

水道クリプトスポリジウム及びジアルジア 汚染調査の概要(2001年度)

田栗 利紹

Investigation of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts and *Giardia lamblia* cysts in Nagasaki Prefecture (2001)

Toshitsugu TAGURI

Key word : *Cryptosporidium parvum* Oocysts , *Giardia lamblia* cysts

キーワード: クリプトスポリジウムオーシスト, ジアルジアシスト

まえがき

クリプトスポリジウム及びジアルジア(以下、クリプトスポリジウム等と略記)感染症は、共に様々な家畜や野生動物および人の腸管粘膜に寄生して下痢を発症させる人獣共通伝染病である。これらの内で最も重要視されているのが、病原体 *Cryptosporidium parvum* (以下、C.パルブムと略記)であり、自然環境の中ではおよそ 4.5 ~ 5 μ m の大きさの微少な類円形オーシストの状態が存在する^{11,12)}。このオーシストが感染力を維持しており、これに暴露された様々な人獣の糞尿が水資源を汚染し、オーシストの持つ塩素消毒に対する抵抗性のために一般的な塩素処理では全てを殺滅することができず、水道水を介して人に集団感染を引き起こすと考えられている^{10,12)}。

平成8年(1996)に埼玉県で起こった水系の大規模集団感染事例を契機として、厚生労働省で定められた暫定対策指針¹³⁾に基づき、各地方自治体でも本疾病に対する対策が迫られてきた。本疾病の試験方法は「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの

検出のための暫定的な試験方法」(以下、暫定試験法と略記)によって通達されている^{11,13)}。その後、平成11年に「飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領」(以下、クロスチェック要領と略記)¹³⁾が通達され検査の精度管理に関する対応が要求されると共に、平成13年には暫定対策指針が一部改正され現在に至っている。

これらに対応して長崎県が実施してきた事業の概略を表1に示した。即ち、平成9年より検査技術の習得を目的として、毎年研究員を研修に派遣する一方で、平成11年には備品の整備を完了した。さらに、緊急時に対するクロスチェック体制の整備および技術の維持を目的とした県内水道原水の汚染状況調査を平成12年から平成13年にわたって実施してきた。本調査の中ではクリプトスポリジウム等は検出されなかったが、現在でも欧米はもちろん国内においても本疾病に対する事故は絶え間がなく、対応が逼迫している状況である。本報告では、国内外の汚

表1 長崎県における水感染性微生物対策事業の経過

平成10年 3月	埼玉県衛生研究所に研究員2名を派遣
平成11年 3月	公衆衛生院主催水道クリプトスポリジウム試験法実習に研究員1名派遣
平成11年 9月	落射型蛍光顕微鏡装置の整備
平成12年 3月	暫定試験法に基づく備品の整備
平成12年8-10月	平成12年度クリプトスポリジウム検査の実施(本土地区10検体)
平成13年 1月	埼玉県衛生研究所に研究員1名を派遣
平成13年 6月	平成13年度クリプトスポリジウム検査の実施(離島地区10検体)
平成13年12月	公衆衛生院主催水道クリプトスポリジウム試験法実習に研究員1名派遣
平成14年 2月	埼玉県衛生研究所に研究員1名を派遣

