

大容量の淀川水系河川水からの病原性原虫類の検出

関西医療大学保健医療学部 大西義博・大瀧博文

1. はじめに

ヒトに寄生する原虫症として、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の摂取で感染する水系感染症であり、しかも汚染した食物の摂取でも感染する食品由来感染症でもある。また、これら感染症は 1999 年に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」、いわゆる感染症新法で五類感染症に指定され、これら症例は保健所に届けられて、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、全国の報告数は平成 25 年度から 1,000 症例を越えている(1)。また、クリプトスポリジウム症は 2002 年、2004 年及び 2014 年に集団発生（アウトブレイク）があった。さらに、汚染した水道水の摂取によっては、1994 年に神奈川県平塚市(461 名)で、1996 年には埼玉県越生町(8812 名)でアウトブレイクがあった(2,3)。

一方、水系感染症では、ヒトや動物が感染すると、患者や動物の糞便に病原体(シストやオーシスト)が排泄される。排泄された病原体が適切に処理されない場合は、河川水の汚染に繋がり、汚染した河川水の再利用によってはフィードバック的に新たな感染の拡大をもたらし、時に大規模なアウトブレイク（越生町の例）が発生する。また、淀川水系河川水は大阪府民の水道水の原水として利用されているが、淀川の取水地点上流には約 150 万人の大都市である京都市があり、他の河川に比較して水道水の原水としては汚染リスクが高い状況にある。

平成 25 年度及び平成 26 年度に、淀川系河川水から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の検出を試みて、これら原虫による河川水の汚染実態調査を行った(4,5)。しかしながら、検出に使用した河川水の量が 2-5L と少量であったので、本年度は大容量の検体 20L を用いて検査することとした。

合わせて、糞便による淀川河川水の汚染実態についても、大腸菌群数を指標にして評価することを試みた。

2. 材料と方法

2.1 検体の採取

平成 28 年 5 月 17 日から平成 29 年 1 月 14 日まで、大阪府寝屋川市佐太西地点（庭窪取水場取水口の上流）、枚方市枚方地点（天野川合流点下流の枚方大橋下）、及び背割堤地点（宇治川支流、洛南浄化センター放流口の下流）で、淀川河川水を月 1 回ずつ、1 か所あたり 20L ずつ、延べ 27 検体を採取した。大腸菌群数の検査には、河川水を滅菌ボトルに 100ml ずつ、採取し冷却して運搬した。

採取した河川水は一晩静置後、上清の四分之三を水流ポンプで吸い上げて破棄した後、残りを遠心し、沈渣を回収した。遠心は 50ml のポリスチレン製尖底遠心管を使用し、3,000rpm、10 分間で行った。次いで、これらの沈渣液を 5~10ml に調整後、多量の砂を含むため、2~4 つに分けて 50%ショ糖液 10ml に重層した後、2,500rpm で、5 分間遠心して浮遊液を回収した。浮遊液は 2 回遠心洗浄後、シスト／オーシストを含む

浮遊回収液 10ml から、免疫磁気ビーズ法によって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を回収し精製し、これらの分画液をクリプトスポリジウム原虫及びジアルジア原虫の検出に用いた。免疫磁気ビーズ法の検査キットは Dynabeads® Cp/G-comb kit (Veritas 社) を用い、操作はキットのマニュアルに準じて行った。

免疫磁気ビーズ法で回収できなかった残渣を赤痢アメーバ原虫の検出に用いた。

オーシスト/シストを含む分画液には、RNA の分解を防止するため、同量の RNase inhibitors 液を添加し、-30℃で冷凍保存した。

2.2 検査方法

2.2.1 クリプトスポリジウム原虫の検出

オーシスト分画液からの RNA の回収・精製は市販キット (NucleoSpin®RNA Plus, Macherey-Nagel 社) を用いて、マニュアルの通りに行った。その後、精製した RNA を用いて検査用キット (Cycleave RT-PCR Cryptosporidium (18SrRNA) Detection kit, TaKaRa 社) でサイクリングブローブ法による定量的 Reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。操作はキットのマニュアルに準じて行い、最終的なオーシスト数は先の報告通りに計算して求めた (4, 5)。

また、Sybergreen (Power SYBR®Green Master Mix, ThermoFisher Scientific 社) を用いた定量的 RT-PCR による検出も試みた。用いた Primer は、Forward primer として 5' -ggaagggtgtattttattagataaagaacca-3' , Reverse primer として 5' -ctccctctccggaatcgaa-3') を用いた (6, 7)。

