

淀川水系におけるヒト寄生性原虫による

汚染実態疫学調査並びに汚染回避のための文献的考察

公立大学法人大阪府立大学大学院 大西義博

1. はじめに

ヒトに寄生する原虫症として、アメーバ赤痢(赤痢アメーバ症)、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症が知られている。これら原虫症は汚染した飲食物の摂取などで感染する水系感染症であり、感染症新法で五類感染症に指定され、その症例数は集計されている(図1)(1)。近年、我が国における赤痢アメーバ症は増加傾向にあり、全国の報告数は800症例を越えている。都道府県別の報告数を見ると、東京都が最も多く、次いで大阪府が第2位になっている。赤痢アメーバ症の原因として、約三割の症例がAIDS感染症などに合併した性行為感染症に位置づけられているが、残りの多くがシストに汚染した飲食物の摂取によるものと考えられている。しかしながら、後者については原因となった食材が何であるかは不明なところが多く、その実態は明かではない。我々は輸入野菜が赤痢アメーバ原虫のシストで汚染しており、これが発生要因の一因になっているのではないかと考え、先に輸入野菜について赤痢アメーバ原虫のシストの汚染実態を調査し、かなりの輸入野菜が赤痢アメーバ原虫のシストで汚染していることを明らかにした(2,3)。これら多くの輸入野菜が食する前に洗滌され、加熱処理されて食されていることを考えると、これら輸入野菜は家庭や大規模の食品流通会社で洗滌され、これらの洗浄液は汚水として下水に流れ下水処理され、又は何も

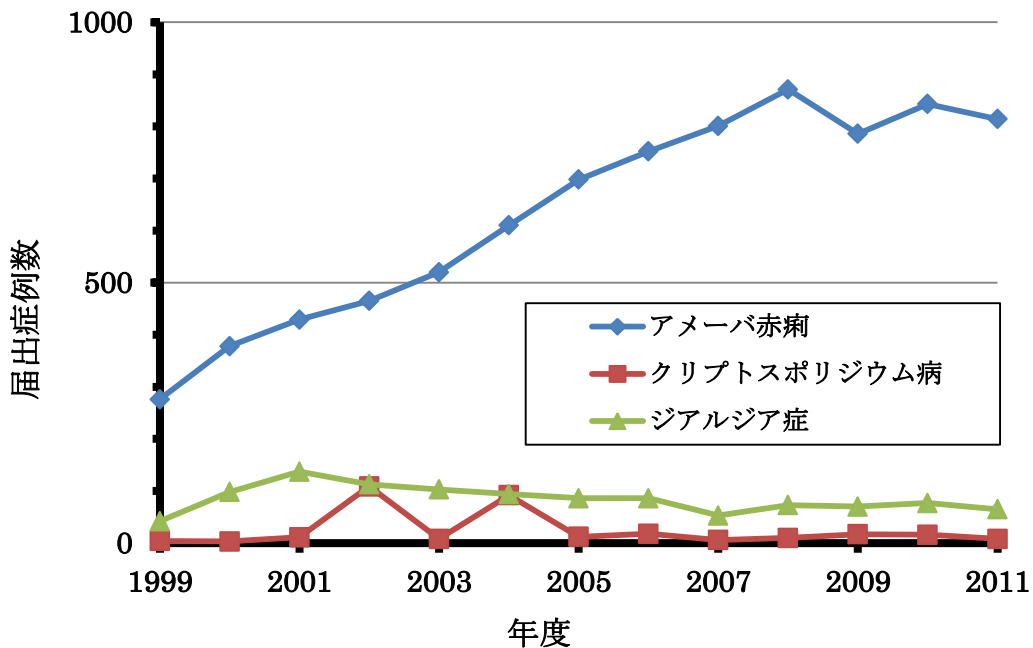


図1 アメーバ赤痢、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の年度別届出症例数

処理されなかった場合は直接、汚水として河川まで流出しているものと考えられる。また、これら患者の糞便が適切に処理されなかった場合は、河川の汚染はより深刻となるものと考えられる。

