

各都道府県・政令市・特別区水道行政担当部（局）長 殿

厚生労働省健康局水道課長

水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について

水道行政の推進につきましては、日頃から格別のご協力を賜り厚くお礼申し上げます。

さて、水道におけるクリプトスポリジウム等の対策については、今般、最新の科学的知見等を踏まえ、「水道施設の技術的基準を定める省令」（平成 12 年厚生省令第 15 号。以下、「施設基準省令」という。）を改正するとともに、新たに、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」（平成 19 年 3 月 30 日付け健水発第 0330005 号通知の別添。以下、「指針」という。）が示され、平成 19 年 4 月 1 日より適用することとしたところですが、指針中 2. 及び 3. の（2）において別に定めることとした「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法」を別添 1～3 のとおり示したので、下記事項に御留意の上、貴管下の水道事業者等に対する検査方法の周知方をお願いします。

なお、当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、適宜検査方法を見直していくこととしておりますので、貴職の御協力を併せてお願いします。

記

第 1 検査方法の概要

1. 指標菌の検査方法

（1）大腸菌の定量方法

現在、水道原水の大腸菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 1 に示した。

- ・特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法

（2）嫌気性芽胞菌の検査方法

現在、水道原水の嫌気性芽胞菌の検査方法として、広く標準的に使用されている方法を基に、次の方法を別添 2 に示した。

- ・ハンドフォード改良寒天培地法
- ・M-C P 寒天培地法
- ・D R C (Differential Reinforced Clostridial) 培地法

2. クリプトスポリジウム等の検査方法

従来、「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成 10 年 6 月 19 日付け衛水第 49 号通知）において、応急対応のための検査方法として定められ、標準的に使用されている方法を基に、「標準的方法」及びその他の方法を別添 3 に示した。

なお、水道の原水及び給水栓水等についての検査方法、応急対応のための検査方法については、「標準的方法」を用いて行うことを基本とするが、「標準的方法」との比較や添加系における回収実験等を行い、対象水に対する適切性、回収率の信頼性等を確認

することができた場合は、その他の方法を用いてもよいこととし、いずれの場合にあっても、試験結果の信頼性が確保できるよう、適切な条件、操作方法を選定すべきであること。

第2 留意事項

1. 定期的な原水に係る検査の実施について

水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度を把握するため、指針に基づき、できるだけ早期に原水に係る検査の実施体制の整備等につき必要な措置を講じ、定期的に原水のクリプトスポリジウム等及び指標菌の検査を実施すること。

また、平成20年度以降については、原水の指標菌の検査及びクリプトスポリジウム等による汚染のおそれのある施設における原水のクリプトスポリジウム等の検査についても、水道法（昭和32年法律第177号）第20条第1項の規定に基づく水質検査に準じて、水道法施行規則（昭和32年厚生省令第45号）第15条第6項の規定に基づく水質検査計画に位置付けられたいこと。

2. 定量的な汚染リスクに関する知見の収集について

クリプトスポリジウム等及び指標菌に関しては、水道原水におけるクリプトスポリジウム等による汚染のおそれの程度に関する定量的な知見が必ずしも十分でないことから、今回示した指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法により、汚染リスクに関する定量的なデータの集積に努めるべきであること。また、当省においては、これらの知見を踏まえ、今後、定量的な汚染リスクに基づく予防対策等について検討を進めることとしていること。

3. 検査方法の見直しについて

当省においては、引き続き新たな知見の集積を行い、通知に示す検査方法と同等以上の方法と認められるものについては、積極的に採用するべく、逐次、検査方法を見直す予定であること。

4. 飲料水における検査結果について

飲料水についての検査において、クリプトスポリジウム等の判別が困難な場合には、別途通知により示すこととしているクロスチェック実施要領に基づくクロスチェックにより、検査結果の確認が適切に行なわれるべきものであること。

なお、水道、飲用井戸等（水道法の規制を受けない水道を含む。）から供給される飲料水において、クリプトスポリジウム等の塩素消毒に耐性のある病原生物の検出情報を把握した場合には、「飲料水健康危機管理実施要領について」（平成14年6月28日付け健水発第0628001号通知）に基づき直ちに当職宛に連絡いただくようお願いしているところであるので念のため申し添えます。

また、クリプトスポリジウム等が水道原水中に存在する場合には、紫外線処理を行っても、クリプトスポリジウム等は浄水にも存在することとなるが、紫外線処理が適切に行われている場合には、ヒトに対する感染性はなく、指針に基づく運転管理を確実に実施することにより、浄水の安全性を確保すべきこと。

第3 関係通知の改廃等

平成19年4月1日付けをもって、厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について」（平成10年6月19日付け衛水第49号）及び「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法の付録の送付について」（平成12年3月30日付け衛水第18号）は廃止する。

別添 1 大腸菌の定量方法

特定酵素基質培地法

1 培地及び試薬

(1) MMO-MUG 培地

硫酸アンモニウム5g、硫酸マンガン0.5mg、硫酸亜鉛0.5mg、硫酸マグネシウム100mg、塩化ナトリウム10g、塩化カルシウム50mg、ヘペス(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)6.9g、ヘペスナトリウム塩(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸ナトリウム)5.3g、亜硫酸ナトリウム40mg、アムホテリシンB 1mg、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド500mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド75mg及びソラニウム500mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、黄色く着色したものは使用しない。

