

20030368 A

厚生労働科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

『健全な水循環を考慮した感染性微生物対策に関する研究』

平成 15 年度

総 括 報 告 書

平成 16 年 3 月

主任研究者 金子 光美 (摂南大学)

目 次

1. はじめに	i
2. 委員会	ii
3. 研究計画	ii
(1) 研究計画	ii
4. 研究の概要	iii
(1) 紫外線照射における <i>Giardia</i> の光回復と濁質による影響	iii
(2) 紫外線による <i>Cryptosporidium parvum</i> の不活化	iii
(3) 海外文献の収集	iv
(4) 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発	iv
第1編 紫外線照射による <i>Eimeria</i> および <i>Entamoeba</i> の不活化	
1. 研究目的	1
2. 研究方法	2
2. 1 赤痢アメーバ (<i>Entamoeba histolytica</i>)	2
2. 2 アイメリア (<i>Eimeria acervulina</i>)	2
2. 3 紫外線照射試験	2
2. 4 寄生虫卵の自家蛍光観察	2
3. 結果及び考察	3
3. 1 <i>Entamoeba</i> 栄養体に対する紫外線照射の増殖阻害効果	3
3. 2 <i>Eimeria</i> 嚢子の投与量と排出量の相関	3
3. 3 紫外線照射後の <i>Eimeria</i> 嚢子を用いたトリ感染実験	4
3. 4 各種寄生虫卵の外界での発育と自家蛍光	4
4. 結論	5
第2編 クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化	
概要	10
UV を照射したクリプトスポリジウムオーシストにおける DNA レベルの明・暗回復	
1. 研究目的	11
2. 研究方法	11
2. 1 供試 <i>C. parvum</i> オーシスト	11
2. 2 紫外線照射	11
2. 3 光回復処理	11
2. 4 暗回復処理	11

2. 5	ESS 法	12
3.	結果及び考察	12
3. 1	紫外線照射線量と生成 ESS 数の関係	12
3. 2	ESS の光回復	13
3. 3	ESS の暗回復	15
4.	結論	16

2-2 クリプトスポリジウムオーシストの紫外線による不活化に及ぼす共存物質の影響

1.	研究目的	18
2.	研究方法	18
2. 1	供試オーシスト	18
2. 2	濁質/オーシスト懸濁液の調製	18
2. 3	紫外線照射	19
2. 4	マウス感染試験	19
2. 5	脱嚢試験	19
3.	結果及び考察	19
3. 1	フミン/オーシスト混在系	19
3. 2	カオリン/オーシスト混在系	21
4.	結論	23

第3編 紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査

1.	はじめに	25
2.	平成 15 年に入手した文献リスト	26
3.	文献のジャンル別分類	27

第4編 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発

1.	研究目的	35
2.	実験設備	35
2. 1	実験原水	35
2. 2	実験プラント	36
2. 3	急速ろ過塔のろ層条件	37
3.	凝集沈殿処理における凝集操作条件の比較検討実験	38
3. 1	検討凝集剤と検討項目	38
3. 2	実験条件	38
3. 3	実験結果と考察	39
4.	急速ろ過処理性の改善に関する実験検討	44

4. 1 検討操作と検討項目	44
4. 2 実験条件	45
4. 3 実験結果と考察	47
5. 急速ろ過処理性の改善に関する実験検討	63
6. 平成 16 年度の課題	64

参考資料

本研究に御尽力・御協力頂いた関係者名簿

1. はじめに

近年、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、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を引き起こされる可能性を含んでいる。厚生労働省では、このような状況を鑑み、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、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、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「紫外線照射による *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化」、第2編「クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化」、第3編「海外文献の収集」、第4編「凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発」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、*Eimeria* および *Entamoeba* の紫外線による不活化を検討し、実験結果をまとめた。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、海外における紫外線による原虫類研究成果に関して、不活化照射線量等の情報収集を行った。第4編では開発した代替トレーサーを用い、各凝集剤による凝集沈殿、急速ろ過の各工程における除去性について検討を行った。

2. 委員会

本研究は、下記の3人の分担研究者と共に実施した。

藤原 正弘(財団法人水道技術研究センター 理事長)

平田 強 (学校法人 麻布大学環境保健学部 教授)

遠藤 卓郎(国立感染症研究所寄生動物部 部長)

また、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 部長
委員	国包 章一	国立保健医療科学院水道工学部長
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健康環境科学科教授
委員	眞柄 泰基	北海道大学大学院工学研究科教授
委員	篠 武夫	横浜市水道局浄水部長

3. 研究計画

(1) 研究計画

平成15年度は、微生物の紫外線による不活化技術の開発及び凝集沈澱・急速ろ過における各凝集剤による除去効果の確認等を目的として、以下の4つのテーマについて研究を行った。

1) 紫外線照射における *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化

本研究は、紫外線による *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化実験を行った。本研究は感染性のある微生物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、同研究室の泉山信司様、大阪府立大学の笹井和美様他、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) クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化

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、同研究室の森田重光様他、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。

