

環境水中におけるクリプトスポリジウム実態調査について (第2報)

徳島県保健環境センター

伊澤 茂樹・尾崎 宏美¹⁾

Fact-finding of Cryptosporidium and Giardia in The Environmental Water (Part II)

Shigeki ISAWA and Hiromi OZAKI

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Abstract

We have surveyed the *Cryptosporidium* & *Giardia* existing in the environment water since 1997. At the start, we surveyed the facilities water, and from 1998, we have researched its existence in the main river water and town river water.

This results from 1999 and 2000 survey, identify the presence of *Cryptosporidium* & *Giardia* positive species just in 2 points of town river water in 2000. The water from these station is not used for drinking etc.

Key words : クリプトスポリジウム cryptosporidium, ジアルジア giardia, 間接蛍光抗体法 indirect fluorescent antibody method

I はじめに

クリプトスポリジウムの調査については、前報(当所年報 No.17)に報告したように、当センターでは平成9年(1997年)から実施している。

現在では全国で検査が行われており、学術的な研究もなされてきており論文も多く報告されている。

平成8年(1996年)埼玉県で起きた集団下痢発生以降、集団発生はないものの水道水中でクリプトスポリジウムが検出され、措置をとった事例も若干見受けられるため、継続的な調査を実施し原水等の汚染状況を事前に把握することは、水道水の安全確保のため重要である。

本報では、河川水中の実態調査として県内主要河川及び都市河川の定点において、調査を継続実施しているので、平成11年度(1999年)及び12年度(2000年)の調査結果について報告する。

II 研究方法等

1 調査地点

平成10年度に開始した同一地点において調査した。

調査地点を図-1に示した。

1) 現 徳島保健所

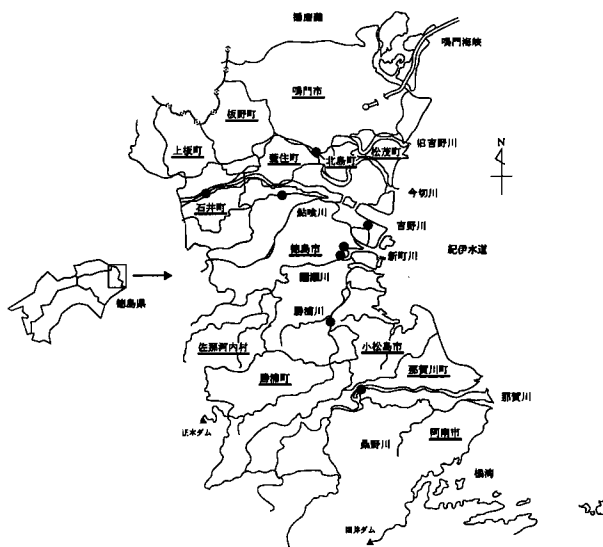


図-1 調査地点図

2 調査器具等

1) 顕微鏡 落射型蛍光・微分干渉顕微鏡 (ニコン:E600型)

2) 画像処理装置 カラーカメラ:ニコン 3 CCD イメージプロセッサー:

浜松ホトニクス ARGUS-20

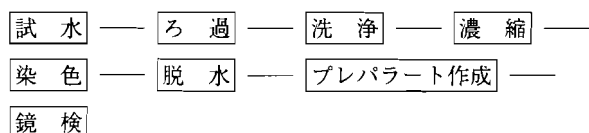
カラーコピー：三菱 CP700A
 カラーモニター：
 ソニートリニトロン PVM-14M4J

- 3) マニホールド 吸引ろ過用：STU6PN型
 (プラスチック製，φ47mm 6連)
 染色用：KM-6N型
 (硬質ガラス製，φ47mm 6連)
- 4) 真空ポンプ 佐藤真空 DN-60型
 5) 遠心分離器 トミー精工 LC-122型
 6) 恒温槽 ヤマト科学 DS-600型
 7) 検査キット ハイドロフルオール・コンボ
 (EnSys 社)
- 8) 採水容器 ユニオンコンテナ(10ℓ容)：使い捨て

