



# Changes of physical and biochemical properties of *Cryptosporidium* oocysts with various storage conditions

井上, 亘

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-06-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2888

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002888>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 6 1 】

氏 名・（本 籍） 井上 亘 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1978号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年6月14日

【 学位論文題目 】

Changes of physical and biochemical properties  
of *Cryptosporidium* oocysts with various storage conditions  
(様々な保存条件下における *Cryptosporidium*  
のオーシストの物理的及び生物化学的性状の変化)

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英

教 授 東 健

教 授 川端 真人

*Cryptosporidium* は家畜や野生動物など少なくとも79種のほ乳類に感染することが知られている (Fayer et al., 1997)。これらの動物が感染を受けた時には、ほぼ1週間の潜伏期間の後、その糞便中に多量のオーシストを排出し始める。宿主から体外に排出されたこれらオーシストはさまざまな環境ストレス下で生き残り、環境を広範囲に汚染する。さらにこれらオーシストは直径が  $4\text{--}6\text{ }\mu\text{m}$  と小さいことに加えて、水道で消毒剤として用いる塩素に対しても著しい耐性を有する。公衆衛生が行き届き、かつ水道が完備した先進国においてさえ水道が原因の集団感染を頻繁に引き起こし、大きな問題になっている。

近年、水からの *Cryptosporidium* の検出法については多くの改良がなされてきたが現在用いられている米国や英国の公定法でさえも、いまだ試料の濁質や分析者の技術レベルによって回収率に変動が生ずるなどの問題点を有していることが指摘されている。

Anguish と Ghiorse (1997)や Brush ら(1998)はオーシスト表面の性状は齢によって変わることを報告している。一方、Klonicki ら(1966)はオーシスト表面の性状は検出方法に影響することを報告している。さらに、Medema ら(1998)は同じ齢のオーシストでも比重にばらつきがあるため、遠心沈殿法や浮遊法では比重の大小によってオーシストのロスが生じるとも述べている。

これらの報告から、保存にともないオーシストの性状が変化し、それが様々な方法で行う回収試験の回収率に影響を与えるということが考えられる。

そこで本研究は、異なる環境下に保存された *C. parvum* のオーシストの物理的あるいは生物化学的性状が保存期間の延長にともない如何に変化するのかを調べ、さらにはそれらの変化が従来行われている環境水からの分離・検出試験の回収方法に如何に影響するのかを考察するためにに行った。

本実験には生後13日から15日のホルスタイン種の仔牛から採取した糞便を採取後24時間以内に用いた。

オーシストの計数は市販の fluorescein isothiocyanate 標識抗 *Cryptosporidium* モノクローナル抗体で蛍光染色し、ビニールフレームスライドグラス法 (Oda ら, 2002) を用い蛍光顕微鏡下で行った。また、形態観察のための試料はウエルスライドを用い、カバーグラスをネイルエナメルで封入した観察スライドを用いた。核染色は 4'-6-Diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI) を用いて行った。

保存実験に際しては糞便懸濁液を PBS で洗浄後、得られた沈渣を以下のとおり処理した。1) 10 倍量以上の 2.0% 重クロム酸カリウム溶液に懸濁 (Cr と略記する)、2) 10 倍量以上の脱イオン水に懸濁 (W)、および 3) 沈渣をそのままの状態に保存 (P) である。これらを 4℃ の冷蔵庫中 (4) と 18℃ のフラン器中 (18) に保存し、保存後の 0 日目、25 日目、50 日目および 100 日目に取出して形態、DAPI による核染色性、比重、超

音波処理に対する堅牢性及びオクタン吸着率による疎水性を調べた。このうち形態については、オーシストを 4 つの形態型に分類し記録した。すなわち、オーシスト内にスポロゾイトと残体が偏心性に局在し、他の部分にはバキューオール状の空洞あるいは窪みが認められるもの (形態型 1)、オーシストに顕著な変形が認められず、内部にスポロゾイトと残体が均一に散在しているもの (形態型 2)、内部の変形が著しく、スポロゾイトが明瞭でないもの (形態型 3)、および内容物がないかほとんどないもの (形態型 4) である。

採取直後のオーシスト (保存 0 日) では、全オーシストの 52% が形態型 1、36% が形態型 2、そして残りが形態型 3 あるいは 4 であった。Cr4 では保存期間にかかわらずこの比率はほとんど変化しなかった。一方、W4、Cr18 あるいは W18 に保存した場合は、保存日数にともないおおむね形態型 1 が減少し形態型 2 および 3 の割合が増加する傾向が認められた。P18 においては、さらに変化は著しく形態型 1 のオーシストは少なくなり、形態型 2、3 あるいは形態型 4 の割合が増加した。

形態型 4 及び形態型 3 はその形態から、共に死滅オーシストであると考えた。形態型 2 は典型的な形態であったが、新鮮な試料に多くみられた形態型 1 ではバキューオール様の構造やくぼみなどの変形が認められた。このような形態のオーシストが出現した原因はオーシスト内外の浸透圧の差であると考えられる。このことは形態型 1 のオーシスト壁は半透性を維持していること示唆し、逆に形態型 2 のように高張液中で変形しないオーシストはすでにオーシスト壁の半透性が損なわれていると考えられる。

