

## 梅毒血清反応検査と精度管理の歴史

## 1 はじめに

「第一回保健所試験検査精度管理事業」の報告書の巻頭において、精度管理事業について、精度管理会議議長 井上所長は次のように述べている。

昭和 57 年度から「保健所試験検査精度管理事業」が衛生部環境衛生課で予算化され、その運営要領も定められた。運営要領によると、実施機関は環境衛生課及び衛生研究所で、この事業を円滑に効果的に推進するために、精度管理会議及び部会がおかれ、この 2 つの会の構成員として保健所検査担当職員も参加するようになっている。

試験検査の精度管理と言うのは、検査者自身のみならずから行うのが本来の姿であり、まして、保健所の場合は、細菌であれ、食品であれ、水質であれ、いずれも常に行政措置に深いかかわりを持っていることから、保健所検査関係職員は、すべて、その責任の重要性を認識し、色々工夫をこらして、事にあたってこられたことは申すまでもないことであろう。

しかし、近年の保健所検査の状況をみると、日進月歩の科学の進歩と社会的ニードにより、検査内容、検査方法、検査過程は著しく複雑多岐となり、検査件数も増加の傾向にあると言え得る。

このような状況と、検査成績はたえず客観性を要求されるということを考えあわせると、何等かの精度管理が必要であると言うことは、異議のないところと思われる。

繰り返して言うが、精度管理は検査者自身が行うのが理想であるが、諸般の事情から県衛生部がこのことを企画し、このような形で実施しようとすることも理解できるし、また将来の方向付けを考える意味で有意義であると言え得る。

しかし保健所検査者にとっては、精度管理の趣旨はともあれ、このような形での実施は、いささか重圧を感じざるを得ないと言うのもまた事実であろう。

最も望ましいことは、もはや精度管理など実施しているという意識からはなれて、精度管理が実施できるようになることである。

検査者は一つの検査にあたって、まず第一にその検査に関連のある学問的図書を、繰り返し、繰り返し、更に繰り返し読み、その検査行程のステップ毎の学問的原理を理解し、第二にこの検査に関連する機器、試薬、培地などについて十分勉強し、第三に陽性、陰性のコントロールを用意し、手技の練習を繰り返し、その後実際の材料に当たることである。このようにして研鑽した知識と技術の成果を問うのが、あるいは試すのが今回の精度管理と位置づけてもらえばよいのではなかろうか。

さて、昭和 57 年度に実施した精度管理の結果に関する報告書をみると、今回は事前に研修会を開催したこともあってか、良い成績である。

今回は、第一回のこともあり、相互の理解が足りなかつたり、検体に不備があつたりしたが、検査担当者からいろいろ建設的意見も出されており、今後これらの点を十分検討し、より良きものにしたいものである。

以上が「保健所試験検査精度管理事業」の第一回報告書の巻頭であるが、そこに述べられているような趣旨で昭和 57 年度から始まった保健所試験検査精度管理事業も、今日では初期の目的は達せられたと考えられるので、次の段階へレベルアップすべき時期と考える。すなわち、初期の『教育及びテスト』

の段階ではなく、『改善』の段階へレベルアップすべき時期と考える。最近の保健所試験検査技術者の発言、発表、及び当所の外部精度管理を引き受けている GLP に関連した財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所の精度管理の姿勢にも、精度管理事業を単なるテストではなく『改善』の方向へ向けようとしているように感ぜられる。

## 2 臨床検査の精度管理

狭義の意味の精度管理は、検査法の管理が主体であり、検査誤差の精度（精密さ：ばらつきの小さい程度）と正確度（正確さ：かたよりの小さい程度）の程度やその変化を、統計的に管理することが中心となる。しかし、検査データが有用であるためには、検査の前後過程をふくめた検査の依頼、検体採取の段階から、結果報告や解釈に至るまでの、すべての過程にかかわる基本的構成要素を管理する必要がある。なかでも材料管理（検体試料、コントロール血清）、試薬管理、機器管理、技術管理は検査データ

の信頼性に直接影響を与える。

（日本臨床衛生検査技師会編集、臨床検査精度管理教本、近代出版、1998）

## 3 梅毒血清反応検査法の進歩

第 2 次世界大戦後の我が国における梅毒血清反応検査についての検査マニュアル、すなわち昭和 24 年頃より厚生省編纂による「細菌・ウイルスおよび血清反応に関する衛生検査指針」、「梅毒血清反応検査指針」、「微生物検査必携」、及び「国立感染症研究所の病原体検出マニュアル」（以下、梅毒血清反応検査指針等と略す）に記載されている梅毒血清反応検査法を表 1 に記しておく。

## 4 愛知県の保健所試験検査において採用された梅毒血清反応検査法の歴史

戦後の愛知県の保健所試験検査において採用された梅毒血清反応検査法の歴史を表 2 に示した。梅毒血清反応検査法が変更されたのは、昭和 29 年以降

表 1. 梅毒血清反応検査法の進歩

時 期	マニュアル等	検 査 方 法					
昭和 24 年～ (1949)	I	梅毒凝集法	ガラス板法	緒方法	北研法	カーン法	村田法
昭和 41 年～ (1966)	II	梅毒凝集法	ガラス板法	カーン法	緒方法	微研法	
昭和 44 年～ (1969)	III	ガラス板法	梅毒凝集法	緒方法	FTA - ABS 法	TPHA 法 (マクロ法)	※ 1 : その他 ①
昭和 53 年～ (1978)	IV	ガラス板法 RPR カードテスト	梅毒凝集法	緒方法	TPHA 法 (マクロ法、マイクロ法)	FTA - ABS 法	
昭和 62 年～ (1987)	V	ガラス板法	RPR カードテスト	梅毒凝集法	緒方法	TPHA 法 (マクロ法、マイクロ法)	FTA - ABS 法
平成 15 年～ (2003)	VI	ガラス板法	RPR カードテスト	梅毒凝集法	※ 3 : TPHA 法 (マクロ法) TPPA 法 (マイクロ法)	FTA - ABS 法	※ 2 : その他 ②

