

(36)

脱嚢 - フローサイトメトリー試験から見た
Cryptosporidium parvum オーシストの生存力に及ぼす水温の影響
Effect of Water Temperature on the Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts
by *In vitro* Excystation -Flow Cytometry Assay

北村友一*, 森田弘昭*

Tomokazu KITAMURA*, Hiroaki MORITA*

ABSTRACT; The survival of the *Cryptosporidium* oocysts are affected in water temperature and storage time. We evaluated the survival of *Cryptosporidium parvum* oocyst under the conditions of controlled temperature from 4 to 60 °C. The survival ratio of oocysts was obtained using *in vitro* excystation-flow cytometry assay. As the result, the survival ratio of the oocysts rapidly decreased with the rise in water temperature. The required time for the decrease in the oocysts survival ratio of 90 % at 60, 55, 50, 45, 40, 30 and 20 °C was 3 min, 42 min, 3 hours, 31 hours, 7 days, 31 days and 150 days, respectively. The decrease of the survival ratio of the oocysts at 10 and 4 °C was less than 10 % after 150 days of storage.

Keyword; *Cryptosporidium parvum* oocysts, *In vitro* Excystation, Survival, Effect of Temperature, Flow Cytometry

1. はじめに

下水処理場に流入する *Cryptosporidium* オーシストのほとんどは、活性汚泥処理において汚泥に移行する¹⁾。汚泥の再利用における感染リスクを低下させるためには、汚泥処理過程で安全なレベルまでオーシストの生存率を減少しておく必要がある。現在、著者らは汚泥処理過程における *Cryptosporidium* オーシストの生存率の減少効果を明らかにすることを目指しているが、この研究を遂行するためには、*Cryptosporidium* オーシストの生死を判定する必要がある。現在、*Cryptosporidium* オーシストの生死の判定方法には、生物としての生死を判定する生育活性試験と動物への感染性から判定する感染試験がある。生育活性試験は、脱嚢法²⁾やバイタル染色法^{2) 3)}が利用され、感染試験は、マウスへの感染実験⁴⁾や細胞培養法⁵⁾が利用されている。オーシストの生死の判定には簡便な脱嚢法やバイタル染色法などの生育活性試験が利用されることも多い。しかし、近年、脱嚢法やバイタル染色法から評価した生育活性とマウスへの感染実験から評価した感染性の間には、相関が認められないとする報告^{6) 7)}も存在する。現時点では、脱嚢法やバイタル染色法からオーシストの生死や感染性を確実に判定することは困難であると考えられる。オーシストの生死や感染性を確実に反映できる試験法の改良や開発は進められている⁸⁾が、確立された方法はない。現時点では、著者らはオーシストの生存率の減少傾向は、簡便な生育活性試験から把握した後、この生育活性試験の結果を基に条件を絞り、感染実験からオーシストの感染性を確認することが望ましいと考えている。

汚泥処理過程における *Cryptosporidium* の生存率に影響を及ぼす重要な環境因子は、水温と時間であると考えられる。オーシストの感染性は60℃以上で容易に消失されることは報告¹⁰⁾されているが、4～60℃の水温においてオーシストの生存率を経時的に調査した報告は少ない。そこで、本研究では、オーシストの生育活性の評価に利用されることが多い脱嚢法から、4～60℃の範囲における *Cryptosporidium* オーシストの生存率の減少傾向を探った。

* 建設省土木研究所 下水道部 汚泥研究室 (Sludge Management Division, Water Quality Control Department, Public Works Research Institute, Ministry of Construction)

2. 実験方法

2.1 供試 *Cryptosporidium* オーシスト

本実験で使用した *Cryptosporidium* オーシストは、大阪市立大学医学部医動物学教室の井関基弘博士から分与された *Cryptosporidium parvum* (HNJ-1) である。実験に供するオーシストは、HNJ-1 株を SCID マウスで継代し、排出された糞便から比重 1.10 の Percoll ショ糖液による遠心浮遊法で精製し、リン酸緩衝液で遠心洗浄した。なお、本実験では、排出されてから 1 週間以内に精製・洗浄したオーシストを実験に供した。

