

県内河川のクリプトスポリジウム等の汚染実態調査 及び検査方法の検討

柳沼幸¹⁾ 山田光一¹⁾ 吉田加寿子¹⁾ 平澤恭子²⁾ 大野金男¹⁾

¹⁾ 理化学課 ²⁾ 微生物課

要 旨

水道水源に利用されている県内河川の上流域から採水し、クリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染実態を把握することを目的に調査を行った。24 箇所から採水し調査した結果、クリプトスポリジウムオーシストは未検出であったが、ジアルジアシストは 4 箇所から検出された。

また、濃縮操作を免疫磁気ビーズ法と密度勾配法の 2 法で検討した。ビーズ法、密度勾配法ともに回収率が大きく変動し、統計的に有意な差は見られなかったが、密度勾配法の方が操作が容易であるとともに費用面での負担が少なかった。

キーワード：クリプトスポリジウム、ジアルジア、免疫磁気ビーズ法、密度勾配法

はじめに

クリプトスポリジウムおよびジアルジアは人畜共通の寄生性原虫で、経口感染により下痢や腹痛などの症状を引き起こす。嚢子の状態であるクリプトスポリジウムオーシスト及びジアルジアシストは、塩素処理に対する耐性が高く、また、1～数 10 個の少ない数で感染するため、浄水処理には十分な注意が必要とされている。そこで、水道水源に利用されている県内河川の上流部より採水し、クリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染実態を把握することを目的に調査を行った。また、今回、併せてオーシスト及びシストの濃縮方法の免疫磁気ビーズ法（以下、“ビーズ法”とする）と密度勾配法の 2 法について比較、検討を行った。

材 料

水道水源に利用している県内河川の上流域を調査対象とし、24 箇所から採水した。

濃縮方法の検討には、水道水 10L に陽性コントロール（Color Seed™（BTF 社製））を添加し、材料とした。

方 法

汚染実態調査におけるクリプトスポリジウムオーシスト（以下“クリプトスポリジウム”とする）及びジアルジアシスト（以下“

ジアルジア”とする）の検出は、「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査法について」¹⁾ で示されている方法に基づいて行った。検水量は 10L とした。

検水の濃縮にはビーズ法と密度勾配法の両者を用いた。ビーズ法は親水性 PTFE 製メンブレンフィルター法で濃縮し、免疫磁気ビーズ（Dynabeads GC-Combo, Dynal 社製）を用いて精製液を作成した。密度勾配法はメンブレンフィルター吸引ろ過アセトン溶解法

表 1 判定表

		クリプト スポリジウム	ジアルジア
蛍 光 像	B 励起	緑色蛍光（壁が特に濃い）	
	G 励起	赤色蛍光発色なし (珪藻と ColorSeed は赤色蛍光発色あり)	
	U 励起	核のみ青色蛍光	
	大きさ	3.5～6.5	8～18
	形	類円形	卵円形
	核	1～4	1～4
	その他 特徴	縫合線	/
微 分 干 渉 像	内 部 構 造	スポロゾイト	軸策
		残体	曲刺
		顆粒	核
		/	中央小体
		/	鞭毛

で濃縮し、Percoll-シヨ糖液を用いて精製液を作成した。その後、それらの精製液に直接蛍光抗体染色 (EasyStain, BTF 社製) および DAPI 染色を行った。染色後、表 1 に従い蛍光像と微分干渉像から、クリプトスポリジウム及びジアルジアの陽性の判定を行った。また、大腸菌最確数、濁度、全有機炭素 (以下"TOC" とする)、pH をクリプトスポリジウム等の汚染指標として、併せて測定を行った。

濃縮方法の検討では、汚染実態調査と同様の方法で陽性コントロールの添加回収試験を複数回実施し、回収率について検討した。

結果及び考察

表 2 に汚染実態調査の結果を示す。クリプトスポリジウムは 24 箇所すべての箇所において検出されなかった。ジアルジアは会津美里町の氷玉川、南会津町の館岩川支流、船引町の大滝根川、須賀川市の釈迦堂川の 4 箇所から検出された。図 1～4 に館岩川支流で検出されたジアルジアの写真を示す。大きさは長径 14.9 μ m、短径 10.7 μ m であった。蛍光像 (図 1, 2) では特異の緑色蛍光があり、核が 2 個確認された。微分干渉像 (図 3, 4) では、核、軸策、曲刺が確認された。

