

2-1

低圧紫外線の照射によって*Cryptosporidium parvum* に生じた
DNA損傷の暗回復

低圧紫外線の照射によって *Cryptosporidium parvum* に生じた DNA 損傷の暗回復

分担研究者 平田 強 (麻布大学環境保健学部 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

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。得られた結果は以下のものである。

- (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 $4.5\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以下における残存 ESS 数は、紫外線照射線量に関係なく $0.1 \sim 0.4 \text{ESS}/10^4 \text{base}$ 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 $4.5\text{mJ}/\text{cm}^2$ 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。

1. はじめに

紫外線が生物を不活化するのは、主に、生物の核酸が紫外線を吸収して損傷を生じ、その損傷が原因となって核酸の完全複製が阻害されることによる。このような効果があるのは、核酸の吸収波長 220~300nm の範囲の紫外線であり、最大吸収波長は 260 nm である。紫外線の吸収によって生じる DNA 損傷の大部分がピリミジン二量体の形成である。ピリミジン二量体にはシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)と(6-4)光産物がある(Harm, 1980)。シクロブタン型ピリミジン二量体は隣り合ったピリミジン塩基(チミン:T またはシトシン:C)の 6 位の炭素と 5 位の炭素どうしが共有結合して生じ、紫外線照射で生成されるピリミジン二量体の約 80% を占める(図 1)。一方、(6-4)光産物は隣り合ったピリミジン塩基の 6 位の炭素と 4 位の炭素が共有結合して生じ、ピリミジン二量体の約 20% を占める (Mitchell *et al*, 1989)。254 nm の紫外線照射においても、シクロブタン型ピリミジン二量体は最大の増加を示す (Spivak *et al*, 1988)。

このような紫外線の特性を考慮して、平成 14 年度には、低圧紫外線を照射したときの照射線量と *C. parvum* HNJ-1 株オーシストの不活化レベルの関係について検討した。そして、*C. parvum* HNJ-1 株オーシストは極めて少量の紫外線照射で顕著に不活化されること、紫外線によって一旦

不活化したオーシストの感染性は光回復処理や 24 時間の暗回復処理を行っても回復しないことなど、紫外線がクリプトスポリジウム対策にきわめて優れた不活化技術である可能性が高いことを定量的に確認することができた（平田と森田，2003b，2004b）。

しかしながら、生物には、光回復や暗回復によって、核酸の損傷部位を修復する機構をもっている。紫外線照射によって一旦不活化したオーシストで、これらの回復機構が働いて一部の感染性を取り戻すということになるのであれば、紫外線の消毒効果は十分な光回復及び暗回復を経た後の不活化レベルで評価しなければならないことになる。

紫外線照射した *C. parvum* に可視光を照射あるいは暗所に静置すると ESS 数が減少すなわち DNA が回復することはすでに明らかにされている（Oguma et al, 2002, Morita et al, 2002）。光回復に関しては、紫外線照射線量 0~4.0mJ/cm² の範囲内であれば可視光照射 2 時間で回復が平衡に達する。しかし暗回復については、平成 15 年度の報告でもピリミジン二量体の一部が単量体に復帰する（回復する）ことが半定量的に確認されているものの（平田と森田，2003a, 2004a），24 時間で回復平衡に達しているか否かはいまだ明らかになっていない。そこで今年度は、暗所静置時間を 24, 48, 72, 96 時間とし、暗回復が平衡に達する時間を ESS 法で評価することを試みた。

2. 材料と方法

2. 1 供試オーシスト

供試 *C. parvum* オーシストは井関基弘博士（金沢大学医学部）より分与されたヒト患者由来の HNJ-1 株を麻布大学付設生物科学総合研究所で飼育している Scid マウス（CB-17./Icr, 日本クレア）で継代維持しているものを用いた。供試 *C. parvum* オーシストは、マウスの糞便からスクロース密度勾配遠心分離法により精製分離し、150mM リン酸塩緩衝液中で保存したものを供試オーシスト懸濁液とした。

2. 2 紫外線ランプ

紫外線照射には 5 W 低圧紫外線ランプ（QCGL5W-14 97D, 岩崎電気社製）を用いた。図 2 に放出スペクトルを示す。低圧紫外線ランプは 253.7 nm にピークを持ち、放出波長幅は極めて狭い。

2. 3 紫外線照射線量率の測定方法

紫外線の照射線量率は紫外線積算光量計（UIT-150 S254, ウシオ電機社製）を用いて測定した。本研究で用いた紫外線積算光量計は DNA 吸収スペクトルに近い分光感度を持っており、おおむね DNA に作用する波長域の光エネルギーを測定していることになる。

2. 4 紫外線照射

プラスチックシャーレ（φ56 mm）にオーシスト懸濁液（ 2.0×10^6 oocysts/mL）を 10 mL ずつ入れた。このときの水層厚は 4.0mm である。これに 5W 低圧水銀ランプ（QCGL5W-14 97D, 岩崎電

気社製)により, 照射線量率 0.10 mW/cm^2 の紫外線を照射した。紫外線照射中はオーシスト懸濁液をマグネチックスターラーで常時緩やかに攪拌した。水槽表面における照射線量率は紫外線積分光量計 (UIT-150-A, ウシオ電機社製) で計測し, 水層中における紫外線の減衰が Lambert-Beer 則に従うと仮定して, 水層厚 4.0 mm のオーシスト懸濁液に紫外線照射したときの平均線量を積分計算で求めた。紫外線照射線量は照射時間で制御した。

2. 5 暗回復処理

紫外線照射後の *C. parvum* オーシスト懸濁液を, アルミ箔で遮光した 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に入れ, インキュベータ (20°C) 内で静置した。静置時間は $24, 48, 72, 96$ 時間とした。

