

リジウムを感染させるためには脱囊のための前処理を施したほうが良いものと判断される。予備的実験によると、前処理を1時間とすると脱囊率は99.9%と極めて効率的であるが、この方法では処理液中で脱囊が始まり、遊出したスポロゾイトの活性の低下が心配された。一方、前処理を5分とし、その後の2時間以内の脱囊率はおよそ84%に留まったが、処理後のオーシストをただちに遠心洗浄し、培養細胞へ移行することで逆に高い感染率が得られた。

2. 培養細胞における増殖

HCT-8 細胞を用いた感染実験

継時的に感染細胞をメタノール固定し、FITC 標識抗-スポロゾイト単クローン抗体染色後に観察に供した。クリプトスポリジウム接種後、1日目の培養細胞シートでは蛍光染色陽性の比較的小さな粒子が点在する像が観察された(図1A)。感染2日目では、染色される粒子が多数観察されるようになり、大きい粒子で直径約5 μ m、小さいものではその約1/2程度であった。また、感染2日後では蛍光粒子が集塊形成(図1B)しており、遊出したメロゾイトが近傍の細胞へ寄生していくことを示す像と考えられた。蛍光発色部を微分干渉顕微鏡で観察すると、明らかにシスト様の粒子が確認された(図1C、D)。一部では第二世代シゾン(4-メロゾイト形成)への発育も観察され(図1D-a)、世代交番も行われるに至っているものと判断された。また、雌性配偶子(macrogamete)ではないかと推測される多数の微細顆粒を含む細胞(図1D-b)も頻繁に観察された。しかしながら、78時間以降の培養では寄生原虫数の増加はほとんど認められず、その後は比較的速やかに消失した。この原因については全く不明であるが、培養条件の整備によりオーシスト形成誘導が可能であるものと判断している。なお、通常の培地組成に glucose や葉酸、その他の組成を追加した強化培地を用いたが、これによる発育の促進や、感染虫体数の増加は認められなかった。

Caco-2 細胞を用いた感染実験

基本的に HCT-8 細胞を用いた感染実験と同様の結果を得た。感染後1日目の Caco-2 細胞を FTEC-標識 抗-オーシスト壁 単クローン抗体、および抗-スポロゾイト 単クローン抗体で二重染色した結果を図1Eに示した。Caco2 細胞中にはすでに4-6 μ mのシスト様構造物が観察された。また、schizogony の速度は速く、感染1日目ですでに8個のメロゾイトを包含するシスト、すなわち schizogony を完了することが確認された。Giemsa 染色標本においても同様にシスト内のメロゾイトが確認された(図1F)。これらの観察結果は後述の電子顕微鏡像とよく符合した。さらに、感染2日目の蛍光顕微鏡観察像では多数のシストの集塊が観察され、新たに遊出したメロゾイトが近傍の細胞に寄生したものと推測された(図1G)。これらの結果は HCT-8 細胞を用いた実験結果とよく一致したが、Caco-2 細胞を宿主とした場合の増殖(メロゾイトの再感染数)がわ

ずかに劣る傾向が見られた。

ちなみに、感染2日目の時点では、オーシスト形成には至らないので、細胞培養中に見られる嚢子構造は第1次、第2次シゾン、あるいは雌性、雄性配偶子のいずれかと判断されるが、その蛍光抗体染色像はオーシストのそれとよく似ており（図1G）、無性生殖期のシスト壁とオーシスト壁の抗原性が一致、あるいは少なくとも共通抗原を有していることが示された。3日目の標本では原虫数が暫減し、4日目以降では著しく減少した。

電子顕微鏡観察

オーシストから脱嚢したクリプトスポリジウムのスポロゾイトは腸管上皮細胞の微絨毛に付着し、これを変形して attachment あるいは feeder organelle と呼ばれる特有の連絡（結合）構造を形成し、細胞の外側（腸管腔側）に寄生胞（parasitophorous vacuole）を形成することが知られている。図-Xは7日培養の Caco2 細胞にクリプトスポリジウムを感染させ、1日経過後の細胞の電子顕微鏡像である。図2Aは多分裂（schizogony）前の trophozoite と考えられ、大きな仁を有する核が観察される。また、宿主細胞との連結部位では feeder organelle など典型的な構造が観察される。図2B,Cは schizogony 中の像で、形成されつつあるメロゾイト（merozoite）が観察される。図2Bでは残体（residual body）等の特徴的な像が観察される。また、図2Dでは schizogony が完了して、シスト内に8個体の merozoite が観察される。すなわち、*C. parvum* は Caco2 細胞に寄生し、感染1日後ですでに schizogony を完了することが確認されたものの、有性生殖期（雌性、雄性生食母体）へ移行したと見られる像は観察されなかった。

3. クリプトスポリジウム感染 HCT-8 細胞の継代培養

継代培養して24時間後は細胞数が少ないためか、蛍光染色されるクリプトスポリジウムは少なかった（写真4A）。48時間を経過すると細胞の増殖に伴って FITC 陽性粒子数が増加したが、初代感染のような旺盛な増殖は見られなかった。さらに、継代を繰り返すと、観察される蛍光粒子は極めて少なくなり、その後72時間の培養期間中に蛍光粒子はほとんど観察されない程度まで減少した。

4. まとめ

HCT-8、あるいは Caco-2 細胞の培養系を用いたクリプトスポリジウムの感染実験は比較的容易に成立することが示された。しかしながら、実験系は定性的で、接種量と感染個体数との相関を得るには至らなかった。培養細胞中でのクリプトスポリジウムの発育は比較的速やかに進行し、接種後24時間にはすでに schizogony（孢子虫類における無性生殖の多分裂様式）を完了することが確認された。その後、2日目まではあらたに形成されたメロゾイトによる感染が認められた。

その際、メロゾイトは近傍の宿主細胞表面に定着する傾向が見られた。したがって、蛍光顕微鏡像としては原虫による集塊が形成された。また、一部では第2世代のシゾン形成が進行し、さらに卵母細胞と思われる像も確認された。齒科 H しながら、その後の培養において原虫数増加は認められず、むしろ比較的速やかに消失した。これは、感染細胞を継代培養した実験においても同じで、単に培養液の老化など培養条件の劣化が原因とは考えられない結果であった。

一般に、孢子虫類では無性生殖世代での分裂回数、すなわち schizogony の回数が決まっており、その後は有性生殖期への移行過程である Second-generation schizont (第2次シゾン; 4個のメロゾイト形成) へ発育し、雄性生殖体、雌性生殖体、さらには受精してオーシスト形成に至ることが知られている。クリプトスポリジウムに関しては1回目の schizogony により形成されたメロゾイトは次いで第2次シゾン形成へ移行するとされている。本培養系では感染48時間以降に寄生虫体の増加が認められないこと、次いで暫時寄生数が減少していくことから、第2次シゾン形成から有性生殖世代への移行は進行するが、オーシスト形成やその後の自家感染が成立していないか、極めて少ないものと判断された。今後は、有性生殖世代への発育を中心にその培養条件設定を行う必要があるものと考えられる。

本実験の結果からは、オーシストを用いた培養細胞への感染は比較的容易に成立すること、少なくとも新たに形成されたメロゾイトによる新たな感染により虫体の増員がはかられることが示された。これらを基に、今後は実験動物への感染に際して培養系でクリプトスポリジウムの増員をはかり、得られた多数の原虫を用いた動物感染実験を検討したい。少数のオーシストを用いた動物感染では実験の成否が危ぶまれるが、培養細胞系で原虫を増員させることで感染実験の効率を向上させることが出来るものと期待される。また、感染細胞を凍結保存することにより分離株保存への応用もあわせて検討したい。

参考文献

1. Tzipori S. and Griffiths J.K., 1998. Natural History and Biology of *Cryptosporidium parvum*. *Ad. Parasitol.* 40:5-36.
2. Fayer R., Speer C.A. and Dubey J.P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*, in: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (Fayer R. eds.) pp 1-42, CRC Press, Boca Raton, Fl.
3. Upton S.J. 1997. In vitro Cultivation, in: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis* (Fayer R. eds.) pp 181-207, CRC Press, Boca Raton, Fl.

