

Brackish Water Benthic Shellfish (*Corbicula japonica*) as a Biological Indicator for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in River Water

T. Izumi,¹ Y. Itoh,¹ K. Yagita,² T. Endo,² T. Ohyama³

¹ Section of Drinking Water Chemistry, Division of Environmental Hygiene, Hokkaido Institute of Public Health, North 19, West 12, North Ward, Sapporo 060-0819, Japan

² Laboratory of Protozoa, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku Ward, Tokyo 162-8640, Japan

³ Department of Food Science and Technology, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, 196 Yasaka, Abashiri 099-2493, Japan

Received: 9 July 2003/Accepted: 3 November 2003

The coccidian protozoan genus *Cryptosporidium* belonging to *Apicomplexa* is capable of infecting the gastrointestinal or respiratory tracts of a wide range of vertebrates (Spano *et al.* 1998). Six *Cryptosporidium* species are so far distinguished on the basis of differences in oocyst morphology, site of infection and host specificity (Morgan *et al.* 1995). *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) is particularly considered a significant human and livestock pathogen causing cryptosporidiosis, severe diarrhea, and wasting which is not currently treatable with antimicrobial drugs, as well as no effective vaccine is available (Shianna *et al.* 1998).

Contamination of drinking water with *C. parvum* oocysts from human and animal feces occasionally causes massive outbreaks of cryptosporidiosis (Johnson *et al.* 1995). In present water purification systems, the removal of fine particles such as *C. parvum* oocysts is mainly based on the rapid filtration process utilized widely in Japan. However, the removal of oocysts by filtration is not necessarily complete, and *C. parvum* oocysts are resistant to chlorination (Carraway *et al.* 1996). If the amounts of oocysts in raw water are high and they cross through the filtration barriers, oocysts could become present in the finished water. Reported evidence supporting water-borne transmission of the parasite as an important mode of spreading is present for some documented epidemics (Awad-el-Kariem *et al.* 1994). There are several different methods available for detecting *C. parvum* oocysts in environmental water samples. Most commonly, direct and indirect microscopic visualization of oocysts is carried out using fluorescent dyes or fluorescein-conjugated antibodies (Johnson *et al.* 1995). The immunofluorescence assay (IFA) is a widely used method to detect oocysts in water, however the efficiency of the detection depends on the amount of suspended substances in the water, and this varies greatly according to the natural environmental conditions.

Benthic shellfishes, *Corbicula japonica* (*C. japonica*) live in restricted downstream brackish water areas where the terminal points of the rivers, and feed on suspended plankton by filtration with gills. Hence, *C. japonica* may be a possible biological indicator for net estimates of contamination levels in river water by *C. parvum* oocysts.

This study investigated and evaluated the role and the usefulness of *C. japonica* as a biological indicator or collection system for *C. parvum* oocysts, useful to explore effective, and stable oocysts gathering methods regardless of the surrounding natural conditions.

MATERIALS AND METHODS

C. japonica with body size 33.3–43.1 × 29.6–37.1 × 18.0–24.1 mm and body weight 15.5–16.5 g were collected from the Ishikari River, Hokkaido, Japan. One hundred and fifty individual *C. japonica* clams were placed in a stainless steel cage in a 12 L aquarium which was filled with dechlorinated 10% artificial sea water (Tetra Marinsalt, Tetrawerke, Germany) of pH 7.4 and $d = 1.002$. The aquarium was kept at 15°C with a cooler (RZ-90, REI-SEA, Japan) and an air pump (Inno · β6000, Nisso, Japan) with two stick type air stones set under the stainless steel cage for aeration and circulation of the water. To remove ammonia and nitrites, an adequate amount of oxidizing bacteria (Nisso, Japan) was added to the water. The clams were acclimated for 6 weeks in the aquarium prior to the oocyst introduction, and they were fed daily with liquid-type chaw for invertebrates (Tetrawerke) and a proper amount of chlorella (*Chlorella pyrenoidosa*, Sun Chlorella, Japan) which had a negative IFA reaction against *C. parvum* oocysts. The water of the aquarium was changed daily.

Oocysts of *C. parvum* (bovine type, Lot No.01-6) suspended in storage solution (PBS containing penicillin, streptomycin and gentamicin) from Waterborne Inc. (USA) were stored at 4°C. After 6 weeks acclimation, twenty randomly selected control clams were removed from the aquarium, and the water had 8.75×10^6 oocysts of *C. parvum* (7.29×10^5 oocysts/L, 6.73×10^4 oocysts/clam) added. Ten randomly selected clams of the 130 remaining were examined at 2, 4, 6, 8, and 16 hrs after start of the exposure, and also 1, 2, 3, 4, 7, 10, and 14 days after the *C. parvum* addition. Clam feces at the bottom of the aquarium and 12 L water samples were collected at the time points detailed above.

