

河川水及び牛等の糞便における クリプトスポリジウム汚染状況調査

松本 一繁・影山 温子・西山 泰彦・松本 道明・安藤 徹

About the cryptosporidium pollution in the river water,
The feces of Cattle, Porcine

Kazushige MATSUMOTO, Atsuko KAGEYAMA, Yasuhiko NISHIYAMA,
Michiaki MATSUMOTO, Tooru ANDOU

【要旨】 クリプトスポリジウムはヒトをはじめとする脊椎動物寄生する原虫であり、経口的に感染して激しい水様性の下痢を発症することが知られている。また上水道で主に使用される次亜塩素酸ナトリウムに高度耐性であるため、水道の衛生管理上重要な病原体である。高知県では平成10年に石井らがクリプトスポリジウムの汚染実態調査を行っているが¹⁾、それ以外の調査報告はない。今回高知県内の5河川6地点を複数回調査したがクリプトスポリジウムは検出されなかった。しかしながら糞便性指標として用いられる大腸菌群、連鎖球菌、クロストリジウム属菌が検出されており、今回調査した河川の表流水を上水道の水源とする場合は汚染対策が必要である²⁾。

また、とちく場だとさつされた牛41頭、肥育豚117頭、親豚83頭の直腸便についてPCR法によるクリプトスポリジウム検出を試みたが検出されなかった。クリプトスポリジウムは流域人口ではなく飼育頭数に影響を受けることから³⁾、水源となる河川については定期的なモニタリングが必要である。

Key words : Cryptosporidium, Giardia, River water, Cattle, Porcine

I はじめに

クリプトスポリジウムは孢子虫類に属し、ヒトをはじめとする脊椎動物寄生する原虫である。経口的に感染すると消化管粘膜上皮細胞で増殖し、増殖に伴う激しい水様性の下痢を発症するため、抵抗力の弱い乳幼児、高齢者、免疫不全者にとって非常に危険な感染症となる。また、原虫の嚢子は強固で、次亜塩素酸ナトリウムをはじめとする消毒薬に強く耐性を持っており、水道を汚染すると被害規模が大きく、1992年米国オレゴン州ジャクソンカウンティ（患者数15,000人）や1993年の米国ウィスコンシン州ミルウォーキーにおける水道汚染事故（患者数403,000人）が世界的にも大規模な事例として知られている⁴⁾。日本でも神奈川県平塚市において受水槽への汚水による汚染事例（患者数461人）や埼玉県越生町における水道汚染事例（患者数8,800人）が報告されており⁴⁾、クリプトスポリ

ジウムが上水道の衛生管理上重要な病原体として対策が強化された。また、多くの汚染実態調査により河川にクリプトスポリジウムが存在することを多数報告している³⁾⁴⁾。高知県では平成11年に当所が実施したがクリプトスポリジウムは検出されなかった¹⁾。今回県内の河川及び動物の糞便においてクリプトスポリジウム汚染実態調査を改めて行ったので報告する。

II 材料および方法

高知県が水質汚濁防止法に基づく毎年策定する公共用水域及び地下水の水質測定計画⁵⁾において採水地点として指定される河川水域から、土佐湾東部関連水域（奈半利川、安芸川）、物部川水域、四万十川水域（東又川、仁井田川）の5河川6地点で複数回採水した。検査項目は採水時の気温、水温、pH、電気伝導率、濁度、溶存酸素量、全有機炭素量、糞便性大腸菌群、

糞便性連鎖球菌、クロストリジウム属菌、クリプトスポリジウム、ジアルジアについて計測、検査した。

検査方法は気温はアルコール温度計、水温およびpH、電気伝導率は電極法、濁度は660nm透過光測定法、溶存酸素量はウィンクラー・アジ化ナトリウム変法、全有機炭素量は非分散型赤外線分析法により行った。糞便性大腸菌群は検体100mlを0.45 μ m孔径45mm径のメンブレンフィルターでろ過し、M-FC寒天培地にのせ、44.5 \pm 0.2 $^{\circ}$ Cで24 \pm 2時間、恒温水槽で培養後、青色コロニー数を計測した⁶⁾。糞便性連鎖球菌は糞便性大腸菌と同様にろ過したのち、M-エンテロコッカス寒天培地にのせ、36 \pm 1 $^{\circ}$ Cで48 \pm 3時間培養後、薄赤から暗赤色のコロニーを計測した⁶⁾。クロストリジウム属菌は1.63倍濃度ハンドフォード培地に10ml検体を接種後、恒温水槽で45 \pm 0.5 $^{\circ}$ C、24 \pm 2時間培養し、直径1mm以上の黒色コロニーを計測した⁶⁾。

