

淀川水系河川水からの 寄生原虫の検出 及び検査法の改良の取り組み

公立大学法人大阪府立大学大学院
大西義博

はじめに

- ヒトに寄生する原虫として、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用水や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、それら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、東京都が最も多く報告され、次いで、大阪府が第2位になっている。
- クリプトスポリジウム症は過去に、9千人規模のアウトブレイクがあった。

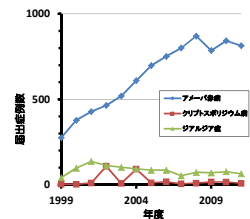
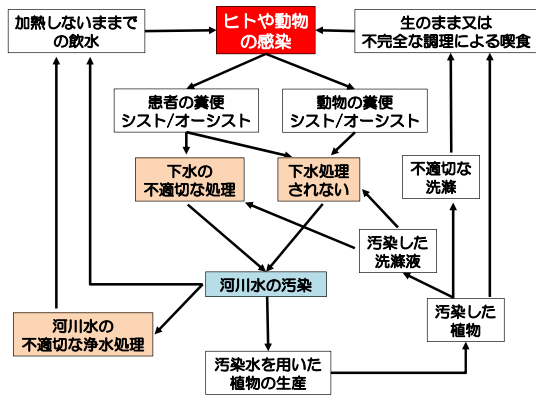


図1 赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の年度別届出症例数

図2 水系感染症の感染様式



目的

- 今年度も、昨年度に引き続き、淀川水系河川水が赤痢アメーバ原虫、クリプトスポリジウム原虫及びジアルジア原虫によって汚染しているか否かを調査した。
- さらに、調査にあたって、検査法の改良も試みたので、これらについても報告する。

材料と方法

- 検体の採水地点：
 - 淀川の佐太西地点（庭窪取水口の上流）
 - 淀川の枚方地点（天野川合流地点下流、枚方大橋下）
 - 宇治川支流の背割堤地点（洛南浄化センター放流口下流、淀川御幸橋下）
- 採水量：20~40L/回/1か所
- 病原体(シスト/オーシスト)の回収法：
 - 遠心沈殿法
 - 免疫磁気ビーズ法との併用又はシヨ糖液遠心浮遊法との併用
- 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の検出：シヨ糖液遠心浮遊法、RT-PCR及び蛍光抗体法
 - ジアルジア原虫の検出：RT-PCR及びMGL法

図3 採水地点 (▲)

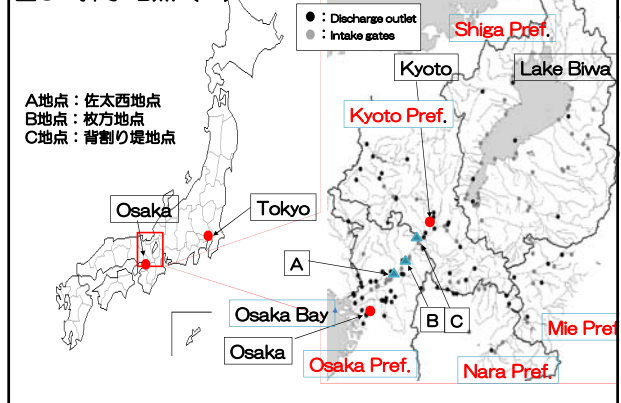
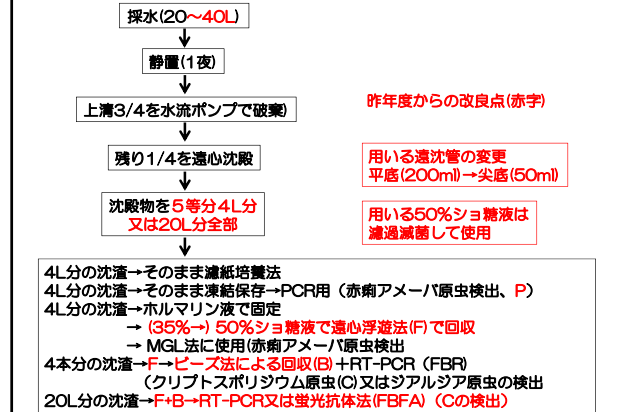