2. 6 ESS 法

ESS 法は小熊ら (2001) の方法に準拠した。すなわち, オーシスト懸濁液を -80°C のディープフリーザ中で凍結させてから室温に戻すという操作を 3 回繰り返した後, 95°C で 5 分間融解してオーシスト壁を破壊し, DNA 抽出キット (Genomic-tip, Qiagen 社製) で DNA を抽出した。UV エンドヌクレアーゼは Carrier and Setlow (1970) の方法に従って *Micrococcus luteus* から抽出したものを, 小熊久美子博士 (東京大学) から分与して頂いた。DNA 抽出液に UV エンドヌクレアーゼを添加して 37°C で 45 分間反応させ, ピリミジン二量体の部分に切断を生じさせた。反応後, アルカリ染色剤 (100mM NaOH , 1mM EDTA , $2.5\%\text{Ficoll}$, $0.05\%\text{BCG}$) を添加し, 0.5% アルカリアガロースゲル (Agarose H, 日本ジーン社製) 上で電気泳動した。泳動槽にはアルカリ緩衝液 (30mM NaOH , 1mM EDTA) を満たし, 0.5V/cm の電圧で 17 時間泳動した。DNA マーカーには 8GT (T4dC+T4dC/BglII digest mixture, 和光純薬工業製) を用いた。電気泳動後のゲルは, エチジウムブロマイド溶液に 5 時間浸漬して染色した後, 画像処理装置 (Gel Doc 2000 システム, BIORAD 社製) で読み取り, 解析ソフトウェア (Quantity One, BIORAD 社製) で解析した。これらのシステムにより DNA の蛍光がピクセルの集合として認識され, 蛍光強度の泳動距離分布が得られる。各試料 DNA については, 総 DNA のちょうど $1/2$ が通過した泳動距離を当該試料の泳動距離中央値とした。DNA マーカーの泳動結果から泳動距離と DNA 塩基数の二次回帰式を求め, それに従って各サンプルの DNA の泳動距離中央値を塩基数中央値 (L_{med}) に換算した。ここで, L_{med} と DNA 断片数により平均化した塩基数平均値 L_n との間には (1) 式が成り立つ (Veatch *et al.*, 1969)。

$$L_n = 0.6 \times L_{med} \quad (1)$$

単位塩基あたりの ESS 数を (2) 式 (Freeman *et al.*, 1986) に従って算出した。

$$\frac{ESS}{\text{base}} = \frac{1}{L_{n(+UV)}} - \frac{1}{L_{n(-UV)}} \quad (2)$$

$L_{n(-UV)}$: 紫外線非照射群の L_n

3. 結果および考察

平均紫外線照射線量と ESS 数の関係を図 3 に示す。照射線量 (R) に比例して生成 ESS 数 (y) が増加した。回帰式は $y = 0.68x - 0.06$ (相関係数 $R = 0.993$) となり、両者に高い相関が認められることが再確認された。

平均紫外線照射線量と暗回復処理後の ESS 数の関係を図 4 に、暗回復処理時間と ESS 数の関係を図 5 に示す。どの紫外線照射量の場合も暗回復処理により ESS 数が顕著に減少し、72~96 時間ではどの照射線量の場合も残存 ESS 数は $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ のレベルで安定している。暗回復が安定レベルに達するのに要する時間は紫外線照射線量に依存しており、紫外線照射線量 $4.5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ のときは 72 時間であったが、紫外線照射線量が低くなるに従って回復に要する時間も短くなり、紫外線照射線量 $2.25 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ のときは 24 時間でほぼ安定レベルに達した (なお、この安定レベルでの ESS 数は本研究で用いた ESS 数測定法の検出下限値以下であり、数値そのものの信頼性は低い)。E. coli に紫外線を照射した後に暗回復処理したとき、生残率が安定レベルに達するのに要する時間は室温で 60 時間との報告があり (Harm, 1968)、本実験でもほぼ同様の時間で安定レベルに達したものと考えられる。

紫外線照射直後の ESS 数と回復した ESS 数との関係を図 6 に示す。暗回復処理 24 時間では、紫外線照射直後の ESS 数が $1.48 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以上の場合、約 $1.0 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ までしか回復できない。暗回復処理 48 時間では、紫外線照射直後の ESS 数が $1.98 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以上の場合、約 $1.5 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ までしか回復できない。これに対し、暗回復処理 72 時間では、紫外線照射線量 $0 \sim 4.5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ の範囲において紫外線照射直後の ESS 数が増加するとともに、回復した ESS 数の増加が見られた。

平田と森田 (2004a) は、光回復できない不可逆的な ESS 数は紫外線照射線量に関係なく $0.5 \sim 1.0 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ であると報告している。これに対して、今回の検討では、暗回復できない ESS 数はそれよりも少なく、 $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ であった。修復を必要とする DNA の損傷の種類として、塩基消失、塩基変更、不正確塩基、ヌクレオチドの欠失/挿入、ピリミジンの結合、主鎖切断、主鎖の架橋、3' デオキシリボース断片があげられているが (Lodish et al, 2001)、光回復が二量体にしか有効でないのに対し、暗回復で修復し得る DNA 損傷の種類が多い (近藤, 1972) ことから考えて、妥当な結果なのかもしれないが、数値そのものが試験方法の検出限界レベルであって確定的な結論を導出することは困難である。これを明らかにするには、より精度の高い評価方法の開発が必要である。

DNA に生成したチミン二量体を修復する経路には、光で誘導される経路と光に依存しない経路の 2 つに分けられる。光回復は古細菌や真核生物、植物など、幅広い生物で確認されており (三谷他, 1989)、光回復酵素が $300 \sim 500 \text{ nm}$ の光エネルギーを利用し、ピリミジン二量体の共有結合を解離することで修復する。一方、暗回復は光エネルギーを必要とせず、これには、損傷を受け

た塩基の除去（除去修復）、損傷のない DNA 鎖部位を再編成して損傷のない DNA を再構築する経路（組換え修復）、損傷の存続を許容してでも DNA 分子全体を保全維持しようとする経路（SOS 修復）（志村, 1989）、不適正塩基対修正酵素が DNA の塩基配列を感知し、その配列のある鎖に誤った対を作っている塩基があるとその領域を除去する経路（ミスマッチ修復）がある（志村, 1989）。

また、光回復において、結合する塩基の比率は T-T:T-C:C-T:C-C=68:16:13:3 との報告があり（Mitchell *et al*, 1992）チミン二量体（T-T）の割合が多い。残存 ESS 数が生じる要因として、シトシン二量体（C-C）の修復が遅れていることも考えられる。なぜなら、T-T のほか C-T も C-C も開裂修復するが、その効率比は、1 : 0.5 : 0.1 と推定されており、開裂速度は T-T, T-C, C-C の順に低下する（近藤, 1972）ためである。暗回復においても、T-T, T-C, C-C の修復効率や速度に差が生じ、72 時間では修復しきれない損傷部位があるとも考えられる。

このほか、残存 ESS 数が生じる理由として、①複製を妨げる修復不可能な損傷、例えば塩基が変化し、除去されない損傷が生じる②損傷の生じた部位が互いに相対して位置している③損傷が密集して生じたために、修復過程に必須な鋳型が存在しない（志村, 1989）④相接近した二量体が同時に修復作用を受け、修復点が衝突するなどの異常によって、修復エラーが起こって非修復性損傷を生じる（近藤, 1972）などが考えられる。

