

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