

一方、シストの生死を蛍光色素の取り込みで検討すると本実験条件では Ct 値 210 付近においても PI 蛍光色素に染色されるシストはわずか 2%にとどまり、色素排除試験結果としてはシストが生存していることを示唆した。一般にシストの塩素耐性は脱嚢試験で評価しているが、これはジアルジアの感染が宿主の胃を通過した後に脱嚢することから始まり、従って、脱嚢できなくなることで感染力を失うものと理解されていることによる。

#### (5) フローサイトメーターによるシスト計数方法の確立

方法に従って *G. muris* シストを塩素処理した後に脱嚢試験を行い、フローサイトメーターによるシスト計数方法を確立するための確認を行った。脱嚢率の測定は蛍光顕微鏡観察と、フローサイトメーターによる解析の 2 方法を採用したが、良い相関が得られた。測定に際しては脱嚢試験後の試料に FITC 標識マウス抗ジアルジアシスト抗体による特異染色（他の粒子との判別）、および PI 染色（生死判定用）を施した。

図-1.4 は脱嚢処理したジアルジアのシストのフローサイトメーター解析像（Y 軸：PI 蛍光強度、X 軸：前方散乱光）である。図は 4 区画に分割されているが、左下区画に脱嚢したシストの殻が分布した。脱嚢後のシスト殻は光学的に萎縮していた。右の上下の区画には脱嚢していないシストが分布したが、右上区画に分布したシストは PI に染色されていることから、死滅したシストと判定された。右下は、正常な活性を有するシスト、あるいは死滅はしていないが脱嚢活性が消失したシストと判定された。図-1.5 の a-c は各区画から分取したシストの顕微鏡像である。図-1.5a は左下区画から分取された粒子で全て正常の脱嚢が起きた後のシスト殻であった。それらは形態的には萎縮し、顕微鏡的には著しいコントラストの低下が起きていた。図-1.5b は右下区画から分取されたシストで、形態変化は認められなかった。図-1.5c は右上区画のシストで、蛍光顕微鏡観察すると全て PI により強染されていた（図-1.5d）。一方、図-1.4 で右下に存在し、未脱嚢と判定されたシストを蛍光顕微鏡観察したところ、結果には示していないが、PI に染色されなかった。明らかに脱嚢活性は阻害されているにもかかわらず生体膜の透過性に変化のない状態のシストが存在していることが示された。

以上の結果より、各区画がシストの脱嚢前後と対応していることが確認された。以降はこの各区画の割合を散乱光強度の違いから算出することで、脱嚢率を求めることとした。

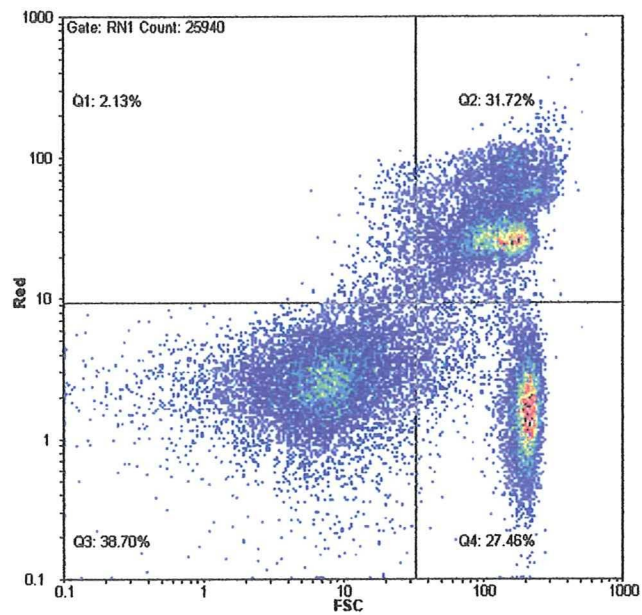


図-1.4 フローサイトメーターによる脱嚢子処理後の *G. muris* の解析像

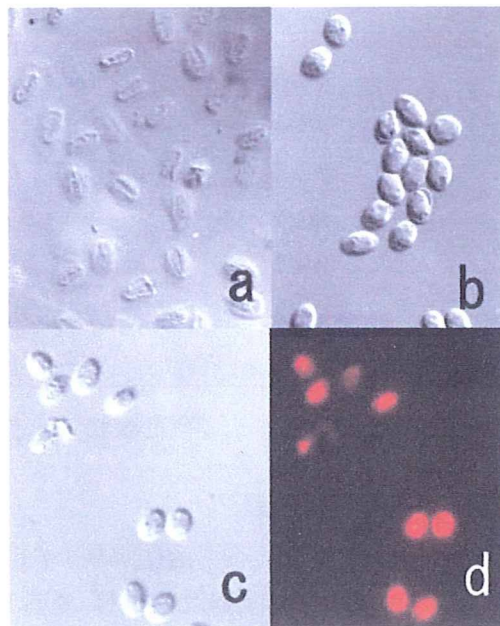


図-1.5 フローサイトメーターによる各分画の分取

- a : 図 1 の左下区画に分布する脱嚢後の嚢子壁の微分干涉像
- b : 右下区画から分取した嚢子で、PI には不染であるが脱嚢しなかった嚢子の微分干涉像
- c : 右上区画から分取した PI に濃染された嚢子の微分干涉像
- d : c と同一の視野の PI 蛍光染色像

## 2.2.2 *Giardia lamblia*

### (1) 脱囊条件の設定

本研究では脱囊試験の条件設定を再検討した。まず、*G. lamblia*の囊子では必須とされる脱囊条件として、低 pH (pH 2~3) 下、炭酸水素ナトリウム存在下で還元剤による前処理を行う必要がある。その際には文献的には塩酸酸性の溶液等が用いられてきたが、本研究ではシステイン・グルタチオン溶液 (pH1.8) と NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (pH8.0) の混合比を調整 (5 : 2) することにより溶液を pH2.7 付近に調整した。また、最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清を添加することで、この間の囊子の変性を防いだ。還元処理後の囊子の遠心・回収に先立って、適当量の水酸化ナトリウムを添加して中和することで、その後の脱囊活性を維持することができた。以上の改良により脱囊活性の評価方法が確立した。表-2.1 に得られた脱囊率を示した。本法によれば脱囊率は囊子の採取日の違いや保存期間に大きく影響されることはなかった。

