

- 報告書、平成9年3月
- 6) 橋本 温、河井健作、西崎 綾、松本かおり、平田 強：相模川水系のクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染とその汚染指標の検討。水環境学会誌、22 (4) pp.282~287 (1999)
 - 7) 吉用省三、牧野芳大、帆足喜久雄：大分県主要2河川水系におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア汚染実態調査、水道協会雑誌、69 (10)、pp.11~16 (2000)
 - 8) 保坂三継、矢野一好、眞木俊夫：水道水並びに各種の環境水からの原虫類の検出状況 (平成11年度)、東京都立衛生研究所年報、51、pp.248~252 (2000)
 - 9) 中西正治、向井聖二、保尊とし子、田中一成、山本 稔、谷 雅章：淀川におけるクリプトスポリジウム及びジアルジアの水源調査、第52回全国水道研究発表会講演集、pp.558~559 (2001)
 - 10) 保坂三継、落合由嗣、矢野一好、眞木俊夫：多摩川におけるクリプトスポリジウムオーシストとジアルジアシストの汚染実態調査、用水と廃水、44 (4)、pp.295~303 (2002)
 - 11) 鈴木 稔、諏訪 守：下水道における病原性微生物への対応、月刊下水道、21 (10)、pp.6~9 (1998)
 - 12) Korich D G, Mead J R, Madore M S, Sinclair N A and Stering C R: Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. Appl. Environ. Microbiol., 56 (5), pp.1423~1428 (1990)
 - 13) Gyurek L L, Finch G R and Belosevic M: Modeling chlorine inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Jour. Environ. Eng., 9, pp.865~875 (1997)
 - 14) 志村有通、竹馬大介、森田重光、平田 強：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)、pp.26~33 (2001)
 - 15) Timms S, Slade J S and Fricker C R: Removal of *Cryptosporidium* by slow sand filtration. Wat. Sci. Technol., 31, pp.81~84 (1995)
 - 16) Schler P P, Ghosh M M and Boutron S N: Comparing the removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* using slow sand and diatomaceous earth filtration, Proc. AWWA Conf., pp.789~797 (1988)
 - 17) LeChevallier M W, Norton W D and Lee R G: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Appl. Environ. Microbiol., 57, pp.2610~2616 (1991)
 - 18) LeChevallier M W and Norton W D: *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. Jour. AWWA, 87 (9), pp.54~68 (1995)
 - 19) Nieminski E C and Ongerth J E: Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration, Jour. AWWA, 87 (9), pp.96~106 (1995)
 - 20) 厚生省水道環境部長通知：水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針、衛水第248号 (平成8年10月4日付け)
 - 21) Jacangero J G, Adham S S and Laine J M: Mechanism of *Cryptosporidium*, *Giardia* and MS2 virus removal by MF and UF. Jour. AWWA, 87, pp.107~121 (1995)
 - 22) Hirata T and Hashimoto A: Experimental assessment of the efficacy of microfiltration and ultrafiltration for *Cryptosporidium* removal, Wat. Sci. Technol., 38, pp.103~107 (1998)
 - 23) Drozd C and Schwartzbrod J: Removal of from river water by crossflow microfiltration: A pilot-scale study, Wat. Sci. Technol., 35 (11-12), pp.391~395 (1997)
 - 24) 神保吉次、小松賢作、後藤光亀、平田 強：原虫除去を目的とした大孔径膜ろ過システムの開発、水道協会雑誌 (投稿中)
 - 25) Haas C N, Crockett S S, Rose J B, Gerba C P and Fazil A M: Assessing the risk posed by oocysts in drinking water, Jour. AWWA, 88 (9), pp.131~136 (1996)
 - 26) 平田 強、木村憲司、保坂三継、猪又明子、伊与 亨、石橋良信、鈴木 稔、諏訪 守：原虫基準の検討結果、第4回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp.181~182 (2001)
 - 27) LeChevallier M W and Norton W D: Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity, Jour. AWWA, 84 (12), pp.54~60 (1992)
 - 28) Li S Y, Goodrich J A, Owens J H, Wiileke G E, Scafer II F W and Clark R M: Reliability of surrogates for determining *Cryptosporidium* removal, Jour. AWWA 89 (5), pp.90~99 (1997)

厚生労働科学研究費補助金

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16年度

総括報告書

平成17年3月

主任研究者 金子 光美 (立命館大学)

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) 原虫類の紫外線耐性	iii
(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	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 原虫類の紫外線耐性

概要	1
1. 研究目的	1
2. 研究方法	2
2. 1 <i>Cyclospora</i> (サイクロスポラ)	2
2. 2 紫外線照射試験	2
2. 3 オーシスト発育試験	2
2. 4 <i>Eimeria acervulina</i> (アイメリア)	3
3. 結果	3
4. 考察	4
5. 結論	4