この培地は、冷暗所に保存する。

(2) IPTG添加ONPG-MUG 培地

硫酸アンモニウム2.5g、硫酸マグネシウム100mg、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、塩化ナトリウム2.9g、トリプトース5g、トリプトファン1g、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド100mg、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びトリメチルアミン-N-オキシド1gを精製水約450mlに溶かし、pH値が6.1~6.3となるように調整した後、精製水を加えて500mlとし、ろ過除菌した後、試験容器に10mlずつ分注したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(3) XG a 1-MUG 培地

塩化ナトリウム5g、リン酸一水素カリウム2.7g、リン酸二水素カリウム2g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ソルビトール1g、トリプトース5g、トリプトファン1g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド50mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド80mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(4) ピルビン酸添加XG a 1-MUG 培地

塩化ナトリウム5g、硝酸カリウム1g、リン酸一水素カリウム4g、リン酸二水素カリウム1g、ラウリル硫酸ナトリウム100mg、ピルビン酸ナトリウム1g、ペプトン5g、4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド100mg、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド100mg及びイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド100mgを無菌的に混合し、試験容器に100分の1量ずつ分取したもの

この培地は、冷暗所に保存する。

(5) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

リン酸二水素カリウム42.5gを精製水500mlで溶かし、1mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH値を7.2に調整した後、精製水を加えて1Lとした溶液1mlを精製水1Lで溶かし、高圧蒸気滅菌したもの

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 試験容器

検水10mlと培地が密封できるもので、滅菌したもの

(3) MMO-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(3)の例による。

(4) IPTG添加ONPG-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(4)の例による。

(5) XG a 1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(5)の例による。

(6) ピルビン酸添加XG a 1-MUG培地用比色液

検査方法告示の別表第2の2(6)の例による。

(7) 恒温器

検査方法告示の別表第1の2(3)の例による。

(8) 紫外線ランプ

検査方法告示の別表第2の2(8)の例による。

(9) 紫外線防護眼鏡

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

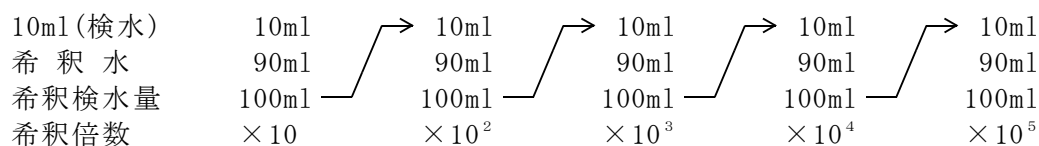
4 試験操作

(1) 希釈検水の調製

検水中の大腸菌数が多いと予想される場合は、次の操作によって希釈検水を調製する。

検水10mlを採り、希釈水90mlに加えてよく振り混ぜる。次に、その10mlを採り、同様な操作を行いながら希釈を繰り返し、10倍ごとの数段階の希釈検水を作る。10倍希釈法の操作を図－1に示す。

なお、希釈検水は、微生物が増殖することや死滅することもあるので、室温に30分以上放置してはならない。



図－1 10倍希釈法の操作

(2) 培養操作

検水10mlを上記1のいずれかの10ml用培地入り試験容器5本に接種する。次いで、各段階の希釈検水について、同様に操作する。接種後、容器を振って培地を溶解あるいは混合させ、恒温器に収め、35～37℃で24時間培養する。なお、接種の際に、5本以上の接種本数となる組み合わせを用いてもよい。培養後、紫外線ランプを用いて波長366nmの紫外線を照射し、蛍光の有無を確認する。培地に対応する比色液より蛍光が強い場合は陽性と判定し、弱い場合は陰性と判定する。

5 菌数の算出

検水、各段階の希釈検水列の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

別添 2 嫌気性芽胞菌の検査方法

第 1 ハンドフォード改良寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) 標準濃度ハンドフォード改良寒天培地

大豆ペプトン4.8g、ペプトン15g、酵母エキス4.8g、クエン酸鉄アンモニウム0.90g、4-メトキシ-6-スルファ-ニルアミドピリミジン0.09g、ピロ亜硫酸ナトリウム0.90g、オレアンドマイシン0.48g、硫酸ポリミキシン B 9,000単位、カナマイシン0.048g、粉末寒天18gを精製水1Lに加熱溶解し、滅菌後のpH値が7.5～7.7となるように調整した後、高圧蒸気滅菌したもの

この培地は、恒温水槽で約45℃に保温し、三重層法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(2) 標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地を疎水格子用ペトリ皿又はメンブランフィルター用ペトリ皿に約15mlずつ分注して平板に固めたもの

この培地は、疎水格子フィルター法及びメンブランフィルター法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(3) 1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地の各成分を精製水600mlを用いて(1)と同様に調製したもの

この培地は、パウチ法に用いる。

この培地は、使用の都度調製する。

(4) 希釈水(リン酸塩緩衝希釈水)