表-2.1 *G. lamblia* 囊子の脱囊成績

精製後日数	脱囊子率%	PI 陽性率(脱囊 前 / 後)
1	97.0	16.9 / 2.7
2	98.5	26.0 / 1.5
0	88.5	11.4 / 9.1
1	92.3	5.7 / 7.4
0	92.7	13.6 / 4.6
1	98.7	6.8/1.0
0	97.3	12.4/1.7
0	85.1	14.7/11.2

(測定細胞数：約 1,000 個)

### (2) 塩素による *G. lamblia* 囊子不活化試験

図-2.1 に *G. lamblia* 囊子の塩素による不活化試験の測定結果の一例を示した。脱囊後の囊子殻は左右の2区画うち左区画に分布し、脱囊しなかった囊子は右区画に分布する。図-2.1aは塩素無処理群で、脱囊率は約88%であった。塩素濃度 1mg/Lで10分間の処理 (C値≒10) によって脱囊率は33%程度にまで阻害された (図-2.1b)。また、30分 (C値≒30) では3.6% (図-2.1c)、60分 (C値≒60) において1%以下までに低下した (図-2.1d)。

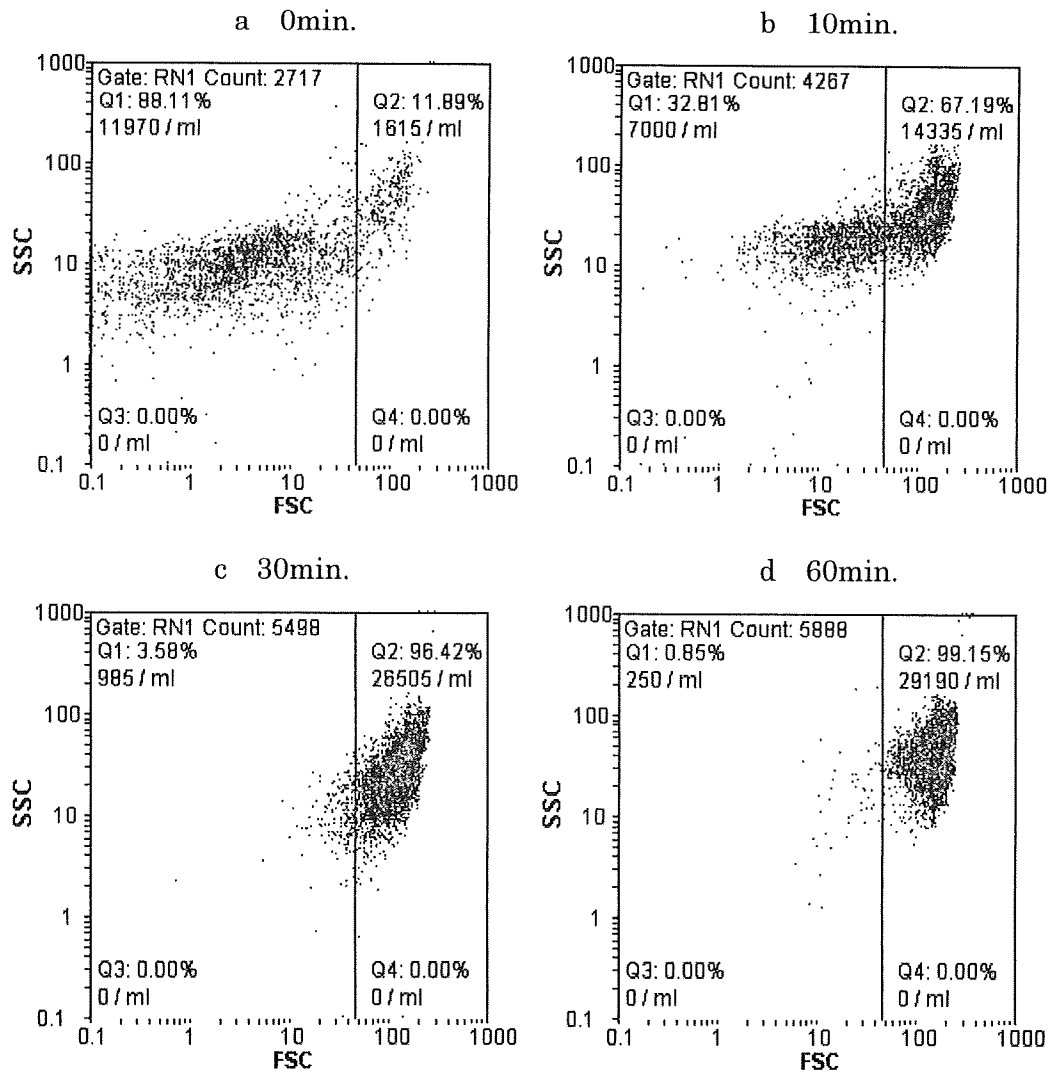


図 2.1 塩素処理後の *G. lamblia* 嚢子のフローサイトメーター解析結果

a : 塩素無処理群の側方散乱光 (Y 軸)、と前方散乱光 (X 軸) のドットプロット像

b : 塩素処理 (1mg/L) 10 分 (Ct 値≒10) のドットプロット像

c : 塩素処理 30 分 (Ct 値≒30) のドットプロット像

d : 塩素処理 60 分 (Ct 値≒60) のドットプロット像

塩素処理が進むにつれて、嚢子の分布が左区画から右の区画へ移動しているのがわかる。

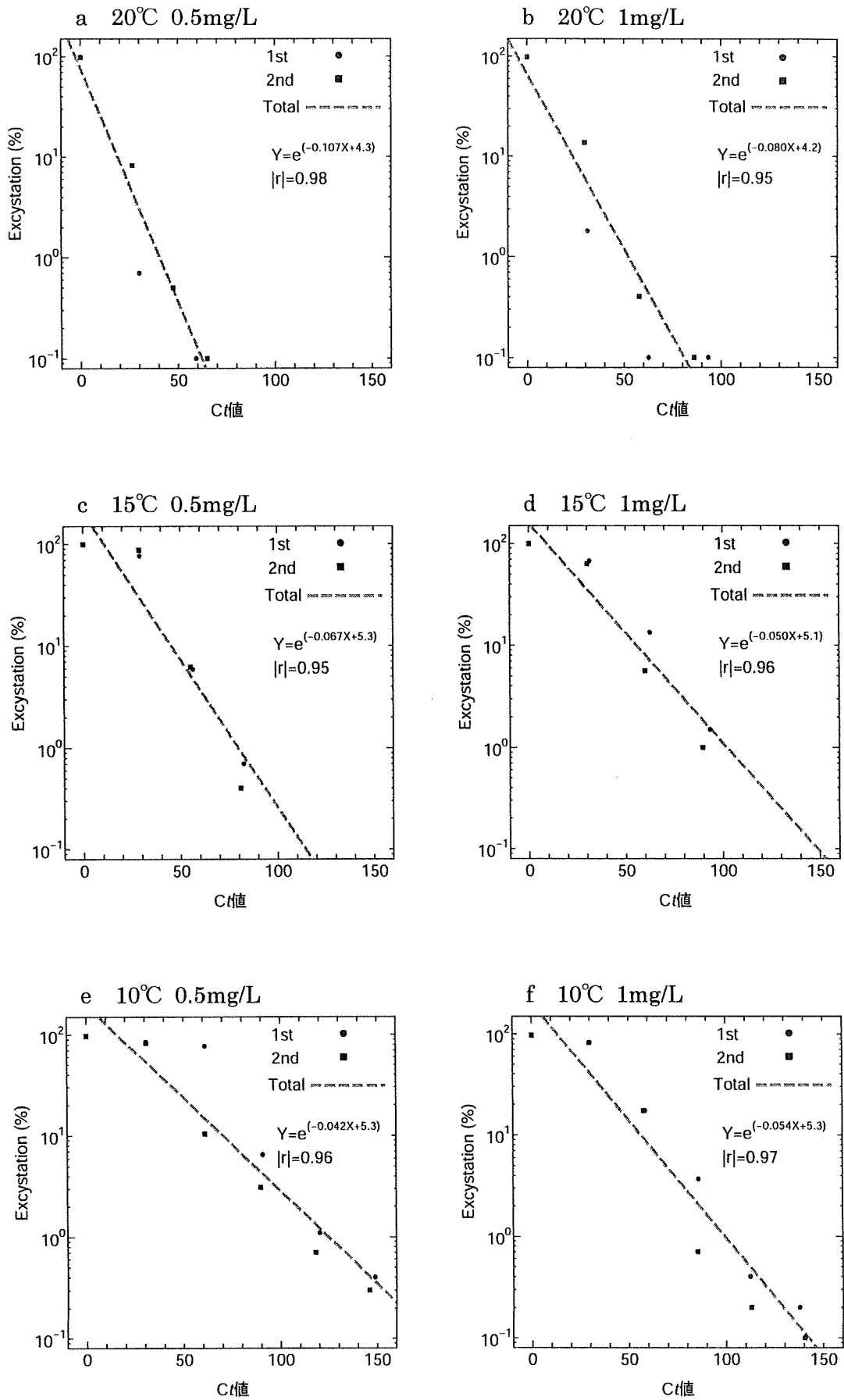


図-2.2 *G. lamblia* 脱囊率の変化

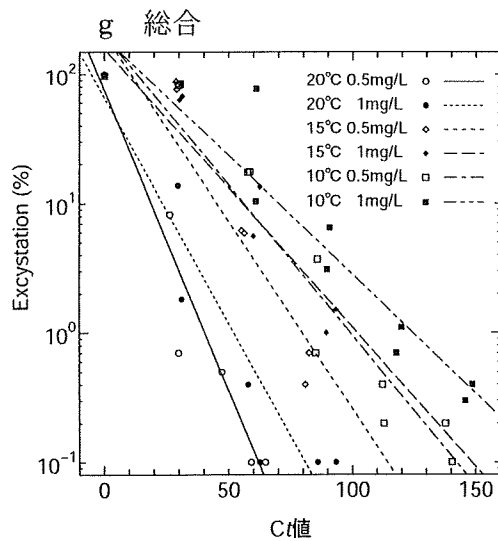