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

2-1 低圧紫外線の照射によって <i>Cryptosporidium parvum</i> に生じた DNA 損傷の暗回復 要旨	9
1. はじめに	9
2. 材料と方法	10
2. 1 供試オーシスト	10
2. 2 紫外線ランプ	10
2. 3 紫外線照射線量率の測定方法	10
2. 4 紫外線照射	10
2. 5 暗回復処理	11
2. 6 ESS 法	11

3. 結果および考察	12
4. 結論	13
2-2 中圧紫外線による <i>Cryptosporidium parvum</i> HNJ-1 オーシストの不活化とDNA損傷の光回復・暗回復	
要旨	19
1. はじめに	19
2. 材料と方法	21
2.1 供試 <i>C. parvum</i> オーシスト	21
2.2 紫外線ランプ	21
2.3 紫外線照射線量率の測定方法	21
2.4 可視光線照射線量率の測定方法	21
2.5 紫外線照射	21
2.6 回復処理	21
2.7 ESS 法	22
3. 結果および考察	23
3.1 紫外線照射線量と ESS 数の関係	23
3.2 ESS の光回復	25
3.3 ESS の暗回復	25
3.4 ESS 法とマウス感染法	26
4. 結論	26
2-3 中圧紫外線と低圧紫外線の <i>Cryptosporidium parvum</i> HNJ-1 オーシスト不活化力の比較	
要旨	38
1. 目的	38
2. 材料と方法	38
2.1 供試 <i>C. parvum</i> HNJ-1 株オーシスト	38
2.2 紫外線ランプ	38
2.3 紫外線照射線量率の測定方法	38
2.4 感染性の測定	39
3. 結果及び考察	39
4. 結論	40
2-4 塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒ー水道のクリプトスポリジウム対策として	
1. 水系クリプトスポリジウム感染症の大規模集団発生が多発	43

2. クリプトスポリジウムとは	43
3. なぜクリプトスポリジウム感染症が発生するのか	43
4. どんな対策が考えられるか	44
5. 紫外線消毒	44
(1) 低圧紫外線によるクリプトスポリジウムの不活化	44
(2) 生育活性か、感染性か、いずれの評価方法を選択すべきか	45
6. 紫外線消毒の適用	46
(1) 紫外線のクリプトスポリジウム不活化力	46
(2) 不活化に及ぼす影響因子	46
(3) 水道への適用	47
7. おわりに	47

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	52
2. 調査した文献リスト	53
3. 文献のジャンル別分類	58

第4編 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発

研究要旨	73
1. 研究目的	73
2. 研究方法	74
2. 1 実験原水	74
2. 2 実験プラント	74
2. 3 急速ろ過塔のろ層条件	76
3. 凝集沈殿プロセスにおける運転管理技術の開発	77
3. 1 塩化第二鉄および有機高分子凝集剤の評価	77
3. 2 凝集操作条件の比較検討実験	86
4. 急速ろ過プロセスにおける運転管理技術の開発	92
4. 1 ろ層条件の比較検討	92
4. 2 ろ材の凝集剤被覆に関する検討	96
5. まとめ	121
5. 1 凝集沈殿工程における運転管理技術について	121
5. 2 急速ろ過工程における運転管理技術について	121

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

平成8年の埼玉県におけるクリプトスポリジウム感染事故以来、水道水を介した感染症発生事例は報告されていないが、厚生労働省による平成16年3月末現在の調査結果では水道原水のクリプトスポリジウムによる汚染の恐れがある施設は4,811施設に上り、そのうち予防対策を実施済みの施設は2,751施設と57%にとどまっている。平成16年度においても、水道原水からのクリプトスポリジウム検出による取水停止や浄水からのジアルジア検出などの事例が報告されており、これらの病原性微生物の監視・対策は依然として大きな課題となっている。

平成8年に策定された「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」では、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おり、平成15年4月に取りまとめられた水質基準の見直しに関する厚生科学審議会答申においては、耐塩素性病原性微生物対策として、「水道法第22条に基づく措置として、消毒に加え、原水がクリプトスポリジウム等により汚染され、または汚染されている恐れがある場合には、適切なる過操作を行うべきこと、を加えることが必要であると考え。」とされた。

しかし、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、紫外線を使った原虫類の不活化実験、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「原虫類の紫外線耐性」、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「紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査」、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、*Cyclospora* および *Eimeria* 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	立命館大学理工学部客員教授
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	北海道大学創成科学共同研究機構特任教授
委員	篠 武夫	横浜市水道局水道技術管理者担当部長

(平成17年3月現在)

3. 研究計画

(1) 研究計画

平成16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) 原虫類の紫外線耐性

本研究は、紫外線による *Cyclospora* および *Eimeria* 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) 紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査

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) 凝集沈澱・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、凝集沈澱ろ過の除去性能を評価した。