The shells of the ten removed clams were opened by cutting the anterior and posterior adductor muscles with a scalpel, and the gills, gastrointestinal tract (GI tract) and mantle were excised in centrifuge tubes with PBS (GIBCO BRL, USA), followed by grinding with a mixer (IKA Labor Technik, Switzerland). According to the amount of contaminants, the ground fluids were diluted 100 to 1,000 times with a dilution buffer (B100-20, Waterborne, Inc.). For the DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma, USA) assay, samples were boiled for 5 min (Inomata *et al.* 1999), followed by staining with a direct immunofluorescent assay kit (Aqua-Glo G/C Direct, Waterborne, Inc.) and DAPI treatment in a shaking water bath incubator at 37°C. The treated samples were applied on four well microscope slides (C. A. Hendley Ltd, U.K.), dried in an incubator at 37°C, and DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane, Sigma)-glycerine was added dropwise. The identification and determination of *C. parvum* oocysts were carried out under a fluorescence microscope (ECLIPSE E800, Nikon, Japan) with 200 times magnification. The wavelength for detection of *C. parvum* oocysts were 450–490 nm (B excitation) for FITC (fluorescein isothiocyanate), 365 nm for DAPI, and 510–560 nm (G excitation) for chlorophyll in algae.

The staining treatment of *C. parvum* oocysts in the collected clam feces sediment was conducted in the same manner as described above, while the water sample was processed by a mixed cellulose ester membrane filter (A100A090C, ADVANTEC, Japan) dissolution method, followed by acetone dissolution, the removal of contaminants by the Percoll (Pharmacia Biotech, USA)-sucrose density gradient method and the staining with

fluorescence dyes in a manner similar to that above. Recovery efficiency of the *C. parvum* oocysts in water samples was determined by adding 1.0×10^3 *C. parvum* oocysts to 6 L of water.

The *in vitro* qualitative detection of infectious *C. parvum* oocysts with cultured cells (HCT-8) was carried out according to the procedure reported previously (Hirata *et al.* 2001; Slifko *et al.* 1997; Upton *et al.* 1995). Thus, feces on day 3 pooled in PBS was prepared for purification of *C. parvum* oocysts by the density gradient method, thereafter the purified oocysts were processed with acid and a succeeding 30 min trypsin (DIFCO, USA) treatment, before subjection to the *in vitro* cultured cell method for the detection of infectious *C. parvum* oocysts. The sporozoites in HCT-8 cells were stained with immunofluorescent agents (Sporo-Glo, Waterborne, Inc., USA) and observed under the fluorescence microscope with 200 times magnification.

An aliquot of the fecal sample at 14 days was analyzed for *Cryptosporidium* DNA by PCR, using TRAP-C2-F (CAT ATT CCC TGT CCC TTG AG) and TRAP-C2-R (TGG ACA ACC CAA ATG CAG AC) primer pair (Science Tanaka, Japan) corresponding to positions 848-867 on the coding strand and 1180-1199 on the negative strand of GenBank sequence X77586, respectively. Purified oocysts were rinsed twice by repeated suspension in 100 μ L sterile distilled water, and the aliquot (10 μ L) was subsequently subjected to DNA extraction. The oocysts were ruptured by 1.0% SDS (GIBCO BRL) in TE buffer (Nippon Gene, Japan) at 100°C for 30 min and the supernatant was subjected to phenol /chloroform /isoamyl alcohol (24/24/1, GIBCO BRL) extraction, precipitated with absolute ethanol (Wako Pure Chemical Industries, Japan), washed with 70% ethanol, and resuspended in TE buffer. The PCR reaction in a total volume of 30 μ L consisted of 1 \times PCR buffer (Clontech, USA), 0.2 mM each dNTP (Clontech), 0.2 μ M of each specific primer, 2.5 U of Taq polymerase (Promega, USA) with antiTaq (Clontech), and 50 copies of internal control. After an initial hot start with both 5 min at 80°C and 5 min at 94°C, DNA amplification was carried out for 30 cycles, each consisting of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 52°C for 30 sec and extension at 72°C for 1 min in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin-Elmer, USA). An additional cycle of 7 min at 72°C was added for strand completion. The PCR products (369 bp) were analyzed by 3.0% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. For the internal control (IC:542 bp), it was prepared from the PCR product (369 bp) and the fragment (173 bp) of the *Bss*HIII digested and Klenow blunted multiple cloning site from pBluescript KS⁻ by the rapid DNA Ligation Kit (Roche, Switzerland).