※ 1 : その他① : TPIA テスト、TPI テスト、

※ 2 : その他② : 酵素免疫測定法 (ELISA 法、FEIA 法、CLEIA 法など)  
イムノクロマト法 (ICA 法)、ラテックス比濁法 (TPLA 法など)

※ 3 : TPHA 法 : *Treponema pallidum* haemagglutination test  
固定したヒツジ赤血球に *Treponema pallidum* (Nichols 株) の菌体成分を吸着させたもの。  
この感作血球が *Treponema pallidum* 抗体によって血球凝集反応を起こすことを応用した検査法。  
TPPA 法 : *Treponema pallidum* particle agglutination test TPHA 法の固定したヒツジ赤血球を、ゼラチンを粒型化した人工担体に変えた検査法。

I : 厚生省編纂、細菌・ウイルスおよび血清反応に関する衛生検査指針、昭和 24 年～、衛生検査指針審議会

II : 厚生省監修、微生物検査必携 (第 1 版)、昭和 41 年、財団法人 日本公衆衛生協会

III : 厚生省監修、梅毒血清反応検査指針、昭和 44 年、財団法人 日本公衆衛生協会

IV : 厚生省監修、微生物検査必携、第 2 版、免疫血清反応検査、昭和 53 年、財団法人 日本公衆衛生協会

V : 厚生省監修、微生物検査必携、第 3 版、細菌・真菌検査、昭和 62 年、財団法人 日本公衆衛生協会

VI : 国立感染症研究所、病原体検出マニュアル、平成 15 年

※ 4 : I ~ VI は、公定書ではない。

3回である。第1回目は昭和29年で、厚生省の優劣比較試験の結果をうけて、従来のカルジオライピンの粗抗原を用いた検査法（北研法及び村田氏法）から、カルジオライピンの精製抗原を用いた検査法（梅毒凝集法、ガラス板法、及び緒方法）に変更された。

第2回目は昭和47年4月12日厚生省公衆衛生局長からの「梅毒血清反応検査について」（衛発第207号）において、従来の検査方法（ガラス板法、梅毒凝集法、及び緒方法等）のほか必要に応じて、梅毒TP感作血球凝集反応検査（以下、TPHA法（マクロ法））、及び蛍光抗体法による梅毒血清学的検査（以下、FTA-ABS法）を行なうこととする旨通知を受けた。そこで、愛知県の保健所における梅毒血清反応検査法の組み合わせが新しい方式に変更された。すなわち、ガラス板法及び梅毒凝集法と梅毒病原体抗原の検査法（TPHA法及びFTA-ABS法）を組み合わせた方法に変更された（緒方法は廃止された）。

第3回目は平成11年で、性病予防法が廃止され、梅毒が新たな感染症に取り込まれたことを受け、梅毒凝集法及びTPHA法（マクロ法）をやめて、カルジオライピンの精製抗原を用いた検査法がガラス板

法及びRPR(Rapid Plasma Reagin)カードテストに、梅毒病原体抗原を用いた検査法がTPPA法及びFTA-ABS法に変更された。

## 5 我が国における戦後の梅毒血清反応検査の精度管理の歴史

昭和22年から昭和28年の間に、厚生省薬事審議会生物学的製剤等小審議会性病専門部会、厚生省衛生検査指針審議会、及び梅毒血清反応検査指針専門部会の協力の下で、日本で行なわれていた梅毒血清検査法の優劣比較試験が8回実施された。その結果、梅毒血清反応検査法として、緒方法、梅毒凝集法、及びガラス板法等が選定された。

松橋直先生が、『緒方富雄監修、カルジオライピン抗原による梅毒の血清学的検査法—その発足から今日まで—（第4版）、1995、住友製薬』において以下のように述べている。

『優秀な方法が選定されても、その術式が正しく、各施設で行われなければならない。そのためには、広報活動がなされなければならない。その点大きな役割を果たしたのが、緒方富雄著「梅毒の新しい血清学的検査法（緒方法と梅毒凝集法とガラス板法）

表2. 愛知県の保健所試験検査において採用された梅毒血清反応検査法の歴史

時 期	マニュアル等	検 査 方 法			
昭和29年以前		北研法	村田氏法		
昭和29年～ (1954)		梅毒凝集法	ガラス板法	緒方法	
昭和44年～ (1969)	※1	梅毒凝集法	ガラス板法	緒方法	
昭和47年～ (1972)	※2 ※3	ガラス板法	梅毒凝集法	TPHA法 (マクロ法)	FTA-ABS法
昭和61年～ (1986)	※4	ガラス板法	梅毒凝集法	TPHA法 (マクロ法)	FTA-ABS法
平成11年～ (1999)	※5	ガラス板法	RPRカードテスト	TPPA法	FTA-ABS法

※1：昭和44年：厚生省監修、梅毒血清反応検査指針、財団法人 日本公衆衛生協会

※2：昭和47年4月12日衛発第207号厚生省公衆衛生局長通知「梅毒血清反応検査について」

※3：昭和47年：梅毒血清診断法の解説、愛知県衛生部

※4：昭和61年：保健所試験検査技術者用手引書「感染症関係の検査法」第4版、愛知県衛生部

※5：平成11年：保健所試験検査技術者用手引書「感染症関係の検査法」第5版改定版(2)、愛知県衛生部

改訂第2版、南山堂、1954」という本である。血清学的検査法にかぎらず、臨床検査法は、その試薬の品質管理と検査術式の統一化が、その検査成績を、何処でも、また誰でもが、同一レベルで論ずることができるという意味で最も大切なものである』

現在、非常に多くの梅毒血清反応検査法の試薬が市販されている。国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに掲載されている検査法（表1）については、どの方法を採用すべきか悩むほどである。厚生省は昭和22年から昭和28年の間に梅毒血清反応検査法の優劣比較試験を実施して最良の方法を選定した。今、厚生労働省等の国が主体となった梅毒血清反応検査法の優劣比較試験の実施が望まれる。

