

## 病原寄生虫クリプトスポリジウムについての解説

## Pathogenic protozoa, Cryptosporidium

大瀧雅寛

Masahiro OTAKI

## はじめに (Introduction)

今回はクリプトスポリジウム (以下クリプトと略す) について解説する。この名前を聞いてピンとくる人はよほどの微生物マニアか水道関係者ぐらいだと思われるが、この名前は大腸菌 O-157 の食中毒問題と同じくらい4年ほど前にマスコミに取り上げられた微生物である。あまり O-157 ほど世間に浸透していないようだが、それはその名前が覚えにくいからか「大腸菌!」という名前に比べて直感的なインパクトが小さいからかも知れない。

しかし実際はこの微生物こそ、現在日本のみならず世界中の水道業界で問題になっている対象微生物なのである。ここ数年の水関連の学会でこの名前を見ないことはまずないだろう。猫も杓子も「クリプト、クリプト」といった様相である。では何故それほどこの微生物が問題になっているのだろうか。

## 感染流行 (Outbreak)

5~6年前に Outbreak という劇的に伝染流行する感染症 (エボラウイルスがモデル) を題材にした映画があった。それほどの劇的な流行ではないが、近年このクリプトによる感染流行 (Outbreak) が頻繁に報告されている。表1は米国、英国、日本における感染流行例を示している。ここでは特に水道経由で感染が広がったケースを取り上げている。加えてここに報告されていなくても原因不確定で疑われている例は多々あると考えられている。

表1の中で1993年のMilwaukeeの例を参照していただきたい。この暴露人口の多さと感染者の多さでは他に類をみない感染流行であるが、実際数はこれよりも多いとも言われている。

日本では1994年に平塚市の雑居ビルで水道由来

のクリプト感染が確認された。この時はビル水道の管理問題と片づけられたのだが、この後1996年に埼玉県越生において数千人にわたり水道由来のクリプト感染流行が発生した。それまで日本の浄水技術では心配ないと半ば確信していた常識があったのだが、それが覆されたため蜂の巣をつついたような大騒ぎとなり、現在までその余波が続いている。ではクリプトスポリジウムとはどのような微生物なのだろうか、また何故そのように問題視されているのであろうか。

## 生活環 (life cycle)

この病原微生物は孢子虫類 (普段は孢子 (殻) に入った状態の生物) のコクシジウム目に属する寄生性原虫に分類される。*Cryptosporidium muris* と *Cryptosporidium parvum* があるが、人に感染して問題を起こすのは主に *Cryptosporidium parvum* である。大きさは約  $5 \mu\text{m}$  ( $0.005 \text{ mm}$ ) である。宿主 (つまり人など感染対象動物) の外の環境中ではこの微生物はオーシスト (Oocyst: 嚢包体) で存在している。この点で他の病原微生物と大きく異なる。このオーシストのままでは増殖は起こらないので環境水中における増加は考慮しなくてもよい。この点はウイルスと同じである。

オーシストが動物内に口から入ると、消化管内で増殖を始める。まずオーシスト内からスポロゾイト (感染体) が放出される。これを脱嚢という。この放出されたスポロゾイトが消化管内、粘膜上皮細胞の微絨毛に進入する。この微絨毛内で寄生胞を作りその中で無性生殖を行い、8個のメロゾイト (感染体) を形成する。このメロゾイトがこの寄生胞から放出され、微絨毛内の別のところに寄生し寄生胞を形成する。まさにネズミ算方式でどんどん増殖して

表1 米国、英国、日本における水道由来のクリプト症感染流行例 1)2)

