ＩＳＳＮ　０３８６－５８７８
土木研究所資料第３８９９号

土 木 研 究 所 資 料

下水・河川水中のクリプトスポリジウムの検査法

Ver.1

平成 15 年 4 月

独立行政法人土木研究所

材料地盤研究グループ（リサイクル）

Copyright © (2003) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、独立行政法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、独立行政法人土木研究所理事長の文章による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

土木研究所資料
第3899号2003年4月

下水・河川水中のクリプトスポリジウムの検査法

Ver.1

独立行政法人土木研究所
材料地盤研究グループ
上席研究員　鈴木　穣
研究員　北村　友一

要旨

下水や河川水中のクリプトスポリジウムの存在量を把握するためには，クリプトスポリジウムの検査方法が必要となる。これまで土木研究所では，公共用水の衛生学的安全性を評価するため，下水や河川水中のクリプトスポリジウムの存在実態を調査するとともに、その検出方法の最適化も行ってきた。本資料は、土木研究所において最適化した下水および河川水中のクリプトスポリジウムの検査手順をまとめたものであり，①顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法，②クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法，③RealTimePCR 法によるクリプトスポリジウムの迅速検出法，④FISH 法による生存クリプトスポリジウムパルブムの染色方法からなる。

キーワード：クリプトスポリジウム，遺伝子型解析，PCR，Real Time PCR，FISH

目　　次

1.　クリプトスポリジウム 1

2.　試験方法の概要 1

3.　顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法 1
3.1　試験に用いる試薬 1
3.2　試験に用いる器具 2
3.3　試験操作 4
3.4　クリプトスポリジウムオーシストの検査方法のフロー 7

4.　クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法 16
4.1　試験に用いる試薬 16
4.2　試験に用いる器具 17
4.3　オーシストからのDNA抽出法 19
4.4　PCR法による解析対象遺伝子の増幅 19
4.5　アガロースゲルからのDNA抽出法 21
4.6　シークエンス反応 21
4.7　塩基配列の決定法 22
4.7.1　ゲルプレートのセッティング 22
4.7.2　装置のセットアップ 23
4.7.3　ソフトウェアのセットアップ 24
4.7.4　シークエンスラン 24
4.7.5　ラン後の洗浄 24
4.8　データ解析法 25
4.9　クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法のフロー 27

5.　Real Time PCR法によるクリプトスポリジウムオーシストの迅速検出方法 66
5.1　試験に用いる試薬 66
5.2　試験に用いる器具 66
5.3　Real Time PCR法によるクリプトスポリジウムの検出法 66
5.4　Real Time PCR法によるクリプトスポリジウムの検出法のフロー 68

6.　FISH法によるクリプトスポリジウムパルブムオーシストの染色方法(案) 72
6.1　試験に用いる試薬 72

6.2 試験に用いる器具 …… 73
6.3 試験操作 …… 73
6.4 クリプトスポリジウムオーシストのFISH法による染色手順のフロー …… 75

7. クリプトスポリジウムオーシストの検査方法の最適化のための基礎実験 …… 82
7.1 目的 …… 82
7.2 実験方法 …… 82
7.2.1 ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法 …… 82
7.2.2 ポリカーボネートフィルターの孔径の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響 …… 82
7.2.3 カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法 …… 83
7.2.4 遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の方法 …… 84
7.2.5 オーシストからのDNA抽出方法 …… 84
7.2.6 河川水へ添加したオーシストのDNA検出方法 …… 85
7.2.7 Real Time PCR法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法 …… 85
7.3 実験結果 …… 86
7.3.1 ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果 …… 86
7.3.2 ポリカーボネートフィルターの孔径の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響 …… 87
7.3.3 カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果 …… 88
7.3.4 遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の結果 …… 89
7.3.5 各種試験方法のオーシストの回収率の比較結果 …… 89
7.3.6 オーシストからのDNA抽出結果 …… 90
7.3.7 河川水へ添加したオーシストのDNA検出結果 …… 93
7.3.8 Real Time PCR法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出結果 …… 94

8. まとめ …… 95

1. クリプトスポリジウム

クリプトスポリジウムは，胞子虫類に属する原虫(病原性を有する原生動物)で，人間や牛，馬，犬，猫等を宿主としている。人間に感染して下痢の原因となるものは小型種の *Cryptosporidium parvum* で，腸管上皮細胞の微繊毛内で有性生殖と無性生殖を繰り返しながら増殖し，有性生殖で形成されたオーシスト（嚢包体）が糞便と共に排出される。環境水中では，クリプトスポリジウムはオーシスト(直径：約4～6μmの類円形)の形態で存在しており，下水・河川水中のクリプトスポリジウム汚染は，このオーシストを検出することにより把握できる。

2. 試験方法の概要

本試験方法は，以下の試験から構成される。

（1）顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法

（2）クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法

（3）RealTimePCR 法によるクリプトスポリジウムの迅速検出法

（4）FISH 法による生存クリプトスポリジウムパルブムの染色方法 (案)

各試験法で検査できる項目を下表に示す。目的に応じて試験方法を使い分ける必要がある。

各試験方法の検査項目と評価

試験方法	オーシスト濃度	種の同定	生死判定	迅速性	設備費用
(1)	○	×	×	×	小[1]
(2)	×	○	×	×	大[2]
(3)	○	△	×	○	大[3]
(4)	○	△	○	×	小[1]

1 蛍光顕微鏡が必要

2 PCR 装置および DNA シーケンサーが必要

3 Real Time PCR 装置が必要

3. 顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法

3.1 試験に用いる試薬

精製水 イオン交換水または蒸留水

りん酸緩衝貯蔵原液 塩化ナトリウム(NaCl)80g，りん酸二水素カリウム（KH_2PO_4）2g，りん酸水素二ナトリウム十二水和物（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）29g，塩化カリウム(KCl)2g に精製水を加え，全量を 1L とする。

りん酸緩衝生理食塩水(PBS 液) りん酸緩衝貯蔵原液を 10 倍に希釈し，0.1mol/L の塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて pH を 7.4 に調整する。使用時に孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

溶出液 1%ドデシル硫酸ナトリウム貯蔵液100ml, 1%Tween80 貯蔵液100ml, 消泡剤0.1ml とりん酸緩衝貯蔵原液 100ml を精製水 500ml に溶かし，pH を 7.4 に調整後 1L とする。孔径

0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

免疫磁気ビーズ　ダイナル社製ダイナビーズアンチクリプトスポリジウムキット

蛍光抗体試薬　FITC 直接蛍光抗体試薬（バイオテクノロジーフロンティア社製，Easy stain）

DAPI染色液　4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)0.4mg を 99.5%エタノールに溶かし，100ml にする。使用時に 10 倍希釈をする。

DABCO 液　グリセロール 100ml を温め DABCO2g を加え溶解させる。または，市販の蛍光抗体試薬についている封入剤。

エタノール・グリセロール混合液（脱水液）　エタノール(99.5%)の適量とグリセロール 5ml，精製水の適量を混合して全量を 100ml として，所定のエタノール濃度(10%, 20%, 40%, 80%, 95%)の脱水液を調整し，孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

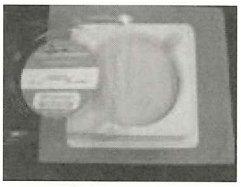
3.2　試験に用いる器具



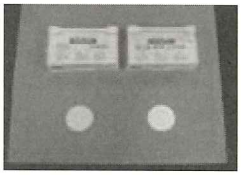
ふるい　乾熱滅菌可能のステンレス製ふるい
（孔径 20μm，内径 15cm 以上）



減圧ろ過器　試料濃縮時と蛍光染色時に使用する。試料濃縮用のろ過器は，直径 90mm のフィルターが装着可能であり，フィルター・ホルダは熱処理可能なものを用いる。蛍光抗体染色用のろ過器は直径 25mm のフィルターが装着可能であり，熱処理可能なものを用いる。



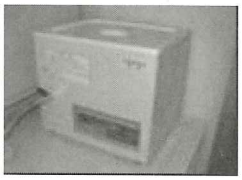
試料濃縮用フィルター　孔径 3μm，直径 90mm のポリカーボネートメンブレンフィルター



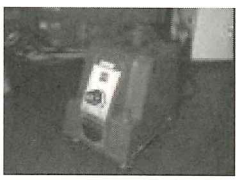
蛍光染色用フィルター　孔径 0.2μm 直径 25mm のセルロースアセテートフィルター



遠心分離機　G 設定ができ，多本掛け水平式でブレーキ解除が行えるものを用いる。

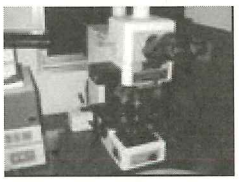


超音波洗浄器　発振周波数 38KHz 程度のもの。

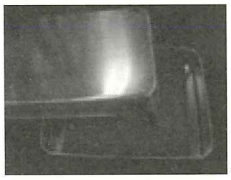


試験管ミキサー　試験管等を攪拌できるもの。

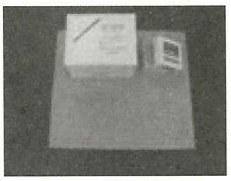
蛍光微分干渉顕微鏡　　微分干渉装置付きで倍率は400倍(油浸観察)及び1000倍(油浸観察)まで可能であること。接眼レンズにはマイクロメーターを装着する。蛍光装置には，B励起，UV励起，G励起を装着する。



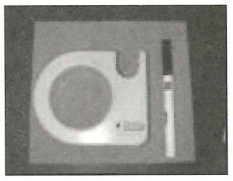
湿潤箱　　遮光・保湿ができるもの



スライドグラス　　76×52mmのもの
カバーグラス　　30×30mmのもの



撥水ペン（DAKOペン）
セロテープ



3.3　試験操作

試料の準備

下水・河川水を採取し[注1]，夾雑物の多い試料についてはふるい（孔径20μm）を使用し除去する。

1)　オーシストの捕捉，濃縮

直径90mm，孔径3μmのポリカーボネートメンブレンフィルターで試料をろ過する[注2]。ろ過後のポリカーボネートメンブレンフィルターはろ過面内側に折り畳み，ハサミで遠心管に入る大きさに裁断する。50ml容量の遠心管に溶出液を45ml入れ，その中に裁断したポリカーボネートメンブレンフィルターを入れる。超音波浴を5分間（1分おきに取り出して攪拌しながらポリカーボネートフィルターから夾雑物を剥離する）行う。チューブ内のポリカーボネートフィルターは，ピンセットで洗うようにして取り出し，溶出液の入った別の遠心管内で洗ってから破棄する。その後，遠心管の蓋を閉じ，遠心分離（1050×G，10分間，ブレーキ解除）を行う。次に遠心管の蓋を開け，沈査を残し，上澄み液をスポイドで吸引除去する。精製水で50mlにメスアップし，試験管ミキサーにかける。遠心分離（1050×G，10分間，ブレーキ解除）後，沈査を残し，上澄み液をスポイドで吸引除去する。精製水による洗浄を再度行う。

2)　オーシストの回収

濃縮，捕捉試料からのオーシストの回収は，ダイナビーズアンチクリプトスポリジウムキットによる免疫磁気ビーズ法とする。ダイナビーズアンチクリプトスポリジウムキットに含まれるバッファーA液1mlとバッファーB液1mlをダイナルチューブに入れておく。1)の試料を試験管ミキサーにかけ，適宜，精製水で希釈した試料10mlをダイナルチューブに入れる[注3]。抗クリプトスポリジウム磁気ビーズを試験管ミキサーにかけ，十分分散させた磁気ビーズをバッファーA，B液と試料が入っているダイナルチューブに100μl添加する。磁気ビーズを加えたダイナルチューブは，ダイナルサンプルミキサーにより，毎分15～20回転で1時間(室温)，攪拌する。攪拌したダイナルチューブは，マグネットMPC-1に取り付け，90度起こす，寝かせる動作を1秒間に1回のペースで繰り返しで2分間行う。次にダイナルチューブをMPC-1に付けたまま，上澄み液を全て捨てる。ダイナルチューブをMPC-1からはずし，1×SL・バッファーA液1mlを加え，緩やかに振って磁気ビーズを分散させる。パスツールピペットを用い，ダイナルチューブ内の液全量を1.5mlチューブに移す。この1.5mlチューブはマグネットMPC-Mにセットし，180度の揺さぶりを1秒間に1回の速度で1分間続ける。1.5mlチューブ内で磁石面にビーズが付着していることを確認し，1.5mlチューブから上澄み液をゆっくり除去する。マグネットMPC-Mから磁石板を取り外し，1.5mlチューブに0.1Nの塩酸を100μl入れる[注4]。そして，5秒間試験管ミキサーにかけ，5分間静置した後，さらに5秒間試験管ミキサーにかける。その後，1.5mlチューブをマグネットMPC-Mにセットし，1.5mlチューブ内のビーズを磁石面に寄せ集める。予め1Nの水酸化ナトリウム20μlを入れた別の新しい1.5mlチューブに，塩酸処理した1.5mlチューブ内の溶液をパスツールピペットを用いて入れ

る。再度，残っている磁気ビーズに対して0.1Nの塩酸を100μl入れ，5秒間試験管ミキサーにかけ，5分間静置後，再度5秒間試験管ミキサーにかける。1.5mlチューブをマグネットMPC-Mにセットし，1.5mlチューブ内のビーズを磁石面に寄せ，上澄み液を先の水酸化ナトリウムが含まれるチューブに加える。試料を中和するためPBSを加え1.0mlとする。

3)　蛍光抗体染色

2)の操作が終了した1.5mlチューブは95℃の温水浴を1分間行う[注5]。予め，撥水ペンで円を描いた検鏡用フィルターと支持用フィルターをシャーレに入れ，PBSに浸けておく。吸引装置にろ過器をセットし，検鏡用フィルターと支持用フィルターを乗せ，PBS5mlで吸引しながら洗浄する。95℃で温水浴した試料を撥水円内に吸引しながら滴下する。検鏡用フィルターと支持用フィルターは，別のシャーレに移し，撥水ペンで描いた円内に蛍光抗体試薬を0.1～0.3ml[注6]滴下し，湿潤箱（遮光・保湿）の中で15分間静置する。フィルターをろ過台に戻し，蛍光抗体試薬を吸引除去した後，洗浄バッファー液を0.1～0.3ml[注6]乗せ1分間置く。吸引しながら洗浄バッファー液を1ml滴下して洗浄吸引する。再度，洗浄用バッファーもしくはPBS5mlで吸引しながら洗浄する。その後，吸引を停止し，DAPI染色液を0.1～0.3ml[注6]滴下し，5分間静置する。DAPI液を吸引除去した後，10%エタノールを1ml滴下しゆっくりと吸引する。その後，20%，40%，80%，95%と脱水液の濃度を順に高めて同様の操作を行なう。

スライドグラスに温めておいたDABCO液を一滴落とし，その上に検鏡用フィルターのみを乗せる。検鏡用フィルターはスライドグラスごと37℃のインキュベーターに保湿して入れ，フィルターを透明化する。その後，検鏡用フィルターをインキュベーターから取り出してDABCO液を滴下し，カバー・グラスを静かに乗せ，セロハンテープで回りを封入する。検鏡するまでサランラップ，アルミ箔で包み冷蔵庫に保管する。

4）蛍光顕微鏡観察

3)で作成したスライドグラスに検鏡用オイルを滴下し，顕微鏡ステージにスライドグラスを乗せる。はじめに，B励起にし，400倍で蛍光観察を行う。検鏡用フィルターの端から順に観察を行い，周辺部が緑色のリング状に輝く円形の物質の有無を調べる。緑色の円形物質を見つけたら，1000倍にし，形と大きさが4～6μmであることを確認する。類円型であるか，縫合線があるか，縫合線が開いているかどうかについても観察する。次にUV励起にし，青白色に光る核の有無を確認し，確認できればその数を数える。通常，オーシストには核が4個存在する。1000倍のまま，蛍光を解除し，微分干渉観察を行う。再度，オーシストの大きさをマイクロメーターで測り，オーシスト内のバナナ状に見えるスポロゾイト，残体などの内部構造を観察する。

注１　採取量は，流入下水 200ml，処理水 20L，河川水 20L 程度である。遺伝子型解析を行う場合は，顕微鏡観察の試料と別に，流入下水 400ml，処理水 40L，河川水 40L を保存しておく。

注２　フィルターが目詰まりをおこした場合は，新しいフィルターに取り換える。

注３　沈査の量によって免疫磁気ビーズ処理する本数を変える。（おおよその目安としては，ポリカーボネートフィルター2 枚分の沈査を磁気ビーズ 1 検体とする。）

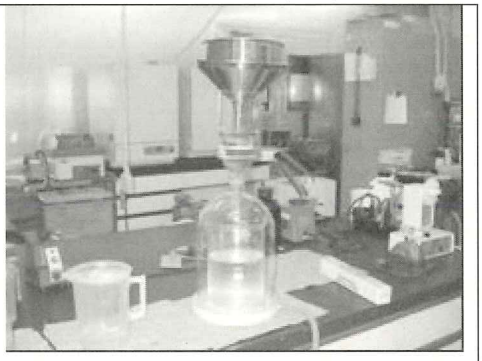
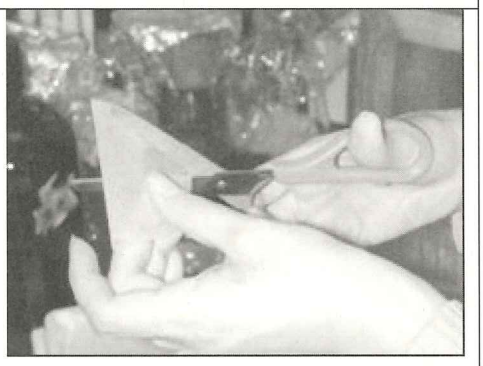
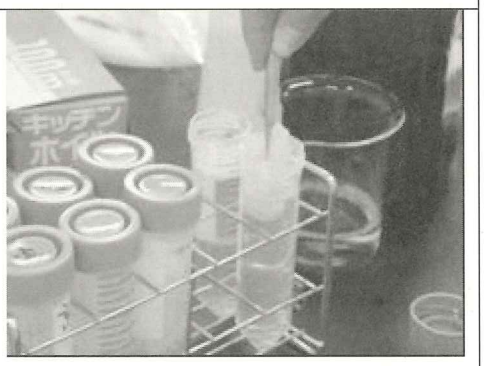
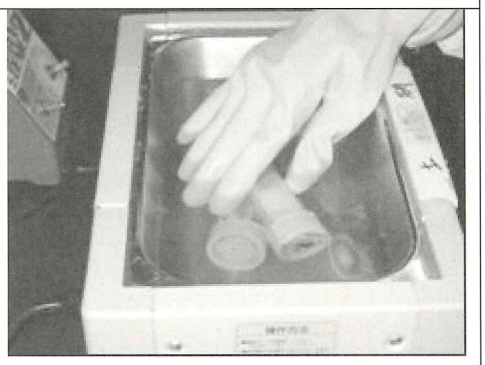
注４　酸を加えることにより，磁気ビーズからオーシストを切り離すことができる。

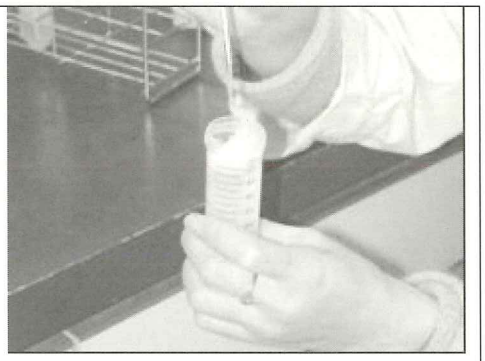
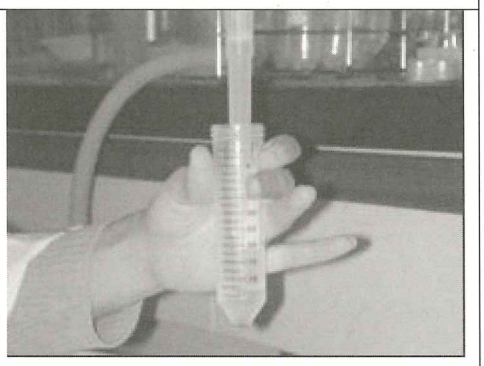
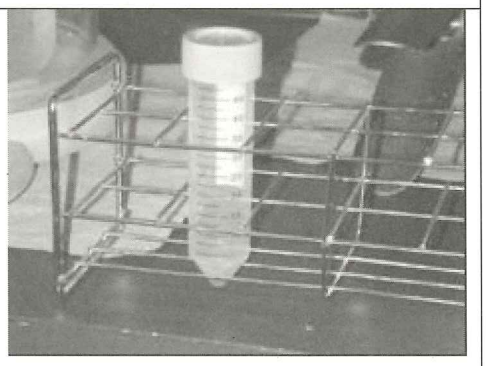
注５　オーシストの DAPI 染色率を向上させるための操作

注６　円内が浸る程度

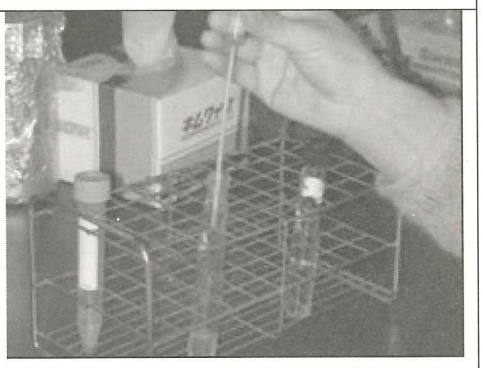
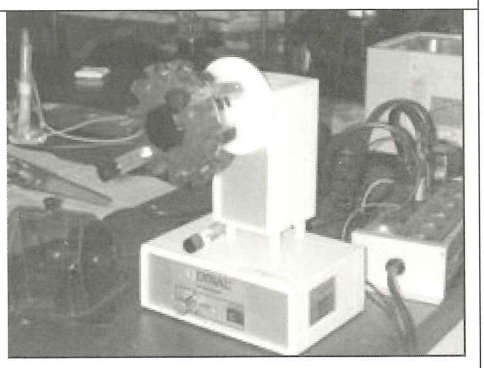
3.4 クリプトスポリジウムオーシストの検査方法のフロー

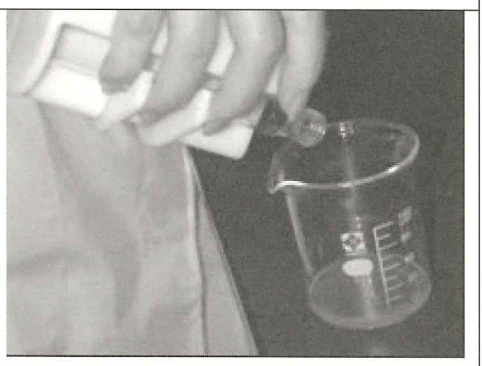
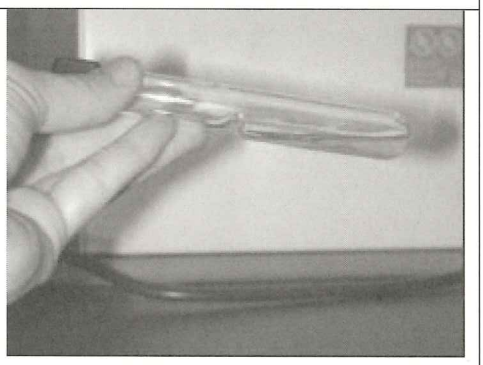
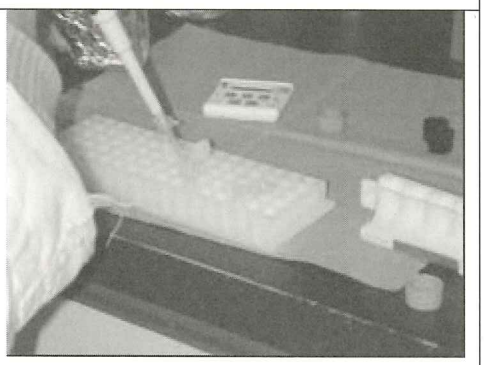
1)　試料のろ過濃縮

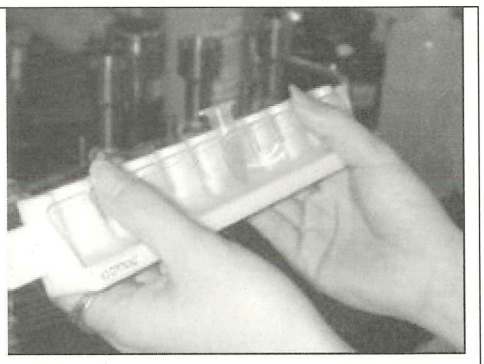
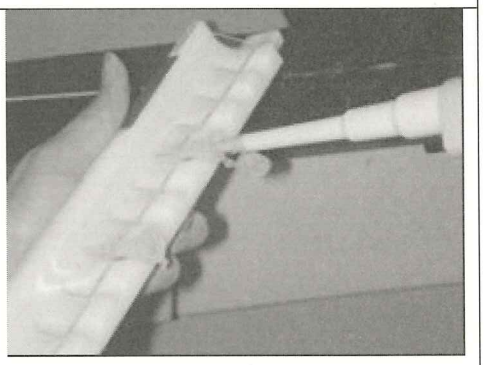
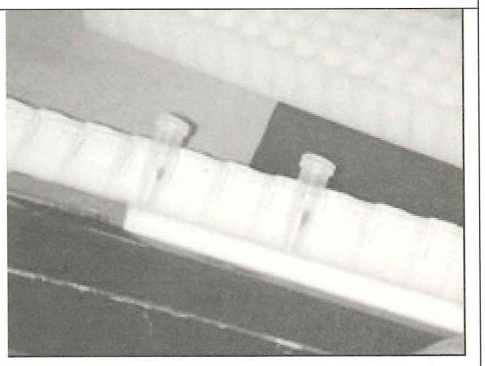
1　ふるい(孔径 20μm)＋ろ過装置(ポリカーボネートフィルター直径 90mm, 孔径 3μm)を使用し，下水・河川のオーシストを濃縮する。	
2　ポリカーボネートメンブレンフィルターをろ過面内側に折り畳み，鋏で裁断する。	
3　裁断したフィルターを溶出液に入れる。(50ml 容量の遠心管に溶出液を 45ml 入れておく)	
4　超音波でオーシストをフィルターから剥離する。 1 分おきに取り出して攪拌しながら，5 分間超音波浴を行う。	

5　フィルターをピンセットで取り出し，取り出したフィルターは，溶出液の入った別の遠心管で洗い，破棄する。50ml 遠心管は，遠心分離（1050×G，10 分間，ブレーキ解除）する。	
6　沈査を残し，上澄み液をスポイドで吸引除去する。	
7　精製水で 50ml にメスアップし，攪拌する（試験管ミキサーに 5 秒間かける）。遠心分離（1050×G，10 分間，ブレーキ解除）する。	
8　上澄み液をスポイドで吸引除去し，7 を繰り返す。 ↓ 2)　免疫磁気ビーズ法へ	

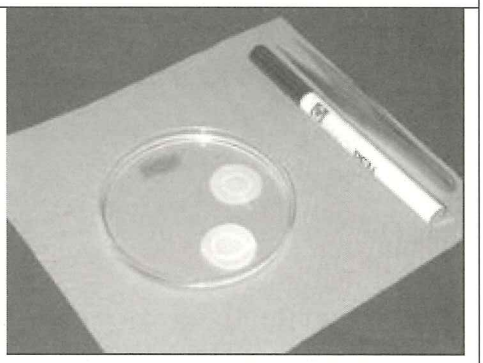
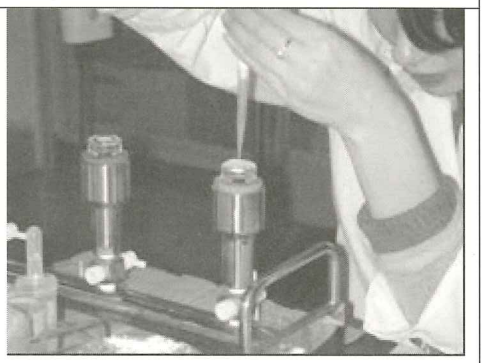
2)　免疫磁気ビーズ法

