

The results of the field survey showed that the level of turbidity in the overflow trough water in which the clams were placed was 35% lower than in control water and that the levels of microbes were around 40 to 60%, depending on the microbe species ingested by the clam. From these results, it was expected that oocysts would be depleted by *H. schlegeli* clams in the pond. The efficiency of oocyst removal might be improved further by increasing the number of clams in the pond water. However, to enable easy maintenance of the clams in the pond for a year, the most appropriate and practical cage occupation area was estimated to be around 40% of the water surface area along the overflow trough.

Clams generally capture a variety of plankton and detritus in water by filter feeding (suspension feeding), and the water containing feed entering via the inhalant siphon passes across the surface of the gills; feed is then trapped by the mucus on the gills during passage of the water to the exhalant siphon. The present field study revealed some variation in rates of microbe removal, which was considered due to variations in the affinities of feed surfaces for the viscous membrane covering the clam gills.

Cryptosporidium hominis is a species morphologically identical to *C. parvum*, which also infects humans (4). In order to collect detailed ecological data on *Cryptosporidium* species, studies similar to the present trials should be carried out using *C. hominis*, although similar data might be obtained, as the genomes of these two species are 97% identical (47).

On the other hand, we have also carried out some experimental studies to investigate the depletion of *Giardia* cysts by *H. schlegeli* clams, and we obtained valuable results (data not shown). These data indicated that cysts were taken up by the clam and excreted predominantly (more than 90%) via the fecal route within 5 days. It was also proved that fecal cysts could not be digested in the GI tract of the clam, as was the case for *C. oocysts*. Accordingly, there is a high possibility that, like *C. oocysts*, *Giardia* cysts would be effectively depleted from the water of the final settling pond by *H. schlegeli* clams.

Norovirus is a well-known pathogen that causes acute nonbacterial gastroenteritis, and it is ordinarily detected at high frequencies in sewage plant water contaminated with excreta. Although we have not yet fully investigated the removal of this virus by *H. schlegeli* clams, it seems likely that this would be possible, as it has been demonstrated that norovirus has an obvious tendency to accumulate in the digestive diverticula of some bivalves, such as oysters, while retaining its infectivity (8, 18, 35, 38, 42, 44, 46).

Previously, it was shown that the regular-sized brackish water benthic clam, *Corbicula japonica* (total body weight, 10 to 20 g) (23, 24), has a potential water filtration rate of 300 to 400 ml/h/clam at 15°C. This suggests that *C. japonica* clams with the same body size as *H. schlegeli* clams (500 g) could have a water filtration rate of 3 to 4 liters/h/clam at 15 to 20°C, considering that the water filtration rate is roughly proportional to the gill area. These data indicate that *H. schlegeli* clams have a water filtration potential that is at least three times higher than that of *C. japonica* clams of the same size. Thus, it is estimated that in order to maintain the same water filtration efficacy as 500-g *H. schlegeli* clams, the quantity of regular-sized *C. japonica* clams (10 to 20 g) required would be at least 100 times larger.

The oocyst preservation time in the GI tract was found to be 7 to 8 days for *C. japonica* clams and 4 to 5 days for *H. schlegeli* clams, and both had similar oocyst excretion patterns. This suggested that *H. schlegeli* clams gather the oocysts into feces more efficiently

(around 40% faster) than *C. japonica* clams. Moreover, *C. japonica* is basically a brackish water clam, and no reports so far have indicated the possibility of maintaining *C. japonica* clams in fresh water for long periods without creating biologically adverse conditions.

From these data, it is considered that *H. schlegeli* clams are, from a practical perspective, more suitable and effective than *C. japonica* clams as biological filters for depletion of oocysts in sewage plant water.

Taking into account the present experimental data and assuming that the environmental conditions in the final settling pond were suitable for long-term maintenance of *H. schlegeli* clams, we think that *H. schlegeli* could be utilized as a practical and effective biological filter for depletion of oocysts in the water of the final settling pond in small- and medium-sized wastewater treatment plants if the clams are properly placed. Moreover, there would be little or no undesirable biological proliferation of the clam, owing to both its unique ecology and the disinfection by sodium hypochlorite in the plant before the treated water is released into rivers. Furthermore, *H. schlegeli* is generally known to be a long-living clam with a life span of at least several decades, much longer than that of *C. japonica*; therefore, there would be little need to replace dead clams with new clams at frequent intervals after placement in the final settling pond. Moreover, the breeding techniques for the clam as a freshwater pearl-producing clams would be expected to afford not only an environment-friendly biological filter but also an indicator of certain protozoan species contaminating freshwater areas, in addition to its value as a pearl clam.

Here, in order to reduce the level of contamination by oocysts in raw sewage as far as possible, various methods for utilizing the natural and familiar ecological cycle as efficiently as possible should be further investigated. Such ecological methods should be applied to water purification before any conventional physical methods, such as rapid sand filtration, slow sand filtration, or ultramembrane filtration, as the ecological methods would be environmentally friendly and not require a large financial outlay.

Although, theoretically, the oocyst removal efficacy of any ecological method would not be powerful, water purification using *H. schlegeli* clams could certainly be helpful for the preservation of aquatic environments, together with the conventional purification methods described above. Furthermore, the fact that water purification by the clam would not require substantial changes to the equipment of sewage plants would be a considerable advantage. Furthermore, the new demand for *H. schlegeli* clams as a biological filter in sewage water would be a secondary benefit to those involved in the fisheries affiliated with the freshwater pearl industry.

However, when employing nonnative (or nondomestic) aquatic organisms, such as *H. schlegeli*, for reduction or control of protozoans, cautious and careful investigations of any biological impact on surrounding aquatic ecosystems must be conducted to ensure that there is no ecological contamination of the original ecosystem.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our appreciation to the staff of the Protozoa Laboratory of the National Institute of Infectious Diseases for technical support and assistance, and we also express our gratitude to Keishi Takano of the Hokkaido Institute of Public Health for the classification and counting of microbes in water.

REFERENCES

- Aizaki M, Morioka M, Kohata K. 1998. The Water quality control of brackish water using bivalve, *Corbicula japonica*. J. Water Waste 40:34–39.
- Bayne BL, Bayne CG, Carefoot TC, Thompson RJ. 1976. The physiological ecology of *Mytilus californianus* Conrad. 1. Metabolism and energy balance. Oecologia 22:211–228.
- Downey AS, Graczyk TK. 2007. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. Appl. Environ. Microbiol. 73:6910–6915.
- Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp. Parasitol. 124:90–97.
- Fayer R, et al. 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitol. Res. 88:998–1003.
- Freire-Santos F, et al. 2002. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). Parasitol. Res. 88:130–133.
- Fujioka K, Toda K, Mori T, Yamaguchi K, Aizaki M. 2006. Seasonal change in filtration rate of *Corbicula japonica* in shallow experimental pond. J. Jpn. Soc. Water Environ. 29:319–326.
- Furuta T, Akiyama M, Kato Y, Nishio O. 2003. A food poisoning outbreak caused by purple Washington clam contaminated with norovirus (Norwalk-like virus) and hepatitis A virus. Kansenshogaku Zasshi 77:89–94.
- Giangaspero A, et al. 2009. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in southern Italy. Parasitol. Int. 58:12–17.
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E. 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Appl. Environ. Microbiol. 66:1866–1870.
- Gómez-Couso H, et al. 2004. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. Int. J. Food Microbiol. 91:279–288.
- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Hernández-Córdova GA, Ares-Mazás ME. 2005. A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). Int. J. Food Microbiol. 102:57–62.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve mollusks. J. Food Prot. 69:185–190.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Ares-Mazás E. 2006. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. Vet. Parasitol. 141:60–65.
- Graczyk TK, Girouard AS, Tamang L, Nappier SP, Schwab KJ. 2006. Recovery, bioaccumulation, and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay non-native oyster, *Crassostrea ariakensis*. Appl. Environ. Microbiol. 72:3390–3395.
- Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC, American Water Works Association, Denver, CO, and Water Environment Federation, Alexandria, VA.
- Guiguet Leal DA, Pereira MA, Bueno Franco RM, Branco N, Neto RC. 2008. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. J. Water Health 6:527–532.
- Hansman GS, et al. 2008. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. J. Food Prot. 71:1689–1695.
- Hirata T, et al. 2001. The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. Water Sci. Technol. 43:163–166.
- Inomata A, Oshimi A, Tanaka S. 1999. Investigation of DAPI staining method of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J. Jpn. Water Work Assoc. 68:32–36.
- Isono R. 1998. Estimation of ingestion rate as nitrogen and factors creating its seasonal changes in *Ruditapes philippinarum* population in Banzu Tidal Flat, Tokyo Bay. J. Jpn. Soc. Water Environ. 29:319–326.
- Isono R, Nakamura Y. 2000. Comparative studies of the water filtering rate in marine bivalves, with particular reference to thermal effects. J. Jpn. Soc. Water Environ. 23:319–326.
- Izumi T, Itoh Y, Yagita K, Endo T, Ohyama T. 2004. Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator for *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72:29–37.
- Izumi T, Yagita K, Endo T, Ohyama T. 2006. Detection system of *Cryptosporidium parvum* oocysts by brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator in river water. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:559–566.
- Kohata K, Hiwatari T, Hagiwara T. 2003. Natural water-purification system observed in a shallow coastal lagoon: Matsukawa-ura, Japan. Mar. Pollut. Bull. 47:148–154.
- Leoni F, Gómez-Couso H, Ares-Mazás ME, McLauchlin J. 2007. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve mollusks. Appl. Microbiol. 103:2430–2437.
- Lévesque B, et al. 2006. A study to assess the microbial contamination of *Mya arenaria* clams from the north shore of the St. Lawrence River estuary (Québec, Canada). Can. J. Microbiol. 52:984–991.
- Li X, et al. 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). Int. J. Food Microbiol. 108:321–325.
- Lucy FE, Graczyk TK, Tamang L, Miraflor A, Minchin D. 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. Parasitol. Res. 103:1369–1375.
- MacRae M, Hamilton C, Strachan NJ, Wright S, Ogden IO. 2005. The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. J. Microbiol. Methods 60:395–401.
- Maeda I, Aizaki M, Yamaguchi K, Fujita N. 2000. A study on water purification by the bivalve, *Corbicula japonica*, using outdoor experimental tanks with continuous flow systems. J. Jpn. Soc. Water Environ. 23:716–720.
- McLusky D. 1973. The effect of temperature on the oxygen consumption and filtration rates of *Chlamys (Aequipecten) opercularis* (L.) (*Bivalvia*). Ophelia 10:141–154.
- Meyhofer E. 1985. Comparative pumping rates in suspension-feeding bivalves. Mar. Biol. 85:137–142.
- Molini U, et al. 2007. Temporal occurrence of *Cryptosporidium* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Northern Adriatic Italian lagoons. J. Food Prot. 70:494–499.
- Morse DL, et al. 1986. Widespread outbreaks of clam- and oyster-associated gastroenteritis: role of Norwalk virus. N. Engl. J. Med. 314:678–681.
- Nakamura M, Yamamuro M, Ishikawa M, Nishimura H. 1988. Role of the bivalve *Corbicula japonica* in the nitrogen cycle in a mesohaline lagoon. Mar. Biol. 99:369–374.
- Nakamura Y, Kerciku F. 2000. Effects of filter-feeding bivalves on the distribution of water quality and nutrient cycling in a eutrophic coastal lagoon. J. Mar. Systems 26:209–221.
- Nishida T, et al. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69:5782–5786.
- Oshima K, Suzuki N, Nakamura M, Sakuramoto K. 2004. Shell growth and age determination of the brackish water bivalve *Corbicula japonica* in Lake Shinji, Japan. Fish. Sci. 70:601–610.
- Owen G. 1974. Feeding and digestion in bivalvia. Adv. Comp. Physiol. Biochem. 5:1–35.
- Robertson LJ. 2007. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. Int. J. Food Microbiol. 120:201–216.
- Savini G, Casaccia C, Barile NB, Paoletti M, Pinoni C. 2009. Norovirus in bivalve mollusks: a study of the efficacy of the depuration system. Vet. Ital. 45:535–539.
- Schets FM, van den Berg HH, Engels GB, Lodder WJ, de Roda Husman AM. 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. Int. J. Food Microbiol. 113:189–194.
- Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Metcalf TG, Atmar RL. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. J. Food Prot. 61:1674–1680.
- Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W. 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. Appl. Environ. Microbiol. 63:3669–3675.
- Sunen E, Sobsey MD. 1999. Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR methods. J. Virol. Methods 77:179–187.
- Tanriverdi S, Widmer G. 2006. Differential evolution of repetitive se-