3) 海外文献の収集

海外における紫外線による原虫類研究成果に関して、不活化照射線量等の情報収集を行った。

4) 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発

本研究は横浜市西谷浄水場の原水に粒径、比重、ゼータ電位をクリプトスポリジウムと類似させた PMMA(ポリメチルメタアクリレート)製の代替粒子を実プラントで用いて、凝集沈殿ろ過の除去性能を評価した。

4. 研究の概要

(1) 紫外線照射における *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化

クリプトスポリジウムと分類学的に近縁であるが紫外線暴露に対し防御機能を有することが想定される孢子虫類のオーシストを用いて紫外線感受性を検討した。本研究ではヒトに感染しないが、紫外線抵抗性を示し、実験モデルとして

取り扱いが比較的容易と考えられる *Eimeria* を用いて評価を行った。評価では紫外線照射した *Eimeria acervulina* の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。投与嚢子数と排出嚢子数の関係を表す検量線を作成し、紫外線照射後の嚢子を投与したトリから一定の期間排出されたオーシスト数を計数することにより消毒の効果を評価した。この実験系による評価の結果、 $8\text{mJ}/\text{cm}^2$ で 2-log 程度の嚢子の不活化効果が得られた。*Entamoeba histolytica* 栄養体への紫外線照射実験を行い、培養でその効果を判定したところ、 $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ で 3-log 程度の生育阻止効果が得られた。紫外線の *Entamoeba* に対する不活化効果は *Cryptosporidium*、*Giardia* と同等と考えられたが、*Eimeria* に対する効果は低く、2-log の嚢子を不活化するのに必要な線量は *Cryptosporidium*、*Giardia* の 8 倍に相当した。併せて各種虫卵の自家蛍光の有無について考察を行った。

(2) クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化

ピリミジン二量体の生成数は紫外線照射線量にほぼ比例して増加し、それらのピリミジン二量体は、光回復、暗回復のいずれのプロセスでも容易に修復された。光回復処理では、修復されずに残存する二量体数が、処理前の二量体数に関係なく、ほぼ一定となる傾向が認められた。その一定値を超える数のピリミジン二量体が生成されている場合は、その超過分に相当する数の ESS が修復された。暗回復では、紫外線照射線量が $0\sim 3\text{mJ}/\text{cm}^2$ の間では、修復された二量体の数が暗回復処理前の二量体の数に依存し、紫外線照射線量の多いものほど、修復される二量体数が多くなる傾向が認められた。しかし、紫外線照射線量が $3\text{mJ}/\text{cm}^2$ を超えると増加傾向がなくなり、修復される二量体の数がほぼ一定値となった。暗回復プロセスで修復できる二量体の数に上限があって一定値となったのか、暗回復プロセスが 24 時間では完了していな

いのか、更に検討する必要がある。

また、クリプトスポリジウムオーシストへの付着性が高いフミンとカオリンを選んで、その共存の影響をマウス感染試験および脱嚢試験で評価した。その結果、フミンがオーシスト壁に付着した系では付着していない系に比べて不活化力が低下する傾向があるが、その程度は小さく、不活化 log 数で約 20%程度の低下であり、カオリンでもオーシスト壁に付着すると不活化力が小さくなる傾向が認められたが、不活化 log 数の低下はフミンの場合よりも更に小さく、約 10%程度である。

(3) 海外文献の収集

原虫類の紫外線による不活化に関して、計 24 編の海外文献の要約を行い、低圧・中圧ランプによる原虫類の不活化、光回復・暗回復、紫外線照射装置の性能予測モデルに関して知見を得、原虫類の紫外線による不活化を評価する際に、微生物にどれだけの紫外線量が有効に照射されるか、という性能検証を精度良く行う必要がある、と思われる。

(4) 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

凝集沈澱及び急速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、凝集沈澱工程における塩化第二鉄および有機高分子凝集剤による除去性能確認実験を行った。その結果、主に以下の知見を得ることができた。

凝集操作条件の比較検討

- ①西谷浄水場の実注入率と同量の凝集剤注入率では、凝集沈澱処理で約 1.3 log 程度のクリプトスポリジウム代替粒子除去率であったが、凝集剤注入率を増加させるほど除去率は向上し、実注入率の 120 %では 1.6 log、200 %では 2.0 log 程度の除去率が期待されることが分かった。
- ②凝集 pH と沈澱処理性の関係では、凝集剤注入率ほどの差は認められなかったものの、実験条件の範囲内では低 pH ほど除去率が向上する傾向が認められた。pH=7.7 と 6.3 では、クリプトスポリジウム代替粒子除去率で 0.3 log 程度の差が認められた。
- ③急速混和池攪拌強度と沈澱処理性の関係では、G 値=300>200>500 の順でクリプトスポリジウム代替粒子除去率が高くなった。

