

20000684

厚生科学研究費補助金による

『飲料水中の微生物による感染症対策に関する研究』

平成12年度

報告書

平成13年3月

財団法人 水道技術研究センター

序にかえて

わが国において水道を介してクリプトスポリジウムの集団感染が発生して以来、厚生労働省をはじめ大学、水道事業体等により、これに関する研究が活発に行われております。当センターにおいても平成8年度に厚生省科学研究費補助金により、クリプトスポリジウム等原虫類の全国規模での存在調査を行いました。その結果、クリプトスポリジウムは日本のいくつかの水道水源にも存在していることが明らかになり、「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」の遵守が重要であることが再確認されました。また、クリプトスポリジウムと同時に調査を行ったジアルジアについては、全国的にみてその存在状況はクリプトスポリジウムよりも多く、何らかの対策が必要であると考えられました。

米国等では、凝集沈澱・急速ろ過工程におけるクリプトスポリジウムの除去の実験が行われておりますが、我が国においては未だほとんど行われておらず、除去性能の確認が必要であると考えられます。また、紫外線を使ったクリプトスポリジウムやジアルジアの不活化については、将来の有用な技術として世界的にも期待されているところです。

この様な状況の中、当センターでは、厚生科学研究費補助金を受けて「飲料水中の微生物による感染症対策に関する研究」を平成9年度から4ヶ年計画で実施しました。本研究は原虫類の浄水過程での除去と不活化を目標としており、平成12年度はトレーサー粒子を用いた浄水実験プラントにおける連続除去実験、代替観測機器の有効性の検討、紫外線による *Girdia lamblia* の不活化、そして紫外線による *Cryptosporidium parvum* の不活化について研究を行い、多くの有用な知見を得ました。今後は更に研究を進め、詳細なデータを蓄積し、水道事業体に対して有用な情報を提供し、より安全で安心のできる水道の確立を目指して行く所存です。

本研究は摂南大学の金子光美教授を委員長とする感染性微生物対策研究委員会の御指導を頂いてきましたこと、国立感染症研究所の遠藤卓郎室長及び同研究室の皆様方、麻布大学の平田強教授及び同研究室の皆様方に格別の御尽力を頂きましたことを記し、感謝致します。また、実験に必要な施設をお貸し頂きました神奈川県内広域水道企業団西長沢浄水場の方々、川崎市水道局潮見台浄水場の方々、装置運転等に御協力を頂きました(株)クボタ、データ解析等に御協力を頂きました日本上下水道設計(株)、代替観測機器を御提供頂きました(株)島津製作所、横河電機(株)、富士電機(株)、川鉄商事(株)、トレーサー粒子の開発に御協力頂きました日本光研工業(株)の関係各位に厚く御礼申し上げます。最後に本研究の遂行にあたり御指導・御支援頂きました厚生労働省の皆様方に感謝申し上げます。

平成13年3月

(財) 水道技術研究センター
専務理事 藤原 正弘

目 次

1. はじめに	i
2. 委員会	ii
3. 研究計画	ii
(1) 全体研究計画	ii
(2) 平成12年の研究計画	ii
4. 研究の概要	iii
(1) ジアルジアの不活化実験	iii
(2) 紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験	iv
(3) トレーサー粒子によるろ過効果の確認実験	iv
(4) 代替観測機器の有効性の検討	v
第1編 ジアルジア嚢子の不活化実験	
1. 目的	1
2. 塩素による不活化試験	3
2.1 研究方法	3
2.1.1 材料	3
2.1.2 方法	4
2.2 研究結果	7
2.2.1 <i>Giardia muris</i>	7
2.2.2 <i>Giardia lamblia</i>	12
2.3 考察	18
2.3.1 <i>Giardia muris</i>	18
2.3.2 <i>Giardia lamblia</i>	18
3. 紫外線による不活化試験	21
3.1 研究方法	21
3.1.1 材料及び方法	21
3.1.2 紫外線照射と培養	21
3.2 結果及び考察	22
3.2.1 栄養体を用いた紫外線照射実験	22
3.2.2 増殖能判定方法	24
3.2.3 シストを対象とした紫外線照射実験	26
第2編 紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験	
1. はじめに	29
2. 材料と方法	31
2.1 クリプトスポリジウムの供試オーシスト	31
2.2 精製オーシスト懸濁液の調整	31
2.3 紫外線の照射	31
2.4 実験条件	32
2.5 感染試験	32
2.6 脱嚢試験	32
3. 結果及び考察	33
3.1 20℃、照射線量率0.23mWs/cm ² における紫外線のオーシスト不活化力	33