- quences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Infect. Genet. Evol. 6:113–122.
48. Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. 1995. Effect of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. J. Clin. Microbiol. 33:371–375.
49. Vahl O. 1973. Pumping and oxygen consumption rates of *Mytilus edulis* L. of different size. Ophelia 12:45–52.
50. Yagita K, et al. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. Parasitol. Res. 87:905–955.
51. Yamamuro Y, Koike I. 1993. Nitrogen metabolism of the filter-feeding bivalve *Corbicula japonica* and its significance in primary production of a brackish lake in Japan. Limnol. Oceanogr. 38:997–1007.
52. Yamamuro Y, Koike I. 1994. Diel changes of nitrogen species in surface and overlying water of an estuarine lake in summer: evidence for benthic-pelagic coupling. Limnol. Oceanogr. 39:1716–1733.

「論文」

粉体汙過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発

泉 山 信 司

国立感染症研究所
寄生動物部主任研究官・工博

遠 藤 卓 郎

国立感染症研究所
細菌第一部客員研究員・獣医学博

要旨：新規クリプトスポリジウム濃縮方法として、酸溶解性のハイドロキシアパタイト球状粉体をケーキ汙過層とした、粉体汙過法を開発した。本汙過法では積層した粒子の間に目的粒子が物理的に捕捉される。直径が均一な球体を積層すると想定した場合、間に内接する球の直径は粉体の直径のおよそ15%と計算された。クリプトスポリジウムの捕捉には、オーシストの直径5 μm を0.15で除した逆算で得られる、33 μm のハイドロキシアパタイト粉体が適すると考えられた。10~40 μm の粉体を使用したオーシストの捕捉率は、概ね9割あるいはそれ以上であった。粉体中のオーシストは、2週間の冷蔵保存と塩酸処理の回収後でも、抗原性と内部微細構造への影響はなかった。直径34mmの使い捨てプラスチック容器内に形成させた汙過フィルターでは、水道水100L以上の汙過が可能であった。汙過濃縮物は、万一の際に迅速な検査を可能とし、本濃縮保存法の活用が期待された。

キーワード：クリプトスポリジウム原虫、オーシスト、粉体汙過、ハイドロキシアパタイト、試料保存
分類項目：試験方法原理 (120202)、原虫 (120506)、汙過その他 (050510)、危機管理一般 (130501)

1. はじめに

クリプトスポリジウムは強い塩素耐性を有し、水系感染する恐れがあることから問題とされている¹⁾。クリプトスポリジウム症の潜伏期間は海外の報告では5.4から7.2日、日本国内の集団感染事例の解析では6日間とされ^{1,2)}、過去にさかのぼっての原因調査は容易ではない。米国ミルウォーキーにおける集団感染では、配水地区にある企業が製造保存していた氷から、クリプトスポリジウムの検出がなされた³⁾。オーストラリアでは、シドニーでのクリプトスポリジウムによる水道汚染問題⁴⁾が生じたことを契機に、試料水の保存が提案された⁵⁾。原因不明の集団下痢症では必ず水の検査が行われることから、検査用試料の保存は重要と考えられる⁶⁾。

飲料水の安全をより確かなものにするため、わが国でも「水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について」(平成19年3月30日、健水発第0330005号)により、浄水あるいは浄水濃縮試料の保存が勧奨された⁷⁾。すなわち、クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物対策にあたって、「地表水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設や地表水

以外の水を水道の原水としており、当該原水から指標菌が検出されたことがある施設では、浄水を毎日1回20L採取し、水または採水した水から得られるサンプルを14日間保存する」ことが推奨されている。現状では、試料水は20L程度のプラスチック容器に入れ、浄水場内の冷暗所に14個の容器が並置・保存されているものと想定されるが、保存場所の確保や管理の負担は少なくない。クリプトスポリジウムのオーシスト等は、外部環境に耐性を持つとされているものの、冷蔵保存が基本である⁸⁾。また、緊急時の検証作業を迅速に行うためには濃縮試料の保存が望まれ、試料水量は20L分に限らず量的に多い方が望ましい。

当該研究はこれらの問題を解消することを目的に、酸溶解性で球状のハイドロキシアパタイト粉体を用いたケーキ汙過の方法(粉体汙過法)を開発したので報告する。本方法を用いれば、多量($\geq 100\text{L}$)の水道水の濃縮が可能で、濃縮試料は標準的な冷蔵庫での保存が可能となる。また、ケーキフィルターからのオーシスト等の回収は、ケーキ層を形成するハイドロキシアパタイトを塩酸で溶解することで、短時間に容易に行うことができる。

2. 実験方法

2.1 球状ハイドロキシアパタイト粉体を用いた沝過フィルター

可溶性粉体として当初の実験に粒径 $10\mu\text{m}$ 程度 (重量分布の平均粒径 $19\mu\text{m}$ 、個数分布の平均粒径 $6\mu\text{m}$ 、顕微鏡下で $6\sim 15\mu\text{m}$ 程度の分布、孔径 $8\mu\text{m}$ の支持体で保持可能で孔径 $16\mu\text{m}$ 支持体では漏れる、アパミクロン AP-20C、積水化成工業(株)、試供品)、 $20\mu\text{m}$ 及び $40\mu\text{m}$ (平均粒径 $20\pm 2\mu\text{m}$ 及び $40\pm 4\mu\text{m}$ 、CHTセラミックハイドロキシアパタイト TypeII、Bio-Rad Laboratories, Inc.、¥79,000/100g) のハイドロキシアパタイト粉体、研究後半に入手できた粒径 $30\mu\text{m}$ (平均粒径 $33\mu\text{m}$ で $20\sim 50\mu\text{m}$ に90%の分布、FSC用アパタイト、アドバンテック東洋(株)、¥3,900/50g) のハイドロキシアパタイト粉体を

用いた (図-1)。予備実験では 47mm フィルター用の直径 11cm 、高さ 18cm の上部が開放のプラスチック製減圧沝過容器 (500mL ファンネル装備の 47mm ポリサルホンホルダー、KP-47W、アドバンテック東洋(株))、あるいは 47mm フィルター用の直径約 70mm 、高さ 29cm の筒状のステンレス製加圧沝過容器 (47mm タンク式ステンレスホルダー (100mL)、XX40 047 00、Millipore corp.) を使用した (図-2、3)。それらのホルダーベースに支持体として孔径 $8\mu\text{m}$ あるいは $16\mu\text{m}$ のナイロンメッシュ (東京スクリーン(株)) を敷いた。これに十分量の精製水に攪拌・懸濁したハイドロキシアパタイト粒子を注入し、ごく緩やかな速度で下行通水し、均質なケーキ層形成に努めた。その際、ケーキ層の上の容器内に、十分量の水層が保たれるよう留意した。

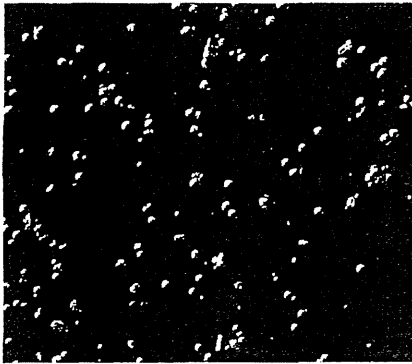
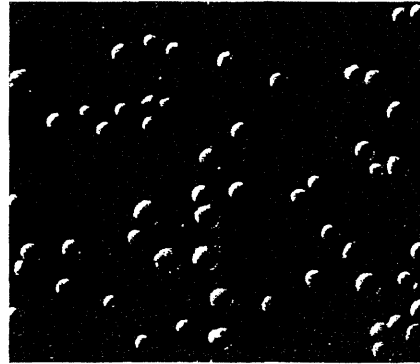
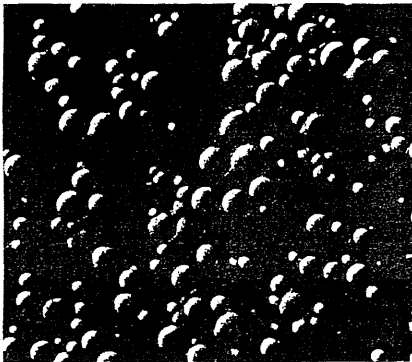
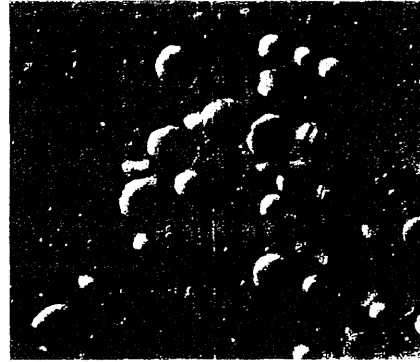
A) $10\mu\text{m}$ B) $20\mu\text{m}$ C) $30\mu\text{m}$ D) $40\mu\text{m}$ 

