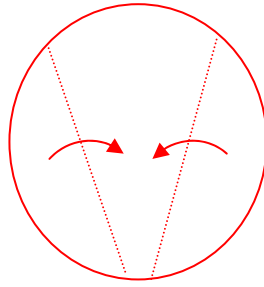


- (1) 親水性 PTFE メンブレンフィルター：孔径 $5\mu\text{m}$ 以下、直径 142mm、または 90mm
- (2) フィルターホルダーセット（加圧ろ過の場合）
- (3) ペリスタポンプ（加圧ろ過の場合）
- (4) 吸引ポンプ（吸引ろ過の場合）
- (5) 吸引瓶またはマニホールド（吸引ろ過の場合）
- (6) 吸引ろ過用フィルターホルダーセット（吸引ろ過の場合）
- (7) 送液チューブ（加圧ろ過の場合）：内径 8mm のシリコン製
- (8) ホースバンド
- (9) フィルター用ピンセット（先端部が鋭利でないもので先が曲がったもの）
- (10) 遠沈管：2. 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に弱いので、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。