図-2.2 *G. lamblia* 脱囊率の変化

図-2.2には20°C、15°C、および10°Cにおいて、同一嚢子を0.5あるいは1.0mg/Lの条件で塩素暴露を行った時の脱囊率の変化を測定した結果を示した。20°Cの実験条件では180分間の暴露期間を追跡し、Ct値は最大で93.3と算出された。初期塩素濃度に依存して脱囊率に若干の差が見られたものの、20°Cの条件下ではCt値約30で1~14%、Ct値約60で0.1~0.4%の脱囊率がそれぞれ測定された(図-2.2aおよびb)。実験温度15°Cにおいても180分間の暴露を追跡し、Ct値は最大で93.3であった。20°Cの場合に比べ暴露初期の脱囊率の低下が鈍く、Ct値約30での脱囊率は63~88%であった。その後、Ct値約60で6~14%、Ct値約90では0.4~1.5%に脱囊率が低下した(図-2.2cおよびd)。10°Cの実験温度では300分間の暴露期間を追跡し、Ct値は最大で149と算出された。暴露初期の脱囊率変化は温度15°Cの場合と同様な傾向を示し、Ct値約30で脱囊率は82~85%にとどまった。その後はCt値約90で0.7~6.5%、Ct値約120で0.2~1.1%に脱囊率が低下した(図-2.2eおよびf)。以上の結果をまとめて図-2.2gに示した。水温10~20°Cおよび塩素濃度0.5または1.0mg/Lの条件下では、*G. lamblia*は塩素消毒によりCt値40~130の範囲で脱囊率が2 Log低下した。

図-2.3には、図-2.2で用いたデータに基づき、同一測定試料におけるフローサイトメーターによる測定値と顕微鏡による測定値の相関性につき検討し、測定法の正当性を確認した。フローサイトメーターの測定値の中で0.1~10%と測定された脱囊率と、その時の顕微鏡による測定値をプロットした。測定値の条件はフローサイトメーターの場合 $1\sim 3\times 10^4$ 個の解析結果から、また顕微鏡の場合は約 $1\times 10^3$ 個の解析結果から得られたものとした。結果は、フローサイトメーターで