図-1 ハイドロキシアパタイト粒子の顕微鏡写真
微分干渉顕微鏡で観察した。各写真は同じ縮尺でスケールバーは $50\mu\text{m}$ 。

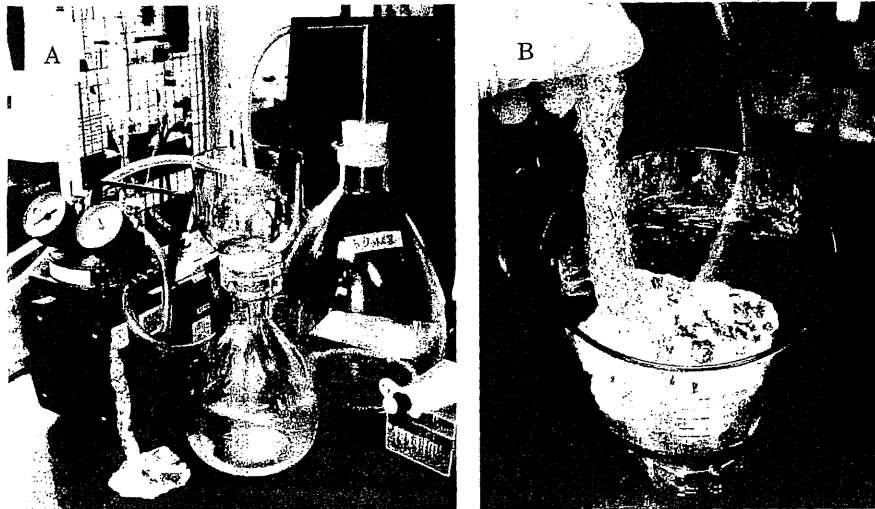


図-2 減圧ろ過装置

A) ポリサルホンホルダーを吸引ガラス瓶に取り付け、5Lの吸引トラップ瓶を経て吸引ポンプ等に接続した。B) ケーキろ過層が乱れないように、アルミホイルで作成した遮蔽板を使って、水の勢いを減じながら連続的に試料水を追加した。

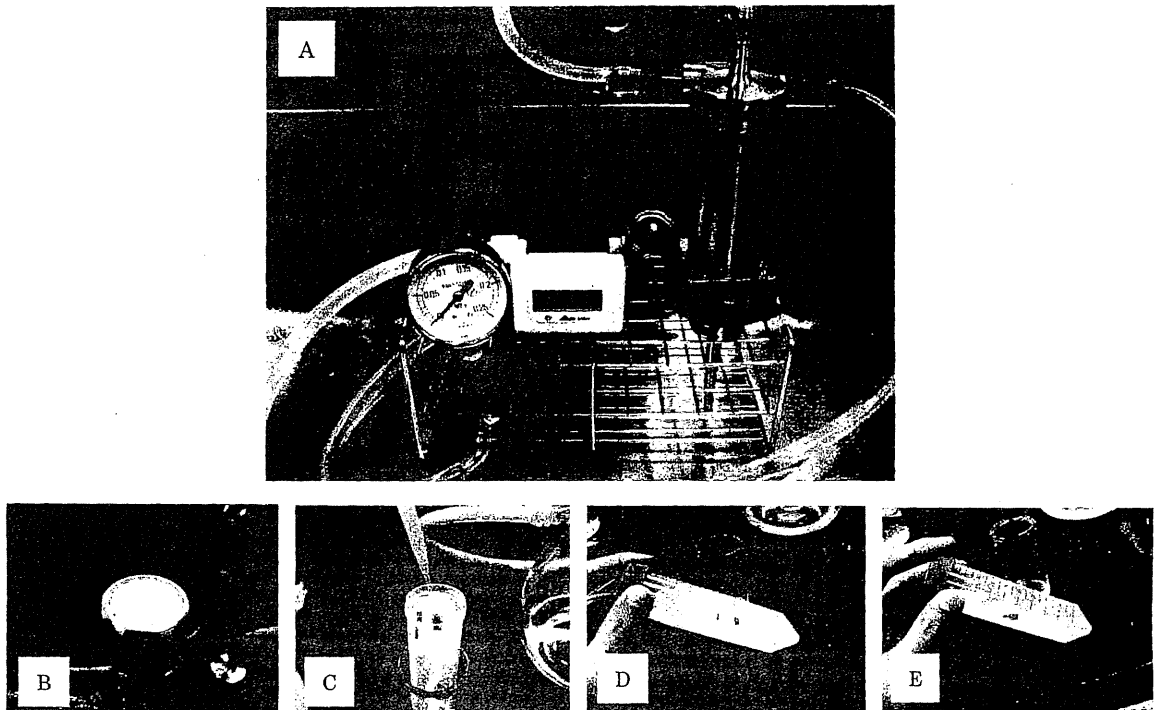


図-3 加圧ろ過装置

A) 水道の蛇口に積算流量計、圧力計、金属製フィルター容器の順に接続した。B) ろ過濃縮物の回収例。水を抜き、ろ過容器を開封した直後。C) ハイドロキシアパタイトをサポートフィルターごと50mL 遠心管に移し、界面活性剤添加精製水でハイドロキシアパタイトを洗い落とした。D) フィルターを除き、塩酸を加え、攪拌直前の様子。E) 攪拌し、塩酸で粉体がすみやかに溶解した。

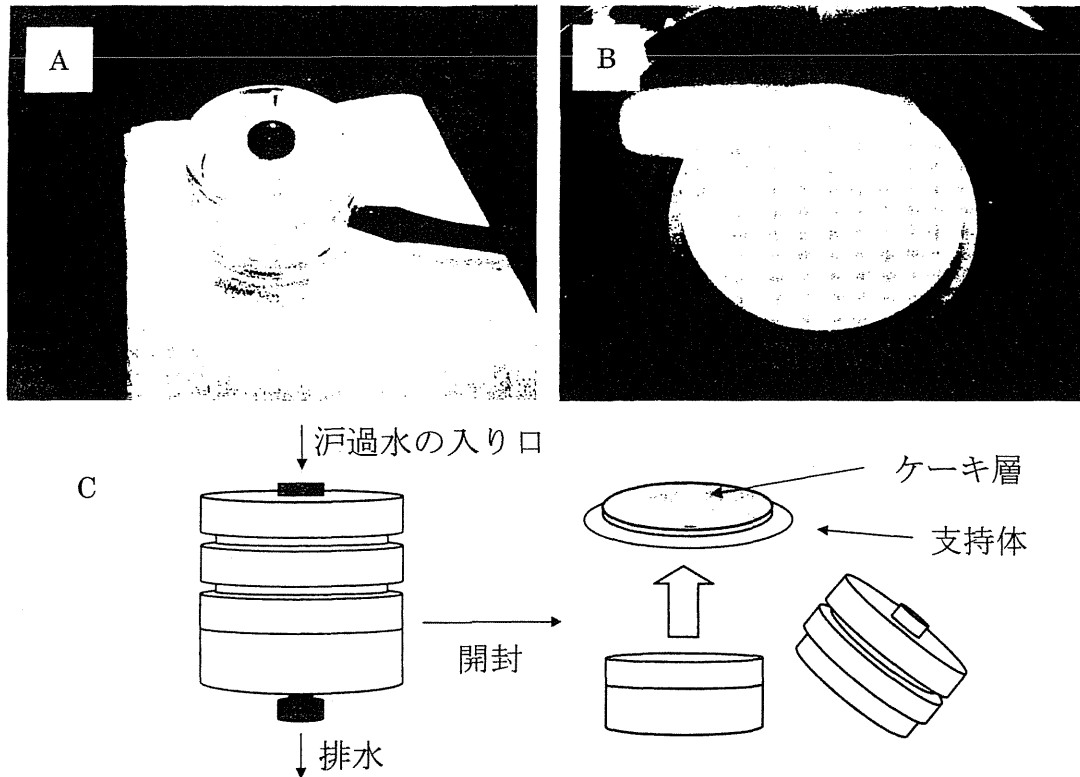


図-4 使い捨てプラスチック容器での汙過

A) 汙過後のプラスチック容器、B) シャーレに取り出した汙過濃縮物、C) プラスチック容器の模式図

本実験には内径34mmの3層構造の使い捨て円筒プラスチック容器（3ピースタイプ37mmモニター、アドバンテック東洋㈱）を用い、その最下部にケーキ層の支持体としてコーテッドタイプフィルター（ $3\mu\text{m}$ の粒子を99.9%保持、Y100A035A、アドバンテック東洋㈱）をセットし、その上に上述の要領でハイドロキシアパタイトのケーキ層を形成させた（図-4）。予備実験の結果から粉体量として $1\sim 1.5\text{kg}/\text{m}^2$ （直径34mmに $1\sim 1.5\text{g}$ 、ケーキ層の厚さは $1\sim 2\text{mm}$ 程度、トータルコストとして約500円/1回分）で良い捕捉率が得られる条件を検討した。

2.2 汙過操作

ハイドロキシアパタイトの粒径とケーキ層の厚さ（ハイドロキシアパタイトの使用量）の検討には吸引汙過を使用した。また汙過の捕捉率の確認試験では多量（ $\geq 100\text{L}$ ）の試料水の汙過を行うため加圧汙過を用いた。

吸引汙過では前述のポリサルホン製フィルターホルダーを用い、トラップピンと圧力調整付きポンプ（吸引加圧両用ポンプ、XX55 100 00、Millipore corp.）あるいはチュービングポンプ（東京理化器械㈱）を接続した（図-2）。汙速は $10\text{m}/\text{h}$ （ $0.2\text{L}/\text{分}$ ）程度に調整した。粗い粉体ではチュービングポンプの排気・排水による低い圧力でも汙過が可能で、細かな $10\mu\text{m}$ の粉体では吸引ポンプによるより高い汙圧を必要とした。粒径毎に捕捉率を求めた際の粉体使用量は、 $1.0\text{kg}/\text{m}^2$ （内径40mm程度に 1.3g の粉体を使用）で一定とした。粉体使用量毎に捕捉率を求めた際には $20\mu\text{m}$ の粉体を使用し、 $0.25\sim 1.0\text{kg}/\text{m}^2$ で用量を変化させた（内径40mm程度に対して $0.3\sim 1.3\text{g}$ の粉体量に相当）。ビーカーに用意した精製水1Lに粉体を懸濁し、フィルターホルダーに通水してケーキ層を形成し、引き続き性能評価用蛍光ビーズを懸濁した1Lを汙過、次いで精製水1Lを汙過し

