

水道におけるクリプトスポリジウム等耐塩素性病原生物の対策について

1. クリプトスポリジウム等対策の経緯と現状

(1) 我が国の水道におけるクリプトスポリジウム等対策の経緯

① 埼玉県越生町における感染症の発生と暫定対策指針の策定

- ・ 平成 8 年 6 月、埼玉県越生町において我が国で初めての水道水に起因するクリプトスポリジウム感染症が発生。町民の 7 割以上にあたる 8,800 人が症状を訴える事態となった。
- ・ この集団感染事故を契機に、「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」(以下「暫定対策指針」という。)を策定(平成 8 年)。
- ・ 暫定対策指針においては、クリプトスポリジウムによる汚染の未然防止のため、
 - 各水道施設におけるクリプトスポリジウムの汚染のおそれを検討し、
 - その汚染のおそれのレベルに応じて、浄水施設におけるクリプトスポリジウムの除去・不活化を基本とした対策を行うこととしている。
- ・ その後、暫定対策指針は平成 10 年及び平成 13 年に改定を行っており、「汚染のおそれ」の根拠となる指標菌検査について、検査を行うべき水道施設の拡大及び検査すべき指標菌の種類の変更を行ってきている。なお、後述する平成 19 年の「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」(以下「対策指針」という。別紙 1 参照)策定により、暫定対策指針は廃止されている。

② 水道施設の技術的基準を定める省令の制定

- ・ 水道法第 5 条に規定する水道の施設基準について、その基準の明確化及び性能基準化を図るため、平成 12 年に「水道施設の技術的基準を定める省令」(以下「技術基準省令」という。)が制定され、同省令において、原水に耐塩素性病原生物が混入するおそれがある場合はろ過等の設備を設置すべきことを規定。
- ・ その後、平成 19 年には、後述する紫外線処理を耐塩素性病原生物対策に新たに位置づけたことを受けて、技術基準省令を改正。

③ 紫外線処理対策の導入と対策指針の策定

- ・ 暫定対策指針策定後、対策の進捗状況は芳しくなく、平成 15 年の厚生科学審議会答申において、「水道水の安全に万全を期するためには、これら耐塩素性病原微生物に対する対策を一層推進していく必要がある」と提言された。しかし、その後も対策の進捗状況はそれほど伸びず、また、対策の取られていない施設の大部分が簡易水道等の小規模施設が占めるという状況であった。
- ・ この状況を踏まえつつ、クリプトスポリジウム等の対策の検討を進めた結果、紫外線照射がクリプトスポリジウム等の不活化に有効であるとの知見が得られ、また、紫外線処理設備はろ過設備と比較して簡便な手法として導入することが可能であることから、平成 19 年に耐塩素性病原生物対策に紫外線処理を新たに位置づけることを軸とした対策指針の策定及び技術基準省令の改正を行った。

(2) クリプトスポリジウム等対策の現状

① クリプトスポリジウム等対策のスキーム

対策指針では、水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を分類し、各分類に応じた施設整備、原水等の検査、運転管理、施設整備中の管理等の措置を示している。概要については以下のとおり。

なお、対策指針において、「クリプトスポリジウム等」とはクリプトスポリジウム及びジアルジアをいい、「指標菌」とは大腸菌及び嫌気性芽胞菌をいう。

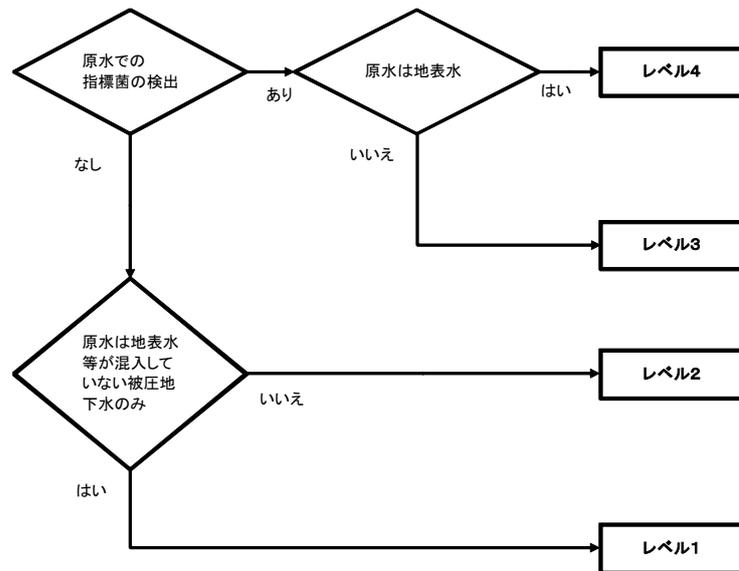


図1 水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの判断の流れ

	施設運転・運転監視	原水検査等
レベル4	ろ過設備 濁度0.1度以下維持 (対策設備整備までの期間の措置は ※1のとおり)	水質検査計画に基づき適切な頻度で 検査(クリプト+指標菌) (対策設備整備までの期間の検査は ※2のとおり)
レベル3	レベル4対応、又はUV設備 UV照射量の常時確認 (対策設備整備までの期間の措置は ※1のとおり)	
レベル2	—	指標菌 1回/3か月以上
レベル1	—	大腸菌・TCE等 1回/年 井戸内撮影等 1回/3年

※1: 対策施設を整備している間は、原水の濁度を常時計測し、濁度レベルが高くなった場合には取水停止を行うこととしている。

※2: クリプトスポリジウム等の検査を1回/3か月以上、指標菌を1回/月以上。

図2 汚染のおそれのレベルに応じた措置の概要

② クリプトスポリジウム等対策の現状

平成 21 年 3 月末現在、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原生物対策の実施状況は、原水が耐塩素性病原生物に汚染されるおそれのレベル判断が行われていないものが施設数ベースで全体の約 3 割あり、また、原水が耐塩素性病原生物に汚染されるおそれがある施設（レベル 4 又はレベル 3）のうち約 4 割が対策を検討中という状況。検討中である施設のうち約 7 割近くが簡易水道（給水人口が 5,000 人以下である水道）の施設となっている。

詳細については、別紙 2 のとおり。

2. 指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法

指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法については、その標準的な検査方法を対策指針と合わせて通知（別紙 3）している。その概要は以下のとおり。

（1） 指標菌の検査方法

① 大腸菌の定量方法（別紙 3 の別添 1）

現在、水道原水の大腸菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を示している。

・ 特定酵素基質培地による大腸菌の定量方法

特定酵素基質培地を使用し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養する方法。菌数の算出については、段階的に希釈した検水列について培養後、最確数法により菌数を算出する。

（現行の検査方法告示の大腸菌の検査方法である「特定酵素基質培地法」（浄水を対象とする定性法）と同種の培地・試験操作を用いる。）

② 嫌気性芽胞菌の検査方法（別紙 3 の別添 2）

現在、水道原水の嫌気性芽胞菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の 3 つの方法を示している。

・ ハンドフォード改良寒天培地法

ハンドフォード改良寒天培地を使用し、嫌気状態下において、 $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 22～26 時間培養する方法。

・ M-C-P 寒天培地法

M-C-P 寒天培地を使用し、嫌気状態下において、 $45\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で 18～24 時間培養する方法。

・ DRC (Differential Reinforced Clostridial) 培地法

DRC 培地を使用し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 45～51 時間培養する方法。定量試験においては、段階的に希釈した検水列について培養後、最確数法により菌数を算出する。

(2) クリプトスポリジウム等の検査方法（別紙3の別添3）

従来、「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」（平成10年6月19日衛水第49号課長通知）において、応急対応のための検査方法として定められ、標準的に使用されている方法を基に、次の方法を示している。

検査方法については、「標準的方法」を用いて行うことを基本とするが、「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、回収率の信頼性等を確認することができた場合は、「その他の方法」を用いてもよいこととし、いずれの場合にあっても、試験結果の信頼性が確保できるよう、適切な条件、操作方法を選定すべきであることとしている。

また、新たな知見の集積により、通知に示す検査方法と同等以上の方法と認められるものについては、積極的に採用するべく、逐次、検査方法を見直すこととしている。

① 懸濁粒子の捕捉・濃縮

水試料中の懸濁粒子を捕捉・濃縮する方法について、標準的方法として3つの方法、その他の方法として3つの方法を示している。

・ メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法（※標準的方法）

アセトン溶解性メンブレンフィルター（孔径 $1\mu\text{m}$ 付近）を用いて水試料を吸引ろ過後、アセトンによりフィルターを溶解させ、残った沈渣を濃縮物として回収する方法。

・ メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法（※標準的方法）

アセトン溶解性メンブレンフィルター（孔径 $1\mu\text{m}$ 付近）を用いて水試料を加圧ろ過後、アセトンによりフィルターを溶解させ、残った沈渣を濃縮物として回収する方法。

・ 親水性PTFEメンブレンフィルター法（※標準的方法）

親水性PTFEメンブレンフィルター（孔径 $5\mu\text{m}$ 以下）を用いて水試料をろ過後、フィルターを遠沈管に挿入し、強く攪拌することでフィルター上の捕捉物を洗い出し、濃縮物を回収する方法。

・ ポリカーボネートメンブレンフィルター法

ポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて水試料をろ過後、超音波処理等により捕捉物をフィルターから剥離させ、濃縮物を回収する方法。

・ カートリッジフィルター法

フィルター（孔径 $1\mu\text{m}$ 程度以下）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て水試料をろ過後、振とう等により濃縮物を剥離、回収する方法。

・ 遠心沈澱法

水試料中の懸濁粒子を遠心沈澱により濃縮する方法。

② オーシストの分離・精製

水試料の懸濁粒子の濃縮試料には多量の夾雑物がある場合、濃縮試料からオーシストを選択的に分離・精製する。標準的方法として1つの方法、その他の方法として1つの方法を示している。

・ 密度勾配遠沈法（浮遊法）（※標準的方法）

濃縮試料を比重 $1.10\sim 1.20$ 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。

・ 免疫磁性体粒子法（免疫磁気ビーズ法）

クリプトスポリジウム特異抗体を表面に吸着させた磁性体粒子と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する方法。

③ オーシストの検出

オーシストの検出・計数は、顕微鏡観察により行う。顕微鏡観察を容易にするため、オーシストを特異的に染色する。染色方法は以下のとおり、標準的方法として1つの方法、その他の方法として1つの方法を示している。

- ・ 直接蛍光抗体染色法（※標準的方法）

精製試料をメンブレンフィルターでろ過し、フィルター上に捕捉したオーシストを 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。

- ・ 間接蛍光抗体染色法

精製試料をメンブレンフィルターでろ過し、フィルター上に捕捉した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後、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。

