

<特集>

クリプトスポリジウムの環境水からの検出法

Detection of *Cryptosporidium* from Environmental Water

木村 明生

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課医動物室*

Akio Kimura

Department of Virology

Osaka Prefectural Institute of Public Health

Abstract

Cryptosporidium is parasitic protozoa recognized to be the one of the most important waterborne pathogen. Since 1985, outbreaks of Cryptosporidiosis had been reported in many countries, including USA, UK, Australia and Japan. In these cases, infections were caused by drinking water contaminated by *C. parvum* oocysts. Currently water treatment plants in developed countries are monitoring the contamination of *Cryptosporidium* in drinking water sources as a daily routine work. Generally, the detection method of oocysts from environmental water includes 3 steps, 1) concentration of large volume of water, 2) isolation and recovery of oocysts from concentrated materials and 3) staining and microscopic detection of oocysts. In the first step, commonly filtration methods are used. The filters currently used are, hydrophobic PTEF filter (membrane filter : JAWA method, in JAPAN), CrypTest™ (capsule filter : USEPA method 1623, in USA) or Filt-Max™ (foam discs multiple layer filter : DETR method SI.1524, in UK). The flocculation method or the continuous flow centrifugation method could be used alternatively to filtration. In the second step, sucrose floatation or /and immunomagnetic separation (IMS) are used. Finally oocysts are stained by immuno fluorescein labeled monoclonal antibodies and screened under fluorescein microscope. The detection of small numbers of oocysts from large volume of water needs time consuming and labor intensive works and also well experienced skills. Research works to develop simple, easy and sensitive detection methods are still on going.

Key Words : *Cryptosporidium* oocysts, Detection method, Environmental water, Monitoring

1 はじめに

クリプトスポリジウムは原虫とよばれる寄生性の原生動物である。分類学上はマラリア原虫やトキソプラズマと同じ、アピコンプレックス門、孢子虫綱に属する。本原虫には現在までに少なくとも10種あることが判明しており、Tab.1に示すようにほ乳類を始め、鳥類や爬虫類などの多種多様な動物種に自然感染している¹⁾。

Tab.1 クリプトスポリジウムの種類と宿主

種名	宿主	平均長径 (μm)
<i>C. parvum</i>	ヒト, ウシ	5.0
<i>C. muris</i>	マウス	7.4
<i>C. andersoni</i>	ウシ	7.4
<i>C. wrairi</i>	モルモット	7.0
<i>C. feris</i>	ネコ	5.0
<i>C. baileyi</i>	ニワトリ	6.4
<i>C. meleagridis</i>	シチメンチョウ	5.2
<i>C. serpentis</i>	ヘビ	6.2
<i>C. saurophilum</i>	トカゲ	5.0
<i>C. nasorum</i>	魚	4.3

*〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69
TEL:06-6972-1321 (内 257) FAX:06-6972-2393
E-mail:akkimura@iph.pref.osaka.jp

この内、人間に感染してクリプトスポリジウム症の原因となるのは *Cryptosporidium parvum* という種である。*C. parvum* には、ヒトからヒトへの感染のみが認められている「ヒト型」と、牛等の家畜やヒトへの感染が見られる「ウシ型」とがあるとされているが²⁾、最近では「ヒト型」を別種 (*C. hominis*) とする説が有力になっている。クリプトスポリジウム症は、1976年に初めてヒトへの感染例が報告され、1980年代になると AIDS 患者での致死性下痢症の原因として注目されるようになった。また近年、飲料水などによる一般健康人の集団感染例が世界各国で頻発したことから、本原虫が水系感染症の重要な病原因子として世界的に認識されるようになってきている。

クリプトスポリジウムは環境中に感染宿主の糞便とともに、オーシストとして排泄される。*C. parvum* のオーシストは直径約 5 μm の類円形をし、内部にバナナ状をした 4 個のスポロゾイドを含んでいる (Fig.1)。これを