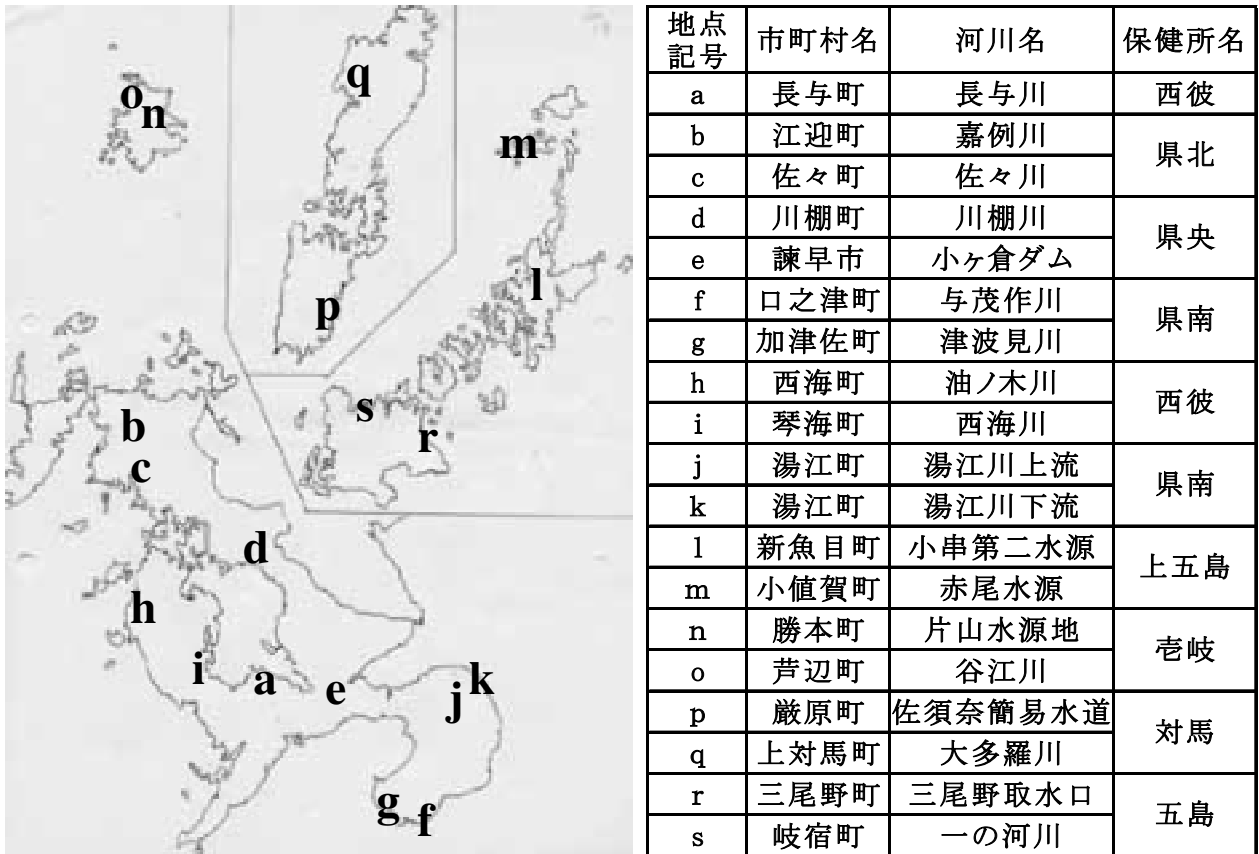


図1 採水地点および河川名

染状況ならびに検査方法を基盤とした各種研究事例をふまえて、今回および昨年度実施した汚染調査を再評価するとともに今後の水道水感染性微生物に対する事業および研究の方向性を考察する。

調査方法

1 採水地点

長崎県下 8 県立保健所管内、19 地点(図 1, a ~ s)の水道水用取水域から採水し、採水時に気温、水温、pH、透視度および浮遊物質量を測定した。指標微生物試験として糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌および嫌気性芽胞菌の検査を実施した。クリプトスポリジウム等試験は平成 12 年度実施の予備試験で検討した結果に基づいて改変した標準法に準拠して実施した。

2 クリプトスポリジウム等試験法

(1) 試料の採取

10L 以上を 10L 用ポリエチレン性採水容器で採取し、24 時間以内に試験に供試した。

(2) オーシスト等の捕捉・濃縮(加圧ろ過法)

原水 10L をφ 142mm セルロースアセートのメンブレンフィルターを用いて全量加圧ろ過した後、容器内を 0.2%Tween80 加 PBS で洗浄し、同様にろ過した。検

水 5L 分のろ過済みフィルターに対して、50ml ホリプロ®レン製チューブ(以下、ポリチューブ)1 本につきφ 142mm メンブレンフィルター 1 枚ずつの割合で入れ、アセトン 40ml を加え、すぐに攪拌振とうし、フィルターを完全に溶解した後、3,000rpm, 5min 遠心分離した(ブレーキは使用しない)。上清をアスピレーターで吸引して捨て、同じ操作を再度繰り返した。沈渣に約 5ml の 99.5 %エタノールを加えて充分攪拌したのち、エタノールと等量の PBS を加えて攪拌し、さらに希釈水と等量の PBS を加えて攪拌した。最終的に PBS で約 45ml に遠沈管を満たして 3,000rpm, 5min 遠心分離した後、上清を捨て、さらに沈渣をガラス棒等で丁寧にほぐした後、PBS 約 10ml を加えてよく攪拌し、3,000rpm, 5min 遠心分離した(ブレーキは使用しない)。複数のフィルターを検査する場合には、フィルター毎に別々に操作し、最終的に足し合わせた。