4. 研究の概要

(1) 原虫類の紫外線耐性

耐塩素性微生物対策の一環として原虫類への紫外線照射について検討している。一連の研究成果として、*Giardia* および、*Cryptosporidium* は紫外線への感受性が高く、極めて低線量で不活化され、回復は無視できることが示されている。しかしながら、一般に生物は紫外線への抵抗性と回復機能等の防御機構を備えており、紫外線消毒に抵抗性を示す他の原虫類の存在が否定できない。実際に *Cryptosporidium* と分類学的に近縁の *Eimeria* は *Cryptosporidium* と *Giardia* に比べて抵抗性を有することを明らかにしてきた。*Eimeria* は鳥類に感染する孢子虫類であることから、人に感染する原虫での検討が待たれていた。本研究では人体寄生性の孢子虫類である *Cyclospora cayatanensis* オーシストを用い、紫外線による不活化効果を検討した。その結果、本原虫のオーシストに対して 2-log の不活化効果、具体的にはスポロシスト形成阻止には 10 mJ/cm² 程度の照射線量が必要であった。これは先の *Eimeria* オーシストを対象とした不活化実験で得られた照射線量に匹敵し、*Giardia* での実験、あるいはクリプトスポリジウムのオーシストで報告されている照射線量の 10 倍量に相当した。この結果から、紫外線消毒における照射線量の設定には原虫種による感受性の違いを十分に検討する必要がある。

(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

低圧紫外線ランプから発する波長 254nm の紫外線を照射した *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株オーシストの光回復ならびに暗回復能力を調べた。二量体数は Endonuclease Sensitive Site (ESS) 法によって測定した。その結果、① *C. parvum* に低圧紫外線を照射すると、照射線量に比例して生成 ESS 数が増加し、紫外線照射時間と生成 ESS 数の回帰式は $y = 0.68x - 0.06$ (相関係数 $R = 0.993$) となり、両者間に高い相関が認められた。② 紫外線照射線量 4.5mJ/cm² 以下における残存 ESS 数は、紫外線照射線量に関係なく 0.1~0.4 ESS/10⁴ base の範囲であり、定量下限値レベルであった。③ 暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存し、紫外線照射量が 4.5mJ/cm² のときは 72 時間を要したが、紫外線照射線量が低くなるに従い、回復に必要とする時間も短くなる傾向が認められた。などの知見が得られた。

また、*Cryptosporidium parvum* を対象に中圧紫外線 (MPUV) によるピリミジン二量体の生成数とその光回復および暗回復の有無と程度を評価した。低圧紫外線 (LPUV) についても同様に実験し、MPUV の結果と比較検討した結果、以下の知見が得られた。

①LPUV および MPUV を照射した *C. parvum* を光回復処理すると、いずれも明らかに ESS 数の減少が観察され、光回復処理による ESS 数の減少に LPUV と MPUV で違いは認められなかった。紫外線照射線量 (生成 ESS 数) が少量の場合、ESS 数の減少はほとんどみられなかったが、紫外線照射線量 (生成 ESS 数) が多くなると ESS が顕著に減少し、光回復後に残存する ESS 数は 0.1~0.8 (/104 base) の範囲にあって、ほぼ一定値 (平均で 0.4/104 base) となる傾向が認められた。

②LPUV および MPUV を照射した *C. parvum* を暗回復処理すると、いずれも ESS 数の減少が観察され、暗回復処理による ESS 数の減少に LPUV と MPUV で違いは認められなかった。光回復では、回復処理後に残存する ESS 数が紫外線照射線量に関係なくほぼ一定値であったのに対して、暗回復では生成 ESS 数が多いものほど残存 ESS 数が多くなった。また、ESS の回復数でみると、生成 ESS 数の増加に伴って ESS の回復数が増加するものの、生成 ESS 数が約 2.5 (/104 base) を超えると、ESS の回復数はほぼ一定の上限值 (1.5~2 /104 base) となった。

さらに、異なる株を用いて行われている *Cryptosporidium parvum* のオーシストの紫外線による不活化データを統合するために、米国で多用されている *C. parvum* Iowa 株と日本で多用されている *C. parvum* HNJ-1 株について、同一条件で低圧紫外線並びに中圧紫外線を照射し、その不活化レベルを Scid マウスで評価した。その結果、*C. parvum* HNJ-1 株は、米国を中心に多用されている *C. parvum* Iowa 株に比べて、紫外線感受性が低圧、中圧のいずれの場合も 1.17 倍高いことが明らかになった。

(3) 紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査

原虫類の紫外線による不活化に関して、計 25 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。

凝集沈澱工程における運転管理技術について

1) 塩化第二鉄、高分子凝集剤の効果

・本実験により、今後利用が進むであろう高分子凝集剤と塩化第二鉄の併用が、凝集沈澱、

ろ過処理性の改善に有効であることが確認された。特にその効果は、一般的に処理性が低下する低水温期において明確であった。また、本実験原水では、PACと比較して塩化第二鉄の方が、トレーサー粒子に対する凝集沈澱、ろ過処理性が高くなることが分かった。

