

混合酸化剤溶液の *Cryptosporidium parvum*

オーシスト感染性に対する不活化効果

¹北里大学医学部微生物学, ³実験動物センター, ²北里環境科学センター

笹原 武志¹⁾ 青木 正人²⁾ 関口 朋子¹⁾ 高橋 晃³⁾
佐藤 義則¹⁾ 北里 英郎¹⁾ 井上 松久¹⁾

(平成 14 年 7 月 31 日受付)

(平成 14 年 10 月 30 日受理)

Key words : *Cryptosporidium parvum*, mixed-oxidant solution, disinfectant

要 旨

強酸性電解水の一つである混合酸化剤溶液 (Miox 溶液と称す) の *Cryptosporidium parvum* オーシストの感染性におよぼす不活化効果について乳飲みマウス感染モデルを使って検討した。その結果, Miox 溶液 (滅菌 PBS 希釈) は残留塩素濃度および処理時間依存的にオーシストの感染性に対して不活化効果を発揮し, 腸管から検出されるオーシスト数は, 無処理対照群と比較して残留塩素濃度 5mg/l, 2 時間処理で $0.5 \log_{10}$, 4 時間処理で $1.5 \sim 2.1 \log_{10}$ の有意な減少を認めた。一方, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (滅菌 PBS 希釈) では残留塩素濃度 5mg/l, 4 時間同様に処理した場合でも腸管から検出されるオーシスト数の減少を全く認めなかった。また, 両者の不活化効果の違いは形態観察によって, Miox 溶液処理群にのみ変性オーシストが散見されたことから確認された。さらに, オーシストを含む生物処理下水に残留塩素濃度 5mg/l の Miox 溶液を加えて 4 時間処理し, オーシスト感染性の不活化効果を比較した。その結果, 腸管から検出されるオーシスト数は, 無処理対照群と比較して PBS 希釈 Miox 溶液で処理した場合に $2.1 \log_{10}$, 生物処理下水希釈 Miox 溶液で処理した場合に $0.8 \log_{10}$ の有意な減少を示した。以上の成績から, Miox 溶液は浄水や下水などの水環境を汚染する可能性のある *C. parvum* オーシストの感染性に対して優れた不活化効果を発揮することが示唆された。

[感染症誌 77: 75-82, 2003]

はじめに

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ことが知られている¹⁾。当該原虫オーシストは腸管粘膜上皮細胞の微絨毛に定着後スポロゾイトを脱囊させてその細胞膜内に感染し寄生胞を形成する。その後, その中で有性生殖と無性生殖を繰り返しながら活発に増殖し

て糞便中にスポロゾイトを包蔵する成熟したオーシストを排出する²⁾。このオーシストの感染力は非常に強く, 塩素耐性で環境抵抗性が強いために次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素系消毒剤による十分な不活化効果が期待出来ない。その為, 河川水や水道水やミネラルウォーターそして下水道水などの水環境或いは食品がこのオーシストに汚染されると大規模な集団感染が発生し, 地域社会に多大なる影響が起ることが懸念される。

C. parvum オーシストに汚染された水環境から

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学 笹原 武志

平成15年2月20日

のオーシスト除去対策としては、濾過法と塩素消毒或いは加熱処理による不活化法とがあるにすぎない。近年、精製水に少量の食塩を添加し隔膜を介した電気分解によって陽極側から生成される強酸性電解水と呼ばれる機能水が、種々の病原微生物に対して優れた殺菌効果を発揮することが報告されており様々な分野における殺菌にその利用が期待されている³⁾⁻⁵⁾。塩素耐性を示す *C. parvum* オーシストに対しても強酸性電解水の一つである混合酸化剤溶液（以降 Miox 溶液と称す）が *in vitro* 及び *in vivo* で不活化効果を示すという報告がなされている⁶⁾⁷⁾。しかし、Miox 溶液処理による *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果を形態学的変化として観察したり、或いは生活排水の生物処理下水中のオーシストに対する感染性不活化効果といった応用面に関する検証はまだ十分行われていない。そこで、今回我々は既に報告されている *C. parvum* オーシストの乳飲みマウス感染モデル⁸⁾を用いて Miox 溶液処理による *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果の再評価を行い、さらにそれに伴う形態学的変化そして生物処理下水中のオーシストに対する Miox 溶液の感染性不活化効果について検討した。

