

表3 渡航者の下痢便、軟便における *C.parvum* の検査結果

滞在日数	検査数	陽性数 (%)
3～7	25	0
8～14	7	0
15以上	4	1 (25.0)

今回の検査結果から、2週間以上国外に滞在した渡航者の下痢便について空港検疫で検査すれば *C.parvum* オーストが検出されるだろう。しかし、滞在期間が短い渡航者では仮に *Giardia* や *C.parvum* に感染していても無症状で帰国してしまうので、両原虫症の実態を把握するためには国内の病院の消化器内科あるいは感染症科の医師に検査協力してもらう必要があるだろう。

長野県大町山岳博物館で飼育しているカモシカ7頭の便について抗酸染色法と蛍光抗体法で検査したが *Cryptosporidium* オーストは検出されなかった。しかし、犬98匹の便を調べた結果、2匹の子犬の便から *C.parvum* オーストが検出された。また、病原性大腸菌、サルモネラ菌、ヨーネ菌、ロタ、コロナ、アデノウイルスが陰性の子牛の下痢便24検体を検査した結果、8検体から *C.parvum* オーストが検出された(表4)。

表4 動物の下痢便、軟便における *Cryptosporidium* の検査結果

動物種	検査数	陽性数 (%)
カモシカ	7	0
犬	98	2 (2.0)
牛	24	8(33.3)

子牛の下痢便からは高率に *C.parvum* が検出されるので、異なる地域の牛の *C.parvum* を入手することはさほど困難ではないので、これらについて遺伝子的な差異を検討していただき。もし、どの地域でも遺伝的に同じであれば、異なる動物間での遺伝子的差異の検討が汚染源を推測する上で大いに役立つのではないかと思われた。

### 3) 糞便及び positive control の保存方法についての検討結果

名古屋空港検疫所支所で渡航者の下痢便を採取し、低温で約2ヶ月保管してもらったが、*C.parvum* オーストが検出できたことから保存方法に問題はなかったと思っている。感染の危険性を考慮すれば10%ホルマリン液を加えて保存した方がよいが、検査に際しては遠心洗浄(2500rpm 7分間、3回)した方がよい。多少の危険性を覚悟すれば糞便に2.5%重クロム酸カリウム液を加えて低温室に保管すればより確実である。*C.parvum* オーストが検出された牛の便に2.5%重クロム酸カリウム液を加えて低温室に保管して経時的に採取し、遠心洗浄後に抗酸染色法及び蛍光抗体法で検査したが、10ヶ月間は検査に支障がなかった。遠心洗浄する場合、遠心後の上清が無色になるまで行えば蛍光抗体法でもよく染色した原虫を検出することができる。10%ホルマリン液では保存した場合は洗浄が不十分だと多少蛍光が弱くなるようなので注意する必要がある。

市販のクリプトスポリジウムのコントロールスライド(TechLab社製)について抗酸染色法及び蛍光抗体法で検討したが、有効期限を1年以上過ぎても問題はなかった。同様に有効期限を1年以上経過した同社の*Giardia* コントロールスライドについて蛍光抗体法で検査した結果、多数のシストが変形していた。1年6ヶ月前に作成した*Giardia* の糞便塗抹標本では変形したシストはほとんど見られなかった(図1A)。一方、10%ホルマリン液を加えて約2年間保存した糞便を遠心洗浄後に蛍光抗体法で検査したが、変形したシストはほとんど見られなかった。したがって、*Giardia* のシストについては長期間保存するならば10%ホルマリン液を加えて保存した方がよいかも知れない。

### 4) 蛍光抗体染色試薬の検討結果

*C.parvum* オースト及び*Giardia* のシストの塗抹標本を作製し、市販の蛍光抗体染色試薬について検討した結果、Waterborne社のA100FIL Aqua-Gro G/Cは両原虫に対する蛍光が強く、2%DABCOグリセリンで封入後、遮光して冷蔵庫内で保管すると約1年間は適度の蛍光を保っていた(図2)。Meridian社のMerifluor DFA *Giardia*/*Cryptosporidium*は、赤色のカウンター染色を行うため原虫は見やすいが、*Giardia* のシストに比べ*C.parvum* オーストに対する蛍光強度がやや劣っていた。また、封入後の退色が早く、1ヶ月後にはかなり見にくくなった。TechLab社の*Giardia*/*Crypto* 直接蛍光試薬(T-4001)は前2社に比べ蛍光強度がやや劣っていた。なお、和光純薬の*Cryptosporidium* 検出キットは封入後約9ヶ月まではある程度の蛍光強度を保っていたが、1年後には多少強度が減少した。TechLab社の*Giardia* 直接蛍光試薬(T-4002)、*Crypto* 直接蛍光試薬(T-4003)は同社の*Giardia*/*Crypto* 直接蛍光試薬に比べ蛍光強度が勝っていた。TechLab社の直接蛍光試薬の退色具合については現在検討中である。両原虫を同時に検査するならば価格の点は別にしてWaterborne社の直接蛍光試薬が最も優れているように思われた。現在、蛍光試薬にグリセリンを加え退色をある程度防ぐことができるか否かについて検討しているが、他の方法についても検討することが望ましい。

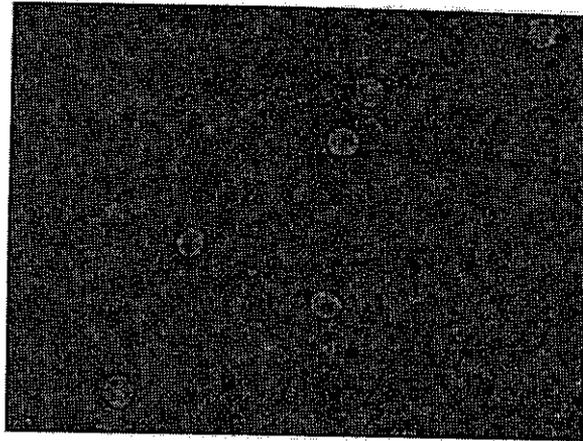


図2 封入1年後の *C.parvum* オーシスト

#### 5) クリプトスポリジウム (*C.parvum*) の感染実験結果

*C.parvum* オーシスト投与後から1ヶ月間3種類の動物の糞便内のオーシスト排出の有無を蔗糖浮遊法により検討した。その結果、ラットでは2株投与群とも投与後3日目からオーシストが検出された。1株投与群の4日目、5日目、6日目、7日目の平均OPG値(1g中のオーシスト数)はそれぞれ $4.3 \times 10^5$ 、 $7.7 \times 10^5$ 、 $4.7 \times 10^5$ 、 $3.1 \times 10^5$ であり、他の株投与群の平均OPG値はそれぞれ $4.0 \times 10^5$ 、 $7.1 \times 10^5$ 、 $4.1 \times 10^5$ 、 $2.6 \times 10^5$ であった。しかし、スキットマウス及びモルモットでは観察期間を通じて糞便中から *C.parvum* オーシストは検出されなかった。河川における汚染源を推定するために、人、牛以外の動物の便から *C.parvum* オーシストが検出されたときは、遺伝子解析だけでなくこのような動物モデルを用いた感染実験を行う必要があるだろう。