クリプトスポリジウムおよびジアルジアは採水地点で採水した20Lの検水を平成19年3月30日発健水発第0330006号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」に記載されたメンブレンフィルター吸引ろ過アセトン溶解法による濃縮、EasyStain（和光純薬）による直接蛍光抗体法による検出を行った²⁾。濁度の高い検体において蛍光抗体法による観察が難しい検体についてはアセトン濃縮時の一部をDNA minikit (QIAGEN) で抽出後、表1のPCR溶液及び反応温度によるPCR法によりスクリーニングを行った⁷⁾。

動物の糞便は牛と豚について実施した。牛は平成22年10月から平成23年10月までに高知県広域食肉センターでとさつされた牛41頭の直腸便を採取し、PBS (-) 10%乳剤を検体とした。豚は平成24年6月から25年3月までに四万十市営食肉センターでとさつされた肥育豚117頭、高知県広域食肉センターでとさつされた親豚83頭の直腸便を10%乳剤とし、5頭をひとまとめの検体とした。検体はDNA mini kit (QIAGEN) で抽出後、表1のPCR溶液及び反応温度によるPCR法によりクリプトスポリジウムの有無を検査した⁷⁾。

表1 PCR溶液の調整及び反応条件

	(μ l)	temp	time	cycle
ABI AmpliTaq Gold Master Mix	12.5	95 $^{\circ}$ C	10:00	
CPB-DIAG F-primer(25uM)	0.5	94 $^{\circ}$ C	0:30	
CPB-DIAG R-primer(25uM)	0.5	55 $^{\circ}$ C	0:30	x 40
DW	6.5	72 $^{\circ}$ C	1:00	
Mixture Total	20	72 $^{\circ}$ C	7:00	
Template DNA	5	4 $^{\circ}$ C	hold	

III 結 果

河川水は表2のとおりであった。糞便性大腸菌及び連鎖球菌は大きくばらついているものの検査した河川すべてで検出された。クロストリジウム属菌は安芸川、奈半利川で未検出、そのほかの河川ではわずかに検出された。また河川水の理化学的な測定項目で特に問題となる項目は見られなかった。

牛及び豚の便からクリプトスポリジウム遺伝子は検出されなかった(表3)。

表2 河川及び採水地点とその測定結果

採水地点	採水日	気温(°C)	水温(°C)	pH	電気伝導率(mS/m)	濁度(度)	溶存酸素量(mg/l)	全有機炭素(mg/l)	クロストリジウム属(cfu/10ml)	大腸菌群(cfu/100ml)	連鎖球菌(cfu/100ml)	クリプトスポリジウム(個/200)	ジアルジア(個/200)	
仁井田川 根々崎	H23.12.26	4.0	4.6	8.1	9.3	4.0	13.1	0.5	3.50	70	45	0	0	
	H24.1.12	5.0	7.0	8.0	9.7	1.7	13.1	1.0	1.00	57	3	0	0	
	H24.8.20	27.8	23.8	8.4	7.1	3.6	7.4	1.8	-	>100	>100	0	0	
東又川 奈路	H23.12.26	5.0	7.0	7.2	6.9	0.5	11.2	0.5	0.00	3	64	0	0	
	H24.1.12	6.0	7.7	7.2	7.0	0.7	10.6	0.8	0.33	4	55	0	0	
	H24.8.20	27.0	23.2	8.0	6.9	2.7	7.4	1.9	-	>100	>100	0	0	
安芸川 榑ノ木橋	H24.3.22	14.0	11.2	8.4	8.3	0.1	11.5	0.3	0.00	2	4	0	0	
	H24.3.29	15.5	12.2	7.3	8.2	0.3	11.8	欠測	0.00	2	3	0	0	
奈半利川 奈半利堰	H24.3.22	19.0	13.0	8.3	6.1	0.5	11.1	0.3	0.00	0	1	0	0	
	H24.3.29	16.0	13.1	7.2	5.9	0.8	11.3	欠測	0.00	3	1	0	0	
物部川	大橋	H24.1.19	7.0	7.3	8.3	12.4	1.8	10.5	0.3	0.67	1	0	0	0
		H24.3.15	10.0	9.5	8.5	10.1	3.0	11.4	0.6	0.00	8	11	0	0
		H24.5.18	23.0	18.2	8.9	10.3	1.2	9.3	0.4	0.33	2	2	0	0
	晩美橋	H24.1.19	8.5	7.5	8.4	13.9	1.8	10.5	0.3	0.67	33	4	0	0
		H24.3.15	9.0	8.8	8.3	10.5	1.3	11.0	0.4	0.33	71	8	0	0
		H24.5.18	21.5	18.8	9.1	10.8	3.2	9.5	1.1	0.33	23	23	0	0