材料および方法

1. オーシストの調整

C. parvum HNJ-1 株は北里大学バイオセイフティ安全管理規程に基づき北里大学医学部実験動物センターの感染実験エリア（レベル 2）内で無菌的にビニールアイソレーター内で飼育されている SCID マウス（C. B-17/lcr-scidjcl, 10 週齢の雄、日本クレア、東京）に経口感染させ継代維持した。オーシストは糞便から井関らの方法⁹⁾に準じて 76.29g/dl ショ糖液（比重 = 1.20）を用いたショ糖密度勾配遠心法（25 で 2,000rpm, 10 分間）により粗精製し、さらに 16% sodium metrizoate（Nycomed As, Norway）含有 phosphate-buffered saline（pH 7.2 PBS）に溶解させた 0.5% および 1% Ficoll 400（Pharmacia, Sweden）を用いた Ficoll 密度勾配遠心法（25 で 2,500rpm, 15 分間）により精製した。最終的にオーシストは gentamycin（Sigma, St. Louis, NO, USA）200 μ g/ml 含有滅

菌 PBS に 10⁷ 個/ml の割に浮遊され、4 で暗所保存された。

2. Miox 溶液の調整

Miox 溶液は Miox Water Disinfection Unit, type BPX Miox Corp., Albuquerque, NM, USA, 日本販売代理店：エコマスコーポレーション、福岡）を用いて流水式にて生成され、その性状は pH 3 酸化還元電位は 1,400mV, 残留塩素濃度は 200~300mg/l であった。この溶液の構成成分としては 90.6% 遊離塩素, 5% オゾン, 2.3% 二酸化塩素, 2.1% 過酸化水素が含まれていた。なお、実験に使用する Miox 溶液は要時調整し、所定の残留塩素濃度になるように滅菌 PBS 或いは生物処理下水（A 処理施設由来）にて適宜希釈した。比較対照として塩素系消毒剤である次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬工業、大阪）も同様に滅菌 PBS で要時調整して使用した。

今回使用した生物処理下水は、生活排水を活性汚泥にて曝気処理後さらに沈殿処理したものであり、その性状は濁度 1.2 度, pH 6.34, 生物酸素要求度（BOD）0.1mg/l, 浮遊粒子状物質 1.1mg/l であった。

3. 残留塩素濃度および pH の測定

Miox 溶液或いは次亜塩素酸ナトリウム溶液の残留塩素濃度は、オルトトリジン法により比色定量され mg/l で表現された¹⁰⁾。

pH はパーソナル pH メータ（D-21, ホリバ、東京）を用いて測定した。

4. *C. parvum* オーシストの Miox 溶液処理

Miox 溶液或いは次亜塩素酸ナトリウム溶液の残留塩素濃度を 1, 2.5, 10mg/l の各濃度になるように滅菌 PBS で希釈した。一部の実験では Miox 溶液を生物処理下水にて残留塩素濃度が 5mg/l になるように調整した。所定の残留塩素濃度に調整された各溶液は、1ml ずつ滅菌済みポリプロピレン製 2ml マイクロチューブ（アシスト、東京）に入れ、さらに保存していた *C. parvum* オーシストを 10⁶ 個/ml の割に加え密栓した。被検マイクロチューブは低速振盪機（SHK03, イワキ、東京）に水平になるように固定し、25 にて一定時間ゆっくりと振盪（35rpm）させた。その後、オーシスト

は PBS にて 3 回遠心 (4 で 3,000rpm, 10 分間) 洗浄され, 一定量の滅菌 PBS に再浮遊された. なお, Miox 溶液処理によってオースト数が著明に減少することはなかった.

5. 感染性不活化効果の評価試験

オーストの感染には乳飲みマウス (ddy 系, 5~6 日齢, 日本 SLC, 静岡) を使用し, 動物は北里大学バイオセーフティ安全管理規程に基づき実験動物センターの感染実験エリア (レベル 2) 内のアイソラックにて SPF 環境下で飼育した.

