

- (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、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