)によって解決できる。

【0012】(1)メタノールもしくはエタノールを含んだアルコール溶液またはホルマリンを含んだ緩衝溶液で処理した培養細胞に被検水を接触させ、 37 ± 1 で30分間～2時間保ち被検水中の原虫類のオーシストもしくはシストを脱囊させ、脱囊により生じたスプロゾイトを培養細胞の表面に付着させ、培養細胞の表面に付着

したスプロゾイトの量を酵素抗体法で検出・定量することを特徴とする原虫類の生育活性評価方法。

【0013】(2)原虫類の量を計測する酵素抗体法に用いる一次処理試薬として、検査対象の原虫類のスプロゾイトを検出可能な抗体もしくは該抗体をビオチンまたはフルオレセインで標識した化合物を用い、さらには、原虫類の量を計測する酵素抗体法に用いる一次処理試薬と二次処理試薬の組み合わせとして、抗スプロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗イムノグロブリン抗体、ビオチン化抗スプロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋ストレプトアビジン、ビオチン化抗スプロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋ストレプトアビジン・ビオチン複合体、ビオチン化抗スプロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗ビオチン抗体、フルオレセイン化抗スプロゾイト抗体とペルオキシダーゼ架橋抗フルオレセイン抗体の中から選ばれる化合物の組み合わせを用いることを特徴とする前記(1)に記載の原虫類の生育活性評価方法。

【0014】本発明は、原虫類の感染性虫体がオーシストの殻を破って出てくる能力（すなわち、脱囊性）を有している場合に“生育活性”があると定義し、供試試料中における脱囊性を保持したオーシストの存在濃度や存在比率を推定するための方法を提供するものである。まず、以下の記載に先立ち、用語の説明を行う。

【0015】・一次処理試薬：検査しようとする原虫に結合する性質を有する化合物。

- ・一次処理溶液：一次処理試薬を含有する溶液。
- ・二次処理試薬：一次処理試薬に結合する性質を有する化合物。
- ・二次処理溶液：二次処理試薬を含有する溶液。
- ・発色試薬：一次処理試薬もしくは二次処理試薬に付加した酵素蛋白質の活性によって呈色反応を起こしうる化合物。

【0016】・発色溶液：発色試薬を含有する溶液。

つぎに、本発明における原虫類の検査方法のフローを図1に示し、以下に詳述する。

(1) 培養細胞の前培養工程：後述の脱囊工程で必要な量の培養細胞を確保し、脱囊工程に供するための培養細胞を調製する工程である。培養細胞の種類は、検査しようとする原虫類が感染しうる細胞株であればよく、例えば、マウス由来BALB/c3T3細胞株、ヒト由来のBT-549細胞株、ヒト由来のCACO-2細胞株、ヒト由来のHCT-8細胞株、ヒト由来のHT-29細胞株、ヒト由来のHS-700T細胞株、ヒト由来のHT-1080細胞株、ヒト由来のL5-174T細胞株、ヒト由来のHCT-8、ヒト由来のRL59-2細胞株、ウシ由来のMDBK細胞株、イヌ由来のMDCK細胞株などを用いることができるが、ヒトに対して感染性があるクリプトスボリジウム・バルバム(*Cryptosporidium parvum*)を検査する場合、ヒト由来の細胞株、例えばヒト腸管内細胞由来のH