た。界面活性剤(濃度0.01%の Tween80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Sigma))を適宜使用した。汙過に際しては水流によるケーキ層(汙過面)の乱れを避けるため、フィルターホルダーの導水部分に遮蔽板を設置して汙過面全面で均一に通水するよう工夫した。なお、フィルターホルダーのファネル内に数百 mL の水量が維持されていれば遮蔽板を用いなくても水の層により水の勢いが吸収されて安定した汙過操作が行えた。

加圧汙過では、前述のステンレス製フィルターホルダーあるいはプラスチック製37mm モニターを用いた。蛇口(東京都新宿区、国立感染症研究所内)に、積算流量計(OF05ZZQ、愛知時計電機株)、ブルドン管式圧力計(三田計器社)、そして汙過器の順にチューブを用いて接続した(図-3、4)。蛇口を徐々に開閉して汙圧を30~50kPa程度、汙速を30~40m/h程度(ステンレス製フィルターホルダーで0.6L/分程度、プラスチック製37mm モニターで0.4L/分程度)に調整した。粉体はステンレス製フィルターホルダーに20 μ mを1.0kg/m²、プラスチック製37mm モニターに30 μ mを1.0ないし1.5kg/m²の条件で使用した。100mL程の精製水に懸濁したハイドロキシアパタイト粒子を下行通水してケーキ層形成後、水道水の汙過を開始した。数分経過後、水道蛇口付近のチューブに設置した三方コネクターを介して汙過を中断せずに、クリプトスポリジウムオーシストあるいは蛍光ビーズをプラスチックシリンジを用いて静かに流路に注入し、その後に100L程の水道水を汙過した。

2.3 捕捉性能評価

捕捉性能評価にはオーシストの代替品として3 μ mの緑色蛍光を発する蛍光ビーズ(以下、代替蛍光ビーズ:粒径:2.762 \pm 0.057 μ m、Fluoresbrite calibration grade YG、Polyscience)を10⁵個、あるいはホルマリン固定した精製クリプトスポリジウムオーシスト10³個を用いた。クリプトスポリジウムは感染マウスの糞便よりショ糖浮遊法と塩化セシウム浮遊法により精製した⁹⁾。

ハイドロキシアパタイト粉体の溶解には1M塩酸(和光純薬)を用いた。管壁へのオーシストあるいは代替蛍光ビーズの付着を防ぐために試料

水には Tween80を適宜使用した。支持体上のケーキ層を全て50mLの遠心管に移し、次いでハイドロキシアパタイト1gに対して20mLの1M塩酸を用いて完全に溶解した。ハイドロキシアパタイトが溶け残った場合は若干量の塩酸を追加した。代替蛍光ビーズの計数にはフローサイトメーター(PAS型、Partec)を用い、溶解後の試料200 μ L中の蛍光ビーズを求め、同じ容量にストックから懸濁した蛍光ビーズを分母として捕捉率を算出した。添加時の誤差が生じることから、十分に攪拌するなどの注意を要した。同一試料の3回前後行ったフローサイトメトリーによる測定での標準偏差は2~5%程度、同一試料の2回行った顕微鏡下の計数で標準偏差は7%程度であった。オーシストの回収実験では、ハイドロキシアパタイト全量を溶解後にその内の1割分を直径25mmのPTFEフィルターで汙過し、定法に従って蛍光抗体染色を行い蛍光顕微鏡で計数した。

2.4 ハイドロキシアパタイト粉体中のオーシスト保存性評価

感染マウスの糞便より精製した未固定の *Cryptosporidium parvum* オーシストを使用した。水道水2mLと粒径30 μ mのハイドロキシアパタイト粉体1.5gとオーシスト(10⁵~10⁶個)を50mL遠心管中で混合し、密栓して4℃で2週間ほど保管した。そこから一定量(20~40 μ L)の試料を取り出して、700 μ Lの1M塩酸で溶解し、その後0.1% Tween80水溶液を加えて1.5mLに調整した。次いで、顕微鏡観察用のPTFEフィルター(直径25mm)で所定量(20~40 μ L)を汙過し、洗浄後、定法により蛍光抗体染色を行い、約100個のオーシストを蛍光顕微鏡下で計数し、染色性の変化の有無を観察した。あるいは、一定量500 μ Lの試料を取り出し、4.5mLの0.1% Tween80水溶液と5mLの1M塩酸を加えてハイドロキシアパタイトを溶解後に遠心分離した。沈さをガラスのスライド上に封入し、微分干渉顕微鏡下で、形態変化の有無を観察した。

3. 結果及び考察

3.1 捕捉される粒子粒径の理論値計算

当該研究ではクリプトスポリジウムオーシスト等の効率的な濃縮・保存方法の開発に向け、球状

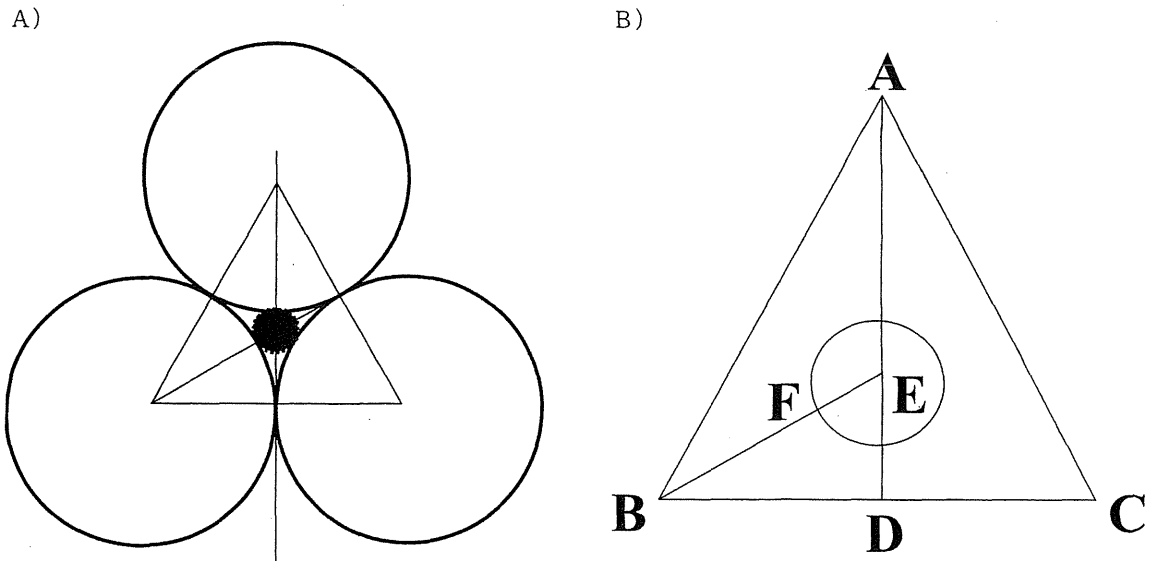


図-5 粉体沝過法のケーキ沝過層に使用する粒径の計算

A) 3つの球の配置が最も密になる状態とその間隙を通過する最大の粒子(中央)の模式図、B) 計算のために設定した三角形の拡大図

のハイドロキシアパタイト粒子を積層して生じたケーキ層をフィルターとした新たな沝過フィルター(粉体沝過フィルター)の有効性について検討した。ここで、積層した粒子がつくるフィルターの孔径、すなわち捕捉可能な粒径を求めた。計算上は球が最密に充填された状態を想定して、そこに形成される空間の大きさを求めた。すなわち、ケーキ層の形成する沝過孔径は平面図上で3つの円の間隙に接する小さい円の直径として計算される(図-5A)。図中の大きな円すなわちハイドロキシアパタイトの半径を r としたとき、3つの円の中心を結ぶ正三角形ABCは、1辺の長さが $2r$ となる(図-5B)。頂点A(=円の中心A)から正三角形ABCを2分割する直線を引き、辺BCとの交点をDとする。同様に、2分割の直線を頂点Bと頂点Cから引くと、三角形の各内角の二等分線は1点E(=内心)で交わる。3つの大きな円が同じ大きさであるとするれば、三角形ABCは正三角形となり、直線AE、BE、CEの長さは等しく、一方、3つの大きな円と小さな円は等距離にあり、点Eは大きな3つの円に外接する円の中心でもある。小さな円と直線BEの交点をFとする。三角形BDEは、30度、60度、90度

の角度を持つ直角三角形であり、辺の長さは、 $DE:BE:BD = 1:2:\sqrt{3}$ の関係にある。ここでBDとBFは大きな円の半径であることから、三角形BDEの各辺の長さは、 $DE = r/\sqrt{3}$ 、 $BE = 2r/\sqrt{3}$ 、 $BD = r$ と計算される。小さな円の半径は直線EFの長さであり、 $EF = BE - BF = 2r/\sqrt{3} - r = (2/\sqrt{3} - 1)r$ と計算される。数値に直すと約 $0.15r$ であり、すなわち補足粒径の理論値は、積層する粒子のおよそ15%の径と計算される。直径 $5\mu\text{m}$ のオーシストを捕捉するには、 $5\mu\text{m}$ を 0.15 で除して得られる直径 $33\mu\text{m}$ の粉体が対応すると計算される。

3.2 粒径毎の実際の粒子捕捉率

夾雑物のない条件下で積層する粒子の粒径を変化させて、実際のクリプトスポリジウムオーシストの捕捉率を検討した。

この実験では当初に入手利用できたハイドロキシアパタイト3種を使用し、模擬粒子として直径 $3\mu\text{m}$ の代替蛍光ビーズの捕捉性能を求めた。その結果、直径 $10\mu\text{m}$ 及び $20\mu\text{m}$ では高い捕捉率が得られた。直径 $40\mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイトを用いた場合、若干捕捉率が低下する傾向が見られたが、いずれの粒径の粒子を用いても概ね9

割あるいはそれ以上の代替蛍光ビーズの捕捉が確認された (表-1)。

表-1 粉体粒径と 3 μm 蛍光ビーズ捕捉率

粉体粒径 (μm)	3 回の実験の捕捉率 (%)			平均捕捉率 (%)
	1	2	3	
40	72	95	97	88
20	105	114	109	109
10	90	101	99	97

概ね 9 割以上の捕捉が確認はされたものの、40 μm で若干の捕捉率が低下する傾向が見られた。夾雑物の少ない水道水には、理論上の 30 μm 強以下の粒径のハイドロキシアパタイトを使用するのが適していると考え、ハイドロキシアパタイトの使用量と捕捉率の関係の検討では 20 μm、後述の使い捨て容器での汙過実験には粒径 30 μm のハイドロキシアパタイトを使用した。

