

県内主要河川中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染状況

熊田裕子 河野裕子 金成徹 平澤恭子 斎藤和男
理化学グループ

要 旨

県内の主要河川中のクリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染状況を調査した。また、同時に大腸菌、大腸菌群、濁度及び TOC を測定することによって、クリプトスポリジウム及びジアルジアの汚染状況との関連を把握することを試みた。さらに、顕微鏡検査の判断基準や、遺伝子検査の有用性についても検討した。

県内主要河川の表層水 20 件の内、1 検体についてジアルジア・シストが検出された。しかし、nested PCR 法では未検出となった。

キーワード：クリプトスポリジウム、ジアルジア、河川、nested PCR

はじめに

クリプトスポリジウムやジアルジアは消毒薬耐性を有し、水系感染を起こす人腸管寄生病原性原虫として知られている。

1996 年に埼玉県で発生した集団感染を契機に、水源河川等の汚染状況について、各地で調査が行われている。そこで、県内の主要河川を調査することによって、県内河川の汚染状況を把握することを目的に調査を行った。

材料及び方法

1 材料

2006 年 12 月から 2007 年 12 月までに採水した県内主要河川の表層水 20 件を対象とした。クリプトスポリジウム及びジアルジアの検査には、表層水 10L を使用した。

2 方法

クリプトスポリジウム及びジアルジアの検出は、日本水道協会の「クリプトスポリジウム(解説と試験方法)」で示されている方法¹⁾のなかで、親水性 PTEF 吸引濾過、ボルテックス剥離後免疫磁気ビーズで捕集し、直接蛍光染色後鏡顕する方法で行った。大腸菌及び大腸菌群は、特定酵素基質培地法、濁度及び TOC、pH は水道法で定められた方法で行った。

3 遺伝子検査方法

染色後のプレパラートを用いた遺伝子検査は、クリプトスポリジウム・オーシスト及びジアルジア・シストプレパラートからの DNA を用いた nested PCR 法²⁾で行った。環境水からの検出は数が少ないことから、充分 DNA が回収できるように以下の操作を加えた。

プレパラートから取り出したフィルターを用いて、カバーガラスに付着した封入剤をフィルターの裏面でふき取るとき、充分封入剤が回収できるように注意を払い慎重に拭き取った。また、DNA 抽出操作において、スクリーキャップチューブからスピncラムにエタノール沈殿液を移す際に、チューブ内の PTFE フィルターとチューブ内壁面を少量のエタノールで洗浄した。

4 顕微鏡観察方法

蛍光像では B 励起で緑色の特異蛍光があり、G 励起で赤色を呈していないもので、微分干渉像では、内部構造(クリプトスポリジウムはスポロゾイト、ジアルジアは核、軸糸)が確認できるもの、また大きさがそれぞれに一致しているものを陽性と判定する(クリプトスポリジウムは円形で約 5 μ m、ジアルジアは楕円形でその長径が 8 から 18 μ m)。

表 1 測定項目と結果

No.	河川名	橋名	採水月日	クリプトスポリジウム (10L中)	ジアルジア	大腸菌 (MPN/100mL)	大腸菌群	濁度 (度)	TOC (mg/L)	PH
1	阿武隈川	徳江大橋	2006/12/12	(-)	(-)	84	1700	3.9	1.3	7.4
2	六角川	竹の内橋	2006/12/13	(-)	(-)	3300	7900	7.6	4.5	7.5
3	五百川	五百川橋	2006/12/13	(-)	(-)	79	4900	1.3	1.2	7.7
4	社川	鳥内橋	2007/01/17	(-)	(-)	330	3300	3.8	1.2	7.2
5	釈迦堂川	未来大橋	2007/01/17	(-)	(-)	230	24000	2.6	1	7.4
6	大滝根川	大平橋	2007/01/23	(-)	(-)	110	1700	3.8	1.3	7.9
7	請戸川	請戸橋	2007/02/06	(-)	(-)	23	790	1.2	0.7	7.4
8	小高川	甲子橋	2007/02/06	(-)	(-)	490	3100	2	1.2	7.5
9	真野川	鹿島橋	2007/02/13	(-)	(-)	11	1300	0.9	0.9	7.2
10	新田川	鮭川橋	2007/02/20	(-)	(-)	4.5	140	3.5	0.9	7.3
11	太田川	丸山橋	2007/02/20	(-)	(-)	13	330	2	0.9	7.1
12	旧湯川	栗の宮橋	2007/04/18	(-)	(-)	23	7900	2.9	1.7	7.2
13	日橋川	南大橋	2007/04/18	(-)	(-)	4.5	170	0.7	0.6	6.9
14	只見川	藤橋	2007/04/24	(-)	(-)	0	49	2.7	0.8	6.9
15	鶴沼川	丈助橋	2007/04/24	(-)	(-)	79	4900	3.9	1.8	7.3
16	阿賀川	宮古橋	2007/04/24	(-)	(-)	23	790	5.5	0.9	7.3
17	広瀬川	広瀬橋	2007/12/04	(-)	(-)	130	4600	3.5	1.3	7.7
18	阿武隈川	大正橋	2007/12/04	(-)	4	49	7900	3.2	1.5	7.5
19	摺上川	瀬ノ上橋	2007/12/04	(-)	(-)	79	11000	1.5	1.2	7.4
20	松川	松川橋	2007/12/04	(-)	(-)	6.1	130	4.2	0.7	5.7

