

## 培養細胞を用いた *Cryptosporidium parvum* の感染力評価

瀧澤 博美<sup>1</sup>, 森田 重光<sup>2</sup>, 荻原 喜久美<sup>2</sup>, 平田 強<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 麻布大学大学院, <sup>2</sup> 麻布大学

### 1. はじめに

塩素耐性病原微生物 *Cryptosporidium parvum* オーシストの感染力はマウスなどを用いた動物感染試験により評価されてきた。しかしながら、動物感染試験は特別な施設を要し、費用や時間がかかるだけでなく、動物の犠牲が生じる。近年、*C. parvum* オーシストが11種類以上の培養細胞へ感染することが確認され、なかでも HCT-8 細胞と MDCK 細胞の感受性が高いということが明らかにされた<sup>1)</sup>。そこで本研究では、HCT-8 細胞を用いた *C. parvum* の感染力評価方法について検討した。

### 2. 方法

#### 2-1 材料

供試オーシスト：*C. parvum* NHJ-1 株のオーシスト (genotype 2) を用いた。

供試細胞：HCT-8 (ヒト回盲腺癌由来細胞株；ATCC CCL 244) を用いた。維持培地には PRMI 1640 に牛胎児血清 (FBS), L-グルタミン, ピルビン酸, 2-ME, 重炭酸ナトリウム, HEPES, スペクチノマイシンを添加したものをを用いた。

#### 2-2 試験方法

(1) オーシストの前処理：培養細胞へ接種するオーシストの前処理を3通り検討した。

- 1) 抗生物質処理：抗生物質 (ペニシリン, ストレプトマイシン, ゲンタマイシン) 添加リン酸塩緩衝液 (PBS) に1時間浮遊させた後、遠心洗浄する。

- 2) 抗生物質+酸処理：抗生物質で処理したオーシストを pH 2.75 Hank's 平衡緩衝液に 37℃, 5 分間浮遊させた後、遠心洗浄する。

- 3) 塩素処理：0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 4℃, 5 分間浮遊させた後、3 回遠心洗浄する。

(2) オーシストの細胞への接種および培養：前処理したオーシストを増殖培地に懸濁させ、被覆率 70~80% の monolayer HCT-8 細胞へ接種し、培養した (37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内, 2 時間)。これを洗浄し、更に 46 時間培養した。増殖培地には、アスコルビン酸, 葉酸, パントテン酸カルシウム, *p*-アミノ安息香酸, ペニシリン, ストレプトマイシンを維持培地に添加したものをを用いた。

(3) 染色：細胞を PBS で 3 回洗浄し、100% メタノールで 10 分間固定した後、*Cryptosporidium* スポロゾイト特異 IgG ポリクローナル蛍光抗体 (sporo-Glo; Waterborne Inc. USA) を用いて室温・暗所で 60 分間染色した。

(4) 計数：落射蛍光顕微鏡を用いて B 励起で観察し、FITC 特有の青リング色に染色された蛍光粒子を、細胞内へ侵入して発育した *C. parvum* とし、計数した。

### 3. 結果および考察

前処理別のオーシスト脱囊率を表 1 に示す。酸や塩素によりオーシストの脱囊が誘発され、塩素処理は脱囊率 87%, 変動係数 (CV) 6.4% と最も良好な成果を得た。しかし、酸や塩素を用いた前処理方法では脱囊したスポロゾイトの活性の低下が危惧される。そこで、脱囊率より算出したスポロゾイト数 (推定スポ

表1 前処理別脱囊率

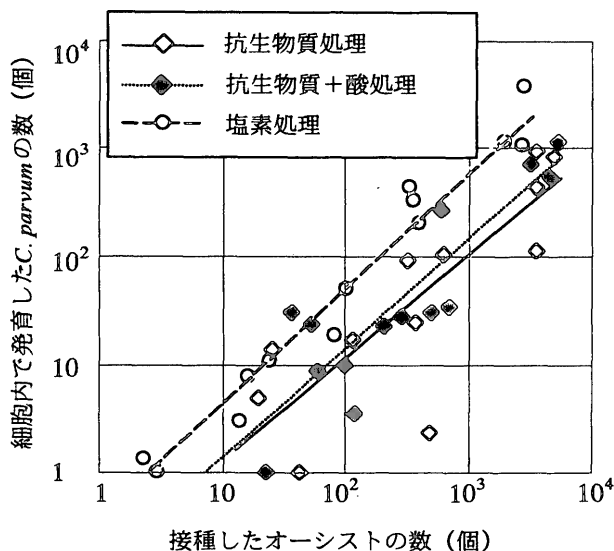
前処理	脱囊率 (%)	標準偏差	CV 値	n
抗生物質処理	23	8.3	35.9%	6
抗生物質+酸処理	55	12.6	22.7%	10
塩素処理	87	5.4	6.4%	8

表2 回帰式

前処理	回帰式	r <sup>2</sup>
抗生物質処理	$y=0.1722x^{0.9103}$	0.6595
抗生物質+酸処理	$y=0.1475x^{0.9824}$	0.8246
塩素処理	$y=0.3040x^{1.1603}$	0.9665

y: 細胞内で発育した *C. parvum* の数 (個)

x: 接種オーシスト数 (個)

図1 前処理別接種オーシスト数と発育 *C. parvum* 数

ロゾイト数) と細胞内で発育した *C. parvum* の数との関係を調べた。推定スポロゾイト数に対する細胞内で発育した *C. parvum* の数の割合は抗生物質処理で 0.12, 抗生物質+酸処理で 0.05, 塩素処理で 0.15 となった。このことから, 塩素処理はオーシストへの悪影響が最も少ないと考えられる。

オーシストの接種数と細胞内で発育した *C. parvum* の数 (蛍光粒子数) の関係を図 1, その回帰式を表 2 に示す。オーシストの接種数に対する細胞内で発育した *C. parvum* の数の割合は抗生物質処理で 0.10, 抗生物質+酸処理で 0.13, 塩素処理で 0.50 であり, 塩素処理がスポロゾイトを最も効率よく細胞へ侵入, 増殖させることが明らかとなった。

また, どの処理の場合も接種したオーシストの数と細胞内で発育した *C. parvum* の数との間に相関が認められたが, 寄与率は塩素処理で  $r^2=0.9665$  と他の二法と比べて最も高い値となった。抗生物質処理および抗生物質+酸処理の検出下限はいずれも 10 個程度であったが, 塩素処理では最も低い約 3 個であった。

以上のことから, オーシストの前処理方法として塩素処理が優れており, 培養細胞により *C. parvum* の感染力を評価しうることが示された。

#### 参考文献

- 1) Upton, S.J. et al. 1994. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 233-236.