未ろ水への凝集剤添加の検討

- ①単層、複層とも、濁度および粒子数については再凝集によるろ過処理性の改善効果が認められた。その効果は凝集剤注入率が高いほど大きく、ろ過開始 24 時間後のろ過水濁度では再凝集を行わない場合と比較して、1 mg/L の注入率で 80 %以上の低減効果が認められた。クリプトスポリジウム代替粒子でも、特に複層ろ過の場合で同様の低減効果が認められた。
- ②この時のろ層の損失水頭に注目すると、再凝集剤注入率 3 mg/L の時、24 時間後には単層で 1600 mm に達したが、複層ではろ過速度が大きいにもかかわらず 1000 mm 程度にとどまり、複層ろ層がろ過池の効率的な運用面で有利であることが示された。

逆洗水への凝集剤添加の検討

ろ過開始直後における粒子の初期流出に注目し、逆洗水への凝集剤添加の効果を検証したところ、以下のような結果が得られた。

- ①単層、複層とも、クリプトスポリジウム代替粒子の流出抑制効果が顕著に現れた。特に、複層では初期流出のピークが全く現れず、ろ過継続後と同等の数値がろ過開始直後から維持された。
- ②一方、濁度を指標とした場合には、初期流出時間を短縮し、その後のろ過水濁度を改善する効果は認められるものの、ピークをカットするには至らなかった。

第1編

紫外線照射による *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化

紫外線照射による *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化

分担研究者 遠藤卓郎 (国立感染症研究所)

協力研究者 泉山信司 (国立感染症研究所)

協力研究者 笹井和美 (大阪府立大学)

概要

当該研究では、紫外線による耐塩素性微生物対策の有用性について検討している。すでに、*Giardia* 嚢子および、*Cryptosporidium* 嚢子は紫外線への感受性が高く、極めて低線量で不活化され、生命体としての光/暗回復が確認できないことが示されている。これは、むしろ例外的と考えるべきで、各種生物はそれぞれに光/暗回復機能を含めた防御機構を備えている。今年度はクリプトスポリジウムと分類学的に近縁であるが紫外線暴露に対し防御機能を有することが想定される孢子虫類のオーシストを用いて紫外線感受性を検討した。本研究ではヒトに感染しないが、紫外線抵抗性を示し、実験モデルとして取り扱いが比較的容易と考えられる *Eimeria* を用いて評価を行った。評価では紫外線照射した *Eimeria acervulina* の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。投与嚢子数と排出嚢子数の関係を表す検量線を作成し、紫外線照射後の嚢子を投与したトリから一定の期間排出されたオーシスト数を計数することにより消毒の効果を評価した。この実験系による評価の結果、 $8\text{mJ}/\text{cm}^2$ で 2-log 程度の嚢子の不活化効果が得られた。*Entamoeba histolytica* 栄養体への紫外線照射実験を行い、培養でその効果を判定したところ、 $2\text{mJ}/\text{cm}^2$ で 3-log 程度の生育阻止効果が得られた。紫外線の *Entamoeba* に対する不活化効果は *Cryptosporidium*、*Giardia* と同等と考えられたが、*Eimeria* に対する効果は低く、2-log の嚢子を不活化するのに必要な線量は *Cryptosporidium*、*Giardia* の 8 倍に相当した。併せて各種虫卵の自家蛍光の有無について考察を行った。微生物の不活化手段としての紫外線の照射線量の検討には慎重を期す必要があることが指摘される。

1. 研究目的

紫外線による耐塩素性病原微生物の不活化は飲料水の安全性確保に向けた新たな消毒処理の 1 つとして検討されている。これまでの研究により *Cryptosporidium* ならびに *Giardia* 嚢子は他の生物に比べて低線量で不活化が達成可能であることが示されている(平成 14 年報告書)。紫外線による不活化において問題となる点として、紫外線に抵抗性を示す原虫が存在する可能性が指摘されており(平成 15 年報告書)、他の原虫類を対象とした紫外線照射実験を行った。

紫外線照射を受けた *Eimeria acervulina* 嚢子の発育は $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ の紫外線照射で嚢子の発育が 2-log 程度阻止されることがこれまでの実験で示されており、本研究では *E. acervulina* 嚢子に対する紫外線照射とトリへの感染実験を実施した。

上述したように *Cryptosporidium*、*Giardia* 嚢子は紫外線に高い感受性を示すとの結果が得られているが、*Eimeria* ならびに *Toxoplasma* は紫外線に抵抗を示す可能性が示唆されている。後者の原虫類のオーシスト壁は紫外線照射により自家蛍光を発することが観察されており、当該研究では自家蛍光と

紫外線抵抗性の関係について考察を行った。併せて、自家蛍光のない原虫として新しく *Entamoeba histolytica* 栄養体に対する紫外線の消毒効果について検討を行った。

2. 研究方法

2. 1赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)