2) 凝集操作条件の影響

- ・凝集沈澱処理工程において、凝集剤注入率を増加させることで濁度、粒子数(3~10 μm)、トレーサー数の処理性は向上する。トレーサー除去率で見ると、通常注入率の1.2倍の凝集剤注入率で0.3 log₁₀程度、2倍では0.7 log₁₀程度、除去性が向上した。
- ・低水温期においては、高水温期と比較して凝集剤注入率の増加による効果は相対的に小さい。従って、後段の急速ろ過工程における処理性も加えて評価を行い、最終の浄水処理水質を管理する上で適切な運転管理計画を検討する必要があると考えられる。
- ・凝集剤注入率の増加が急速ろ過池の損失水頭に与える影響は、特に認められなかった。

急速ろ過工程における運転管理技術について

1) ろ層構成の比較

高速ろ過時、2層ろ過に対する3層ろ過の粒子漏出抑制効果が示唆された。

2) ろ剤の凝集剤被覆の効果

- ・未ろ水に凝集剤を1 mg/L以上添加することで、濁度および粒子数の処理性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、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、80%以上の低減効果が認められた。
- ・この時の損失水頭を見ると、再凝集剤注入率3 mg/Lの場合、24時間後には単層で1600 mmに達していたのに対し、複層ではろ速が大きいにもかかわらず1000 mm程度にとどまっております。再凝集処理を行う場合には、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。
- ・再凝集槽における攪拌強度は、ろ過処理性に明確な差を与えなかった。
- ・逆洗水に添加した凝集剤によるろ材被覆により、単層、複層とも、粒子数及びトレーサー数について初期流出の抑制効果が顕著に認められた。
- ・逆洗水への凝集剤添加量については、逆洗用水への添加量を10 mg/Lから5 mg/Lに減少させても、流出抑制効果を維持させることができた。また、添加時間については、逆洗時間の前半だけの添加は効果がないが、後半への添加では、添加率5 mg/Lで逆洗終了直前2分間の添加で、十分な効果が認められた。
- ・凝集剤を添加することにより、ろ過開始直後のろ過水へのアルミニウムの漏出が懸念されたが、ろ過水中のアルミニウム濃度は凝集剤添加の有無で差は認められなかった。

第1編

原虫類の紫外線耐性

原虫類の紫外線耐性

分担研究者	遠藤卓郎（国立感染症研究所寄生動物部）
協力研究者	泉山信司（国立感染症研究所寄生動物部）
協力研究者	笹井和美（大阪府立大学）

概要

耐塩素性微生物対策の一環として原虫類への紫外線照射について検討している。一連の研究結果として、*Giardia* および、*Cryptosporidium* は紫外線への感受性が高く、極めて低線量で不活化され、回復は無視できることが示されている。しかしながら、一般に生物は紫外線への抵抗性と回復機能等の防御機構を備えており、紫外線消毒に抵抗性を示す他の原虫類の存在が否定できない。実際に *Cryptosporidium* と分類学的に近縁の *Eimeria* は *Cryptosporidium* と *Giardia* に比べて抵抗性を有することを明らかにしてきた。*Eimeria* は鳥類に感染する孢子虫類であることから、人に感染する原虫での検討が待たれていた。本研究では人体寄生性の孢子虫類である *Cyclospora cayetanensis* オーシストを用い、紫外線による不活化効果を検討した。その結果、本原虫のオーシストに対して 2-log の不活化効果、具体的にはスポロシスト形成阻止には 10 mJ/cm² 程度の照射線量が必要であった。これは先の *Eimeria* オーシストを対象とした不活化実験で得られた照射線量に匹敵し、*Giardia* での実験、あるいはクリプトスポリジウムのオーシストで報告されている照射線量の 10 倍量に相当した。この結果から、紫外線消毒における照射線量の設定には原虫種による感受性の違いを十分に検討する必要がある。

1. 研究目的

耐塩素性微生物の *Cryptosporidium* ならびに *Giardia* は水系感染し、水道を介した大規模集団感染を引き起こすことから問題となっている。紫外線消毒はこれらの原虫類に対して効果的であることが本研究を含む内外の研究で示され (Bukhari et al. 1999、Morita et al. 2002、Campbell and Wallis 2002、Izumiyama et al., 2002)、耐塩素性微生物対策の 1 つとして期待が寄せられている。欧米では耐塩素性微生物対策の 1 つとして適用した場合の除去率が計算から示され (EPA, 2003)、浄水工程の 1 つの選択肢として期待されている。ところで、紫外線消毒は残留効果がないこと、遮蔽物によって効果が著しく減じる恐れがあることなどといった問題を抱えている。本研究では紫外線消毒の問題点について、DNA 損傷からの回復現象、濁質による遮蔽、紫外線抵抗性を有する種や株の存在などの検討を行ってきた。これまでの研究で *Giardia* や *Cryptosporidium* は紫外線照射による DNA 損傷からの回復はほとんど無視できること、濁質による遮蔽の重要性を実験的に示してきた。加えて、寄生虫虫卵が有する自家蛍光が紫外線抵抗性と関連する可能性について考察し、外界での虫卵の発育を必要とする種が紫外線に抵抗性を有する可能性を検討してきた (遠藤卓郎ら、H15 年度)。この性質を有するシスト壁の 1 例として鳥類に感染する *Eimeria* への紫外線照射実験を行い、*Giardia* に比べて強い紫外線抵抗性を有することを示したが、これまでのところ人への感染性を持つ原虫種で紫外線抵抗性を有するものの存在については示されていない。