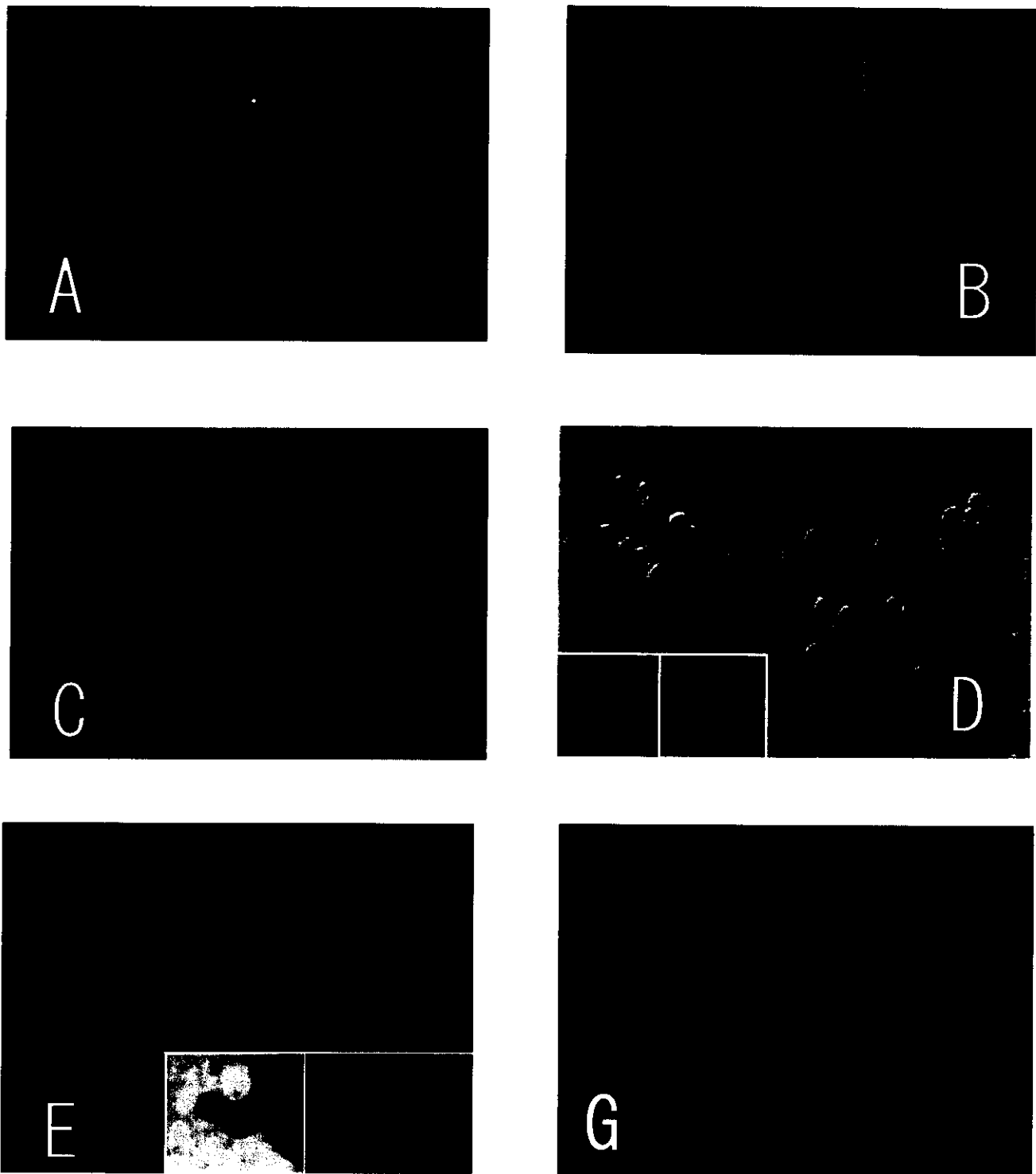


図 1. 培養細胞へのクリプトスポリジウム感染実験

- A: 感染後1日目のHCT-8細胞中に認められるクリプトスポリジウム、
 B: 2日目 原虫が集塊を形成、C: 2日目、拡大 蛍光抗体染色像、
 D: 2日目、拡大 微分干渉顕微鏡像 Cの蛍光像と同一視野、
 a: Second-generation schizont、b: macrogamete
 E: 感染1日目のCaco-2細胞、8個のメロゾイトが観察される（枠内、拡大図）
 F: 1日目、シスト内のメロゾイト Giemsa 染色像 拡大図、
 G: 2日目、蛍光抗体染色像 シストが集塊を形成 拡大図