現在の水からの回収法において、オーシストの形態は内部にスポロゾイトや残体が認められるものと規定されており、内容物がきれいにおさまった長円形のオーシストが典型的なものであるという認識があるが、本研究の結果、新鮮な試料においては内容物が片寄っていたり、オーシストが窪んでいるもの (形態型 1) の方がむしろ高頻度で出現することが明らかになった。今回は生存性に関する実験は行わなかったため、形態上の特徴と生存性との検討は出来ないが、オーシストが死滅するのが形態型 1 から形態型 3 の間のどの時点であっても、過去の報告の範疇に収まる。また、4℃ で保存したオーシストより 18℃ で保存したオーシストの方が形態的な変化も早く、これも生存性を調べた報告と同じ傾向であった。現在、水の *Cryptosporidium* の回収法ではオーシストの生存性が確認できないことが大きな欠点であるといわれているが、形態的な特徴と生存性の関係を詳細に調査することにより、簡便に生存性をチェックできる方法が開発されるかもしれない。

オーシストの大きさと扁平率については、保存条件や保存日数に影響を受けることなくほとんど変化は認められなかった。このことは大きさと形に基づいて判定するレーザー स्क्यानを用いた検査法はオーシストの新旧にかかわらず安定した結果を示すことを示している。

DAPIによる核染色性については、オーシストをCr4およびCr18の条件で保存した場合、DAPI陽性オーシストの出現頻度は保存日数とともにわずかに増加したが、概して低かった。一方、W4、W18およびP18の各条件で保存した場合には保存期間に応じて、主に形態型2のものに変化が見られた。また、形態型1や形態型4では保存条件や保存期間にかかわらずほとんどDAPI陰性であった。このことからDAPI染色性を同定の根拠として重視しすぎると新鮮で感染性を有していると思われる、オーシストを見逃すおそれのある事を意味している。

オーシストの比重についてはCr4、W4およびCr18は、保存日数が経過しても、変化はほとんど認められないか、若干小さくなる程度であった。P18で保存したオーシストだけは保存日数とともに比重が有意に増加した。浮遊法を利用した検査法を用いた場合、これらのオーシストの回収率は低くなることが考えられる(Medema et al. 1998)。したがって、オーシストの試験工程において回収率を損なわないためには、オーシストを乾燥させないように取り扱うことが重要である。

超音波処理に対する堅牢性については、P18以外の各条件で保存した試料では、100日保存した場合でも80%以上のオーシストが120秒の超音波処理に耐えており、保存日数の経過に伴う超音波処理に対する堅牢性の低下は認められなかった。これに対して、P18では50日以上保存したもので、60秒以上の超音波処理に対する堅牢性の低下が顕著であった。オーシストの検出法において超音波処理を行う場合は、温度上昇がおこらない条件で、60秒以内で行うことが重要であると考えられる。

オクタン吸着率による疎水性については保存0日のオーシストは16%がオクタンに吸着した。保存温度にかかわらず、Crに保存したものでは0日のものよりわずかに高くなり、一方、水に保存したものでは0日のものと同じかわずかに低下した。これらの結果はDrozdとSchwartzbrod(1996)の報告どおり、極端な疎水性を示さないものであった。一方、P18で保存したオーシストは50日目のものも100日目のものも、ほぼ100%のオーシストがオクタンに吸着した。こういったオーシストでは回収結果が著しく変動するであろうと考えられる。したがって、フィルターからの剥離や遠心分離等の回収試験の様々な工程では試料の半乾燥を避け、界面活性剤等を用いるなど、可能な限りオーシストの吸着を防止することが、安定した高い回収率を得るためには不可欠であろう。

水からのCryptosporidiumオーシストの回収方法として現在までに様々なものが採用され、あるいは現在も開発が進められているが、いずれにしてもオーシストの性状が回収や同定に影響し、これらの性状は保存時間や保存状態によって変化するという事が今回の研究により示唆された。現在の試験方法を実際のフィールドで用いる場合も、新しく方法を開発する場合もオーシストの性状がどのようなものであるかを考慮し、その影響を出来るだけ少なくすることが、正確で信頼性のある試験には必要であろう。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 1981 号	氏 名	井上 亘
論文題目 Title of Dissertation	Changes of physical and biochemical properties of Cryptosporidium oocysts with various storage conditions 様々な保存条件下におけるCryptosporidiumのオーシストの物理的及び生物化学的性状の変化		
審査委員 Examiner	主 査 西尾 久英 Chief Examiner 副 査 東 健 Vice-examiner 副 査 川端 豊人 Vice-examiner		
審査終了日	平成 18 年 5 月 17 日		

(要旨は1, 000字〜2, 000字程度)

