

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

1. はじめに

ヒトに寄生する原虫症として、アメーバ赤痢(以下、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(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。また、クリプトスポリジウム症においては、過去に9千人規模のアウトブレイクが起こった経緯がある(2)。

水系感染症では、図1に示すように感染した患者や動物の糞便中に新たなシストやオーシストなどの感染源が排出され、これらの不適切な処理があると、河川水の汚染が引き起こされる。これに伴って、汚染した河川水の再利用によって新たな感染が広がり、時に大規模な集団発生と言ったアウトブレイクが発生する。

この研究では、昨年度に引き続き、淀川水系の原水における赤痢アメーバ原虫とジアルジア原虫のシスト、及びクリプトスポリジウム原虫のオーシストによる汚染の有無についての実態調査を行った。

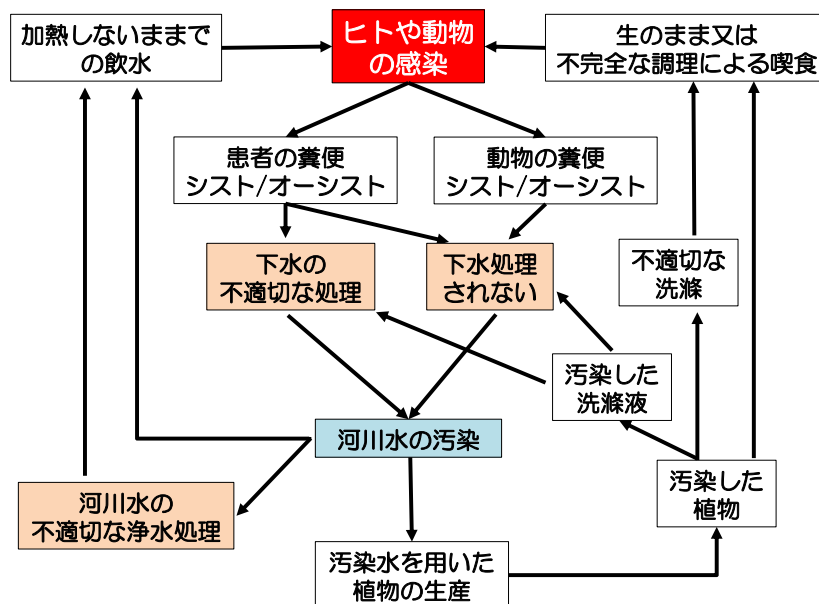


図1 水系感染症の発生メカニズム

2. 方法

2.1 検体の採取

平成26年5月から平成27年1月まで、大阪府寝屋川市佐太西地点(庭窪取水場取水口の上流)で計14検体、枚方市枚方地点(天野川合流点下流の枚方大橋下)で計20検体、及び背割堤地点(宇治川支流、京都府洛南浄化センター放流口下流)で14検体、淀川河川水を20~40Lずつ/1ヶ所、延べ48検体を採取した。

検体は昨年度と同じように、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を遠心操作によって、沈渣を回収した。遠心操作は昨年度使用の200ml平底遠心管に換えて、50mlの尖底遠心管を使用して行い、2,500rpmで10分間遠心した。その後、20L分の沈渣、もしくは5等分して得た4L分の沈渣(昨年度から変更)として以下の検査に供した。

2.2 検査方法

2.2.1 赤痢アメーバ原虫の検出

赤痢アメーバ原虫検出用の検体(4L分)は凍結保存後、凍結融解を5回施し、病原体のDNAの抽出をQIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen社)によって行った。このキットのマニュアル通りに行うと、6400倍の希釈がかかることから、操作上の上清をすべて回収して、最終的に蒸留水34.75 μ l(PCRの1回分/50 μ l)にてDNAを回収した(3-5)。

赤痢アメーバ原虫のDNAの検出はTachibanaらの方法(6)に準じて行った。Tachibanaらの方法はprimerとしてP11(5'-ggaggagtaggaaagttgac-3')とP12(5'-ttcttgcaattctctgcttcga-3')を用いた検出法であり、赤痢アメーバ原虫*Entamoeba histolytica*の検出に広く使われている。但し、増幅回数は原法の30cyclesから40cyclesに増やした(3-5)。

