

秋田県の主要河川等におけるクリプトスポリジウム及び ジアルジアの検出状況について

遠藤 守保 鈴木 陽子 笹嶋 肇 齊藤志保子 佐藤 宏康

1997年11月から2000年3月まで県内主要河川等の水道水源について、クリプトスポリジウム及びジアルジアについての実態調査を実施した。また、検査法にも検討を加えた。その結果クリプトスポリジウム（確定）は1998年に1検体、1999年に2検体、2000年に1検体、合計4検体2河川から検出した。ジアルジア（確定）も2河川から1999年に1検体、2000年に1検体、合計2検体検出した。

キーワード：クリプトスポリジウム、ジアルジア、水道水源

I. はじめに

クリプトスポリジウムは、マウス腸管に寄生する胞子虫綱コクシジウム類に属する新種の腸管寄生原虫として1912年に¹⁾また、人に感染した初めての事例は1976年にそれぞれ報告された²⁾。その後、免疫不全患者に感染すれば死の転帰をたどる恐ろしい人畜共通感染原虫であることが判明し、さらに塩素消毒に対しては大腸菌の69万倍の強い抵抗力を持ち、通常の塩素消毒では効果がなく、なおかつ、1個のオーシストを経口摂取しても発症する強い感染力を有し、健康者にも感染することが明らかとなり、1983年頃からは英国や米国において、水道水による集団感染が報告されている³⁾。

我が国でも、埼玉県などで⁴⁾集団感染の発生が見られたことから、国は環境水中のクリプトスポリジウムなどの全国的な実態調査を行った⁵⁾。その結果、県内では雄物川水道水源（豊岩）及びその近傍からも検出された。この結果をうけ、県環境衛生課（現生活衛生課）が中心となり、クリプトスポリジウム及びジアルジアの水道水汚染による感染を未然に防止し、水道施設の浄水方法など今後の検討に資するため、県内の主要河川等、比較的大規模に取水（一日最大給水量1000m³/日程度以上）している水道水源25地点を対象として、クリプトスポリジウム及びジアルジアの実態調査を行った。また、検査方法についても若干の検討を行ったのでその概要を報告する。

II. 調査期間、調査地点、使用器材及び検査方法

1. 調査期間

1997年11月から2000年3月まで、年2～3回

2. 調査地点

県内の25地点（県北部7地点、県中央部12地点、県

南部6地点）を調査した（表－1）。検体総数は175検体である。

表1 調査地点及び水源区分

	No.	調 査 地 点	区 分
県 北 部	1	大館市上水道米代川水源	表流水
	2	比内町上水道米代川水源	表流水
	3	鹿角市上水道米代川水源	表流水
	4	鹿角市上水道大楽前沢川水源	表流水
	5	能代市上水道米代川水源	表流水
	6	八森町観海簡易水道水源	表流水
	7	峰浜村沢目簡易水道水源	表流水
県 中 央 部	8	秋田市上水道雄物川水源（仁井田）	表流水
	9	秋田市上水道雄物川水源（豊岩）	表流水
	10	雄和町上水道雄物川水源	表流水
	11	男鹿市上水道馬場目川水源	表流水
	12	大瀧村簡易水道水源	表流水
	13	五城目町上水道馬場目川水源	表流水
	14	井川町上水道井川ダム	表流水
	15	八郎潟町上水道馬場目川水源	表流水
	16	本荘市上水道黒森貯水池	表流水
	17	本荘市上水道子吉川水源	表流水
	18	矢島町上水道金井川堰水源	表流水
	19	象潟町上水道鳥越岩股金山川水源	表流水
県 南 部	20	大曲市上水道雄物川水源	表流水
	21	西仙北町刈和野簡易水道水源	表流水
	22	角館町上水道松木内川水源	表流水
	23	田沢湖町上水道生保内川水源	表流水
	24	横手市上水道横手川水源（上内町）	表流水
	25	横手市上水道横手川水源（大沢）	表流水