(3) オーシスト等の選択的な分離・精製(密度勾配遠沈法)

フィルター抽出後の 50ml ホリチューブ残液に対し PBS を 1 : 3 の割合で加え、超音波洗浄器を用いて 5 分間作動させ、液中の残査を分散させた。残液を攪拌後、直ちに Percoll-ショ糖液(比重 1.10)約 10ml を加え 3,000rpm, 5min 遠心分離した(ブレーキは使用し

平成 13 年度 採水月日(H13)	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
気温(°C)	27	27.5	19.0	22.1	22.5	24.0	18.9	19.5	23.5	23.0
水温(°C)	19.1	23.3	19.5	20.0	19.5	22.5	15.7	12.8	18.0	21.5
pH	6.8	8.0	7.0	6.8	7.2	8.2	6.6	6.4	8.0	8.4
透視度(cm)	3 0<	3 0<	3 0<	3 0<	2 5<	2 5<	5 0<	5 0<	2 5<	25<
SS(mg/L)	12.5	10.4	7.0	0.4	13.6	15.2	0.4	0.4	15.0	2.0
FC(/dL) ^{※1}	170	1,600	920	8	34	4	23	<2	1,600	23
FSC(/dL) ^{※1}	43	170	540	5	920	23	130	2	79	11
CP(/10ml) ^{※2}	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
Cry 検査	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
GL 検査	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

※1 : MPN 法, ※2 : ウェルシュ菌パウチ法, ※3 : not tested

略語; SS : 浮遊物質量, FC : 糞便性大腸菌群, FSC : 糞便性連鎖球菌, CP : 嫌気性芽胞菌

Cry : クリプトスポリジウム, GL : ジアルジア

考 察

(1) 国内外の汚染状況

クリプトスポリジウムは 1907 年に C.ムーリスが 1912 年に C.パルブムがマウスの胃腸から発見したのが最初であるが, 人で感染が確認されたのは 1976 年になってからである。それから 1981 年までは世界で 8 症例しか確認されていないほど希少な感染症であったが, 1982 年に米国 CDC が AIDS の重症下痢患者に本症を多く見つけ, 有効な治療薬がないことを報告して以来にわかに注目を浴びだし, 下痢症の重要な病原体であることが判明した⁵⁾。

水道水による集団感染は 1983 年頃から英国や米国で次々と報告されるようになった¹⁰⁾。1993 年の米国ウイスコンシン州ミルウォーキー市における 40 万人規模の集団感染例に代表されるように, 今や水系感染の原因体として最もポピュラーな感染性原虫となり, 各国で様々な対策がとられるようになった。

日本では 1994 年の神奈川県平塚市⁹⁾, 1996 年

の埼玉県越生町の集団感染⁹⁾が有名であるが, 後者を契機として通知された厚生省の暫定対策指針¹³⁾により各地方自治体で様々な対応がなされてきた。1999 年(平成 11 年)7 月現在で検出された原水または浄水におけるクリプトスポリジウム等検出状況は全国で 51 件に上り, 6 件の給水停止措置がとられている¹³⁾(表 3)。

最近では 2001 年に愛媛県でとられた給水停止事例があるが感染患者は報告されていない。しかし, 本年(2002 年 2 月)になって兵庫県でクリプトスポリジウムを原因とする 129 人の集団感染事例が報告されており, 新しい展開を見せている。発症から 1 週間ほど前に実施された北海道修学旅行中の感染が最も疑われているが原因物質は特定されていない。次いで報告された札幌市と室蘭市の事例を含め, 全て北海道管内での汚染が疑われており, 原因や感染経路が調査されている状況である。

表 3 水道におけるクリプトスポリジウム等検出状況と対応の事例(厚生労働省調べ一部改変, 1999.7 現在)

年度	原水(浄水) 検出件数	給水停止 件数	都道府県 市町村	種別	浄水 処理方法	備 考
8	1	1	埼玉県越生町	上水道	急速ろ過	浄水より検出, 感染者 8,800 人
9	19	2	鳥取県鳥取市	簡易水道	塩素処理	原水より検出, 感染者なし
			兵庫県山崎町	簡易水道	塩素処理	原水より検出, 感染者なし
10	23	2	福井県永平寺町	簡易水道	急速ろ過	原水浄水より検出, 感染者なし
			兵庫県夢前町	簡易水道	塩素処理	原水より検出, 感染者なし
11	8	1	山形県朝日村	上水道	塩素処理	浄水より検出, 感染者なし
合計	51	6				