一方、全国各地の浄水場取水口において、クリプトスポリジウム原虫のオーシストやジアルジア原虫のシストでの原水の汚染が広がっている。しかしながら、赤痢アメーバ原虫のシストによる原水の汚染の実態調査はほとんど行われていない。そこで、この研究では、淀川水系の河川水における赤痢アメーバ原虫のシストによる汚染の実態調査を行うことを目的とした。加えて同時に、クリプトスポリジウム原虫のオーシストとジアルジア原虫のシストの汚染についても調査した。

2. 材料と方法

2.1 検体の採取

平成 25 年 6 月から平成 26 年 1 月まで、大阪府寝屋川市佐太西地点（庭窪取水場取水口上流）で計 14 回、枚方市枚方地点で計 16 回、及び背割堤地点（宇治川支流）で 7 回、淀川河川水を 20L/回/1ヶ所ずつ、採取した（延べ 37 検体）（表 1）。対照として、堺市の水道水（淀川河川水由来）を 7 検体、泉佐野市の水道水（非淀川河川水由来）を 8 検体、採取した。

表 1 検体の採水日及び採水地点

採水日	採水地点				
	佐太西地点	枚方地点	背割堤地点 (宇治川)	堺市 (水道水)	泉佐野市 (水道水)
平成 25 年 6 月 9 日	○207*	○1			
6 月 15 日	○208	○2			○501
7 月 19 日	○209	○3		○401	
7 月 27 日	○210	○4		○402	○502
8 月 9 日	○211	○5		○403	○503
8 月 24 日	○212	○6		○404	○503
9 月 7 日	○213	○7		○405	○504
9 月 14 日	○214	○8		○406	○505
10 月 12 日		○9		○407	○506
10 月 26 日		○10	○301		○507
11 月 9 日	○201	○11	○302		
11 月 23 日	○202	○12	○303		
12 月 14 日	○203	○13	○304		
12 月 28 日	○204	○14	○305		
平成 26 年 1 月 11 日	○205	○15	○306		
1 月 24 日	○206	○16	○307		
計	14	16	7	7	8

*○付きの数字は検体番号

検体は一晩静置後、上清の四分の三を水流ポンプで吸い上げて破棄した後、残りの 5L を遠心操作 (2500rpm、10 分間) して、沈渣を回収した。その後、10 等分して、2L 分の沈渣として以下の検査に供した。2 本は PCR 用としてそのまま凍結し、1 本は濾紙培養法にそのまま用いて、1 本はホルマリンエーテル (MGL) 法用にホルマリン液で固定保存し、1 本は 50% ショ糖液を用いた遠心浮遊法用に供し、残り 5 本は 35% ショ糖液を用いて遠心浮遊法を行い、ショ糖液上部に浮遊したものを回収し、そのうち 1 本はホルマリン液で固定し、残りは回収後に凍結保存した。検体の水道水については、回収した沈渣の全量を用いた。

2.2 検査方法

2.2.1 赤痢アメーバ原虫の検出

赤痢アメーバ原虫の DNA の検出は Tachibana らの方法 (1991) 又は Haque らの方法 (1998) に準じて行った (2,3)。Tachibana らの方法は primer として P11 (5' -ggaggagtaggaaagttgac-3') と P12 (5' -ttcttgcaattctctgcttcga-3') を用いた PCR (polymerase chain reaction) であり、赤痢アメーバ原虫 *Entamoeba histolytica* の検出に広く使われている (4)。Haque らの方法は 1st PCR では primer として E1 (5' -tttgtattagtacaaa-3') と E2 (5' -gta(a/g)tattgatatact-3') を、2nd PCR では primer として E3 (5' -aatggccaattcattcaatg-3') と E4 (5' -tttagaaacaatgcttctct-3') を用いて赤痢アメーバ原虫を検出する Nested PCR である (5)。病原体の DNA の抽出は、未処理で凍結保存していたものから、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen 社) を用いて行った。