Cyclospora は *Cryptosporidium* ならびに *Eimeria* に近縁の孢子虫類に属し、ヒトへの感染性を有

する。*Cyclospora* は *Cryptosporidium* と同じく環境抵抗性のオーシストを形成し、水系感染が海外で報告されている (CDC, 1991, Wurtz, 1994, Rabold et al., 1994)。したがって、*Cryptosporidium* 同様に紫外線を用いて不活化処理したい病原性微生物の 1 つと言える。わが国における *Cyclospora* 感染の報告は限られており実態は不明であるが (Abe et al., 2003)、広く原虫類の紫外線耐性を研究することは、紫外線消毒の応用並びに *Cryptosporidium* と *Giardia* の紫外線感受性を理解する上で有用である。本研究ではこの *Cyclospora* を偶然入手し、その紫外線抵抗性を *Eimeria* の評価と同じスポロシスト形成を指標として紫外線の *Cyclospora* に対する不活化効果の検討を行なったので報告する。

2. 研究方法

2. 1 *Cyclospora* (サイクロスポラ)

Cyclospora のオーシストは自然感染した海外旅行者の糞便検体より得た。得られたオーシストの形態的は *Cyclospora* sp.特徴を良く示すもので (図 1)、オーシストの大きさは 8.2 ないし 8.3 μm の球形で、内部には顆粒が充実しており、蛍光顕微鏡の紫外線照射下でネオンプルーの自家蛍光を発した。次に、18S rDNA の塩基配列決定を行い、*Cyclospora cayetanensis* の配列との一致を確認した。鋳型 DNA の抽出には QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen)を用いた。*Cyclospora* 特異的 PCR は Relman らのプライマー (CYCF1E と CYCR2B、ならびに CYCF1E と CYCR4B のペア)を用いて Nested-PCR を行なった (Relman et al., 1996, Pieniazek et al., 1996, Abe et al., 2004)。得られた PCR 産物は BigDye terminator v1.1 と ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて直接塩基配列決定を行い、*C. cayetanensis* の登録配列 AF111183 (GenBank) との 100% (522 / 522 bp)一致を確認した (図 2)。

2. 2 紫外線照射試験

Cyclospora のオーシストの精製は次の手順で行なった。始めに糞便を酢酸エチルで脱脂し、続いて塩化セシウム密度勾配遠心法を用いて夾雑物を除いた (Arrowood and Donaldson, 1996)。精製したオーシストは精製水に浮遊し、数時間以内に紫外線照射実験に供した。紫外線ランプは極大波長が 254 nm の 4 W 低圧水銀ランプ (GL-4、日本電気)を 2 本用いた。ランプの直下約 40 cm に浮遊液 10 mL を入れた 60×15 mm シャーレ (Corning 430166) を置き (水層: 4.7 mm)、0.10 mW/cm² の強度で 4、8、12 mJ/cm² の線量を照射した。紫外線強度の測定には紫外線積算光量計 (UTI-150-A+UVD-S254, ウシオ電機)を使用した。

2. 3 オーシスト発育試験

紫外線照射後の *Cyclospora* オーシストは遠心濃縮し、1%重クロム酸カリ溶液に懸濁し、25°C で発育させた。発育はオーシスト中に 2 つのスポロシストが発育したことを基準とし、顕微鏡観察により成熟したオーシスト数と未成熟のオーシスト数を記録し、発育の割合を求めた。精製オーシストに対する紫外線の照射と発育は、4 mJ/cm² と 12 mJ/cm² の条件でそれぞれ 2 回ずつ、8 mJ/cm² の条件で 3 回行なった。紫外線照射試料での回復と発育の遅れを考慮して 17 日から 25 日の間に発育の割合を 2 回測定し、その平均値を発育の割合として用いた。割合は 0 mJ/cm² の条件を 100%とした相対値として算出した。

2. 4 *Eimeria aceroulina*(アイメリア)