表1 検体の採水日、採水地点、採水量及び検査法

採水日	採水場所		
	A.佐太西地点	B.枚方地点	C.青柳橋地点 (宇治川)
平成26年5月10日	O215(4L×5)F,P	O17(4L×5)F,P	O308(4L×5)F,P
5月27日	O216(4L×5)F,P	O18(4L×5)F,P	O309(4L×5)F,P
6月7日	O217(4L×5)F,P	O19(4L×5)F,P	O310(4L×5)F,P
6月24日	O218(4L×5)P	O20(4L×5)P	O311(4L×5)F,P
7月12日	O219(4L×5)P,FBR	O21(4L×5)P,FBR	O312(4L×5)P
7月22日	O220(4L×5)P,FBR	O22(4L×5)P,FBR	O313(4L×5)P,FBR
8月8日	O221(4L×5)P,FBR	O23(4L×5)P,FBR	O314(4L×5)P,FBR
8月29日	O222(4L×5)P,FBR	O24(4L×5)P,FBR	O315(4L×5)P
9月13日	O223(4L×5)P,FBR	O25(4L×5)P,FBR	O316(4L×5)P,FBR
9月23日	O224(4L×5)P,FBR	O26(4L×5)P,FBR	O317(4L×5)P,FBR
10月10日	O225(4L×5)P,FBR	O27(4L×5)P,FBR	O318(4L×5)P,FBR
10月22日	O226(4L×5)P,FBR	O28(4L×5)P,FBR	O319(4L×5)P,FBR
11月21日		O33(20L)FBR O34(20L)FBFA	
12月27日	O227(20L)FBFA	O29(4L×5)BR	O320(20L)FBFA
平成27年1月27日	O228(20L)FBFA	O36(20L)FBFA	O32(20L)FBFA
検体の合計	14	20	14

○付きの数字は検体番号(昨年度からの通し番号)
○内は採水量
検査法: F,シヨ糖液遠心浮遊法; FBR, F+ビーズ法+RT-PCR; FBFA, F+ビーズ法+蛍光抗体法

図4 検査の流れ

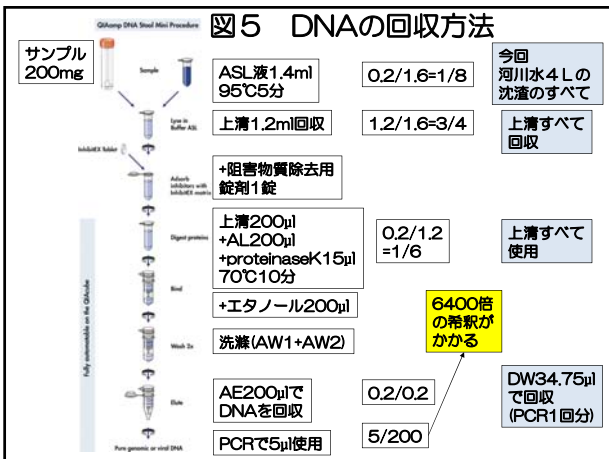


(1) 赤痢アメーバ原虫の検出

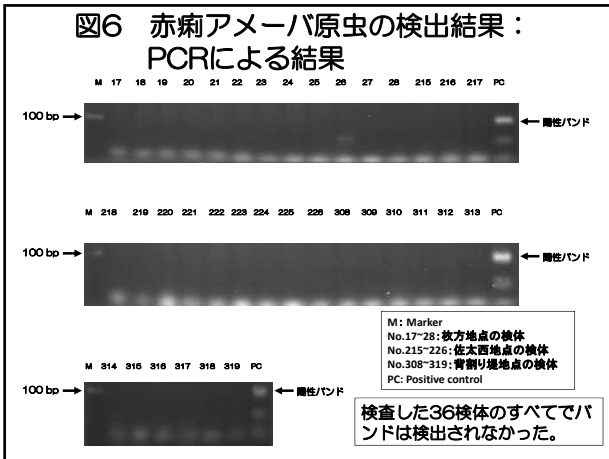
• Polymerase chain reaction(PCR)での
DNAの検出