発生年	場所	暴露人口	感染人口	原水	処理法	考えられる原因
1984	Braun Station, TX, 米	5,900	2,006	地下水	塩素	地下水の下水汚染
1987	Carrollton, GA, 米	32,400	12,960	河川水	通常処理	処理効率の悪化
1989	Swindon-Oxford, 英	741,092	516	河川水	通常処理	処理効率の悪化
1989	Isle of thames, 英	177,300	47	河川水	通常処理	処理効率の悪化
1992	Jackson Co., OR, 米	160,000	15,000	湧水/河川水	塩素/簡易ろ過	処理効率の悪化
1993	Milwaukee, WI, 米	1,600,000	403,000	湖水	通常処理	処理効率の悪化
1993	Washington state, 米	Unknown	7	井戸	—	無処理
1993	Minnesota, 米	Unknown	27	湖水	ろ過、塩素	特定できず
1993	Las Vegas, NV, 米	Unknown	103	湖水	通常処理	特定できず
1994	College Place, WA, 米	Unknown	104	井戸	—	下水の汚染
1994	平塚市雑居ビル、日	763	461	水道	受水槽	下水の混入
1996	埼玉県越生町、日	14,000	8,800	河川水及び伏流水	通常処理	処理効率の悪化

いくわけである。このメロゾイトの一部は有性生殖に移行し、雌性生殖細胞と雄性生殖細胞になって受精を行いオーシストを形成する。オーシストは寄生胞内で成熟し、中にスポロゾイトを4つ形成する。成熟オーシストは糞便とともに体外に排出されて感染体となるが、一部は同生物内の消化管内で同じように寄生して自家感染を起こす。図1に上述のクリプトスポリジウムの生活環を模式的に示した。

### クリプト症 (Cryptosporidiosis)

症状の特徴としては水様性の下痢を起こし、時に腹痛、吐き気、発熱、疲労を伴うという厄介なものである。オーシストがヒトの口から入って、症状がでるまでの潜伏期間は5~28日と差があるが平均7.2日といわれている。つまり口に入ってから下痢になるまでタイムラグがあることになる。従って感染症が発生してから原因がクリプトだと突き止めても、その汚染源の特定が困難なことが多い。

一般に感染するのに必要なオーシスト数は30個ほどであるということがアメリカのボランティア実験（一説には囚人を使っていたとも）によって報告されている。普通は発症して3~7日ほどで患者の免疫機構が働き自然治癒するのだが、患者が免疫不全だった場合（例えばAIDS末期症状）や、乳幼児、お年寄りなど耐性が弱い場合には死に至ることもあり、ないがしろにはできない。実際日本の越生で起こった事故では幸運にも死者は報告されていないが、Milwaukeeで起こった事例では約100名が死亡したとされている。

余談だが日本人旅行者がインドなどの東南アジアに行った時にかかる下痢で、潜伏期間や発症例（かなり重い症状。普通の下痢と明らかに違う苦しさだとのこと。筆者はまだ経験無し）だとすると、それはクリプトかジアルジアという病原原虫によるものだと疑ってよいのではないかなと思う。

### 感染源 (Source)

クリプトの感染源は主に牛、豚などの家畜、イヌ、ネコ、ネズミ等の哺乳類である。つまりえり好みせずに人畜共通に感染するため、ヒトからの汚染だけに注意を払っていても片手落ちになってしまう。こ

の点が一般の病原微生物管理と大きく違うところである。特に水源付近で畜産が行われているところは畜産排水はもちろんであるが、雨により放牧地に堆積している糞中のオーシストが水源を汚染することでも考慮しなければいけない。特に後者は汚染源が特定できないためノンポイントソース（非点源汚染）といわれ取り扱いが難しい。

またヒトの場合も感染期間中は患者からオーシストが下水へ放出されるわけであるから、主要な感染源の一つとなる。実際に米国での調査結果<sup>3)</sup>によると、生下水及び処理水のほとんどからオーシストが検出されている。

### 塩素耐性 (Resistance to Chlorine)

日本では浄水、下水処理とも塩素消毒を行って病原微生物に対処している。一般的に塩素はまず微生物の外側の細胞膜に致命的なダメージを与えると考えられている。しかしこのクリプトの場合はオーシストという殻が塩素に対して耐性が強く、なかなか感染力をなくすことができない。

現在我が国では、浄水、下水とも処理水中の大腸菌群を調べることによって消毒効率の管理を行っている。つまり大腸菌群が死んでいれば、他の病原微生物も死んでいるだろうという考えによる。しかしクリプトは大腸菌群の数千倍の耐性を持っているため、この指標では対応できないことになる。事実、Milwaukeeの事例においても、供給していた浄水場の2つにおいてその前後の期間を通して大腸菌群は不検出であった。