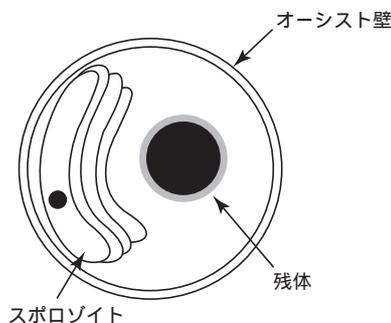


Fig.1 クリプトスポリジウムのオーシスト。オーシスト壁は 2 層からなり、内部にバナナ状のスポロゾイドが 4 個と残体 1 個が存在する。

ヒトが飲料水などとともに摂取すると、オーシスト内のスポロゾイドが腸管内でオーシストから飛び出し小腸粘膜の微絨毛に接着侵入する。そこで寄生胞と呼ばれる宿主の微絨毛を利用した袋を作り、その中で 8 個のメロゾイドを含んだシゾンまで発育する。やがてメロゾイドは寄生胞を飛び出して新しい微絨毛に侵入し、無性生殖による増殖を繰り返す (自家感染)。メロゾイドの一部は有性生殖の過程を取り雄性生殖細胞 (ミクロガメート) と雌性生殖細胞 (マクロガメート) に分化、受精して再びオーシストが形成され、糞便と共に外界に排泄され新たな感染の原因となる。このように本原虫は、同じ宿主の腸管内で無性生殖と有性生殖を繰り返すのが特徴である。

クリプトスポリジウム症の主症状は、持続性の激しい水様下痢と腹痛である。免疫機能の正常な患者の場合、通常数日から数週間で自然治癒するが、AIDS 患者などの免

疫力の低下している患者では重症化する 경우가多く、脱水により死亡することもある。どの様なメカニズムで下痢が引き起こされるかについては未だ十分に明らかにはされていないが、原虫が小腸の絨毛内で爆発的に増殖することにより、吸収が著しく阻害される事が原因ではないかと考えられている。

人や家畜での感染のピーク時には、大量のオーシスト (10 から 100 億個/日) が糞便中に排出され、これが環境水を汚染する事によりさらに感染を広げる原因となっている。約 30 個のオーシストが体内に入っただけで感染が成立するとも言われており、またオーシストは低温や乾燥に耐性を持ち、塩素にも強い抵抗性があることも (大腸菌の 240,000 倍) 問題を大きくしている一因となっている³⁾。

クリプトスポリジウム症は、発展途上国、先進工業国の区別無く、世界中のあらゆる場所で発生している。上述のとおり特に AIDS 患者における日和見感染症として注目されており、AIDS 関連下痢症の原因の約 16% を占めている。更に健康人にも感染し、激しい下痢の原因となる事が明らかとなり、現在では公衆衛生上重要な新興感染症として認識されるに至っている。欧米地域、特にアメリカ、イギリス、カナダ、オーストラリアでは、オーシストで汚染された飲料水や遊泳プールを原因とする集団発生例が多数報告されている。大規模集団発生例としては、1993 年のアメリカ・ウィスコンシン州で汚染された飲料水による 40 万人以上の患者発生があり、このうち 400 人余りが死亡している。また遊泳プールでの感染例としては、オーストラリア・ニューサウスウェールズ州において 1989 年の 1 月から 9 月までに 1,085 名の患者発生が報告されている。わが国でも 1994 年に神奈川県平塚市で患者数 461 名の集団発生例があり、さらに 1996 年には埼玉県越生町で患者数 8,812 名の集団発生があった (Tab.2)。前者は雑居ビルの飲料水用の受水槽が、後者は町の浄水場から給水されていた飲料水が、オーシストにより汚染されていたことが原因であると推測されている⁴⁾。最近では、2002 年 2 月に北海道へ修学旅行に行った兵庫県洲本市の高校生 129 名と、同年 4 月に北海道内で合宿を行った札幌市内の専門学校生 170 名の集団発生事例が報告されている。

アメリカやオーストラリアではオーシストは飲料水の原水から恒常的に検出されており、更に浄水 (水道水) からの検出例も少数ながら報告されている。わが国でも 1997 年に発表された旧厚生省生活衛生局の報告によると、全国 94 水道水源水域の 282 地点で採取した原水のうち、秋田、山形、群馬、栃木、熊本、沖縄の各県の 6 水源水域