- DNAの回収: QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen社)を使用
 - 方法: 添付のマニュアルに準じて行った。
ただし、抽出にあたっては操作上のすべての上清を用いて行い、最終産物は滅菌水34.75µl (PCR1回分量)にて回収した。
- Tachibanaらの方法(1991) (増幅産物: 100 bp)
 - Primer: P11 (5' -ggaggagtaggaaagtac-3')と P12 (5' -ttcttccaattctctgcttcca-3')を使用
 - 温度設定など:
Denaturation 94°C1分, Annealing 59°C90秒
Elongation 72°C90秒で40 cycles(原報では30cycles)
- シストの検出: MGL法+ヨードヨードカリウム液染色

図5 DNAの回収方法



- PCRでDNAの検出
 - DNAの回収: QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen社)を使用
 - 方法: 添付のマニュアルに準じて行った。
ただし、抽出にあたっては操作上のすべての上清を用いて行い、最終産物は滅菌水34.75µl (PCR1回分量)にて回収した。
 - Tachibanaらの方法(1991) (増幅産物: 100 bp)
 - Primer: P11 (5' -ggaggagtaggaaagtac-3')と P12 (5' -ttcttccaattctctgcttcca-3')を使用
 - 温度条件など:
Denaturation 94°C1分, Annealing 59°C90秒
Elongation 72°C90秒で40 cycles(原報では30cycles)
- シストの検出: MGL法+ヨードヨードカリウム液染色



