

平成 12 年度水道クリプトスポリジウム及びジアルジア 汚染調査の概要

田栗利紹, 田中良徳

Investigation of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts and *Giardia lamblia* cysts in Nagasaki Prefecture, 2000

Toshitsugu TAGURI, Yoshinori TANAKA

Key word : *Cryptosporidium parvum* Oocysts , *Giardia lamblia* cysts , the oocysts recovery test

キーワード: クリプトスポリジウムオーシスト, ジアルジアシスト, オーシスト添加実験

はじめに

クリプトスポリジウム及びジアルジア(以下クリプトスポリジウム等と略記)感染症は、水道水を介してヒトに感染する疾病として知られているが、1996年に埼玉県で発生したアウトブレイクを契機として厚生省で定められた暫定対策指針に基づき、各地方自治体でも本疾病に対する対策が迫られてきた。本疾病の試験方法は「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」(以下暫定試験法と略記)によって通達されている^{1,2)}が、試験項目毎に数種類の試験方法が示されており、それらの選択は各試験機関に任せられている。従って、クリプトスポリジウム等試験を実施するに当たり、暫定試験法に示されている各試験方法の内容を検証選抜して、一律化した最適な試験システムを確立する必要がある。

今回、暫定試験法に標準的方法として示されている加圧ろ過法-密度勾配法-直接蛍光染色法の組み合わせ(以下標準法と略記)を選択してオーシスト添加実験を実施したが、当初の回収率は10%程度であったため、原因を追及するために試験システムの基礎的検討を行った。さらに県下の水道原水に対してクリプトスポリジウム等試験およびオーシスト添加実験を実施すると共に、理化学試験および指標微生物試験を実施して成績を比較検討したので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 試験システムの基礎的検討

本試験システムで回収率を減退させる要因を追求するために実施した予備試験の結果、オーシストの固定方法及び処理水残査が密度勾配法に与える要因が大きいことが推察された(成績未掲載)。従って両要因の密度勾配法に与える影響を実証するために次の試験を行った。なお添加実験はクリプトスポリジウムオーシストについてのみ行いジアルジアシストについては省略した。

(1)ホルマリン固定オーシスト(Aqua-Glo G/Cdirect FL 添付コントロール, Waterborne, Inc.)と熱処理後、重クロム酸カリ固定オーシスト(S 地衛研より分与)を用いた密度勾配法の添加回収試験。

濃度既知のオーシスト液を3mLPBS(リン酸緩衝生理食塩水, pH7.4)に懸濁して、percoll-シヨ糖液(比重1.10)およびシヨ糖液(比重1.2)で回収した後、2回回収液と残液を染色して回収オーシスト数とした。

(2)超音波負荷による密度勾配法のオーシスト添加実験。

長与川(図1)より採水し、予めクリプトスポリジウム等検査で陰性を証明した水道原水を試験に供した。試料を加圧ろ過法により処理した後、残査のPBS懸濁液3mLにホルマリン固定オーシストを適量添加した。超音波処理を行わないものはそのまま、行うものは500W超音波洗浄機(USC-26D, 旭テクノグラス)を用いて5分間処理した後、密度勾配法により回収した。

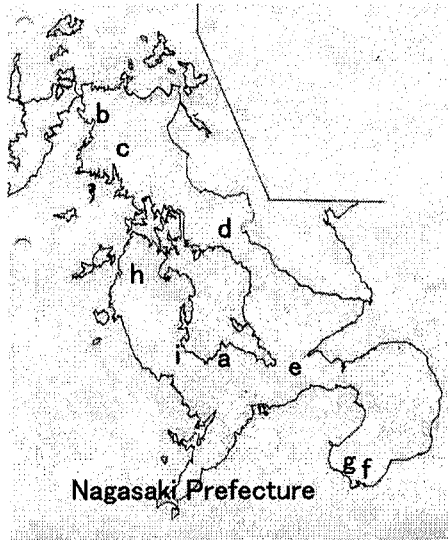
2 県下水道原水の水質調査およびクリプトスポリジ

ウム等汚染調査

県北、県央、県南および西彼保健所管内 9 地点 (図 1, a-i) の水道水用取水域から、採水時に気温、水温、pH および透視度を計測して、地点ごとに 2 試料 (1 試料 = 10L) 採水し、研究所に搬入した後浮遊物質量 (以下 SS と略記) を測定した。1 試料はクリプトスポリジウム等試験を実施し、1 試料は精度管理のためのオーシスト添加実験を行った。オーシス

