〔技術資料〕

全自動細胞解析装置(イメージアナライザー)による コクシジウム生ワクチン中のオーシスト数の計数に関する検討

野牛一弘、小池良治、山本篤、永井英貴

（受付：平成 25 年 4 月 24 日受付、平成 26 年 9 月 22 日受理）

〔TECHNICAL REPORT〕

Study on counting the number of Oocysts in coccidium live vaccines by Automated cell analysis device（Image Analyzer）.

Kazuhiro YAGYU, Ryoji KOIKE, Atsushi YAMAMOTO and Hidetaka NAGAI

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,

1-15-1, Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan

（Recieved : April 24, 2013 ; Accepted : September 22, 2014）

Summary

Automated cell analysis device（Image Analyzer）(Array SCAN VTI system: Thermo Tec. Co. Ltd.） is a useful device for analyzing cells. In this study, we investigated this device whether can be used for the content test of Coccidium live vaccine.

In the content test of coccidium live vaccine, the number of oocysts in a vaccine must be counted. Although the numbers of oocyst which were counted by Image Analyzer were a few differences with the numbers which were inspectors counted, But, imagings by Image Analyzer showed the good selection of oocyst from contaminants in vaccines.

And, in the three and the four strains mixture vaccines, oocysts were divided into two groups with a boundary 25um and 30um major axis of oocyst, respectively. Therefore, in these two vaccines, the number of ooysts of more than 25um and 30um major axis must be counted, respectively.By Image analyzer, histograms of the major axis of oocysts in both three and four strains vaccines showed that oocysts are divided into two gloups with a boundary 30um major axis. Therefore, the number of oocyst in three or four strains mixed vaccines must be counted with a boundary 30um major axis of oocyst by Image Analyzer.

Although the additional studies will be needed, the results of this study shows the possibilities of the potential application of Image Analyzer in the content test of coccidium live vaccine.

要旨

現在承認されているコクシジウム生ワクチンには、鶏コクシジウム感染症(ネカトリックス)生ワクチン、鶏コクシジウム感染症(アセルブリナ・テネラ・マキシマ)混合生ワクチン及び鶏コクシジウム感染症(アセルブリナ・テネラ・マキシマ・ミチス)混合生ワクチン(以下それぞれ「ネカトリックス」、「３種混合」及び「４種混合」とする。)の計３製剤がある[1)]。これらのワクチンではオーシスト含有量試験があり[2)]、ワクチン中の胞子形成オーシスト数が計数されている。また、３種及び４種混合では、それぞれ長径 25 μｍ以上及び長径 30 μｍ以上のオーシスト数の規格がある。

現在、コクシジウム生ワクチンのオーシスト数は、透過型光学顕微鏡で、プランクトン計算盤等を用いて、肉眼で計数している。今回我々は、全自動で試料の撮影・測定・画像解析が可能な落射型蛍光顕微鏡である全自動細胞解析装置(イメージアナライザー)を用いたオーシスト数の計数を検討したので報告する。

材料及び方法

今回の試験には、検定を終了した有効期間内の４ロット（ネカトリックス及び３種混合は各１ロット、並びに、４種混合は分注区分(原液は共通)のＡ及びＢの２ロット）のワクチンを試料として用いた。また３種混合においては、混合前のオーシスト原液も、試料として用いた。

計数には、サーモ社のアレイスキャンＶ^{TI}システム(以下「イメージアナライザー」とする)を用いた。

イメージアナライザーでの計数は、96 ウェルマイクロプレート（96 マイクロウェルオプティカルボトムプレート・カバーグラスボトム，Nunk 社)の８ウェルに、１ウェルあたり試料 0.1 ｍＬずつ入れ、10 分間以上静置してから行った。