CT-8を用いれば、培養細胞表面への感染性虫体の吸着力が強いと考えられるため、感度よく検出・評価できる。細胞を培養するための培地組成、培養温度、湿度、炭酸ガス濃度、培養時間等の培養条件は、用いようとする細胞株に応じて選定することができる。後述の脱囊工程で必要な量の培養細胞を確保するための細胞培養において用いる培養容器は、調製すべき培養細胞の量に応じて選定すればよく、培養容器表面への細胞の接着性を高めるためにゼラチン、ポリ-L-リジン、コラーゲン等で表面処理されていてもよい。増殖した培養細胞を常法に従って回収して、細胞数を計数した後に新鮮な培地液等で $10^3 \sim 10^5$ 個/m¹となるように細胞濃度を調整し、1ウェルあたり $10^3 \sim 10^5$ 個、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 個となるようマルチプレートへ分注して、再び1～3日間程度培養して後述の固定操作に備える。マルチプレートのサイズや規格は、検出工程で用いようとする分光分析装置の規格に合わせて選定すれば良く、96穴マルチプレートを用いることが汎用的である。また、マルチプレートは容器表面への細胞の接着性を高めるためにゼラチン、ポリ-L-リジン、コラーゲン等で表面処理されていてもよい。培養を終えたマルチプレートの各ウェルから培地液を除去し、後述の脱囊工程に供するために細胞を固定する。固定操作は、感染性虫体が細胞内部に侵入することなく細胞表面に付着した状態を保持させるために、また、検出工程中の培養細胞の剥離を防止するために、細胞を固定する工程であり、マルチプレートの各ウェルにメタノール等の有機溶媒やホルマリンを添加した細胞固定液を分注し、5分間～3時間、好ましくは1～2時間、静置した後に固定液を除去し、さらに、ウェルをリン酸緩衝液やハンクス平衡塩溶液等の緩衝液もしくは細胞培養用培地で1～数回洗浄する。

【0017】(2) 原虫オーシストの脱囊工程：本工程は原虫オーシストを脱囊させ、かつ脱囊を経て産生した感染性虫体を固定した培養細胞表面へ付着せしめる工程であり、固定操作を終えたマルチプレートの各ウェルに、原虫オーシスト濃度を測定したい水試料を分注して、所定時間培養することによって、原虫を培養細胞へ付着させることができる。水試料は、好ましくは、培養細胞用の培地を添加したり、培養細胞用の培地で希釈したり、遠心分離後に沈殿物を培養細胞用の培地に再懸濁させたりすることによって、溶媒を培養細胞用の培地に置換した方がよい。さらに、水試料中に雑菌の生存が懸念された場合には、抗菌剤、防黴剤等を添加することができる。オーシストを含んだ水試料を分注した後、前記した細胞培養条件下で30分間～3時間程度、好ましくは1～2時間程度培養する。培養後に各ウェルから培地液を除去してから、細胞をリン酸緩衝液やハンクス平衡塩溶液等の緩衝液もしくは細胞培養用培地で1～数回洗浄する。

10 20 30 40 50

【0018】(3) 検出工程：検出工程は、1) ブロッキング操作、2) 一次処理操作、3) 二次処理操作、4) 発色操作、5) 分析操作の6つの単位操作からなる。ブロッキング操作は、細胞やウェル内壁に対する一次処理試薬や二次処理試薬等の非特異的な吸着を防止する工程であり、前述の脱囊工程を終えたマルチプレートの各ウェルにブロッキング液を分注して、30分間以上静置してから、ブロッキング液を除去する。ブロッキング液は、細胞培養用培地、もしくは、ウシ血清アルブミン等を溶解させた緩衝液等を用いることができる。さらに、ブロッキング液は、Tween20(商標)等の界面活性剤を含んでいても良い。前工程において、血清成分を含んだ細胞培養培地を用いた場合には、ブロッキング操作を省略することもできる。

【0019】一次処理操作は、検査したい原虫の感染性虫体を検出可能な試薬(すなわち一次処理試薬)を含んだ一次処理溶液で処理する工程であり、前記した固定操作後のウェル、もしくはブロッキング操作後のウェルに一次処理溶液を分注し、所定時間反応させた後に一次処理溶液を除去し、ウェルをリン酸緩衝液やハンクス平衡塩溶液等の緩衝液もしくは細胞培養用培地で1～数回洗浄する。一次処理試薬としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、レクチン等を使用することができる。検査したい原虫の感染性虫体を検出可能な一次処理試薬は、ビオチン、ストレプトアビシン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、アルカリフィオスファターゼ、ペルオキシダーゼ等の化合物で標識されてもよい。一次処理試薬を溶解させる溶媒としては、一次処理試薬を変性させることなく、原虫との結合を阻害せず、細胞やウェル内壁に対する一次処理試薬の非特異的な吸着を引き起こさない性質であればいかなる溶液も使用することができるが、前記したブロッキング液を用いることが簡便である。

