

## 2. 方法

### 2.1 C.parvum oocysts

C.parvum strain : HNJ-1 (金沢大学、井関により単離)

### 2.2 UV 照射

### 2.3 蛍光線照射と暗状態への貯蔵

### 2.4 感染性

感染性は、麻布大学の生物科学研究所で無菌室で飼育された SCID マウスを用いて動物感染性により測定された。生後 5 週間の SCID マウスは新しい飼育箱への適応期間として 1 週間飼育してから試験に供した。

### 2.5 試験管内での脱囊

オーシストの生存能力は、Woodmansee の方法の変法により測定した。

TABLE 1. Summary of experimental conditions

Trial no.	UV intensity (mW/cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (s)	UV dose (mWs/cm <sup>2</sup> )	Temp (°C)	Evaluation method <sup>a</sup>
1	0.24	5	1.20	5	AI
2	0.24	5	1.20	10	AI
3	0.24	5	1.20	30	AI
4	0.24	7	1.68	5	AI
5	0.24	7	1.68	10	AI
6	0.24	7	1.68	30	AI
7	0.24	10	2.40	5	AI
8	0.24	10	2.40	10	AI
9	0.24	10	2.40	30	AI
10	0.048	25	1.20	20	AI
11	0.12	10	1.20	20	AI
12	0.60	2	1.20	20	AI
13	0.048	38	1.82	20	AI
14	0.12	15	1.80	20	AI
15	0.60	3	1.80	20	AI
16	0.048	50	2.40	20	AI
17	0.12	20	2.40	20	AI
18	0.60	4	2.40	20	AI
38	0.24	167	40.0	20	Ex
39	0.24	167	40.0	20	Ex
40	0.24	333	80.0	20	Ex
41	0.24	333	80.0	20	Ex
42	0.24	500	120	20	Ex
43	0.24	500	120	20	Ex
44	0.24	667	160	20	Ex
45	0.24	667	160	20	Ex
46	0.24	1,000	240	20	Ex
47	0.24	1,000	240	20	Ex
C-1 <sup>b</sup>		Not irradiated			AI
C-2		Not irradiated			AI
C-3		Not irradiated			AI
C-4		Not irradiated			AI

<sup>a</sup> AI, animal infectivity; Ex, in vitro excystation.

<sup>b</sup> C, Control samples for MPN<sub>h</sub> in animal infectivity.

TABLE 2. Experimental conditions of UV irradiation and subsequent recovery treatments

Trial no.	UV intensity (mW/cm <sup>2</sup> )	Irradiation time (s)	UV dose (mWs/cm <sup>2</sup> )	Temp (°C)	Treatment after UV irradiation		Evaluation <sup>b</sup>
					FL <sup>a</sup> dose (mWs/cm <sup>2</sup> )	Storage duration (h)	
19	0.10	5	0.50	20	Not treated		AI, ESS
20	0.10	5	0.50	20	150		AI, ESS
21	0.10	5	0.50	20	300		AI, ESS
22	0.10	5	0.50	20		12	AI, ESS
23	0.10	5	0.50	20		24	AI, ESS
24	0.10	10	1.00	20	Not treated		AI, ESS
25	0.10	10	1.00	20	150		AI, ESS
26	0.10	10	1.00	20	300		AI, ESS
27	0.10	10	1.00	20		12	AI, ESS
28	0.10	10	1.00	20		24	AI, ESS
29	0.10	15	1.50	20	Not treated		AI, ESS
30	0.10	15	1.50	20	Not treated		AI, ESS
31	0.10	15	1.50	20	180		AI, ESS
32	0.10	15	1.50	20	360		AI, ESS
33	0.10	15	1.50	20	540		AI, ESS
34	0.10	15	1.50	20	720		AI, ESS
35	0.10	15	1.50	20		4	AI, ESS
36	0.10	15	1.50	20		12	AI, ESS
37	0.10	15	1.50	20		24	AI, ESS

<sup>a</sup> FL, fluorescent light.

<sup>b</sup> AI, animal infectivity.

## 2.6 ESS 試験

*C.parvum* の懸濁液は、液体窒素で3分間凍結し、それからオーシストの殻を破碎するため95°Cで5分間加熱し解凍した。

DNAはGenomic-tip DNA抽出キットを用いて抽出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 UV照射の効果