3.3 ハイドロキシアパタイト粉体使用量と捕捉率

本汙過方法では使用する粉体の量によって汙速や汙過圧力などが変わり、ひいてはフィルターの捕捉性能に影響する。しかし、安易に粉体量を増やせば回収工程における塩酸量が増えるなどの不都合が生じる恐れがあり、量は必要最小限に抑えることが望ましい。そこで、粒径 20 μm のハイドロキシアパタイトを用いて、粉体の使用量 (すなわちケーキの層厚) を変化させて、捕捉率への影響を検討した (表-2)。その結果、粉体量を 0.25kg/m²とした場合、形成されるケーキ層は薄く、捕捉率が平均 64% に低下した。粉体量を 0.5 から 1.0kg/m²の間とした場合ではケーキ層の完全さが確保され、この範囲では概ね 9 割あるいはそれ以上の捕捉率が得られた。当該結果からは粉体量が 1.0kg/m²が適していると考えられた。なお、汙過後の処理を考慮すると粉体量はなるべく少ないことが望まれることから、汙過を安定させるなどの方法で可能な限り粉体の低減化に向けて検討する予定である。

3.4 大容量の汙過後の捕捉率

当該研究では浄水の数 L~数百 L の汙過への応用を想定しており、大容量の汙過に際しても一旦

表-2 粉体使用量と捕捉率

粉体使用量 (kg/m ²)	2 回の実験の捕捉率 (%)		平均捕捉率 (%)
	1	2	
0.25	61	68	64
0.5	83	93	88
1.0	104	104	104

表-3 大容量の汙過後の捕捉率

実験番号	汙過水量 (L)	処理時間 (h)	汙圧 (kPa)	捕捉率 (%)
1	120	3.4	40~50	97
2	110	4.3	30~40	80
3	160	4.2	40	80
平均				86

捕捉した目的粒子を保持し続けなければならない。そこで、10⁵個の代替蛍光ビーズを捕捉させたケーキ汙過フィルターで多量の水道水 (≧ 100L) を汙過し、その間のオーシスト等の漏失の有無を検討した。その結果、ケーキ層からは 9 割程度の代替蛍光ビーズが回収され、多量の汙過による捕捉物の漏失は最小限に抑えられていた (表-3)。

3.5 ハイドロキシアパタイト粉体と混合したオーシストの保存性確認

ハイドロキシアパタイト粉体と混合したオーシストを用意し、2 週間にわたり定期的にその一部を取り出して所定の回収・顕微鏡標本作製工程を経てオーシストを計数し、染色性ならびに微細構造の変化の有無を検討した。その結果、2 週間の冷蔵保存期間中にオーシスト数は減少せず (図-6)、また、蛍光抗体染色性、あるいは微細構造に変化が起きないことが確認された。

3.6 使い捨て容器での粉体汙過

汙過装置の簡素化、ひいては方法の普及を目指して、内径 34mm 程度の使い捨て三層プラスチック容器を用いて粉体汙過を試みた。計算上でも実験上でも 30 μm 強の粒径が最も適していたこと、研究後半に入手可能となったことから、粒径 30 μm のハイドロキシアパタイトを使用した。この時の粉体量は 1 あるいは 1.5g (1 あるいは 1.5kg/m²に

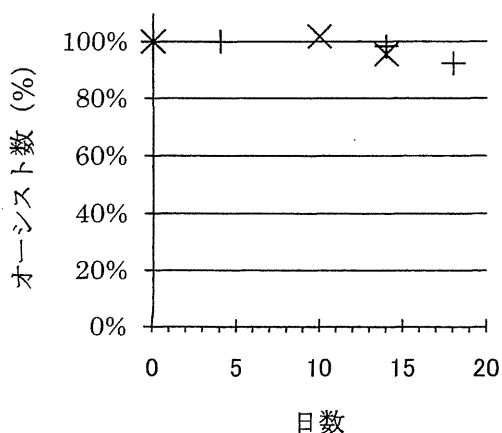


図-6 水道水に懸濁した粉体中のオーススト保存性
+ : 1回目、x : 2回目

相当) を用い、ケーキ層は目視で1~2mm程度となり、安定した汙過が可能に見えた。ろ加圧は50kPaとしたが、汙速が早すぎるとケーキ層の中央が削れて窪むことを経験し、低い圧力で一定とした。

方法に記したように、汙過の初期に10⁸個の蛍光ビーズあるいは10⁸個の固定クリプトスポリジウムオースストを添加し、その後に水道水を100L以上汙過した。使用した汙過フィルターは内径34mmとこれまでにクリプトスポリジウムの濃縮法で使用されていたメンブレンフィルターに比べて小さいが、上記の汙過条件において100L以上の水道水を余裕をもって汙過できることが確認された。汙過の初期に添加した代替蛍光ビーズあるいはオースストは、その後に100L以上の汙

過によっても9割以上が回収されており、多量の汙過による漏失は最小限に抑えられていることが示された(表-4)。

なお、プラスチック容器に1gあるいは1.5gのハイドロキシアパタイトを使用した、実際の手技として50mLの遠心管に濃縮物を含むケーキ汙過層を移すには界面活性剤添加精製水20mLが適量であること、25mLの1M塩酸でハイドロキシアパタイト1.5gまで溶解できること、などを考慮し、1.5gの粉体量を上限とした。

4. まとめ

酸溶解性の球状のハイドロキシアパタイト粉体を積層してなるケーキ層をフィルターとした粉体汙過法を開発した。クリプトスポリジウムオーススト5μmを捕捉するには30μmの粒子が適すると計算され、実験的に10μmから40μmの粒径を持つ粒子で形成した汙過フィルターで捕捉可能であることを確認した。ハイドロキシアパタイトの粉体量の検討では使用量に従った捕捉率が得られ、1kg/m²が適していると考えられた。汙過装置の簡素化、ひいては方法の普及を目指して内径34mm程度の使い捨ての三層プラスチック容器を用いたケーキ汙過フィルターを作製し、100L以上の水道水の汙過が可能なること、また、9割以上の捕捉性能を確認した。当該ケーキ汙過方法は単に多量の浄水の汙過が可能なるばかりではなく、保存が容易であること、さらにオースストなど捕捉粒子の回収に際してケーキ層を形成するハイドロキシアパタイトを塩酸で溶解除去できる利点がある。

表-4 使い捨て容器での粉体汙過

実験番号	粉体使用量 (kg/m ²)	評価粒子	汙過水量 (L)	汙過時間 (h)	汙圧 (kPa)	捕捉率 (%)
1	1.5	3μm 蛍光粒子	144	6	50~80	97
2	1.5	3μm 蛍光粒子	113	5	50~60	107
3	1.5	オーススト	105	4.5	50~60	101
4	1.5	オーススト	112	5	50~60	102
5	1	3μm 蛍光粒子	117	4.5	40~70	104
6	1	3μm 蛍光粒子	110	4.5	40~70	98
7	1	オーススト	104	6.5	25~40	93
8	1	オーススト	129	7.8	20~40	92

5. 謝辞

積水化成品工業株式会社よりハイドロキシアパタイト粉体の試供品と粒度分布の資料をご提供いただいた。本研究は平成18年度の厚生労働省科学研究費補助金「地域健康危機管理研究事業 最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究」(主任研究者: 眞柄泰基、H16-健康-066)、平成19~21年度の厚生労働省科学研究費補助金「健康安全・危機管理対策総合研究事業 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(研究代表者: 松井佳彦、H19-健危-一般-012)の補助を受けて実施した。本研究成果の一部は、第59回全国水道研究発表会(平成20年)において発表した。

参 考 文 献

- 1) Warren, CA, and Guerrant RL. Clinical disease and pathology, pp.235-253. In Fayer R and Xiao L (ed.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. (2008)
- 2) 泉山信司、遠藤卓郎、わが国で発生した *Cryptosporidium* 集団感染に関する考察、日本臨床寄生虫学会雑誌、Vol.16, No.1, pp.58-60 (2005)
- 3) Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB,

- Davis JP. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* Vol.331, No.3, pp.161-167 (1994)
- 4) Stein PL. The Great Sydney Water Crisis of 1998, *Water, Air, & Soil Pollution*, Vol.123, No.1-4, pp.419-436 (2000)
- 5) McClellan PQC. Sydney Water Inquiry Fifth Report; Final Report Vol.2, p.160 (1998) (http://www.dpc.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0016/15361/Fifth_Report_-_Final_Report_Volume_2_-_December_1998.pdf, 2011年11月8日確認)
- 6) 八木欣平、高野敬志、山野公明、伊東拓也、澤田幸治、古屋宏二、2002年、北海道クリプトスポリジウム症集団発生事例報告、病原微生物検出情報、Vol.26、No.7 (No.305)、pp.171-172、2005
- 7) 水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について、厚生労働省健康局水道課長、健水発第0330005号(平成19年3月30日)
- 8) Peng X, Murphy T, Holden NM. Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Appl Environ Microbiol.* Vol.74, No.23, pp.7101-7107 (2008)
- 9) Arrowood MJ, Donaldson K. Improved Purification Methods for Calf-Derived *Cryptosporidium parvum* Oocysts Using Discontinuous Sucrose and Cesium Chloride Gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43 : 89S. (1996)

(平成23年11月9日受付)

<報告>

水道クリプトスポリジウム試験法の検査体制維持・向上に係る技術研修の役割

黒木俊郎¹⁾, 泉山信司²⁾, 八木田健司²⁾, 遠藤卓郎²⁾, 岸田直裕³⁾, 島崎大³⁾, 秋葉道宏³⁾

¹⁾ 神奈川県衛生研究所企画情報部

²⁾ 国立感染症研究所寄生動物部

³⁾ 国立保健医療科学院

Role of technical training course at National Institute of Public Health in maintaining and improving detection system for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples in Japan

Toshiro KUROKI¹⁾, Shinji IZUMIYAMA²⁾, Kenji YAGITA²⁾, Takuro ENDO²⁾,
Naohiro KISHIDA³⁾, Dai SIMAZAKI³⁾, Michihiro AKIBA³⁾

¹⁾ Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

²⁾ National Institute of Infectious Diseases

³⁾ National Institute of Public Health

抄録

国立保健医療科学院の短期研修「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」は、水試料からのクリプトスポリジウム及びジアルジア試験法の習得を目的に平成10年度に国立公衆衛生院（当時）において開講され、平成23年度で14回目を迎えた。この研修は、水道におけるクリプトスポリジウム等汚染に対応するための技術的知識、能力ならびに検査技術を習得して、地方において中心的役割を担う人材を養成することを目的としている。研修は講義と実習からなり、実習は実技習得に重点を置き、水試料の濃縮・精製方法、染色方法、微分干渉装置付蛍光顕微鏡による観察方法から構成されている。最近では、研修の中にクリプトスポリジウム等の検査に導入されることとなった遺伝子検出法を取り入れている。

キーワード：クリプトスポリジウム，人材育成，公衆衛生専門職，コンピテンシー

Abstract

The technical training course of the detection methods for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples at The National Institute of Public Health started in 1999 and the 14th in the series was held in 2012. The aim of the course is to acquire technique knowledge, proficiency and competencies for performing the detection methods of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking and source water and to train personnel with major roles in the local area. The course consists of lectures and practical training. Practical training is designed to focus on acquiring laboratory skills for detecting *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples, including concentration of water samples, separation of the target microbes by means of sucrose gradient separation and immunomagnetic separation, immunostaining and differential interference optic (DIC microscopic)

連絡先：秋葉道宏

〒351-0012 埼玉県和光市南2-3-6

2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama, 351-0197, Japan.

