

別添 3 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法

概 要

本試験方法は水中に存在するクリプトスポリジウムのオーシストを精製・濃縮し、蛍光抗体染色により検出するためのものである。試験はオーシストの捕捉・濃縮、選択的な分離・精製、蛍光抗体染色、顕微鏡観察の諸工程からなり、顕微鏡下で蛍光を発する粒子の寸法、外部、内部形態に基づいてオーシストを検出・計数する方法である。

留意事項

一般に、水源水、水道原水、沈殿水等には多種多様の無機物、有機物、微生物等が存在している。水道水中にもその一部や浄水用薬品の反応生成物等が混入している。試料によっては、それらの物質がクリプトスポリジウムオーシストの検出を妨害することがある。特に、一部の藻類は大きさ、形態等がオーシストに酷似しており、それらが蛍光抗体試薬と交叉反応などにより偽陽性を示し、オーシストとの判別が困難となることが知られている。

本試験方法の作成に当たっては、使用可能と考えられる複数の方法について併せて採用することとし、

- 2 水試料からの懸濁粒子の捕捉・濃縮については、
 - 2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法
 - 2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法
 - 2.3 親水性 PTFE メンブレンフィルター法
 - 2.4 その他の捕捉・濃縮法
 - 2.4.1 ポリカーボネートメンブレンフィルター法
 - 2.4.2 カートリッジフィルター法
 - 2.4.3 遠心沈殿法
- 3 オーシストの選択的な分離・精製については、
 - 3.1 密度勾配遠沈法(浮遊法)
 - 3.2 免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)
- 4 蛍光抗体染色については、
 - 4.1 直接蛍光抗体染色法
 - 4.2 間接蛍光抗体染色法

を並列的に記載した。また、以下の項目を付記した。

付録 1 精度管理のためのオーシスト添加実験

付録 2 顕微鏡の取扱い

付録 3 顕微鏡観察における蛍光フィルター選択と観察上の注意

[参考] 検査室におけるクリプトスポリジウムの感染防止方法

このうち、「標準的方法」(2.1、2.2又は2.3と、3.1及び4.1等を組み合わせた方法)については、すべての試験操作等を確定的に記述した。しかしながら、検出の原理を損なわず、かつ回収率を損なわないことが確実であるか、あるいは一層の改善が得られることが

明らかな場合は、必要に応じて適宜、部分的な変更や改良を加えても差し支えない。

一方、その他の方法については基本操作を記述した。必要に応じて、標準的方法との比較や添加系における回収実験等を行い、対象水に対する適切性、回収率等を確認することが適当である。

なお、検査機器等の整備に当たっては、試験の目的、対象水の水質等に応じて選択した方法に必要な試薬、器具、器材を用意すればよく、試験方法に記載されているすべての試薬、器具、器材等を用意する必要はない。

1 試料の採取

クリプトスポリジウムのオーシストは感染力が強いため、水道では低濃度でも問題になる。このため、原水、水道水ともに大量の水を採取して試験しなければならない。また、ガラス壁に付着しやすい性質があるといわれていることから、採取容器は大型のポリエチレン又はポリプロピレン製容器を用いる。

採取水量は原水で概ね 10L、水道水で 20L を標準とするが、応急対応のための検査にあつては、水道水 40L (消毒のみで給水する水道等であつて原水を対象とする場合も原水 40L) を採水場所毎に 3 試料採取し、その全量を濃縮して、濃縮物の半量を検査し、残りの半量を保存しなければならない。

1) 器具

試料容器：容量 10L または 20L のポリエチレン又はポリプロピレン製で、スクリューキャップ付きのもの。あらかじめ採水量に相当する目盛りを付しておくことよい。

2) 操作

試料水の適量を試料容器に採取し、密栓して 24 時間以内に試験室に搬入し、速やかに濃縮処理を行う。

2 懸濁粒子の捕捉・濃縮

試料水中の懸濁粒子を捕捉して濃縮する方法には、アセトン溶解性のメンブレンフィルターを用いた吸引ろ過法あるいは加圧ろ過法、親水性 PTFE メンブレンフィルター法、アセトン非溶解性のポリカーボネートメンブレンフィルター法 (吸引ろ過法又は加圧ろ過法)、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法がある。このうち、ポリカーボネートメンブレンフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法についてはいずれも知見の集積が少なく、適用できる水質や操作条件等の詳細が必ずしも十分には明らかになっていないので、基本的事項を記載するに留めた。これらの未確定な方法を採用する場合は、予備的検討を行い、適正な条件を設定する必要がある。

2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法

本法は、孔径 $1\mu\text{m}$ 付近のアセトン溶解性メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過したのち、メンブレンフィルターをアセトンにより完全溶解して除去し、残った沈渣を濃縮物として回収する方法である。高濁度試料水の場合は多量のメンブレンフィルターを要するなどの難点がある。

1) 試薬

- (1) **精製水**：イオン交換水又は蒸留水等の精製水で、クリプトスポリジウムによる汚染のないもの。
- (2) **10 倍濃度 PBS** (10 倍濃度リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：精製水約 800mL に塩化ナトリウム 80g、塩化カリウム 2g、リン酸二水素カリウム 2g、リン酸一水素ナトリウム 12 水和物 29g を溶解し、1 N塩酸または 1 N水酸化ナトリウムを用いて $\text{pH}7.4$ に調整したのち、精製水を加えて 1 L とする。
- (3) **PBS** (リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：精製水 900mL に 10 倍濃度 PBS 100mL を加えて混合する。 pH 値を確認し、必要に応じて 0.1 N塩酸又は 0.1 N水酸化ナトリウムを用いて $\text{pH}7.4$ に調整する。
- (4) **界面活性剤加 PBS** (界面活性剤添加リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：PBS 1L に Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween80 又はそれと同等のもの) 1mL を加え、混和する。
注 1) 1 M トリス ($\text{pH}7.4$)：精製水約 70mL にトリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1g を溶解し、濃塩酸(約 7mL)で $\text{pH}7.4$ に調整した後、精製水を加えて 100mL とする。
注 2) 0.5M EDTA：精製水約 80mL にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・2 水塩 18.6g を加え、さらに水酸化ナトリウム(概ね 2g 程度)を追加して完全に溶解し、 $\text{pH}8.0$ に調整する。その後、精製水を加えて 100mL とする。
- (5) **アセトン**：試薬特級
- (6) **エタノール**：試薬特級

2) 器具及び器材

- (1) 吸引ポンプ
- (2) 吸引瓶又はマニホールド(フィルターホルダーセット用)
- (3) フィルターホルダーセット(ベース、ファネル、固定金具)
- (4) トラップ用吸引瓶(ろ過水用及びアセトン廃液用)
- (5) **メンブレンフィルター**：孔径 $1\mu\text{m}$ 付近で、アセトンに完全溶解する材質のもの。
- (6) フィルター用ピンセット
- (7) 連結用チューブ
- (8) **遠沈管**：容量 15mL 又は 50mL のポリプロピレン製でスクリュウキャップ付きのもの。目盛付きのものが使用しやすい。
- (9) **遠心沈殿機**：遠心荷重 $1,050\times\text{g}$ (半径 15cm スイング型ローターで 2,500rpm に相当) が保証でき、15mL 及び 50mL 遠沈管用多本掛バスケット付きで、ブレーキの解除ができるもの。
- (10) **アスピレーター**
- (11) **パストゥールピペット又は駒込ピペット**