赤痢アメーバの栄養体は試験管培養で継代されている *E. histolytica* HM-1:IMSS cl-6 株を用いた (Diamond ら、1972)。培養液は BI-S-33 培地を使用した (Diamond ら、1978)。培養液中の栄養体を滅菌 10mM リン酸緩衝液 (pH7.4、以下 PBS) で 2 回遠心洗浄後に 10ml の PBS に 10^3 ないし 10^4 /ml となるよう再浮遊し、紫外線照射実験に供した。照射後の栄養体は 15 分間氷上に静置した後に 15mL 遠心管に入れ、遠心濃縮した。栄養体増殖能の検定は試験管培養で行い、紫外線照射後に生残した栄養体の定量は MPN 法を採用した。試験の手技ならびに MPN の計算は、*Giardia* の培養評価法に準じて行った (平成 14 年度報告書)。

2. 2アイメリア(*Eimeria acervulina*)

Eimeria 嚢子は感染ニワトリの糞便より、飽和食塩水浮遊法を用いて精製した。紫外線照射に用いた嚢子は 30℃ で 48~60 時間培養した後の成熟嚢子を用いた。嚢子は 10mL の滅菌脱イオン水に 10^5 /ml の濃度で懸濁し、紫外線照射実験に供した。照射後の嚢子はシリンジを用いて 1ml の懸濁液としてニワトリに投与した。投与時の濃度は 10^4 /ml および 10^5 /ml の 2 段階とした。トリは 1 ケージに 3 羽ずつ入れ、同じ照射線量かつ同じ希釈段階の嚢子を 2 ケージのトリに投与した。嚢子の排出がピークとなる投与後 4~8 日の期間に糞便を回収し、嚢子の排出数を求めた。トリの飼育ケージは糞便の回収機構を有し、かつ食糞の防止措置が施されたケージ (武田薬品) を使用した。1 つのケージに 3 羽のトリを入れて飼育したが、トリ間の感染が防がれており、飼育形態は測定結果に影響しないものと考えた。糞便は 3 羽分が混合されており、期間中の 1 羽あたりの嚢子排出数を平均として算出した。

嚢子排出数は改良型 McMaster 算定盤を用いて顕微鏡下で求めた。手順は以下の通りである。糞便の総重量を測定した後に糞便をよく攪拌し、3 本の 50ml 試験管に 10 ないし 20g ずつ糞便を分取した。分取した糞便は 30℃ で 48~60 時間培養した後、4℃ で保存した。保存した糞便は脱イオン水で最終液量を 40ml に調整し、十分に懸濁した。懸濁後に 180 μ l を 820 μ l の飽和食塩水と混合してから 150 μ m のフィルターでろ過した。ろ過液をよく混合し、算定盤に十分量のろ過液を入れ、3 分以上静置した。100 倍の倍率で明視野観察を行い、嚢子を計数した。計数を容易にする目的でコンデンサーを意図的に下げる、あるいは紫外線励起による自家蛍光の観察を補助的に適用した。最終的に、計数値、希釈率、糞便量等より 1 羽あたりの嚢子排出数を求めた。

2. 3紫外線照射試験

紫外線ランプは極大波長が 254 nm の 5 W 低圧水銀ランプ (ニッポ電機) を 2 本用いた。クランプで固定したランプの直下約 40cm に浮遊液 10mL を入れた 60 \times 15 mm シャーレ (Corning430166) を置き (水層: 4.7 mm)、0.10mW/cm² の強度で所定の線量を照射した。照射線量測定には紫外線積算光量計 UIT-150-A +UVD-S254 (ウシオ電機) を使用した。

2. 4寄生虫卵の自家蛍光観察

寄生虫卵はホルマリン固定された以下の試料を用いた。*Taenia taeniaformis*(ネコ条虫)、*Ascaris suum*(ブタ回虫)、*Schistosoma japonicum*(日本住血吸虫)、*Clonorchis sinensis*(肝吸虫)。蛍光顕微鏡は Axiophoto2 (Zeiss)を用いた。蛍光フィルターは紫外線励起フィルター (02UV フィルター、G365:FT395:LP420)、青色光励起フィルター (09B フィルター、BP450-490:FT510:LP520)、緑色光励起フィルター (15G フィルター、BP546/12:FT580:LP590)を用いた。写真撮影は D1X デジタルカメラ (Nikon)を用いた。いずれの試料も無染色で観察を実施した。

倫理面への配慮

動物実験は動物愛護上の問題が生じないよう、国立感染症研究所動物実験委員会ならびに大阪府立大学動物実験委員会の指導のもとで行った。

3. 結果及び考察

3.1 *Entamoeba* 栄養体に対する紫外線照射の増殖阻害効果

照射紫外線強度 0.10 mW/cm²、室温の条件で赤痢アメーバの栄養体に対して紫外線照射を行った。効果の判定は赤痢アメーバの増殖能を指標とし、結果は図-1 に示した。赤痢アメーバの栄養体は、紫外線照射に対して感受性が高く、照射線量と増殖阻害効果との間には強い相関関係が見られた。具体的には、紫外線の阻害効果は 0.5 mJ/cm² (=0.5 mW・sec/cm²) ですでに認められ、1.0 mJ/cm² では 1-log 以上の増殖阻害が認められた。また、2.0 mJ/cm² の照射では 3-log 程度の増殖阻害効果が観察された。不活化の効果は *Giardia* 嚢子ならびに *Cryptosporidium* 嚢子と同程度であると考えられた (平成 14 年度報告書)。この赤痢アメーバの増殖を阻害した照射条件はバイオセンサーとして紫外線照射効果の実験に常用される枯草菌に対してはほとんど増殖阻害効果が認められない線量であり (平成 14 年度報告書)、赤痢アメーバ栄養体は紫外線に対して感受性が高いことが示された。