また、赤痢アメーバ原虫のシストの検出は MGL 法、又は 35% ショ糖液を用いた遠心浮遊法で回収し、ヨードヨードカリウム液で染色後に鏡検して行った。

2.2.2 クリプトスポリジウム原虫の検出

クリプトスポリジウム原虫 (Cp) の検出は Cp 検出用キット (Cycleave RT-PCR Cryptosporidium (18S rRNA) Detection Kit, TaKaRa 社) を用いて、real-time reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR) によりキットの説明書通りに行った。DNA/RNA の抽出は 35% ショ糖液遠心浮遊法で回収したものから行った。結果判定は、陽性対照を用いた標準曲線を作成し、最終使用検査液量 2 μ l あたりの DNA コピー数を RT-PCR で求め、希釈倍数 (3×10^3 倍) を乗じた後、1 個のオーシストあたりの DNA コピー数 1.8×10^4 個で除して、検体 2L あたりに含まれるオーシスト数を算出した。

また、クリプトスポリジウムのオーシストの検出は 50% ショ糖液を用いた遠心浮遊法でも行った。

2.2.3 ジアルジア原虫の検出

ジアルジア原虫 (Gi) の検出は Gi 検出用キット (Cycleave RT-PCR Giardia (18S rRNA) Detection Kit, TaKaRa 社) を用いて RT-PCR により行った。シスト数はクリプトスポリジウムのオーシストの算出法と同じ方法で算出した。

また、ジアルジア原虫のシストの検出は赤痢アメーバ原虫検出と同じように MGL 法でも行った。さらに、市販の Cp/Gi 検出用キット (EasyStainTM, BTF 社製和光純薬 KK) を用いた蛍光抗体法によっても Cp/Gi の検出を試みた。観察はバーチャルスキャンスライドシステムを用いた蛍光顕微鏡で行った。

2.2.4 土壤線虫の検出

土壤線虫の検出は濾紙培養法で行った。また、MGL法、もしくは35%ショ糖液遠心浮遊法で浮遊した浮遊物について、ヨードヨードカリウム液で染色して鏡検を行った。

3. 結果及び考察

3.1 赤痢アメーバ原虫の検出

PCR(Tachibana らの方法)で河川水 35 検体中 1 検体から 100bp の陽性バンド(検体 No. 3)が検出された(図 2)。堺市の水道水 1 検体は陰性であった。この陽性検体 No. 3