つまりこれは大腸菌群を殺すには十分な処理がなされていたにも関わらず、重大な感染事故が起こったということであり、皮肉にもこの指標の限界を如実に示す絶好の例となってしまった。

### 管理手法 (Monitoring method)

クリプトの危険を回避するにはどうすれば良いだろうか。それは水源を良好に保つことが最も良い方法であろう、しかしそれでも原水に含まれてしまった場合には塩素消毒に耐性があるクリプトに浄水処理としてどう対応すればよいだろう。クリプトはそのサイズが約 $5\mu\text{m}$ と、ウイルスが $0.02\sim0.2\mu\text{m}$

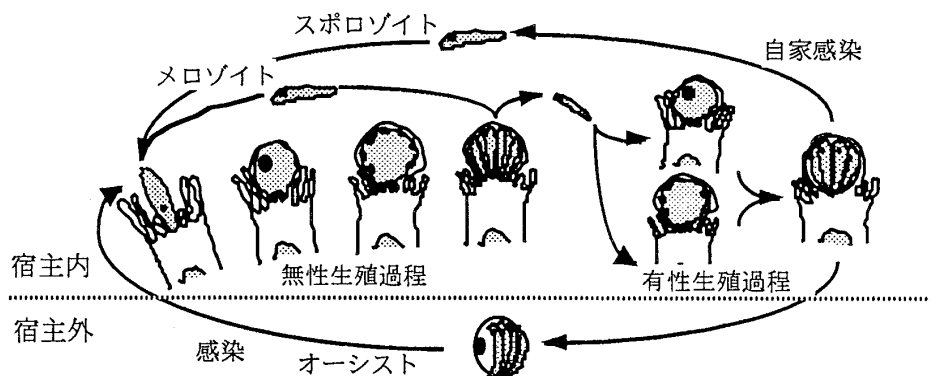


図1 クリプトスポリジウムの発育環

(0.00002～0.0002mm)、細菌が 0.3～5  $\mu\text{m}$  (0.0003～0.005mm) であるのに対し、比較的大きい。この数  $\mu\text{m}$  という大きさは懸濁物質（簡単に言えば水の濁り）と同程度の大きさであるため、浄水処理で行われる通常の濁り除去過程（凝集沈殿＋砂ろ過）において濁りと一緒に除去することができる。表1に示した感染流行の中で、処理効率の悪化に伴って起こったと考えられる事例はいずれも濁度（濁りの指標）が通常値を超え、異常な値を示していたことが報告<sup>1)</sup>されている。即ちクリプトの場合、消毒処理というより粒子除去処理と考えた方が良いのかも知れない。現在我が国では暫定的な対策指針として、浄水場での処理後に濁度で 0.1 度以下に維持管理するように定められている。しかしいづれにせよ水源保護が最良の方法であることは疑いがない。

### 測定方法 (Measurement)

一口に微生物の測定方法といっても、生きている微生物を測定する場合、活性（感染するかどうか）のあるものを測定する場合、総数（死んでいるものも含めて）を測定する場合、と場合に分けて考えておかねばならない。クリプトを測定する場合どれを選択するかによって方法が異なるため注意を要する。それでは、それらの方法について述べていく。

#### 1) 総数の測定

主に試料水中のクリプトの存在の有無を調べるために使われる。従って主に自然水や実際の処理場から採水したサンプルに用いる。通常これらの試料には非常に低濃度でしか存在しないため、大量の試料水からクリプトを濃縮・回収する必要がある。濃縮には孔径が 1～1.2  $\mu\text{m}$  以下のフィルターがよく用いられる。これにより試料をろ過し、フィルター上の残沙から抽出液を使って回収する。これらの試料には通常クリプトと同程度の懸濁粒子や微生物も含まれるためそれらと区別するためにはクリプトに目印を付けねばならない。そのためにクリプトのみを染色する染色剤を用いる。これは動物の免疫抗体機構を利用した物で、クリプトに特異的にくっつく免疫抗体に蛍光発色剤を付けたものと考えて良い。またクリプトは内部構造が特殊なので（4つのバナナの様なスポロゾイトを持つ）、内部構造が鮮明に見えるように脱水処理を行って形態を観察する。この際、生きているものと死んでいるものの区別が付かなくなってしまう。染色&脱水した試料を落射蛍光顕微鏡を用いて観察する。クリプトならば蛍光グリーンに光って見える。また位相差設定によって内部構造を観察しクリプトかどうかの確認を行う。

