資料４

微生物問題検討会説明資料

原水を対象としたクリプトスポリジウム等の検査法について

～MPN 法を用いた水道原水のクリプトスポリジウム定量の試み～

橋本温(県立広島大学)　遠藤卓郎(国立感染症研究所)

1. 背景

(1)原水を対象としたクリプトスポリジウム試験の必要性

現行のクリプトスポリジウム等原虫類の検出方法は、浄水からのクリプトスポリジウムの検出を目的として開発されたものであり、浄水からこれらの病原微生物が検出されれば、その汚染量にかかわらず給水停止の判断を求められることから、厳密な検査精度（原虫類であることの確証）が要求される定性的な検査となっている。

一方、近年では、飲料水の分野にもいわゆる HACCP の概念の導入が図られ（水安全計画)、浄水中の低濃度の病原微生物の検査から、より高濃度で存在する原水の汚染度の調査への関心が高まってきている。原水の病原微生物の検査では河川等の水源の汚染の程度を知ることが重要であり、示された汚染レベルに応じた浄水処理がなされてはじめて水の安全性が確保されるものと考える。現行では、原水の検査においても、浄水を対象にデザインされた定性試験方法がそのまま利用されているが、原水汚染の程度を知るためには、定量性をもった検査法を検討していくことが望ましい。

(2)MPN 法の導入とそのねらい

上述の通り、原水のクリプトスポリジウム等の検査を現行の定性から定量性に重点を移し、併せて検査方法の簡略化に向けた検討が必要と考えた。そこで、統計学的確率論に基づいた定量方法として広く用いられている最確数法（MPN: Most probable Number）を適用したクリプトスポリジウム等の検査法の検討を行った。

(3)具体的な手法と期待される点

MPN 法によるクリプトスポリジウム定量法は、最終濃縮物をろ過し、顕微鏡観察試料を作成する際に格子入りメンブランフィルターを用い、クリプトスポリジウム様の粒子の陽性区画数を計測して、面積当たりの濃縮物のろ過量(=原水相当量)と陽性区画数から MPN 値を求めるもので、試験操作の大幅な簡易化があわせて期待できる。また、MPN 法では MPN 値を中心とした確率分布が得られることから、これまでの点推定的な定量（個/10L）から、確率分布を基に区間推定的な原虫濃度として表現されることから、水道の微生物リスク管理への応用性の向上も期待される。

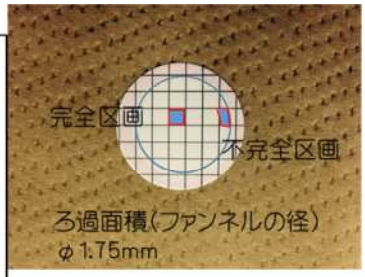
2. 現在までの検討事項(資料)と課題

(1)検鏡用メンブランフィルター上でのオーシスト等の分散性

クリプトレーサーを使用して、顕鏡用メンブランフィルターでの分散性を確認した。ろ過操作と条件を規定することで、検鏡用メンブランフィルター上でクリプトレーサーはほぼ均一に分散することが確認され(資料１)、最適なろ過条件が設定された。

資料１　格子付メンブランフィルターでの分散性：面積当たり一定量がろ過されることの確認

分散性の確認:実験条件
①クリプトレーサー(比重1.19、直径5μm)（約1500個/ml)溶液をろ過
　現状での最適条件
　　・1mlの溶液(0.1%Tween　80加PBS)
　　・試料はファンネル壁面からゆっくりと載せる
　　・10分間静置(沈降を期待)
　　・ステンレスフィルターホルダー
　　・ゆっくりと吸引
　検討済み
　　・静置なし、焼結ガラスホルダー、界面活性剤なし、急速吸引
　　→すべて中央付近に集中
②疎水円内の完全区画、不完全区画のトレーサー数を計数



ザルトリウス製
φ25mm孔径0.45μm
3mm格子角
　Φ20mmの疎水円付

完全区画1区画のトレーサ計数値

	全体		中央4区画		辺縁部		中間部	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
Trial 1	33.3	8.0	32.8	1.5	35.5	12.2	32.1	5.8
Trial 2	39.3	9.8	42.8	4.8	35.0	12.2	41.2	7.9
Trial 3	36.2	11.7	40.0	6.5	33.4	15.7	37.8	5.5
Trial 4	41.4	6.6	43.5	5.3	39.3	4.7	42.1	7.7
Trial 5	42.4	6.5	45.5	7.2	39.7	5.4	42.9	6.3
Trial 6	39.3	7.0	39.5	6.8	40.1	7.1	38.5	7.0
Trial 7	43.6	9.1	45.5	4.7	45.1	11.1	41.8	8.5
Trial 8	40.3	6.9	33.5	1.1	44.0	4.8	40.7	7.3
Trial 9	37.6	7.1	36.3	5.5	37.9	8.7	37.8	6.2
Trial 10	37.1	12.1	41.3	1.6	36.6	8.3	36.0	15.4
平均	39.0	-	40.1	-	38.7	-	39.1	-