2.2 実験操作

本実験では、4, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60℃の温度条件下で 0 から 150 日間保存したオーシストの生存率を脱囊法から評価した。実験では、15ml のチューブと 1.5ml のチューブを使用した。4 から 45℃までの実験では、 10^6 個 / ml にリン酸緩衝液で調整したオーシスト液 10ml を 15ml チューブに入れ、このチューブを 10, 20, 30, 40, 45℃に設定したインキュベータ内に保管した。4℃の条件は 4℃に設定された冷蔵庫に保管した。その後、経日的に保存用チューブからオーシスト液を 0.2ml 取り出し、このオーシスト液について脱囊操作を行った。50, 55, 60℃のケースでは、オーシスト液が設定温度にできるだけ速く到達するように 1.5ml の小型チューブを使用した。このチューブに 10^6 個 / ml のオーシスト液を 1.5ml 入れ、このチューブを 50, 55, 60℃に設定したウォーターバスで保温し、経時的に各チューブからオーシスト液を 0.2ml を取り出し脱囊操作を行った。脱囊操作は 2.3 に示す。なお、本試験は全ケース 3 回行った。

2.3 脱囊操作

脱囊操作は、基本的に Campbell ら¹¹⁾の方法によった。脱囊操作は次のとおりである。脱囊操作を行う試料 0.2ml は、1.5ml のチューブへ入れ、4℃, 11000G, 1 分の条件で遠心分離を行い、底部 0.1ml を残し上澄水を吸引除去した。次に、塩酸性 HBSS (pH2.75) 液を 1ml 加え、37℃に設定したウォーターバスにより 30 分間保温した。その後、4℃, 11000G, 1 分の条件で遠心分離を行い、底部 0.1ml を残し上澄水を吸引除去した。次に、HBSS をベースに調整した 0.1% デソキシコール酸ナトリウムと 0.2% 炭酸水素ナトリウムの混合液を 1ml 加え、37℃に設定したウォーターバスにより 4 時間保温した。脱囊操作を終えたチューブは、4℃, 11000G, 1 分の条件で遠心分離した後、上澄水 0.5ml を吸引除去し、10% リン酸緩衝ホルマリン溶液を 0.5ml 加えて 4℃の冷蔵庫に一晩保管し、翌日、2.4 の手順により蛍光抗体染色を行った。

2.4 蛍光抗体染色操作

本実験では、空オーシストと完全オーシストを迅速に判別できるフローサイトメトリーを脱囊評価に利用した。オーシストをフローサイトメーターで検出する場合、オーシストを蛍光抗体染色する必要がある。本研究では、FITC 直接蛍光抗体試薬 (Crypt-a-glo, waterborne 社製) をリン酸緩衝液で 10 倍に希釈し、0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過処理したものを使用した。蛍光抗体染色は、1.5ml のチューブ内で次の通り行った。蛍光抗体染色を施すサンプルは 4℃, 11000G, 1 分の条件で遠心分離し、底部 0.1ml を残し上澄水を吸引除去した後、このチューブにヤギ血清 0.1ml と 10 倍希釈蛍光抗体試薬を 0.1ml 加えて攪拌し、室温暗所で 45 分間、蛍光抗体染色を行った。染色終了後、リン酸緩衝液を 1ml 加え攪拌し、4℃, 11000G, 1 分の条件で遠心分離を行い、底部 0.1ml を残し上澄水を吸引除去した。次に、このチューブに 0.1% Tween80 溶液を 1ml 加え攪拌した後、目開き 37 μ m のナイロン製メッシュでろ過し、このろ液中のオーシストの脱囊率を算出した。

2.5 フローサイトメーターの設定条件

フローサイトメトリーによる完全オーシストと空オーシストの判定は基本的に Vesey¹²⁾らの方法によった。なお、オーシストは 10000 個測定した。フローサイトメーターは、Beckman Coulter 社製の ALTRA を使用した。フローサイトメーターの分析条件は次のとおりである。アルゴンレーザー出力: 40mW, FS: 106V, PMT1: 378V, PMT2: 541V, ディスクリミネーター 660, フローレート: 約 200 個 / 秒。

以上の脱囊操作による新鮮なオーシストの脱囊率は、90 ~ 95% の範囲であった。新鮮なオーシストの脱囊試験前と脱囊試験後のフローサイトメトリー分析結果を Fig.1,2 に示した。Fig.1,2 中の C 範囲内の内のドットが完全オーシストを反映し、B 範囲内のドットが空オーシストを反映している。

2.6 生存率の計算方法

脱嚢率からのオーシストの生存率の算出は小澤ら¹³⁾の方法を基本とした。この評価法では、脱嚢操作によりスポロゾイトが脱嚢したオーシストを生育活性有りと判定し、脱嚢操作前に脱嚢していたオーシストおよび脱嚢操作で脱嚢しなかったオーシストは、生育活性無しと判定される。

$$V = (E a - E b) / (E c - E d) \quad \dots\dots (1)$$

ここで、V : 生存率(脱嚢操作によりスポロゾイトが脱嚢したオーシストの割合)