## 6 愛知県の保健所試験検査における梅毒血清反応検査の精度管理の歴史

前項で述べたように昭和28年に梅毒血清反応検査として緒方法、梅毒凝集法、ガラス板法が選定さ

れた。優秀な検査法が示されたので、昭和29年以降の愛知県の保健所試験検査における梅毒血清反応検査の精度管理の変遷を表3に示した。

以下、愛知県の保健所試験検査における梅毒血清反応検査の精度管理の状況とその結果について、その要点を説明する。

昭和44年～47年、年1回、保健所及び性病代用病院検査技術者に対して、梅毒血清反応検査の実技研修を、衛生部環境衛生課が主催して当所で実施した。緒方法の成績のバラツキの要因を探る目的で、同一条件での検査を実施するため当所に各検査室の技術者を集めて、使用する機器及び試薬を統一して緒方法の実技研修が実施された。研修会での検討の結果、緒方法の成績のバラツキの原因の一つが、ヒツジ赤血球の遠沈の条件（遠心機の回転数と時間、メーカー及び機種）であり、当時の各施設の設備では統一は困難であるとの結論になった。

昭和47年には当時の厚生省公衆衛生局長通知を

表3 愛知県の保健所試験検査における梅毒血清反応検査の精度管理の変遷

年 度	梅毒血清反応検査の精度管理	問題点等
昭和29年度	愛知県の保健所試験検査における梅毒血清反応検査法として緒方法、梅毒凝集法、ガラス板法が採用された。	緒方法の検査結果にバラツキが認められた。
昭和44年度	緒方法の成績のバラツキ対策として、保健所及び性病代用病院検査技術者の研修が、当所で実施された（本庁・環境衛生課主催）。	
昭和47年度	梅毒血清反応検査法として梅毒凝集法、ガラス板法、梅毒病原体抗原の検査法（TPHA法及びFTA-ABS法）を組み合わせた方法が採用された。パンフレット『梅毒血清診断法の解説』（愛知県衛生部）を作成し、県内の全保健所等への配布が開始された。	緒方法が廃止された。
昭和51～59年度	当所におけるプール血清から梅毒コントロール血清を作成し、希望する保健所へ分与した。	
昭和59・60年度	梅毒検査を対象に保健所試験検査精度管理事業が実施された。（全保健所を対象に、5検体につきガラス板法及び梅毒凝集法を実施。昭和60年度には中心保健所で、TPHA法を追加実施。）	梅毒凝集法の検査結果にバラツキが認められた。
昭和60年度	当所で梅毒陽性管理血清（ガラス板法及び梅毒凝集法用、家兔免疫血清）を作成し、県内全保健所への配布を開始した。	
昭和61年度	本県における保健所試験検査技術者用手引書「感染症関係の検査法、第4版」に梅毒血清反応検査法が初めあて掲載された。	
平成元・2年度	梅毒検査を対象に保健所試験検査精度管理事業が実施された。（全保健所を対象に（5検体）ガラス板法及び梅毒凝集法、中心保健所ではTPHA法を追加）	
平成8年度	梅毒検査を対象に保健所試験検査精度管理事業が実施された。（全保健所を対象に（2検体）ガラス板法及び梅毒凝集法、中心保健所ではTPHA法を追加）	梅毒凝集法の検査結果にバラツキが認められた。
平成11年度	保健所試験検査技術者用手引書「感染症関係の検査法、第5版（改訂2版）」で、梅毒血清反応検査法がガラス板法及びRPRカードテストと梅毒病原体抗原の検査法（TPPA法及びFTA-ABS法）とされた。梅毒陽性管理血清（ガラス板法用）を作成し県内の保健所へ配布した。保健所試験検査精度管理事業が実施された。（全保健所を対象に（3検体）ガラス板法及び梅毒凝集法、中心保健所ではTPHA法を追加）	梅毒凝集法及びTPHA法（マクロ法）が廃止された。

受け、愛知県の保健所における梅毒血清反応検査方法の組み合わせをガラス板法、梅毒凝集法、TPHA法、及びFTA-ABS法の新しい方式に変更し、緒方法は削除された。昭和47年9月から、全保健所でガラス板法及び梅毒凝集法、中心保健所（豊橋保健所、岡崎保健所、一宮保健所、及び半田保健所）でガラス板法、梅毒凝集法及びTPHA法（マクロ法）、衛生研究所でガラス板法、梅毒凝集法、TPHA法、及びFTA-ABS法を実施することとした。また、同年8月中心保健所の試験検査技術者を対象に、TPHA法（マクロ法）の実技研修を衛生部環境衛生課が主催して当所で実施した。

さらに、パンフレット『梅毒血清診断法の解説』（愛知県衛生部）が作成され、県内の全保健所及び各関係者（開業医等）へ配布された。『梅毒血清診断法の解説』では各梅毒血清反応検査法の特徴と意義を解説し、さらに、産婦人科医院等の依頼者が保健所へ検査を依頼する様式（検査法の組み合わせ様式）を簡単に選べるように表示された。

昭和51年～59年については、当所におけるプール血清からコントロール血清を作成し、希望する保健所へ分与した。コントロール血清は次のようにして作成した。当所における梅毒検査が終了した後、陽性血清と陰性血清を別々にフリーザーに保存し、陽性血清を陰性血清で希釈して弱陽性血清としたものをコントロール血清として分与した。

昭和59年度、保健所試験検査精度管理事業が初めて梅毒検査を対象に実施された。全保健所を対象にガラス板法及び梅毒凝集法の定性法が実施された。ガラス板法は全保健所の検査結果が正しく一致したが、梅毒凝集法では一部検体の検査結果にバラツキがみられ、中には生理食塩水を陽性と報告した保健所があった。

梅毒凝集法の検査結果にバラツキが認められたことから、梅毒凝集法の誤判定要因の解析を行なった。梅毒凝集法を構成している検体、試薬、機械、方法、判定、人的要因がどのように誤判定に関与しているかを示す誤判定の特性要因図を作成し、各要因について検討を加えた。その結果、保健所によって要因が異なることも考えられ、確定的な要因を挙げるまでには至らなかったが、検査方法、判定方法、検査者の要因が大きく関与しているものと判断された。

そこで、梅毒凝集法の手技の改善をした。すなわ

ち、①培地等の不純物の混入を防ぐため、反応管は細菌検査と長さの異なるものに統一し、反応管に注意を払わなくても良いようにした。②洗剤で偽陽性が生じることがあるので、水洗を完全に実施するように改善した。