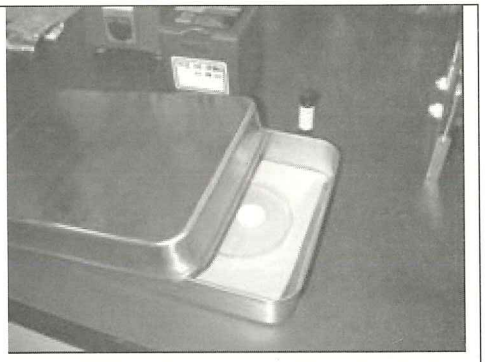
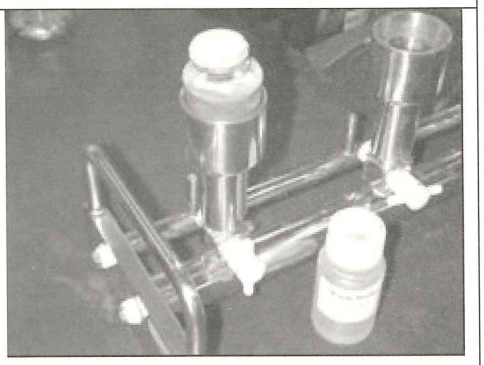
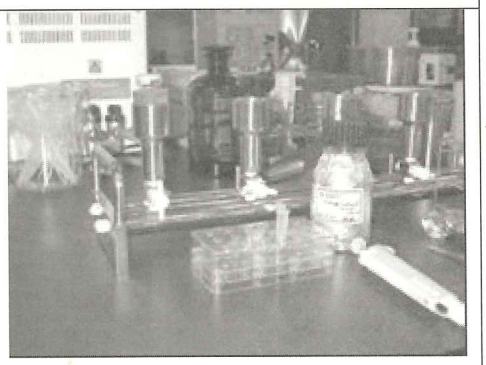
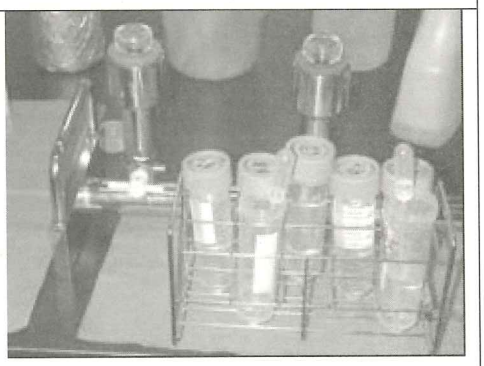
1　ダイナビーズアンチクリプトスポリジウムキットを予め，室温に戻しておく。10×SL-バッファーA 液を精製水で 10 倍希釈する。その容量は，ビーズ処理する本数によって決まる。(7 のオーシストの捕捉で使用する。)	
2　バッファーA 液 1ml とバッファーB 液 1ml をダイナルチューブに入れる。1)の試料を精製水で希釈し，ダイナルチューブに 10ml 入れる。	
3　ビーズを試験管ミキサーにかけ，十分分散（ビーズチューブを逆さにして完全に懸濁されて，容器の底にペレットが溜まっていないかを確認する。)し，ビーズ 100 μl を試料の入ったダイナルチューブに添加する。	
4　ダイナルチューブを回転ミキサー（ダイナルサンプルミキサー）に取り付け，ビーズと試料を混和する。(15～20 回転／分・室温で 1 時間)	

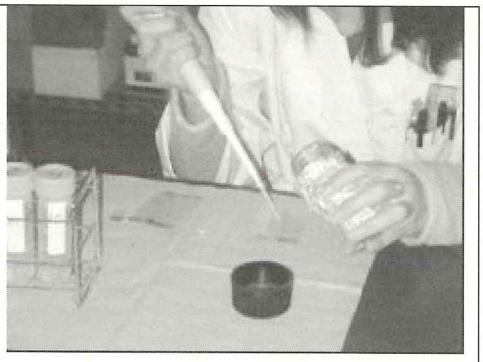
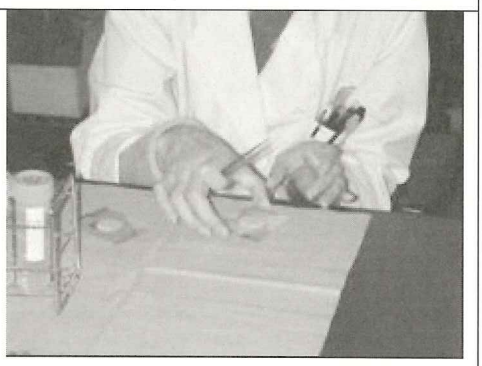
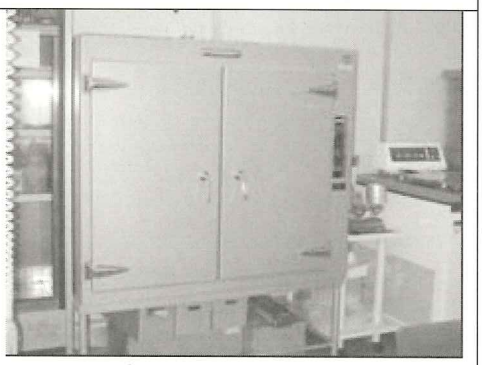
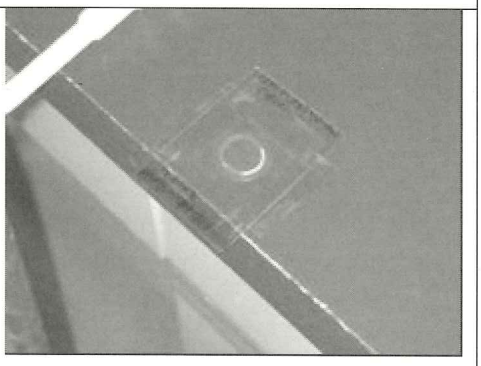
5　攪拌終了後，ダイナルチューブをチューブの平らな面を磁石へ向く様にして，マグネット MPC-1 に取り付け，2 分間攪拌する。(90 度起こす，寝かせる動作を 1 秒間に 1 回繰り返す)	
6　MPC-1 を垂直に立て，キャップを外し，上澄み液を全て捨てる。 (ダイナル・チューブを振ったり，MPC-1 から外さない様に注意する。)	
7　ダイナル・チューブを MPC-1 から外し，1×SL・バッファーA液 1ml を加え，緩やかに振って内容物を混和させる。(試験管ミキサーは使用しない。)	
8　液全量を 1.5ml チューブに移す。	

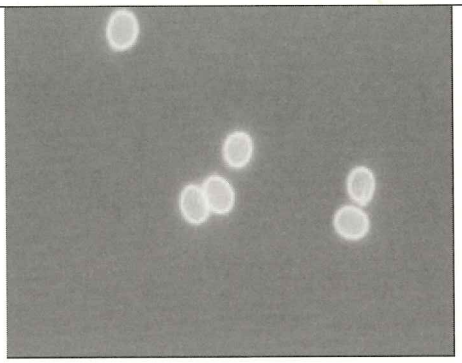
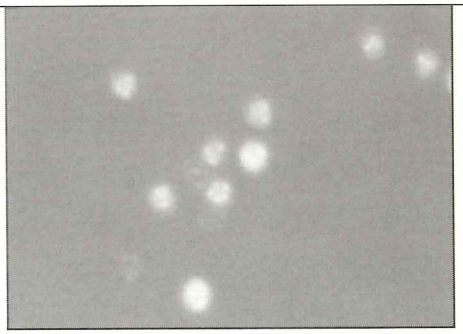
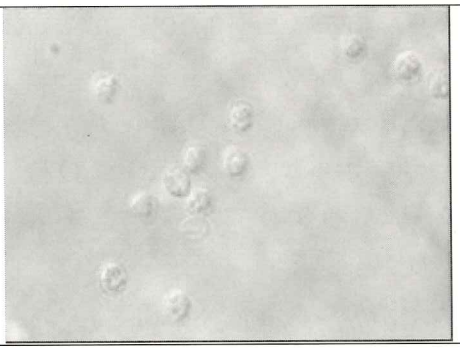
9　1.5ml チューブを MPC-M に付けた状態で，180 度の揺さぶりを 1 秒間に 1 回の速度で 1 分間続ける。	
10　MPC-M に付けられた 1.5ml チューブから上澄み液を吸引除去する。0.1N の塩酸を 100 μl 入れて 5 秒間試験管ミキサーにかけ，室温で 5 分間静置する。	
11　5 秒間試験管ミキサーにかけ，MPC-M に 1.5ml チューブを付けて軽く振動を与えビーズを寄せる。上澄み液をオーシスト回収用 1.5ml チューブ（1N の水酸化ナトリウム 20 μl が入れてある）に移し，試験管ミキサーにかける。	
12　再度，残った磁気ビーズに 0.1N の塩酸を 100 μl 入れ，洗浄を繰り返す。（10，11 を参照）。上澄み液をオーシスト回収用チューブに加え，5 秒間試験管ミキサーにかける。 （PBS を遠心管の 1ml の所まで加える。） ↓ 3)　蛍光抗体染色へ	

3)　蛍光抗体染色法

1　2)の試料を加温する。(95℃温水浴, 1～2 分間, DAPI 染色用の前処理)	
2　検鏡用フィルター(撥水ペンで円を描いておく)と支持用フィルターをシャーレに入れ, PBS に浸けておく。	
3　ろ過器をセットし, ベースの上に支持フィルター(下)と検鏡用フィルター(上)を乗せ PBS5ml で洗浄吸引後, 試料を撥水円内に滴下する。	
4　吸引を止め, 支持フィルターと検鏡用フィルターを別のシャーレに移す。蛍光抗体試薬を 0.1～0.3ml (円内が浸る程度) のせる。	

5　湿潤箱（遮光・保湿）の中で 15 分間静置する。	
6　支持フィルターと検鏡用フィルターをろ過台に戻し，蛍光抗体試薬を吸引除去する。 洗浄バッファー液を 0.1～0.3ml（円内が浸る程度）乗せ 1 分間置いた後，吸引しながらバッファー液を 1ml 洗浄吸引する。再度，洗浄用バッファーまたは，PBS 5ml で吸引洗浄を行う。	
7　吸引停止後，DAPI 染色液を 0.1～0.3ml（円内が浸る程度）乗せ,5 分間静置する。	
8　吸引しながら，10%エタノールを撥水円内に滴下(2 回，計 1ml/1 枚) 吸引しながら,20%エタノールを滴下(2 回，計 1ml/1 枚) 吸引しながら，40%エタノールを滴下(2 回，計 1ml/1 枚) 吸引しながら，80%エタノールを滴下(2 回，計 1ml/1 枚) 吸引しながら，95%エタノールを滴下(2 回，計 1ml/1 枚)	

9　DABCO をスライドグラスに滴下する。 （フィルターの表面に広がる程度，DABCO は少し温めておく。）	
10　検鏡用フィルターだけをスライドグラスの上に置く。 （スライドグラスとフィルターの間に隙間がないように，DABCO が足りなければ隙間から追加する。）	
11　スライドグラスをインキュベーターに入れ，検鏡用フィルターを透明化する。（暗箱に入れ，保湿，保温 37℃，約 10 分）	
12　スライドグラスをインキュベーターから出し，DABCO を検鏡用フィルターの上に滴下する。次に，カバーグラスを乗せ，セロテープを 4 辺に貼り，封入する。 サランラップ，アルミ箔につつんで冷蔵庫に保管する。（遮光） ↓ 検鏡へ	

顕微鏡観察の様子	
クリプトスポリジウムオーシストの蛍光像 オーシストは，アップル・グリーンに蛍光する。オーシスト壁が強く蛍光し，内部の蛍光は弱く観察される。	
クリプトスポリジウムオーシストのDAPI染色像 核は通常は4つ観察される。ステージを上下させ，核の個数を数える。	
クリプトスポリジウムオーシストの微分干渉像 オーシストの大きさは約5μm程度，内部にバナナ状のスポロゾイトや残体が確認される。しかし，明確に確認できることは稀である。	

4. クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法

顕微鏡観察で陽性になった試料について，DNA 解析からクリプトスポリジウムであるかどうかの確認と種の推定を行う。ただし，プレパラートに封入されたクリプトスポリジウムの DNA 抽出は困難であることから，ここでは，同時に採取している試料中のクリプトスポリジウムの DNA 解析を行う。

4.1 試験に用いる試薬

精製水：イオン交換水または蒸留水

滅菌水(DNase・RNase free)

DNA 抽出キット：Neasy Tissue Kit(キアゲン社製　動物組織，バクテリア等からのゲノム DNA 分離用キット)

AmpliTaq Gold
10×PCR Gold Buffer
dNTP(each2mM)
$MgCl_2$(25mM)
　} Applied Biosystems 社製 PCR キット PCR 用酵素及びバッファー

100bp DNA
Ladder loading Buffer
　} TAKARA 社製 電気泳動用の DNA サイズマーカー

プライマー　(合成／HPLC 精製品)

ファースト	フォワードプライマー	18S-1-f	5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'
ファースト	リーバースプライマー	18S-1-r	5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'
セカンド	フォワードプライマー	18S-2-f	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'
セカンド	リバースプライマー	18S-2-r	5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'

SYBR Gold染色液　：DNA 染色用蛍光試薬（フナコシ社製)

DNA 電気泳動用バッファー：TAE バッファー（コスモバイオ社製)

アガロース　：電気泳動用ゲル作製用

GENECLEAN Ⅱ Kit　：　フナコシ社製

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit：シークエンス用試薬キット(Applied Biosystems 社製)

BigDye Terminator v3.0 Matrix Standards：マトリックス用試薬(Applied Biosystems 社製)

脱イオンホルムアミド：AMRESCO 社製

ローディングダイ：アプライする試料に混和し，試料の比重を上げ，ウェル内に試料を沈降させるための色素

水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム 5 粒を 99.5%エタノール 50m1 に溶解

BIO NOX 溶液：ガラスプレート洗浄用洗剤，BIONOX5g を 500ml のイオン交換水に溶かす。

エタノール(特級)

イソプロパノール(特級)

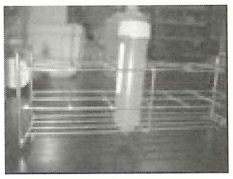
10×TBE バッファ：TRIS108.0g，ホウ酸 55.0g と $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 8.3g をスターラーで撹拌溶解後，イオン交換水で 1L にメスアップし，結晶が目立つ場合は，0.2μm ニトロセルロースフイルターで

ろ過する。

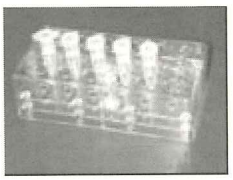
1×TBE 溶液: 10×TBE バッファをイオン交換水で 10 倍希釈するが，pH が 8.3(±0.2)にならない場合は，溶液を再度作り直す。

4.2　試験に用いる器具

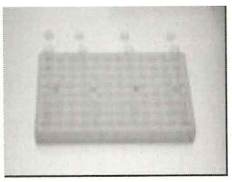
遠沈管　　容量 50ml チューブ



1. **5mlチューブ**　DNase　RNase　Free



PCR 反応チューブ　PCR 用 200μl(Applied　Biosystems 社製)



Centri-sep スピンカラム　余分な蛍光標識を除去する。(Applied Biosystems 社製)



ヒートブロック　1.5ml チューブが加温可能で，室温～100℃で制御可能なこと。



小型遠心分離機　クリーンベンチ内に設置できる小型のもの



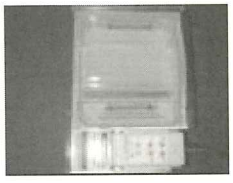
クリーンベンチ　DNA 抽出用と PCR 試薬調整用を別々に設置することが望ましい。



サーマルサイクラー



電気泳動用装置　Mupid など小型のもの



マイルドミキサー　アガロースゲル中の DNA の染色に使用する。



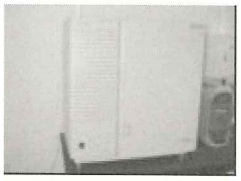
UV トランスイルミネーター　ゲル中の DNA の確認に使用。



遠心エバポレーター

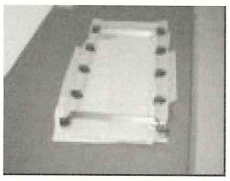


DNA シーケンサー　　ABI PRISM 377

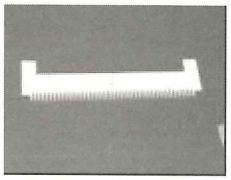


シークエンス用ゲルプレート作製器具一式

ゲルカセット，48cm プレーンガラス板，48cm ノッチガラス板
スペーサー，クリアブレース，ゲルインジェクター



ペーパーシャークコーム　　32 ウェル用



パソコン　　(Mac)



LongRangerSinglePack　　ABI Sequencer 377－48cm ゲル用 (TAKARA 製ゲル用パック)



ケイドライ又はキムタオル



上記は参考例であり特定の商品の購入を義務つけるものではない。

4.3　オーシストからのDNA抽出法

下水または河川試料[注1]中のオーシストを 3．3（1）および（2）の方法により濃縮・精製する。オーシストが回収された1.5mlチューブは，遠心分離(11000rpm，5分間)を行い，底部100μlを残し，上澄み液を除去する。この1.5mlチューブにDNeasy Tissue Kitに含まれているBuffer ATLを180μl加え，試験管ミキサーにかける。次に，液体窒素中に2分間，65℃のヒートブロックに3分間置き，凍結融解を5回繰り返す。ProteinaseKを20μl入れ，試験管ミキサーにかけ，55℃のヒートブロックに1時間置く。その後，試験管ミキサーに15秒かけ，1秒間遠心分離を行う。Buffer ALを200μl加え，試験管ミキサーにより攪拌し，1秒間遠心分離を行う。70℃のヒートブロックに10分間おく。エタノール(99.5%)を200μl加え，試験管ミキサーにより攪拌した後，1秒間遠心分離をする。その後，マイクロピペッターの目盛を800μlに合わせ，試料をDNeasy Mini Columnに移し替え，遠心分離(8000rpm，3分間)をする。下の液の入ったコレクションチューブは捨て，Mini Columnを新しい2mlコレクションチューブの上にセットする。Buffer AW1を500μl加え，遠心分離(8000rpm，3分間)する。下の液の入ったコレクションチューブは捨て，新しい2mlコレクションチューブの上にMini Columnをセットする。Buffer AW2を500μl加え，遠心分離(11000rpm，5分間)する。下の液の入ったコレクションチューブは捨て，Mini Columnを1.5mlのマイクロ遠心管の上にセットする。Buffer AE100μlをMini Columnのフィルター上に乗せ，室温で2分間おいた後，遠心分離(8000rpm，3分間)する。1.5mlマイクロ遠心管中のBuffer AEを100μlのピペットで取り出し，再度，Mini Columnのフィルターの上に乗せ，室温で2分間置く。遠心分離(8000rpm，3分間)を行い，1.5mlマイクロ遠心管中にDNAを回収する。回収したDNA溶液は冷凍庫(−20℃)で保存可能である。

4.4　PCR法による解析対象遺伝子の増幅

クリプトスポリジウムの種を同定するための解析対象遺伝子は，18SrDNAとし，解析対象遺伝子の増幅は，Xiaoら[1)]の方法に準じて行う。DNAの増幅は，AmpliTaq Gold DNA Polymerase（Applied Biosystems社）を用い，ネステッドPCR法により，18SrDNA増幅法を行う[注2]。

PCRキット内のDNAポリメラーゼ以外の試薬を室温で解凍する。下記組成で反応溶液を調製する。DNAポリメラーゼは最後に添加し，ピペッティングにより混和する。

H_2O	15.5μl
10×PCRbuffer	5μl
dNTP(each2mM)	5μl
$MgCl_2$（25mM）	12μl
18S-1-f（10pmol/μl）	1μl
18S-1-r(10pmol/μl)	1μl
DNAポリメラーゼ(5U/μl)	0.5μl
Total	40μl

上記の反応溶液40μlを0.2mlチューブに入れ，これに4.3で抽出したDNA溶液10μlを加え，ピペッティングにより混和する。

次に，サーマルサイクラーを用いて，下記条件でDNA増幅を行う。

Step	温度	時間	サイクル数
1	94℃	12min	1
2	94℃	45sec	35
	55℃	45sec	
	72℃	1min	
3	72℃	10min	1
4	4℃	保温	1

増幅したfirst PCR産物は，冷凍庫(−20℃)で保管する。

次に，キット内のDNAポリメラーゼ以外の試薬を室温で解凍する。下記組成で反応溶液を調製する。DNAポリメラーゼは最後に添加し，ピペッティングにより混和する。

H_2O	53μl
10×PCRbuffer	10μl
dNTP(each2mM)	10μl
$MgCl_2$ (25mM)	12μl
18S-2-f (10pmol/μl)	2μl
18S-2-r(10pmol/μl)	2μl
DNAポリメラーゼ(5U/μl)	1μl
Total	90μl

上記の反応用溶液90μlを0.2mlチューブに入れ，次にfirst PCR産物10μlを加え，ピペッティングにより混和する。サーマルサイクラーを用いて，下記条件で増幅を行う。

Step	温度	時間	サイクル数
1	94℃	12min	1
2	94℃	45sec	35
	55℃	45sec	
	72℃	1min	
3	72℃	10min	1
4	4℃	保温	1

増幅したsecond PCR産物は，冷凍庫(−20℃)で保管する。

次に，以上の操作により，目的DNAが増幅されているかどうかのチェックを電気泳動により行う。アガロース0.8gに電気泳動用バッファー40mlを入れ，よく混ぜた後，電子レンジにかけて溶かし，型に流してアガロースゲルを作る。アガロースゲルを電気泳動用装置にセットする。(予め，ゲルがかぶる程度の電気泳動用バッファーを入れて置く。)適当な大きさのパラフィルムの上にloading Bufferを2μlと100bp DNA Ladderを10μl取り，パラフィルム上でよく混合し，アガロースゲルの凹みに入れる。同様にloading Bufferを2μlとsecond PCR産物10μlをパラフィルム上で混合し，アガロースゲルの凹みに入れる。電気泳動装置の電源を入れ，

30分後，ゲルを取り出し，SYBR Gold染色液(1/10000に希釈)の入った容器（暗箱）に移し，マイルドミキサーで15分間振盪する。ゲルを電気泳動バッファー（洗浄用）の入った容器(暗箱)に移し，マイルドミキサーで15分間振盪する。ラップをかけたUVトランスイルミネーター上にゲルを置き，UVを照射し，増幅産物を確認する。

4.5　アガロースゲルからのDNA抽出法

PCR産物が確認されたDNA溶液（second PCR産物90μl）の中にloading Buffer 18μlを入れ，よくピペッティングし，50μlをゲル中の大きめに作った凹みにセットし，電気泳動を行う。

800bp付近にあるPCR増幅産物を火炎処理したカッターナイフを用いて切出し，1.5m1チューブに移す。ゲルを溶解しやすくするために2㎜程度に刻むと良い。GENECLEAN Ⅱキットに添付されているNaI700μ1（ゲルの3倍以上を添加）を加え，転倒混和し，溶解する。室温でゲルが溶解しない場合は45℃のヒートブロックで5分間保温し，完全にゲルを溶解する。グラスミルクは使用前にボルテックスを使ってよく懸濁し，5μlを溶解したゲル中に添加する。その後，5分間転倒混和して5分間室温で静置する。その後，遠心分離(11,000rpm，5分間）を行い，上清を除去する。次に，700μlのNewバッファーを加えてペレットを混濁する。遠心分離(11,000rpm，5分間）後，上清を除去する。この工程を2回繰り返す。最後のNewバッファーは若干のグラスミルクを吸い上げても良いのでピペットを用いて完全に上清を除去する。室温で5分間静置してペレットを乾かし，エタノールを除去する。滅菌水(DNase・RNase free)を20μl加えてペレットを完全に懸濁する。遠心分離(11,000rpm，5分間）後，上清を0.5mlチューブに回収する。その際に，グラスミルクはPCRを阻害するので完全に除去する。再度，0.5mlチューブを遠心分離(11000rpm，5分間)し，8μlにセットしたピペットで2回，計16μlの上清を0.2mlのチューブに回収する。回収したDNA溶液は，冷凍庫(−20℃)で保管する。

4.6　シークエンス反応

シークエンス反応は，BigDye Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems社）を用い[注3]，それぞれの塩基に異なった色の蛍光を標識する。

Kitのプレミックス試薬は，氷上で解凍し，下記組成で反応溶液を調整する。プレミックス試薬は最後に添加し，ピペッティングにより混和する。プライマーは，18S-2-fと18S-2-rを利用し，別々に反応溶液を調整する。[注4]

H_2O	6μl
プライマー（1pmol/μ1）	4μl
DNA溶液	2μl
プレッミクス	8μl
Total	20μl

なお，シークエンス反応に供するDNA量は下表のとおりである。アガロースゲル電気泳動の発色強度からDNA濃度を概算する。

PCR産物の大きさ(bp)	DNA量(ng)
100～200	1～3
200～500	3～10
500～1000	5～20
1000～2000	10～40
>2000	40～100

サーマルサイクラーを下記プログラムにセットし，DNAの蛍光標識を行う。

Step	温度	時間	サイクル数
1	96℃	1min	1
2	96℃	10sec	25
	50℃	5sec	
	60℃	4min	
3	72℃	7min	1
4	4℃	保温	

次に，Centri-sep スピンカラムによる余剰の蛍光標識の除去を行う。タッピングにより，スピンカラム内の乾燥ゲルをカラムの底に集める。上蓋を開けて 800μl の滅菌水を加え，蓋をする。試験管ミキサーでよく撹拌して乾燥ゲルを水和させ，30分以上室温で静置する。水和したカラムは4℃で数日間保管可能である。転倒混和，タッピングにより気泡を除き，スラリー状のゲルをカラムの底に集める。カラムの上蓋を空けた後，下蓋を空け，洗浄用チューブにセットする。カラム内の滅菌水をゲル表面まで自然落下させる。捕集した滅菌水は廃棄する。カラムを洗浄用チューブにセットし，遠心分離(3000rpm，2 分間)する。カラムを洗浄用チューブから取り外し，カラムの底に水滴がついている場合はマイクロピペッターで取り除く。ゲル表面を乱さないように，ゲルの上部中央にサンプル(シークエンス反応後の溶液 20μl)を乗せる。このとき，サンプルがカラムの内壁に触れないように注意する。サンプルコレクションチューブにカラムを移し[注5]遠心分離(3000rpm，2分間)する。回収したDNA溶液は，遠心エバポレーターで乾燥する。

サンプルにローディングバッファー（脱イオンホルムアミド：ローディングダイ＝5：1）を 6μl 入れ，ピペッティングしてよく溶かす。

4.7 塩基配列の決定法

4.7.1 ゲルプレートのセッティング

DNAシーケンサー(ABI PRISM 377 DNasequencing System：Applied Biosystems 社製)を使用し，増幅したDNAの塩基配列を決定する。シーケンス用ガラス板を始めて使用する時やゲルイメージの後半に赤い縦線が入るような時は，下記のアルカリ処理を行ってから使用する。水

酸化カリウム 5 粒程度を，99.5%エタノール 50ml で溶解し，KOH 溶液を作る。ケイドライなどに KOH 溶液を含ませて，ガラス板の内側を磨く。ガラス板の表面が白濁したら水道水で十分に洗浄する。次に，BIO NOX 溶液でガラス板の両面を十分に洗浄する。(BIO NOX 5g は予め，500ml のイオン交換水に溶かし，洗瓶等に入れておく。)水道水で十分に BIO NOX 溶液を洗い流した後，イオン交換水をガラス板両面にかける。ガラス板を風乾もしくは，エタノール溶液をかけ乾燥させる。ケイドライ等にイソプロパノールを含ませ，ガラス板のゲル面を磨く。ゲルカセットを水平な台に置き，クランプを開いた位置(つまみを縦)にし，プレーンガラス板の切り欠きを下側にしてゲルカセットにゲル面を上にしてのせる。スペーサーを外枠に合わせ，ガラスの両側に置き，ノッチガラス板を重ねる。ガラス板下の切り欠きが，ゲルカセットのアライメトピンにしっかり接触しているか確認する。クランプでガラス板を固定し，ガラス板の底面がずれていないか確認する。

次に，LongRanger SinglePack（TAKARA 社製）のゲルパックを開け，中の黒いクリップを外し，手で 1 分間良く混合する。 ゲルパックを中速のシェーカー又は手で，5 分間振とうさせた後，手で 1 分間良く混合する。更にゲルパックを中速のシェーカー又は，手で 5 分間振とうさせる。赤いクリップを外し，手で 1 分間良く混合(重合)する。白いクリップを外し，パックを FOLD LINE まで折りたたみ，ゲル溶液をフィルター方向に移動する。カットマークを上にしてパックを持ち，CUT と記してある部分のコーナーをはさみで切る。ゲルパックを絞りながら，ビーカーにゲル溶液を出す。乾燥したシリンジ(50ml)に気泡を混合しないようにゲル溶液を吸入する。

ガラス板のノッチ側からゲル溶液を流し込む。ガラス板に傾斜をつけると，流し込みやすい。ゲル溶液の流入部先端を見て，気泡が生じそうになったら，ガラス板を軽くたたく。ゲル溶液がゲル板底部まで十分に満たしたら，ゲルの注入をやめる。乾燥したキャスティングコームの平らなほうをノッチ部（上部）に差し込む。コーム先端に気泡がないか確認し，気泡がある場合は一度コームを抜いて薄い板などで取り除く。ガラス板のノッチ部分の両端のクランプを下向きにし，クリアブレースの両側のピン(Side peg)がクランプの上になるように取り付ける。クリアブレース横のクランプを回して固定する。ゲルの乾燥を防ぐためにゲル板の底部をテープ等で覆う。ゲルは重合後 2 時間から 6 時間以内で使用する。

4.7.2 装置のセットアップ

ゲルカセットの上部の 2 つのクランプを回して，クリアブレースとバックサポートを取り外す。キャスティングコームをゆっくり抜き取る。ガラス板のノッチ部分の余分なゲルの小片は，電気泳動のパターンに影響を与えるため，薄いプラスチックの板を利用して除去する。乾燥している場合は，イオン交換水をかける。ビームストップを下に倒し，クランプを回してビームストップを固定する。コームのセンターマーカーを，ガラス板のセンターマーカーに合わせて，ペーパーシャークティースコームを挿入する。コームの歯の先端をゲルの表面に少しだけ差し込み(0.5mm 位)，すべての歯をゲル表面に接触させる。アッパーバッファーチャンバの上端の突起部を，ガラス板の上端に引っ掛かるようにセットし，チャンバーの両側のクランプを回してアッパーバッファーチャンバーを固定する。