ジアルジア属は家畜類・げっ歯類・爬虫類

表 2 汚染実態調査結果

No	採水地点	市町村名	検出数 (/10L)				大腸菌 (/100ml)	濁度 (度)	TOC (mg/L)	pH
			ビーズ法		密度勾配法					
			クリプト スポリジウム	ジアルジア	クリプト スポリジウム	ジアルジア				
1	摺上川ダム	福島市	(-)	(-)	(-)	(-)	2.0	3.9	1.4	7.2
2	布入川	福島市	(-)	(-)	(-)	(-)	8.0	0.2	0.9	7.5
3	大滝根川	三春町	(-)	(-)	(-)	(-)	2.3 $\times 10^3$	2.1	1.7	7.9
4	左支夏井川	小野町	(-)	(-)	(-)	(-)	1.7 $\times 10^2$	1.1	1.5	7.3
5	笠松ダム	須賀川市	(-)	(-)	(-)	(-)	2.0	3.1	2.3	7.8
6	油井川	二本松市	(-)	(-)	(-)	(-)	1.3 $\times 10^2$	0.9	3.0	7.0
7	高根川	川俣町	(-)	(-)	(-)	(-)	1.1 $\times 10$	0.7	1.3	7.4
8	広瀬川支流	川俣町	(-)	(-)	(-)	(-)	3.3 $\times 10$	1.0	0.9	6.9
9	真野ダム	相馬市	(-)	(-)	(-)	(-)	2.0	2.8	2.3	8.2
10	沢川	古殿町	(-)	(-)	(-)	(-)	<1.8	0.6	1.1	7.4
11	中野川	西会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	1.3 $\times 10$	0.7	1.2	7.2
12	宮古川	山都町	(-)	(-)	(-)	(-)	<1.8	0.4	0.8	7.2
13	氷玉川	会津美里町	(-)	1	(-)	(-)	4.5	0.8	0.6	7.4
14	茗荷川	西会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	3.1 $\times 10$	6.6	1.6	7.3
15	阿賀川支流	南会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	4.5	<0.1	1.2	7.0
16	田島ダム入り口高野川	南会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	4.5	<0.1	1.7	7.2
17	伊南川支流	南会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	2.3 $\times 10^3$	1.3	3.2	7.3
18	八木ノ岐川	南会津町	(-)	(-)	(-)	(-)	4.0 $\times 10^2$	0.4	4.7	6.9
19	館岩川支流	南会津町	(-)	10	(-)	56	7.8	0.2	2.9	6.9
20	堀川ダム	白河市	(-)	(-)	(-)	(-)	2.0	0.9	2.5	7.2
21	大滝根川	船引町	(-)	51	(-)	11	3.1 $\times 10^4$	7.8	1.9	7.5
22	釈迦堂川	須賀川市	(-)	5	(-)	3	2.2 $\times 10^3$	1.1	1.8	7.6
23	五百川	本宮町	(-)	(-)	(-)	(-)	4.9 $\times 10^4$	1.4	2.2	7.1
24	阿武隈川支流	桑折町	(-)	(-)	(-)	(-)	3.3 $\times 10$	1.7	3.6	7.4

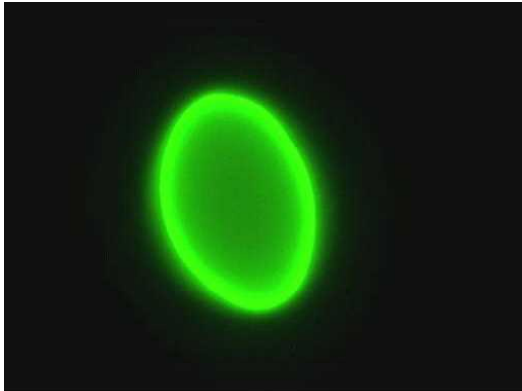


図1 蛍光像1

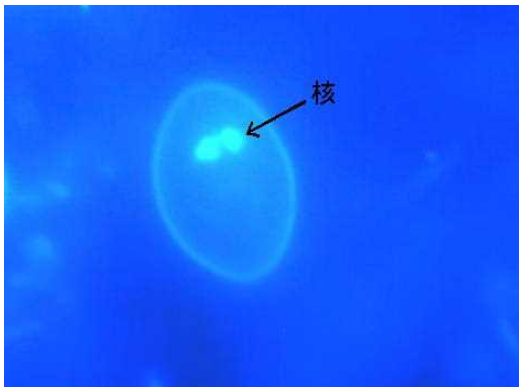


図2 蛍光像2



図3 微分干渉像1



図4 微分干渉像2

など、多くの動物を宿主としている。そのため、今回検出されたジアルジアは、野生動物の糞便由来の可能性が高いのではないかと考えられた。また、採水場所よりさらに上流に民家や畜産施設がある場所もあり、排水によって汚染された可能性も考えられた。