ト添加実験は、1 試料につき 5L を用いて 2 回ずつ実施した。また指標微生物試験として糞便性大腸菌群、糞便性連鎖球菌および嫌気性芽胞菌の検査を実施した。

クリプトスポリジウム等試験およびオーシスト添加実験は前述の予備試験で検討した結果に基づいて改変した標準法に準拠し、理化学試験および微生物試験は上水試験法³⁾に準拠して実施した。



地点記号	採水量と試料数	市町村名	河川名	保健所名
a	10L×4	長与町	長与川	西彼
b	10L×2	江迎町	嘉例川	県北
c	10L×2	佐々町	佐々川	
d	10L×2	諫早市	小ヶ倉ダム	県央
e	10L×2	川棚町	川棚川	
f	10L×2	口之津町	与茂作川	県南
g	10L×2	加津佐町	津波見川	
h	10L×2	西海町	油ノ木川	西彼
i	10L×2	琴海町	西海川	
9地点	10L×20			

図 1 採水地点および河川名と採水試料数

結果

1 試験システムの基礎的検討

(1)ホルマリン固定オーシストを用いた場合の回収率は、2 回回収液が 78 ~ 87%、残液が 0.2%を示した。熱処理オーシストを用いた場合、2 回回収液が 8 ~ 22%で残液が 88 ~ 77%であった (表 1)。percoll-シヨ糖液 (比重 1.10) とシヨ糖液 (比重 1.2) の間には熱処理後固定したオーシストの回収率で若干差が認められたが、ホルマリン固定オーシストを使用した場合には差は認められなかった。

(2)原水を用いたオーシスト平均回収率は超音波

未処理時には 7.1%であったが、超音波処理時には 44.2%に上昇した (表 2)。

2 県下水道原水の水質調査およびクリプトスポリジウム等汚染調査

県下の水道原水を用いたクリプトスポリジウム等試験成績は全て陰性であった (表 3)。理化学試験のうち SS は、水道原水を用いた添加実験との関係において負の相関が認められた (P<0.01, 図 2)。他の 4 項目の理化学試験および 3 項目の微生物試験成績は添加実験との関係において有意な関係は認められなかった。

表 1 オーシスト固定方法別の密度勾配法回収率の比較

	ホルマリン固定オーシスト ^{*1} (添加量 422)		熱処理後重クロム酸塩 固定オーシスト ^{*2} (添加量 523)	
	2回回収液	残液	2回回収液	残液
percoll-シヨ糖液で (比重 1.10) で回収	87.5%	0.2%	8.0%	88.5%
シヨ糖液 (比重 1.2) で回収	78.4%	0.2%	22.1%	77.4%

※1: 市販キット添付, ※2: K地研分与

表2 超音波負荷による密度勾配法のオーシスト添加実験^{※1}

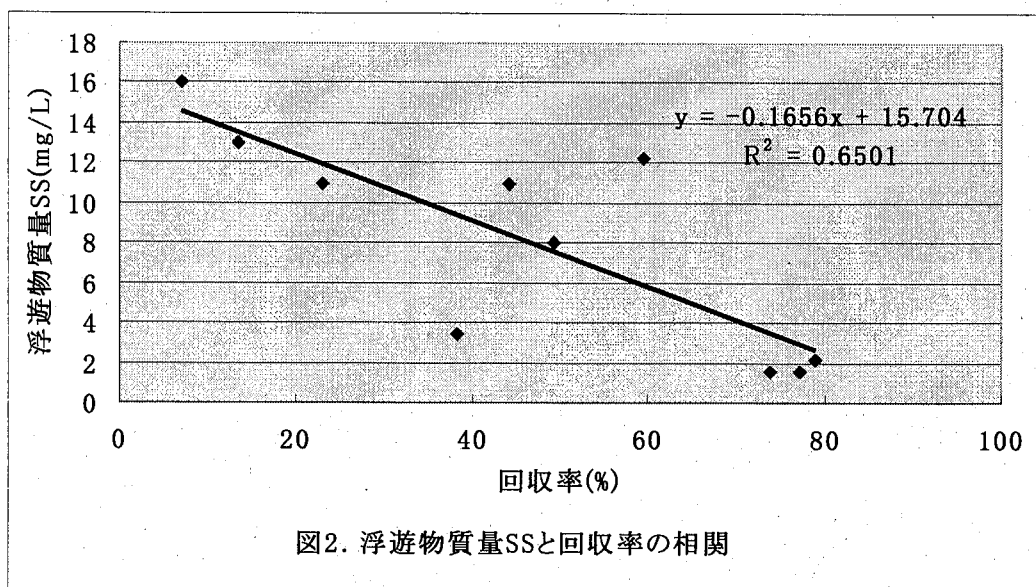
処理の有無	超音波未処理	超音波処理
1回目	5.10%	25.50%
2回目	9.10%	62.90%
平均	7.10%	44.20%
SS(mg/L) ^{※2}	9	11