3) 操作

- (1) **ろ過装置の組立**：吸引ろ過装置にメンブレンフィルターをセットし、[フィルターホルダーをセットした吸引瓶又はマニホールド]—[トラップ用吸引瓶]—[吸引ポンプ]の順にチューブ等で連結する。
- (2) **ろ過**：試料水をファネルに注ぎ、吸引ポンプを用いて吸引ろ過する^{注1、2)}。試料水を全ろ過し終わったのち、試料容器に**界面活性剤加 PBS 200~300mL**を加え、強く振盪して内部を洗浄し、洗液を同様にろ過する。さらに試料容器に精製水 200~300mLを加えて内部を再度すすぎ、すすぎ液を同様にろ過する。

注1) 試料容器内の全量をろ過する。

注2) ろ過速度が遅くなり始めた時点で試料水の供給を停止してメンブレンフィルターを交換する。ろ過済みのメンブレンフィルターは乾燥させないように注意して保管する。

(3) 回収

- i) **メンブレンフィルターの溶解・除去**：ろ過に用いたメンブレンフィルターを遠沈管に入れる^{注1)}。十分量^{注2)}のアセトンを速やかに加え、スクリュキャップを強く閉め^{注3)}、直ちに強く攪拌してメンブレンフィルターを溶解した後^{注4)}、1,050×gで10分間遠心する。上清(アセトン層)を吸引除去^{注5)}した後、ガラス棒等で沈渣をよくほぐし、再び充分量^{注2)}のアセトンを加えて強く攪拌して沈渣を完全に分散させる。これを1,050×gで10分間遠心し上清を吸引除去する^{注6)}。
- ii) **アセトン除去と水和**：遠沈管内の沈渣に遠沈管容量の約1/10量^{注7)}のエタノールを加えて充分攪拌したのち、エタノールと等量のPBSを加えて再び充分攪拌する。繰り返し攪拌しながらPBSを徐々に加えて遠沈管を満した後、1,050×gで10分間遠心する。上清を捨て、沈渣をガラス棒等で丁寧にほぐした後、PBS約10mL^{注8)}を加えてよく攪拌し、1,050×gで10分間遠心して、上清を捨てる。

得られた沈渣の量が少なく顕微鏡観察に支障がない場合はそのまま **4 蛍光抗体染色**に移る。沈渣が多い場合は **3 オーシストの分離精製**を行った後、**4 蛍光抗体染色**に移る。

注1) 一度に処理するメンブレンフィルターの枚数は、15mL遠沈管の場合47mm径メンブレンフィルター5枚、50mL遠沈管の場合142mm径メンブレンフィルター2枚程度とする。

注2) 加えるアセトン量は、15mL遠沈管の場合12mL、50mL遠沈管の場合45mL程度とする。

注3) アセトンの揮発防止のため、遠沈管のスクリュキャップをしっかりと閉める。

注4) アセトンを加えたまま放置するとメンブレンフィルターが溶解しなくなり、フィルター残渣が生じる。

注5) アスピレータの使用が可能であるが、アセトン廃液は所定の廃棄物処理を行う。

注6) 沈渣にフィルター残渣が認められるようであれば、アセトンによる遠心洗浄を繰り返す。

注7) 沈渣量が多い場合は、沈渣の量に応じてエタノールを適宜増量する。

注8) 沈渣量が多い場合は、沈渣の量に応じてPBSを適宜増量する。

2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過—アセトン溶解法

本法は、2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過法と同様、孔径1μm付近のアセトン溶解

性メンブレンフィルターを用いるが、ろ過を加圧方式で行う点異なる。吸引ろ過法に比べて比較的少量の試料水をろ過できる利点がある。

1) 試薬類

2.1 1) に同じ。

2) 器具及び器材

- (1) 加圧装置：ペリスタポンプ
- (2) 加圧ろ過用フィルターホルダーセット
このほかに、2.1 2) の(4)～(11)。

3) 操作

- (1) ろ過装置の組立：フィルターホルダーにメンブレンフィルターをセットし、[試料水の入った試料容器]－[加圧装置]－[フィルターホルダー]－[ろ液受け]の順にチューブ等で連結する。
- (2) ろ過：メンブレンフィルターに瞬間的に大きな負荷がかからないよう徐々に加圧し、フィルターホルダーの安全弁を開けてチューブ内に溜まった空気を排出する。試料水があふれ出る直前に安全弁を閉じてろ過を開始し、試料容器内の試料水の全量をろ過する^{注1)}。試料水を全てろ過し終わった後、試料容器に界面活性剤加 PBS 200～300mL を加え、強く振とうして内部を洗浄し、洗液を同様にろ過する。さらに試料容器に精製水 200～300mL を加えて内部を再度すすぎ、すすぎ液を同様にろ過する。
- (3) 回収：ろ過に用いたすべてのメンブレンフィルターを集め、2.1 3) (3)回収に従って濃縮物を回収する。得られた沈渣の量が少なく顕微鏡観察に支障がない場合はそのまま 4 蛍光抗体染色に移る。沈渣が多い場合は 3 オーシストの分離・精製を行った後、4 蛍光抗体染色に移る。

注1) ろ過速度が遅くなり始めた時点で試料水の供給を停止してメンブレンフィルターを交換する。ろ過済みのメンブレンフィルターは乾燥させないように注意して保管する。

2.3 親水性 PTFE メンブレンフィルター法

本法は、孔径 5 μ m 以下の親水性 PTFE メンブレンフィルターを用いてろ過した後、メンブレンフィルターを 50ml の遠沈管に挿入し攪拌子とともに試験管ミキサーを用いて強く攪拌して、メンブレンフィルター上の捕捉物を洗い出す方法である。

1) 試薬

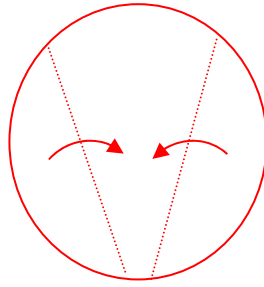
- (1) 精製水：2.1 1) (1) に同じ。
- (2) 100 倍濃度 PET (10 倍濃度ピロリン酸ナトリウム希釈液)：精製水約 800ml にピロリン酸ナトリウム 10 水塩 20g、エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム 30g、Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween80 またはそれと同等のもの) 10ml を溶解し、1N 塩酸または 1N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.4 に精製したのち、精製水を加えて 1 L とする。
- (3) 界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム希釈液 (PET)：精製水 990ml に 100 倍濃度 PET10ml を加えて混合する。

2) 器具および器材

- (1) 親水性 PTFE メンブレンフィルター：孔径 $5\mu\text{m}$ 以下、直径 142mm、または 90mm
- (2) フィルターホルダーセット（加圧ろ過の場合）
- (3) ペリスタポンプ（加圧ろ過の場合）
- (4) 吸引ポンプ（吸引ろ過の場合）
- (5) 吸引瓶またはマニホールド（吸引ろ過の場合）
- (6) 吸引ろ過用フィルターホルダーセット（吸引ろ過の場合）
- (7) 送液チューブ（加圧ろ過の場合）：内径 8mm のシリコン製
- (8) ホースバンド
- (9) フィルター用ピンセット（先端部が鋭利でないもので先が曲がったもの）
- (10) 遠沈管：2. 1 2) (8) の容量 50ml で、目盛り付きのもの。
- (11) 試験管ミキサー：出力 50W 以上
- (12) 遠心沈殿機：2. 1 2) (9) に同じ。
- (13) 攪拌子：長さ 35mm、幅 16mm、フットボール型