経口投与したオーシストの数、マウスへの感染率、MPN、95%信頼区間、相対的感染は、Table 3に示されている。

TABLE 3. Summary of *C. parvum* infectivity in SCID mice for each trial

Trial no. <sup>a</sup>	Inoculum <sup>b</sup> (no. of positive mice/total no. of mice)	MPN	95% confidence interval	Relative infectivity
C-1	9 (1/5), 49 (3/4), 203 (4/5), 1,010 (5/5)	$1.33 \times 10^{-2}$	$5.56 \times 10^{-3}$ to $3.19 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^0$
1	149 (1/5), 745 (3/5), 3,725 (5/5), 18,625 (5/5)	$1.63 \times 10^{-4}$	$5.45 \times 10^{-5}$ to $4.90 \times 10^{-4}$	$1.23 \times 10^{-2}$
2	126 (0/3), 630 (0/3), 3,150 (0/3), 15,750 (2/3), 78,750 (3/3)	$5.33 \times 10^{-5}$	$1.72 \times 10^{-5}$ to $1.65 \times 10^{-4}$	$4.01 \times 10^{-3}$
3	122 (0/3), 608 (0/3), 3,038 (0/3), 15,188 (1/3), 75,938 (3/3)	$3.37 \times 10^{-5}$	$1.13 \times 10^{-5}$ to $1.01 \times 10^{-4}$	$2.53 \times 10^{-3}$
8	127 (0/3), 634 (0/3), 3,169 (0/3), 15,844 (0/3), 79,219 (1/3)	$3.91 \times 10^{-7}$	$5.62 \times 10^{-8}$ to $2.72 \times 10^{-6}$	$2.94 \times 10^{-5}$
10	120 (0/3), 600 (0/3), 3,000 (0/3), 15,000 (2/3), 75,000 (3/3)	$5.60 \times 10^{-5}$	$1.81 \times 10^{-5}$ to $1.74 \times 10^{-4}$	$4.21 \times 10^{-3}$
11	120 (0/3), 600 (1/3), 3,000 (2/3), 15,000 (2/3), 75,000 (3/3)	$1.54 \times 10^{-4}$	$5.16 \times 10^{-5}$ to $4.63 \times 10^{-4}$	$1.16 \times 10^{-2}$
12	144 (0/3), 720 (1/3), 3,600 (3/3), 18,000 (3/3), 90,000 (3/3)	$7.15 \times 10^{-4}$	$2.38 \times 10^{-4}$ to $2.15 \times 10^{-3}$	$5.38 \times 10^{-2}$
17	126 (0/3), 631 (0/3), 3,156 (0/3), 15,781 (0/3), 78,906 (1/3)	$3.93 \times 10^{-7}$	$5.65 \times 10^{-8}$ to $2.74 \times 10^{-6}$	$2.95 \times 10^{-5}$
18	149 (0/3), 746 (0/3), 3,731 (0/3), 18,656 (3/3), 93,281 (3/3)	$8.66 \times 10^{-6}$	$2.82 \times 10^{-6}$ to $2.66 \times 10^{-5}$	$6.51 \times 10^{-4}$
C-2	5 (0/8), 24 (1/8), 121 (4/5), 604 (5/5)	$9.49 \times 10^{-3}$	$4.14 \times 10^{-3}$ to $2.18 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^0$
4	5,625 (0/5), 28,125 (2/5), 140,625 (4/5), 703,125 (5/5)	$1.24 \times 10^{-5}$	$5.22 \times 10^{-6}$ to $2.97 \times 10^{-5}$	$1.31 \times 10^{-3}$
5	6,850 (0/5), 34,250 (3/5), 171,250 (3/5), 856,250 (5/5)	$8.74 \times 10^{-6}$	$3.62 \times 10^{-6}$ to $2.11 \times 10^{-5}$	$9.21 \times 10^{-4}$
6	6,088 (0/5), 30,438 (0/5), 152,188 (3/5), 760,940 (5/5)	$6.22 \times 10^{-6}$	$2.56 \times 10^{-6}$ to $1.51 \times 10^{-5}$	$6.55 \times 10^{-4}$
13	6,700 (2/5), 33,500 (2/5), 167,500 (3/5), 837,500 (5/5)	$1.04 \times 10^{-5}$	$4.34 \times 10^{-6}$ to $2.48 \times 10^{-5}$	$1.10 \times 10^{-3}$
14	6,700 (1/5), 33,500 (4/5), 167,500 (5/5), 837,500 (5/5)	$4.38 \times 10^{-5}$	$1.77 \times 10^{-5}$ to $1.09 \times 10^{-4}$	$4.62 \times 10^{-3}$
15	6,750 (0/5), 33,750 (0/5), 168,750 (1/5), 843,750 (5/5)	$2.54 \times 10^{-6}$	$1.08 \times 10^{-6}$ to $5.96 \times 10^{-6}$	$2.68 \times 10^{-4}$
C-3	9 (1/5), 39 (3/5), 203 (4/5), 1,010 (5/5)	$1.29 \times 10^{-2}$	$5.44 \times 10^{-3}$ to $3.04 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^0$
19	149 (1/5), 745 (3/5), 3,725 (5/5), 18,625 (5/5)	$1.35 \times 10^{-3}$	$5.44 \times 10^{-4}$ to $3.34 \times 10^{-3}$	$1.05 \times 10^{-1}$
20	134 (1/5), 670 (3/5), 3,350 (5/5), 16,750 (5/5)	$1.50 \times 10^{-3}$	$6.04 \times 10^{-4}$ to $3.72 \times 10^{-3}$	$1.16 \times 10^{-1}$
21	153 (1/5), 765 (3/5), 3,825 (5/5), 19,125 (5/5)	$1.31 \times 10^{-3}$	$5.29 \times 10^{-4}$ to $3.25 \times 10^{-3}$	$1.02 \times 10^{-1}$
22	155 (1/5), 776 (3/5), 3,880 (5/5), 19,400 (5/5)	$1.29 \times 10^{-3}$	$5.22 \times 10^{-4}$ to $3.21 \times 10^{-3}$	$1.00 \times 10^{-1}$
23	161 (1/5), 805 (3/5), 4,025 (5/5), 20,125 (5/5)	$1.25 \times 10^{-3}$	$5.03 \times 10^{-4}$ to $3.09 \times 10^{-3}$	$9.69 \times 10^{-2}$
24	269 (1/5), 1,345 (1/5), 6,725 (2/5), 33,625 (5/5)	$1.29 \times 10^{-4}$	$5.35 \times 10^{-5}$ to $3.12 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-2}$
25	805 (1/5), 4,025 (3/5), 20,125 (4/5), 100,625 (5/5)	$1.30 \times 10^{-4}$	$5.48 \times 10^{-5}$ to $3.06 \times 10^{-4}$	$1.01 \times 10^{-2}$
26	755 (2/5), 3,775 (2/5), 18,875 (4/5), 94,375 (5/5)	$1.33 \times 10^{-4}$	$5.64 \times 10^{-5}$ to $3.15 \times 10^{-4}$	$1.03 \times 10^{-2}$
27	759 (1/5), 3,794 (3/5), 18,970 (4/5), 94,850 (5/5)	$1.37 \times 10^{-4}$	$5.81 \times 10^{-5}$ to $3.25 \times 10^{-4}$	$1.06 \times 10^{-2}$
28	755 (1/5), 3,775 (3/5), 18,875 (4/5), 94,375 (5/5)	$1.38 \times 10^{-4}$	$5.84 \times 10^{-5}$ to $3.26 \times 10^{-4}$	$1.07 \times 10^{-2}$
C-4	8 (2/5), 40 (3/5), 250 (4/5), 1,350 (5/5)	$1.32 \times 10^{-2}$	$5.29 \times 10^{-3}$ to $3.30 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^0$
29	3,220 (0/5), 16,100 (0/5), 80,500 (3/5), 402,500 (5/5)	$9.45 \times 10^{-6}$	$3.95 \times 10^{-6}$ to $2.26 \times 10^{-5}$	$7.16 \times 10^{-4}$
30	3,170 (0/5), 15,850 (0/5), 79,250 (3/5), 396,250 (5/5)	$9.60 \times 10^{-6}$	$4.01 \times 10^{-6}$ to $2.30 \times 10^{-5}$	$7.27 \times 10^{-4}$
31	2,207 (0/5), 11,033 (1/5), 55,165 (1/5), 275,825 (5/5), 1,379,125 (5/5)	$9.74 \times 10^{-6}$	$4.15 \times 10^{-6}$ to $2.28 \times 10^{-5}$	$7.38 \times 10^{-4}$
32	2,265 (0/5), 11,325 (0/5), 56,625 (2/5), 283,125 (5/5), 1,415,625 (5/5)	$9.99 \times 10^{-6}$	$4.25 \times 10^{-6}$ to $2.35 \times 10^{-5}$	$7.57 \times 10^{-4}$
33	2,447 (0/5), 12,233 (0/5), 61,165 (2/5), 305,825 (4/4), 1,529,125 (5/5)	$8.87 \times 10^{-6}$	$3.61 \times 10^{-6}$ to $2.18 \times 10^{-5}$	$6.72 \times 10^{-4}$
34	2,500 (0/5), 12,500 (0/5), 62,500 (2/5), 312,500 (5/5), 1,562,500 (5/5)	$9.05 \times 10^{-6}$	$3.85 \times 10^{-6}$ to $2.13 \times 10^{-5}$	$6.86 \times 10^{-4}$
35	2,336 (0/5), 11,680 (0/5), 58,400 (2/5), 292,000 (5/5), 1,460,000 (5/5)	$9.69 \times 10^{-6}$	$4.12 \times 10^{-6}$ to $2.28 \times 10^{-5}$	$7.34 \times 10^{-4}$
36	2,253 (0/5), 11,266 (1/5), 56,330 (1/5), 281,650 (5/5), 1,408,250 (5/5)	$9.75 \times 10^{-6}$	$4.12 \times 10^{-6}$ to $2.31 \times 10^{-5}$	$7.39 \times 10^{-4}$
37	2,200 (0/5), 11,000 (1/5), 55,000 (3/5), 275,000 (4/5), 1,375,000 (5/5)	$9.32 \times 10^{-6}$	$3.98 \times 10^{-6}$ to $2.18 \times 10^{-5}$	$7.06 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> C-1, control for trials 1, 2, 3, 8, 10, 11, 12, 17, and 18; C-2, control for trials 4, 5, 6, 13, 14, and 15; C-3, control for trials 19 through 28; C-4, control for trials 29 through 37.

<sup>b</sup> Number of oocysts per mouse.

*C.parvum* オーシストの20□でのUV照射による感染性の減少はFig. 1に示されている。

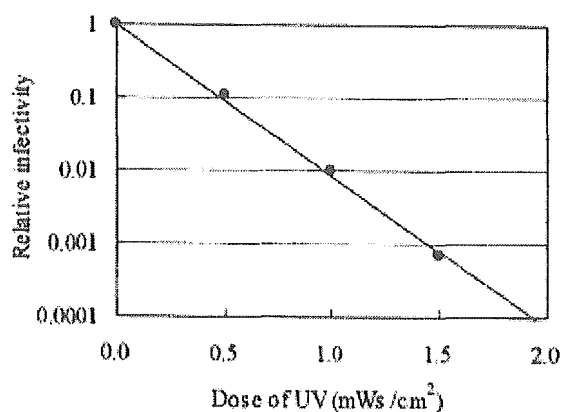


FIG. 1. Relationship between the relative infectivity of *C. parvum* oocysts and the UV irradiation dose.

*C. parvum* オーストの UV 処理による生存能力の減少を、脱嚢試験により測定した結果を Fig.2 に示す。

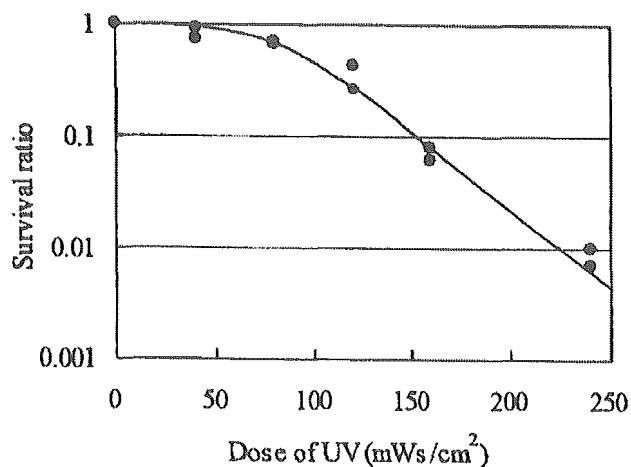


FIG. 2. Relationship between the survival ratio as assessed by in vitro excystation of *C. parvum* oocysts and the UV irradiation dose.