この方法については、濃縮・回収方法について研究開発が競って行われている。磁気ビーズに免疫抗体をくっつけて、クリプトのみを磁力によって回収するという方法も実用化されており、アメリカ環境保護局 (USEPA) では、標準法として用いられて

いる。また最終的に計数はヒトの目視に頼る為、正確な判断力と経験が必要である。そのため同じ試料を測定しても実施機関や実施者によって結果が異なるといった問題点がある。この点については染色したクリプトを粒子を自動的に計測する装置（フローサイトメーター等）で行う方法など<sup>4)</sup>が検討されているが、共存物質とクリプトの判別がうまくできない場合が多く、未だに実用化に至っていない。

#### 2) 生きているクリプトの測定

これは主にクリプトの消毒処理を行う時の処理効率の判定（生死の判定）に用いられる。従って実験室などで大量培養したクリプトを清澄な溶液に希釈したような試料に用いられる場合が多い。この場合は元々試料中の濃度が高いため、大量濃縮は必要がなく、また観察の際に邪魔になる共存粒子が無いので上記の総量の測定に比べ濃縮・回収の煩わしさはない。生死の判定には主に DAPI/PI 法と脱囊法が使われる。

##### 2-1) DAPI/PI 法 (DAPI/PI method)

これは試料に DAPI と PI の2種類の染色液を入れてクリプトを染色して観察する方法である。この染色液は両方とも遺伝子核を染色するものだが、生きている細胞膜を DAPI は通過し、PI は通過しないという特徴を持つ、よってこれらに染まっているか（陽性：+）、染まっていないか（陰性：-）で生死を判断する。これらの組み合わせによって以下の表2の様に判断する。この方法は通常、細菌の生死判定に使われるが、オーシスト殻に対して、あまり敏感でないことなどが問題点である。

表2 DAPI/PI染色法による生死判定

DAPI	PI	判定
+	+	死
+	-	生
-	+	あり得ない
-	-	生の可能性あり、酸などで処理してDAPIが+になれば、生

##### 2-2) 脱囊法 (Excystation method)

生きているクリプトは宿主内（感染対象動物）に入るとまず胃を通り、小腸内で脱囊してスポロゾイトを放出する。そこでこれを利用して試験管内で同じ様な状況を作り出してやり、脱囊するかしないかで生死判定をすることができる。脱囊した後のオーシストはスポロゾイトを放出して空になっているため、顕微鏡観察により容易に判別できる。

比較的簡便なこの方法の判定結果は生死判定の一つではあるが、スポロゾイトの生死を判断するものではないため、下の式の脱囊率として表される。

$$\text{脱囊率} = \frac{\text{空のオーシスト数}}{\text{全オーシスト数}}$$

### 3) 活性をもつクリプトの測定 (感染試験)

上記の生死判定法では、クリプトが生きているかどうかの判断であり、宿主に感染して発症させることができるかどうかの活性を判断するものではない。この感染試験には主に生きたマウスを使う感染方法と培養細胞を用いる方法が主に用いられる。

#### 3-1) マウスを用いた感染試験 (Infectivity test)

方法論としては単純で、段階的に希釈した試料をそれぞれ非抗体マウスに経口投与し、数日後に発症するかどうかで判断する。各希釈列におけるマウスが発症する、しないの結果から MPN 法 (最確率法) を用いて濃度を計算する。この方法で用いるマウスは免疫機構が不全であるような特殊なマウスを用いる (Skid mouse という) が、このマウスは特許製品で非常に高価である。またマウスの飼育には特別な部屋が必要 (専用ケージ、臭気対策等) などの理由から簡単に測定できる方法ではないという短所を持つ。

