

検査センターのお仕事 密着シリーズ⑰ ～クリプトスポリジウム・ジアルジア編～

毎回、当検査センターの業務内容を分かりやすく紹介している「密着シリーズ」。第17回はクリプトスポリジウム・ジアルジアの検査について紹介します。

クリプトスポリジウム及びジアルジアは塩素消毒に抵抗性のある原虫で、ヒトを含む脊椎動物の消化管などに寄生します。環境中ではそれぞれオーシスト、シストという固い殻に覆われて存在しています。クリプトスポリジウムは、人に寄生すると激しい水様性の下痢、嘔吐、吐き気、胃痛などの症状を主とするクリプトスポリジウム症を引き起こし、通常約1週間程度で自然治癒します。幼児や免疫機能が極度に低下している人は、重症化し激しい下痢のため脱水により死亡する例もあります。ジアルジアもクリプトスポリジウムと同様、ヒトに寄生した際、下痢、腹痛などの症状を呈するジアルジア症を引き起こします。約2～4週間と長く症状が続く場合もありますが、致命的な結果になることはありません。

国内では平成8年6月に、初めて水道水に起因するクリプトスポリジウム症が埼玉県越生町で発生しました。このため、同年に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」が策定されました。その後、対策が十分とは言えない状況が続いたため、平成19年3月にクリプトスポリジウム等による汚染リスクの程度に応じ、レベル4からレベル1に分類し、それぞれのレベルで実施すべき予防対策などが規定された「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」が策定され、平成19年4月から適用されています。また、レベル4の施設の予防対策に紫外線処理設備が盛り込まれ、令和元年5月に最新の改定が行われています。

【1】 サンプルング

検体は、ほとんどが原水です。採水場所は、山中の険しいところや河川のほとりなど、足場の悪い場所にあります。採水場所にて10Lの容器2個分に採水し、持ち帰ります。



採水風景



採水地点から車まで運ぶ様子

【2】検査の流れ

濃縮・分離



検水ろ過の様子

持ち帰った検体は冷蔵で保管し、翌日、孔径 $1\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いて10Lを加圧ろ過します。

左の写真のようなろ過装置を用いて実施しますが、検体の汚れがひどい場合はフィルターが目詰まりするため、何枚も取り換えることとなります。ひどいときにはチューブがはじけ飛び、朝から検体を浴びてしまうこともあります。ろ過の終わったフィルターは、アセトンで溶解後、遠心操作を何度か行います。アセトンをPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に置換し、最終的にはオーシスト、シストが含まれる沈渣を回収します。

精製

続いて、前工程で回収した沈渣をPBSに再懸濁させます。懸濁したPBSの下に比重1.10~1.20のショ糖液を入れて遠心を行います。するとオーシスト、シストはPBS層とショ糖層の界面部分(フラッフ層)に集まり、汚れなど大きな粒子は沈殿します。フラッフ層を中心に液層を回収することで、選択的にオーシスト、シストを分離濃縮することが出来ます。

蛍光抗体染色

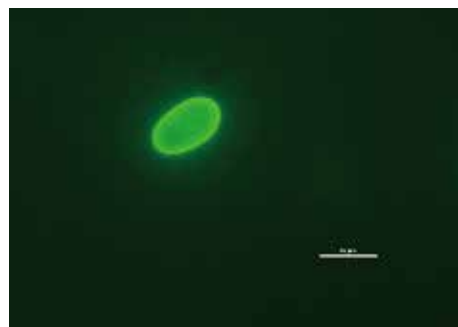


フィルター洗浄の様子(染色前)

分離濃縮された試料を直径25mm、孔径 $1\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過します。ろ過したフィルター上にはオーシスト、シスト以外の粒子が多数混在していることが考えられます。そのままでは夾雑物の影響で顕微鏡観察が難しいため免疫反応を利用してオーシスト、シストを特異的に染色します。当検査センターでは蛍光標識した一次抗体のみで行う直接蛍光抗体染色法を採用しています。また、オーシスト、シストだけでなくDAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)で核の染色も行います。

顕微鏡観察

最後は顕微鏡観察です。まずは低倍率(200倍)で全視野の蛍光観察を行います。直接蛍光抗体染色法で染色したオーシスト、シストはB励起で右の写真のような緑色の特異的な蛍光を示し、DAPIで染色された核は、UV励起で青白い蛍光を示します。低倍率で特異的な蛍光が見られた場合は、高倍率(1000倍)での観察に切り替えます。高倍率での観察は内部構造を立体的に見ることが出来る微分干渉も使用します。そして、全ての特徴が観察された場合にクリプトスポリジウムまたは、ジアルジアと認定します。



シストの蛍光抗体染色画像

クリプトスポリジウムやジアルジアが検出されると、場合によっては貯水池の取水停止など重い判断が下されるため、細心の注意を払って検査を行っています。