

リアルタイムPCRを用いた クリプトスポリジウム・ジアルジア検査の検討



公益財団法人
鳥根県環境保健公社
原 孝宏

クリプトスポリジウムの形態



学名	Cryptosporidium parvum: 172001111	
形態	オーシスト	スポロゾイト
体形	楕円形	バナナ状
大きさ	径4.5(μm)	1.4×0.5(μm)
特徴	オーシスト内部にバナナ状の4個のスポロゾイトと、膜に包まれた液嚢と顆粒がある。スポロゾイトは直接オーシストに包まれている。	
特徴	環境中ではオーシストで存在し、塩素に対して極めて高い耐性がある。	
感染経路	潜伏期間は2～12日経、無症状や軽い下痢の場合もあるが、重症では激しい水様下痢や腹痛を発生。通常は1～2(一週)程度で自然治癒するが免疫不全患者では激しい下痢による脱水症状が続き、死亡する。有効な治療薬はない。	

ジアルジアの形態



学名	Giardia lamblia (Sintz, 1915) (G. duodenalis) (G. duodenalis)	
形態	栄養体	シスト
体形	洋梨形	楕円形
大きさ	19-21×10-15(μm)	15-12×10-10(μm)
特徴	両面は扁平。腹面に大きな吸着円盤がある。8本の鞭毛、2目の楕、中央を貫く、成熟シストは4枚を持つ。内封嚢もや血前などの構造がみられる。 シストは感染力が強く、水中で数か月間生存力がある。浄水処理による完全除去が難しい上に塩素処理にも耐性がある。 潜伏期間は平均11日から最長で15日ほど。平均9～15日経、少数感染では無症状で免疫となり無症状の慢性感染は稀だがある。水様下痢、腹痛、嘔吐等、治療薬が処方されている。	

水道におけるクリプトスポリジウム等 検出状況と対応の事例

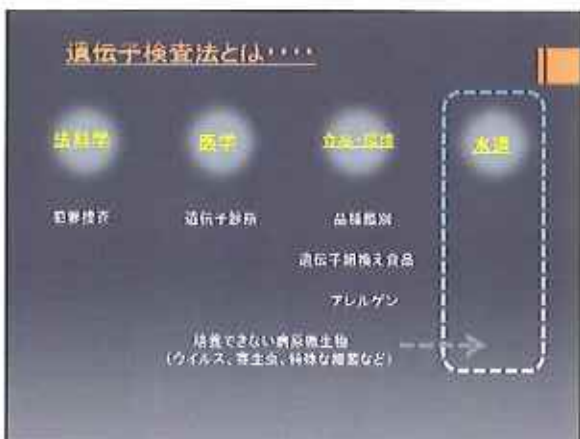
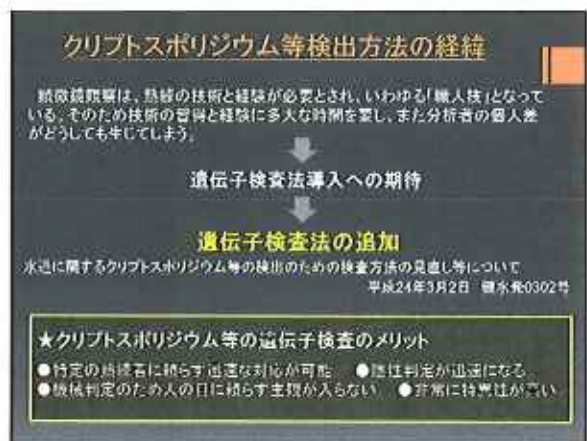
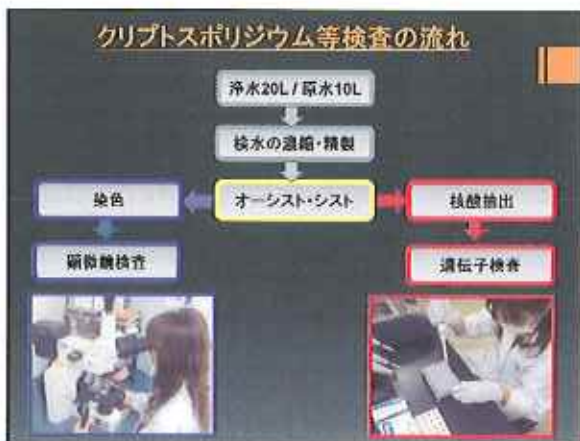
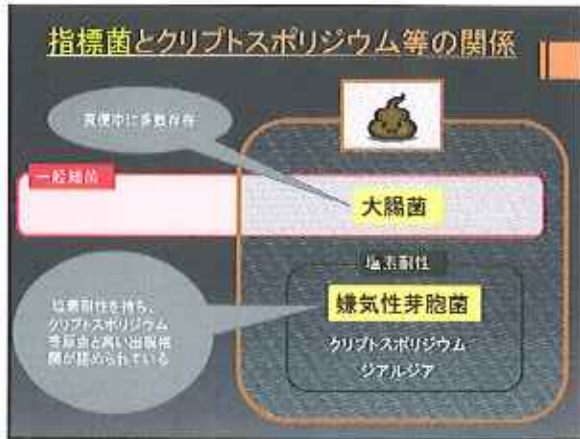
〔取水停止等の対応を行ったもの：H10以降〕