以上のごとく、①検査結果での異常値を発見し、②異常値の原因を究明し、③原因を排除し、④改善し、その後、⑤検査結果を確認する。この過程を絶え間なく繰り返して、信頼性のある検査結果を出す必要がある。

昭和59年度の県衛生部・環境衛生課の保健所試験検査精度管理会議において、同一の梅毒陽性管理血清を県内の全保健所に検査の対照血清として置くことの必要性が指摘された。しかし、梅毒患者の減少に伴い力価の強い陽性のプール血清の入手が困難になったことから、昭和60年度以降、当所で梅毒陽性管理血清を作成し、保健所に配布することにした。以下の方法で陽性血清を作成した。ガラス板法等で用いられるカルジオライピン抗原を家兎に接種して、梅毒に対する家兎の免疫血清を作成し、その血清を陽性血清とした。それを陰性血清（正常家兎血清）で希釈して弱陽性血清を作成し、これを梅毒陽性管理血清とし情報（梅毒陽性管理血清の陽性の程度、使用法等の情報）を添付して保健所に配布してきた。昭和60年度～平成10年度は、梅毒陽性管理血清（ガラス板法及び梅毒凝集法検査用）を配布し、平成11年度以降は、表4に示した希釈法で作成した梅毒陽性管理血清（ガラス板法検査用）を配布してきた。

昭和61年に、保健所試験検査者用手引書「感染症関係の検査法」第4版に免疫血清反応検査（梅毒血清反応検査）が加えられた。その結果、精度管理を実施する上で必要な全保健所に同一のマニュアルと対照血清が確保された。

平成8年度保健所試験検査精度管理事業においては、梅毒凝集法の判定に、陽性か陰性かに悩むヒト血清が検体とされた。ガラス板法では、全保健所で陽性と正しく報告された。これに対して梅毒凝集法の成績は保健所によって成績が分かれたが、梅毒凝集法は感作時間の長さ等が判定に微妙な影響を及ぼすことから、問題のある試験法であると考えられた。梅毒凝集法は、このことも理由の一つとなり、平成11年度以降は梅毒血清反応検査法から省かれた。

表 4. コントロール血清の希釈法と判定結果の例（平成 11 年以降）

試験管番号	陽性血清 (ml)	陰性血清 (ml)	RPR カードテスト	ガラス板法
1	1. 0	1. 0	R	R
2	0. 5	1. 5	R	R
3	0. 25	1. 75	R	R
4	0. 20	1. 80	R	R
5	0. 15	1. 85	R	Rm
6	0. 12	1. 88	R	W
7	0. 09	1. 91	Rm	Wm
8	0. 06	1. 94	N	N
9	0. 03	1. 97	N	N
10	0. 00	2. 00	N	N

注) R = 強陽性、Rm = 陽性、W = 弱陽性、W m = 最弱陽性、N = 陰性

表 4 に示された結果に基づき、次のような血清希釈の選択が適切である。

コントロール No. 1 試験管番号 4( 強陽性 )

コントロール No. 2 試験管番号 6( ガラス板法の弱陽性 )

コントロール No. 3 試験管番号 7( RPR の弱陽性とガラス板法用最弱陽性 )

コントロール No. 4 試験管番号 8 ~ 10( 陰性 )

( 菅原孝雄、山屋駿一、笠松重雄：検査と技術、梅毒の血清学的診断法Ⅱ、脂質抗原試験（その 1）、vol.7、no.4、1979.)

※菅原孝雄、山屋駿一、笠松重雄：国立予防衛生研究所 細菌 2 部

## 7 おわりに

保健所試験検査精度管理事業の報告書で見ると、問題点の指摘は回数を重ねるほど少なくなり、『全ての保健所の成績が一致した。』『正しく報告された。』という結論が多くなっている。たとえば、複雑な術式の検査法、誤判定が多い検査法などは担当者の指摘等に注目し、それらの指摘事項や問題点を解決して、その成果を保健所試験検査精度管理事業で確認するような、すなわち問題点を探して解決する努力を続ける必要がある。

精度管理を徹底する努力をしてもなお、異なった成績を出す保健所がなくなるといったような検査方法（緒方法及び梅毒凝集法）に関しては、本県では保健所検査者の意見等を収集し、現在までに、より良い検査方法に切り替えてきている。これは、精度管理事業の成果であり、検査者の意見に注目し実現したものである。異なった成績を検査者の技術不足によるものだけとは考えないで、どうしたら施設内及び施設間で異なった成績が出ることをなくすようにできるかを検討して、検査方法を改善又は変更することは重要である。

『梅毒血清反応検査指針等』は、表 1 に示したように何種類もの検査方法を掲載している。どの検査方法を採用するかは、各自治体及び病院等が自分で検討して決定されている。愛知県の保健所が昭和 47 年に中止した緒方法は、平成 15 年の国立感染症研究所の『病原体検出マニュアル』からは削除されている。愛知県の保健所が平成 11 年に中止した梅毒凝集法及び TPHA 法（マクロ法）は、現在も同上に掲載されている。保健所検査者自身の意見を収集し検討して、より早く、より簡便に、より正確な結果を出せる検査方法を検討する努力は、今後も求められる。

( 文責 微生物部 松井 博範 )

## 水道水及び原水からのクリプトスポリジウム検出方法

### 1 はじめに

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*; 以下、Cr と略す) は動物の消化管内で増殖し、ヒトに重篤な下痢を起こす腸管寄生性原虫である。この原虫のオーシストは水道法で定められた残留塩素濃度では死滅しないことから、感染者に免疫機能不全者などが存在すると日和見感染により重症になる場合がある。

近年、イギリス・アメリカなどでCrが水系の集団感染症発生の病原体として問題になり、日本でもその対策に着手していた折、1994年に神奈川県平塚市(配管の腐食により汚水が浄水に混入した事例)、1996年には埼玉県越生町で水道水を汚染したCrが原因と思われる集団下痢症が発生した。1996年、当時の厚生省は緊急に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」を策定し、その中で「水道水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」が示された。その後、この暫定的な試験方法について検討が加えられたが、現在も1996年の暫定試験方法は変更されていない。