【0020】二次処理操作は、一次処理試薬のみでは後述する分析操作が不可能な場合について、一次処理試薬を検出可能な試薬(すなわち二次処理試薬)を含んだ溶液で処理する工程であり、前記した一次処理操作後のウェルに二次処理溶液を分注し、所定時間反応させた後に二次処理溶液を除去し、ウェルをリン酸緩衝液やハンクス平衡塩溶液等の緩衝液もしくは細胞培養用培地で1～数回洗浄する。二次処理試薬としては、一次処理試薬の性質に応じて選定すれば良く、一次処理試薬に対する抗体やプロテインA、プロテインG、ビオチン、ストレプトアビシンを使用することができる。さらに、二次処理試薬の結合状態をその結合量に応じて可視化・定量するためには、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート等の蛍光色素化合物もしくはアルカリフィオスファターゼ、ペルオキシダーゼ等の酵素蛋白質で標識した二次処理試薬を用いればよい。二次処理試薬を溶解させる溶媒としては、二次処理試薬を変性させることなく、

一次処理試薬との結合を阻害せず、細胞やウェル内壁に対する二次処理試薬の非特異的な吸着を引き起こさない性質であればいかなる溶液も使用することができるが、前記したブロッキング液を用いることが簡便である。なお、一次処理試薬や二次処理試薬は独自に作成することもできるが、検査の再現性、特異性、汎用性等を鑑みた場合に、市販のビオチン化抗体を一次処理試薬とし、市販のストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体を二次処理試薬として用いることが好ましく、さらに、ストレプトアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体を二次処理試薬として用いれば検出感度を高めることもできる。

【0021】発色操作は、検査したい原虫に対する一次処理試薬もしくは二次処理試薬の結合状態をその結合量に応じて可視化するための工程であり、前記した一次処理操作後のウェルもしくは二次処理操作後のウェルに発色溶液を分注し、所定時間反応させた後に、後述の分析操作に供する。但し、一次処理試薬もしくは二次処理試薬に付加した標識化合物が蛍光色素化合物であって、該蛍光色素化合物の発光強度を以て結合量を測定する場合には、該発色操作を省略することができる。発色溶液は、一次処理試薬もしくは二次処理試薬に付加した酵素蛋白質に応じて選定した基質（例えば、アルカリフィオスファターゼに対してはONPP [o-nitrophenyl phosphate]、PNPP [p-nitrophenyl phosphate] 等が挙げられ、ペルオキシダーゼに対してはABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid]、OPD [o-phenylenediamine]、TMB [3,3',5,5'-tetramethylbenzidine] 等が挙げられる）を所定の緩衝液に溶解したものを用いることができる。発色溶液を分注する前に、基質を添加していない緩衝液でウェルを洗浄するとよい。

【0022】分析操作は、前記した発色操作後のウェルにおける発色の程度を分光光度計または蛍光分光光度計等の分析装置を用いて計測する工程であり、測定条件は発色の性質に応じて選定することができる。また、前記した発色操作を経ずに、一次処理試薬もしくは二次処理試薬に付加した標識化合物が蛍光色素化合物であって、該蛍光色素化合物の発光強度を以て結合量を測定する場合には、分析に至適な溶液をウェルに分注した後に、蛍光分光光度計等で吸光度を計測すればよい。

【0023】ところで、前記した酵素抗体法においては、分析結果としての吸光度と検査試料中の対象物（本発明においては原虫のオーシストもしくは感染性虫体）の濃度との間が必ずしも正比例の関係にならないことが知られている。従って、吸光度から原虫類（オーシストもしくは感染性虫体）の濃度とを相関づけるための検量線が必要となる。そこで、既知の濃度で原虫類（オーシストもしくは感染性虫体）を含有している標準試料を、複数の濃度段階に調製した一連の標準試料系列につい