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の1(5)の例による。

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

容量100ml以上のもので、滅菌したもの

(3) 疎水格子フィルター

50mm四方で1mm四方の1600区画にわけられているもので、滅菌したもの

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

滅菌したもの

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

孔径0.2～0.45 μ m、直径47mmのもので、滅菌したもの

(7) メンブランフィルターろ過装置

滅菌したもの

- (8) メンブランフィルター用ペトリ皿

直径約5cm、高さ約1.5cmのものであって、ガラス製又はプラスチック製で滅菌したもの

- (9) 嫌気ジャー

内部の酸素を除去し、嫌気状態にすることができるもの

- (10) パウチ

滅菌したもの

- (11) プラスチックシーラー

- (12) 恒温水槽

水温を45℃又は75℃に保持できるもの

- (13) 恒温器

温度を44～46℃に保持できるもの

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

- (1) 検水の加熱処理

検水約100mlを加熱用容器に採り、75℃の恒温水槽に20分間浸して加熱した後、速やかに氷水に浸して冷やす。

- (2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

- (3) 培養操作

次のいずれかの培養操作を行う。なお、汚染の著しい検水では希釈検水を用いてもよい。

- a) 疎水格子フィルター法

疎水格子フィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径0.25mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

- b) メンブランフィルター法

メンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、フィルターのろ過面を上にして気泡が入らないように標準

濃度ハンドフォード改良寒天平板培地に密着させる。これに標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを重層して固化した後、更に標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを重層する。これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

c) 三重層法

標準濃度ハンドフォード改良寒天培地5～10mlをペトリ皿2枚以上に注いで固めた平板をあらかじめ用意する。次いで、加熱処理した検水又は希釈検水1mlずつをペトリ皿の中央部に入れ、溶解して約45℃に保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約10mlを注いだ後、直ちに蓋をし、速やかに前後左右に揺り動かして検水と培地を十分に混和させ、平板に固めて混積平板とする。次に、この平板に溶解して保温した標準濃度ハンドフォード改良寒天培地約5mlを注いで直ちに蓋をし、ペトリ皿を静かに揺り動かして混積平板の表面全体に培地を行きわたらせた後、静置し、平板に固める。培地が固まったことを確認した後、これを嫌気ジャーに入れて恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

d) パウチ法

加熱処理した検水をパウチ2枚以上に10mlずつ入れ、1.67倍濃度ハンドフォード改良寒天培地15mlを加え、直ちに指でよく揉んで検水と培地を十分に混合する。培地に混入した気泡をパウチの首部に集めて排除した後、パウチ首部をプラスチックシーラーで溶着して封じ、平らな面において室温で平板状に固める。これを恒温器に収め、44～46℃で22～26時間培養する。

培養後、直径1mm以上の黒色集落をウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落をそれぞれの方法の計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

第2 M-C P寒天培地法

1 培地及び試薬

(1) M-C P寒天平板培地

トリプトース3.0g、粉末酵母エキス2.0g、シュクロース0.50g、L-システイン塩酸塩0.10g、硫酸マグネシウム(7水塩)0.01g、ブロモクレゾールパープル0.004g、粉末寒天1.5gを精製水90mlに加熱溶解し、pH値を7.6に調整した後、高圧蒸気滅菌し、滅菌後、速やかに約50℃に冷却した後、D-シクロセリン0.04g、ポリミキシンB硫酸塩0.0025g、インドキシル-β-D-グルコシド溶液8ml、フェノールフタレインニリン酸塩溶液2ml、塩化第二鉄溶液0.2mlを無菌的に加えて混合し、調製後、直ちに疎水格子用ペトリ皿には約10mlずつ、メンブランフィルター用ペトリ皿には約3mlずつ分注して平板に固めたもの

この培地を保存する場合は、密閉容器に入れて冷蔵庫に収める。

この培地は、調製後96時間以内に使用する。

(2) インドキシル- β -D-グルコシド溶液

インドキシル- β -D-グルコシド0.060gを滅菌精製水8mlで溶かしたもの

この溶液は、使用の都度調製する。

(3) フェノールフタレインニリン酸塩溶液

フェノールフタレインニリン酸塩0.50gを精製水100mlで溶かした後、高圧蒸気滅菌したもの

(4) 塩化第二鉄溶液

塩化第二鉄(6水塩)4.5gを精製水100mlで溶かした後、ろ過除菌したもの

(5) アンモニア水(25%～30%)

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(3) 疎水格子フィルター

第1の2(3)の例による。

(4) 疎水格子フィルターろ過装置

第1の2(4)の例による。

(5) 疎水格子用ペトリ皿

検査方法告示の別表第1の2(2)の例による。

(6) メンブランフィルター

第1の2(6)の例による。

(7) メンブランフィルターろ過装置

第1の2(7)の例による。

(8) メンブランフィルター用ペトリ皿

第1の2(8)の例による。

(9) 嫌気ジャー

(10) 恒温水槽

水温を44.8～45.2℃に保持できるもの

(11) 恒温器

第1の2(13)の例による。

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(2) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

(3) 培養操作

疎水格子フィルターろ過装置又はメンブランフィルターろ過装置にフィルターを装着し、ファンネルに加熱処理した検水又は希釈検水の30ml以上を入れ、吸引ろ過する。検水又は希釈検水のろ過が終了した後、希釈水20～30mlによりファンネル内壁を洗浄し、検水の場合と同様に吸引ろ過する。この洗浄ろ過操作を2～3回繰り返す。ろ過が完了した後、フィルターをろ過装置から外し、メンブランフィルター又は疎水格子フィルターのろ過面を上にして、気泡が入らないようにM-C P寒天平板培地に密着させる。これを倒置して嫌気ジャーに入れ、恒温水槽に沈め、44.8～45.2℃で18～24時間培養する。