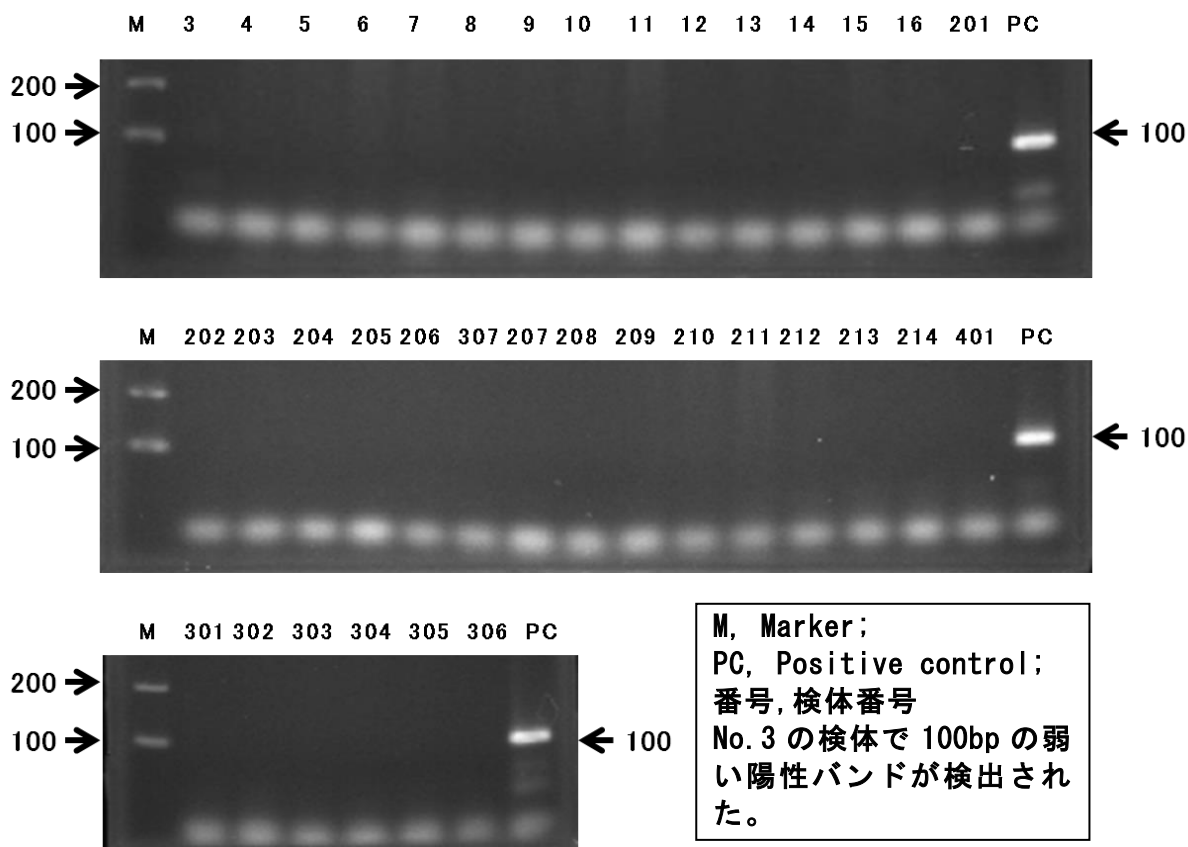


図 2 PCR による赤痢アメーバ原虫の検出

は、枚方地点で 7 月 19 日に採取した検体であり、MGL 法では 1 核のアメーバ原虫のシストが数個、検出された(図 3)。シストのサイズは $11.3 \times 11.3 \sim 16.5 \times 16.5 \mu\text{m}$ であった。一方、PCR(Haque らの方法)では赤痢アメーバ原虫は検出されなかった。Tachibana らの方法はヒト症例の赤痢アメーバ原虫の検出に広く使われているが、最近、日本産ニホンザル由来のアメーバ原虫である *Entamoeba nuttali* に交差性があることが知られたことから(6)、今回検出したアメーバ原虫は後者のものである

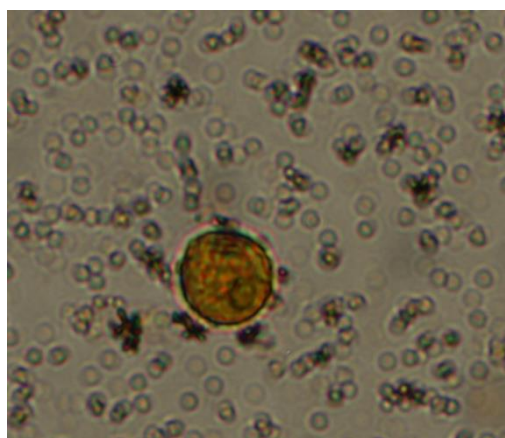


図 3 枚方地点の河川水 No. 3 から検出された 1 核のアメーバシスト

かもしれない。よって、今回検出したシストが赤痢アメーバ原虫のものであるかどうかはさらなる精査が必要と考えられた。

3.2 クリプトスポリジウム原虫の検出

Cp 検出用のキットを用いた RT-PCR では、非特異的反応による蛍光強度が cycle の初めから高くなり、CT 値による解析はできなかった。ただ、いくつかの検体で蛍光強度の増強が認められた。標準曲線を用いた解析で、表 2 の様に河川水 2L 中には 0.23~0.77 個のオーシストが含まれ、すべての検体でオーシスト数が 1 個以下であると計算された。また、これらの RT-PCR 増幅産物の電気泳動像では、陽性バンドよりもサイズの大きなバンドが出現したもの (No. 10, No. 11, No. 12) やバンドが 2 本出現したもの

表 2 Cp 検出用キットで蛍光強度の増強が認められた検体におけるオーシスト数

検出キット名	検体番号	増加した蛍光強度 (log2)	DNA コピー数/2 μ l	DNA コピー数/2L $\times 10^3$	計算されたオーシスト数/2L 1.8×10^4 /オーシスト
Cp	7	5.21	4.34	13.02	0.72
	204	4.7	1.97	5.91	0.32
	207	5.25	4.61	13.83	0.77
	209	4.46	1.36	4.08	0.23
	G100	6.75	(100)		標準曲線 Y=1.487X +4.2613 R ² =0.8714
G10	6.28	(10)			
G1	4.82	(1)			
G0	2.45	(0)			

