セルロース吸着・凝集法を用いた河川水中 クリプトスポリジウム・オーシストの 濃縮法に関する検討

鈴木 淳・村田以和夫・矢野一好・古畑勝則
諸角 聖

(東京都立衛生研究所)

(受付 平成8年8月1日)

(受理 平成8年9月30日)

A Method for the Concentration of Oocysts of *Cryptosporidium parvum* from River Water Using Cellulose and Organic Coagulant

Jun SUZUKI, Iwao MURATA, Kazuyoshi YANO, Katsunori HURUHATA
and Satoshi MOROZUMI

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3-24-1
Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169)

Cryptosporidiosis is a disease caused by oocysts of *Cryptosporidium parvum*. In June 1996, about 1,000 people in Saitama prefecture, Japan, became ill with a prolonged diarrhea after drinking water contaminated with oocysts of *C. parvum*. Therefore, waterborne cryptosporidiosis is gathering concern in Japan.

The diagnostic methods are acid-fast stain and immunofluorescence of oocysts of *C. parvum* in feces. However, the methods for the concentration and detection of the oocysts in water from private supplies and river water involving many impurities have not been established in Japan.

In this study, using the method for the concentration of viruses from water using cellulose, we examined whether the oocysts in river water can be concentrated with DEAE-cellulose and eluting solution. The most efficient eluting solution was the solution consisting of 1 ml Tween 80 and 10 g NaCl in 1 l pH 9 water.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, Oocyst, Eluting solution, Concentration

緒 言

クリプトスポリジウム症は *Cryptosporidium parvum* のオーシストの感染により、軟便から水様性に至る下痢を起こす感染症である。わが国においては、1993年に神奈川県で、1996年に埼玉県でクリプトスポリジウムのオーシストの水系感染による大規模な集団下痢症が発生している。

現在、クリプトスポリジウム症の診断にあたっては糞

便の直接塗抹による抗酸染色法および蛍光抗体法が行われているが、いずれも高密度にオーシストが存在する便を対象とした方法である。しかし、本症の感染源として重視される飲料水および水道原水からのオーシストの効果的な検査法は確立されていない。特に、水道原水の場合はオーシストの汚染レベルが低く、かつ孔径1~2 μ m程度のメンブランフィルターでのろ過が困難な緑藻類および自由生活原虫等の夾雑物が多いため、本原虫の濃縮は極めて困難である。

今回、水中ウイルスの濃縮法^{3,5)}を応用し、夾雑物の多い水道原水中からのクリプトスポリジウムの濃縮方法を

検討したので報告する。

材料および方法

1. 試料水の調製

河川から採取した濁度：5.0 度，pH: 7.2 の水道原水 1 L に対してクリプトスポリジウムのオーシストの検出された陽性便 2 g を加えた。

2. 試料水中のオーシストの捕捉

試料水中のオーシストの捕捉は，すでに矢野^{3,5)}の開発したウイルスのセルロース吸着・凝集法を用いて以下の手順で行った。

1) **DEAE-セルロースの添加** 吸着剤として繊維性の DEAE-セルロースを使用 (SIGMA D-6418) した。あらかじめ 0.1 N NaCl および 0.1 N HCl で活性化したものを試料水 1 l に対して 250 mg を添加した。

2) **高分子凝集剤による試料中の有機固形物の凝集** 2 mg/l に調製したアニオン系高分子凝集剤 (市川毛織 (株)アイケイフロック T212) をセルロースの添加された試料水 1 l に対して 5 ml の割合で添加・混合し，セルロースと試料水中に混入している有機固形物を凝集させた。

3) **セルロースのろ過による回収** 市販の孔径 20 μ m スイケンバッグTM (ケアメディクス (株)) でセルロースをろ過回収後，このバッグを手袋を装着した手で軽く絞り脱水した。また，セルロースで捕捉できなかったオーシスト数を調べるため，脱水液を 3,000 rpm で 10 分間遠心し，沈渣を検査した。

3. クリプトスポリジウム・オーシストの誘出条件

1) **誘出液** セルロースに捕捉されたクリプトスポリジウム・オーシストの誘出条件の検討にはホウ酸緩衝液 (pH 9)，5% NaCl 水溶液および 4 種の界面活性剤 (Tween 80，塩化ベンザルコニウム，ラウリル硫酸ナトリウムおよびレシチン) にそれぞれ Table 1 に示した各条件で NaCl を添加した後，pH を調製した誘出液を用いた。まず，1% の NaCl を添加，pH 7 および 9 に調製

した 4 種の界面活性剤溶液 (Table 1 の 3~10-1) で誘出後，再度 2% の NaCl 濃度に調製した各誘出液 (3~10-2) でオーシストの回収を試みた。