培養後、直径1mm以上の不透明な青～黄色集落をマークした後、フィルター上の集落をアンモニア蒸気に20～30秒接触させ、直ちに集落の色調を観察する。このとき、マークしたもののうち、アンモニア蒸気の接触によりピンク色～赤色(紫色は除く)に変色したものをウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

ウェルシュ菌芽胞と判定された集落を計数方法に従って計数し、菌数を算出する。

第3 D R C (Differential Reinforced Clostridial)培地法

1 培地及び試薬

(1) 標準濃度D R C基礎培地

少量の精製水を用いて溶性デンプン1.0gをスラリー状とし、沸騰した精製水180mlを加え、かき混ぜて溶かし、このデンプン溶液をペプトン10g、粉末酵母エキス1.5g、肉エキス10g、酢酸ナトリウム(3水塩)5.0gを溶解した混合液に加え、全量を1Lとし、加熱溶解後、ブドウ糖1.0gとL-システイン0.50gを加えて溶かし、滅菌後のpH値が7.1～7.2になるように調整した後、ねじ口瓶100mlに100mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

(2) 2倍濃度D R C基礎培地

標準濃度D R C基礎培地の各成分の2倍量を精製水1Lを用いて(1)と同様に調製した後、ねじ口瓶25mlには1mlずつ又は10mlずつ、ねじ口瓶100mlには50mlずつ分注し、高圧蒸気滅菌したもの

この培地を保存する場合は、滅菌後、冷蔵庫に収める。

(3) 1ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.04mlを2倍濃度D R C基礎培地1mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(4) 10ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液0.4mlを2倍濃度D R C基礎培地10mlに無

菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(5) 50ml用D R C培地(2倍濃度)

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを2倍濃度D R C基礎培地50mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(6) 標準濃度D R C培地

亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液2mlを標準濃度D R C基礎培地100mlに無菌的に加えて混合したもの

この培地は、使用の都度混合調製する。

(7) リトマス牛乳培地

生牛乳では15分間煮沸、氷室に一夜静置した後、上に浮いたクリームを捨てたもの、脱脂粉乳では20gを温精製水180mlで溶かしたものに、リトマス溶液を青紫色を呈するように加え、液層の高さが4cm程度になるように試験管に分注し、間欠滅菌したもの

(8) 亜硫酸ナトリウム溶液

亜硫酸ナトリウム4.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(9) クエン酸第二鉄溶液

クエン酸第二鉄7.0gを精製水100mlに溶かし、ろ過除菌後、ねじ口瓶100mlに入れたもの

この溶液は、冷蔵庫で保存し、2週間以内に使用する。

(10) 亜硫酸ナトリウム・クエン酸第二鉄混合液

亜硫酸ナトリウム溶液とクエン酸第二鉄溶液を等量ずつ、無菌的に混合したもの
この溶液は、使用の都度調製する。

(11) リトマス溶液

リトマス1gを精製水10mlに溶かしたもの

2 器具及び装置

(1) 採水瓶

検査方法告示の別表第1の2(1)の例による。

(2) ねじ口瓶：容量25ml及び100mlのもの。

(3) 加熱用容器

第1の2(2)の例による。

(4) 白金線又は白金耳

(5) 恒温器

温度を35～37℃に保持できるもの

3 試料の採取及び保存

検査方法告示の別表第1の3の例による。

4 試験操作

(1) 定性試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 培養操作

加熱処理した検水50mlを50ml用DRC培地1本に接種する。次いで、標準濃度DRC培地をねじ口瓶の首上端まで満たす。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

(2) 定量試験

a) 推定試験

(a) 検水の加熱処理

第1の4(1)の例による。

(b) 希釈検水の調製

特定酵素基質培地法による大腸菌の定量方法の4(1)の例による。

(c) 培養操作

加熱処理した検水は、10ml用DRC培地5本に10mlずつ、1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、各段階の希釈検水は、それぞれ1ml用DRC培地5本に1mlずつ接種する。次いで、標準濃度DRC培地を瓶の首上端まで満たす。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が黒変したものを推定試験陽性とする。

b) 確定試験

推定試験で黒変が認められたねじ口瓶から白金耳を用いて1白金耳量を採り、リトマス牛乳培地に移植する。これを恒温器に収め、35～37℃で45～51時間培養する。

培養後、培地が凝固し、“顕著な塊”がガスによって試験管の上部にまで盛り上がる状況を呈したものを確定試験陽性とし、ウェルシュ菌芽胞と判定する。

5 菌数の算出

各希釈段階の陽性管数を数え、最確数法に従って対応する最確数を求める。

別添 3 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法

概 要

本試験方法は水中に存在するクリプトスポリジウムのオーシストを精製・濃縮し、蛍光抗体染色により検出するためのものである。試験はオーシストの捕捉・濃縮、選択的な分離・精製、蛍光抗体染色、顕微鏡観察の諸工程からなり、顕微鏡下で蛍光を発する粒子の寸法、外部、内部形態に基づいてオーシストを検出・計数する方法である。

