

時の約 40 頭の黒毛和種の健康母牛のふん便と血清を 2 週間毎に 3 回採取した。併せて新生子牛約 40 頭のふん便と血清を 1 週間毎に 3 回採取した。血清については子牛由来の *C. parvum* を抗原として用いた ELISA 法（遠藤ら，2001）により抗 *C. parvum* IgG 抗体価を検査した。ふん便のオーシストの検出には，ショ糖連続密度勾配分離法を用いた。次に IFT（免疫蛍光抗体法）処理後に蛍光顕微鏡で鏡検し，形態学的かつ免疫学的に *C. parvum* を同定した。最終的に，分離したオーシストから DNA を抽出した後，PCR-RFLP 法により，遺伝子学的に *C. parvum* を特定した。平均値の差の検定には Student の *t* 検定を行った。箱ヒゲ図のボックスはデータの 50%を囲み，変数の中央値はラインで表示した。ボックスの上下ラインは，変数母集団の±25%の限界を示す。ボックスの上下間のラインは，許容範囲内にある最小値と最大値を示す。範囲外の外れ値は個々の点で表示した。

2-C. 研究結果

表 4 に感染子牛における月齢別の *C. parvum* オーシスト検出率とふん便 1g 当たりのオーシスト数を示す。感染子牛の *C. parvum* オーシストの排出は，最も早い例で生後 5 日齢から始まり，最も遅い例では，生後 78 日齢まで認められた。保育期における感染子牛の *C. parvum* オーシスト検出率は，1~4 カ月齢まで，それぞれ 100%，50%，10%および 0%であった。感染子牛のふん便 1g 当たりの *C. parvum* オーシスト数は，1~4 カ月齢までそれぞれ 800~3,273,600，800~2,967,200，156,000~2,540,000 および 0 であった。

図 1 に健康分娩牛および新生子牛における抗 *C. parvum* IgG 抗体価（ELISA 法による吸光度，箱ヒゲ図）を示した。分娩時、分娩 2 週間および分娩 4 週後の母牛の吸光度はいずれも類似し、有意な変化は特に認められなかった。出生時の子牛の吸光度は分娩時、分娩 2 週間および分娩 4 週後の母牛の吸光度に比べて有意差は認められなかった。しかしながら、1 週齢の子牛の吸光度は分娩時と分娩 4 週後の母牛に比べて有意（ $P < 0.05$ ）な低値を示し、2 週齢の子牛の吸光度は分娩時、分娩 2 週間、分娩 4 週後の母牛および出生時の子牛に比べて有意（ $P < 0.01$ または $P < 0.05$ ）な低値を示した。

また、出生時の子牛と分娩時、分娩 2 および 4 週後の母牛の吸光度間には有意（それぞれ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ および $P < 0.001$ ）な相関が認められた。

図 2 に子牛の *C. parvum* 自然感染持続例における月齢別ふん便 1g 当たりの *C. parvum* オーシスト数（箱ヒゲ図）を示した。月齢別のふん便

1g 中 *C. parvum* オーシスト数の対数変換値には有意差は認められなかった。

図 3 に子牛の *C. parvum* 自然感染持続例における月齢別抗 *C. parvum* IgG 抗体価 (ELISA 法による吸光度, 箱ヒゲ図) を示した。1 および 2 カ月齢の感染子牛の吸光度は健康な 2 週齢子牛に比べて有意 (それぞれ $P < 0.05$) な高値を示した。さらに 3 および 4 カ月齢の感染子牛の吸光度は健康な 2 週齢子牛, 1 および 2 カ月齢の感染子牛に比べて有意 ($P < 0.001$, $P < 0.01$ または $P < 0.05$) な高値を示した。

2-D. 考察

哺育期において *C. parvum* に感染した子牛では, *C. parvum* オーシスの排泄は約 1 カ月間, 2 カ月間および 3 カ月間持続する例が認められた。約 3 カ月間の長期にわたって感染が持続した理由は自家感染 (Current, 1985; O'Donoghue, 1995; Xiao, 1994) によるものと考えられた。

哺育期において抗 *C. parvum* IgG 抗体は母牛の移行抗体と感染抗体の混在により複雑な推移を示すと考えられている。北野ら (1991) はニワトリの *Cryptosporidium* を抗原とした間接蛍光抗体法による子牛の経時的な抗体陽性率は、生後 4 カ月齢で最も低下することを報告している。しかしながら、今回 *C. parvum* オーシストが陽性を示した 1 および 2 カ月齢の子牛の抗 *C. parvum* IgG 抗体価は、健康な 2 週齢の子牛に比べて有意に高く、さらに 3 および 4 カ月齢子牛の抗体価は健康な 2 週齢の子牛, 1 および 2 カ月齢の感染子牛に比べて有意に高く、北野ら (1991) とは全く異なる結果を示した。Toyoguchi, et al. (2000, 2001) は初乳を摂取させない 2 日齢の初生子牛を用いた人工的な感染実験により *C. parvum* 接種の 2 週間後に抗 *C. parvum* IgG 抗体価 (間接蛍光抗体法) が上昇することを認め、今回の 1 カ月齢の子牛と同様な結果を得ている。従って、野外における *C. parvum* 感染症では 3 カ月齢以降に最も高い抗体価を示し、4 カ月齢以降においても高値が持続することが判明した。

2-E. 結論

健康な分娩時の母牛と新生子牛の出生時の抗 *C. parvum* IgG 抗体価は有意な相関を示した。健康な出生時の子牛の抗体価は 1 および 2 週齢で有意に減少した。出生時に *C. parvum* 感染がみられた子牛では, *C. parvum* オーシストの排泄が約 1 カ月間, 2 カ月間および 3 カ月間持続する例が認められた。*C. parvum* 感染がみられた 1 および 2 カ月齢の感染子牛の抗体価は 2 週齢の健康子牛に比べて有意に高く、さらに 3 および 4

カ月齡の感染子牛の抗体価は、2週齡の健康子牛、1および2カ月齡の感染子牛に比べて有意な高値を示した。

表4. 感染子牛における月齢別の *C. parvum* オーシスト検出率とふん便1g当たりのオーシスト数

検査時期	1カ月齢	2カ月齢	3カ月齢	4カ月齢
日齢	5~27	39~58	72~93	108~111
<i>C. parvum</i> オーシスト検出率	100% (20/20)	50% (10/20)	10% (2/20)	0% (0/20)
ふん便1g当たりの <i>C. parvum</i> オーシスト数	800~ 3,273,600	800~ 2,967,200	156,000~ 2,540,000	0

注1) () : 例数

図1. 健康分娩牛および新生子牛における抗 *C. parvum* IgG抗体価 (ELISA法による吸光度, 箱ヒゲ図)