装置本体（ABI PRISM 377）のフロントドアを開け，ロアーバッファチャンバーを装置内部の下部の棚に置く。装置内部の4つのカセットクランプを縦向きにし，ゲルカセットをカセットクランプの内側に掛けるように装着する。カセットを装置に押し付け，4ケ所のクランプを横向きに回し，カセットを固定する。ガラス板下部の切り欠き部分のスペーサと位置調整ピンが接触し，ガラス板の下部がロアーバッファチャンバーの中に入ることを確認する。上下のバッファチャンバーの電極ケーブルをコネクタにそれぞれ差し込む。

4.7.3　ソフトウェアのセットアップ

装置本体のドアが閉じていることを確認し，電源を入れる。Macintoshを起動，あるいは再起動する。装置のグリーンのステータスライト(LED ランプ)が点灯していることを確認し，ABI PRISM 377 Co11ectionソフトウェアを起動する。Fi1eメニューからNewを選択し，Sequence Samp1e をクリックし，サンプル名を入力する。DyeSet/Phrimer(モビリティファイル)を各サンプルについて設定する。Instrument Fi1e(マトリックスファイル)を各サンプルについて設定し，サンプルシートを保存し，閉じる。

4.7.4　シークエンスラン

装置本体のドアを閉じ，カチッと音がしてから，Runウインドウの Plate Checkボタンをクリックする。スキャン画面上の4本のラインが水平かつ平行であることを確認する。プレートが汚れている場合，Pauseをクリックしてガラス表面の汚れを拭き，Resumeをクリックして，再びプレートチェックを行う。アッパーバッファチャンバーに，1×TBEバッファを約660ml注ぎ，漏れがないか確認する。次に，ロアーバッファチャンバーに1×TBEバッファを約600ml入れる。バッファをシリンジに取り，針先(チップの先端)をコームの間に当て，ウェルをフラッシュする。装置本体のドアを閉じ，カチッと音がしてから，PreRun をクリックする。PreRun の間に，4.6 の処理を行った試料を，95℃で4分間ヒートショック(熱変性)を行う。加熱後，すぐにサンプルを氷上に置き急冷する。ランファイル上のPauseをクリックし，装置ドアを開け，シリンジですべてのウェルをフラッシュする。まず，奇数番号のウェルにサンプルを1.5μlアプライする。ドアを閉め，ランファイル上のResumeをクリックし，5分間，プレランを行う。ランファイル上のCancelをクリックし，装置ドアを開け，ゲルプレートよりペーパーコームを抜き取る。アッパーバッファチャンバーにふたを取り付け，ドアを閉じる。Runボタンをクリックし，Gel File名，保存先を指定し，OKを押す。塩基の読み取りには約12時間要する[注6]。

4.7.5 ラン後の洗浄

ランが終了したら，装置本体の電源を切る。上下両方のチャンバーのバッファを廃棄する。電極ケーブル(赤，黒の2本)を外し，ゲルカセットを取り外す。ロアーバッファーチャンバーを取り外し，水洗いし，風乾させる。クランプを縦向きし，アッパーバッファチャンバーを取り外して水洗いし，風乾させる。水で湿らせたキムワイプ等でリア放熱プレートおよび位置調整ピンを拭いて付着物が残らないようにする。ゲルカセットのクランプをすべて縦向きにして，ゲル板を

ゲルカセットから取り外し，ゲルカセットは水洗いし，イオン交換水で洗浄し風乾させる。（ゲルカセットは有機溶媒を使用しない）スパチュラなどをガラス板の底部に入れ，2枚のガラス板をゆっくりと離す。コームとスペーサは，水洗いした後，イオン交換水でリンスして風乾させる。ガラス板のゲルの上にキムタオル等を乗せて除去し，廃棄する。ガラス板にゲルを残さないように柔らかいスポンジなどを使い流水で洗浄し，イオン交換水でガラスの両面をリンスしておく。ガラス板は風乾させる。

4.8　データ解析法

ラン終了後，ABI377は読み取られた蛍光データを自動的に解析し，個々のサンプルは，サンプルファイルとして保存されている。自動解析が正しく行われたかどうかを確認するため，Gel Fileを開き，サンプルシートの設定どおりに個々のサンプルが正しく認識されているかどうかを確認する。[注7]レーンのシフト修正や泳動パターンに合わせてトラッキングラインを修正する。修正後，Gelメニューから Extract Laneを選択し，サンプルファイルを修正する。

次に，AutoAssembler(Applied Biosystems社製)を用いて，読み取った塩基配列を繋ぎ合わせる。AutoAssemblerを起動し，Fileメニューから Newを選び，Projectウインドウを表示する。Projectメニューから Add Multip1eを選択する。繋ぎ合わせたいサンプルを選択し，Addボタンを押す。サンプルがProjectウインドウに移ったら，Doneを押す。Projectメニューから，Assembly Setupを選び，Engineを選択し Submitを押す。自動的に DNAが繋ぎ合わされる。アライメントビューから，繋ぎ合わせたシーケンスファイルを選び，Electropherogramを選ぶ。センス側とアンチセンス側の塩基配列を比較しながら，正しい塩基が選択されているかどうかを確認する。不要の塩基や，正しい塩基のタイプ，プライマー塩基配列部分を削除し，修正する。編集終了後，Fileメニューから，Saveを選びプロジェクトを保存する。次に，Projectメニューから Bui1d Consensusを選び，OKをクツリクし，コンセンサスシーケンスデーターを作る。Fileメニューの Exportから Textを選び，コンセンサスシーケンスをテキストファイルに変換する。

次に，決定された塩基配列の相同性検索を行う。相同性検索は，日本DNAデータバンクの相同性検索(FASTA)を利用する。インターネットエクスプローラーなどで日本DNAデータバンクのホームページにアクセス(http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html)し，データベース検索内の相同性検索を選択する。次に FASTAを選択する。プログラムは，fasta(DNA配列 X DNA配列 DB)を選択し，決定した塩基配列をコピ&ペーストし，自分のメールアドレスを入力し，入力内容の送信を押す。

約1時間後に，相同性検索結果が戻ってくる。相同性検索結果より，データベースに登録されているクリプトスポリジウムの中で，もっとも塩基配列が一致した Accession番号を記録する。日本DNAデータバンクのホームページ内の getentryを選択し，記録した Accession番号を入力し，検索をクリックする。そして，クリプトスポリジウムの種[注8]や宿主に関する情報を入手する。

注１　検査水量は，顕微鏡観察でオーシストが２個以上検出できる水量とする。

注２　解析対象領域は下記のとおり(GeneBank:AF164102 より)

```
   1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct aagtataaac ttttatacgg ttaaactgcg aatggctcat tataacagtt atagtttact
 121 tgataatctt tacttacatg gataaccgtg gtaattctag agctaataca tgcgaaaaaa ctcgacttta tggaagggtt gtatttatta gataaagaac caatataatt ggtgactcat
 241 aataacttta cggatcacat taaatgtgac atatcattca agtttctgac ctatcagctt tagacggtag ggtattggcc taccgtggca atgacgggta acggggaatt agggttcgat
 361 tccggagagg gagcctgaga aacggctacc acatctaagg aaggcagcag gcgcgcaaat tacccaatcc taatacaggg aggtagtgac aagaaataac aatacaggac tttttggttt
 481 tgtaattgga atgagttaag tataaacccc tttacaagta tcaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa
 601 aagctcgtag ttggatttct gttaataatt tatataaaat attttgatga atatttatat aatattaaca taattcatat tactatatat tttagtatat gaaattttac tttgagaaaa
 721 ttagagtgct taaagcaggc atatgccttg aatactccag catggaataa tattaaagat ttttatcttt cttattggtt ctaagataag aataatgatt aatagggaca gttgggggca
 841 tttgtattta acagtcagag gtgaaattct tagatttgtt aaagacaaac taatgcgaaa gcatttgcca aggatgtttt cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagacgatca
 961 gataccgtcg tagtcttaac ataaactat gccaactaga gattggaggt tgttccttac tccttcagca ccttatgaga aatcaaagtc tttgggttct gggggagta tggtcgcaag
1081 gctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccagga gtggagcctg cggcttaatt tgactcaaca cgggaaaact caccaggtcc agacatagga aggattgaca gattgatagc
1201 tctttcttga ttctatgggt ggtggtgcat ggccgttctt agttggtgga gtgatttgtc tggttaattc cgttaacgaa cgagacctta acctgctaaa tagacataag aaatattata
1321 ttttttatct gtcttcttag agggactttg tatgtttaat acagggaagt tttaggcaat aacaggtctg tgatgccctt agatgtcctg ggccgcgcgc gcgctacact gatgcatcca
1441 tcaagtatat attcctgttt cgaaggaaat gggtaatctt ttgaatatgc atcgtgatgg ggatagatca ttgcaattat tgatcttgaa cgaggaattc ctagtaagcg caagtcatca
1561 gcttgcgctg attacgtccc tgccctttgt acacaccgcc cgtcgctcct accgattgaa tgatccggtg aattattcgg accatacttt gtagcaatac atgtaaggaa agtttcgtaa
1681 accttatcat ttagaggaag gagaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcggaa ggatca
```

青色　ファースト PCR でのプライマーの位置

赤色　セカンド PCR でのプライマーの位置

緑色　解析対象領域（835bp）

注３　BigDyeTerminatorv3.1CycleSequencing Kit で反応が止まる場合は，dGTP BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems 社製）または，DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(Amershum 社製) を利用する。

注４　DNA の２本鎖の両側を読む。

注５　遠心機にセットするときは，ゲルの最も高いヵ所が常にローターの外側になるようにする。

注６　電気泳動は，夜間に行い，翌日，DNA 解析を行うようにする。

注７　波形の重なりや，どのシーケンシング反応試薬を用いても反応が進まない場合は，２種類以上の異なる種のクリプトスポリジウムが混在している可能性がある。この場合，クローニング法または，マイクロマニュピレーターにより１個のオーシストからの DNA 抽出を行う必要がある。このようなときには，土木研究所まで相談されたい。

注８　クリプトスポリジウムパルブムの遺伝子型を見分ける場合は，heat shock protein 遺伝子を解析対象とすることが望ましいと考えられる。heat shock protein 解析対象とする場合は，土木研究所まで相談されたい。

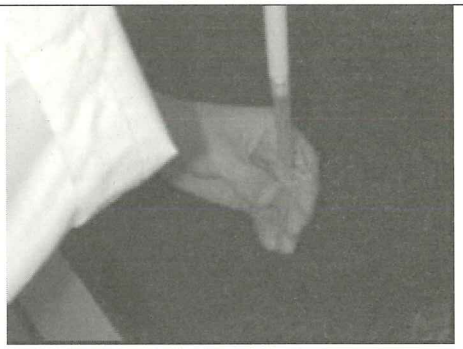
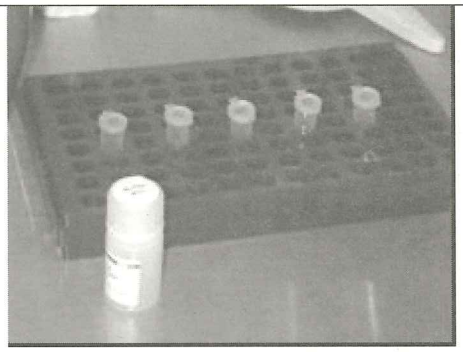
【参考文献】

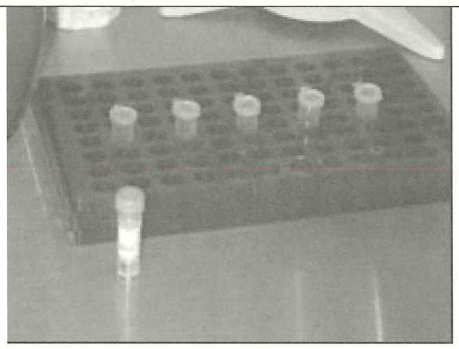
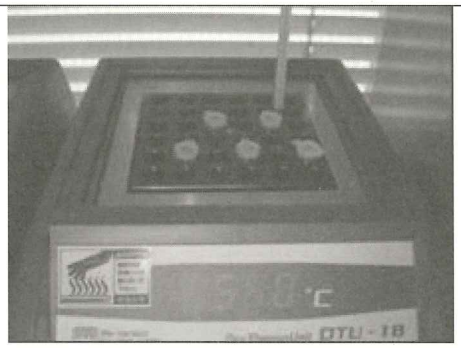
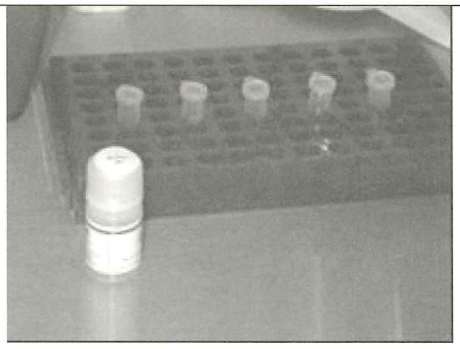
1)　Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA

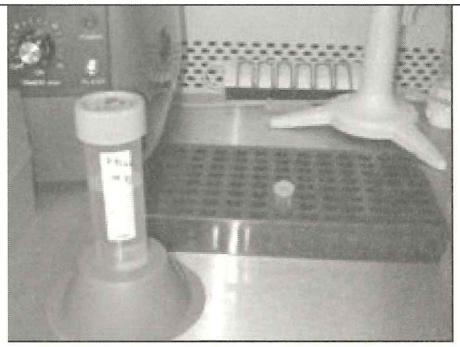
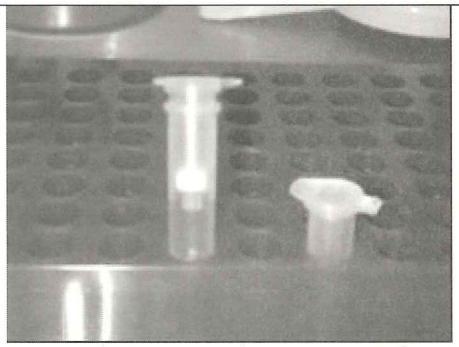
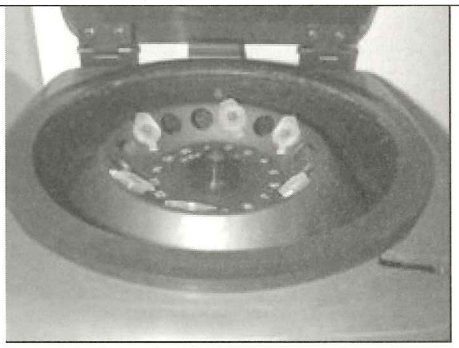
Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Water with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Dec;66(12):5492-8

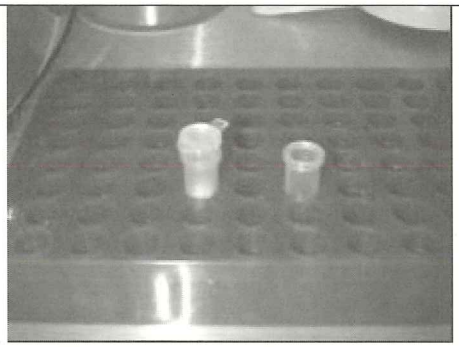
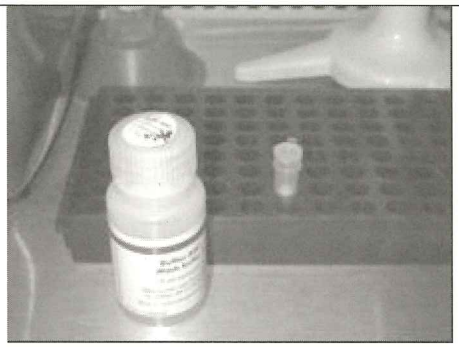
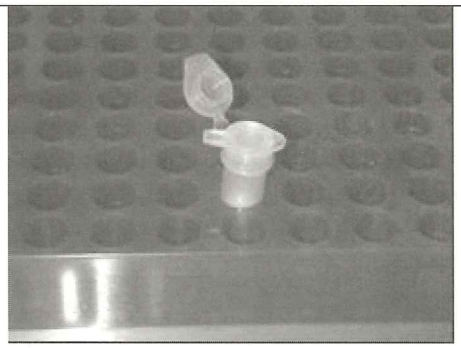
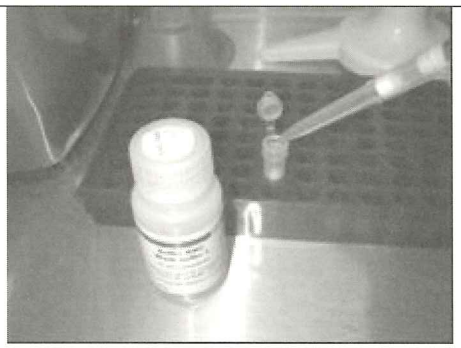
4.9　クリプトスポリジウムの遺伝子型解析方法のフロー

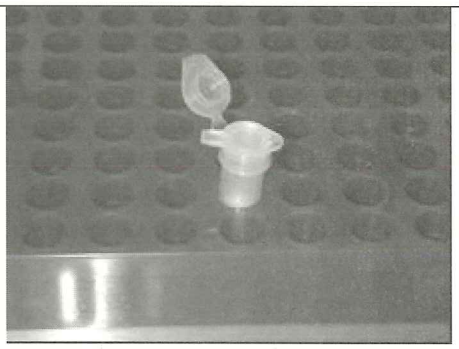
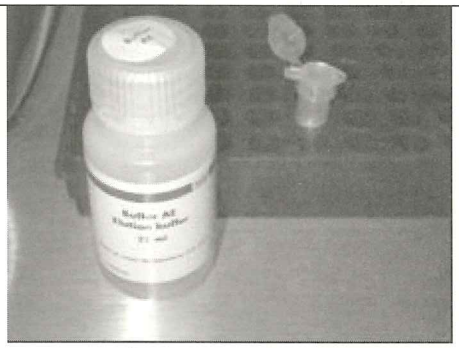
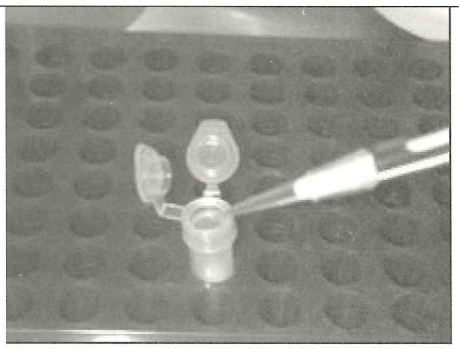
1)　オーシストからのDNA精製

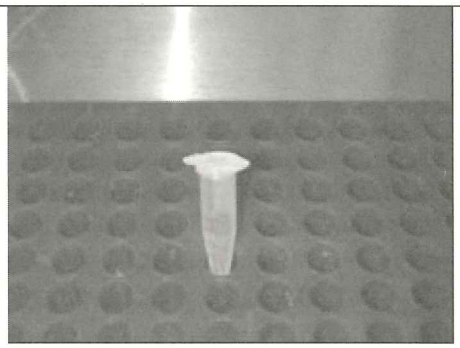
1　3.3.2）の免疫磁気ビーズ法でオーシストを回収した試料を遠心分離(11000rpm，5 分間)し，100µl まで上澄み液を取る。	
2　DNeay Tissue Kit（ｷｱｹﾞﾝ社製）の Buffer ATL を 180µl 加え，試験管ミキサーにかける。	
3　液体窒素の中に 2 分間入れて凍結させる。	
4　65℃に設定したヒートブロックの中に 3 分間置き融解させる。3,4 の工程を 5 回繰り返し行う。	

5　Proteinase K を 20μl 入れ，試験管ミキサーにかける。	
6　ヒートブロック（55℃）で 1 時間置く。	
7　試験管ミキサーに 15 秒かけ，遠心分離機に 1 秒間かける。	
8　Buffer AL を 200μl 入れ，ボルテックスし，遠心分離に 1 秒間かける。	

9　ヒートブロック（70℃）で10分間おく。	
10　エタノール(99.5%)を200μl入れ，試験管ミキサーにかけ，遠心分離（1秒間）をする。	
11　マイクロピペッターの目盛を800μlに合わせ，DNeasy Mini Columnに移し替える。	
12　遠心分離(8000rpm，3分間)する。	

13　下の液の入ったチューブは捨て，新しい2mlコレクションチューブの上にセットする。	
14　Buffer AW1を500µlを加え，遠心分離(8000rpm，3分間)する。	
15　下の液の入ったチューブは捨て，新しい 2ml コレクションチューブの上にセットする。	
16　Buffer AW2 を 500 µl 加え，遠心分離(11000rpm，5 分間)する。	

17　下の液の入ったチューブを捨て，1.5ml のマイクロ遠心管の上にセットする。	
18　Buffer AE100μlをDNeasy Mini Columnのフィルターの中央に落とし，室温で2分間おく。	
19　遠心分離(8000rpm，3分間)をする。	
20　マイクロ遠心管中のBuffer AE液100μlのピペットで取り，再度，DNeasy Mini Columnのフィルターの中央に乗せ，室温で2分間置く。	

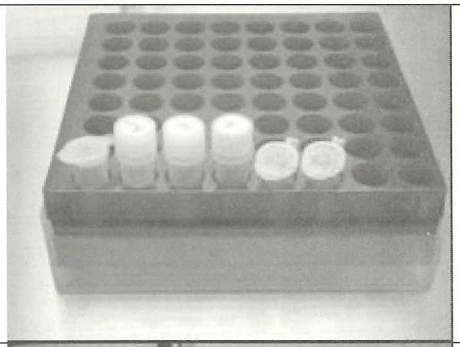
21　遠心分離(8000rpm，3分間)をする。	
22　冷凍庫(−20℃)で保管する。	

【注意】　DNaseのコンタミネーションを防ぐため，全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。

2)　PCR 法　　【first PCR】

1　キット内の DNA ポリメラーゼ以外の試薬を室温で解凍する。

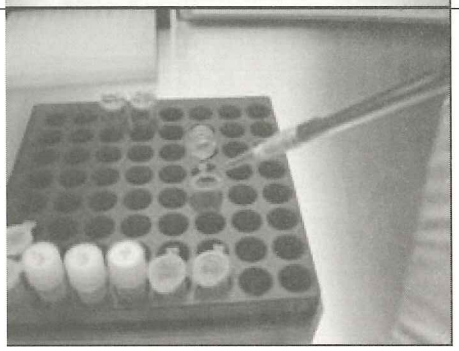
【注意】　DNase のコンタミネーションを防ぐため全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。



2　下記組成で反応溶液を調製する。DNA ポリメラーゼは最後に添加し，ピペッティングにより混和する。

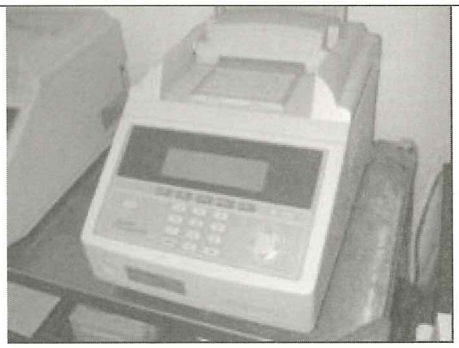
H_2O	15.5 μl
10×PCRbuffer	5 μl
dNTP(each2mM)	5 μl
$MgCl_2$（25mM）	12 μl
18S-1-f（10pmol/μl）	1 μl
18S-1-r(10pmol/μl)	1 μl
DNA ポリメラーゼ(5U/μl)	0.5 μl
Total	40 μl

上記の反応溶液 40 μl をチューブに入れた中に DNA 溶液 10 μl を入れ，ピペッティングにより混和する。

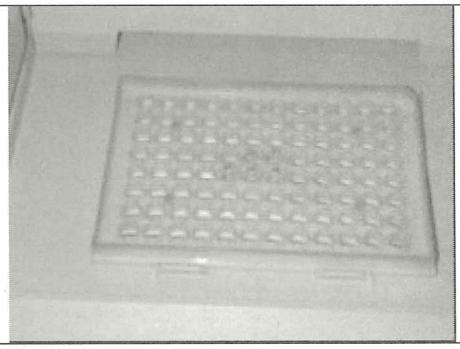


3　サーマルサイクラーを用いて，下記条件で増幅を行う。

Step	温度	時間	サイクル数
1	94℃	12min	1
2	94℃	45sec	35
	55℃	45sec	
	72℃	1min	
3	72℃	10min	1
4	4℃	保温	1



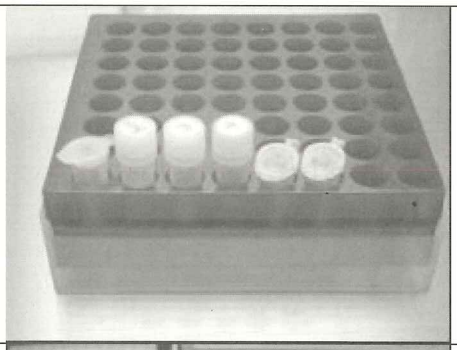
4　First PCR 産物は，冷凍庫(−20℃)で保管する



【second PCR】

1　キット内の DNA ポリメラーゼ以外の試薬を室温で解凍する。

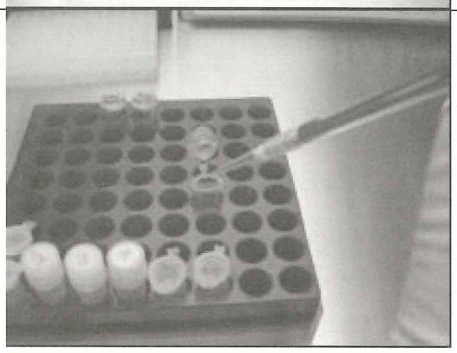
【注意】　DNase のコンタミネーションを防ぐため全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。



2　下記組成で反応溶液を調製する。DNA ポリメラーゼは最後に添加し，ピペッティングにより混和する。

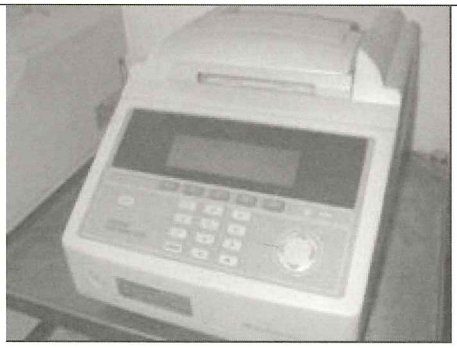
H_2O	53μl
10×PCRbuffer	10μl
dNTP(each2mM)	10μl
$MgCl_2$（25mM）	12μl
18S-2-f（10pmol/μl）	2μl
18S-2-r(10pmol/μl)	2μl
DNA ポリメラーゼ(5U/μl)	1μl
Total	90μl

上記の反応溶液 90μl をチューブに入れた中に first PCR 産物 10μl を入れ，ピペッティングにより混和する。

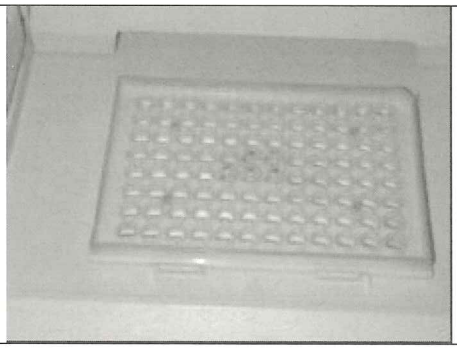


3　サーマルサイクラーを用いて，下記条件で増幅を行う。

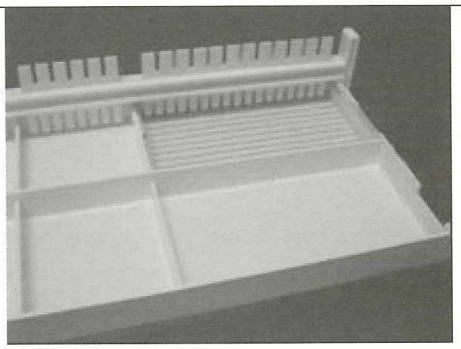
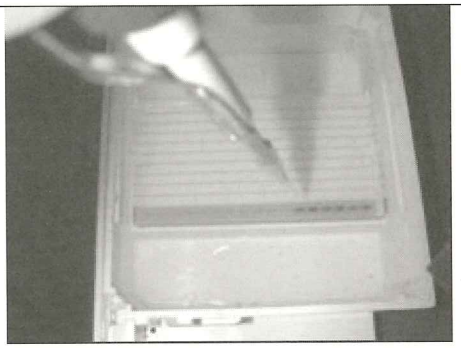
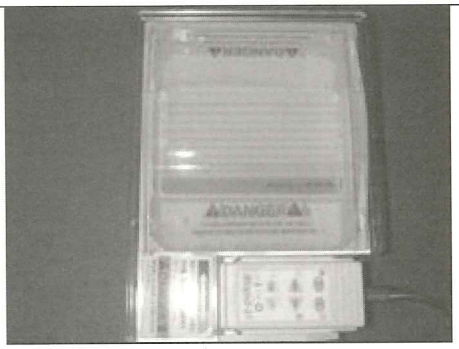
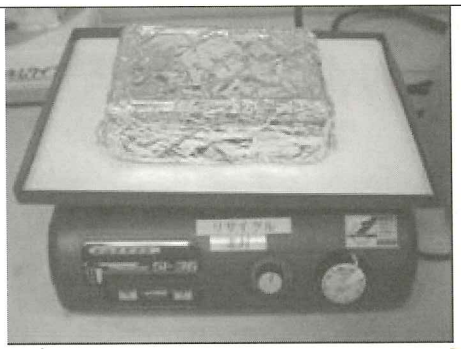
StePP	温度	時間	サイクル数
1	94℃	12min	1
2	94℃	45sec	35
	55℃	45sec	
	72℃	1min	
3	72℃	10min	1
4	4℃	保温	1

