

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

背景(1)

- 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る。
- 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。
- 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。

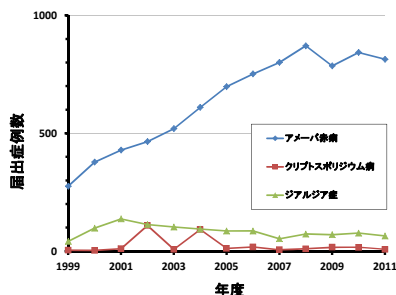


図1 アメーバ赤痢、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の年度別届出症例数

- 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。

背景(2)

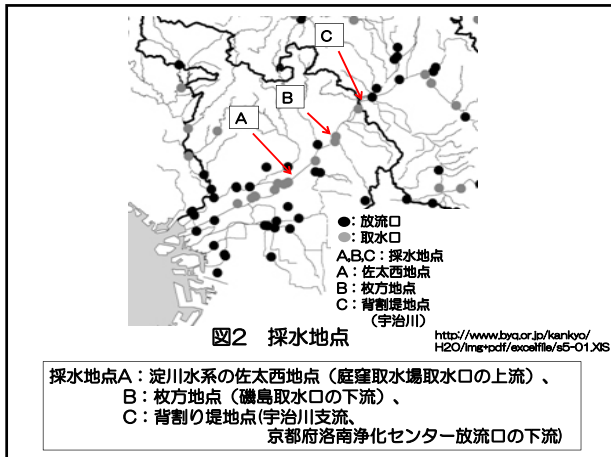
- 赤痢アメーバ症の原因として、約三割の症例がAIDS感染症などに合併した性行為感染症に位置づけられている。
- 残りの多くがシストに汚染した飲食物の摂取によるものと考えられている。
- しかしながら、後者については原因となった食材が何であるかは不明なところが多く、その実態は明かではない。
- 我々は輸入野菜が赤痢アメーバ原虫のシストで汚染しており、これが発生要因の一因になっているのではないかと考え、先に輸入野菜について赤痢アメーバ原虫のシストの汚染実態を調査し、かなりの輸入野菜が赤痢アメーバ原虫のシストで汚染していることを明らかにした。

背景(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、又は何も処理されなかった場合は直接、汚水として河川まで流失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。
- 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。

材料と方法

- 検体の採水地点：淀川水系の佐太西地点、枚方地点、背割堤地点(宇治川支流)の3カ所
- 採水日及び採水回数：表1の通り
 - 佐太西地点：14回
 - 枚方地点：16回
 - 背割り堤地点：7回
- 採水量：20L/回
- 沈渣の回収方法：遠心沈殿法
- 検査方法：
 - 赤痢アメーバ原虫の検出：PCR及びホルマリンエーテル(MGL)法
 - クリプトスポリジウム原虫(Cp)の検出：Cp検出用キット(RT-PCR)、シヨ糖液遠心浮遊法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - ジアルジア原虫(Gi)の検出：Gi検出用キット(RT-PCR)、MGL法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - 土壌線虫の検出：濾紙培養法



材料と方法

- 採水地点: 淀川水系の佐太西地点、枚方地点、背割り堤地点(宇治川支流)の3カ所
- 採水日及び採水回数: 表1の通り
 - 佐太西地点: 14回
 - 枚方地点: 16回
 - 背割り堤地点: 7回
- 採水量: 20L/回
- 沈渣の回収方法: 遠心沈殿法
- 検査方法:
 - 赤痢アメーバ原虫の検出: PCR及びホルマリンエーテル(MGL)法
 - クリプトスポリジウム原虫(Cp)の検出: Cp検出用キット(RT-PCR)、シヨ糖液遠心浮遊法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - ジアルジア原虫(Gi)の検出: Gi検出用キット(RT-PCR)、MGL法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - 土壌線虫の検出: 濾紙培養法