て、前記した（1）～（3）の検査工程を実施することで原虫類（オーシストもしくは感染性虫体）の濃度と吸光度に関する検量線を得ることができる。また標準試料に関する原虫類の濃度と吸光度との相関関係の式化は、試験結果に応じてふさわしい近似方法を選定すればよいが、例えば、一次線形近似、多項式近似、対数近似、指数近似、累乗近似あるいは両逆数プロット解析などが挙げられる。当検量線に基づけば、複数の被検試料中の原虫類濃度について定性的な判断ではなく、定量的な評価ができる。

【0024】

【実施例】（実施例1）濃度が既知のクリプトスピリウムのオーシスト懸濁液について本発明の定量評価を実施し、オーシスト濃度と吸光度との相関関係を確認した。米国Waterborne Inc.より購入したクリプトスピリウム（バルバム種）のオーシスト懸濁液（ 1×10^6 個 / mL - リン酸緩衝液）を希釈液（0.2%重炭酸ナトリウム、10%ウマ血清、1 mMピルビン酸ナトリウム、0.1 g / L カナマイシン、1 mg / L 葉酸、4 mg / L p-アミノ安息香酸、2 mg / L パントテン酸、35 mg / L アスコルビン酸を添加した RPMI 1640 培地からなる溶液）を希釈して、 1×10^2 ~ 1×10^4 個 / 0.1 mL の範囲で希釈系列試料（以下、被検試料1という）を調製した。なお、比較例として同様のオーシスト懸濁液を熱処理（100 ; 5分間）して死滅させた後に前記希釈液にて 1×10^2 ~ 1×10^4 個 / 0.1 mL の範囲で希釈系列試料（以下、被検試料2という）を調製した。

【0025】脱囊工程に供する培養細胞はヒト由来培養細胞HCT-8株（ATCC # CCL 244）を用いた。0.2%重炭酸ナトリウム、10%ウマ血清、1 mMピルビン酸ナトリウム、0.1 g / L カナマイシンを添加した RPMI 1640 培地からなる維持培地にて培養し、トリプシン処理で培養容器から回収し、細胞濃度が 2.5×10^5 個 / mL となるように新鮮な増殖培地に懸濁して、予めゼラチンでコートした96穴マルチプレートに $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、炭酸ガス培養器内で24時間培養した。培養後のマルチプレートの培地を除去し、4%ホルマリンを添加したリン酸緩衝液からなる固定液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注して、室温で2時間反応させて固定した。固定後の各ウェルより固定液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、被検試料1または2を各々 $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、炭酸ガス培養器内で90分間培養した。培養後の各ウェルより被検試料を除去し、リン酸緩衝液で2回洗浄した。洗浄後の各ウェルに、1%ウシ血清アルブミンと0.002%Tween 20（商標）を添加したリン酸緩衝液からなるブロッキング液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注して、室温で1時間反応させてブロッキングした。ブロッキング液を除去し、一次処理溶液を $33 \mu\text{l}$ ずつ分注して、室温で1時間反応させ

た。一次処理溶液は、米国Waterborne Inc.より購入したフルオレセイン標識抗体（商品名Sporo-G10）を前記したブロッキング液で20倍に希釈した溶液を用いた。反応後の各ウェルから一次処理溶液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、二次処理溶液を33μlずつ分注して、室温で1時間反応させた。二次処理溶液は、米国Amersham-Pharmacia Biotech社より購入した抗フルオレセイン抗体（ペルオキシダーゼ標識物）を前記したブロッキング液で300倍に希釈した溶液を用いた。反応後の各ウェルから二次処理溶液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄し、過ホウ酸ナトリウム添加リン酸クエン酸緩衝液（米国Sigma社より購入）で1回洗浄した後、発色溶液を100μlずつ分注して、室温で1時間反応させて発色させた。発色溶液は、OPD [o-phenylenediamine dihydrochloride]（米国Sigma社）を発色試薬として0.4mg/mlとなるように過ホウ酸ナトリウム添加リン酸クエン酸緩衝液（Sigma）に溶解したものを用いた。発色反応後のマルチプレートは、マイクロプレートリーダー（バイオラド社製 モデル550）を用いて、波長595nmをリファレンスとして波長450nmの吸光度を測定した。