#### 6) 赤痢アメーバ症の検査結果と免疫診断法としての dot-ELISA 法の検討

110例の患者の下痢便あるいは軟便を直接塗抹法及びヨード法で検査した結果、下痢便の1例から赤痢アメーバの栄養型、軟便の1例から赤痢アメーバのシストが検出された。念のため、これらの便をコーン染色して形態を観察したが、カリオソームが核のほぼ中央にあり、赤痢アメーバであることが確認された。

次に、新たな赤痢アメーバ症の免疫学的検査法としての dot-ELISA 法の有用性について検討したが、IHA陰性の7例を含む36例のアメーバ症患者血清では赤痢アメーバ抗原に対して明瞭な陽性のスポットが認められた。しかし、健常人血清40例、他の寄生虫症患者血清38例ではいずれも赤痢アメーバ抗原に対して陰性であった。特にIHA陰性の7例でも陽性になったことから、赤痢アメーバ症のスクリーニング法として有用であることが明らかになった。これらの検査結果は第74回感染症学会総会(2000年4月、福岡)に報告するが、診断法としての有用性が確認されたので、今後は国立公衆衛生院で行う新興・再興

感染症の技術研修などで指導する。また、赤痢アメーバ症の免疫学的検査を希望する機関に抗原を吸着させたニトロセルロース膜を供与したい。

蠕虫類の抗原を吸着させたニトロセルロース膜はプラスチック容器あるいはビニール袋に入れて冷蔵庫に保管すれば 3 年以上使用できることが分かっているので、赤痢アメーバ抗原を吸着させたニトロセルロース膜も同様に長期間使用が可能と思われる。

#### 7) おわりに

蛍光抗体法は *Cryptosporidium*、*Giardia* を検出するのに優れた検査法であるが、これらの原虫を扱ったことがない者にとっては一度の研修に参加しただけでは必ずしも容易な検査法ではないだろう。他の検査と同様に繰り返し観察することが重要である。今回の検討結果から、用いる蛍光試薬によって多少異なるが、2%DABCO グリセリンで封入して冷蔵庫に保管しておけば 9~12 ヶ月間は適度の蛍光強度を保っていることが明らかになったので、研修などで作成した標本は持ち帰り、繰り返し観察しておけばいざというときに役立つだろう。

終わりにあたり、渡航者の下痢便を採取して下さった名古屋空港検疫所支所の諸先生、犬の下痢便を供与して下さったファミリー動物病院の北川巖千先生、*Cryptosporidium* オーストの入った牛の便を供与して下さった帯広畜産大学の前田龍一郎先生、データのパソコン処理に多大なご尽力を頂いた国立公衆衛生院衛生微生物学の伊藤健一郎先生に深謝いたします。

分担研究報告書 3

## UF中空糸膜を用いた原虫濃縮方法の開発

分担研究者 平田 強、金子光美

## 分担研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究

### UF中空糸膜を用いた原虫濃縮方法の開発

分担研究者 平田 強 麻布大学環境保健学部 教授

金子光美 摂南大学工学部 教授

研究協力者 橋本 温 麻布大学大学院環境保健学研究科

#### 要 旨

現在、水試料の原虫濃縮方法として多用されているメンブレンフィルター濃縮-アセトン溶解法は、大量の水試料の濃縮に多大の時間と労力を要するうえ、フィルター溶解過程で使用するアセトンによる原虫の生育活性の消失が懸念される。そこで、大量濃縮が可能でかつ濃縮物をアセトン使用なしに回収できる濃縮方法として、中空糸 UF 膜モジュールを用いた新しい濃縮方法を開発、その性能評価を試みた。その結果、この新しい方法は、モジュール内の中空糸膜面積の制御により浄水について数 100ℓ～数 1,000ℓ 規模の水量の試験に十分利用可能と判断された。また、ろ過水量に関しては濁質、高分子物質等の存在により変化しうるが、原水でも従来法と同等の回収が期待できると判断された。

#### 1 はじめに

水試料の原虫試験は一般に、(1)オーシストの濃縮・回収 (2)選択分離 (3)分別・同定の 3 段階の工程からなり(水道におけるクリプトスポリジウム算定対策指針, 厚生省 1999.6), それぞれの工程に対して各種の方法が提案されているが、我が国で濃縮回収操作に最も多用されている方法は「メンブレンフィルター-アセトン溶解法」である。この方法では、アセトン溶解性のセルロースアセテートディスクフィルターにより吸引ろ過して原虫類を懸濁物質とともに濃縮した後、フィルターにアセトンを加えて溶解し、遠心により原虫類を含む懸濁物質を遠心沈渣として回収する。原理的に高度の回収率が期待できる方法であり、実際、(1)～(3)の一連の工程全体で 40～50%の回収率が得られており、一応の信頼性が確保されている。しかしながら、浄水 100 ℓ, 1,000 ℓ といった大量の水試料を濃縮するには多大な労力と時間を必要とし、また、誘出操作でアセトンを使用するため、アセトンの原虫の生育活性への影響、労働衛生上の危惧などの諸問題点を抱えている。

原虫の感染力は一般に著しく高い。このため、水道水中の濃度が極めて低くても公衆衛生上の問題となる。たとえば水道水の許容感染リスクレベルを  $10^{-4}$ /年に設定したときの水道水のクリプトスポリジウム許容濃度は、飲水量を 1 日 2ℓ とすると、約 3 個/100m<sup>3</sup> と極めて低い値となる。飲料水量を 1/10 の 0.2ℓ に減少し、許容感染リスクを 100 倍危険側の  $10^{-2}$ /年に設定したとしても、計算される許容濃度は約 3 個/100ℓ である。この許容濃度レベルの汚染を把握するには、少なくとも浄水 100ℓ(許容濃度を 3 個/100m<sup>3</sup> とすると 100 m<sup>3</sup>)の試験が必要となるが、わが国では水道水のクリプトスポリジウム試験の実質検査水量は 20ℓ であり、上述の許容濃度レベルの汚染を把握することは不可能である。

そこで本研究では、

- (1) 浄水 100～1,000 ℓ を容易に濃縮できること
- (2) ろ過済フィルターモジュールが容易に搬送できること
- (3) ろ過、誘出回収操作が比較的簡便であること
- (4) フィルターからアセトンを使用せずにかつ簡便に誘出できること

(5) 全体を通しての回収率が少なくとも既存のメンブレンフィルター-アセトン溶解法と同等であること

の5点を達成できる方法の開発・構築を試みた。

## 2 これまでの経緯と今年度の検討内容

大量試料水の濃縮が可能な方法として、1998年度の研究ではまず、多量の水試料濃縮用に開発されたMFカートリッジフィルター(カプセルフィルター、Gelman社製)の性能評価を行った。その結果、本法は1,000l規模の水道水の濃縮が可能で、ろ過水への漏出もまったくなく、クリプトスポリジウムオーシストの捕捉に関しては何ら問題がなかったが、捕捉したオーシストの誘出が極めて困難で、膜からのオーシスト回収率は最大で20%にすぎず、誘出段階で大きな問題を抱えていることが明らかとなった。誘出を改善するための方策として超音波の利用を試みたが、改善効果はまったくみられなかった(金子光美,平成9年度分担報告書-クリプトスポリジウム濃縮方法へのカートリッジフィルター導入に関する検討)。