今回はCrの水道水及び原水からの検出方法について、その暫定試験方法と日本水道協会が推奨する試験方法を解説する。

なお、Crの生物学的な概要と糞便からの検出については愛知衛研技術情報VOL. 20, NO. 4, 1-3, 1996を、水道水におけるCrの暫定指針の再改正に伴い導入されたCr汚染のおそれを判断するための指標菌の検査方法については愛知衛研技術情報VOL. 26, NO. 2, 4-7, 2002を参照してほしい。

### 2 暫定試験方法 (以下、暫定法と略す)

Crの試験は浄水20Lもしくは原水10Lを用いて、A: 試料水からの捕捉・濃縮、B: 濃縮した試料からの分離・精製、C: 精製した試料の蛍光抗体染色の3段階からなる操作を経て、作製したプレパラートを落射型蛍光顕微鏡で観察する方法である。

暫定法では、濃縮の段階(A)にメンブランフィルター-アセトン溶解法、精製の段階(B)に(浄水で沈渣が少ない場合省略可能) ショ糖による密度勾配遠心法(ショ糖浮遊法)を用いることとしている。

写真1に①採水容器からの捕捉・濃縮の段階(A)を示した。②は加圧ポンプであるが、吸引ポンプを用いても良い。③のディスクフィルターホルダーには、直径142mm, 孔径 $1\mu\text{m}$ の混合セルロースアセテート膜を用いる。これらを使用して、試料の濃縮を行なう。



写真1 濃縮装置

- ①: 採水容器      ②: 加圧ポンプ  
③: ディスクフィルターホルダー

濃縮した試料を膜とともに注意深く50mL用遠心管に移し、アセトン10mLを加えて試験管ミキサーで攪拌しながら膜を溶解させたあと、さらにアセトンを加えて全量約50mLとし、さらに攪拌して完全に溶解させる。遠心(約 $1,000 \times g$ , 10分間: 以下の遠心は同条件)後、沈渣を巻き上げないように上層のアセトンをアスピレーターで吸引除去する。2~3mLのリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)を加えても白濁しないようになるまで、アセトンへの溶出操作を2~3回繰り返して行ない、膜を溶かし込んだアセトンを完全に除去する。エタノール5mLを入れて沈渣を馴染ませて試験管ミキサーで攪拌した後、PBS約5mLを入れて同様に攪拌する。さらに全量約50mLとなるようにPBSを加えた後、再び遠心する。上清をアスピレーターで吸引除去後、PBS約5mLを入れ、沈渣を試験管ミキサーで攪拌する。15mL用遠心管に移し替え、沈渣を残さないようにPBSを使用して2~3回すすぎ洗いし、全量を約15mLとして再び遠心した後、上清をアスピレーターで吸引除去し、PBS約2mLを加えて沈渣とともに試験管ミキサーで攪拌しておく。

次に精製の段階 (B) について説明する。さきの沈渣を含む PBS の入った 15mL 用遠心管の内側の底部から重層するように、パストゥールピペットを使用してシヨ糖液 (比重 1.20) 約 2mL を入れ、遠心する。底部から沈渣・シヨ糖液層・PBS 層の 3 層構造となるので、最初にシヨ糖液層と PBS 層との境界付近を回収用の 15ml 用遠心管にパストゥールピペットを用いて回収し、次に PBS 層全量、最後にシヨ糖液層上部 1/4 ~ 1/2 程度を回収する。残った沈渣及びシヨ糖液にその 4 倍量の PBS を加え、試験管ミキサーでよく攪拌した後、再び同様に遠心管の底部から重層するようにシヨ糖液約 2mL を入れた後、遠心し、同様にさきの回収用遠心管に回収する。

次に蛍光抗体染色の段階 (C) について述べる。間接蛍光抗体染色法と直接蛍光抗体染色法の 2 法があるが、当所ではこのうち工程の少ない直接蛍光抗体染色法を実施している。セルロースアセテート膜 (直径 25mm, 孔径  $0.8 \mu\text{m}$ ) の中央に撥水ペンで直径約 15mm の円を描き、PBS に浮かべるように浸す。膜を吸引装置 (金属製のマニホールド) にセットされた染色用フィルターホルダーベース上に載せ、弱く吸引しながら約 1mL の PBS で洗浄する。ブロッキング試薬 (1% ウシ血清加 PBS 及び 10% ヤギ血清加 PBS) を 1 ~ 2mL 添加し、室温で 5 分間反応させる。ブロッキング試薬を弱く吸引ろ過して除去した後、さきに精製した試料を、膜に描いた円内全面に行き渡るようにマイクロピペットを用いて滴下しながら、必要に応じて弱く吸引ろ過する。約 1mL の PBS で洗浄ろ過後、再度ブロッキング試薬を 1 ~ 2mL 添加し、室温で 5 分間反応させる。ブロッキング試薬を弱く吸引ろ過して除去した後、ピンセットで膜をスライドガラス上へ移す。蛍光抗体染色液 (FITC [フルオレスセイン-イソチオシアネイト] 標識抗 Cr オーシストマウス単クローン抗体試薬) を 1mL 添加し、これを  $37^{\circ}\text{C}$  にて約 30 分間遮光可能な密閉した湿潤箱 (乾燥を防ぐために精製水で湿らせた紙などを敷いた、平らな蓋付きの菓子缶など) 内で静置する。

再び膜をホルダー上に載せ、弱く吸引ろ過後、元のスライドガラス上へ移して、DAPI 染色液 (DAPI 保存液 [0.2% 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール加メタノール溶液]  $10 \mu\text{L}$  を PBS 約 50mL に加えた溶液) を 1 ~ 2mL 添加し、室温にて 10 分間

同様の湿潤箱内で蓋をして静置する。再び膜をホルダー上に載せ、弱く吸引ろ過した後、洗浄のため PBS 約 1mL を添加し、再度弱く吸引ろ過する。この PBS による洗浄操作を 5 回繰り返した後、10%、30%、70%、90% のグリセリン加エタノール溶液を順次約 1mL ずつ添加して脱水し、その都度弱く吸引ろ過する。封入用の清潔なスライドガラスに、封入用試薬 (DABCO 加グリセリン: 1, 4-ジアザビスクロ [2, 2, 2] オクタン 0.2g にグリセリン 12.6g を加温・溶解したもの)  $75 \mu\text{L}$  をあらかじめ載せて、 $37^{\circ}\text{C}$  の恒温器で温めておく。膜をスライドガラス上へ移して、封入用試薬約  $25 \mu\text{L}$  を載せ、気泡が入らないようにカバーガラスで封入する。カバーガラスの周囲をネイルエナメルなどで封じた後、ただちに顕微鏡での観察を行なう。