年月	地域	種別	上水処理	広域町村	備考
平成14年度	大塚市 肥後町	山形水道	ろ過処理	大塚市水道、冷 時池田管理組合	雨水及び浄水からクリプトスポ リジウム検出、取水停止発生。
平成19年度	高山市	山形水道	塩素処理のみ	上水清水事業団	浄水からジアルジアを抽出、感 染発生を防止。
平成20年度	高山市 山形市	山形水道	ろ過処理(高 度ろ過不可)	宮井神谷理産出 水組合	浄水からジアルジアを抽出、感 染発生を防止。
平成22年度	赤松市 佐田町	山形水道	塩素処理のみ	山形県管理組合	浄水からジアルジアを抽出、感 染発生を防止。
平成27年度	鳥取市 伊都町	山形水道	ろ過処理	鳥取市水道	浄水からクリプトスポリジ ウム及びジアルジアを抽出、内 容検出不良、4年ジアルジア感 染。

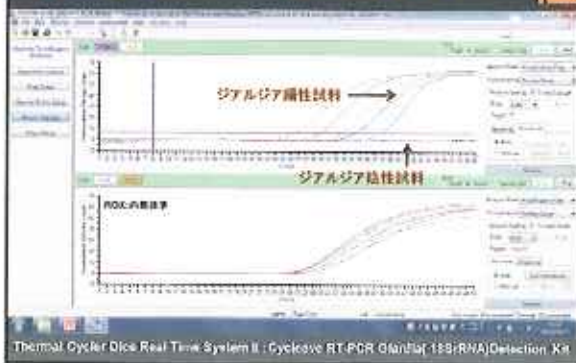


各LEVELに応じた検査頻度と施設設備

リスクレベル	検査項目	検査頻度	施設設備
LEVEL4 及び LEVEL3	クリプトスポリジウム等 及び 指標菌	施設設備中はクリプト等 1回以上/1ヶ月 + 指標菌1回以上/1ヶ月	ろ過設備を整備し、ろ過池出口 の濁度を0.1度以下で常時監視 (高感度濁度計設置) 上取設備又は兼用給水設備
LEVEL2	指標菌	1回以上/1ヶ月	
LEVEL1	大腸菌 トリクロロエチレン等	1回/年	
	塩素消毒の状況確認 (井戸内側の目撃等)	1回/3年	



リアルタイムRT-PCR法による検出例



リアルタイムRT-PCR法による検出例



検討試験について



検討項目

1. 県内環境水の実地調査(検出試験)
2. 顕微鏡法との相関性確認
3. 検査法の特異性確認
4. 陽性検体の再現性試験
5. 陽性コントロールを用いた添加回収試験
6. 実用性評価