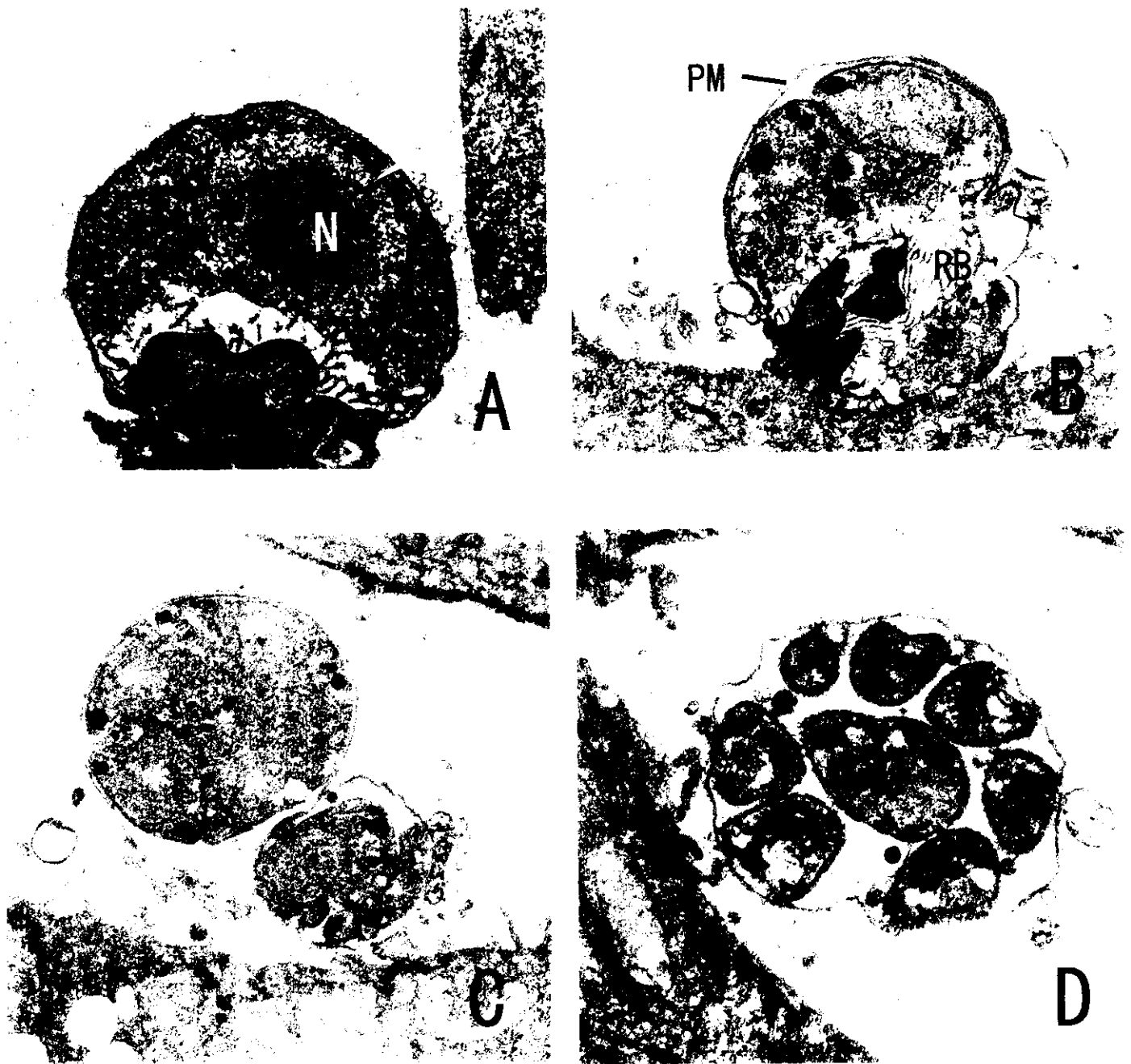


図2 培養細胞内でのクリプトスポリジウムの発育像

- A: 感染1日目のCaco-2細胞表面に形成されたシスト1個のTrophozoiteが観察される
- B: 同上、schizont、メロゾイト2個が認められる
- C: 同上、schizont、メロゾイト4個が認められる
- D: 同上、分裂が完了し、形成された8個のメロゾイト

*:merozoite; N:nucleus; PM: parasitophorous membrane; RB:residual body

分担研究報告書 8

Cryptosporidium parvum オーシストの脱嚢試験方法の改良

分担研究者 平田 強、金子光美

Cryptosporidium parvum オーストの脱囊試験方法の改良

分担研究者 平田 強 麻布大学環境保健学部 教授

分担研究者 金子 光美 摂南大学工学部 教授

研究協力者 森田 重光 麻布大学環境保健学部 講師

研究要旨

Cryptosporidium parvum HNJ-1 株のオーストの脱囊に及ぼす酸性 HBSS による前処理の有無の影響と、前処理時間および脱囊処理時間の影響を、2 種類の脱囊液について、新鮮な無処理オーストと UV 照射オーストを用いて評価した。脱囊率は、生成した空のオースト数と遊離スポロゾイト数の 2 通りの方法で評価した。その結果、前処理の有無の影響および脱囊処理時間の影響は、脱囊の判定方法および脱囊液の種類によって異なり、条件によっては脱囊率に大きな差異が生じた。脱囊試験方法の適正化が必要であることが強く示唆された。

A 研究目的

Cryptosporidium parvum による水系感染リスクや処理・消毒の不活化効果の適切な評価には、水中のオーストの生育活性や感染性の正確な把握が望ましい。感染性の評価方法として細胞感染法やマウス感染法があるが、これらはいずれも特別の施設と技術を必要とし、費用もかかる。比較的簡便な生育活性評価方法としては脱囊法がある。これは、脱囊を刺激・促進する「脱囊液」に一定時間暴露（脱囊処理）し、脱囊して空となったオーストの殻あるいは遊離スポロゾイトを計数（あるいはその双方を計数）する方法であり、単に脱囊による生育活性の評価のみならず、最近新たに発展してきた培養細胞感染法でも使用されている。

現在使用されている *C.parvum* オーストの脱囊方法には 2 通りの方法がある。その 1 つはオーストをそのまま脱囊液で処理する Woodmansee (1987) に代表される方法である。この方法は新鮮オーストの脱囊率が低く、少量の酸化剤に暴露させると脱囊率が高くなるという生育活性評価上の問題を有していることから、この欠点をカバーするための前処理方法が検討され、1.75% 次亜塩素酸ナトリウムに氷上で 12 min (Reduker et al, 1985), 5.25% 次亜塩素酸ナトリウムに氷上で 5 min (Woodmansee, 1987), 酸性 HBSS に 30℃ で 60 min (Campbell et al, 1992) など、いくつかの方法が検討された。このうち、酸性 HBSS による前処理方法は温血動物の胃内環境を模擬したもので、感染様式を踏まえた点では方法的に優れた前処理と考えられることから、酸性 HBSS による前処理時間の脱囊に及ぼす影響について、空オースト生成の観点からの検討を行った（小澤ほか, 1999）。それによると、新鮮オーストでは前処理時間 5 min 程度で 90 数% に達する脱囊率が得られ、前処理時間を延長しても脱囊率の低下は生じなかったが、UV 照射したオーストでは、長時間（5 min 超）の前処理を行うと、UV 照射線量が多いオーストほど前処理時間が長くなるに従って、脱囊率が有意に減少することが明らかにされた。このことは、オースト側の条件によっては、脱囊率が前処理条件に大きく依存することを示している。

一方、生育活性のないオーストが前処理や脱囊処理による物理化学的影響で脱囊する可能性がある指摘されており、そのような現象が生じた場合には、生育活性を実際よりも高く評価する結果につながるおそれがある。

これらの問題を克服するには、脱囊したオーストから遊離するスポロゾイトを計数する方法が一つの選択肢となりうるが、37℃、4 h の脱囊処理では脱囊液中でスポロゾイトがほとんど完全に消失するので（Campbell et al, 1992）、そのままスポロゾイト計数法に利用することはできない。

このように、*C. parvum* の生育活性を脱糞試験結果に基づいて評価する方法論が数多く利用されているにもかかわらず、適切な脱糞処理条件が必ずしも明確になっていない。

そこで、本研究では、前処理液として酸性 HBSS、脱糞液として Woodmansee の方法と Campbell の方法で使用されている 2 種類の脱糞液を用いて、*C. parvum* HNJ-1 株オーシストの空オーシストの数と遊離スポロゾイト数に及ぼす前処理時間と脱糞処理時間の影響を実験的に評価した。

B 方法

1 供試オーシスト

大阪市立大学医学部井関基弘博士（現 金沢大学医学部教授）より譲与され、麻布大学生物科学総合研究所感染エリアで SCID マウスを用いて継代維持している *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストを、シヨ糖浮遊遠心法で精製した。実験には、(1)精製したオーシストそのもの、(2)異なる線量の紫外線を照射したオーシストを用いた。