また、PCRが陽性であった検体については、50%ショ糖液を用いた遠心浮遊法で上清を回収し、ヨードヨードカリウム液で染色してシストを確認した。さらに、陽性バンドのPCR増幅産物のDNAシーケンス解析はABI社のDNAアナライザー3130を用いて行った。

昨年度においてアメーバ原虫のシストが検出された検体及びPCRで陽性バンドが認められた検体について、使用するprimerなどを増やして解析し、原虫の種類の同定を試みた。

2.2.2 クリプトスポリジウム原虫の検出

検体(4L分)は砂の混入が多いため、50%ショ糖液遠心浮遊法によって砂を除去後、オーシストを含む上清を回収し、免疫磁気ビーズ法によってクリプトスポリジウム原虫(Cp)のオーシストを回収した。免疫磁気ビーズ法の検査キットはDynabeads® Cp/G-comb or anti-Cp kit(Veritas社)を用いた(ただし、4Lの沈渣の処理では、キットの10分の一の試薬を用いて行った)。この方法で回収したものは凍結保存し、その後凍結融解を5回施して、RNAをRNA回収キット(NucleoSpin® RNA、Macherey-Nagel社製 TaKaRa社)を用いて回収した。Reverse transcriptase real-time PCR(以下、RT-PCR)はCp検出用キット(Cycleave® RT-PCR Cryptosporidium(18S rRNA) Detection Kit、TaKaRa社)を用いて、StepOnePlus(ABI社)で測定した。判定は陽性対照のCt値を求めて標準曲線を作成して行った。但し、StepOnePlusによる自動化でのCt値による標準

曲線を求めることができなかつたので、蛍光強度が 10 サイクル目から 10,000u、上昇したサイクル数を Ct 値とし、解析に用いた。最終使用検査液量 2 μ l あたりの RNA コピー数を求め、希釈倍数 (3×10^3 倍) を乗じた後、1 オーシストあたりの RNA コピー数 1.8×10^4 個で除して、検体 4L あたりに含まれるオーシスト数を算出した。

また、RT-PCR で陽性であった検体については、50%ショ糖液を用いた遠心浮遊法でもオーシストの検出を行った。

さらに、蛍光抗体法でも、市販の Cp/G 検出用キット (EasyStain™、BTF 社製和光純薬 KK) を用いて検出を試みた。先ず、淀川よ 20L の沈査を用いて、50%ショ糖液遠心浮遊法を行い、さらにこの上清から免疫磁気ビーズ法でオーシストを回収したものを検体とした。観察はバーチャルスキャンシステム蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) を用いて行った。

PCR 増幅産物の DNA シーケンス解析は ABI 社の DNA アナライザー 3130 を用いて行った。Cp 検出用キットに用いられている primer と TaqMan probe の DNA 配列は情報公開されていないので、文献 (7,8) を参考に合成した primer (Forward primer: 5' -ggaagggttgattttatttagataaagaacca-3'、Reverse primer: 5' -ctccctctccggaatcgaa-3') を用いて、蛍光強度が増加した検体について、PCR を再度行い、検出バンドの DNA 配列を調べて解析した。

2.2.3 ジアルジア原虫 (Gi) の検出

RT-PCR 用の RNA は、クリプトスポリジウム原虫用に回収したものを使用した。RT-PCR による検出は Gi 検出用キット (Cycleave® RT-PCR Giardia (18S rRNA) Detection Kit、TaKaRa 社) を用いて行った。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行った。また、RT-PCR で陽性であったものは、50%ショ糖液遠心浮遊法の上清を用いて、ヨードヨードカリウム液で染色してから、シストの検出を試みた。

