

## クリプトスポリジウムの活性試験法及び紫外線照射装置による不活化効果の検討 Detection and Enumeration of Infectious *Cryptosporidium parvum* and effect on UV disinfection

9830114 佐藤瑠美 大瀧雅寛

Rumi SATO and Masahiro OTAKI

お茶の水女子大学 環境工学研究室

### 1. 研究の背景と目的

近年、クリプトスポリジウムによる水道原水の汚染が問題となっている。この病原性原虫は大腸菌の数千倍の塩素耐性を持っている為、本研究ではこれに対応した新たな浄水処理法の一つとして、紫外線消毒に着目する。

ここで問題となるのは、オゾンや塩素消毒方法と違い、紫外線消毒法はクリプトスポリジウム内部の遺伝子に直接作用するため、クリプトの生死判定に通常使われる脱嚢法など外的損傷に関連した生死判定法では正しく評価できないという点である。そこで本研究では従来の脱嚢法と並行して、近年新たなクリプトスポリジウムの生死判定法として注目を集めている Cell Culture 法について検討した。クリプト溶液に紫外線を照射し、その不活化効果を脱嚢法、cell culture 法の 2 種類の活性試験法で評価し、その差異を定量化することが目的である。

又、紫外線照射装置として、パルスランプ、高圧ランプ、中圧ランプの 3 種類を用いて、種々の UV ランプによる不活化効果に差が生じるのかについても検討した。

### 2. Cell culture 法について

cell culture 法とは、まず HCT-8 と呼ばれるヒト細胞を人工培養し、そこにクリプトスポリジウムを投入し培養する。投入したクリプトスポリジウムに感染力があれば、人工培養細胞組織上で増殖し、増殖したクリプトが検出される。従ってこの方法ではクリプトスポリジウムの感染力をもって生死判定ができるという特徴がある。

紫外線によるクリプトスポリジウムの消毒効果は、より簡便な脱嚢試験によって評価さ

れることが多いが、脱嚢をしても感染力は失われているようなクリプトが存在すると誤陽性の判定となってしまう。紫外線消毒という生物の遺伝子に損害を与える処理法の原理から考えるとそのようなクリプトが多数存在すると考えられるため脱嚢試験ではその消毒効果を正確に評価することはできないと考えられる。その概略図を図 1 に示す。

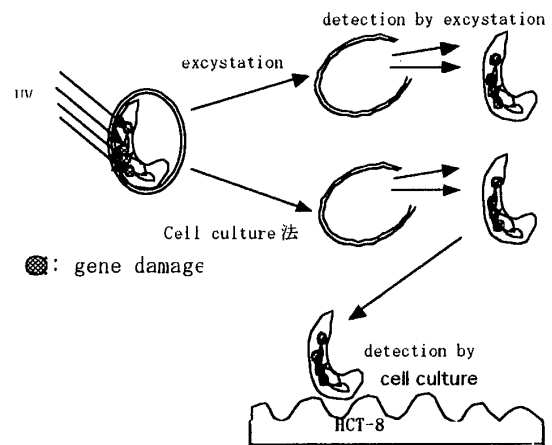


Fig.1 The difference between two methods following UV disinfection

この cell culture 法であればクリプトに対する紫外線などの消毒法についての正確な評価が行えると期待されている。

### 3. 実験手順<sup>1)2)</sup>

#### 3-1 脱嚢法の手順

- 3-1-1 紫外線照射装置を用いてクリプト溶液に紫外線を照射する。
- 3-1-2 クリプト溶液に塩酸性 HBSS を投入し、4℃で 5 分冷却する。
- 3-1-3 冷却遠心後、上澄みを除き HBSS、さらに 2 種類の脱嚢培養液を入れ恒温槽で 4 時間培養する。

3-1-4 HBSS を投入し冷却遠心する。この操作を 2 回繰り返す。

3-1-5 上澄みを除きよく攪拌後、顕微鏡にて観察する。

### 3-2 cell culture 法の手順

3-2-1 HCT-8 細胞を解凍し、維持媒液を入れた 25cm<sup>2</sup> フラスコで 1~2 日間培養する。

3-2-2 培養細胞を感染試験用チェンバースライドへ移し、そこに細胞単膜を形成させる。

3-2-3 オーシストを脱色剤処理し、HCT-8 増殖媒液で 6 段階に希釈する。

3-2-4 細胞単膜にオーシストを接種し、2 日間培養する。

3-2-5 A600FL 抗体でオーシストを染色し、蛍光顕微鏡及び微分干渉顕微鏡で観察する。

3-2-6 MPN 法により活性を持つクリプトの濃度を計算する。

### 3-3 紫外線ランプの比較

光源として連続照射型の高圧、中圧ランプと断続照射型のパルスランプを用いた。それぞれ生物線量計<sup>3)</sup>を用いて UV 線量を測定しクリプトの不活化率を比較した。

## 4. 実験結果及び考察

### 4-1 脱囊法の実験結果

脱囊試験法による 3 種類の光源における紫外線消毒効果を測定した。Fig.2 にその結果を示す。

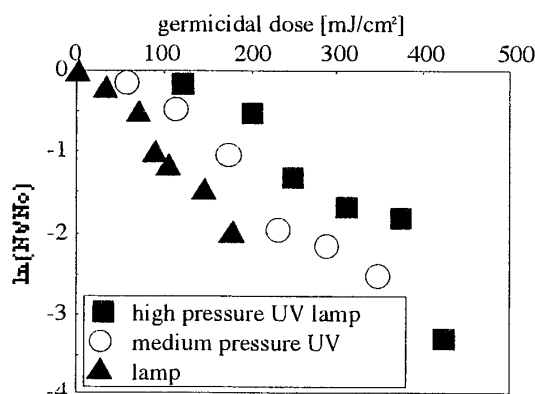


Fig. 2 Inactivation of *Cryptosporidium parvum* measured by excystation method

Fig.2 に示したように照射した紫外線線量は等しくても、ランプによって、脱囊法測定における不活化速度に差が生じることがわかった。このような現象が起こった原因として考えられるのは、遺伝子損傷に最も有効に作用すると考えられている 254nm 以外にランプから発せられるいずれかの波長が、脱囊する(=殻を破る)というクリプトの働きにダメージを与える効果があるのではないかということである。しかし、この原因についてまだ不明であり断定するにはさらなる実験が必要である。

### 4-2 cell culture 法の実験結果

この実験に関しては、細胞を継代培養して育て、スライドに細胞単膜を形成させる段階までは成功したが、その後染色された感染力を持つクリプトを蛍光顕微鏡で観察することはできなかった。なぜ、このような結果に陥ったのか考えられる原因としては、まず、細胞の継代数が 10 代後半であったことから、細胞が古くクリプトが感染しにくかったのではないか、蛍光染色剤と本研究で用いたクリプト種の相性が悪かったため等が考えられる。今後はその他の染色剤を使ったり、蛍光顕微鏡を使わない PCR 法による検出などを試みていく必要がある。

### 【参考文献】

- 1) Martin O'rielly "Detection and Enumeration of Infectious *Cryptosporidium parvum* by FDM-MPN" private SOP
- 2) T.R.slifko "Enumeration of Infectious *Cryptosporidium parvum* Using the Foci Detection Method and Most Probable Number Method(FDM-MPN)" textbook of WQTC2000 *Cryptosporidium* cell culture Workshop
- 3) 大瀧雅寛：生物線量計の原理とその応用「生活工学研究」第 2 巻 第 2 号