E a : 各温度条件下で各期間保存した後における脱嚢操作後の脱嚢率(%)

E b : 各温度条件下で各期間保存した後における脱嚢操作前の脱嚢率(%)

E c : コントロール (新鮮なオーシスト) の脱嚢操作後の脱嚢率(%)

E d : コントロール (新鮮なオーシスト) の脱嚢操作前の脱嚢率(%)

$$\text{脱嚢率 (\%)} = (\text{全検出オーシスト個数} - \text{完全オーシストの個数}) / \text{全検出オーシストの個数} \times 100 \dots (2)$$

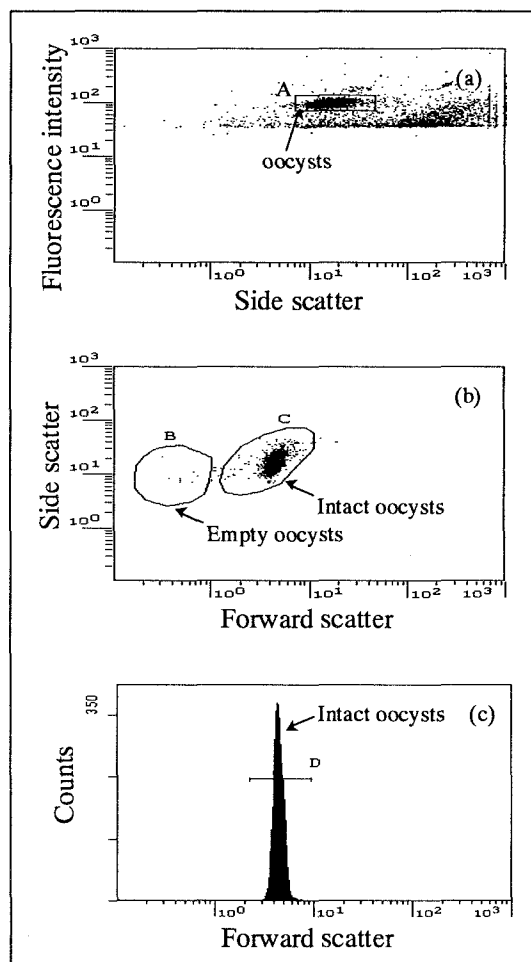


Fig.1 Flow cytometric analysis of fresh *C.parvum* oocysts before excystation assay . (a) The relationship between side scatter and fluorescence intensity. (b) The relationship between forward scatter and side scatter. (c) The relationship between forward scatter and counts.

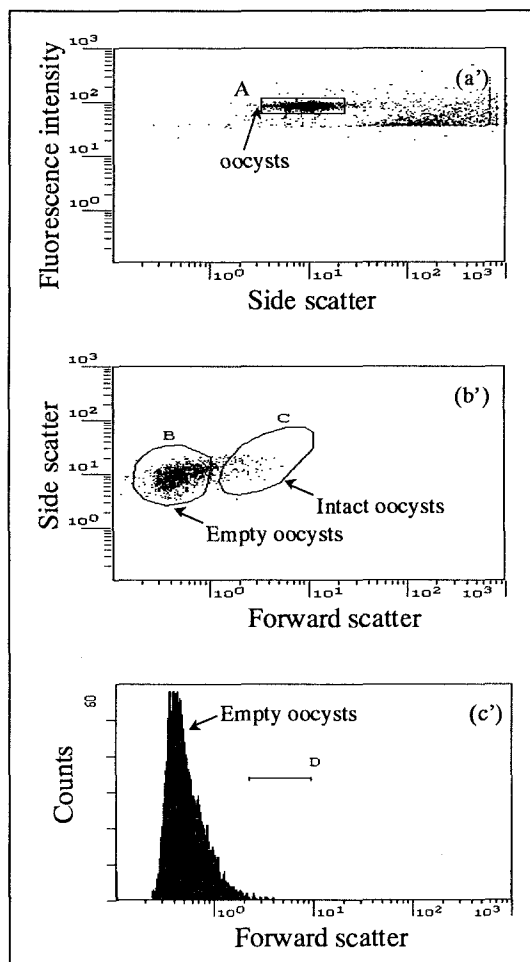


Fig.2 Flow cytometric analysis of fresh *C.parvum* oocysts after excystation assay. (a') The relationship between side scatter and fluorescence intensity. (b') The relationship between forward scatter and Side scatter. (c') The relationship between forward scatter and counts.