3) ろ過操作

- (1) 加圧ろ過の場合
 - i) 試料水に、PET 溶液を試料 1 L に 10 mL の割合で加え、よく混和する。
 - ii) フィルターホルダーのサポートスクリーン上に親水性 PTFE メンブレンフィルターを重ね、PET で全体を湿らせる。
 - iii) フィルターホルダーをセットしてチューブポンプと接続し、徐々に試料水を送る。
 - iv) 上部プレートのエアイベントを開け、ホルダー内の空気を抜きその後閉める。
 - v) ポンプのろ過速度を上げて毎分 2 L 程度に設定する。
 - vi) 試料水をすべてろ過し終わったのち、試料容器に PET を 200~300 mL を加え、強く振盪して内部を洗浄し、洗液を同様にろ過する。
 - vii) さらに試料容器に精製水 200~300 mL を加えて内部を再度すすぎ、すすぎ液を同様にろ過する。
 - viii) ろ過終了後、ポンプの電源を切り、フィルターホルダーの排水側をアスピレーターに接続して、ホルダー内の水をすべて吸引する。
 - ix) ピンセットを用いてメンブレンフィルターを下図のように折りたたみ、50 mL の遠沈管に入れる。
 - x) ろ過に数枚のメンブレンフィルターが必要な場合は、ろ過速度の低下、送液チューブの膨張などをみてメンブレンフィルターを交換する（50 mL の遠沈管には 142 mm メンブレンフィルターを同時に 3 枚まで入れることができる）。
 - xi) 回収操作に進む。



メンブレンフィルターの折りたたみ方

(2) 吸引ろ過の場合

- i) 試料水に PET を試料 1 L に 10 mL の割合で加え、よく混和する。
- ii) フィルターホルダーにメンブレンフィルターをセットし、PET で全体を湿らせる。
- iii) 試料をすべてろ過したのち、メンブレンフィルターを取り外す。
- iv) ろ過に数枚のメンブレンフィルターが必要な場合は、ろ過速度の低下などをみてメンブレンフィルターを交換する (50 mL の遠沈管には 142 mm メンブレンフィルターを同時に 3 枚まで入れることができる)。
- v) 回収操作に進む。

4) 回収操作

- (1) 遠沈管 1 に PET を 15ml 入れる。遠沈管 1 に攪拌子をいれ、回転速度を最大に設定した試験管ミキサーで遠沈管 1 を 2 分間攪拌する。(時々遠沈管を上下に振り、中のメンブレンフィルターがよく展開するようにする)。
- (2) メンブレンフィルターを 1 枚ずつピンセットで遠沈管 1 の側面に当てて水分を絞り、メンブレンフィルターと攪拌子を取り出す。
- (3) 懸濁液を新しい 50ml 遠沈管 (遠沈管 2) に移し、遠沈管 1 に攪拌子とメンブレンフィルターを戻し、洗い出し液 10ml を加え、試験管ミキサーを用いて 1 分間攪拌し、同様の操作でメンブレンフィルターを取り出し懸濁液を遠沈管 2 に統合する。
- (4) この操作を合計で 3 回繰り返す、最後に遠沈管 1 を洗い出し液 5ml でリンスし、遠沈管 2 に統合する (得られる懸濁液の総量は 50ml になる)。
遠沈管 2 を $1,050 \times g$ で 10 分間遠心濃縮し、上清を吸引除去する。

2. 4 その他の補捉・濃縮法

2. 4. 1 ポリカーボネートメンブレンフィルター法

本法は、アセトン溶解性フィルターの代わりにアセトン非溶解性のポリカーボネートメンブレンフィルターを使用する方法である。試料水の水質によってはアセトン溶解性のメンブレンフィルターに比べてろ過に時間を要する場合があるが、メンブレンフィルターからの粒子の剥離が容易であり、アセトンを使用せずに濃縮物を回収できる利点がある。

本法の採用に当たっては、予めメンブレンフィルターからの剥離・回収条件を十分検討し、適正な操作条件を設定する必要がある。

1) 基本操作

ポリカーボネートメンブレンフィルター(孔径 $2\mu\text{m}$ 以下)を用いて、**2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過-アセトン溶解法**又は**2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過-アセトン溶解法**に準じて吸引ろ過又は加圧ろ過する。ろ過したメンブレンフィルターから、超音波処理、セパレーターによる掻き取り、界面活性剤加 PBS 中での手もみ等により捕捉物を剥離させ、剥離物の全量を回収する。これを遠沈管に集め、 $1,050\times g$ で 10 分間遠心する。上清を捨て、沈渣をガラス棒等で丁寧にほぐした後、PBS 約 10mL を加えてよく攪拌し、再度 $1,050\times g$ で 10 分間遠心して、上清を捨てる。

得られた沈渣が少なく顕微鏡観察に支障のない場合はそのまま **4 蛍光抗体染色**に移る。沈渣量が多い場合は、必要に応じて **3 オーシストの分離・精製**を行った後、**4 蛍光抗体染色**に移る。

備考：超音波処理を行う場合、処理しすぎるとオーシストが破壊されることがある。また、超音波処理の過程でエアロゾルが飛散する可能性があるため、注意して操作する。

2.4.2 カートリッジフィルター法

本法は、孔径 $1\mu\text{m}$ 程度以下のフィルターを可搬型ハウジングに高密度に収納したカートリッジフィルターを用いる方法である。吸引ろ過又は加圧ろ過のいずれの方法にも使用できる。濁質の少ない水では多量の試料水が濃縮できるほか、濁質の多い試料の濃縮にも適用可能と考えられるが、現在入手可能なフィルターでは良好な回収率が得られるかどうか確認されていない。したがって、本法の採用に当たっては、予めフィルターからの剥離・回収条件を十分検討し、適正な操作条件を設定する必要がある。

1) 基本操作

カートリッジフィルターに対応した所定の方法で試料水をろ過した後、ハウジング内に誘出液を入れ、振とう等によって濃縮物をフィルターから剥離した後、その全量を回収する。必要に応じてこの操作を繰り返し、回収液の全量を $1,050\times g$ で 10 分間遠心する。上清を捨て、沈渣をガラス棒等で丁寧にほぐした後、PBS を加えてよく攪拌する。これを再び $1,050\times g$ で 10 分間遠心して、上清を捨てる。

得られた沈渣の量が少なく顕微鏡観察に支障がない場合はそのまま **4 蛍光抗体染色**に移る。沈渣が多い場合は **3 オーシストの分離・精製**を行った後、**4 蛍光抗体染色**に移る。

2.4.3 遠心沈殿法

本法は、試料水中の懸濁粒子を遠心沈殿により濃縮する方法である。遠心沈殿法により懸濁物質を回収する場合、遠心荷重(g 値)と遠心時間が重要であり、本法の採用に当たっては、オーシスト添加系等での回収実験を行って適正な操作条件を設定する必要がある。また、遠心機を停止させる際にブレーキを使用すると遠沈管内に渦流が発生して沈渣が再浮上し、回収率に影響することがあるので、遠心沈殿機はブレーキ機能を解除して自然停止できるものを使用する。

1) 基本操作

遠心機の使用 방법에合わせて、クリプトスポリジウムオーシストの沈殿が保証される条件で遠心する。上清を捨て、沈渣をすべて遠沈管に集め、十分分散したのち、PBS を加えて再

度よく攪拌する。これを 1,050×g で 10 分間遠心し、上清を捨てる。

得られた沈渣の量が少なく顕微鏡観察に支障がない場合はそのまま 4 蛍光抗体染色に移る。沈渣が多い場合は 3 オーシストの分離・精製を行った後、4 蛍光抗体染色に移る。