2.2.4 土壌線虫の検出

糞線虫及び土壌線虫の検出は淀川河川水 4L の沈査を用いて、濾紙培養法で行った。

3. 結果及び考察

3.1 赤痢アメーバ原虫の検出

PCR で検査したすべての 36 検体 (すべて淀川河川水 4L 分の沈査、昨年度の 2 倍量) において、陽性バンドは検出されなかつた (図 2)。

昨年度と今年度においては、患者の糞便由来の赤痢アメーバ原虫のシストが検出されなかつたことから、下水処理によってシストの除去が適確に行われていると判断された。しかしながら、淀川水系の下水道普及率は、大阪市や京都市の都会ではそれぞれ 100%、99.5%と比較的に高いけれども、地方や山間部ではやや低い (9)。滋賀県全域では 87.9%であり、奈良県の生駒市で 64%、宇陀市で 59.2%と低い普及率になっている。さらに、三重県の下水道普及率は津市、名張市と伊賀市で、それぞれ 43.8%、26.1%、と 18.7%とかなり低い状態である。このようなことから、淀川河川水が大阪府民などの飲用水用に、淀川下流で取水されていることから、感染症のアウトブレイクが起らないようにするためには下水道普及率のより一層の向上が望まれる。

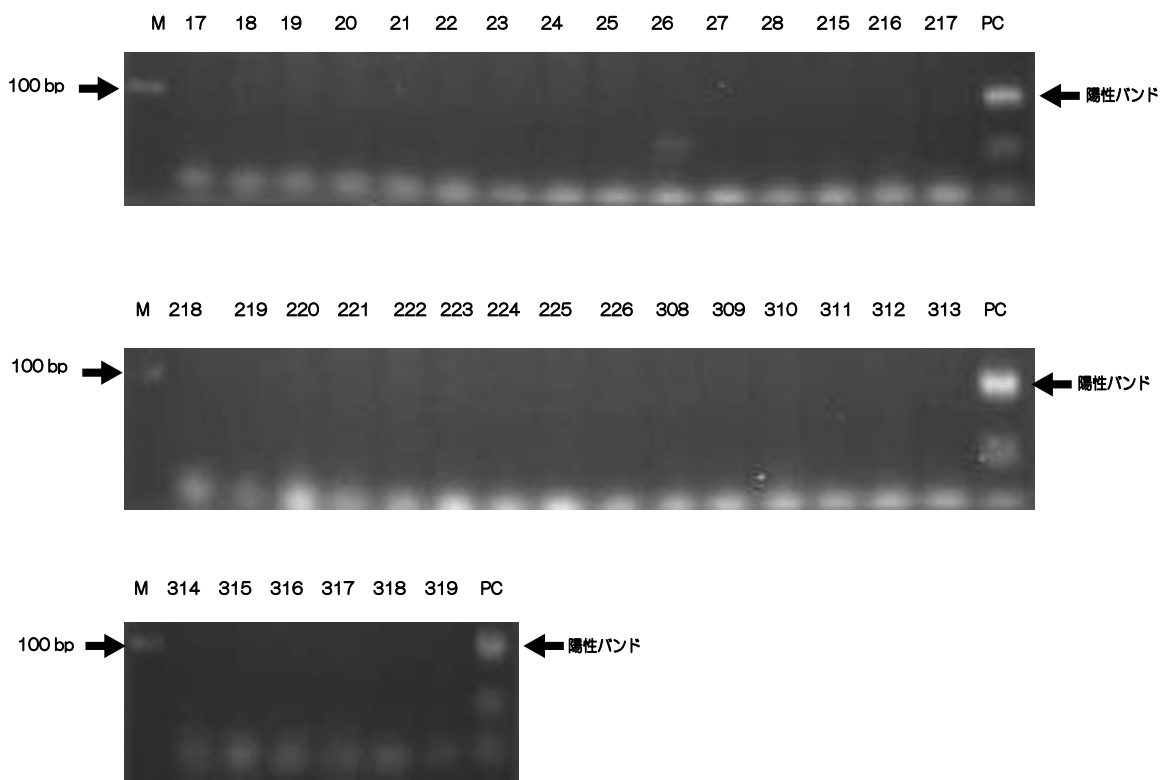


図2 赤痢アメーバ原虫の検出後のPCR増幅産物のアガロース電気泳動像

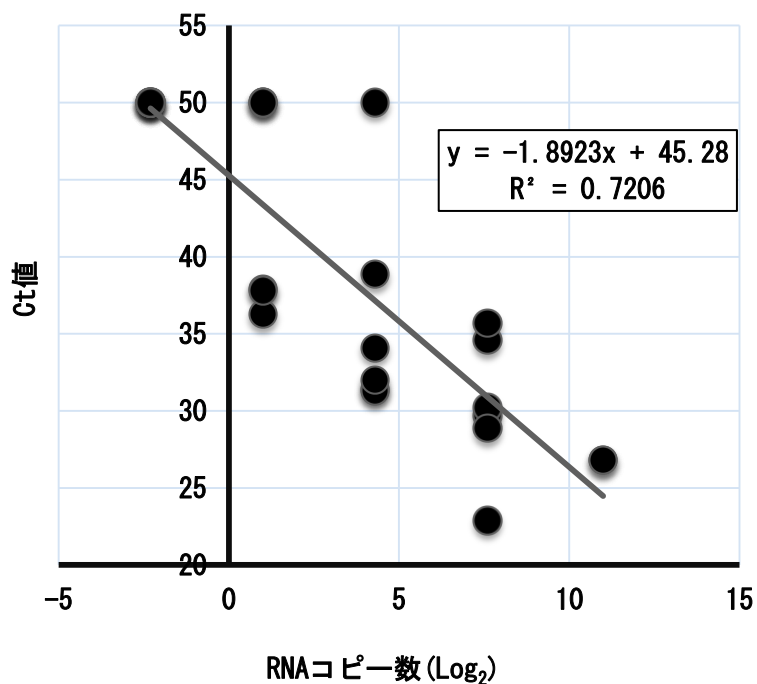


図3 クリプトスポリジウム原虫を検出するRT-PCRにおける陽性対照のCt値を用いた標準曲線（2013年度の成績も含む）

3.2 クリプトスポリジウム原虫の検出

3.2.1 RT-PCR による検出