2.2.2 ジアルジア原虫の検出

RNA の回収・精製は 2.2.1 と同様に行った。精製した RNA を用いて検査用キット (Cycleave RT-PCR Giardia (18SrRNA) Detection kit, TaKaRa 社) でサイクリングブローブ法による定量的 RT-PCR を行った。操作はキットのマニュアルに準じて行い、最終的なオーシスト数は先の報告通りに計算して求めた (4, 5)。

また、Sybergreen (Power SYBR®Green Master Mix, ThermoFisher Scientific 社) を用いた定量的 RT-PCR による検出も試みた。用いた primer は、Forward primer として 5' -catccggtcgatcctgcc-3' と reverse primer として 5' -agtcgaaccctgattctccgccagg-3' を用いた。

2.2.3 赤痢アメーバ原虫の検出

免疫磁気ビーズ法の残渣 (シストを含む分画液) から RNA を回収・精製し、精製した RNA を用いて PCR で定性的に赤痢アメーバ原虫の検出を行った。PCR は Tachibana らの方法 (8) に準じて行った。但し、増幅回数は原法の 30cycles から 40cycles に増やした。Forward primer として P11 (5' -ggaggagtaggaaagttgac-3') と reverse primer として P12 (5' -ttcttgcaattcctgcttcga-3') を用いた。

また、Sybergreen (Power SYBR®Green Master Mix, ThermoFisher Scientific 社) を用いた定量的 RT-PCR による検出も試みた。Primer として P11 と P12 を用いた。

2.2.4 大腸菌群数の検出

大腸菌群数の検査は、採取した河川水 100μl ずつをデゾキシコレート培地 (日水製

薬) に播種した。25℃で 24 時間培養後、赤色のコロニーを数えて、大腸菌群数とした。コロニー数が 10 個以下の場合は、次の日に河川水を 3,000 回転、10 分間遠心して、10 倍に濃縮して、同様に検査した。結果は平板培地 3 枚ずつの平均値を用い、cfu/100 ml で表した。

大腸菌群数と降水量(検体採取前 24 時間積算値)との関係を見るために、降水量については気象庁のホームページのデータバンクの降水量をもとに積算値を計数した(9)。背割り堤の降水量は大津+信楽、枚方の降水量は園部+京都+大津+信楽+京田辺+上野、佐多西の降水量は園部+京都+大津+信楽+京田辺+上野+枚方、各地点の 1 時間ごとの計測値の 24 時間積算値(mm)で表した。ただし、検体採取前 24 時間が晴れの場合は、降水量積算値を便宜上 0.5mm とした。

3. 結果及び考察

3.1 クリプトスポリジウム原虫の検出

サイクリングブローブ法による定量的 RT-PCR によって陽性を示す検体は認められなかった。検体の反応曲線では反応当初から蛍光強度が高く、検体中に nuclease のような阻害物質の混入があり、検出がうまくいっていないことが考えられた。検体には大量の砂等の混入があり、原虫のオーシストの精製が不十分であり、阻害物質の除去は今後の課題と考えられた。

そこで、Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR についても検討した。図 1 に陽性コントロールでの標準曲線を示す。結果は表 1 のように、陽性反応を示した検体からは河川水 20L 当たり 0.03~12.8 個のオーシストが検出された。オーシスト数が 1 以上の陽性検体は 27 検体中 6 検体であった。ただ、1 個未満のオーシストの検出があることから、用いた primer は他の原虫とも非特異的に反応していると考えられた。

3.2 ジアルジア原虫の検出

サイクリングブローブ法による定量的 RT-PCR によって検体 No. 351 が陽性を示し、

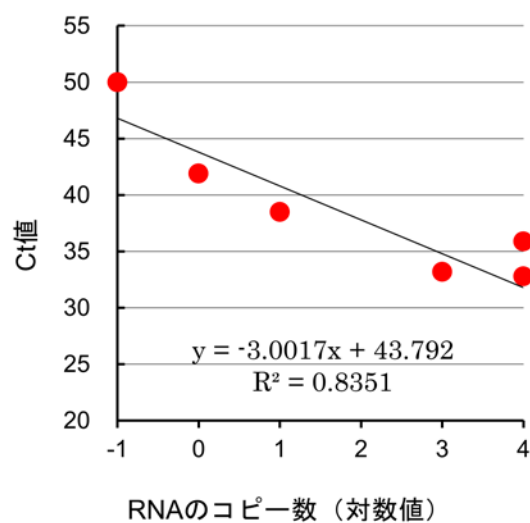


図 1 クリプトスポリジウム原虫の検出 : Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR での標準曲線