イメージアナライザーは、ウェルの中心から螺旋状に、１視野を１フィールドという１辺 512 ピクセルの大きさの正方形の単位で順次撮影する（図１）。１ピクセルの長さは、今回の撮影設定では 1.29 μｍとしたため、１フィールドの面積は 436233.8304 μｍ^{2}となる。一方、試験に使用した 96 ウェルプレートの１ウェルの直径は 6450 μｍであるので、その面積は π × 3225 μｍ^{2}である。そのため、１ウェルのフィールド計数値の平均に(π × 3225 ^{2})／ 436233.8304 ≒ 74.9 を乗じたものが、イメージアナライザーによる試料 0.1 ｍＬ当たりのオーシスト数となる。なお、ウェルのエッジがフィールドにかかる領域では適正な計数ができないことから、フィールドがエッジにかからないよう、計数するフィールド数を調整した。

また、当該イメージアナライザーは可視光と蛍光光源の両方が使えることから、どちらの光源を採用するかを検討した。

計数に用いるプログラムは、アレイスキャンに添付されている Morphology Explorer BioApplication を用いた[3)]。当該プログラムは、選択用パラメーター値を入力することにより、試料中の目標物を夾雑物から区別して認識することを可能としたものである。この選択用パラメーターは、単に大きさのみを対象としたものではなく、円形度

や蛍光強度など数多くの形態学的特徴が設定できるようになっている。当該パラメーター値の設定は、オペレーターが自由に変更できるようになっているが、撮影した画像においてオーシストと思われるものをクリックして選択することにより、コンピューターが自動的に選択用パラメーター値を設定することも可能である。今回我々は、数十枚のワクチンの画像を用いて、オーシストの選択操作を繰り返すことにより、オーシストが適正に選択される値を設定した。

成績

【光源の選択】

可視光及び蛍光光源を用いた場合の３種混合の画像を図２に示す。コクシジウムワクチン中にはオーシスト以外のゴミ様不純物が混入しており、可視光で観察した場合、このゴミ様不純物を排除するためのパラメーターの設定が非常に難しく、認識ミスがおこることが想定された。一方、蛍光光源で観察すると、当該不純物の蛍光は非常に弱く、オーシストが背景と際立って区分されるため、計数は蛍光光源を用いて行うこととした。

【イメージアナライザーにおけるパラメーター値の設定とオーシストの選択確認】

今回のパラメーターの設定でオーシストを選択した画像を写真１に示す。青線で囲まれたものが選択された対象、オレンジ線で囲まれたものが計数から排除された対象である。今回の設定では、試料の状態等によりまだ若干のオーシスト認識ミスがあるのが確認できたが、大きな認識ミスとは思われなかった。

【オーシスト計数のためのワクチンの希釈倍数の設定】

計数過程で作成されるフィールドの画像を精査すると、３種混合の未希釈で計数した場合、オーシストの重複や凝集により認識ミスがかなり認められた。そこで、1フィールドあたりの平均総オーシスト数を、未希釈と 10 倍希釈で比較すると、未希釈では 2.7×10^{2} 個、10 倍希釈の 10 倍値では 3.7×10^{2} 個となり、未希釈では 10 倍希釈より計数値が低くなることが確認された。そのため、３種混合の計数には 10 倍希釈を用いることとし、他のワクチンについても３種混合の 10 倍希釈に近い画像が得られるように、ネカトリックスでは未希釈、４種混合では 10 倍希釈を用いた。

【フィールド単位でのオーシスト計数値の変動とワクチン希釈値の設定】

オーシストの計数において安定した成績を得るためには、各ウェルに均一にオーシストが分布しているか否かの確認が必要である。そこで、計数する８ウェルにおいて、フィールド単位でのオーシスト計数の変動について検討した。

図３は、各ウェルにおいて計数したフィールドのオーシスト計数値を表したものである。各フィールドのオーシスト計数値の変動は大きく、特定の１フィールドのみを用いて総オーシスト数を推定することは不適当であると考えられた。また、同様の比較を25μｍ以上のオーシスト数についても行ったが、前述同様に変動が大きく、特定の１フィールドのみを用いるのは不適切であると思われた。

以上の成績から、計数するフィールド数が少ないと計数値の変動がおこりうる可能

性が高いことから、計数方法としては、1ウェルあたりの計数フィールド数を可能な限り大きくし(少なくとも 25 以上)、8ウェルを計数し、各ウェルのオーシスト数の平均値を未希釈で計数するネカトリックスでは 10 倍、及び、10 倍希釈で計数する3種及び4種混合では 100 倍を1ｍＬ当たりのオーシスト数とした。