表3 牛と豚におけるクリプトスポリジウム検出状況

牛	褐毛和種	0 / 21
	黒毛和種	0 / 6
	交雑種	0 / 14
	計	0 / 41
豚	肥育豚	0 / 117
	親豚	0 / 83
	計	0 / 200

IV 考 察

クリプトスポリジウムはヒトをはじめとする脊椎動物寄生する原虫であり、経口的に感染して激しい水様性の下痢を発症することが知られている。また上水道で主に使用される次亜塩素酸ナトリウムに高度耐性であるため、水道でクリプトスポリジウム汚染があると水道事業の一時停止など影響が大きく、国外での大規模な集団感染事例や国内の上水道汚染事例があるため⁴⁾、衛生管理上重要な病原体である。高知県では平成10年に石井らがクリプトスポリジウムの汚染実態調査を行っているが¹⁾、それ以外の調査報告はない。

今回、河川水を複数回検査したが検出されなかった。しかしながら糞便性指標として用いられる大腸菌群、連鎖球菌、クロストリジウム属菌が検出されており、平成19年3月30日付け健水発第0330006号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」で記載されているように今回調査した河川の表流水を上水道の水源とする場合は汚染対策が必要である²⁾。

動物での感染は主に1カ月齢未満の仔牛に多く月齢が上昇するに従って感染率が低下する⁸⁾。豚ではコクシジウムなど他の病原体とともに重感染することが発症要因となる可能性が示唆されている⁹⁾。クリプトスポリジウムは感染後、発症により大量の嚢子を便に排出するため、下痢を呈している動物はリスクが高い。今回クリプトスポリジウムは健康な牛、豚の便から検出されなかったが、検出率は動物の飼育頭数に影響を受けるといわれていることから³⁾、今後も定期的なモニタリングが必要である。

IV 文 献

- 1) 石井隆夫ら：高知県内の河川及びダム湖におけるクリプトスポリジウム汚染の有無に関する調査、高知衛研報, 45, 85-88, 1999
- 2) 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、平成19年3月30日付け健水発第0330006号厚生労働省健康局水道課長通知
- 3) 小野一男ら：河川水からの*Cryptosporidium*と*Giardia*の検出状況、感染症学雑誌, 75, 201-208, 2001
- 4) 保坂三継：クリプトスポリジウムとジアルジアによる水環境及び水道水の汚染、東京都健康安全研究センター年報, 57, 31-42, 2006
- 5) 公共用水域及び地下水の水質測定計画：<http://www.pref.kochi.lg.jp/soshiki/030801/mizu-houkokusho.html>
- 6) 日本水道協会：糞便性指標，上水試験法（2001年改訂），610-638, 2001
- 7) 遠藤卓郎ら：クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル，2003
- 8) 泉山信司ら：家畜およびと畜場搬入動物等のクリプトスポリジウム汚染実態調査、動物の原虫病, 1618-23, 2001
- 9) 勝田賢ら：ふぐ抗感染症としての豚下痢症の実態解明、動衛研研究報告, 111, 21-27, 2005