今年度の RT-PCR の結果判定は Ct 値を求めて検討した。陽性対照の Ct 値より標準直線 $y=-1.8923x+45.28$ 、 $R^2=0.7206$ を求めることができた。淀川河川水 27 検体（うち、4 検体は 20L の沈査）の中で、蛍光強度の増強が認められた 2 検体（いずれも検体量は 4 L）の結果を表 1 に示した。検体 No. 24 と No. 313 のオーシスト数はそれぞれ 0.14 個と 1.15 個と計算された。しかしながら、RT-PCR 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。さらに、RT-PCR 増幅産物を再度 PCR（2 回目）で増幅したところ、バンドが出現したが、このバンドについて DNA シーケンス解析をしたところ、*Aspergillus* sp. (GQ980286.1) のそれと 99% (197/199)、一致した。*Cryptosporidium parvum* との相同性は 68.4% (124/181) と低かった。RT-PCR は RNA を検出するので、死んでいるオーシストは検出されず、生きているオーシストしか検出されない。よって、今年度に検査したすべての検体で生きているオーシストは検出されなかったと判断された。

表 1 クリプトスポリジウム原虫を検出する RT-PCR で蛍光強度の増強が認められた検体における Ct 値及び計算されたオーシスト数

検査年度	検体番号	Ct 値	RNA コピー数 /2 μ l	RNA コピー数 /4L $\times 10^3$	計算されたオーシスト数/4L (1.8 $\times 10^4$ /オーシスト)
2014	24	45.6	0.89	2.67	0.14
2014	313	40	6.92	20.76	1.15