3.2 紫外線の不活化効果に及ぼす水温の影響	33
3.3 紫外線照射線量率の影響	34
3.4 脱囊	35
4. まとめ	36

第3編 トレーサー粒子によるろ過効果の確認実験

1. 研究目的	39
2. 平成9年度研究成果の概要	40
2.1 <i>C. parvum</i> オーシスト代替トレーサー粒子の検討	40
2.1.1 トレーサー粒子の選定	40
2.1.2 トレーサー粒子の計数方法の検討	40
2.2 ジャーテスト実験	41
2.2.1 実験方法	41
2.2.2 実験結果	41
2.3 50m ³ プラント実験	42
2.3.1 実験装置と実験手順	42
2.3.2 実験結果	43
3. 平成10年度研究成果の概要	44
3.1 蛍光トレーサー粒子の開発	44
3.2 <i>C. parvum</i> オーシストと蛍光トレーサー粒子の挙動比較	44
3.2.1 実験方法	44
3.2.2 実験結果	45
3.3 50m ³ プラント実験	46
3.3.1 実験装置と実験手順	46
3.3.2 実験結果	46
4. 平成11年度研究成果の概要	49
4.1 浄水場原水と実プラント規模の実験設備による浄水処理効果の確認	49
4.1.1 実験方法	49
4.1.2 実験結果	49
5. 平成12年度研究報告	51
5.1 実験方法	51
5.2 実験内容	54
5.3 実験条件	54
5.4 実験結果及び考察	60
5.4.1 各処理工程におけるトレーサー粒子の処理性比較	60
5.4.2 凝集沈澱工程におけるトレーサー粒子の処理特性に関する検討	63
5.4.3 急速ろ過工程におけるトレーサー粒子の処理特性に関する検討	64

第4編 代替観測機器の有効性の検討

1. 研究目的	71
2. 調査方法	72
2.1 実験場所	72
2.2 微粒子カウンターの選定	72
2.3 実験プラントの運転条件	73
2.4 標準試料による測定値の比較	73
2.5 実験条件	74

3. 実験結果	75
3.1 各測定機器の測定原理の比較	75
3.2 自動計器による測定結果	76
3.3 計測機器間の相関	82
3.4 微粒子カウンターの性能仕様の比較	83
3.5 各社測定機器の測定結果	85
3.6 各社の計測機器による測定結果のまとめ	90
3.7 バッチ式測定器による測定結果	94
3.8 粒子数と濁度との関係	95
3.9 微粒子径・数と濁度の関係	99
3.10 各粒径を検出する閾値電圧の測定および校正方法	100
3.11 実験プラントにおける粒子測定	101
3.12 粒子の除去率のまとめ	106
3.13 各社の粒子数測定値の相関について	107
4. 考察	109
4.1 各測定機器の測定原理の比較	109
4.2 各粒子計測機器の特性を決定する因子	110
4.3 クリプトスポリジウムの代替観測機器としての有効性の検討	118
4.4 クリプトスポリジウムの代替観測機器としての微粒子カウンターの評価方法	120
4.5 実際の浄水処理工程管理における微粒子カウンターの有効性について	123
5. まとめ	125

参考資料

本研究に御尽力・御協力頂いた関係者名簿及び問い合わせ先	126
クリプトスポリジウム代替蛍光トレーサー粒子の基材仕様	127
富士電機株式会社、微粒子カウント式高感度濁時計カタログ	137
株式会社島津製作所、濁度・粒度監視上水モニタカタログ	141
横河電機株式会社、粒子カウンタ説明資料	143
川鉄商事株式会社、浄水場用液中微粒子計測器	153

1. はじめに

現在、クリプトスポリジウムやジアルジア等、経口摂取によって下痢症等を引き起こす病原性の原虫類が問題となっている。これらの原虫類は、水道水源を容易に汚染する可能性があり、浄水処理が十分でない場合、飲料水を介した集団感染が引き起こされる可能性を含んでいる。厚生労働省（旧厚生省）では、この様な状況を鑑み、平成8年10月に「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」を策定し、予防対策や応急対策を定め、都道府県を通じて全国の水道事業体に周知を図っている。

同指針には予防対策として、浄水処理工程でのクリプトスポリジウムの除去が挙げられているが、浄水処理工程におけるこれら原虫類の挙動についてはほとんど明らかになっていない。沈澱やろ過工程でどの程度原虫類が除去されるのか、ろ過池の逆流洗浄の効果はどの程度あるのか等の知見は、浄水場を適切に運営・維持管理する上で重要である。

また、原虫類に対する予防対策としては、除去の他に消毒剤による不活化が考えられる。クリプトスポリジウムに関しては、現在、日本の全ての浄水場において使用されている塩素では、その注入率と接触時間では十分に不活化されない。一方、ジアルジアに関しては、クリプトスポリジウムに比べ塩素耐性が低く、現行の注入率と接触時間でも不活化させることが可能であるといわれている。前述の暫定対策指針の中に記載されている予防対策を遵守していれば、原虫由来の下痢症の集団感染は充分防げるものと考えられるが、ジアルジアの塩素耐性を把握しておくことや、紫外線等有効な代替消毒技術の確立を図ることは、水道水の更なる安全を確保する上で極めて重要であるといえる。

本研究はこれらの状況を踏まえ、感染性微生物対策研究委員会および厚生労働省の指導のもと、ジアルジアシストの塩素耐性試験や、紫外線を使ったジアルジア及びクリプトスポリジウムの不活化実験、クリプトスポリジウムの代替品としてのトレーサーの浄水処理工程での除去実験を行い、考察を加えるものである。

本報告書は、第1編「ジアルジアの不活化実験」、第2編「紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験」、第3編「トレーサー粒子によるろ過効果の確認実験」、第4編「代替観測機器の有効性の検討」からなり、それぞれ原虫類の不活化と除去技術の確立を目指している。

第1編では、*Girdia muris* 及びヒトへの感染が認められている *Girdia lamblia* の塩素による不活化と、紫外線による *Girdia lamblia* の不活化を検討し、実験結果をまとめた。また、フローサイトメーターを導入し、不活化の測定手法を開発した。第2編では、同じく紫外線を用いて *Cryptosporidium parvum* の不活化を検討し、実験結果をまとめた。第3編では、開発した代替トレーサーを用い、実規模実験プラント設備において、凝集沈殿、急速ろ過、活性炭吸着処理の各工程における除去性と運転の最適条件について検討を行った。第4編では、代替観測機器である微粒子カウンターの有効性について、4社の協力のもと、各データの相関、信頼性等といった観点から有効性を検討し、評価を行った。