### 3.3 温度と強度の影響

様々な温度で測定された感染性の減少は、Fig.3 に示されている。

この結果から、温度については、5、10、30℃において、UV 照射線量の増加に対する相対的な感染性に関する影響は認められなかった。

### 3.4 UV 不活化後の *C. parvum* の光回復と暗回復

UV 照射による *C. parvum* オーストの感染性の減少は、永久的ではないかもしれない。なぜなら、ある種の微生物の DNA 障害は光回復又は暗回復により回復するかもしれない

Fig.6 に、UV により不活化されたオーシストを暗状態で様々な期間貯蔵した後の ESS の数を示している。

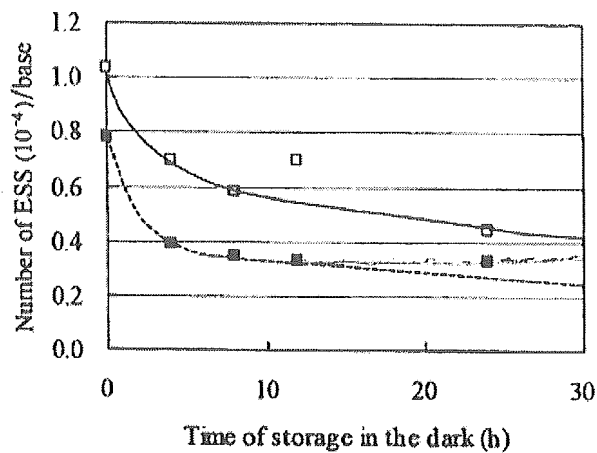


FIG. 6. Relationship between the number of ESSs and the duration of dark storage in UV-irradiated (at 0.50 or 1.00 mWs/cm<sup>2</sup>) *C. parvum* oocysts. Symbols: ■, 0.50 mWs/cm<sup>2</sup>; □, 1.00 mWs/cm<sup>2</sup>.

TABLE 5. Infectivity in SCID mice of *C. parvum* oocysts stored in the dark after UV inactivation

UV irradiation dose (mWs/cm <sup>2</sup> )	Storage duration (h)	Log <sub>10</sub> reduction
0.50	0	0.98
0.50	12	1.00
0.50	24	1.01
1.00	0	2.00
1.00	12	1.97
1.00	24	1.97
1.50	0	3.15
1.50	4	3.13
1.50	12	3.13
1.50	24	3.15

中圧紫外線による飲料水中の *Giardia* の不活化Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water

Stephen A. Craik ら

## 1. 概要

Ontario 州の Grand 川の表流水を用いて、*Giardia muris* に中圧紫外線を用いて照射実験を行った。C3h/HeN マウスを用いた感染性試験では、紫外線照射線量  $5\sim 83\text{mJ}/\text{cm}^2$  にて、 $2\sim 3\log$  の不活化が得られた。動物感染試験法に比べ、脱嚢法や核酸染色法での不活化率はかなり低く評価された。

## 2. 実験方法

## 2-1 紫外線照射装置

実験は、室温を  $20\sim 22$  度に保持した実験室内でおこない、Ontario 州の Mannheim 浄水場の浄水をろ過した水を使用しておこなった。本浄水場は、Grand 川の河川水に対して前オゾン処理、凝集沈澱処理、急速ろ過処理を行っている。紫外線照射装置は直径 6cm、高さ 93cm の紫外線ランプを用い、28cm 離れた場所に、ペトリ皿を設置し、紫外線を照射した。試水は 20ml であり、液面の高さは 8mm であり、直径 3mm 長さ 10mm のマグネチックスターラーにより攪拌を行った。

## 2-2 紫外線照射線量の測定

紫外線照射線量は SED240 UV 検出器を備えた線量計(International Light, Model IL1400A)を用いて、ペトリ皿の中心表面を各実験終了後、直ちに測定を行った。照射線量は、例外を除き、ほぼ同じ値であった。

## 2-3 ジアルジア

*Giardia muris* は、Roberts-Thomson らが、ゴールデンハムスターより単離し、隔週で 4~5 週令の雌の CD-1 マウス若しくは 8~11 週令の C3h/Hen マウスにより継体培養したものである。Cyst は感染後、4~14 日以内に糞便より回収した。Cyst を単離するため、回収した糞便は超純水及び 1M スクロースを用いて、 $400\times g$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 5 分間の遠心分離をおこなった。その後、水—スクロース層から、cyst を回収した。Cyst 数は血球計算板法を用いて行った。紫外線照射実験時は、回収後 48 時間以内に実験を行った。

実験は  $1.5\times 10^6$  若しくは  $3.0\times 10^6$  このジアルジアシストを  $0.5\sim 1.5\text{ml}$  添加し、2 分間の紫外線照射を行った。その後、試水を 50ml の遠心分離管に移し、20ml のリンス水にてペトリ皿を洗浄し、 $800\times g$  で遠心分離を行い、パスツールピペットを用いて  $3\sim 5\text{ml}$  に濃縮を行った。その後、サンプルを 3 分割し、C3H/HeN マウスモデルを用いた感染性試験、*in vitro* での脱嚢試験、Live/Dead BacLight 核酸染色試験方法を行った。マウスへの摂取は実験終

了後、8時間以内に行った。

## 2-4 C3H/HeN マウスを用いた感染性試験

8~11週令の雄のC3H/HeNマウスに、接種の少なくとも1日前には、感染の有無の確認を行い、同一日に10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>個cystを接種し、同一の容器に置いて、糞便回収時の2時間程度は、別の容器にて飼育を行った。糞便は、スクロースによる濃度勾配遠心分離後、血球計算板法を用いて、計数した。Fig.1に経口接種した通常の用量—応答曲線を示す。Figure1に示すように、感染したシストの量が少ない場合は、感染性の潜伏期間(LP)があり、シスト量と潜伏期間の相関をFig.2に示す。その結果、

$$\text{Log}(n) = (-10.4 \pm 0.5) \times (\text{log}(LP) + (9.5 \pm 0.3)) \quad (1)$$

というモデル式が成立する。ここで、nはシスト数、LPは潜伏期間(日)である。

本実験では、コントロール実験として、10<sup>5</sup>個のシストを5匹のマウスに感染させ、接種量は0.12~0.22mlである。シストの生存率は、下記の式で表される。

$$\text{Log}(N/N_0) = \text{log}(n/n_0) \quad (2)$$

ここで、n<sub>0</sub>は接種したシストの総量であり、nは式(1)より計算した感染性を有するシスト量である。

## 2-5 脱嚢試験

*Giardia muris*の脱嚢試験はSchaeferらの方法に従って行った。ジアルジアの生存率は下式によって表される。

$$\text{脱嚢により評価した生存率} = (\text{ECW} + \text{PET}) / (\text{ECW} + \text{PET} + \text{IC}) \times 100$$

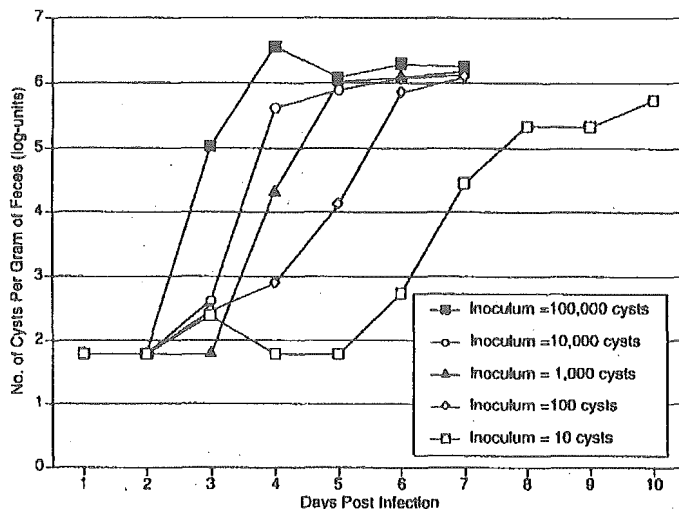


Fig. 1. Pattern of *G. muris* cyst shedding in C3H/HeN mice infected with different oral inoculums of fresh cysts. Each point represents the average cyst output per gram of wet feces for a cohort of five mice on successive days post infection. For days on which no cysts were detected, cyst production was set at one-half the detection limit (i.e. 1.8 log-units).

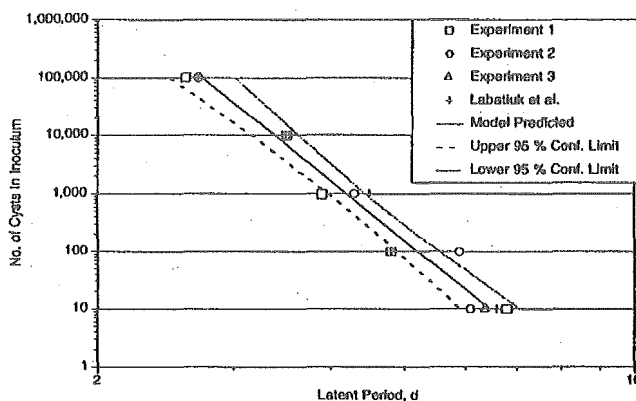


Fig. 2. Predictive latent period model for oral inoculum of live *G. muris* cysts in the C3H/HeN mouse model. Results from three separate dose response experiments conducted as part of this study and from a fourth dose response experiment conducted as part of an earlier study (Labatiuk, 1992) are shown.