3. 実験結果

Fig.3, Fig.4, Fig.5 に各温度条件における経過時間とオーシストの生存率の関係を示した。各温度で生存率が90%まで減少する時間を図より読みとると60℃では約3分、55℃では42分、50℃では3時間、45℃では31時間、40℃では7日、30℃では31日、20℃では150日となった。10℃及び4℃では、150日間保存した後もオーシストの生存率の減少は10%以下であった。Fig.6は、各温度とオーシストの生存率が90%減少するまでの時間の関係を示したものである。脱糞試験から判定したオーシストの生存率は、温度が高くなるに従い、速く減少することが示された。

4. 考 察

本実験から温度20～60℃の範囲における *Cryptosporidium parvum* オーシストの生存率の減少速度を把握することができた。一方、4℃および10℃の条件下で0～150日間保存しても、オーシストの生存率はほとんど減少せず、オーシストの生存率の減少速度は得られなかった。Fig.6から、4℃および10℃の条件でオーシストの生存率が90%減少するまでのおおよその時間を推測すると、200日以上は必要と考えられる。Medemaら¹⁴⁾は、5℃および15℃の河川水中にオーシストを6ヶ月以上保存した後においても、生育活性のあるオーシストは検出されたと報告しており、低温環境下にあるオーシストは、長期間生存することが予想される。