1999年度は、1998年度の研究結果に基づいて、既存の濃縮装置、濃縮方法には選択対象とすべき適切な方法がないと判断し、民間企業(ダイセル化学(株)及びダイセンメンブレンシステムズ(株))の協力を得て、新たな濃縮装置の開発の検討を行い、中空系UF膜(酢酸セルロース製、分画分子量150,000 Dalton)を用いた濃縮装置を試作、その性能評価を行った。その結果、①水道水であれば有効膜面積1m<sup>2</sup>当たり30m<sup>3</sup>のろ過が可能であること、②誘出効率の点で内圧ろ過方式よりも外圧ろ過方式が優れていること、③水道水レベルの水質であれば、特殊な誘出液を用いることなく単にモジュール内に精製水を入れて手動振盪するのみでクリプトスポリジウムオーシストを高率に誘出できること、④有機汚濁の進んだ河川水を試料水とし、試作装置の回収率を従来法と比較したところ、クリプトスポリジウムでは高率の、ジアルジアではほぼ同等の回収率が得られること、⑤水道水源として利用されている河川水を用いて、オーシスト添加系と無添加系で従来法と比較したところ、試作装置の回収率は従来法と同等か、若干高くなる傾向が認められること、などの知見を得た。このように、試作装置は従来法に比べて、(1)ろ過性能、(2)搬送性、(3)誘出回収の簡便性、(4)アセトンなしでの簡便誘出、(5)回収率のいずれの点でも既存のメンブレンフィルター-アセトン溶解法に比べて利点があるか、少なくとも同等と認められた。しかし一方で、UF膜の分画分子量が原虫サイズに比べて非常に小さいため、原虫に加えて微細な粒子や高分子物質を濃縮するため沈渣が多くなる傾向あり、検鏡用フィルターの枚数が多くなる欠点が認められた(平田 強,金子光美,橋本 温,平成10年度分担報告書-中空系膜モジュールを用いた新しい原虫濃縮方法の検討)。

そこで今年度は、ろ過可能水量、オーシスト誘出方法について再度検討するとともに、ポリカーボネート製メンブレンフィルターを装着した攪拌型ろ過セルを利用して中空系UF膜法濃縮物を洗浄することにより、微細粒子や高分子物質を排除できるかどうか、検討した。

## 3 方法

### 3-1 中空系UF膜モジュールの仕様

これまでと同様、酢酸セルロース製外圧型中空系UF膜モジュール(中空系内径0.8mm,外径1.3mm,分画分子量150,000,ダイセン・メンブレン・システムズ(株)社製)を用いた。

### 3-2 試料およびろ過操作

試料として麻布大学構内水道水、水道原水(濁度3.0度,相模川社家付近の寒川取水堰付近より取水している小雀浄水場の着水井より採水)および相模川寒川町宮山付近の河川水(濁度1.75度)を用いた。

水道水の場合は、給水栓に水圧計、中空系 UF 膜モジュール(膜面積 0.1m<sup>2</sup>)、流量計を直列に接続したのち、流量が 1l/min になるように給水栓開度を調節してろ過を開始した。ろ過開始後は給水栓開度を一定とし、ろ過速度が初期の 1/3 に低下した時点でろ過終了とした。水道原水の場合は、着水井から試料をローラーポンプで加圧送水し、中空系 UF 膜モジュール(膜面積 0.3m<sup>2</sup>)でろ過が停止するまで連続ろ過を行った。

相模川寒川町宮山付近の河川水を用いた実験では、河川水を 20 l ポリタンクに採水し研究室に持ち帰った。持ち帰ったポリタンクから試料をローラーポンプで加圧送水し、中空系 UF 膜モジュール(膜面積 0.3m<sup>2</sup>)でろ過が停止するまで連続ろ過を行った。

### 3-3 中空系 UF 膜モジュールからのオーシストの誘出方法の検討

#### 3-3-1 供試クリプトスポリジウムオーシストおよび添加オーシスト数の測定

大阪市立大学井関博士より分与され、麻布大学生物科学総合研究所感染エリアで継代・維持しているヒト分離 *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を Scid マウスに感染させ、その糞便から分離・精製したオーシストを用いてオーシスト懸濁液(50 個/ml)を 50ml 調製した。調製した試料を 1ml ずつ 5 枚のセルロースアセテート製メンブランフィルター(孔径 0.8 μm, 直径 25mm)でろ過して間接蛍光抗体染色した。染色後、フィルター上のオーシストを落射蛍光顕微鏡で判別、計数した。

#### 2-2 ろ過および誘出

ポリバケツ(60l)を原水槽とし、原水槽内を常に攪拌機で攪拌しながら試料が一定水量、一定オーシスト濃度(約 14 個/l)に保たれるように水道水およびオーシスト液を加えながらローラーポンプで試料を中空系 UF 膜モジュール(膜面積 0.3m<sup>2</sup>)に送水し、ろ過した。試料 1,000l を全てもろ過した後、PBS (Tween80 添加: T+)を 500ml 加えて原水槽の壁面を洗浄し、洗液もろ過した。さらに精製水 500ml を加えて原水槽の壁面を洗浄し、その洗液もろ過した。試料および洗液のろ過後、ミリ Q 水 100ml を中空系 UF 膜モジュールの流入側から加え、手動振とうで誘出した。ミリ Q 水による誘出を 4 回行った後、EPA Method 1622 カプセルフィルター用誘出液 (Laureth12: 1g, Trith: 10ml, EDTA: 2ml, Antiform A: 150 μl, D.W.: 1,000ml) を用いて同様の誘出操作を行った。計 5 回の誘出液をそれぞれ分取、染色し、原虫数を計数した。

### 3 攪拌型ろ過セルによる濃縮物の洗浄

オーシスト濃度 1 個/ml の試料を 200ml 調製、そのうち 50ml を攪拌型ろ過セルの原水タンクに入れ、原水タンクに PBS(T+)を加えておおよそ 300ml とした。攪拌子を入れて攪拌しながら N<sub>2</sub> ガスで加圧 (0.5kgf/cm<sup>2</sup>)し、試料をポリカーボネート製メンブランフィルター (孔径 3.0 μm, 直径 80mm) を装着した攪拌型ろ過セルに圧送してろ過した。原水タンク内の試料を全てもろ過した後、PBS(T+)50ml を加えて原水タンクおよび攪拌型ろ過セルの壁面を洗浄して洗液もろ過した。ろ過終了後、フィルターをはずして 50ml 遠沈管に入れ、PBS(T+, Antiform A 添加; A+)20ml を加えてタッチミキサーで攪拌した。攪拌後、フィルターを取り出して PBS(T+, A+) 30ml で洗い流し、あわせて 50ml とした。ろ過後の試料を染色用フィルターでろ過して間接蛍光抗体染色し、オーシストを計数した。オーシスト濃度を 1 個/ml に調製した試料の残りの 150ml は 50ml ずつ染色用フィルターでろ過して間接蛍光抗体染色し、オーシストを定量した。