The measurement of metals (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, and Zn) in the water sample was performed by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES, OPTIMA 3300DV, Perkin-Elmer) (Greenberk *et al.* 1992). The sample water was pretreated with 1% HNO₃ and 0.1 mg/L yttrium as the internal standard, then subjected to ICP-AES under recommended conditions. The determination of nitrogen derived from ammonia and nitrites in the aquarium was carried out according to the indophenol and colorimetric methods (Greenberk *et al.* 1992), respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

It is not simple to keep benthic freshwater or brackish water shellfishes for appropriately long periods in an artificial environment. Therefore, several daily basic check points for shellfish keeping were observed, removal of ammonia and nitrites, the temperature and pH of the aquarium water, aeration and stirring of the water, the choice of clam chow, and the amount of daily chow consumption by clam *etc.* The clam mortality was below 2% for more than 4 months in this laboratory aquarium. In this study, clam mortality was zero during both the acclimation and experimental periods.

The metal concentrations, which might influence on the water organisms, in the aquarium water were maintained during the experimental period and were as follows: Al, 0.034 ± 0.005 ; Ba, 0.009 ± 0.001 ; Ca, 80.5 ± 0.550 ; Cd, <0.001 ; Cr, <0.001 ; Cu, 0.015 ± 0.003 ; Fe, 0.021 ± 0.001 ; Mg, 144 ± 5.00 ; Mn, <0.001 ; Pb, <0.001 ; and Zn, 0.010 ± 0.002 mg/L. The nitrogen values of ammonia and nitrites, which were both harmful to clam, were below the detection limit (0.05 and 0.005 mg/L, respectively) during the experiments. The filtration method could not be adopted for trapping of ammonia and nitrites to avoid the absorption of oocysts by filter fiber, while application of oxidizing bacteria might be considered to be adequate judging from the almost perfect removal of ammonia and nitrites in the aquarium during the experimental period.

Feeding to clam was conducted daily 30 min after water exchange. The chow was freshly prepared everyday by suspending powdered chlorella and liquid-type chow in water, while the appropriate daily amount of chow was presumed to be 1.5–2.0 mg/clam for powdered chlorella, and 1.0–1.5 μ L/clam for liquid-type chow, respectively, estimated by the chow consumption and residue in the aquarium.

Recovery efficiency of *C. parvum* oocysts in the water samples by the mixed cellulose ester membrane filter dissolution method was ranged from 71 to 78% (mean \pm SD = $74.1 \pm 5.8\%$, CV = 8.0%).

None of the control clams contained *C. parvum* oocysts, confirmed by both microscopic and PCR methods. The aquarium water was oocyst-negative before the start of the experiment.

The study showed that a single exposure of *C. parvum* oocysts (6.67×10^4 oocysts/clam) to *C. japonica* resulted in a relatively rapid intake and excretion of oocysts. Fig. 1 shows the results of the balance study on the percentage of *C. parvum* oocysts detected in clam bodies and feces. The oocyst intake to the clam body was rapid, and practically no oocysts were detected in the water 2 hrs after dose. The oocysts in the clams were almost all in the GI tract, and here reached the maximum at 2 hrs after dose, thereafter they gradually reduced (Fig. 1-A, and -B). The oocyst distribution in the shellfishes 2 hrs after exposure showed that about 90% of the dose was present in the GI tract, 5.0% in the mantle (Fig. 1-B, and -D) and 0.1% in the gills (data not shown). The excretion of oocysts into feces was the predominant route and about 85% (83.4 and 1.2% in the feces and water, respectively) of the oocysts were recovered 4 days after exposure (Fig. 1-E). The total recovery of oocysts was 90% 14 days after exposure. As shown in Fig. 1-F, the oocyst excretion in feces can be presumed to start more than 4 hrs after exposure, and reaches the maximum excretion level at 8 hrs after exposure. The biological half-life ($T_{1/2}$) for the *C. parvum* oocysts in the clams was estimated to be about 24 hrs. The oocysts were excreted into feces in several phases, more rapid in the first phase, and 6 days after exposure (end of the last phase), little of the oocysts