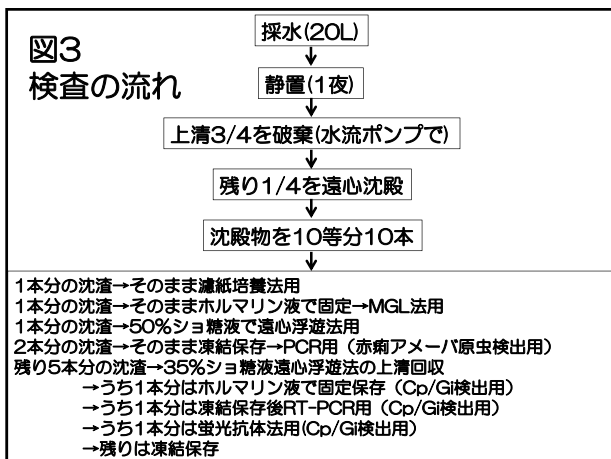
表1 検体の採水地点

採水日	採水場所				
	佐太西地点	枚方地点	背割堤地点 (宇治川)	堺市 (水運水)	泉佐野市 (水運水)
平成26年 6月 9日	O207*	O1			
6月15日	O208	O2			O501
7月19日	O209	O3		O401	
7月27日	O210	O4		O402	O502
8月 9日	O211	O5		O403	O503
8月24日	O212	O6		O404	O503
9月 7日	O213	O7		O405	O504
9月14日	O214	O8		O406	O505
10月12日		O9		O407	O505
10月28日		O10	O301		O507
11月 9日	O201	O11	O302		
11月23日	O202	O12	O303		
12月14日	O203	O13	O304		
12月28日	O204	O14	O305		
平成28年 1月11日	O205	O15	O306		
1月24日	O206	O16	O307		
計	14	16	7	7	8

*O付きの数字は検体番号

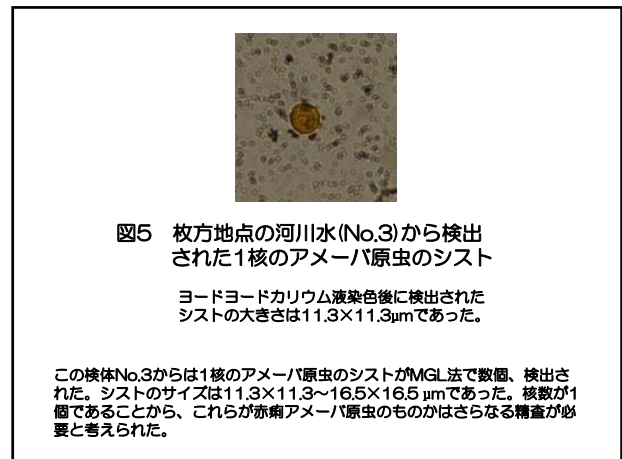
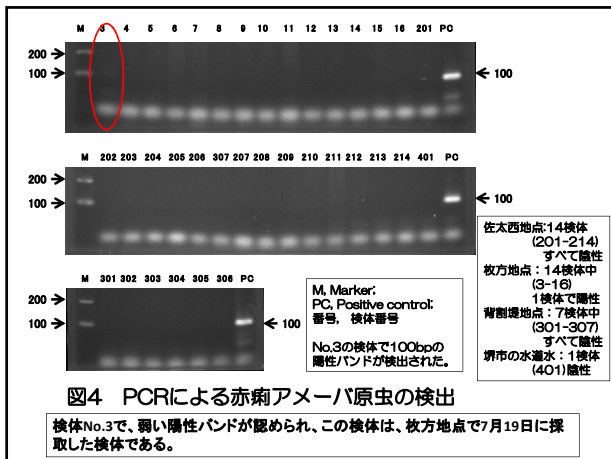
材料と方法

- 採水地点: 淀川水系の佐太西地点、枚方地点、背割り堤地点(宇治川支流)の3カ所
- 採水日及び採水回数: 表1の通り
 - 佐太西地点: 14回
 - 枚方地点: 16回
 - 背割り堤地点: 7回
- 採水量: 20L/回
- 沈渣の回収方法: 静置→遠心沈殿で回収
- 検査方法:
 - 赤痢アメーバ原虫の検出: PCR及びホルマリンエーテル(MGL)法
 - クリプトスポリジウム原虫(Cp)の検出: Cp検出用キット(RT-PCR)、シヨ糖液遠心浮遊法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - ジアルジア原虫(Gi)の検出: Gi検出用キット(RT-PCR)、MGL法及びCp/Gi検出用キット(蛍光抗体法)
 - 土壌線虫の検出: 濾紙培養法



赤痢アメーバ原虫の検出

- PCRでDNAの検出
 - Tachibanaらの方法(1991)
 - Primer: P11 (5' -ggaggagtaggaaagtgcac-3') と P12 (5' -ttctgcaattctgottoga-3')
 - Haqueらの方法(1998)
 - 1st PCRのprimer: E1 (5' -tttgattagtagcaaaa-3') と E2 (5' -gta(a/g)tattgatatact-3')
 - 2nd PCRのprimer: E3 (5' -aatggccaattcattcaatg-3') と E4 (5' -tttagaacaacatgcttctct-3')
- DNAの回収: QIAamp DNA Stool Mini Kitを用いて
- シストの検出: MGL法+ヨードヨードカリウム液染色



クリプトスポリジウム原虫の検出

- RT-PCRによるDNAの検出:
 - クリプトスポリジウム原虫(Cp)検出用キット (Takara社)
 - 方法キットの説明書通り
- オーシストの検出:
 - 50%ショ糖液による遠心浮遊法