2. 委員会

適切な研究の実施、および研究結果の評価のため委員会を設置した。同委員会の構成は以下の通りである。

感染性微生物対策研究委員会		
委員長	金子 光美	摂南大学工学部教授
委員	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部原生動物室長
委員	国包 章一	国立公衆衛生院水道工学部長
委員	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所細菌病理部臨床血清科主任研究員
委員	平田 強	麻布大学環境保健学部長、教授
委員	眞柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科教授
委員	松田 奉康	東京都水道局技監

3. 研究計画

(1) 全体研究計画

本研究は平成9年度～平成12年度までの4年計画とし、主に以下の項目について調査研究を行うこととした。

- 1) 凝集沈澱・急速ろ過による除去技術の確立
- 2) 不活化技術の開発

(2) 平成12年度の研究計画

平成12年度は、凝集沈澱・急速ろ過における除去効果の確認と運転管理技術の確立、クリプトスポリジウム及びジアルジアの不活化技術の開発を目的として、以下の4つのテーマについて研究を行った。

1) 紫外線によるジアルジアの不活化実験

本研究は、紫外線によるジアルジアの不活化実験を行った。本研究は感染性のある原虫を用いるという理由から、専門機関である国立感染症研究所の協力を仰ぎ、感染性微生物対策研究委員会委員である遠藤卓郎委員を始め、同研究室の八木田健司様他、皆様の協力を得て実験を行い、その成果について委員会の評価を受けた。

2) 紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験

本研究は、紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験を行った。本研究は感染性のある原虫を用いるという理由から、専門機関である麻布大学の協力を仰ぎ、感染性微生物対策研究委員会委員である平田強委員を始め、同研究室の皆様の協力を得て実験

を行い、その成果について委員会の評価を受けた。

3) トレーサー粒子によるろ過効果の確認実験

本研究は、クリプトスポリジウムの代替品としてのトレーサーを用いたろ過効果の確認実験を行った。本研究は、神奈川県内広域水道企業団西長沢浄水場の実規模実験プラント施設（最大約 1,500m³/日）を借用して主にトレーサーの除去実験を行い、その成果について委員会の評価を受けた。

4) 代替観測機器の有効性の検討

現時点では、水中のクリプトスポリジウムをオンラインでかつ常時直接測定・検出することが技術的に不可能である。そこで代替観測機器としての微粒子カウンターを実規模プラント施設で使用し、浄水場の維持管理における採用の可否について、委員会の評価を受けた。

4. 研究の概要

(1) ジアルジアの不活化実験

平成9年度～11年度は塩素による *Giardia muris* 及び *Giardia lamblia* の不活化試験を行った。*G. muris* の脱嚢阻止に要する塩素処理条件は、水温 15℃、添加塩素 2mg/L の条件において 2 Log (99%) の不活化に要する Ct 値はおよそ 200 付近であることが示された。他方、*G. lamblia* の脱嚢阻止 (2 Log) に要する Ct 値は、水温 10～20℃、塩素濃度 0.5 または 1.0mg/L の条件下で 40～130 の範囲であることが示された。フローサイトメーターを利用した脱嚢率の測定では、顕微鏡測定による結果と高い相関が得られ、短時間で精度よく測定することが可能となった。

平成12年度は紫外線による *G. lamblia* の不活化試験の予備的検討を行った。栄養体に対して 1～25 mJ/cm² (=mW・s/cm²) の紫外線照射後に培養し、細胞数の変化を測定した。その結果、1mJ/cm² 照射においては培養3日目までは接種虫体数が保たれたが、5mJ/cm² 以上の照射では虫体数の減少が認められた。次いで 1mJ/cm² の照射虫体を培養7日目まで虫体数及び形態変化を観察したところ、時間の経過とともに生存虫体数が減少し、形態的に異常を呈する虫体が増加した。この結果から、*G. lamblia* の栄養体は紫外線に高い感受性を示し、1mJ/cm² の紫外線照射により増殖能に著しい障害を受けたものと考えられた。次いで、シストに対して 5～800mJ/cm² の紫外線を照射し、脱嚢により活性評価を試みた。50mJ/cm² 以下の照射条件では脱嚢活性への影響は見られなかったが、100mJ/cm² 以上の照射条件では脱嚢阻害が認められた。上述の栄養体では極めて微量の紫外線で増殖阻害が認められており、脱嚢阻害に要する紫外線量との間には著しい量的差異が認められた。これらの結果より、紫外線による不活化効果には増殖能へ影響するレベルと直接的な脱嚢阻害を示すレベルの2段階があることが推測される。今後、*G. lamblia* シストを用いた増殖阻害の評価方法について検討したい。

(2) 紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化実験

本研究では、紫外線のクリプトスポリジウム不活化力を感染と脱囊で評価した。また、不活化に要する紫外線線量率に及ぼす水温と照射線量率の影響を調べた。その結果、以下の知見を得ることができた。