作製されたスライドガラスを落射型蛍光顕微鏡にて Blue 励起、UV 励起、Green 励起で観察したのち、微分干渉像で縫合線や内部構造の有無も観察する。写真 2 に Blue 励起で観察した時に見られる特徴的な緑色の蛍光色を示す。

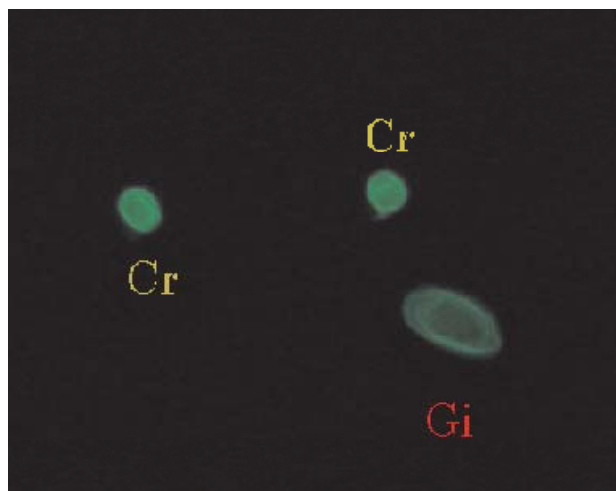


写真 2 蛍光抗体染色像 (Cr 及び Gi : ジアルジア)

### 3 水道協会が推奨している方法 (以下、推奨法と略す)

1993 年のアメリカのミルウォーキー事件以降、日本水道協会は「水道の原虫対策に関する研究会 (研究会)」を組織し、Cr の検査方法について常に検討・研究を重ねている。厚生省の暫定法 (1996 年 10 月) に先駆けて、研究会はアメリカ環境保護庁 (USEPA) が Cr に関して示した最初の試験方法 (ICR [Information Collection Rule] 法, 1995 年 6 月) を検討しており、USEPA から後に示された ICR 法の改良方法である 1622 法 (1997, 1998, 1999 年) やイ



ギリスの SI No. 1524 法 (1999 年 6 月) をも追試した結果、2003 年においては推奨法が最良の方法と考えたようである。

推奨法でも濃縮の段階 (A) では写真 1 に示した暫定法と同様なる過装置を用いるが、膜には暫定法の混合セルロースアセテート膜ではなく、PTFE (ポリテトラフルオロエチレン; いわゆるテフロン) 膜を用いている。写真 3 はろ過濃縮後フィルターホルダーを開き、ホルダー上の膜を遠心管に入れるために半分に折り曲げたところを示す。これに 15mL の Cr 誘出液 (1% PET 溶液; PET 原液 [ピロリン酸ナトリウム・10 水塩  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  20g, エチレンジアミン四酢酸 3 ナトリウム  $\text{EDTA}3\text{Na}$  30g, 及び Tween80 10g を精製水に溶解し全量を 1L としたもの] を 100 倍希釈) とフットボール型攪拌子 (長さ 35mm, 幅 16mm) を入れ、試験管ミキサーで約 2 分間激しく攪拌したのち、ピンセットを使用して遠心管壁で膜の液を搾り取るようにして沈渣を洗い出し、その液を別の 50mL 用遠心管に回収する。この誘出液を入れて搾り出す操作をあと 2 回繰り返し、最後に誘出液 5mL で元の遠心管をすすぎ、全量を約 50mL とした後、遠心する。上清をアスピレーターで吸引除去後、Cr 誘出液約 2mL を入れ、沈渣を試験管ミキサーで攪拌した後、別の 15mL 用遠心管に移す。沈渣を残さないように Cr 誘出液を使用して 2~3 回すすぎ洗いし、全量を約 15mL として回収する。

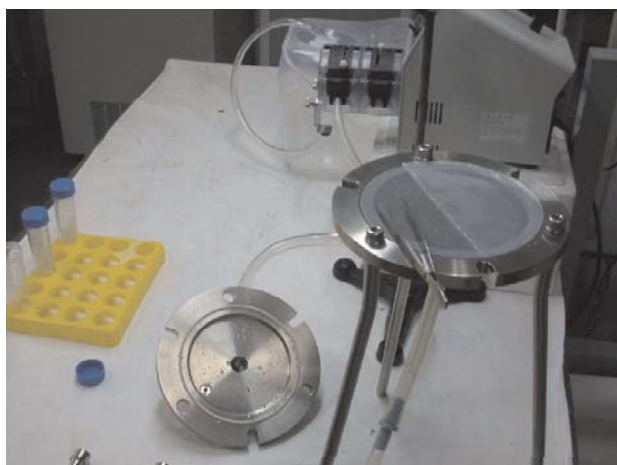


写真 3 ディスクフィルターホルダーからの膜の取り出し (ホルダー上の膜を遠心管に入れるために折り曲げたところ)

推奨法では、精製の段階 (B) で免疫磁性体分離 (磁気ビーズ) 法を用いる。写真 4 に試薬と器具一式を示す。①は DYNAL 社製の免疫磁気ビーズキット

(Dynabeads anti-Cyptosporidium kit)、②はガラス製のレイトンチューブ (DYNAL の L10 チューブ; 一側面が平坦になっている)、③は②のチューブ専用の DYNAL の回転ミキサー、④は②のチューブ専用の磁気ビーズ用磁石 (DYNAL の MPC-1)、⑤は磁気ビーズ用マイクロチューブ立て (DYNAL の MPC-M) と専用磁石である。