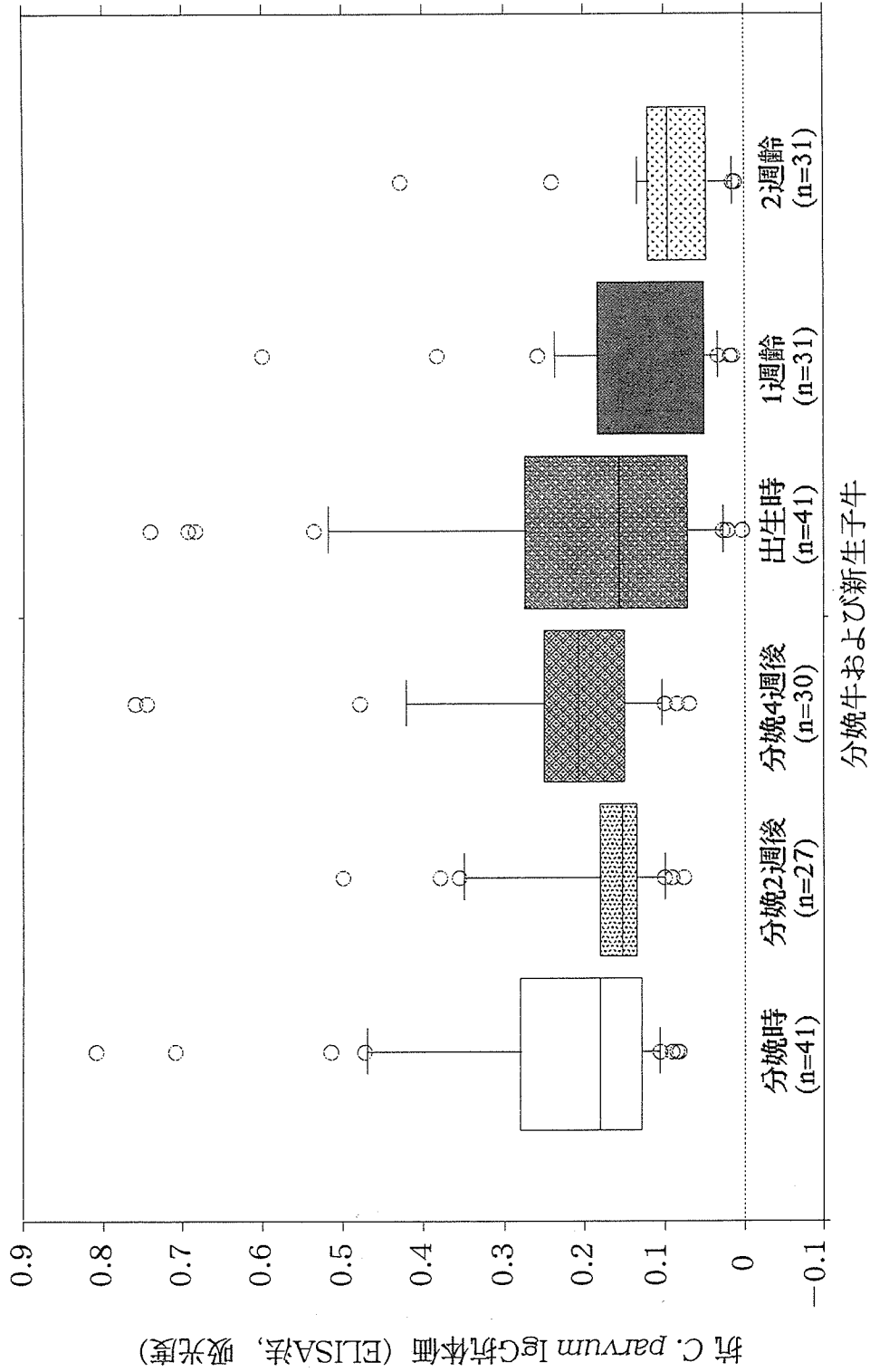


図2. 子牛の*C. parvum* 自然感染持続例における月齢別ふん便1g当たりの*C. parvum*オーシスト数 (箱ヒゲ図)