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。感染実験に用いた嚢子は 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 10⁵ 個/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 1ml の懸濁液としてニワトリに経口投与した。投与時の濃度は 10⁴ 個/ml および 10⁵ 個/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、糞便を 30℃で 48~60 時間培養した後に 4℃で保存した。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。発育試験では未成熟の嚢子に紫外線を照射し、スポロゾイト形成をが行われるか否かを指標として効果を判定した。本研究では 3 つ以上のスポロシストが観察された嚢子を発育したものと判定した。

3. 結果

方法に従ってスポロシスト形成を指標として *Cyclospora* 嚢子に対する紫外線の効果を検討した結果、10 mJ/cm² で 2-log の発育阻止が観察された (図 3)。測定値の標準偏差を信頼区間として図示した。不活化の直線は 0 mJ/cm² を除いた結果より最小自乗法で算出し、

$$y = e^{(-0.72 \times x + 2.5)}$$

で表され、相関係数 R² 値は 0.98 であった。

紫外線照射後の発育期間を決めるにあたり、正確な発育期間を求める必要があり、平行して検討を行なった。精製後のオーシストを脱イオン水 (系列 1) あるいは 1% 重クロム酸カリ水溶液 (系列 2 から 4) に懸濁し、25℃で発育させ、経時的に発育の割合を測定した (図 4)。発育開始前の試料に発育したオーシストの存在しないことを確認し、時間の経過とともに発育したオーシストの割合を測定した (図 4A)。精製前の糞便試料は 13℃で保管し、オーシストの精製ならびに発育開始は日をかえて 4 回行なったが、発育開始が遅れるに従い発育するオーシストが減少した。理由として、室温で糞便試料を取り扱った際の温度変化で失活したことが考えられた。なお、1 ヶ月間保存した後の同じ糞便試料より精製したオーシストでは 35% の発育が観察された。

計数した割合の最大値を基準として 4 系列実験の発育の割合を標準化したところ (図 4B)、本研究で用いた条件下では、5 日目からスポロシスト形成が観察され始め、9 日目にその相対割合がほぼ 9 割に達した。スポロシスト形成の進行は、発育開始日ならびに最終的に到達した発育の割合には影響されず (図 4B)、4 系列の試験を同列に扱えるものと判断した。

本実験の条件下ではスポロシスト形成に要する期間は 9 日で十分と考え、紫外線照射群の測定では安全を見てその約 2 倍の期間まで観察を行なった。なお、実験回数は少ないが、オーシストの懸濁に用いた脱イオン水と 1% 重クロム酸カリ水溶液の違いは発育の割合には影響しなかった。脱イオン水中の発育では微生物の増殖とオーシストの凝集が見られたところから、重クロム酸カリ溶液中での実験が好ましいと考えられた。

ちなみに、*Cyclospora* オーシストの発育に関しては至適温度が 25℃付近とされており、それ以上の温度では発育しなくなるとされていたが、(Upton SJ: <http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/Apicomplexa11.html>)、今回の研究でも確認さ

れた。すなわち、30℃、35℃の条件下での発育を併せて試みたところ、それらの培養温度で発育した割合はそれぞれ0.07%未満(0/1353)、0.05%未満(0/2000)となり、温度条件が発育に大きく影響した。

4. 考察

当該研究では *Cyclospora* オーシストの発育を 2-log 阻止するのに必要な線量は 10mJ/cm²であった。この照射線量は *Giardia* の不活化に要した線量のおよそ 10 倍量に相当し、生類の孢子虫類の *Eimeria* に対する照射試験の結果とほぼ同等の値であった(図5)。これらのことより紫外線照射による原虫類オーシスト/シストの不活化では紫外線抵抗性を有する原虫類を考慮した線量の選択が必須であることが示された。EPA では *Cryptosporidium* 並びに *Giardia* の 2-log 不活化に必要な照射線量をそれぞれ 5.8 mJ/cm²、5.2mJ/cm² と計算しているが (EPA, 2003)、*Cyclospora* の 2-log 除去では 10mJ/cm² 程度の紫外線照射が必要である。

自家蛍光を有して外界で発育する種における紫外線抵抗性を予想していたが(遠藤卓郎ら、H15 年度)、これらの性質を有する *Cyclospora* と *Eimeria* は同程度の耐性を有する結果が得られた。この 2 種が感受性の高い *Cryptosporidium* や *Giardia* と異なるのは、オーシストが外界に排出された直後は感染性を有さず、一定期間環境中での様々なストレスに抵抗し、発育しなければならないことにある。*Isospora*、*Toxoplasma* 等もシスト壁に自家蛍光を有することから、実際的な紫外線耐性の検討が強く望まれる。

5. 結論

人に感染する原虫類は種によって紫外線感受性が異なり、外界での発育を要する種では特に抵抗する可能性が示唆されている。人に感染する *Cyclospora* では 2-log の発育阻止に 10mJ/cm² 程度の線量が必要となり、トリに感染する *Eimeria* と同等、*Giardia* とは 10 倍の開きが認められた。既に *Cyclospora* の水系感染が海外で報告されており、わが国でも注意しなければならない病原体の 1 つである。紫外線消毒を耐塩素性微生物対策として利用するにあたり、紫外線に抵抗性を示す原虫に対応した線量の選択が必要であると考えられた。

