

実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討（その2） —市販弱酸性次亜塩素酸水の影響—

Some Observations on the Means to Inactivate *Echinococcus multilocularis* Eggs
in Controlled Laboratory Condition: II. The Influence of Slightly Acidic Hypochlorous Acid Water

孝口 裕一 入江 隆夫

Hirokazu KOUGUCHI and Takao IRIE

Key Words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫); slightly acidic hypochlorous acid water (弱酸性次亜塩素酸水); Hokkaido isolate (北海道分離株); eggs (虫卵)

弱酸性次亜塩素酸水は、塩化ナトリウム水溶液を電解することなどにより得られる次亜塩素酸を主成分とする水溶液である¹⁾。本薬剤は一般細菌（芽胞を含む）やウイルスに対して広く殺滅効果を示し、次亜塩素酸ナトリウムと比べても同等以上の効果を発揮するとされている²⁾。従来の殺菌剤に比べて取扱いが容易であることから、近年、食品加工施設をはじめ、医療現場や実験動物施設等にも普及してきている^{3,4)}。

エキノコックス（多包条虫）の虫卵は、本寄生虫に感染したイヌ科動物の糞便中に排出される。ヒトを含む中間宿主への感染は虫卵を偶発的に経口摂取することにより引き起こされる。虫卵は中間宿主の消化管において胃酸や胆汁の刺激により六鉤幼虫を放出し、当該幼虫は循環系を介して肝臓に至り定着・発育する。ヒトの場合、感染してから数年から10数年の年月を経て、幼虫シスト（病巣）が増殖し、適切な処置が施されない場合には死に至る。

当所では、1986年のエキノコックス実験区域の設置以来、野ネズミから分離した多包条虫を実験的に継代し、その生物学的な性状等を明らかにしてきた⁵⁾。その中、実験室内での作業員の安全性を確保することはもとより、住民の感染予防対策を進める上でも、特に虫卵の不活化条件を明らかにすることが重要となっている。実験室内での虫卵の不活化には、主に加熱、 -80°C 以下での冷凍あるいは薬剤処理が用いられる。従来、次亜塩素酸ナトリウム（塩素系漂白剤等）が本寄生虫卵に対して有効な殺滅効果を発揮する薬剤として知られてきたが⁶⁾、弱酸性次亜塩素酸水の本寄生虫卵に対する影響は知られていない。本報告では、一般に市販されている200 ppm及び500 ppm濃度の弱酸性次亜塩素酸水を用いて多包条虫卵を処理し、マウスへの感染性及び虫卵の形態変化を指標として、本薬剤の多包条虫卵に対する殺滅効果を評価した。

方 法

1. 虫卵の精製

北海道根室市において分離され、当所で継代維持されている多包条虫（北海道株）を本試験に用いた。

虫卵は先に報告した方法⁷⁾で多包条虫に実験的に感染させたイヌの糞便から採取した。糞便を水道水に懸濁し、茶漉しを用いてろ過した。次に、そのろ液を目開き125 μm の金網メッシュを用いてろ過し、未消化物を除いた。そのろ液に5倍量の水道水を加えよく混合した後、簡易沈殿を行い、沈渣部分に含まれる虫卵を回収した。ペニシリン（Meiji Seika社製、100万単位/L）及びストレプトマイシン（Meiji Seika社製、2 g/L）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で約2500個虫卵/mLに調整し、これを精製虫卵として試験に供した。

2. 薬剤処理

15 mL容コニカルチューブ4本に精製虫卵10 mLをとり、遠心分離（1,500 rpm, 5分間）により上清を除いた。その沈渣（約0.8 g）に市販弱酸性次亜塩素酸水（200 ppm及び500 ppm濃度の製品）を加えてそれぞれ13 mLとした。対照実験として、PBS及び次亜塩素酸ナトリウム溶液（市販塩素系漂白剤）を希釈せずに、それぞれ同様の手順で加えた。このようにして市販弱酸性次亜塩素酸水（200 ppm及び500 ppm濃度）、PBSそして次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えた4本の試験液を調製した。これら4本の試験液をボルテックスで攪拌し、沈渣に含まれる虫卵を溶液中に懸濁させた。これらの試験液を室温で1時間静置し、その間に2回すべてのチューブを転倒混和した。以上の処理後、すべての試験液を遠心分離（1,500 rpm, 5分間）して上清を取り除き、10 mLのPBSを加えて沈渣を再懸濁させる操作を2回繰り返して、虫卵を十分に洗浄した。