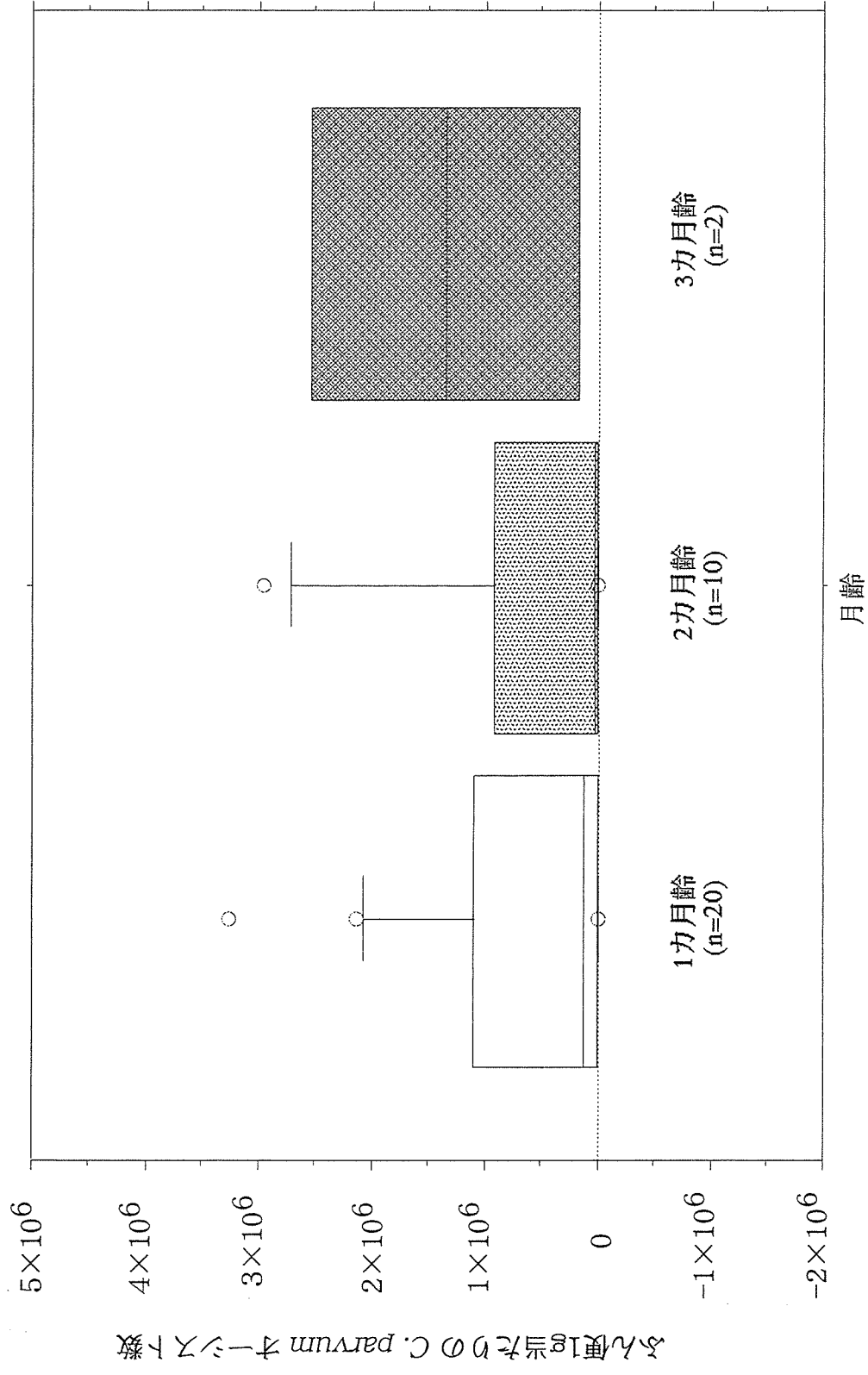
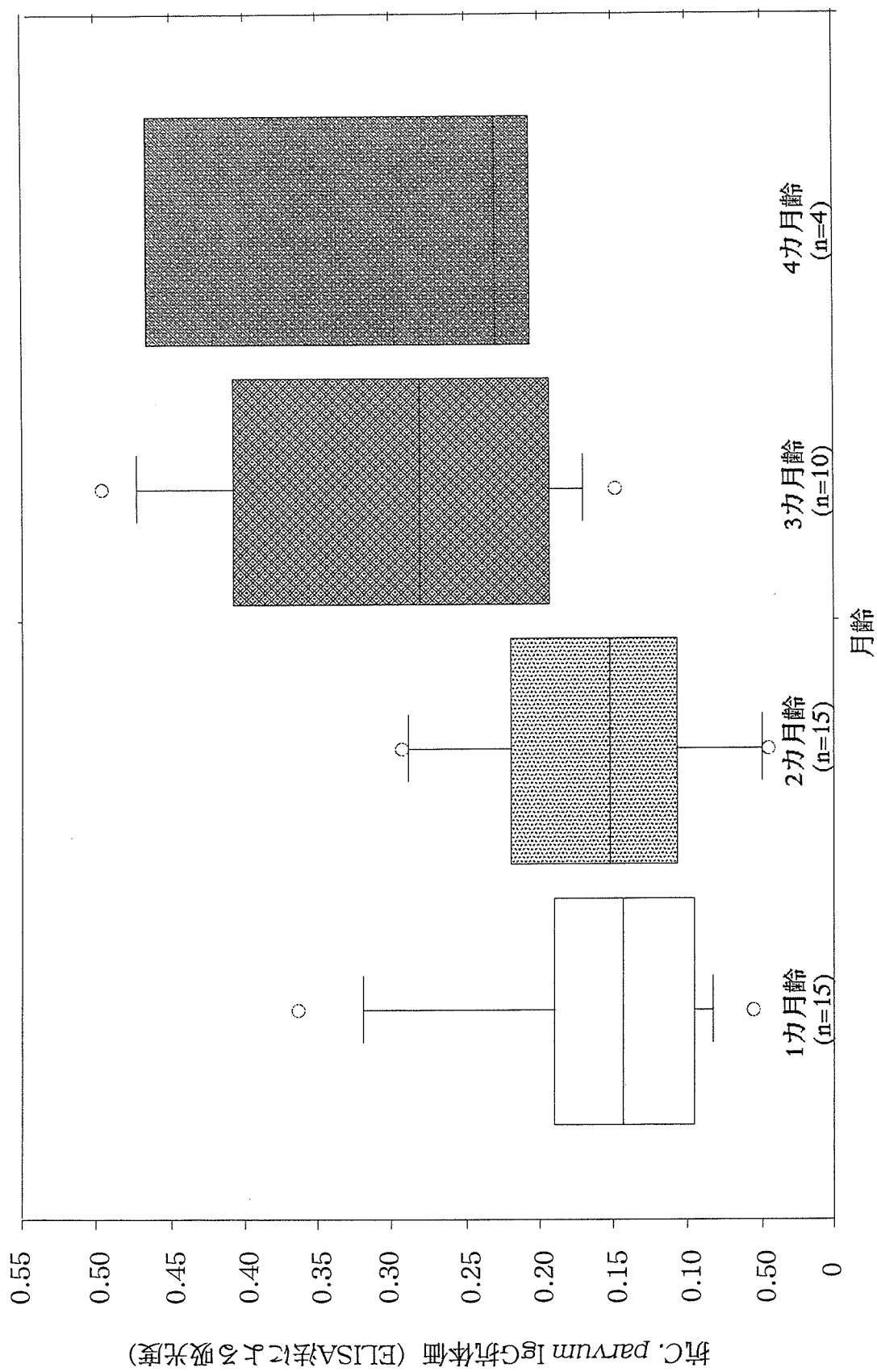


図3. 子牛の*C. parvum* 自然感染持続例における月齢別抗*C. parvum* IgG抗体価 (ELISA法による吸光度, 箱ヒゲ図)



分担研究報告書 7

クリプトスポリジウムオーシストの
細胞感染性評価のための前処理方法の検討

分担研究者 平田 強、金子光美
研究協力者 森田重光

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

水道水のクリプトスポリジウム等による汚染に係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の細胞感染性評価のための前処理方法の検討

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

要旨

本研究では、HCT-8 細胞を用いた *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株オーシストの細胞感染性試験のためのオーシストの前処理方法として、抗生物質処理、抗生物質および酸処理、塩素処理の 3 種類について検討した。その結果、これらの 3 つの前処理方法のなかでは、オーシストの脱嚢率が最も高いこと (87%)、変動係数が最も低いこと (6.4%)、前処理が脱嚢したスポロゾイトの活性を著しく低下させることはないこと、感染力の相対値に及ぼす影響は十分無視できること、それに、培養細胞系への微生物の汚染防止にすぐれることなどの理由から、塩素処理による方法が最も優れていることを確認した。

