

銅イオンの *Cryptosporidium parvum* オーシスト 感染性に対する不活化効果

¹北里環境科学センター, ²北里大学医学部微生物・寄生虫学,

³北里大学医学部実験動物センター, ⁴同 第5内科

菊野理津子¹⁾ 笹原 武志²⁾ 関口 朋子²⁾ 高橋 晃³⁾
 曾我 英久¹⁾ 青木 正人¹⁾ 佐藤 義則²⁾ 高山 陽子⁴⁾
 北里 英郎²⁾ 井上 松久^{1,2)}

(平成15年10月16日受付)

(平成15年11月18日受理)

Key words : *Cryptosporidium parvum*, copper ions, disinfection

[感染症誌 78 : 138~140, 2004]

1. 序 文

Cryptosporidium parvum はヒトを含む哺乳類の腸管に寄生する原虫であり, ヒトや家畜が感染すると激しい下痢を起こす¹⁾. その際, 糞便中にはスポロゾイトを包蔵する成熟したオーシストが排出されるが, このオーシストは環境抵抗性が強いためにその殺菌法について苦慮されている. 最近, 我々は強酸性電解水の一つである混合酸化剤溶液 (Miox 溶液) が優れた不活化効果を示すことを明らかにした²⁾. 今回は細菌に対して殺菌作用を持つことが知られている銅イオン (Cu^{2+})³⁾ について *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果について検討した.

2. 材料と方法

銅イオン溶液としては濃硝酸処理銅板より調製された溶液 (銅板溶液と略す), 硫酸銅溶液そして原子吸光分析用標準液 (標準液と略す, 和光純薬, 大阪市) を用いた. Dulbecco's phosphate-buffered

saline (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) に 10^6 個/ml の割に浮遊された *C. parvum* HNJ-1 株 オーシストは 0.25, 1, 3mg/l の各濃度になるように Cu^{2+} が添加され, 25℃にて12時間ゆっくりと振盪された. 処理されたオーシストの形態はノマルスキー微分干渉装置付き顕微鏡 (BX60, オリンパス, 東京) にて観察され, 既報²⁾ に従ってオーシストの回収率および変性率が測定された. その後, 既報²⁾ に従って処理オーシストを1群5匹の ddy 系乳飲みマウスに感染させ, 7日後に腸管当たりのオーシスト数を算定した. その結果は腸管当たりの (Number of oocysts/intestine \pm SD) あるいは無処理対照群の平均オーシスト数から銅イオン処理群のそれを引いたオーシストの減少数 (\log_{10}) として表現された. 2群間の有意差検定は t 検定にて行い, 危険率 (P) < 0.07 を有意とした.

3. 成 績

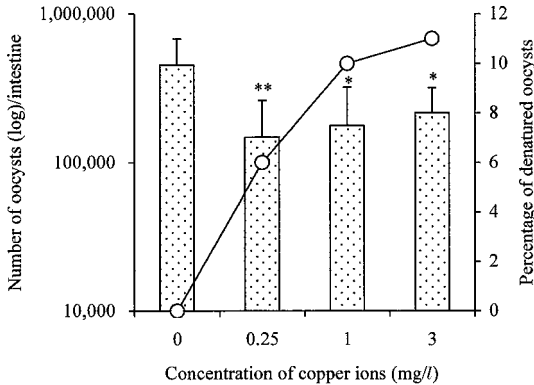
銅板溶液を用いてオーシストの感染性不活化効果に及ぼす Cu^{2+} 濃度の影響について検討した. その結果, 無処理対照群では 4.5×10^5 個のオーシストが検出されたのに対して銅板溶液処理群では

別刷請求先 : (〒228 8555) 相模原市北里 1 15 1

北里大学医学部微生物・寄生虫学

笹原 武志

Fig. 1 Comparison of various concentrations of copper ions on the inactivation of *C. parvum* oocysts suspended in PBS. The oocysts were exposed to 0.25, 1 or 3 mg/L of copper ions in PBS for 12 h. The neonatal mice were orally challenged with 10^4 of the exposed oocysts and sacrificed on day 7. Results were expressed as the mean numbers of oocysts ($n = 10$) \pm SD. Open circles show the percentages of denatured oocysts. A *P* value of less than 0.07 are significant different (**P* < 0.07, ***P* < 0.03)



0.25mg/l 以上の Cu^{2+} 濃度で有意なオーシスト数の減少が認められた。即ち、その減少数は 0.25mg/l 処理で $0.49 \log_{10}$ 、1 mg/l 処理で $0.41 \log_{10}$ 、3 mg/l 処理で $0.36 \log_{10}$ あった (Fig. 1)。なお、その際の銅板溶液処理群におけるオーシスト回収率は無処理対照群とほぼ同程度であったが、オーシストの変性は 6% ~ 11% の割合で認められた。なお、その変性像はオーシスト壁の一部が傷害され、その内部のスプロゾイトは膨化して一部が球状を呈していた。次に、銅板溶液による不活化効果が銅イオンによるものであるかを硫酸銅溶液および標準液を用いて 0.25 mg/l の Cu^{2+} 濃度で検証した。その結果、銅イオン処理 12 時間後のオーシスト数は無処理対照群と比較してそれぞれ有意に減少しており、その減少数は硫酸銅溶液で $0.74 \log_{10}$ 、そして標準液で $0.62 \log_{10}$ であった。