3 検査方法

検査方法は、厚生省が示した「水道に関するクリプトスポリジウム・オーシストの検出のための暫定的な試験方法について」によった。

この方法の簡単なフローシートは次のとおりである。



Ⅲ 研究結果と考察

1 平成11年度調査結果

平成11年度(1999年)の調査結果を表-1に示した。

主要河川4地点については、年3回(うち2地点については、ダム放流のため採水できなかったのが2回)、都市河川4地点については、1地点で年3回、3地点で年1回の調査を実施した。

調査結果は、クリプトスポリジウム・ジアルジアともに不検出であったが、12月に持井橋でクリプトスポリジウム疑陽性個体が観察されたため、再調査を実施したところ不

検出であった。

この個体の記録写真を平成12年度に、阿南工業高等専門学校(橋本先生)に見てもらったところ、蛍光像が若干いびつなところがあり、核についてももうすいため、他の顆粒が紛らわしい位置に観察された可能性があるとの判断であった。

また、記録写真は、35mmフィルムの写真撮影装置であったが、光量不足のためか蛍光観察像が説明用写真としては不十分にしか撮影できなかった。このため平成11年6月に画像処理装置(カラーカメラ、イメージプロセッサ、カラーコピー等)を導入し、以降この装置により充分明瞭な記録写真がとれるようになった。

2 平成12年度調査結果

平成12年度(2000年)の調査結果を表-2に示した。

平成12年度は少し無理をして、年間4回の調査が実施できた。

主要河川及び都市河川の計8地点で調査を実施した結果、11月に都市河川においてクリプトスポリジウム・ジアルジアの陽性個体が確認された。しかし、これらの地点では利水がなく経口的にヒトに摂取される恐れはない。

これらの個体は、橋本先生に観察してもらい、UV励起観察、微分干渉観察を行い間違いないと判断した。クリプトスポリジウムが検出された大岡新橋で再調査をしたが不検出であった。

文献によると都会の河川には、クリプトスポリジウム・ジアルジアは常在していると考えられ、試験水量を100ℓにするとほとんどの地点で検出されるようである。

本県でも河川水中での存在が確認されたため、今後の調査方法を検討した。

測定器具や顕微鏡観察能力の制限があるなか、少しでも有効な調査を目的として、水道水源の上流側の河川水を調査しようと考えている。

つまり、次年度から県内の水道水源の上流側の河川水で採水できる地点を順次調査することにより、水道水の安全

表-1 平成11年度調査結果

試料名	持井橋			野上橋		高瀬橋			大正橋			山城橋			沖須賀橋	大岡新橋	飯尾川橋
	平成11年 4月26日	12月7日	12月10日	4月26日	12月7日	4月26日	9月20日	12月7日	4月26日	9月20日	12月7日	4月26日	9月20日	12月13日	12月13日	12月13日	12月13日
採水日																	
ろ過水量(ℓ)	10	10	10	10	10	10	5	10	7.5	3	10	2	2	4.09	2.5	5.5	4.4
濃縮後液量(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10
染色ろ紙枚数	3	3	2	3	2	3	4	2	4	4	4	4	4	3	3	3	3
結果	クリプトスポリジウム	不検出	* ^o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
	ジアルジア	不検出	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

表-2 平成12年度調査結果

試料名	持井橋			野上橋				高瀬橋				大正橋				
	平成12年 4月11日	8月28日	11月6日	平成13年 3月21日	平成12年 4月11日	8月28日	11月6日	平成13年 3月21日	平成12年 4月11日	8月28日	11月6日	平成13年 3月21日	平成12年 4月11日	8月28日	11月6日	平成13年 3月21日
ろ過水量(ℓ)	4.5	7.9	5.3	10	4.5	8.4	8.5	10	6.8	9.0	4.8	10	5.3	5.0	5.0	9.25
濃縮後液量(ml)	5	5	10	4	10	5	5	4	5	5	5	4	10	5	10	4
染色ろ紙枚数	4	3	3	2	5	3	2	3	2	2	2	2	4	3	3	3
結果	クリプトスポリジウム	不検出	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
	ジアルジア	不検出	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃