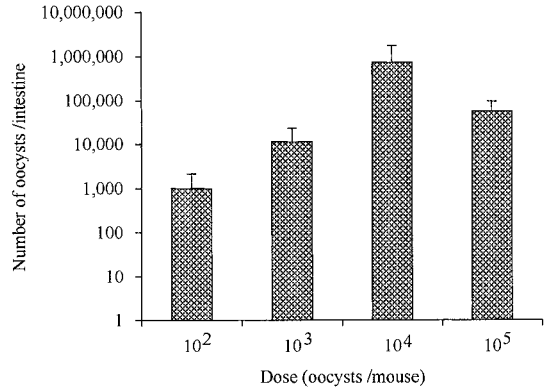
1 群 10 匹の乳飲みマウスに処理したオースト浮遊液 50 μ l を経口的に接種し, 7 日目に炭酸ガスにて窒息死させた後, 小腸から大腸に至る腸管 (腸管内容物を含む) を取り出し, 個体毎に 10% ホルマリン水溶液 7ml を入れたガラス製ホモジナイザー (Wheaton, エア・ブラウン, 東京) にてホモジナイズした. ホモジネート中のオーストはショ糖密度勾配遠心法により粗精製され, FITC 標識マウス抗 *C. parvum* oocyst モノクロナール抗体 (クリプトスポリジウム検出キット, 和光純薬工業) を用いた直接蛍光抗体法により蛍光染色され, 最終的に 50 μ l の PBS に浮遊された. オースト数は落射型蛍光顕微鏡 (BH-2, オリンパス, 東京) を用いて倍率 \times 400 倍で被検体 0.5 μ l 当たりの蛍光染色されたオーストを計測することにより算出された. その結果は各計測値に 100 を乗じ, 腸管当たりのオースト数 (Number of oocysts/intestine) として表現された. なお, 非感染乳飲みマウスの腸管ホモジネートについても粗精製の操作後同様の免疫染色を行ったが, 非特異的に染色される腸管組織由来のオースト様構造物は全く検出されなかった.

6. 微分干渉顕微鏡による形態観察

Miox 溶液或いは次亜塩素酸ナトリウム溶液 (残留塩素濃度 5mg/l) で 4 時間処理したオーストはノマルスキー微分干渉装置付き顕微鏡 (BX 60, オリンパス) を用いて倍率 \times 1,000 倍で形態観察された.

Miox 溶液或いは次亜塩素酸ナトリウム溶液処理オースト中の変性オースト数の出現率 (%) は, 各溶液処理後に計測されたオースト 100 個

Fig. 1 Optimal dose of the oocysts inoculation in a neonatal mouse. The mice were orally challenged with 10^2 , 10^3 , 10^4 , or 10^5 of oocysts and sacrificed on day 7. Results were expressed as the mean numbers of oocysts ($n = 10$) \pm standard deviation (SD)



当たりの変性オースト数の割合に 100 を乗じて算出された. なお, 変性オーストとしては明らかに形態学的異常 (オースト壁の傷害やスポロゾイトの形態変化など) を示すものをそれに充てた.

7. 統計処理

2 群間の有意差検定は t 検定にて行い, 危険率 $p < 0.05$ を有意とした.