2 オーシストへの紫外線照射

低圧水銀ランプが発生する紫外線を照射した。照射線量率は紫外線線量計により測定し、照射線量 (mW s/cm^2) は線量率 (mW/cm^2) \times 照射時間 (s) により算出した。

3 脱糞試験

Woodmansee 法と Campbell 法を基本的な 2 つの方法と位置付け、前処理には酸性 HBSS (pH2.75) を、脱糞処理には Woodmansee(1987) と Campbell et al(1992) の脱糞液 (それぞれ、以下、脱糞液(W)、脱糞液(C)) を選定して評価した。処理温度は前処理、脱糞処理ともに 37°C とした。試験操作は次の通りである。

3-1 前処理

- (1) オーシスト懸濁試料 100 μL に酸性 HBSS (HBSS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, pH7.2) に 1 N HCl を加えて pH2.75 に調整したもの) 1 mL を加えてよく混合する。
- (2) 直ちに 37°C の恒温槽に入れ、所定時間保温する。
- (3) 4°C 恒温水槽に 5min 浸漬して冷却する。
- (4) 冷却遠心機(4°C)を用いて 1,120 \times g で 10 min 遠心する。
- (5) 上清の吸引除去し、沈渣を含む 100 μL 分を残す。
- (6) 冷却遠心機(4°C)を用いて 1,120 \times g で 10 min 遠心する。
- (4) 上清を吸引除去して沈渣を含む 100 μL 分を残し、これを脱糞処理用試料とする。

3-2 脱糞処理

3-2-1 脱糞液

次の 2 通りの脱糞液を使用した。

脱糞液(C) : A 液 (デソキシコール酸ナトリウム 1g を HBSS 100 mL に溶解したもの) と B 液 (炭酸水素ナトリウム 2.2 g を HBSS 100 mL に溶かしたもの) の 2 液からなり、使用の際に、オーシスト懸濁液 100 μL に対して A 液 10 μL 、B 液 10 μL を順次加える。

脱糞液(W) : 1.5% (w/v) 胆汁酸 (Sigma chemical Co, St. Louis, Mo) 0.015 g と 0.5% (w/v) トリプシン (United States Biochemical Corp, Cleveland, OH) 0.005 g を HBSS (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, pH7.2) 1 mL に溶解する。本液は使用時の 30 分以内に作製し、ろ過してから、オーシスト懸濁液 100 μL に対して 1 mL 加える。

3-2-2 脱糞処理操作

- (1) 脱糞液(W) の場合は、オーシスト懸濁液 100 μL に対して脱糞液(W) を 1 mL 加える。
脱糞液(C) の場合は、オーシスト懸濁液 100 μL に対して A 液、B 液をそれぞれ 10 μL ずつ加える。

(2) 37°Cの恒温槽に浸漬し、所定時間保温する。

(2') 脱囊液(C)を用いた場合のみ、HBSS (pH7.2)を 1 mL 加え (pH の中性化)、よく混合する。

*スポロゾイトを計数する場合は、この段階で一部を定量的に分取して顕微鏡観察する。

*オーシストの形態観察の場合は、濃縮を目的に、必要に応じて、さらに以下のように操作する。

(3) 1,120×g で 10 min 遠心する。

(4) 上清を吸引除去し、沈渣を含めて、試験に供したオーシスト懸濁液量分を残す。

(5) HBSS を 1 mL 加え、良く攪拌後、1,120×g で 10 min 遠心する。

(6) 上清を吸引除去し、沈渣を含めて 20μL 分を残す。

(7) よく攪拌した後、定量的に分取して、顕微鏡で観察する。

3-3 脱囊率の算出

脱囊率は、次式により算出した。

脱囊率(オーシスト) = [一連の脱囊処理により脱囊したオーシスト数] / [全オーシスト数]

脱囊率(スポロゾイト) = [一連の脱囊処理後の遊離オーシスト数 / 4] / [全オーシスト数]

C 結果

1 UV を照射したオーシストを用いた脱囊液(W)と(C)による脱囊率の比較

脱囊液(W)と脱囊液(C)の *C.parvum* オーシストの脱囊に及ぼす影響を評価するために、UV を 100, 150 mW s/cm²照射したオーシストを酸性HBSS により 37°Cで5または60 min 前処理したのち、それぞれ30, 60, 90, 120, 180, 240 min 脱囊処理した。脱囊は、オーシストの形態変化に基づく方法と遊離スポロゾイト数に基づく方法の両者により評価した。

1-1 オーシストの形態に基づく評価結果 (図1および表1)

オーシストの形態変化 (完全オーシストから、空のオーシストへの変化) で評価したとき、脱囊液(C)では脱囊液(W)中よりも速やかに脱囊し、脱囊液(C)では、UV 照射線量約 150 mW s/cm²・前処理時間 5 min のケースを除いて、UV 照射線量および前処理時間に依存することなく、脱囊処理時間 30 min で脱囊がほぼ完了した。UV 照射線量約 150 mW s/cm²・前処理時間 5 min のケースでは、脱囊処理時間 30 min の脱囊率は 60 数%程度と他の3ケースに比べて低かったが、脱囊処理 60 min で完了した。

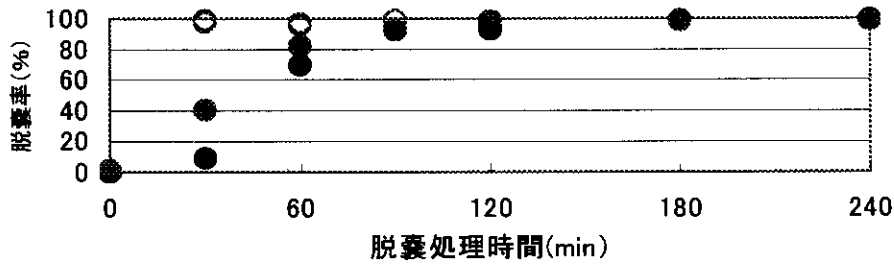
これに対して脱囊液(W)では(C)の場合よりも脱囊が緩やかに進み、脱囊処理時間 30 min における脱囊率は最大 40%程度、最小 0 と大きくばらつき、90%脱囊に 90~120 min, 脱囊完了に 180 min を要した。

酸性 HBSS による前処理時間、UV 照射線量も脱囊速度に影響しており、前処理時間が長いほど、UV 照射線量が少ないケース (約 150 mW s/cm²) で、若干ではあるが、より速やかに脱囊する傾向が認められた。

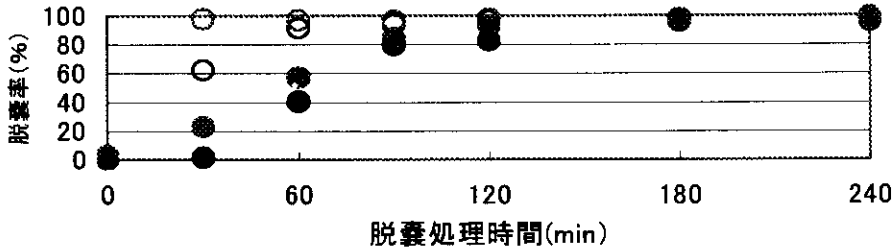
表1 脱囊率が最大値に到達する脱囊処理時間 (オーシスト形態による評価)