### 4 河川水中のオーシスト濃縮法および濃縮物の洗浄の検討

#### 4-1 試料

試料として水道原水として用いられている相模川寒川町宮山付近河川水 (濁度 2.17) および小鮎川厚木市元町付近の河川水 (濁度 4.0) を用いた。

## 4-2 操作

比較検討した操作工程の組合せを図1に示した。

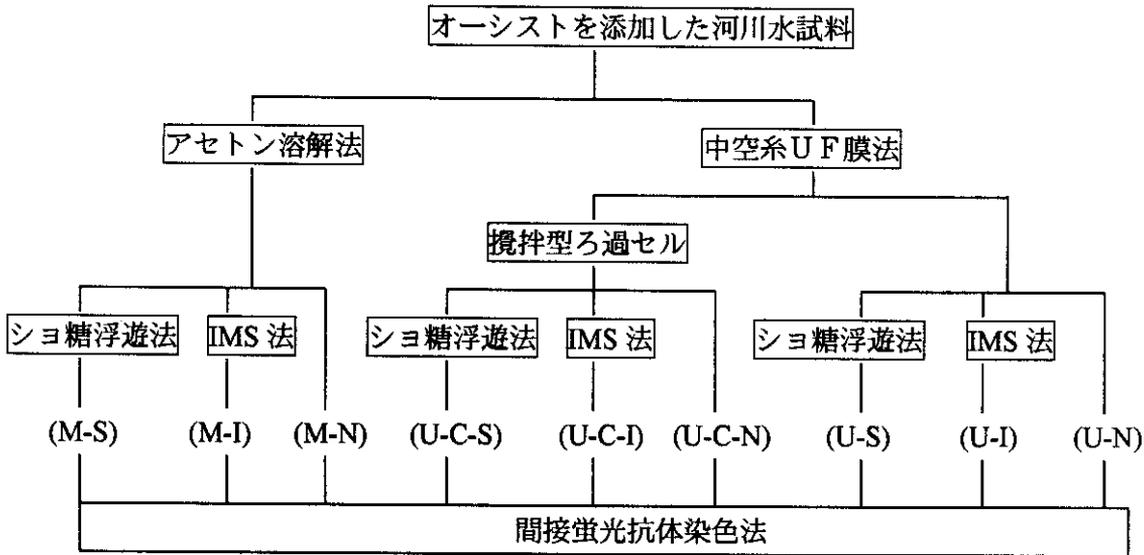


図1 操作工程の組合せ

M-S :	アセトン溶解法－シヨ糖浮遊法
M-I :	アセトン溶解法－IMS法
M-N :	アセトン溶解法－選択分離なし
U-C-S :	中空系膜法－攪拌型ろ過セル－シヨ糖浮遊法
U-C-I :	中空系膜法－攪拌型ろ過セル－IMS法
U-C-N :	中空系膜法－攪拌型ろ過セル－選択分離なし
U-S :	中空系膜法－シヨ糖浮遊法
U-I :	中空系膜法－IMS法
U-N :	中空系膜法－選択分離なし

### (1) 濃縮

原水槽(60l ポリバケツ)に試料水 20l を入れて攪拌機でよく攪拌しながら、試料水中のオーシスト濃度がおおよそ 100 個/l になるようにオーシスト液を添加した。攪拌を続けながら 10 分程度オーシストを拡散させた後、試料水約 10l ずつを中空系 UF 膜モジュール(膜面積 0.1m<sup>2</sup>)またはセルロースアセテートディスクフィルター(直径 142mm, 孔径 1.2μm)を用いてろ過した。試料水のろ過終了後、原水槽に PBS(T+) を 500ml 加え、壁面を洗浄したのち洗液も同量ずつろ過した。さらに、精製水 500ml を原水槽に加えて再度、壁面洗浄し、その洗液も同様にろ過した。

試料および洗液のろ過後、ミリ Q 水 100ml を中空系 UF 膜モジュールの流入側から加え、手動振とうで誘出した。ミリ Q 水 100ml による誘出を 3 回行った後、1622 カプセルフィルター用誘出液 50ml を加えて同様に誘出した。再度ミリ Q 水を加え、計 5 回の誘出操作を行った。

セルロースアセテートディスクフィルターは試料および洗液のろ過後、1 枚ずつポリプロピレン遠沈管(50ml)に入れた。この遠沈管にアセトン(99.5%)を加え 50ml とし、タッチミキサーで攪拌してフィルターを溶解させた後、遠心分離 (1,050×g, 10min) し、アスピレーターで沈渣を含む残液が 10ml になるまで上清を除去した。この操作を 3 回繰り返した後、PBS(T+, A+)を加えて 50ml とし、攪拌、遠心分離した後、アスピレーターで沈渣を含む残液が 5ml になるまで上清を吸引除去した。再び PBS(T+, A+)を加え、遠心と上澄み液の除去までの操作を 3 回繰り返した。

### (2) 選択分離

選択分離はIMS法またはシヨ糖浮遊法を用いて行った。

#### ①IMS法

磁性免疫抗体ビーズを用いて選択分離した。磁性免疫抗体ビーズには、DYNAL社製 Dynabeads anti-Cryptosporidiumを用いた。操作は、添付説明書に従って行った。

#### ②シヨ糖浮遊法

1本当たりの沈渣量が0.5ml以下になるように試料を遠沈管に分取した。遠沈管をタッチミキサーでよく攪拌した後PBS(T+, A+)を加えて約20mlにし、再びよく攪拌してからシリンジを用いてPercollシヨ糖液30mlを遠沈管底部にゆっくり注入して2重層にした。界面が乱れないように注意して遠沈管を遠心機に入れ、遠心分離(1,050×g, 10min)した。遠心後、パスツールピペットで界面の上部を回収して新しい遠沈管に移し、PBSを加え50mlにしてよく攪拌した後、再び遠心分離した。遠心後、アスピレーターで10mlまで上澄み液を除去して再度PBSを加え、遠心と上澄み液の除去までの操作を3回繰り返した。

### 4 結果及び考察

#### 4-1 中空系UF膜モジュールのろ過可能水量

水道水(麻布大学構内)および河川水(相模川寒川町宮山付近および相模川社家付近)を用いて連続ろ過を行い、中空系UF膜モジュールのろ過可能水量を測定した。水道水では、ろ過速度が初期の1/3になるまでろ過した結果、ろ過水量は740l(単位面積当たりのろ過水量7,400l/m<sup>2</sup>)であった。相模川寒川町宮山付近の河川水(濁度1.75)ではろ過可能水量は56l(単位面積当たりのろ過水量400l/m<sup>2</sup>)、相模川社家付近の河川水(濁度3.0)ではろ過可能水量は20l(単位面積当たりのろ過水量200l/m<sup>2</sup>)となった。