Tab.2 飲料水によるクリプトスポリジウム集団発生例

発生年	発生場所	患者数
1987	アメリカ・ジョージア州 Carrolton Country	1,300
1989	イギリス・Swindom/Oxfordshire	5,000
1990	イギリス・N. Humberside	447
1991	アメリカ・ペンシルバニア州 Berks Country	551
1992	アメリカ・オレゴン州 Jacson Country	1,500
1993	アメリカ・ウィスコンシン州 Mikwaukee	403,000
1994	日本・神奈川県平塚市	461
1996	カナダ・ブリティッシュコロンビア州 Kelowna	15,000
1996	日本・埼玉県越生町	8,812

8 地点からオーシストが検出されている（陽性率 2.8%）。また 1999 年度には，13 の都府県の水道原水あるいは浄水から，1~14 個/10L のクリプトスポリジウムオーシストが検出されている。わが国では現在までに 4 件の集団発生例しか報告されていないが，原因不明の下痢症患者の中には，潜在的なクリプトスポリジウム症の患者が多数含まれているのではないかと懸念されている。

環境水，特に飲料水の原水や浄水からのオーシストの検出は，大量のオーシストが存在する糞便からの検出とは異なり，非常な手間と時間を要する。寄生性であるクリプトスポリジウムは細菌や真菌とは異なり，オーシストそれ自身が外界（環境中）で増殖しない。多量の水試料中に通常は数個存在するかしないかのオーシストの検出は，甲子園球場に落ちているパチンコ玉を見つけ出す様なものと喩える研究者もいる。また試料中には，形態的にオーシストに極めて類似した藻類なども存在している。しかし分析器機等を用いる化学物質の検出などとは異なり，最終的な判定は検査担当者の顕微鏡による形態観察によって行うため，その結果は検査担当者の経験や熟練度に依るところが大きい。この点から，本特集のテーマである「バイオアッセイ」の趣旨に合致しないとも思われるが，検出法もその都度改良が加えられ，一部機器の導入も行われているので，本稿ではそれらについても紹介しながら検出法について概説したい。

2 クリプトスポリジウム検出法

環境水からのオーシストの検出は，大きく分けて 1) 試料の濃縮，2) 濃縮試料からのオーシストの分離回収，3) 回収したオーシストの染色と顕微鏡による同定の，3 段階のステップで実施する。わが国の水道協会が推奨して

いる「親水性 PTFE ろ過-ボルテックス剥離法」⁴⁾，米国環境保護庁が定めた 1623 法⁵⁾，英国環境運輸地域省 SI.1524 法⁶⁾を始めとする様々な検出法が提唱されているが，基本的には全てこの 3 ステップからなる (Fig.2)。検水量は国によって異なるが（概ね 10L から 1000L），我



Fig.2 環境水からのクリプトスポリジウム検出の流れ

が国では，原水は 10L，浄水（水道水）は 20L と定められている。各ステップで用いられる手技はそれぞれの検出法によって様々であるが，代表的なものについて以下に挙げる。

2.1 試料水の濃縮

試料の濃縮にはフィルターを用いたろ過濃縮 (filtration) が主流であるが，アルミニウムや鉄などの凝集剤を用いた凝集フロック沈殿法 (flocculation) も用いられる場合がある。また連続流入遠心法による濃縮 (continuous flow centrifugation) も検討されている。

1) ろ過濃縮法 (filtration)：ろ過濃縮用のフィルターとして，我が国の「親水性 PTFE ろ過-ボルテックス剥離法」では，膜状で孔径 5 μ m の親水性 PTFE フィルター (MILIPORE) を金属製の加圧式フィルターホルダーにセットして用いている (Fig.3)。また米国 1623 法ではカプセル内にろ過膜がセットされたカプセルフィルター (CrypTestTM: Whatman) を，英国 SI.1524 法では数十枚のスポンジ状のろ材を数センチに圧縮した，圧縮発泡体フィルター (Filta-MaxTM: IDEXX) を用いている。こ