【ワクチン中のオーシスト計数値】

イメージアナライザー、薬検(肉眼)及びメーカー(肉眼)における計数値を表 1 に示した。ネカトリックス及び3種混合におけるメーカー（肉眼）による計数値は、メーカーの了承が得られなかったので示していない。

ネカトリックス及び3種混合では、メーカー(肉眼)（データ未記載）と薬検(肉眼)の成績は、総オーシスト数及び 25 μｍ以上のオーシスト数のいずれにおいても近似していた。一方、イメージアナライザーの計数値は肉眼の計数値より高く、特にネカトリックスや3種混合の 25 μｍ以上のオーシスト数では約2倍であった。

一方、4種混合の総オーシスト数では、ロットＡでは薬検(肉眼)での計数値はメーカー（肉眼）の計数値より若干低く、逆に、ロットＢでは高かった。また、30 μｍ以上のオーシスト数ではいずれのロットでも、薬検（肉眼）のほうがメーカーより計数値が高かった。他方、イメージアナライザーの計数値は、30 μｍ以上ではメーカー(肉眼)の計数値と近似していたが、総オーシスト数ではメーカー(肉眼)の計数値より低かった。当該ロットの可視光の画像精査では、30 μｍ以下の不純物（無蛍光又は弱蛍光）が多数認められていた。

【各ワクチンにおける長径別ヒストグラム】

イメージアナライザーは対象物の大きさの分布もヒストグラムで視覚化できることから、各ワクチンのオーシストの長径の分布について検討した。

3種混合におけるオーシストの大きさのヒストグラムは 30 μｍを境にして長径 14 ～ 30 μｍと 30 ～ 46 μｍの2群に分かれた（図４）。3種混合の計数において、25 μｍ以上(赤矢印)のオーシストを計数すると、長径の短い群に所属するオーシストをかなり計数していることが明らかとなった。そこで、3種混合の場合、長径が 25 μｍ以上で計数することが適切か否かを確認するため、3種混合の構成成分の各オーシスト原液別に長径のヒストグラムを調べた。図5のヒストグラムは各オーシストの原液別に長径を測定したヒストグラムを重ね合わせたもので、表は各原液の総オーシスト数における長径 25 μｍ以上又は 30 μｍ以上オーシストの割合を示したものである。ここで、各オーシスト群における長径 25 μｍ以上の大きさのオーシストの割合は、マキシマでは 97.7 %と高率ではあるが、テネラでも 55.3 %とテネラ群の半数以上がこの領域に存在した。一方、各オーシスト群における長径 30 μｍ以上の大きさのオーシストの割合を確認すると、マキシマでは若干下がって 93 %となるが、依然、群の大半がこの領域に存在することが確認されたが、長径の短い群に属するテネラやアセルブリナでは、それぞれ 4.4 %及び 0.8 %となりこの領域にほとんど存在しないことが確認された。また3種混合を、長径 30 μｍ以上の設定のイメージアナライザーで計数すると、計数値は 4.4×10^4 個となり、

メーカー(肉眼)(データ未記載)や薬検(肉眼)での計数値(表１)に近くなった。

４種混合の場合は３種混合よりも不純物が多く(図６)、可視光ではいくつかのフィールドでそれらの不純物を計数してしまったが、蛍光を用いると、不純物は前述したように蛍光を発しない又は弱い場合が多く、計数が可能となった。計数を行った分注区分であるＡ及びＢロットのヒストグラムは長径 30 μｍを境として２群に分かれ、両ロットはほぼ同一のヒストグラムパターンを示した。