この実験では赤痢アメーバの環境型である嚢子ではなく、栄養体を用いて実験していることから、今後は嚢子を用いた実験が望ましいと考えられる。しかしながら、赤痢アメーバの嚢子は入手が困難であることから、感染動物からの嚢子の取得、代替アメーバのシストでの実験、あるいはヒトアメーバ症患者の糞便からシストを精製する等の手段を検討する必要がある。

Cryptosporidium ならびに *Giardia* では光回復現象が見られていないが、赤痢アメーバにおける回復現象の有無については今後の研究に待たれる。

3.2 *Eimeria* 嚢子の投与量と排出量の相関

紫外線に対する抵抗性が強い原虫の存在が示唆されていたことから、本研究では *Cryptosporidium* に近縁な孢子虫類に属する *E. acervulina* 嚢子を用いて紫外線消毒効果の検討を行った。嚢子の発育を指標とした試験では 8mJ/cm² で 1-log 程度、12mJ/cm² で 2-log 程度の不活化がこれまでに得られていた (平成 15 年度報告書)。本研究では発育した *E. acervulina* 嚢子に対して紫外線を照射し、照射後の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。本研究では動物から排出される嚢子数と投与嚢子数から得られる検量線を用いて、生残した嚢子数を求めた。これにより必要な動物数は最小限に抑えることが可能であった。

検量線の作成では、トリに対して 10^2 から 10^5 の嚢子を投与し、糞便中に排出された嚢子数を McMaster 算定盤を用いて計数した。投与した嚢子数と排出された嚢子数の間に十分な相関が成り立ち、 $Y=1.26 \times 10^5 \times X^{0.13}$ の式で表され、このときの X は嚢子投与量(Log)、 Y は嚢子排出数に対応する(図・2)。相関係数(R^2)は 0.990 であった。腸管で生成可能な嚢子数には限度があり、嚢子投与量が過剰であれば排出数は頭打ちとなる。一方、嚢子投与量が少ない場合は今回の検量線では測定を行っていないことから、排出数は不明である。いずれの場合であっても、得られた式を元に測定範囲外を予測するのは困難であると考えられ、この図示した検量線の範囲内で実験を行うこととした。

3. 3紫外線照射後の *Eimeria* 嚢子を用いたトリ感染実験

照射紫外線強度 0.10 mW/cm^2 、室温の条件で *Eimeria* 嚢子に対して紫外線照射を行った。効果の判定は感染トリからの嚢子の排出数を指標とし、先に求めた検量線より照射後に生残した嚢子数を求め、紫外線による不活化の効果を図・3 に示した。実験は 2 回行い、それぞれの結果を同時に図に示している。

紫外線の阻害効果は 4 mJ/cm^2 で 1-log 近く、 8 mJ/cm^2 では 2-log 程度の不活化効果が観察された。 12 mJ/cm^2 付近の照射では 3-log 程度の不活化効果が観察されたが、この照射条件では嚢子の排出数が図・2 の検量線の範囲外であったことから、この値は参考程度として捉えるものである。なお、今回の実験では照射後速やかにトリへの投与を行っており、損傷 DNA の光/暗回復を一切行っておらず、光/暗回復実験を行う必要がある。

2-log の不活化に必要な線量は *Cryptosporidium*、*Giardia* の 8 倍に相当しており、不活化の効果は *Giardia* 嚢子、*Cryptosporidium* 嚢子等に比べて低いと考えられた。すなわち、分類学上 *Cryptosporidium* と近縁関係にある *E. acervulina* は明らかに感受性が低く、紫外線に強い抵抗性を示すものと判断された。今後はヒトに感染する *Isospora*、*Cyclospora* 等の他の原虫類に検討対象を広げ、紫外線を用いた飲料水の消毒に必要な線量ならびに、照射条件等々の検討を行う必要があるものと考えている。

3. 4各種寄生虫卵の外界での発育と自家蛍光

寄生虫類の虫卵は種類によって宿主外での発育を必要とし、その間は紫外線に暴露される期間となる。虫卵によっては高性能の対紫外線防御機構を有するものと想像され、損傷 DNA を修復する回復酵素や紫外線吸収物質の存在が予想される。本研究では虫卵の自家蛍光に焦点をあてて各種虫卵の観察を行い、紫外線吸収物質として機能している可能性について考察した。