- 1) *C. parvum* オーシストの感染性は、紫外線照射線量の増加に伴って指数関数的に減少し、不活化速度はいわゆる Chick 型で表すことができた。
- 2) 紫外線はクリプトスポリジウムの感染力を容易に奪うことができ、不活化 $1\log_{10}$ 当たりの紫外線照射線量はわずか $0.5\sim 0.7\text{mWs/cm}^2$ にすぎなかった。
- 3) 紫外線照射線量率 0.24mW/cm^2 のとき、試験した $5\sim 30^\circ\text{C}$ の範囲で、水温 10°C の低下に伴う必要紫外線照射線量の増加率はわずか 7%にすぎず、紫外線の不活化効果に及ぼす水温の影響は極めて小さかった。
- 4) 紫外線照射線量率が必要照射線量に及ぼす影響も小さく、線量率 $0.048\sim 0.60\text{mW/cm}^2$ の範囲では、不活化に必要な紫外線照射線量に線量率の及ぼす有意な影響はほとんど認められなかった。
- 5) これらの結果から、紫外線照射はクリプトスポリジウムの感染性を奪うには極めて有効かつ実用的な手段であることが明らかになった。
- 6) これに対して、不活化を脱囊で評価した場合、不活化曲線は初期に脱囊率の低下がほとんどみられない大きなラグが出現し、マルチヒット型となった。
- 7) 脱囊評価の場合、 $2\log$ 不活化紫外線照射線量は $180\sim 220\text{mWs/cm}^2$ となり、感染評価の場合の $1.0\sim 1.3\text{mWs/cm}^2$ の約 200 倍にも相当する多量の紫外線量が必要であった。

(3) トレーサー粒子によるろ過効果の確認実験

凝集沈澱及び急速砂ろ過処理によるクリプトスポリジウムの除去性を評価することを目的として、代替トレーサー粒子 (約 $5.0\mu\text{m}$) を開発し、実規模の実験施設において除去実験を行った。平成 9 年度～10 年度は人工濁水を用いた $50\text{m}^3/\text{日}$ 規模の実験施設で行い、平成 11 年度～12 年度は実際の浄水場原水による $1,000\text{m}^3/\text{日}$ 規模の実験施設で行った。その結果、主に以下の知見を得ることができた。

50m³/日プラント実験

- 1) カオリン無添加の低濁度原水 ($0.7\sim 0.8$ 度) に対し、凝集剤無注入では凝集沈澱・急速ろ過処理によるトレーサーの除去はほとんど行われなかった。
- 2) 中程度の濁度 (カオリン濁度 10 度) に対しては、硫酸バンド注入率 20mg/L では凝集沈澱で $1.5\log$ の除去、急速ろ過で $2\sim 3\log$ の除去が行われた。
- 3) 砂ろ過行程における蛍光トレーサーの除去率は、通水初期では $3.0\sim 4.0\log$ 以上得られ、ろ過継続 25 時間経過時点で $1.0\sim 1.5\log$ 、その後 45 時間で $1.0\log$ 程度と、ろ過の継続に伴って蛍光トレーサーのろ過処理水への漏出が多くなった。

- 4) 濁度、蛍光トレーサーの砂ろ過初期での流出に対応するための捨水時間は、今回の実験条件では 30～60 分が必要であった。

実規模プラント実験

- 5) 各工程における蛍光トレーサーの除去率は、凝集沈澱で概ね 0.5～1.0log、急速ろ過で 1.5～2.5log であった。また後段に活性炭ろ過を行うことによって、さらに除去率を上乘せできることがわかった。
- 6) システム全体として最適な運転管理が行われた場合、3.5log 以上の除去率が見込める一方、原水水質や運転管理条件等によっては除去能力が低下する場合があることがわかった。
- 7) 蛍光トレーサーの除去性は原水濁度が低いほど低下する傾向が見られ、さらに同じ低濁度であっても低水温時により不安定になりやすいことがわかった。これより、トレーサー粒子（オーシスト）の効率的な除去を目指す上では、低水温でかつ低濁度の時に、運転管理上最も留意が必要であることが示唆された。
- 8) ろ過池のろ層に抑留されたトレーサー粒子は、逆洗により効果的に排出されている様子が確認されたが、一方で逆洗後もなお最下層部分においてもトレーサー粒子が残留する可能性が示され、急速ろ過工程において高い除去性を維持するためには逆洗の管理も重要であると考えられた。

(4) 代替観測機器の有効性の検討

クリプトスポリジウムの測定において、微粒子カウンターの代替観測機器としての有効性を評価するため、複数の微粒子カウンターを用いて測定を行い、各機器のデータの相関、信頼性等の評価を行った。平成 10～12 年度までの 3 ヶ年間に行った研究結果として、微粒子計測機器の有効性について次のとおりまとめることができる。

- 1) 低濃度濁度計については測定方式の光学的差異により粒子に対する検出特性に差がある。
- 2) 粒径の定まった標準粒子の個数と濁度との間には高い相関が認められたが、浄水場原水及び処理水中の濁度と粒子数の間の相関性については不確実である。
- 3) メーカーとしての同一機種間の測定値は安定しているが、メーカーの異なる計測機器間にばらつきが認められる。
- 4) 計器のキャリブレーションや標準粒子及び校正方法等がメーカーによって異なる。
- 5) 同一の測定器による測定値間の相関は非常に高い。
- 6) 液体と粒子の屈折率が近似している場合には、実際の粒子径よりも小さく測定されるため、結果の考察については、測定対象とする粒子の性状について考慮する必要がある。

これらの結果より、微粒子カウンターは濁度計を補完する計測機器として、凝集沈澱処理の状況や、ろ過池における濁質除去機能の診断等、浄水処理工程の変動を相対的に評価する手段としては十分に有効であると考えられた。