留意事項

一般に、水源水、水道原水、沈殿水等には多種多様の無機物、有機物、微生物等が存在している。水道水中にもその一部や浄水用薬品の反応生成物等が混入している。試料によっては、それらの物質がクリプトスポリジウムオーシストの検出を妨害することがある。特に、一部の藻類は大きさ、形態等がオーシストに酷似しており、それらが蛍光抗体試薬と交叉反応などにより偽陽性を示し、オーシストとの判別が困難となることが知られている。

本試験方法の作成に当たっては、使用可能と考えられる複数の方法について併せて採用することとし、

- 2 水試料からの懸濁粒子の捕捉・濃縮については、
 - 2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法
 - 2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法
 - 2.3 親水性 PTFE メンブレンフィルター法
 - 2.4 その他の捕捉・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
 - 2.4.2 カートリッジフィルター法
 - 2.4.3 遠心沈殿法
- 3 オーシストの選択的な分離・精製については、
 - 3.1 密度勾配遠沈法(浮遊法)
 - 3.2 免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)
- 4 蛍光抗体染色については、
 - 4.1 直接蛍光抗体染色法
 - 4.2 間接蛍光抗体染色法

を並列的に記載した。また、以下の項目を付記した。

付録 1 精度管理のためのオーシスト添加実験

付録 2 顕微鏡の取扱い

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

[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

このうち、「標準的方法」(2.1、2.2 又は 2.3 と、3.1 及び 4.1 等を組み合わせた方法)については、すべての試験操作等を確定的に記述した。しかしながら、検出の原理を損なわず、かつ回収率を損なわないことが確実であるか、あるいは一層の改善が得られることが

明らかな場合は、必要に応じて適宜、部分的な変更や改良を加えても差し支えない。

一方、その他の方法については基本操作を記述した。必要に応じて、標準的方法との比較や添加系における回収実験等を行い、対象水に対する適切性、回収率等を確認することが適当である。

なお、検査機器等の整備に当たっては、試験の目的、対象水の水質等に応じて選択した方法に必要な試薬、器具、器材を用意すればよく、試験方法に記載されているすべての試薬、器具、器材等を用意する必要はない。

1 試料の採取

クリプトスポリジウムのオーシストは感染力が強いため、水道では低濃度でも問題になる。このため、原水、水道水ともに大量の水を採取して試験しなければならない。また、ガラス壁に付着しやすい性質があるといわれていることから、採取容器は大型のポリエチレン又はポリプロピレン製容器を用いる。

採取水量は原水で概ね 10L、水道水で 20L を標準とするが、応急対応のための検査にあつては、水道水 40L (消毒のみで給水する水道等であつて原水を対象とする場合も原水 40L) を採水場所毎に 3 試料採取し、その全量を濃縮して、濃縮物の半量を検査し、残りの半量を保存しなければならない。

1) 器具

試料容器：容量 10L または 20L のポリエチレン又はポリプロピレン製で、スクリュウキャップ付きのもの。あらかじめ採水量に相当する目盛りを付しておくといよい。

2) 操作

試料水の適量を試料容器に採取し、密栓して 24 時間以内に試験室に搬入し、速やかに濃縮処理を行う。

2 懸濁粒子の捕捉・濃縮

試料水中の懸濁粒子を捕捉して濃縮する方法には、アセトン溶解性のメンブレンフィルターを用いた吸引ろ過法あるいは加圧ろ過法、親水性 PTFE メンブレンフィルター法、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法(吸引ろ過法又は加圧ろ過法)、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法がある。このうち、ポリカーボネートメンブレンフィルター法、カートリッジフィルター法、遠心沈殿法についてはいずれも知見の集積が少なく、適用できる水質や操作条件等の詳細が必ずしも十分には明らかになっていないので、基本的事項を記載するに留めた。これらの未確定な方法を採用する場合は、予備的検討を行い、適正な条件を設定する必要がある。

2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過－アセトン溶解法

本法は、孔径 $1\mu\text{m}$ 付近のアセトン溶解性メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過したのち、メンブレンフィルターをアセトンにより完全溶解して除去し、残った沈渣を濃縮物として回収する方法である。高濁度試料水の場合は多量のメンブレンフィルターを要するなどの難点がある。

1) 試薬

- (1) **精製水**：イオン交換水又は蒸留水等の精製水で、クリプトスポリジウムによる汚染のないもの。
- (2) **10 倍濃度 PBS** (10 倍濃度リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：精製水約 800mL に塩化ナトリウム 80g、塩化カリウム 2g、リン酸二水素カリウム 2g、リン酸一水素ナトリウム 12 水和物 29g を溶解し、1 N塩酸または 1 N水酸化ナトリウムを用いて $\text{pH}7.4$ に調整したのち、精製水を加えて 1 L とする。
- (3) **PBS** (リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：精製水 900mL に 10 倍濃度 PBS 100mL を加えて混合する。 pH 値を確認し、必要に応じて 0.1 N塩酸又は 0.1 N水酸化ナトリウムを用いて $\text{pH}7.4$ に調整する。
- (4) **界面活性剤加 PBS** (界面活性剤添加リン酸緩衝生理食塩水、 $\text{pH}7.4$)：PBS 1L に Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween80 又はそれと同等のもの) 1mL を加え、混和する。
注 1) 1 M トリス ($\text{pH}7.4$)：精製水約 70mL にトリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1g を溶解し、濃塩酸(約 7mL)で $\text{pH}7.4$ に調整した後、精製水を加えて 100mL とする。
注 2) 0.5M EDTA：精製水約 80mL にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・2 水塩 18.6g を加え、さらに水酸化ナトリウム(概ね 2g 程度)を追加して完全に溶解し、 $\text{pH}8.0$ に調整する。その後、精製水を加えて 100mL とする。
- (5) **アセトン**：試薬特級
- (6) **エタノール**：試薬特級