※1:ホルマリン固定オーシスト使用, ※2:浮遊物質量

表3 クリプトスポリジウム等検査成績一覧

	a-1	a-2	b	c	d	e	f	g	h	i
採水月日	7/17	7/24	8/21	8/21	10/17	10/17	9/19	9/19	10/24	10/24
気温(°C)	37	30.5	28	28.8	21	24	23.3	23.2	24	26.2
水温(°C)	32	29.5	24.2	24.5	22.5	19	20.6	21.7	17.5	19.5
pH	8.4	8.2	7	7.2	7.2	7.5	7.2	7.3	7	6.8
透視度(cm)	50	38	50	30	50	50	50	50	50	40
SS(mg/L)	5	16	5	13	1.6	2.2	3.4	8	1.6	12.2
糞便性大腸菌群 (/dL) ^{※1}	NT ^{※3}	NT ^{※3}	0	1700	2	170	13	27	130	130
糞便性連鎖球菌 (/dL) ^{※1}	NT ^{※3}	NT ^{※3}	NT ^{※3}	NT ^{※3}	2	40	350	110	130	240
嫌気性芽胞菌 (/10ml) ^{※2}	NT ^{※3}	NT ^{※3}	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30
クリプトスポリジウム 検査	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
ジアルシア 検査	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
添加実験 平均回収率(%)	NT ^{※3}	NT ^{※3}	23.0	13.6	73.9	79.1	38.3	49.4	77.3	59.5

※1:MPN法, ※2:ウエルシュ菌パウチ法, ※3: not tested



考 察

暫定試験法に示されている精度管理のためのオーシスト添加実験にはオーシストの固定方法について言及されていない。オーシストの固定方法には感染力不活化を期待したホルマリン処理と熱処理がある。熱処理を加えるとオーシストの膜透過性が増すため核染色に用いる DAPI 染色に染まりやすくクリプトスポリジウム等試験の判定に有効であることが知られているが、今回の試験により熱処理をしたオーシストは密度勾配法には不適切であることが明らかとなった。また、暫定試験法には超音波処理がオーシスト回収率の改善に有効であることが明記されているが¹²⁾、今回の成績において 5 分間の超音波処理により回収率を改善できることが実証された。

今回の汚染調査において、全ての採水地点からクリプトスポリジウムおよびジアルジアは検出されなかった。しかし、今回示した SS とオーシスト回収率の関係から、汚濁が著しい水道原水を検査する場合には高い回収率を期待できないことが示唆され、予め汚濁の著しい河川や水源の掌握は応急検査の一助となると考えられた。これらのことから、継続したモニタリングの必要性が認められた。

クリプトスポリジウム等の汚染については、家畜やヒトの糞尿が汚染源になることはよく知られており、糞便性微生物の汚染指標としての役割が言及されてきた¹⁾。今回の調査では、クリプトスポリジウム等検査が全例陰性であり、水質検査でもあまり顕著な汚染は認められなかったため、指標としての有効性は証明できなかった。しかし、SS とオーシストの回収率の関係にも見られるように、水質の理化学検査データや糞便性微生物検査データは水系感染症の監視に重要な役割を果たしている。これらの検査体制の強化は、煩雑で高価なクリプトスポリジウム等検査の手間及び経費を節減し有効なモニタリング体制の強化につながると考える。

参 考 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知:水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法について, 衛水第 49 号, (1998)
- 2) 金子光美編:水道のクリプトスポリジウム対策, ぎょうせい, 50 ~ 77, (1999)
- 3) (社)日本水道協会:上水試験法, 502 ~ 517, (1993)

- 4) 小野一男他:河川水からの *Cryptosporidium* と *Giardia* の検出状況, 感染症誌, 75, 201 ~ 208, (2001)