4. 結論

本研究では、低圧紫外線により *C. parvum* の DNA 上に生成されたピリミジン二量体数を ESS 法で定量した。また、紫外線照射後の暗回復処理時間を変化させ、ピリミジン二量体が修復されるために必要な時間および修復の程度を評価した。その結果をまとめると、以下の通りである。

- 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 数も増加した。紫外線照射線量と生成 ESS 数の回帰式は $y = 0.68x - 0.06$ となり、相関係数 $R = 0.993$ と相関性が高かった。
- 2) 紫外線照射線量 4.5 mJ/cm^2 以下における残存 ESS 数は紫外線照射線量に依存せず、 $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ の範囲となった。この残存 ESS は ESS 法の測定誤差とも考えることができ、実際に残存した ESS の数とは必ずしも断定できないが、高度に回復することは明らかである。
- 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、紫外線照射線量 4.5 mJ/cm^2 のときは 72 時間であったが、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った。

参考文献

- ・ Harm W (1980) Biological effects of ultraviolet radiation, Cambridge university press, 31-39
- ・ 平田 強, 森田重光 (2003a) 「紫外線照射した *Cryptosporidium parvum* オーシストにおける光回

復・暗回復」, 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 14 年度総括報告書, 平成 15 年 3 月, 8-22.

- ・平田 強, 森田重光 (2003b) 「紫外線の *Cryptosporidium parvum* オーシスト不活化効果と濁質の影響」, 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 14 年度総括報告書, 平成 15 年 3 月, 23-34.
- ・平田 強, 森田重光 (2004a) 「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」, 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 15 年度総括報告書, 平成 15 年 3 月, 11-17.
- ・平田 強, 森田重光 (2004b) 「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」, 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 15 年度総括報告書, 平成 15 年 3 月, 18-24.
- ・平田強, 森田重光, 杉本ひとみ, 下間綾美, 小熊久美子, 片山浩之, 大垣眞一郎, 本山信行, 森岡崇行, 藤原正弘, (2001) 紫外線を照射した *Cryptosporidium parvum* の光回復・暗回復, 465
- ・近藤宗平 (1972) 分子放射線生物学, 学会出版センター, 101, 118-119, 133
- ・Lodish H, Berk A, Zipursky S L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2001) 分子細胞生物学 (上) 第 4 版, 422
- ・Mitchell D L and Nairn R S (1989) The biology of the (6-4) photoproduct, *Photochem. Photobiol.*, 49(6), 805-819
- ・Oguma K (2003) Ultraviolet Inactivation And Repair Of Health-Related Microorganisms In Water, 28
- ・小熊久美子, 片山浩之, 三谷啓志, 大垣眞一郎, (2001) エンドヌクレアーゼ・センシティブ・サイト法による *Escherichia coli* の紫外線不活化および光回復の評価, 水環境学会誌, 24(8), 534-538
- ・Oguma K, Katayama H and Ohgaki S (2002) Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay, *AEM*, 68(12), 6029-6035
- ・志村令郎 (1989) フライフェルダール 分子生物学 (上巻), 273-289
- ・Spivak G, Leadon S A, Vos J-M, Meade S, Hanawalt P C, Genesan A K (Stanford Univ., CA USA), (1988) Enhanced transforming activity of pSV2 plasmids in human cells depends upon the type of damage introduced into the plasmid. Vol.193, No2, 97-108

