

VII — 1 水道におけるサイクロスポーラ感染症予防に関する基礎研究

東北学院大学大学院 学生員 ○志賀 淳一
東北学院大学 正会員 石橋 良信、佐藤 篤
前澤工業株式会社 木村 憲司

1. はじめに

Cryptosporidium parvum（以下 *C. parvum*）は平成 8 年の越生町でのわが国初めての集団発生事故以来、水道事業体でも厚生省による『暫定対策指針』にもとづいて木目細やかな処理が行われ、幸いにもその後には集団感染は起きていない。一方、*Cyclospora cayetanensis*（以下 *C. cayetanensis*）については、海外では 1990 年代初頭にシカゴ、ネパールでの水系感染の発生が報告され、近年では、アメリカ、カナダでの食品による感染などにより注目されて来ており、世界保健機関や米国環境保護庁でも注意すべき原虫として警戒している。わが国では、現在のところ集団感染は報告されていないが、海外から帰国した旅行者から検出された例が報告されており、今後の動向が注目されている。

そこで、本研究ではこの *C. cayetanensis* 感染症予防の基礎研究として、*C. parvum* 等のために用意されている資料と試験器具を用い、*C. cayetanensis* について様々な検出方法の検討を試みた。また、原虫の細胞感染実験における検出法についても検討した。

2. *Cyclospora cayetanensis* の検出法

検討内容は、(1) オーシストの形態的特徴の把握（顕微鏡撮影した写真から 60 個以上のオーシストを任意に選び、直径の測定および内部構造を観察）、(2) 自家蛍光の退色状況の把握（紫外線により自家蛍光を発するのが特徴であるが時間と共に退色することから 30 個以上のオーシストを用いて退色までの時間を測定）とそれにより得られる最適なフィルター別観察法の検討。

(3) *C. cayetanensis* が *C. parvum* と混在した場合の検出方法の検討（*C. parvum* を蛍光染色した場合の蛍光フィルターの選択による同時観察）である。

研究に用いた *C. cayetanensis* は兵庫県立衛生研究所より分与されたものであり、ヒト由来のものである。また、*C. parvum* の試験方法は厚生省による『暫定的な試験方法』に準じて行った。

実験方法は、(1) *C. cayetanensis* オーシストの形態学的検討は微分干渉顕微鏡観察による。オーシストの形態、寸法（直径）、内部構造の変化（未成熟時および成熟時）は、既存の写真をもとに計測、記録した。(2) 現行の蛍光による検出法の検討は落斜蛍光顕微鏡の U 励起（波長 330～385nm）により観察した。また、紫外線照射による自家蛍光の退色時間の測定も行った。このとき、オーシストは退色するので迅速な観察が必要である。全部で 50～100 個体を観察した。(3) *C. parvum* および *C. cayetanensis* の存在下での同時検出法の検討。なお、現行の *C. parvum* および *C. cayetanensis* の検出法は FITC (fluorescein isothiocyanate) および DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) の同時染色である。*C. parvum* は FITC 染色により落斜蛍光顕微鏡の B 励起にて青リンゴ色のオーシストを観察でき、オーシスト内部のスποロゾイトの核は、落斜蛍光顕微鏡の U 励起で観察できる。これを同時に観察する場合は波長域の広い DF フィルターを用いることによりオーシストは青リンゴ色、核が青色と観察できる。

なお、*C. cayetanensis* 観察のための抗体はまだ得られておらず、FITC 染色液が開発されていないので、現在のところは自家蛍光観察および DAPI 染色法しか方法がない。そのため、2 者を同時に観察しようとする場合には、DF フィルターを用いての観察方法が有効である。

3. 原虫の細胞感染実験における検出法

検討内容はヒト由来がん細胞（HCT-8）を用いて、細胞感染させたオーシスト（がん細胞と *C. cayetanensis* オーシストの共存下）の検出法¹⁾²⁾の検討である。

