大容量の淀川水系河川水からの病原性原虫類の検出

平成29年3月22日

関西医療大学医療学部
大西義博・大瀧博文

はじめに

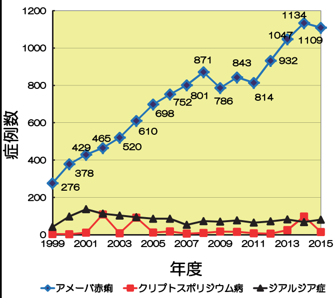
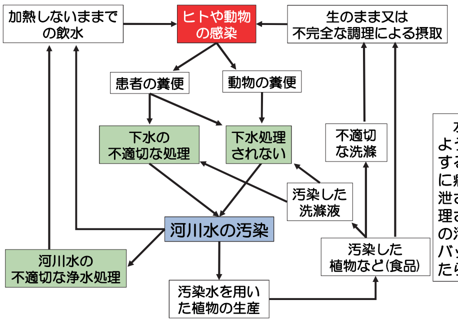


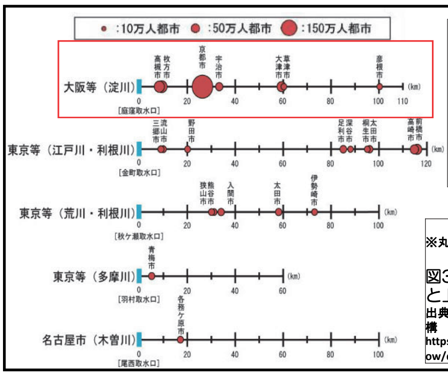
図1　赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症及びジアルジア症の年度別届出症例数

- 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、これら症例は届けられて、図1のように集計されている。
- 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1,000症例を越えている。
- 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)、1996年には埼玉県越生町(8812名)でアウトブレイクがあった。

図２　水系感染症の感染様式



水系感染症では、図２のように、ヒトや動物が感染すると、患者や動物の糞便に病原体が排泄される。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、フィードバック的に感染の拡大をもたらす。

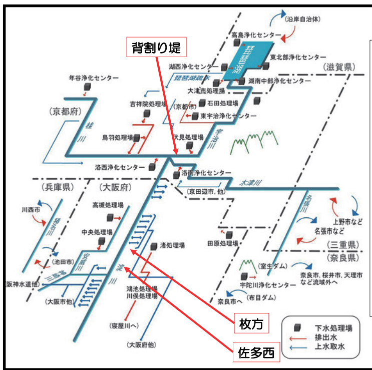


一方、淀川水系河川水は大阪府民の水道水の原水として利用されているが、図３のように、淀川の取水地点上流には約150万人の大都市である京都市があり、他の河川に比較して水道水の原水としては汚染リスクが高い状況にある。

※丸印面積は、人口規模に比例

図3　大都市の主要取水地点と上流都市の関係
出典：財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構
https://www.yodogawa.kkr.mlit.go.jp/know/data/problem/01/a.html

目的



平成25年度及び平成26年度に、淀川水系河川水から赤痢アメーバ原虫、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。しかしながら、検出に使用した河川水の量が2-5Lと少量であったことから、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、糞便による淀川水系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。

河川水の採取地点は図４に示した背割り堤地区（宇治川支流）、枚方地区（枚方大橋）及び佐多西地区である。

図4　琵琶湖・淀川水系の取排水のしくみ
出典：財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構
https://www.yodogawa.kkr.mlit.go.jp/know/data/problem/01/a.html

表１　検体の採取日、採集地点及び検体番号

採取日	採取地点	検体番号	採取日	採取地点	検体番号
2016年5月17日	背割堤	351	10月17日	背割堤	356
5月17日	枚方	51	10月17日	枚方	56
5月17日	佐太西	251	10月17日	佐太西	256
6月21日	背割堤	352	11月14日	背割堤	357
6月21日	枚方	52	11月14日	枚方	57
6月21日	佐太西	252	11月14日	佐太西	257
7月19日	背割堤	353	12月19日	背割堤	358
7月19日	枚方	53	12月19日	枚方	58
7月19日	佐太西	253	12月19日	佐太西	258
8月23日	背割堤	354	2017年1月14日	背割堤	359
8月23日	枚方	54	1月14日	枚方	59
8月23日	佐太西	254	1月14日	佐太西	259
9月26日	背割堤	355			
9月26日	枚方	55			
9月26日	佐太西	255			