ネカトリックスにおいても、可視光では試料中に不純物がかなり認められた(図７)。また、長径のヒストグラムにおいて、当該ロットは２群に分かれた。

考察

今回の成績から、イメージアナライザーによるコクシジウムワクチンのオーシストの計数は蛍光光源を用いることにより可能であることが示された。また、当該機器による計数は、計数対象を多く設定できることから計数値の区間推定が行えることや、ワクチン中のオーシストの長径のヒストグラムパターンを確認することも可能であること、並びに、測定がプログラムに沿って行われることから、測定者の相違による影響が少ないと考えられること等から、現在の方法より優れたコクシジウムワクチン品質管理試験法であるといえる。

また今回の成績では、イメージアナライザーによる総オーシスト数の計数は、３種混合では肉眼で計数した値より若干高く、また、ネカトリックスの総オーシスト数及び３種混合の長径 25 μｍ以上では、肉眼で計数した値よりかなり高い値であった。この原因について、今後多数のワクチンを用いて比較検討をしないと明確とは言えないが、ネカトリックスの場合は、イメージアナライザーの画像記録の再確認ではオーシストと不純物の認識ミスは非常に少ないと考えられることから、肉眼での計数ではオーシストを不純物と判断して計数から外している可能性があると考えられた。一方、３種混合の長径 25 μｍ以上のオーシストの計数の場合、①肉眼で計数する場合、１つ１つのオーシストの大きさを正確に計測して計数するわけではなく、相対的な大小で区別して計測していること、②３種混合におけるオーシストは 30 μｍで明確に大小の２群に分かれることがイメージアナライザーの成績において確認されていること、③イメージアナライザーを長径 30 μｍ以上で設定し計数すると、肉眼で計数した値に類似すること、以上のことから、３種混合における長径 25 μｍ以上のオーシスト計数において、肉眼による計数値がイメージアナライザーによる数数値より低くなった原因は、肉眼による計数では、長径 25 μｍ以上のオーシストではなく、長径 30 μｍ以上のオーシストを計数していたためであると類推された。

ここで、３種混合における 25 μｍ以上のオーシストの計数は、マキシマのみのオーシスト数の計数を目的としたものである。しかし、３種混合ワクチンに含まれる株別の長径分布のヒストグラムから、イメージアナライザーで長径 25 μｍ以上のオーシストを計数すると、マキシマ以外にテネラのオーシストもかなり計数すると推測された。一方、設定を長径 30 μｍ以上に

すると、マキシマ群の大半がその領域に存在し、かつ、テネラやアセルブリナはその領域にほとんど存在しない。これらのことから、３種混合のオーシスト含有量試験におけるマキシマのオーシストを目的とした計数は、25 μｍ以上ではなく 30 μｍ以上で計数することが必要と思われた。

ネカトリックスにおいては、１種のみのオーシストワクチンであることから、長径のヒストグラムは１峰であると予測されたが、今回の計測では２峰が認められ、当該ロット中には大きさの異なるオーシスト群の混在が類推された。今後精査する必要があるかもしれない。

４種混合においては、薬検（肉眼）及びメーカー(肉眼)のいずれにおいても、総オーシスト計数値がイメージアナライザーの計数値より高くなっていた。この原因は明確ではないが、肉眼による長径 30 μｍ以上のオーシスト計数値では、イメージアナライザーによる計数値と比較的類似すること、また、当該ワクチン中には 30 μｍ以下の蛍光を発しない不純物が多いことから類推すると、肉眼では不純物の一部をオーシスト数として計数したため総オーシスト計数値が高くなったか、イメージアナライザーでは一部のオーシストを不純物(無蛍光又は弱蛍光)として計数しなかった可能性もあり、今後精査する必要があると思われた。

今回の試験においてはまだ試験ロット数も少なく、イメージアナライザーのプロトコールにおけるパラメーターの設定も完全ではないが、今回の設定で計測しても、同じ原液で製造された分注区分の２ロット間のヒストグラムがほぼ同等となったことから、イメージアナライザーを用いたオーシストの選択計測は非常に再現性が高いことが明らかである。今後さらに試験例数を増やし、より完成度の高いパラメーターの設定を検討してゆく予定である。

参考文献

１）永井英貴（２０１１）日本で使用されている動物のワクチン（XIX）　鶏用ワクチンの概説 11 鶏コクシジウム感染症（生ワクチン），日本獣医師会雑誌 **64,**765-768.

