

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。 $\text{pH}$  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<sup>注1、2)</sup>。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<sup>注1)</sup>。十分量<sup>注2)</sup>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<sup>注3)</sup>、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<sup>注4)</sup>、1,050×gで10分間遠心する。上清(アセトン層)を吸引除去<sup>注5)</sup>した後、ガラス棒等で沈渣をよくほぐし、再び充分量<sup>注2)</sup>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<sup>注6)</sup>。
- 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<sup>注7)</sup>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<sup>注8)</sup>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<sup>注1)</sup>。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 $\mu$ 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