A 目的

波長 254 nm 付近の低圧紫外線 (LPUV) のクリプトスポリジウム $2 \log_{10}$ 不活化線量は、脱嚢の場合、 120 mJ/cm^2 (Iowa 株, Ransome *et al.*, 1993) と高い線量が必要であるとされ、クリプトスポリジウムの消毒には不適と考えられていた。しかし、近年になって、マウス感染性は紫外線照射線量 4.9 mJ/cm^2 で $2.8 \log_{10}$ 不活化 (Iowa 株, Craik *et al.*, 2001), 2 mJ/cm^2 で $1.5 \log_{10}$ 不活化 (Iowa 株, Shin *et al.*, 2001), 1 mJ/cm^2 で $2 \log_{10}$ 不活化 (HNJ-1 株, Morita *et al.*, 2002) と報告され、マウス感染性で評価した場合、紫外線はクリプトスポリジウムに対して極めて優れた効果を発揮しうることが証明された (そのほか、Landis *et al.*, 2000)。そのうえ、クリプトスポリジウムでは、DNA レベルでの回復は生じるものの、紫外線消毒で問題となる回復 (Hanawalt *et al.*, 1979) は、感染では生じないことが推測され (Shin *et al.*, 2001; Oguma *et al.*, 2001), 光回復も暗回復もないことが実証された (Morita *et al.*, 2002)。

最低限の消毒は感染力の喪失で達成されるとの立場にたてば、クリプトスポリジウムのマウス感染試験は非常に重要である。しかし、マウス感染試験は、動物の犠牲、試験期間、費用、維持管理などの問題を抱えていることも事実である。その解決策に、マウス感染試験の代替法として細胞培養技術を適用したオーシストの感染性評価が注目されている。細胞培養法によるクリプトスポリジウムの感染試験は 1980 年代前半から検討され、宿主細胞および培養条件、培養細胞への *Cryptosporidium* の接種方法、オーシストの前処理方法、感染細胞の検出方法、感染力の定量評価方法が確立されつつある (Craik *et al.*, 2001; Fayer and Unfar, 1986; Owens *et al.*, 1999; Ransome *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1993; Rosales *et al.*, 1993; Slifko *et al.*, 1999; Slifko *et al.*, 1997; Upton *et al.*, 1994a, b; 1995)。しかしながら、混在する他の微生物による

汚染を防止するために欠くことのできないオーシストの前処理には、クリプトスポリジウムそのものを不活化しない前処理が望まれるが、それに関する研究は極めて少ない。

そこで本研究では、クリプトスポリジウムオーシストに感受性があることが明らかになっている11種類の培養細胞のうち、感受性が最も高いとされているHCT-8細胞 (Upton *et al.*, 1994a) を宿主細胞とし、クリプトスポリジウムHNJ-1株オーシストに対する3とおりの前処理方法の有効性を比較検討した。

B 方法

1 供試オーシスト

供試オーシストとして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でSCIDマウス(C.B-17/C.B-17/lcr, CLEA Japan)を用いて継代維持しているHNJ-1株(genotype 2)を使用した。

オーシストを感染させたマウスの糞便を回収し、連続ショ糖浮遊遠心法により精製した後、0.1 Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS: Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)に懸濁させ、4°Cで保存した。精製後、1ヶ月以内のオーシストを感染試験に供した。

2 オーシストの前処理

培養細胞へ接種するオーシストの前処理として、以下の3種類を検討した。

(1) 抗生物質処理

抗生物質は、オーシストに対する非ストレス性の薬剤として保存液に古くから用いられているものとしたが、細菌による汚染が防止できず、細胞の生育が阻害された。さらに、死細胞が著しく増加し、細菌の増殖に伴い培地が黄変した。このことから、ゲンタマイシンの濃度のみを通常の保存液の10倍濃度とした。

処理方法は次のとおりである。

精製済みオーシスト懸濁液を3回遠心洗浄した。洗浄後、抗生物質の最終濃度がペニシリン 10^5 U/L (結晶ペニシリンGカリウム; 明治製薬), ストレプトマイシン 100 mg/L (硫酸ストレプトマイシン; 明治製薬), ゲンタマイシン 1 g/L (ゲンタシン; シェリング・プラウ) となるように調製した溶液を添加し、室温で1時間接触した。接触後、遠心洗浄した。

(2) 抗生物質+酸処理

酸溶液は、オーシストが宿主動物内へ侵入した場合、胃内で酸刺激を受けること、さらに新鮮なオーシストの脱嚢試験で、酸溶液による前処理(pH 2.75, 37°C, 5 min)が脱嚢率を明らかに向上させることから(小澤ら, 1999)、抗生物質処理と酸処理を組み合わせた方法とした。

抗生物質処理後、pH 2.75に調整したHBSS(Hank's 平衡緩衝液; Sigma)を添加し、37°C, 5%CO₂インキュベーター内に5分間接触した。接触後、遠心洗浄した。

(3) 塩素処理

塩素は殺菌効果が高く、オーシストは低温高濃度の暴露では比較的塩素耐性が強い。志村ら(2001)の感染の不活化CT値と平均遊離塩素濃度間の回帰式の適用可能CT値範囲は0.7~100

mg・min/L であるが、それ以外の情報がないので、志村らのデータに基づいて、本研究における塩素処理条件（5,000 mg/L, 4°C, 5 min）での感染力の減少率を推算した。その結果、遠心洗浄中のオーシスト暴露時間や接触濃度により異なるものの、塩素暴露によるオーシストの感染力の減少は 0.054~0.32 log₁₀ 程度（暴露時間 5~35 min）と比較的少ないことから、塩素を用いた。

次亜塩素酸ナトリウム水溶液（アンチフォルミン；和光純薬）を超純水で塩素濃度約 5,000 mg/L に調製した。その塩素水を精製済みオーシスト懸濁液に添加し、4°C で 5 分間接触した。接触後、3 回遠心洗浄した。

塩素濃度の影響は、濃度約 5,000 mg/L と約 1,000 mg/L で調べた。5,000 mg/L と約 1,000 mg/L の塩素水を調製して、オーシスト懸濁液 1 mL に対して塩素水 9 mL を加えて、4°C で 5 分間接触した。接触後、3 回遠心洗浄した。

3 供試細胞

宿主細胞として、ヒト回盲腺癌由来細胞株 HCT-8 (Human ileocecal adenocarcinoma, CCL-244 ; ATCC) を用いた。細胞は維持培地を用いて 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で培養し、3~4 日毎に継代して維持した。培地は、Upton *et al.* (1995) の方法を一部変更して供した。

(1) 維持培地

RPMI1640 培地 (Gibco, Brl.) を基本とし、これに 3% 牛胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum ; ニチレイ), 0.2 M L-グルタミン (和光純薬), 0.2 M ピルビン酸 (Sigma), 5×10⁻⁵ M 2-ME (2-Mercaptoethanol ; Sigma), 0.07% 重炭酸ナトリウム (関東化学), 0.02 M HEPES (Sigma), スペクチノマイシン 7.6 mg/L (Sigma) を添加したものを供した。