3 オーシストの分離・精製

懸濁粒子の捕捉・濃縮によって得られた濃縮物中に多量の夾雑物が含まれていて、そのままでは顕微鏡観察によるオーシストの確認が困難な場合に、オーシストを選択的に分離して精製する方法である。密度勾配遠沈法(浮遊法)と免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)の二通りの方法がある。

3.1 密度勾配遠沈法(浮遊法)

本法は、濃縮物を比重 1.10~1.20 の高比重液の上に載せて遠心し、オーシストを高比重液層の界面部分に集めて選択的に分離・精製する方法である。濃縮物中の比重の大きい粒子は沈渣として排除され、オーシストは水層と高比重層の界面部分に集まるので、その界面部分(絮状沈殿層:フラッフ)又は沈渣以外の全液層を回収することによってオーシストを選択的に分離濃縮することができる。しかし、生物性懸濁粒子など、高比重液層よりも比重が小さい粒子はオーシストとの分離ができず、それらを多く含む試料では必ずしも十分な分離・精製ができない。

1) 試薬類

- (1) 精製水：2.1 1) (1)に同じ。
- (2) 10 倍濃度 PBS (pH 7.4)：2.1 1) (2)に同じ。
- (3) PBS (pH 7.4)：2.1 1) (3)に同じ。
- (4) 高比重液：次の(a)、(b)のいずれかを用いる。用時に室温に戻し、液体比重計により比重を確認する。
 - (a) ショ糖液(比重 1.20)：精製水 650mL にサッカロース(C₁₂H₂₂O₁₁ FW:342) 500g を攪拌しながら徐々に加えて溶解する。
 - (b) コロイド PVP 処理シリカーショ糖混合液(比重 1.10)：精製水 45mL にコロイド PVP 処理シリカ(Percoll 又はそれと同等のもの)45mL 及び 2.5M ショ糖液 10mL(8.55g のショ糖を精製水に溶解して全量を 10mL とする)を加えて混合する。

2) 器具及び器材

- (1) 遠心沈殿機：2.1 2) (9)に同じ。
- (2) パスツールピペット
- (3) 遠沈管：2.1 2) (8)の容量 15mL で、目盛り付きのもの。
- (4) 液体比重計

3) 操作

2 懸濁粒子の捕捉・濃縮で得られた沈渣をガラス棒等で丁寧にほぐした後、PBS 約 3mL ^{注1)}を加えてよく攪拌する^{注2)}。攪拌後、直ちに試験管立てに入れてパスツールピペットにより

高比重液約 2mL を遠沈管底部にゆっくり注入して2重層とする^{注3)}。重層界面が乱れないように注意して遠心沈殿機に入れ、1,050×g で 10 分間遠心する^{注4)}。パスツールピペットを用いて、まずフラッフを回収し、新たな遠沈管 15mL(回収用遠沈管)に移す。次いで、PBS 層の全量、高比重液層上層部 1/4~1/2 程度を回収し、先の回収液に加える(1回目の回収)。

遠沈管に残った沈渣を再びガラス棒等で丁寧にはぐした後、遠沈管残液の約 4 倍量の PBS を加えてよく攪拌し、高比重液約 2mL を遠沈管底部にゆっくり注入して2重層とする。これを 1,050×g で 10 分間遠心した後、1回目の回収と同様に、フラッフ、PBS 層、高比重層上層部を回収して、1回目の回収液に加える(2回目の回収)。

この回収液の全量を染色用試料とし、**4 蛍光抗体染色**に移る。

注 1) 沈渣量が多い場合は加える PBS を適宜増量する。沈渣量が 0.5mL を超えるような多量の場合は、遠沈管 1 本当当たりの沈渣量が 0.5mL 以下になるように数本に分割して行う。

注 2) 超音波処理により沈渣中の粒子塊を破碎・分散させると回収率が改善されることがある。その際、超音波処理によるオーシストの破壊がないように十分注意する。

注 3) 攪拌後直ちに高比重液を注入する。直ちに注入できなかった場合は、必ず再度攪拌してから高比重液を加える。高比重液を加える際に、ゴム球等を用いて強制的に注入すると2層界面が乱れやすいので、ピペット先端を遠沈管最下端に付けた後、ピペットエンド(吸い口部分)をわずかに解放してゆっくり自然落下させて注入するとよい。また、パスツールピペットを抜き取る際に、ピペット先端で遠沈管内壁をなぞるようにしてゆっくり引き上げると境界面を乱さない。

注 4) 遠心後、遠沈管内に上から PBS 層、フラッフ、高比重液層が形成され、最下部に沈渣が集積している。このフラッフにオーシストが選択的に濃縮される。なお、場合によって 500×g、10 分程度の遠心処理でオーシストの回収率が向上したとの報告もある。

3.2 免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)

本法は、表面にクリプトスポリジウム特異抗体を吸着させた磁性体粒子と濃縮試料中のオーシストを選択的に結合させ、その後に磁石を用いて磁性体粒子に結合したオーシストを回収しようとするものである。この方法を用いることで、オーシストを高度に選択的に回収することができる。しかし、オーシストと免疫磁性体粒子の結合力が比較的弱いため、個々の操作に細心の注意が求められる。また、共存する懸濁粒子の量や性状によっては回収率が低下することがあるので、使用に当たっては、予め密度勾配遠沈法との比較評価や添加系での回収率の確認等を行い、試料水の水質に応じた適正な操作条件を構築する必要がある。

1) 基本操作

2 懸濁粒子の捕捉・濃縮で得られた沈渣に所定の緩衝液を加え、十分攪拌して分散^{注1)}させた後、免疫磁性体粒子を所定量加える。これを混和して免疫磁性体粒子とオーシストを結合させたのち、磁石により免疫磁性体粒子-オーシスト結合物を回収する。次いで、回収物に所定の解離液を加えて結合を解き、磁石で磁性体粒子のみを容器壁面等に固定してから液層を回収する。この回収液を精製濃縮液とし、**4 蛍光抗体染色**に移る。

なお、本法は操作の方法や条件が必ずしも確立されていないので、当面、本法を採用する場合は以下の点に十分留意する必要がある。

- (1) 操作法等については試薬キットの用法や使用上の注意に従う。
- (2) 試料中の懸濁粒子が多い試料ではオーシストの回収率が低下する傾向が認められるので、濃縮物と免疫磁性体粒子との適正な混合比を検討しておく必要がある。
- (3) 濃縮物と免疫磁性体粒子を混合する場合、オーシストと免疫磁性体粒子を効率的に接触・反応させるための工夫が必要である。特に、試料水中の懸濁物質の捕捉・濃縮過程で形成された濃縮物の塊を十分にほぐして、オーシストが良好な分散状態にあるようにしなければならない^{注1)}。また、免疫磁性体粒子と懸濁物質とを均一に混和させるように注意する必要がある。
- (4) 免疫磁性体粒子とオーシストの結合力は比較的弱いので、反応後は強い振とうや衝撃を避ける。
- (5) その他、微量の試料を散逸させないように、丁寧に扱う必要がある。

注 1) 超音波処理が効果的であるとの報告がある。

4 蛍光抗体染色

水試料の濃縮物中にはオーシスト以外の粒子が多数混在しているのが一般的であり、そのままでは夾雑物の妨害により顕微鏡観察が不可能であることから、免疫反応を利用してオーシストを特異的に染色し、顕微鏡観察を容易にする方法である。蛍光抗体染色法には蛍光標識した一次抗体のみで行う直接蛍光抗体法と、一次抗体と蛍光標識した二次抗体の2種類の抗体を使用する間接蛍光抗体染色法の二通りの方法がある。