表 1 クリプトスポリジウム原虫の検出結果 : Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR による

検体番号	Ct 値	RNA のコピー数/2μl	検出したオーシスト数/20L
351	40.5	12.5	0.34
352	37.1	169.5	4.71
359	35.8	459.5	12.8
52	36.9	197.7	5.5
58	36.7	230.5	6.4
252	43.6	1.16	0.03
256	43.1	1.7	0.05
258	38.8	46.0	1.28
259	37.9	91.7	2.54

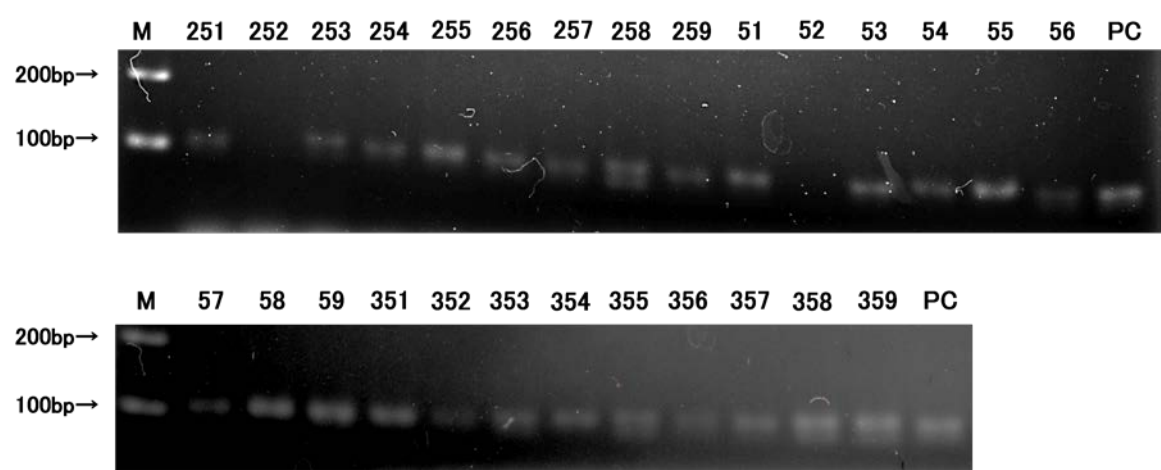


図 2 アメーバ原虫の検出結果(定性的)
PCR の増幅産物のアガロース電気泳動像
M, Marker ; PC, Positive control ; 数字, 検体番号.

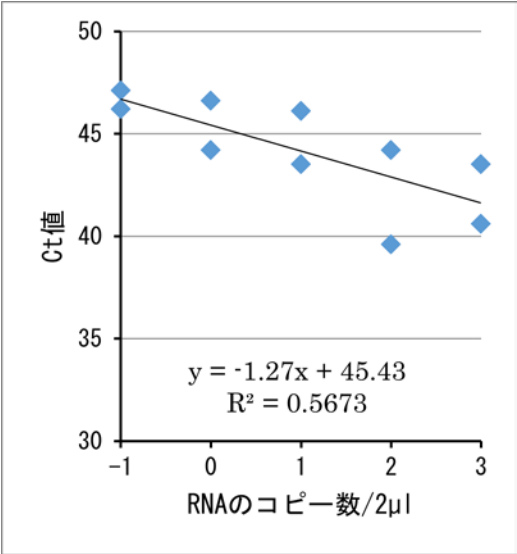


図 3 赤痢アメーバ原虫の検出 :
Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR
での標準曲線

表 2 赤痢アメーバ原虫の検出結果 :
Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR
による

検体 番号	Ct 値	検出した RNA 数/2μl	検出した RNA 数/20L
352	46.8	0.0835	41.8
353	47.5	0.0235	11.8
354	48.6	0.0319	16.0
356	47.3	0.0337	16.9
357	46.1	0.297	148.5
358	46.3	0.206	103
359	42.4	240	120,000
52	44.5	5.38	2,690
53	48.9	0.00185	0.925
56	50	0.00055	0.275
57	48.3	0.0055	2.75
58	49.6	0.00052	0.26
59	45.5	0.8808	440.4
252	45.5	0.8808	440.4
253	46.7	0.1	50
258	46.4	0.173	86.5