TeI: 048-458-6271

Fax: 048-458-6272

E-mail: akiba@niph.go.jp

[平成24年10月18日受理]

observation. Recently, gene detection technique of *Cryptosporidium* and *Giardia* are included in the laboratory training.

keywords: *Cryptosporidium*, human resources development, public health professionals, competency
(accepted for publication, 18th October 2012)

I. はじめに

クリプトスポリジウムはコキシジウムに属する原虫の1種で、消化管の上皮細胞に寄生し、ヒトの下痢症の原因となる。感染型であるオーシストはオーシスト壁に覆われ、環境や消毒薬に抵抗性を示す。環境中にはオーシストが存在する。この原虫によるヒトの感染症は欧米では1976年に最初に報告され [1, 2], 1980年代には水系感染による集団下痢症が注目された。耐塩素性であるクリプトスポリジウムは、塩素消毒により微生物学的安全性が確保されてきた水道水にとって、大きな脅威となっている。多くの水系感染事例が世界中で報告されており、特に1993年には米国ミルウォーキー市において、水道水を介して推計40万人が感染した史上最大の集団下痢症事例が発生した [3]。

わが国においては、1986年に高知県で最初の症例が報告され [4], その後散発事例が発生した。1994年(平成6年)に神奈川県平塚市の雑居ビルで簡易専用水道を介した集団下痢症が発生し [5], 1996年(平成8年)には埼玉県越生町の町営水道が汚染され、町民の約9,000人が下痢症を発症する大規模な集団発生があった [6]。これらの水道関連事例の発生を受けて、厚生省(当時)は平成8年10月に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針(以下、暫定対策指針という)」[7]を策定するとともに、水道水源の汚染状況を把握するために「水道に関するクリプトスポリジウムオーシストの検出のための暫定的な試験方法」[8]を提示した。この試験法は平成10年6月に一部改正され、さらに平成19年3月には「暫定対策指針」が「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針(以下、対策指針という)」[9]に変更されて、「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」[10]の別添として「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(以下、検査方法という)」が公表された。

検査方法では、クリプトスポリジウム同様にジアルジアについても試験方法が示されている。ジアルジアは動物性鞭毛虫の1種であり、ヒトに寄生するジアルジアはランブル鞭毛虫とも呼ばれている。感染型であるシストはシスト壁に覆われ、クリプトスポリジウムオーシスト(以下、オーシストという)と同様に環境や消毒薬に抵抗性を示す。ヒトが感染すると無症状の場合もあるが、軟便から水様便を呈する下痢症の原因となることもある。

平成8年の暫定対策指針により試験法が示されたことを受けて、試験法および顕微鏡観察技能の習得に関する技術研修に対する要望が非常に高まったことから、「水試料か

らのクリプトスポリジウム試験法実習」が国立公衆衛生院(当時)において平成10年度から開講された。受講対象者は地方衛生研究所、保健所および水道事業体などの職員としている。本研修は、単に受講生が必要な知識と技術を習得するにとどまらず、本研修の受講生が地方におけるクリプトスポリジウム・ジアルジア対策の推進に重要な役割を担うことが期待されている [11]。さらに、本研修への参加について、多くの機関から強い要望が出されている。

本稿では、国立保健医療科学院において実施されている短期研修、水道クリプトスポリジウム・ジアルジア試験法に係わる技術研修を概説し、さらに、今後の課題について述べる。

II. 研修の意義, 目的

「水試料からのクリプトスポリジウム試験法実習」では、その目的を①耐塩素性微生物に関する知識を習得する、②飲料水における耐塩素性微生物の問題を理解する、③試験方法を理解し、操作法を習得する、④技術者に求められる基本的能力と専門能力を向上させる、としている(表1)。試験方法の基本的操作法を習得することは重要であるが、研修の受講対象者を3年以上の微生物実務経験者としてい

表1 研修の目的

項目	概要
耐塩素性微生物に関する知識の習得	クリプトスポリジウムの生物学的特徴を習得する ジアルジアの生物学的特徴を習得する
飲料水における耐塩素性微生物の問題に対する理解	飲料水の安全性確保と耐塩素性微生物の問題を理解する 試験法実施の意義と自らの役割を理解する 過去の汚染事例を学習する 対応法を理解する 飲料水の安全性確保上の問題点を見出し、解決する
試験方法に対する理解と操作法の習得	試験方法の工程を理解する 試験方法の操作を理解し、習得する 操作上の留意点を理解する 顕微鏡操作及び写真撮影技術を習得する
技術者に求められる基本的能力と専門能力の向上	試験法を適切・確実に実施し、オーシストやシストを正しく判定する 各ステップにおける操作法を適切に選択し、効率的に実施する 試験法の問題点を見出し、解決する

るため、試験方法における実践的な高度知識・技術の習得にも力点を置いている。

水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法は、検査手順の統一性よりも検査実績（回収率）を重視した方法であり、先述の「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」[10]においても、「回収率に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。」と記載されている。このため、水試料の性状等により使用する試験法の内容の変更や操作方法の検討等を行い、それぞれの水試料に適した操作方法を見出し、回収率を向上させるとともに、顕微鏡観察によりオーシストやシストの判定を行わなければならない。そのためには、クリプトスポリジウム等の生物学的な知識や試験方法全般に関する知識と技術が求められる。それぞれの施設において試験実施者を育成するためには、OJT（On-the-Job Training、職場内での訓練）を活用することが重要である。しかし、人事異動や職員数の減少あるいは試験方法の実施に経験と高度な技術を要するといった様々な理由により、OJTだけでは不十分となる状況が生じている。そのため、OffJT（Off the Job Training、職場外での訓練）の重要性がますます増大している。

国立保健医療科学院では保健衛生等に関するOffJTを提供する機関として位置づけられている。OffJTの利点は、それぞれの施設でのニーズに即した、OJTでは得られない技術や知識・能力あるいは高度な技術や最新の情報および知識を短時間で得られること、OffJTの場において講師や受講生と情報交換を行えることなどが挙げられる。本研修では、水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法の担当者に求められる実践的な知識と操作手技が習得できるように研修内容を編成している。

近年、職務遂行に必要な能力を明確に規定し、評価するためにコンピテンシーの概念が導入されている。本研修においては、水試料からのクリプトスポリジウム等試験法に関する知識と技術の習得に重点を置いているが、専門職として求められる能力を身につけることにも配慮している。求められる能力としては、「新任時期における地域保健従事者の現任教育に関する検討会報告書（平成16年3月）」[12]において示された基本的能力と専門能力を参考に設定している（表2）。具体的には、水道水の微生物学的安全性確保における耐塩素性微生物問題の重要性やクリプトスポリジウム等の汚染の把握のための試験法の意義といった、責任感、積極性、情報収集・調査研究能力及び健康危機管理

表2 試験担当者に求められる能力

能力		到達目標	
基本的能力	責任感	組織目標認知能力	職場の使命や試験業務の重要性を正しく理解している。
		完遂能力	試験業務に誠意を持って取り組み気概を持って遂行することができる。
	協調性	役割認識能力	試験業務における自らの役割を理解し、関係者と協力して遂行する。
		相互理解能力	同僚、上司、関係者と意思疎通を図り、連携して試験業務を遂行する。
	積極性	問題把握能力	試験業務の目的を理解し、問題意識を持って遂行する。
		問題解決能力	試験業務における課題・問題点を抽出し、解決しようと前向きに取り組む。
		自己開発能力	自己啓発に努め、積極的に知識・技術の習得・向上に努める。
	効率性	コスト認識能力	コスト意識を持ちながら試験業務を遂行する。
		手段選択能力	試験業務の手順や効率性を考えて遂行する。
		業務遂行能力	試験業務を決められた手順で遂行できる。
	理解力	事実認識能力	試験業務に関する情報を検証し、事実を正確に理解できる。
		分類能力	試験業務に関する事実・情報を分類し、整理することができる。
		情報収集能力	適切な方法を用いて情報を正確に収集することができる。
		分析能力	得られた情報を正確に分析し、総合的に捉える。
	判断力	権限認識能力	試験業務に関する事実や情報を上司に報告、相談する。
判断処理能力		試験業務に関する判断を自ら行い、適切に対処できる。	
倫理観	規範認識能力	試験業務に対する使命感を持ち、住民の信頼に応える。	
専門能力	各職種共通の専門能力	企画・立案能力	水道水の耐塩素性微生物に関する課題に対応した企画・立案ができる。
		情報収集・調査研究能力	専門職として知識・技術を身につけ、業務に必要な情報を収集し、業務に役立てる。
		事業運営能力	試験業務に関する事業を円滑に運営することができる。
		事業対象者支援能力	事業の対象者を適切に支援することができる。
		健康危機管理能力	健康危機管理が必要な状況を理解し、発生時に迅速・適切に対処できる。
		連携・調整・社会資源開発能力	必要に応じて人的資源、社会的資源を適切に活用し、問題を解決できる。
		事業評価能力	事業の評価に主体的に参画することができる。

能力等の、試験実施者に求められる能力に関連した内容を講義と実習に盛り込んでいる。

我が国における水道水のクリプトスポリジウム汚染を監視・制御するためには、専門的知識を有し、確定検査を実施可能な試験者が各地域において複数名ずつ存在することが理想であるが、人事異動等の影響で確保が困難な状況にある。本研修には、このような課題を解決するための2つの役割が存在する。1つは、受講生がそれぞれの地域でのクリプトスポリジウム等の対策に実践的に取り組むことができるようになること、および検査体制の中核として活躍することである。さらに、研修で得られた知識や習得した技術は職場内あるいは地域の関連部署・機関へ伝達することで、その地域のクリプトスポリジウム等への対応ならびに検査体制が確立・強化されていくことである。もう1つは、本研修は地方におけるクリプトスポリジウム等の対応体制の支援に重要な役割を担っている。受講生が職場において異動することにより、知識や技術が十分に伝達されないことも実際に起きている。そのため、同一の職場から複