#### 4-2 中空系UF膜モジュールからのオーシストの誘出方法の検討

中空系UF膜モジュールからの誘出操作におけるオーシストの検出数および回収率を表1に示した。1回目の誘出液から、添加したオーシスト14,100個の内13,900個(98.6%)のオーシストが回収され、1回の誘出でほぼ100%に近い回収率が得られた。2~4回目の誘出によるオーシスト回収率はそれぞれ1.6%, 0.03%, 0.04%であり、5回目の誘出では全くオーシストは回収されなかった。

表1 検出数および回収率

誘出回数	検出数(個)	回収率(%)	誘出液
1	13900	98.6	ミリQ水
2	223	1.6	ミリQ水
3	4	0.03	ミリQ水
4	5	0.04	ミリQ水
5	0	0	1622誘出液

#### 4-3 攪拌型ろ過セルによる濃縮物の洗浄

攪拌型ろ過セルによる洗浄工程でオーシストが損失しないことを確認するため、オーシスト濃度既知の試料を攪拌型ろ過セルに入れて洗浄操作を行い、セル内に残存するオーシストを計数して回収率を調べた。50個のオーシストを添加した水道水50mlを攪拌型ろ過セルに入れて洗浄操作を行っても、55個のオーシストが回収された。この結果から、攪拌型ろ過セルを用いた洗浄操作でオーシストの損失が生じないと判断した。

#### 4-4 河川水中のオーシスト濃縮法および濃縮物の洗浄の検討

##### (1)回収率

試料水からのクリプトスポリジウム回収率を図2および表2に示した。中空系UF膜法で濃縮した後シヨ糖浮遊法で選択分離を行った系(U-S)と、IMS法で選択分離を行った系(U-I)でのオーシストの回収率はそれぞれ51%と30%であり、選択分離なし(U-N)の回収率は31%であった。また、中空系UF膜法で濃縮し攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行った後に、シヨ糖浮遊法で選択分離を行った系(U-C-S)とIMS法で選択分離を行った系(U-C-I)での回収率はそれぞれ30%と29%であり、選択分離なし(U-C-N)では24%であった。

一方、標準的な濃縮方法であるアセトン溶解法で濃縮した後、シヨ糖浮遊法で選択分離を行った系(M-S)とIMS法で選択分離を行った系(M-I)での回収率はそれぞれ31%と30%であり、選択分離なし(M-N)の回収率は32%であった。

これらの結果より、中空系UF膜法ではアセトン溶解法と同等かそれよりも高い回収率が得られる傾向が求められた。中空系UF膜法で濃縮した後、攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行った系(U-C-S, U-C-I, U-C-N)と行わなかった系(U-S, U-I, U-N)では、シヨ糖浮遊法で選択分離を行った系(U-S)以外はほぼ同等の回収率であった。さらに、中空系UF膜法で濃縮した後攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行った系(U-C-S, U-C-I, U-C-N)とアセトン溶解法でろ過した系(M-S, M-I, M-N)での回収率を比較してもほぼ同等の結果が得られた。

本研究においては中空系UF膜法で濃縮しシヨ糖浮遊法で選択分離を行った系の回収率が最も高かったが、その回収率は50%であり、また実験ごとの回収率にもばらつきが生じた。しかしながら、中空系UF膜法で濃縮しシヨ糖浮遊法で選択分離を行った系と、アセトン溶解法で濃縮しシヨ糖浮遊法で選択分離を行った系の最も低い回収率はそれぞれ18%と19%で、同等の結果が得られた。

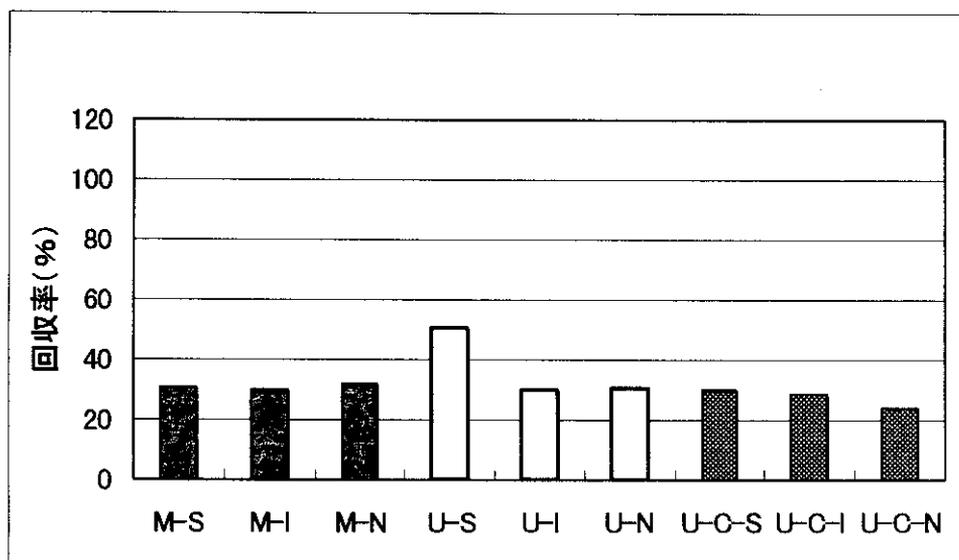


図2 クリプトスポリジウム添加試料からの回収率(%)および回収率範囲

- M-S: アセトン溶解法-シヨ糖浮遊法
- M-I: アセトン溶解法-IMS法
- M-N: アセトン溶解法-選択分離なし
- U-S: 中空系膜法-シヨ糖浮遊法
- U-I: 中空系膜法-IMS法
- U-N: 中空系膜法-選択分離なし
- U-C-S: 中空系膜法-攪拌型ろ過セル-シヨ糖浮遊法
- U-C-I: 中空系膜法-攪拌型ろ過セル-IMS法
- U-C-N: 中空系膜法-攪拌型ろ過セル-選択分離なし

全体としては選択分離を行うことで回収率にばらつきが出てしまい、特にIMS法を用いると、回収率は1桁まで下がってしまうことがあった。また、攪拌型ろ過セルを用いた洗浄を行うと、回収率が10%近くにまで下がることもあった。

表2 クリプトスポリジウム添加試料からの回収率(%)

	濃縮方法 攪拌型ろ過セル 選択分離法	アセトン溶解法			中空系UF膜法					
		不使用			使用			使用		
		シヨ糖	IMS	なし	シヨ糖	IMS	なし	シヨ糖	IMS	なし
相模川	算術平均	32	35	27	34	20	17	37	28	28
	回収率範囲	19~45	12~58	23~31	11~88	8~39	11~25	18~78	6~64	24~30
	検体数	4	4	3	4	4	3	5	5	3
小鮎川	算術平均	29	25	37	25	37	30	64	33	35
	回収率範囲	21~40	18~31	22~50	23~28	26~47	22~42	26~124	9~81	29~44
	検体数	3	3	3	3	3	3	3	3	3
試料全体	算術平均	31	30	32	30	29	24	51	30	31
	回収率範囲	19~45	12~58	22~50	11~88	8~47	11~42	18~124	6~64	24~44
	検体数	7	7	6	7	7	6	8	8	6