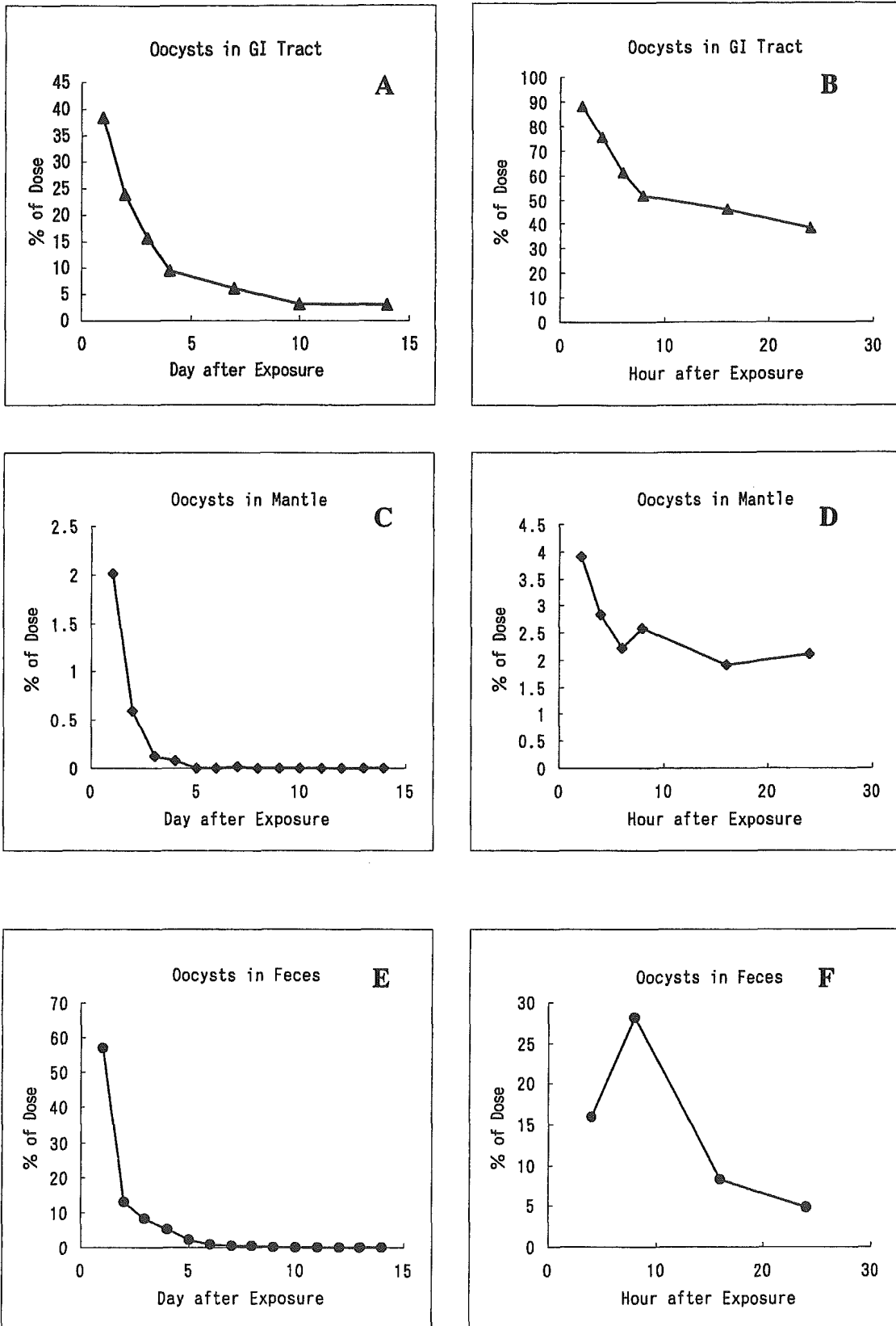


Figure 1. The relative amounts of oocysts detected in the clams and feces after a single exposure of *Cryptosporidium parvum* oocysts to *Corbicula japonica* at 6.67×10^4 /clam.