数回にわたり職員が受講生として参加していることも事実である。このような場合には、新たに知識や技術を習得した受講生が継続的に対応に当たることを可能にしている。

Ⅲ. 研修受講生の概要

本研修には、毎年度16～23人（平均21.5人）が受講し、平成10年から平成22年度までの13年間で279人に達した。水道事業者からの受講生が最も多く126人（45.2%）で、地方衛生研究所がこれに次いで114人（40.9%）となっている（表3）。受講生は北海道から沖縄まで1県を除く46都道府県から集まり、所属数は131機関となった。その内訳は46地方衛生研究所（35道府県、11市区）、16保健所（6道府県、10市）、52水道事業者、16検査機関、その他1機関であった（表4）。各機関からの参加は原則1人としているが、受講生を複数年度にわたり参加させている機関もあり、最高は9人で、1機関からの参加受講生数は平均2.13人となっている。

表3 「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」の年度別受講者数

	年 度														合計 (%)
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
受講者数															
所 属															
地方衛生研究所	12	13	5	11	8	4	8	9	5	8	12	9	10	8	122 (40.3)
保健所	2	3	1	0	3	1	3	2	3	1	1	1	0	3	24 (7.9)
国立機関	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (0.3)
水道事業者	5	7	10	10	10	11	9	9	11	12	9	13	10	13	139 (45.9)
検査機関	1	0	3	2	2	0	3	1	3	2	0	0	0	0	17 (5.6)
地 域															
北海道・東北	2	3	4	3	5	4	5	3	3	3	5	5	4	4	53 (17.5)
関東	4	6	4	7	7	2	3	4	6	7	3	4	7	2	66 (21.8)
中部	3	2	3	3	4	3	6	4	2	2	4	3	2	6	47 (15.5)
近畿	3	4	2	1	2	1	3	1	2	2	1	3	1	1	27 (8.9)
中国・四国	4	5	3	5	4	2	3	5	3	3	4	3	1	4	49 (16.2)
九州・沖縄	4	3	3	4	1	4	3	4	7	6	5	5	5	7	61 (20.1)
合計	20	23	19	23	23	16	23	21	23	23	22	23	20	24	303 (100)

表4 「水道クリプトスポリジウム試験法に係る技術研修」の受講者の地域別所属数

	衛生研究所	保健所	水道事業者	検査機関	その他*
北海道・東北	7	3	10	2	0
関東	12	0	10	2	1
中部	8	2	8	5	0
近畿	4	4	7	0	0
中国	5	5	6	2	0
四国	3	1	5	2	0
九州・沖縄	9	1	9	2	0
合計	48	16	55	16	1

*：国立機関

IV. 試験法の概要

水道原水や水道水中のオーシスト及びシストの有無ならびに個数を監視することは、水道水を汚染したこれらの原虫の感染リスクを推定し、あるいは水道原水中の汚染状況を把握して、水道水の微生物学的安全性を確保することが目的である。もしも汚染があれば適切な処置を施し、未然に感染を防がなければならない。

水試料のクリプトスポリジウム等の試験法は、採水、濃縮、精製、染色および顕微鏡観察と計数の各段階から構成されている(表5)[10]。水試料からのクリプトスポリジウム等の試験法は欧米でも実施され、米国のMethod 1622および1623や英国のthe Water Supply(Water Quality)(Amendment) Regulations 1999がある[13-15]。これらの試験法もわが国の試験法と同様の段階を踏んでオーシストおよびシストを検出する。しかし、各段階で使用する器材などはそれぞれ国により異なり、経済的理由や試験法に対する考え方などの違いが反映されている。

わが国あるいは米国や英国などにおいて、水試料からのクリプトスポリジウム等の検査は採用すべき試験法が定められている。しかし、試料の性状が多様で、具体的には砂や粘土質様濁質あるいは植物プランクトンなどの生物が多い、あるいは各種排水が流入しているといった状況があり、オーシストやシストの回収率の向上や正確な判別のために試験法に記載された限られた範囲ではあるがそれぞれの試料の性状に見合った手法・操作や試薬・器具・器材などを変更しなければならないことがある。そこで、実績主義の立場が取られている[16]。すなわち、試験実施者は対象とする試料に合わせて試験法の内容を組み立て、それを実施することが推奨されている。

水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法

において、回収率を向上させ、汚染状況のより正確な数値を得るためには、試験法の内容を覚え、技術を習得するだけでは不十分である。試験実施者は、それぞれの試薬・機器や操作などの意義、原理、長所、短所を正しく理解し、さらに応用に関する知識や技術が備わっていることが望ましい。実際にこの試験法は、試料中のオーシストおよびシスト数が非常に少ないために大量の水を対象とし、労力と時間を要する。さらに夾雑物の中から少数の微粒子であるオーシストおよびシストを検出・確定するための高度な技術と能力が要求される[17-19]。そのため、試料や試験過程の様々な要因が回収率やオーシストやシストの判別・計数に影響する。報告されている回収率に非常に幅があるのはそうした実情を反映している[17-19]。

V. 研修

1. 研修の概要

研修は講義と実習で構成している。講義の内容は「原虫汚染への行政対応」、「水道システムと水の安全性」、「原虫汚染の実態」、「浄水処理における対応とモニタリング」、「原虫の生物学的特性と水系感染」、「試験法の解説」と、原虫の生物学的特性から飲料水の微生物学的安全性の確保及び行政対応までの広い範囲に渡っている。こうした講義において、耐塩素性原虫の公衆衛生上の問題、試験法実施の使命及び意義、試験結果に基づく行政対応の重要性、汚染や健康危機管理事項発生時の行政及び浄水場等での対応、耐塩素性原虫に関する世界的状況、耐塩素性原虫及び試験法等に関する情報収集の重要性等について学習する。これにより、試験実施者に求められる基本的能力(責任感、積極性、理解力及び判断力)及び専門能力(情報収集・調査研究能力及び健康危機管理能力)に対する理解を深めることが期待される。また、近年では「遺伝子検査法の導入に

表5 水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法の概要

ステップ	手法
1. 採水	
2. 濃縮	1) セルロースフィルター-アセトン溶解法 2) 親水性PTFEフィルター法 3) ポリカーボネート製メンブレンフィルター法 4) カートリッジフィルター法
3. オーシスト・シストの分離・精製	1) 密度勾配遠沈法(浮遊法) 2) 免疫磁性体粒子法(磁気ビーズ法)
4. 蛍光抗体染色	1) 直接蛍光抗体染色法 (1) メンブレンフィルター法 (2) 試験管内染色法 2) 間接蛍光抗体染色法
5. 顕微鏡観察	1) 蛍光顕微鏡による観察 (1) B励起光 (2) G励起光 (3) UV励起光 2) 微分干渉顕微鏡による観察

「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」より抜粋

向けて」を組み込み、今後導入される遺伝子検査の概要と最新情報が学習できるようにしている。

本研修の実習では、受講者が水試料の濃縮、精製、染色までの一連の操作を確実に習得できるように、実習期間中に3回実施できるようにカリキュラムを組んでいる(表6)。こうした操作法の選択は、試験法の効率的実施、試験法上の問題の抽出と解決、また、同じ操作を繰り返すことでより確実に技術を習得することを目指している。さらに、試験法における各段階では操作法に選択肢があるため、一連の操作を複数回実習する中で受講生が操作法を選択し、異なる方法を実施できるように考慮している。これにより、受講生が自発的に各種操作法を体験できるように促し、各自の職場において採用している操作法が適正であるか否かを確認することも、普段採用していない操作法を実習することができるようにしている。

水試料からのクリプトスポリジウム・ジアルジア試験法では、試料からのオーシストとシストの回収率を向上させ、さらに顕微鏡観察により正しく判別・計数して、汚染状況を可能な限り正確に把握することが重要である。そのためには、各段階における試薬と機器、それらの操作に関する詳細な説明を加え、留意すべきポイントを把握できるようにし、受講生がそれぞれの職場に戻ってから、試験法の対象とする試料水に合わせた試験法を実施できるように実習の内容を配慮している。研修中のデモンストレーションにおいてこうしたポイントを段階ごとに紹介するとともに、受講生が操作の実習中にポイントを確認しながら進められるように、それぞれの段階で説明を加えている(図1)。

実習は受講生を4グループに分けて行っている。カリ

表6 研修の内容

1.	開講式、オリエンテーション
2.	講義
3.	河川水からの検出のデモンストレーションおよび演習
4.	顕微鏡操作法実習
5.	添加回収実験
6.	河川水からの検出
7.	作製標本の評価
8.	遺伝子検査法のデモンストレーションおよび演習

キュラムに従って、与えられた課題に対して各受講生が個々に試験操作を実習することを基本としているが、グループ毎に受講生間で意思疎通を図って調整しながら課題の完遂とそれに伴う各自の責任を認識し、実習結果の情報交換などを行うように配慮している。濃縮法と精製法は複数の操作法が選択できるようにし、受講生個々の自主性が発揮されるようにしている。

研修期間の後半では、この数年にわたり全受講生を対象に口頭試問を試行している。これは受講生の試験法への理解度と技術的到達度を確認することが目的で、随時必要なアドバイスを行っている。

2. 濃縮法

水試料中のオーシスト数あるいはシスト数は非常に少ないため、大量の水試料をフィルターにより濃縮しなければならない。「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」では、採水量を原水では10L、水道水では20Lを標準とするとしている。水試料の濃縮法として、「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」に準じて受講生がアセトン溶解法と親水性PTFEメンブランフィルター法のいずれかを選択して実習できるようにしている。

濃縮の段階ではオーシストやシストが多量の夾雑物と共に存在しており、夾雑物の影響による回収率の低下を防がなければならない[20]。また、遠心による濃縮や洗浄を行うため遠心操作を繰り返すが、遠心操作によるオーシストやシストのロスが生じることが判明している[17]。そこで研修では、夾雑物の扱いや界面活性剤の効果[21]、遠心操作の回数を可能な範囲で減らすこと、遠心機のブレーキのかけ方、上清の除去の仕方、沈渣の処理方法などを説明している。