3. マウスへの虫卵投与試験

先に報告された方法⁷⁻¹⁰⁾に準じ、若干の改変を加えた以下の方法により行った。1群5頭のddY系マウス(オス, 7~8週齢)に、上記処理後の虫卵約400個を、胃ゾンデを用いて経口投与し、投与25日後に解剖し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓をペトリディッシュに置き、-18℃で一晩凍結した後、メスで約1mm厚に薄切し、ヘッドルーペ(1.6×)を用いた肉眼的観察により肝臓に定着・発育した病巣(シスト)を計数した。市販弱酸性次亜塩素酸水(200ppm及び500ppm濃度)、PBSそして次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した虫卵を投与した各群について、感染が成立したマウスの形成シスト数の平均及び標準偏差を算出し、両側t検定により平均シスト数の群間の差を評価した。

4. 薬剤処理された虫卵の形態観察

市販弱酸性次亜塩素酸水(200ppm及び500ppm濃度)及び次亜塩素酸ナトリウム溶液によって処理された虫卵は、それぞれの薬剤添加直後から位相差顕微鏡(オリンパス社製, CK2)を用いて形態観察を行った。観察は、添加直後から10分間継続的に、その後は5分ごとに30分間経過後まで行った。

結果及び考察

表1に示すように、200ppm及び500ppm濃度の市販弱酸性次亜塩素酸水で処理した虫卵を投与したマウスすべてが感染し、コントロール(PBS)と比べて有意なシスト数の減少も認められなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液を作用させた虫卵を投与したマウス5頭のうちシストを確認したマウスは1頭のみで、シスト数もコントロール(PBS)に比べ著しく減少した。

薬剤を作用させた虫卵を顕微鏡下で観察すると、200ppm及び500ppmの次亜塩素酸水では全く形状に変化が認められなかった。一方、次亜塩素酸ナトリウム溶液を作用させた虫卵は、速やかに幼虫皮殻が崩壊し、さらに六鉤幼虫が露出または崩壊した。また、露出し残存した六鉤幼虫も30分間以内にやや丸みを帯びた形状に変化し、その細胞膜等に損傷が生じていることがうかがわれた。以上のことから、市販弱酸性次亜塩素酸水(200ppm及び500ppm)は、多包条虫の幼虫皮殻の崩壊を引き起こすに至らず、次亜塩素酸ナトリウム溶液に比較し、虫卵に対する殺滅効果

を有していないと評価された。

弱酸性次亜塩素酸水及び次亜塩素酸ナトリウム溶液中の有効塩素は、前者では次亜塩素酸(HClO)態として、後者では次亜塩素酸イオン(ClO⁻)態として存在する。有効塩素の酸化力は微生物やウイルスなどの病原微生物の細胞膜や細胞壁の損傷、内部タンパク質や核酸の変性を引き起こすといわれており²⁾、次亜塩素酸(HClO)の殺菌力はその分子特性により次亜塩素酸イオン(ClO⁻)より約80倍高いとされている³⁾。

一方、市販弱酸性次亜塩素酸水の次亜塩素酸濃度は200~500ppmが主であり、その有効塩素は有機物が存在すると容易に活性が低下する³⁾。今回、200ppm及び500ppm濃度における市販弱酸性次亜塩素酸水による処理では多包条虫卵は幼虫皮殻の崩壊も観察されなかった。本試験では、実験感染させたイヌの糞便から調製した多包条虫卵を、著者が日常的に試験・研究に用いている方法と同様の条件で精製を行っていることから、試験液中に残存した糞便の残渣等有機物が次亜塩素酸の有効塩素の活性の低下に影響した可能性が考えられる。近年、消毒剤として普及が進んでいる市販弱酸性次亜塩素酸水の使用に当たっては、有機物の存在下で容易に失活するという本剤の特性を十分に踏まえた上で有効に活用することが重要であろう。