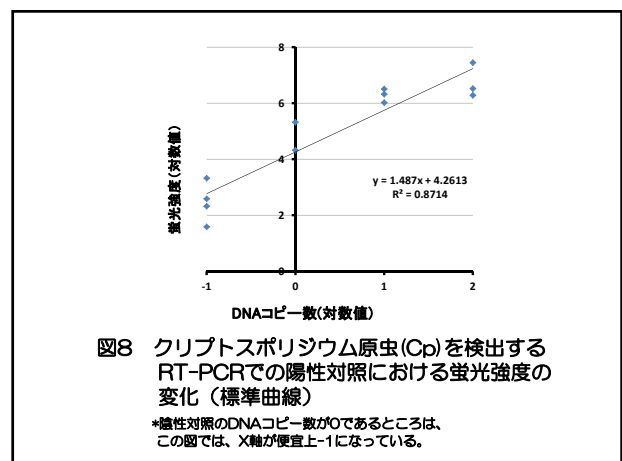
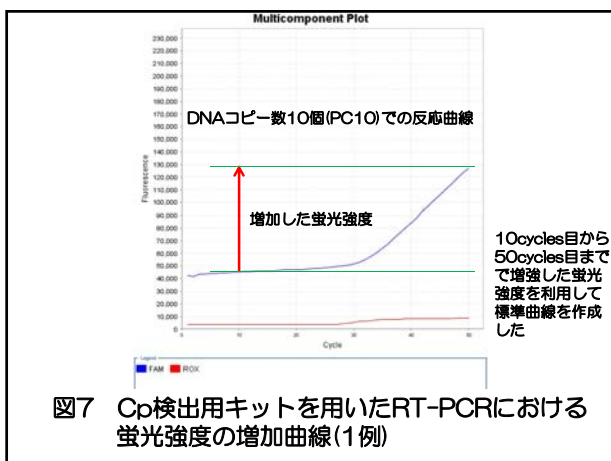
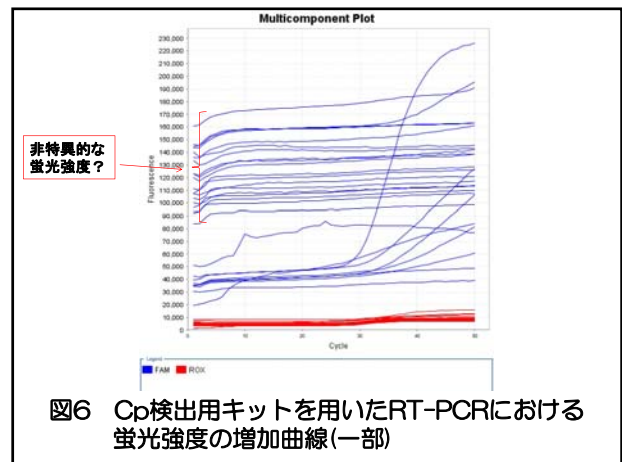
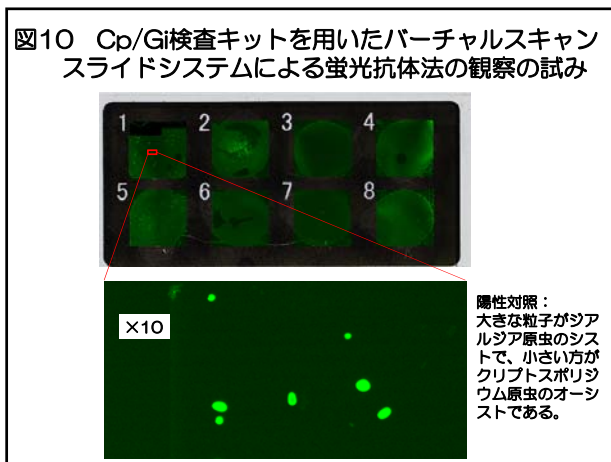
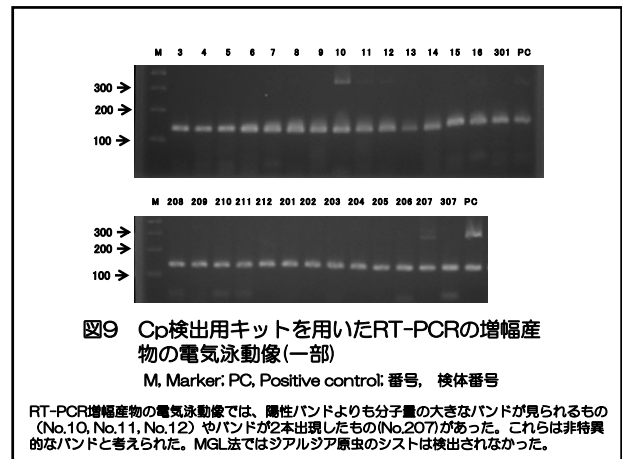