2) **誘出方法** オーシストの誘出は Table 1 に示した各誘出液を用いて次の 2 種の方法で検討した。

① 各誘出液 50 ml と脱水したスイケンバッグを 200 ml のビーカーに入れ，手で繰り返し軽くもみ洗いし，ろ液にオーシストを誘出させる方法。

② 各誘出液 50 ml と脱水したスイケンバッグをポリ袋に入れ 60 秒および 120 秒間ストマッカーを用いてオーシストを誘出させる方法。

①および②の誘出液を 3,000 rpm で 10 分間遠心し，沈渣を回収してオーシスト数を測定した。

3) **回収率および破損・脱囊率の評価** 各誘出液によるオーシストの回収率は次の方法により比較した。クリプトスポリジウム・オーシスト陽性便を加えた試料水 200 ml を 3,000 rpm で 10 分間遠心，沈渣中の 22 視野あたりの平均オーシスト数を C 値 (対象)，セルロース凝集法により同様に算出した平均オーシスト数を A 値とし，さらにスイケンバッグでろ過したセルロースのろ液を 3,000 rpm，10 分間遠心し，セルロースに捕捉されない沈渣の平均オーシスト数を B 値とし，非捕捉率を B/C 値で示した。各誘出液の回収率は A/C 値により求めそれぞれ評価した。また，各誘出液のオーシストの破損および脱囊に及ぼす影響は，沈渣中の 22 視野あたりの平均破損・脱囊オーシスト数を D 値とし，A/D 値により各誘出液の破損および脱囊率を求め，B/D 値によりセルロースに捕捉されなかったオーシストの破損および脱囊率を求め評価の参考とした。

4. オーシストのスライドグラスへの塗布・固定方法

クリプトスポリジウム・オーシストを誘出後，誘出液の遠心沈渣をスライドグラスに 24×32 mm の範囲内で塗布・固定する条件を次の①~③の方法で検討した。

① 誘出液沈渣に水 50 ml を入れ攪拌後，3,000 rpm，10 分間遠心し沈渣をスライドグラスに塗布し，メタ

Table 1. Kinds of the eluting solution for *Cryptosporidium parvum*

No.	Eluting solution	pH	No.	Eluting solution	pH
1	Borate buffer solution	9	7-1	1 ml Sodium lauryl sulfate +	7
2	5% NaCl aq.	—		10 g NaCl/water 1 l	
3-1	1 ml Tween 80 + 10 g NaCl/water 1 l	7	7-2*	" 20 g "	7
3-2*	" + 20 g "	7	8-1	" 10 g "	9
4-1	" + 10 g "	9	8-2*	" 20 g "	9
4-2*	" + 20 g "	9			
5-1	1 ml Benzalkonium chloride +	7	9-1	1 ml Lecithin + 10 g NaCl/water 1 l	7
	10 g NaCl/water 1 l		9-2*	" + 20 g "	7
5-2*	" 20 g "	7	10-1	" + 10 g "	9
6-1	" 10 g "	9	10-2*	" + 20 g "	9
6-2*	" 20 g "	9			

Note: * After cellulose with *Cryptosporidium* oocysts was eluted with the each surface-active agents and 1% NaCl mixture solutions, 3~10-1, its cellulose was further eluted with 2% NaCl mixture solutions, 3~10-2.

ノールで3分間固定した。

② 誘出液沈渣に水 50 ml を入れ攪拌遠心後、さらにその沈渣をエタノール 50 ml で再浮遊させ 3,000 rpm, 10 分間遠心した沈渣をスライドガラスに塗布し、メタノールで3分間固定した。

③ 誘出液沈渣に水 50 ml を入れ攪拌遠心後、さらにその沈渣をアセトン 50 ml で再浮遊させ 3,000 rpm, 10 分間遠心した沈渣をスライドガラスに塗布し、メタノールで3分間固定した。

①～③それぞれの沈渣をウシ血清アルブミン (BSA) であらかじめコートしたスライドガラスに塗布し、メタノールで3分間固定した。

5. オーシストの形態観察

沈渣を固定したスライドについてそれぞれ井関の変法²⁾による抗酸染色を行った後、鏡検によりオーシストの形態を確認した。抗酸染色は Ziehl の石炭酸フクシン液、5% 硫酸水、2.5% ライトグリーン液を用い染色し、ビオライト (応研商事(株)) を用い封入した。

結果および考察

1. クリプトスポジウム・オーシストのセルロースによる捕捉

水道原水に添加したセルロースにオーシストが捕捉されるか否かを検討した。判定はスイケンバッグでセルロースを回収したろ液中のオーシスト数を測定することにより行った。その結果、水道原水 200 ml 中の平均オーシスト数が 63 個に対して、ろ液の遠心沈渣中の平均オーシスト数が 16 個 (25%) のオーシストが存在した。したがって、セルロースには約 75% が捕捉されたものと推察され、セルロースによる捕捉法がオーシスト