Fig.3 親水性 PTFE フィルター用の加圧式フィルターホルダー

他には、孔径 $10\mu\text{m}$ と $3\mu\text{m}$ の 2 枚のポリカーボネート製フィルターを用いて 2 段階のろ過を行うサイズ選択ろ過法も用いられる場合がある。100 個のオーシストを浄水に添加して検討した各ろ過濃縮方法でのオーシストの回収率は、概ね 30% から 50% であるが、なかでも PTFE フィルターの回収率が最も優れているとされている⁴⁾。カプセルフィルターや圧縮発泡体フィルターは、回収率では劣るものの、大容量で濁度の高い試料の濃縮を簡便に実施できることに長所があるとされている。またサイズ選択ろ過法は、可搬性に優れており、給水栓など現場で試料濃縮を行えることから、迅速な検査が必要な場合に効果を発揮する⁴⁾。

2) 凝集フロック沈殿法 (floculation) : この方法は浄水施設で用いられている原水の沈殿処理を、試料の濃縮に応用した方法である。操作は試料に適当な濃度の凝集剤を添加した後、凝集したフロックを遠心して回収するだけなので、フィルター法と比較して操作が簡便で安価に実施出来るという利点がある。凝集剤には硫酸第Ⅱ鉄、硫酸アルミニウム、炭酸カルシウムが用いられるが、オーシスト添加実験での回収率検討では、硫酸第Ⅱ鉄が 68% と他の凝集剤と比較して高い結果が得られている。また水道水への数個のオーシストを添加した回収実験でも、硫酸第Ⅱ鉄を用いた凝集フロック沈殿法は高い回収率 (約 70%) を示した。しかしこの方法では、フロックの形成と沈殿に数時間を要することから、迅速性という点については改良の余地があると考えられる⁷⁾。

3) 連続流入遠心法 (continuous flow centrifugation) : この方法は、遠心分離器にポンプで試料水を一定の流量で流入させながら、連続的に遠心してオーシストを分離

するというものである。もともとは血液細胞の分離を目的とした方法を改良したもので、専用の装置が必要となる。水道水への添加実験によると、オーシスト回収率は 55% であったと報告されている。この方法は特別な遠心分離器が必要な点で、一般への普及は難しいが、大量の水試料を比較的短時間で処理出来るという利点がある⁸⁾。

以上代表的な 3 濃縮法を挙げたが、実際の浄水や原水のモニタリングにはろ過濃縮法が用いられている。なおいずれの濃縮方法を用いても、河川水などの原水からのオーシストの回収率は 10% から 30% と低下する⁴⁾⁻⁸⁾。

2.2 濃縮試料からのオーシストの分離回収

ろ過濃縮法ではフィルター表面から、また凝集フロック沈殿法や連続流入遠心法では試料濃縮液から、オーシストを分離回収する必要がある。オーシストの分離回収には、比重 1.2 のショ糖液を用いた遠心浮遊法 (ショ糖浮遊法: sucrose floatation)、あるいは免疫磁気ビーズ分離法 (IMS 法: immunomagnetic separation) が用いられている。前者はオーシストの比重が 1.08 前後であることを利用した方法で、濃縮した試料を比重 1.2 のショ糖液で懸濁して遠心することにより、比重が 1.2 以上の夾雑物は沈殿し、オーシストはショ糖液上に浮遊するため分離回収出来る。後者は、磁気ビーズを結合させた抗オーシスト抗体を濃縮試料に加え混和し、抗体と結合したオーシストを、磁石を用いて回収する方法である。この方法に必要な磁気ビーズは、キットとして市販されている (Dyanabeds anti-Cryptosporidium kit: DYNAL)。IMS 法はショ糖浮遊法と比較して回収率が良好であることから、最近では主流となってきている。しかし濁度が高い原水からの濃縮試料で、IMS 法単独では回収率が低下する場合には、両法を併用すると良好な回収率が得られるようである⁴⁾。

2.3 オーシストの染色と同定

最後は濃縮試料より回収されたオーシストを、顕微鏡下で検索、同定、カウントするステップである。蛍光物質 FITC (フルオレセイン・イソシアネート) 標識モノクローナル抗体によりオーシスト壁を、同時に DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニールインドール 2 塩酸塩) によりオーシスト内部のスプロゾイトの核を染色し、試料スライドを作製する (蛍光抗体法)。作製した試料スライドを微分干渉装置の付いた蛍光顕微鏡で観察し、蛍光染色されたオーシストを検索する。クリプトスポリジウム