【0026】結果を図2に示す。図2においては、被検試料1に関する評価結果を実施例として白丸（○）印で示し、被検試料2に関する評価結果を比較例として黒丸印で示した。縦軸は、原虫の添加量が無い場合の吸光度を0%とし、最も吸光度が高かった 1×10^4 個に関する実施例の吸光度を100%とした時の相対値を示している。本図より明らかなように、比較例においては添加量を高めても吸光度は高まることがなかったことから、熱処理によって死滅した原虫について検出できない。これに対して、実施例においては原虫の添加量に応じて吸光度が高まったことから、生存した原虫濃度に依存した検出定量ができるることは明らかである。また、図2に基づけば吸光度と原虫濃度との関係を数式化でき、それに基づいて原虫濃度が未知の水試料について定量評価できる。

【0027】（実施例2）既知の濃度のクリプトスピリジウムのオーシスト懸濁液について本発明の定量評価を実施し、従来技術に比して検出感度が高いことを確認した。米国Waterborne Inc.より購入したクリプトスピリジウム（バルバム種）のオーシスト懸濁液（ 1×10^6 個/ml - リン酸緩衝液）を希釈液（0.2%重炭酸ナトリウム、10%ウマ血清、1mMピルビン酸ナトリウム、0.1g/Lカナマイシン、1mg/L葉酸、4mg/Lp-アミノ安息香酸、2mg/Lバントテン酸、35mg/Lアスコルビン酸を添加したRPMI1640培地からなる溶液）で希釈して、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ 個/0.1mlの範囲で希釈系列試料（以下、被検試料3という）を調製した。

10 10 20 30 40 50

【0028】脱囊工程に供する培養細胞はヒト由来培養細胞HCT-8株（ATCC #CCL 244）を用いた。0.2%重炭酸ナトリウム、10%ウマ血清、1mMピルビン酸ナトリウム、0.1g/Lカナマイシンを添加したRPMI1640培地からなる維持培地にて培養し、トリプシン処理で培養容器から回収し、細胞濃度が 2.5×10^5 個/mlとなるように新鮮な増殖培地に懸濁して、予めゼラチンでコートした96穴マルチプレートに200μLずつ分注し、炭酸ガス培養器内で24時間培養した。培養後のマルチプレートの培地を除去し、4%ホルマリンを添加したリン酸緩衝液からなる固定液を100μlずつ分注して、室温で2時間反応させて固定した。固定後の各ウェルより固定液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、被検試料3を各々100μlずつ分注し、炭酸ガス培養器内で90分間培養した。培養後の各ウェルより被検試料を除去し、リン酸緩衝液で2回洗浄した。洗浄後の各ウェルに、1%ウシ血清アルブミンと0.002%Tween20（商標）を添加したリン酸緩衝液からなるブロッキング液を100μlずつ分注して、室温で1時間反応させてブロッキングした。ブロッキング液を除去し、一次処理溶液を33μlずつ分注して、室温で1時間反応させた。一次処理溶液は、米国Waterborne Inc.より購入したフルオレセイン標識抗体（商品名Sporo-G10）を前記したブロッキング液で20倍に希釈した溶液を用いた。反応後の各ウェルから一次処理溶液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、二次処理溶液を33μlずつ分注して、室温で1時間反応させた。二次処理溶液は、米国Amersham-Pharmacia Biotech社より購入した抗フルオレセイン抗体（ペルオキシダーゼ標識物）を前記したブロッキング液で300倍に希釈した溶液を用いた。反応後の各ウェルから二次処理溶液を除去し、リン酸緩衝液で3回洗浄し、過ホウ酸ナトリウム添加リン酸クエン酸緩衝液（米国Sigma社より購入）で1回洗浄した後、発色溶液を100μlずつ分注して、室温で1時間反応させて発色させた。発色溶液は、OPD [o-phenylenediamine dihydrochloride]（米国Sigma社）を発色試薬として0.4mg/mlとなるように過ホウ酸ナトリウム添加リン酸クエン酸緩衝液（Sigma）に溶解したものを用いた。発色反応後のマルチプレートは、マイクロプレートリーダー（バイオラド社製 モデル550）を用いて、波長595nmをリファレンスとして波長450nmの吸光度を測定した。