4.1 直接蛍光抗体染色法

本法は、染色用試料をろ過して懸濁粒子をメンブレンフィルター上に捕捉し、メンブレンフィルター上のクリプトスポリジウムオーシストを FITC 標識抗-クリプトスポリジウムオーシストマウス単クローン抗体を用いて特異的に染色する方法である。

1) 試薬

- (1) 精製水：2.1 1) (1)に同じ。
- (2) メタノール：試薬特級
- (3) 抗体試薬：FITC 標識抗-クリプトスポリジウムオーシストマウス単クローン抗体。単体の抗体試薬又は試薬キットとして市販されている。
- (4) ブロッキング試薬：10%ウシ血清アルブミン加 PBS 溶液、10%カゼイン加 PBS 溶液、10%ヤギ血清加 PBS 希釈溶液など。自家調製する場合はメンブレンフィルター(孔径 2 μm 以下)でろ過して冷蔵保存する。
- (5) 10 倍濃度 PBS (pH7.4)：2.1 1) (2)に同じ。
- (6) PBS (pH7.4)：2.1 1) (3)に同じ。
- (7) 封入剤：以下の封入剤のいずれかを用いる。
 - (a) DABCO-グリセリン (セルロースアセテートメンブレンフィルター用)：グリセリン (比重 1.26) 12.6g を 60~70°C に加温し、これに DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane

又はこれと同等のもの) 0.2g を加えて攪拌・溶解する。使用時に調製するのがよい。

(b) 水性封入剤 (PTFE メンブレンフィルター用) : DABCO-PBS (PBS、p H 7.4、に DABCO 0.2g を加えて攪拌・溶解したもので、使用時に調製する) 又は市販の蛍光試料用水性封入剤 (Fluoprep またはそれと同等のもの)。

(8) エタノール段階希釈液(脱水用グリセリン加エタノール段階希釈溶液) : グリセリン、エタノール及び精製水を下記の比率で混合する。

	濃 度	30%	70%	90%
グリセリン (g)		6.3	6.3	6.3
エタノール(mL)		30	70	90
精 製 水(mL)		65	25	5

(9) DAPI 保存液 : メタノール 1mL に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 2mg を溶解する。密閉容器に入れ、遮光して冷蔵庫に保管する。

(10) DAPI 染色液 : PBS 50mL に DAPI 保存液 10 μ L を加えて混合する。本液は使用時に調製する。残った希釈液は所定の方法で廃液として処理する。

2) 器具及び器材

(1) メンブレンフィルター : セルロースアセテート又は PTFE 製で、孔径 2 μ m 以下、直径 25mm のもの。

(2) スライドグラス

(3) カバーグラス

(4) フィルター用ピンセット

(5) 恒温器 : 温度を 35~37°C に保持できるもの。

(6) 吸引瓶又はマニホールド

(7) フィルターホルダーベース : 直径 25mm メンブレンフィルター用のもの^{注1)}。

(8) 吸引ポンプ又はアスピレーター

(9) 撥水ペン

(10) マイクロピペット

(11) 湿箱 : 遮光・密閉でき、底部が平らなもの(金属製の菓子箱などで代用できる)。内部に精製水を含ませた紙等を置き、高湿度に保っておく。

注 1) 焼結ガラス製のものをを用いると、メンブレンフィルターにゆがみが生じにくい。

3) 操作

特別の留意点: 以下の操作は、途中の段階で乾燥が生じると染色不良となるので、一つの操作が終わったら速やかに次の操作に移る。一連の操作を途中で中断してはならない。

(1) 染色用試料の調製 : 2. 1、2. 2、2. 3、2. 4. 1、2. 4. 2、2. 4. 3 により回収した沈渣は PBS を加えて一定量とする。3. 1 により精製した染色用試料はそのまま使用する。3. 2 により分離精製した染色用試料は、必要に応じて PBS を加えて一定量とする。いずれも液量を読みとり、記録しておく。

(2) フィルターの調製 : メンブレンフィルターの中央に撥水ペンで直径約 15mm の円を描き、PBS で濡らす^{注1)}。フィルターホルダーのベースを吸引瓶等にセットし、弱く吸引しながら、ベース上端面を PBS でゆっくりと洗浄したのち、円を描いた面を上にして

メンブレンフィルターをホルダーベース上に載せる。吸引を停止し、少量のブロッキング試薬をメンブレンフィルターの円内全面に行き渡るように滴下し、室温で約5分間^{注2)}作用させた後、残ったブロッキング試薬を吸引除去する。除去したら直ちに吸引を停止し、速やかに(3)の操作に移る。

- (3) **染色用試料の添加**：染色用試料の適量^{注3)}、陰性対照 (PBS 液) 及び陽性対照^{注4)} (試薬キット添付又は自家調製オーシスト浮遊液) をそれぞれ個別のメンブレンフィルターに少量ずつ、円内全面に行き渡るように滴下しながら、必要に応じて弱く吸引して、ゆっくりろ過^{注5、6、7)}する。次いで、(2)の場合と同様に操作して、少量のブロッキング試薬を円内全面に行き渡るように滴下し、室温で約5分間作用^{注8)}させた後、残ったブロッキング試薬を吸引除去する (除去したら直ちに吸引を停止し、速やかに(4)の操作に移る)。
- (4) **抗体処理**：メンブレンフィルターの円外部分をフィルター用ピンセットで挟んでスライドグラス上に移し、湿箱に入れる。少量の抗体試薬をメンブレンフィルターの円内全面に行き渡るように滴下し、室温で所定の時間^{注9)}反応させる^{注10)}。反応終了5分前に DAPI 液 100 μ L を加える^{注11)}。反応後、メンブレンフィルターをホルダーベースに戻し、弱く吸引しながら、PBS 約 10mL を用いて円内全面をゆっくりとろ過洗浄する^{注12)}。
- (5) **脱水処理**：(セルロースアセテートメンブレンフィルターを用いた場合にのみ適用) エタノール段階希釈液を、エタノール濃度の低いものから順にそれぞれ約 1mL ずつ、弱く吸引しながら、円内全面をゆっくりとろ過・脱水する^{注13)}。
- (6) **封入処理**：(セルロースアセテートメンブレンフィルターを用いた場合にのみ適用)
 - i) **封入用スライドグラスの準備**：予め、清浄なスライドグラスに検体名、試料番号、その他必要事項を記載したのち、封入剤約 75 μ L をスライドグラス上に載せ、35～37°C で保温しておく。
 - ii) **封入操作**：スライドグラスの封入剤の上に、試料面を上にしてメンブレンフィルターを載せた後^{注14)}、35～37°C で約 20 分間保温する^{注15)}。スライドグラスを取り出し、メンブレンフィルター上面に封入剤約 25 μ L を滴下する。気泡を入れないように注意してメンブレンフィルターの上にカバーグラスを掛け、カバーグラスからはみ出した封入剤を拭き取る。周囲をネイルエナメル等で封じたのち、**5 顕微鏡観察**に移る。直ちに顕微鏡観察できない場合は、遮光して冷蔵保存する。
- (7) **封入処理**：(PTFE メンブレンフィルターを用いた場合にのみ適用)
 - i) **封入用スライドグラスの準備**：予め、清浄なスライドグラスに検体名、試料番号、その他必要事項を記載しておく。
 - ii) **封入操作**：スライドグラスに、試料面を上にしてメンブレンフィルターを載せた後、メンブレンフィルター上面に市販の蛍光試料用水性封入剤又は DABCO - PBS 約 25 μ L を滴下する。気泡を入れないように注意しながら、メンブレンフィルターの上にカバーグラスを掛け、カバーグラスからはみ出した封入剤を拭き取る。周囲をネイルエナメル等で封じたのち、**5 顕微鏡観察**に移る。直ちに顕微鏡観察できない場合は、遮光して冷蔵保存する。