ここで、ECWは空の 嚢子、PETは栄養体を一部排出したもの、ICは嚢子壁に損傷を受けていないものである。

## 2-6 Live/Dead BacLight 核酸染色試験方法

Live/Dead BacLight(L-7007)は *G. muris* を他のキットに比べ *G.cyst* の染色性の高い、2重染色生死判定キットである。Cystのサンプルとして、約105-cystを400×gで5分間遠心分離を行い、浮遊物を除去後、遠沈管内にて、PBS溶液にて再懸濁を行った。染色液(3.34mM SYTO 9-無水ジメチルスルホキシド溶液及び20mM propidium ヨウ化物-ジメチルスルホキシド)を-20度の冷凍庫より取り出し、室温にて解凍した。2.4μLの上記染色液を21.6μLのPBS溶液にて、希釈した後、6μLの各希釈染色液と90μLのPBS溶液をcystに添加後、37°Cの暗室にて、30分培養した。培養後、血球算定器上にて、倍率×40にてepifluorescence顕微鏡(Nikon Model Optiphot-FXA)にて観測した。活性のあるcystは、SYTO 9染色液により緑色に染色され、活性をなくしたcystは、propidium ヨウ化物により橙色/黄色、若しくは薄赤色に染色される。200以上のcystに対して観測を行い、不活化率を評価した。

## 3. 結論及び考察

1.4~83mJ/cm<sup>2</sup>に中圧紫外線ランプの照射線量を変化させ、その結果をtable1に示す。ペトリ皿への平均照射量は、中心部における照射量の0.8倍であった。また、cyst量にも拠るが、減衰率は0.43~0.61であった。

Table 1. Summary of UV trial information for *G. muris* UV exposure experiments

Trial	UV data			Infectivity data			<i>In vitro</i> excystation		Live/Dead BacLight	
	Effective irradiance (mW/cm <sup>2</sup> )	Exposure time (s)	Effective dose (mJ/cm <sup>2</sup> )	Latent period (d)	Log (n)	Log survival log(n/n <sub>0</sub> )	% Excysted	Log survival log(n/n <sub>0</sub> )	% Viable	Log survival log(n/n <sub>0</sub> )
A1	0.74	14	10.7	4.6	2.6	-1.4	N.D.	N.D.	72	-0.03
A2	0.75	30	22.3	5.0	2.2	-2.8	N.D.	N.D.	62	-0.10
A3	0	0	0.0	2.7	5.0	-0.04	N.D.	N.D.	78	0.00
A4	0.73	7.4	5.4	4.4	2.8	-2.2	N.D.	N.D.	81	0.02
A5	0.72	122	88.2	5.0	2.2	-2.8	N.D.	N.D.	56	-0.14
B1*	0.73	122	88.8	N.D.	N.D.	N.D.	34	-0.43	N.D.	N.D.
B2*	0.72	14	10.2	N.D.	N.D.	N.D.	96	0.03	N.D.	N.D.
B3*	0	0	0.0	N.D.	N.D.	N.D.	91	0.00	N.D.	N.D.
B4*	0.69	30	20.5	N.D.	N.D.	N.D.	96	-0.02	N.D.	N.D.
B5*	0.70	7.7	5.4	N.D.	N.D.	N.D.	95	0.02	N.D.	N.D.
C1	0.53	2.9	1.5	3.6	3.7	-1.3	95	-0.02	93	0.04
C2	0.52	15	7.8	4.6	2.6	-2.4	90	-0.05	91	0.03
C3	0	0	0.0	2.8	4.8	-0.2	100	-0.00	85	0.00
C4	0.52	124	64.3	4.1	3.1	-1.9	59	-0.23	81	-0.02
C5*	0.28	124	35.2	4.6	2.6	-2.4	84	-0.07	87	0.01
D1	0.46	138	58.7	5.0	2.2	-2.8	66	-0.14	71	-0.10
D2	0	0	0.0	2.6	5.2	-0.15	92	-0.00	90	-0.00
D3	0.46	51	23.4	5.1	2.1	-2.9	90	-0.01	92	0.01

\*For trial set B, number of cysts in the Petri dish was 1.5 × 10<sup>6</sup>. For all other trials, the number of cysts in Petri dish was 3.0 × 10<sup>6</sup>. N.D.—not done. n<sub>0</sub>— number of cysts in inoculum to each mouse. 1 × 10<sup>6</sup>. This trial was carried out in a 100 ml beaker. All other trials were conducted in 20 ml of water in a Petri dish.

Set A では、不活化率を動物感染試験法及びLive/Dead BacLight 核酸染色試験法により評価を行った。Set B では脱嚢法のみで、Set C,D では、全ての試験方法にて評価を行った。

3つの評価方法による不活化率をFig.3に示す。Fig.3に示すように、Live/Dead BacLight 核酸染色試験法及び脱嚢法は83mJ/cm<sup>2</sup>の時においても不活化率は0.43log及び0.14logであったが、動物感染性試験では、2~3logの不活化を得られた。この差異は紫外線ランプによる殺菌メカニズムにて説明可能である。紫外線は、微生物の生体分子細胞の内部、特にDNAに損傷を与えることで、宿主細胞内の有機物合成を妨げ、不活化を行う。動物感染試験法は、C3H/HeNマウス等を用いて、シストが寿命を全うすることにより感染性があると判断する。対して、脱嚢法は、in vitro条件で脱嚢できない嚢子のみを、不活化していると判断するものである。故に

上記より、UVを暴露した *G.muris* は、脱嚢はするが感染力を失っていることが分かる。

Live/Dead BacLight 核酸染色試験法は、細胞壁及び細胞膜を透過して、細胞内の生体分子を染色する方法である。Live/Dead BacLight 核酸染色試験法において、SYTO 及び propidium ヨウ化物に染色されるには、細胞壁に大きな損傷が必要であり、オゾンによる消毒メカニズムとよく似ている。しかし、動物感染試験法と比べると、不活化率との相関は低い。

Fig.3 より  $5\text{mJ}/\text{cm}^2$  の紫外線量で、 $2\log$  不活化が可能であることがわかる。また、 $8\text{mJ}/\text{cm}^2$  以下では、不活化率は紫外線量と相関があることが分かる。しかし、 $8\sim 130\text{mJ}/\text{cm}^2$  以下では、紫外線と不活化率に相関は見られなかった。仮説ではあるが、遮蔽若しくは攪拌が不十分であるため、紫外線の影響を殆ど受けないためと思われる。

しかし、400 倍の倍率にて観測したところ、紫外線を遮蔽するような塊は観測されず、また、シストと同程度の大きさで紫外線を阻害する粒子も観測されなかった。この観測結果から判断すると、シストの大きさ以下のバクテリアや堆積物により、紫外線は、阻害されていることになる。他の原因として、照射線量のばらつきが考えられ、そのばらつきは  $1\log$  程度計測されている。攪拌不十分であることも手伝い、一部のシストには、他のシストに比べ、照射される紫外線量が少ないということになる。しかし、顕微鏡観測結果によると、シストは均一に攪拌されていたことが確認された。さらに、不活化率は Fig3 に示すように、ある程度の幅をもつことが見て取れる。 $3\times 10^6$  個のシストを  $100\text{ml}$  の水に溶解させて、 $150\text{ml}$  ビーカーに入れ、液面高を  $47\text{mm}$  として、同様の実験(C5)を行ったが、ペトリ皿の実験と比較しても、シストの濃度が不活化率に大きな影響を及ぼすことはなかった。

二つ目の仮説は、DNA 損傷修復のため、潜伏期が長くなり、完全に不活化されたことによる影響ではないというものである。この仮説を確かめるために、D1 及び D3 の試験より 10 個のシストを回収して、3 匹のマウスに感染させ、実験を行った。25 匹のマウスに 10 個の紫外線照射していないシストを加えた場合、感染後 9 日まで、シストを糞便中に排出したが、紫外線照射後のシストでは、14 日を過ぎても、シストは排出されなかった。このことより、紫外線照射後のシストは、完全に不活化されていることが分かる。

以上のデータより、効率的に紫外線を照射すれば、 $5\text{mJ}/\text{cm}^2$  程度の紫外線量で  $2\log$  以上の *G.muris* の不活化が可能であることがわかる。

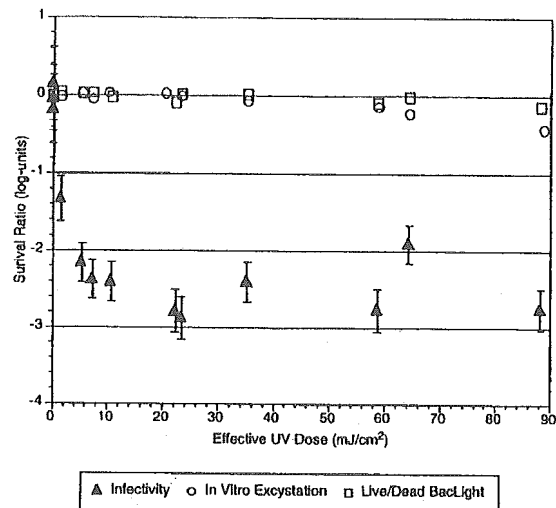


Fig. 3. Inactivation of *G. muris* by exposure to various UV doses light as determined by C3H/HeN mouse infectivity model, *in vitro* excystation and Live/Dead BacLight nucleic acid stain. Error bars are 95% confidence limits and were derived from the 95% confidence limits of the C3H/HeN dose response model (Fig. 2).