標準曲線と希釈倍率からシストが 1.16 コ、検出されたと計算された。ジアルジア原虫の検出でも、検体の反応曲線では反応当初から蛍光強度が高く、検体中に nuclease のような阻害物質の混入があり、検出がうまくいっていないことが考えられた。検体には大量の砂等の混入があり、原虫のシストの精製が不十分であり、阻害物質の除去は今後の課題と考えられた。

そこで、Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR についても検討した。しかしながら、用いた primer による陽性コントロールでの正の相関を示す標準曲線は得られず、検体に陽性反応を示すものがあるものの計算不能であった。

3.3 赤痢アメーバ原虫の検出

PCR で淀川水系河川水の 27 検体中 25 検体から陽性バンドが検出された（図 2）。

また、Sybergreen を用いた定量的 RT-PCR についても検討した。赤痢アメーバ原虫栄養型における目的遺伝子の発現量の報告がないことから、用いた赤痢アメーバ原虫（栄養型）1 匹あたり発現している RNA のコピー数を 1 として標準曲線を求めた。図 3 に示す標準直線が得られ、表 2 に示すような結果が得られた。河川水 20L から赤痢アメーバ原虫の RNA が 0.26～120,000 コピー、検出された。PCR（定性的）の結果と矛盾する検体が認められた（検体番号 52, 252 と 355, 51, 53-56, 251, 254-257, 259）。また、定量的 RT-PCR の結果から、陽性反応を示した検出中の RNA のコピー数が 1 以下のものが 3 検体あり、非特異的に他種の RNA を検出している可能性が高かった。さらに、今回用いた primer はニホンザルに寄生する *Entamoeba nuttalli* とも反応することから(10)、primer の再検討が必要と考えられた。

赤痢アメーバ原虫の陽性検体 No. 52 では大腸菌群数が最も多く検出されたことから、

表 3 降水量の積算値と大腸菌群数

採取日	採取地点	検体番号	降水量積算値	大腸菌群数 (cfu/100ml)	採取日	採取地点	検体番号	降水量積算値	大腸菌群数 (cfu/100ml)
2016年					10月17日	背割堤	356	59.0	54,667
5月17日	背割堤	351	60.5	58,333	10月17日	枚方	56	179.0	56,000
5月17日	枚方	51	235.5	59,667	10月17日	佐太西	256	193.0	5,667
5月17日	佐太西	251	272.0	74,667	11月14日	背割堤	357	1.0	833
6月21日	背割堤	352	42.5	33,667	11月14日	枚方	57	2.5	2,933
6月21日	枚方	52	150.0	118,667	11月14日	佐太西	257	2.5	1,467
6月21日	佐太西	252	174.5	34,000	12月19日	背割堤	358	0.5	2,567
7月19日	背割堤	353	0.5	9,333	12月19日	枚方	58	0.5	1,667
7月19日	枚方	53	0.5	7,000	12月19日	佐太西	258	0.5	2,933
7月19日	佐太西	253	0.5	43,667	2017年				
8月23日	背割堤	354	0.5	700	1月14日	背割堤	359	0.5	33
8月23日	枚方	54	1.0	1,633	1月14日	枚方	59	2.0	567
8月23日	佐太西	254	1.0	900	1月14日	佐太西	259	2.0	567
9月26日	背割堤	355	25.5	6,000					
9月26日	枚方	55	102.5	9,667					
9月26日	佐太西	255	117.0	9,000					

背割堤の降水量は大津+信楽、枚方の降水量は園部+京都+大津+信楽+京田辺+上野、佐多西の降水量は園部+京都+大津+信楽+京田辺+上野+枚方、各地点の 1 時間ごとの計測値の 24 時間積算値 (mm) で表した（ただし、検体採取前 24 時間が晴れの場合は、降水量積算値を便宜上 0.5mm とした）。

この検体は糞便による汚染が十分考えられた。また、陽性検体 No. 359 の採取地点は下水処理水の放流口の下流であることから、大腸菌群の検出数は少ないものの、下水処理が不適切であった可能性が示唆された。