- 注 1) 予め PBS をシャーレに入れておき、撥水ペンで円を描いた面を上にしてメンブレンフィルターを液に浮かべると、撥水ペンの線を濡らさないですむ。濡れた場合は水滴を拭き取ってからろ過する。
- 注 2) メンブレンフィルターへの抗体の非特異吸着を防ぐための処理である。この間、必要に応じてブロッキング試薬を追加し、ブロッキング試薬が常時保持された状態を保つ。
- 注 3) メンブレンフィルターのろ過能力が低下するほど多量の染色用試料を添加すると、染色や洗浄に影響するだけでなく、粒子が重なって顕微鏡観察に支障を来す。
- 注 4) 陽性試料が他の試料等に混入しないように十分注意する。
- 注 5) 強く吸引すると標本が乾燥するだけでなく、メンブレンフィルター面の捕捉に著しいムラが生じ、顕微鏡観察が妨げられる。このため、染色用試料が円内全面に渡ってゆっくろ過できる状態になるよう、極めて微弱な陰圧状態でろ過しなければならない。これができない場合は、吸引を停止した状態で染色用試料を少量ずつ円内全面に滴下した後、吸引ポンプのスイッチを一瞬入れてろ過する。
- 注 6) ろ過した染色用試料の液量を必ず記録しておく(後のオーシスト数の計算に用いる)。
- 注 7) 染色用試料中にショ糖等が含まれている場合は、PBS 約 10mL を用いて円内全面をゆっくろ過洗浄する。
- 注 8) オーシスト以外の粒子への抗体の非特異吸着を防止するための処理である。この間、必要に応じてブロッキング試薬を追加し、ブロッキング試薬が常時保持された状態を保つ。
- 注 9) 一般的に蛍光抗体法での反応時間は室温で 30 分以上必要である。試薬キットに記載された取扱方法がこれと異なる場合は、その指示に従う。
- 注 10) 時々湿箱内を開けて、メンブレンフィルター円内の抗体液の残量をチェックする。なくなるようであれば少量ずつ追加する。
- 注 11) この処理を行うと DAPI によりスポロゾイトの核が青色の蛍光を発するようになり、オーシストの判定が容易になることが多い。ただし、DAPI 液との反応時間が長すぎると夾雑物が強く染色され、オーシストの判別を妨害するようになる。
- 注 12) 円内を丁寧に洗浄する。洗浄液が円外に流れるとオーシストが流出するので、円を越えて流出しないように注意して操作する。
- 注 13) 急激にろ過すると十分な脱水が行われないので、注 5) に準じてゆっくろ過する。
- 注 14) エタノール段階希釈液 (90%) で湿った状態のメンブレンフィルターを載せる。乾燥させてはならない。また、メンブレンフィルターとスライドガラスの間に気泡を入れないように留意する。
- 注 15) この過程でメンブレンフィルターが透明化する。
- 備考 : 陽性対照のオーシストが他の標本に混入しないよう操作の全体を通して注意する。また、マイクロピペットの先端をメンブレンフィルターに触れさせないように十分注意し、標本中のオーシストの剥離を避ける。

4.2 間接蛍光抗体染色法

本法は、染色用試料をろ過して懸濁粒子をメンブレンフィルター上に捕捉し、メンブレンフィルター上のクリプトスポリジウムを一次抗体(抗-クリプトスポリジウムオーシストマウ

ス単クローン抗体)と特異的に反応させたのち、FITC 標識二次抗体 (抗 - マウス免疫抗体ウサギ抗体) を加えて一次抗体と反応させることにより、クリプトスポリジウムを FITC で標識する方法である。

1) 基本操作

- (1) 一次抗体を用いて 4.1 3) の (1) ~ (4) に準じて一次抗体処理を行う。
- (2) **標識二次抗体処理** : メンブレンフィルターをスライドガラスに移して湿箱に入れ、少量の標識二次抗体試薬をメンブレンフィルターの円内全面に行き渡るように滴下し、室温で所定の時間^{注9)} 反応させる。反応終了 5 分前に DAPI 液 100 μ L を加える。メンブレンフィルターをホルダーベースに戻し、弱く吸引しながら、PBS 約 10mL を用いて円内全面をゆっくりとろ過洗浄する。(セルロースアセテートメンブレンフィルターの場合は、洗浄後速やかに 4.1 3) の (5) 及び (6) の操作に移る。PTFE メンブレンフィルターの場合は、洗浄後速やかに 4.1 3) の (7) の操作に移る。)

5 顕微鏡観察

蛍光抗体法で染色した顕微鏡標本を蛍光顕微鏡及び微分干渉顕微鏡により観察し、特異蛍光を発する粒子の寸法、外部及び内部形態を精査してクリプトスポリジウムオーシストを検出する。検出したオーシストを顕微鏡標本ごとに計数する^{注1)}。

注 1) 添付の測定結果調査票に記録する。

1) 試薬及び器材

- (1) 油浸オイル
- (2) 顕微鏡 : 蛍光装置と微分干渉装置付き。20 倍、40 倍及び 100 倍の対物レンズ付き。
- (3) ミクロメーター : 接眼スケール又はその他の計測機器を付属すること。
- (4) レンズペーパー

2) 顕微鏡観察の手順

- (1) **陰性対照標本の観察** : 陰性対照標本を 3) 観察方法に従って検査し、標本中にクリプトスポリジウムオーシストが一切検出されないことを確認して (2) 陽性対照標本の観察へ移行する。万一、標本中にオーシストが検出されるようなことがあれば標本作製の過程でなんらかの操作ミス (オーシストの混入など) があったものと判断してその時点で試験を中止し、作製した標本をすべて廃棄する。原因を究明した上で試験をはじめからやり直す。
- (2) **陽性対照標本の観察** : 陽性対照標本を 3) 観察方法に従って検査し、標本中のクリプトスポリジウムオーシストが FITC の特異蛍光を示していること、及び大半の夾雑物、又は標本のある部分が一面に特異蛍光を発するなどの異常が認められないことを確認して (3) 検査試料の観察に移行する。万一、標本中のオーシストが FITC の特異蛍光を示さない場合、オーシストが検出されない場合、又は上記の異常が認められた場合には標本作製の過程でなんらかの操作ミスがあったと判断してその時点で試験を中止

し、作製した標本をすべて廃棄する。原因を究明した上で試験を始めからやり直す。

- (3) 検査用顕微鏡標本の観察：3) 観察方法に従って検査し、オーシストの有無とその数を数える。

3) 観察方法

- (1) 低倍率による FITC の蛍光観察：光源はB励起を選択し、20 倍の対物レンズを用いて FITC の特異蛍光（緑色）を示す $5 \mu\text{m}$ 程度の粒子を探す。粒子が検出されたらその都度(2)高倍率での観察に移る。標本中に特異蛍光を示す粒子が検出されなければ陰性と判断し、観察を終了する。