２）動物用生物学的製剤基準

３）*Cellomics® Morphology Explorer BioApplication Guide*, V4 version.

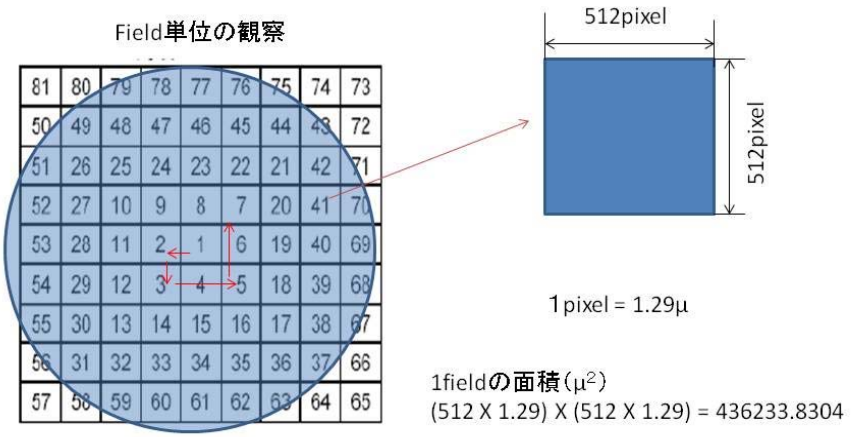


図1．イメージアナライザーにおける撮影フィールド

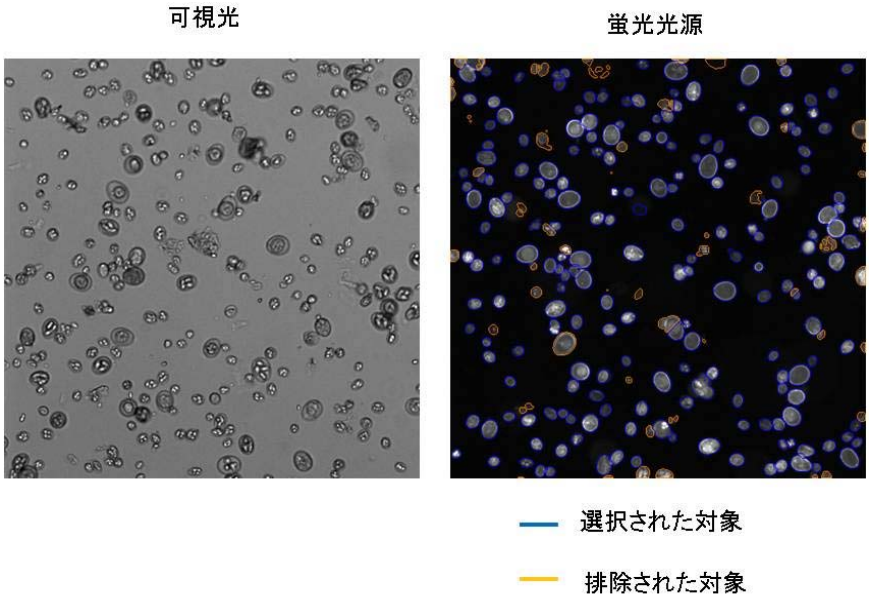