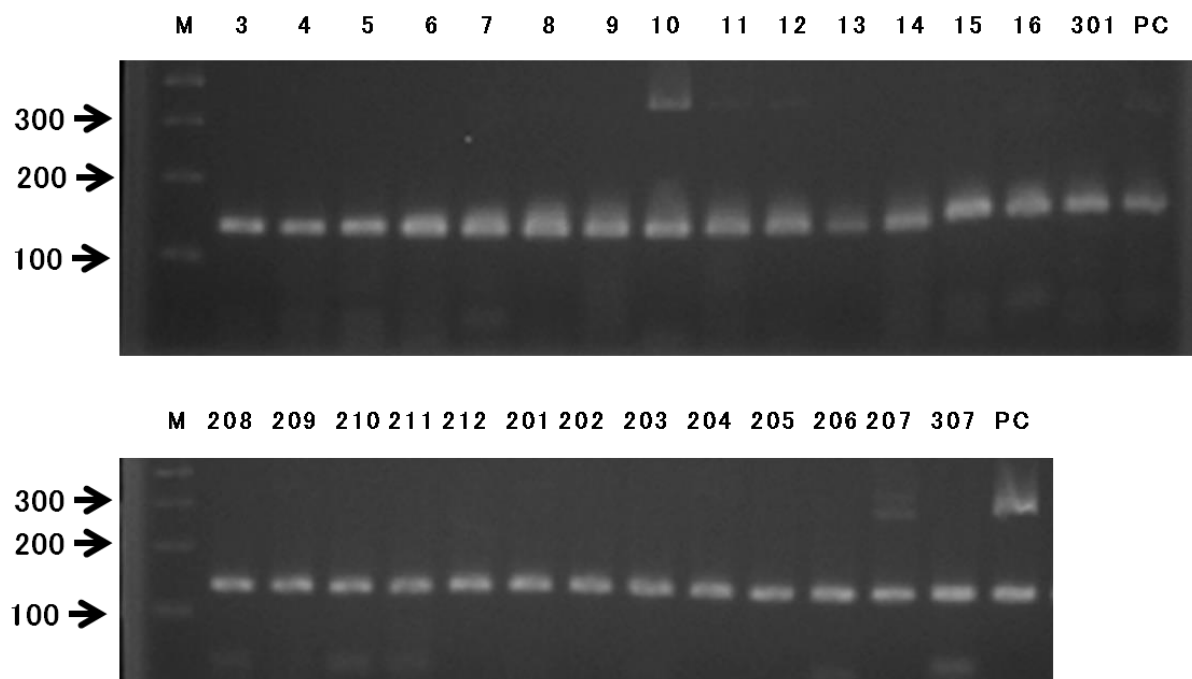


図 4 Cp 検出用キットを用いた RT-PCR の増幅産物の電気泳動像 (一部)
M, Marker; PC, Positive control; 番号, 検体番号

(No. 207)があり、これらのバンドも非特異的なバンドと考えられた。これらのことから、今回 RT-PCR で認められた検体での蛍光強度の増強は非特異的な反応によるものと考えられた。さらに、ショ糖液遠心浮遊法でも特徴的なクリプトスポリジウムのオーシストは観察されなかった。ただ、オーシスト様のほぼ同じサイズのものが多いが、検出されたが、緑藻か藍藻由来のものと思われた(7)。

Cp/Gi 検出用キットを用いた蛍光抗体法も検討したが、堺市や泉佐野市の水道水からも非特異的な反応物と思われるオーシスト様のもの(ややサイズが小さい)が多いが、検出され、判定不能と判断された。

3.3 ジアルジア原虫の検出

Gi 検出用のキットを用いた RT-PCR でも非特異的な反応による蛍光強度が cycle の初めから高くなり、Cp の検出と同じように、CT 値による解析はできなかった。ただ、いくつかの検体で蛍光強度の増強が認められた。標準曲線を用いた解析で、表 3 の様に河川水 2L 中には 2.5~60.8 個のシストが含まれると計算された。一見、これら検体にはジアルジア原虫のシストが含まれているかに思われたが、RT-PCR の増幅産物を電気泳動すると陽性バンドとは異なるサイズの大きいバンドが認められた(図 5)。特に、