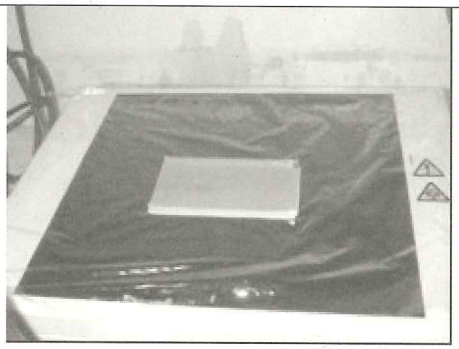
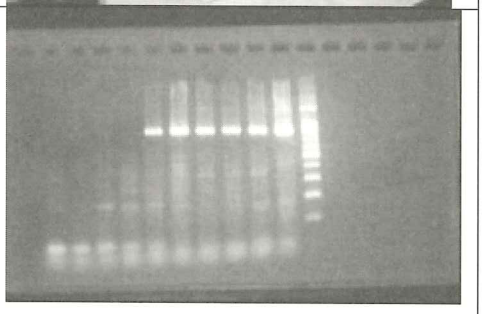


4　Second PCR 産物は，冷凍庫(−20℃)で保管する



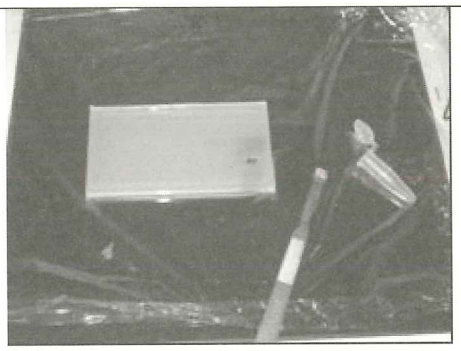
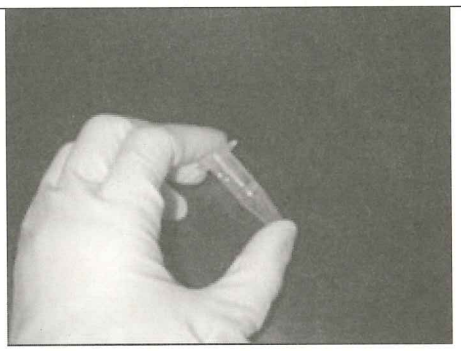
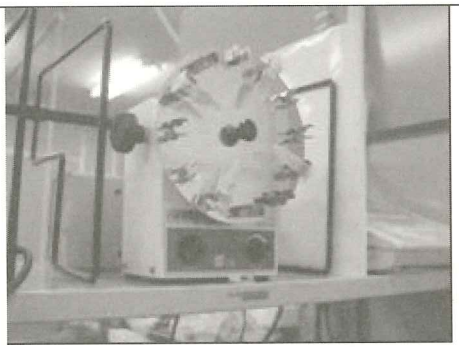
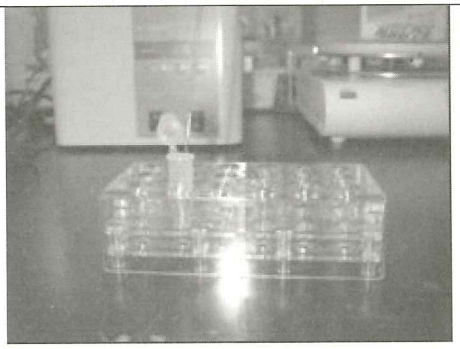
3) アガロースゲル電気泳動法

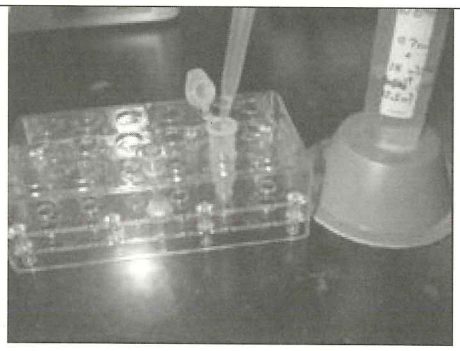
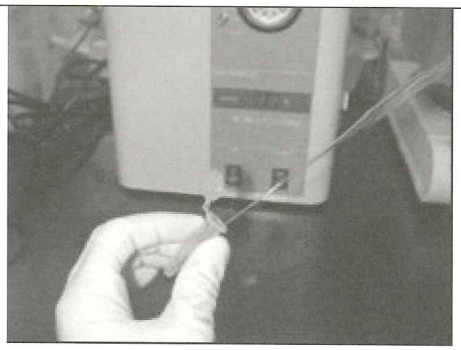
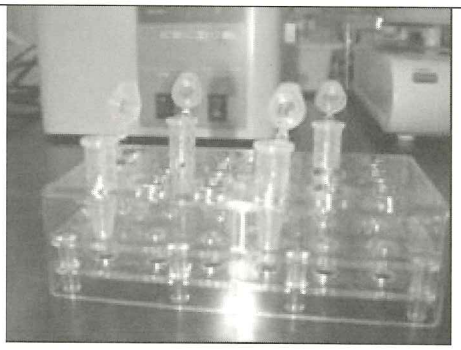
1　アガロース 0.8g に電気泳動用バッファー40ml を入れ，よく混ぜた後，電子レンジにかけて溶かし，型に流してアガロースゲルを作る。	
2　適当な大きさのパラフィルムの上に loading Buffer を 2μl と 100bp　DNA　Ladder を 10μl 取り，よくピペッティングし，アガロースゲルの凹みに入れてセットする。同じように loading Buffer を 2μl と second PCR 産物 10μl をし，パラフィルム上で混合し，アガロースゲルの凹みに入れる。	
3　電気泳動装置の電源を入れる。	
4　30 分後，ゲルを取り出し，SYBR Gold 染色液の入った容器（暗箱）に移し，マイルドミキサーで 15 分間振盪させる。	

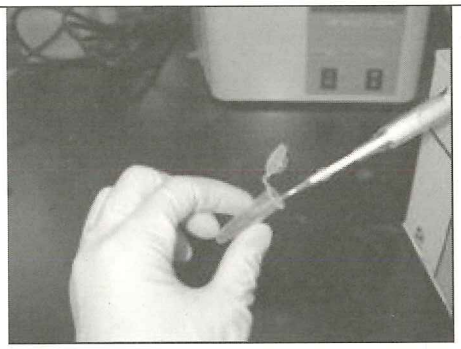
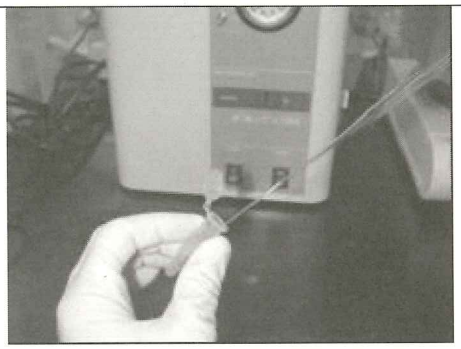
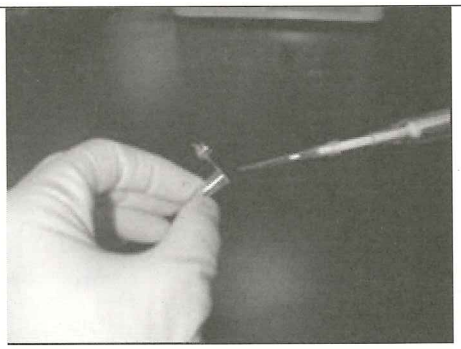
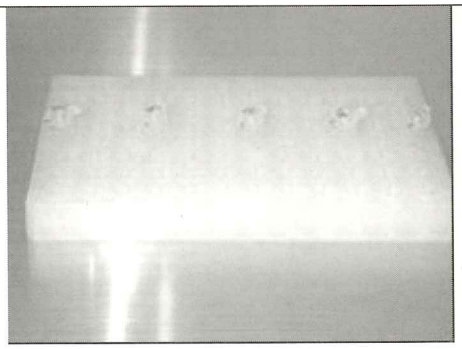
5　ゲルを電気泳動バッファー（洗浄用）の入った容器(暗箱)に移し，マイルドミキサーで 15 分間振盪させる。	
6　ラップをかけた UV トランスイルミネーター上にゲルを置く。	
7　UV を照射し・増幅産物を確認する。	
8　電気泳動の写真 800bp 付近にバンドがあることを確認する。	

・DNase のコンタミネーションを防ぐため，全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。

4) DNA 溶液の精製－GENECLEAN II Kit

1　火炎処理したカッターナイフを用いて目的の増幅産物を切出し，1.5m1 チューブに移す。ゲルを溶解しやすくするために 2mm 程度に刻むと良い。	
2　NaI を 700μ1（ゲルの 3 倍以上を添加）加え，転倒混和する。室温でゲルが溶解しない場合は 45℃のヒートブロックで 5 分間保温し完全にゲルを溶解する。	
3　グラスミルクを 5μl 添加し，5 分間転倒混和して 5 分間室温で静置する。（グラスミルクは使用前にボルテックスを使ってよく懸濁する。）	
4　遠心分離(11,000rpm，5 分間）後，上清を除去する。	

5　700μlのNewバッファーを加えてペレットを混濁する。	
6　　遠心分離(11,000rpm，5分間）後，上清を除去する。	
7　5，6をさらに，2回繰り返す。最後のNEWバッファーは若干のグラスミルクを吸い上げても良いのでピペットを用いて完全に上清を除去する。	
8　室温で5分間静置してペレットを乾かし，エタノールを除去する。	

9　滅菌水(DNase・RNase free)を20μl加えてペレットを完全に懸濁する。	
10　遠心分離(11,000rpm，5 分間) 後，上清を回収し，0.5ml のチューブに入れる。グラスミルクはPCR を阻害するので完全に除去する。	
11　遠心分離(11000rpm，5 分間)後，8μl にセットしたピペットで2 回, 計16μl の上清を0.2ml チューブに回収する。	
12　冷凍庫(−20℃)で保管する。	

・DNase のコンタミネーションを防ぐため，全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。

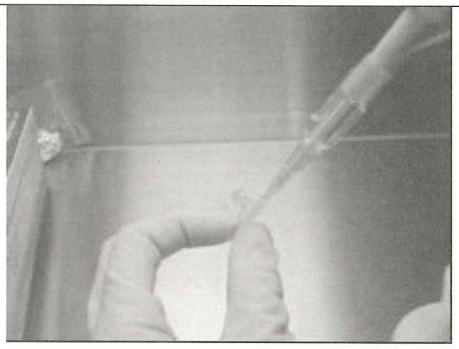
5　シークエンス反応

1　BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems 社）内のプレミックス試薬を氷上で解凍する。



2　下記組成で反応溶液を調整する。プレミックス試薬は最後に添加し，ピペッティングにより混和する。

H_2O	6μl
プライマー（1pmol/μl）	4μl
DNA 溶液	2μl
プレッミクス	8μl
Total	20μl



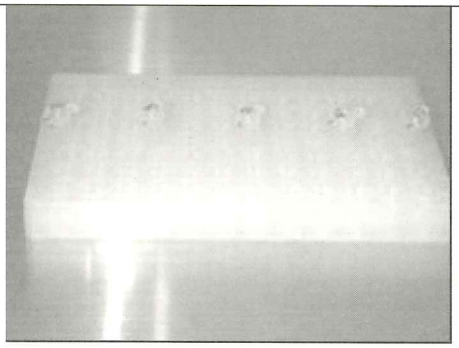
3　サーマルサイクラーを用いて，下記プログラムでシーケンス反応を行う。

Step	温度	時間	サイクル数
1	96℃	1min	1
2	96℃	10sec	25
	50℃	5sec	
	60℃	4min	
3	72℃	7min	1
4	4℃	保温	1



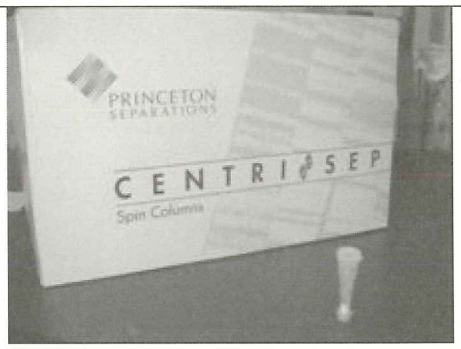
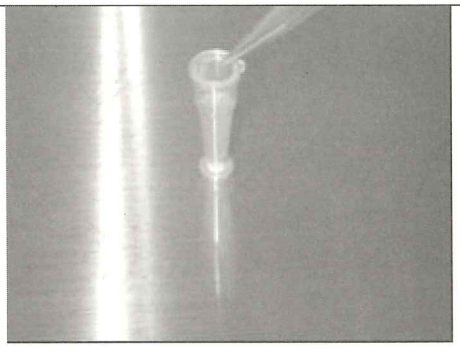
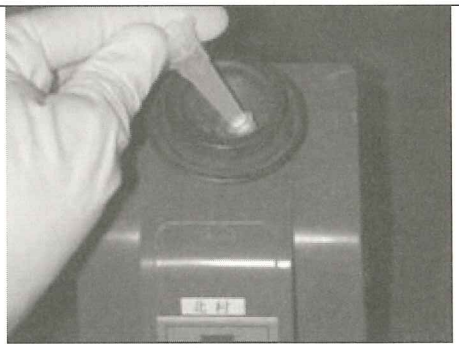
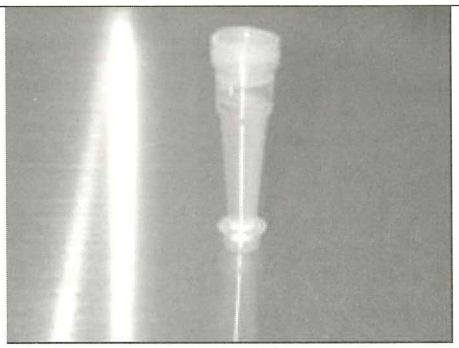
4　PCR 増幅産物を，冷凍庫(−20℃)で保管する。
2 で加える DNA 量は下表のとおりである。アガロースゲル電気泳動の発色強度から DNA 濃度を概算する。

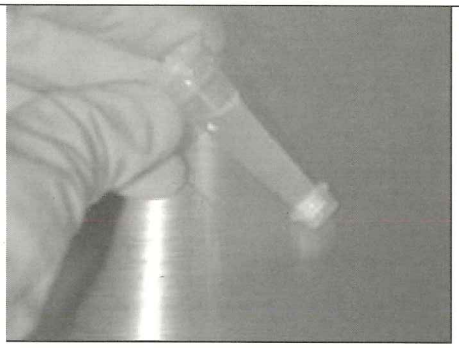
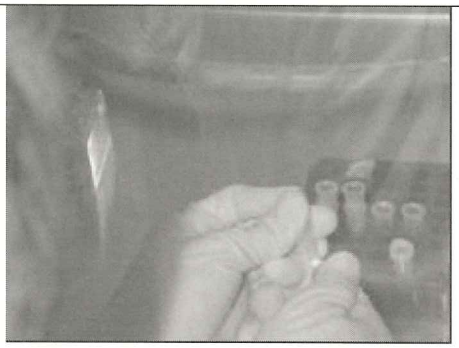
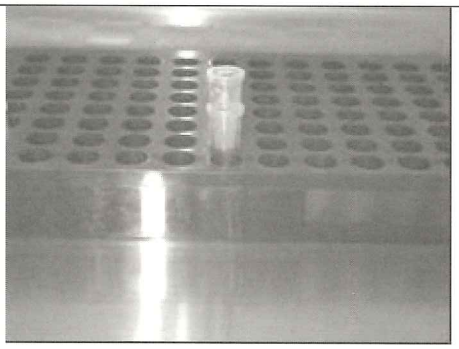
PCR 産物の大きさ(bp)	DNA 量(ng)
100～200	1～3
200～500	3～10
500～1000	5～20
1000～2000	10～40
>2000	40～100

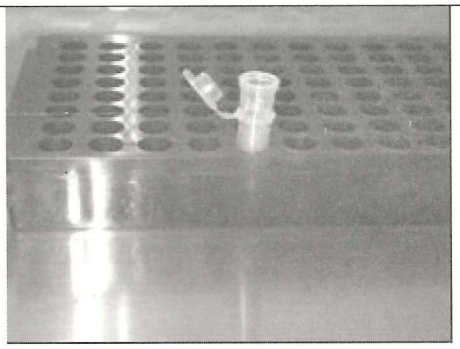


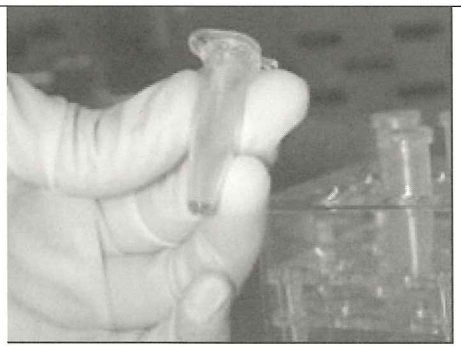
・DNase のコンタミネーションを防ぐため，全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。

6)　DNA の精製－Centri-sep スピンカラム

1　タッピングにより，スピンカラム内の乾燥ゲルをカラムの底に集める。	
2　上蓋をあけて 800 μl の滅菌水を加え，蓋をする。	
3　試験管ミキサーでよく撹拌して乾燥ゲルを水和させる。気泡がある場合は，カラムをたたいて除く。	
4　30 分以上室温で静置する。水和したカラムは 4℃で数日間保管可能である。	

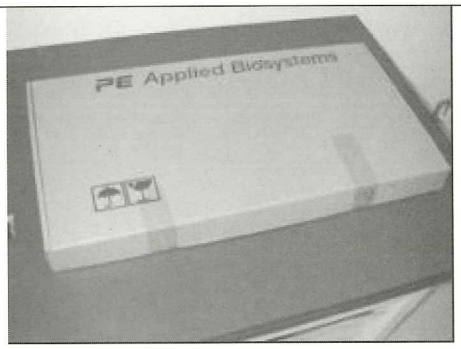
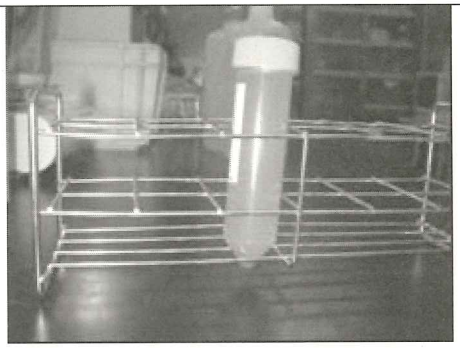
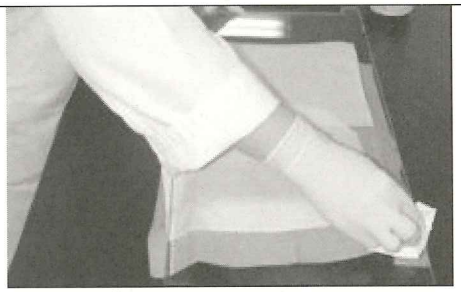
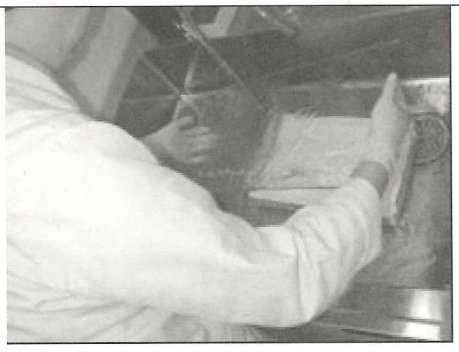
5　転倒混和，タッピングにより気泡を除き，スラリー状のゲルをカラムの底に集める。	
6　上蓋を空けた後，下蓋を空ける。	
7　洗浄用チューブにセットする。	
8　カラム内の滅菌水をゲル表面まで自然落下させ，捕集した滅菌水は，廃棄する。	

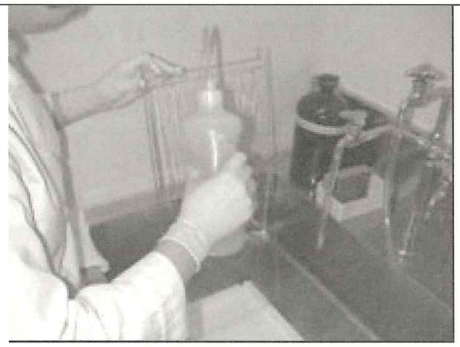
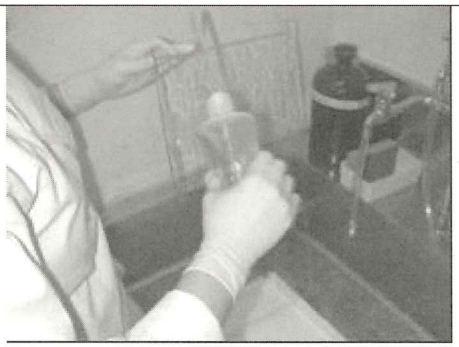
9　カラムを洗浄用チューブにセットし，遠心分離(3000rpm，2分間)する。	
10　カラムを洗浄用チューブから取り外し，カラムの底に水滴がついている場合はピッペターで取り除く。	
11　ゲル表面を乱さないように，ゲルの上部中央にサンプル(シークエンス反応後溶液 20μl)を乗せる。サンプルがカラムの内壁に触れないように注意する。	
12　サンプルコレクションチューブにカラムを移し，遠心機にセットする。このとき，ゲルの最も高いヵ所が常にローターの外側になるようにする。	

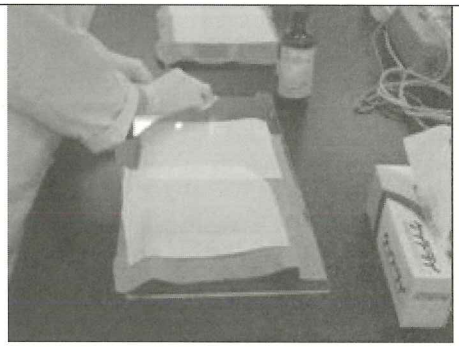
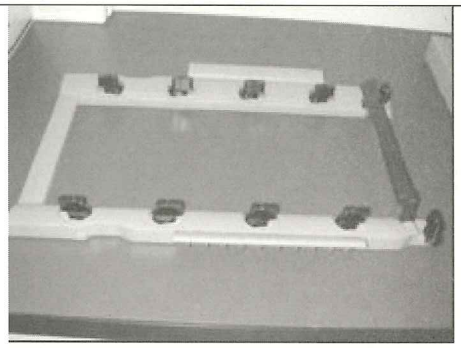
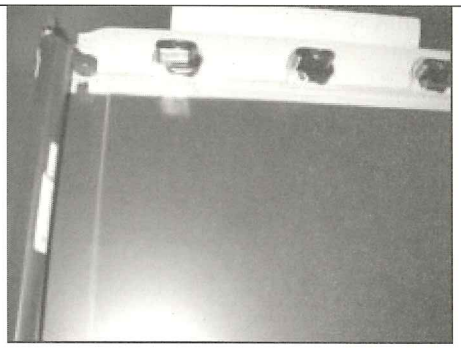
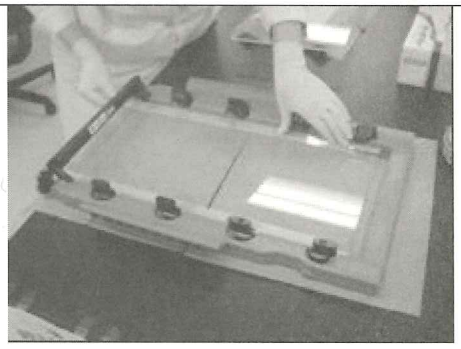
13　遠心分離(3000rpm，2分間)する。	
14　回収した DNA 溶液を遠心エバポレーターで乾燥する。	
15　サンプルにローディングバッファー(脱イオンホルムアミド：ローディングダイ＝5：1) を6μ1入れ，ピペッティングしてよく溶かす。	
16　冷凍庫(−20℃)で保管する。	

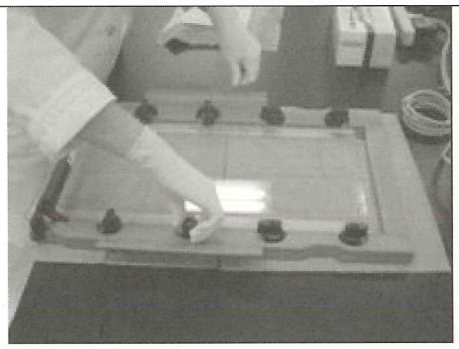
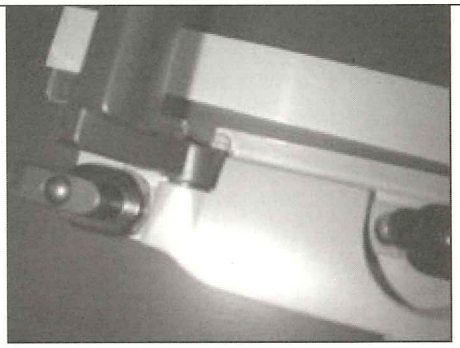
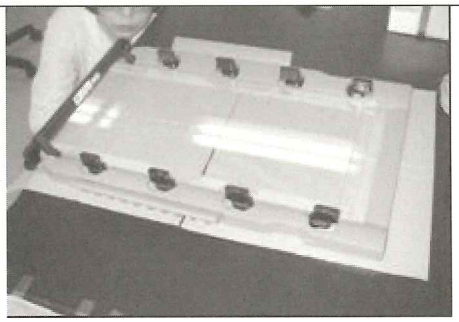
・DNase のコンタミネーションを防ぐため，全操作はゴム手袋を装着しクリーンベンチ内で行う。

7）塩基配列の決定法　【ゲルプレートのセッティング】

1　ガラス板を始めて使用する時やゲルイメージの後半に赤い縦線が入るような時は，下記のアルカリ処理を行う。	
2　水酸化カリウム 5 粒程度を，99.5%エタノール 50ml で溶解し，KOH 溶液を作る。	
3　ケイドライなどに KOH 溶液を含ませて，ガラス板の内側を磨く	
4　ガラス板の表面が白濁したら水道水で十分に洗浄する。	

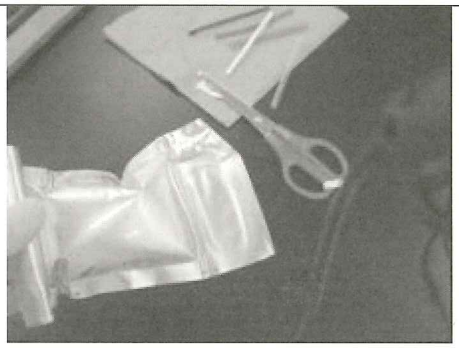
5　BIO NOX 溶液でガラス板の両面を十分に洗浄する。（BIO NOX 5g は予め，500ml のイオン交換水に溶かし，洗瓶等に入れておく。）	
6　水道水で十分に BIO NOX 溶液を洗い流す。	
7　イオン交換水をガラス板両面にかける。	
8　ガラス板を風乾もしくは，エタノール溶液をかけ乾燥させる。	

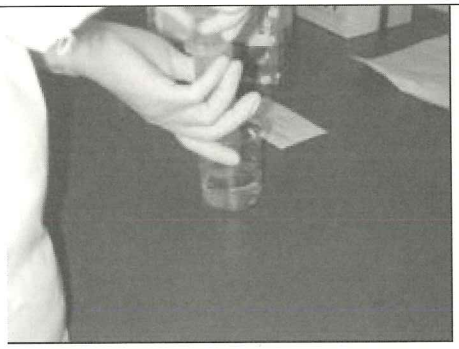
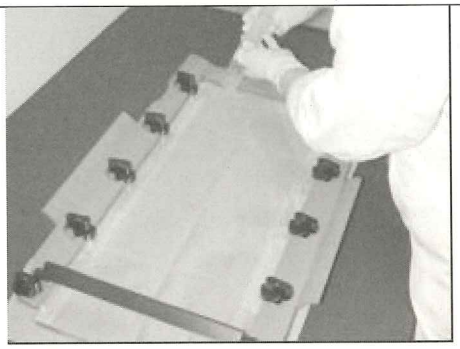
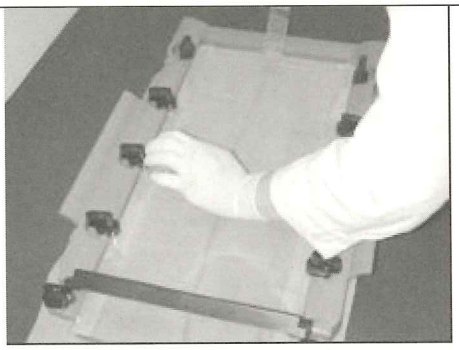
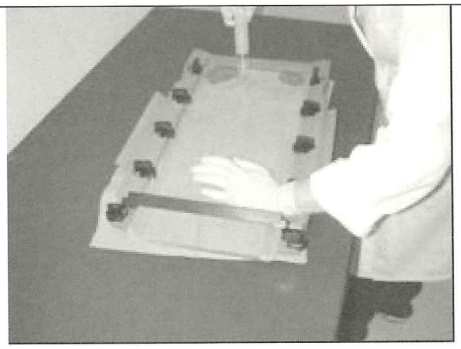
9　ケイドライにイソプロパノールを含ませ，ガラス板のゲル面を磨く。	
10　ゲルカセットを水平な台に置き，クランプを開いた位置(つまみを縦に)する。	
11　プレーンガラス板の切り欠きを下側にしてゲルカセットにのせる。ゲル面を上にする。	
12　スペーサーを外枠に合わせ，ガラスの両側に置く。	