#### 3-2) 培養細胞試験 (Cell-culture method)

上記のマウスの代わりに、試験管で培養させた消化管細胞に試料を投与し、そこで細胞内で増殖するかを観察する方法である。最終的に増殖したスポロゾイト、メロゾイトを染色し顕微鏡で観察する。この方法も段階的に希釈した試料について行い、各希釈列において、染色して見えるか見えないかの判断結果を得た後、MPN 法で濃度を計算することができる。この方法は上述のマウスの感染試験に比べて安価で手軽であるため、その使用が急速に広まっている方法である。

#### 4) その他の方法

数がわからなくても良い! クリプトがいるかいないかが取りあえず知りたい! といった時に用いる方法としては、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法という方法がある。これは生物の遺伝子の塩基配列によってクリプトかどうかを判断する方法である。クリプトが存在すれば、この方法によって検出できる。この PCR 法とは遺伝子の判別によく使われる方法であり、身近な例ではよくニュースで聞かれる「実の子供かどうか遺伝子検査で・・・」という時の検査方法とはこの方法を応用したものである。

#### クリプトの研究動向 (Research trend)

大まかに言えば三つの流れがある。一つは現在のクリプトの実態調査である。水道原水となるような河川水・湖沼水での存在の有無もしくはその濃度変化がどうなっているのか、季節変動、降雨による濃度の変化など、以前としてデータが十分に揃っているとはいえない。

二つ目は低濃度で存在する自然水や実処理場水からクリプトを如何にうまく検出し定量するかという

方法論を確立するものである。現在では濃縮・回収方法については確立されてきており回収率で 60%が見込める状況になってきている。この回収率はかなり高いものと言える。今のトピックとしては顕微鏡を用いた人的労力によって行われている観察、計測の自動化が検討されているが、未だに未確立である。

三つ目はクリプトの効率的な消毒方法の検討である。即ち如何に殺すかということである。懸濁物質の除去法をしっかり行っていれば、クリプトもほぼ完全に除去できるというものの、運転管理に異常が発生したときの最後のバリアとして、消毒処理は必要不可欠な物である。塩素への耐性が非常に高いことは前述したが、その他の処理法としてはオゾン、紫外線などがよく検討されている。オゾンに関しては塩素と同じく耐性があることが報告されているが、塩素との併用処理で高効率となるなどの報告<sup>5)</sup>もある。紫外線はこれまで非常に高い耐性をもつものとして信じられてきたが、それは生死判定法での研究であり、近年培養細胞試験を用いた試験結果においては大腸菌と同じほど耐性が弱いとの報告<sup>6)</sup>があり、最も効率の良い消毒処理法として注目される可能性が高い。

筆者の研究室でもクリプトの不活化 (活性を失わせるという意味) に関する研究を行っている。具体的には紫外線処理として、照射パターンやエネルギーなどが異なる新しいタイプのランプを用いて、クリプトの不活化機構に差異が生じるかどうかに関する研究を行っている。また新しい消毒処理法として光触媒を用いた研究も行っており、紫外線単独よりもクリプトの不活化速度が大きく促進されることや、光源によってその不活化促進の程度に差があること等がわかってきている<sup>7)</sup>。

#### 最後に (Conclusion)

以上述べてきたようにクリプトはその生態や取り扱い方が従来の病原細菌や病原ウイルスなどと異なり、未解明な部分がまだまだ多く、今後も研究しなければならない対象であることは間違いない。

またそれと同時にクリプトと同様、従来注目されなかった病原微生物が測定技術の向上や疫学調査の進展により脚光を浴びるかも知れない。衛生工学の研究者としては常に目を光らせている必要があるようだ。

#### 参考文献 (Reference)

- 1) Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, CRC press, 1997
- 2) 水道のクリプトスポリジウム対策、ぎょうせい、1997
- 3) J.B.Rose: J. AWWA 80(2), pp53-58, 1988
- 4) G.Vesey: Int. J. Parasitology, 27(11), pp1353, 1997
- 5) J.L Rennecker: Wat. Res., 34(17), pp4121, 2000
- 6) G.A.Shin: Proc. AWWA Wat. Qua. Tech. conf., 2000
- 7) M.Otaki: Wat.Sci.&Tec., 42(9/10), 2000