

- (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<sup>バンドパス</sup>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<sup>ロングパス</sup>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<sup>注1)</sup>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**<sup>注2)</sup>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 ID<sub>50</sub> (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。