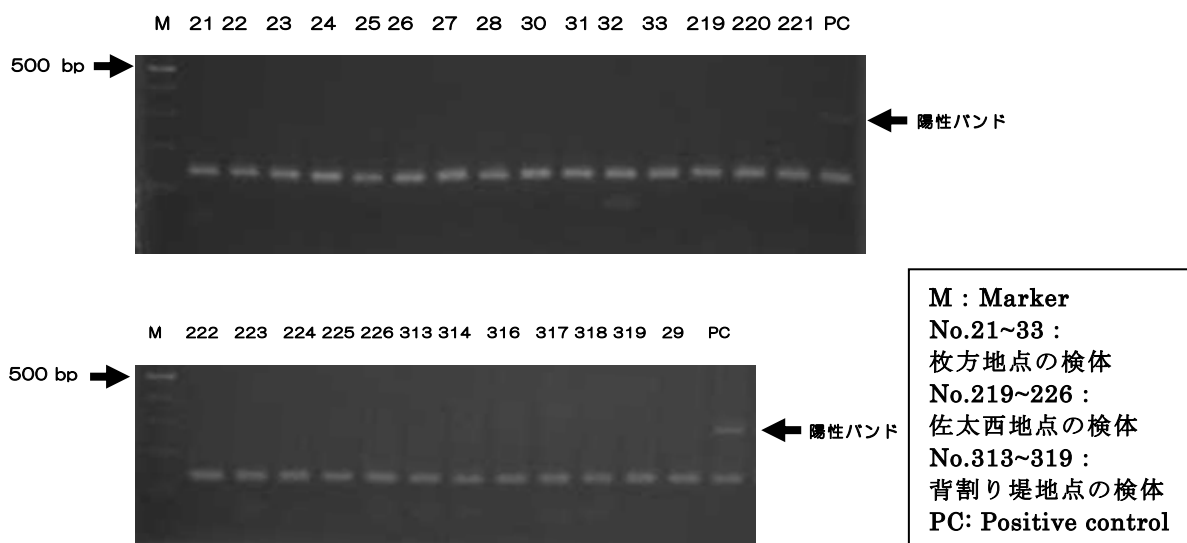


図 4 クリプトスポリジウム原虫を検出する RT-PCR の増幅産物のアガロース電気泳動像

また、昨年度の RT-PCR で蛍光強度が増強された枚方地点で採水した No. 7 でもオーシスト数が 1.44 個と再計算されたが、PCR 増幅産物の出現バンドの DNA シーケンス解析では、*Bodomorpha* sp. (HM36172.1) や *Cercozoa* sp. (HQ918178.1) のそれらと 98%(198/202)、一致した。また、*Cryptosporidium parvum* のそれとは全領域で 75.3%(152/202)、forward primer 領域で 100%(30/30)、TaqMan probe 領域で 88.6%(31/35)、reverse primer 領域で 100%(20/20)、それぞれ一致した。これらのことから、検査に用いる領域が *Aspergillus* sp.、*Bodomorpha* sp. や *Cercozoa* sp. のそれらと極めて類似しているため、検査に際して交差反応性があることを留意して行うことが必要であり、今後はより特異性のある検査法の開発が望まれる。

3.2.2 蛍光抗体法による検出

さらに、クリプトスポリジウム原虫の検出を市販のキットを用いた蛍光抗体法でも行った。淀川河川水 7 検体の 20L ずつの沈査から、50%ショ糖液遠心浮遊法でオーシストを集めたのち、免疫磁気ビーズ法でオーシストを回収したにもかかわらず、紛らわしい大型粒子(図 5b: 検体 No. 35 で、大きさは 13.2-38.7 μ m、図 5d: 陽性対照の大きさは 6.4-8.4 μ m)や小形の粒子(データを示していないが、検体 No. 228 で大きさは 2.8-5.3 μ m、陽性対照の大きさは 8.7-9.5 μ m)の蛍光が観察された。陽性対照の蛍光を示すクリプトスポリジウム原虫のオーシスト(8.71 μ m、図 5e)は実際のオーシストの大きさ(4-6 μ m)よりも大きく観察された。これはオーシストにピントが合っておらず、蛍光がハレーションを起こしたためと考えられた。陽性対照のオーシストの大きさとほぼ同じもの(8.72-9.51 μ m)が No. 228、No. 35 と No. 321 でそれぞれ 2 個(8.32、7.21 μ m)、4 個(7.25-9.7 μ m) と 1 個(8.55 μ m)、それぞれ検出された。

蛍光抗体法の観察はバーチャルスキャンシステム蛍光顕微鏡(オリンパス社製)を用いて行った。このシステムは 20 倍又は 40 倍の対物レンズで、全視野をスキャンし、