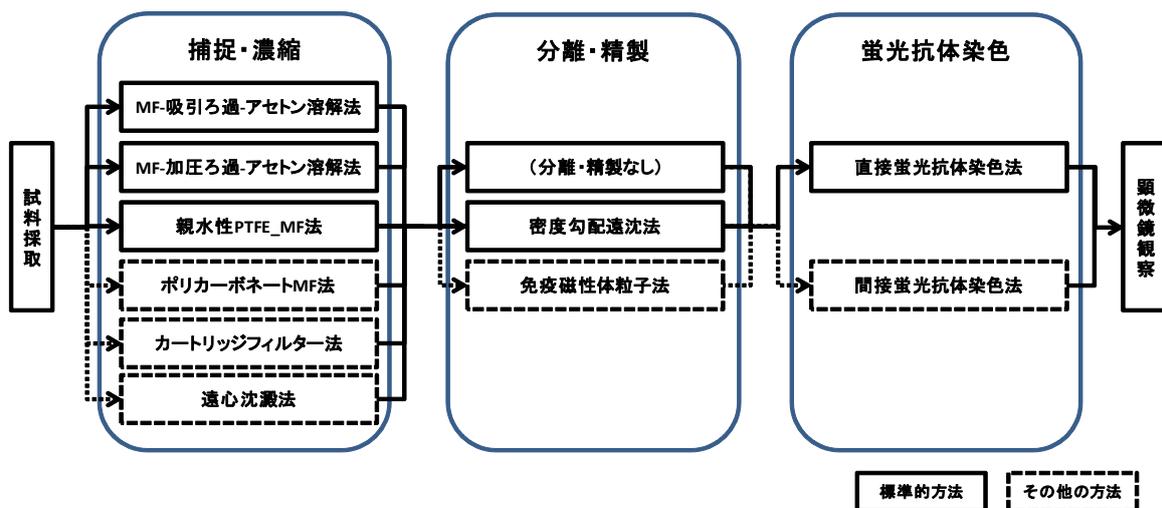


図3 クリプトスポリジウム等の検査の流れ

健水発第 0330005 号
平成 19 年 3 月 30 日

各都道府県・政令市・特別区水道行政担当部（局）長 殿

厚生労働省健康局水道課長

水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について（通知）

水道行政の推進につきましては、日頃から格別のご協力を賜り厚くお礼申し上げます。

さて、水道におけるクリプトスポリジウム等の対策については、「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」（「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」（平成 8 年 10 月 4 日付け衛水第 248 号通知）の別添。以下「暫定指針」という。）を貴管下の水道事業者、水道用水供給事業者及び専用水道の設置者（政令市及び特別区にあっては専用水道の設置者に限る。以下「水道事業者等」という。）に対し、周知を図り、これに基づき指導されるようお願いするとともに、「水道施設の技術的基準を定める省令」（平成 12 年厚生省令第 15 号。以下、「施設基準省令」という。）において、原水に耐塩索性病原生物が混入するおそれがある場合にはろ過等の設備を設置すべきことを規定し、対策の推進を図ってきたところです。

対策を更に充実するため、クリプトスポリジウム等について必要な調査研究を行っていたところですが、今般、最新の科学的知見等を踏まえ、施設基準省令を改正するとともに、新たに、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」（以下、「指針」という。）を別添のとおりとりまとめ、平成 19 年 4 月 1 日より適用することとしました。

つきましては、改正後の施設基準省令及び指針に基づくクリプトスポリジウム等の対策が的確に講じられるよう、貴管下の水道事業者等に対し、指針について周知を図るとともに、これに基づく対策が徹底されるよう御指導についてよろしく申し上げます。

また、貴職におかれては、水道水からクリプトスポリジウム等が検出された場合等には、迅速に情報を収集するとともに直ちに当該水道事業者等の給水区域を管轄する衛生行政担当部局に情報提供するようお願いいたします。

なお、当省においては、引き続き、指針に基づく対策の実施状況について点検するとともに、新たな知見の集積を行い、適宜指針を見直していくこととしておりますので、貴職の御協力を併せてお願いします。

記

第 1 指針設定の趣旨

1. 水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を分類し、各分類に対応した施設整備、原水等の検査、運転管理、施設整備中の管理等の措置を示した。
2. 新たに導入することとした紫外線処理について、紫外線処理の適用要件、原水の水質変化時の対応、及び、紫外線照射量の常時監視等の運転・維持管理に必要な事項を示した。
なお、紫外線処理設備を導入する際の適用要件および運転管理に関する現時点での知見について、参考資料として別途提供することとした。

第2 留意事項

1. 定期的な原水に係る検査の実施について

水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を把握するため、指針に基づき、平成19年度以降できるだけ早期に原水に係る検査の実施体制の整備等につき必要な措置を講じ、定期的に原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施すること。

また、平成20年度に実施する検査について水質検査計画を策定する際には、原水の指標菌の検査及びクリプトスポリジウム等による汚染のおそれのある施設における原水のクリプトスポリジウム等の検査についても、水道法（昭和32年法律第177号）第20条第1項の規定に基づく水質検査に準じて、当該計画に位置付けられたいこと。

2. 定量的な汚染リスクに関する知見の収集について

クリプトスポリジウム等及び指標菌に関しては、水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度に関する定量的な知見が必ずしも十分でないことから、今回示した指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法により、汚染リスクに関する定量的なデータの集積に努めるべきであること。また、当省においては、これらの知見を踏まえ、今後、定量的な汚染リスクに基づく予防対策等について検討を進めることとしていること。

3. 水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法については、標準的な検査方法を別途通知により示すこととした。

第3 関係通知の改廃等

平成19年4月1日付けをもって、厚生省生活衛生局水道環境部長通知「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」（平成8年10月4日付け衛水第248号）及び「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」（平成10年6月19日付け生衛発第1039号）並びに厚生労働省健康局水道課長通知「水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について」（平成13年11月13日付け健水発第100号）は廃止する。

なお、従来、暫定指針の添付資料として示されてきた、クリプトスポリジウム等の生物学的性状等の知見については、参考資料として別途提供することとしていること。

水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針

1. 背景及び目的

水道水中のクリプトスポリジウムによる感染症については、米国ウィスコンシン州ミルウォーキー市で40万人以上が感染した事例など、海外でいくつかの事例が報告されている。このような状況を踏まえ、WHOは平成7年12月からクリプトスポリジウムを含む病原生物に係る飲料水水質ガイドラインの検討を開始し、その成果を飲料水水質ガイドライン(第2版)追補版(平成14年)や同(第3版)(平成16年)にとりまとめている。

一方、平成8年6月には、我が国で初めての水道水に起因するクリプトスポリジウムによる感染症(クリプトスポリジウム症)が埼玉県越生町で発生した。

このため、厚生労働省では、平成8年に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」を策定し、さらにその後の知見を踏まえ、平成10年及び平成13年に同指針を改定した。また、平成12年に制定した「水道施設の技術的基準を定める省令」において、原水に耐塩素性病原生物が混入するおそれがある場合には濾過等の設備を設置すべきことを規定し、対策の推進を図ってきた。

しかしながら、各水道施設における対策の進捗状況は十分とは言えず、平成15年の厚生科学審議会答申「水質基準の見直し等について」において、「水道水の安全に万全を期するためには、これら耐塩素性病原微生物に対する対策を一層推進していく必要がある」と提言された。このため、最新の科学的知見等を踏まえ、更に検討を進めてきた結果、今般、本指針をとりまとめたものである。

なお、本指針は、我が国において特に対策を講ずべき耐塩素性病原生物であるクリプトスポリジウム及びジアルジア(以下、「クリプトスポリジウム等」という。)を対象として作成している。

2. 水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの判断

(1) レベル4 (クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高い)

地表水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設

(2) レベル3 (クリプトスポリジウム等による汚染のおそれがある)

地表水以外の水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設

(3) レベル2 (当面、クリプトスポリジウム等による汚染の可能性が低い)

地表水等が混入していない被圧地下水以外の水を原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがない施設

(4) レベル1 (クリプトスポリジウム等による汚染の可能性が低い)

地表水等が混入していない被圧地下水のみを原水としており、当該原水から指標菌が検出されることがない施設

○感染経路

クリプトスポリジウムは人間や哺乳動物（ウシ、ブタ、イヌ、ネコ等）の消化管内で増殖し、感染症をもたらす。これらの感染した動物の糞便に混じってクリプトスポリジウムのオーシストが環境中に排出され、オーシストを経口摂取することにより感染症による被害が拡大する。水源がクリプトスポリジウムにより汚染された水道においては、浄水施設でクリプトスポリジウムを十分に除去又は不活化できなければ、水道水を経由して感染症による被害が拡大するおそれがある。また、ジアルジアについても水系を通じた感染症を起こすおそれがあり、基本的にクリプトスポリジウムに対する予防対策を講じることが有効と考えられる。

○指標菌

大腸菌 (*E. coli*) 及び嫌気性芽胞菌は水道原水の糞便による汚染の指標として有効である。また、その感染経路から、糞便により汚染された水源の水にはクリプトスポリジウム等が混入するおそれがある。このため、原水にいずれかの指標菌が検出された場合には「原水に耐塩素性病原生物が混入するおそれがある場合」に該当することとなる。

○リスクレベルの判断

(1) レベル4

クリプトスポリジウム等については、し尿、下水、家畜の糞尿等を処理する施設から排出される汚水その他、イノシシ、シカ、サル等の野生生物の糞便も汚染源となることから、地表水である原水から指標菌が検出されている場合は、クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高いと判断される。

(2) レベル3

レベル4に該当しない、伏流水、浅井戸等を水源とする施設であっても、原水から指標菌が検出されたことがある場合、当該原水は糞便により汚染されていると考えられることから、クリプトスポリジウム等による汚染のおそれがあると判断される。

(3) レベル2

原水から指標菌が検出されていない場合は、当該原水は糞便により汚染されていないと考えられることから、当面、クリプトスポリジウム等による汚染の可能性は低いと判断される。

(4) レベル1

井戸のケーシング等が破損していないこと、ストレーナーが被圧地下水のみを取水できる位置にあること等が確認され、かつ、原水の水質検査結果から地表水が混入し

ていないことが確認できる井戸（例えば、大腸菌、トリクロロエチレン等が検出されていないこと等）から取水した被圧地下水を原水とし、当該原水から指標菌が検出されることがない場合には、クリプトスポリジウム等による汚染の可能性は低いと判断される。

指標菌の検査には別に定める検査方法を用いることを原則とする。

なお、通常使用されていない水源についても、そのリスクレベルを判断しておくこと。

こうしたリスクレベルの判断フローは図に示すとおりである。

3. 予防対策

水道事業者等は、水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度に応じ、次の対応措置を講ずること。

(1) 施設整備

(ア) レベル4

ろ過池またはろ過膜（以下、「ろ過池等」という。）の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備（急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等）を整備すること。

(イ) レベル3

以下のいずれかの施設を整備すること。

(a) ろ過池等の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備（急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等）。

(b) クリプトスポリジウム等を不活化することができる紫外線処理設備。具体的には以下の要件を満たすもの。

① 紫外線照射槽を通過する水量の 95%以上に対して、紫外線（253.7nm 付近）の照射量を常時 10mJ/cm² 以上確保できること。

② 処理対象とする水が以下の水質を満たすものであること。

・濁度 2 度以下であること

・色度 5 度以下であること

・紫外線（253.7nm 付近）の透過率が 75%を超えること（紫外線吸光度が 0.125 abs./10mm 未満であること）

③ 十分に紫外線が照射されていることを常時確認可能な紫外線強度計を備えていること。

④ 原水の濁度の常時測定が可能な濁度計を備えていること（過去の水質検査結果等から水道の原水の濁度が 2 度に達しないことが明らかである場合を除く。）。

○紫外線照射量

低圧紫外線ランプから発せられる紫外線 $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ (照射強度 $(\text{mW}/\text{cm}^2) \times$ 照射時間 (s)) を水に照射することにより、当該水中のクリプトスポリジウムを 99.9%不活化すること (3log 不活化)ができる。また、紫外線 $5\text{mJ}/\text{cm}^2$ を水に照射することにより、当該水中のジアルジアを 99%不活化すること (2log 不活化)ができる。

○紫外線処理設備の整備に関する留意事項

- ・ 紫外線照射槽は水流の偏りのない、所定の滞留時間が得られる構造のものであること。
- ・ 適正なランプ照射強度を持つ紫外線ランプを選定し、必要な紫外線強度分布を得られるようランプを配置すること。
- ・ ランプスリーブを適切に洗浄できること。
- ・ 水質、水量の計測設備を設置し、効率的な運転、信頼性の向上を図ること。
- ・ 地震時の揺れ対策やランプ本体やランプスリーブの破損防止措置をとること。また、紫外線ランプの点灯状況を常時確認できること。
- ・ 紫外線照射を阻害する物質がランプスリーブの表面に付着することによる紫外線照射量低下の影響をできるだけ避けるため、処理対象水中の鉄が $0.1\text{mg}/\text{L}$ 以下、硬度が $140\text{mg}/\text{L}$ 以下及びマンガンが $0.05\text{mg}/\text{L}$ 以下であることが望ましいこと。
- ・ 紫外線照射槽を二つ以上の複数基に分けて設置し、一つの設備が故障しても最低限の処理水量が得られる設計とすることが望ましいこと。
- ・ ランプ寿命や流量等についても考慮した、紫外線照射量の自動制御が望ましいこと。
- ・ 停電時の対策として非常用電源設備を設けることが望ましいこと。
- ・ 異常時の緊急遮断弁を設置することが望ましいこと。
- ・ 浄水処理の安全性を一層高めるために、ろ過池等の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備と紫外線処理設備を併用することとしてもよいこと。