第1編

ジアルジアの不活化実験

ジアルジアの不活化実験

1. 目的

ジアルジア症は *Giardia lamblia* の感染によって引き起こされる下痢性疾患である⁽¹⁾。本症の感染経路はいわゆる糞-口感染で、人と人の接触や食品を介した小規模集団感染と飲料水を介した大規模な集団感染が知られている。米国では水を介して発生した集団下痢症の多くがジアルジアによるものとの報告もある^(2,3)。米国では給水人口 10,000 人を超える浄水施設に対してジアルジアシストの 99.9% (3 Log) 以上の除去が義務付けられている⁽⁴⁾。我が国では 1996 年に埼玉県越生町の水道を介して発生した集団感染症を契機として水道事業を中心に原虫類による汚染問題が表面化し、状況調査が行われてきた^(5,6)。また、原虫類による汚染防止には総合的な取り組みが必要との判断にたつて 1999 年 4 月 1 日から施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」において、クリプトスポリジウムおよびジアルジア症が全数把握の 4 類感染症に指定された。これに伴い、クリプトスポリジウムと同じく下痢症の病原原虫として知られるジアルジアによる飲料水汚染問題も並行して検討する必要性が生じている。

原虫類汚染対策の前提条件として検査法の確立が必須となるが、対象の原虫類には (1) 外界で増殖しない、(2) 培養による検出が困難、(3) 形態学依存した検査が当面考えられる唯一の方法、(4) 検出限界以下の量で感染が成立する可能性があるなど、検査法の確立に向けて難問が山積している。操作性や検出感度の飛躍的な向上が望める状態にあるとは考え難い現状でもある。したがって、引き続き検査法改良への努力を前提としつつ、同時に汚染源での (オー) シストの不活化や除去などといった別の視点からの対策を講じる必要があるものと考えらる。

浄水処理における病原微生物の汚染防除は、一連の物理的浄水処理に加えて、塩素消毒による化学的不活化の両面からなされている。既にジアルジアシストによる水道原水の汚染が明らかにされており、塩素によるジアルジア不活化効果の検証を急ぐ必要がある。一方、塩素消毒以外の不活化も模索されており、そうした方法の 1 つとして紫外線照射に期待が寄せられている。

ジアルジアのシストの塩素および紫外線に対する感受性についてはすでに米国等の報告があるが、我が国においても現在の水道処理に合わせて各種不活化方法の評価を独自に行い、基礎的資料を整備しておくことが求められている⁽⁷⁻¹⁴⁾。本研究においては塩素処理および紫外線照射によるジアルジアシストの不活化効果の評価および評価方法の確立を目的とした。

これまでの報告によると *G. lamblia* シストに対する不活化効果の評価方法には、動物への感染実験が用いられている。しかしながら、この方法では多数の実験動物 (スナ

ネズミ)が必要な点と感染抵抗の個体差等の不確定要素が介在する。一方、脱嚢阻止試験は、本原虫の感染から定着(寄生)に至る一連の生物学的現象である脱嚢をどの程度阻害するかを測定することで評価の指標とするものである。しかしながら、*G. lamblia*では脱嚢活性の高いシストが得られなかったり、脱嚢を誘導する実験条件の不備から評価の信頼性が得られなかった^(7,15,16)。本研究では取り扱いが比較的容易な *G. muris* を用いて評価方法を検討し、この結果に従ってヒトに病原性を示す *G. lamblia* を用いた方法を開発した。具体的には、感染動物にスナネズミを用い、活性の高いシスト回収、脱嚢条件の設定、フローサイトメーターを用いた定量的測定方法、等々の確立・整備を行った。特に、フローサイトメーターの導入により迅速かつ定量性を有する脱嚢率測定を可能にした。

当該システムを用いて塩素の消毒効果を評価した結果、水温 10~20℃および塩素濃度 0.5 または 1.0mg/L の条件下では、Ct 値(塩素濃度(mg/L)×接触時間(分))が 40~130 の範囲で *G. lamblia* を 2 Log 不活化することが示された。

紫外線は DNA に損傷を与えることが知られており、その結果強い分裂阻害(殺滅)効果を示す。細胞死に要する線量に比べ DNA 損傷に要する線量は極めて低いことから紫外線照射による不活化効果の判定には、脱嚢後の栄養体の増殖能を評価することとした。現在照射条件の設定と増殖能の判定方法について予備的検討を行った。

2. 塩素による不活化試験

2.1 研究方法

2.1.1 材料

(1) *Giardia muris*

G. muris は米国 Clancy Environmental Consultants (Dr. J. Clancy) より分与されたもので、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) に経口感染させることで継代維持を行っている。*G. muris* はヌードマウスに強い感染性を示し、1個のシストの経口投与により100%の感染が成立することを6週令のヌードマウスにマイクロマニピレーション法により1個のシストを経口投与し感染が成立することで確認した(10/10で感染成立)。

実験用シストの採取のため、感染マウスを採便用容器に移し、容器内に排泄された新鮮便を採取した。便を10mMリン酸緩衝液(PB)に溶き、密度勾配遠沈法(シヨ糖浮遊法)を繰り返すことで分離・精製を行った。得られたシストを 10^7 個/mlレベルとなるように精製水で濃度を調節し、保存液とした。一般に、塩素耐性試験等に用いる場合のシストの標品は、標品中に脱囊したシストが1%以上含まれないこと、また、脱囊試験で90%以上の脱囊率を示すことが求められている。本実験で使用したシスト標品は全てこの条件を満たしていた。