(2) 増殖培地

FBS を 10% に調整した維持培地に、アスコルビン酸 2 mg/L (和光純薬), 葉酸 1 mg/L (和光純薬), パントテン酸カルシウム 2 mg/L (和光純薬), *p*-アミノ安息香酸 4 mg/L (和光純薬), ペニシリン 10⁵ U/L, ストレプトマイシン 100 mg/L を添加したものとした。

4 前培養

HCT-8 細胞のセルシートを coverslip 上, もしくは 8 well chamber slide (LAB-TEK® II Chamber Slides ; Nalge Nunc Inc.) 上に作製した。coverslip 上にセルシートを作製する場合には, φ35 mm シャーレ内に滅菌水を 5 μL 滴下し, その上に coverslip (22×22 mm) を置き, 細胞懸濁液 (初期濃度 : 1×10⁵ cells/mL) を 500 μL/coverslip ずつ播種し, 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で 2 時間静置して細胞を付着させた。その後, シャーレに維持培地 1.5 mL を静かに添加して細胞を覆い, 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で細胞が 70~80% コンフルエントになるまで 4 日間培養した。

8 well chamber slide 上にセルシートを作製する場合には, 細胞懸濁液 (初期濃度 : 4~5×10⁵ cells/mL) を 500 μL/well ずつ播種し, 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で細胞が 70~80% コンフルエントになるまで 24 時間培養した。

5 オーシストの接種および培養

接種および培養は Slifko *et al.* (1997)の方法に一部変更を加えて行った。すなわち、前処理したオーシストを増殖培地に懸濁させ、70~80%コンフルエントの monolayer 細胞へ接種し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。2 時間後に洗浄し、更に 46 時間培養した。

6 感染細胞の検出および判定

オーシストを接種して培養した細胞を PBS で 2 回洗浄し、100%メタノールで 10 分間固定し、よく風乾した。風乾後、1%NGS を添加して 30 分間静置した (blocking) 後、*Cryptosporidium* スポロゾイト特異 IgG ポリクローナル抗体 (sporo-Glo ; Waterborne Inc.) を用いて、暗所で 60 分間染色した。

染色した試料は落射蛍光顕微鏡を用いて B 励起で観察し、FITC 特有の青リンゴ色の蛍光を発する粒子を、スポロゾイトが細胞へ侵入して発育した *Cryptosporidium* と判断し、計数した。また、いくつかの蛍光粒子からなる集団 (cluster) が確認されたことから、cluster 構成蛍光粒子数別の cluster 数も計数した。

7 MPN 法による細胞感染性の定量

各希釈段階のオーシスト接種数と接種した細胞の well 数および感染陽性と判定した well 数から、Harley & Roscoe (1983)の MPN 法を用いて 1 MPN (Most Probable Number) 発現オーシスト数 (ID : Infective Dose) を求めた。

また、UV 照射オーシストの感染力を非照射オーシストの感染力で除した値を相対感染力とした(1 式)。

$$\text{RIF} = \frac{\text{ID}_0}{\text{ID}_x} = ae^{-kF} \quad (1)$$

ここで、RIF : 相対感染力

ID₀ : 非照射オーシストの 1 MPN 発現オーシスト数 (個)

ID_x : UV 照射オーシストの 1 MPN 発現オーシスト数 (個)

a : 非照射オーシストの相対感染力

k : 単位線量当たりの不活化力 (cm²/mJ)

F : UV 照射線量 (mJ/cm²) である。

また、UV 照射に伴うオーシストの相対感染力の変化は、基本的に (1) 式に従うものとして整理した。低線量域で lag (消毒遅延期) が生じた場合は、感染力が指数関数的な減少が認められる線量域のみを (1) 式により整理した。

8 脱囊率の算出

オーシストの接種試験ごとに脱囊率を算出した。未処理または酸処理後のオーシスト懸濁液の一部を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 2 時間保温した。保温前 (接触前のオーシストの脱囊状態に相当する) と保温後 (洗浄までのオーシストの脱囊状態に相当する) に微分干渉顕微鏡を用いてオーシストの形態を観察し、形態別に計数した。脱囊率 V を (2) 式より算出した。なお、細

胞に接触させたオーシストと、細胞には接触させずに 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で 2 時間保温したオーシストの間で、脱囊状態に差がないことは予め確認済みである。

$$V = \left(\frac{E_a}{T_a} - \frac{E_b}{T_b} \right) \times 100 \quad (2)$$

ここで、V：脱囊率(%), E：何らかの脱囊状態を呈しているオーシストの合計(=G+R+P+S), G：ゴースト数, R：残体含有オーシスト数, P：部分脱囊オーシスト数, S：縫合部開口オーシスト数, T：全オーシスト数, 添字 a は保温後, 添字 b は保温前を表す。

また、接種したスポロゾイト数を (3) 式より算出した。

$$S_e = O \times \left(\frac{V}{100} \right) \times 4 \quad (3)$$

ここで、S_e：接種スポロゾイト数, O：オーシストの添加数, V：脱囊率(%) である。

C 結果および考察

1 感染細胞の検出

オーシストを接種して培養した細胞を、*Cryptosporidium* スポロゾイト特異 IgG ポリクローナル蛍光抗体で染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて B 励起で観察したところ、培養細胞の内部に径 1~7 μm の大きさの異なる蛍光粒子が確認された。また、それらの蛍光粒子が群集化しているもの (cluster) が確認された。しかし、sporozoite 様の形態をした蛍光粒子は観察されなかった。さらに、オーシストを接種せずに培養した細胞には、蛍光粒子はまったく観察されなかった。

蛍光粒子には DAPI 染色により核が確認されるものと、されないものがあった。核が確認されたもののうち、6~8 個の核を有する蛍光粒子は、type I meront と推測される。また、4 個の核を有する蛍光粒子は、type II meront か、オーシストと考えられるが、細胞培養系ではオーシスト形成 (life cycle の完了) にまで至ることは不可能ではないものの、極めて困難とされているので (Rasmussen *et al.*, 1993; Rosales *et al.*, 1993), type II meront の可能性が高い。小さい蛍光粒子 (<4 μm) は trophozoite などであると推測される。

cluster を構成している蛍光粒子は、数、大きさ、蛍光粒子内部の核の数が様々であった。cluster 内の構成蛍光粒子数は、多いものでは 50 個を超えるものもあった。HCT-8 細胞で、オーシスト接種後 12 時間培養で既に自家感染が生じるので (Slifko *et al.*, 1997), これらの蛍光粒子は培養細胞内で発育した *Cryptosporidium* と考えられる。