10%以下と測定された脱囊率は、顕微鏡での目視により染色および形態学的特徴から測定した脱囊率と高い相関を示した。

顕微鏡観察では各標本で囊子を1,000個程度観察しているが、C値120以上で脱囊後の囊子殻はほとんど認められなかった。*G. lamblia* の囊子壁は脱囊後に特有の形態変化が認められた。栄養体の遊出後に囊子壁の光学的なコントラストが低下する点は*G. muris* の囊子壁と同様であるが、その後、図-2.4に示すように囊子壁が著しく伸張する現象が認められた。ただし、像のコントラストが著しく減じるために、通常の光学顕微鏡では観察が困難であった。その一方で、伸張した囊子壁は蛍光抗体染色によって非常に強染した。この現象はフローサイトメーターの測定によっても明瞭に観察され、図-2.5に示されたFITC強度のヒストグラムでは通常のピークに加えて、

蛍光強度が増強した位置に新たなピークが形成され、二峰性となった。

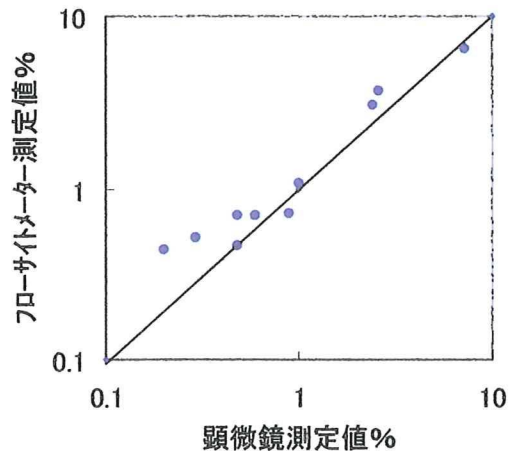


図-2.3 同一試料における顕微鏡測定結果とフローサイトメーター測定結果の相関

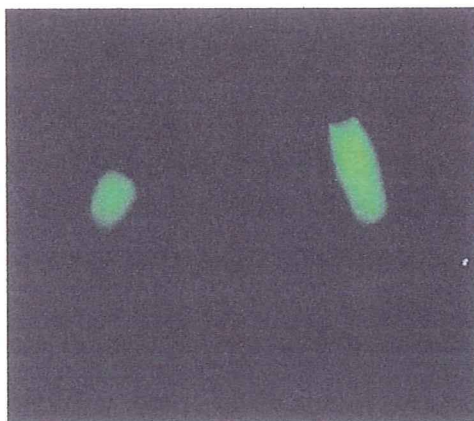


図-2.4 脱囊後の囊子壁の蛍光抗体染色像  
囊子壁は著しく伸縮し、蛍光抗体染色によって強染される。

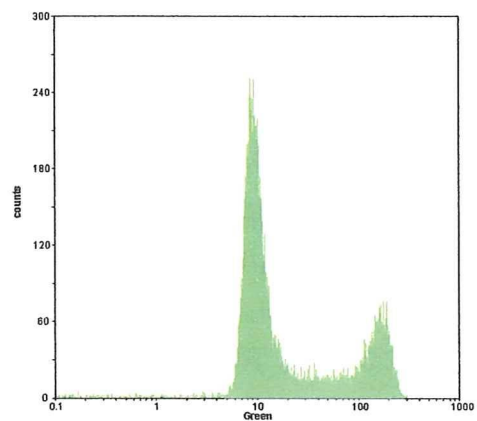


図-2.5 脱囊後の囊子壁のフローサイトメーターによる解析像  
(FITC強度のヒストグラム)

表-2.2は、2点の塩素処理条件（脱糞率3.5%および0.5%）を選びその脱糞率における嚢子のスナネズミ感染率を調べた結果である。対照の塩素無処理嚢子では120分後で脱糞率96.8%を保持しており、この嚢子はすべてのスナネズミ（4/4）に感染した。これに対し塩素処理された嚢子では、脱糞率が3.5%に低下した時点でその感染率は10個/ネズミの投与条件で0%（0/4）、また $10^2$ 個/ネズミの条件で50%（2/4）であった。さらに脱糞率が0.5%に低下した時点での感染率は $10^2$ 個/ネズミの条件で0%（0/4）、また $10^3$ 個/ネズミの条件では100%（4/4）であった。この結果は脱糞率3.5%の嚢子においておよそ10個/ $10^2$ 個（およそ10%）の嚢子が、また脱糞率0.5%の嚢子においては $10^3$ 個の嚢子のうち感染成立に必要な10個程度（約1%）が生残していたと思われ、脱糞率は嚢子の生残率をほぼ反映しているものと考えられた。なお感染スナネズミは $10^3 \sim 10^5$ 個/100mg糞便の嚢子を排出しており、感染、定着さらに原虫の増殖が明らかであった。

表-2.2 塩素暴露嚢子の脱糞率と感染率との関係

実験条件		感染数 /試験数	使用嚢子の 脱糞率%
塩素処理	投与量/ネズミ		
無処理	10	4 / 4	96.8
塩素 (Ct=61.2)	10	0 / 4	3.5
塩素 (Ct=61.2)	$10^2$	2 / 4	
塩素 (Ct=90.6)	$10^2$	0 / 4	0.5
塩素 (Ct=90.6)	$10^3$	4 / 4	



## 2.3 考察

### 2.3.1 *Giardia muris*

*G. muris* のシストを用いて塩素耐性試験を行った。シストの生物活性 (感染性) を見る手段として一般に脱嚢試験が用いられているが、今回も脱嚢試験による結果でのみ塩素の Ct 値との間に一定の関係が認められた。脱嚢試験によると、水温 15°C、添加塩素 2mg/L の条件において 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。また、当該研究では *G. muris* は *G. lamblia* に比べて塩素耐性が高い傾向にあることが他の報告<sup>(8,11)</sup>と同様に示された。

蛍光色素排除試験の結果について補足すると、脱嚢活性を失ったシストはいまだに色素排除能を失っておらず、その意味で死滅していないことを示していた。予備的に行った実験では色素排除能が消失するまでに要する Ct 値は数千以上と計算され、脱嚢試験の結果とは著しい差を示した。

### 2.3.2 *Giardia lamblia*

本研究では *G. lamblia* (WB 株) を実験動物のスナネズミに感染させて嚢子を得た。スナネズミでは感染後 6 日以内に嚢子排出が始まり、その後 3 週間ほど良質な嚢子を排出することが確認された。その後は徐々に排出数が減少し、脱嚢率も低下する傾向が認められた。従って、実験にはこの間に排出された嚢子を用いることとした。嚢子の脱嚢活性は表-2.1 に見られるように十分高いものであった。