2002年3月現在、長崎県においてクリプトスポリジウムの検出は報告されておらず平成12-13年度(2000-2001)の調査でも検出されなかったが、1997年の厚生労働省の調査ではジアルジアが検出されていることもあり¹³⁾、潜在的な汚染は否定できない。また、今後北海道のような事例が我が県で生ずる可能性も容易に推測でき、このような事故に対し迅速に対応するためには、汚染地域の掌握が最も重要なポイントであると考えられる。以上のことから、環境水に対する汚染調査は、今後も続けていくべきことは明らかである。

(2) 検査方法の進歩と展開

河川水や下水、水道水などに含まれるクリプトスポリジウムの微量なオーシストを検出するのは容易ではない。米国における ASTM (American Society for Testing and Materials) 法は、カートリッジフィルター濃縮-密度勾配精製-蛍光抗体染色である⁷⁾が、LeChevallier ら³⁾の水道原水を用いた汚染調査によると、その回収率は濁度 150NTU の水においてクリプトスポリジウムで 42%、ジアルジアで 48%であった。他の報告においても各工程ごとの回収率はろ過の段階で 88-99%、フィルターからの誘出の段階で 16-78%、シヨ糖浮遊遠心法の段階で 66-77%であり、抗体染色を含む全ての工程では 9-59%とかなり不安定でかつ低い値をとるとされている⁵⁾。また、Hansen らが用いたメンブレンフィルター濃縮-密度勾配精製-蛍光抗体染色法においても 18.6 ~ 34.3%⁴⁾にすぎない。

暫定試験法は、米国の ASTM 法を一部改変した方法であるが、その中で示されている標準法は Hansen らの方法⁴⁾に近い。平成12年度に実施した回収率の成績¹⁹⁾は、Hansen らの成績をよく反映しており、水濁質の影響を強く受けているがために生じたものであると考えられる。

1999年に報告された米国の Method1622 は前記 ASTM 法の中で、密度勾配精製を免疫磁気ビーズ精製に改変したものである¹⁴⁾。小野ら²⁰⁾は、2001年の汚染調査で、Method1622 をそのまま適用した場合には環境水中の藻類や微生物の混入が高い水では回収率は低く、独自にいくつかの改良を加えた上で応用していると報告した。

以上のことから、環境水からのクリプトスポリジウム検出における精度の高い方法の確立は、世界的にも困難を極めていることが容易に推察され、今後も探求されるべき課題であることは言うまでもない。また、様々な標準法や公定法が提出された場合でも、マニユ

アル通りに実施すればよいというものではなく、必ず回収試験により追試を行い試験法に対する独自の評価を追求した上で実施されなければならない。

(3) 新しい取り組み

クリプトスポリジウムに関する最近の研究は、病原体の感染性及び系統発生的分類についてのものが多く見受けられる。前者は脱囊法や DAPI/PI 染色法などの生育活性値の評価方法¹⁵⁾及び RT-PCR 法¹⁶⁾が用いられ、後者では主に PCR-RFLP^{17),21)}といった遺伝学的技術によりアプローチしている。

感染性について、我が国ではあまり議論がなされていない。公定法により水道水からクリプトスポリジウム等のオーシストが検出されれば、全て給水停止という行政措置を採らなければならない。この措置により生ずる住民生活への影響は計り知れず、行政の責任は非常に大きいものがある。現行の公定法はクリプトスポリジウムの病原性あるいは感染性の保持を分別できる方法ではないことをよく理解した上で行政措置を採ることが必要であると考えられる。また、国際的には煮沸勧告措置が主体である国がほとんどであることから¹³⁾今後の状況をふまえて検討していくべきであると考ええる。

一方で、分類学上クリプトスポリジウムはほ乳類一般に寄生する C.パルブムだけでなく、齧歯類と反芻類に寄生する C.ミューリス、家猫に寄生する C.フェリス、鳥類に寄生する C.ペイレイと C.メリアグリディスおよび爬虫類に寄生する C.サーペンティス等が存在することが知られている^{5),17)}。現在の蛍光抗体染色法では C.パルブムに絶対特異的であるという保証は乏しく、交差反応により人に感染性のない種を検出する可能性は否定できない⁵⁾。C.ミューリスオーシスト(パルブムや他の種よりも直径が大きい)以外は形態学的に分別することは困難であると考えられている^{5),17)}。