成 績

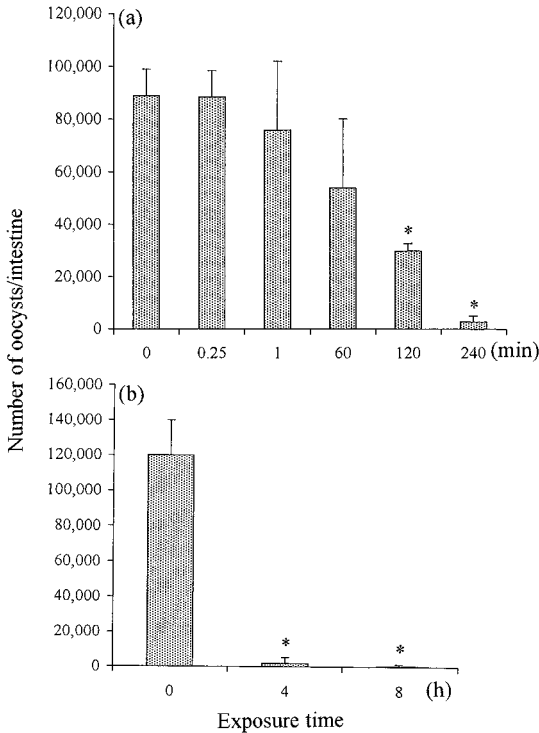
1. オーストの至適接種量の検討

乳飲みマウスに 50 μ l 当たり 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 個のオースト浮遊液をそれぞれ経口接種し, 7 日目における腸管内オースト数を計測して至適接種量を検討した. その結果, 接種量に比例して腸管から検出されるオースト数は増加し, 10^4 個接種群において最高値 (8×10^5 個) を示した (Fig. 1). 従って, 以降の感染実験では 10^4 個のオーストを至適接種量とした.

2. Miox 溶液による感染性不活化効果

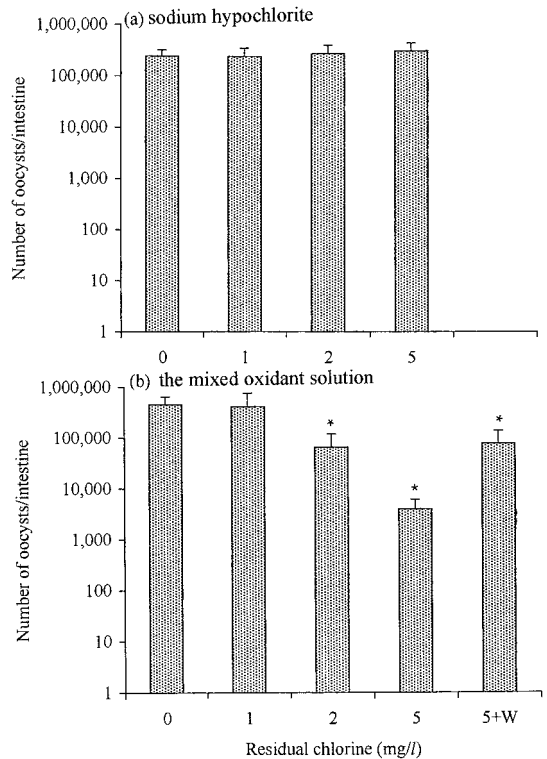
Venczell ら⁶が動物実験にて *C. parvum* オースト感染性の不活化効果を認めた残留塩素濃度 (5 mg/l) と同じ濃度の Miox 溶液を用いてオーストを処理し, その感染性不活化効果に及ぼす処理時間の影響を検討した. その結果, 無処理対照群では 8.9×10^4 個のオーストが検出されたのに対

Fig. 2 Effect of contact times of the mixed-oxidant solution on inactivation of infectivity of oocysts. The oocysts were exposed to 5 mg/l (residual chlorine) of the mixed-oxidant solution in PBS for contact times up to 4 h (a) and 8 h (b). The neonatal mice were orally challenged with 10^4 of oocysts obtained at the indicated times after exposure and sacrificed on day 7. Results were expressed as the mean numbers of oocysts ($n = 10$) \pm SD. *, Values are significant different ($P < 0.05$)



して Miox 溶液処理群では処理時間に比例して腸管から検出されるオーシスト数は減少する傾向を示し、特に、120 分間処理で 3×10^4 個 ($0.5 \log_{10}$), 240 分間処理で 2.8×10^3 個 ($1.5 \log_{10}$) の有意な減少が認められた (Fig. 2a). さらに、同じ残留塩素濃度の Miox 溶液で最大 8 時間まで処理を行った場合におけるオーシスト感染性の不活化効果を検討した。その結果は Fig. 2b に示す如くであり、検出されるオーシスト数は 4 時間目で 1.9×10^3 個 ($1.8 \log_{10}$), 8 時間目で 4.8×10^2 個 ($2.4 \log_{10}$) というように処理時間の延長によりさらに顕著な減少を示した。一方、Miox 溶液の残留塩素濃度を 2 倍の 10