表2 Cp検出用キットで蛍光強度の増強が認められた検体におけるオーシスト数

検出キット名	検体番号	増加した蛍光強度 (log2)	DNAコピー数 /2μl	DNAコピー数 /2L ×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
C100		6.75		(100)	標準曲線 Y=1.487X +4.2613 R ² =0.8714
C10		6.28		(10)	
C1		4.82		(1)	
CO		2.45		(0)	

希釈倍数: 3×10³



ジアルジア原虫の検出

- RT-PCR
 - ジアルジア原虫検出用キット(Takara社)
 - 方法:キットの説明書通り
- MGL法+ヨードヨードカリウム液染色

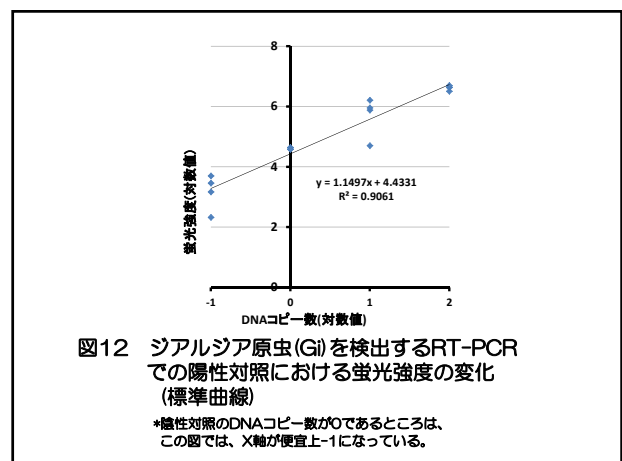
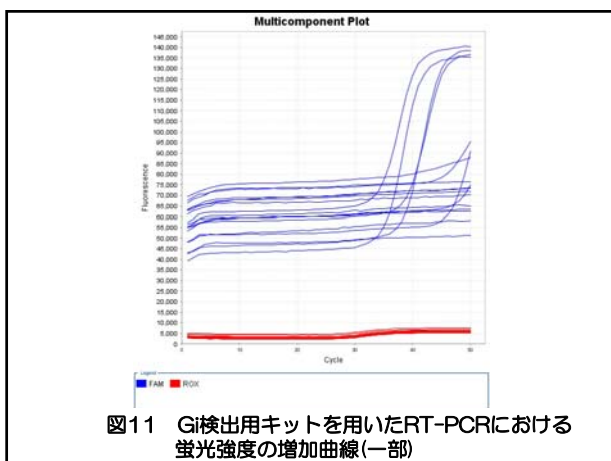


表3 Gi検出用キットで蛍光強度の増加が認められた検体におけるシスト数

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)	
G100	5.69		(10)		
G100	4.6		(1)		
GO	3.16		(0)		

希釈倍数: 3×10^3

標準曲線
Y=1.1497X
+4.4331
R² = 0.9061

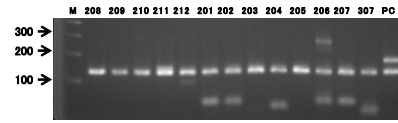


図13 Gi検出キットを用いたRT-PCRの増幅産物の電気泳動像(一部)

M, Marker; PC, Positive control; 番号, 検体番号

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バンドが認められた(図5)。特に、No.206の検体では陽性バンドよりもサイズの大きい強いバンドが認められた。



図14 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

ヨードヨードカリウム液染色後のオーシストの大きさは $20 \times 20 \mu\text{m}$ であった。

これらのRT-PCRで蛍光強度の増加が見られた検体について、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。これらオーシストは家畜由来の*Eimeria*属のものと思われる。

土壌線虫の検出

- 検査方法：濾紙培養法及びMGL法
- 結果：
 - 佐太西地点：検体14検体中2検体から、
 - 枚方地点：検体16検体中5検体から、
 - 背割堤地点(宇治川)：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。
 - 今回、ヒトに感染する糞線虫は検出されなかった。



図15 検出された虫卵及び幼虫(一部)

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

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ルジア原虫のシストは、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。

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。淀川の平成14～23年までの年平均流量 $267\text{m}^3/\text{s}$ 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除去するか、抽出したDNA/RNAをさらに精製する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と思われた。

河川の原因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であるが、家畜や野生動物にも広く感染することから、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当たらない。
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りうる。
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。
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むべきだ。」という啓発が必要であると考えられる。

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。

ご静聴ありがとうございました