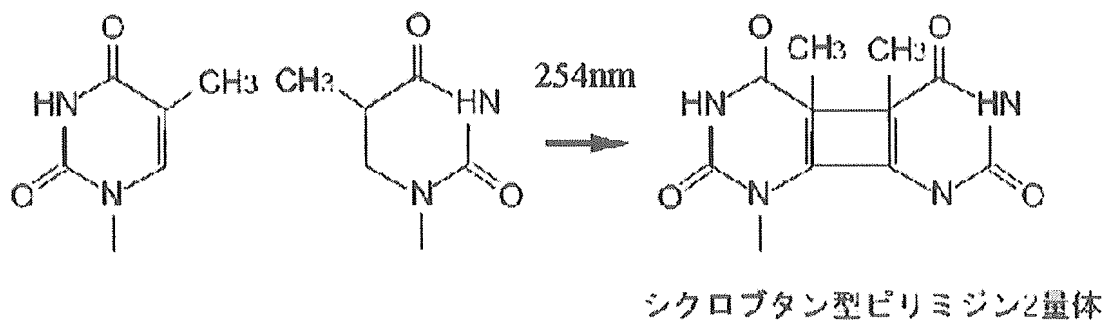


図1. シクロブタン型ピリミジン二量体の生成

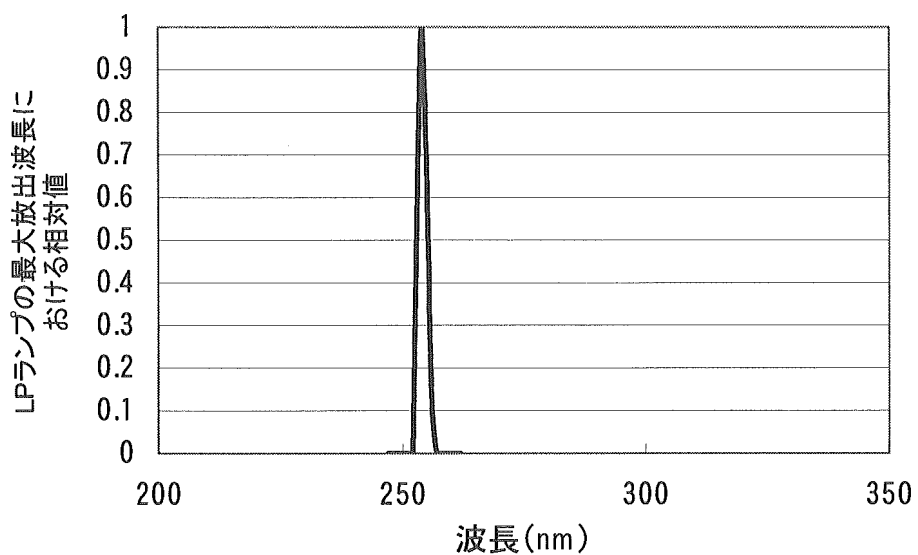


図2. LP UV の波長域

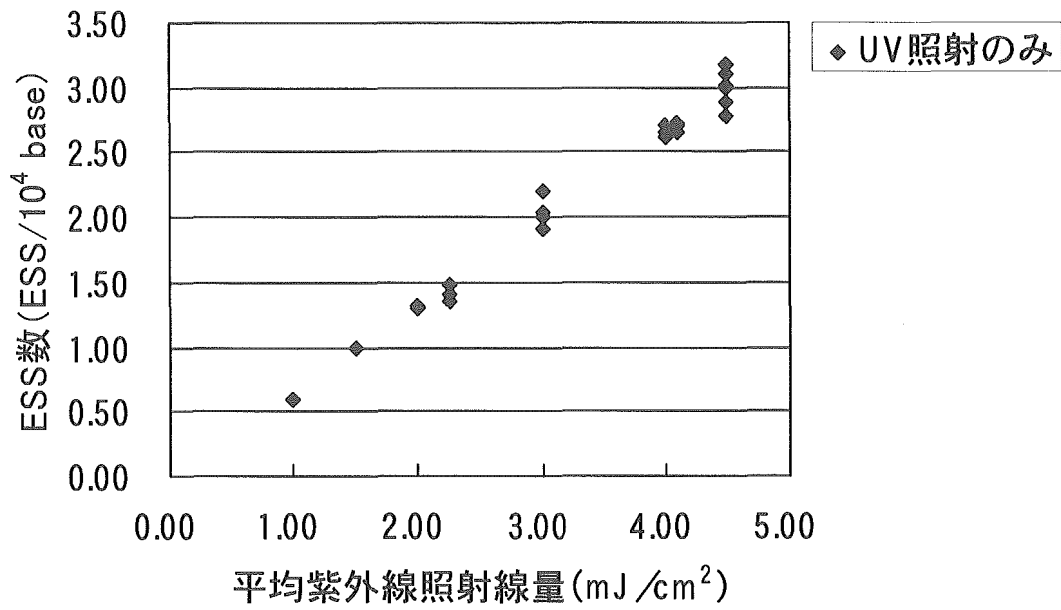


図3 平均紫外線照射線量と ESS 数の関係

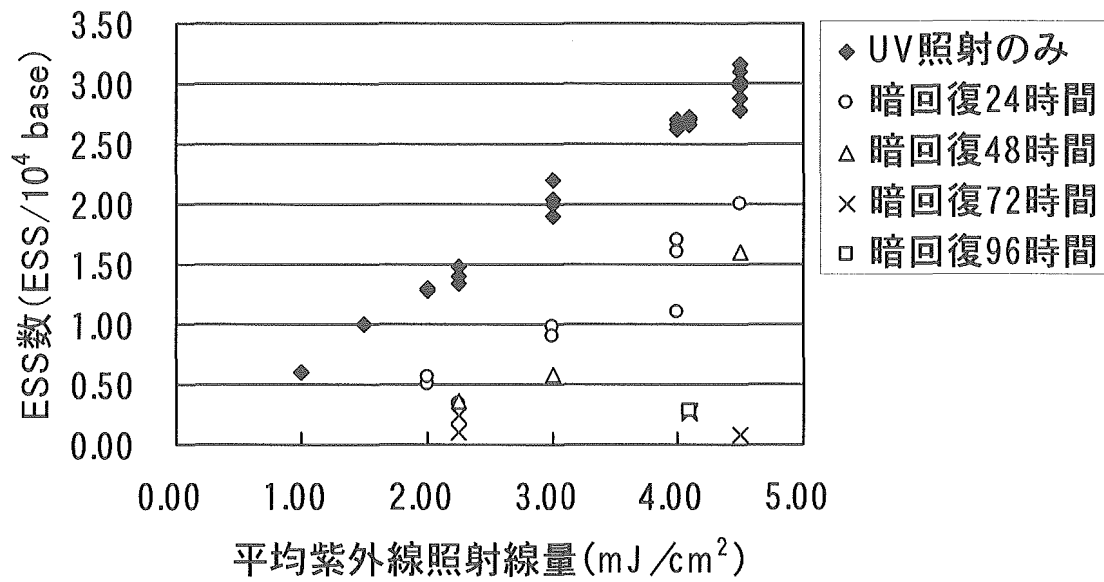


図4 平均紫外線照射線量と暗回復処理後の ESS 数の関係

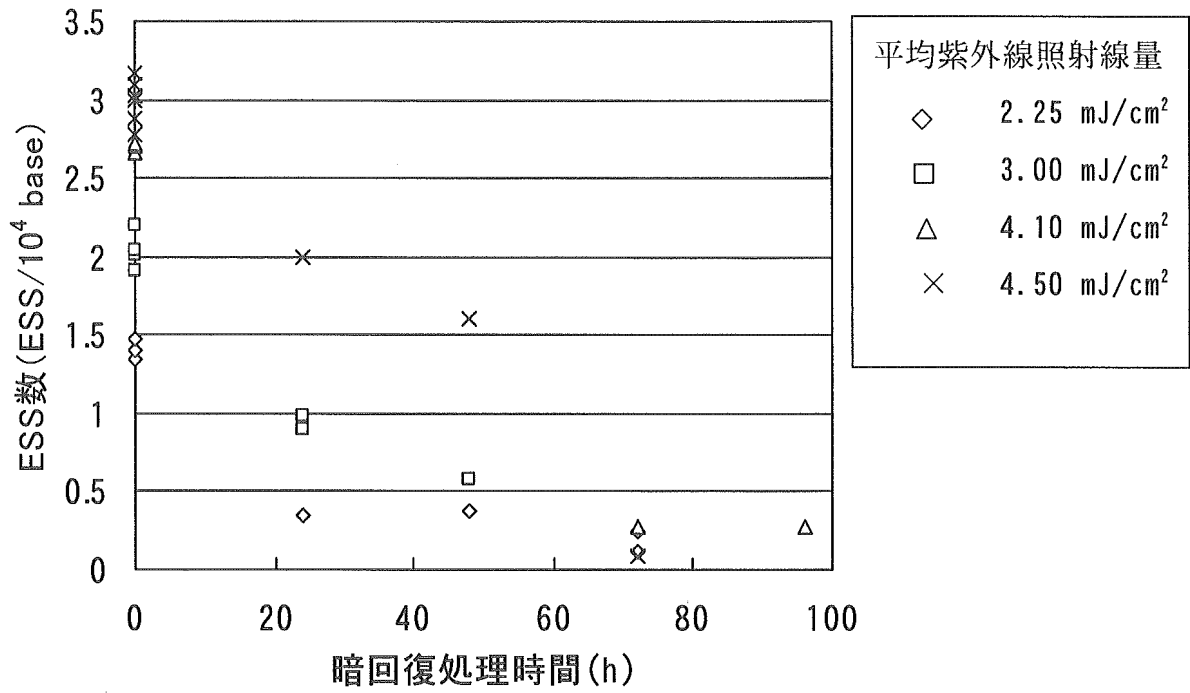


図5 暗回復処理時間と残存 ESS 数の関係

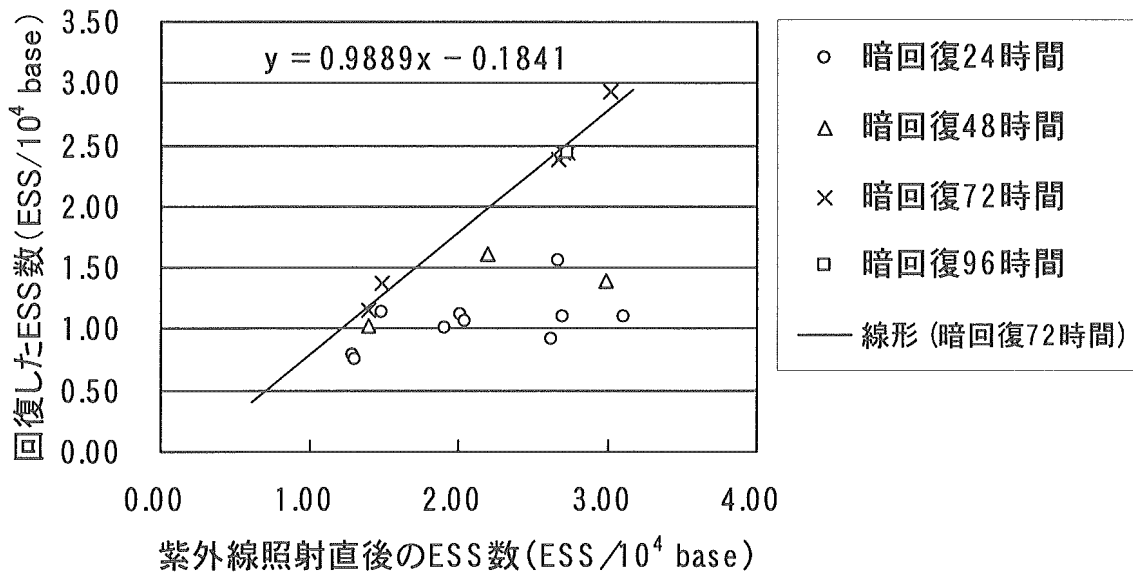


図6 紫外線照射直後の ESS 数と暗回復した ESS 数の関係

表1 ESS実験の結果

平均UV照射線量 (mJ/cm ²)	ESS数(ESS/10 ⁴ base)				実験日
	UV照射のみ	暗回復24時間	暗回復48時間	暗回復72時間	
2.00	1.29	0.50			8.3
3.00	2.01	0.90			8.3
4.00	2.62	1.70			8.3
2.00	1.31	0.55			8.3
3.00	2.04	0.98			8.3
4.00	2.66	1.10			8.3
4.50	2.88				8.3
2.25	1.35				8.19
4.50	2.78				8.19
3.00	2.20		0.58		9.2
1.00	0.60				9.8
4.50	3.17				9.8
1.50	1.00				9.8
2.25	1.40		0.37		9.17
4.50	2.99		1.60		9.17
2.25	1.40			0.25	9.17
2.25	1.48	0.34			9.23
4.50	3.10	2.00			9.23
3.00	1.91	0.90			10.15
4.00	2.70	1.60			10.15
2.25	1.48			0.11	11.2
4.50	3.02			0.08	11.2
4.10	2.66			0.27	11.20
4.10	2.72			0.28	11.20
4.10	2.70			0.27	11.20
4.10	2.72				11.20
				0.28	11.20

2-2

中圧紫外線による*Cryptosporidium parvum* HNJ-1オーシスト
の不活化とDNA損傷の光回復・暗回復

中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

分担研究者 平田 強（麻布大学環境保健学部 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