- (2) 高倍率での観察：必要に応じて 40 倍～100 倍の対物レンズを用い、B 励起（FITC の蛍光観察）、UV 励起（DAPI の蛍光観察）、及び微分干渉装置を用いて粒子のサイズを測定し、染色性や微細構造等を詳細に観察する。形態観察の要点を i)～iv)に示すが、標本の状態によって観察できる微細構造は限られることが多い。なお、蛍光の減衰を考慮して、蛍光顕微鏡観察は手際よく行う必要がある。

i) 一般的特徴：クリプトスポリジウムのオーシストは類円形で、その長径は約 $5 \mu\text{m}$ であるが、測定状況によって $3.5\sim 6.5 \mu\text{m}$ の範囲に入る。オーシスト壁は薄く平滑で、その 1ヶ所に縫合線（脱囊時の開口部分）と呼ばれる亀裂様構造を有する。内部には 4 個の三日月型をしたスポロゾイト、残体とその他の顆粒を含む。標本によってはオーシストが変形して紙風船がひしゃげたような形状を呈することがある。また、縫合線が開口し、内部構造が消失していることもある。

ii) 蛍光抗体法で染色されたオーシストの特徴：B 励起下での FITC の特異蛍光は緑色である。オーシストが示す蛍光は一樣ではなく、辺縁（シスト壁）の蛍光が強く、それに比して中央部は弱い。観察の方向によっては縫合線が確認できることがある。オーシストの内部が赤色、又は強い黄色を呈することはない。

iii) DAPI 染色されたオーシストの特徴：UV 励起下での DAPI の特異蛍光は青色である。オーシスト内にスポロゾイトの核が 1～4 個青色に染まって見える。

iv) 微分干渉像の特徴：表面が平滑なオーシスト壁、その中に 1～4 個のスポロゾイト及び残体とその他の顆粒構造が確認できる。

- (3) 判定：FITC 標識蛍光抗体染色で緑色の特異蛍光を示す類円形の粒子で、 $3.5\sim 6.5 \mu\text{m}$ の範囲に入るもののうち、以下の条件のいずれかを満たす粒子をオーシストと認定し、その数を数える。

i) 蛍光抗体染色像又は微分干渉像で明らかに縫合線が観察される場合^{注1)}。

ii) 微分干渉像でスポロゾイトが確認される場合。

iii) DAPI 染色の結果、オーシスト中のスポロゾイトの核が明瞭に観察される場合

注1) 縫合線は開口している場合もある。

4) オーシストの計数

顕微鏡標本の試料塗布面全面を精査してオーシストを計数する。ただし、標本中に検出されるオーシストが非常に多い場合は標本を定量的に部分観察して検水 20L 当たりに換算表示してもよい。

5) オーシスト数の算出

オーシスト数の算出は以下の計算式に従って行う。

O_{20} : 試料水 20L 中のオーシストの数(個/20L)

N : 検出されたオーシストの総数(個)、

V_t : 試料水 V_s (L) を濃縮して得た染色用試料の総液量(ml)

V_n : 顕微鏡検査した染色用試料の総液量(ml)

V_s : 濃縮した試料水量(L)

$$O_{20} = N \times \frac{V_t}{V_n} \times \frac{20}{V_s} \quad \dots\dots\dots (1)$$

備考 : 多くの市販の蛍光抗体試薬キットには**抗 - ジアルジア抗体**が含まれており、ジアルジアのシストの同時検出が可能である。観察は**5 3)**に準じて行う。ジアルジアシストの形態的特徴及びその判定基準を下記に示した。

- i) **一般的特徴** : ジアルジアのシストは卵円形で、その長径は 8~12 μ m、短径 5~8 μ m であるが、測定状況によっては長径が 8~18 μ m の範囲に入る。シスト壁は薄く、平滑である。成熟したシストでは 4 核を備え、その他に軸糸(太目の繊維用構造で、一端が湾曲する。鞭毛との区別は容易でない。)、曲刺(釜状の構造物で、吸着円盤等の遺残物)、中央小体(微細顆粒の集合体として観察される)、鞭毛等が認められる。
- ii) **蛍光抗体法で染色されたシストの特徴** : B 励起下での FITC の特異蛍光は緑色である。シストが示す蛍光は一樣ではなく、辺縁(シスト壁)の蛍光が強く、それに比して中央部は弱い。
- iii) **DAPI 染色されたシストの特徴** : UV 励起下での DAPI の特異蛍光は青色である。シスト内に栄養体の核が 1~4 個青色に染まって見える。クリプトスポリジウムのオーシストに比べてシスト壁が DAPI に染まりやすく、青色を帯びて観察される傾向がある。
- iv) **微分干渉像の特徴** : 表面が平滑なシスト壁、その中に 1~4 個の核、軸糸(又は鞭毛)、曲刺、中央小体等が観察される。

したがって、蛍光抗体染色標本で緑色の特異蛍光を示す卵円形の粒子のうち長径が 8~18 μ m の範囲に入るもので、iv) に示した内部構造のいずれかが観察された粒子をジアルジアのシストと判定する。

付録 1 精度管理のためのオーシスト添加実験

1 概要

水試料からのオーシストの回収率を算定するための実験で、オーシスト添加の実施方法について述べる。技術の確認、技術の向上、新しく導入する方法や改良法の評価、回収率に対する水試料の影響についての検討などに用いる。

2 オーシスト原液の濃度の確認

オーシスト原液中のオーシスト数は、血球計算板による計数か段階希釈法で予め調べておく。

2.1 血球計算板を用いる方法

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) Buerker-Tuerk 型血球計算板(又は improved Neubauer 型)
- (3) 顕微鏡
- (4) マイクロピペット

2) 操作

- (1) オーシストは集塊をつくりやすいので、原液をミキサーで 2 分間攪拌し、均一な浮遊液とする。
- (2) 血球計算板に専用のカバーガラスを Newton 輪ができるようにすり合わせ、マイクロピペットを用いて、カバーガラスと血球計算板の間のチャンバー(上下 2 つ)へオーシスト原液 10 μ L ずつを注入する。オーシストが沈むまで 2 ~ 3 分静置する。
- (3) 顕微鏡下 400 倍で、上部チャンバー内の分画 (1mm²) の 4 隅と中央の計 5 区画中のオーシスト数を数える。図 1 に Buerker-Tuerk 型血球計算板の分画を示した。図 2 には区画内のオーシストの計数方法を示した。
- (4) 血球計算板の 1mm² が 0.1 μ L の液量に相当する場合、オーシスト原液のオーシスト数 (N) は以下の式で算出する。なお、オーシスト数は個/mL で表現する。
$$N = (5 \text{ 区画中のオーシスト数} / 5) \times 10^4$$
- (5) 1 区画中のオーシスト数が多すぎた場合は原液を適当に希釈して計数し直す。
- (6) 同様に、(3) ~ (5) の方法に従って下部チャンバー内の 5 区画中のオーシスト数を数える。2 つのチャンバーで得られたオーシスト数が大きく隔たっていないことを確認し、その算術平均値を持ってオーシスト原液中のオーシスト数とする。
- (7) 血球計算板から注意深くカバーガラスを取り、洗浄液はビーカー等に受けるようにして血球計算板とカバーガラスを洗い流し、続いてアルコール綿で血球計算板とカバーガラスを十分に拭き、乾燥させる。この操作は手袋をはめて行い、洗浄液とアルコール綿はオートクレーブで滅菌する。

2.2 段階希釈による方法

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) 精製水
- (3) 蛍光染色に必要な試薬及び器具(4 蛍光抗体染色 参照)
- (4) 蛍光顕微鏡
- (5) マイクロピペット
- (6) 段階希釈用試験管：蓋付きサンプルチューブ 1.5mL など