オーシストは、蛍光顕微鏡のB励起光下で壁がアップルグリーンに、UV励起光下で内部のスプロゾイトの核がライトブルーに観察されることによって同定出来る。さらに微分干渉顕微鏡像で、オーシスト内部のバナナ状のスプロゾイトを確認することによって、同定がより確実になる (Fig.4)。試料スライドは、全視野を検鏡してオーシスト数をカウントする。



Fig.4 クリプトスポリジウムオーシストの顕微鏡像。(A)FITC 染色壁:オーシスト壁のアップルグリーンに観察できる。(B)DAPI 染色像:オーシスト内部のスプロゾイトの核がライトブルーに観察できる。(C) 微分干渉像:オーシスト内部のバナナ状のスプロゾイトが観察できる。

この顕微鏡観察が全行程中で最も時間と労力がかかり、また経験が必要となるステップである。そこで操作の簡便性や労力の軽減を目的としてレーザーキャナー付きの蛍光顕微鏡が開発され (ChemScan RDI: Chemunex)⁹⁾、一部の検査機関では既に運用されている。これは蛍光顕微鏡のステージ上で、レーザー光線によって蛍光標識されたオーシストを自動的にスキャンし、オーシストと同じ大きさで蛍光強度を持つ粒子の位置を記録出来る装置である。検査担当者は記録された場所のみを検鏡し判定を行えばよいので、これにより検査労力を大幅に節約できる。しかし装置が高価であることから、一般の検査機関に普及するには至っていない。

この他検出器機を用いた方法として、フローサイトメトリー (flow-cytometry) がある。これは免疫担当細胞等の解析に用いられている自動細胞解析装置 (FACSCaliburTM: BD Biosciences) を、オーシスト検出に応用した方法である。原理的には、液体中の FITC 標識モノクローナル抗体で染色されたオーシストが石英フローセル中を流れる間に、レーザー光線によってオーシストの蛍光信号を解析し、さらにソーティング領域を指定することにより目的のオーシストが分取できるというものである。高率でオーシストが回収できるという報告もあるが、実際の環境水の検査では非特異的な蛍光を発する物質も多く含まれ、また器機が高価でかつ使用に際しては習熟を要する点などで、日常の検査に用いるに

は未だ課題が多い。

3 オーシスト検出精度の確認

環境水からのオーシストの検出率が、試料水の水質や用いる方法、また検査担当者の手技等によって変動することは前述の通りである。そこで最近、検出精度を確認するためのキットが開発され市販されている (ColorSeedTM C&G: BioTechnology Frontiers)。これは、テキサスレッドで蛍光標識されているオーシストが 100 個ずつバイアル中に入っており、これを内部陽性対照 (internal positive control) として試験対象の試料水にあらかじめ添加し、通常の検出操作を実施するものである。この内部陽性対照は蛍光顕微鏡の B 励起光下で赤く観察出来るので、試料由来のオーシストと容易に区別出来る。検出率の算定は極めて簡単で、例えば 60 個の赤いオーシストが検出された場合には、検出率 60% となる。またこの場合に、例えば 6 個の試料由来のオーシストが検出できたとすると、もとの試料中には 10 個のオーシストがあったと推定できる。この方法の大きな利点は、通常の検査と同時に、また水質等の条件の異なった試料毎に検出率が検討できる点である。しかし現在のところこのキットは非常に高価であるため (10 回分で 107,000 円)、日常の検査に常に用いることは困難である。日本水道協会では、今のところ年 4 回以上の検出精度確認と、検出率が 30% 以下である場合やばらつきが大きい場合に、各ステップごとのチェックを実施することを推奨している。