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。また、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。

LPUV 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 $0.1\sim 0.8$ ($/10^4$ base) の範囲にあって、ほぼ一定値（平均で $0.4/10^4$ base）となる傾向が認められた。

LPUV 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 ($/10^4$ base) を超えると、ESS の回復数はほぼ一定の上限值 ($1.5\sim 2/10^4$ base) となった。

1. はじめに

塩素は水処理において使用されている最も一般的で有効な消毒剤であり、水道では唯一の消毒剤として使用されている。しかし、近年、塩素に著しい耐性を示す *Cryptosporidium* による水系感染症の発生（Atherton *et al.*, 1995 ; Fox and Lytle, 1996）を契機に、塩素耐性の病原微生物に対する安全性の確保が問われている。

Cryptosporidium は孢子虫類のкокシジウム目に属する寄生性原虫で、環境中では長径 $4\sim 6$ μm のオーシストの形態をとる。また、強固で厚いオーシスト壁を持つため、塩素に著しい耐性を示す。このため、一般の水道の消毒で用いられている塩素濃度および接触時間では不活化は事実上期待できず（志村ら, 2000）, 塩素消毒を補完する消毒法として、オゾンや紫外線処理などが検討されている。中でも紫外線消毒は消毒副生成物が生じず、ランニングコストが安価、維持管理が容易であるなどのメリットを有する。

Cryptosporidium parvum に対する低圧紫外線（LPUV）の不活化力を実験動物や培養細胞を用いて判定した結果、 2 mJ/cm^2 で 1.7 log （MDCK 細胞, Shin *et al.*, 2001）, 1 mJ/cm^2 で 2.0 log （SCID マウス, Morita *et al.*, 2002）不活化されたと報告されている。また、中圧紫外線（MPUV）では、 3 mJ/cm^2 で 3.4 log （CD-1 マウス, Clancy *et al.*, 2000）, 1 mJ/cm^2 で 3.8 log （HCT-8 細胞, Zimmer *et al.*, 2003）不活化されたと報告されており、極めて低い照射線量で *C. parvum* を不活化出来ることが明らかとなってきた。欧米ではすでに一部の上水施設で紫外線消毒装置が

導入されており、塩素消毒を補完する消毒方法として非常に有効であると考えられている。また、下水処理では塩素消毒の副生成物である有機塩素化合物や残留塩素による人体や放流先の生態系に及ぼす影響に対する関心の高まりから、紫外線による消毒法の実用化が進んでおり、わが国でも一部の施設で稼働している。