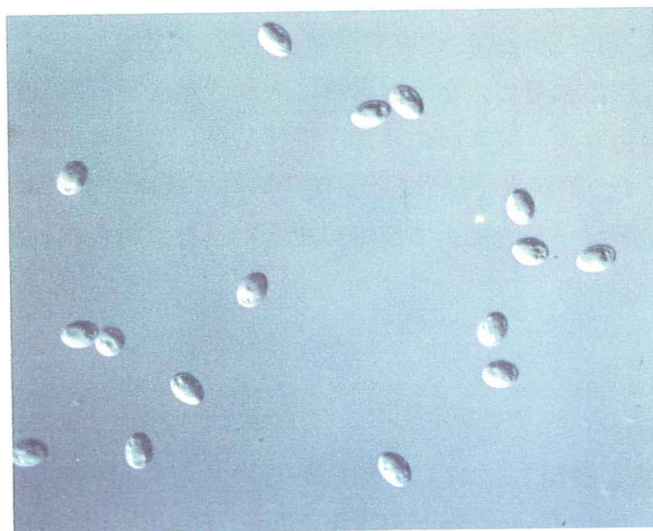


図-1.1 シヨ糖浮遊法により精製した *G. lamblia* シストの微分顕微鏡写真

(2) *Giardia lamblia*

米国 ATCC より WB 株を入手し、TYI-S-33 培地 (増殖用培地: 0.75mg/ml ウシ胆汁添加、pH7.2) を用い準嫌気的な条件で継代培養した⁽¹⁷⁾。WB 株の栄養体 1×10^6 個を 4~5 週令のスナネズミ (*Meriones unguiculatus*, MON/Jms/Gbs) に経口投与し、翌日より検便で感染の有無を調べた。投与後 3~6 日後に糞便中に嚢子が検出された。嚢子の精製・回収はショ糖密度勾配遠心法を用いた (図-1.1: シストの写真)。得られた嚢子を 1×10^7 個/ml となるように 50mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に浮遊させ、嚢子保存液とした。なお、感染後、時間の経過とともに嚢子の脱嚢活性が減じてくるため、糞便中に排出されるようになってから 3 週間以内の嚢子を使用することとした。

2.1.2 方法

(1) 塩素耐性試験

基本的に上水試験法の塩素耐性試験法に準じて嚢子の塩素耐性を測定した。実験に用いるガラス器具等はあらかじめ 2~3mg/L (=ppm) の塩素 (次亜塩素酸ナトリウム) 水を加えて 1~2 日間放置し、塩素消費物質の除去を行った。また、実験に供する精製水についても含有塩素消費物質の除去を行った。方法は同濃度の塩素添加精製水を一晩放置し塩素を消費させ、その後に熱処理 (15 分間煮沸) により残余の塩素を除去した。

別に用意した 10 倍濃縮のリン酸緩衝液 (500mM、pH7.0) を脱塩素精製水で希釈し、所定濃度 (50mM) のリン酸緩衝液を作製した。これを試薬ビンに移し、30 分間 2 気圧 121°C の蒸気滅菌を行った。冷却後、必要があれば pH の調整を行い、所定濃度 (1~2mg/L) の塩素溶液を作製した。

塩素液を入れた試薬ビン恒温水槽に入れ、水温を一定 (15°C) に保った。嚢子保存液を適量取り、塩素液に添加・攪拌した。この時点を実験 0 時間とし、継続的に 50ml ずつ試料水を採取した。採取試料には速やかに最終濃度 0.5% となるようにチオ硫酸ソーダを加えて反応停止を行った。得られた試料は次の脱嚢試験に供した。

(2) 脱嚢試験

1) *Giardia muris*

シストを遠心濃縮し、37°C にあらかじめ温めておいた還元液 (0.2g 還元型 glutathione、0.2g L-cysteine-HCl in 20ml Hanks' balanced salt soln.) 5ml、次いで 37°C の 0.1M の重炭酸ナトリウム液 5ml を加えて充分攪拌した。これを 37°C、30 分間保温した。遠沈によりシストを回収し、沈渣に 0.3ml の 37°C の 0.5% トリプシン-タイロド液 (人工腸液: pH 8.0) をゆっくり攪拌しながら加えた。

人工腸液中のシストを観察用チャンバー（スライドグラス上に両面テープでカバーグラスを固定して作製した観察用小室）に移し、開口部をシールし、37℃の保温箱に30分保存した。反応後、観察用チャンバーを顕微鏡下に移し、脱嚢率を測定した。

2) *Giardia lamblia*

予備実験により、従来の *G. lamblia* 嚢子の脱嚢試験に用いられている実験条件の検討を行った⁽¹⁵⁾。主な改良点は以下の3点である。

- ① 還元液の pH 調整に塩酸を用いず、システインとグルタチオン溶液 (pH1.8) と NaHCO₃ 溶液 (pH8.0) の混合比を 5 : 2 とすることで pH2.7 付近に調整した。
- ② 還元液に最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清を添加した。
- ③ 還元処理後、水酸化ナトリウムを添加することで速やかに pH を 7.0 に調整 (中和) した。

(3) 試薬の準備

- ① 低 pH 還元液 : 1.0g/100ml の L-システイン塩酸塩、1.0g/100ml のグルタチオンを、グルコースを含まない HBSS に添加 (pH 1.8)。使用まで 4℃ に保存
- ② 0.1M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 8.0)。使用まで 4℃ に保存
- ③ ウシ胎児血清 (FCS)
- ④ 0.1% Tween80 水溶液 (Tw80)
- ⑤ FITC 標識 マウス 抗-ジアルジア・シスト抗体 (蛍光抗体試薬)
- ⑥ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.0)