(2) 原水等の検査

(ア) レベル 4 及びレベル 3

- ・ 水質検査計画等に基づき、適切な頻度で原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施すること。ただし、クリプトスポリジウム等の除去又は不活化のために必要な施設を整備中の期間においては、原水のクリプトスポリジウム等を 3ヶ月に 1回以上、指標菌を月 1回以上検査すること。

(イ) レベル 2

- ・ 3ヶ月に 1回以上、原水の指標菌の検査を実施すること。

(ウ) レベル 1

- ・ 年 1回、原水の水質検査を行い、大腸菌、トリクロロエチレン等の地表からの汚染の可能性を示す項目の検査結果から被圧地下水以外の水の混入の有無を

確認すること。

- ・ 3年に1回、井戸内部の撮影等により、ケーシング及びストレーナーの状況、堆積物の状況等の点検を行うこと。

○留意事項

レベル4及びレベル3の場合、浄水を毎日1回20リットル採水し、ポリタンクに注入した水または採水した水から得られるサンプルを14日間保存することが望ましい。そのための採水は浄水施設で行うことが望ましいが、当該浄水場からの給水を受ける配水系統内の給水栓の水でも差し支えない。

なお、採取した水については直射日光や高温となる場所を避けて冷暗所に保存すること、採水した水から得られるサンプルについては、乾燥を避けて冷蔵保存することが望ましい。

クリプトスポリジウム等の検査には別に定める検査方法を用いることを原則とする。

(3) 運転管理

(ア) ろ過

- ① ろ過池等の出口の水の濁度を常時把握し、ろ過池等の出口の濁度を0.1度以下に維持すること。
- ② ろ過方式ごとに適切な浄水管理を行うこと。特に急速ろ過法を用いる場合にあつては、原水が低濁度であっても、必ず凝集剤を用いて処理を行うこと。
- ③ 凝集剤の注入量、ろ過池等の出口濁度等、浄水施設の運転管理に関する記録を残すこと。

○共通の留意事項

- ・ ろ過池等の出口の水の濁度を常に0.1度以下に維持すること。そのため、原水水質の変化を浄水処理操作に即時に反映できるようにすること。なお、その際、目視のみによって浄水処理の効果を判断せず、必ず十分に調整された濁度計を用いること。
- ・ ろ過池等の出口の水の濁度は各ろ過池等ごとに測定することとするが、不可能な場合は、各処理系統ごとに測定することとし、いずれの場合も測定記録を残すこと。

○急速ろ過法における留意事項

a) 凝集用薬品の注入

- ・ 原水が低濁度であっても急速砂ろ過池でろ過するのみではクリプトスポリジウム等を含めコロイド・懸濁物質の十分な除去は期待できないので、必ず凝集剤を用いて処理を行うこと。
- ・ 原水の濁度、pH、水温、アルカリ度等の検査結果に即応して、凝集剤の適正な注入率が調整できるよう、また、適正なpHに調節できるよう、必要な機器の整備と維持管理を行うこと。

- ・ 凝集剤の注入率は、処理する原水を用いたジャーテストにより決定することが基本であることから、定期的にジャーテストを実施すること。また、注入率及びpHが適正なものになっているかどうかを確認するため、原水の水質、並びに、当該原水に係る凝集沈殿処理水及びろ過水の濁度の相関関係を十分把握し、注入率及びpHの調整にフィードバックすること。
 - ・ 原水水質が急変した場合にはジャーテストを行う必要があるが、当該ジャーテストの結果を注入率の調整に用いるまでの間タイムラグがある。そのため、あらかじめ、原水に濁度成分（上流の河床底泥等）を添加した人工高濁度水を用いた実験の結果や過去の実績値に基づいて、高濁度時の注入率を設定しておくこと。なお、水源に汚染源が新たに立地された場合には、必ず設定注入率を見直すこと。
 - ・ 凝集剤、アルカリ剤等の浄水用薬品は、その使用期限を遵守して用い、注入量等の記録を残すこと。
- b) 凝集操作
- ・ 凝集剤を注入した直後に攪拌し、原水全体に一様に凝集剤を拡散させること。
 - ・ 凝集用薬品の注入率を変えたときには、必ず、フロック形成池及び沈殿池での処理結果を確認すること。
- c) 沈殿操作等
- ・ 沈殿池の滞留時間、池内の流速に留意し、十分な沈殿処理を行うこと。
 - ・ 沈殿効果を高める必要がある場合は、傾斜板等を設置すること。
- d) 急速ろ過操作
- ・ ろ過池のろ過速度を急激に変更してはならないこと。
 - ・ ろ過池は、目詰まりの発生が少ない場合であっても、適切な間隔で洗浄を行うこと。
 - ・ ろ過池の洗浄は適正な逆流洗浄速度で行うこと。
 - ・ ろ過池の洗浄は、通常、洗浄排水の最終濁度が2度以下となることを目標として行うこと。可能であれば1度以下を目標とすることが望ましいこと。また、洗浄の終了時には逆流洗浄速度を段階的に減少すること。
 - ・ ろ過池の洗浄等の直後はろ過機能が発現していないため、ろ過開始後のろ過速度を設定流量まで段階的に増加することやろ過池出口の濁度が0.1度以下になるまでの捨て水を行うこと等により、ろ過池出口の水の濁度が0.1度以下を維持できるようにすること。
- e) ろ過池洗浄排水等の原水への返送管理
- ・ 水道原水水質に急激な変化が生じないよう返送に係る運転・管理に留意すること。
 - ・ ろ過池で捕捉されたクリプトスポリジウム等が再び浄水施設内で循環しないように、可能な限り排水池等に濁質の低減機能を持たせること。
- 緩速ろ過法における留意事項
- ・ 生物ろ過膜の損傷を防ぐため、ろ過速度はおおむね5m/日を超えないように、また、ろ過速度の急激な変化が発生しないようにすること。
 - ・ かき取ったろ過砂を再利用する場合には、洗浄水の濁度が2度以下になる程度

まで洗浄し、洗浄水は水道原水として利用しないこと。

- ・ かき取り後、ろ過水を排水しながら、生物膜が再び形成され浄水の濁度が 0.1 度以下になるまで、低いろ過速度から徐々に速度を上げるようにすること。

○膜ろ過法における留意事項

- ・ 膜の損傷による事故を防止するため、異常の有無を適切に検知又は検査するとともに、異常が発見された場合には、直ちに該当する膜ろ過設備の運転を停止すること。

(イ) 紫外線処理

- ① 紫外線強度計により常時紫外線強度を監視し、水量の 95% 以上に対して紫外線 (253.7nm 付近) の照射量が常に $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上得られていることを確認すること。
- ② 原水濁度が 2 度を超えた場合は取水を停止すること。ただし、紫外線処理設備の前にろ過設備を設けている場合は、この限りではない。
- ③ 常に設計性能が得られるように維持管理 (運転状態の点検、保守部品の交換、センサー類の校正) を適正な頻度と方法で実施すること。

○留意事項

- ・ 原水濁度が 2 度を超えた場合は、不活化に必要な紫外線照射量が得られないおそれがあるため、直ちに取水を停止すること。そのため、常時監視が可能な濁度計により処理対象水の濁度変動に常時注意を払う必要があること。
- ・ 紫外線強度計の受光部の曇り及び汚れの有無、使用時間を確認し、定期的に洗浄、校正、交換を行うこと。
- ・ 紫外線照射槽内の流量について、設計値、ユニットごとの設定流量からの乖離がないか確認すること。
- ・ 紫外線ランプの点灯状況、運転時間及び出力を把握し、消灯あるいは、ランプまたは紫外線照射施設の状況に応じ必要な出力以下に低下した場合は交換すること。
- ・ ランプスリーブを定期的に洗浄すること。紫外線照射の有無にかかわらず紫外線照射槽内に水がある場合はスリーブの汚れの原因となるため、紫外線照射停止中であってもスリーブを定期的に洗浄すること。なお、自動洗浄装置を備えておくことが望ましいこと。
- ・ 紫外線照射槽内の流量、水温を定期的に監視し、異常が発生した場合には速やかに運転を停止し、設備を点検すること。
- ・ 紫外線が人体に直接照射されることがないように、ランプ交換等の作業時はランプを消灯し、やむを得ずランプ点灯時に作業する必要がある場合には手袋や紫外線保護マスク等を着用すること。
- ・ 適切な日常点検を行うとともに、必要な予備部品を保管しておくこと。使用済み紫外線ランプは適切に処分すること。

(ウ) 施設整備中の管理

①レベル4

クリプトスポリジウム等対策のために必要な施設整備を早急に完了する必要があるが、整備中の期間においては、原水の濁度を常時計測して、その結果を遅滞なく把握できるようにし、濁水等により原水の濁度レベルが通常よりも高くなった場合には、原則として原水の濁度が通常のレベルに低下するまでの間、取水停止を行うこと。

ただし、上流の河川工事等が水道原水の濁度を上昇させている場合、底泥をまき上げない工事等のように必ずしもクリプトスポリジウム等による汚染を生じさせないものもあるため、当該工事の種類、場所その他を勘案して取水停止の必要性を判断すること。

②レベル3

クリプトスポリジウム等対策のために必要な施設整備に時間を要する場合には、以下のいずれかの措置をとること。

- ・過去の水質検査結果等から濁水等により原水の濁度レベルが高くなることが明らかである場合には、原水の濁度を常時計測して、その結果を遅滞なく把握できるようにし、原水の濁度レベルが通常よりも高くなった場合には、原則として原水の濁度が通常のレベルに低下するまでの間、取水停止を行うこと。
- ・その他の場合には、原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査の結果、クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高くなったと判断される場合には、取水停止等の対策を講じること。

○留意事項

クリプトスポリジウム等の除去又は不活化のために必要な施設を整備中の期間においては、原水の水質監視を徹底し、クリプトスポリジウム等が混入するおそれが高まったと判断される場合には、取水を停止する等の対策を講じる必要があること。

(4) 水源対策

地表水若しくは伏流水の取水施設の近傍上流域又は浅井戸の周辺にクリプトスポリジウム等を排出する可能性のある污水处理施設等の排水口がある場合には、当該排水口を取水口等より下流に移設し、又は、当該排水口より上流への取水口等の移設が恒久対策として重要であるので、関係機関と協議のうえ、その実施を図ること。

また、レベル3又はレベル4の施設においてクリプトスポリジウム対策に必要な施設を整備することが困難な場合には、クリプトスポリジウム等によって汚染される可能性の低い原水を取水できる水源に変更する必要があること。

○水源対策の実施に関する留意事項

一般に、污水处理施設等の排水口下流に近接して、水道原水の取水口が設けられている場合は少ないが、特にクリプトスポリジウム等による汚染の可能性のある污水处理施設等の場合は、より一層の注意が必要であること。

また、水道の取水口の上流近傍に污水处理施設が設けられる場合が考えられるが、こ

の場合には、当該施設の排水口を水道の取水口の下流に位置させる等、水道事業者等は関係機関と十分協議する必要があること。

レベル3又はレベル4に該当する施設であってクリプトスポリジウム等対策に必要な施設を整備することが困難な場合には、水源を変更することにより、レベル1又はレベル2に移行する必要があること。