紫外線が生物を不活化する作用機序は生物の核酸が紫外線を吸収し、光産物（DNA 損傷）を生成することによる。核酸は 220~300 nm（UV-B, UV-C）の波長域を吸収し、核酸塩基のピリミジンやプリンが光化学反応を起こすことで DNA 損傷をもたらす。DNA 損傷の大部分がピリミジン二量体であり、ピリミジン二量体にはシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）と（6-4）光産物がある（Harm, 1980）。シクロブタン型ピリミジン二量体は隣り合ったピリミジン塩基（チミン：T またはシトシン：C）の 6 位の炭素と 5 位の炭素どうしが共有結合して生じ、ピリミジン二量体のうち、約 80% を占める。結合する塩基の比率は、T-T : T-C : C-T : C-C = 68 : 16 : 13 : 3 との報告がある（Mitchell *et al.*, 1992）。一方、（6-4）光産物は隣り合ったピリミジン塩基の 6 位の炭素と 4 位の炭素が共有結合して生じ、ピリミジン二量体の約 20% の割合を占める（Mitchell and Nairn, 1989）。これらの損傷は DNA の複製を阻害する結果、不活化を招く。しかし、生物は紫外線によって受けた損傷を光回復や暗回復によって修復する機構を持っている。光回復は古細菌や真核生物、植物など、幅広い生物で確認されており（三谷, 嶋, 1989）、光回復酵素が 300~500 nm の光エネルギーを利用し、ピリミジン二量体の共有結合を解離することで修復する。一方、暗回復は光エネルギーを必要とせず、主に損傷部位の除去または組替えで修復する。このような修復作用により、紫外線による消毒効果が低減する恐れがあることから、紫外線消毒で十分な効果を得るためには光回復および暗回復の評価が重要となる。

Oguma *et al.* (2002) は、LPUV を照射した *E. coli* (IFO 3301) は DNA レベルでもコロニー形成能（CFA）でも光回復したが、MPUV ランプを用いて 200~580 nm の紫外線を照射した *E. coli* は DNA レベルでも CFA でも有意な光回復は見られないと報告している。また、Zimmer and Slawson (2002) は、MPUV 照射した *E. coli* (ATCC 11229) は CFA において、有意な光回復および暗回復は認められず、MPUV は回復を抑制する点で LPUV より有利であると報告している。しかし、回復能力は生物種や株間で異なり（Liltved and Landfald, 1996；土佐ら, 1997；Sommer *et al.*, 2000）、指標細菌や病原微生物に対しては個々に回復現象を評価することが望ましい。

LPUV ランプから放出される 254 nm の紫外線を *C. parvum* に照射し、Endonuclease Sensitive Site（ESS）法で評価をすると、光回復および暗回復することが確認されている（Oguma *et al.*, 2002, Morita *et al.*, 2002）が、データ数は少なく、再現性が良好でない。また、MPUV ランプから放出される広域な波長の紫外線を照射した *C. parvum* の回復についてはまだ検討されていない。そこで、本研究では MPUV 照射により生成されたピリミジン二量体数とその光回復および暗回復の有無および程度を ESS 法で評価した。また、LPUV でも実験を行い、生成されたピリミジン二量

体数とその光回復および暗回復について MPUV と比較検討した。

2. 材料と方法

2. 1 供試 *C. parvum* オーシスト

供試 *C. parvum* オーシストは井関基弘博士（金沢大学医学部）より分与されたヒト分離由来である HNJ-1 株を Scid (CB-17.1cr, 日本クレア) マウスで継代維持して用いた。供試 *C. parvum* オーシストはマウスの糞便からスクロース密度勾配遠心分離法により精製分離し、150 mM リン酸塩緩衝液中で保存したものを供試 *C. parvum* オーシスト懸濁液とした。精製より 1 ヶ月以内の *C. parvum* オーシストを試験に供した。

2. 2 紫外線ランプ

LPUV 照射には 5 W LPUV ランプ (QCGL5W-14 97D, 岩崎電気) を、MPUV 照射には 330 W MPUV ランプ (B410MW, 荏原製作所) を用いた。図 1 および図 2 に放出スペクトルを示す。LPUV ランプは 253.7 nm にピークを持ち、放出波長幅は極めて狭い。一方、MPUV ランプから放出される波長は 200 nm から 350 nm 以上まで広域に渡る。

2. 3 紫外線照射線量率の測定方法

LPUV および MPUV の照射線量率は紫外線積算光量計 (UIT-150 S254, ウシオ電機) を用いて測定した。図 3 に光量計の相対分光感度と DNA 吸収スペクトル (Sonntag, 1986) を示す。MPUV ランプの放出波長は広域に渡るが、本研究で用いた光量計は DNA 吸収スペクトルに近い分光感度を持つため、DNA に作用する波長域とほぼ同様な光エネルギーを測定していることになる。

2. 4 可視光線照射線量率の測定方法

可視光線の照射線量率は 360 nm 付近で測定した。測定には紫外線強度計 (UVR-1, トプコン) を用いた。

2. 5 紫外線照射

紫外線照射には 5W LPUV ランプまたは 330 W MPUV ランプを組み込んだ紫外線照射装置 (荏原製作所) を用いた。φ56 mm プラスチックシャーレに 10 mL の滅菌水道水を入れた後、 2×10^7 個の *C. parvum* オーシストを懸濁し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら試料の上方より紫外線を照射した。試料液表面での紫外線照射線量率は LPUV ランプを用いた照射では 0.10 mW/cm², MPUV ランプを用いた照射では 0.95~1.40 mW/cm² とした。紫外線照射線量 (mJ/cm²) は紫外線照射線量率 (mW/cm²) と照射時間 (s) の積とした。

1 照射条件につき、3 つの *C. parvum* オーシスト懸濁液を紫外線照射した。1 つは紫外線照射直後の試料として 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。また、残りのうち 1 つは光回復処理を、1 つは暗回復処理を行った。

2. 6 回復処理

(1) 光回復処理

紫外線照射後の *C. parvum* オースト懸濁液をマグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら、上方から 15 W 蛍光灯（メロウホワイト FL15N, 東芝）を用いて可視光線を照射した。試料表面における可視光線の照射線量率を 0.05 または 0.10 mW/cm² とし、インキュベータ内で試料水温を 20℃ に維持した。光回復処理は 2 時間とした。光回復処理後、試料を 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。なお、本研究では可視光線照射線量率 0.05 または 0.10 mW/cm² の 2 通りの実験を行ったが、どちらの線量率でも十分な回復が生じており、回復率に違いがないことを確認している。

(2) 暗回復処理

紫外線照射後の *C. parvum* オースト懸濁液をアルミ箔で遮光した 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。インキュベータ内で試料水温を 20℃ に維持し、24 時間静置した。