温度とオーシストの感染性を調査した報告はFayerら¹⁵⁾のもの

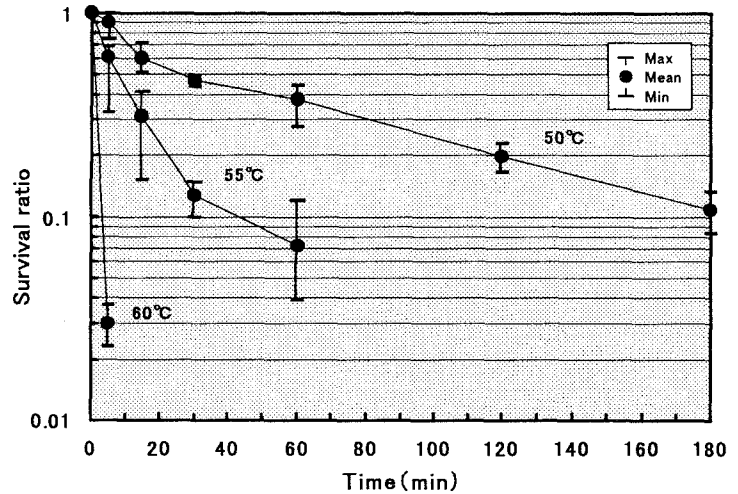


Fig.3 The survival ratio of the *C.parvum* at 60, 55, 50 °C

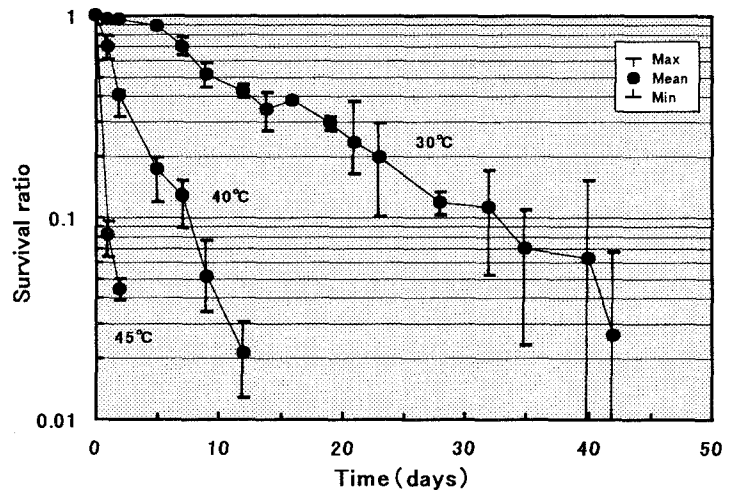


Fig.4 The survival ratio of the *C.parvum* at 45, 40, 30 °C

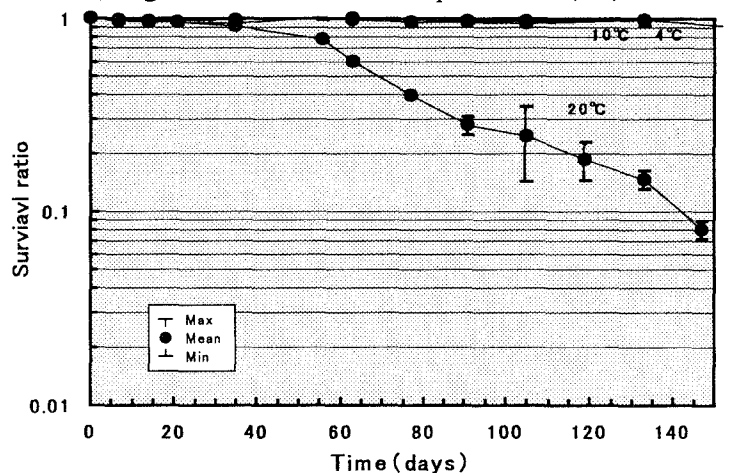


Fig.5 The survival ratio of the *C.parvum* at 20, 10, 4 °C

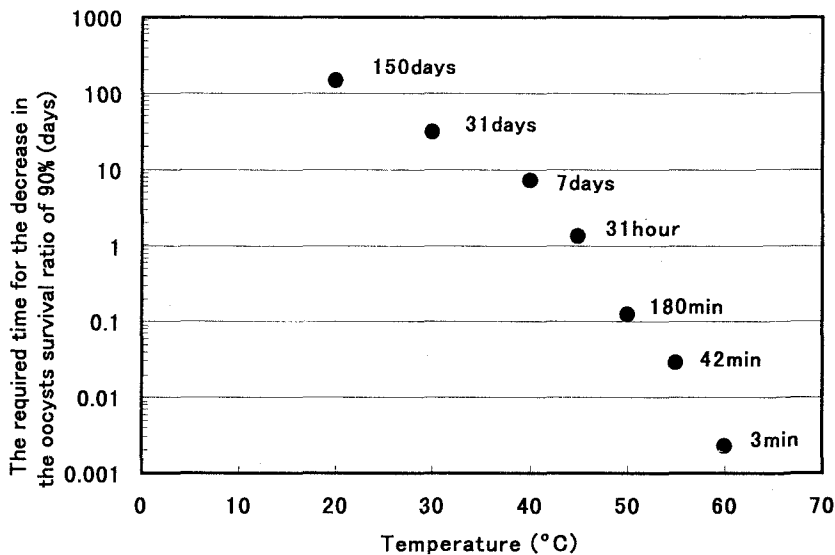


Fig.6 The relationship between temperature and the required time for the decrease in the oocysts survival ratio of 90%.

がある。Fayer らは、 $-10 \sim 35^{\circ}\text{C}$ の範囲におけるオーシストの感染性をマウスによる感染実験から評価している。Fayer らの報告によると、 30°C 、 20°C 、 10°C 、 5°C の条件においてマウスへの感染性を90%減少（10匹中1匹が感染）させるまでの期間は、 30°C では4週間（28日）、 20°C では24週間（168日）であった。 10°C 、 5°C では24週間（168日）保存した後も感染力はほとんど失われていない。また、 60°C 以上の高温域の感染実験¹⁰⁾では、 65°C 、5分以上でマウスへの感染性が消失されることを報告している。Vergara-Castiblanco らは、オーシストの生育活性と感染性の相関は株により異なることを指摘している⁹⁾。このことから、著者らの脱囊試験の結果からオーシストの感染性が消失される条件を明らかにすることや株が異なるFayer らの結果と比較することはできないが、オーシストの生存性や感染性の減少は、温度が上昇するに従い高くなることは明らかなようである。本研究から得られた温度とオーシストの生存率の減少速度の関係から、汚泥処理過程でのオーシストの生存率の減少に有効な処理は、発酵温度が 60°C 近くまで達するコンポストや 55°C の高温嫌気性消化であると推察される。オーシストの生存率は温度の他に塩分やアンモニアにも影響されることが報告¹⁶⁾¹⁷⁾されている。このことから、オーシストの生存率は保存する溶媒により変化すると考えられ、今後、汚泥中のオーシストの生存可能期間も調査する必要がある。