Fig. 3 Comparison of the inactivation of oocysts exposed to sodium hypochlorite or the mixed-oxidant solution. The oocysts were exposed to 1,2 or 5 mg/l (residual chlorine) of sodium hypochlorite (a) or the mixed-oxidant solution (b) in PBS for 4 h. In some experiments, the oocysts were exposed to 5 mg/l (residual chlorine) of the mixed-oxidant solution in biologically treated wastewater (indicated as 5+W). 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. *, Values are significant different ($P < 0.05$)



mg/l に上げて 4 時間処理しても腸管から検出されるオーシスト数の減少の程度は、残留塩素濃度 5mg/l で処理した場合と同じ位の $2 \log_{10}$ であった (データ示さず)。従って、以降の実験におけるオーシストの処理時間は 4 時間に固定して実施した。

3. Miox 溶液および次亜塩素酸ナトリウム溶液の感染性不活化効果の比較

Miox 溶液および次亜塩素酸ナトリウム溶液の 1,2,5mg/l の各残留塩素濃度におけるオーシスト

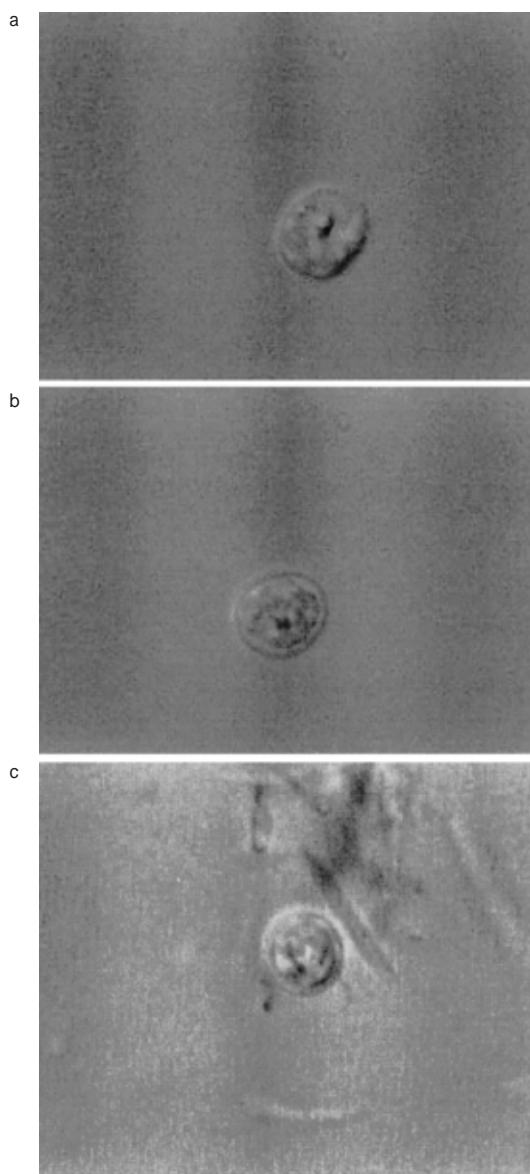
の感染性不活化効果を比較検討した。その結果、Miox 溶液で処理した場合、2.5mg/l の残留塩素濃度において濃度依存的に腸管から検出されるオースト数の有意な減少が認められた (Fig. 3b)。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した場合、5mg/l の残留塩素濃度でも腸管から検出されるオースト数の減少は全く認められなかった (Fig. 3a)。

循環型の再利用水や下水道水などの水環境処理への Miox 溶液の応用の可能性について検討する目的でオーストを生物処理下水にて残留塩素濃度を 5mg/l に希釈した Miox 溶液で処理し、そのオーストに対する感染性の不活効果を滅菌 PBS で希釈した Miox 溶液のそれと比較検討した。その結果、腸管から検出されるオースト数は、無処理対照群に比較して PBS 希釈 Miox 溶液で処理した場合に $2.1\log_{10}$ 、生物処理下水希釈 Miox 溶液で処理した場合に $0.8\log_{10}$ のそれぞれ有意な減少を示した (Fig. 3b)。なお、4 時間処理後における PBS 希釈 Miox 溶液、或いは生物処理下水希釈 Miox 溶液中の残留塩素濃度の減少は検出感度 (0.5mg/l) 以下であった。また、各溶液中の pH の変化 (前者で pH 7.2、後者で pH 6.28) もほとんど認められなかった。