虫卵の微分干渉観察像と対応する蛍光観察像を図・4 に示した。紫外線の励起下で観察した結果、*Eimeria*、*Cyclospora*、*Ascaris* のオーシスト壁あるいは卵殻から青い自家蛍光を観察した(図・4B、D、F)。青色光励起で観察した結果、*Schistosoma japonicum*、*Clonorchis sinensis*、*Taenia taeniaformis* から黄色自家蛍光を観察した(図・4J、L、O)。*Ascaris* のタンパク膜は紫外光励起で黄色自家蛍光を発した(図・4H)。*T. taeniaformis* は紫外光励起で黄色自家蛍光を発した(図・4P)。紫外光励起で黄色自家蛍光が観察されるのは、用いている観察用蛍光フィルターが長波長側の光を透過するロングパスフィルターを使用していることによるもので、実際に紫外光の励起で黄色蛍光を発していることを示している。*T. taeniaformis* は緑色光励起で赤い自家蛍光を発した(図・4N)。ここで紫外励起に用いた光は高圧水銀ランプから発した 360 nm 付近の UV-A 領域の紫外光である。消毒で用いている 254 nm

の UV-C に比較すれば UV-A 領域の紫外光は核酸を損傷する効果は少ないが、現実では UV-A 領域の紫外光が最も多く地上に到達している波長域である。

以上の観察結果を受けて、外界での発育の必要性、自家蛍光の有無を基準に各種虫卵を分類し、表 1 にまとめた。*Eimeria*、*Isospora*、*Cyclospora*、*Toxoplasma* 等原虫は紫外線で励起されると青い蛍光を発した。これらは排出直後の嚢子は未成熟で、感染には外界での発育を必要とする。一方の *Cryptosporidium*、*Giardia*、*Entamoeba* では自家蛍光は観察されず（図は省略）、外界に排出された時点で既に感染性を有しており、発育の必要はない。ここで紫外線に対する感受性に着目すると、前者の自家蛍光を有するグループは紫外線に抵抗を示し（一部未確認であり、今後の検討が必要）、後者のグループは紫外線で容易に不活化される特徴を有している。外界での発育の必要性、自家蛍光の有無、そして紫外線感受性の特徴が 2 つのグループ間でよく揃っており、偶然とは考えにくい。前者のグループでは、自家蛍光は紫外線励起による青い光として観察されており、この蛍光を発する物質が紫外線吸収物質としての役割を有していることが示唆されるが、その寄与の程度は不明であり、今後の検討が必要である。ちなみに、寄生虫卵の多くは外界での発育を必要とし、蛍光顕微鏡で観察すると何らかの蛍光を発する場合が多い（図 4）。これらの蛍光の生物学的な意義は不明であるが、紫外光を効率よく吸収するか否かについて検討する価値があるものと考えられる。わが国の浄水処理では、寄生虫卵による汚染が問題となることはすでになく、その意味から紫外線消毒に関する検討を必要としないが、原虫類の紫外線防御機構に関連する情報が得られる可能性が期待される。原虫以外の寄生虫卵に関する検討も併せて行う予定である。紫外線に対する防御メカニズムをより詳細に明らかにしていくことが、紫外線消毒の有効性の評価につながると考えられる。

紫外線消毒を利用するにあたり、*Cryptosporidium*、*Giardia* 等感受性の高い原虫だけではなく、他の原虫の評価を併せて行い、回復能力、照射に係る要件等を検討しておくことが、問題の発生を未然に防ぐ意味では重要である。本研究では紫外線の *E. histolytica* ならびに *E. acervulina* の紫外線に対する感受性の検討、および自家蛍光を有する虫卵に関して考察を行った。*Entamoeba* が *Cryptosporidium*、*Giardia* と同等の紫外線感受性を示したのに対して、*E. acervulina* が紫外線に抵抗性を示したのは対照的であった。本来、紫外線に抵抗する機構は生物があまねく保有する機能であり、*Cryptosporidium* や *Giardia* といった紫外線に対する感受性が高い生物は数少ないと考えられる。今回の実験結果で示されたように *Cryptosporidium* に近縁の *E. acervulina* において紫外線抵抗性を示したことは、低線量での紫外線消毒が危険であることを喚起していると言える。すなわち将来の紫外線抵抗性原虫の出現に備えるべきであり、ヒトに感染する他の原虫に対する紫外線消毒の効果を十分に検討しておく必要がある。ウイルス等では紫外線による消毒効果が期待できないものが既に知られており（Qianら、2004；USEPA、2003）、紫外線消毒はマルチプルバリアの 1 つとしての利用法を検討すべきである。物理的除去や塩素消毒等の処理は欠かすことは出来ず、紫外線消毒の適用に関しては慎重な対応が求められるものとする。

4. 結論

紫外線照射による *Entamoeba* の不活化は、*Cryptosporidium*、*Giardia* と同程度の効果が得られた。その一方で、*Eimeria* は紫外線に対して抵抗性を示し、紫外線耐性を有する微生物への注意が必要で

ある。紫外線抵抗性は自家蛍光との関連が示唆されており、紫外線による消毒の導入に際しては照射線量の適正化、照射条件などに関して科学的根拠の積み重ねが求められる。

参考文献

Diamond LS, Mattern CF, Bartgis IL. Viruses of *Entamoeba histolytica*. I. Identification of transmissible virus-like agents. *J Virol*. 1972 Feb;9(2):326-41. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1978;72(4):431-2.