さきに回収した沈渣の懸濁液を再び遠心し、上清をアスピレーターで除去後、蒸留水約 5mL にて懸濁しておく。これを②のチューブに移して、蒸留水で全量を約 10mL とした後、Cr 免疫磁気ビーズ 100mL とキットに付属の緩衝液 (SL-バッファー A, SL-バッファー B) 各 1mL を加えた後、③の回転ミキサーで 15~20rpm の非常にゆっくりとした回転速度で 1 時間回転攪拌する。その後④の磁石に②のチューブをセットし、上下転倒を 120 回 (約 2 分間) 繰り返したあと、②のチューブを磁石にセットしたまま蓋を開けて上澄み液をパスツールピペットでビーズに触れないように注意深く吸引して取り除く。④の磁石から②のチューブを外して、緩衝液 (10 倍に希釈した SL-バッファー A) 1mL を入れ、手で軽く振って緩やかにビーズを混和・懸濁したのち、磁石を外した⑤の磁気ビーズ用マイクロチューブ立て (MPC-M) にセットした 1.5mL マイクロチューブへ、パスツールピペットで懸濁液を移す。⑤の専用磁石を装着して上下転倒を 60 回 (約 1 分間) 繰り返したあと、磁石を装着したまま蓋を開けて上澄み液を同様にパスツールピペットで取り除く。⑤の専用磁石を外した後、Cr を磁気ビーズから誘出させるために 0.1mol 塩酸 50  $\mu\text{L}$  を加えて試験管ミキサーで 5 秒間攪拌後、5 分間静置する。再度試験管ミキサーで 5 秒間攪拌して均一の懸濁液とした後、再び専用磁石を着けて磁気ビーズをマイクロチューブの壁に寄せた (ビーズが丸い集合体となる) のち、マイクロピペットでビーズに触れないように注意深く Cr を含む上澄み液全量を、あらかじめ 1mol 水酸化ナトリウム 5  $\mu\text{L}$  を入れた別の回収用 1.5mL マイクロチューブに移す。

次に蛍光抗体染色の段階 (C) について述べる。さきの回収用 1.5mL マイクロチューブを 5 分間沸騰水に漬ける。その後、室温まで自然冷却した後、直接蛍光抗体染色液 (BTF 社製の Easy Stain) 100  $\mu\text{L}$  を添加し、室温で 30 分間静置する。さらに暫定法の蛍

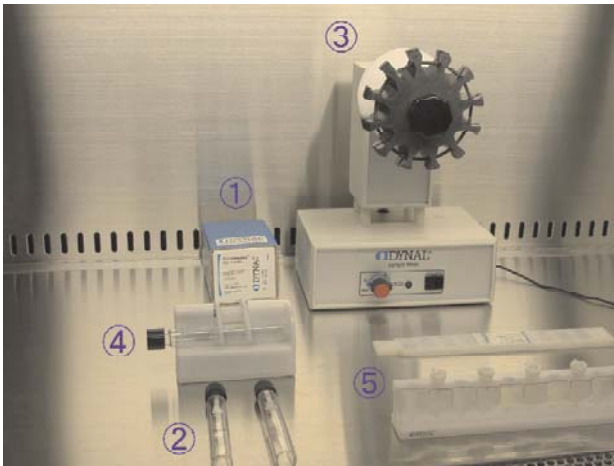


写真4 免疫磁性体分離に用いる試薬と器具

- ①: ビーズキット ②: レイトンチューブ  
 ③: 回転ミキサー ④: 磁気ビーズ用磁石  
 ⑤: 磁気ビーズ用マイクロチューブ立て  
 (奥は専用磁石)

光抗体染色でも使用した DAPI 染色液 90  $\mu$  L を加えて室温で 5 分間静置する。PBS で湿らせた直径 25mm、孔径 1  $\mu$  m の PTFE 膜を染色用フィルターホルダーベースにセットし、余分な PBS を弱く吸引除去したのち、この膜上に染色済みの試料（回収用 1.5mL マイクロチューブに入っている）をマイクロピペットで全量添加する。弱く吸引し過ぎた後、PBS 200  $\mu$  L での洗浄・吸引し過ぎを 3 回行なう。付属の封入剤をあらかじめ 10  $\mu$  L 滴下したスライドグラス上に膜を移し、さらに封入剤を 10  $\mu$  L 添加して、気泡が入らないようにカバーグラスを載せ、周辺部をネイルエナメルなどで封入し顕微鏡観察用試料とする。

#### 4 あとがき

以上、Cr の水道水及び原水からの検出方法について解説した。わが国では、1996 年の埼玉県越生町での集団発生事件以降、2002 年初春には北海道で 2 つの集団発生が問題となった。その後も河川水や水道水から Cr が検出されたこともあったが、給水停止などの処置により患者の発生は報告されていない。

今後、本県においても Cr 感染症の集団発生が起こる可能性が否定できないため、水道水の安全性を確保するための備えを強化しておく必要がある。濁度や指標菌の継続的な監視も非常に重要なことであるが、集団感染事件発生時の確実な Cr 検出のため、技術者の確保と検査体制の充実が必要であると考えられる。また、さらなる Cr の検出感度の良い、簡

便な試験方法が開発されることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) (社) 日本水道協会：クリプトスポリジウム—解説と試験方法—，2003.
- 2) (社) 日本水道協会：上水試験方法，上水試験方法解説編，2001.
- 3) 埼玉県衛生部：『クリプトスポリジウムによる集団下痢症』—越生町集団下痢症発生事件—報告書，1997.
- 4) 小野 一男、辻 英高他：河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況，感染症学雑誌，75，201-208，2001.