4. Miox 溶液および次亜塩素酸ナトリウム溶液処理したオーストの形態観察

オーストを 5mg/l の残留塩素濃度の Miox 溶液および次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理し、微分干渉顕微鏡を用いてオーストの形態学的変化を観察した。その結果、無処理対照群ではオーストの輪郭がはっきりとし、その内部には規則的に配列したスポロゾイトが確認されるのに対して、Miox 溶液で処理した場合、オースト壁の一部が傷害され、その内部のスポロゾイトは膨化して一部が球状を呈した状態でドーナツ状に配列したように見られる変性オーストが散見された。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理したオーストにはスポロゾイトの規則的な配列がやや乱れているものも存在したが、その形態は無処理対照群のそれとほとんど同じ状態で維持されていた (Fig. 4)。なお、その際の変性オースト数の出現

Fig. 4 Morphological changes of oocysts exposed to the mixed-oxidant solution. The oocysts exposed to 5 mg/l (residual chlorine) of the mixed-oxidant solution (a) or sodium hypochlorite (b) in PBS for 4 h. The oocysts not exposed to the disinfectants served as a control (c) The morphologically degeneration of oocysts were observed under Nomarski differential interference contrast microscopy. Original magnification : 1,000 x



率は、無処理対照群で 0.17%、Miox 溶液処理で 35.5%、次亜塩素酸ナトリウム溶液処理で 0.3% で

あった。

考 察

C. parvum の水系感染の原因としては、ヒト生活環境からの下水や処理水の流入、或いは感染家畜や野生動物の糞便の混入による水道水原水（表流水や伏流水など）の汚染が挙げられている。最近の本邦における河川水の *Cryptosporidium* 汚染に関する疫学調査によれば 69% の河川 55% ~ 75% の採水地点から *C. parvum* オーシストが検出され、特に、ウシ飼育施設が河川流域にある場所で高頻度に見つくと報告されている¹¹⁾。このような背景から、下水や浄水処理場における *C. parvum* オーシスト汚染対策は重要な課題である。オーシストに汚染された水環境からのオーシスト除去対策としては、濾過法と塩素系消毒剤或いは加熱処理による不活化法とがあるにすぎない。しかし、大量の水、特に様々な懸濁物が混在している下水を塩素系消毒剤による不活化以外の方法で処理することは、経済性或いは汎用性の面からみて困難を極めるものと考えられ、次亜塩素酸ナトリウムに代わる実効性のある消毒剤による不活化法の開発が待たれている。

塩素耐性を示す *C. parvum* オーシストの感染性不活化には、近年、オゾンや遊離塩素とクロラミンを併用した消毒法¹²⁾¹³⁾などの他に、強酸性電解水である Miox 溶液を用いた処理による不活化法が有効であると報告されている⁶⁾⁷⁾。今回、残留塩素濃度 5mg/l の Miox 溶液について *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果について検討したところ、無処理対照群に比較して 4 時間処理で腸管から検出されたオーシスト数は 1.5 ~ 2.1log₁₀ の減少を示し、既に報告されている Miox 溶液による *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果⁶⁾⁷⁾が同じ条件下で起こることが確認された。しかし、その感染性の不活化効果による腸管から検出されるオーシスト数の減少値は Venczel ら⁶⁾が報告した 3.5log₁₀ より劣るものであった。かかる報告と今回の実験において使用された乳飲みマウス系統、*C. parvum* の菌株の種類、およびオーシスト検出方法に違いがあることから、これらの相違がオーシスト数の減少値の違いをもたらした原因になったの

ではないかと推察される。実際に、*C. parvum* 分離株の違いによって乳飲みマウスへの感染性が異なることを指摘する報告もある¹⁴⁾。また、Miox 溶液を用いて残留塩素濃度 5mg/l、4 時間処理したオーシストの感染性不活化効果に関する 3 回の実験において有意に減少したオーシスト数に 1.5 ~ 2.1log₁₀ の変動が認められた背景には、今回使用した乳飲みマウス発育上の個体差或いはオーシスト検出方法が係わっていた可能性があるかもしれない。