2) 操作

- (1) 試験管数本に精製水を 900 μ L ずつ分注する。
- (2) オーシスト原液の 100 μ L を上記の試験管の 1 本に入れ、十分攪拌する。
- (3) (2)の希釈液から 100 μ L を取り、別の精製水 900 μ L の入った試験管に入れ、十分攪拌する。この操作を 3、4 回繰り返し、数段階の 10 倍段階希釈液を調製する。各希釈段階で使用するマイクロピペットのチップを必ず交換する。
- (4) 各段階の希釈液の 100 μ L を 4. 1 又は 4. 2 に準じて蛍光染色を施し、染色されたオーシスト数を数える^{注1)}。
- (5) オーシスト原液中のオーシスト数 (N) は以下の式で算出する。なお、オーシスト数は 個/mL で表現する。

$$N = (\text{標本 (100 } \mu\text{L) 中のオーシスト数}) \times (\text{希釈倍数}) \times 1 \text{ mL} / 100 \mu\text{L}$$

注1) 計数に用いる際の標本はオーシストが 50-500 個/mL となるように希釈されていることが望ましい。

3 添加液の調製及び添加

3.1 添加液の調製

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) 精製水
- (3) 蛍光抗体染色に必要な試薬及び器具(4 蛍光抗体染色参照)
- (4) 蛍光顕微鏡
- (5) マイクロピペット

2) 操作

- (1) 100 μ L 中のオーシスト数が 100-500 個程度の範囲内に入るように精製水でオーシスト原液を希釈し、オーシスト添加液とする。
- (2) オーシスト添加液から 100 μ L を 5~10 回取り、それぞれ試験方法に準じて蛍光染色を施し、各標本のオーシスト数を蛍光顕微鏡下で数える。得られた計測値から算術平均を求め、添加数とする。

3.2 添加

1) 器具

- (1) 試料容器

(2) マイクロピペット

2) 操作

- (1) 添加実験に用いる試水が入ったスクリーキャップ付き試料容器にオーシスト添加液 100 μ L を加えて攪拌する。なお、河川水等を用いる場合、その試料水中にオーシストが既に含まれている可能性があるため、予め試料水中のオーシスト数を計数し、記録しておく。
- (2) 回収率を算定しようとする試験方法でオーシストを回収し、オーシスト数を数える。
- (3) 次の計算式で回収率を計算する。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{(\text{検出オーシスト数}) - (\text{試料水中のオーシスト数})}{(\text{添加オーシスト数})} \times 100$$

備考：クリプトスポリジウムのオーシストは病原体レベル分類で「レベル 2」に位置付けられている(参考：国立感染症研究所病原体等安全管理規定)。したがって、生存オーシストを添加する場合の扱いはレベル 2 となり、レベル 2 に対応した封じ込め設備を具備した実験施設内での扱いが必要である。ただし、不活化(固定、熱処理等)されたオーシストを扱う場合はこの限りではない。

なお、水質試験のための試料は「レベル 1」の扱いとなり、通常の実験室での試験でよい。

付録 2 顕微鏡の取扱い

本試験方法で用いる顕微鏡には、蛍光装置、微分干渉装置、20、40、100 倍の対物レンズが必要である。また、一般に接眼レンズは 10 倍が用いられる。このほか、粒子サイズ測定のために、接眼スケール又はその他の計測機器を付属させる。

1) 蛍光顕微鏡装置

落射型と透過型の 2 種類がある。落射型は不透明な支持体上の標本でも観察が可能で、メンブレンフィルターを用いた顕微鏡標本の観察には落射型を用いるのがよい。個々の蛍光色素は特有の励起波長を持った光の照射により励起光とは異なった(それよりも長波長の)蛍光を発する。したがって、染色に用いた蛍光色素に合わせて、励起波長と接眼フィルターを組み合わせる必要がある。

2) 微分干渉装置

微分干渉装置はポラライザー(偏光板)、2 枚の DIC プリズム、アナライザー(偏光板)からなり、それらが一般の生物顕微鏡に組み込まれる。光源として偏光が用いられ、光線が標本を通過する際に標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差(又は色の差)に変換する装置で、通常は標本の厚さの差が明暗の差として観察される。顕微鏡観察に先立って、ケーラー照明法に準じた顕微鏡の調製が必要である。

ケーラー照明法

- (1) 未調整の顕微鏡に染色標本を載せて焦点を合わせる。
- (2) 視野絞りを絞り込み、視野に絞りの影を確認する。その際、コンデンサー絞りを適度に絞ると視野絞りの影が見やすくなる。
- (3) コンデンサーを上下して、視野絞りの影が最もシャープに見える位置に固定する。
- (4) 視野絞りの開口部を視野の中心に位置させる(センタリング)。
- (5) 視野絞りを開ける。その際、開口率を 80%程度に設定すると対物レンズのもつ解像力がほぼ完全に引き出される。
- (6) 対物レンズを換えた場合には視野絞りを絞って、絞りの影が明瞭に見えることを確認する。

付録3 顕微鏡観察における蛍光フィルター選択と観察上の注意

顕微鏡観察においては、試料中に混在する藻類等の植物プランクトン粒子とクリプトスポリジウムのオーシストの判別が困難な場合があることが知られている。これに対応するための蛍光フィルター選択と観察上の注意について述べる。

1 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。

1.1 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^{バンドパス}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^{ロングパス}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。

1.2 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ビル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

核染色に用いられる 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ビルン系色素、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。

2 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^{注1)}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。囊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**^{注2)}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。

3 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ビルン系(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。

オーシストと紛らわしい植物プランクトンの観察例については、国立感染症研究所のホームページ(<http://www.nih.go.jp/~tendo/atlas/japanese/>)で閲覧できる。

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

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。
4. 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。

[参考] 検査室におけるクリプトスポリジウムの感染防止方法

クリプトスポリジウムの ID₅₀ (50%感染量) は 132 個、オーシスト 1 個を経口摂取したときの感染確率は 0.4%と計算されており、感染力の強い病原体である。また、熱や乾燥によりオーシストは失活するが、検査室などで使用する消毒液には強い抵抗性を示す。このため、検査に当たっては無菌操作など感染防止に必要な技術を修得した者が担当することとし、バイオハザード対策に関する以下の諸点に留意しなければならない。

- (1) 汚染の疑われる試料水の採取においてはゴム手袋を着用する。
- (2) 採水等に使用した用具はビニール袋に入れて持ち帰り、加熱処理(5分以上煮沸)した後、洗浄して使用又は廃棄する。
- (3) 試料水の取り扱いにおいてはその飛散に注意する。
- (4) 試料水及び検査に使用した器具で熱処理の可能なものは 70℃以上で 10 分間程度の加熱処理を行う。また、検査に使用した上清液等の廃液は所定の方法で処理する。
- (5) 検査者の手指や身体の一部がオーシスト等で汚染されたときはアルコール綿等で拭いた後、石けんで洗浄し、紙タオル等で拭いてからよく乾燥させる。
- (6) 実験台や器材がオーシスト等で汚染されたときも同様にアルコール綿等でよく拭き、十分に乾燥させる。
- (7) 使用したアルコール綿や紙タオル等はオートクレーブ処理か、焼却処分する。
- (8) 検査室内にサンプラー管が引かれている場合は、返送水等が汚染されないように十分に注意する。
- (9) クリプトスポリジウム等による感染者は水源地、取水施設、浄水施設及び配水施設への立ち入りは無論、検査や業務に従事してはならない。
- (10) 試験に用いられる試薬類には発癌性を示すものがあり、検査担当者本人の汚染を回避するのみならず、環境汚染を招かないように廃棄処理を徹底する必要がある。