表 3 Gi 検出用キットで蛍光強度の増強が認められた検体におけるシスト数

検出キット名	検体番号	増加した蛍光強度 (log2)	DNA コピー数/2 μ l	DNA コピー数/2L $\times 10^3$	計算されたシスト数/2L 1.6×10^3 /シスト
Gi	203	4.58	1.36	4.08	2.54
	204	4.58	1.36	4.08	2.54
	206	6.17	32.4	97.2	60.8
	210	4.07	1.2	3.6	2.25
	G100	6.62	(100)		標準曲線 Y=1.1497X +4.4331 R ² =0.9061
	G100	5.69	(10)		
	G100	4.6	(1)		
	G0	3.16	(0)		

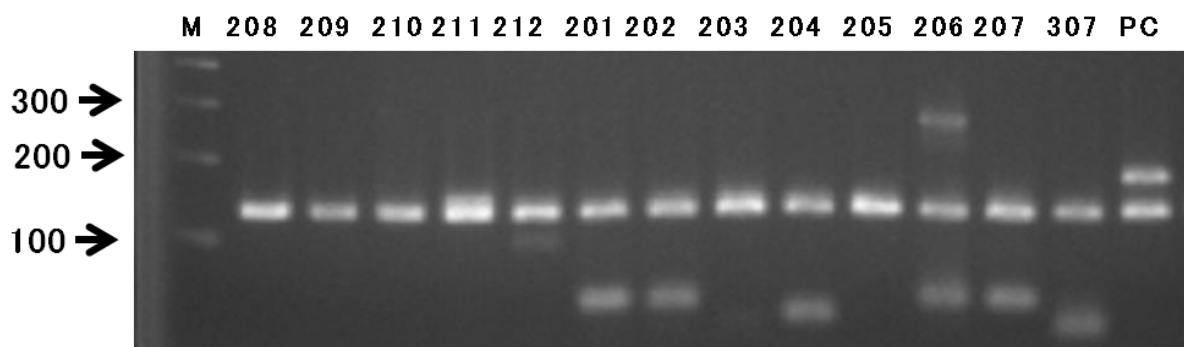


図 5 Gi 検出キットを用いた RT-PCR の増幅産物の電気泳動像(一部)
M, Marker; PC, Positive control; 番号, 検体番号

No. 206 の検体では強いバンドが認められた。これらの検体について、MGL 法で検査するとジアルジアのシストは検出されず、コクシジウムのオーシストが検出された(図 6)。これらは家畜由来の *Eimeria* 属のものと思われた。以上のことから、RT-PCR で認められた蛍光の増強は交差反応によるものと考えられた。

3.4 土壌線虫の検出

濾紙培養法及び MGL 法の検査で、佐太西地点の検体 14 検体中 2 検体から、枚方地点の検体 16 検体中 5 検体から、背割堤地点(宇治川支流)7 検体中 3 検体から、合計 37 検体中 10 検体 (27.0%) から土壌線虫の幼虫や虫卵が検出された(図 7)。今回、ヒトに感染する糞線虫は検出されなかった。これら検出された土壌線虫やコクシジウム原虫由来の DNA が PCR と RT-PCR における擬陽性をもたらしているものと考えられた。



図 6 佐太西地点の河川水 No. 206 から検出されたコクシジウムのオーシスト(×40)
大きさは 20×20µm であった。



図 7 検出された虫卵及び幼虫(一部)

A, 虫卵 (×40, 枚方 No. 3) ; B, 一期幼虫 (×20, 佐太西 No. 202) ;
C, 二期幼虫 (×20, 佐太西 No. 202) ; D, 三期幼虫 (×20, 背割り堤 No. 303)
E, D の頭部の拡大 (×40)

4. まとめ

淀川の河川水について延べ 37 検体について検査したが、今回、ヒト寄生性の原虫、特に赤痢アメーバ原虫のシスト、クリプトスポリジウム原虫のオーシスト及びジアリジウム原虫のシストは、検出されなかった。ただ、擬陽性の検体が認められたので、さらなる検討が必要であると考えられた。