(2) クリプトスポリジウム原虫(Cp)の検出

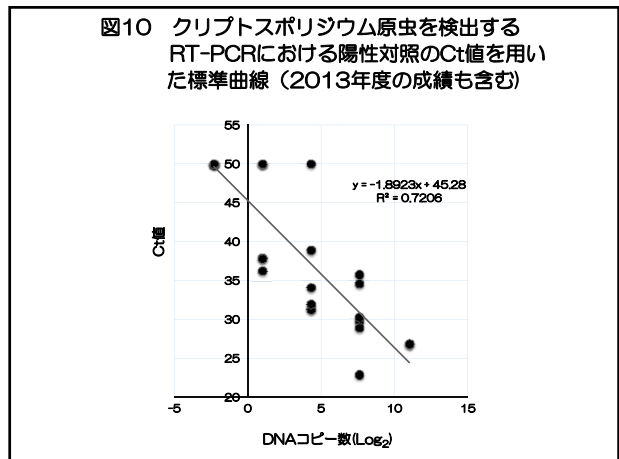
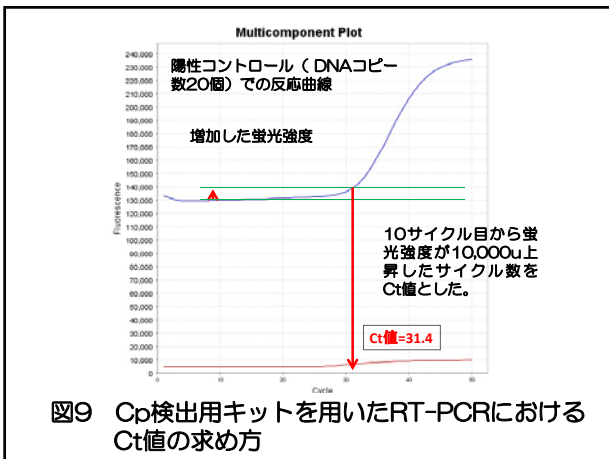
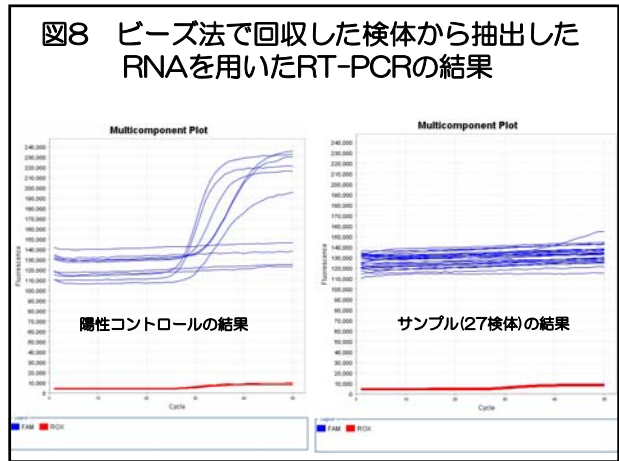
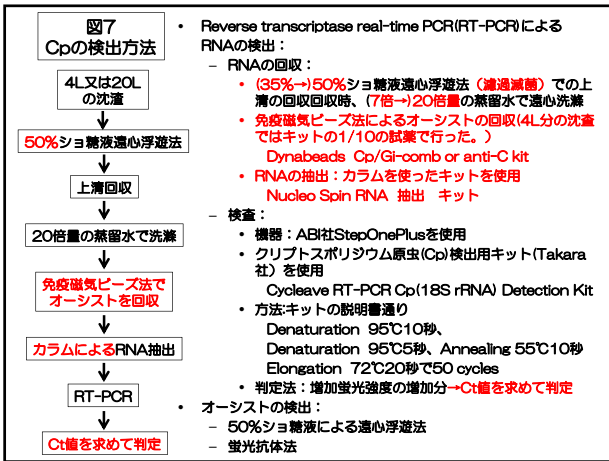
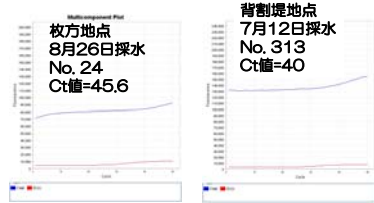


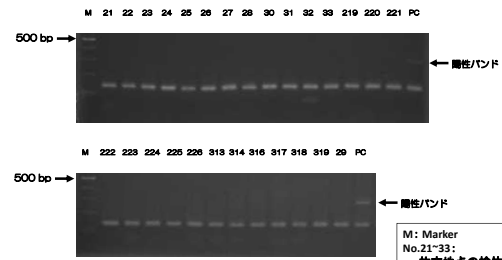
表2 Cp検出用キットで蛍光強度の増強が認められた検体におけるオーシスト数

検出キット名	検体番号	Ct値	DNAコピー数 /2μl	DNAコピー数 /4L ×10 ³	計算されたオーシスト数/4L (1.8×10 ⁴ /オーシスト)
Cp	24	45.6	0.89	2.67	0.14
	313	40	6.92	20.76	1.15



検体 No.24 でオーシスト数が0.14個、検体313でオーシスト数が1.15個と計算された。

図11 クリプトスポリジウム原虫検出用のRT-PCR増幅産物の電気泳動像の結果



27検体のすべてのRT-PCRの増幅産物でバンドが検出されなかった。

M: Marker
No.21~33: 枚方地点の検体
No.219~226: 佐太西地点の検体
No.313~319: 青洲堤地点の検体
PC: Positive control