#### 厚生労働省関係通知等

- 1) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について(平成8年10月4日 衛水第248号)
- 2) 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 衛水第49号)
- 3) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について(平成10年6月19日 生衛発第1039号)
- 4) 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31日 衛水第18号)
- 5) 水道水中のクリプトスポリジウムに関する対策の実施について(平成13年11月13日 健水発第100号)
- 6) 水道水におけるクリプトスポリジウム検査について(平成13年11月21日 事務連絡 健康局水道課)
- 7) 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集の送付について(平成14年2月15日 事務連絡 健康局水道課)

#### 愛知県関係通知

- 1) 愛知県下の水道事業者におけるクリプトスポリジウム対策暫定方針の一部改正について(平成14年3月29日 13生衛第611号)

(文責 毒性部 都築 秀明)

## Web ページの作り方 その6 (スタイルシートの概要)

HTML の基礎を学んで、いざページを作成してみたら、行間が詰まってしまっていて見づらかったり、文章の段落ごとの字下げをするためにいちいち全角スペースを入れたり、画像の周囲のスペースがうまく調節できなかったりと、悪戦苦闘している方をよく見かけますが、スタイルシートを使うことでそれらを簡単に解決することができます。

今回はその概要についてご紹介します。

### 1 スタイルシートとは

Web ページを記述する HTML (Hyper Text Markup Language) は、文書の論理的な構造を示す言語です。

すなわち、文書が見出し、段落、リスト、表などのような要素で構成されているか、あるいはある特定の部分が文書全体の中でどのような意味を持っているのかをコンピュータに知らせるための言語であり、表現方法 (見栄え) を指定するための言語ではありません。そこで HTML とは別に文書の見栄えを指定・制御する言語を使用する必要があります。

このような言語は一般にスタイルシート言語と呼ばれていますが、数多くのスタイルシート言語の中で現在は CSS (Cascading Style Sheets) が広く用いられています。

### 2 スタイルシートの設定方法

#### (1) デフォルトのスタイルシートの設定

前述のとおりスタイルシートは CSS だけではありませんので、デフォルトで使用するスタイルシートが CSS であると言うことを指定しておく必要があります。

`<head>` タグと `</head>` タグの間に `<meta>` タグを使って指定します。

例) `<meta http-equiv="Content-Style-Type" content="text/css">`

#### (2) スタイルシートの設定方法

スタイルシートの設定には、以下の 3 つの方法があります。

① HTML 文書とは別にスタイルシートを記述した文書を作成し、それを HTML 文書に読み込ませる。

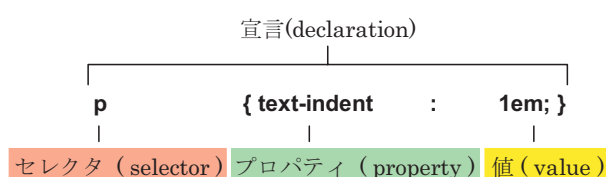
② HTML 文書の `<head>` タグと `</head>` タグの間に `<style>` タグを使ってまとめて記述する。

③ タグに直接スタイルを指定する。

これらの 3 つの方法を同時に使用することができますが、文書の同じ部分に 2 つ以上の方法で異なった指定をした場合には、③>②>①の順に優先的に適用されます。

#### (3) スタイルシートの書式

スタイルシートの基本的な書式は次のとおりです。



前記の (2) の②の方法での使用例を示します。

```
<html>
<head>
<meta http-equiv="Content-Type"
      content="text/html; charset=Shift_JIS">
<meta http-equiv="Content-Style-Type"
      content="text/css">
<style type="text/css">
<!--
p {text-indent: 1em; line-height: 150%;}
-->
</style>
<title></title>
</head>
<body>
<p>この段落の 1 行目 1 文字分の「字下げ」を行い、行間は通常の 1.5 倍にするという指定をしています。</p>
</body>
</html>
```

この例では、`<body>` タグで挟まれた部分 (本文) にある `<p>` タグ (段落を設定するタグ) で挟んで段落設定した **段落の 1 行目の「字下げ」** を **1 文字**

分  
行  
間  
は  
通  
常  
の  
1.5  
倍  
に  
す  
る  
と  
い  
う  
指  
定  
を  
し  
て  
い  
ま  
す。  
「  
;  
」  
で  
区  
切  
る  
こ  
と  
で  
複  
数  
の  
指  
定  
を  
す  
る  
こ  
と  
が  
で  
き  
ま  
す。

<!-- と --> で挟まれた場所はコメントとして処理されるので、スタイルシートに対応していないブラウザでそのまま表示されてしまうのを防ぐことができます。

また、ここで使用している単位 (em と %) は相対単位といい、em はそこで使用している標準の文字サイズを 1、% は基準となる割合を 100 としています。

これに対して、pt (ポイント)、cm (センチメートル)、mm (ミリメートル) などのような単位を使用することもでき、これらを絶対単位といいます。

さらに、要素 (ここでは p) によって使用できるプロパティは決まっており、多くの種類があります。

(2) の③の方法で段落の 1 行目の「字下げ」を 3 文字分  
行  
間  
は  
通  
常  
の  
2  
倍  
、  
段  
落  
の  
右  
側  
余  
白  
を  
10pt という指定を行うと、次のようになり

ます。

```
<p style=" text-indent: 3em; line-height: 200%; margin-right: 10pt;" >段落の 1 行目の「字下げ」を 3 文字分、行間は通常の 2 倍、段落の右側余白 10pt という指定</p>
```

このように、タグに直接スタイルを指定する場合には、style という HTML のプロパティの値としてスタイルを書き込みます。このとき、値の両側は「"」で囲む必要があります。

②の方法では本文中の全ての <p> タグに対して指定することになりますが、③の場合はスタイルが指定された <p> タグだけが有効となります。

以上の例では、要素名 (<p> タグの p) をセレクタとして利用しましたが、これ以外にもセレクタの指定方法にはいくつも種類があり、柔軟にスタイルを指定することができます。セレクタの種類については次回ご紹介します。

(文責 企画情報部 櫻井 博貴)

愛知衛研技術情報 第 28 巻第 4 号・第 29 巻第 1 号合併号 平成 17 (2005) 年 3 月 31 日  
照会・連絡先 愛知県衛生研究所  
〒 462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6 号  
愛知県衛生研究所のホームページ 【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

平成 13 年 5 月よりダイヤルインとなりました。

所 長 室 : 052-910-5604	毒性部・毒性病理科 : 052-910-5654
次 長 : 052-910-5683	毒性部・毒性化学科 : 052-910-5664
研 究 監 : 052-910-5684	化学部・生活化学科 : 052-910-5638
総 務 課 : 052-910-5618	化学部・環境化学科 : 052-910-5639
企 画 情 報 部 : 052-910-5619	化学部・薬品化学科 : 052-910-5629
微生物部・細菌 : 052-910-5669	生活科学部・水質科 : 052-910-5643
微生物部・ウイルス : 052-910-5674	生活科学部・環境物理科 : 052-910-5644

FAX : 052-913-3641 (変更ありません)