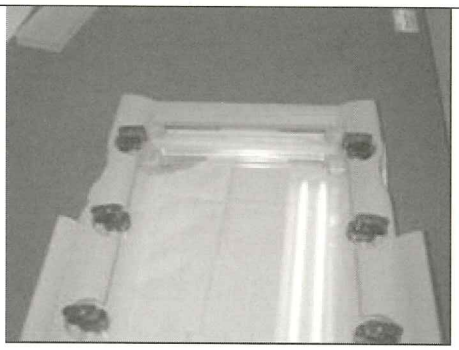
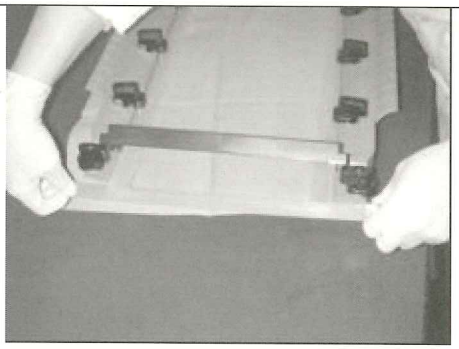
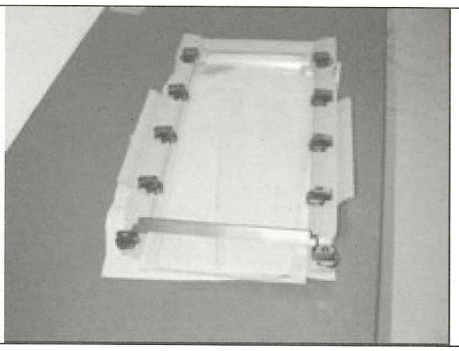
13　ノッチガラス板を重ねる。	
14　ガラス板下の切り欠きがゲルカセットのアライメトピンにしっかり接触しているか確認する。	
15　クランプでガラス板を固定する。クランプを回した後，ガラス板の底面がずれていないか確認する。	

【ゲルの作製】

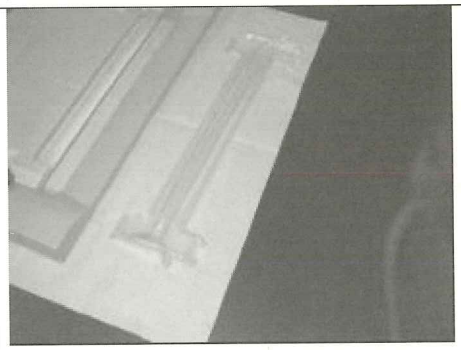
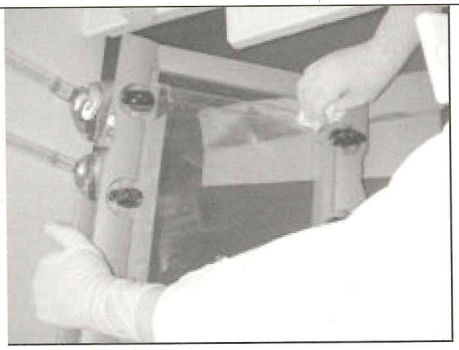
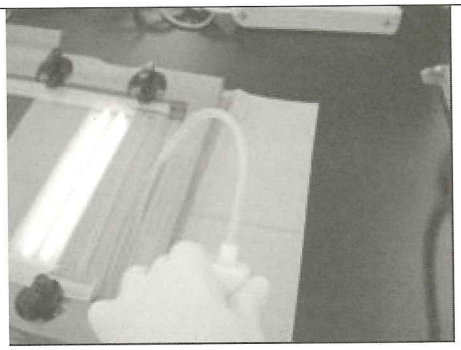
1　ゲルパック（LongRanger SinglePack：TAKARA 社製）を開け，中の黒いクリップを外し，手で１分間良く混合する。	
2　ゲルパックを中速のシェーカー又は手で，5 分間振とうさせる。	
3　再び，手で１分間良く混合する。	
4　更にゲルパックを中速のシェーカー又は，手で 5 分間振とうさせる。	

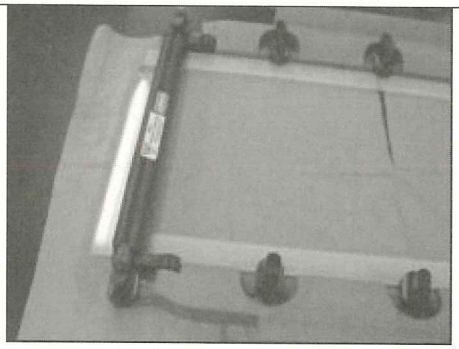
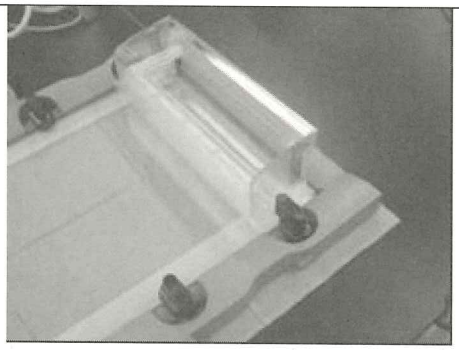
5　赤いクリップを外し，手で 1 分間良く混合(重合)する。	
6　白いクリップを外し，パックを FOLD LINE まで折りたたみ，ゲル溶液をフィルター方向に移動する。	
7　カットマークを上にしてパックを持ち，CUT と記してある部分のコーナーをはさみで切る。	
8　ゲルパックを絞りながら，ビーカーにゲル溶液を出す。	

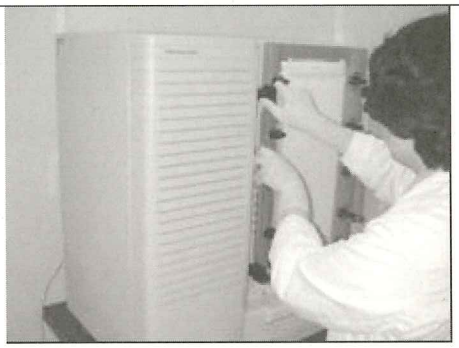
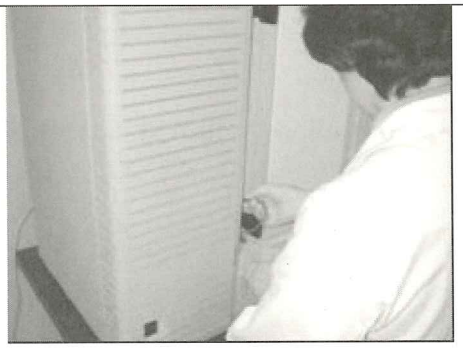
9　乾燥したシリンジ(50mL)にゲル溶液に気泡を混合しないように吸入する。	
10　ガラス板のノッチ側からゲル溶液を流し込む。ガラス板に傾斜をつけると，流し込みやすい。	
11　ゲル溶液の先端を見て，気泡が生じそうになったら，ガラス板を軽くたたく。	
12　ゲル溶液がゲル板底部まで十分に満たしたら，ゲルの注入をやめる。	

13　乾燥したキャスティングコームの平らなほうを差し込む。コーム先端に気泡がないか確認し，気泡がある場合は一度コームを抜いて薄い板などで取り除く。	
14　ガラス板のノッチ部分の両端のクランプを下向きにし，クリアブレースの両側のピン(Side peg)がクランプの上になるように取り付ける。クリアブレース横のクランプを回して固定する。	
15　ゲルの乾燥を防ぐためにゲル板の底部をテープ等で覆う。	
16　ゲルは重合後，2時間から6時間以内で使用する。	

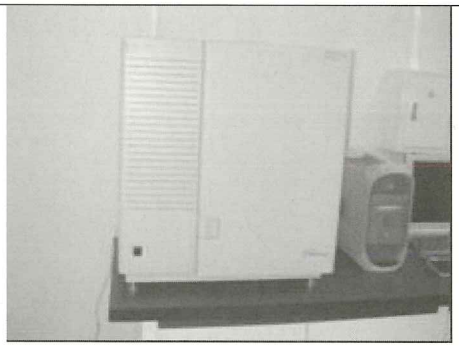
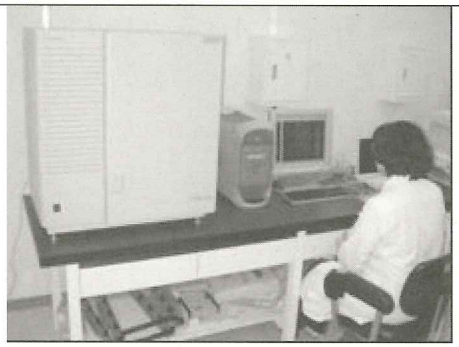
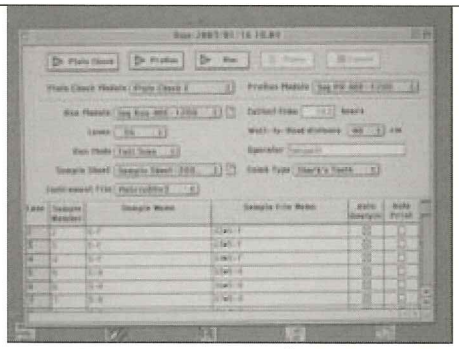
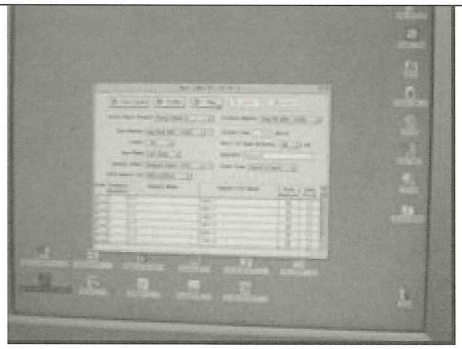
【装置のセットアップ】

1　ゲルカセットの上部の２つのクランプを回して，クリアブレースとバックサポートを取り外す。	
2　ゲルの面をゆがめないように注意して，キャスティングコームをゆっくり抜き取る。	
3　プラスチックの板を利用して，ガラス板のノッチ部分の余分なゲルの小片をすべて除去する。	
4　ゲルの小片があると電気泳動のパターンに影響を与えるため，イオン交換水を用いて完全に除去する。	

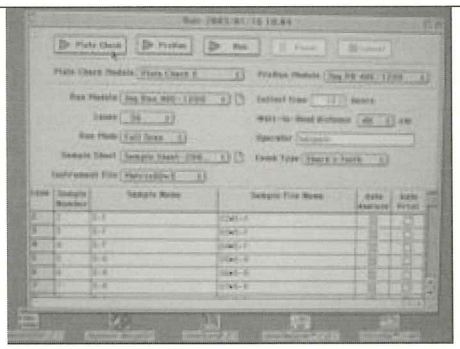
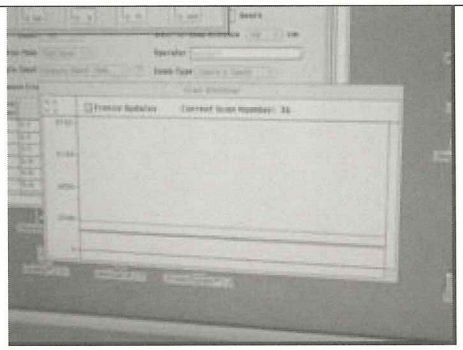
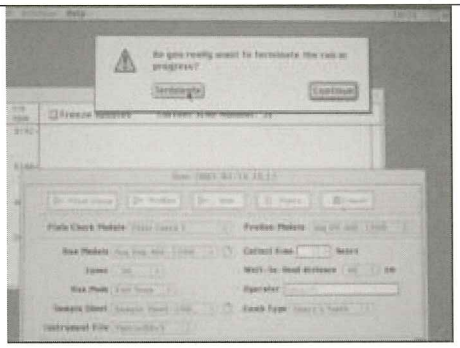
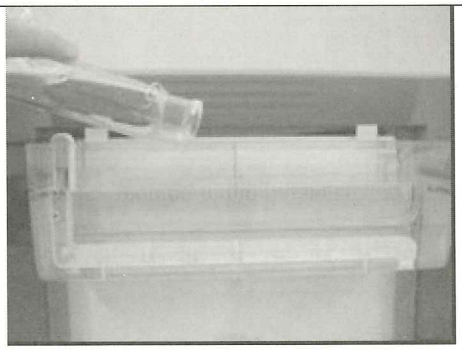
5　ビームストップを下に倒し，クランプを回してビームストップを固定する。	
6　コームのセンターマーカーを，ガラス板のセンターマーカーに合わせて，ペーパーシャークティースコームを挿入する。	
7　コームの歯の先端をゲルの表面に少しだけ(0.5mm 程度)差し込み，すべての歯をゲル表面に接触していることを確認する。	
8　アッパーバッファーチャンバの上端の突起部を，ガラス板の上端に引っ掛かるようにセットし，チャンバーの両側のクランプを回して固定する。	

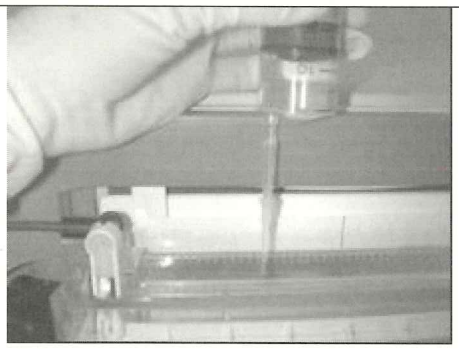
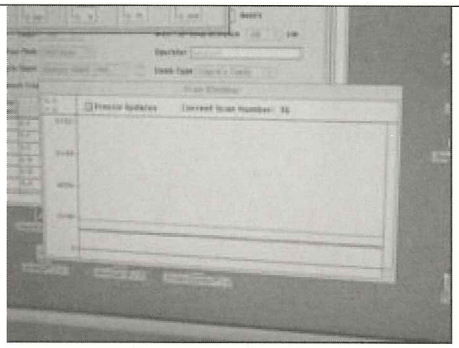
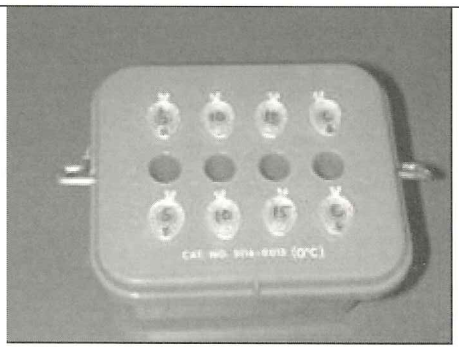
9　装置本体（ABI PRISM 377）のフロントドアを開け，ロアーバッファチャンバーを装置内部の下部の棚に置く。	
10　装置内部の 4 つのカセットクランプを縦向きにし，ゲルカセットをカセットクランプの内側に掛けるように装着する。	
11　カセットを奥に押し，4 ケ所のクランプを横向きに回しカセットを固定する。ガラス板下部の切り欠き部分のスペーサと位置調整ピンが接触し，ガラス板の下部がロアーバッファチャンバーの中に入ることを確認する。	
12　上･下のバッファチャンバーの電極ケーブルをコネクタにそれぞれ差し込む。	

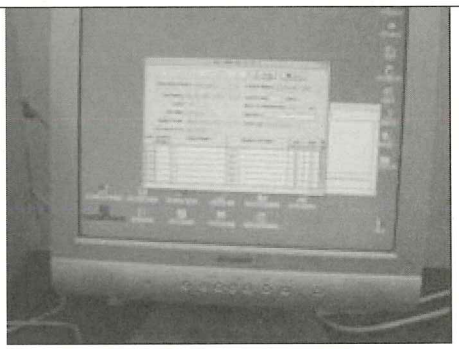
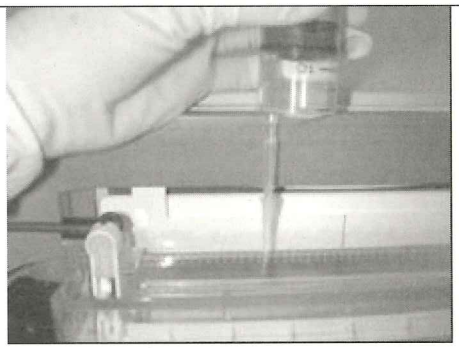
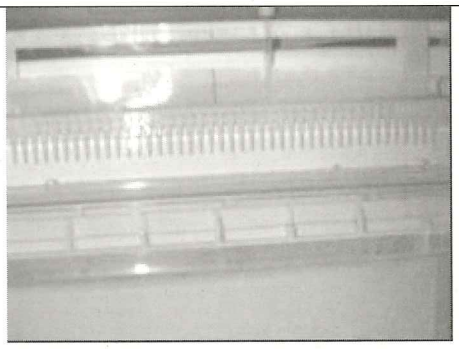
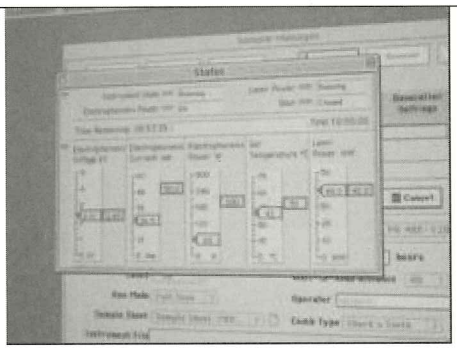
【ソフトウェアのセットアップ】

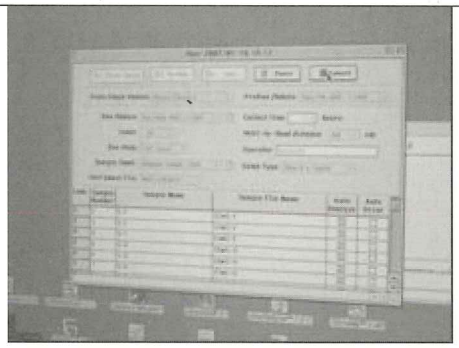
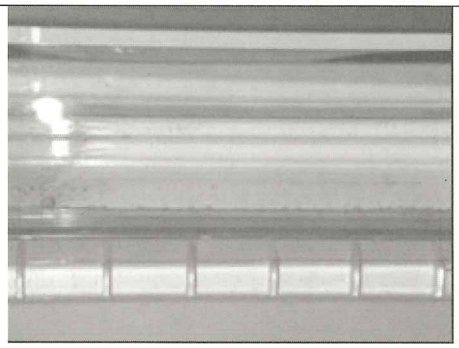
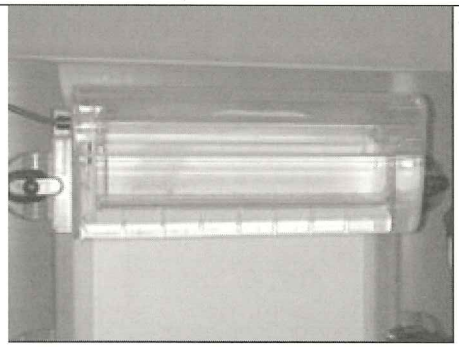
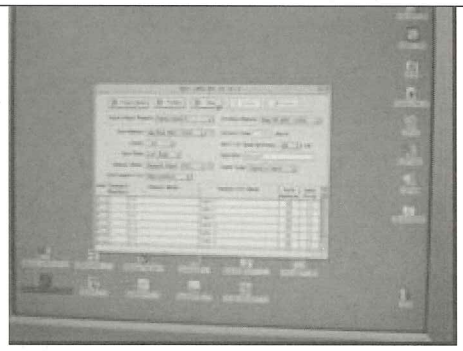
1　装置本体のドアが閉じていることを確認し，電源を入れ，Macintosh を起動，あるいは再起動する。	
2　装置のグリーンのステータスライト(LED ランプ)が点灯していることを確認し，ABI PRISM 377 Co11ection ソフトウェアを起動する。	
3　Fi1e メニューから New を選択し，Sequence Samp1e をクリックし，サンプル名，DyeSet / Phrimer (モビリティファイル)と Instrument Fi1e (マトリックスファイル) を各サンプルについて設定する。サンプルシートを保存し，閉じる。 シートの内容を変更したいときは，ドキュメントアイコンをクリックして内容を編集，保存する。	
4　Fi1e メニューから New を選択し，Sequence Run をクリックする。Lanes を設定し，Samp1eSheet , Run Modu1e を選択，Instrument Fi1e(マトリックスファイル)を設定する。	

【シークエンスラン】

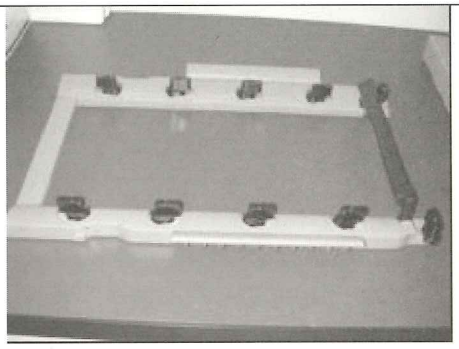
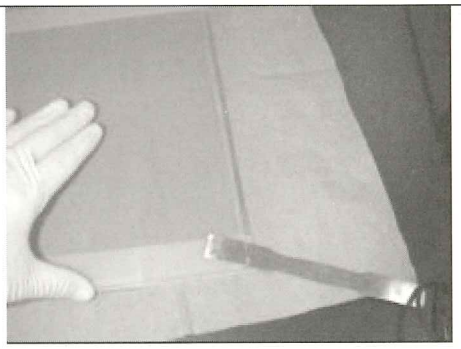
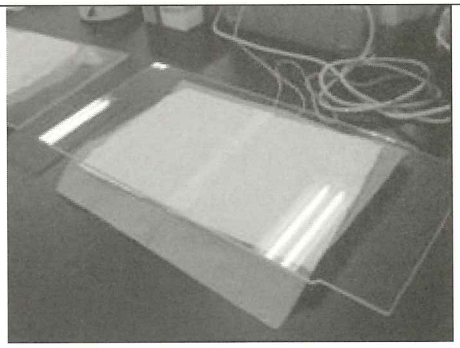
1　装置本体のドアを閉じ，カチッと音がしてから(30～40 秒間)，Run ウインドウの Plate Check ボタンをクリックする	
2　スキャン画面上の 4 本のラインが水平かつ平行であることを確認する。	
3　プレートが汚れている場合，Pause をクリックしてガラス表面の汚れを拭き，Resume をクリックして，再びプレートチェックを行う。	
4　アッパーバッファチャンバーに，1×TBE バッファを約 660mL 注ぎ，漏れがないか確認した後，ロアーバッファチャンバーに 1×TBE バッファを約 600mL 入れる。	

5　バッファをシリンジに取り，針先(チップの先端)をコームの間に当て，ウェルをフラッシュする。	
6　装置本体のドアを閉じ，カチッと音がしてから(30～40 秒間)，PreRun をクリックする。	
7　6)のシーケンス反応済みのサンプルにローディングバッファを入れ，95℃で 4 分間加熱ヒートショック(熱変性)する。	
8　加熱後，すぐにサンプルを氷上に置き急冷する。	

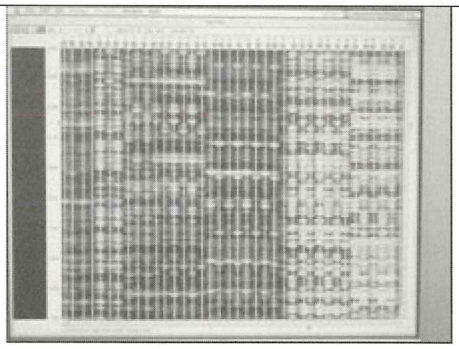
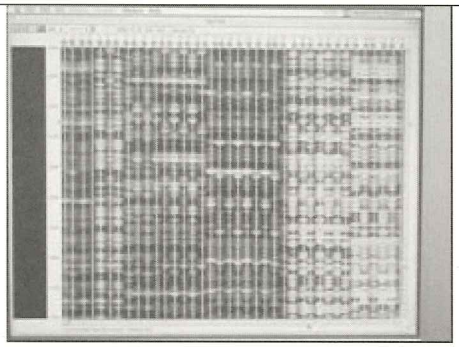
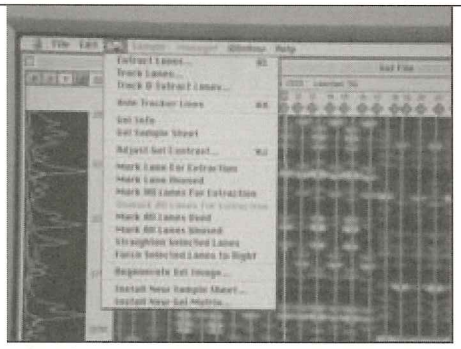
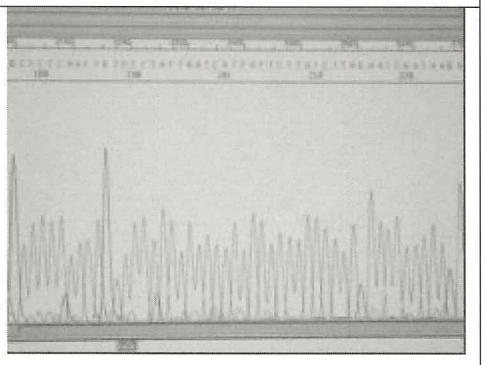
9　ランファイル上の Pause をクリックする。	
10　ドアを開け, シリンジですべてのウェルをフラッシュする。	
11　奇数番号のウェルにサンプルを 1.5 μl アプライする。	
12　ドアを閉め，ランファイル上の Resume をクリックし，5 分間，プレランを行う。	

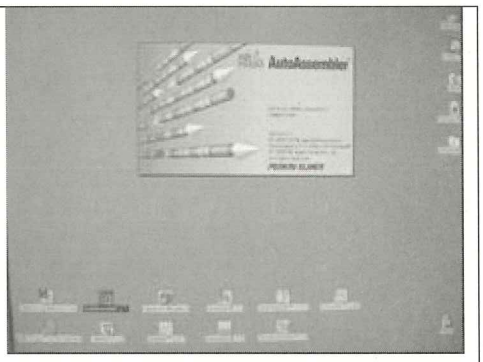
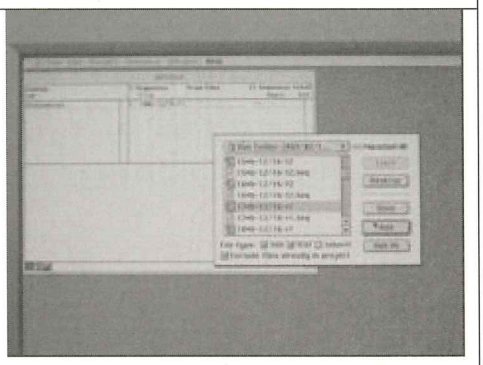
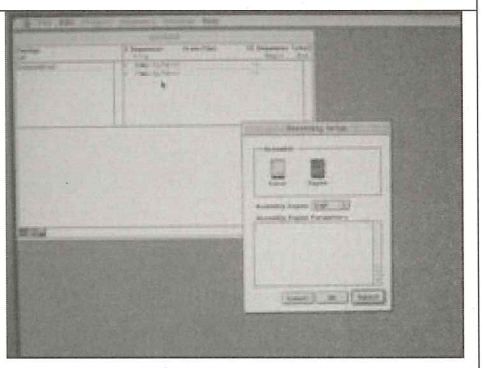
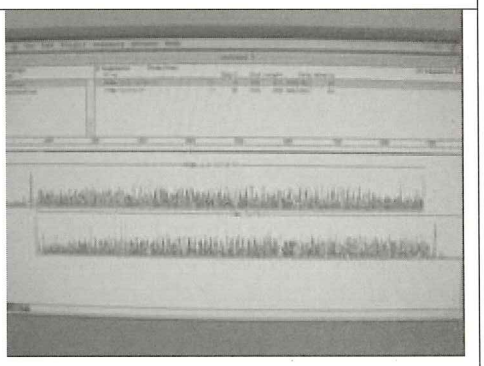
13　ランファイルの Cancel をクリックする。	
14　ドアを開け, ゲルプレートよりペーパーコームを抜き取る。	
15　アッパーバッファチャンバーにふたを取り付け, ドアを閉じる。	
16　Run ボタンをクリックし, Gel File 名, 保存先を指定し, OK を押す。	