紫外線による *Cryptosporidium oocysts* の不活化UV light inactivation of *Cryptosporidium oocysts*

Jennifer L. Clancy ら

## 1. 概要

本研究では、*C. parvum* を不活化できる、従来にはない紫外線照射装置に関する最初の研究であり、3種類のシステムに関して実験を行い、不活化率を脱糞法、DAPI/PI法、動物感染試験法等を用いて評価を行った。

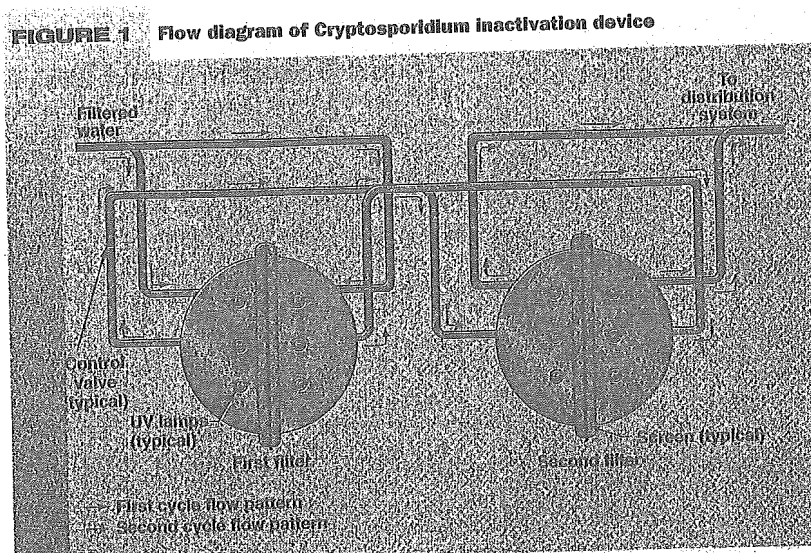
## 2. 実験方法

## 2-1 実験装置

trial1~3までの実験はFig.1に示す2つの実験槽を用いておこなった。一つの実験装置の中に85Wの低圧水銀ランプを6本設置し、253.7nmでの最低理論照射線量が $14.6\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ とした。

また、クリプトスポリジウムオーシストの回収系として、紫外線照射装置の後段に、全長51cm、孔径 $1.0\mu\text{m}$ のPCTEの

フィルターカートリッジ4本(合計膜面積 $11.2\text{m}^2$ )を用いて最大、378L/分の水を目詰まりなく通水可能であった。

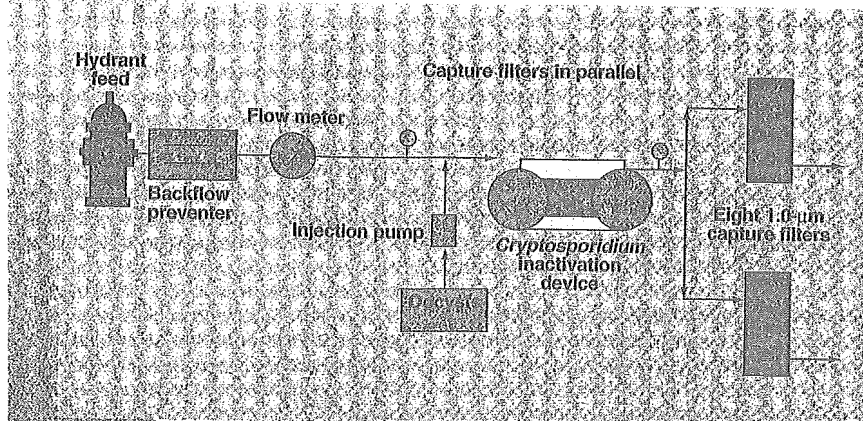


## 2-2 trial1 : 不活化したオーシストを用いた実験

原水は、Michigan湖の水を113,000Lのタンクに貯蔵し、 $5.0\mu\text{m}$ のろ紙により、ろ過を行った。回収系を設置する前に、テスト実験を行い、その際の通水速度は378L/分、圧力は179kPaであった。5分を1サイクルとして紫外線照射装置の運転を行い、これより、最低照射線量は $4,380\text{mW}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ と設定した。ホルマリンに浸した $10^9$ 個/mlのクリプトスポリジウムオーシストは200mLのろ過水にて希釈し紫外線照射開始と同時に注入を開始し、初期の10分で、約90%の注入を行った。3サイクル目より、注入速度を40ml/分にあげ、共洗水を含め、4サイクル目

までに注入を終了した。紫外線照射装置はその後、5 サイクル分運転させた後、停止した。回収系内のフィルターは3分割して、それぞれ1Lの1%PBS溶液を入れたストマックカーバッグにて5分間洗浄し、更に5分間の手もみ洗浄を行った。

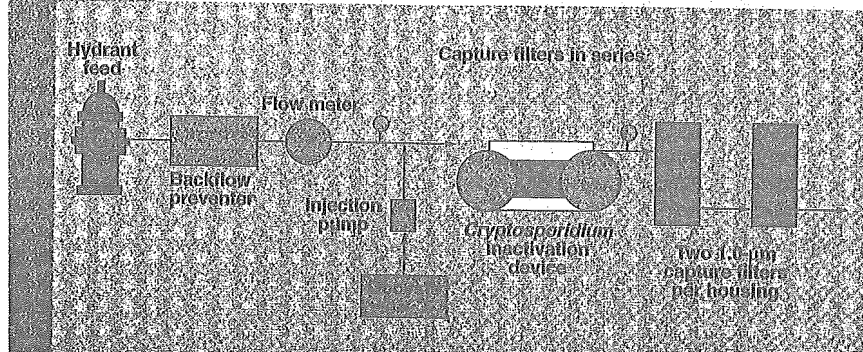
FIGURE 2 System configuration for CID challenge study



2-3Trial2：活性のある「オーシストを用いた実験

実験装置は trial 1 と同様のものと使用し、流量を 473L/分及び 235L/分に設定し、初期オーシスト量は、両者とも

FIGURE 3 System configuration for the process control CID challenge study



$5 \times 10^8$  個の活性のあるオーシストを準備した。注入条件は trial 1 と同様に第 2 サイクルまでにオーシスト全量の 90%の注入を行い、3 サイクル目より、注入速度を 40ml/分にあげ、共洗水を含め、4 サイクル目までに注入を終了した。紫外線照射装置はその後、5 サイクル分運転させた後、停止した。その後、回収率を上げるため、trial1 よりも小さく分割した回収系のフィルターを同様の方法にて、オーシストを回収した後、1050g $\times$ 10 分間の遠心分離をかけたものをサンプルとして、動物感染試験法を行うため、アリゾナ大学へと冷蔵便にて送付した。

2-4Trial3：高流速での活性のオーシストを用いた実験

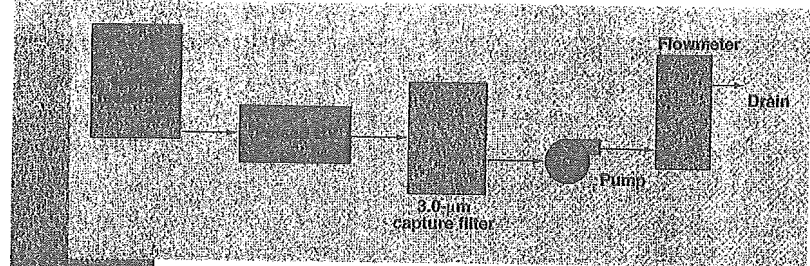
更に紫外線照射装置を評価するために、Camplain 湖の水を使用し、South Burlington の Champlain 水道局の施設にて行った。実験装置は trial 1 と同様のものと使用し、流量を 378L/分及び 1514L/分に設定し、同様の実験を行った。ただし、fig2 に示すように回収系のみ全長 51cm、孔径 1.0 $\mu$ m の PCTE のフィルターカートリッジ 8 本(合計膜面積 22.4m<sup>2</sup>)を使用した。また、Figure3 に示すように、process control 実験を行う際は、オーシストの漏れがないように、2 本の回収系を装置後段に設置した。

## 2-5 パルス UV を用いた実験

Figure4 に示す実験装置にて、パルス UV を用いた実験を行った。実験に用いた紫外線ランプは1~30Hzにてパルスを持つキセノンランプを反応塔中央に設置し、2cm離れた地点での照射線量は

75mW/cm<sup>2</sup>であった。水量は3.8~19L/分であり、通水量は34L、後段に0.01m<sup>2</sup>のPTFEフィルターを用いて回収を行った。C.parvum オーシストは、Arizona 大学より入手した Iowa 株を使用し3.8×10<sup>7</sup> オーシストを10Lの水(遊離塩素1.6mg/L)に注入させた。実験装置は、パルスを10Hzに設定し、3.8L/分にて通水を行った。また、残りの水は空気によりフィルターへと押し込んだ後、フィルターを50mLtubeの中へ水と共に封入し、冷蔵便にてアリゾナ大学へと送付した。紫外線ランプは、最小の照射線量を1900,W・s/cm<sup>2</sup>であった。