本研究では嚢子の不活化の判定基準を脱嚢活性で評価することとした。評価方法としては脱嚢試験、生死判定用の染色試験 (色素排斥能試験) あるいは実験動物への感染実験などが用いられている<sup>(18,19)</sup>。しかしながら、実験動物を用いた感染実験では、その条件として宿主と寄生体との親和性が問題となる。たとえば、ヌードマウスを用いた *G. muris* 嚢子の感染実験では 1 個の嚢子の投与で確実に感染が成立することが予備試験で見られていた。しかしながら *G. lamblia* の宿主特異性は高く、げっ歯類のビーバーなどの例外を除いて基本的にはヒトに限った寄生性原虫と考えられている。実際、実験動物への感染は容易でなく、特定の株に限ってスナネズミやヌードマウスに感染が成立しているのみである。

これらを用いた感染実験の場合に定量性が保証されるか疑問と考えた。また、感染実験では宿主側の要因が結果に大きく影響する懸念もあり、この点が培養試験とは大きく異なる点と考えられる。色素排斥試験は生体膜の選択透過性を判定する試験法で、基本的に裸の細胞に用いられるべき手法と考えられる。ジアルジアに適用した場合には嚢子内の栄養体の色素排斥能が検討されることになり、その前提として嚢子壁を色素が自由に透過できることが保証されなければならない。これまでの予備実験で、ジアルジアの嚢子壁はこの条件を満たしていないものと判断された。

*G. muris* 嚢子を用いた脱嚢試験はすでに条件設定がなされており、常に再現性の高い結果を得ることができるが、*G. lamblia* 嚢子に関しては問題点が指摘されている<sup>(20)</sup>。Sauch (1988) によれば、*G. lamblia* 嚢子の脱嚢活性は同一の宿主由来であっても採取日によって変動することが報告されている<sup>(16)</sup>。その理由は特定されていないが、嚢子が形成されてからある程度の成熟期間が必要ではないかとの推測もされている。そこで、本研究では *G. lamblia* 嚢子の脱嚢条件を再検討し、評価に耐える条件設定を行った。

まず、前処理として嚢子を低 pH 環境 (pH 2~3)、炭酸水素ナトリウム存在下で還元剤による前処理が必須であった。文献的には塩酸酸性の溶液液が用いられたが、本研究ではシステイン・グルタチオン溶液 (pH1.8) と炭酸水素ナトリウム溶液 (pH8.0) を 5 : 2 の割合で混合することにより溶液の pH を 2.7 付近に調整した。また、最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清を添加した。その後の行程では、所定の反応時間後に適量の水酸化ナトリウムを添加して中和し、遠心沈殿により嚢子を回収した。嚢子を PBS に再浮遊させ、37°C に 120 分間保存し、その間の脱嚢率を持って判定した。

嚢子の脱嚢は感染に必須の生物学的現象であり、脱嚢活性の阻害は直ちに感染能力の喪失につながる。本研究の目的はこの脱嚢活性を利用して現行の消毒方法を評価し、併せて今後開発されるであろう新たな処理の効果判定に供すべき手段を確立することにあつた。本研究成果として、まず *G. lamblia* の嚢子を用いて再現性のある脱嚢方法を開発し、これにより塩素による不活化を定量的に測定する方法を確立した。さらにフローサイトメーターを利用することにより、多量の嚢子を迅速かつ再現性良く測定する方法を確立した。

水温 10~20°C および塩素濃度 0.5 または 1.0mg/L の条件下では、*G. lamblia* は塩素消毒により Ct 値 40~130 の範囲で脱嚢率が 2 Log 低下することが示された。他の報告と比較して、総じて大きな差がなく、一致する結果と考えられた<sup>(7-12)</sup>。

実際の消毒のあり方を考える上で、塩素濃度ならびに水温は不活化効果に大きな影響を与える条件となる。本研究でも、初期塩素濃度に併せて水温条件の変化が不活化効果に影響することが示された。

フローサイトメーターによる測定は、FCS (前方散乱光) と FITC 強度のドットプロット解析から、脱嚢率を正確に測定することが可能であった。方法および結果では触れていないが、測定に際して特異的な蛍光染色を行い、解析時に注意深いゲーティング操作により嚢子数を計数することで、その測定限界を 3 Log の脱嚢率低下に対応する程度に保証できるものと思われた。

スナネズミを用いた感染実験により本報告で用いた脱嚢率による評価方法の妥当性が確認された。

感染の成立には、脱嚢、定着さらに増殖という過程を経なければならず、脱嚢は重要

な過程の1つであると考えられる。不活化評価の基準としての脱嚢活性は、動物の個体差を受けない、動物飼育等を含む大規模実験を要しない点で感染実験よりも有用であり、特に定量性においては優位にあるものと考えられる。今後は、これらの点をさらに検討しつつ、塩素以外の有望な消毒剤による不活化方法の評価に適用を図っていきたいと考えている。

### 3. 紫外線による不活化試験

#### 3.1 研究方法

##### 3.1.1 材料及び方法

###### (1) 栄養型虫体

*G. lamblia* WB 株の栄養体を TYI-S-33 人工培地で毎 3 日ごとに継代培養した。実験に用いる虫体の回収に際しては、培養試験管を転倒混和し、試験管壁に付着できない栄養体を積極的に浮遊除去した。培養試験管に新鮮な培地を加えた後に氷水中で 10 分間冷却し、転倒混和することで付着虫体を遊離させた。浮遊液を回収し、4°C 1,000×g で 5 分間遠心して栄養型虫体を回収した。次いで、栄養型虫体を氷冷 PBS で 1 回遠心洗浄し、10<sup>5</sup> 個/ml となるように細胞数を氷冷 PBS で調製した。

###### (2) シスト

予めスナネズミに WB 株栄養型虫体を経口投与し、その糞便中に排出されたシストをシヨ糖密度勾配遠心法で精製回収して得た。シストは PBS で 2 回遠心洗浄後、10<sup>5</sup> 個/ml となるように調製した。

