

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様ではなく、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)

$$O_{20} = N \times \frac{V_t}{V_n} \times \frac{20}{V_s} \dots\dots\dots (1)$$

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。