今回の試験において、対照実験として使用した次亜塩素酸ナトリウム溶液(市販塩素系漂白剤)は多包条虫卵に対し十分な殺滅効果を発揮したと評価されたが、虫卵を投与したマウス5頭のうち1頭にシストの形成が確認された。

実験的に虫卵浮遊液に3.75%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えた場合、数分で虫卵の幼虫皮殻が崩壊し、大部分の六鉤幼虫に損傷を与えるとされている⁶⁾。一方、多包条虫を含むテニア科条虫卵は低濃度(0.8%以下)に希釈した次亜塩素酸で処理した場合、速やかに幼虫皮殻の崩壊が起こるが、露出した六鉤幼虫はin vitroにおける研究に利用できその活性を維持する^{6,11,12)}。我々は、3%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液中で10分間処理した場合においても多包条虫卵は感染性を維持することを報告した⁷⁾。また、家庭で使用される塩素系漂白剤中の多包条虫卵殺滅効果は実際の有効塩素濃度の違い、温度あるいは対象物に含まれる有機物の含有量によって変動があると報告されている¹³⁾。

今回、希釈していない次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時

表1 マウスへの虫卵投与試験による形成シスト数の比較

試験液	濃度	投与頭数	感染頭数	平均シスト数 (標準偏差)
PBS(陰性対照群)	—	5	5	23.8(7.9)
次亜塩素酸ナトリウム溶液(陽性対照群)	原液	5	1	1.0(2.2)*
市販弱酸性次亜塩素酸水	200ppm	5	5	32.8(12.0)
	500ppm	5	5	27.8(10.6)

*: 陰性対照群に対して有意差あり(P<0.01)

間浸漬させた虫卵が完全に殺滅されなかった理由は不明であるが、可能性として前述した試験液中の糞便残渣等の有機物の影響や市販塩素系漂白剤の実際の有効塩素濃度の違いなどが上げられる。いずれにしても、現在、次亜塩素酸ナトリウム溶液が多包条虫卵の殺滅に最も有効な薬剤であり、今後とも本剤を適切に使用することにより実験室内の安全を確保することが必要と考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省：次亜塩素酸水の成分規格改正に関する添加物部会報告書，<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002wy32-att/2r9852000002wybg.pdf>（確認：2017年5月24日）
- 2) 小野朋子：弱酸性次亜塩素酸水溶液の各種芽胞に対する殺菌効果及びその適用事例，日醸造協会誌，107，100-109（2012）
- 3) 厚生労働省：次亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの同類性，<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002wy32-att/2r9852000002wyao.pdf>（確認：2017年5月24日）
- 4) 石原雅之，服部秀美，中村伸吾，寺田稔：緩衝樹脂法による微弱酸性次亜塩素酸水を用いた対微生物（B）防護，防衛装備庁技術シンポジウム2015要旨集，27（2015）
- 5) 八木欣平，伊東拓也：感染実験による多包条虫の生物学的性状の解析．北海道のエキノコックス（北海道立衛生研究

- 所編），北海道立衛生研究所，札幌，1999，pp.51-63
- 6) Craig PS, Macpherson CNL: Sodium hypochlorite as an ovicide for *Echinococcus*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 82, 211-213 (1988)
 - 7) 入江隆夫，孝口裕一：実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討，道衛研所報，64，63-65（2014）
 - 8) 石下真通，伊東拓也，八木欣平：多包条虫卵の寿命とその温度条件．道衛研所報，43，49-51（1993）
 - 9) 八木欣平，伊東拓也：多包条虫卵の感染性に及ぼす低温および乾燥の影響．道衛研所報，49，167-168（1999）
 - 10) 八木欣平，伊東拓也：室温で一定湿度に保存したイヌ糞便中の多包条虫卵の感染性について．道衛研所報，53，96-97（2003）
 - 11) Meymerian E, Schwabe CW: Host-parasite relationships in echinococcosis VII. Resistance of the ova of *Echinococcus granulosus* to germicides. Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 360-364 (1962)
 - 12) Laws GF: Chemical ovacidal measures as applied to *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia pisiformis*, and *Echinococcus granulosus*. Exp. Parasitol., 20, 27-37 (1967)
 - 13) Veit P 1, Bilger B, Schad V, Schafer J, Frank W, Lucius R: Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. Parasitology, 110, 79-86 (1995)