2) 器具及び器材

- (1) 吸引ポンプ
- (2) 吸引瓶又はマニホールド(フィルターホルダーセット用)
- (3) フィルターホルダーセット(ベース、ファネル、固定金具)
- (4) トラップ用吸引瓶(ろ過水用及びアセトン廃液用)
- (5) **メンブレンフィルター**：孔径 $1\mu\text{m}$ 付近で、アセトンに完全溶解する材質のもの。
- (6) フィルター用ピンセット
- (7) 連結用チューブ
- (8) **遠沈管**：容量 15mL 又は 50mL のポリプロピレン製でスクリュウキャップ付きのもの。目盛付きのものが使用しやすい。
- (9) **遠心沈殿機**：遠心荷重 $1,050\times\text{g}$ (半径 15cm スイング型ローターで 2,500rpm に相当) が保証でき、15mL 及び 50mL 遠沈管用多本掛バスケット付きで、ブレーキの解除ができるもの。
- (10) **アスピレーター**
- (11) **パストゥールピペット又は駒込ピペット**

3) 操作

- (1) **ろ過装置の組立**：吸引ろ過装置にメンブレンフィルターをセットし、[フィルターホルダーをセットした吸引瓶又はマニホールド]－[トラップ用吸引瓶]－[吸引ポンプ]の順にチューブ等で連結する。
- (2) **ろ過**：試料水をファネルに注ぎ、吸引ポンプを用いて吸引ろ過する^{注1、2)}。試料水を全ろ過し終わったのち、試料容器に**界面活性剤加 PBS 200～300mL**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。さらに試料容器に精製水 200～300mLを加えて内部を再度すすぎ、すすぎ液を同様にろ過する。

注1) 試料容器内の全量をろ過する。

注2) ろ過速度が遅くなり始めた時点で試料水の供給を停止してメンブレンフィルターを交換する。ろ過済みのメンブレンフィルターは乾燥させないように注意して保管する。

(3) 回収

- i) **メンブレンフィルターの溶解・除去**：ろ過に用いたメンブレンフィルターを遠沈管に入れる^{注1)}。十分量^{注2)}のアセトンを速やかに加え、スクリュキャップを強く閉め^{注3)}、直ちに強く攪拌してメンブレンフィルターを溶解した後^{注4)}、1,050×gで10分間遠心する。上清(アセトン層)を吸引除去^{注5)}した後、ガラス棒等で沈渣をよくほぐし、再び充分量^{注2)}のアセトンを加えて強く攪拌して沈渣を完全に分散させる。これを1,050×gで10分間遠心し上清を吸引除去する^{注6)}。
- ii) **アセトン除去と水和**：遠沈管内の沈渣に遠沈管容量の約1/10量^{注7)}のエタノールを加えて充分攪拌したのち、エタノールと等量のPBSを加えて再び充分攪拌する。繰り返し攪拌しながらPBSを徐々に加えて遠沈管を満たした後、1,050×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^{注8)}を加えてよく攪拌し、1,050×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。

注1) 一度に処理するメンブレンフィルターの枚数は、15mL 遠沈管の場合 47mm 径メンブレンフィルター5枚、50mL 遠沈管の場合142mm 径メンブレンフィルター2枚程度とする。

注2) 加えるアセトン量は、15mL 遠沈管の場合 12mL、50mL 遠沈管の場合 45mL 程度とする。

注3) アセトンの揮発防止のため、遠沈管のスクリュキャップをしっかりと閉める。

注4) アセトンを加えたまま放置するとメンブレンフィルターが溶解しなくなり、フィルター残渣が生じる。

注5) アスピレータの使用が可能であるが、アセトン廃液は所定の廃棄物処理を行う。

注6) 沈渣にフィルター残渣が認められるようであれば、アセトンによる遠心洗浄を繰り返す。

注7) 沈渣量が多い場合は、沈渣の量に応じてエタノールを適宜増量する。

注8) 沈渣量が多い場合は、沈渣の量に応じてPBSを適宜増量する。

2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過－アセトン溶解法

本法は、2.1 メンブレンフィルター吸引ろ過法と同様、孔径 1μm 付近のアセトン溶解

性メンブレンフィルターを用いるが、ろ過を加圧方式で行う点異なる。吸引ろ過法に比べて比較的多量の試料水をろ過できる利点がある。

1) 試薬類

2.1 1) に同じ。

2) 器具及び器材

(1) 加圧装置：ペリスタポンプ

(2) 加圧ろ過用フィルターホルダーセット

このほかに、2.1 2) の(4)～(11)。

3) 操作

(1) **ろ過装置の組立**：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、[試料水の入った試料容器]－[加圧装置]－[フィルターホルダー]－[ろ液受け]の順にチューブ等で連結する。