・最適条件のろ過方法で完全区画においてはクリプトレーサーが均一に分散する(α=0.05)。
・実オーシスト、夾雑物存在下での検討が必要

(2)MPN 値の算出例

MPN の算出例を資料 2 に示した。

資料 2　MPN の算出例と問題点

Ex.10Lの濃縮物を完全区画22(198mm²)、不完全区画42mm²

例①陽性区画(完全1,不完全0)
　従来法:　1個/10L
　本法:　1.02 MPN/10L (95%信頼区間　0.14-7.3)

例②陽性区画(完全0,不完全1)
　従来法:　1個/10L
　本法:　1.10 MPN/10L (95%信頼区間　0.16-7.4)

要検討:　最確数値より信頼区間の方が重要？

・MPN 値と計数値(従来値)にかい離が生じることもある(ex.1 区画で 2 個以上検出)。
・信頼区間が求められる。

(3)検討が必要な課題

不完全区画と完全区画の面積とその処理案を資料３に示した。

資料３　完全区画および不完全区画の処理

完全区画および不完全区画の面積

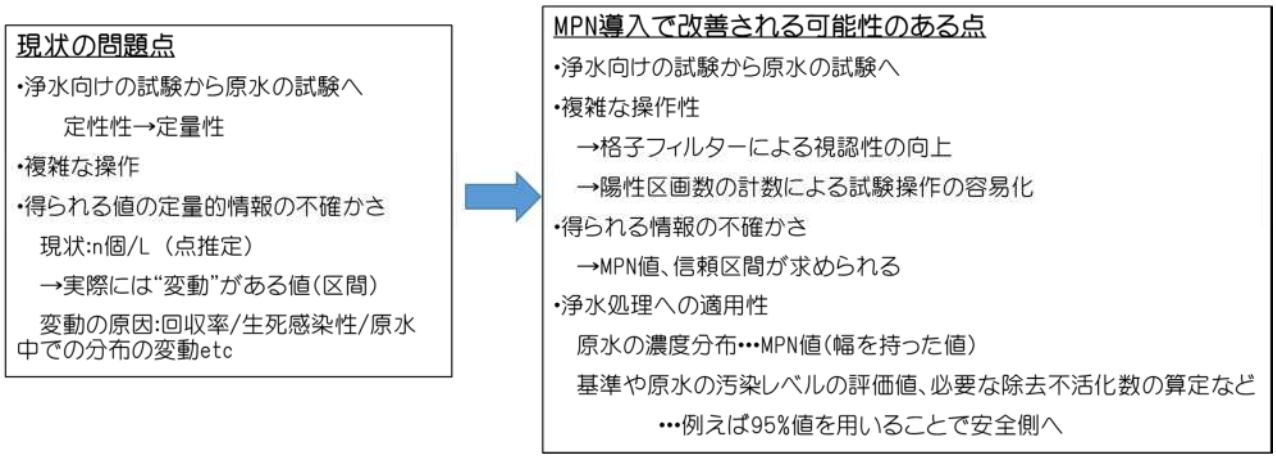
	完全区画		不完全区画	
	区画数	面積(mm^2)	面積(mm^2)	全ろ過面に占める割合(%)
Trial 1	20	180	60	25
Trial 2	26	234	6	3
Trial 3	22	198	42	18
Trial 4	21	189	51	21
Trial 5	24	216	24	10
Trial 6	25	225	15	6
Trial 7	21	189	51	21
Trial 8	22	198	42	18
Trial 9	23	207	33	14
Trial 10	22	198	42	18
平均	22.6	203.4	36.6	15.25

・フィルターごとに区画数が異なる。/ろ過面の特定は難しい

・不完全区画をどうするか

→計数しない、１区画として計数

→面積をファネル内径から推定

・不完全区画が生じない形状のフィルターの開発(大腸菌等の MPN 用の四角形など)

3.MPN 法で何ができるのか？