FIGURE 4. System design for pulsed UV challenge study

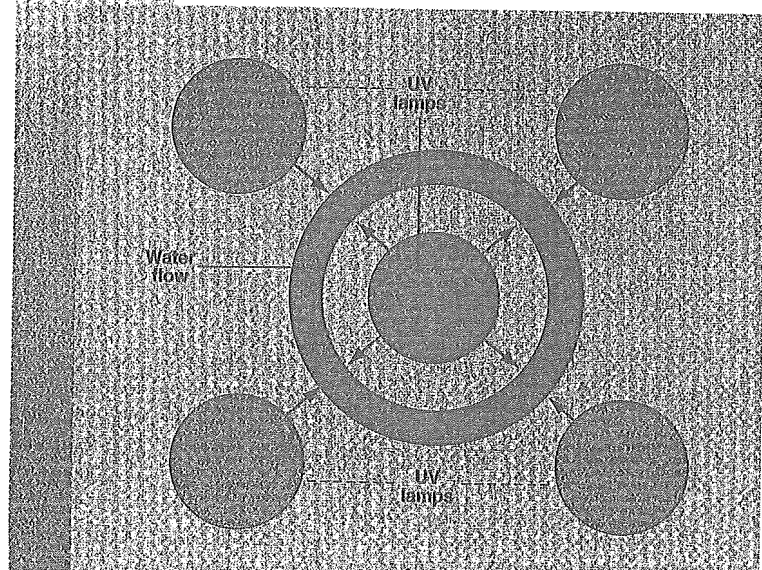


## 2-6 薄膜型従来紫外線装置を用いた実験

Figure5 に示すように、254nmの低圧紫外線ランプを用いて、figure6に示すフローにて実験を行った。

投入オーシスト量は2×10<sup>7</sup>個-C.parvum オーシストを5分にわたり注入し、通水速度は3.8L/分、有効照射線量は180mW・s/cm<sup>2</sup>であり、PCTEの3µm粒子によって補足した。

FIGURE 5. Diagram of thin-film UV technology



## 3. 評価方法

DAPI/PI法はCampbellらの、核酸染色法はBelosevicらの、動物感染試験方法は、suckling miceを用いて、感染7日後に回腸終端部を用いて試験を行った。

## 4. 結果及び考察

流速473L/分、235L/分での回収率はそれぞれ、46.2%、44.1%であり、高回収率が得られた。また、table1に示すように trip control 実験の処理前後の脱糞法および動物感染試験法によりほ

ば、同程度の結果が得られた。

Trial 1 の実験では、サンプルを遠心分離せず、直接、核酸染色法を用いて、回収率を評価した結果、脱嚢法及び動物感染法に最低限必要な  $1 \times 10^7$  個のオーシスト以上の  $5 \times 10^7$  個のオーシストの回収が確認された。

Trial 2 の実験では、多量の微粒子が存在したため、脱嚢試験を行わず、動物感染試験法のみを使用した。Table 2 に示すように、不活化率は  $4 \log$  以上とあるが、感染したマウス数が 0 なので、正確な数値は不明である。本実験は trip control として行ったが、動物感染試験法及び脱嚢法において、明確な差は見られず、輸送及び計測までの時間が、不活化率を測定するにあたり、影響を与えないことが分かる。

Trial 3 の実験では、脱嚢法、DAPI/PI 法、動物感染試験法を用い評価を行い、その結果を Table 3 に示す。378L/分と 1514L/分の流速によって、両者とも  $4 \log$  以上の不活化が行われ、流速による不活化率の差異は確認されなかった。

パルス光を用いた実験では、table 4 に示すように  $1.7 \sim 2.9 \log$  の不活化が得られ、Table 5 に示すように、動物感染試験方法において、UV 処理水に感染性は確認されなかった。また、各評価方法による *C.parvum* オーシストの活性の比較を table 4 に示すが、各評価方法とも不活化率は  $2 \log$  程度であり、動物感染試験方法でも table 5 に示すように、 $100 \sim 10^5$  個のオーシストを摂取したが、感染したマウスは確認されなかった。しかし、紫外線を照射しない系においても不活

**TABLE 1 Trip control excystation rates for CID trial 2**

Sample	Excystation Rate percent	Sporozoite Ratio
Pretreatment	93.2	2.46
Posttreatment	86.6	2.32

\*No spontaneous excystation was found in either the pre- or posttreatment stage.

**TABLE 2 Animal infectivity results for CID trial 2**

Challenge Flow Rate	Group	Number of Mice	Oocyst Doses	Number of Mice Infected	Percent of Mice Infected
62 gpm (235 L/min)	1	10	60	0	0
		10	200	0	0
	2	10	10	0	0
		10	36	0	0
	3	10	10	0	0
		10	60	0	0
125 gpm (473 L/min)	1	10	60	0	0
		10	200	0	0
	2	10	10	0	0
		10	36	0	0
	3	10	10	0	0
		10	60	0	0

**TABLE 3 Animal infectivity results for CID trial 3**

Flow Rate/Treatment	Group	Number of Mice	Oocyst Doses	Number of Mice Infected	Percent of Mice Infected
400 gpm (1514 L/min)/UV	1	10	100	0	0
		10	100	0	0
	2	10	100	0	0
		10	100	0	0
	3	10	100	0	0
		10	100	0	0
378 gpm (378 L/min)/UV	1	10	100	0	0
		10	100	0	0
	2	10	100	0	0
		10	100	0	0
	3	10	100	0	0
		10	100	0	0
100 gpm (378 L/min)/none	1	10	100	0	0
		10	100	0	0
	2	10	100	0	0
		10	100	0	0
	3	10	100	0	0
		10	100	0	0
Trip control	10	100	100	10	10
	10	100	100	10	10

\*Process control, no UV exposure

化が確認され、今後検討する必要がある。また、薄膜型従来紫外線装置を用いた実験では、脱囊法、DAPI/PI、核酸染色法等を使用したか、有効性は確認されなかった。

**TABLE 4** Percentage viability determined by in vitro viability assays for pulsed UV system

Assay	Lab Control	Trip Control	Process Control (Power Off)	UV Treatment (Power On)	Log Reduction in Viability*
Stain 1	89.3	79.3	60.9	<0.1	2.8
Stain 2	96.2	93.7	71.6	<0.1	1.7
DAPI-PI	63.0	62.5	60.9	<0.3	2.3
Excystation	80.5	80.8	79.4	<0.1	2.0

\*Log inactivation was calculated as  $\log_{10}$  (process control/UV treatment)

**TABLE 5** Animal infectivity results for pulsed UV treatment

Flow Rate/Treatment	Replicate	Number of Mice	Oocyst Dose	Number of Mice Infected	Percent of Mice Infected		
1 gpm (3.8 L/min)/UV	1	10	100	0	0		
		10	$1 \times 10^3$	0	0		
		10	$1 \times 10^4$	0	0		
		10	$1 \times 10^5$	0	0		
		10	100	0	0		
		11	$1 \times 10^3$	0	0		
	2	10	$1 \times 10^4$	0	0		
		11	$1 \times 10^5$	0	0		
		1 gpm (3.8 L/min)/none	1	10	100	0	0
				10	250	0	0
				10	750	0	0
				10	1,000	0	0
2	10			100	0	0	
	10			250	0	0	
	9		750	0	0		
	9		1,000	1	10		
	Trip control		1	9	50	3	33
				10	100	3	30
10				200	3	30	
10				300	10	100	
10		50		0	0		
2		10	100	0	0		
		9	200	3	100		
		10	300	3	100		
		10	50	0	0		
		10	300	10	100		

\*Process control: no UV exposure

白色パルス光を用いた浄水器でのバクテリア、ウイルス、クリプトスポリジウムの不活化

Inactivation of bacteria, virus and Cryptosporidium by a point-of-use device

using pulsed broad white light

Debra E,Huffman ら

## 1. 概要

白色パルス光を用いた紫外線殺菌装置を用いて、*Klebsiella terrigena*、polio virus type 1 (Lsc2ab 株)、simian rotavirus SA11、Cryptosporidium parvum の不活化試験を行った。初期濃度はそれぞれ、 $10^5$ CFU/mL、 $10^4$ PFU/mL、 $10^4$ PFU/mL、 $10^4$  オースト/mL であった。15.4L/分にて照射実験を行い、それぞれ、>7log、>4log、>4log、>4log の不活化率を達成した。また、活性の指標として、細胞培養感染法及び動物感染法の両方にて行い、同様の結果が得られた。

## 2. 方法

### 2.1 実験装置

実験装置は、PurePulse Technologies,Inc 社の装置を使用した。実験に使用した水は Table1 に示す 2 種類で一つは、脱塩素した水道水(average case water)、もう一つ(worst case water)は最低の水質を想定して、脱塩素した水道水に TDS500mg/L、濁度 10NTU、TOC2.5~3.0mg/L である。試験水は両方の水とも 75.7L 用意し、15.1L/分にて装置運転を行った。紫外線ランプはキセノンフラッシュランプを用い、flash rate は 0.42Hz で、一回の flash 時間は、300 マイクロ秒である。

Table 1. Test waters characteristics used during the PureBright evaluation

	Average case water	Worst case water <sup>a</sup>
Turbidity (NTU)	< 0.05	10
pH	7.6	7.8
Total dissolved solids (TDS mg/l) <sup>b</sup>	50-150	500 ± 20
Total organic carbon (TOC mg/l) <sup>c</sup>	< 0.1	2.5-3.0
Number of challenges	3	3

<sup>a</sup>Worst case water amended for turbidity using Arizona Fine Test Dust (General Motors, Flint, MI).