また、正常人に感染性を持つ種は C.パルブムであると考えられており、遺伝的に人の糞便由来である人型と牛の糞便由来である牛型に分けられている²¹⁾。現在のところでは、環境水からの検出感度が低いことから汚染調査への応用は難しいが、感染事故が起こった場合、PCR による糞便からの検出は比較的容易であり、疫学調査に応用することが可能であると考えられる。

しかしながら、前述した人に感染性がないとされている種においても HIV 患者やハイリスク患者においては病原性を示した例が報告されていることも忘れてはならない¹⁸⁾。

以上のようなことから、今後行政対応に関する考え方を議論していく一つの手法として PCR といった遺伝学的な検索方法を検討することも必要であると考えられる。

おわりに

以上述べてきたように、水道水におけるクリプトスポリジウム対策は検査部門においても様々な問題をはらんでおり今後かなりの困難が予想される。1996年の越生の事件以来患者発生事例は報告されていないため行政対応も空回りしていた感が否めなかったが、今年の兵庫県の事例により集団感染の原因となることが明確に再確認されたと考えられる。本事例の調査結果次第では、今後指針の改正等、さらなる展開が予想され、より明確な対応が要求されることも考えられる。最新の情報や技術に遅れることなく、かつ行政との綿密な連絡を怠らないように、今後も検査技術の確保ならびに向上に努めたい。

参考文献

- 1) 井関基弘:クリプトスポリジウム症ー原虫の生物学的性状と診断法, 臨床と微生物, 14, 434 ~ 439, (1987)
- 2) 井関基弘: *Cryptosporidium*, 臨床と微生物, 15, 613 ~ 619, (1988)
- 3) LeChevallier, M.W. *et al*: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2610 ~ 2616, (1991)
- 4) Hansen J.S. *et al*: Effects of Time and Watershed Characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2790 ~ 2795, (1991)
- 5) 金子光美監訳: 飲料水の微生物学, 技報堂出版, 279 ~ 306, (1992)
- 6) (社)日本水道協会: 上水試験法, 502 ~ 517, (1993)
- 7) Nieminski, E.C., *et al*: Comparison of two methods for detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1714 ~ 1719, (1995)
- 8) 黒木俊郎他: 神奈川県で集団発生した水系感染クリプトスポリジウム症, 感染症誌, 70, 132 ~ 140 (1996)
- 9) 埼玉県衛生部: クリプトスポリジウムによる集団下

痢症ー越生町集団発生下痢症発生事件ー報告書, 埼玉県, (1997)

- 10) 井関基弘: クリプトスポリジウム症の集団発生とその対策, *モダンメディア*, 43, 431 ~ 437, (1997)
- 11) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知: 水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について, 衛水第49号, (1998)
- 12) 井関基弘: 水と食品によるクリプトスポリジウムおよびサイクロスポーラの集団感染, *日本食品微生物学会雑誌*, 14, 179 ~ 185, (1998)
- 13) 金子光美編: 水道のクリプトスポリジウム対策, ぎょうせい, (1999)
- 14) U.S. Environmental Protection Agency, Office of water, Method 1622, *Cryptosporidium* in water by filtration IMS FA, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., (1999)
- 15) 小澤克行, 他: 脱囊法と DAPI/PI 染色法による *Cryptosporidium parvum* オーシストの生育活性値に及ぼす酸前処理の影響, *水環境学会誌*, 22, 827 ~ 832, (1999)
- 16) Widmer, G. *et al*: β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst Viability, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1584 ~ 1588, (1999)
- 17) Xiao, L. *et al*: Genetic diversity *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3386 ~ 3391, (1999)
- 18) Pieniazek, N.J.: New *Cryptosporidium* Genotypes in HIV-infected persons, *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 444 ~ 449, (1999)
- 19) 田栗利紹, 他: 平成12年度水道クリプトスポリジウム及びジアルジア汚染調査の概要, 長崎県衛生公害研究所所報, 46, 118 ~ 121, (2000)
- 20) 小野一男, 他: 河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況, *感染症誌*, 75, 201 ~ 208, (2001)
- 21) Guyot, K., *et al*: PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates human and animal origin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2071 ~ 2076, (2002)