参考文献

- Abe N, Iseki M, Matsuda H, Ohnishi K. Identification of species of *Cyclospora* isolates from patients by the PCR-based diagnostic methods. *Kansenshogaku Zasshi*. 2003 Feb;77(2):47-52. Japanese.
- Arrowood MJ, Donaldson K. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J Eukaryot Microbiol*. 1996 Sep-Oct;43(5):895.
- Bukhari, Z., Hargy, T.M., Bolton, J.R., Dussert, B. and Clancy, J.L. (1999). Medium-pressure UV for oocyst inactivation. *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 91, 86-94.
- Campbell, A.T. and Wallis, P. (2002). The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Wat. Res.*, 36, 963-969.
- CDC (1991). Outbreaks of diarrheal illness associated with cyanobacteria (blue-green algae)-like

bodies-Chicago and Nepal, 1989 and 1990. Morbidity and Mortality Weekly Report, 40:325-327.

EPA. National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule. 2003. 40 CFR Parts 141 and 142. pp. 47712.

Izumiyama S, K. Yagita, T. Hirata, M. Fujiwara, T. Endo. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by Ultraviolet Irradiation. First Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies for Water, Wastewater & Environmental Applications (International UV association, Singapore, 2002)

Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Nov;68(11):5387-93.

Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Alfano EM, Arrowood MJ. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg Infect Dis.* 1996 Oct-Dec;2(4):357-9.

Rabold JG, Hoge CW, Shlim DR, Kefford C, Rajah R, Echeverria P. *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet.* 1994 Nov 12;344(8933):1360-1361.

Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M, Cross J, Yoder K, Sethabutr O, Echeverria P. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J Infect Dis.* 1996 Feb;173(2):440-5.

Wurtz RM (1994). *Cyclospora*: a newly identified intestinal pathogen of humans. *Clinical Infectious Diseases*, 18:620-623.

遠藤卓郎、泉山信司、笹井和美、厚生労働科学研究費補助金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」H15 年度研究報告より分担研究報告書「紫外線照射による *Eimeria* および *Entamoeba* の不活化」

Upton SJ. Tube graphs representing sporulation of *Cyclospora cayetanensis* from Lima Peru.: <http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/Apicomplexa11.html>

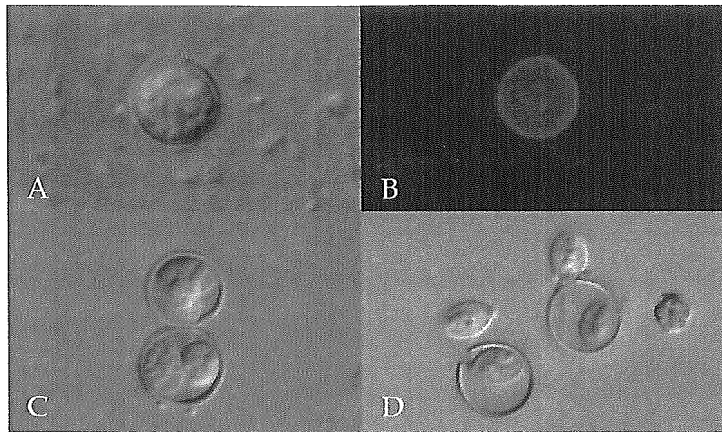


図1 海外旅行者より得た *Cyclospora* オーシストの顕微鏡写真

A: 未成熟のオーシスト、B: 紫外線励起下で観察された自家蛍光、C: 成熟したオーシスト、
D: 物理的な力で開いたオーシストと外に出たスポロシスト

```

AF111183 : CGAGGTAGTGACGAGAAATAACAATACAGGGCATTTAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGGAATTTAAAATCCTTCCAGA : 80
Isolate : ..... : 80

AF111183 : GTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGTGTATATTAGAGTTGTTGCAGTT : 160
Isolate : ..... : 160

AF111183 : AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGTGCTGGTCATCCGGCCTTGCCCGTAGGGTGTGCGCCTGGGTTGCCCGCGGCTTCT : 240
Isolate : ..... : 240

AF111183 : TCCGGTAGCCTTCCGCGCTTCGCTGCGTGCCTGGTGTCCGGAACCTTTACTTTGAGAAAAATAGAGTGTTC AAGCAG : 320
Isolate : ..... : 320

AF111183 : GCTTGTGCGCCTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAGATAGGACCTTGGTTCATTTTGTGTTGTTCTAGGACCGAGGTA : 400
Isolate : ..... : 400

AF111183 : ATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACT : 480
Isolate : ..... : 480

AF111183 : GCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGA : 522
Isolate : ..... : 522