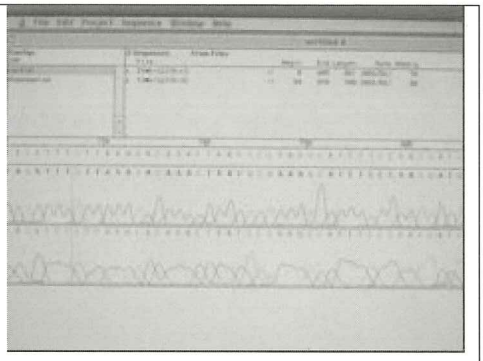
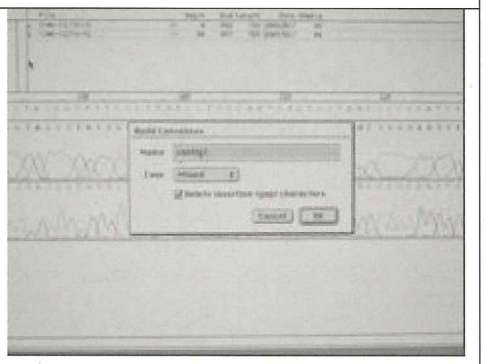
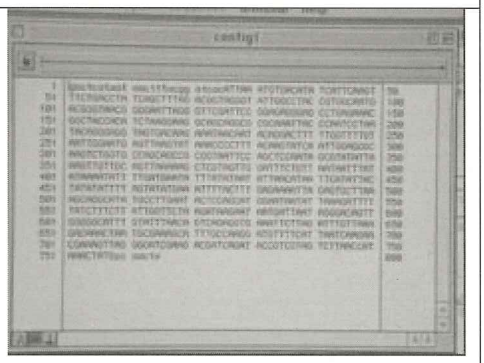
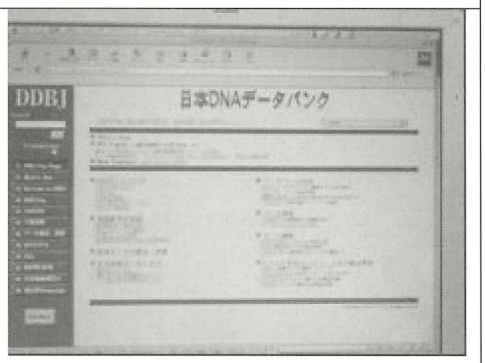
【ラン後の洗浄】

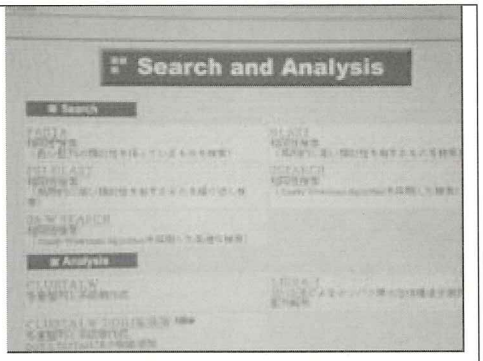
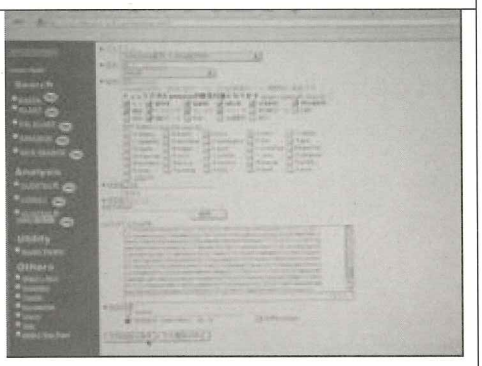
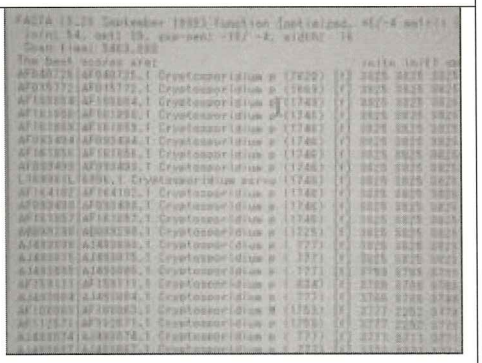
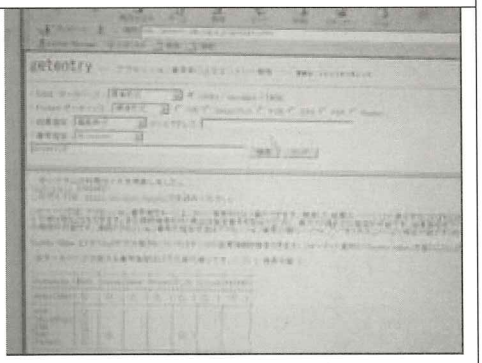
1　ランが終了したら装置本体の電源を切り，チャンバーのバッファを廃棄後，電極ケーブルを外し，ゲルカセットを取り外す。	
2　チャンバー，ゲルカセットを取り外し，水洗いし，風乾させる。水で湿らせたキムワイプ等でリア放熱プレートおよび位置調整ピンを拭いて付着物のないようにする	
3　ゲル板をゲルカセットから取り外し，スパチュラなどをガラス板の底部に入れ，2枚のガラス板をゆっくりと離す。コームとスペーサは，水洗い後，イオン交換水でリンスして風乾させる。	
4　ガラス板をゲルを残さないように流水で洗浄し，イオン交換水でガラスの両面をリンスし，風乾しておく。	

8)　データ解析の方法

1　ラン終了後，Gel File と Sample Manager のウィンドウが画面に開いている。	
2　Gel File 上のトラッカーラインの曲がりを修正する。	
3　トラッカーラインを修正後，Extract Lanes コマンドを使用し，サンプルファイルを修正する。	
4　決定された塩基配列	

5　決定された塩基配列を AutoAssembler（Applied Biosystems 社製）を用いてつなぎ合わせる。 （プライマー18S－2－f と 18S－2－r のそれぞれを用いて，シーケンス反応を行い，ABI 377 で読み取った塩基をつなぐ。）	
6　File から New を選び，プロジェクトウインドウを表示する。Project メニューから Add Multiple を選択し，つなぎ合わせたいサンプルファイル名を選択する。 Add を押し，サンプルファイルがプロジェクトウインドウに移ったら，Done を押す。	
7　Project メニューから，Assembly Setup を選び，Engine を選択し，Submit を押す。自動的に DNA がつなぎ合わされる。	
8　アライメントビューから Electropherogram を選び，センス側と，アンチセンス側の塩基配列を修正しながら，正しい塩基配列が選択されているかどうかを確認する。	

9　不要の塩基や正しい塩基をタイプする。さらに，プライマーの塩基配列部分を削除し，塩基配列を修正する。	
10　編集終了後，File メニュから Save を選びプロジェクトを保存する。Project メニューから Build Consensus を選び OK をクリックし。コンセンサスシーケンスデーターを作成する。	
11　File メニューの Export から Text を選び，コンセンサスシーケンスをテキストファイルに変換する。	
12　相同性検索は，日本 DNA データバンクのホームページ上の相同性検索 FASTA を利用する。 http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html	

13　日本 DNA データバンクのホームページ内の相同性検索にアクセスし，FASTA を選択する。	
14　プログラムは，fasta（DNA 配列×DNA 配列 DB）を選択し，修正した塩基配列をコピ&ペーストし，自分のメールアドレスを入力し，入力内容を送信する。	
15　約 1 時間後に検索結果が送り返されてくる。データベース検索結果は，塩基配列が最も一致した順に整理されている。	
16　塩基配列が最も一致したデータベースに登録されているクリプトスポリジウムの情報を見たいときは，日本 DNA データバンクのホームページ内の getentry をクリックし，Accession 番号を入力し，検索する。クリプトスポリジウムの種や宿主の情報を知ることができる。	

5. Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムオーシストの迅速検出方法

Real Time PCR は，PCR により増幅される DNA を蛍光シグナルにより Real Time で検出するものであり，本法により，試料中の DNA を簡便に定量することが可能となる。本法を用いることにより簡便にクリプトスポリジウムを検出することが可能となる。以下に，Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出操作を示す。

5.1　試験に用いる試薬

QuantiTect Probe Kit（キアゲン社製）

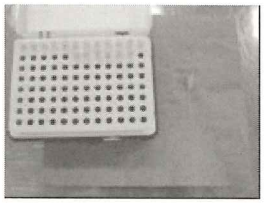


5.2　試験に用いる器具

Real Time PCR 装置（LightCycler：ロッシュ社製）



LightCycler 用キャピラリー管：20 μl



プライマーとプローブ(HPLC 精製)

フォワードプライマー　5'-GGA CAG TTG GGG GCA TTT-3'

リバースプライマー　5'-GTT TCA GCC TTG CGA CCA T-3'

プローブ　5'-CAG ATA CCG TCG TAG TCT TAA CCA TAA ACT ATG C-3'-Fluorescein

プローブ　5'-LCRed640-AAC TAG AGA T TG GAG GTT GTT CCT TAC TCC TT-3'

標準 DNA 溶液　4..3 の方法により 0, 1, 3, 10, 30, 100 個のオーシストから DNA を抽出した液

5.3　Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出法

4.3 の方法でクリプトスポリジウムオーシストから DNA を抽出し，抽出試料中のクリプトスポリジウムに由来する 18SrDNA を Real Time PCR 法により検出する。

QuantiTect Probe Kit 内に含まれる Master Mix，H_2O，プライマー，プローブを解凍する。解凍した試薬は下記に組成で調整する。

H_2O	1.8 μl
PCR Master Mix	10 μl
フォワードプライマー（10pmol/μl）	1 μl
リバースプライマー　（10pmol/μl）	1 μl
Fluorescein プローブ　（10pmol/μl）	0.4 μl
LCRed640 プローブ　（10pmol/μl）	0.8 μl
	15 μl

上記反応液15μlをライトサイクラー用キャピラリー管に入れ（試料本数分），これに4..3で抽出したDNA溶液，および，標準DNA溶液5μlをそれぞれのキャピラリー管に加えピペッティングにより混和する。

次にlightcyclerを用いて下記の条件でPCRを行う。

Step	温度	時間	ランプ	サイクル数	Signal
1	95℃	15min	20℃/sec	1	none
	95℃	0min	20℃/sec		none
2	62℃	30sec	20℃/sec	50	Signal
	72℃	30sec	20℃/sec		none
3	40℃	30sec	20℃/sec	1	none

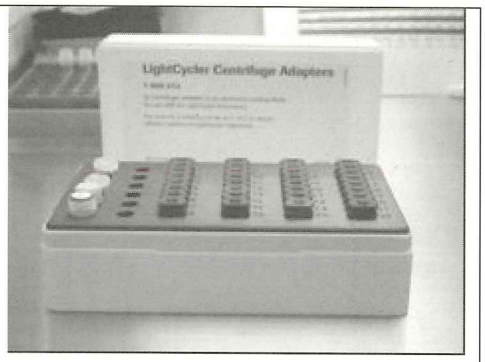
反応終了後，データ解析画面が自動で立ち上がる。ここで，サイクル数と蛍光強度のグラフのy軸の蛍光強度をF2/F1に変更する。蛍光強度がネガティブコントロールより上昇している試料は，DNA溶出液中にクリプトスポリジウム由来する18SrDNAが存在していることを示している。

次に，Qunatificationボタンをクリックする。Baseline画面において，FitpointとPropotionalを選択し，Baseline補正を行う。次に，Noise Band画面において，ネガティブコントロール以下のシグナルをカットする。次に，Analaysys画面において，標準DNA試料のデータを使用し，ある蛍光強度[注1]まで到達するまでに要するサイクル数とオーシスト濃度の検量線を作成する。この検量線を利用し，未知試料中のオーシスト濃度を算出する。

注1　蛍光強度の対数直線領域の範囲のデータを使用する。

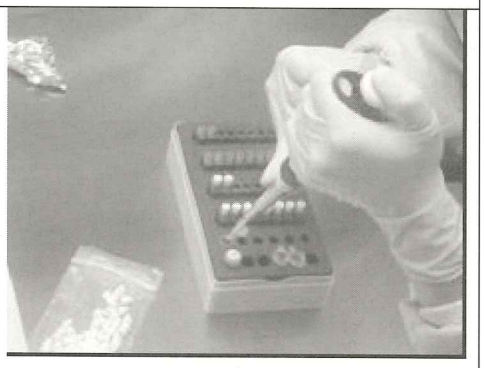
5.4　Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出法のフロー

1　QuantiTect Probe Kit に含まれる Master Mix, H_2O, プライマー, プローブを解凍する。

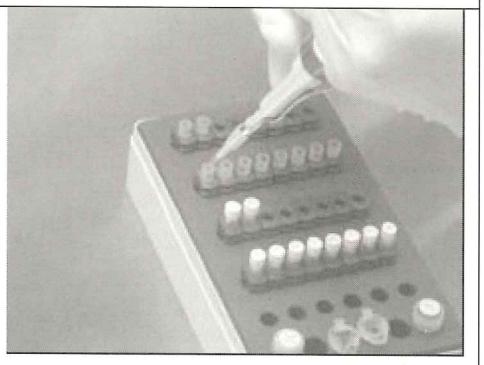


2　キャピラリー管をサンプルの本数分をセットする。次に, 以下の PCR 反応液をサンプルの本数分作成する。

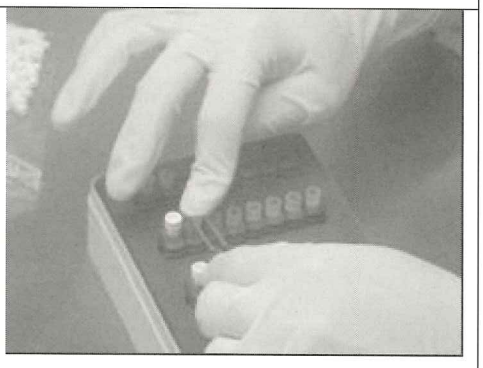
H_2O		1.8 μl
PCR Master Mix		10 μl
フォワードプライマー	(10pmol/μl)	1 μl
リバースプライマー	(10pmol/μl)	1 μl
Fluorescein プローブ	(10pmol/μl)	0.4 μl
LCRed640 プローブ	(10pmol/μl)	0.8 μl
計		15 μl



3　2で作成した PCR 反応液をそれぞれのキャピラリー管に 15 μl 入れる。次に, 標準 DNA 溶液および, DNA 抽出サンプル 5 μl を加える。



4　キャピラリー管専用のキャップを付ける。



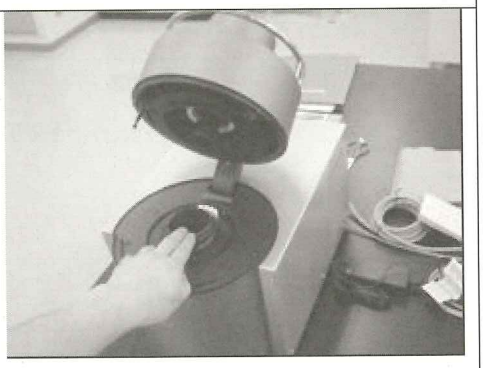
5　カローセルにキャピラリー管をセットする。



6　キャピラリー管をセットしたカローセルは，専用の遠心機で遠心分離する。

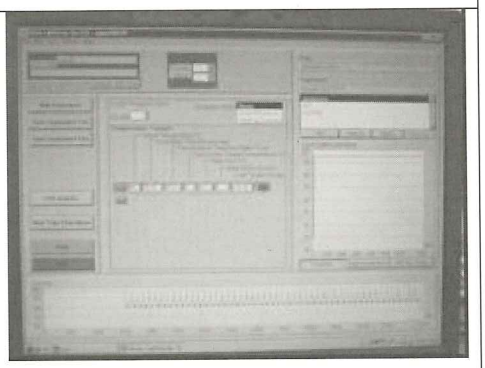


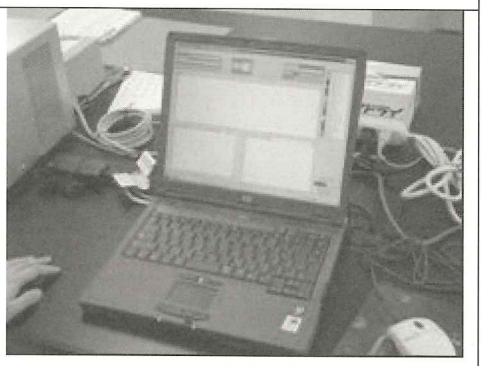
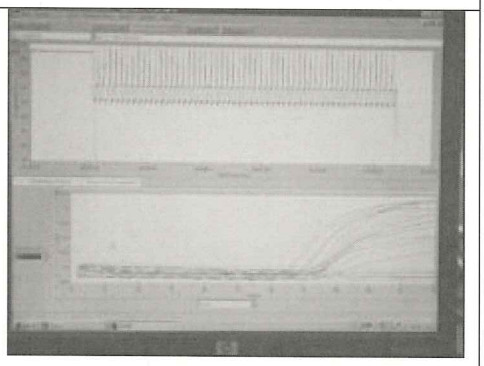
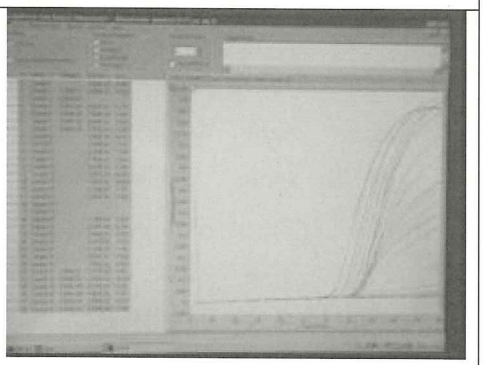
7　キャピラリー管をセットしたカローセルをlightcyclerにセットする。

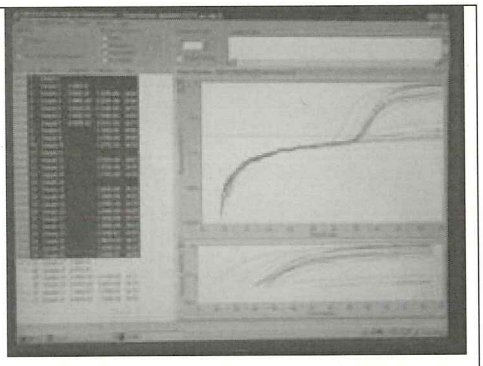
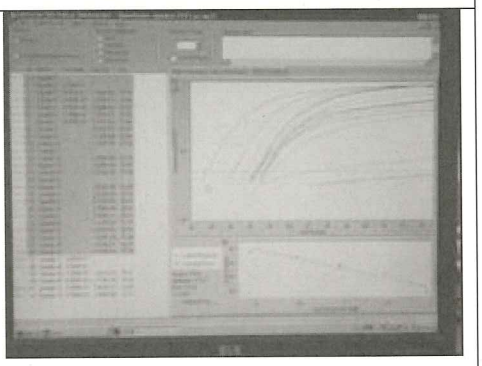


8　あらかじめ下記のPCR条件を登録しておいたプロトコールファイルを呼び出す。

Step	温度	時間	ランプ	サイクル数	Signal
1	95℃	15min	20℃/sec	1	none
	95℃	0min	20℃/sec		none
2	62℃	30sec	20℃/sec	50	Signal
	72℃	30sec	20℃/sec		none
3	40℃	30sec	20℃/sec	1	none



9　標準 DNA 溶液のオーシスト濃度および試料のサンプル名を入力する。	
10　RUN ボタンを押し，PCR を開始する。	
11　PCR 終了後，データ解析画面が自動で立ち上がる。蛍光グラフのｙ軸の表示を F2/F1 とする。	
12　Qunatification ボタンを押し定量解析を始める。はじめに，Fit points，Proportional を選択し，ベースライン補正を行う。	

１３　次に Noise Band の設定を行う。パソコン画面上の赤いラインをネガティブコントロールの蛍光シグナルより上に配置する。	
１４　次に Analysis 画面で，標準 DNA 試料のデータを基に検量線（蛍光強度がある一定の値まで到達するまで似要するサイクル数とオーシスト濃度の関係）を作成する。この検量を用い未知試料中のオーシスト濃度を算出する。	

6. FISH 法によるクリプトスポリジウムパルブムオーシストの染色方法(案)

顕微鏡観察で検出されたクリプトスポリジウムが，クリプトスポリジウムであるかどうかを確定するためには，５章に示した遺伝子レベルでの解析が必要となる。しかし，５章で示した遺伝子解析法は，下水処理施設などの現場で利用することは難しく，迅速性にも欠ける欠点がある。

FISH（蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション）法は顕微鏡観察と同時に，標的遺伝子の検出が可能であり，プローブの設計部位によっては種の同定も可能となる。さらに，ｒRNA を標的とすることにより，クリプトスポリジウムの生育活性も評価することが可能となると考えられる。

蛍光顕微鏡を導入した検査施設においてFISH 法は，クリプトスポリジウムの検出と同定および生育活性が同時に判定できる有効な手法になると考えられる。

以下に，FISH 法によるクリプトスポリジウムの染色手順を示す。なお，本染色手順はD.Deere ら[1] が開発した方法を基本としている。

6.1　試験に用いる試薬

精製水:イオン交換水または蒸留水を孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

リン酸緩衝貯蔵原液:塩化ナトリウム（NaCl）87.7g，リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）20.4g リン酸水素二ナトリウム･12 水和物（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）71.6g，塩化カリウム（KCl）20.1g に精製水を加え，全量を 1L とし（pH を 7.4 に調製），孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

リン酸緩衝生理食塩水(PBS):リン酸緩衝貯蔵原液を精製水で 10 倍に希釈し，孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

エタノール:エタノール（C_2H_5OH）を孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

洗浄用 PBS:RNASIN を PBS で 100 倍希釈する（要時調製）。

懸濁用 PBS:RNASIN を PBS で 100 倍希釈し 4.0℃で保存（要時調製）。

900mM NaCl(5 倍濃度):塩化ナトリウム(NaCl)26.3g を精製水 100ml に溶かし，孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

1M Tris-HCl:Tris12.1g を精製水 80ml に溶かし，2N 塩酸で pH を 7.2 に調製する。精製水で全量を 100ml とした後，孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

ハイブリダイゼーション用緩衝液(10 倍濃度):1M Tris-HCl 20ml，SDS 0.5g を精製水 80ml に溶かし，孔径 0.45μm 以下のフィルターでろ過する。

Rnase 阻害剤: RNASIN（Promega）を PBS 液で必要な濃度に希釈する（要時調製）。

蛍光標識 DNA プローブ:5'末端側を蛍光色素 Cy3 で標識した以下の DNA プローブを合成し，TE により 5pM に調製する。

Cry1（5'-CGGTTATCCATGTAAGTAAAG-3'）

6.2　試薬に用いる器具

恒温水槽(高温対応):試料の固定（80℃）に使用する。

恒温水槽:ハイブリダイゼーション溶液のインキュベーションおよびハイブリダイゼーション反応（48℃）に使用する。試料の固定で使用する恒温水槽も使用できるが，温度差と時間を考慮すると２台あったほうが都合がよい。

キャップロック:1.5ml チューブ用

フローターラック:1.5ml チューブ用，80℃以上に耐性のあるもの

遠心分離機:1.5ml チューブ対応

6.3　試験操作

試料の準備

下水・河川水からのオーシストの濃縮精製は，3.3　1)，2)に従い，Rnasefree の滅菌水で洗浄し，オーシストを 100μl に濃縮する。

1) ハイブリダイゼーション溶液の準備[注1]

1.5ml チューブ内にハイブリダイゼーション溶液および洗浄用 PBS[注2] を作製し，48℃の恒温水槽内でインキュベーションする。

2) オーシストの固定

1.5ml チューブに入った試料 100μｌにエタノール 100μｌを添加し（終濃度 50%エタノール），試料飛散防止のためチューブにキャップロックをする[注3]。チューブをフローターラック等に装着し，80℃の恒温水槽内で 10 分間インキュベーションする。

3) オーシストの遠心回収

インキュベーション終了後，チューブのまわりについた水分を十分に拭き取り，13,000×*g* 2 分間遠心分離する[注4]。遠心終了後，沈殿物を巻上げないよう注意しながら上澄み液を除去する。

4) ハイブリダイゼーション反応[注1]

沈殿物（オーシスト）にあらかじめインキュベートしておいたハイブリダイゼーション溶液を 100μｌ添加し，試験管ミキサーで十分に攪拌する。チューブをフローターラック等に装着し，48℃の恒温水槽内で 30 分間インキュベーションする。

5) 試料の洗浄

反応終了後に，チューブに洗浄用 PBS を 250μｌ添加（全量 350μｌ）し，13,000×*g*，2 分間 遠心分離し，上清を除去する[注4]。再度，洗浄用 PBS を 250μｌ添加し，ピペッティングにより数回攪拌した後さらに試験管ミキサーで十分攪拌する。その後，13,000×*g*，2 分間 遠心分離し，上清を除去する[注4]。以後，この操作(PBS 添加，遠心分離，上清除去)を 2 回行った後，沈殿物（オーシスト）に懸濁用 PBS を 50μｌ添加し，蛍光抗体染色に供するまで 4.0℃，暗下で保存する。

6) 蛍光抗体染色

オーシストを Easy Stain により蛍光抗体染色を行う。

7) 蛍光顕微鏡観察

6) で作製したスライドガグラスに検鏡用オイルを滴下し，ステージにスライドグラスをのせる。1000倍で蛍光観察を行う。プローブのハイブリダイズしたオーシストの検出は，G励起下で行う。朱色の蛍光を発するFISH解析により，細胞内に18S-rRNAを含む生育活性が残存している可能性の高いオーシストのみを選択的に計数できる。

注1　試料100μlに対し，900mM NaCl（5倍濃度）20μl，ハイブリダイゼーション用緩衝液(10倍濃度)10μl，Rnase阻害剤（PBSで100倍希釈）10μl，蛍光標識DNAプローブ10μl，精製水50μl，全量で100μlを1.5ml用のマイクロチューブ内で作成する。

注2　試料100μlに対しRnase阻害剤（PBSで1000倍希釈）750μl（250μl×3）

注3　チューブは気密性が高いため，キャップロックをしないでインキュベーションすると，膨張により蓋が開き内容物が飛び散る危険がある。

注4 遠心機にチューブをセットする際に方向を決めておく（沈殿物は目で確認できないため)。

※Rnase阻害剤は高価で少量なため，以下の操作を行うことで必要最低量が作製できる。

FISH法では陽性コントロールをおくことにより最低2検体分のハイブリダイゼーション溶液および洗浄用PBSが必要である（以下の添加量は2検体分で記載する)。

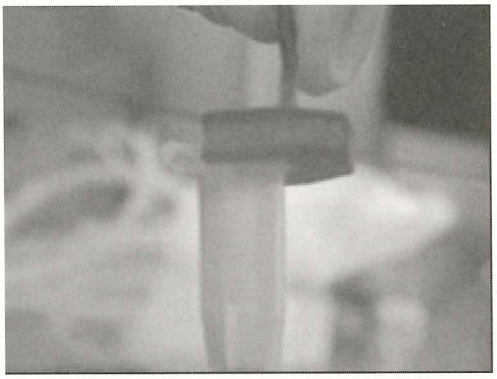
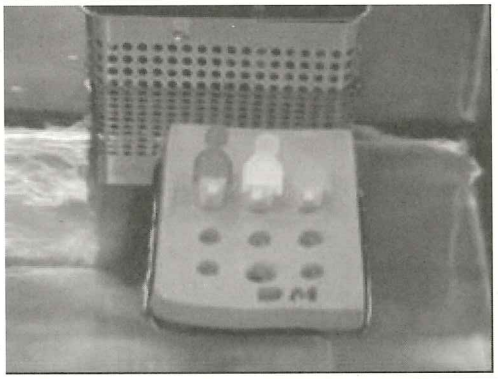
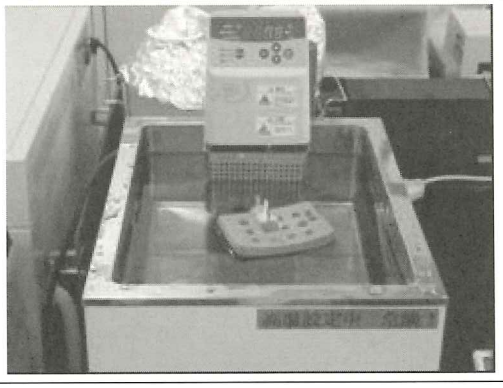
2μl　Rnase阻害剤(40000U／ml)
198μl　PBS
200μl　Rnase阻害剤(400U／ml) → 20μl　ハイブリダイゼーション溶液
180μl
1620μl　PBS
1000μl　Rnase阻害剤(40U／ml)
1500μl　洗浄用PBS → 48℃
100μl　懸濁用PBS → 氷冷(4℃)

【参考文献】

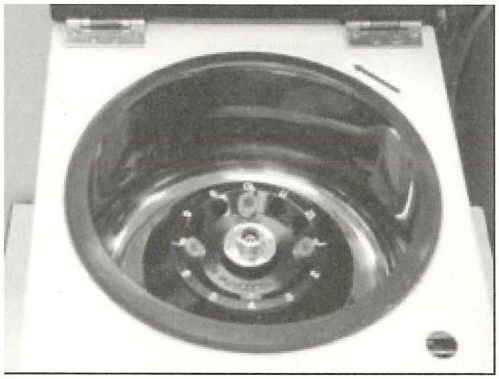
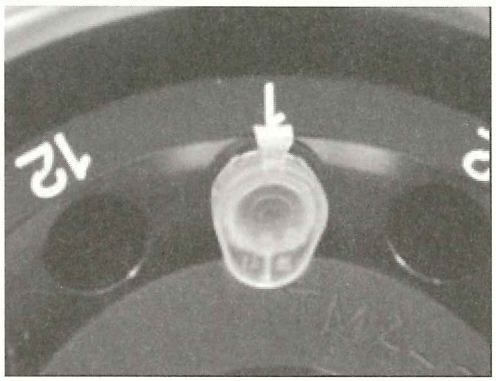
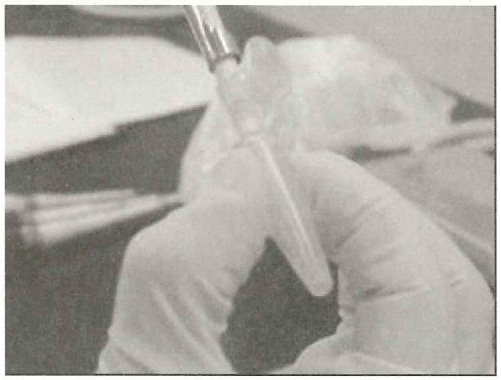
1. D. Deere, G. Vesey, M. Milner, K. Williams, N. Ashbolt and D. Veal: Rapid method for fluorescent in situ ribosomal RNA labeling of *Cryptosporidium parvum*: J. Appl. Microbiol. 1998. 85. 807-818