(2)操作性

河川水 10L を濃縮した試料を染色用フィルター(孔径 3.0 $\mu$ m 直径 25mm)でろ過する際に必要なフィルター枚数を表3に示した。小鮎川河川水(濁度 4.0)にクリプトスポリジウムを添加した試料をアセトン溶解法で濃縮を行った場合の染色用フィルターの顕微鏡像を写真1に示した。また、同一試料を同量中空系UF膜法で濃縮を行った場合の染色用フィルターの顕微鏡像を写真2に、中空系UF膜法で濃縮を行った後、攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行った場合の染色用フィルターの顕微鏡像を写真3に示した。写真1~3に示したように、攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行うことで洗浄を行わなかった系およびアセトン溶解法よりフィルター上の粒子が少なく、バックグラウンドによる影響も減少した。

河川水をおおよそ 10L ろ過、誘出するために必要な時間はアセトン溶解法で約 60 分を要したが、中空系UF膜法では約 25 分と半分以下に短縮された。また、中空系UF膜法で濃縮を行った系はアセトン溶解法で濃縮を行った系の染色用フィルター枚数と比較すると、同等かそれよりも多い枚数となり、最も差が生じた場合では、染色用フィルター枚数は7枚も多くなった。一方、中空系UF膜法で濃縮した後攪拌型ろ過セルを用いた系の染色用フィルター枚数はアセトン溶解法と同等であった。また、攪拌型ろ過セルを用いた系の染色用フィルター枚数は中空系UF膜法で濃縮を行った系と比較し、3~4枚減少した。

表3 選択分離を行わなかった場合の染色に必要なフィルター枚数(枚/10L)

	濃縮法 攪拌型ろ過セル オーシスト添加の有無	アセトン溶解法		中空系UF膜法		アセトン溶解法		中空系UF膜法	
		不使用		使用		不使用		使用	
		有		無		有		無	
相模川	1回目	11	12	12	14	20	15		
	2回目	15	17	12	14	23	23		
	3回目	14	16	11	16	23	17		
	平均	14	15	11	15	22	18		
小鮎川	1回目	11	16	11	15	17	12		
	2回目	10	16	10	13	14	9		
	3回目	8	11	11	13	11	11		
	平均	10	14	11	14	14	11		

以上、中空系 UF 膜法による水試料からの原虫濃縮法について検討を行った結果、濃縮方法は浄水で 1m<sup>3</sup>、原水で 100l レベルの濃縮が可能であり、標準的な方法として用いられているセルロースアセテートディスクフィルターによる吸引ろ過-アセトン溶解法では実用上不可能なレベルの大量試料の濃縮が可能であった。

我が国では「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」<sup>3)</sup>により、水道水がクリプトスポリジウムに汚染された場合、給水栓、配水池および浄水池のそれぞれで 40l を濃縮し、その半量の 20l を検査することが定められている。しかしながら、年間感染リスクを 10<sup>-4</sup> 以下にするためには、処理水中に含まれるオーシスト濃度は 0.003 個/100l 以下<sup>8)</sup>となる。また、適正な運転管理のもとで急速砂ろ過法が適用されている浄水場ではクリプトスポリジウムは 3log 程度除去することができ<sup>9)</sup>、これを考慮した場合、原水の許容クリプトスポリジウムオーシスト濃度は 3 個/100l となるため、原水では 100l レベルのクリプトスポリジウム試験を行う必要がある。このように、低濃度の原虫汚染を把握する必要があり、本法はアセトン溶解法より大量の試料の濃縮が可能であるため、原水および浄水の原虫濃縮方法として有効であると考えられる。

また、水道水および河川水にオーシストを添加し、回収実験を行った。その結果、中空系 UF 膜法で、アセトン溶解法と同等かそれ以上の回収率が得られた。なかでも、中空系 UF 膜法で濃縮しシヨ糖浮遊法で選択分離を行った系で最も高い回収率が得られたものの、その回収率には大きなばらつきがあった。全体としても、選択分離を行うことで回収率にばらつきが出る傾向があった。このようなばらつきは、クリプトスポリジウム試験の作業工程が複雑で、顕微鏡観察も熟練を要するためであると考えられる。しかしながら、中空系 UF 膜法で濃縮し、シヨ糖浮遊法を選択分離として行った系とアセトン溶解法で濃縮し、シヨ糖浮遊法を選択分離として行った系の最も低かった場合の回収率はそれぞれ 18%と 19%で、数値的にはほぼ同等であった。このことから中空系 UF 膜法で濃縮し、シヨ糖浮遊法で選択分離を行う方法は、回収率にばらつきがあったものの、回収率の点からもアセトン溶解法と比較してある程度有効な方法であると考えられる。

しかしながら、中空系 UF 膜モジュールは分画分子量 150,000 であり、孔径が非常に小さいため、クリプトスポリジウムより微細な粒子も捕捉し、濃縮後の沈渣量が多くなる。その結果、染色用フィルター枚数がアセトン溶解法と比較して多くなる欠点がある。また、染色用フィルター上の濁質も多くなり、バックグラウンドの影響が増加したため、オーシストの計数はアセトン溶解法と比べ、より困難になる点も見逃せない。そこで、中空系 UF 膜モジュールの濃縮物をポリカーボネート製メンブランフィルターを装着した攪拌型ろ過セルにより洗浄する方法を検討した。その結果、攪拌型ろ過セルを用いて洗浄を行った系の回収率と、洗浄しない系の回収率に差はなく、染色用フィルター枚数もアセトン溶解法と同等か、それよりも若干少ない枚数で試験できた。攪拌型ろ過セルを用いても染色用フィルター枚数を著しく減少させることはできないが、洗浄によってフィルター上のバックグラウンド粒子が少なくなり、アセトン溶解法および洗浄を行わなかった系よりもオーシストの計数が容易になるという利点が認められた。

中空系 UF 膜モジュールによる大量試料の濃縮方法および攪拌型ろ過セルによる洗浄を組み合わせた原虫濃縮法は、ろ過可能水量、オーシストの回収率、操作性の点で、原虫濃縮法として標準的な方法であるアセトン溶解法と同等か、若干優れており、アセトン溶解法の代替濃縮法として有効と判断された。また、アセトン溶解法ではアセトンを用いて行う誘出操作を中空系 UF 膜法ではアセトンを用いずにミリ Q 水および界面活性剤のみで行えることから、回収されたオーシストの生育活性に与える影響が小さいと考えられ、今後必要と考えられる生育活性の測定法を組み込んだ原虫試験方法のた

めの濃縮方法としても有効と判断された。

## 6 まとめ

本研究ではアセトン溶解法の代替濃縮法として中空糸 UF 膜モジュールを用いた濃縮方法について水道原水の濃縮を視野において回収率および操作性の点からその有用性について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

- (1) 中空糸 UF 膜モジュールは 1m<sup>3</sup> レベルの浄水、100l レベルの河川水の濃縮が可能であった。
- (2) 中空糸 UF 膜法は、浄水では 100% 回収でき、河川水においてはシヨ糖浮遊法で選択分離を行った系および IMS 法を行った系および選択分離を行わなかった系の全ての系においてアセトン溶解法と同等かそれよりも高い回収率が得られた。
- (3) 中空糸 UF 膜法では誘出までの操作時間がアセトン溶解法を行ったときの半分以下となり、膜付着物もオーシストの生育活性に影響を及ぼす可能性のあるアセトンのような誘出液を用いずにミリ Q 水で容易に回収できた。