3.4 大腸菌群数の検出

結果を表 3、図 4 に示した。検出した大腸菌群数は 33～118,667cfu/100ml が検出された。大腸菌群数と検体採取前 24 時間の降水量積算値との相関は全体で相関直線 $y = 0.5491x + 3.2886$ ，相関係数 $R^2 = 0.491$ （図 4A）で，晴れの日を除くと相関直線 $y = 0.7464x + 2.9187$ ，相関係数 $R^2 = 0.7702$ であった（図 4B）。降水量がより多い方が，大腸菌群数の検出が多い結果となった。これは未処理越流水が増加したり，川の水か

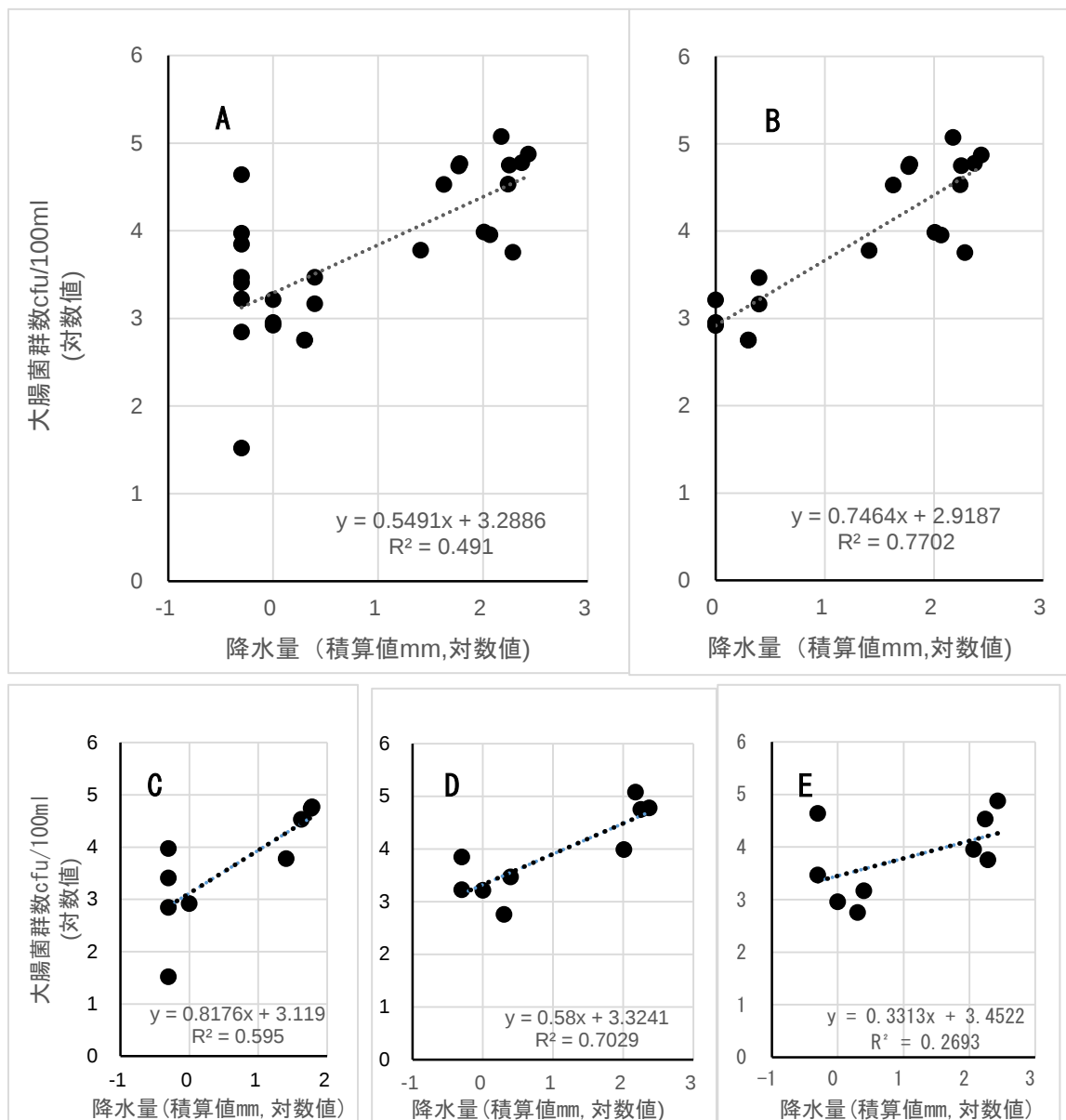


図 4 検出した大腸菌群数と降水量との関係

A: 検査したすべての検査成績、B: 晴れの日を除いた時の検査成績、C: 背割堤地区、D: 枚方地区、E: 佐太西地区。晴れの日では便宜上、降水量を 0.5mm として計算した。