6.4 クリプトスポリジウムオーシストの FISH 法による染色手順のフロー

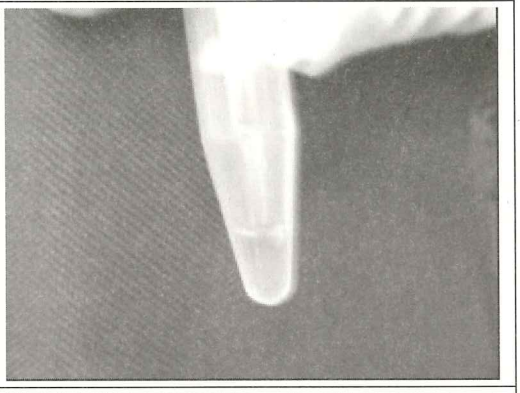
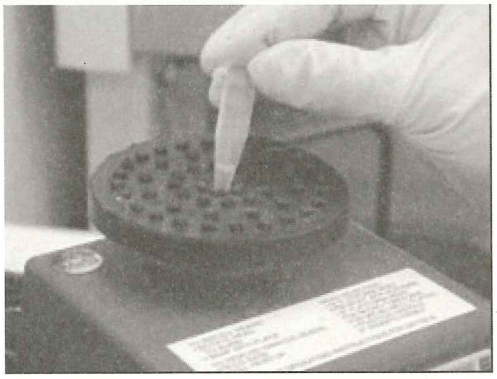
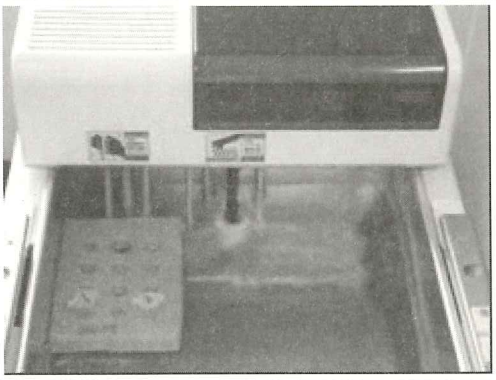
1)試料の固定

1 試料 100μl(1.5ml チューブ内)に 100%エタノール 100μl を添加。(終濃度が 50%エタノールになるように添加)	
2 チューブの内の試料が飛び出ないようにキャップロックを装着する。	
3 チューブをフローターラック等にセットする。	
4 試料を湯浴槽にてインキュベーション(80℃, 10 分間) チューブの蓋が開かないように	

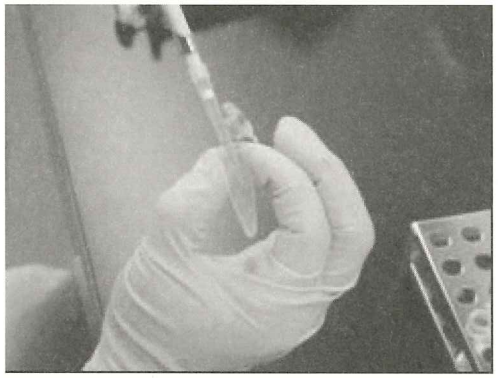
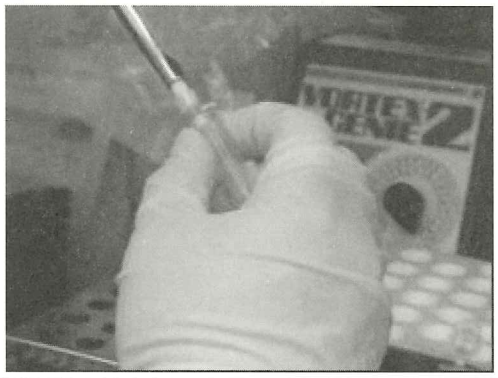
2)オーシストの遠心回収

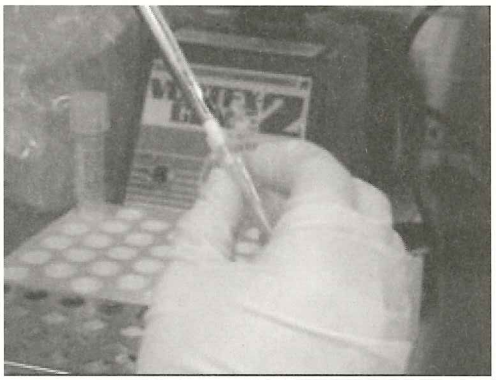
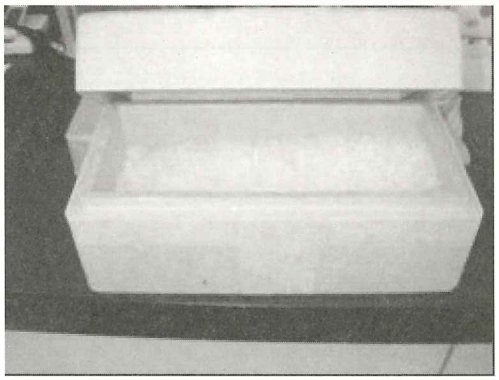
1　1)のインキュベーション終了後，チューブについた水分を拭き取り遠心分離(13,000×g，2 分間)する。	
2　遠心分離にチューブをセットするときは向きを決めておくと沈殿物が何処に存在するかわかりやすい	
3　沈殿物を残し，上澄みをピペットマンで除去する(ピペットマンのチップは 200μl用を使用)	

3)ハイブリダイゼーション反応

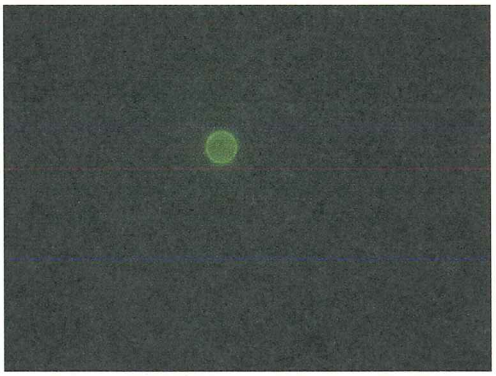
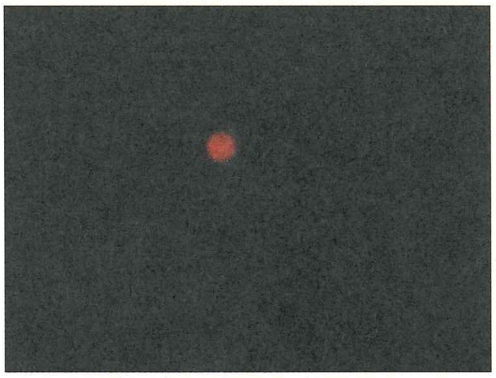
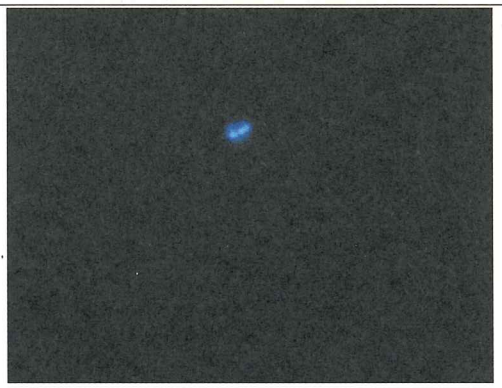
1 ハイブリダイゼーション溶液の作製 1.5ml チューブ内にハイブリダイゼーション溶液(900mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.05%SDS, 40U/ml RNASIN, 5pM DNA プローブ)100µlを作製し, 48℃の湯浴槽で温める。(作業は遮光して行う) ※1)試料の固定作業の前に行	
2 2)で回収したオーシストにハイブリダイゼーション溶液100µlを添加	
3 試験管ミキサーで十分に攪拌する	
4 試料を湯浴槽にてインキュベーション(48℃, 30 分間) ※ハイブリダイゼーション反応は遮光しておく	

4)洗浄→遠心回収→再懸濁

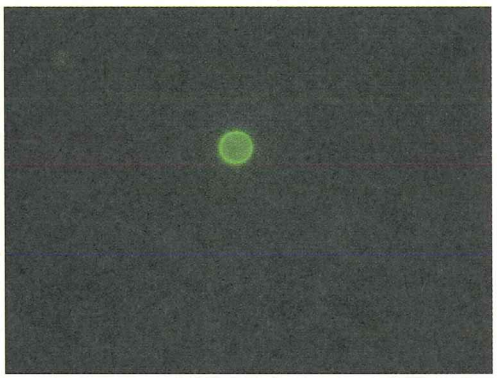
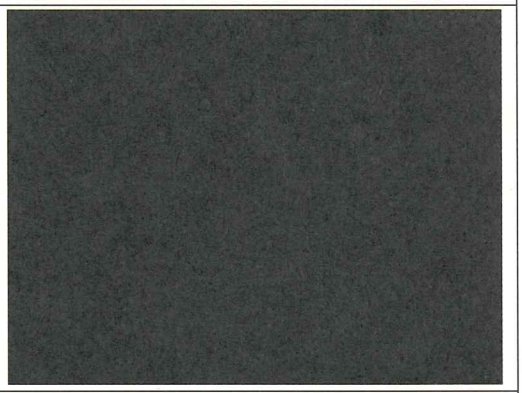
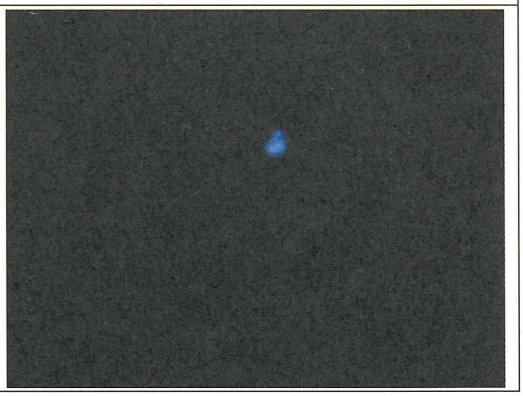
1　3)のハイブリダイゼーション反応後，PBS(RNASIN 入)を 250μl添加。	
2　遠心分離(13,000×g，2 分間)する ※遠心分離にチューブをセットするときは向きを決めておくと沈殿物が何処に存在するかわかりやすい)	
3　沈殿物(オーシスト)を残し，上澄みをピペットマンで除去する(ピペットマンのチップは 200μl用を使用)	
4　沈殿物に PBS(RNASIN 入)を 250μl添加する (ピペッティングを行う)	

5 試験管ミキサーで十分に攪拌する	
6 遠心分離(13,000×g, 2 分間)する	
7 沈殿物(オーシスト)を残し, 上澄みをピペットマンで除去する(ピペットマンのチップは 200μl用を使用) 4～7の作業をもう1回行う	
8 沈殿物に氷冷した PBS((RNASIN 入)を 50μl添加し, 4℃, 暗下で保存 ↓ 蛍光抗体染色へ	

顕微鏡観察　FISH 法＋蛍光抗体染色(生育活性があると考えられるもの)　※1, 2, 3同一視野

1　クリプトスポリジウムオーシストの蛍光像 蛍光標識:FITC 蛍光顕微鏡:B励起 ・蛍光抗体法のみより蛍光輝度は若干低下する	
2　クリプトスポリジウムオーシストの蛍光像 蛍光標識:Cy3 蛍光顕微鏡:G励起 ・FISH法のみより蛍光輝度は低下する ・生育活性があるため蛍光を発する。	
3　クリプトスポリジウムオーシストの DAPI 染色像 蛍光標識:DAPI 蛍光顕微鏡:U励起	

FISH法＋蛍光抗体染色法(生育活性がないと考えられるもの)　※1, 2, 3同一視野

1　クリプトスポリジウムオーシストの蛍光像 蛍光標識:FITC 蛍光顕微鏡:B励起 ・蛍光抗体法のみ蛍光輝度は低下する。	
2　クリプトスポリジウムオーシストの蛍光像 蛍光標識:Cy3 蛍光顕微鏡:G励起 ・生育活性がないため蛍光を発しない	
3　クリプトスポリジウムオーシストの DAPI 染色像 蛍光標識:DAPI 蛍光顕微鏡:U励起	

7. クリプトスポリジウムオーシストの検査方法の最適化のための基礎実験

7.1 目的

本章は，第3章，第4章，第5章の試験法を決定するために行った基礎実験をまとめたものである。本章の実験は，河川・下水中のオーシストの回収率及び実用性の観点から最も適した方法を開発することを目的とし実施した。検討した項目は，ポリカーボネートフィルター法，カートリッジフィルター法，遠心浮遊法によるオーシストの回収率比較，スピンカラム法とシリカビーズ法のオーシストからのDNA抽出率の比較，および，Real time PCR法の検出限界の確認であり，各試験法は，添加・回収実験から評価した。

7.2 実験方法

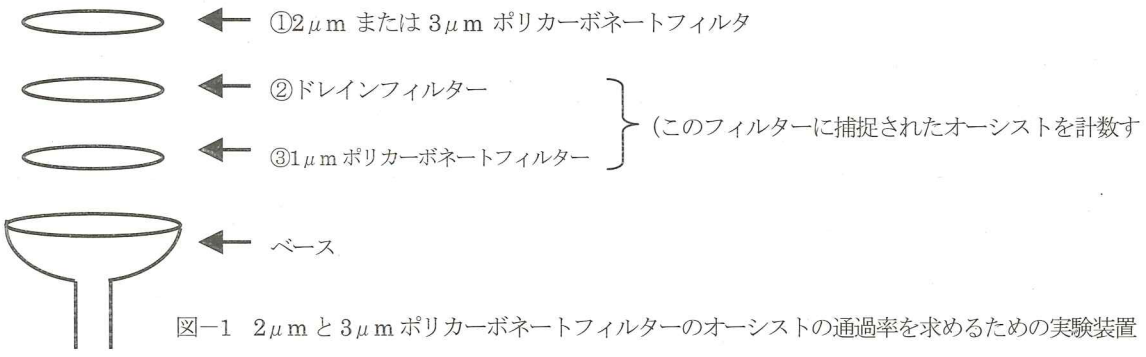
7.2.1 ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法

河川水約1Lに約1000個のオーシストを添加し，ポリカーボネートフィルター(ワットマン製サイクロポアメンブレン：孔径2μm)で捕捉濃縮し，免疫ビーズ法により，どの程度オーシストが回収できるか調べた。試料は1枚のポリカーボネートフィルターでろ過できる量で行った。試験操作は3章の顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検査方法と同様である。

7.2.2 ポリカーボネートフィルターの孔径の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響

オーシストは直径約4～6μmの類円形のため，理論的には，孔径3μmのフィルターでオーシストを捕捉できる。しかし，フィルターの孔が重なって存在する場合もあると考えられ，その場合孔径がオーシストより大きくなり，オーシストがフィルターを通り抜ける可能性がある。オーシストが通過せず，かつフィルター1枚でろ過できる水量が多いフィルターを検討する必要がある。そこで，フィルターの孔径の違い（1,2,3μm）が回収率に及ぼす影響を調べた。本添加回収実験では，試料量は1枚のフィルターでろ過できる量で行い，試料にはオーシストを130個程度添加した。試験操作については3章の顕微鏡観察によるクリプトスポリジウムオーシストの検査方法と同様である。

さらに，オーシストが2,3μmのポリカーボネートフィルターを通過するかどうかを確認するため以下の実験を行った。ミリQ水にオーシストを約4500個添加し，ポリカーボネートフィルターを上から①2または3μmのフィルター，②ドレインフィルター，③1μmのフィルターの順に3枚を重ね，オーシストを添加したミリQ水をろ過した（図－1）。ろ過後，①のフィルターを除去し，③の孔径1μmのフィルターと②のドレインフィルターからオーシストを剥離させ，蛍光観察用フィルターに捕捉後，蛍光抗体染色を施し，オーシストを計数した。ポリカーボネー



図－1 2μmと3μmポリカーボネートフィルターのオーシストの通過率を求めるための実験装置

トフィルターにはサイクロポア ™ とニュークリアポア ™ があり，それぞれのポリカーボネートフィルター(孔径 2,3 μm)を実験に供した。

7.2.3　カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の方法

1)　試料のろ過濃縮

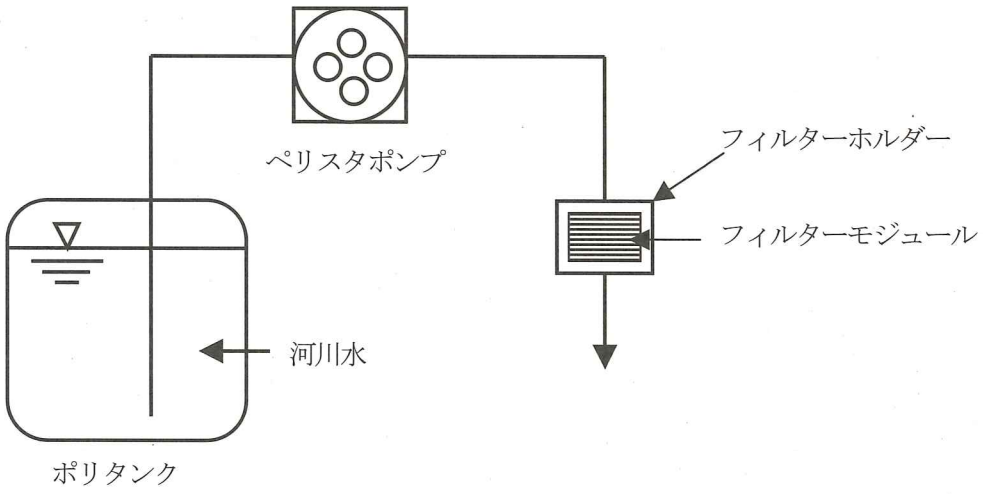
カートリッジフィルターは，IDEXX 社製の Filter　Max を使用した。濃縮装置の概要を図―2 に示す。実験操作は次のとおりである。オーシスト 700 個添加した河川水 20L を 1 個のフィルターモジュールに加圧ろ過する。ろ過終了後，精製水でタンクの中を洗浄し，洗浄水も同じフィルターモジュールにろ過する。その後，フィルターモジュールをフィルターホルダーから取り外し，オーシスト抽出装置に取り付け，溶出液 600ml が入った容器の中で抽出装置攪拌棒を上下させ，フィルターモジュールからオーシストを剥離させた。剥離液は遠心管に移す。この抽出操作を 2 回行い，すべての剥離液を遠心分離（2500rpm，10 分間，ブレーキ解除）した後，上澄み液をサイフォンで吸引除去し，沈査を 50ml 量のチューブに移す。集めた沈査は PBS で遠心洗浄を 2 回行い，磁気ビーズの試料とする。

2)　磁気ビーズ法

3.3 試験操作の 2)のオーシストの回収と同様

3)　蛍光抗体染色

3.3 試験操作の 3)の蛍光抗体染色と同様



図―2　カートリッジフィルターによるオーシストの濃縮装置

7.2.4　遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の方法

1)　試料の遠心浮遊濃縮

遠心浮遊法によりどの程度オーシストが回収できるかを明らかにするため，遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験も行った。試験操作は次のとおりである。河川水に 4.2L オーシストを 2000 個程度添加し，オーシストを添加した河川水を遠心分離（2500rpm，10 分間，ブレーキ解除）し，沈査を残し，上澄み液をサイフォンで吸引除去する。沈査はスポイドでほぐしながら，50ml 容量のチューブに移す。使用した遠心管を溶出液で洗浄し，この洗浄液も 50ml チューブに回収する。沈査を回収した 50ml チューブは遠心分離（1050×G，10 分間，ブレーキ解除）した後，沈査を残し上澄み液を吸引除去する。沈査に溶出液を加え 10ml にした後，試験管ミキサーにより，粒が細かくなるまで攪拌する。分散させた沈査は，比重 1.10 のパーコール蔗糖液が入っている別の 50ml チューブに積層する。試料をパーコール蔗糖液に積層したチューブは，遠心浮遊分離（1050×G，10 分，ブレーキ解除）を行い，上澄み液，界面相，界面下 5ml を別の 50ml チューブに移す。試料を移した 50ml チューブに精製水を加え，50ml までメスアップし，試験管ミキサーにかけ，その後，遠心分離（1050×G，10 分，ブレーキ解除）を行い，沈査を残し，上澄み液を廃棄する。再度，精製水による洗浄を行った後，磁気ビーズ法の操作に移る。

2)　磁気ビーズ法

3.3 試験操作の 2)オーシストの回収と同様

3)　蛍光抗体染色

3.3 試験操作の 3)の蛍光抗体染色と同様

7.2.5　オーシストからの DNA 抽出方法

オーシストからの DNA 抽出法には，凍結融解法，スピンカラム法，シリカビーズ法等があるが，どの抽出法の回収率が良いか，簡便であるのかを明らかにするため以下の実験を行った。本実験では，5 段階のオーシストの希釈系列(0.29 個，0.87 個，2.9 個，8.7 個，29 個／100 μl)を作成し，この希釈試料から DNA を抽出し，4.4 の PCR 操作により，どの希釈段階までクリプトスポリジウムの DNA が検出されるかを明らかにした。検討した方法は，凍結融解＋スピンカラム，凍結融解＋シリカビーズである。

1)凍結融解＋スピンカラム法の操作

4.3 のオーシストからの DNA 抽出法と同様

2)凍結融解＋シリカビーズ法の操作

凍結融解を 5 回繰り返した試料に，よく懸濁した磁性ビーズを 50μl 入れ，10 分間転倒混和した後，磁性ビーズ用スタンドで固液分離し，上清を廃棄する。洗浄液を 800 μl 添加し，試験管ミキサーにかけ，室温で 1 分間静置する。その後，磁性ビーズ用スタンドを用いて固液分離を行い，上清を廃棄する。再度，洗浄操作を行った後，70%エタノールを 900 μl 添加し，試験管ミキサーで攪拌し，室温で 1 分間静置する。その後，磁性ビーズ用スタンドを用いて固液分離を行い，上清を廃棄する。再度，

70%エタノールを 900μl 添加し，上清を廃棄する。その後，遠心分離(11000rpm，5 分間)を行い，上清を完全に除去する。溶出液を 100μl 添加し，10 分間懸濁する。次に，遠心分離(11000rpm，5 分間)を行い，マイクロピペットにより上清を回収する。回収した DNA 溶液は，4.4 の方法により PCR を行う。

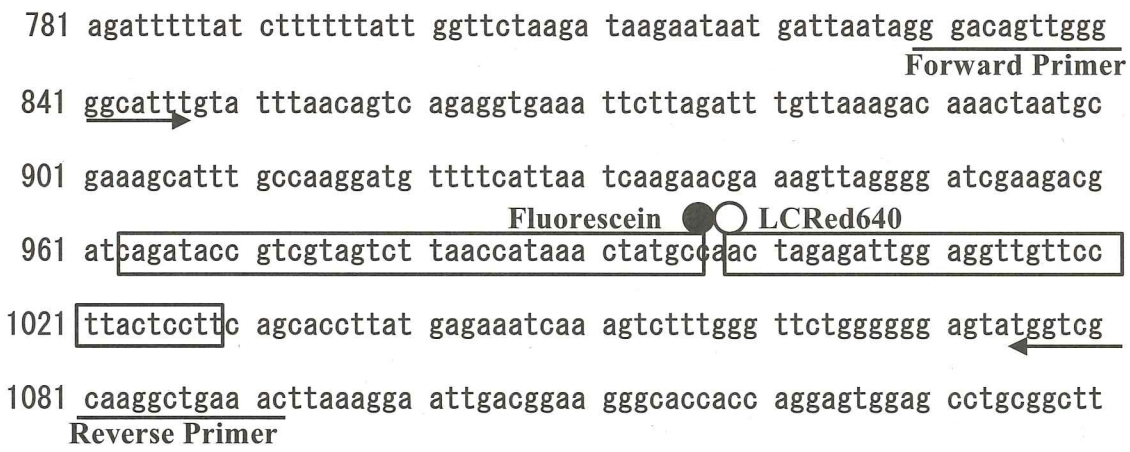
7.2.6　河川水へ添加したオーシストの DNA 検出方法

顕微鏡観察と PCR により検出できるオーシストの個数の関係を明らかにするため，次の実験を行った。オーシストを 6 個，8 個，16 個添加した河川水 300ml から 3.3 の操作によりオーシストを回収した。同操作を 2 系列行い，1 系列は顕微鏡観察（3.3 3)）でオーシストを計数し，1 系列は PCR（4.4）法により DNA 検出を行った。

7.2.7　Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出方法

(1)クリプトスポリジウムを Real Time PCR 法により検出するための Primer と Probe の設計

クリプトスポリジウムを Real Time PCR により検出するためのプライマーとプローブは，GeneBank access number AF093489 (Human *Cryptosporidium parvum*)より設計した。設計したプライマーとプローブの位置および塩基配列を図―3 に示す。このプライマーにより増幅される区間の塩基配列の相同性検索(BLAST)をした結果，表－1 に示したクリプトスポリジウムと塩基配列が 100%一致した。本プライマーとプローブを用いた場合，*C.parvum* の他に，*C.meleagridis*, *C.felis* が検出される可能性がある。ヒトに感染性を有する *C.parvum* のみが検出できることが望ましいが，18SrDNA 領域は，クリプトスポリジウムの種間で，配列の異なる部位が少なく，*C.parvum* のみを検出できるプライマーおよびプローブを設計することは困難であった。



図－3　*Cryptosporidium* 18SrDNA 検出用の primer 及び probe の位置

GeneBank:Access number AF093489, Human *Cryptosporidium parvum* より設計，増幅領域 DNA サイズ:263bp

表－1　図－3の増幅対象塩基配列と100%同じ塩基配列であるGeneBank登録*Cryptosporidium*

AY166839 Cryptosporidium meleagridis	AF262327 Cryptosporidium sp.	AF112576 Cryptosporidium parvum
U11440 Cryptosporidium wrairi	AF248764 Cryptosporidium parvum	AF112575 Cryptosporidium felis
L25642 Cryptosporidium parvum	AF248763 Cryptosporidium parvum	AF112574 Cryptosporidium meleagridi
L16997 Cryptosporidium parvum	AF248762 Cryptosporidium wrairi	AF112573 Cryptosporidium sp.
L16996 Cryptosporidium parvum	AF248759 Cryptosporidium meleagridis	AF112572 Cryptosporidium parvum
AY030093 Cryptosporidium parvum	AF248758 Cryptosporidium meleagridis	AF112571 Cryptosporidium parvum
AY030092 Cryptosporidium parvum	AF248757 Cryptosporidium meleagridis	AF112570 Cryptosporidium parvum
AY030091 Cryptosporidium parvum	AF248756 Cryptosporidium meleagridis	AF112569 Cryptosporidium parvum
AY030089 Cryptosporidium meleagridis	AF248755 Cryptosporidium meleagridis	AF108865 Cryptosporidium parvum
AY030088 Cryptosporidium parvum	AF248754 Cryptosporidium parvum	AF108864 Cryptosporidium parvum
AY030086 Cryptosporidium parvum	AF248753 Cryptosporidium parvum	AF108863 Cryptosporidium sp.
AY007254 Cryptosporidium sp.	AF248752 Cryptosporidium parvum	AF108862 Cryptosporidium felis
AF513227 Cryptosporidium sp.	AF248751 Cryptosporidium parvum	AF108861 Cryptosporidium sp.
AF481962 Cryptosporidium parvum	AF248750 Cryptosporidium parvum	AF108860 Cryptosporidium sp.
AF442484 Cryptosporidium sp.	AF247535 Cryptosporidium sp.	AF093494 Cryptosporidium parvum
AF411631 Cryptosporidium meleagridis	AF222998 Cryptosporidium parvum	AF093493 Cryptosporidium parvum
AF323567 Cryptosporidium sp.	AF164102 Cryptosporidium parvum	AF093492 Cryptosporidium parvum
AF323566 Cryptosporidium felis	AF162430 Cryptosporidium parvum	AF093491 Cryptosporidium parvum
AF323565 Cryptosporidium felis	AF161859 Cryptosporidium parvum	AF093490 Cryptosporidium parvum
AF323564 Cryptosporidium felis	AF161858 Cryptosporidium parvum	AF093489 Cryptosporidium parvum
AF323563 Cryptosporidium felis	AF161857 Cryptosporidium parvum	AF087577 Cryptosporidium parvum
AF308600 Cryptosporidium parvum	AF161856 Cryptosporidium parvum	AF087576 Cryptosporidium parvum
AF280053 Cryptosporidium sp.	AF159113 Cryptosporidium felis	AF087575 Cryptosporidium parvum
AF262334 Cryptosporidium sp.	AF159112 Cryptosporidium parvum	AF087574 Cryptosporidium parvum
AF262333 Cryptosporidium sp.	AF159111 Cryptosporidium parvum	AF040725 Cryptosporidium parvum
AF262331 Cryptosporidium sp.	AF159110 Cryptosporidium parvum	AF015772 Cryptosporidium parvum
AF262330 Cryptosporidium sp.	AF133842 Cryptosporidium parvum	AB089290 Cryptosporidium parvum
AF262329 Cryptosporidium sp.	AF115378 Cryptosporidium wrairi	
AF262328 Cryptosporidium sp.	AF115377 Cryptosporidium parvum	