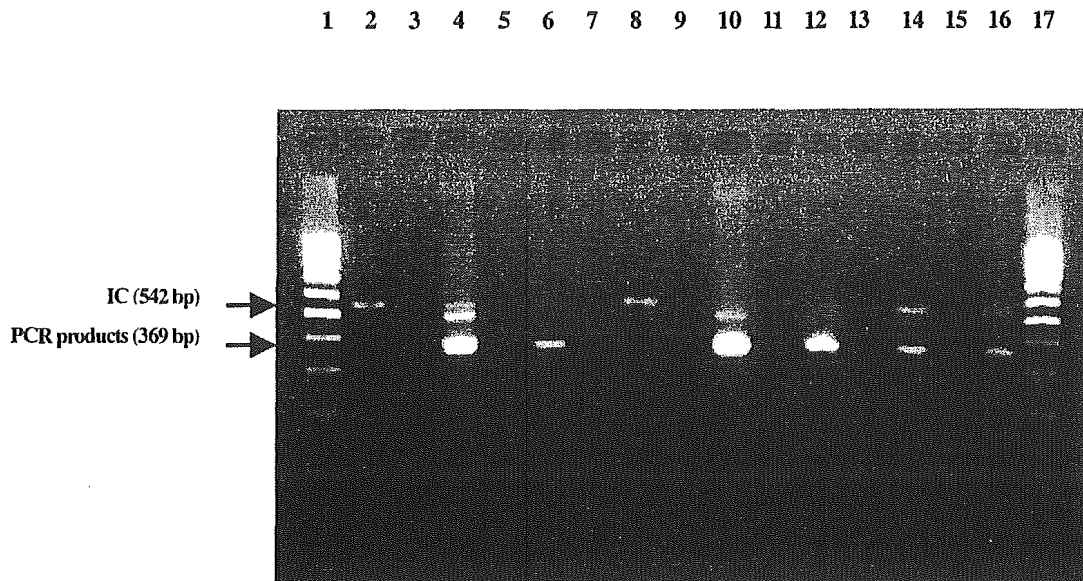


Figure 2. Ethidium bromide-stained 3.0% gel showing the amplification products using trap-C2 primers from clam fecal and GI tract samples.

Lane 1; molecular marker, **lane 2;** negative control, **lane 4;** fecal sample on 1 day after dose, **lane 6;** fecal sample on 6 days after dose, **lane 8;** fecal sample on 14 days after dose, **lane 10;** GI tract sample on 1 day after dose, **lane 12;** GI tract sample on 7 days after dose, **lane 14;** GI tract sample 14 days after dose, **lane 16;** positive control, **lane 17;** molecular marker

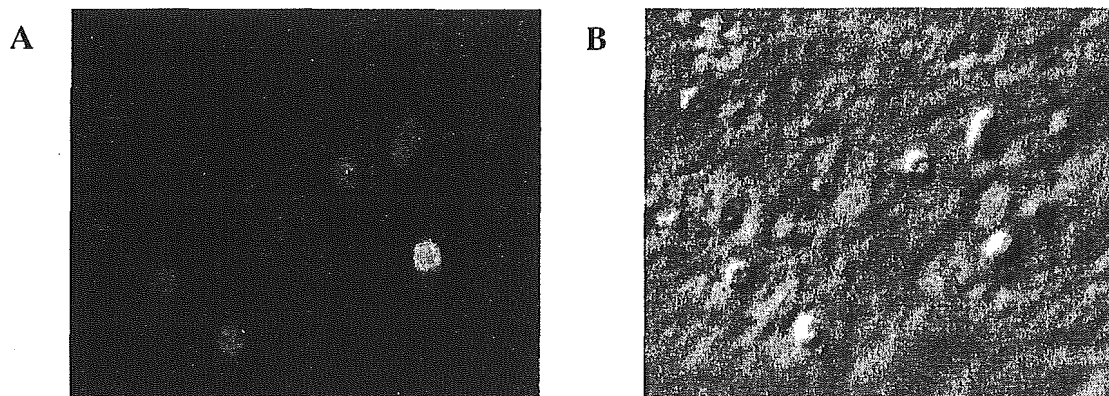


Figure 3. Photographs of developmental stage of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells 2 days after inoculation.

A: Fluorescence photograph of a field of foci after 2 days of inoculation.

B: Normarski interference-contrast photomicrograph of the field in panel A.

were detected, while, the DNA of *C. parvum* was detected by PCR (Fig. 2). The density of oocysts determined in the clam GI tract and mantle samples was highest 2 hrs after exposure (Fig. 1-B, and -D), almost no oocysts were detected in the gills (<0.01% of dose) during the whole of the experimental period. The oocyst decrease in the GI tract during the first 24 hrs showed two phases, with the decrease in the first 6 hrs steeper than later. One day (24 hrs) after the dose, the level of oocysts in the GI tract decreased further in two

phases, and the decrease in the first 3 day phase was more rapid than later. The slope of the curve in the second later phase was quite flat and appeared to reach a plateau level 10 days after exposure. Overall, the decrease in oocysts in the GI tract appeared to correspond to the fecal excretion in both magnitude and pattern of reduction. For the GI tract, the oocyst residue levels 7 and 14 days after exposure were 6.1 and 3.1% of the dose, and the DNA of *C. parvum* was identified by PCR (Fig. 2). The mantle showed very low oocysts residue levels, and the microscopic examination of the samples 4 days after exposure found no oocysts.

With respect to the infectious activity of *C. parvum* oocysts in the fecal samples, it was shown that the rate of excystation under the experimental condition here was about 70%, and that sporozoites were detected in HCT-8 cells 2 days after inoculation, proving that there are infectious oocysts in the clam feces (Fig. 3).