従来の報告⁶⁾⁷⁾¹⁵⁾にあるように塩素系消毒剤である次亜塩素酸ナトリウム溶液に比較して Miox 溶液は *C. parvum* オーシストに対して著明な感染性不活化効果を発揮することが今回明らかにされ、さらにオーシストの形態観察からも Miox 溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液による不活化効果の差異を裏付ける変性所見が得られた。次亜塩素酸ナトリウムは水中で解離して次亜塩素酸イオン (ClO⁻) と次亜塩素酸 (HOCl) になり、pH 酸性側から中性付近で主に生成するものは後者である。一方、生成された Miox 溶液には先に述べたように次亜塩素酸を主成分とする塩素関連物質の以外にオゾンや過酸化水素など殺菌作用を持つ複数の酸素系酸化物質が含まれている。従って、Miox 溶液による *C. parvum* オーシストに対する形態変性を伴う著明な感染性不活化効果は、次亜塩素酸を主とする塩素関連物質と酸素系酸化物質による相乗的或いは相加的酸化作用によってもたらされたものと考えられる。また、酸性電解水による殺菌効果には pH が関係しており、より安定した殺菌効果を得るには生成した次亜塩素酸などの酸化物質が安定状態にある pH 6 前後が重要であると言われている⁴⁾。今回使用した各溶液の pH は pH 6.28 ~ pH 7.2 の範囲であったことから、次亜塩素酸を含む一連の酸化物質が比較的長時間にわたり安定して存在していたことが、今回の *C. parvum* オーシストに対する著明な感染性不活化効果をもたらした要因になったものと考えられた。実際、処理前後における残留塩素濃度はほとんど減少しなかったことから次亜塩素酸を主とする一連の酸化物質が安定した状態で存在していたことを裏

付けるものと考えられた。

今回、微分干渉顕微鏡を使用して Miox 溶液および次亜塩素酸ナトリウム溶液処理後のオーシストの形態変化を観察したところ、同濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液の効果と比較して Miox 溶液はオーシスト壁の一部を傷害し、内部のスポロゾイトまでも効率よく傷害していることが観察されたことから、Miox 溶液による *C. parvum* オーシストに対する感染性不活化効果は、上記の酸化物質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スポロゾイトが変性したことによるものと推測される。なお、形態的に変性したオーシストの出現率は、Miox 溶液の残留塩素濃度に比例して認められた（データ示さず）。

有機物を多く含む下水においても Miox 溶液による *C. parvum* オーシストの感染性不活化効果が期待される。今回、Casteel らの報告⁷⁾と同様に、PBS の代わりに生物処理下水に浮遊させた *C. parvum* オーシストに対する感染性不活化効果が次亜塩素酸ナトリウム溶液より Miox 溶液において顕著に認められたことから、浄水および下水処理施設における *C. parvum* オーシストの不活化に Miox 溶液が優れた効果を発揮するものと考えられる。しかし、その不活化効果は、オーシスト数を指標として見た場合、PBS 希釈 Miox 溶液の場合のその約 10 分の 1 であった。この理由としては、使用した生物処理下水に含まれる有機物がこれらの酸化物質を一部失活させた為に起こったものと考えられる。一方、予備実験において著者らはこれまでに *C. parvum* オーシストの保存温度環境がその感染性にどの様に影響するか検討し、45

前後の温度で数時間処理することによって完全に感染性を不活化することを確認しており、Miox 溶液による処理にこの加温処理法を併用することで残留塩素濃度をあまり濃くすることなく Miox 溶液による *C. parvum* オーシストの感染性不活化をさらに優れたものにすることができるものと考えている。