##### 3.1.2 紫外線照射と培養

###### (1) 栄養型虫体

6ml の栄養体浮遊液 (10<sup>4~5</sup> 個/ml in リン酸緩衝生理食塩水 pH7.4) を直径約 60mm のシャーレに取り (水深約 2.8mm)、照射線量計測装置付き紫外線照射装置 (FUNA-UV-Linker FS-800, Funakoshi, Japan) を用いて 0~400mJ/cm<sup>2</sup> (=mW・s/cm<sup>2</sup>) の範囲で照射した。虫体の回収のためシャーレを 5 分間氷冷し、ピペットで十分攪拌してから液ごと遠心用試験管に移し、1,000×g 5 分間遠心回収した。得られた虫体を TYI-S-33 培地に移し、一定期間 (3~7 日間) 培養した。培養期間中に増殖した栄養体数を顕微鏡下で目視、あるいはフローサイトメーターにより測定した。

###### (2) シスト

6ml のシスト浮遊液 (10<sup>4~5</sup> 個/ml in リン酸緩衝液 pH 7.4) を 60mm のシャーレに移し (水深約 2.8mm)、紫外線照射装置 (FUNA-UV-Linker FS-800, Funakoshi, Japan) を用いて 0~800mJ/cm<sup>2</sup> の範囲で照射した。シストを遠心回収、一連の脱囊処理後に TYI-S-33 培地に移し、35°C で一定期間 (~10 日間) 培養した。培養期間中に増殖した栄養体数を顕微鏡下で目視、あるいはフローサイトメーターにより測定した。

## 3.2 結果および考察

### 3.2.1 栄養体を用いた紫外線照射実験

$5 \times 10^5$  個の栄養体に対し  $1 \sim 400 \text{ mJ/cm}^2$  の紫外線を照射したところ、 $100 \text{ mJ/cm}^2$  までの照射虫体は培養試験管内壁への付着能を暫くの間保持していることが確認された。しかしながら、 $1 \sim 25 \text{ mJ/cm}^2$  の範囲で照射された虫体を培養液に移し、3日間培養を行い、この間の細胞数の変化を測定した。その結果、 $1 \text{ mJ/cm}^2$  照射した場合においてのみ接種虫体数が保たれたが（図-3.1；Y軸の矢印が培地への接種量）、 $5 \text{ mJ/cm}^2$  以上の照射では虫体数の減少が認められ、明らかに死滅していることが確認された。

次いで、 $1 \text{ mJ/cm}^2$  の照射栄養体（ $10^4$  個/tube）を7日間培養し、この間の培養虫体の数及び形態変化をフローサイトメーターにより解析を行った。フローサイトメーターの解析結果では、照射虫体数は培養時間とともに減少し、これに伴って形態変化も起きていることが示された。すなわち、図-3.2A~E に対照群および照射群の典型例を示した。図-3.2A-C は対照群の増殖パターンで、X軸に虫体（粒子）の大きさを示す FSC、Y軸に各サイズの虫体数を表している。図-3.2A-C で明らかなようにヒストグラムは X軸で 20（任意の単位）をピークにほぼ正規分布を示したが、培養日数の経過とともに虫体数のヒストグラムは X軸方向でやや広がる傾向が認められた。これに対し、照射群では対照群のヒストグラムとは明らかに異なっていた（図-3.2D-E）。すなわち、図-3.2D で明らかなように、この照射条件では培養3日においてヒストグラムは二峰性となり虫体の崩壊を示す小粒子の増加と X軸 40-50 を中心としたピークが観察された。さらに、図-3.2E ではピークはさらに低くなり、その中心は 50-60 に移行しており、時間の経過とともに大型の粒径がわずかに存在するだけとなった。

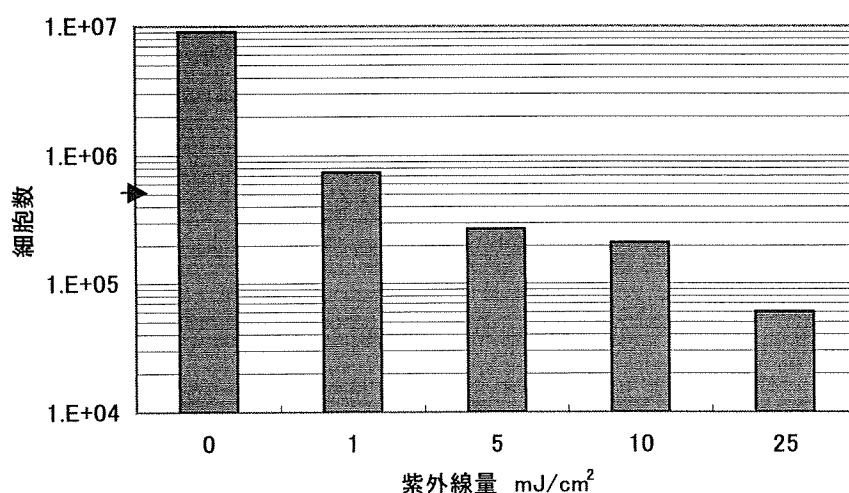


図-3.1 照射エネルギー量による生存細胞数の変化

培養虫体の顕微鏡観察において以下の点が明らかとなった。

- 1) 照射前の集団 (図-3.2B および C) 中に含まれる細胞は単体 (図-3.2A) がおよそ 97%、2 分裂細胞がおよそ 3%であった (図-3.2B)。これを反映して図-3.2B および C のヒストグラムは図-3.2A に比較してやや広がりをもつものと判断された。
- 2) 対照群は 7 日間の培養で細胞数はおよそ 360 倍に増加した。細胞の形態として分裂中の細胞が多いためか、ややヒストグラムが右側に広がる傾向が見られたが、集団としては正常な分裂による細胞数の増加が進んでいることが示された。
- 3) 照射群では培養 3 日後でヒストグラムが右側へ移動し、細胞の形態に変化が生じていることが示唆された。図-3.2D で明らかなように、より大きな粒径を示すピークに相当する栄養体では運動する鞭毛が認められることから生存は確認されるが、多数の鞭毛、7-8 個もの吸着円盤と思われる構造を備えるなど異常な形態を示した。このような異常形態を示す虫体は、細胞小器官の形成が進行するものの、細胞分裂に至らないことによる結果と考えられた。ヒストグラムの変化は、この分裂異常を反映したものと考えられた。顕微鏡観察では、この時点ですでに正常細胞は認められず、ヒストグラム上で右方移動した集団にのみ生存虫体が含まれることが確認された。分裂異常を示す虫体は培養 7 日後には著しく減少したが、正常な虫体の増加は見られなかった。これら虫体は増殖能が欠除しており、死滅したものと考えられた。