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) は激しい水様性の下痢を引き起こす原虫である。感染能を有するオーシストを経口摂取することで感染が成立し、オーシストは水道が消毒剤として用いる塩素に対して著しい耐性を有するため、公衆衛生が行き届き、かつ水道が完備した先進国においてさえ水道が原因の集団感染を頻繁に引起し、大きな問題になっている。また、感染力が強いためにそのリスクを把握するためには大量の試料水中のオーシスト数を調べる必要があり、したがって、検出には大量の試料水の濃縮と夾雑物からの精製が必要となる。従来の検査方法では、その回収率は低く、大きくばらつき、また偽陰性や偽陽性も多く見られた。その後、米国 EPA が開発した Method1623 などの免疫磁気分離法と蛍光抗体法を用いる方法で回収率等がある程度改善されたが、まだ十分ではない。検出過程でのオーシストのロスの原因は試料水やオーシストの性状が関係することが報告されている。また、オーシストの性状については加齢にともない変化することも報告されている。しかしながら、時間経過とともに変化したオーシストの性状がどのように検出過程に影響するかということを総括的に調べた研究はない。

そこで、本研究では、異なる環境下に保存された *C. parvum* のオーシストの物理的及び生物化学的性状が保存期間の延長にともない如何に変化するかを調べ、さらにはそれらの変化が従来行われている環境水からの分離・検出試験の結果に如何に影響するかを考察するために行い、次のことを明らかにした。

1. 採取直後のオーシストでは、全オーシストの 52% がオーシスト内に空胞状の構造を有するか、あるいはオーシストがくぼんでおり (形態型 1)、36% が典型的な形態で (形態型 2)、残りがスポロゾイトが変性しているか (形態型 3) あるいはオーシストの内容物がなくなかほとんどないもの (形態型 4) であった。

2. 形態型 1 のオーシストの変形の原因は、オーシスト壁が半透性を保持しているためと考えられ、このようなオーシストは生存していることが示唆された。一方、変形がない形態型 2 のオーシスト壁は半透性を喪失しており、既に死滅しているかあるいはまもなく死滅するであろうことが示唆された。このことから、典型的な形態のオーシストよりも変形したオーシストの方がむしろ新鮮であり、顕微鏡観察による鑑定で注意する必要がある。

3. 重クロム酸カリウム溶液に 4℃ で保存したもの (Cr4) では保存期間にかかわらずこの比率はほとんど変化しなかった。重クロム酸カリウム溶液に 18℃ で保存したもの (Cr18)、水に 4℃ (W4) 及び 18℃ で保存したもの (W18) では、保存期間が長くなるのに伴い、形態型 1 が減少し、形態型 2 及び 3 の割合が増加する傾向が認められた。ペレットで 18℃ で保存したもの (P18) においては、さらに変化は著しく、形態型 1 のオーシストが少なくなり、形態型 2、3、4 の割合が増加した。

4. オーシストの大きさと扁平率については、保存条件や保存日数の影響を受けることなく、ほとんど変化は認められなかった。

5. DAPI 染色性試験において、Cr4 及び Cr18 では、保存後においても DAPI 陽性オーシストの出現頻度は概して低かった。一方、W4、W18 及び P18 では保存期間に応じて、主に形態型 2 のものに変化が見られた。このことは DAPI 染色性を同定の根拠として重視しすぎると新鮮で感染性を有していると思われるオーシストを見逃すおそれのある事を意味している。

6. オーシストの比重については、Cr4、W4 及び Cr18 は、保存日数が経過しても、変化はほとんど認められないか、若干小さくなる程度であった。P18 では保存日数とともに比重が有意に増加した。浮遊法ではこれらのオーシストの回収率は低くなることが考えられる。

7. 超音波処理に対する堅牢性については、P18 以外の各条件で保存した試料では、100 日保存した場合でも 80% 以上のオーシストが 120 秒の超音波処理に耐えた。これに対して、P18 では 50 日以上保存したもので、60 秒以上の超音波処理に対する堅牢性の低下が顕著であった。超音波処理を行う場合は、温度上昇がおこらない条件で、60 秒以内で行うことが重要であると考えられる。

8. オクタン吸着率による疎水性については、保存温度にかかわらず、保存に伴い Cr では 0 日のものよりわずかに高くなり、W では 0 日のものと同じかわずかに低下した。一方、P18 では保存後は、ほぼ 100% のオーシストがオクタンに吸着した。こういったオーシストでは回収結果が著しく変動するであろうと考えられる。したがって、回収試験の様々な工程では試料の半乾燥を避け、界面活性剤等を用いるなど、可能な限りオーシストの吸着を防止することが、安定した高い回収率を得るためには不可欠であろう。

以上、本研究は、クリプトスポリジウムのオーシストの性状について研究したものであるが、従来明確でなかったオーシストの性状と検出法の関係を明らかにし、また、日常業務で簡便にオーシストの生死判定を行える方法を開発する上で重要な示唆を与えるものであり、クリプトスポリジウムについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。