UV 照射線量 前処理 (mW s/cm ²) (min)	脱囊液(C)		脱囊液(W)	
	脱囊処理 (min)	脱囊率 (%)	脱囊処理 (min)	脱囊率 (%)
99.96	30	99.1	90 (60)	92.0 (69.2)
	60	97.6	90 (60)	92.3 (82.0)
149.9	30	94.6	180 (60)	96.6 (40.8)
	60	97.5	180 (60)	96.2 (57.3)

()内の数字は、脱囊処理時間 60 min の時の脱囊率。



紫外線条件 (99.96mW s/cm², 20°C, pH7)
オーシストによる脱糞率



紫外線条件 (149.9mW s/cm², 20°C, pH7)
オーシストによる脱糞率

○C法 前処理5分 ○C法 前処理60分
●W法 前処理5分 ●W法 前処理60分

図1 脱糞処理時間による脱糞率の変化 (オーシスト形態による評価)

1-2 遊離スポロゾイト数に基づく評価 (図2および表2)

遊離スポロゾイト数から算出した脱糞率の脱糞処理時間に伴う変化を図2に示す。スポロゾイト数が最大になる脱糞処理時間は、前処理時間、UV照射線量に関係なく、脱糞液(W)ではほぼ60minとなったが、脱糞液(C)では実験した最短時間30minの段階で既に最大値となっており、60minでは低下した。

スポロゾイト数から求めた脱糞率の値には、UV照射線量が同じであっても脱糞液間で異なる傾向があり、一般に脱糞液(W)で大きくなる傾向があったほか、UV照射線量による違いや、前処理時間による違いが認められた。前処理時間の影響は脱糞液(W)で大きく、前処理時間5minよりも60minのほうが、脱糞率が明らかに高い値を示した。脱糞液(C)でも、前処理時間60minの脱糞率が脱糞処理時間30minのときよりも高い傾向を示した。

表2 脱糞率がプラトーに到達する脱糞処理時間 (脱糞液(C), スポロゾイト数による評価)

UV照射線量 mW s/cm ²	前処理 min	脱糞液(C)		脱糞液(W)	
		脱糞処理 min	脱糞率 %	脱糞処理 min	脱糞率 %
99.96	5	30 (60)	14.9 (12.1)	60	26.8
	60	30 (60)	34.9 (7.7)	60	56.1
149.9	5	30 (60)	7.6 (0.8)	60	30.0
	60	30 (60)	22.1 (8.1)	60	33.7

()内の数字は、脱糞処理時間60minの時の脱糞率。

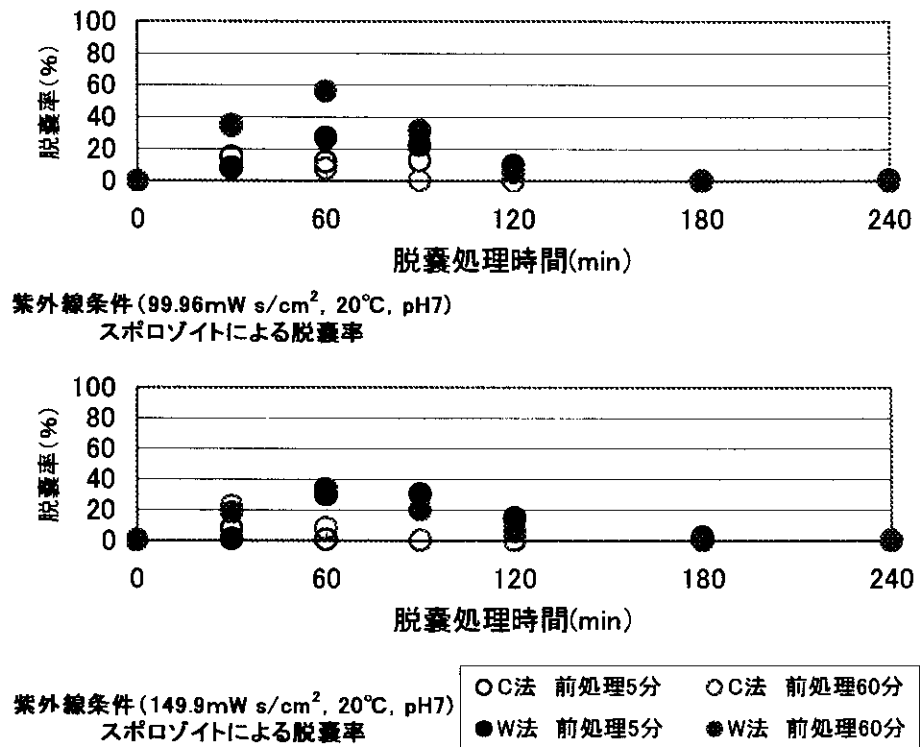


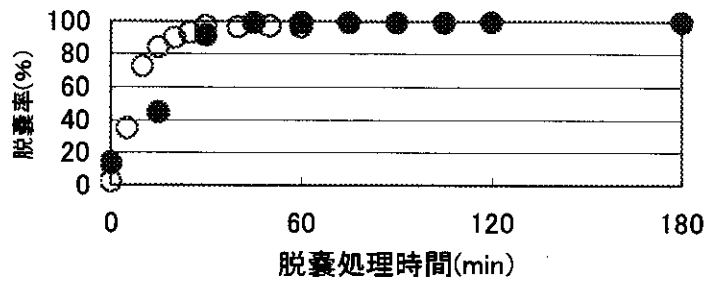
図2 脱囊処理時間に伴う脱囊率の変化 (スポロゾイト数による評価)

2 UV 未照射オーシストと UV 照射オーシストの比較

1-1 および 1-2 で、最小脱囊時間 30 min のときにスポロゾイト数が最大となる例が認められた。そこで、脱囊処理時間の間隔を細分化して、再度評価実験を行った。オーシストは、未処理オーシストおよび 102 mW s/cm² の UV を照射したオーシストとし、前処理は脱囊液(W), (C)のいずれも酸性 HBSS による 60 min のみとし、脱囊所持時間は脱囊液(W)では 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 min, 脱囊液(C)では脱囊処理 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min とした。また、極少量の UV を照射することによってオーシストの感染性が著しく減少するとの知見を得ていたことから、UV を 5 mW s/cm² 照射したオーシストも対象にすることとした。前処理時間は 60 min のみとし、脱囊処理時間は脱囊液(W)については 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 min, 脱囊液(C)については 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 min とした。いずれの場合も、形態別オーシストとスポロゾイトを計数した。

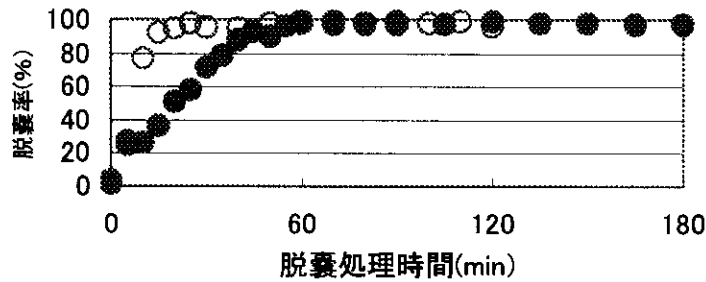
2-1 オーシストの形態に基づく評価 (図3, 表3)