4. 考 察

今回、塩素耐性を示す *C. parvum* オーシストの感染性不活化に Miox 溶液²⁾、オゾン⁵⁾そして遊離塩素とクロラミン⁶⁾による消毒法の他に新たに

Cu^{2+} による消毒法が有効であることが初めて明らかとなった。銅イオンは銀イオン (Ag^{2+}) と並んで種々の微生物³⁾や藻類⁷⁾に対して殺菌作用があることが知られており、その殺菌作用に発揮する Cu^{2+} 濃度の範囲は $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M である。今回 *C. parvum* オーシストの感染性を不活化するのに要した最小 Cu^{2+} 濃度は 0.25 mg/l、即ち 3.93×10^{-6} M であり、他の微生物の殺菌に要するこれまでの Cu^{2+} 濃度と著しい違いは認められなかった。

銅イオンによる殺菌作用には Cu^{2+} を触媒として水中の酸素分子から産生される過酸化水素やその最終産物であるヒドロキシル (OH^{\cdot}) が関与している⁸⁾。Miox 溶液による *C. parvum* オーシストの感染性不活化にはこの溶液に含まれる次亜塩素酸を主成分とする塩素関連物質や複数の酸素系酸化物質 (オゾン、過酸化水素、 OH^{\cdot}) などが関与していることから²⁾、今回の銅イオンによる *C. parvum* オーシストの感染性不活化にもこれらの酸素系酸化物質が重要な役割を果たしていることが推察された。また、既報²⁾と同様に、銅イオン処理されたオーシストの数は未処理対照群のそれとほぼ同じであったもののその形態は一部変性していたことから、銅イオンによる不活化効果はそれらの活性酸素群がオーシスト壁に対して強力な細胞傷害作用を及ぼした結果起こるスプロゾイトの変性に基づくものであると考えられた。

銅イオンを水中に持続的に遊離させる仕組みとしては銅製配管の利用そして銀・銅電極を用いたイオン化装置の設置が挙げられる。銅イオンによる *C. parvum* オーシストの感染性不活化も有効な殺菌法の一つとして今後の応用面についてさらに検討を重ねていく必要があるであろう。

謝辞：本研究は社団法人日本銅センターおよび (財) とうきゅう環境浄化財団からの研究助成により実施された。また、実験遂行に当たり卓越した技術をもって実験補助をしていただいた北里大学医学部特別研修生 佐藤真弓氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NL : Cryptosporidiosis. N Engl J Med 2002 ; 346 : 1723 - 31.

- 2) 笹原武志, 青木正人, 関口朋子, 高橋 晃, 佐藤義則, 北里英郎, 他: 複合酸化剤溶液の *Cryptosporidium parvum* オースト感染性に対する不活化効果. 感染症誌 2003 ; 77 : 75 - 82.
- 3) Kushner DJ : Influence of solutes and ions on microorganisms. In : Hugo WB, ed. Inhibition and destruction of the microbial cells. Academic Press, London, New York, 1971 ; p. 259 - 83.
- 4) Sasahara T, Maruyama H, Aoki M, Kikuno R, Sekiguchi T, Takahashi A, *et al.* : Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. J Infect Chemother 2003 ; 9 : 278 - 81.
- 5) Finch GR, Black EK, Gyurek L, Belosevic M : Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. Appl Environ Microbiol 1993 ; 59 : 4203 - 10.
- 6) Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR : Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Appl Environ Microbiol 1990 ; 56 : 1423 - 8.
- 7) Den Dooren de Jong LE : Tolerance of *Cholrella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. Antonie van Leeuwenhoek 1965 ; 31 : 301 - 13.
- 8) Cross JB, Currier RP, Torracco DJ, Vanderberg LA, Wagner GL, Gladen PD : Killing of *Bacillus* spores by aqueous dissolved oxygen, ascorbic acid, and copper ions. Appl Environ Microbiol 2003 ; 69 : 2245 - 52.

Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Copper Ions

Ritsuko KIKUNO¹⁾, Takeshi SASAHARA²⁾, Tomoko SEKIGUCHI²⁾,
Akira TAKAHASHI³⁾, Hidehisa SOGA¹⁾, Masahito AOKI¹⁾,
Yoshinori SATOH²⁾, Yoko TAKAYAMA⁴⁾,
Hidero KITASATO²⁾ & Matsuhisa INOUE^{1, 2)}

¹⁾Kitasato Research Centre for Environmental Sciences ²⁾Department of
Microbiology & Parasitology, Kitasato University School of Medicine,

³⁾Laboratory Animal Center for Medical Science, ⁴⁾Fifth Department of Internal Medicine,
Kitasato University School of Medicine