```

図2 *Cyclospora* 分離株の塩基配列

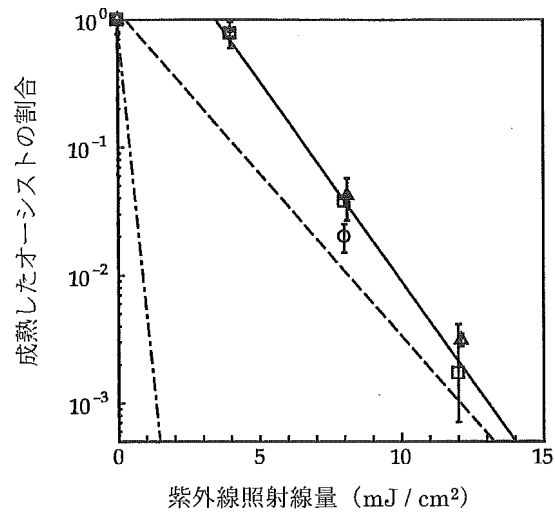


図3 紫外線照射による *Cyclospora* オーシストの不活化

エラーバーは測定値の標準偏差を表す。実線は *Cyclospora* の不活化曲線を表す。併せて、*Giardia* シストの不活化曲線（1点鎖線）、*Bacillus subtilis* 栄養型細胞の不活化曲線（鎖線）を示した。

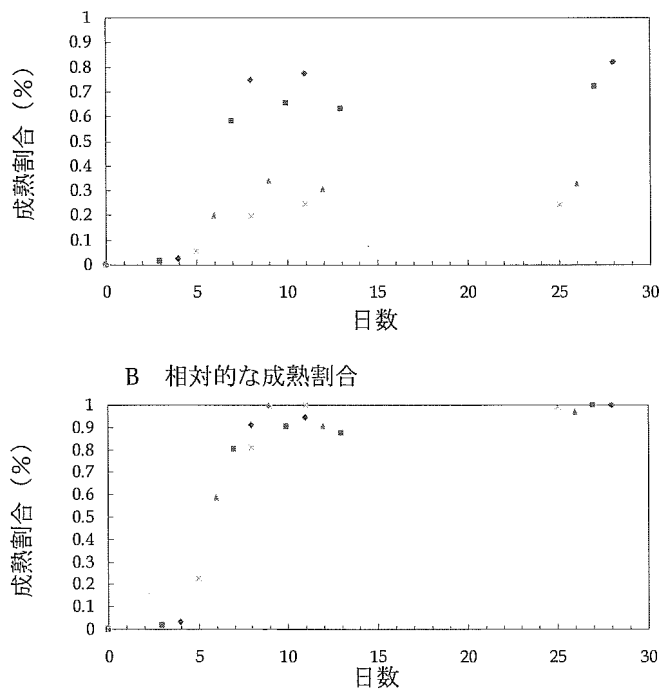
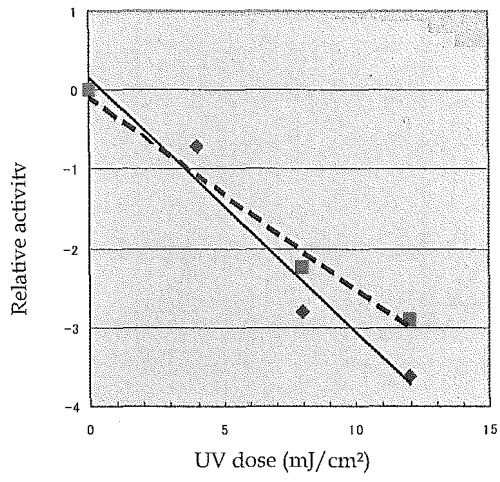


図4 成熟した *Cyclospora* オーシストの割合と発育に要した期間

A: 顕微鏡下で求めた成熟オーシストの割合（4測定分）、B: 各測定毎に最大値を100%として相対割合を求めた場合

A) 感染実験による評価



B) 発育阻止による評価

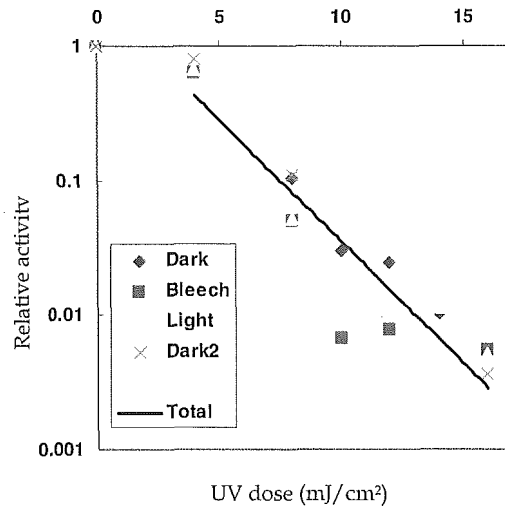


図5 *Eimeria* 嚢子に対する紫外線の不活化効果

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