オーシストの形態変化 (完全オーシストから、空のオーシストへの変化) で評価したとき、脱囊液(C)では UV 照射の有無および照射線量に関係なく、ほぼ 20~30 min で脱囊が完了した。これに対して脱囊液(W)は脱囊液(C)に比べて脱囊に長時間を要し、かつ UV 照射線量の増大に伴って増加する傾向があり、UV 照射線量 0, 5, 102 mW s/cm² のときの脱囊完了時間はそれぞれ 45, 60, 75 min であった。



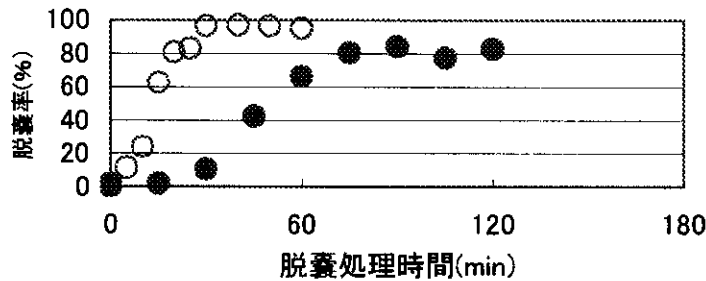
紫外線条件 (0mW s/cm², 20°C, pH7)
オーシストによる脱糞率

●W法 前処理60分 ○C法 前処理60分



紫外線条件 (5mW s/cm², 20°C, pH7)
オーシストによる脱糞率

●W法 前処理60分 ○C法 前処理60分



紫外線条件 (102mW s/cm², 20°C, pH7)
オーシストによる脱糞率

●W法 前処理60分 ○C法 前処理60分

図3 脱糞処理時間による脱糞率の変化 (オーシスト形態による評価)

表3 脱糞率が最大値に到達する脱糞処理時間 (オーシスト形態による評価)

UV 照射線量 mW s/cm ²	前処理 min	脱糞液(C)		脱糞液(W)	
		脱糞処理 min	脱糞率 %	脱糞処理 min	脱糞率 %
0	60	25	92.7	45	99.2
5	60	20	94.9	60	99.1
102.6	60	30	96.3	75 (60)	80.3 (66.3)

()内の数字は, 脱糞処理時間 60min のときの脱糞率。

2-2 スポロゾイト数に基づく評価結果 (図4, 表4)

スポロゾイト数で評価したときに脱糞率が最大になる脱糞処理時間は, 脱糞液(C)の場合, UV 照射が

0, 5, 102 mW s/cm² でいずれも 20~30 min であった。脱囊液(C)では UV 照射 0, 5 mW s/cm² で 45~60 min, 102 mW s/cm² では若干長くなり、60~90 min であった。

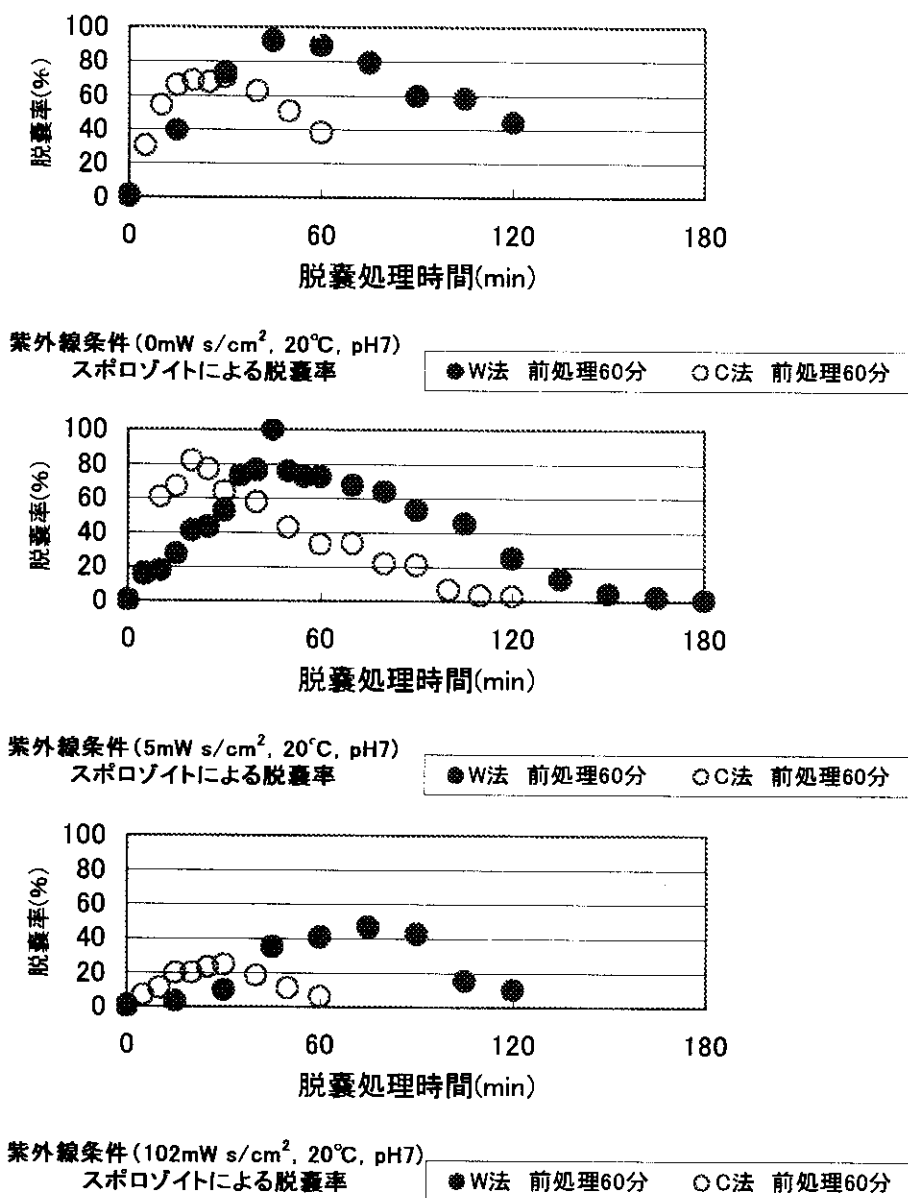


図4 脱囊処理時間に伴う脱囊率の変化 (スポロゾイト数による評価)

表4 脱囊率が最大値に到達する脱囊処理時間 (スポロゾイト数による評価)

UV 照射線量 mW s/cm ²	前処理 min	脱囊液(C)		脱囊液(W)	
		脱囊処理 min	脱囊率 %	脱囊処理 min	脱囊率 %
0	60	15~30 (60)	66.1~62.5 (38.2)	45~60	92.3~89.4
5	60	20 (60)	81.9 (33.2)	45~60	73.5~73.0
102.6	60	20~30 (60)	19.7~18.1 (6.0)	60~90	40.9~42.7

()内の数字は、脱囊処理時間 60 min のときの脱囊率。

3 脱囊液(W)における酸性 HBSS 前処理の有無が脱囊率に及ぼす影響 (図 5, 図 6)