なお、本研究で得られた知見から、従来法と同等かそれ以上の機能を有する原虫濃縮回収方法として、中空糸膜モジュールを用いた方法が提案可能と判断される。その基本操作は以下のとおりである。

- (1) 中空糸膜モジュールを装着したハウジングを用いて外圧ろ過する。
- (2) 必要量ろ過した後、空気加圧等によりハウジング内の残存水の一部を排除し、残存水量をハウジング容量の 1/2~1/5 程度に減少させる。
- (3) 試験室に持ちかえり、手動振盪して膜モジュール付着物を剥離させる。
- (4) ハウジング内液を回収する。
- (5) ハウジングに精製水を入れ、手動振盪したのち、ハウジング内液を回収する。  
(この操作を 2 回繰り返す)。
- (6) 回収液の全量を濃縮試料とし、必要に応じて洗浄、選択分離し、原虫試験に供する。

## 参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知:水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針(平成 10 年 6 月 19 日改正)。
- 2) (財)水道技術研究センター(1997):平成 8 年度厚生科学研究費報告書 - クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告書。
- 3) 神奈川県衛生部報道発表資料(1997):クリプトスポリジウムに係る水道原水調査の結果について(平成 9 年 7 月 2 日付)。
- 4) 平田強, 橋本温(1997):水中のクリプトスポリジウムの存在量, 環境技術 26(9), 561-566。
- 5) 橋本温, 平田強(1998):相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染レベル, 水環境学会誌 21(2), 119-121。
- 6) Haas C N, Crockett C S, Rose J B and Gerba C P(1996): Assessing the Risk Posed by Oocysts in Drinking Water, *Journal of American Water Works Association* 88, 131-135。
- 7) 平田 強, 橋本温(2000)平成 11 年度厚生科学研究費補助金分担研究報告書「水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び類似の原虫性疾患の監視と制御に関する研究 - 浄水場における原水の原虫類出現状況と浄水処理による除去」

分担研究報告書 4

クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した  
直接蛍光抗体法用試薬の改良と染色方法の検討

分担研究者 井関基弘

## 分担研究報告書

水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び  
類似の原虫性疾患の監視と制御

### クリプトスポリジウムのオーシスト検出用に開発した 直接蛍光抗体法用試薬の改良と染色方法の検討

分担研究者	井 関 基 弘	大阪市立大学医学部
研究協力者	木 俣 勲	大阪市立大学医学部
研究協力者	大 賀 嘉 信	和光純薬(株)

**研究要旨：** 環境水に存在するクリプトスポリジウムのオーシスト検出用として開発した直接蛍光抗体法用試薬の改良と染色方法の検討を行なった。当研究室でクリプトスポリジウムのオーシスト壁に対するモノクローナル抗体 (IgM) を作成し、それに FITC を標識した試薬を平成 9 年度に製品化したが、非特異反応をさらに低減するために、今回、抗体分子の Fc 部位を切断した Fab 抗体に FITC を標識した試薬を作成し、他社の製品とも比較してその評価を行なった。Fab 抗体試薬では蛍光強度は従来のもと同程度に保持され、非特異反応も少しは低減されたが、製造コストは 1.5 倍程度になり、費用対効果の点であまり実際的ではないと判断された。これらの非特異を低減させるには、試料を 0.1N の NaOH で 30 分間の前処理を行なうことが有効であった。前処理による蛍光像や DAPI 染色への影響は認められなかった。

#### 1. はじめに

埼玉県で水道水による集団感染が発生した 1996 年当時、水試料からのオーシストの検出には、米国製の間接蛍光抗体法用試薬 (コンボキット) が用いられていた。価格は高く (染色用フィルター 100 枚につき、20 数万円)、輸入にもかなりの時間を要した。そこで、低価格で安定供給できる製品を国内生産することが求められ、染色時間を短縮するために直接蛍光抗体法用試薬の開発に踏み切った。

当初、*C. muris* のオーシストでマウスを免疫して各種モノクローナル抗体を作成し、その中からオーシスト壁と強く反応するものを選択した。抗体は IgM で、これに FITC を直接標識した。

平成 9 年度に行なった予備実験では、この抗体は *C. parvum*、*C. muris*、*C. baileyi* のオーシストすべてに反応し、赤痢アメーバや大腸アメーバ、ジアルジアのシスト、イソスポーラ、サイク

ロスポーラ、アイメリアなどのオーシストとの交叉反応は見られなかった。また、水道水など、夾雑物の少ない水試料に *C. parvum* のオーシストを添加して、メンブレンフィルター上で染色した場合の染色性や検出率は「コンボキット」の間接蛍光抗体法と同等であった。しかし、河川水や底泥、下水など、夾雑物が多い試料に添加して染色した場合には、オーシストの蛍光強度が弱くなり、検出率は間接蛍光抗体法試薬に比較して低下することが判明し、また、河川水等に含まれるある種の藻類との交差反応も認められた。これらのことから、さらに試薬の改良を進めることが必要になった。

平成10年度には *C. parvum* を抗原としたモノクローナル抗体を作成。抗体1分子に標識する FITC の数も増やした。しかし、染色強度は強くなったが藻類等への非特異反応は同等であった。そこで、抗体分子の Fc 部位を切断した F'ab 抗体に FITC を標識した試薬を作成した。

今回、F'ab 抗体試薬の評価、コンボキットおよび最近国内で使用されている Waterborne 社製の Crypt-a-Glo（直接蛍光抗体法用試薬）と和光純薬製試薬との比較、非特異反応を低減させる前処理の条件設定の検討を進めた。

## 2. F'ab 抗体試薬の評価

F'ab 抗体試薬では蛍光強度は従来のもと同程度に保持され、非特異反応も少しは低減されたが、製造コストは1.5 倍程度になり、費用対効果の点であまり実際的ではないと判断された。

3 製品の比較では Crypt-a-Glo が最も強い蛍光強度を示した。しかし、3 者とも、検体に含まれる夾雑物（ある種の藻類や細菌）の種類によっては非特異反応が強く出現し、オーシストの検出に支障をきたす場合があることも判明した。

## 3. 非特異反応を低減させるための前処理の検討

河川水または糞便材料から得た非特異反応を示す夾雑物を含む沈渣にオーシストを添加して調整した染色用試料を用いて、夾雑物との非特異反応を低減させる目的で、染色液に Eriochrome Black T を加える操作を試みたが、その効果はあまり認められなかった。

次に、同様に調整した染色用試料を酸やアルカリで前処理することにより、オーシストの形態や内部構造および染色性には変化を与えず、藻類や細菌の表面抗原性を変性させて交差反応を抑える効果のある処理条件を、メンブレンフィルター (MF) 上で染色する場合と、スライドガラス上で染色する場合とについて、それぞれ検討した。予備実験で使用した HCl、NaOH、KOH の中では NaOH が最も優れていたため、その最適条件を求めた。NaOH の濃度は 0.1N と 1N とし、処理時間は 5 分、10 分、30 分、処理温度は室温とした。