○水源対策実施後のリスクレベルの判定

水源対策実施後は、原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査結果に基づきリスクレベルを改めて判断することができること。

4. クリプトスポリジウム症等が発生した場合の応急対応

クリプトスポリジウム症等が発生し、水道水がその原因であるおそれがある場合には、関係者は次の対応措置を講ずること。

(1) 応急対応の実施

水道事業者等をはじめ、都道府県の関係部局は連携して応急対応を実施すること。

○連絡体制の整備

感染症の発生を迅速に把握するとともに、応急対応が遅滞なく実施されるよう、都道府県（水道行政担当部局、感染症担当部局、食中毒担当部局、保健所等）、水道事業者、水道用水供給事業者等の関係者の間における連絡マニュアル・連絡網を予め策定しておくこと。感染症が発生した場合、予め策定したマニュアルに基づき水道事業者等は都道府県へ、都道府県は国へそれぞれ報告し、連絡を密にすること。また、水道用水供給事業者等とその受水事業者との間の連携を密にし、水道利用者への対応と水道施設における対応を協調して実施すること。

(2) 水道事業者等における応急対応

①水道利用者への広報・飲用指導等

下痢患者等の便からクリプトスポリジウム等が検出される等、水道が感染源であるおそれが否定できない場合には、直ちに、水道利用者への広報・飲用指導等を行うこと。

○広報の実施

クリプトスポリジウム等による感染症の発生状況から見て、水道が感染源であるおそれが否定できないと判断される場合には、水道事業者等は都道府県と協力して直ちに、水道利用者に対する広報・飲用指導を行う必要があること。なお、レベル3またはレベル4の浄水施設において、浄水処理の異常等によって、ろ過池出口の水の濁度が0.1度

を超過した場合や紫外線照射量が $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ を下回った場合等においても、当該水道水が感染源となるおそれがあることに留意して、必要に応じた広報等を行うこと。

○広報の手段

クリプトスポリジウム等による感染症の拡大を防止するため、また、水道の利用者の混乱を招くことがないように、各種手段（広報車、ビラ、新聞、テレビ）を活用して、迅速かつ確実に広報を行うこと。

○広報の内容

飲用時の注意事項（例：煮沸して飲用すること）や、二次感染の予防方法（例：手洗いを十分行うこと、手拭きを共用しないこと）について周知するとともに、クリプトスポリジウム症等の症状や感染予防策、水道事業者の対応等について、わかりやすくかつ詳細に伝えること。広報の具体例を別添 1、2 に示す。

②水道施設における応急対応

水道水がクリプトスポリジウム等に汚染されたおそれのある場合には、浄水場からの送水を停止する等の措置を講じた上で、浄水処理の強化を行うか、または、汚染されているおそれのある原水の取水停止・水源の切り替え等を実施すること。

その後、配水管等の洗浄を十分に行った上で、クリプトスポリジウム等の有無の検査により、飲用水としての利用に支障がないと判断された場合に給水を再開すること。

○給水停止等の実施

水道水がクリプトスポリジウム等に汚染されたおそれのある場合には、汚染の疑われる浄水場からの送水を停止する等の措置を迅速かつ確実に行うこと。このために通常時より、必要なバルブ等の作動状態を点検しておくこと。

○ろ過等の強化

ろ過については、浄水用薬品の注入率、ろ過速度等の調整を行い、浄水処理条件を適正化して、浄水の濁度を 0.1 度以下に維持すること。また、紫外線処理については、必要な紫外線照射量が常時照射されていることを確認すること。

○取水停止／水源の変更

浄水処理が適切に実施できない場合には、クリプトスポリジウム等に汚染されているおそれのある原水の取水を停止し、可能な場合は糞便による汚染のない他の水源に切り替えること。

○水道利用者への広報の徹底等

クリプトスポリジウム等による感染症の拡大を防止するため、また、水道の利用者の混乱を招くことがないように、水道水を飲用することによりクリプトスポリジウム等に感染する危険があることについて、各種手段（広報車、ビラ、新聞、テレビ）を活用して、迅速かつ確実に広報を行うこと。

○給水の確保

断水等による生活への重大な影響や、洗浄を行うための清浄な水の不足が生ずること

も想定されることから、あらかじめ、緊急時には汚染されていない水源を活用し、又は、水道用水供給事業による給水量を増加させること等により対処できるよう施設の整備をしておくこと。

なお、給水を停止した場合、代替水源への切り替えや受水量の増加、送配水系統の切り替え等の措置を行っても断水等が生じ、水道利用者の生活に重大な影響を及ぼしたり、洗浄を行うための清浄な水が不足したりする場合に限り、応急的措置として、水道利用者が飲用時の注意事項や二次感染の予防方法等について十分周知、徹底したと判断できる場合において、ろ過等の強化を行った上で、経口感染のおそれのない用途において使用することとすることができる。

○汚染された施設の洗浄

汚染された配水系統内の水道水の排水を行うとともに、汚染されていない水道水で配水管や配水池等の施設の洗浄を十分行うこと。この場合、配水管からの排水が速やかに実施できるよう、ドレーンの適切な設置、配水管網の点検を行うこと。

○水質検査の実施

感染症の発生の原因や影響の規模を特定するため、浄水サンプルを保存している場合には、必要に応じ、それらについてクリプトスポリジウム等の検査を行うこと。

また、給水の再開にあたっては、給水栓水、配水池水及び浄水池水についてクリプトスポリジウム等に係る水質検査を行い、給水栓、配水池及び浄水池のそれぞれにおいて検水 20L についてクリプトスポリジウム等が検出されないことを確認すること（水質検査は、確実性を高めるため、各 3 試料について 40L（給水栓、配水池及び浄水池の各々の水について 40L を 3 回、一箇所につき合計 120L）ずつ採水し行うこと）。

なお、紫外線処理を用いる施設においては、給水栓までの配水系統内の水道水が、必要な量の紫外線を照射されている水に十分に入れ替わったことを確認すること。

また、水源を切り替えることにより給水を再開する場合については、新規の水道原水についても併せて水質検査を行うこと。

水質検査方法については、別に定める方法を用いること。

（3）都道府県等の水道行政担当部局における対応

関係の水道事業者等、都道府県の感染症担当部局、試験研究機関等と連携を密にして、水道事業者等における対応の円滑な実施を支援するほか、関係都府県とも連絡を密にし、自らも住民への広報に努める等、対策の早期実施に努めること。

○水道利用者への広報・指示

水道事業者等と連携し、都道府県の感染症担当部局等や保健所を通じて、病院、老人保健施設、社会福祉施設、学校等をはじめとし、利用者に広報・指示を行うとともに、患者等の問い合わせ等に適切に対応すること。

○受水槽の管理

受水槽の設置者に対し、給水の停止及び水槽内の清掃を行うよう指導すること。また、給水の再開は、汚染されていない水に入れ替えたのちに行うよう指導すること。

○近傍の水道事業者等への連絡等

近傍の地表水又は地表水の影響を受ける地下水（伏流水、浅井戸）を水源とする水道事業者等に対し、クリプトスポリジウム症等の発生について速やかに情報提供を行うとともに、浄水処理の徹底を指導すること。

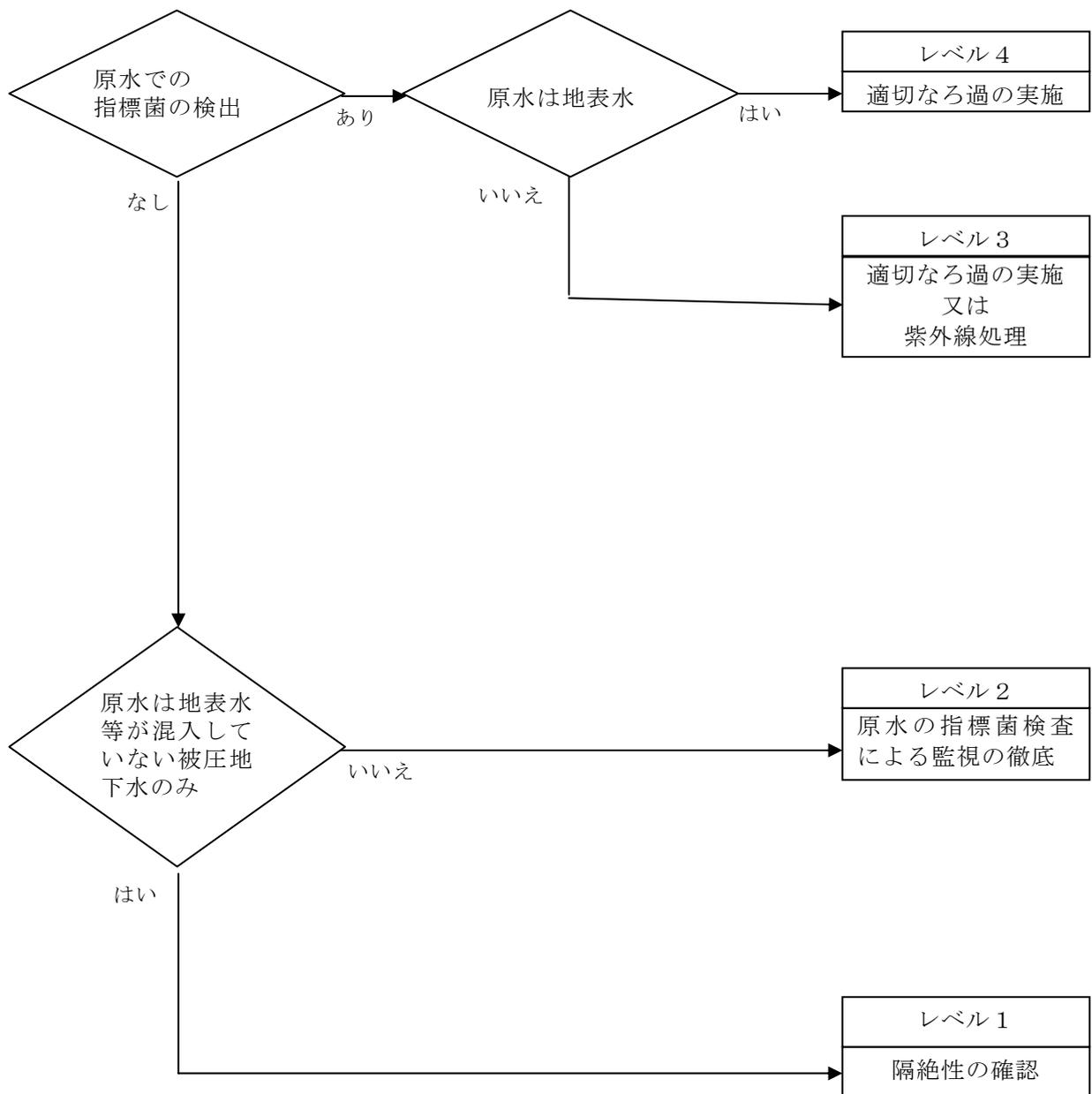


図 水道原水に係るクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの判断の流れ

【別添1】

水道がクリプトスポリジウムの感染源であるおそれが否定できない場合の広報の具体例

1 クリプトスポリジウムに関する情報の提供

水道利用者等に混乱を生じないように、クリプトスポリジウム症の特徴などを十分説明する。

●クリプトスポリジウムは人間や牛などの小腸に寄生する原虫です。

クリプトスポリジウムは人の他に牛、豚、犬、猫などのほ乳動物の腸に寄生する、大きさは4～6 μ m(1 μ mは1mmの千分の1)の原虫です。感染した人や動物の糞便といっしょにオーシストと呼ばれる形で体の外へ排出され、感染源となります。排出量は、1日当たり、人では約10億個、ウシでは約100億個といわれています。