3. 使用器材

- 1) 滅菌スポイト3号(栄研機材)(EK-4177)
- 2) 遠心管(ポリプロピレン製)(住友)(MS-56500)
- 3) 遠心管(ポリプロピレン製)(住友)(MS-56150)
- 4) メンブランフィルターセルロースエステル(アドバンテック)(H100A 047A)
- 5) 親水性PTFEフィルター(アドバンテック)(H100A 025A)
- 6) メンブランフィルター(アドバンテック)(H100A 025A)
- 7) ハイドロフルオール・コンボ(100)(関東化学)
- 8) 水系封入剤:DABCO (1,4-diazabicyclo2,2,2octane)を2%の割合で10%リン酸緩衝ホルマリン液に添加する。
- 9) ミュークマルチパーパスコート
- 10) PBS原液:NaCl 80.0g+KCl 2.0g+Na₂HPO₄ 29.0g+KH₂PO₄ 2.0g/ℓ、これを使用時10倍にする。

4. 検査方法

採水は水源区域を担当する保健所の環境公害担当職員が、現地で10ℓ入りポリビン2本に採水後当所に搬入したもののうちの1本を検査に使用した。なお、吸引ろ過は搬入された翌日から行った。また、検査方法は国立感染症研究所の希少感染症診断技術研修会、水道技術研究センターの講習会、埼玉県衛生研究所及び山形県衛生研究所で行った技術研修資料で研修を受けた検査方法の長所を組み合わせた検査方法で実施した(表-2)。

III. 結果と考察

1. クリプトスポリジウム(確定)は、県中央部で84検体中4検体から検出された。県北、県南部では検出されなかった(表-3)。検出された雄物川は全長129.8kmの1級河川であり、馬場目川は秋田県南秋田郡五城目町馬場目字盆地地先北の又沢合流点に端を発する全長47.518kmの2級河川である。

表3 クリプトスポリジウム検出水源

検出年	水 源 名	水源区分
1998	秋田市上水道雄物川水源(豊岩)	表流水
1999	雄和町上水道雄物川水源	表流水
1999	五城目上水道馬場目川水源	表流水
2000	雄和町上水道雄物川水源	表流水

表2 環境水の検査方法

1. 採水
水道水は40ℓ、河川水は10ℓ、容器は未使用のもの。
2. 吸引ろ過
孔径1μm、口径47mmのセルロースエステルのフィルターを用いて減圧ろ過。
3. フィルターからの抽出
メンブランフィルターを50ml遠心管(ポリプロピレン製)に入れ、アセトン40mlを加えて良く手で振りフィルターを溶解後、2500rpmで5分間の遠心分離し上清液を取る。これを3回繰り返す。
4. アルコール置換
沈査の入っている遠心管に、95%エチルアルコール5mlを加えて軽く振とうし、さらにPBS5mlを加える。少し時間をおいてPBS5mlを加え、よく混合してからPBS5mlを加える。さらに良く混合してからPBS10mlを加える。最後にPBSで40mlにする。遠心分離後、上清をキャピラリーで吸引除去する。
5. ショ糖浮遊法準備
15mlの滅菌遠心管にPBS2mlを加え、栓をして激しく振り管壁を湿らせておく。次にあらかじめ内壁をPBSで湿らせたポリピペットで、アルコール置換した沈査を15mlの遠心管に移す。次に沈査を取ったあとの遠心管にPBS4ml加え、管壁を洗浄し、洗浄液を15mlの遠心管に移す。この操作を繰り返して最後にPBSで14mlにメスアップする。遠心分離後上清を吸引除去する。ただし残液量は2mlとする。
6. ショ糖浮遊法
PBS20mlを50ml遠心管に取る。又PBSをビーカーに入れ、この中にスポイトを入れ管壁を湿らせておく(以下すべてこのスポイトを使用した)。次に、PBS約1mlを吸ったスポイトで沈査を浮遊させた後PBSを吹き出す。ボルテックスで懸濁(7mlの目盛りの範囲内で行う)次に約2mlのPBSを滴下しながら管壁を洗い流し、全量を5mlとする。比重1.2のショ糖液約2mlを水層の下に界面を乱さないように注入する。遠心分離後、水槽(最上層)、界面のフラッフ層(中間層)及びショ糖層(下部)の上部を、あらかじめPBS20mlを入れた50ml遠心管に回収する。残量は3mlとする次に、上層にある液をスポイトで吸い上げ(約0.5ml)そのスポイトで沈査を浮遊させた後、液を吹き出す。この操作を3回繰り返す。回収した液層を遠心分離し、上清をピペットで吸引して捨てる。ただし、残液量は5mlとする。次に沈査をPBSで共洗いしながら、あらかじめPBSで湿らせた15mlのチューブに集める。遠心分離後沈査を1mlにして蛍光染色を行う。
7. 蛍光染色
ろ紙は親水性PTFEフィルターとメンブランフィルターを使用し、ハイドロフルオール・コンボの説明書に従って染色した。封入後、鏡検し、強い蛍光を発し、辺縁部に厚みがあり、大きさが一致した個体数を推定値とした。さらに、推定値のうち、微分干渉鏡検下でスポロゾイトが確認出来た個体数を、確定値とした。