(2) **ろ過**：メンブレンフィルターに瞬間的に大きな負荷がかからないよう徐々に加圧し、フィルターホルダーの安全弁を開けてチューブ内に溜まった空気を排出する。試料水があふれ出る直前に安全弁を閉じてろ過を開始し、試料容器内の試料水の全量をろ過する^{注1)}。試料水を全てろ過し終わった後、試料容器に**界面活性剤加 PBS 200～300mL**を加え、強く振とうして内部を洗浄し、洗液を同様にろ過する。さらに試料容器に精製水 200～300mL を加えて内部を再度すすぎ、すすぎ液を同様にろ過する。

(3) **回収**：ろ過に用いたすべてのメンブレンフィルターを集め、2.1 3) (3)回収に従って濃縮物を回収する。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。

注1) ろ過速度が遅くなり始めた時点で試料水の供給を停止してメンブレンフィルターを交換する。ろ過済みのメンブレンフィルターは乾燥させないように注意して保管する。

2.3 親水性 PTFE メンブレンフィルター法

本法は、孔径 5 μ m 以下の親水性 PTFE メンブレンフィルターを用いてろ過した後、メンブレンフィルターを 50ml の遠沈管に挿入し攪拌子とともに試験管ミキサーを用いて強く攪拌して、メンブレンフィルター上の捕捉物を洗い出す方法である。

1) 試薬

(1) **精製水**：2.1 1) (1)に同じ。

(2) **100 倍濃度 PET** (10 倍濃度ピロリン酸ナトリウム希釈液)：精製水約 800ml にピロリン酸ナトリウム 10 水塩 20g、エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム 30g、Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween80 またはそれと同等のもの) 10ml を溶解し、1N 塩酸または 1N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.4 に精製したのち、精製水を加えて 1 L とする。

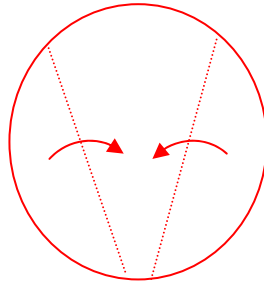
(3) **界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム希釈液 (PET)**：精製水 990ml に 100 倍濃度 PET10ml を加えて混合する。

2) 器具および器材

- (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 回繰り返し、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 その他の捕捉・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ーアセトン溶解法**又は**2.2 メンブレンフィルター加圧ろ過ーアセトン溶解法**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はぐした後、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ので、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はぐした後、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 $1,050\times g$ 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($C_{12}H_{22}O_{11}$ 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、 $1,050\times g$ 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 $1,050\times g$ 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 $500\times g$ 、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弱いため、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。

- (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に、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℃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℃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り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りとろ過洗浄する。
- 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) に準じてゆっくりろ過する。
- 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

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。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)

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

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 $8 \sim 12 \mu m$ 、短径 $5 \sim 8 \mu m$ であるが、測定状況によっては長径が $8 \sim 18 \mu m$ 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 $8 \sim 18 \mu m$ 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。

付録 1 精度管理のためのオーシスト添加実験

1 概要

水試料からのオーシストの回収率を算定するための実験で、オーシスト添加の実施方法について述べる。技術の確認、技術の向上、新しく導入する方法や改良法の評価、回収率に対する水試料の影響についての検討などに用いる。

2 オーシスト原液の濃度の確認

オーシスト原液中のオーシスト数は、血球計算板による計数か段階希釈法で予め調べておく。

2.1 血球計算板を用いる方法

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) Buerker-Tuerk 型血球計算板(又は improved Neubauer 型)
- (3) 顕微鏡
- (4) マイクロピペット

2) 操作

- (1) オーシストは集塊をつくりやすいので、原液をミキサーで 2 分間攪拌し、均一な浮遊液とする。
- (2) 血球計算板に専用のカバーガラスを Newton 輪ができるようにすり合わせ、マイクロピペットを用いて、カバーガラスと血球計算板の間のチャンバー(上下 2 つ)へオーシスト原液 $10\mu\text{L}$ ずつを注入する。オーシストが沈むまで 2 ～ 3 分静置する。
- (3) 顕微鏡下 400 倍で、上部チャンバー内の分画 (1mm^2) の 4 隅と中央の計 5 区画中のオーシスト数を数える。図 1 に Buerker-Tuerk 型血球計算板の分画を示した。図 2 には区画内のオーシストの計数方法を示した。
- (4) 血球計算板の 1mm^2 が $0.1\mu\text{L}$ の液量に相当する場合、オーシスト原液のオーシスト数 (N) は以下の式で算出する。なお、オーシスト数は個/mL で表現する。
$$N = (5 \text{ 区画中のオーシスト数} / 5) \times 10^4$$
- (5) 1 区画中のオーシスト数が多すぎた場合は原液を適当に希釈して計数し直す。
- (6) 同様に、(3) ～ (5) の方法に従って下部チャンバー内の 5 区画中のオーシスト数を数える。2 つのチャンバーで得られたオーシスト数が大きく隔たっていないことを確認し、その算術平均値を持ってオーシスト原液中のオーシスト数とする。
- (7) 血球計算板から注意深くカバーガラスを取り、洗浄液はビーカー等に受けるようにして血球計算板とカバーガラスを洗い流し、続いてアルコール綿で血球計算板とカバーガラスを十分に拭き、乾燥させる。この操作は手袋をはめて行い、洗浄液とアルコール綿はオートクレーブで滅菌する。