【0029】結果を図3に示す。被検試料3に関する本発明の評価結果を実施例として印で示した。また、従来法（A. Joe et al. (1998) "Attachment of Cryptosporidium parvum sporozoites to Human Intestinal Epithelial Cells" Infection and Immunity, vol.66, N 0.7, p3429）として報告されている評価結果を比較例と

して黒三角印で示した。なお、比較例においては、予め精製した感染性虫体を培養細胞へ接種する方法である。本実施例では検出限界を明確にするために、実施例および比較例のそれぞれの計測結果に基づいて算定した飽和吸光度を100%とし、原虫類を添加しなかった場合の吸光度を0%とした時の相対値を算出して比較した。図3では横軸に原虫オーシスト添加量を、縦軸に前記した吸光度の相対値をプロットした。図より明らかなように、比較例においては 10^4 から 10^8 個の範囲、特に 10^5 から 10^7 個の範囲で定量検出できる可能性がある。これに対し、実施例においては 10^2 から 10^5 個の範囲で定量検出できた。よって本発明では検出限界の上限値は従来法よりも3桁低いものの、下限値が従来法に比べて2桁低いことから、本発明によって検出感度が100倍高くすることができた。さらに、従来法で必須であった前処理工程、すなわち、培養細胞へ原虫を接種するに先だって脱囊とそれに続く感染性虫体を精製する工程を省いても感度よく生育活性を評価することができた。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、供試試料中の生育活性のある原虫オーシストの濃度を容易に定量評価できる。*

*原虫汚染が懸念される河川水や湖沼水など自然水については、混入濃度が低い場合には凝集沈澱やろ過分離などによって濃縮した試料を調製すれば、当該試料中の生育活性のある原虫オーシストの濃度を容易に定量評価できる。

【0031】また、原虫汚染が懸念される汚泥や糞尿については、好適な方法によって原虫オーシストを分離・抽出した試料を調製すれば、当該試料中の生育活性のある原虫オーシストの濃度を容易に定量評価できる。さらに、本発明によれば、上・下水道分野や食品産業分野等で開発が進められている消毒技術を始めとした種々の原虫対策技術の性能を評価することができる。