(2)クリプトスポリジウムオーシストの個数と Real Time PCR での検出限界を明らかにするため，クリプトスポリジウムオーシストの 87 個,29 個,8.7 個,2.9 個,0.87 個,0.29 個,0 個の 6 段階の希釈系列を作成し，これらの試料から 4.3 の手順により DNA を抽出し，この DNA 抽出試料から，クリプトスポリジウムの Real Time PCR 検出を試み，検出限界と定量限界を明らかにした。

7.3　実験結果

7.3.1　ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果

表－2 にポリカーボネートフィルター法（サイクロポアメンブレン,孔径 2μm）によるオーシストの添加回収実験の結果を示す。1 枚のフィルターで 1000ml 程度の河川水をろ過することができ，本法のオーシストの回収率の平均は 78.6%であった。

表-2　ポリカーボネートフィルター法によるオーシストの添加回収実験結果　　C=B/A*100

試料No.	実験日	試料	試料中SS濃度 (mg/l)	添加の有無	フィルターの孔径(μm)	河川水ろ過量(ml)	添加オーシストの個数 (A)	回収されたオーシストの個数(B)	回収率 C(%)
1	H13.10.15	河川水	－	添加	2	1200	844	678	80.3
2	10.17	河川水	－	添加	2	1000	766	662	86.4
3	10.18	河川水	－	添加	2	1000	2292	1576	68.8
4	10.19	河川水	－	添加	2	1000	2558	1928	75.4
5	10.22	河川水	－	無添加	2	1000	0	0	0
6	10.22	河川水	－	添加	2	1000	131	113	86.3
7	10.23	河川水	5.818	添加	2	1000	130	97	74.6
	（平均）	河川水		添加	2				78.6

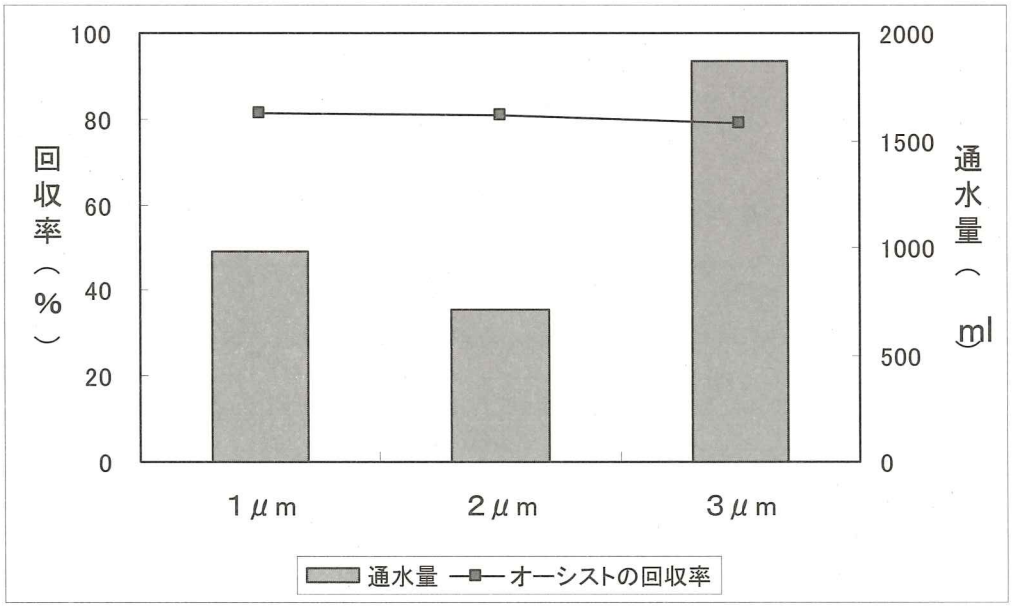
7.3.2　ポリカーボネートフィルターの孔径の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響

表－3 にポリカーボネートフィルターの孔径の違いがオーシストの回収率に及ぼす影響結果を示す。ポリカーボネートフィルターによるオーシストの回収率は，フィルター孔径3,2,1μmの順に79.0, 84.6, 78.3%となり，顕著な違いはみられなかった。孔径の2μmより1μmのフィルターのろ過量が若干多かった理由は，フィルターに占める孔面積の割合が1μmのフィルターの方が大きいためと考えられる。

ポリカーボネートフィルターの孔径とオーシストの回収率および河川水の通水量の関係を図－4に示す。孔径1,2,3μmのフィルターのオーシストの回収率は，同レベルであり，オーシストの濃縮には，通水量の多い孔径3μmのポリカーボネートフィルターを使用することが望ましいと考えられる。

表-3　ポリカーボネートフィルターの違いがオーシストの回収率に及ぼす影響　　C=B/A*100

試料No.	実験日	試料	試料中SS濃度 (mg/l)	添加の有無	濾紙の材質	フィルターの孔径(μm)	河川水ろ過量(ml)	添加オーシストの個数(A)	回収されたオーシストの個数(B)	回収率 C(%)
1	11.28	河川水	2.700	添加	Nuclepore	1	1300	133	102	76.7
2	11.28	河川水	2.700	添加	Nuclepore	2	930	133	112	84.2
3	11.28	河川水	2.700	添加	Nuclepore	3	2200	133	100	75.2
4	11.29	河川水	6.133	添加	Nuclepore	1	850	123	109	88.6
5	11.29	河川水	6.133	添加	Nuclepore	2	610	123	100	81.3
6	11.29	河川水	6.133	添加	Nuclepore	3	1640	123	104	84.6
7	11.30	河川水	5.067	添加	Nuclepore	1	790	128	101	78.9
8	11.30	河川水	5.067	添加	Nuclepore	2	600	128	99	77.3
9	11.30	河川水	5.067	添加	Nuclepore	3	1770	128	99	77.3
	(平均)	河川水		添加		1	980			81.4
		河川水		添加		2	713			81.0
		河川水		添加		3	1870			79.0



図－4　ポリカーボネートフィルターの孔径の違いとオーシストの回収率および通水量の関係

表－4 はポリカーボネートフィルターの孔径・種類の違いとオーシストの通過率の関係を示した。2μmと3μmのポリカーボネートフィルターのオーシストの通過率は，孔径が2μmでは0%で，孔径3μmでは，0.21%であった。孔径2μmと3μmのオーシストの捕捉率は100%と99.8%となる。孔径3μmのサイクロポアとニュークリアポアのポリカーボネートフィルターのオーシストの通過率には，顕著な違いは見られなかった。

表－4 ポリカーボネートフィルターの孔径・種類の違いとオーシストの通過率の関係

C=B/A*100

試料No.	実験日	濾紙の種類（上部・下部）	フィルター上部の孔径(μm)	フィルター下部の孔径(μm)	オーシストの添加の有無	試料	試料ろ過量(ml)	添加オーシストの個数(A)	回収されたオーシストの個数(B)	オーシスト通過率C(%)
1	H13.12.5	Nuclepore	2	1	無添加	ミリQ	3000	4550	0	0.0
2	12.5	Nuclepore	3	1	添加	ミリQ	3000	4550	8	0.18
3	12.6	Nuclepore	2	1	添加	ミリQ	3000	4550	0	0.0
4	12.6	Nuclepore	3	1	添加	ミリQ	3000	4550	9	0.20
5	12.7	Nuclepore	2	1	添加	ミリQ	3000	4550	0	0.0
6	12.7	Nuclepore	3	1	添加	ミリQ	3000	4550	12	0.26
7	12.20	Cyclopore	3	1	添加	ミリQ	3000	4100	11	0.27
8	12.25	Cyclopore	3	1	添加	ミリQ	3000	3950	12	0.30
9	12.26	Cyclopore	3	1	添加	ミリQ	3000	4350	10	0.23
	（平均）	Nuclepore	2	1	添加	ミリQ				0.0
		Nuclepore	3	1	添加	ミリQ				0.21
		Cyclopore	3	1	添加	ミリQ				0.27

7.3.3 カートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果

表－5にカートリッジフィルター法によるオーシストの添加回収実験の結果を示す。回収率の平均は，46.7%であった。カートリッジフィルター法は，1 個のフィルターモジュールでろ過できる水量が多いことから，試料中に夾雑物が多い場合や試料水量が多い場合に適している。

表－5 カートリッジフィルター法による回収率

C=B/A*100

試料No.	実験日	試料	試料中SS濃度 (mg/l)	オーシストの添加の有無	試料ろ過量(L)	添加オーシストの個数(A)	回収されたオーシストの個数(B)	オーシスト回収率C(%)
1	H13.10.30	河川水	10.0	添加	20	607	261	43.0
2	11.1	河川水	12.1	添加	20	607	197	32.5
3	11.5	河川水	8.0	添加	20	678	311	45.9
4	11.7	河川水	4.9	添加	20	746	399	53.5
5	11.8	河川水	13.2	無添加	20	738	0	0.0
6	11.9	河川水	5.2	添加	20	779	459	58.9
	（平均）	河川水		添加				46.7

7.3.4　遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の結果

表―6 に遠心浮遊法によるオーシストの添加回収実験の結果を示す。本法の回収率は 10%と低かった。

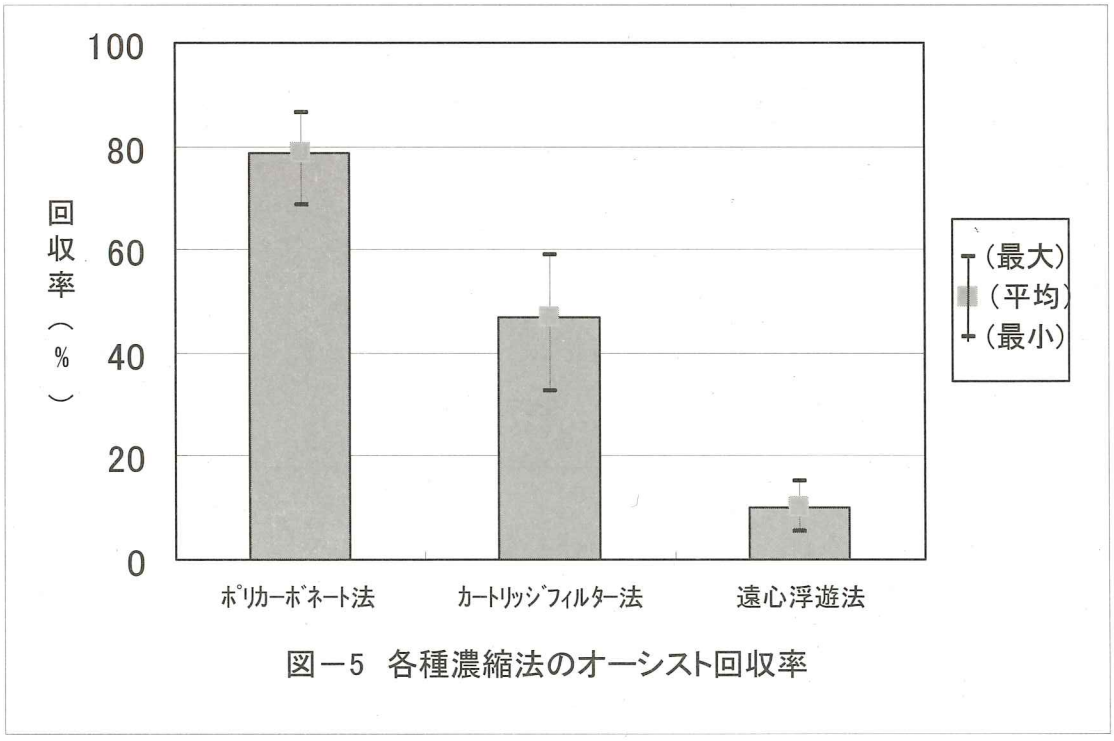
表－6　遠心浮遊法による回収率

C=B/A*100

試料No.	実験日	試料	オーシストの添加の有無	試料ろ過量(L)	添加オーシストの個数(A)	回収されたオーシストの個数(B)	オーシスト回収率D(%)
1	H.13.10.2	河川水	無添加	4200	0	0	0.0
2	10.2	河川水	添加	4200	1794	98	5.5
3	10.3	河川水	添加	4200	2304	348	15.1
4	10.5	河川水	添加	4200	1355	138	10.2
5	10.10	河川水	添加	4200	1140	145	12.7
6	10.11	河川水	添加	4200	1659	107	6.4

7.3.5　各種試験方法のオーシストの回収率の比較結果

図－５にポリカーボネートフィルター法・カートリッジフィルター法・遠心浮遊法の回収率の比較を示す。ポリカーボネートフィルター法の回収率が約 80%と最も高いことがわかる。ただし，ポリカーボネートフィルター法はフィルター１枚でろ過できる水量が少なく，大量の試料をろ過する場合は，フィルターの交換枚数が増える欠点がある。しかし，下水 200ml，下水処理水 20L，河川水 20L 程度であればポリカーボネートフィルター法でも十分対応可能である。



図－5　各種濃縮法のオーシスト回収率

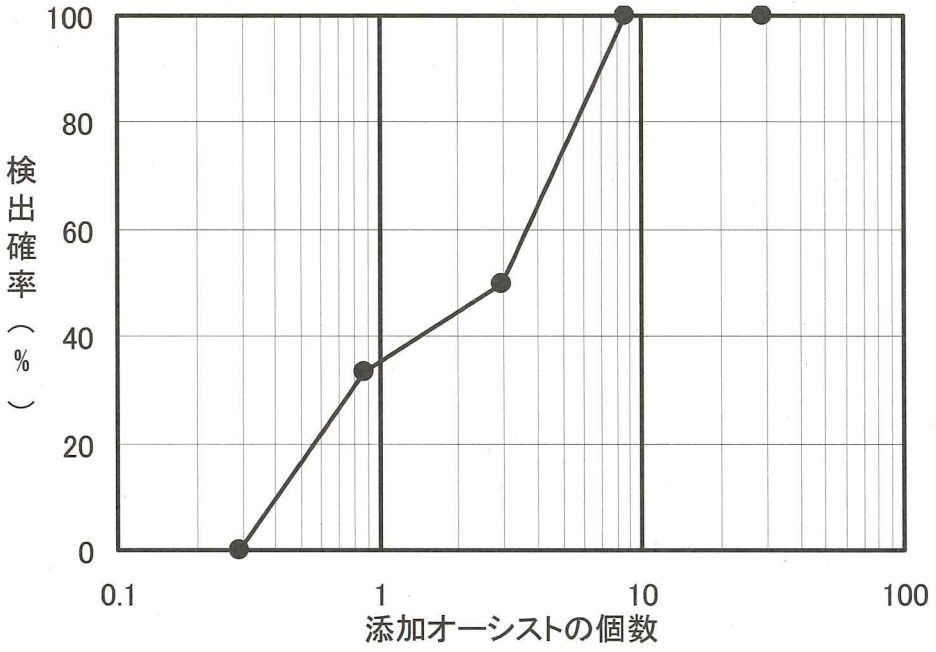
7.3.6　オーシストからのDNA抽出結果

表－7は凍結融解＋スピンカラム法によるDNA検出結果である。本法ではオーシスト数約9個以上より，クリプトスポリジウムDNAが確実に検出される。図－6は，オーシストの個数と検出確率の関係を示している。

表－7　（凍結融解＋スピンカラム）法によるDNA回収の結果

	実験日	無添加①	無添加②	添加オーシストの個数 0.29	0.87	2.9	8.7	29
1	10.1	－	－	－	＋	－	＋	＋
2	10.3	－	－	－	－	＋	＋	＋
3	10.7	－	－	－	－	＋	＋	＋
4	10.15	－	－	／	＋	－	＋	＋
5	10.17	－	－	／	－	＋	＋	＋
6	10.18	－	－	／	－	－	＋	＋

＋　検出　　－　未検出　／　未実施



図－6 凍結融解＋スピンカラム法によるDNA検出結果

表－8 は，凍結融解＋シリカビーズ法による DNA 検出結果である。図－7 は，オーシストの個数と検出確率の関係である。本法では，オーシスト数 2.9 個以上より検出されるが，オーシスト数 29 個であっても検出されない場合があった。

表－8（凍結融解＋ビーズ）法によるDNA回収の結果

	実験日	無添加①	無添加②	添加オーシストの個数 0.29	0.87	2.9	8.7	29
1	9.3	－	－	－	－	＋	＋	＋
2	9.4	－	－	－	－	＋	＋	＋
3	9.6	－	－	－	－	－	＋	＋
4	9.9	－	－	－	－	＋	＋	＋
5	9.11	－	－	－	－	－	－	＋
6	9.13	－	－	－	－	－	－	＋
7	9.25	－	－	－	－	－	＋	－

＋ 検出　－ 未検出

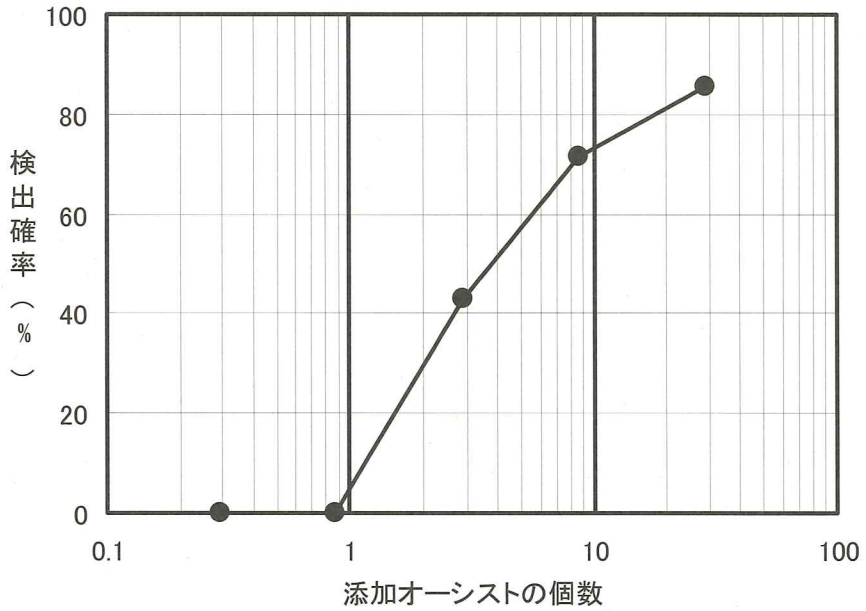


図-7 凍結融解+シリカビーズ法によるDNA検出結果

図－8 は凍結融解＋スピンカラム法と凍結融解＋シリカビーズ法によるオーシストの個数とクリプトスポリジウムの DNA 検出確率の比較である。下図より，同オーシスト濃度では，凍結融解＋スピンカラム法の方が，検出確率が高いことがわかる。

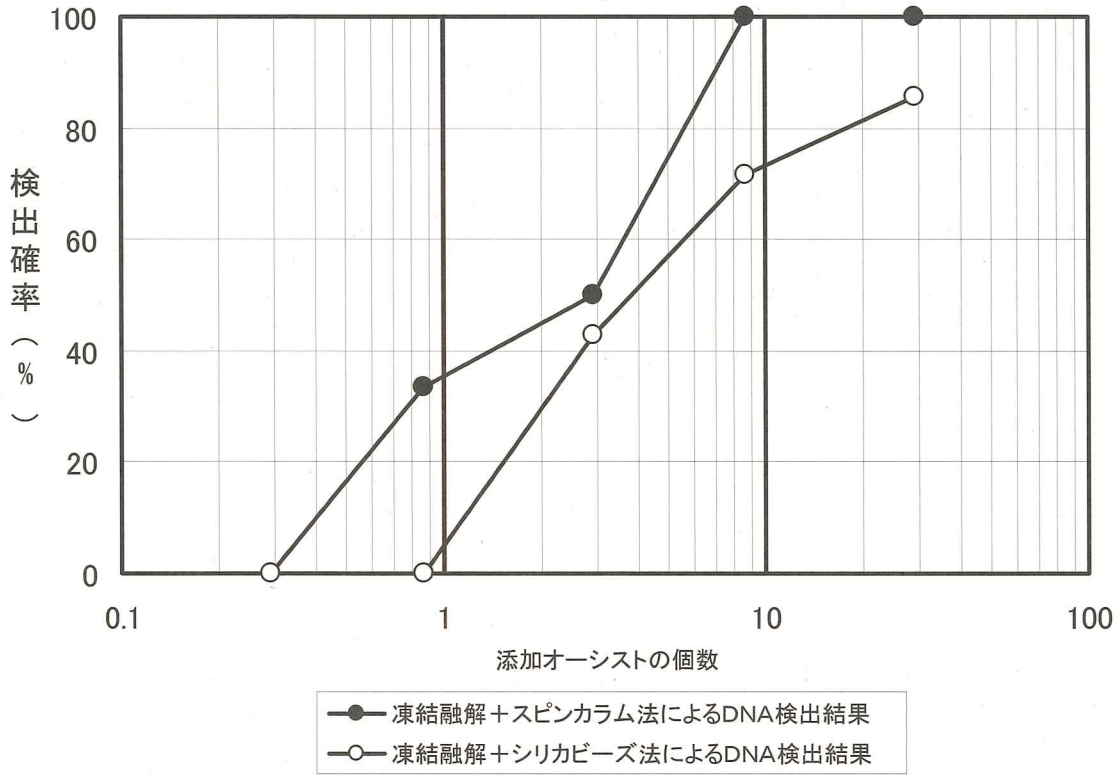


図-8　DNA回収法の比較

7.3.7　河川水へ添加したオーシストのDNA検出結果

表－9は，顕微鏡観察によるオーシストの回収結果である。

表－10は，同試料（同じ添加量のオーシストを同操作で回収した試料）のＰＣＲ検出結果である。検鏡で2個確認できるレベルであれば，概ねPCR法でも陽性となることがわかる。

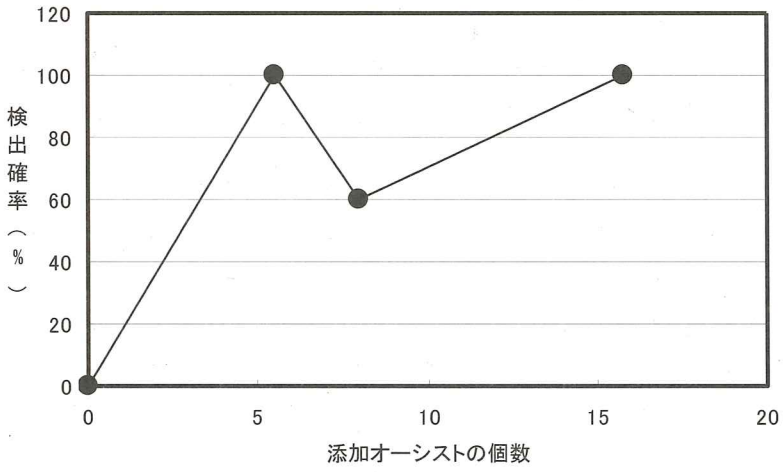
表-9　顕微鏡観察によるオーシストの回収結果

	実験日	試料	試料ろ過量 (ml)	添加オーシストの個数（検鏡による） 0	3～7	5～12	12～20
				平均添加オーシストの個数 0	6	8	16
1	12.16	河川水	300	0	2	7	12
2	12.19	河川水	300	0	2	5	7
3	12.20	河川水	300	0	5	5	13
4	1.9	河川水	300	0	3	10	8
5	1.15	河川水	300	0	3	7	11
（平　均）				0	3	6.8	10.2

表-10　河川水に添加したオーシストのDNA検出結果

	実験日	試料	試料ろ過量 (ml)	DNA検出 平均添加オーシストの個数 0	6	8	16
1	12.16	河川水	300	－	＋	－	＋
2	12.19	河川水	300	－	＋	＋	＋
3	12.20	河川水	300	－	＋	＋	＋
4	1.9	河川水	300	－	＋	－	＋
5	1.15	河川水	300	－	＋	＋	＋

＋　検出　　－未検出



図－9　DNA回収の結果

7.3.8　Real Time PCR 法によるクリプトスポリジウムオーシストの検出結果

図－10 は，クリプトスポリジウムオーシストの 0～87 個の希釈系列試料の Real Time PCR 結果である。図よりオーシスト数 0.87 個以上から，蛍光強度が増加していることがわかる。これは，標的としている 18SrDNA 部位が増加していることを意味しており，本法ではオーシスト数約 1 個から検出できることがわかる。図－11 は，図－10 の結果をオーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するまでに要するサイクル数の関係に整理したものである。オーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するまでのサイクル数の間に，相関関係が得られ，約 1 個相当のオーシストの定量検出が可能となることがわかる。

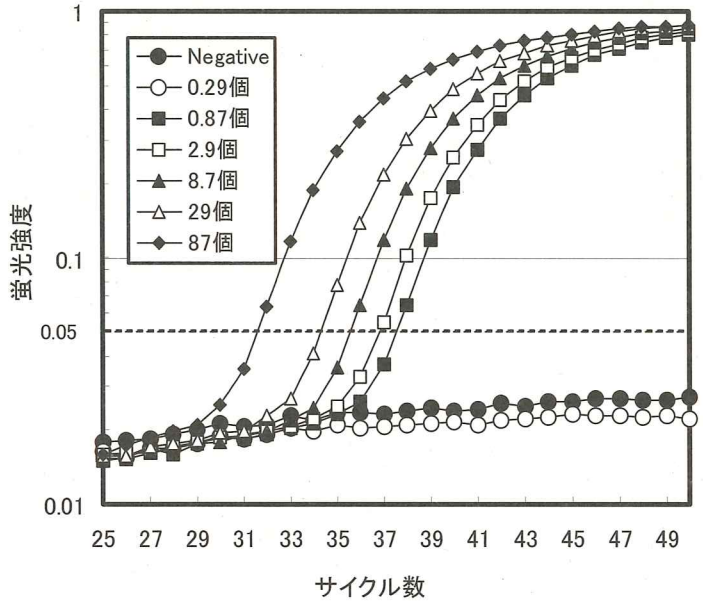


図-10　*Cryptosporidium*オーシストのReal Time PCR 結果

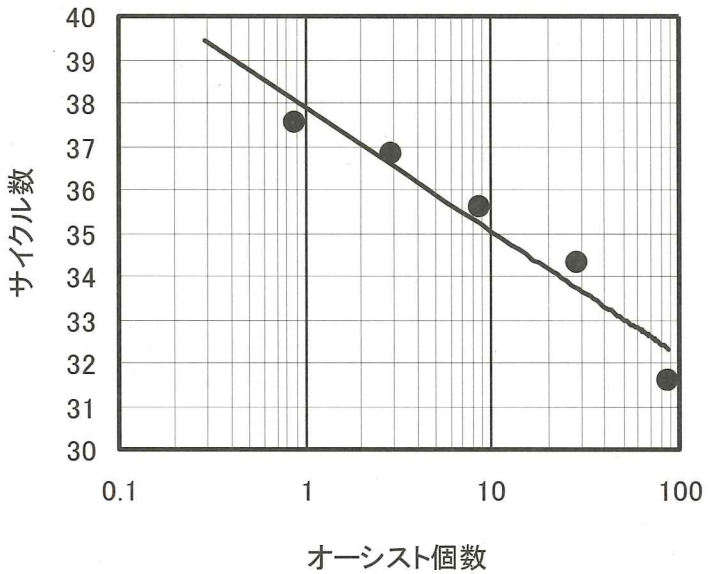


図-１１　オーシストの個数と蛍光強度が0.05に到達するに要するサイクル数の関係

8．まとめ

河川水中のオーシストをポリカーボネートフィルター法，カートリッジフィルター法，遠心浮遊法により濃縮した試料からのオーシストの回収率を比較した結果，ポリカーボネートフィルター法の回収率が80%と最も高かった。ただし，ポリカーボネートフィルター法はフィルター1枚でろ過できる水量が少なく，大量の試料をろ過する場合は，フィルターの交換枚数が増える欠点がある。しかし，下水200ml，下水処理水20L，河川水20L程度であればポリカーボネートフィルター法でも対応可能であると考えられた。河川水・下水中のオーシストの濃縮法には，ポリカーボネートフィルター法を採用した。

オーシストの濃縮に使用するポリカーボネートフィルターの孔径は3μmとした。これは、孔径2μmと3μmのポリカーボネートフィルターのオーシスト回収率には，顕著な違いは見られなかったことと，孔径2μmのポリカーボネートフィルターでは，オーシストを100%補足できるものの，フィルター通水量が孔径3μmのポリカーボネートフィルターの半分となる。ポリカーボネートフィルターの交換枚数を減少するためには，99.8%オーシストを補足できる3μmのポリカーボネートフィルターを使用することが望ましいと考えられた。

オーシストからのDNAの回収法は，凍結融解＋スピンカラム法で回収することとした。本DNA回収操作は簡便であり，検鏡によりオーシストを2個確認できるレベルであれば，PCR法で陽性になる。

Real Time PCR法では，クリプトスポリジウムオーシスト数約1個から定量検出可能となり，顕微鏡観察の代替法となる可能性がある。