結果

1 原虫検査等の結果

表 1 に測定項目と結果を示す。No.18 阿武隈川（大正橋）の採水検体からジアルジア・シストが 4 個、顕微鏡観察で確認された。また同一検体からクリプトスポリジウム類似の原虫様物体が認められたが、最終的にクリプトスポリジウムではないと判断した。他の採水地点からは、クリプトスポリジウム・オーシスト、ジアルジア・シストともに検出されなかった。クリプトスポリジウムとジアルジアについて、鏡頭後、すべての検体で DNA 抽出を行い nested PCR 法を行ったが、どちらも検出されなかった。今回の調査では、1 地点においてジアルジアが検出されただけで、その他の地点では検出されなかった。その結果、クリプトスポリジウム及びジアルジアと他の大腸菌等の検査項目の関連については明らかにできなかった。

2 事例報告

今回の調査で No.18 阿武隈川（大正橋）において、ジアルジアが検出された。図 1 はジアルジア様の物体が見られた微分干渉顕微鏡



図 1 No. 18の微分干渉顕微鏡写真（×1000）

写真である。中央部の楕円形の物体で、大きさはおよそ $8 \times 14 \mu\text{m}$ である。図 2 は同じ写真を拡大したものである。矢印のところに 4 個の核が観察された。この核は片側に偏在している。厚生労働省通知³⁾の顕微鏡観察の方法に基づき、微分干渉で核が 4 個観察されたのでジアルジアと判定した。

クリプトスポリジウム類似の原虫様物体の蛍光染色写真を図 3 に示す。B 励起で観察したもので、中央の緑色の物体が形、蛍光色ともに類似していた。しかし、B 励起で内部が

わずかに光っていることや、小さい突起のようなものがあり、クリプトスポリジウムではないと判定した。

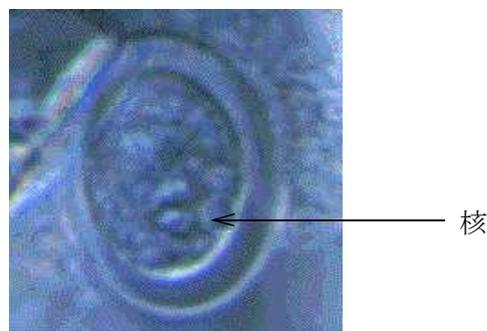


図2 図1写真の拡大図

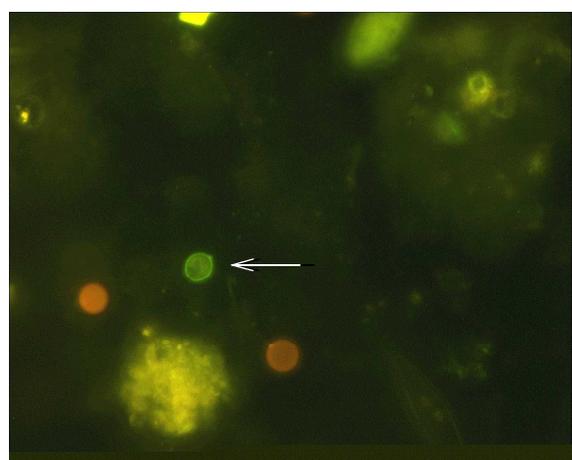


図3 No.18の蛍光染色(×1000)

考察

水道水源からクリプトスポリジウム等が検出された場合は、給水停止など行政指導が行われる。したがって、検査結果の判定には十分注意が必要であるが、その判定がまぎらわしいことがある。顕微鏡での判定には熟練が必要であり、環境水中の原虫の数は少なく、典型的な形態を示さない場合もあることを考慮して、PCRでの判定を試みた。

PCRを用いて原虫類の特定遺伝子を検出することは技術的には可能ではあった。しかし、フィルター上のDNA抽出が容易でないこと、同じDNA抽出液を使用してもバンドが確認できるときとできないときがあること、きわめて希薄な原虫汚染に対する感度が

低いこと等、といった問題点があった。

最終的な判定にはプレパラートでの顕微鏡像が重要であることを考慮すると、一般化されていないPCRの応用に関しては、集団感染時の感染源特定や種同定が必須の事例に限って利用すべきではないかと思われる。

今後、さらに季節的要因や河川の水質などを考慮し調査を続け、クリプトスポリジウム及びジアルジアの検出精度を向上させていきたいと考える。

謝辞

今回の調査にあたり、神奈川県衛生研究所主任研究員黒木俊郎先生に助言いただきましたことに、深謝いたします。

引用文献

- 1) 日本水道協会. クリプトスポリジウム(解説と検査方法)
- 2) 慶野昌明, 熊田裕子, 河野裕子, 他. クリプトスポリジウム・オーシストおよびジアルジア・シストプレパラートからのDNAを用いたnested PCR法. 福島県衛生研究所年報2005; 23: 62-66.
- 3) 厚生労働省健康局水道課長通知. 水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について. 健水発第0330006号, 平成19年3月30日. 別添3 水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験法.