これらの結果から、本研究では、蛍光粒子は宿主細胞内に侵入した sporozoite が発育したものとみなすことができると判断した。

2 オーシストの前処理方法の検討

細胞培養用培地は栄養価が高い。そのため、細菌や真菌に対しても至適生育条件となりうること

から、微生物の混入を避け、無菌状態を維持することが重要である。しかしながら、培養細胞へ接種するオーシスト懸濁液は、マウスの糞便から精製するため、挟雑する微生物の濃度が非常に高く、オーシストのみを分離することは実質上不可能である。そこで、3種類の前処理方法を検討した。

(1) 脱嚢率への影響

前処理別の脱嚢率を Table 1 に示す。塩素処理の脱嚢率は 87% と最も高く、酸や塩素によりオーシストの脱嚢が誘発されることが明らかとなった。また、塩素処理の脱嚢率の変動係数 (CV) は 6.4% と、もっとも小さかった。これらの結果から、塩素処理は脱嚢誘発効果が最も高く、しかも安定した処理であると考えられた。

Table 1 Excystation ratio of oocysts after pretreatment

Pretreatment	Excystation ratio (%)	Standard deviation	Coefficient of variation	n
Antibiotics	23	8.3	36%	6
Antibiotics + Acid	55	12.6	23%	10
Chlorine	87	5.4	6.4%	8

(2) スポロゾイト活性への影響

酸や塩素を用いた前処理方法では脱嚢したスポロゾイトの活性を低下させることが危惧される。そこで、接種スポロゾイト数（接種したオーシスト数に1オーシスト内のスポロゾイト数および脱嚢率を乗じたもの）と細胞内で発育した *C. parvum* の数（蛍光粒子数）との関係を調べた。その結果、接種スポロゾイト数に対する蛍光粒子数の割合は、抗生物質処理で 20% (0.5~45%)、抗生物質+酸処理で 8.3% (1.3~32%)、塩素処理で 17% (6.6~37%) であった。抗生物質処理と塩素処理との間に有意な差は認められず、塩素処理が他の処理方法と比べてスポロゾイトの活性を低下させるような傾向は認められなかった。

(3) 接種オーシスト数と蛍光粒子数の関係

接種オーシスト数と細胞内の蛍光粒子数との関係を Fig. 1 に示す。培養細胞へ接種したオーシスト数が増すにつれて細胞内の蛍光粒子の数も増加する傾向が認められた。その回帰式を Table 2 に示す。いずれの処理の場合においても接種したオーシスト数と蛍光粒子数との間に相関が認められたが、塩素処理の寄与率は 0.967 であり、塩素処理が他の二法と比べて、最も高い値であった。

接種オーシスト数に対する蛍光粒子数の割合は、抗生物質処理で 17% (0.48~56%)、抗生物質+酸処理で 20% (3.0~80%)、塩素処理で 58% (21~130%) であり、塩素処理が最も高かった。

また、それぞれの回帰式における検出下限（蛍光粒子を 1 個発現するオーシストの数）は、抗生物質処理および抗生物質+酸処理においてはどちらも 7 個であったが、塩素処理では 3 個であり、塩素処理の検出下限値が有意に小さかった。本研究で検討した 3 通りの前処理方法のなかでは、塩素処理が最も検出率の高い方法であることが明らかとなった。

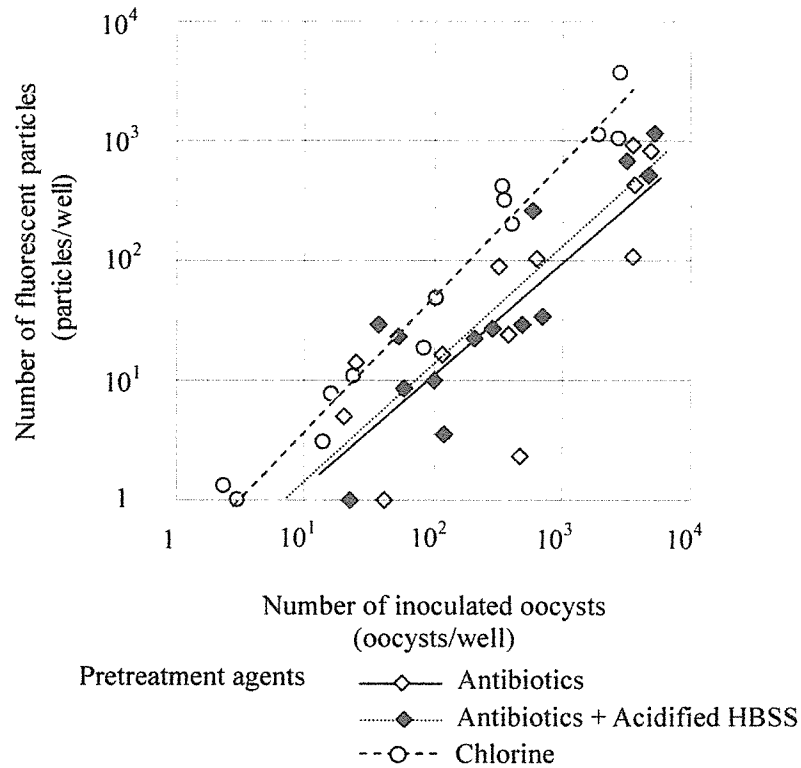


Figure 1 Relationship between number of inoculated oocysts and number of fluorescent particles produced

Table 2 Regression function of pretreatments

Pretreatment	Regression function	r^2	oocyst number of detection limit
Antibiotics	$y = 0.1722x^{0.9103}$	0.6595	7
Antibiotics + Acid	$y = 0.1475x^{0.9824}$	0.8246	7
Chlorine	$y = 0.3040x^{1.1063}$	0.9665	3

y: Number of fluorescent particles (particles/well)

x: Number of inoculated oocysts (oocysts/well)

(4) 接種オーシスト数と cluster 数の関係

オーシストを接種して培養した細胞に cluster が観察されたことから、その cluster 数を計数した。接種オーシスト数と cluster 数の関係を Fig. 2 に示す。接種オーシスト数が増すにつれて cluster 数も増加する傾向が認められた。cluster 数 (y: 2 個以上の蛍光粒子から構成する cluster 数) と接種オーシスト数(x) の 2 つの変数を用いて回帰分析した。結果を Table 3 に示す。接種オーシスト数と cluster 数の間にも、接種オーシスト数と蛍光粒子数の関係と同様、どの処理においても明瞭な相関関係が認められた。寄与率が最も高いのは塩素処理であった ($r^2 = 0.952$)。回帰式から算出した 1 個の cluster を発現するオーシスト数は、抗生物質処理で 41 個、抗生物質+酸処理で 37 個、塩素処理で 16 個となり、ここでも前処理として塩素処理が優れていた。