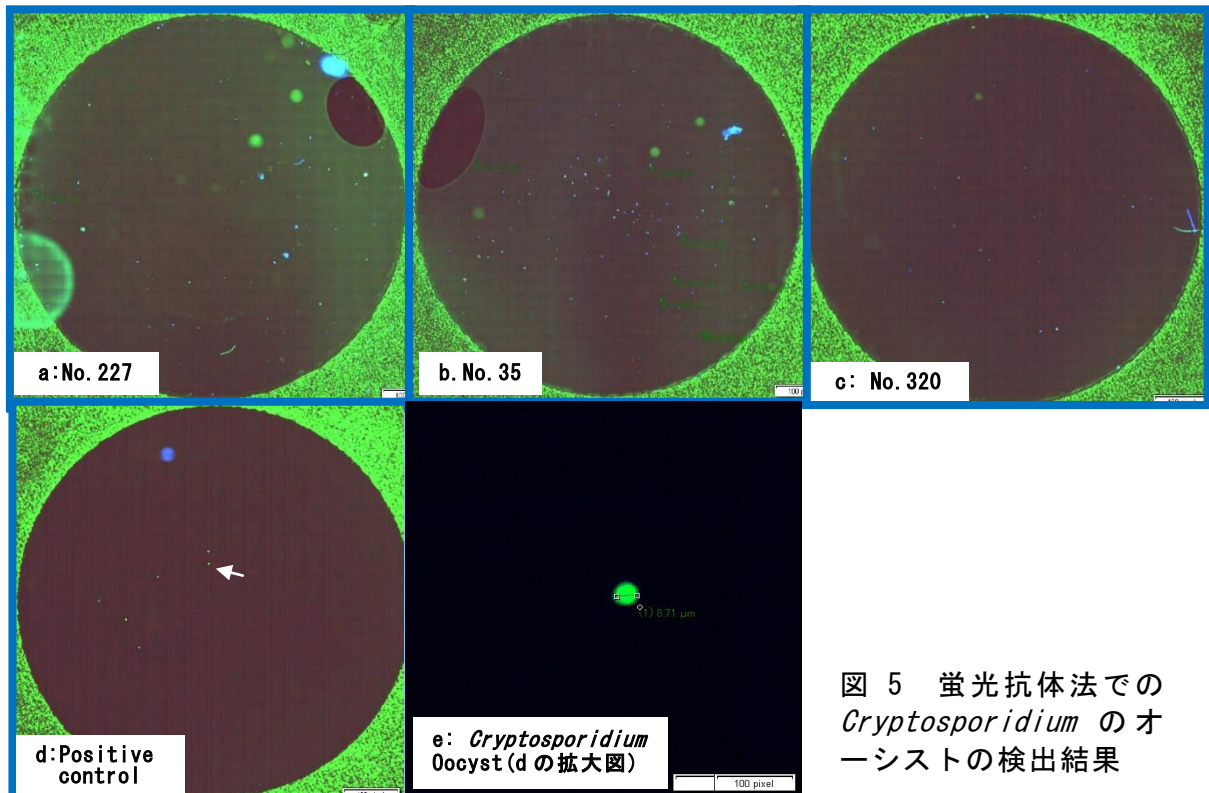


図 5 蛍光抗体法での *Cryptosporidium* のオーシストの検出結果

データを保存でき、いつでも再検討できる有利性がある。また、10 μ m サイズまで拡大して観察でき、オーシストのサイズも計測が可能である。しかしながら、今回使用した蛍光抗体染色キットはクリプトスポリジウム原虫のオーシストだけでなく、真菌などの胞子も染色されたので、鑑別が極めて困難であった。さらに、この蛍光抗体法はクリプトスポリジウム原虫のオーシスト壁を染色するので、死んでいるオーシストも染まってくる。RT-PCR との併用が必要であると考えられたが、今回は併用して行わなかった。

3.3 ジアルジア原虫の検出

ジアルジア原虫検出用のキットを用いた RT-PCR でも、クリプトスポリジウム原虫の検出時と同様にして Ct 値を求めて結果を評価した。陽性対照の Ct 値から標準直線 $y = -1.7415x + 43.45$ 、 $R^2 = 0.7657$ が求められた(図6)。淀川河川水 26 検体中 2 検体で蛍光強度が増加した。結果を表 2 及び図 7 に示した。これらの 2 検体はシスト数がそれぞれ 0.83 個と 0.54 個と計算され、シスト数が 1 個以下であることから両者ともオーシストは検出されなかったと評価された。