湿った環境の中では、クリプトスポリジウムは2～6ヶ月間、感染力をもっています。

●クリプトスポリジウムは食べ物や水を介して口から感染します。

クリプトスポリジウムのオーシストを、食べ物や水を介して口から摂取すると、クリプトスポリジウムは小腸の組織に入り込み増殖を始めます。

●クリプトスポリジウムに感染した場合の症状は下痢や腹痛です。

クリプトスポリジウムが人に感染症を引き起こす原因として知られ始めたのは、1976年からです。

クリプトスポリジウムに感染すると、2日～5日後に、下痢、腹痛、吐き気や嘔吐、軽い発熱などの症状が始まります。下痢はさらさらの泥水の様で、血液が混じることはありません。感染しても症状が出ない人もいます。

健康な方で免疫が正常に働いていれば、クリプトスポリジウム症の症状は4、5日～約1週間程度でなくなります。長い場合は2週間ほど続く場合もありますが、生命に関わる病気ではありません。

一方、免疫不全の方やガンの治療で免疫抑制療法を受けている方などの場合、病気が長びき、深刻な症状になるおそれがあります。

●感染症にかかったら水分の補給に心がけてください。

クリプトスポリジウムによる下痢は、免疫の作用で自然に治りますが、脱水症状にならないよう、水分の補給に気をつけてください。水やお茶よりもスポーツドリンクの方が吸収されやすく、脱水を防ぐのに有効です。

また、症状がひどくて心配な場合は、医師に相談してください。

2 感染症の予防

感染症の流行時に心掛けるべきことを説明する。

●手をきちんと洗ってください。

おむつの交換のあと、患者の糞便にさわったあと、また、料理など食べ物を扱うまえには、アルコール綿等でふき取り、石けんで手を良く洗い紙タオル等で良くふいて乾かしてください。

〔参考〕

クリプトスポリジウムに感染した場合、症状が治った後、あるいは症状が出なくてもオーストは便から排出されることから、2次感染を防止するため、便に触れた場合や飲食物を扱うときには、アルコール綿等でふき取り、石けん等で十分手を洗って良く拭いて乾かしてください。

●水は煮沸して飲んでください。

クリプトスポリジウムは熱に弱いので、水は1分以上煮沸して飲んでください。氷も湯冷ましを使って作ってください。プールの水、湖や川の水からも感染することがありますから、再生水を口にすることがないように注意してください。

この他、生ものは避け、加熱して調理してください。食器も良く拭き乾燥させてください。

〔参考〕

クリプトスポリジウムは加熱、冷凍、乾燥に弱く、60℃以上又は-20℃以下で30分間、又は、常温の場合で1~4日間乾燥状態におかれると、感染力を失います。飲用水の場合は、1分間沸騰させれば十分不活化できます。

●浄水器の使用にも注意してください。

家庭用等の浄水器については、全ての機種がクリプトスポリジウムの除去に有効であるわけではなく、1μmより大きい粒子が確実に除去できるもの以外は効果がありません。

また、クリプトスポリジウムを除去できる浄水器でも、継続した使用に伴ってカートリッジにクリプトスポリジウムが蓄積されるので、使用の手引きに従ってカートリッジの交換を適宜行ってください。なお、カートリッジの交換時には、手にクリプトスポリジウムが付着しないよう気をつけるようにし、交換後には手をよく洗ってください。

●その他

家族で下痢をしている人がいる場合、家族内感染を防ぐため、患者の方の入浴を最後にしてください。また、クリプトスポリジウムは熱湯に弱いので、患者のふん便で汚れた下着やおむつは熱湯をかけてから洗濯してください。

3 水道局での対応

水道事業者等の対応状況を広報し、住民の理解と協力を得ること。

●配水管の洗浄などに伴う断水に関する広報事項(例)

- ・目的 : 配水管内のクリプトスポリジウムを除去するため、管の洗浄を実施する
- ・断水の影響のある世帯、地域等
- ・断水の開始予定時刻及び終了予定時刻
- ・洗浄後の安全確認結果
- ・水道水の利用再開時の注意

しばらく水道水を放水し、給水管内のクリプトスポリジウムを流し出す。

【別添 2】

水道がジアルジアの感染源であるおそれが否定できない場合の広報の具体例

1 ジアルジアに関する情報の提供

水道利用者等に混乱を生じないように、ジアルジア症の特徴などを十分説明する。

●ジアルジアは人間を含む多くの哺乳動物の小腸に寄生する原虫です。

ジアルジアは人やほ乳動物の腸に寄生する、大きさは長径 8~12 μ m、短径 5~8 μ m(1 μ m は 1mm の千分の 1)程度の大きさの原虫です。感染した人や動物の糞便といっしょにシストと呼ばれる形で体の外へ排出され、感染源となります。ジアルジアのシストは下痢の治まった後の有形便の中に多量に排出されます。排出されるシストの量は変動するようで、糞便 1g あたり 10^6 ~ 10^8 個、一人当たり 1 日 10 億個以上となりますが、感染しても検出限界以下のごくわずかのシストしか排出しない人も多く見られます。

湿った環境の中では、ジアルジアは少なくとも 2 ケ月間、感染力をもっています。

●ジアルジアは食べ物や水を介して口から感染します。

ジアルジアのシストを、食べ物や水を介して口から摂取すると、ジアルジアは十二指腸や小腸の上皮細胞表面に吸着して増殖を始めますが、細胞や組織の中に侵入することはありません。一方、輸胆管やさらに上流部まで感染が広がることもあります。

●ジアルジアに感染した場合の症状は下痢や腹痛です。

ジアルジアが人に感染症を引き起こすことは、古くから知られていました。

ジアルジアに感染してから下痢、腹痛などの症状が出るまでの期間は一定しませんが、一般的には 6~15 日後とされています。下痢は水溶性の激しいものから泥状便まで様々ですが、血液が混じることはありません。また、感染しても症状が出ない人も多く見られます。

健康な方が感染しても 2~4 週間あるいはそれ以上と比較的長く症状が続きますが、生命に関わる病気ではありません。また、本症には治療薬が知られていることから、正しく診断されれば免疫不全患者においても深刻な症状に発展することはありません。

●感染症にかかったら水分の補給に心がけてください。

ジアルジアによる下痢は、免疫の作用で自然に治りますが、脱水症状にならないよう、水分の補給に気をつけてください。水やお茶よりもスポーツドリンクの方が吸収されやすく、脱水を防ぐのに有効です。

2 感染症の予防

感染症の流行時に心掛けるべきことを説明する。

●手をきちんと洗ってください。

おむつの交換のあと、患者の糞便にさわったあと、また、料理など食べ物を扱うまえには、アルコール綿等でふき取り、石けんで手を良く洗い紙タオル等で良くふいて乾かしてください。

[参考]

先にも触れましたが、ジアルジアのシストは下痢の治まった後の有形便の中に多量に排出されます。ジアルジアに感染した場合、症状が治った後、あるいは症状が出なくてもシストは便から排出されることから、2次感染を防止するため、便に触れた場合や飲食物を扱うときには、アルコール綿等でふき取り、石けん等で十分手を洗って良く拭いて乾かしてください。

●水は煮沸して飲んでください。

ジアルジアは熱に弱いので、水は1分間以上煮沸して飲んでください。氷も湯冷ましを使って作ってください。プールの水、湖や川の水からも感染することがありますから、再生水を口にすることがないように注意してください。

この他、生ものは避け、加熱して調理してください。食器も良く拭き乾燥させてください。

●浄水器の使用にも注意してください。

家庭用等の浄水器については、全ての機種がジアルジアの除去に有効であるわけではなく、1 μ mより大きい粒子が確実に除去できるもの以外は効果がありません。

また、ジアルジアを除去できる浄水器でも、継続した使用に伴ってカートリッジにジアルジアが蓄積されるので、使用の手引きに従ってカートリッジの交換を適宜行ってください。なお、カートリッジの交換時には、手にジアルジアが付着しないよう気をつけるようにし、交換後には手をよく洗ってください。

●その他

家族で下痢をしている人がいる場合、家族内感染を防ぐため、患者の方の入浴を最後にしてください。また、ジアルジアは熱湯に弱いので、患者のふん便で汚れた下着やおむつは熱湯をかけてから洗濯してください。

[参考]

便で汚れた下着などは比較的小さな容器(盥(たらい)やバケツなど)に入れて、熱湯をかけると効果的に消毒ができます。

3 水道局での対応

水道事業者等の対応状況を広報し、住民の理解と協力を得ること。

●配水管の洗浄などに伴う断水に関する広報事項(例)

- ・目的 : 配水管内のジアルジアを除去するため、管の洗浄を実施する
- ・断水の影響のある世帯、地域等
- ・断水の開始予定時刻及び終了予定時刻
- ・洗浄後の安全確認結果
- ・水道水の利用再開時の注意
 - しばらく水道水を放水し、給水管内のジアルジアを流し出す。

水道におけるクリプトスポリジウム等対策の実施状況について

1. 調査内容及び方法

水道事業、水道用水供給事業及び専用水道における「水道水におけるクリプトスポリジウム対策指針」（以下「対策指針」という。）に基づく浄水施設でのろ過又は紫外線処理施設の整備や水源変更等によるクリプトスポリジウム対策の実施状況について平成21年3月末時点で調査を行った。また、これまでのクリプトスポリジウム等の検出による給水停止等の対応状況を取りまとめた。

2. 調査結果等

(1) 平成21年3月末現在の対策指針に基づく予防対策の実施状況は表－1, 2, 3及び図－1, 2のとおり。

①表流水、伏流水、浅井戸又は深井戸を水源とする浄水施設（全量浄水受水以外の施設）19,954施設のうち、水道原水のクリプトスポリジウムによる汚染のおそれがある施設（予防対策の必要な施設）は5,948施設（約30%）である。

②このうち3,512施設では、既に対策施設設置等の予防対策について実施済みである。

③残る2,436施設については、対策施設設置等について検討中である。このような施設には簡易水道等の小規模な水道事業者によるものが多いため、給水人口ベースでは簡易水道の占める割合は15%にすぎないが、施設数ベースでは約2/3を占める。

・給水人口ベース

簡易水道：約82万人（15%）、上水道：約445万人（83%）

・施設数ベース

簡易水道：1,600施設（66%）、上水道：634施設（26%）

これらの施設では、当面の措置として新対策指針に基づき原水の水質監視を徹底し、クリプトスポリジウム等が混入するおそれが高まった場合には、取水停止等を行うこととされている。

(2) 水道の浄水等でクリプトスポリジウム等が検出され、給水停止等の対応を行ったとして、平成22年1月末迄に厚生労働省健康局水道課に報告された事例は表－4のとおり。なお、平成8年の埼玉県越生町上水道における事故以降、水道水を介した感染症発生事例は報告されていない。

(参考) クリプトスポリジウム等対策の促進策について

厚生労働省においては、平成9年度から膜処理施設の整備を国庫補助の対象とし、さらに、平成17年度には、簡易水道におけるクリプトスポリジウム対策としてのろ過施設整備に代替して開発する水源施設の整備を国庫補助対象に加え、積極的に対策を進めてきたところである。また、平成19年3月の水道施設の技術的基準を定める省令の改正を踏まえ、一般的なろ過施設より安価に整備することができる紫外線処理施設の整備を国庫補助対象に加えるとともに、対策が必要な既存水源を廃止し、別の自己水源から給水する場合等に必要な施設の整備を国庫補助対象に加え、クリプトスポリジウム等対策の一層の推進を図ることとしている。