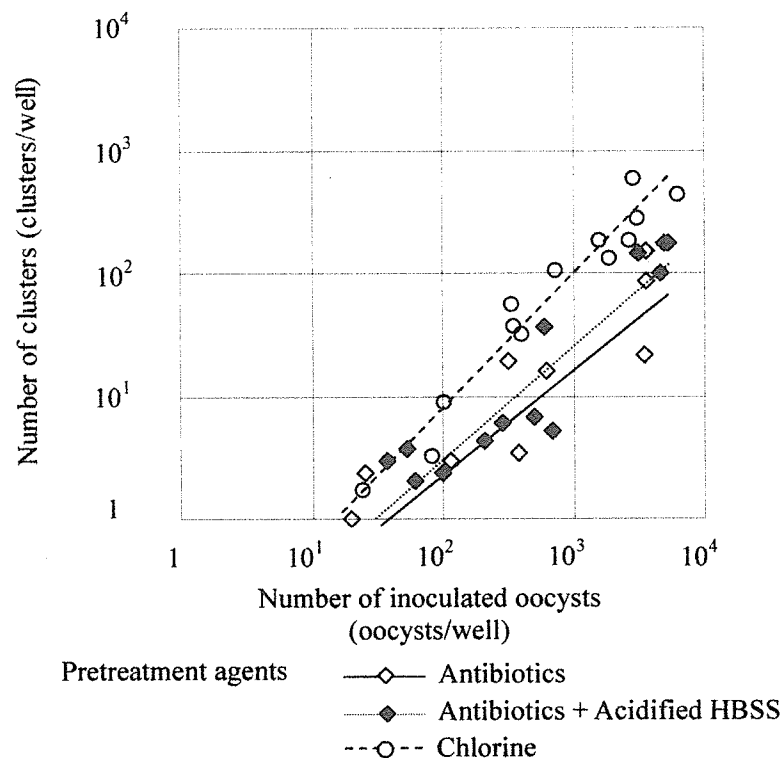


Figure 2 Relationship between number of inoculated oocysts and number of clusters

Table 3 Regression function of pretreatments

Pretreatment	Regression function	r^2
Antibiotics	$y = 0.0371x^{0.887}$	0.6453
Antibiotics + Acid	$y = 0.0298x^{0.9712}$	0.8373
Chlorine	$y = 0.0526x^{1.0757}$	0.9516

y: Number of clusters (clusters/well)

x: Number of inoculated oocysts (oocysts/well)

以上の結果に基づき、検討した3種類の前処理方法のなかでは、微生物汚染の防止効果、検出感度、定量性、再現性のいずれの点においても、塩素処理が最も優れていると判断した。

(5) 塩素濃度の影響

培養細胞へ接種するオーシストの前処理として、塩素処理(塩素濃度 5,000 mg/L, 4°C, 5 min)の有効性が確認された。しかしながら、消毒剤の不活化効果を評価する場合、培養細胞へ接種するための前処理としての塩素処理が *Cryptosporidium* そのものを不活化し、結果として、消毒剤の効果に塩素処理の影響が加わり、結果の信頼性が損なわれるおそれがある。そこで、実際にUV照射したオーシストを用いて、2通りの異なる塩素処理条件(条件1: 5,000 mg/L, 4°C, 5 min, 条件2: 1,000 mg/L, 4°C, 5 min)で前処理して、感染性を評価した。なお、感染力の定量にはMPN法を用いることとし、陽性の判定基準を「3個以上の蛍光粒子から構成されるclusterが少

なくとも1個存在すること」とした。

UV照射線量の増加に伴う相対感染力の変化をFig. 3に示す。UV非照射オーシストのID(1 MPN 発現オーシスト数)は、塩素濃度 1,000 mg/L で 26 個、塩素濃度 5,000 mg/L で 41 個であった。1回の同時試験結果ではあるが、塩素濃度 5,000 mg/L のときのIDは 1,000 mg/L の 1.6 倍であったことは、塩素濃度が高いほどオーシストの感染力が低下する可能性を示唆していると考えられる。

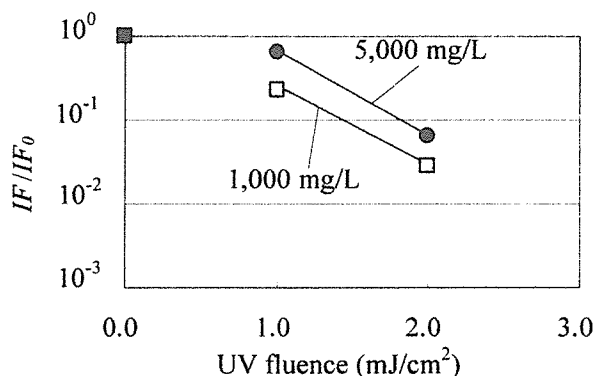


Figure 3 Effect of chlorine pretreatment on cell infectivity of UV irradiated oocysts

UVを照射したオーシストの細胞感染性は、塩素濃度 5,000, 1,000 mg/L のいずれでも、UV照射線量の増加に伴って感染力が同じように低下し、 $2 \log_{10}$ 不活化線量は、塩素濃度 5,000 mg/L で 2.8 mJ/cm²、塩素濃度 1,000 mg/L で 2.5 mJ/cm²で、両者に顕著な差異は認められなかった。脱嚢率は、4回の繰り返し試験(2条件同時試験)で、1,000 mg/L で 84% (CV: 12%)、5,000 mg/L で 90% (CV: 5.6%)であり、有意差が認められた。このことから、塩素濃度 5,000 mg/L はより脱嚢率が高く、その変動が少なかった。したがって、濃度 5,000 mg/L の塩素処理は、オーシストの感染性に若干影響するものの、UVの不活化効果は、塩素処理した非照射オーシストと照射オーシストの感染力の相対値で評価するので、前処理としての塩素処理による不活化効果は相殺され则认为される。

この塩素処理条件は、Upton *et al.* (1994b)の前処理方法(0.525%次亜塩素酸ナトリウム、氷上、10 min)やSlifko *et al.* (1999)の方法(0.525%次亜塩素酸ナトリウム、氷上、5~8 min)とは暴露条件が若干異なるが、塩素濃度はほぼ同等である。

(6) 細胞感染性試験方法

細胞培養法では、オーシストの脱能率を高めること、挟雑する他の微生物を極力排除あるいは不活化することが必要である。これを達成するためのオーシスト前処理方法として一部で塩素が用いられているが、塩素自体にもクリプトスポリジウムの感染性を低下させる能力があることが知られている。したがって、前処理に塩素を用いる場合、その影響を明らかにしておく必要がある。また、可能であれば、クリプトスポリジウムの感染性に影響を及ぼさない方法が望ましい。そこで本研究では、抗生物質による方法、抗生物質と酸処理を併用する方法を塩素による方法と比較した。その結果、脱嚢率、定量性、再現性、検出感度のいずれの点においても、塩素を用いる方法が他の2つ