(3) ジアルジア原虫 (Gi) の検出

図12 Giの検出方法

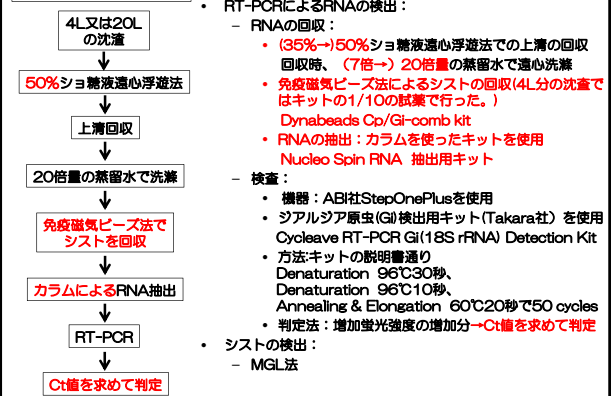


図13 ビーズ法で回収したジアルジアのシストから抽出したRNAを用いたRT-PCRの結果

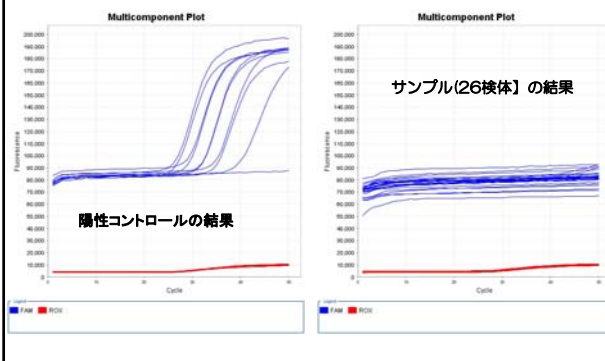


図14 ジアルジア原虫を検出するRT-PCRにおける陽性対照のCt値を用いた標準曲線 (2013年度の成績も含む)

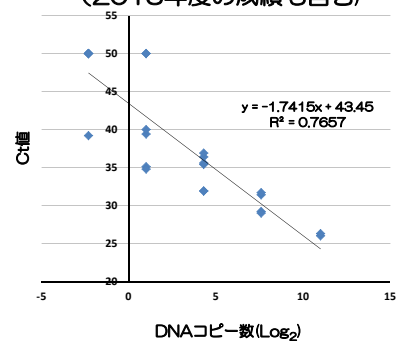


表3 Gi検出用キットで蛍光強度の増加が認められた検体
におけるシスト数

検出 キット名	検体 番号	Ct値	DNAコピー数 /2μl	DNAコピー数 /4L ×10 ⁹	計算された シスト数/4L (1.6×10 ⁹ /シスト)
Gi	24	45.5	0.286	0.85	0.54
	30	46.6	0.442	1.32	0.83

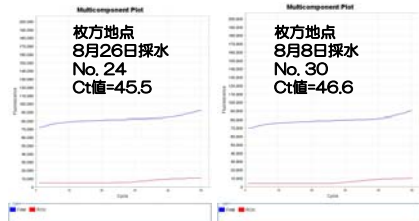
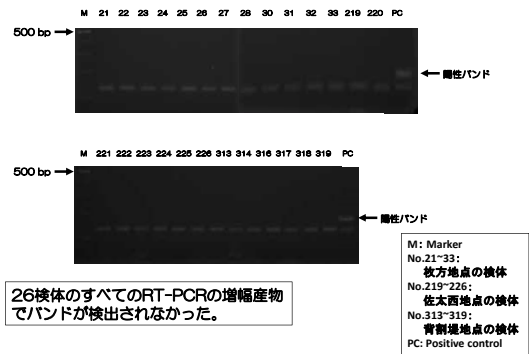