脱囊液(C)では、新鮮な無処理オーシストの場合、前処理なしでは脱囊率が 50%前後に過ぎないが、酸性 HBSS による前処理を 5 min 程度行うことにより、90%以上になることが知られている。しかし、脱囊液(W)では新鮮な無処理オーシストの脱囊率に及ぼす前処理の影響は明らかになっていない。そこで、脱囊液(W)について、新鮮な無処理オーシストの脱囊率に及ぼす酸性 HBSS による前処理の有無の影響を調べるために、5 および 60 min 前処理したオーシストについて、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 min 脱囊処理し、オーシストの形態およびスポロゾイトを計数した。結果を図 5, 6 に示す。なお、図中には、比較のため、脱囊液(W)で酸性 HBSS により 60 min 前処理した場合の脱囊率を示した。

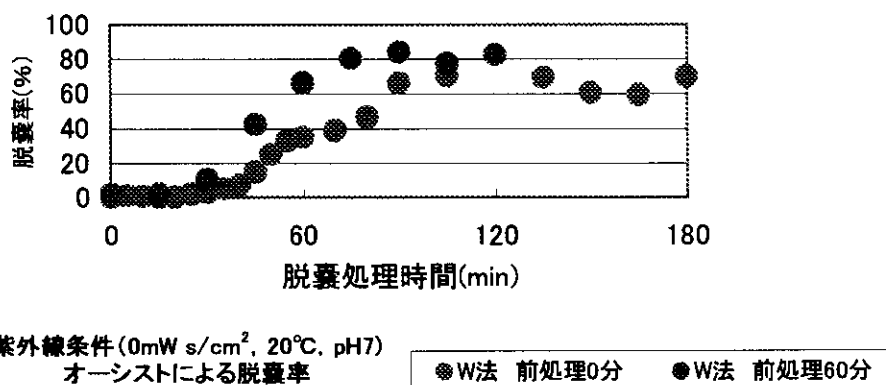


図 5 脱囊処理時間に伴う脱囊率の変化 (オーシスト形態による評価)

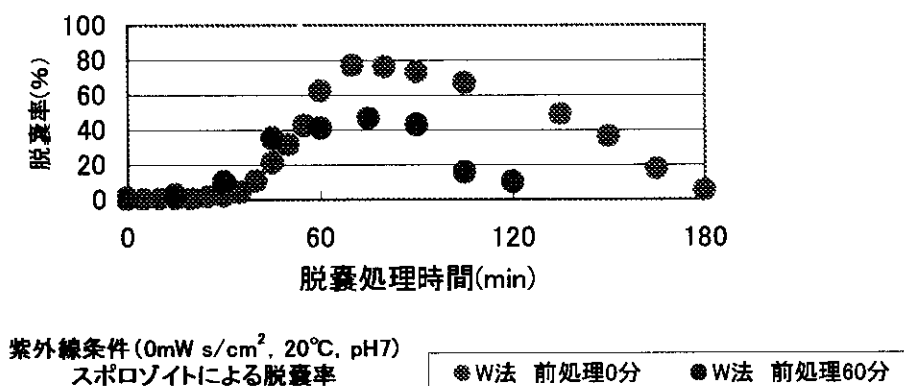


図 6 脱囊処理時間に伴う脱囊率の変化 (スポロゾイト数による評価)

脱囊をオーシストの形態で評価した場合、脱囊液(W)では、酸性 HBSS による前処理なしでは脱囊に明らかに遅れが見られ、脱囊が完了するまでに 90~120 min を要した (酸性 HBSS により 60 min 前処理した場合は 60~90 min)。しかし、達成された脱囊率そのものの値には、脱囊液(C)とは異なり、前処理の有無による違いは生じなかった。

スポロゾイト数で評価した脱囊率でも、最大値に達する脱囊処理時間に前処理の有無の影響が現れたもののその影響は小さく、前処理 60 min の場合 45~90 min、前処理なしの場合は 70~90 min と若干長めになる程度であった。しかし、脱囊率の値そのものに影響が現れ、60 min の前処理を行ったときの最大脱囊率は 50%以下であったが、前処理なしの場合は約 80%にまで上昇した。

D 考察

Cryptosporidium parvum オーシストの場合、脱囊による生育活性の評価法は、試験に特別の施設を必要とせず、比較的簡便に行える点で優れている。また、評価結果の取り扱い方法によっては消毒効果の評価にマウス感染性や培養細胞感染性の直接、間接の代替評価手法として利用できる場合がある。

実際、塩素では Hirata et al (1999), Hirata et al (2001), 志村ら(2001)等のマウス感染性による評価結果と Marinas et al (2001)の脱囊試験による評価結果がよく一致しているし、Hirata et al (2001)は、オゾンによる不活化効果の評価で、Woomansee 法-スポロゾイト計数法の脱囊試験結果とマウス感染試験結果がおおむね一致することを示している。オゾンでも、脱囊試験結果で感染試験結果と類似する結果が得られている (Rennecker et al, 1999; Marinas et al, 2001)。

一方、UV 照射による不活化では、同じ不活化レベルを達成するのに要する UV 照射線量は、脱囊で評価すると感染による評価結果の 100~200 倍もの照射線量を必要とすることが明らかになっている (Morita et al, 2001)、これは UV のもたらす不活化が DNA の損傷にあつて、極低レベルの UV 照射により DNA に損傷が生じて感染力を失うものの、オーシストは生物学的にはなお生きている状態にあることによるものであり、化学消毒剤による不活化とは性状が異なることによるものと考えられる。したがって、DNA 損傷によらない不活化効果をもたらす薬剤等の不活化効果を直接あるいは間接的に評価する手法として、脱囊が利用できる可能性は必ずしも少なくない。しかしながら、脱囊試験方法は必ずしも統一されておらず研究者によって異なる方法が使用されているため、各研究結果の相互比較が場合によっては困難となる。

また、脱囊は培養細胞感染法でも重要である。培養細胞感染法では細胞にスポロゾイトを感染させるためにオーシストからスポロゾイトを脱囊させなければならないので、高率で脱囊させることができ、しかも脱囊したスポロゾイトが長時間生育活性を維持することができる脱囊試験方法の開発が望まれる。

そこで本研究では、新鮮無処理オーシストと UV 照射したオーシストを用いて、脱囊試験に多用されている組成の異なる 2 種類の脱囊液について、前処理の有無、前処理時間、脱囊処理時間が脱囊率に及ぼす影響を、脱囊によって生じた空のオーシスト数と、脱囊によって生じた遊離スポロゾイト数の 2 つの生物学的特徴を指標として評価したところ、

- (1) 脱囊液によって脱囊の発現が異なり、脱囊液(C)は比較的速やかに脱囊を発現させるのに対して、脱囊液(W)では比較的長時間を要する傾向にあること、
 - (2) 酸性 HBSS による前処理は、脱囊液(C)では無処理オーシストの脱囊率を約 2 倍程度に増加させるが、脱囊液(W)では、前処理は脱囊率そのものにはほとんど影響せず、2 時間程度の長時間の脱囊処理を行うことにより、脱囊液(C)で前処理付きの場合と同等の脱囊率が得られること、
- が明らかになった。