【図面の簡単な説明】

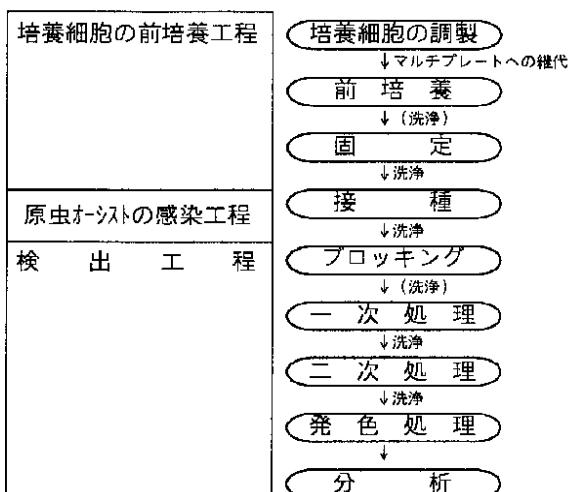
【図1】図1は、本発明における原虫類の検査方法のフローを示す。

【図2】図2は、既知濃度のクリプトスピリジウムのオーシスト懸濁液についての本発明の定量法による評価結果であり、オーシスト濃度と吸光度の相関関係（検量線）を示す。

【図3】図3は、従来技術に比較した本発明に係る定量法の高い検出感度を示す。

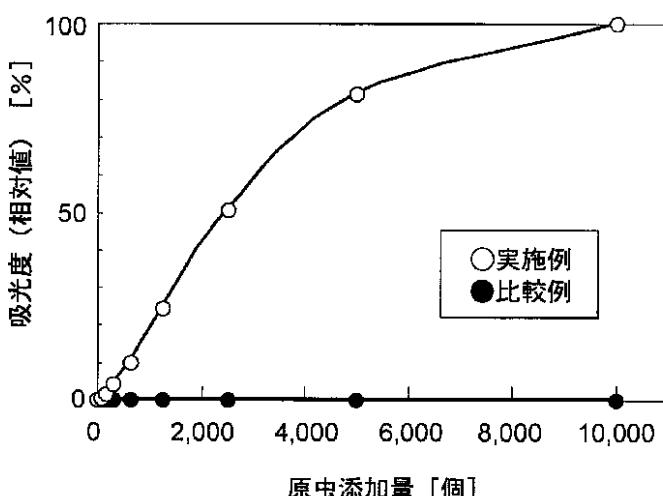
【図1】

図1

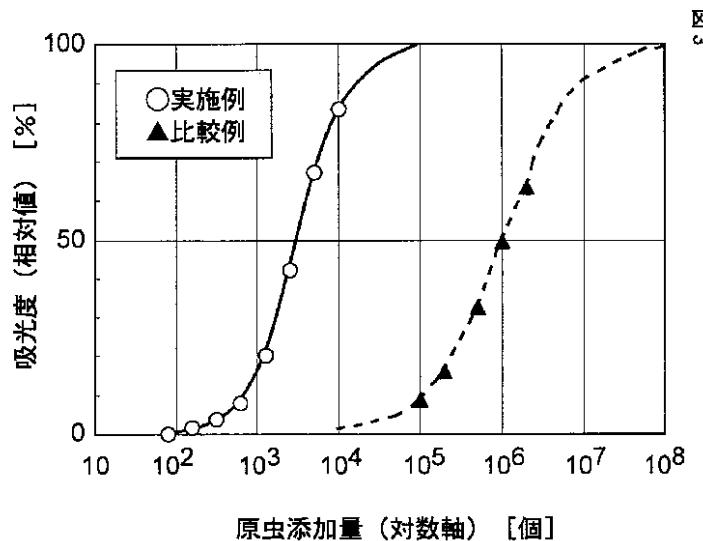


【図2】

図2



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷
C 12 R 1:90)

識別記号

F I
C 12 R 1:90)

テ-マコ-ド[®] (参考)

(72) 発明者 三木 理
千葉県富津市新富20-1 新日本製鐵株式
会社技術開発本部内

(72) 発明者 伊藤 公夫
千葉県富津市新富20-1 新日本製鐵株式
会社技術開発本部内

F ター-ム(参考) 4B063 QA01 QQ05 QQ18 QR02 QR48
QR51 QR77 QS11 QS24 QS28
QS33 QS36 QX01

专利名称(译)	评估原生动物寄生虫生长活性的方法		
公开(公告)号	JP2002221524A	公开(公告)日	2002-08-09
申请号	JP2001017261	申请日	2001-01-25
申请(专利权)人(译)	新日本制铁株式会社		
[标]发明人	加藤敏朗 小野芳朗 三木理 伊藤公夫		
发明人	加藤 敏朗 小野 芳朗 三木 理 伊藤 公夫		
IPC分类号	G01N33/569 C12Q1/06 C12R1/90 G01N33/533 G01N33/535		
FI分类号	G01N33/569.A C12Q1/06 G01N33/533 G01N33/535 C12R1/90		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ05 4B063/QQ18 4B063/QR02 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS11 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种无需显微镜就可以容易，准确地定量和评估卵囊的囊泡性的方法，作为评估原生动物卵囊生长活性的方法。解决方案：将包含卵囊的测试样品与培养的细胞接触，然后进行囊泡化，并通过免疫学方法检测和定量附着在培养细胞表面的感染性蠕虫的数量。因此，可以定量地评价在试验样品中保留了可囊泡性，即具有生长活性的卵囊的数量。