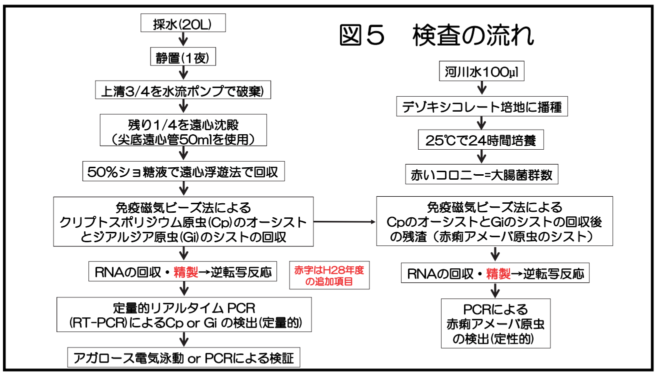


図５　検査の流れ

結果(1)クリプトスポリジウム原虫の検出

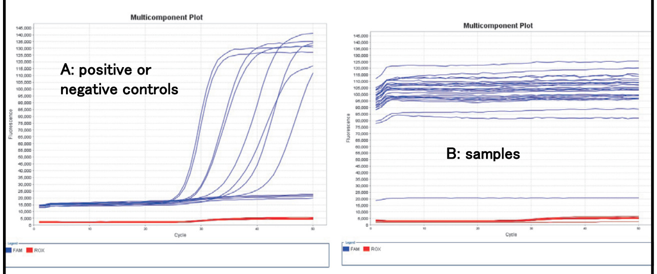


図６　定量的リアルタイム PCR(RT-PCR)による
クリプトスポリジウム原虫の検出

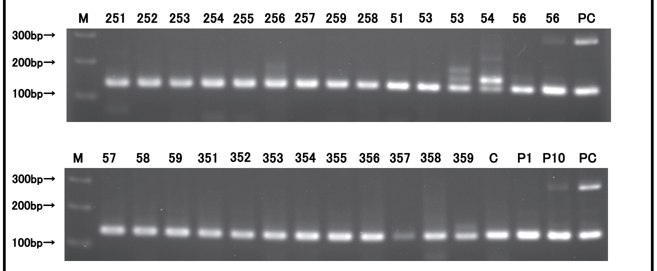


図７　クリプトスポリジウム原虫の検出：
RT-PCRの増幅産物をアガロース電気泳動

結果(2)ジアルジア原虫の検出

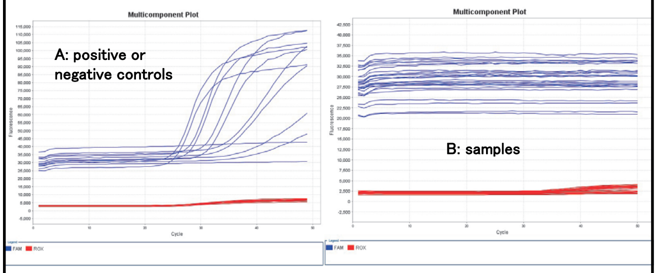


図８　定量的RT-PCR によるジアルジア原虫の検出

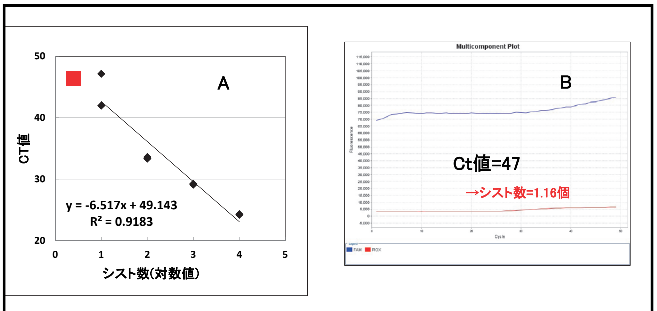


図９　ジアルジア原虫の検出
A: Positive control による標準曲線、 B: 検体番号No.351の反応曲線

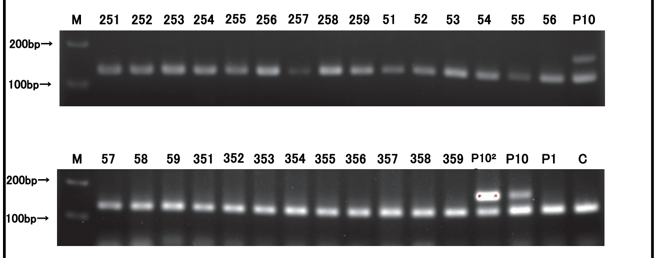


図10　ジアルジア原虫の検出：
RT-PCRの増幅産物のアガロース電気泳動

結果(3)アメーバ原虫の検出

結果：
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11　アメーバ原虫の検出(定性的)：
PCRの増幅産物のアガロース電気泳動

結果（４）大腸菌群数の検出

表２　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)
2016年				
5月17日	背割堤	351	60.5	58,333
5月17日	枚方	51	235.5	59,667
5月17日	佐太西	251	272.0	74,667
6月21日	背割堤	352	42.5	33,667
6月21日	枚方	52	150.0	118,667
6月21日	佐太西	252	174.5	34,000
7月19日	背割堤	353	0.5	9,333
7月19日	枚方	53	0.5	7,000
7月19日	佐太西	253	0.5	43,667
8月23日	背割堤	354	0.5	700
8月23日	枚方	54	1.0	1,633
8月23日	佐太西	254	1.0	900
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
10月17日	背割堤	356	59.0	54,667
10月17日	枚方	56	179.0	56,000
10月17日	佐太西	256	193.0	5,667
11月14日	背割堤	357	1.0	833
11月14日	枚方	57	2.5	2,933
11月14日	佐太西	257	2.5	1,467
12月19日	背割堤	358	0.5	2,567