4 クリプトスポリジウム種および型の同定

上述した通りヒトに病原性を有するのは、10 種類以上あるクリプトスポリジウムの中で *C. parvum* である。しかし *C. parvum* と、他種のクリプトスポリジウムとオーシストのサイズや形態はほぼ同一である (Tab.1)。またオーシスト壁の抗原性も種間で類似しているので、*C. parvum* に対する蛍光抗体も他種のクリプトスポリジウムと反応してしまい、蛍光顕微鏡下での区別はつけられない。そこで検出されたオーシストが *C. parvum* であるかどうかの判定は、分子遺伝学的手法によらなくてはならない。現在これには polymerase chain reaction 法 (PCR 法) が用いられている。PCR 法は現在ではあらゆる分野で用いられている一般的な技術で、標的となる特定の遺伝子 (ここでは *C. parvum* 遺伝子) のみを、抽出した DNA を鋳型として、プライマーと呼ぶ短い遺伝子断片

とデオキシリボ核酸，および核酸合成酵素（DNA ポリメラーゼ）により大量に増幅する方法である．この方法を，環境水中のクリプトスポリジウム検出や種，型同定へ応用した報告は，1990年代から多数なされている¹⁰⁾．方法としては，濃縮前あるいは後の試料を蛍光抗体法に用いるものと分割してから遺伝子を抽出し，PCR法を行うのが一般的である．また蛍光抗体法でオーシストが検出された後，同地点から再度試料を採取してPCR法を行なう場合もある．理論的には試料中に標的となる遺伝子が1コピーあればその増幅が可能であるが，特に少数のオーシストしか含まれていない試料の場合では，遺伝子の抽出効率や合成酵素の阻害物質の存在等により増幅がうまくいかないケースもある．そこでこの問題を解決するために，*C. parvum* 特異的な遺伝子を認識する蛍光標識合成DNA（プローブ）を用いた fluorescence *in situ* hybridization 法（FISH法）の応用が検討されている¹¹⁾．この方法は，オーシストから遺伝子を抽出せずに，オーシストの形態および抗原性を維持したまま，オーシスト内部の *C. parvum* 遺伝子を蛍光標識したプローブで検出できるのが特徴である．この方法の利点は，通常の蛍光抗体法と同時に，オーシストの検出と種の同定が出来る点にある．このようにFISH法は優れた方法であるが，蛍光標識プローブが高価であり，また結果の再現性に若干問題があるため，日常の検査に用いられるまでには至っていない．今後は既存の方法の改良を含めた，確実に簡便な種同定法の開発が望まれている．

5 おわりに

この稿では，飲料水などによる水系感染症の原因となるクリプトスポリジウムの環境水からの検査法について概説した．クリプトスポリジウムの環境水からの検出には，基本的には検査実施者の経験や熟練度に依存する部分が多く，また多大な時間を要するのが現状である．しかし精密分析機器等の応用や開発を始めとした，新しい検

査法開発に関する研究も進められており，近い将来には簡便でより精度の高い方法が導入される事が期待される．

[参考文献]

- 1) Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J.: Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1305-1322 (2000)
- 2) O' Donoghue, P. J.: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* **25**, 139-195 (1995)
- 3) 井関基弘：クリプトスポリジウム症，日本における寄生虫学の研究 6, VI 原虫類，571-585 (1999)
- 4) 日本水道協会編：クリプトスポリジウム，解説と試験方法，同文社，東京 (2003)
- 5) USEPA: Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA (1999)
- 6) DETR: Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy water supply regulations 1999, SI No.1524. Part1-5 (1999)
- 7) Karanis, P. and Kimura, A.: Evaluation of three flocculation method for the purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 444-449 (2002)
- 8) Zuckerman, U., Armon, R., Tzipori, S. Gold, D.: Evaluation of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 955-961, 1999.
- 9) Rushton, P., Place, B. M., Lightfoot, N. F.: An evaluation of laser scanning device for the detection of *Cryptosporidium parvum* in treated water samples. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 303-307 (2000)
- 10) Morgan, U. M. and Thompson, R. C. A.: PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward?, *Parasitol. Today*, **14**, 241-245 (1998)
- 11) Deere, D., Vasey, G., Milner, M., Williams, K., Ashbolt, N., Veal, D.: Rapid method for fluorescent *in situ* ribosomal RNA labeling of *Cryptosporidium parvum*. *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 807-818 (1998)