<sup>b</sup>TDS using Sea Salts (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

<sup>c</sup>TOC using humic acid (Aldrich Chemical).

### 2.2 運転方法

微生物の不活化を評価するため、3 つに実験を行った。

①3 つの不活化実験を同時に行い、一系列では繰り返し、バクテリオファージとクリプトスポリジウムの評価を行った。この装置は 8 時間のうち 10 分のみ、紫外線を照射するサイクルを実験終了まで継続した。計 6 回の実験行い、average case water は 1,3,4 日後に、worst case water は 6, 7 日後に微生物及びサンプルを回収した。ただし、本実験中に 5 日目~7 日目の間にて、48 時間の装置停止があった。

②初期濃度は  $10^3$ ~ $10^5$ PFU/L で poliovirus 及び rotavirus の不活化実験を行った。

③第3の実験では、初期濃度  $10^4$ 個/mLにて *Cryptosporidium parvum* の実験を両水質にて行った。  
原水は 75.7L 準備し、微生物添加後、5 分間攪拌した後、15.1L/分の流速にて装置に通水した。  
約 45.4~53.0 L 通水後、原水及び処理を 1L 採水した。

### 2.3 微生物の準備及び評価

#### *Klebsiella Terrigena*(ATCC#33257)

50mL の TSB 溶液に摂取し、定常相に達するまで一晩攪拌しながら、培養を行った。試料水の分析は m-Endo 寒天培地(Difco)を用いたメンブランフィルター法による。24 時間、  
37°Cにて培養後、計測を行った。

#### *Bacteriophage MS-2*(ATCC#15597B)及び *PRD-1*

*E.Coli*(ATCC#15597)と *Salmonella*(ATCC#19585)より準備した。分析は両者とも、採取後すぐに寒天二重層法を用いて分析した。

#### *Poliovirus type1*、*Simian rotavirus SA11*

*Poliovirus*、*rotavirus* はフロリダ大学の Dr.S.Faceah より入手し、Buffalo green monkey (BGM)kidney 細胞株により培養した。Rotavirus の懸濁液は、poliovirus と同様、MA104 細胞株以外のものを使用した。

流入水はフィルター滅菌し、1ml を滅菌した PBS 溶液にて  $10^7$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、に希釈して、BGM 若しくは MA104 の単層法により分析した。処理水はフィルター滅菌後、1ml 及び 10ml を 25cm<sup>2</sup> のフラスコに BGM 若しくは MA104 の単層法により分析した。

*Poliovirus* を含む試料は 45 分間 BGM 細胞単層上にて培養した。2%の新生の子牛の血清、1.2%の寒天、0.001%のニュートラルレッドを加えた Minimum Essential Media(MEM)フラスコに加え 3 日間培養した。そのプラックを計数し、濃度(PFU/mL)を決定した。

Rotavirus を含む試料は 45 分間 MA104 の単層法により培養した。Serum free の MEM 培地に L-グルタミン、抗生物質、トリプシンをフラスコに添加し、37 度の CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 1 週間培養した。流入及び流出の濃度測定には、最確数法を用いた。

*Cryptosporidium parvum* oocyst は Idaho 主の Pleasant Hill Farm の感染した子牛の糞便より精製した。Oocyst は 4 週令であり、4-7°Cにて保存した、原水と処理水(50ml、1L)は 1050xg を 10 分間の遠心分離によって濃縮された。浮遊物は吸引により除去した。

### 2.4 活性及び感染性試験

oocyst の活性及び感染性透試験は DAPI/PI 法、脱嚢法、細胞培養感染法、動物感染法の 4 種類が用いられてきた。DAPI/PI 法は Campbell らの、脱嚢法は Korich らの、細胞培養法は最確数法を用いた。また、本論文にて用いた、動物感染法は Dr.Mike Arrowood により行われ、新生の Balb-C のマウスを用いて行われた。生後 5 日後のマウスに 25µL を濃度別に経口投与した。各濃度別に 5~10 匹のマウスを用意した。感染 7 日後に 3cm 程の回腸末端部を取り出し、2.5%の

重クロム酸カリウムに浸し、不連続型ショ糖勾配法によりオーシストの分離を行った。サンプルは、イソチオシアン酸フルオレセイン(OW50-FITC)と共役の *Cryptosporidium* oocyst の単クローン性の抗体とともに培養し、血球計数器にて計数した。腸は重クロム酸カリウム液中にてホモジナイズし、上記と同様の分析を行った。後者の試験法は、1 体ごとでは見落とす可能性のある少量の oocyst を検出するためのものである。活性のあるオーシストは最確数法によって計数した。

### 3, 結果

白色光により *Klebsiella terrigena* は平均して 7.79log 不活化され、その結果を table2 に示す。何れのユニットのデータからも、UV 処理後 48 時間を経過しての、リグロウスは見られなかった。また、m-Endo 培地ではなく、寒天平板計数法を用いた場合も、同様の感度にて、Table3 に示す結果が得られた。また、水質の差による不活化率の違いは生じなかった。

Bacteriophages MS-2 と PRD-1, enteroviruses, poliovirus は table4 に示すように、それぞれ、4.3log 以上、5.4log 以上、6.23log、4.86log 以上不活化された。

*Cryptosporidium* oocyst の不活化率を DAPI/PI 法、脱嚢法、細胞培養感染法、動物感染法を用いた評価を table5 に示す。

脱嚢法では、average case water の不活化率は平均で 0.67log、worst case water の不活化率は平均で 0.53log であった。

DAPI による染色法では、average case water の不活化率は平均で 0.31 log、worst case water の不活化率は平均で 0.28log であった。

MPN を用いた細胞培養感染法では、table 5 に示すように両水質において 3.40 以上の不活化率が得られた。

average case water では動物感染法で >4.6log、細胞培養感染法で 4.2log、worst case water では動物感染法で 4.1log、細胞培養感染法で 5.5log の不活化率が得られた。本研究は動物感染法と細胞培養感染法を比較した最初の研究のものであり、高濁度(>30NTU)のサンプルでは、濁質の影響にて不活化率を過剰評価する可能性があるが、今後の研究で改善されると思われる。

*Cryptosporidium* の不活化を評価するのに、安価で手軽な方法は細胞培養感染法であるといえる。

本装置は最低でも、250mJ/cm<sup>2</sup> 以上の紫外線を照射するよう設計されている。



#### 4. 結論

PureBright 装置を用いて、EPA のガイドラインに示す数値以上の成果、即ち、*Klebsiella terrigena*、

Table 2. Inactivation of *Klebsiella terrigena* by the PureBright unit<sup>a</sup>

Day	Unit	Average <sup>b</sup> influent CFU/ml challenge	Average <sup>b</sup> effluent CFU/ml challenge	Log <sub>10</sub> inactivation
1	1	2.5 × 10 <sup>5</sup>		
1	2	3.0 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.40
1	3	2.5 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.48
3	1	2.3 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.40
3	2	2.5 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.36
3	3	2.1 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.40
5 <sup>c</sup>	1		< 0.01	> 7.32
5 <sup>c</sup>	2			
5 <sup>c</sup>	3			
Post 48-h stagnation				
	1		< 0.01	
	2		< 0.01	
	3		< 0.01	
6	1	1.1 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.04
6	2	1.2 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.08
6	3	1.2 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.08
7	1	3.0 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.48
7	2	2.0 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.30
7	3	3.1 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.49
Post 48-h stagnation				
	1		< 0.01	
	2		< 0.01	
	3		< 0.01	
8	1	1.2 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.08
8	2	1.2 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.08
8	3	1.2 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.08
Mean values for all units		2.0 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.30

<sup>a</sup>Assay performed on M-endo agar, 100 ml assayed. Worst case water used days 6, 7 and 8.

<sup>b</sup>Average of two replicate counts.