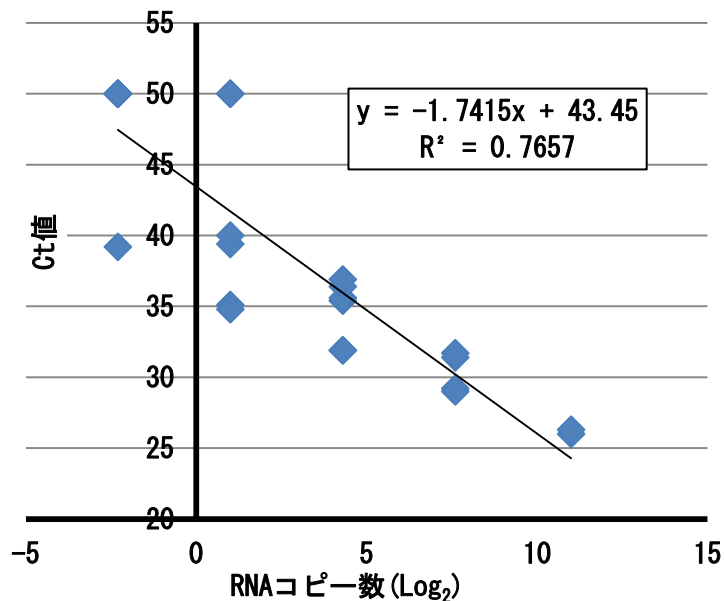


図6 ジアルジア原虫を検出するRT-PCRにおける陽性対照のCt値を用いた標準曲線(2013年度の成績も含む)

表 2 ジアルジア原虫を検出する RT-PCR で蛍光強度の増強が認められた検体のシスト数

検査年度	検体番号	Ct 値	DNA コピー数/2 μ l	DNA コピー数/4L ($\times 10^3$)	計算されたシスト数 1.6×10^3 /シスト
2014	24	45.5	0.44	1.33	0.83
2014	30	46.6	0.29	0.86	0.54

また、昨年度の検体 No. 206 でシスト数が 80.1 個と再計算されたが、この検体には *Eimeria* sp. のオーシストが検出されていたことから交差反応によるものと考えられた（昨年度の成績）。本年度は免疫磁気ビーズ法を使用したことで、*Eimeria* sp. や *Isospora* sp. のオーシストの混入を防ぐことができ、これらによる交差反応を防げたと考えられた。