図15 ジアルジア原虫検出用のRT-PCR
増幅産物の電気泳動像の結果



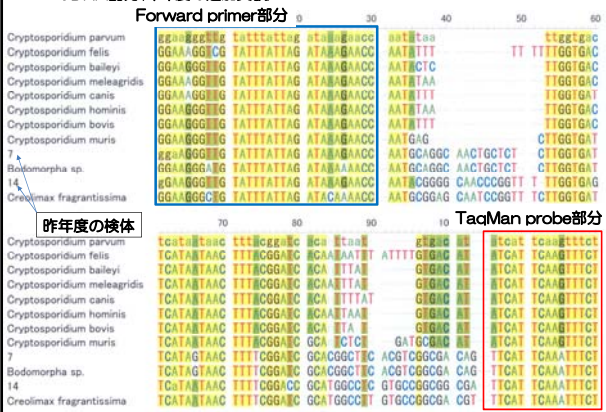
結果

- 赤痢アメーバ原虫のPCRによる検出
 - 河川水36検体(すべて4L)からは原虫は検出されなかった。
- クリプトスポリジウム原虫のRT-PCRによる検出
 - 河川水27検体中(4L、うち4検体は20L) 1検体(No.313、4L)からオーシストが1.15個、検出された。
 - ただし、RT-PCRの増幅産物のアガロース電気泳動では、陽性バンドは検出されなかった。
- ジアルジア原虫のRT-PCRによる検出
 - 河川水26検体(4L、4検体は20L)からは原虫は検出されなかった。

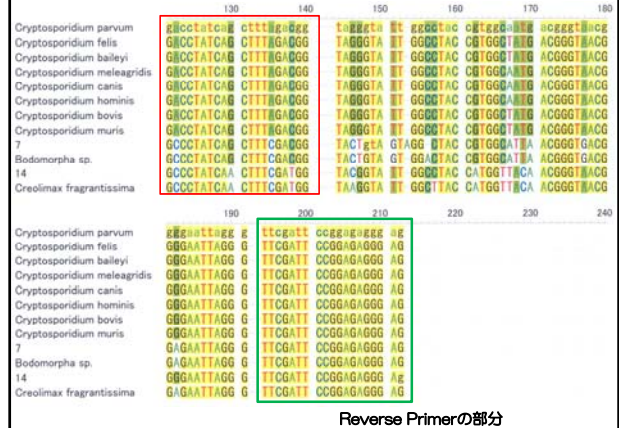
考察

- 今回、PCR及びRT-PCRによって三種類の病原体の検出を試みたが、検体27検体中1検体にクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。
- 問題点：
 - 用いたRT-PCRのキットでは、ターゲットが原虫のRNAであることから、RNAの抽出時には、RNAが分解されやすいことから特別な注意が払われるべきと考えられる。
 - また、ターゲットの18S rRNA遺伝子は近縁種と類似の配列を保持している(昨年度の追加実験、図16)ので、今回の様に免疫磁気ビーズ法などで病原体を精製してからの検査が必要であると考えられた。
 - 河川水は雨水によってかなり希釈されていると考えられるものの、患者の糞便の処理などが効果的に行われていると考えられた。

図16 RT-PCRで増幅されていると考えられるクリプトスポリジウム原虫のDNA配列(昨年度の追加実験)



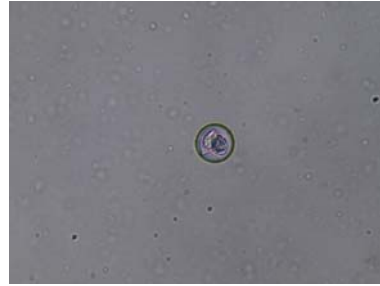
TaqMan probe部分の続き



考察

- 今回、PCR及びRT-PCRによって三種類の病原体の検出を試みたが、検体27検体中1検体にクリプトスポリジウムのオーシストが検出された。
- 問題点：
 - 用いたRT-PCRのキットでは、ターゲットが原虫のRNAであることから、RNAの抽出時には、RNAが分解されやすいことから特別な注意が払われるべきと考えられる。
 - また、ターゲットの18S rRNA遺伝子は近縁種と類似の配列を保持している(昨年度の追加実験、図16)ので、今回の様に免疫磁気ビーズ法などで病原体を精製してからの検査が必要であると考えられた。
 - 河川水は雨水によってかなり希釈されるものの、患者の糞便の処理などを徹底する必要があると考えられた。

(4) その他



平成26年6月7日に採取した検体NO.19から
検出されたコクシジウム (*Isospora* sp.?)の
オーシスト

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。

ご清聴ありがとうございました