2. 7 ESS 法

(1) ESS 法の原理

UV エンドヌクレアーゼはピリミジン二量体に特異的に作用し、一本鎖切断を引き起こす酵素である。Endonuclease Sensitive Site (ESS) 法では紫外線照射した DNA を UV エンドヌクレアーゼ処理し、一本鎖切断が引き起こされた箇所を ESS とする。UV エンドヌクレアーゼ処理した DNA をアルカリ条件で電気泳動することにより、二本鎖 DNA が一本鎖に解離し、ESS 数に応じて DNA が断片化される。従って、ESS 数が多いサンプルほど電気泳動後のバンドがスミアになる (図 4)。電気泳動後、ゲルの蛍光画像からサンプル DNA の蛍光強度と相対移動距離の分布が得られる。蛍光強度はサンプル DNA の量を反映するため、蛍光強度を積分した値はサンプル DNA の総量となる。総 DNA の中央値にあたる移動距離をサンプル DNA の代表値とし、マーカーの移動距離と DNA 塩基数の関係式からサンプル DNA の塩基数中央値 (L_{med}) を算出する。 L_{med} と (1) 式 (Veatch and Okada, 1969) から損傷 DNA を断片化した時の塩基数平均値 (L_n) を求める。

$$L_n = 0.6 \times L_{med} \quad (1)$$

L_n : 塩基数平均値

L_{med} : 塩基数中央値

また、1 塩基当たりの ESS 数は (2) 式 (Freeman *et al.*, 1986) から求めることができる。

$$\frac{ESS}{base} = \frac{1}{L_{n(+uv)}} - \frac{1}{L_{n(-uv)}} \quad (2)$$

$L_{n(+uv)}$: 紫外線照射したサンプル DNA の L_n

$L_{n(-uv)}$: 紫外線未照射のサンプル DNA の L_n

(2) 測定および解析方法

紫外線照射と光回復および暗回復処理を行った試料を遠心濃縮（1,050×g, 15 min）した後、沈渣を3回凍結融解（-80℃15分, 80℃）し、*C. parvum* オースト壁を破碎した。DNA抽出キット（Genomic-tip, QIAGEN）を用いて *C. parvum* から DNA を抽出（平均 DNA サイズ：100 k base）し、抽出 DNA を膜濃縮キット（Centricon, Millipore）で遠心濃縮した。抽出 DNA は UV エンドヌクレアーゼ緩衝液（30 mM Tris(pH 8.0), 40 mM NaCl, 1 mM EDTA）で3回遠心洗浄し、ESS測定に供した。

UV エンドヌクレアーゼ（*Micrococcus luteus* 由来）を抽出 DNA に添加し、37℃で45分間反応後、アルカリダイ（最終濃度が 100 mM NaOH, 1 mM EDTA, 2.5% Ficol, 0.05% bromocresol green）を加え、反応を止めた。0.5%アルカリアガロースゲル（0.5% Agarose H（日本ジーン）, 30 mM NaOH, 1 mM EDTA）にサンプルを1ウェルごとに添加し、アルカリ緩衝液（30 mM NaOH, 1 mM EDTA）で満たした電気泳動槽を用いて 0.5 V/cm で17時間電気泳動した。また、マーカーとして 8GT

（T4GT7+T4GT7/*Bgl* II digest mixture, WAKO）をサンプルと同条件で電気泳動した。泳動後のゲルは 0.5 μg/mL のエチジウムブロマイド溶液（WAKO）に浸漬し、5時間染色した。染色後、ゲルの蛍光画像を CCD カメラ（GelDoc 2000, BIORAD）で取り込み、画像解析ソフトウェア（Quantity One, BIORAD）を用いて解析した。ゲルの蛍光画像を解析する上で用いるバックグラウンドはサンプル泳動レーンをはさむ両隣の泳動レーン（サンプルを流していない）の平均値とした。総 DNA の中央値にあたる移動距離をマーカーの移動距離と DNA 塩基数の関係式に挿入し、サンプル DNA の L_{med} を算出した。この値から(1)式と(2)式を用いて、1塩基当たりの ESS 数を算出し、 1×10^4 塩基当たりの ESS 数で示した。また、ESS 回復率は(3)式から求めた。

$$ESS_r = 1 - \frac{ESS_t}{ESS_{UV}} \quad (3)$$

ESS_r : ESS 回復率

ESS_t : 回復処理後の ESS 数 (/10⁴ base)

ESS_{UV} : 紫外線照射による生成 ESS 数 (/10⁴ base)

3. 結果および考察

紫外線照射線量と UV 照射直後、光回復および暗回復処理後の ESS 数の関係を、LPUV は図 5 に、MPUV は図 6 に示す。また、結果を表 1~6 に示す。

3. 1 紫外線照射線量と ESS 数の関係

図 7 に LPUV と MPUV の紫外線照射線量と生成 ESS 数の関係を示す。LPUV および MPUV 共に、本研究の実験範囲内では生成 ESS 数が直線的に増加した。LPUV および MPUV の回帰式を以下に示す。

$$\text{LPUV} : \text{ESS}_{\text{UV}} = 0.72D - 0.11 \quad (r^2 = 0.98) \quad (4)$$

$$\text{MPUV} : \text{ESS}_{\text{UV}} = 0.61D - 0.07 \quad (r^2 = 0.93) \quad (5)$$

D : 紫外線照射線量 (mJ/cm²)

どちらの場合も紫外線照射線量と生成 ESS 数の間にはよい相関 ($r^2=0.9753$ および $r^2=0.9335$) が得られたが、MPUV の単位線量当たりの生成 ESS 数は LPUV より約 16 %低くかった。

紫外線を用いた不活化研究において、紫外線照射線量の算出方法はランプの放出エネルギーを物理的に測定する紫外線照射線量率計 (Clancy *et al.*, 2000b ; Mofidi *et al.*, 2001) や、特定の化学物質が吸収した線量を算出する化学線量計 (Linden and Darby, 1998) , 指標生物の不活化の度合いから生物が吸収した線量を算出する生物線量計 (Kamiko and Ohgaki, 1989) など、研究者によって様々である。また、Zimmer *et al.* (2002) や Craik *et al.* (2001) は紫外線照射線量率計での測定値を DNA 吸収スペクトルで補正した紫外線照射線量で評価している。ここで、本研究でも DNA 吸収スペクトルで補正した紫外線照射線量で評価すると回帰式は、

$$\text{LPUV} : \text{ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.11 \quad (r^2 = 0.98) \quad (6)$$

$$\text{MPUV} : \text{ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.07 \quad (r^2 = 0.93) \quad (7)$$

D_w : 補正した紫外線照射線量 (mJ/cm²)

となり、LPUV と MPUV の傾きに違いは認められず、単位線量当たりの生成 ESS 数が一致した。図 8 に、補正した紫外線照射線量と生成 ESS 数の関係を LPUV と MPUV の結果を合わせて示す。また、回帰式を以下に示す。

$$\text{ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.10 \quad (r^2 = 0.97) \quad (8)$$