According to these results, it was presumed that a part of oocysts (about 3%) might nonspecifically adsorb to the GI tract. The present study also showed that the total amount of excreted and clam-retained oocysts was totally about 92%, which was about 8% less than the initial introduced oocyst dose. This may partly be accounted for by the absorption of oocysts by aquarium equipment. Thus far it was reported that *C. parvum* oocysts maintained infectivity for up to 1 year in seawater at 6–8°C, and oocysts captured by mussels, seawater shellfish, retained the infectivity for about 14 days in the clam body (Tamburrini and Pozio 1999), however, the infectivity of oocysts in the feces of shellfish was not yet clarified. As judged by a balance study and infection test to the cultured cells (HCT-8), most of the *C. parvum* oocysts appeared not to be readily digested by clams, and seemed to be excreted in feces with almost intact infectivity. These results suggest that estuarine shellfish may be useful to recover *C. parvum* oocysts from water samples by fecal sedimentation.

The present study indicated that *C. japonica* may serve as an effective scavenger of *C. parvum* oocysts, and that this brackish water clam could be employed as a biological indicator of contamination in river water by *C. parvum* oocysts. The optimum qualitative detection of *C. parvum* oocysts in *C. japonica* was demonstrated in the present study by screening feces and/or GI tract samples of clams with fluorescence-dye treatment. This could lead to improvements in the accuracy of detection of *C. parvum* oocysts especially in turbid water samples, where it is difficult to establish the presence of oocysts by routine filtration methods, because of the various other suspended substances.

A study on the recovery of *C. parvum* oocysts in Asian freshwater shellfish, *Corbicula fluminea* (*C. fluminea*) has been reported, however, no precise balance study of oocysts was carried out (Graczyk *et al.* 1998). The present study may be the first balance study report of *C. parvum* oocysts in bivalves. With respect to clam tissue residue of *C. parvum* oocysts, the present study showed much lower residual magnitudes in the GI tract and gills through the experimental period than in the previous reports on *C. fluminea* (Graczyk *et al.* 1998). Further, from the balance study, the *C. parvum* oocysts seemed to be harder to digest in *C. japonica* than in *C. fluminea* (Graczyk *et al.* 1998). A mortality of 10% in the above-mentioned study with *C. fluminea* seems too high. Under inadequate circumstances, shellfishes are liable to assume a fasting state and mortality would increase significantly, hence the high clam mortality (about 10%) may be presumed to be caused by inappropriate

conditions, and the differences in the retention and digestion of *C. parvum* oocysts in *C. japonica* and *C. fluminea* may be due to both biological metabolic species differences in metabolism and also in the aquarium conditions, involving the water-filtration system for removal of waste, which would affect the recovery of oocysts by its adsorptive function on glass fibers (Kawasaki 1998).

Several reports on the harboring of *C. parvum* oocysts in seawater clams, such as oysters, mussels, and cockles, were recently presented (Fayer *et al.* 1998; Gomez-Bautista *et al.* 2000), and it was shown that some tissue would be of retaining some oocysts. However, no quantitative time-course balance study has been carried out so far. Successive administration of *C. parvum* oocysts to shellfish would be required to clarify and assess water contamination by *C. parvum* oocysts as a bioindicator, as water pollution with *C. parvum* oocysts is not usually a short term phenomenon, but tends to last more than a few days. In addition, other experimental conditions, such as temperature, salt concentration of the water, and size of clams *etc.*, that may have an effect on clam metabolism, should be taken into account. Further, other benthic organisms, e.g. *Corbiculidae* and *Unionidae* clams *etc.* should be investigated as bioindicators. At present, we are investigating these subjects with *C. japonica* and other benthic freshwater organisms.

Corbicula clams are consumed after heat treatment, at least in Japan, so it may be assumed that there is practically no epidemiological danger of these shellfish to act as a reservoir of *C. parvum* and some helminths. However, some waterfowl, e.g. bay ducks and sea ducks *etc.*, have been reported to feed on these shellfishes (Nakamura and Nakamura 1995; Robbins *et al.* 1983), and these wild animals may act as carriers of *C. parvum*. In the same manner, *C. japonica* may play an epidemiologically important role as a reservoir of *C. parvum* in the natural food chain in some cases.

Acknowledgments. We thank the staffs of the laboratory of protozoa of NIID for the technical support and assistance. We are deeply indebted to Prof. T. D. Christensen for the English version.

REFERENCES

- Awad-el-Kariem FM, Warhurst DC, McDonald V (1994) Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitology* 109:19-22
- Carraway M, Tzipori S, Widmer G (1996) Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. *Appl Environ Microbiol* 62:712-716
- Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA (1998) Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 64:1070-1074
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E (2000) Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol* 66:1866-1870
- Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, Conn DB (1998) Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl Environ Microbiol* 64:427-430
- Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD (1992) Standard Methods for the Examination of