写真1．3種混合の可視光画像と蛍光光源におけるオーシスト選択画像

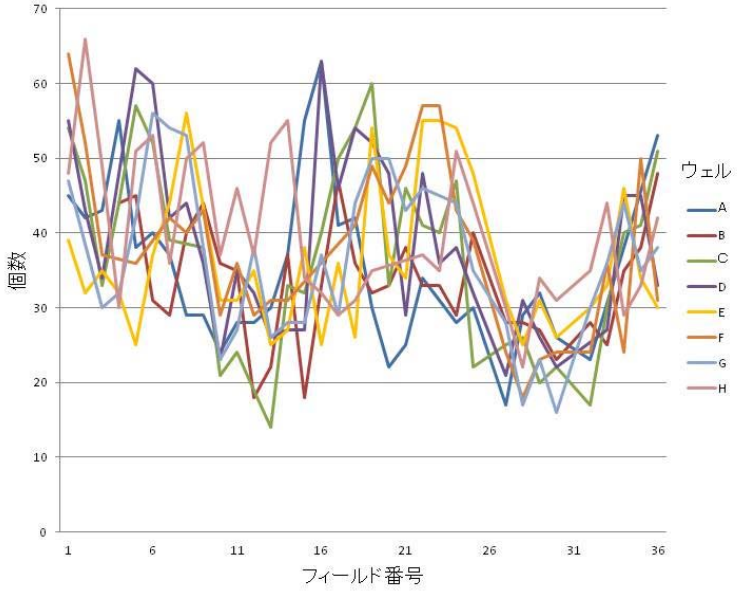


図2．8ウェル（A～H）における各フィールドの総オーシスト測定数

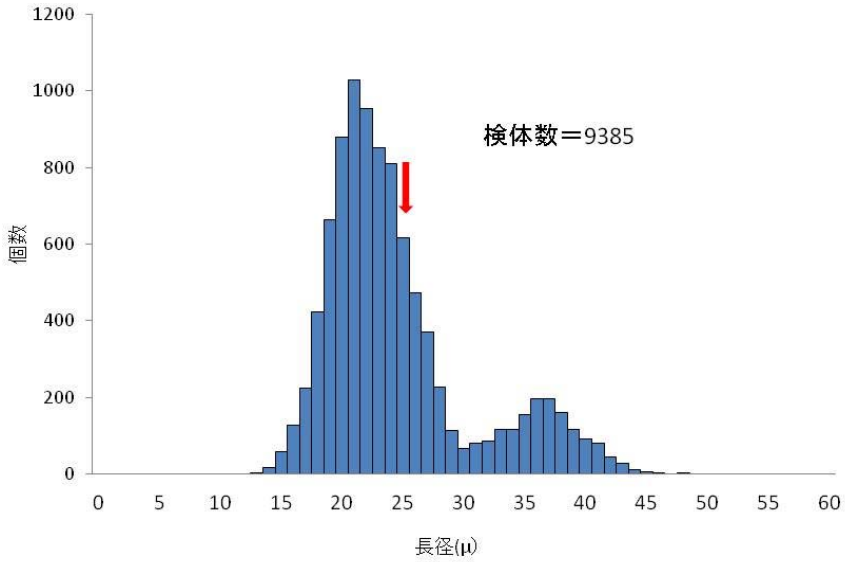
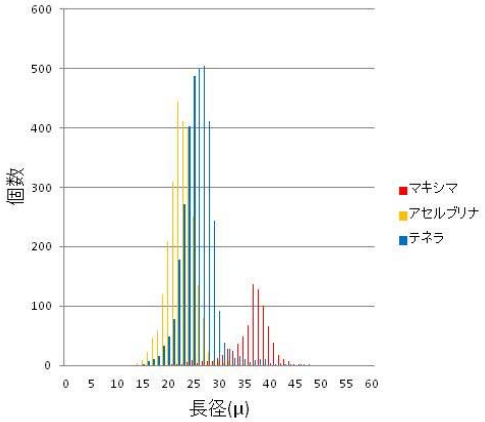