DNA 吸収スペクトルを考慮した紫外線照射線量で評価すれば、LPUV と MPUV で単位線量当たりの生成 ESS 数は一致し、(8)式を用いることで、紫外線照射した *C. parvum* に生成される ESS 数を推定することができると思われる。

紫外線照射線量に対する生成 ESS 数とマウス感染法による相対感染力の関係を図 9 に示す。図 9 に示したデータは LPUV のみの結果であり、マウス感染試験は本研究と同時に行ったデータではないが、ほぼ同条件下で行ったものである (Morita *et al.*, 2002) 。ESS が約 0.3 (/10⁴ base) 生成されるごとに感染力が 1/10 に減少しており、ピリミジン二量体数と感染力の喪失の程度が強く関連している。

*E. coli*とLPUVを照射した*C. parvum*の生成ESS数を比較すると、*C. parvum*の単位線量当たりのESS数は0.7 (/10⁴ base/mJ·cm²)であり、*E. coli*の0.4 (/10⁴ base/mJ·cm²) (Oguma *et al.*, 2001)の約1.8倍であり、*E. coli*よりも*C. parvum*は紫外線に感受性が高いことになる。*C. parvum*のスプロゾイトは厚いオーシスト壁に保護され、化学消毒剤に対しては著しい耐性を示すが、紫外線はオーシスト壁を容易に透過し、スプロゾイトの核酸に損傷を引き起こす。これが、紫外線が*C. parvum*に対して有効な消毒方法となる理由と考えられる。

3. 2 ESSの光回復

図5および6より、LPUVおよびMPUVを照射した*C. parvum*を光回復処理すると、いずれも明らかなESS数の減少が確認できる。LPUVを照射した場合の残存ESS数は紫外線照射線量にかかわらず0.13~0.80 (/10⁴ base)となった。これは、同じHNJ-1株オーシストで行ったOguma *et al.* (2001), Morita *et al.* (2002)の結果と同様であった。また、MPUVを照射した場合の残存ESS数は紫外線照射線量にかかわらず0.18~0.51 (/10⁴ base)となった。光回復後の残存ESS数はいずれの紫外線を照射した場合でも紫外線照射線量(生成ESS数)に関係なくほぼ一定値(平均で約0.4/10⁴ base)となった。*E. coli*では、LPUVを照射した場合はESSの減少が認められたが、MPUVを照射した場合はESS数の減少は認められないとされているが(Oguma *et al.*, 2002), *C. parvum*ではLPUVとMPUVで差は認められなかった。

LPUVおよびMPUV照射による生成ESS数とESSの回復数の関係を図10に示す。ESSの回復数は生成ESS数が増加するに従って増加し、LPUVとMPUVで違いは認められなかった。LPUVとMPUVを合わせた結果の回帰式を以下に示す。

$$ESS_{\text{rep}} = 1.09ESS_{\text{UV}} - 0.65 \quad (r^2 = 0.97) \quad (9)$$

ESS_{rep} : ESSの回復数 (/10⁴ base)

ESS_{UV} : 紫外線照射による生成ESS数 (/10⁴ base)

(9)式から、生成ESS数が約0.6 (/10⁴ base)以下では、回復処理してもESS数が減少しない。また、傾きがほぼ1となったことから、回復処理後も残存するESS以外はほぼ100%修復している。

以上の結果から、紫外線照射によって*C. parvum*に生じるピリミジン二量体には光回復で修復できる二量体とできない二量体があること、光回復で修復できない二量体は少量の紫外線照射で速やかに生じ、紫外線照射線量の増加に伴って光回復で修復できる二量体が増加するものと考えられる。

3. 3 ESSの暗回復

図5および6より、LPUV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数の減少が確認できる。暗回復後の残存ESS数にLPUVとMPUVによる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。

図 11 に LPUV および MPUV 照射による生成 ESS 数と回復率の関係を示す。図中には Oguma *et al.* (2001) のデータも示す。ESS 回復率は生成 ESS 数が増加するに従って直線的に低下した。

図 12 に LPUV および MPUV 照射による生成 ESS 数と ESS の回復数の関係を示す。図中には Oguma *et al.* (2001) のデータも示す。生成 ESS 数が約 2.5 ($/10^4$ base) までは原点付近から生成 ESS 数の増加に従って、ESS の回復数も増加した。生成 ESS 数が約 2.5 ($/10^4$ base) 以上の時は ESS の回復数が 1.5~2.0 ($/10^4$ base) でほぼ一定となり、それ以上の回復は認められなかった。

光回復では(9)式から、生成 ESS 数が約 0.6 ($/10^4$ base) 以下の場合、回復処理しても ESS 数が減少しない。しかし、暗回復では生成 ESS 数が少ない程 ESS 回復率は高く (図 11) , 生成 ESS 数が約 0.6 ($/10^4$ base) 以下の場合でも ESS を減少する傾向が認められた (図 12) 。このことから、生成 ESS 数が少ない範囲のデータ数が少ないため推測に留まるが、暗回復では光回復処理後に残存する ESS を修復する可能性があると考えられる。

3. 4 ESS 法とマウス感染法

紫外線照射によって一度感染力を喪失した *C. parvum* は光回復および暗回復処理しても感染力を取り戻せない (Morita *et al.*, 2002) 。本研究の結果から、紫外線照射した *C. parvum* では、その後の光回復処理や暗回復処理により ESS 数が減少し、紫外線の主な損傷であるピリミジン二量体を明らかに修復している。しかし、どちらの回復処理を行っても全てのピリミジン二量体を修復することはなかった。このことから、ピリミジン二量体数が減少しているにもかかわらず、*C. parvum* の感染力の回復が認められないのは、光回復や暗回復では修復できずに残存するピリミジン二量体が DNA の完全な複製を阻害するためであると推測される。

4 結論

本研究では、MPUV 照射によって *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストに生成されたピリミジン二量体と、その光回復および暗回復の有無と程度を ESS 法で評価した。また、LPUV ランプを用いて同様に実験し、生成されたピリミジン二量体とその光回復および暗回復について比較検討した。その結果、以下の知見が得られた。

- 1) DNA 吸収スペクトルで補正した紫外線照射線量で評価すると、LPUV と MPUV で単位線量当たりの生成 ESS 数は一致し、補正紫外線照射線量 (D_w) と生成 ESS 数 (ESS_{UV}) の関係について次式を得た。

$$ESS_{UV} = 0.75D_w - 0.10 \quad (r^2 = 0.97)$$

- 2) MPUV 照射によって生じた ESS は、LPUV 照射したものと同様に、光回復および暗回復のいずれのプロセスでも減少した。
- 3) 光回復後の残存 ESS 数は、紫外線照射線量 (生成 ESS 数) に関係なく、ほぼ一定値 (平均で