(4) 実験手技

- ① 使用直前に還元溶液ならびに炭酸水素ナトリウム水溶液を 37℃ に加温する。
- ② 5ml の還元溶液、2ml の炭酸水素ナトリウム水溶液および 0.7ml の FCS を 15ml スクリューキャップ付き遠心管に入れ、速やかに攪拌する (pH 2.7)。
- ③ 0.1ml の嚢子浮遊液 (約 10⁶/ml) を加えて攪拌する。
- ④ 37℃ で 3 分間、保温する。
- ⑤ 1.0M 水酸化ナトリウム溶液 0.3ml を加えて攪拌後、遠心回収 (1,000×g 5 分間) する。
- ⑥ 1ml ほど残して上清を捨てる。
- ⑦ 2.0ml の PBS を加えて攪拌後、遠心回収 (1,000×g 3 分間) する。
- ⑧ 50 μl ほど残して上清を捨てる。
- ⑨ 2ml の PBS を加えゆっくり混和する。
- ⑩ 脱嚢を完了させるために、37℃ で 2 時間保温する。

- ⑪ Tw80 を 2ml 加えて軽く混和・洗浄した後、遠心回収 (1,500×g 3 分間) する。
- ⑫ 50 μ l ほど残して、上清を捨てる。
- ⑬ 再び Tw80 を 2ml 加えて軽く混和し、37°C で 30 分間保温する (遊出栄養体の破壊)。
- ⑭ 遠心・回収 (1,500×g 3 分間) する。
- ⑮ 20~30 μ l ほど残して上清を捨てる。
- ⑯ 10 μ l の蛍光抗体試薬を加え、静かに混和する。
- ⑰ 遮光して 30 分間染色。
- ⑱ 必要に応じ PI 染色を行う。
- ⑲ 顕微鏡下、およびフローサイトメーターにより脱囊率を測定する。

(5) 染色性の変化による生死判定

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) は生理活性を有している細胞膜を通過することから、生きた細胞を染色することができるとされている。一方、PI (propidium iodide) は生きている細胞膜を通過できないことから、生理活性を失った (死んだ) 細胞のみを染色する。これらの色素を組み合わせることで、一般の細胞の生死判定が可能となる。これらを用いた染色により、ジアルジアシストの生死判定を試みた。染色標本は蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターにより染色/不染を分けて計数した。

(6) フローサイトメーターによる測定

フローサイトメーターは Partec 社 PAS-III 型を用いた (ドイツ、ミュンスター)。その仕様は 15mW 空冷アルゴンイオンレーザー (488nm) で励起し、各蛍光色素に特有な蛍光波長を各種の狭帯域 (バンドパス) フィルターで選択的に分光・集光し、光電子増倍管で検出・定量するものである。代表的には、PI の特異蛍光 (赤色) は 610nm のバンドパスフィルター、FITC の蛍光 (緑色) は 520nm のバンドパス・フィルター、DAPI の蛍光 (青色) は 435nm のバンドパスフィルターで選択した。光電子増倍管のゲインは適時調整したが、おおむね赤色蛍光で 800V、緑色蛍光で 300V、青色蛍光で 400V とした。これらと同時に測定した前方散乱光 (FSC、粒子のサイズを反映) のゲインは 280V、側方散乱光 (SSC、内部構造を反映) については 415V に設定した。試料液の流速は 2.5 μ l/sec とした。測定時間を一定 (5 分間) とし、脱囊に伴う形態的および染色性の変化を測定し、測定時間から液量および囊子数を算定した。フローサイトメーターによる分画が正しいことの確認のために、一部の試料につき分画を分取 (cell sorting) してその形状を顕微鏡下で観察した。

2.2 研究結果

2.2.1 *Giardia muris*

(1) *G. muris* のヌードマウス感染性

経口的に1個のシストを投与し、感染7日後から直接塗抹法でシストの排出の有無を検査した。その結果、7日目に2頭のマウスからシストが検出された。9日目の直接塗抹法による検査でも2頭からシストが排出されているのが確認できた。14日目に密度勾配遠心法（ショ糖浮遊法）で検便したところ、10頭全部からシストが確認された。その後、ヌードマウスへの定着が徐々に進行し、いずれの個体でも糞便中に多量のシストが排出されることが確認された。

(2) 精製 *G. muris* シストの保存条件と生残性

精製したシストを8℃で保存し、2日後にDAPI/PI染色による生残率と脱嚢試験による脱嚢率を測定した。その後、陰性対照と同等の条件（50mM PB 360mlにシストの密度を $2.1 \times 10^4/\text{ml}$ に調整）15℃で6時間保存して同様に生残率と脱嚢率を測定した。表-1.1に示すように生残率と脱嚢率は、精製直後から2日間の冷蔵保存等の処理によって低下することはなかった。次いで、この冷蔵保存していたシストを不活化実験における陰性対照の条件とほぼ同様の条件においても、脱嚢率は約90%であり大幅には低下することは無かった。以上のことから、*G. muris*のシストは精製後2日後でも不活化実験に使用可能と考えられた。