Qian SS, Donnelly M, Schmelling DC, Messner M, Linden KG, Cotton C. Ultraviolet light inactivation of protozoa in drinking water: a Bayesian meta-analysis. *Water Res*. 2004 Jan;38(2):317-26.

USEPA、UV Disinfection Guidance Manual、2003

平成 14 年度報告書

平成 15 年度報告書

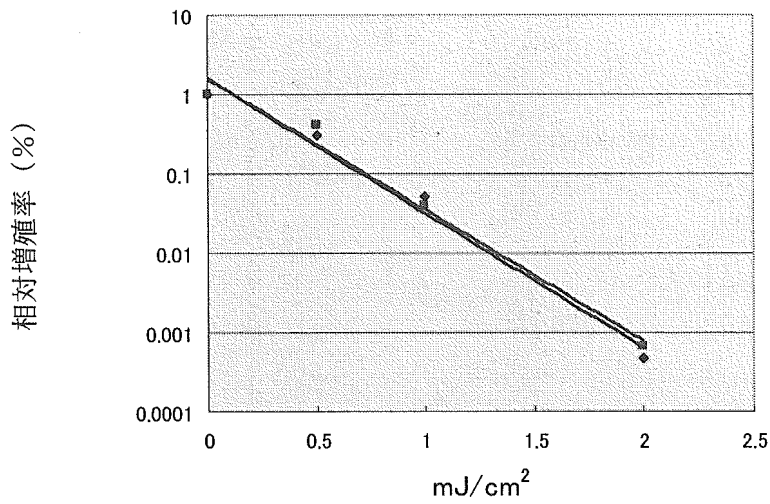


図-1 赤痢アメーバ栄養体に対する紫外線照射の増殖阻害効果

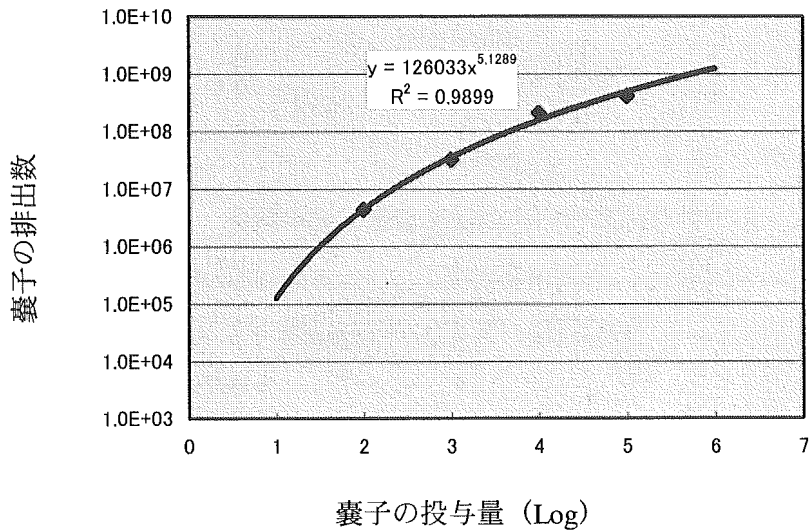


図-2 *Eimeria* 嚢子の投与量に対する嚢子の排出数

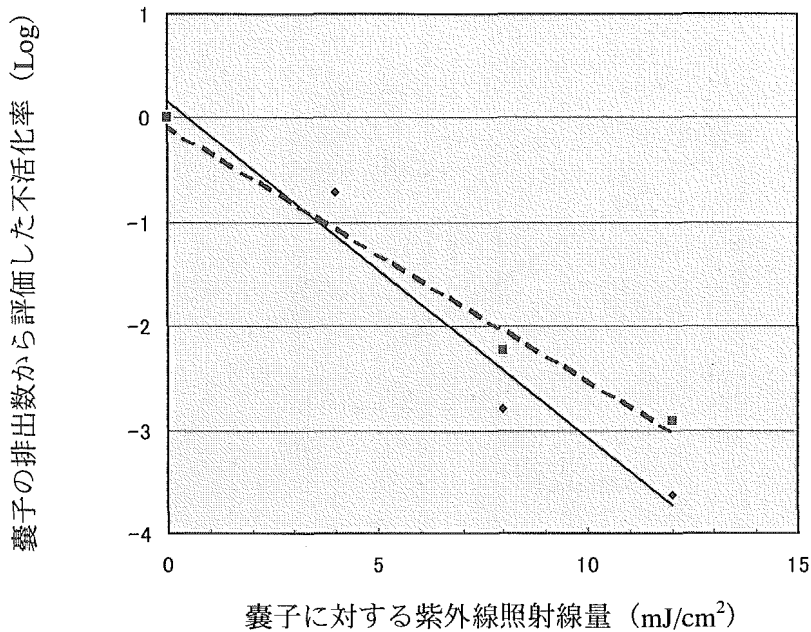


図-3 *Eimeria* 嚢子に対する紫外線の不活化効果

表-1 虫卵の外界発育の必要性と自家蛍光の関係

	自家蛍光あり		自家蛍光無し	
	外界での発育が必要	外界での発育が不要	外界での発育が必要	外界での発育が不要
原虫	<i>Eimeria</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	<i>Toxoplasma</i>		<i>Giardia</i>	
	<i>Cyclospora</i>		<i>Entamoeba</i>	
	<i>Isospora</i>			
条虫	<i>Taenia taeniaeformis</i> (ネコ条虫)			
線虫	<i>Ascaris suum</i> (ブタ回虫)			
吸虫	<i>Schistosoma japonicum</i> (日本住血吸虫)			
	<i>Clonorchis sinensis</i> (肝吸虫)			