汚染指標の測定では、ジアルジアが検出された4箇所、大腸菌が4.5/100mlから 3.1×10^4 /100ml検出された。しかし、24箇所中大腸菌が最も高かった河川からジアルジアは検出されず、大腸菌の汚染度合とジアルジアの検出について、関連性は認められなかった。また、濁度は、2度を超えた箇所が、24箇所中6箇所あった。7.8度と最も高値を示した河川からは、ジアルジアが検出された。

TOCは、3mg/Lを超えた箇所が、24箇所中4箇所、その中でジアルジアが検出された箇所はなかった。これらの結果から、クリプトスポリジウム等の汚染と河川の汚染について関連性は見いだせなかった。しかし、河川の汚染度合を知ることにより、夾雑物の量を把握することができ、濾過・濃縮作業の補助と

なった。また、水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針²⁾の中で、原水から指標菌が検出されている場合は、クリプトスポリジ

表3 回収試験結果

No	ビーズ法 (%)		密度勾配法 (%)	
	C	G	C	G
1	35	26	36	22
2	63	35	0	6
3	17	0	36	22
4	20	72	65	95
5	1	6	25	45
6	0	20	51	52
7	0	33	51	71
8	6	28	43	64
9	25	35		
平均	18.6	28.3	38.4	47.1
SD	20.8	20.6	19.7	29.6
CV	111.9	72.7	51.3	62.8

*C：クリプトスポリジウムオーシスト

G：ジアルジアシスト

ウム等による汚染の可能性が高いと判断されているため、クリプトスポリジウム等の検査を行う際は、併せて測定することが望ましいと考えられた。

表3に濃縮方法の比較検討のため添加回収試験を行った結果を示す。ビーズ法並びに密度勾配法のどちらの濃縮方法でも、回収率は大きく変動し、安定した成績は得られなかった。密度勾配法の方が平均回収率は高かったが、統計的に有意な差ではなかった。

回収率の変動が大きかった原因について、河川水に含まれる夾雑物が関係していると考え、河川水と水道水にジアルジアを添加して比較検討した。結果を表4に示す。いずれの測定結果でも、安定した回収率は得られなかった。また、試薬や採水容器等を変えて行った添加回収試験の検討でも、回収率の向上は得られず、変動係数が大きい原因は明らかにできなかった。オーシスト（シスト）の計数は個人差があるとの報告もあり³⁾、技術的に非常に難しいことが、要因のひとつとも考えられた。

表4 添加水を変えた回収率結果

		ジアルジアシスト (%)	平均	SD	CV
河川水	密度勾配法	4	8.0	5.7	70.7
		12			
	ビーズ法	12	10.5	2.1	20.2
		9			
水道水	密度勾配法	8	17.5	13.4	76.8
		27			
	ビーズ法	52	52.0	0.0	0.0
		52			

操作の簡便性や費用面を比較してみると、ビーズ法は、精製液量が少ないため、顕微鏡観察を短時間で終わらせることができた。しかし、ビーズ法は操作が煩雑で、時間と熟練を要する上に、特定の試薬や機材が必要となり、費用面での負担が大きかった。密度勾配法は、精製液量が多くなるため、染色液を多量に使用し、顕微鏡での観察時間も長時間要した。しかし、ビーズ法と比較すると費用面での負担は少なく、操作も容易であった。

まとめ

今回の調査では、24箇所中4箇所の河川からジアルジアシストを検出した。

濃縮方法は、ビーズ法と密度勾配法ともに変動が大きく、回収率に統計的な優位差は認められなかったが、密度勾配法の方が、操作が容易であり費用面の負担が少なかった。

謝辞

今回の調査にあたり、採水にご協力くださいました、各市町村の水道担当者様、並びにご助言いただきました、国立感染症研究所の泉山信司先生に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省健康局水道課長通知。水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について。健水発第0330006号，平成19年3月30日。
- 2) 厚生労働省健康局水道課長通知。水道水中のクリプトスポリジウム等対策の実施について。健水発第0330005号，平成19年3月30日。
- 3) 日本水道協会。クリプトスポリジウムー解説と検査法ー