3. 精製法

「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」では、密度勾配遠沈法(Percol-シヨ糖浮遊法)と免疫磁性体粒子法(免疫磁気ビーズ法)が示されている。試料の性状(濁度、夾雑物の量や質・種類)、技術的要因あるいは経済的理由などにより選定する方法が決まる。表

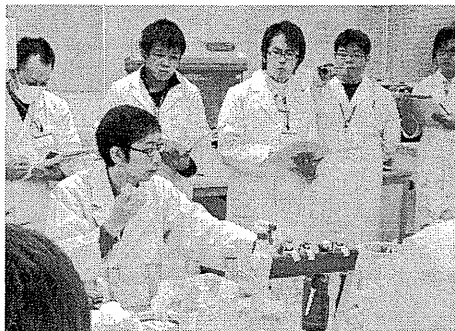


図1 (a) デモンストレーションの様子

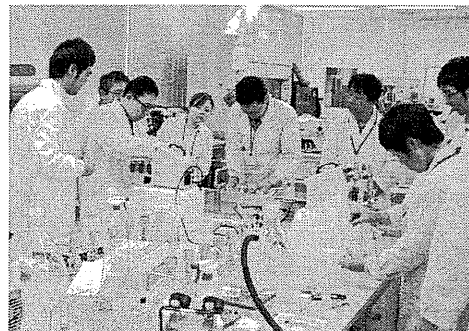


図1 (b) 実習の様子

流水を試料とする場合は夾雑物が多いために、精製が不可欠である。本研修では、Percol-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法をいずれもデモンストレーションで受講生に示している。実際の実習においては、受講生が2法を選択して実施できるようにしている。

免疫磁気ビーズ法は特異性が高く、概して浮遊法よりも回収率が高いとされている [22, 23]。浮遊法に比較して作製した標本中の夾雑物が少なく、観察が容易に行えるという利点もある。また、操作も比較的簡単であるため、検査担当者による実施が容易である。しかし、試料中の夾雑物の量や質・種類、その他の条件によっては抗原抗体反応やビーズ・(オー)シスト複合体の回収を阻害し、特に鉄様微粒子が存在したり、適切なpHから外れたりすると回収率が低下することが報告されている [22, 24, 25]。高濁度の試料では浮遊法の回収率が良いとの報告もある [23, 26]。研修ではこうした事項を含め、免疫磁気ビーズ法とPercol-シヨ糖浮遊法の操作方法および回収率を低下させないためのポイントなどを紹介している。

さらに、夾雑物が非常に多い高濁質試料を想定して、実習ではPercol-シヨ糖浮遊法と免疫磁気ビーズ法を組み合わせた精製法も実施している。この方法は、両法の欠点を補い、利点を補完しており、回収率を向上させることができる [27]。こうした実習を通じて、実際の試験において応用されることが期待される。

4. 染色法

オーシストやシストを特異的に染色するために抗原抗体反応に基づいた染色法（蛍光免疫染色法）が推奨されている。そこで、抗原抗体反応に関する基礎的知識に関する講義を行い、操作法を実習する。オーシストやシストのロスを防ぎ [28]、内部構造の観察を可能にするために、染色はメンブランフィルター上で実施することを推奨しており、フィルターの種類はセルロースアセテートフィルターと親水性PTFEメンブランフィルターを採用している。セルロースアセテートフィルターでは染色後に脱水操作が必要であり、この操作にある程度の訓練を要するとともにやや煩雑であることから、最近では操作が容易なPTFEフィル

ター上で染色を中心とした実習を行っている。

フィルター上で染色を行う場合には、フィルターに試料を載せ過ぎない、乾燥させない、染色液の洗浄を十分に行うなどといった点に留意するように実習する。こうした留意点は顕微鏡観察を確実にし、延いては正しく判定することにつながることから、染色操作上の重要なポイントとなる。

5. 顕微鏡観察法

水試料からのクリプトスポリジウム等試験法は、図2に示すとおり、水試料中のオーシストとシストを顕微鏡による観察に基づいて判別した上で計数するため、顕微鏡観察は最も重要な部分を占めている。このオーシストあるいはシストを正しく判別できるかどうかは検査担当者の能力に依存している [29]。米国の公定法（Method 1622および1623）では、免疫磁気ビーズ法で精製されたオーシストとシストをスライドガラスに乾燥固着させ、特異蛍光抗体とDAPIによる核の染色により確定するとしている。これに対して、日本の試験法では染色をメンブランフィルター上で行い、特異蛍光抗体とDAPIによる染色に加えて微分干渉装置による内部構造の観察により確定することが求められている。そのため、形態観察を確実に行う必要があり、検査担当者の高い能力が要求される。

顕微鏡は微生物の検査や研究を行う施設に設備されている一般的な装置であるが、その操作法を熟知している技術者や研究者は極めて少ないといっても過言ではない。ところが、水試料からのクリプトスポリジウム等試験法に用いる「微分干渉装置付蛍光顕微鏡」は、非常に特殊で操作法を熟知して観察することが求められる。

微分干渉装置は、無染色で細胞などの微細構造を観察するのに適している。しかし、適切な観察像を得るためには光学素子の調整が不可欠であるため、その習得に多くの時間を要し、研修では重点的に実習している。V. 4. で述べたように、染色・観察に用いるPTFEフィルターでは特有の縞模様が観察される。さらに、オーシストやシストがメンブランフィルター上にあるために標本が厚くなり、観察像が悪影響を受けて微分干渉装置付顕微鏡本来の観察像

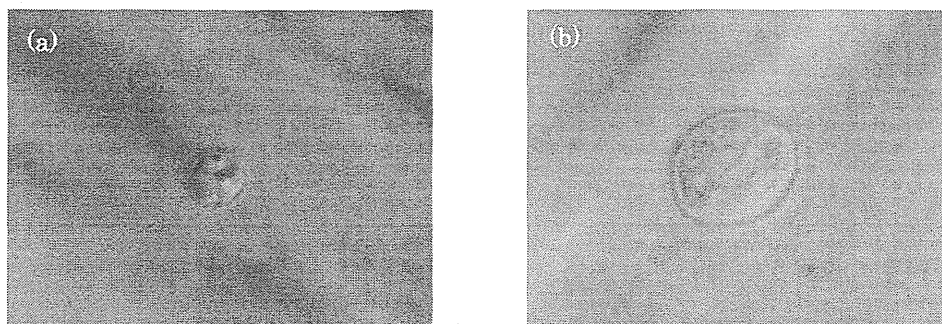


図2 実習において受講生が撮影したオーシストおよびシストの写真の1例。
 (a) 水試料から捕捉されたメンブランフィルター上のクリプトスポリジウムオーシスト（微分干渉像）
 (b) 同ジアリジアシスト

とやや異なるものとなる。そのため、夾雑物やフィルターの妨害を受けてもなお、適切な操作により観察することでオーシストやシストを正しく判別することが求められる。

本研修では、受講生2～3人に1台の顕微鏡を準備し、実習時間内にできる限り長い時間を顕微鏡観察に費やすことができるように努めてきている。顕微鏡の構造から始まり、蛍光顕微鏡の励起光の選択、対物レンズの選択、ケーラー照明法、被写界深度、標本の観察時の視野とステージの移動などを説明する。さらに、受講生の標本の観察実習中には講師がマンツーマンで操作法を説明するとともに、受講生の操作法への理解度を確認する。

平成14年からはデジタルカメラが装備された顕微鏡を使用するようになった。写真撮影が格段に容易になり、写真撮影技術の実習が追加された。受講生には、観察したオーシストとシストを撮影し、写真を提出することを必修の課題としている。実習の最終日には、講師が写真を1枚ずつ講評する。これにより受講生の顕微鏡操作、観察、写真撮影を含む総合的な顕微鏡観察技術の習得達成度の確認が可能となった。すなわち、オーシストやシストの特徴を捉えた写真を撮影するためには、それぞれの特徴を理解するとともに、顕微鏡の操作とデジタルカメラによる撮影技術を習得していなければならない。提出された写真によりそれらを評価することができ、受講生自身も写真の客観的評価により技術の習得度を認識できるようになった。提出された原虫の写真はCDあるいはDVDに記録し、研修最終日に受講生全員に配付している。

写真撮影技術は観察記録を残す上で必須である。水試料

からオーシストあるいはシストを疑う粒子が検出された場合に、専門家に電子メールで写真を送付すれば、意見を迅速に得ることも可能となる。水道水などからクリプトスポリジウム等が検出された場合に、できるだけ短時間に確定して、対応策を講じなければならない。写真による確定判断に際しては、オーシストやシストの特徴が的確に写真に記録されていなければならない。こうした観点からも、写真撮影技術の習得は重要である。

6. 精度管理

水試料からのオーシストとシストの回収率は様々な要因の影響を受ける。回収率の確認作業は、採用している試験法の信頼性を把握するために重要である [16]。さらに、前述したように試験法は実績を重視するため、事前に評価することを条件に、各段階で使用する試薬や器材、操作方法を置き換えることが認められている。「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」には精度管理法として「精度管理のためのオーシスト添加実験」が記載されており、本研修では、実際に添加回収実験を行うことで精度管理に関する手法を身につけるようにしている。

VI. 受講生の技術習得度の評価

水試料からのクリプトスポリジウム等の検出のための試験法を実施するに当たり必要とされる知識及び操作手技を設定し(表7)、研修期間中に各研修受講生に対して口頭試問により習得度の評価を行っている。各項目は4点評価

表7 口頭試問の対象と期待されるレベル

対象項目	期待される主なレベル
プロセス手順の理解	試験法の特徴を述べることができる。
	試験法の手順を述べることができる。
	試験法全般における留意点を述べることができる。
	試験法全般における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
濃縮・精製法の理解	濃縮・精製法の種類と特徴を述べることができる。
	各濃縮・精製法の手順を述べることができる。
	濃縮・精製法の操作上の留意点を述べることができる。
	濃縮・精製法における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
染色技術・標本の作成	染色技術・標本作製法の種類と特徴を述べることができる。
	染色技術・標本作製法の操作上の留意点を述べることができる。
	染色技術・標本作製法における回収率を上げるための留意点を述べることができる。
蛍光・微分干渉像観察のセッティング	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の特徴を述べることができる。
	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の操作上の留意点を述べることができる。
	蛍光顕微鏡・微分干渉装置の応用的操作を述べることができる。
ケーラー照明	ケーラー照明の特徴を述べることができる。
	ケーラー照明の操作上の留意点を述べることができる。
	ケーラー照明の応用的操作を述べることができる。
クリプトスポリジウム・ジアルジアの写真撮影	(オー)シストの形態的特徴を述べることができる。
	(オー)シストの鑑別点を述べることができる。
	(オー)シストの写真撮影上の留意点を述べることができる。