12月19日	枚方	58	0.5	1,667
12月19日	佐太西	258	0.5	2,933
2017年				
1月14日	背割堤	359	0.5	33
1月14日	枚方	59	2.0	567
1月14日	佐太西	259	2.0	567

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）。

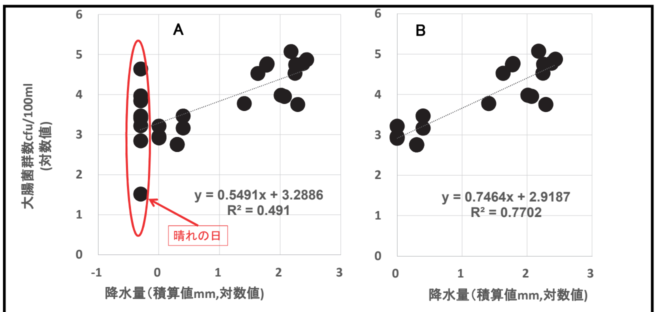


図12　検出した大腸菌群数と降水量との関係
A:　検査したすべての検査成績、B:　晴れの日を除いた時の検査成績、
晴れの日は便宜上、降水量を0.5mmとして計算した。

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。
  - クリプトスポリジウム原虫はサイクリングプローブ法を用いた定量的RT-PCRで検出されなかった。
  - ジアルジア原虫については、背割り堤(宇治川支流)から採取した淀川水系河川水No.351から1.16個のシストが定量的RT-PCRで検出された。
  - 赤痢アメーバ原虫が淀川水系河川水27検体中25検体からPCRで検出された(定性的)。
  - 現在、いずれの原虫の検出でもSybergreenを用いた定量的RT-PCRも検討中である。
- 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。
  - 淀川水系河川水100mlあたり、33～118,667cfu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。
  - 晴れの日でも、43,667cfuと比較的多い大腸菌群数が検出された日があった。

今後の課題

1．今回も、サイクリングプローブ法の定量的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。

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ついての再検討が必要と考えられる。

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る。
→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る。

4．ただ、大腸菌群が0.1mg/l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ている。
→このことから、下水処理法の改良が必要であると考えられ、塩素消毒の時間の延長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。

ご清聴ありがとうございました