図3．3種混合中のオーシストの長径のヒストグラム



株名	25μ以上が占める割合（%）	30μ以上が占める割合（%）
マキシマ	97.7	93.0
アセルブリナ	10.6	0.8
テネラ	55.3	4.4

図4．　3種のオーシストのヒストグラムと各オーシスト群において25μ又は30μ以上のオーシストが占める割合

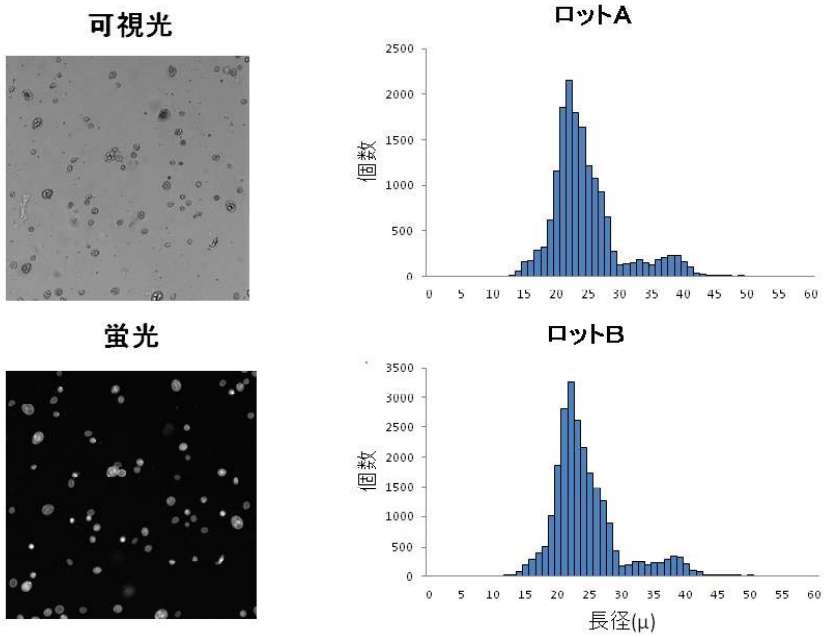


図5．4種混合の可視光及び蛍光画像と長径のヒストグラム

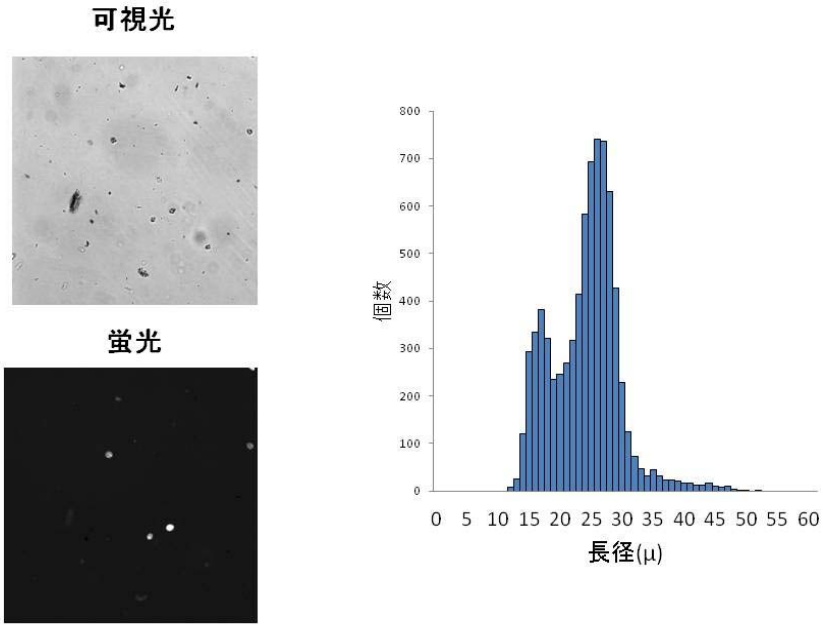


図6. ネカトリックスの画像と長径のヒストグラム

表1. イメージアナライザーとヒトによるオーシスト計数値(個/mL)の比較

ワクチン		総オーシスト数			25又は30μ以上の数		
		イメージ	薬検(肉眼)	メーカー(肉眼)	イメージ	薬検(肉眼)	メーカー(肉眼)
ネカトリックス		2.1±0.2* X 10^4	1.05X10^4	NS**			
3種混合		2.8±0.1 X10^5	2.2X10^5	NS	8.1±0.2 X10^4	3.65X10^4	NS
4種混合	ロットA	4.9±0.3 X10^5	5.7X10^5	7.6X10^5	5.8±0.2 X10^4	6.3X10^4	5.9X10^4
	ロットB	6.9±0.1 X10^5	1.2X10^6	8.0X10^5	8.1±0.1 X10^4	1.1X10^5	7.0X10^4

* :95%信頼限界
**:未表示