の方法と同等か、より優れていた。その結果、現時点では、前処理は塩素に頼らざるを得ないと判断された。塩素を用いることにより最終結果には前処理段階における塩素の不活化効果加わることになるが、感染力の相対的な変化にまでは有意な影響が及ばないことが強く示唆された。

なお、最終的に得られた細胞感染性試験方法は Figure 4 のとおりである。

D 結論

本研究では、HNJ-1 株の *C. parvum* オーシストの HCT-8 細胞感染性試験における前処理方法について検討し、塩素による前処理（塩素濃度 5,000 mg/L, 5 min, 4°C）は、感染力へ若干影響をあたえるが、微生物汚染の防止効果と脱嚢誘発効果があり、相対感染力を評価するには有用な前処理方法であることを明らかにすることができた。

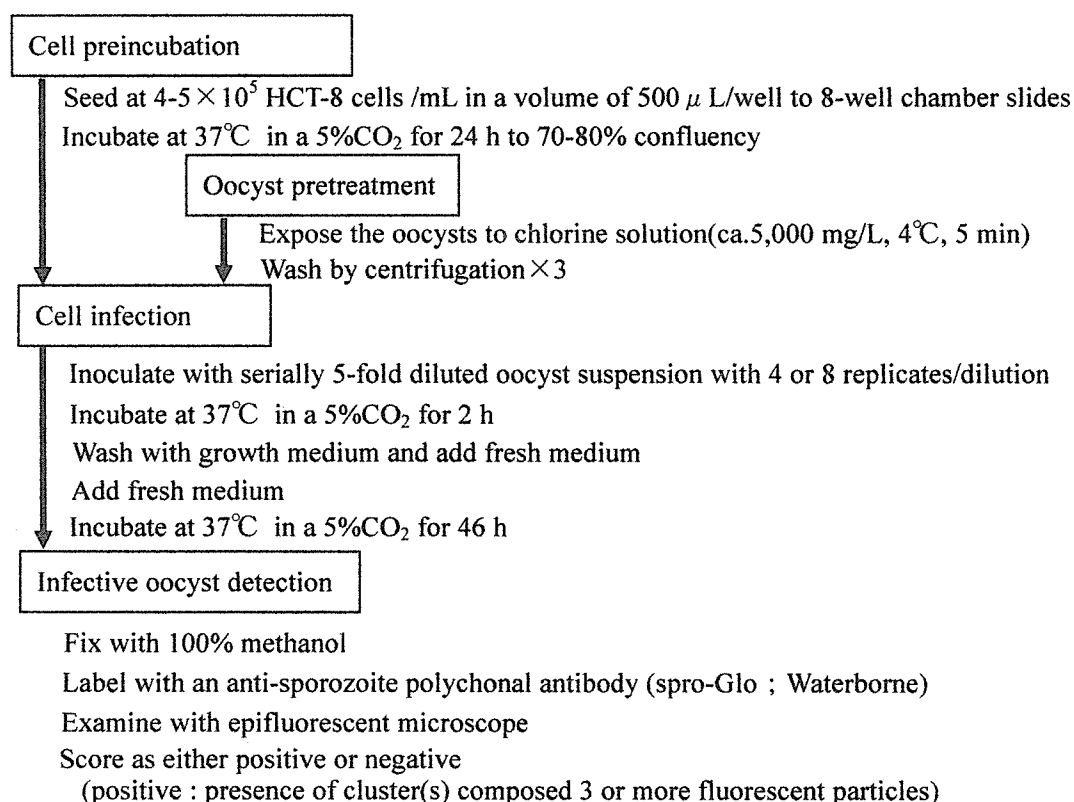


Figure 4 Procedure for cell culture infectivity assay

E 参考文献

Craik S.A., Weldon D., Finch G. R., Bolton J. R. and Belosevic M.(2001) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium-and low-pressure ultraviolet radiation, *Water Research*, 5(6), 1387-1398

Current W. L. and Reese N. C. (1986) A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice, *Journal of Protozoology*, 33 (1),

- Fayer R. and Unfar B. L. P. (1986) *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis, *Microbiological Reviews*, 50 (4), 458-483
- Hanawalt P. C., Cooper P. K., Ganesan A. K. and Smith C. A. (1979) DNA repair in bacteria and mammalian cells, *Annual Review of Biochemistry*, 48, 783-836
- Hurley M. A. and Roscoe M. E. (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 159-164
- Landis H. E., Thomapson J. E., Robinson J. P. and Blatchley E. R. III. (2000) Inactivation responses of *Cryptosporidium parvum* to UV radiation and Gamma radiation, *Proc. AWWA Water Quality Technology Conference*, 2000, 4-1, 1247-1265
- Morita S., Namikoshi A., Hirata T., Oguma K., Katayama H., Ohgaki S., Motoyama N. and Fujiwara M. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Applied and Environment Microbiology*, 68(11), 5387-5393
- Oguma K., Katayama H., Mitani H., Morita S., Hirata T. and Ohgaki S. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), 4630-4637
- Owens J. H., Milter R. J., Slifko T. R. and Rose J. B. (1999) In vitro excystation and infectivity in mice and cell culture to assess chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium* oocysts, *Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference*, 1999 (4), TU12.4.1-TU.12.4.10
- 小澤克行, 竹馬大介, 平田強 (1999) 脱嚢法と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
- Ransome M. E., Whithmore T. N. and Carrington E. G. (1993) Effects of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*, *Water Supply*, 11, 75-89
- Rasmussen K. R., Larsen N. C. and Healey M. C. (1993) Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line, *Infection and Immunity*, 61 (4), 1482-1485
- Rosales M. J., Cifuentes J. and Mascaro C. (1993) *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells, *Experimental Parasitology*, 76, 209-212
- 志村有道, 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
- Shin G. A., Linden K. G., Arrowood M. and Sobsey M. D. (2001) Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Applied and Environment Microbiology*, 67 (7), 3029-3032
- Slifko T. R., Huffman D. E. and Rose J. B. (1999) A most-probable-number assay for

- enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts, , *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9), 3936-3941
- Slifko T.R., Friedman D., Rose J.B. and Jakubowski W. (1997) An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 3 (9), 3669-3675
- Upton S. J., Tilley M. and Brillhart D. B. (1994a) Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines, *FEMS. Microbiology Letters*, 118, 233-236
- Upton S. J., Tilley M. and Brillhart D. B. (1994b) Comparative development of *Cryptosporidium parvum* in MDCK and HCT-8 cells under select atmospheres, *Biomedical Letters*, 49, 265-271
- Upton S. J., Tilley M. and Brillhart D. B. (1995) Effects of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells, *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (2), 371-375