これらのことから、*G. lamblia* の栄養型虫体は紫外線に高い感受性を示し、 $1\text{mJ}/\text{cm}^2$  程度の低線量被爆によっても増殖能に著しい障害を受けることが示された。

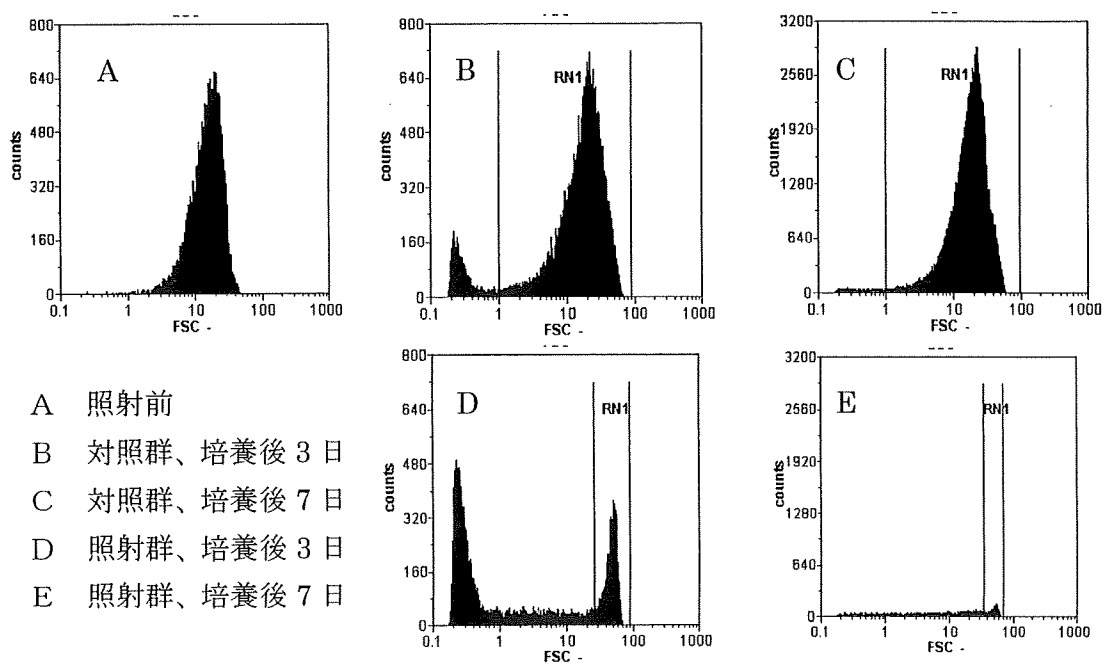


図-3.2 フローサイトメーターによる解析例 (ヒストグラム解析)

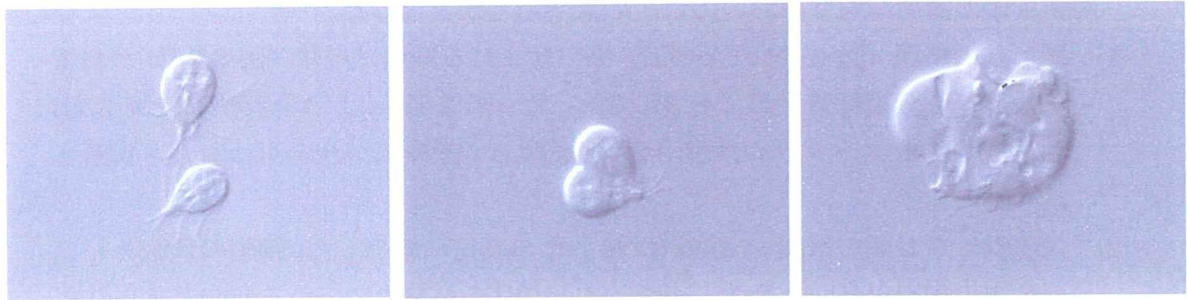


図-3.3 対照群および照射群の細胞の形態

- A: 対照群、3日間培養した細胞
- B: 対照群、正常な増殖を示す2分裂細胞
- C: 照射群、3日間培養した細胞

### 3.2.2 増殖能判定法

紫外線照射の模擬実験として、無処理の栄養型虫体と  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射栄養型虫体（増殖能完全阻害）を用意し、両者を混合して無処理の栄養型虫体の割合が 100%、10% および 0%となるように調整した。これを培養系に移し、増殖虫体の確認試験を行った。虫体数の測定はフローサイトメーターを用いた。表-3.1 に示すように無処理の栄養型虫体では培養 1 日目で約 2 倍、3 日目で 20 倍以上、7 日目で 300 倍以上に増殖することが示され、増殖率の数値から分裂回数はおおよそ 1~2 回/日と算定された。栄養型虫体 10%生存群では 3 日目で 5 倍、7 日目で 100 倍強に増殖していることが確認された。7 日目にはほぼ **confluent** に近い状態にまで増殖した。増殖率の補正を行うため、当初生存している栄養型虫体数を母数とすると、増殖パターンは 1 日目で 2 倍、3 日目で 50 倍弱、7 日目で 100 倍強と、オーダーレベルで無処理群と一致していることが示された（図-3.3）。なお、 $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射群のみである生/死虫体混合比 0%の場合、1 日後はガラス面に接着し運動する虫体が見られたが、3 日後には管壁から離れて遊泳する細胞がごく少数観察されるのみで、他は死滅していた。培養 7 日目では運動する虫体はなく、膨化した虫体の他は死滅崩壊した虫体像が観察され、培養日時とともに虫体数の死滅・暫減が確認された。

表-3.1 *G. lamblia* 栄養型虫体の増殖

生/死虫体混合比	Day 1	Day 3	Day 7
100%	20,100 (2.01)*	229,000 (22.9)	3,470,000 (347)
10%	11,200 (1.12)*	53,800 (5.4)	1,170,000 (117)
0%	9,900 (0.99)*	6,910 (0.691)	4,860 (0.486)

\* 比増殖指数 ( = [Total Cell] / 10,000 )