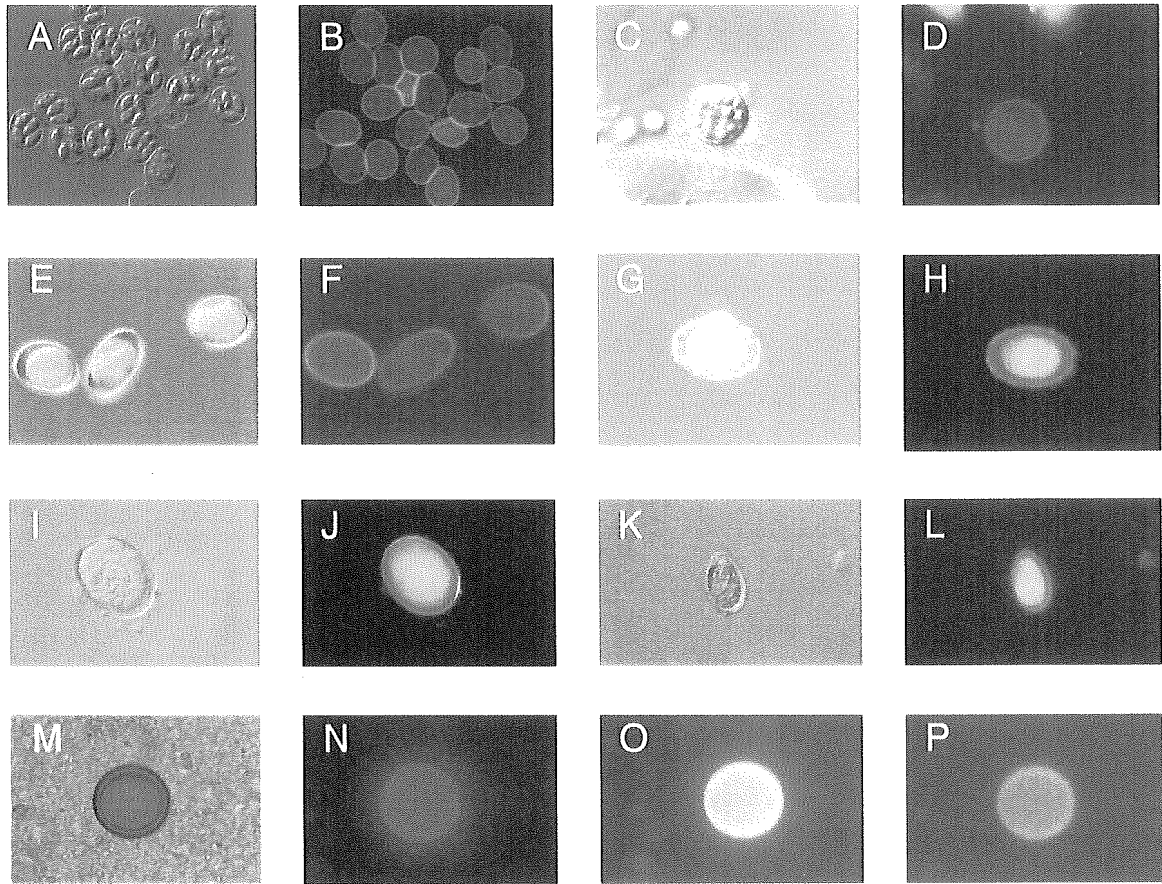


図-4 虫卵の自家蛍光

A: *Eimeria* (微分干渉像、以下 DIC)、B: *Eimeria* (紫外光励起蛍光像、以下 UV)、C: *Cyclospora* (DIC)、D: *Cyclospora* (UV)、E: *Ascaris suum* (DIC)、F: *Ascaris suum* (UV)、G: *Ascaris suum* タンパク膜付き (DIC)、H: *Ascaris suum* タンパク膜付き (UV)、I: *Schistosoma japonicum* (DIC)、J: *Schistosoma japonicum* (青色光励起蛍光像、以下 B)、K: *Clonorchis sinensis* (DIC)、L: *Clonorchis sinensis* (B)、M: *Taenia taeniaformis* (明視野観察像)、N: *Taenia taeniaformis* (緑色光励起蛍光像)、O: *Taenia taeniaformis* (B)、P: *Taenia taeniaformis* (UV)

第2編

クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化