山城橋			沖須賀橋				飯尾川橋				大岡新橋				徳住橋		
平成12年 4月18日	8月22日	11月13日	平成13年 3月26日	平成12年 4月18日	8月22日	11月13日	平成13年 3月26日	平成12年 4月18日	8月22日	11月13日	平成13年 3月26日	平成12年 4月18日	8月22日	11月13日	11月22日	平成13年 3月26日	平成12年 11月22日
1.7	3.2	4.0	2.2	1.5	3.6	4.0	2.2	1.4	4.0	4.5	4.0	2.8	4.5	5.6	7.0	3.1	10
5	5	5	8	5	5	5	8	5	5	10	8	5	5	10	10	8	10
2	3	3	3	2	2	3	2	3	2	4	2	2	3	4	4	2	3
〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	2	不検出	〃	〃
〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	1	不検出	〃	〃	〃	〃	〃	〃

情報の一部に活用できるのではないかと考えている。

クリプトスポリジウムについては、近年いろいろな研究がなされており、論文も多数発表されている。しかし、現在の検査方法の問題点や当センターでの調査における限界等もいくつか考えられる。

そこで、試験水量、回収率、陽性個体の確定方法について検討してみた。

まず、試験水量であるが、年間の許容感染確率を 10^{-4} としたときは、少なくとも100ℓの水を検査する必要がある、神奈川県内の河川調査ではこの規模の調査が行われている。

当センターでは、メンブランフィルターでのろ過方法をとっており、調査結果からわかるようにろ紙1枚あたりの処理水量は、きれいな河川で約5ℓ、都市河川では1ℓ未満である。

100ℓの水を調査するためには、1地点で20~100枚のろ紙を顕微鏡観察しなければならない計算であり、非現実的でありこの方法は少人数では適用できない。

ろ過方法を大量処理する方法（例えばカートリッジフィルター等）を採用するとしても、顕微鏡観察の枚数は減少しないので、少人数で対応できるものでない。

次に回収率であるが、現在の方法での回収率は、熟練した研究者でも50%前後だと言われている。これは、検査の操作工程が多いことが大きな要因である。

しかし、微小な生物体を顕微鏡で観察する方法では、大量の濃縮、染色、脱水は不可欠な工程であり、やむを得ないものである。

検査方法自体の改良や新しい検出方法の開発がなければ解決しないとされる。

次いで陽性個体の確定方法であるが、顕微鏡操作の熟練と観察の訓練が必要である。

プレパラート上の生物体を陽性と確定するには、ゴミと生物体の区別、対物レンズの切り替え、各観察法の適用、記録写真の撮影等が必要であり、時間と労力がかかる作業である。

また、検査キットの陽性コントロールでも、脱水条件により形が一樣でなく、UV励起での核観察も全ての個体が染色されないのが現実である。

そして、もっと厄介なことは、今までの観察で大きさが該当し、UV励起での核も観察されるが、陽性ではない藻類と思われる個体が出現することである。

著者もプランクトンの観察を以前に行い、顕微鏡観察には相当経験を有しているが、この最後の確定をする判断には疑問が残っている現状である。

以上のように、クリプトスポリジウム・ジアルジアの検査は、多くの難題を抱えており、現時点では一般的な検査方法とはいえない。

しかし、自然界では宿主域が広く、汚染があれば環境水中で検出されても不思議ではない状況である。そのため、完全な検査方法がとれなくても、調査研究を継続して県内の水環境での情報を得ることは重要なことであると思われる。

IV まとめ

1. 平成11・12年度も引き続き同じ地点での調査を実施し、

平成12年度において四季を通じた年4回の検査が実施できた。

2. 平成11年度に疑陽性個体，平成12年度は陽性個体が観察されたが，再調査したところいずれも不検出であった。また，陽性個体の検出された地点は利水がなく，河川水がヒトの口にはいる恐れのない地点であった。

3. 現在までの観察において，非常にまぎらわしい藻類と思われる個体が出現し，出現個体を陽性と確定することは相当困難なように感じた。

技術的レベルの向上に努める必要がある。

文 献

- 1) 厚生省：水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針，1996
- 2) 厚生省：水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針，1998
- 3) 平田 強他：クリプトスポリジウム汚染と水道，水道協会雑誌，64巻12号，2-10（1995）
- 4) 特集1・水のクリプトスポリジウム汚染と対策，環境技術，Vol.26 No.9 3-25（1997）
- 5) 橋本 温他：相模川水系の原虫汚染レベル，阿南工業高等専門学校研究紀要，No.37，33-40（2001）