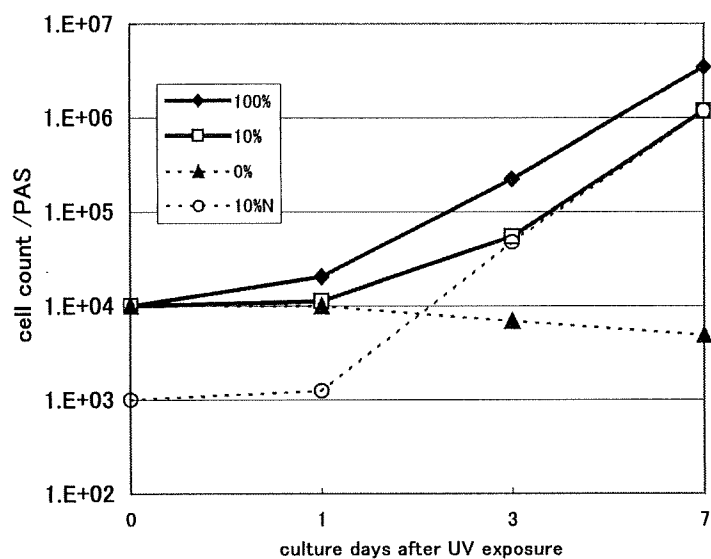


図-3.4 生存細胞数の割合と増殖性の関係

$$*10\%N = [10\%]_{\text{day } n} - \{[0\%]_{\text{day } n} \times 0.9\}$$



### 3.2.3 シストを対象とした紫外線照射実験

#### (1) 5mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射条件における定性的解析

10<sup>5</sup>個のシストに対し5~800mJ/cm<sup>2</sup>の紫外線を照射し、脱囊 ⇒ 培養の工程により活性評価を行った。脱囊率はフローサイトメーターにより測定した。その結果、50mJ/cm<sup>2</sup>以下の照射条件では、脱囊活性への影響は見られず、脱囊活性への影響は100mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射条件で認められた。200mJ/cm<sup>2</sup>の照射条件ではほぼ50%のシストが脱囊阻害を受け、さらにこれらがすべて Propidium Iodide (PI) 染色陽性となったことから、脱囊阻害を受けたシストは紫外線の直接的な影響によって死滅したものと判断された。400mJ/cm<sup>2</sup>以上の多量の暴露では照射直後にシスト内部構造の萎縮が観察された。

これらの結果より、紫外線によるシストの不活化効果には増殖能へ影響するレベルと直接的な殺滅効果を示すレベルの2段階があることが示された。しかしながら、紫外線による直接的な殺滅効果を期待した装置の開発は非効率で経済的にも負担が大きいのと考えられ、50mJ/cm<sup>2</sup>以下の照射条件で増殖阻害を目的とした照射実験を検討すべきものと考えられた。

なお、前項で詳細に記載した培養系を用いたジアルジアの増殖活性判定法では糞便由来のシストの無菌化が必須で、シストの生理活性（脱囊、および増殖能）に影響しない無菌化の方法についての検討があわせて必要と考えられた。

表-3.2 紫外線照射囊子の脱囊率と形態

UV 照射量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	脱囊率 (%)	脱囊阻害シスト (PI 染色陽性率%)	備 考
0	95.4	—	正常に脱囊
50	92.4	—	正常に脱囊
100	80.8	—	一部(20%)に脱囊阻害 ただし、囊子壁が膨化
200	46.3	100	約50%に脱囊阻害 ただし、囊子壁が膨化。
400	1.9	98.3	紫外線照射直後にシストの萎縮 脱囊試験でシスト壁は膨化せず。
800	0.4	100	紫外線照射直後にシストの萎縮 脱囊試験でシスト壁は膨化せず

## References

- (1) Farthing MJ. Giardiasis. (1996) *Gastroenterol Clin North Am*, 25:493-515.
- (2) Craun GF. Waterborne giardiasis in the United States 1965-84. (1986) *Lancet*, 2:513-514.
- (3) Barwick RS, Levy DA, Craun GF, Beach MJ and Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998. (2000) *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ*, 49:1-21.
- (4) EPA. National primary drinking water regulations: Interim enhanced surface water treatment; final rule. (1998) *Federal Register*, 63:69747-69521.
- (5) 水道技術研究センター. クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告. (1997) 「O-157等感染に関する研究」厚生科学研究費補助金事業報告書
- (6) 橋本温、平田強. 相模川におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染レベル. (1998) *水環境学会誌*, 21:119-122.
- (7) Hibler CP, Hancock CM, Perger LM, Wegrzyn JG and Swabby KD. Inactivation of *Giardia* cysts with chlorine at 0.5°C to 5.0°C. (1987) *American Water Works Association*, 1-40.
- (8) Rice EW, Hoff JC and Schaefer FW 3rd. Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. (1982) *Appl Environ Microbiol*, 43:250-251.
- (9) Rubin AJ, Evers DP, Eyman CM and Jarroll EL. Inactivation of gerbil-cultured *Giardia lamblia* cysts by free chlorine. (1989) *Appl Environ Microbiol*, 55:2592-2594.
- (10) Jarroll EL, Bingham AK and Meyer EA. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. (1981) *Appl Environ Microbiol*, 41:483-487.
- (11) Leahy JG, Rubin AJ and Sproul OJ. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. (1987) *Appl Environ Microbiol*, 53:1448-1453.
- (12) Hoff JC, Rice EW and Schaefer FW 3rd. Comparison of animal infectivity and excystation as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by chlorine. (1985) *Appl Environ Microbiol*, 50:1115-1117.
- (13) Rice EW and Hoff JC. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by ultraviolet irradiation. (1981) *Appl Environ Microbiol*, 42:546-547.
- (14) Belosevic M, Craik SA, Stafford JL, Neumann NF, Kruithof J and Smith DW. Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. (2001) *FEMS Microbiol Lett*, 204:197-203.

- (15) Boucher SE and Gillin FD. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. (1990) *Infect Immun*, 58:3516-3522.
- (16) Sauch JF. A new method for excystation of *Giardia*. (1988) *Advances in Giardia research*. Willis P M ed., University of Calgary Press, Calgary, Alberta, Canada, pp. 261-264.
- (17) Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. (1983) *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77:487-488.
- (18) Smith AL and Smith HV. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. (1989) *Parasitology*, 99 Pt 3:329-331.
- (19) Labatiuk CW, Schaefer FW 3rd, Finch GR and Belosevic M. Comparison of animal infectivity, excystation, and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. (1991) *Appl Environ Microbiol*, 57:3187-3192.
- (20) Feely DE. A simplified method for in vitro excystation of *Giardia muris*. (1986) *J Parasitol*, 72:474-475.

## 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