の濃縮に応用可能であると判断した。

2. オーシストの誘出条件

1) オーシストの誘出方法の検討 セルロースに捕捉されたクリプトスポジウム・オーシストを液中に誘出させるために、スイケンバッグを手で繰り返し軽くもみ洗いする方法と、60 秒および 120 秒間ストマッカーで機械的にオーシストを誘出する方法とを比較検討した。その結果、ストマッカーを用いた場合には誘出液にセルロースが多く含まれ、視界を妨げるなど鏡検に悪影響が現れた。また、界面活性剤による気泡が発生し、それにオーシストが捕捉される可能性が示唆されたため、誘出操作には手によるもみ洗いが適していることが明らかとなった。したがって、以下の比較実験は手によるもみ洗いで行った。

2) オーシスト誘出液の比較 誘出操作は手によるもみ洗いが適していることが明らかとなったため、この方法を用いて各種誘出液によりセルロースに捕捉されたオーシストの回収率と破損率を調べ、その結果を Table 2 に示した。

オーシストの回収率と誘出率の pH との関係を見ると、pH 9 のアルカリ条件では pH 7 (中性) に比べ回収率が幾分高いことが認められたが、この手法ではオーシストの抗酸染色での色調が薄く十分に染色されないため鏡検に支障が生じた。そこで回収沈渣を pH 7 リン酸緩衝液 (PBS) 50 ml で再浮遊し 3,000 rpm, 10 分間遠心した沈渣を抗酸染色した結果、染色性が改善された。

誘出液の NaCl 濃度の影響について検討した結果、NaCl 濃度による浸透圧に起因すると思われるオーシストの破損率は 5% NaCl 濃度では 66%, 2% NaCl 濃度では最大 13% を示した。

Table 2. *Cryptosporidium parvum* recovery and excystation rate by kinds of the eluting solution

No.	Recovery rate*	Excystation rate [†]	No.	Recovery rate*	Excystation rate [†]
1	5% (A/C: 3/63)	0%	7-1	29% (A/C: 18/63)	0%
2	24 (" : 14/63)	66	7-2	2 (" : 1/63)	0
3-1	40 (A/C: 25/63)	0	8-1	30 (" : 19/63)	0
3-2	2 (" : 1/63)	10	8-2	5 (" : 3/63)	13
4-1	46 (" : 29/63)	2	9-1	19% (A/C: 12/63)	0
4-2	3 (" : 2/63)	10	9-2	2 (" : 1/63)	0
5-1	13 (A/C: 8/63)	0	10-1	22 (" : 12/63)	10
5-2	2 (" : 1/63)	0	10-2	2 (" : 1/63)	10
6-1	14 (" : 9/63)	8	Filtrate (B)	25 (B/C: 12/63)	0
6-2	3 (" : 2/63)	10	Control (C)	— (—/63)	—

Note: * The ratio of A or B to C (A/C or B/C).

A is the mean number of *Cryptosporidium* oocysts in 200 ml sample water isolated from each eluting solutions (from 1 to 10-2) in observation area, field number F.N. 22.

Filtrate (B) is the mean number of *Cryptosporidium* oocysts not captured DEAE-cellulose.

Control (C) is the mean number of *Cryptosporidium* oocysts involved 200 ml sample water in observation area, field number F.N. 22.

[†] Excystation rate is the ratio of D to A or B (D/A, D/B).

D is the mean number of oocysts, devoid of a wall, as thick-walled oocyst, in 200 ml sample water isolated from each eluting solutions in observation area, field number F.N. 22.

1% の NaCl 濃度で pH 7 に調製した条件での各種界面活性剤濃度におけるオーシスト回収率を比較したところ、Tween 80 溶液では回収率が 40% と最も高く、それ以外は 30% 以下であった。また、pH を 9 に上げた誘出液での回収率も同様に Tween 80 の場合が 46% で、それ以外は 30% 以下を示した。

また、前記の pH 7 および pH 9 の各誘出液により、1 度誘出操作を行ったセルロースから、さらに 2% NaCl 濃度として誘出液で再誘出を試みた。その結果、pH 7 における再誘出ではいずれも約 2%、また pH 9 ではいずれも 5% 以下の回収率であった。

以上の結果から、セルロースに捕捉されたオーシストを誘出する条件として、水 1 L に Tween 80 を 1 ml、NaCl を 10 g 溶解し、pH 9 に調製した誘出液で誘出し、回収沈渣を pH 7 の PBS で洗浄、pH を中性にする方法が最適であることが明らかになった。MUSIAL ら^{1,4)}は水道原水をメンブランフィルターでろ過し、それらを細切する方法によって 9~59% の回収率が得られたと報告している。今回、開発した方法は前述の方法に比べ、操作が簡便で回収率のばらつきも少なく、十分な回収率が得られる方法と考えられた。