さが上昇し、さらに川の流れが強くなり川底にたまっていた大腸菌群の菌が濁流となって巻き上がって、より多くの大腸菌群数が検出されたものと考えられた。ただ、晴れの日であっても、検出された大腸菌群数が多い日が認められた。7月19日に佐太西で採取した検体では43,667cfu/100ml(図4E), また、同日に背割り堤で採取した検体でも9333cfu/100mlの大腸菌群数が検出された(図4C)。塩素消毒によって損傷を受けた大腸菌群の菌が川の流れとともに(塩素の希釈によって)菌が復活して下流の佐太西地区で多く検出されたと考えられた(検体番号 No. 253)。これらの数値は下水処理水の大腸菌群数の基準値である1mlあたり3,000cfuよりも低い値(11)であるけれども、背割り堤(宇治川支流)の上流には京都府洛南浄化センターがあることから、下水処理が不十分な処理水が淀川に流れ込んでいる可能性が示唆された。

4. まとめ

平成28年5月17日から平成29年1月14日に採取した大容量(20L)の淀川水系河川水27検体からクリプトスポリジウム原虫、ジアルジア原虫及び赤痢アメーバ原虫の検出を試みた。

- 1) クリプトスポリジウム原虫ではサイクリングプローブ法による定量的RT-PCRで検出されなかった。しかし、Sybergreenを用いた定量的RT-PCRによって、6検体からオーシストが検出された。
- 2) ジアルジア原虫については、背割り堤(宇治川支流下)から採取した淀川水系河川水 No. 351 から1.16個のシストがサイクリングプローブ法による定量的RT-PCRで検出された。
- 3) 赤痢アメーバ原虫はPCRで淀川水系河川水25検体から検出された(定性的)。また、Sybergreenを用いた定量的RT-PCRではRNAが13検体から赤痢アメーバ原虫が検出された。

また、糞便による汚染の有無について、大腸菌群数を指標に検討した。

- 4) 淀川水系河川水100mlあたり、33~118,667 (1.2×10^5) cfuの大腸菌群数が検出された。検出される大腸菌群数は降水量と正の相関を示した。しかし、晴れの日でも、43,667 (4.4×10^4) cfuと比較的多い大腸菌群数が検出された日があった。

5. 今後の課題

- 1) 今回も、市販キットを用いたサイクリングプローブ法による定量的RT-PCRを行ったが、反応当初から蛍光強度が高く、反応液中に反応阻害物質の混入が考えられた。
阻害物質の除去については、今後の課題であると考えられた。
- 2) 今回も、水系感染症であるクリプトスポリジウム原虫、ジアルジア原虫及び赤痢アメーバ原虫の検出を試みたが、陽性や陰性の判定に困難を極めた。
検査キットやPCR用プライマーの特異性についての再検討が必要と考えられた。
- 3) 今回検査した3種類の原虫類は、大腸菌に比して比較的大型であることから、大腸菌よりも容易に下水処理水から除去でき、河川水の汚染を排除できるものと考えられた。
大腸菌群数を指標にすることで、これら原虫による河川水の汚染度を把握できるものと考えられた。
- 4) ただ、大腸菌群が0.1mg/l (0.1ppm)の塩素濃度で、5分ほどで死滅するのに対し

て、これら原虫は塩素消毒に比較的抵抗性を示すと考えられた。

このことから、下水処理法の改良が必要であり、塩素消毒の時間の延長が必要であると考えられた。

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・淀川水質機構なら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://www.nih.go.jp/niid/ja/survei/2085-idwr/ydata/6563-report-ja2015-30.html>
- 2) 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣 勲, 井関基弘:神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症, 感染症学雑誌, 70(2):132-140, 1995.
- 3) 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.
- 4) 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
- 5) 大西義博: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, 平成 26 年度水質保全研究助成成果報告書, pp10, 2015 年 3 月 http://www.byq.or.jp/josei/h26/seikahoukokusyo/03_seikahoukoku_oonishi.pdf
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 降水量, 気象庁のホームページのデータバンク, <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>
- 10) 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.

- 11) 大腸菌群数の一律排水基準，水・土壌・地盤・海洋環境の保全(環境省)，
<http://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html>