3.4 土壌線虫の検出

検査した 37 検体中 19 検体 (51.4%) で土壌線虫が検出された。

昨年度に検出した土壌線虫の同定を試みたが、種を確定することができなかったため、今年度は、土壌線虫の同定を行わなかった。

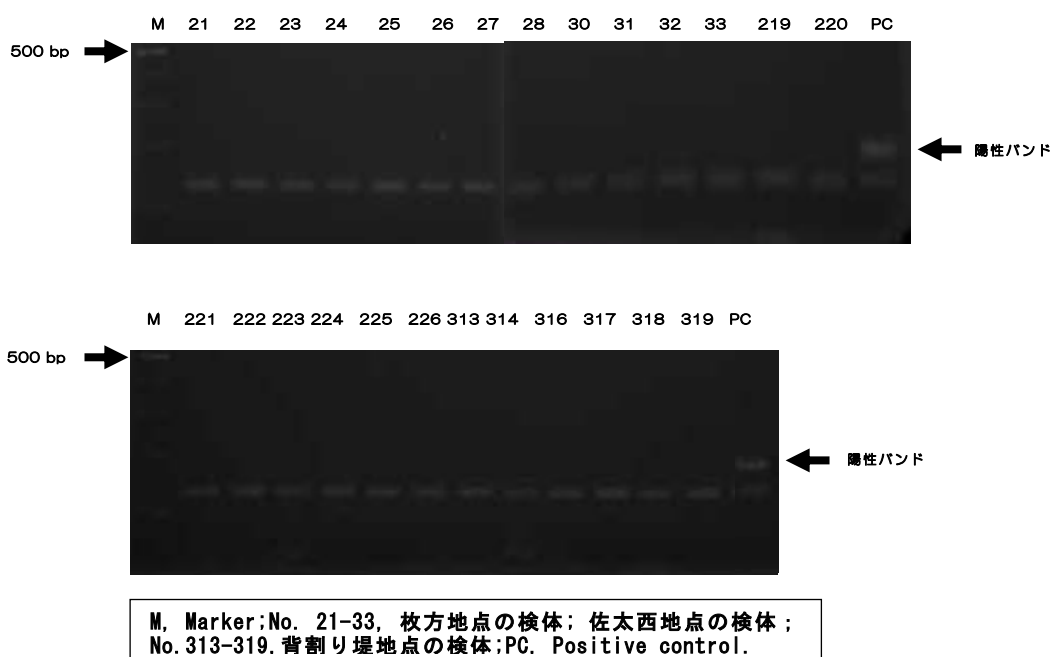


図 7 ジアルジア原虫を検出する RT-PCR の増幅産物のアガロース電気泳動像



図 8 枚方地点で採水した検体 No. 19 から検出された *Isospora* sp. のオーシスト

5. その他

シヨ糖液遠心浮遊法で検体 No. 19 から *Isospora* sp. のオーシストが検出された。このオーシスト内にはスポロシストが2個、観察された(図8)。一方、昨年度に検出された *Eimeria* のオーシストでは4個のスポロシストが観察された。前者はペット由来、後者はニワトリかうシ由来と考えられた。

4. まとめ

1. 赤痢アメーバ原虫の検出：

淀川河川水 36 検体(すべて 4L 使用) について PCR よって検査したが、赤痢アメーバ原虫は検出されなかった。

2. クリプトスポリジウム原虫の検出：

淀川河川水 27 検体(4L、うち4検体は20L) について RT-PCR でクリプトスポリジウム原虫(生きているもの) を検査し、1 検体でオーシスト数が 1.15 個と計算されたが、これは非特異的反応によるものと判断された。

また、蛍光抗体法では、淀川河川水 7 検体(すべて 20L) 中、3 検体でそれぞれ2個、4個と1個ずつ、オーシスト様粒子が検出されたが、確定には至らなかった。

3. ジアルジア原虫の検出：

淀川河川水 26 検体について RT-PCR で検査したが、ジアルジア原虫(生きているもの) は検出されなかった。

5. 今後の課題

PCR、RT-PCR 及び蛍光抗体法の検査法は赤痢アメーバ原虫、クリプトスポリジウム原虫とジアルジア原虫の検出に用いられるが、それぞれの検査法の特異性と交差反応性に留意して検査する必要があると考えられた。

また、淀川は随時、流れがあり、たとえ淀川が糞便で汚染したとしても、かなり希釈されることから、検体量をより多く採取して行う必要があるとも考えられた。

6. 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、貴財団の益々の発展をお祈り申し上げます。

7. 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. 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.
3. 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
4. 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.
5. 大西義博：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、平成 25 年度水質保全研究助成成果報告書、pp9、2014

年 3 月.

http://www.byq.or.jp/josei/h25/pdf/25_3-4_houkokusyo_oonisi.pdf

6. 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.
7. Miller, W.A., Gardner, I.A., Atwill, E.R., Leutenegger, C.M., Miller, M.A., Hedrick, R.P., Melli, A.C., Barnes, N.M. and Conarad, P.A.: Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). *J. Microbiol. Methods*, **65**(3): 367-379, 2006.
8. Kishida, N., Miyata, R., Furute, A., Izumiyama, S., Tsuneda, S., Sekiguchi, Y., Noda, N. and Akiba, M.: Quantitative detection of *Cryptosporidium* oocyst in water source based on 18S rRNA by alternately binding probe competitive reverse transcription polymerase chain reaction (ABC-RT-PCR). *Water research*, **46**: 187-194, 2012.
9. 日本下水道協会ホームページ、都道府県別下水道処理人口普及率、
<http://www.jswa.jp/rate/pdf/popularization.pdf?2014-09-25>