3. 二次濃縮法の検討

セルロースからの誘出液中に沈渣が多い場合、スライドガラスへの固定と鏡検に支障が生じた。この問題を解決するために沈渣を比重 1.2 の蔗糖液に重層して 3,000 rpm、10 分間遠心後、液面から 2 cm 程度を駒込ピペットで静かに採取し、水で 10~15 倍に希釈（比重：1.05

以下）し、3,000 rpm、10 分間遠心後、沈渣を回収した結果、沈渣中の夾雑物が減少した。したがって、試料水を最終的に濃縮した際の沈渣が多い場合には比重 1.2 の蔗糖液を用いる二次濃縮法が推奨される。

4. オーシストのスライドガラスへの固定方法の検討

クリプトスポリジウムのオーシストを誘出後、遠心した沈渣をスライドガラスに固定する方法を検討した。その結果、誘出液の遠心沈渣に水 50 ml を加えて攪拌し、再遠心した沈渣とエタノールに浮遊させ遠心した沈渣は、溶媒の揮発性の問題により、ともにスライドガラス上に全量を塗布、固定することができなかった。さらに、この塗抹標本をメタノール固定する際、塗布沈渣の約 3 割が塗布面から脱落する問題が生じ、BSA コートしたスライドガラスを用いた場合でも塗布試料の 1~2 割が脱落した。一方、水 50 ml で 1 回攪拌洗浄後の沈渣をさらにアセトン 50 ml に浮遊させ 3,000 rpm、10 分間遠心した沈渣を、BSA コートしたスライドガラスに塗布、固定する方法では、塗布試料の脱落は認められなかった。したがって、濃縮沈渣をスライドガラスに固定するためにはアセトンで最終的な処理操作を行い、BSA でコートされたスライドガラスに塗布、固定する方法が適当と思われた。

5. 抗酸染色法による検査

スライドガラスに固定した試料を抗酸染色法により染色した場合、クリプトスポリジウムのオーシストは内部のスポロゾイドや残体が Fig. 1 に示したように赤~淡赤色に染色された。オーシストは直径約 5 μ m のほぼ均

Fig. 1. Microscopy of stained oocysts of *Cryptosporidium parvum* in river water with modified acid-fast staining by Iseki

The peripheral region of the oocyst, that is, sporozoites through suture in wall stain from light pink to deep red, whereas the central region of the oocyst stain very light pink.

Note: * Narrow bag made of nylon meshes about 20 μ m.

[†] (1 ml Tween 80 + 10 g NaCl)/water 1 l and pH9.

Fig. 2. Method for concentration of oocysts of *Cryptosporidium parvum* in river water with cellulose-coagulation method

一な大きさの類円形で、内部構造は発育状態によって三日月型、馬蹄形、リング状および半月形など、虫体の発育段階に応じていろいろな形態が観察された。しかし、抗酸染色によるオーシストの検出では水道原水中には大きさや形態が類似した直径約 5 μ m ほどで淡赤紫色～赤紫色に染まる緑藻類や自由生活原虫が混在するため、ハイドロフルオローコンボ (ENSYS INC. 社製) を用いた蛍光抗体法を併用するべきと考察された。

以上の検討により、濁度が高く夾雑物の多い試料水中のクリプトスポリジウム・オーシストの濃縮が可能となった。今後、捕捉率の向上や回収率の向上に向けて詳細な検討を行っていきたい。

6. 濃縮操作手順のまとめ

水道原水である試料水にセルロースを添加しクリプトスポリジウム・オーシストの捕捉を試みたところ、約 75% のオーシストが捕捉された。そこで、このセルロースからオーシストを効率的に回収する条件についてさら

に検討し、簡易な濃縮方法を開発した。その操作手順をフローチャート (Fig. 2) にまとめた。

文 献

- 1) McFeters, G. A.: 飲料水の微生物学, 技報堂出版, p. 291-292, 東京 (1987).
- 2) 井関基弘: 染色法のすべて, MEDICAL TECHNOLOGY, p. 320-321 (1992).
- 3) 厚生省生活衛生局水道環境部監修: 上水試験方法, 日本水道協会, p. 549-551 (1993).
- 4) Musial, C. E., Arrowood, M. J., Sterling, C. R. and Gerba, C. P.: Detection of *Cryptosporidium* in water using polypropylene cartridge filters. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 687-692 (1987).
- 5) Yano, K., Yoshida, Y., Shinkai, T. and Kaneko, M.: A Practical method for the concentration of viruses from water using fibriform cellulose and organic coagulant. Wat. Sci. Tech., **27**(2-3), 295-298 (1993).