表-1.1 精製シストの生残率

保存条件	生残率 (%)	脱嚢率 (%)
精製直後	93.3	97.6
2日後	93.0	98.3
2日後+6時間 15℃保存	-	89.1

(3) 塩素耐性試験における保存条件

シストの塩素耐性試験の条件設定として、糞便より分離・精製したシストを精製水、10mM、および50mMリン酸緩衝液に浮遊・懸濁して24時間室温放置し、緩衝液中での生残率をPI蛍光色素の取り込みで測定したところ、この間に生残率のわずかな低下が見られるものの著しい活性の低下は認められなかった（表-1.2）。ついで、保存温度の影響と、シスト懸濁液の細胞密度の影響を検討した。ちなみに、実験開始時のシストの生残率は97%であった。緩衝液の種類や温度、あるいは浮遊液中のシストの密度による違いはほとんど見られず、25時間後でも90%

以上が生存していた（表-1.3）。ただし、精製水を用いた場合は、シスト同士の凝集塊形成される傾向が認められた。さらに保存温度を上昇させると明らかに PI で染色されるシストの割合が増加し、37℃では一部のシストが脱囊する現象が観察された（表-1.4）。

表-1.2 10mMリン酸緩衝液中でのシストの生残率（PI色素排除試験）

	懸濁直後の生残率(%)	24 時間後の生残率(%)
実験 1	96.3%	82.5%
実験 2	98.8%	81.6%

表-1.3 ジアルジアシストの生残率に与える緩衝液の mol 濃度と保存温度の影響

保存溶液	シスト濃度	0℃		10℃		20℃		25℃	
		5h	25h	5h	25h	5h	25h	5h	25h
精製水	10 ⁶ /10ml	-	-	-	90.6	-	90.0	-	-
10mM PB	10 ⁶ /10ml	98.9	96.8		99.0	98.0	92.9	-	96.2
10mM PB	10 ⁵ /10ml	-	-	-	-	97.5	91.8	-	-

表-1.4 高温下におけるジアルジアシストの生残率

温 度		生残率 (%)	実験中の脱囊率 (%)
実験開始前	-	95.9	2.4
20℃	(10mM PB)	92.3	5.3
	(50mM PB)	93.2	3.2
37℃	(10mM PB)	69.1	24.0
	(50mM PB)	72.8	22.5

(4) 塩素による *G. muris* 嚢子不活化試験

精製シストを用いて塩素濃度 2mg/L、水温 15°Cの条件で *G. muris* シストの塩素耐性を検討し、その結果を図-1.2 に示した。結果の判定はシストの脱嚢試験を採用した。シストの脱嚢率は Ct 値が 127 付近で 2%程度に低下、さらに Ct 値が 210 付近では 1%を下回った (0.66%)。

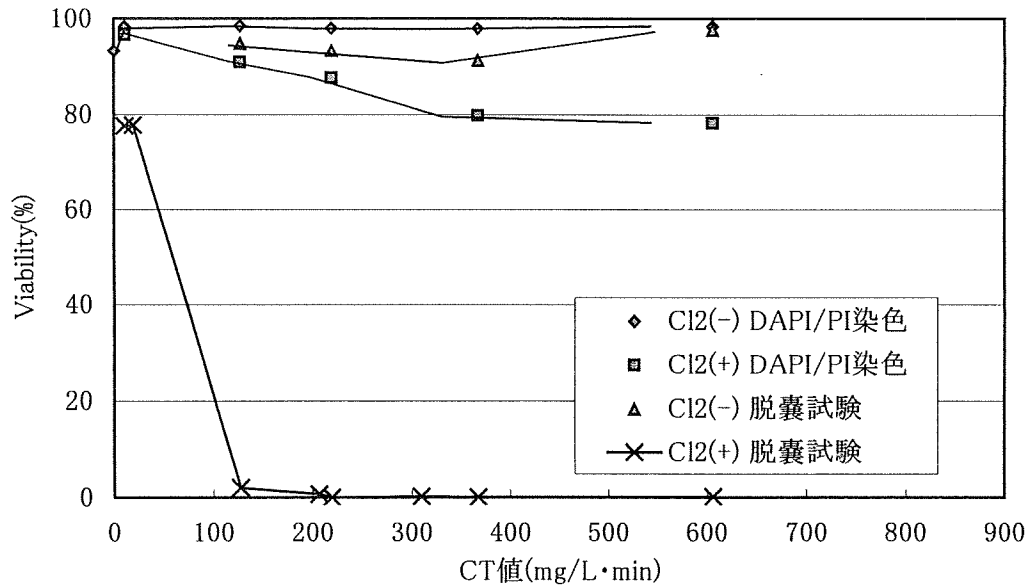


図-1.2 *G. muris* 不活化実験

実験条件：

- * 材料シストは当日精製したもの。3×10⁴/mlの濃度で用いた。
- * 使用緩衝液は50mMリン酸緩衝液、pH7.0。水温は15°C
- * 塩素濃度は、シスト添加の実験開始時に2.17mg/L。

図中のグラフ説明

- Cl₂(-) DAPI/PI染色 … 塩素処理せずにDAPI/PI染色したシストをフローサイトメーターで解析したときの、非染色シスト数の割合
- Cl₂(+) DAPI/PI染色 … 塩素処理したシストをDAPI/PI染色し、その後フローサイトメーターで解析したときの、非染色シスト数の割合
- Cl₂(-) 脱嚢試験 … 塩素処理しないシストの生残率 (脱嚢率)
- Cl₂(+) 脱嚢試験 … 塩素処理したシストの生残率 (脱嚢率)