環境水からの検出試験結果

№	採水場所	検出	№	採水場所	検出	№	採水場所	検出	№	採水場所	検出
1	21	41	61
2	22	42	62
3	23	43	63
4	24	44	64
5	25	45	65
6	26	46	66
7	27	47	67
8	28	48	68
9	29	49	69
10	30	50	70
11	31	51	71
12	32	52	72
13	33	53	73
14	34	54	74
15	35	55	75
16	36	56	76
17	37	57	77
18	38	58	78
19	39	59	79
20	40	60	80

相関性試験結果

		顕微鏡法		
		陽性	陰性	合計
遺伝子検査法	陽性	0	0	0
	陰性	0	113	113
	合計	0	113	113

		顕微鏡法		
		陽性	陰性	合計
遺伝子検査法	陽性	6	1	7
	陰性	0	106	106
	合計	6	107	113

一致率: 99.1%

検討試験に基づいた遺伝子検査法の評価1

項目	評価
1. 環境水の裏面調査	<p>生活排水26試料中5試料、河川水90試料中2試料からジアルジアが検出された。また、水道原水27試料からは検出されなかった。</p> <p>※生活排水が直接河川へ流入、または処理施設でクリプトスポリジウム等を完全に除去しきれないまま河川へ流入した場合、自然環境中に放出される危険がある。</p>

※(参考) 下水処理場からの検出率(国内)

- ・流入水中のクリプトスポリジウムの検出率: 約10%
- ・一時的な排水処理(活性汚濁法)によるクリプトスポリジウムの除去率: 99%

↓

SS等凝沈の排水基準をクリアする排水処理施設の管理が必要。
(付随してクリプトスポリジウム等の検出も抑えられる)

検討試験に基づいた遺伝子検査法の評価2~5

項目	評価
2. 相関性試験 (顕微鏡法との比較)	結果及び定量値は概ね一致したが、113試料中1試料で試験結果が異なった(遺伝子法:1個、顕微鏡法:5個)。本検討では水道原水以外は試料を分割して遺伝子検査法と顕微鏡法に供したため、検出の問題であると考えられた。
3. 検査法の特異性	113試料のうち偽陽性または偽陰性となる試料はなく、特異性に問題ないと考えられた。
4. 再現性	陽性試料については、精液抽出後から3回繰り返し試験を行ったが全て同じ結果が得られた。
5. 追加回収試験 (検査法の感度)	クリプトスポリジウム、ジアルジアそれぞれについて陽性コントロールを用いた追加回収を行ったが、遺伝子検査法と顕微鏡法のいずれも高い回収率を示し、定量値も概ね一致した。

検討試験に基づいた遺伝子検査法の評価6, 7

項目	評価
6. 実用性評価	<ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子検査法において、複数の試験者による結果の相違はなかった。 ・遺伝子検査法で陽性の試料から、精液したジアルジアシストが検出されたが、顕微鏡法のみでは判定が困難であったと思われる。 ・1, 2試料を処理する時間は顕微鏡法と変わらないが、多量の検体を処理する際には時間短縮等の効果が期待できる。

項目	評価
7. その他	遺伝子検査の特異性については実証されており、今回の検討でも高い特異性を示したが、偶発的原因と類似した遺伝子をもつ微生物が存在する可能性は否定できない。万一水辺を止める等の重要な判断を下す際には、実績のある顕微鏡法で確認する必要がある。遺伝子検査法の導入後も、顕微鏡法の技術の継承は重要な課題であることには変わりはないと考えられる。

遺伝子検査法による試験の流れ



セカンドオピニオンとは

より良い決断をするために、当事者以外の専門的知識を持った第三者※に意見を求めること。

※給衛協のクリプトスポリジウム等検査検討委員会

24時間体制のサポートシステム

おわりに

わたしたちはクリプトスポリジウム・ジアルジア検査機関として、緊急時には迅速に検査を実施できる体制を整えています。更に、定期的な精度管理に取り組み技術維持に努めます。

これからも、検査結果精度の向上と、信頼性確保に向け努力してまいります。

ご静聴ありがとうございました。