<sup>c</sup>Influent levels not detected.

polio virus type 1 (Lsc2ab 株)、simian rotavirus SA11、Cryptosporidium parvum においてそれぞれ、>7log、>4log、>4log、>4log の不活化率を達成した。また、Cryptosporidium の活性の指標として、細胞培養感染法が、有用であることも確認された。動物感染法と比較しても両方にて行い、同様の結果が得られた。

Table 3. Inactivation by the PureBright unit of *Klebsiella terrigena* as assayed by Plate Count Agar<sup>a</sup>

Day	Unit	Average influent/ml	Average effluent/ml	Log <sub>10</sub> inactivation
3	1	4.6 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.66
3	2	2.8 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.45
3	3	2.4 × 10 <sup>5</sup>	< 0.01	> 7.38

<sup>a</sup>Average case water. All experiments done in triplicate.

Table 4. Mean inactivation of viruses and coliphage in average and worst case waters<sup>a</sup>

Test water	Rota virus SA11 (MPN/ml)			Polio virus type 1 (PFU/ml)			Coliphage MS-2 (PFU/ml)			Coliphage PRD-1 (PFU/ml)		
	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation
Average	2.6 × 10 <sup>3</sup>	< 0.036	> 4.86	6.2 × 10 <sup>5</sup>	0.37	6.23	2.0 × 10 <sup>4</sup>	< 1.0	> 4.30	2.5 × 10 <sup>5</sup>	< 1.0	> 5.40
Worst	1.2 × 10 <sup>3</sup>	9.33	4.11	3.9 × 10 <sup>4</sup>	3.94	4.10	ND	ND	ND	6.0 × 10 <sup>5</sup>	9.0	4.83

<sup>a</sup>All experiments done in duplicate. ND: not done.

Table 5. Comparison of inactivation of *c. parvum* in Average and worst case waters determined by three viability assays

Day <sup>a</sup>	Excystation			Sporozoite yield		DAPI/PI		Cell culture			
	Influent (% viable)	Effluent (% viable)	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent	Effluent	Influent (% viable)	Effluent (% viable)	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent (MPN)	Effluent (MPN)	Log <sub>10</sub> inactivation
1	56	7	0.90	2.59	1.48	75	28	0.43	1.84 × 10 <sup>4</sup>	14.25	3.11
3	56	20	0.45	2.59	0.29	73	31	0.37	1.84 × 10 <sup>4</sup>	< 1.00	> 4.26
5	62	11	0.75	2.63	0.14	83	53	0.43	2.6 × 10 <sup>3</sup>	14.25	2.83
Mean/SD	56.0 ± 2.8	12.7 ± 5.4	0.67	2.60 ± 0.02	0.64 ± 0.60	77.0 ± 4.3	37.3 ± 11.2	0.31	1.5 × 10 <sup>4</sup> ± 4.1 × 10 <sup>3</sup>	< 9.8 ± 6.3	> 3.4
6	59	14	0.62	2.89	1.15	83	49	0.23	1.84 × 10 <sup>4</sup>	< 1.00	> 4.26
7	63	18	0.54	2.76	0.77	74	48	0.19	1.84 × 10 <sup>4</sup>	14.25	3.11
8	68	24	0.45	3.08	0.27	84	31	0.43	> 1.73 × 10 <sup>4</sup>	36.72	> 3.67
Mean/SD	61.3 ± 3.7	18.7 ± 4.1	0.53	2.91 ± 0.13	0.73 ± 0.36	80.3 ± 4.5	42.7 ± 8.3	0.28	> 7.0 × 10 <sup>4</sup> ± 7.3 × 10 <sup>4</sup>	< 17.3 ± 4.7	> 3.7

<sup>a</sup>Days 1, 3, 5 used average case water; days 6, 7, 8 used worst case water.

Table 6. Number of infected mice using a serial dilution MPN assay approach

Sample ID	Number of infected mice/total mice in litter group at each dilution					
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Influent (average case water)		6/6	5/5	5/5	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>
Effluent (average case water)	0/7	0/6	0/5			
Influent (worst case water)		10/10	6/6	6/6	2/5 <sup>a</sup>	0/5 <sup>a</sup>
Effluent (worst case water)	4/9	0/11	0/6	0/6		

<sup>a</sup>A hypothetical calculation based upon a previously reported ID<sub>50</sub> of 100 oocysts for *C. parvum* in mice.

Table 7. Number of infected cell culture wells using a serial dilution MPN assay approach

Sample ID	Number of infected wells/total number of wells inoculated at each dilution			
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Influent (average case water)	3/3	3/3	3/3	1/3
Effluent (average case water)	1/3	0/3	0/3	0/3
Influent (worst case water)	3/3	3/3	3/3	1/3
Effluent (worst case water)	1/3	0/3	0/3	0/3

Table 8. *C. parvum* inactivation determined by cell culture, and animal infectivity

Test water	Cell culture MPN/ml			Animal infectivity MPN/ml		
	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation	Influent	Effluent	Log <sub>10</sub> inactivation
Average case	3.7 × 10 <sup>5</sup>	31.1	4.2	2.0 × 10 <sup>5</sup>	< 5.6	> 4.6
	(7.5 × 10 <sup>4</sup> to 1.0 × 10 <sup>6</sup> )	(6.9 to 90.3)		(6.7 × 10 <sup>4</sup> to 5.1 × 10 <sup>5</sup> )	(0.9 to 19.1)	
Worst case	2.4 × 10 <sup>6</sup>	7.4	5.5	2.5 × 10 <sup>5</sup>	20.2	4.1
	(4.8 × 10 <sup>5</sup> to 9.7 × 10 <sup>6</sup> )	(1.7 to 21.5)		(9.0 × 10 <sup>4</sup> to 5.8 × 10 <sup>5</sup> )	(3.9 to 42.7)	

## 低圧紫外線を用いた消毒装置によるクリプトスポリジウムの不活化

*Cryptosporidium* Inactivation by Low-pressure UV in a Water Disinfection Device

A.C.Drescher ら

## 1. 概要

動物感染試験法を用いて、クリプトスポリジウムの不活化能力の試験を行った。脱塩素した水道水を 4gpm(15 L/分)で通水し、 $120\text{mJ}/\text{cm}^2$ の照射線量でクリプトスポリジウムを不活化できることが確認された。

## 2. 方法

## 2.1 実験装置

図 1 に示すフローにて実験を行った。水道水は  $0.5$  若しくは  $1.0\mu\text{m}$  のポリオレフィン系繊維ろ紙によりろ過し、脱塩素処理を行った。原水濁度は  $0.1\text{NTU}$  以下、透過率は  $95\%$  以上であった。紫外線照射実験開始 10 分前には、低圧紫外線ランプを運転させ、通常での運転温度にまで引き上げた。水は  $15\text{L}/\text{分}$  にて通水し、オーシストを含む spike cylinder 内の水は  $200\text{mL}/\text{分}$  にて通水し、リンスするために、水を加えてさらに 2 分間の運転を行った。処理水は一度、受槽にて受けた後、フィルターによってろ過を行った。フィルターを緩衝液にて 2 分洗浄、5 分間超音波処理、2 分洗浄、 $1050\text{g}$  での遠心分離をした後、 $1\text{mL}$  まで吸引した。吸引後は冷蔵保存し、24 時間以内に感染性試験を行った。

## 2.2 オーシスト

オーシストは、アリゾナ大学より、1 ヶ月未満の Iowa 株を用いた。 $10^8$  個/mL の試料を 2 つ用意し、一つは紫外線照射実験に、もう一つは、コントロール実験に用いた。試料は攪拌後、共洗いを行い、計  $100\text{mL}$  になるよう調整し、spike cylinder へと移しかえた。

## 2.3 マウス

オーシストの計測は明視野の血球算定器を用いて実施した。4~6 週齢の異系交配マウスを使用した。各条件(trip control ,process control ,UV 照射)において、60 匹のマウスを用い、低用量、中用量、高用量にそれぞれ約 20 匹のマウスを使用した。紫外線照射後の水は  $10^3$ 、 $10^5$ 、 $10^7$  個のオーシストをマウスに感染させた。process control 水は、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  個のオーシストをマウスに感染させた結果、紫外線以外の要因で  $1\sim 2\log$  の減少がみられた。オーシストはマウスに経口摂取させ、2 週間後に、約  $2\text{cm}$  の回腸終端部にて試験を行った。この組織は、ホルマリンにて凝固させ、パラフィンに埋め込んだのち、切断し、顕微鏡のスライドガラス上で着色した。着色したサンプルの腸の絨毛の境界の寄生虫の有無にて活性の評価を行う。

### 3. 結果

trip control 水を用いた場合、感染性は 0.3~0.6log の減少が確認された。この減少は、輸送や冷蔵保存により生じたものと思われる。紫外線を照射しない process control 水を使用した場合、感染性はより低下した。また、紫外線照射後の水を用いた場合、感染力のあるオーシストは検出されなかった。

### 4. 結論

120mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線を照射することで、クリプトスポリジウムは少なくとも 5.4log 以上の感染力の減少が確認された。本結果は、バクテリアやウイルスと異なり、感染性で評価した場合、クリプトスポリジウムは低圧ランプにて低線量にて、不活化可能であることを示している。