表4 ジアルジア検出水源

検出年	水 源 名	水源区分
1999	大館市上水道米代川水源	表流水
2000	八郎潟町上水道馬場目川水源	表流水

2. ジアルジア（確定）は県北部と中央部で1検体ずつ合計2検体から検出された（表-4）。米代川は本県と岩手県にまたがる全長110.181kmの1級河川である。

3. 検査方法について

検査の技術研修を受けた後、当所でそれぞれの検査方法について再度検討した結果、国の方法では、エタノール脱水の複雑性、プレパラート作成に時間がかかる、遠心分離回数が多すぎる等の短所がある反面、ダビー染色性が良い、等の長所もあった。当所ではそれぞれの検査方法の長所を組み合わせ検査方法とした。また、山形県衛生研究所で行った技術研修では、水のろ過濃縮液内容物が、強固に遠心管内壁に付着した。その結果、付着により検出率の低下をさけるため遠心沈殿操作を減らすことが試みられた。当所では濃縮内容物を遠心管内壁に付着させないため、あらかじめPBSで遠心管を湿らせる操作を行っているためか、内容物が強固に付着する現象は肉眼的に全く認められていない。遠心管内壁へのろ過濃縮内容物の付着は、遠心管の材質にも影響されると思われるので、クリプトスポリジウム検査においては、遠心管の材質を統一する必要があるのではないかと考えている。今後検討してみたい。また、国の通達⁶⁾による検査結果のクロスチェックは、埼玉県衛生研究所で行った。

IV. まとめ

3年間の水道水源におけるクリプトスポリジウム・ジアルジアの実態調査において、次の成績が得られた。

1. 当所では遠心操作により、ろ過濃縮内容物が遠心管内壁に強固に付着する現象は認められていない。遠心管の材質について今後検討したい。
2. 本県の場合、クリプトスポリジウムは、雄物川と馬場目川の両河川の下流部で検出された。また馬場目川ではジアルジアも検出された。

VI. 文 献

1. Tyzzer, E. E.: *Cryptosporidium Parvum* (Sp. nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenk., 1912 ; 26:394-418.
2. Nime, F. A. et al.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterol., 1976 ; 70:592-598.
3. 井関 基弘: クリプトスポリジウム症の集団発生とその対策. モダンメディア, 1997 ; 43 : 431-437.
4. クリプトスポリジウムによる集団下痢症-越生町集団下痢症発生事件-報告書. 埼玉県衛生部. 1997.
5. 山村 勝美: クリプトスポリジウム等の水道水源における動態に関する研究報告. 水道技術研究センター浄水技術部. 水技第279号, 1997.
6. 飲料水におけるクリプトスポリジウム等の検査結果のクロスチェック実施要領について. 厚生省生活衛生局水道環境部. 衛水第3号, 1999.