一方、遊離スポロゾイト数から算出した脱囊率では、脱囊液(C)、脱囊液(W)のいずれも、脱囊率が最大となる脱囊処理時間は空オーシスト数から算出した脱囊率が最大となる脱囊処理時間よりも短いことが明らかになった。このことは、脱囊によって生じた遊離スポロゾイトが脱囊液中で比較的速やかに消失することを示している (生存期間はおそらく 30~60 min 程度)。また、長時間の脱囊処理では、生物学的要因によらない、単なる物理化学的脱囊が生じている可能性も示唆していると考えられる。

図 2, 4, 6 を見ると、脱囊液(W)よりも脱囊液(C)で脱囊現象の発現が速やかであるが、スポロゾイトの消失も速やかなので、結果として脱囊液(W)のスポロゾイト数の最大値が大きくなる傾向がある。したがって、細胞感染法に用いる脱囊液としては、(C)よりも(W)のほうが優れている可能性がある。しかしながら、スポロゾイトが消失していることは明らかであり、この消失をどのように取り扱うかが今後

の重要な課題の一つである。脱囊過程で生じる空のオーシストと遊離スポロゾイトに関する詳細な検討が望まれる。

加えて、細胞感染法とマウス感染法の評価結果に有意な相関があり動物感染法の代替評価方法として細胞感染法が利用できる可能性が明らかにされてきている。信頼性の高い試験結果を得るためにも細胞感染法における脱囊条件を整える必要がある。

E 結論

脱囊液(C)と(W)について、酸性 HBSS による前処理の有無、前処理時間ならびに脱囊処理時間に関する検討を行った。その結果、以下の知見が得られた。

- (1) 空オーシストの生成で評価する場合、前処理は脱囊液(C)では必須であるが、時間は 5min 程度で十分であり、脱囊処理時間はオーシストの状態によらず、30 min 程度でよい。一方、脱囊液(W)では前処理をしなくてもよいが、90~180 min の脱囊処理時間を必要とし、必要最低処理時間はオーシストの状態によって異なる。
- (2) 遊離スポロゾイト数は、脱囊液(C)、(W)のいずれにおいても脱囊処理時間の増加に伴っていったん増加したあと減少するパターンを示し、脱囊液中に放出されたスポロゾイトは明らかに消失する。
- (3) 遊離スポロゾイト数が最大となる脱囊処理時間は、オーシストの状態に関係なく、前処理 60 min のとき、脱囊液(C)では 20~30 min、脱囊液(W)では 60 min 程度である。

このように、*C.parvum* オーシストの脱囊の発現は脱囊液によって異なった。今後、適正な脱囊試験方法の開発が望まれる。

参考文献

- Black E K, Finch G R, Taghi-Kilani R and Belosevic M (1996) Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *Federation of European Microbiological societies Microbiology letters* 135, 187-189.
- Campbell A T, Robertson L J and Smith H V (1992) Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 58(11), 3488-3493.
- Hirata T, Chikuma D, Shimura A, Hashimoto A, Motoyama N, Takahashi K, Moniwa T, Kaneko M, Sato S and Maede S (1999) Effects of ozonation and chlorination on viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Science and Technology* 41(7), 39-46.
- Hirata T, Shimura A, Chikuma D, Morita S, Kimura S, Motoyama N and Hoshimawa H (2001) The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Water Science and Technology* 41(7) (In press)
- Jakubowski W, Boutros S, Faber W, Fayer R, Ghiorse W, LeChevallier M, Rose J, Schaub S, Singh A and Stewart M (1996) Environmental methods for *Cryptosporidium parvum*. *Journal of American Water Works Association* 88, 107-121.
- Marinas B J, Rennecker J L, Ruffell K M and Rubin S A. (2001) Effects of ozonation and chlorination on viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Science and Technology* 41(7) (In press)
- Morita S, Suzuki M, Motoyama N, Morioka T, Hoshikawa H, Fujiwara M and Hitata T (2001) The effects of temperature and intensity on the efficacy of ultraviolet irradiation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Proceedings of IWA Asia-Pacific Regional Conference* (Accepted).
- 小澤克行, 竹馬大介, 平田 強 (1999) 脱囊法と DAPI/PI 染色法による *Cryptosporidium parvum* オーシス

トの生育活性値に及ぼす酸前処理の影響, 水環境学会誌 22(10), 827-832.

Reduker D W and Speer C A (1985) Factors influencing excystation in *Cryptosporidium parvum* from cattle. *Journal of Parasitology* 71(1), 112-115.

Rennecker J L, Marinas B J, Owens J H and Rice E W (1999) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research* 33 (11), 2481-2488.

Robertson L J, Campbell A T and Smith H V (1992) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 58(11), 3494-3500.

志村有通, 竹馬大介, 森田重光, 平田 強(2001) 塩素の *Cryptosporidium parvum* オーシスト不活化効果とその濃度依存性, 水道協会雑誌 70 (1), 26-33.

Woodmansee D B (1987) Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *Journal of Protozoology* 34(4), 398-402.

F 健康危険情報	なし。
G 研究発表	なし。
H 知的財産の出願・登録状況	なし。
I 特許取得	なし。

分担研究報告書 9

クリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標
に関する研究

分担研究者 眞柄泰基、国包章一

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係わる
健康リスク評価及び管理に関する研究

クリプトスポリジウムオーシスト除去の代替指標に関する研究

分担研究者	真柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科	教授
主任研究者	国包 章一	国立公衆衛生院水道工学部	部長
研究協力者	秋葉 道宏	国立公衆衛生院水道工学部	主任研究官
研究協力者	金 漢承	国立公衆衛生院水道工学部	特別研究員
研究協力者	小林 康宏	国立公衆衛生院水道工学部	研修生

研究要旨：クリプトスポリジウム除去の代替指標を確立するために、緑藻類 *Scenedesmus quadricauda* に着目し、直接ろ過による除去性の比較を行い、その有効性を検討した。また、砂ろ過の粒子除去率は原水中粒子の存在量によって変化する可能性があるため、*S. quadricauda* を用いて添加濃度を変化させた直接ろ過実験を行い、初期粒子濃度が粒子除去率に与える影響について調べた。*S. quadricauda* は漏出粒子濃度の挙動が *Cryptosporidium* オーシストに類似しており、かつ除去性がわずかに下回っていることから、オーシスト除去の代替指標として有効であることが明らかになった。また、砂ろ過処理の除去率は一定ではなく、初期粒子濃度の影響を受けることが示された。

A. 研究目的

クリプトスポリジウム除去の代替指標として、浄水中に漏出しやすい粒子で、かつ調達及び検鏡が容易である緑藻類 *Scenedesmus quadricauda* に着目し、直接ろ過による粒子の抑留、漏出挙動及び除去率の比較を行い、その有効性を検討した。また、砂ろ過の粒子除去率は原水中粒子の存在量によって変化する可能性があるため、*S. quadricauda* を用いて添加濃度を変化させた直接ろ過実験を行い、初期粒子濃度が粒子除去率に与える影響について調べた。

B. 研究方法

1. 使用試料類

試料水は、脱塩素処理した水道水に標準カオリンを添加して濁度 10 度にし、pH7.0±0.2、アルカリ度 48 度±5 度に調整した。水温は 22℃±2℃であった。

クリプトスポリジウムオーシスト（以下オーシスト）は、ホルマリン固定不活化された市販品（関東化学：#74002）を使用し、試料水に対し 1,000 個/ml の濃度で添加して原水