その結果、MF 上での染色では、0.1N または 1N NaOH、30 分の前処理によって細菌などが示す非特異反応は強く抑えられ、無処理群に比べてオーシストの検出が非常に容易になった。前処理は DAPI 染色に対しても好影響を及ぼし、また、オーシストの形態は正常に保たれた。しかし、0.1N も 1N の場合も処理時間が 5 分および 10 分では 30 分処理のような明確な効果は認められなかった。以上の結果から、MF を用いる検査では 0.1N の NaOH で 30 分間の前処理を行うことが最適であると判定された。

一方、スライドグラス上での染色では、DAPI染色は処理群と無処理群の間に差は認められなかったが、オーシスト壁や内部構造が収縮・変形するために、「確定オーシスト」の比率が無処理群の90%に対して0.1N処理群では76~78%、1N処理では48~36%に低下した。変形の度合いはNaOHの濃度が高いほど、また処理時間が長いほど強くなった。この形態的変性は、MF上での操作ではみられなかったことである。この違いは、MF上での操作では試料を乾燥・固定する前に前処理を施すのに対して、スライドグラス上での染色では試料を乾燥・固定した後で前処理を行ったために生じたと思われる。しかし、スライドグラス上での染色においても前処理によって夾雑物の非特異反応は大幅に抑えられるので、蛍光顕微鏡でオーシストを検索するのは処理群の方が容易であった。

以上の結果から、非特異反応を抑制するための前処理としては、0.1NのNaOHで30分間の処理が最適と判断された。従来の標準的方法にこの前処理の操作過程を加えることで、今後、水試料中のオーシストの蛍光抗体染色による検出と確認に要する労力を緩和することができると思われる。

## 分担研究報告書

### 水道水を介して感染するクリプトスポリジウム及び 類似の原虫性疾患の監視と制御

#### 水試料のクリプトスポリジウム検査のための濃縮用装置の開発

分担研究者	井 関 基 弘	大阪市立大学医学部
研究協力者	木 俣 勲	大阪市立大学医学部
研究協力者	坂 本 照 正	神奈川県水道局
研究協力者	加 藤 修 身	三菱レイヨン(株)

**研究要旨：**水試料のクリプトスポリジウム検査のために、市販の遠心管を利用する小型の濃縮用カートリッジ装置を開発した。ホルダー部には 175 mL 用プラスチック製尖底遠心管を使用し、蓋に多孔質中空糸膜モジュールと原水供給口および濾過水排出口を装着した構造である。操作は簡単で、原水を必要量濾過した後、震盪攪拌し、そのまま遠心機で遠心、上清は排出口から吸引排水し、膜を逆洗して再び遠心、沈渣を検体とする。本装置では濃縮からオーシスト分離操作までを同一容器で実施でき、操作や搬送が簡単・安全で、しかも安価である。小型の吸引ポンプを使用すれば採水現場での濃縮が可能であり、大量の試験水の搬送は不要になる。

#### 1. はじめに

水道水や水道原水(河川水等)のクリプトスポリジウム/ジアルジア検査には大量の水を濃縮する必要がある。採水現場から検査室まで幾つもの重たいタンクを搬送し、その試料水を濃縮するには、濾過または遠心操作に多大の労力と時間が費やされる。これを改善するために、現場で手軽に操作できる小型の装置を開発することが望まれている。

これまでに、中空糸膜を使用した小型のハンディータイプを3機種試作し、膜充填量と濾過可能水量や通水速度の関係、カオリン、パン酵母、オーシストなどの添加試験による回収率の検討など、基礎的データを集積してきた(未発表)。

今回、操作の簡便性、安全性、経済性などを考慮して実用的な機種を開発したので、その概要と操作手順、添加実験による回収率などについて報告する。

#### 2. カートリッジ装置の概要

装置はホルダー部とモジュール部(蓋と中空糸膜)から構成されている(図1)。ホルダー部は容量 175 mL の尖底遠心管(ポリカーボネート製、耐熱性)で、遠心機にそのまま装着可能な構造で

ある。モジュール部は孔径 0.4  $\mu\text{m}$  の親水性ポリエチレン多孔質中空糸膜からなり、中空糸膜の膜面積は約 600 $\text{cm}^2$  で、浄水では 500~1000L の濾過が可能である。

### 3. 操作の概要

浄水場等における日常の微生物検査では、単にクリプトスポリジウムとジアルジアのみならず、サイクロスポーラのオーシストやエキノコックスの虫卵など、感染の危険性のある種々の病原微生物が原水に混入している可能性があり、検査過程で検査担当者が汚染されないための配慮が必要であり、また、それらの全てを効果的に濃縮して顕微鏡的に的確に検出することが要求される。今回、それらを考慮して下記のように加熱処理の行程を加えるなどの工夫を行ない、回収率の検討には *Cryptosporidium parvum* のオーシストを用いて添加試験を実施した。

- (1) カートリッジ装置で水試料を濾過。
- (2) 熱処理：100℃のPBSを注入して1分間静置して吸引除去した後、冷PBSを注入して冷却。
- (3) 誘出：PBSを注入して震盪・攪拌し、そのまま遠心(1,050G、10分)。  
上清は別に用意したホルダーに移し、使用したモジュール部をそれに装着。沈渣は保存。
- (4) (3)の誘出操作を1~2回繰り返す。
- (5) (3)と(4)の沈渣を1本にまとめて遠心し、上清は捨てる。
- (6) 沈渣液に比重 1.20 のシヨ糖液を等量加えて攪拌し遠心。
- (7) 上清を回収しPBSで3~4倍に希釈して遠心。

上清・・[一次分画液]

沈渣・・[二次分画液]

- (8) (6)の沈渣に再度比重 1.20 のシヨ糖液を適量(10~20 mL)加えて攪拌し遠心。
- (9) 上清を回収・・[三次分画液]
- (10) (8)の沈渣について免疫磁気ビーズ法を行い、処理・回収・・・・・・・・・・[四次分画液]
- (11) 各分画液をそれぞれ染色用 PTFE フィルターで濾過し、蛍光抗体法および DAPI で染色。
- (12) 鏡検：オーシスト壁の蛍光像、DAPI 染色像、微分干渉像により総合的に判定。

### 4. 回収率の試験方法

精製水および濁度水を用いた。精製水の場合は、平均約150個(SD=4.04, CV=2.70%, n=2)のオーシストを装置内に直接添加し、精製水1Lまたは10Lについて上記の(1)から(12)の操作をおこなった。濁度水の場合は、濁度14.5の湖沼水に平均191個(SD=7.35, CV=3.86%, n=3)のオーシストを添加した1Lまたは10Lを用い、同様の操作で回収率を検討した。

### 5. 結果および考察

精製水を用いた場合の総回収率は平均 80.5%であった。分画毎にみると、一次分画では平均 6.6%、二次分画で44.6%、四次分画で29.3%であった。濁度水における総回収率は平均84.3%、一次分画と二次分画の合計が30.9%、四次分画が53.4%であった。また、モジュールから漏出するオーシストはみられなかった。なお、今回の試験では三次分画のオーシストの計数は都合によ