- Water and Wastewater (18th. ed.). American Public Health Association, Washington, D.C. American Water Works Association, Denver. Water Environment Federation, Alexandria
- Hirata T, Shimura A, Morita S, Suzuki M, Motoyama N, Hoshikawa H, Moniwa T, Kaneko M (2001) The effect of temperature on the efficacy of ozonation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Sci Technol* 43:163-166
- Inomata A, Oshimi A, Tanaka S (1999) Investigation of DAPI staining method of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Japan Water Work Assoc* 68:32-36
- Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB (1995) Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* 61:3849-3855
- Kawasaki E (1998) The improvement of examination for detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *J Water Waste* 40:60-62
- Morgan UM, Constantine CC, O'Donoghue P, Meloni BP, O'Brien PA, Thompson RCA (1995) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from Human and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *American J Trop Med Hyg* 52:559-564
- Nakamura T, Nakamura M (1995) Birds life in Japan with color pictures (Birds of marsh, shore and ocean). Hoikusha Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- Robbins CS, Bruun B, Zim H (1983) *Birds of North America*. Golden Books Publishing Company, Inc., New York
- Shianna KV, Rytter R, Spanier JG (1998) Randomly amplified polymorphic DNA PCR analysis of bovine *Cryptosporidium parvum* strains isolated from the watershed of the Red River of the North. *Appl Environ Microbiol* 64:2262-2265
- Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W (1997) An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl Environ Microbiol* 63:3669-3675
- Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan UM, Le Blancq SM, Tchack L, Tzipori S, Widmer G (1998) Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J Clin Microbiol* 36:3255-3259
- Tamburrini A, Pozio E (1999) Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Parasitol* 29: 711-715
- Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB (1995) Effect of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J Clin Microbiol* 33:371-375

病原微生物対策への理解に向けて

Safe Drinking-Water : for the Control of Microbial Hazards

遠藤 卓郎* 泉山 信司*

水道が多数の利用者に病原微生物を運び、病気を起こす可能性については、国の経済状態のいかんを問わず、どこの国においてもよく知られる事実である。水道における病原微生物汚染の特徴は種類も量もともにつねに変化していることで、また、水道事故の常として、広い範囲に被害が及ぶ。したがって、社会生活への影響は甚大である。

欧米諸国におけるリスクを基にした管理では、汚染許容濃度すなわち患者発生数の許容範囲を定めて、その範囲内に汚染を抑えることを行なう。しかし、病原微生物の許容汚染濃度を設定するさいに絶対値が存在しているわけではないため、目標値は技術的に到達可能な除去効率から算出され、患者発生に伴う経済的損失と、患者発生を回避するために必要となる設備投資とを比較する経済論が背景にあると理解している。無遠慮なリスク論を展開すれば、経済を優先させるあまり不平等が生ずる事態を回避できなくなるおそれがある。

感染症を論ずる場合、個々の疾病の易伝染性(二次感染の確率)も重要な要素の1つである。治癒することを前提にすれば、二次感染を防ぐことで流行は収束する。併せて、つねに健康弱者への配慮が求められよう。経済論から離れて、このような感染症の特性を考慮しつつ許容感染リスクを設定していかなければならないものと考えている。

Key words : 病原微生物, ふん便汚染, 大腸菌, 原虫類, 指標, リスク評価, 許容汚染濃度

1. はじめに

飲料(水道)水の微生物学的品質は、消費者のみならず、供給側および監督官庁などにとってきわめて関心の高い問題である。水道が多数の利用

者に病原微生物を運び、病気を起こす可能性については、国の経済状態のいかんを問わず、どこの国においてもよく知られる事実である。米国ミルウォーキーにおける1993年のクリプトスポリジウム集団感染は、くしくもインパクトの強い実例

* Takuro ENDO, Shinji IZUMIYAMA, 国立感染症研究所寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan (E-mail : tendo@nih.go.jp)

を提供してくれたが、実に40万人に及ぶ住民が罹患したとされる¹⁾。この罹患者数に関しては過大評価であるとの指摘²⁾もあるが、大規模水系感染の事実が変わるわけではない。もっと新しくは、カナダのオンタリオ州で起きた出血性大腸菌 O157H7による水系集団感染では2,300名以上が感染し、6名の犠牲者を出している。世界各地から頻繁に寄せられる水系感染の報告は、現代社会にあってなおかつ水道水を介した水系感染の脅威を示すものである。わが国でもこれまでにクリプトスポリジウム症の水系感染事例が2件起きており、けっして対岸の火事では済まされない³⁾。

水系感染事例の報告は、むしろ実態を過小評価しているものとする意見が多く、実態把握の難しさも合わせて指摘されている。おそらく水系感染の患者は、いわゆる患者を対象とした疫学調査ではほとんど把握できないものと考えべきなのかも知れない。水系感染のおもな疾患は胃腸症で⁴⁾、一般的には比較的症状が軽く、数日から10日間程度で治まるものが多い。したがって、胃腸症に罹患したとしてもごく限られた患者が医療機関を訪ねるに過ぎず、その原因の検索にまで至る例はさらに少ない。