謝辞：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環境科学センター佐藤真弓技師に深謝いたします。

平成15年2月20日

文 献

- 1) Ungar BLP : *Cryptosporidium*. In : Mandel GI, Bennett JE, Dolin R, ed : Mandel, Douglas and Bennett, s Principles and practice of infection diseases. 5th ed. Churchill Livingstone, Pennsylvania, 2000 ; p. 2903 - 15.
- 2) Tzipori S, Wider G : The biology of *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol* 2000 ; 6 : 1 - 32.
- 3) Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP : Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4276 - 9.
- 4) 岩沢篤郎, 中村良子 : 酸化電解水と偽似的酸性水との殺菌効果の比較検討 . *感染症誌* 1996 ; 70 : 915 - 22.
- 5) 佐藤久聡, 前原信敏, 井川房欣, 斎藤洋介, 阿知波信夫, 松井英則, 他 : 厨房内の消毒における電解水の有用性 . *日化療誌* 2000 ; 48 : 768 - 74.
- 6) Venczel LV, Arrowood M, Hurd M, Sobsey M : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; 63 : 1598 - 601.
- 7) Casteel MJ, Sobsey MD, Arrowood MJ : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and other microbes in water and wastewater by electrochemically generated mixed oxidants. *Wat Sci Tech* 2000 ; 41 : 127 - 34.
- 8) 青木正人, 柴田水矢子, 笹原武志, 北里英郎, 井上松久, 山本 一郎 : *Cryptosporidium parvum* oocyst 感染性に及ぼすエージング効果 . *感染症誌* 2001 ; 75 : 201.
- 9) 井関基弘, 木俣 勲 : 技術解説, クリプトスポリジウム症・サイクロスポーラ症 . *臨床検査* 1998 ; 42 : 541 - 6.
- 10) American Public Health Association. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th edition. APHA, Washington, D.C.
- 11) 小野一男, 辻 英高, 島田邦夫, 塩田邦義, 遠藤卓郎 : 河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況 . *感染症誌* 2001 ; 75 : 201 - 8.
- 12) 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.
- 13) 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 En-*

- viron Microbiol 1993 ; 59 : 4203 10.
- 14) Vergara-Castiblanco CA, Freire-Santos F, Oteiza-Lopez AM, Ares-Mazas ME : Viability and infectivity of two *Cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location. Vet Parasitol 2000 ; 89 : 261 7.
- 15) Barbee SL, Weber DJ, Sorbsey MD : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization. Gastrointestinal Endoscopy 1999 ; 49 : 605 11.

Effect of the Mixed-Oxidant Solution on Infectivity of *Cryptosporidium parvum*
Oocysts in a Neonatal Mouse Model

Takeshi SASAHARA¹⁾, Masahito AOKI²⁾, Tomoko SEKIGUCHI¹⁾, Akira TAKAHASHI³⁾,
Yoshinori SATOH¹⁾, Hidero KITASATO¹⁾ & Matsuhisa INOUE¹⁾

¹⁾Department of Microbiology, School of Medicine, Kitasato University

²⁾Kitasato Research Center of Environmental Sciences

³⁾Laboratory Animal Center for Medical Science, School of Medicine, Kitasato University

Cryptosporidium parvum oocysts were exposed to the mixed-oxidant solution, which was electrochemically generated by Miox Water Disinfection Unit, and sodium hypochlorite in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) or biologically treated wastewater at 25 °C by using concentrations of residual chlorine of up to 5 mg/l and contact times of up to 8 h. The effect of two disinfectants on infectivity of the oocysts in a neonatal murine model was comparatively evaluated by determining the total number of oocysts recovered from the intestine. Exposure to the mixed-oxidant solution at 2 and 5 mg/l (residual chlorine) yielded a significant inactivation of infectivity in the dose-and exposure time-dependent manner, while exposure to 5 mg/l (residual chlorine) of sodium hypochlorite for contact times of up to 4 h produced no measurable inactivation of infectivity. Morphological examination also revealed a picture of degenerating oocysts after exposure to 5 mg/l (residual chlorine) of the mixed-oxidant solution, but not with sodium hypochlorite. When the oocysts were exposed to either biologically treated wastewater - or PBS-diluted the mixed-oxidant solution at 5 mg/l (residual chlorine) for 4 h, the disinfectants produced a significant inactivation of infectious oocysts. The decrease number of the oocysts was 0.8 log₁₀ in the former and 2.1 log₁₀ in the latter. These results demonstrate that the mixed-oxidant solution may be a useful disinfectant against *Cryptosporidium* oocysts, but appropriate applications need to be validated.