2.2 段階希釈による方法

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) 精製水
- (3) 蛍光染色に必要な試薬及び器具(4 蛍光抗体染色 参照)
- (4) 蛍光顕微鏡
- (5) マイクロピペット
- (6) 段階希釈用試験管：蓋付きサンプルチューブ 1.5mL など

2) 操作

- (1) 試験管数本に精製水を 900 μ L ずつ分注する。
- (2) オーシスト原液の 100 μ L を上記の試験管の 1 本に入れ、十分攪拌する。
- (3) (2) の希釈液から 100 μ L を取り、別の精製水 900 μ L の入った試験管に入れ、十分攪拌する。この操作を 3、4 回繰り返し、数段階の 10 倍段階希釈液を調製する。各希釈段階で使用するマイクロピペットのチップを必ず交換する。
- (4) 各段階の希釈液の 100 μ L を 4. 1 又は 4. 2 に準じて蛍光染色を施し、染色されたオーシスト数を数える^{注1)}。
- (5) オーシスト原液中のオーシスト数 (N) は以下の式で算出する。なお、オーシスト数は個/mL で表現する。

$$N = (\text{標本 (100 } \mu\text{L) 中のオーシスト数}) \times (\text{希釈倍数}) \times 1 \text{ mL} / 100 \mu\text{L}$$

注 1) 計数に用いる際の標本はオーシストが 50-500 個/mL となるように希釈されていることが望ましい。

3 添加液の調製及び添加

3.1 添加液の調製

1) 試薬及び器具

- (1) オーシスト原液
- (2) 精製水
- (3) 蛍光抗体染色に必要な試薬及び器具(4 蛍光抗体染色参照)
- (4) 蛍光顕微鏡
- (5) マイクロピペット

2) 操作

- (1) 100 μ L 中のオーシスト数が 100-500 個程度の範囲内に入るように精製水でオーシスト原液を希釈し、オーシスト添加液とする。
- (2) オーシスト添加液から 100 μ L を 5~10 回取り、それぞれ試験方法に準じて蛍光染色を施し、各標本のオーシスト数を蛍光顕微鏡下で数える。得られた計測値から算術平均を求め、添加数とする。

3.2 添加

1) 器具

- (1) 試料容器

(2) マイクロピペット

2) 操作

- (1) 添加実験に用いる試水が入ったスクリーキャップ付き試料容器にオーシスト添加液 100 μ L を加えて攪拌する。なお、河川水等を用いる場合、その試料水中にオーシストが既に含まれている可能性があるので、予め試料水中のオーシスト数を計数し、記録しておく。
- (2) 回収率を算定しようとする試験方法でオーシストを回収し、オーシスト数を数える。
- (3) 次の計算式で回収率を計算する。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{(\text{検出オーシスト数}) - (\text{試料水中のオーシスト数})}{(\text{添加オーシスト数})} \times 100$$

備考：クリプトスポリジウムのオーシストは病原体レベル分類で「レベル 2」に位置付けられている(参考：国立感染症研究所病原体等安全管理規定)。したがって、生存オーシストを添加する場合の扱いはレベル 2 となり、レベル 2 に対応した封じ込め設備を具備した実験施設内での扱いが必要である。ただし、不活化(固定、熱処理等)されたオーシストを扱う場合はこの限りではない。

なお、水質試験のための試料は「レベル 1」の扱いとなり、通常の実験室での試験でよい。

付録 2 顕微鏡の取扱い

本試験方法で用いる顕微鏡には、蛍光装置、微分干渉装置、20、40、100 倍の対物レンズが必要である。また、一般に接眼レンズは 10 倍が用いられる。このほか、粒子サイズ測定のために、接眼スケール又はその他の計測機器を付属させる。

1) 蛍光顕微鏡装置

落射型と透過型の 2 種類がある。落射型は不透明な支持体上の標本でも観察が可能で、メンプレンフィルターを用いた顕微鏡標本の観察には落射型を用いるのがよい。個々の蛍光色素は特有の励起波長を持った光の照射により励起光とは異なった(それよりも長波長の)蛍光を発する。したがって、染色に用いた蛍光色素に合わせて、励起波長と接眼フィルターを組み合わせる必要がある。

2) 微分干渉装置

微分干渉装置はポラライザー(偏光板)、2 枚の DIC プリズム、アナライザー(偏光板)からなり、それらが一般の生物顕微鏡に組み込まれる。光源として偏光が用いられ、光線が標本を通過する際に標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差(二次光線の位相の差)をコントラストの差(又は色の差)に変換する装置で、通常は標本の厚さの差が明暗の差として観察される。顕微鏡観察に先立って、ケーラー照明法に準じた顕微鏡の調製が必要である。

ケーラー照明法

- (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^{バンドパス}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^{ロングパス}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^{注1)}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。嚢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**^{注2)}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リン系（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 ID₅₀ (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。