5. 今後の課題

1. 今回、河川水の採取を流れの比較的小さい川辺近くで行ったことから、原虫のシストやオーシストの多くは沈んでおり回収されなかったのかもしれない。よって、今後は河川水の採取を流れのある川の中央部で行う必要があると考えられた。

2. 検査量として 1 検体あたり 2L を使用したが、淀川の平成 14～23 年までの年平均流量 $267\text{m}^3/\text{s}$ (8) を考えると、検査量を多くする必要があるのかもしれない。

3. 浄水用に開発された市販キットを用いて河川水などの環境水を検査する場合は、検体から土壌などの夾雑物をより多く除去するか、あるいは抽出した DNA/RNA を精製するかなどの改良が必要であると考えられた。

4. 土壌線虫は原虫のキャリアになる恐れもあり、これらの線虫が原虫を摂取しているかの検討が必要であると思われた。

6. 河川の原虫による汚染の回避のための文献的考察

1. ここで検査した 3 種類の原虫はヒトに感染する原虫症であるが、家畜や野生動物にも広く感染することから(9)、ヒトの糞便の処理を徹底して行わなければならないだけでなく、家畜の糞便処理も畜産廃棄物として徹底して行わなければならない。ただ、感染した野生動物に対する方策は見あたらない。

2. ヒト由来の下水の処理水も、浄水のための取水口の上流への放流は極力、避けなければならない。もし、下水処理や浄水処理が不十分であった場合は、飲料水の汚染の原因となり、ヒトへの感染源となり、アウトブレイクの発生が起ころう。

3. これら原虫のオーシストやシストは比較的重いことから、容易に川底に沈殿しやすい。しかし、降雨後などでは、川底に沈んでいたオーシストやシストが流れによって巻き上げられる。よって、浄水のための取水は、降雨後には極力、避けなければならない。1996 年 6 月に発生した埼玉県越生町でのクリプトスポリジウム症の集団発生は、豪雨後に取水した濁度の高い原水を浄化不十分のまま水道水に用いたことが一因と考えられている(10)。

4. これら原虫は塩素消毒に対してかなり抵抗性を保持していることから、「塩素消毒された飲料水であっても煮沸してから飲水するべきだ。」という啓発が必要であると考えられる。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました公益財団法人琵琶湖・淀川水質機構並びに関係各位に心より感謝を申し上げますとともに、貴財団のますますの発展をお祈り申し上げます。

8. 参考文献

1. 感染症情報センターホームページ、感染症報告数一覧:全数把握(五類感染症)、

<http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>

2. 大西義博：輸入食材中からの病原体、特に寄生虫卵や原虫のシストの検出の試み及び疫学的調査、浦上財団研究報告書、**20**：143-152、2013.
3. Ohnishi, Y. : Detection of cysts and eggs from imported vegetables in Japan. *In*: Proceeding of first AFSSA conference, Kada, K. *et al.* eds., Dhaka printers, Bangladesh, 72-75, 2013.
4. Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M. and Ihara, S. : Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, **164**(4) : 825-826, 1991.
5. Haque, R., Ali, I.K., Akther, S. and Petri, W.A. Jr. : Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **36**(2) : 449-452, 1998.
6. Tachibana, H., Yanagi, T., Akatsuka, A., Kobayashi, S., Kanbara, H. and Tsutsumi, V. : Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. *Parasitology*, **136**(10) : 1169-1177, 2009.
7. 一瀬 諭、若林 徹哉：やさしい日本の淡水プランクトン・図解ハンドブック、滋賀の理科教材研究委員会編、合同出版、東京、2008.
8. 公益社団法人日本河川協会ホームページ、日本の河川図、60 淀川 Yodo R、http://www.japanriver.or.jp/river_law/kasenzu/kasenzu_gaiyou/kinki_r/060yodo.htm
9. 内田明彦編著：図説獣医寄生虫学、改訂4版、CD-ROM版、メディカグローブ、弘前、2013.
10. 山本徳栄：水道水汚染によるクリプトスポリジウム症の集団発生、埼玉医科大学雑誌、**28**(3) : 77-84、2001.