実験方法は、ヒト由来がん細胞（HCT-8）を培養中のペトリ皿に *C. parvum* を加え、トリブシン溶液により回収し、FITC 染

色することにより検出した。

4. 結果および考察

2-(1) *Cyclospora cayetanensis* オーシストの形態学的検討

発達段階により内部構造が異なり、未成熟段階では多くの顆粒や液泡が観察され、成熟すると2個の紡錘形のスポロシストが観察された。オーシストの直径の分布は8.4~10.9 μm の範囲で、9.6 μm の固体が最も多かった。

2-(2) 紫外線照射による自家蛍光の退色時間の測定から得られた適切な観察法

種々のメーカーの顕微鏡とフィルターを用いての観察の結果、Nikon V-2A Filter block を用いた場合は、*C. parvum* と *C. cayetanensis* のどちらを先に観察してもよいことが分かった。ただし、4分以内に次のオーシストに移る必要があった。*C. cayetanensis* も明るくて見やすかった。Nikon DF Filter block を用いた場合は、30秒以内に *C. cayetanensis* オーシストを観察し、次に *C. parvum* を観察すべきであった。*C. cayetanensis* はやや蛍光が弱く、探しにくいが見えないことはなかった。Zeiss DF Filter block を用いた場合は、先に *C. cayetanensis* を30秒以内に観察し、次に *C. parvum* を観察すべきであった。*C. cayetanensis* も明るくて見やすかった。Olympus WU filter を用いた場合は、先に15~30秒以内に *C. cayetanensis* を観察し、次に *C. parvum* を30秒以内に観察すべきであった。Olympus WU filter とNIB Filter を用いる場合は、先にWUで15~30秒以内に *C. cayetanensis* を観察し、次にNIBで *C. parvum* を4分以内に観察すべきであった。

2-(3) *C. parvum* と混在した場合の検出方法の検討

一番優れていたのがNikon V-2A Filter block フィルターで、*C. cayetanensis* は4分程度では退色しなかった。また、*C. parvum* のFITC染色の退色時間は同程度に長い。色調は若干異なるが、DAPI像も観察され、同時観察が可能である。

(1)(2)(3)の結論として、同時に観察するために、v-2Aフィルターを用いた場合では、どちらを先に観察しても良く、DFフィルターの場合では、退色が早い *C. cayetanensis* を先に観察しなければならない。*C. cayetanensis* の自家蛍光(退色後)は二度と発色しないので、速やかに観察し、蛍光観察後は速やかに光路を切り替え、内部構造観察に移る必要があった。

3 原虫(*C. parvum*)の細胞感染実験における検出法

従来この検出法の問題点は、FITC染色時における非特異反応によりがん細胞が染まってしまうという点であった。そこで、細胞を完全にに取り除けば *C. parvum* オーシストのみを検出できるとの考えから界面活性剤tween80を利用し、細胞を浸透圧によりパンクさせ除去しようと試みた。その結果、トリプシン消化を十分に行えば、tween80により確実に細胞を除去できることを確認した。このことにより、FITC染色により *C. parvum* オーシストのみを検出することができた。

5. おわりに

細胞感染実験技術の *C. cayetanensis* への応用が今後の課題になった。その先として、得られた生理生態的特徴をもとに、*C. cayetanensis* の上水道における消毒法などを検討していきたいと考えている。なお、実験遂行にあたり、東北学院大学の塩沢徹也さんの労に負うところが大きく、記して感謝する。

参考文献

- 1) Theresa R.Slifko, M.S.: Enumeration of Infectious *Cryptosporidium parvum* Using the Foci Detection Method and Most Probable Number Method (FDM-MPN)
- 2) Slifko, Theresa R., Debra E. Friedman, and Joan B. Rose: A most probable number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl. Environ. Microbiol. 65(9):3936-3941, 1999.
- 3) Slifko, Theresa R., Debra E. Friedman, Joan B. Rose, and Walter Jakubowski: An In-Vitro Method for Detection of Infectious *Cryptosporidium* Oocysts Using Cell Culture. Appl. Environ. Microbiol. 63(9):3669-3675, 1997.