表一 1 対策指針に基づく予防対策の実施状況（平成21年3月末現在）

	水道事業		水道用水供給事業	専用水道	合計
	上水道	簡易水道			
調査対象浄水施設 ^{注1} 数	5,281	8,497	170	6,006	19,954
給水人口 ^{注3} (人)	118,589,376	5,460,116	-	527,417	124,576,909
レベル4施設数	949	2,113	142	208	3,412
対応済みの浄水施設数	884	1,447	142	152	2,625
対策施設を検討中の浄水施設 ^{注2} 数	65 (22)	666 (183)	0 (0)	56 (13)	787 (218)
給水人口(人)	581,675	315,291	0	17,497	914,463
レベル3施設数	875	1,420	4	237	2,536
対応済みの浄水施設数(ろ過)	306	486	3	92	887
対応済みの浄水施設数(紫外線照射)	10	8	0	8	26
対策施設を検討中の浄水施設 ^{注2} 数	569 (245)	934 (215)	1 (1)	145 (23)	1,649 (484)
給水人口(人)	3,865,363	504,605	4,038	37,646	4,411,652
レベル2施設数	1,084	1,487	4	1,108	3,683
レベル1施設数	1,371	1,240	5	1,968	4,584
レベル不明施設数 ^{注4}	1,002	2,237	15	2,485	5,739

注1) 「調査対象浄水施設」とは、表流水、伏流水、湧水、地下水（浅井戸及び深井戸）を水源とする浄水施設（全量浄水受水以外の施設）である。

注2) 「対策施設設置等を検討中の浄水施設」とは、対応に必要な浄水施設のうち、対策指針に示す過施設の設置等の恒久的な予防対策を検討中（実施中を含む）の施設であり、このうち具体的な導入予定のある施設数を括弧内に示す。なお、これらの施設では、当面の措置として原水の水質監視を徹底し、クリプトスポリジウム等が混入するおそれが高まった場合には、取水停止等を行っている。

注3) 厚生労働省水道課調べ（平成19年度）による。

注4) 水道原水に係わる指標菌（大腸菌、嫌気性芽胞菌）の検査結果に基づくレベル判断を未実施である施設の数。ろ過等による浄水処理対策を実施済みの施設も含まれる。

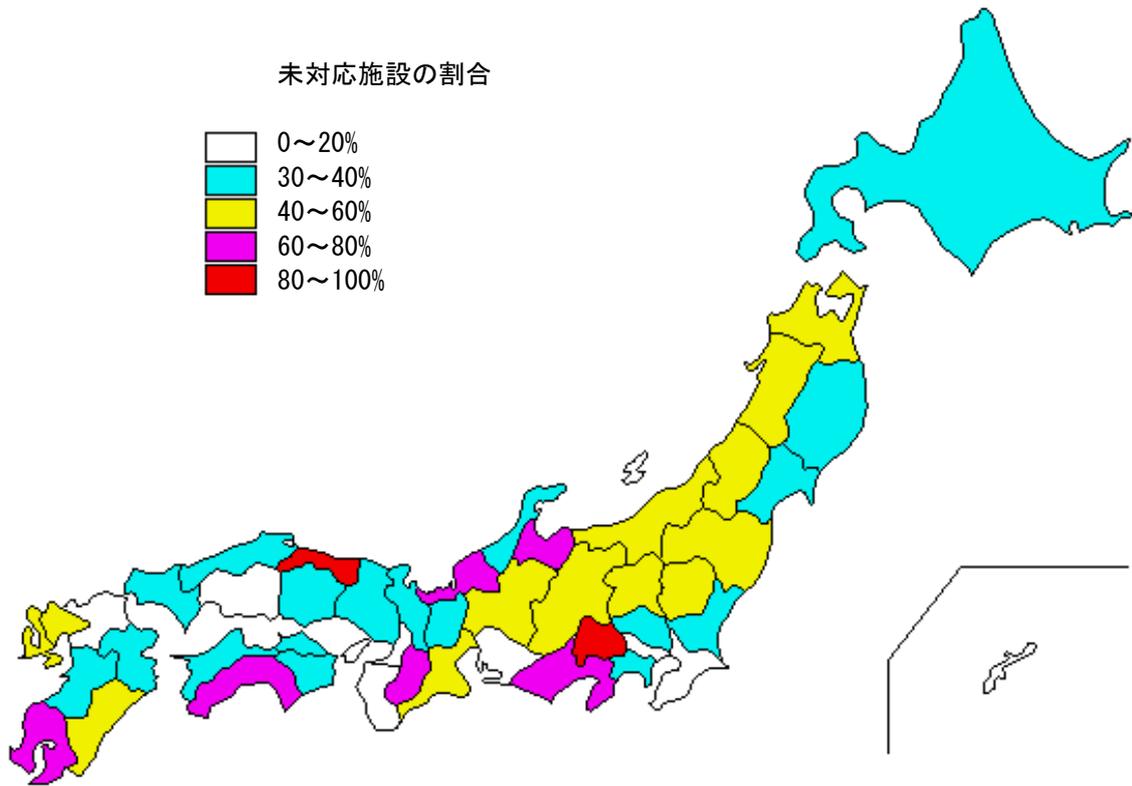
表一 2 都道府県別対応状況（施設数）

都道府県	調査対象浄水施設(A)	対応の必要な浄水施設数(B)	B/A(%)	対応済みの浄水施設数(C)	C/B(%)	対策施設設置等検討中の浄水施設数(D)	D/B(%)
北海道	996	383	38.5%	255	66.6%	128	33.4%
青森県	262	77	29.4%	43	55.8%	34	44.2%
岩手県	457	167	36.5%	112	67.1%	55	32.9%
宮城県	248	109	44.0%	84	77.1%	25	22.9%
秋田県	479	146	30.5%	68	46.6%	78	53.4%
山形県	208	75	36.1%	38	50.7%	37	49.3%
福島県	499	155	31.1%	85	54.8%	70	45.2%
茨城県	395	77	19.5%	60	77.9%	17	22.1%
栃木県	534	75	14.0%	33	44.0%	42	56.0%
群馬県	296	68	23.0%	39	57.4%	29	42.6%
埼玉県	392	88	22.4%	59	67.0%	29	33.0%
千葉県	837	52	6.2%	44	84.6%	8	15.4%
東京都	285	57	20.0%	49	86.0%	8	14.0%
神奈川県	369	67	18.2%	41	61.2%	26	38.8%
新潟県	570	165	28.9%	85	51.5%	80	48.5%
富山県	388	78	20.1%	21	26.9%	57	73.1%
石川県	339	55	16.2%	37	67.3%	18	32.7%
福井県	250	91	36.4%	28	30.8%	63	69.2%
山梨県	576	156	27.1%	30	19.2%	126	80.8%
長野県	760	233	30.7%	120	51.5%	113	48.5%
岐阜県	706	301	42.6%	173	57.5%	128	42.5%
静岡県	902	162	18.0%	47	29.0%	115	71.0%
愛知県	365	102	27.9%	93	91.2%	9	8.8%
三重県	344	101	29.4%	46	45.5%	55	54.5%
滋賀県	199	103	51.8%	76	73.8%	27	26.2%
京都府	450	228	50.7%	160	70.2%	68	29.8%
大阪府	261	62	23.8%	52	83.9%	10	16.1%
兵庫県	464	144	31.0%	88	61.1%	56	38.9%
奈良県	188	25	13.3%	10	40.0%	15	60.0%
和歌山県	217	98	45.2%	81	82.7%	17	17.3%
鳥取県	379	72	19.0%	14	19.4%	58	80.6%
島根県	365	197	54.0%	133	67.5%	64	32.5%
岡山県	284	165	58.1%	124	75.2%	41	24.8%
広島県	372	146	39.2%	119	81.5%	27	18.5%
山口県	270	99	36.7%	76	76.8%	23	23.2%
徳島県	218	87	39.9%	64	73.6%	23	26.4%
香川県	125	94	75.2%	63	67.0%	31	33.0%
愛媛県	535	244	45.6%	165	67.6%	79	32.4%
高知県	356	49	13.8%	18	36.7%	31	63.3%
福岡県	514	109	21.2%	91	83.5%	18	16.5%
佐賀県	200	51	25.5%	26	51.0%	25	49.0%
長崎県	628	172	27.4%	96	55.8%	76	44.2%
熊本県	717	81	11.3%	52	64.2%	29	35.8%
大分県	519	165	31.8%	104	63.0%	61	37.0%
宮崎県	284	156	54.9%	75	48.1%	81	51.9%
鹿児島県	871	311	35.7%	90	28.9%	221	71.1%
沖縄県	81	50	61.7%	45	90.0%	5	10.0%
合計	19,954	5,948	29.8%	3,512	59.0%	2,436	41.0%