5. まとめ

本研究では、脱囊-フローサイトメトリー試験から、水温 $4 \sim 60^{\circ}\text{C}$ の条件下における *Cryptosporidium parvum* オーシストの生存率を経時的に調査した。その結果、オーシストの生存率は、水温が高くなるに従い速く減少した。オーシスト生存率が90%減少するに要する時間は、 60°C では3分、 55°C では42分、 50°C では3時間、 45°C では31時間、 40°C では7日、 30°C では31日、 20°C では150日、 10°C では150日保存後もオーシスト生存率の減少は10%以下であった。

今後、衛生上の安全性を確保するための処理レベルを決定するためには、感染実験からもオーシストの感染性を判定する必要があると考えられる。

参考文献

- 1)諏訪守, 鈴木穰: 活性汚泥処理によるクリプトスポリジウムの除去実験, 第34回日本水環境学会年回講演集, p64, 2000
- 2)本山信行, 小澤克行, 平田強, 星川寛, 茂庭竹生, 金子光美: オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化能に関する実験的研究, 水道協会雑誌, Vol.64, No.1, pp.19-26, 2000
- 3)M.Belosevic, R.A.Guy, R.Taghi-Kilani, N.F.Neumann, L.L.Gyurek, L.R.J.Liyanage, P.J.Millard, G.R.Finch: Nucleic Acid Stains as Indicators of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Viability, International Journal for Parasitology, Vol.27, No.7, pp787-798, 1997
- 4)G. R. Finch, E. K. Black, L. Gyurek, and M. Belosevic: Ozone Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Demandfree Phosphate Buffer Determined by In vitro Excystation and Animal Infectivity, Applied and Environmental Microbiology, Vol.59, No.12, pp.4203-4210, 1993
- 5)Theresa R. Slifko, Debra Friedman, Joan B. Rose, and Walter Jakubowski: An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture, Applied and Environmental Microbiology, Vol.63, No9, pp.3669-3675, 1997.
- 6)C.A.Vergara-Castiblanco, F.Freire-Santos, A.M.Oteiza-Lopez, M.E.Ares-Mazas: Viability and infectivity of two *cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location, Veterinary Parasitology, Vol.89, pp.261-267, 2000
- 7)Norman F. Neumann, Lyndon L. Gyurek, Gordon R. Finch and Miodrag Belosevic: Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice, FEMS Microbiology Letter Vol.183, pp.331-336, 2000
- 8)Jirigut and Richard G.Nelson: *Cryptosporidium parvum*: Synchronized Excystation in vitro and evaluation of sporozoite infectivity with a new lectin-based assay, Journal of Eukaryotic microbiology, Vol.46, No.5, p56S, 1999
- 9)G.Vesey, N.Ashbolt, E.J.Fricker, D.Deere, K.L.Williams, D.A.Veal and M.Dorsch: The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts, Journal of Applied Microbiology, Vol.85, pp.429-440, 1998
- 10)R.Fayer: Effect of High Temperature on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol.60, No.8, pp.2732-2735, 1994
- 11)A.T.Campbell, L.J.Robertson and H.V.Smith: Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts: Correlation of In Vitro Excystation with Inclusion or Exclusion of Fluorogenic Vital Dyes, Applied and Environmental Microbiology, Vol.58, No.11, pp.3488-3493, 1992
- 12)G.Vesey, K.R.Griffiths, M.R.Gauci, D.Deere, K.L.Williams and D.A.Veal: Simple and Rapid Measurement of *Cryptosporidium* Excystation Using Flow Cytometry, International Journal for parasitology, Vol.27, No.11, pp1353-1359, 1997
- 13)小澤克行, 竹馬大介, 平田強: 脱囊法とDAPI/PI染色法による *Cryptosporidium parvum* オーシストの生育活性値に及ぼす酸前処理の影響, 水環境学会誌, Vol.22, No.10, pp.827-832, 1999
- 14)G.J.Medema, M.Bahar, and F.M.Schets: Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, *Fecal Enterococci* and *Clostridium perfringens* in River Water: Influence of Temperature and Autochthonous Microorganisms, Water Science and Technology, Vol.35, No.11-12, pp.249-252, 1997
- 15)R.Fayer, J.M.Trout, and M.C.Jenkins: Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures, Journal of Parasitology, Vol.84, No.6, pp.1165-1169, 1998
- 16)F.Freire-Santos, A.M.Oteiza-Lopez, C.A.Vergara-Castiblanco, E.Ares-Mazas: Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques, Veterinary Parasitology, Vol.89, pp253-259, 2000
- 17)Michael B. Jenkins, Dwight D. Bowman, William C. Ghirese: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia, Applied and Environmental Microbiology, Vol.64, No.2, pp.784-788, 1998