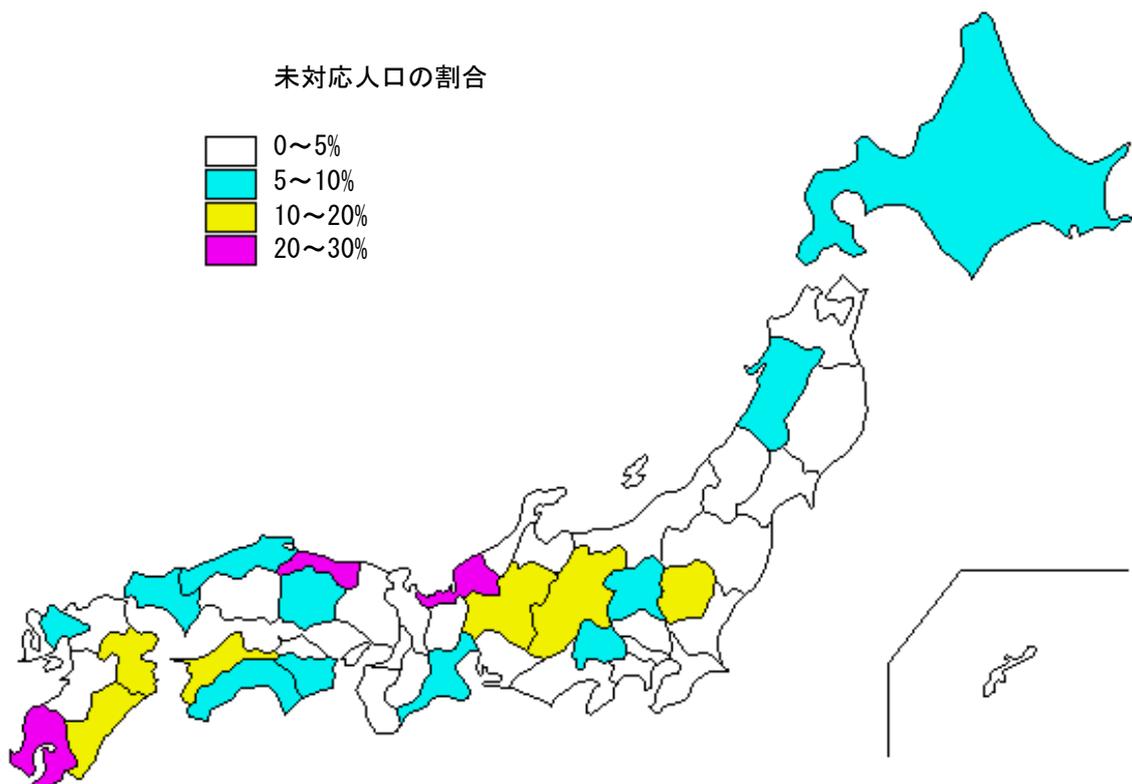
表ー3 クリプトスポリジウム対応状況（給水人口）

都道府県	現在給水人口(A)	対応不要又は対応済みの浄水施設人口(B)	B/A(%)	対策施設設置等検討中の浄水人口(C)	C/A(%)
北海道	5,433,173	4,953,999	91.2%	479,174	8.8%
青森県	1,360,457	1,312,098	96.4%	48,359	3.6%
岩手県	1,254,893	1,200,149	95.6%	54,744	4.4%
宮城県	2,316,193	2,276,460	98.3%	39,733	1.7%
秋田県	998,063	919,384	92.1%	78,679	7.9%
山形県	1,162,405	1,139,285	98.0%	23,120	2.0%
福島県	1,894,584	1,813,375	95.7%	81,209	4.3%
茨城県	2,719,430	2,658,715	97.8%	60,715	2.2%
栃木県	1,908,676	1,675,330	87.8%	233,346	12.2%
群馬県	1,996,635	1,828,703	91.6%	167,932	8.4%
埼玉県	7,095,266	6,838,552	96.4%	256,714	3.6%
千葉県	5,772,312	5,770,488	100.0%	1,824	0.0%
東京都	12,839,534	12,835,442	100.0%	4,092	0.0%
神奈川県	8,900,673	8,784,177	98.7%	116,496	1.3%
新潟県	2,366,908	2,313,099	97.7%	53,809	2.3%
富山県	1,025,878	997,405	97.2%	28,473	2.8%
石川県	1,150,931	1,141,899	99.2%	9,032	0.8%
福井県	783,588	580,966	74.1%	202,622	25.9%
山梨県	868,909	814,369	93.7%	54,540	6.3%
長野県	2,147,071	1,839,456	85.7%	307,615	14.3%
岐阜県	2,010,853	1,661,796	82.6%	349,057	17.4%
静岡県	3,750,183	3,596,842	95.9%	153,341	4.1%
愛知県	7,349,205	7,197,089	97.9%	152,116	2.1%
三重県	1,844,639	1,667,827	90.4%	176,812	9.6%
滋賀県	1,398,464	1,348,054	96.4%	50,410	3.6%
京都府	2,621,909	2,538,972	96.8%	82,937	3.2%
大阪府	8,818,313	8,797,977	99.8%	20,336	0.2%
兵庫県	5,574,036	5,349,547	96.0%	224,489	4.0%
奈良県	1,392,694	1,389,715	99.8%	2,979	0.2%
和歌山県	1,003,938	964,663	96.1%	39,275	3.9%
鳥取県	589,740	442,381	75.0%	147,359	25.0%
島根県	701,852	658,634	93.8%	43,218	6.2%
岡山県	1,923,556	1,806,910	93.9%	116,646	6.1%
広島県	2,703,476	2,626,615	97.2%	76,861	2.8%
山口県	1,353,283	1,277,533	94.4%	75,750	5.6%
徳島県	755,577	686,282	90.8%	69,295	9.2%
香川県	989,958	949,141	95.9%	40,817	4.1%
愛媛県	1,368,437	1,131,172	82.7%	237,265	17.3%
高知県	720,195	663,020	92.1%	57,175	7.9%
福岡県	4,679,766	4,594,072	98.2%	85,694	1.8%
佐賀県	812,607	756,057	93.0%	56,550	7.0%
長崎県	1,417,259	1,350,499	95.3%	66,760	4.7%
熊本県	1,561,142	1,545,737	99.0%	15,405	1.0%
大分県	1,082,384	960,004	88.7%	122,380	11.3%
宮崎県	1,103,650	932,041	84.5%	171,609	15.5%
鹿児島県	1,684,797	1,309,829	77.7%	374,968	22.3%
沖縄県	1,369,417	1,359,072	99.2%	10,345	0.8%
合計	124,576,909	119,254,832	95.7%	5,322,077	4.3%

注）現在給水人口は厚生労働省水道課調べ（平成19年度）による。



図一 1 都道府県別対応状況（施設数）



図一 2 都道府県別対応状況（給水人口）

表ー4 水道におけるクリプトスポリジウム等検出状況と対応の事例（給水停止等の対応を行ったもの）

平成22年1月末現在

年度	件数	都道府県市町村	種別	浄水処理	長期的対応	備考
平成8年度	1	埼玉県越生町	上水道	急速ろ過処理	膜ろ過施設設置	浄水からクリプトスポリジウムを検出。住民14,000人のうち8,800人が感染。
平成9年度	2	鳥取県鳥取市	簡易水道	塩素処理のみ	上水道事業に併合	原水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
		兵庫県山崎町	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
平成10年度	2	福井県永平寺町	簡易水道	急速ろ過処理	浄水処理管理強化	原水及び浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
		兵庫県夢前町	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
平成11年度	1	山形県朝日村	上水道	塩素処理のみ	広域用水供給事業から受水	浄水からクリプトスポリジウム及びジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成12年度	3	青森県三戸町	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
		沖縄県名護市	小規模水道	簡易ろ過及び塩素処理	上水道事業に併合	浄水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
		岩手県平泉町	簡易水道	塩素処理のみ	水源変更、急速ろ過施設設置	浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成13年度	5	愛媛県今治市	上水道	塩素処理のみ	当該水源は使用中止	浄水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
		岩手県釜石市	簡易水道	緩速ろ過処理	浄水処理管理強化	原水及び浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
		兵庫県山崎町	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
		鹿児島県財部町	上水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置予定	原水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
		愛媛県北条市	上水道	急速ろ過、活性炭処理	ろ材入替、浄水処理管理強化を予定	浄水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
平成14年度	1	山形県新庄市	簡易水道	塩素処理のみ	応急対策として膜処理装置設置、長期的には上水道事業と統合予定	原水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成15年度	2	大分県別府市	上水道	塩素処理のみ	当該水源は使用中止	原水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
		山形県米沢市	小規模水道	塩素処理のみ	応急対策として膜ろ過施設設置、長期的には水源変更	浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成16年度	1	兵庫県宝塚市	上水道	急速ろ過処理	安全確認迄の間飲用制限、浄水処理管理強化を実施	原水及び浄水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成17年度	0	該当なし				
平成18年度	1	大阪府能勢町	簡易水道	急速ろ過	濁度計を設置し常時濁度管理を徹底	原水及び浄水からクリプトスポリジウムを検出。感染症患者なし。
平成19年度	2	富山県富山市	簡易水道	塩素処理のみ	上水道事業に併合	原水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
		富山県高岡市	簡易水道	急速ろ過（濁度管理不可）	紫外線処理施設設置予定	原水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
平成20年度	1	山形県村山市	簡易水道	塩素処理のみ	膜ろ過施設設置	原水からジアルジアを検出。感染症患者なし。
	22					

※ 原水からクリプトスポリジウム等が検出された場合で「対策指針」に基づく対策が講じられていない施設の事例を含む。

各都道府県・政令市・特別区水道行政担当部（局）長 殿

厚生労働省健康局水道課長

水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について

水道行政の推進につきましては、日頃から格別のご協力を賜り厚くお礼申し上げます。

さて、水道におけるクリプトスポリジウム等の対策については、今般、最新の科学的知見等を踏まえ、「水道施設の技術的基準を定める省令」（平成 12 年厚生省令第 15 号。以下、「施設基準省令」という。）を改正するとともに、新たに、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」（平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330005 号通知の別添。以下、「指針」という。）が示され、平成 19 年 4 月 1 日より適用することとしたところですが、指針中 2. 及び 3. の（2）において別に定めることとした「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」を別添 1～3 のとおり示したので、下記事項に御留意の上、貴管下の水道事業者等に対する検査方法の周知方をお願いします。

なお、当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、適宜検査方法を見直していくこととしておりますので、貴職の御協力を併せてお願いします。

記

第 1 検査方法の概要

1. 指標菌の検査方法

（1）大腸菌の定量方法

現在、水道原水の大腸菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 1 に示した。

- ・特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法

（2）嫌気性芽胞菌の検査方法

現在、水道原水の嫌気性芽胞菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 2 に示した。

- ・ハンドフォード改良寒天培地法
- ・M-C P 寒天培地法
- ・D R C (Differential Reinforced Clostridial) 培地法

2. クリプトスポリジウム等の検査方法

従来、「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成 10 年 6 月 19 日付け衛水第 49 号通知）において、応急対応のための検査方法として定められ、標準的に使用されている方法を基に、「標準的方法」及びその他の方法を別添 3 に示した。

なお、水道の原水及び給水栓水等についての検査方法、応急対応のための検査方法については、「標準的方法」を用いて行うことを基本とするが、「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、回収率の信頼性等を確認

することができた場合は、その他の方法を用いてもよいこととし、いずれの場合にあっても、試験結果の信頼性が確保できるよう、適切な条件、操作方法を選定すべきであること。

第2 留意事項

1. 定期的な原水に係る検査の実施について

水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を把握するため、指針に基づき、できるだけ早期に原水に係る検査の実施体制の整備等につき必要な措置を講じ、定期的に原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施すること。

また、平成20年度以降については、原水の指標菌の検査及びクリプトスポリジウム等による汚染のおそれのある施設における原水のクリプトスポリジウム等の検査についても、水道法（昭和32年法律第177号）第20条第1項の規定に基づく水質検査に準じて、水道法施行規則（昭和32年厚生省令第45号）第15条第6項の規定に基づく水質検査計画に位置付けられたいこと。

2. 定量的な汚染リスクに関する知見の収集について

クリプトスポリジウム等及び指標菌に関しては、水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度に関する定量的な知見が必ずしも十分でないことから、今回示した指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法により、汚染リスクに関する定量的なデータの集積に努めるべきであること。また、当省においては、これらの知見を踏まえ、今後、定量的な汚染リスクに基づく予防対策等について検討を進めることとしていること。

3. 検査方法の見直しについて

当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、通知に示す検査方法と同等以上の方法と認められるものについては、積極的に採用するべく、逐次、検査方法を見直す予定であること。

4. 飲料水における検査結果について

飲料水についての検査において、クリプトスポリジウム等の判別が困難な場合には、別途通知により示すこととしているクロスチェック実施要領に基づくクロスチェックにより、検査結果の確認が適切に行なわれるべきものであること。

なお、水道、飲用井戸等（水道法の規制を受けない水道を含む。）から供給される飲料水において、クリプトスポリジウム等の塩素消毒に耐性のある病原生物の検出情報を把握した場合には、「飲料水健康危機管理実施要領について」（平成14年6月28日付け健水発第0628001号通知）に基づき直ちに当職宛に連絡いただくようお願いしているところであるので念のため申し添えます。

また、クリプトスポリジウム等が水道原水中に存在する場合には、紫外線処理を行っても、クリプトスポリジウム等は浄水にも存在することとなるが、紫外線処理が適切に行われている場合には、ヒトに対する感染性はなく、指針に基づく運転管理を確実に実施することにより、浄水の安全性を確保すべきこと。

第3 関係通知の改廃等

平成19年4月1日付けをもって、厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成10年6月19日付け衛水第49号）及び「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法の付録の送付について」（平成12年3月30日付け衛水第18号）は廃止する。

別添 1 大腸菌の定量方法

特定酵素基質培地法

1 培地及び試薬

(1) MMO-MUG培地

硫酸アンモニウム5g、硫酸マンガン0.5mg、硫酸亜鉛0.5mg、硫酸マグネシウム100mg、塩化ナトリウム10g、塩化カルシウム50mg、ヘペス(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)6.9g、ヘペスナトリウム塩(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸ナトリウム)5.3g、亜硫酸ナトリウム40mg、アムホテリシンB 1mg、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド500mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド75mg及びソラニウム500mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、黄色く着色したものは使用しない。

この培地は、冷暗所に保存する。

(2) IPTG添加ONPG-MUG培地

硫酸アンモニウム2.5g、硫酸マグネシウム100mg、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、塩化ナトリウム2.9g、トリプトース5g、トリプトファン1g、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド100mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びトリメチルアミン-N-オキシド1gを精製水約450mlに溶かし、pH値が6.1~6.3となるように調整した後、精製水を加えて500mlとし、ろ過除菌した後、試験容器に10mlずつ分注したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(3) XG a 1-MUG培地

塩化ナトリウム5g、リン酸一水素カリウム2.7g、リン酸二水素カリウム2g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ソルビトール1g、トリプトース5g、トリプトファン1g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド80mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(4) ピルビン酸添加XG a 1-MUG培地

塩化ナトリウム5g、硝酸カリウム1g、リン酸一水素カリウム4g、リン酸二水素カリウム1g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ピルビン酸ナトリウム1g、ペプトン5g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド100mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(5) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

リン酸二水素カリウム42.5gを精製水500mlで溶かし、1mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH値を7.2に調整した後、精製水を加えて1Lとした溶液1mlを精製水1Lで溶かし、高圧蒸気滅菌したもの

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 試験容器

検水10mlと培地が密封できるもので、滅菌したもの

(3) MMO-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(3)の例による。

(4) IPTG添加ONPG-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(4)の例による。

(5) XGa1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(5)の例による。

(6) ピルビン酸添加XGa1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(6)の例による。

(7) 恒温器

検査方法告示の別表第1の2(3)の例による。

(8) 紫外線ランプ

検査方法告示の別表第2の2(8)の例による。

(9) 紫外線防護眼鏡

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 希釈検水の調製

検水中の大腸菌数が多いと予想される場合は、次の操作によって希釈検水を調製する。

検水10mlを採り、希釈水90mlに加えてよく振り混ぜる。次に、その10mlを採り、同様な操作を行いながら希釈を繰り返し、10倍ごとの数段階の希釈検水を作る。10倍希釈法の操作を図-1に示す。

なお、希釈検水は、微生物が増殖することや死滅することもあるので、室温に30分以上放置してはならない。

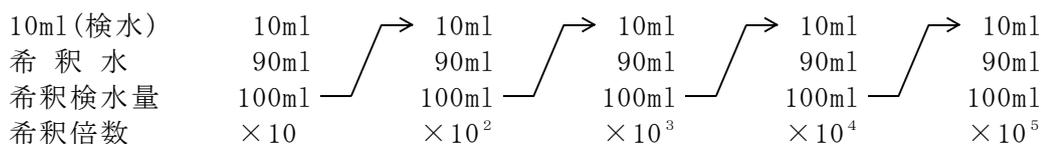


図-1 10倍希釈法の操作

(2) 培養操作

検水10mlを上記1のいずれかの10ml用培地入り試験容器5本に接種する。次いで、各段階の希釈検水について、同様に操作する。接種後、容器を振って培地を溶解あるいは混合させ、恒温器に収め、35～37℃で24時間培養する。なお、接種の際に、5本以上の接種本数となる組み合わせを用いてもよい。培養後、紫外線ランプを用いて波長366nmの紫外線を照射し、蛍光の有無を確認する。培地に対応する比色液より蛍光が強い場合は陽性と判定し、弱い場合は陰性と判定する。

5 菌数の算出

検水、各段階の希釈検水列の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

別添 2 嫌気性芽胞菌の検査方法

第 1 ハンドフォード改良寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) 標準濃度ハンドフォード改良寒天培地

大豆ペプトン4.8g、ペプトン15g、酵母エキス4.8g、クエン酸鉄アンモニウム0.90g、4-メトキシ-6-スルファ-ニルアミドピリミジン0.09g、ピロ亜硫酸ナトリウム0.90g、オレアンドマイシン0.48g、硫酸ポリミキシンB 9,000単位、カナマイシン0.048g、粉末寒天18gを精製水1Lに加熱溶解し、滅菌後のpH値が7.5～7.7となるように調整した後、高圧蒸気滅菌したもの

この培地は、恒温水槽で約45℃に保温し、三重層法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(2) 標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地を疎水格子用ペトリ皿又はメンブランフィルター用ペトリ皿に約15mlずつ分注して平板に固めたもの

この培地は、疎水格子フィルター法及びメンブランフィルター法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(3) 1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地の各成分を精製水600mlを用いて(1)と同様に調製したもの

この培地は、パウチ法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(4) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の1(5)の例による。

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

容量100ml以上のもので、滅菌したもの

(3) 疎水格子フィルター

50mm四方で1mm四方の1600区画にわけられているもので、滅菌したもの

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

滅菌したもの

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

孔径0.2～0.45 μ m、直径47mmのもので、滅菌したもの

(7) メンブランフィルターろ過装置

滅菌したもの

- (8) メンブランフィルター用ペトリ皿

直径約5cm、高さ約1.5cmのものであって、ガラス製又はプラスチック製で滅菌したもの

- (9) 嫌気ジャー

内部の酸素を除去し、嫌気状態にすることができるもの

- (10) パウチ

滅菌したもの

- (11) プラスチックシーラー

- (12) 恒温水槽

水温を45℃又は75℃に保持できるもの

- (13) 恒温器

温度を44～46℃に保持できるもの

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

- (1) 検水の加熱処理

検水約100mlを加熱用容器に採り、75℃の恒温水槽に20分間浸して加熱した後、速やかに氷水に浸して冷やす。

- (2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

- (3) 培養操作

次のいずれかの培養操作を行う。なお、汚染の著しい検水では希釈検水を用いてもよい。

- a) 疎水格子フィルター法

疎水格子フィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径0.25mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

- b) メンブランフィルター法

メンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準

濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これに標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを重層して固化した後、更に標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを重層する。これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

c) 三重層法

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地5～10mlをペトリ皿2枚以上に注いで固めた平板をあらかじめ用意する。次いで、加熱処理した検水又は希釈検水1mlずつをペトリ皿の中央部に入れ、溶解して約45℃に保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを注いだ後、直ちに蓋をし、速やかに前後左右に揺り動かして検水と培地を十分に混和させ、平板に固めて混積平板とする。次に、この平板に溶解して保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを注いで直ちに蓋をし、ペトリ皿を静かに揺り動かして混積平板の表面全体に培地を行きわたらせた後、静置し、平板に固める。培地が固まったことを確認した後、これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

d) パウチ法

加熱処理した検水をパウチ2枚以上に10mlずつ入れ、1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地15mlを加え、直ちに指でよく揉んで検水と培地を十分に混合する。培地に混入した気泡をパウチの首部に集めて排除した後、パウチ首部をプラスチックシーラーで溶着して封じ、平らな面において室温で平板状に固める。これを恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落をそれぞれの方法の計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

第2 M-C-P寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) M-C-P寒天平板培地

トリプトース3.0g、粉末酵母エキス2.0g、シュクロース0.50g、L-システイン塩酸塩0.10g、硫酸マグネシウム(7水塩)0.01g、プロモクレゾールパープル0.004g、粉末寒天1.5gを精製水90mlに加熱溶解し、pH値を7.6に調整した後、高圧蒸気滅菌し、滅菌後、速やかに約50℃に冷却した後、D-シクロセリン0.04g、ポリミキシンB硫酸塩0.0025g、インドキシル-β-D-グルコシド溶液8ml、フェノールフタレインニリン酸塩溶液2ml、塩化第二鉄溶液0.2mlを無菌的に加えて混合し、調製後、直ちに疎水格子用ペトリ皿には約10mlずつ、メンブランフィルター用ペトリ皿には約3mlずつ分注して平板に固めたもの

この培地を保存する場合は、密閉容器に入れて冷蔵庫に収める。

この培地は、調製後96時間以内に使用する。

(2) インドキシル-β-D-グルコシド溶液

インドキシル-β-D-グルコシド0.060gを滅菌精製水8mlで溶かしたもの

この溶液は、使用の都度調製する。

(3) フェノールフタレインニリン酸塩溶液

フェノールフタレインニリン酸塩0.50gを精製水100mlで溶かした後、高圧蒸気滅菌したもの

(4) 塩化第二鉄溶液

塩化第二鉄(6水塩)4.5gを精製水100mlで溶かした後、ろ過除菌したもの

(5) アンモニア水(25%～30%)

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(3) 疎水格子フィルター

第1の2(3)の例による。

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

第1の2(4)の例による。

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

第1の2(6)の例による。

(7) メンブランフィルターろ過装置

第1の2(7)の例による。

(8) メンブランフィルター用ペトリ皿

第1の2(8)の例による。

(9) 嫌気ジャー

(10) 恒温水槽

水温を44.8～45.2℃に保持できるもの

(11) 恒温器

第1の2(13)の例による。

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

(3) 培養操作

疎水格子フィルターろ過装置又はメンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、メンブランフィルター又は疎水格子フィルターのろ過面を上にして、気泡が入らないようにM-C P寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れ、恒温水槽に沈め、44.8～45.2℃で18～24時間培養する。

培養後、直径1mm以上の不透明な青～黄色集落をマークした後、フィルター上の集落をアンモニア蒸気に20～30秒接触させ、直ちに集落の色調を観察する。このとき、マークしたもののうち、アンモニア蒸気の接触によりピンク色～赤色(紫色は除く)に変色したものをウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落を計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

第3 D R C (Differential Reinforced Clostridial)培地法

1 培地及び試薬

(1) 標準濃度D R C基礎培地

少量の精製水を用いて溶性デンプン1.0gをスラリー状とし、沸騰した精製水180mlを加え、かき混ぜて溶かし、このデンプン溶液をペプトン10g、粉末酵母エキス1.5g、肉エキス10g、酢酸ナトリウム(3水塩)5.0gを溶解した混合液に加え、全量を1Lとし、加熱溶解後、ブドウ糖1.0gとL-システイン0.50gを加えて溶かし、滅菌後のpH値が7.1～7.2になるように調整した後、ねじ口瓶100mlに100mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

(2) 2倍濃度D R C基礎培地

標準濃度D R C基礎培地の各成分の2倍量を精製水1Lを用いて(1)と同様に調製した後、ねじ口瓶25mlには1mlずつ又は10mlずつ、ねじ口瓶100mlには50mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

(3) 1ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.04mlを2倍濃度D R C基礎培地1mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(4) 10ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.4mlを2倍濃度D R C基礎培地10mlに無

菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(5) 50ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを2倍濃度D R C基礎培地50mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(6) 標準濃度D R C培地

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを標準濃度D R C基礎培地100mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(7) リトマス牛乳培地

生牛乳では15分間煮沸、氷室に一夜静置した後、上に浮いたクリームを捨てたもの、脱脂粉乳では20gを温精製水180mlで溶かしたものに、リトマス溶液を青紫色を呈するように加え、液層の高さが4cm程度になるように試験管に分注し、間欠滅菌したもの

(8) 亜硫酸ナトリウム溶液

亜硫酸ナトリウム4.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(9) クエン酸第二鉄溶液

クエン酸第二鉄7.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(10) 亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液

亜硫酸ナトリウム溶液とクエン酸第二鉄溶液を等量ずつ、無菌的に混合したもの
この溶液は、使用の都度調製する。

(11) リトマス溶液

リトマス1gを精製水10mlに溶かしたもの

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) ねじ口瓶：容量25ml及び100mlのもの。

(3) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(4) 白金線又は白金耳

(5) 恒温器

温度を35～37℃に保持できるもの

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 定性試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 培養操作

加熱処理した検水50mlを50ml用DRC培地1本に接種する。次いで、標準濃度DRC培地をねじ口瓶の首上端まで満たす。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

(2) 定量試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

(c) 培養操作

加熱処理した検水は、10ml用DRC培地5本に10mlずつ、1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、各段階の希釈検水は、それぞれ1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、標準濃度DRC培地を瓶の首上端まで満たす。

これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

各希釈段階の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

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、スクリュウ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。目盛り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、スクリュウ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、遠沈管のスクリュウ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

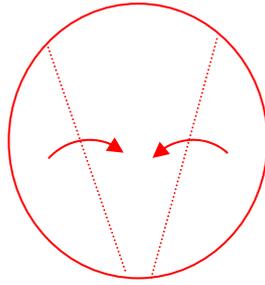
- (1) 精製水：2.1 1) (1) に同じ。
- (2) 100 倍濃度 PET (10 倍濃度ピロリン酸ナトリウム希釈液)：精製水約 800ml にピロリン酸ナトリウム 10 水塩 20g、エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム 30g、Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween80 またはそれと同等のもの) 10ml を溶解し、1N 塩酸または 1N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.4 に精製したのち、精製水を加えて 1 L とする。
- (3) 界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム希釈液 (PET)：精製水 990ml に 100 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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グ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グラスを 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、カバーグ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グラスを取り、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グラスを洗い流し、続いてアルコール綿で血球計算板とカバーグラスを十分に拭き、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פור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。