水道における病原微生物汚染の特徴は、種類も量もともにつねに変化していることで、そのなかにはわれわれが知らないものもあり、検出できるものばかりとは限らない。病原微生物の影響は短期暴露によって生じることが多く、また、水道事故の常として、広い範囲に被害が及ぶ。したがって、社会生活への影響は甚大である。

クリプトスポリジウム等の塩素耐性を示す病原体による集団感染が認識される以前は、水道水の微生物汚染対策はもっぱら細菌学的な見地からの取組みであったといえる⁵⁾。その意味で塩素消毒の果たしてきた役割は、きわめて大きいものがあった。また、今後ともその評価に変わりはない。しかしながら、クリプトスポリジウム問題を契機として水道の世界が新たな局面を迎えたことは事実である。

2. 指 標

わが国を含めた多くの国で微生物学に係わる水

質基準項目が設定されているが、化学物質等の水質基準項目と異なり、例外を除いて特定の病原微生物を検査対象としておらず、その代わりに大腸菌(大腸菌、ふん便性大腸菌群、大腸菌群など)や一般細菌(従属栄養細菌)が設定されている。ところが、微生物学的検査は即時性に欠け、得られた検査結果をもって健康被害を未然に防止することは困難である。

これまであまり話題にされたことはなかったが、いわゆる『指標』という言葉には2通りの意味合いがあり、英語では“Index”と“Indicator”の使い分けがなされている。浅学にして筆者は“Indicator”と“Index”の的確な日本語訳が浮かばないが、“Index”は評価の「対象」の存在(たとえばふん便汚染)を示すものと理解されている。一方、“Indicator”とは「処理効率の評価に用いるもの」で、その存在が「製造管理および品質管理規則(Good Manufacturing Practice)上の不具合を示し、製品に瑕疵が生じている可能性を指摘するものである⁶⁾。これを使い分けるとすれば、“Index”は水質監視と製品管理に重点的に用いられるべき性質のもので、“Indicator”は処理工程監視に用いるべきものといえる。

これまで、ふん便汚染の微生物指標は以下のような特性を目安に探索が進められてきた。そのさい、暗黙の了解として『微生物指標』は“Indicator”と“Index”の両機能を兼備していることが前提となっていたようである。すなわちふん便汚染の『指標』には、以下の性質が求められる。

- ・ふん便汚染のない水には存在せず、汚染された水には存在すること
- ・環境中で増殖しないこと
- ・病原体よりも数が多く存在すること
- ・自然環境中や浄水処理過程で病原微生物と同様の挙動を示すこと
- ・検出や同定、計数が容易であること
- ・検査法は安価で、頻繁に検査が可能であること
- ・(検査担当者の安全性を考慮して)それ自体に病原性をもたないこと

このような条件で水質基準項目の大腸菌の機能/役割を評価すると、ふん便汚染の“index”には

よく合致する。すなわち、大腸菌は、①人や動物のふん便中に多量(10⁹個/g)に存在し、②下水、処理下水あるいは、そんなに遠くない過去にふん便汚染のあったあらゆる水や土壌から検出される、③例外的な報告を除いて環境水での増殖は確認されていない、④大腸菌の検出方法は容易で廉

価な検査方法が確立されている、などの指標の性質を満たしている。また、消毒にも敏感に反応することから、消毒の効果判定の“Indicator”としても用いることができるが、大腸菌はウイルスやクリプトスポリジウムなどに比べてはるかに消毒に弱く、これらの病原体の除去/不活化の効果

表1 微生物指標の例示とその特性(OECD報告書を改変)

指標生物	ふん便汚染との関連性	取り扱い上の危険度	検査に要する時間	費用	難易度	環境中での生残性	消毒耐性
大腸菌群	NA	L	M	M	M	M	L
ふん便性大腸菌群	M	M	M	M	M	M	L
大腸菌	H	M	M	M	M	M	L
ふん便性連鎖球菌	M	M	M	M	M	M	ISD
全菌数(顕微鏡観察)	NA	NA	H	M	M	H	H
生菌数(顕微鏡観察)	NA	NA	M	M	M	H	M
従属栄養細菌	NA	L	M	M	M	H	H
一般細菌	NA	L	M	M	M	H	M
好気性芽胞菌	NA	L	M	M	M	H	H
大腸菌体細胞ファージ	ISD	M	H	M	M	H	M
F-特異RNAファージ	ISD	M	H	M	M	H	H
ウエルシュ菌	H	L	M	M	M	VH	VH
<i>Aeromonas/Pseudomonas</i>	NA	M	M	M	M	VH	L
クリプトスポリジウム・オーシスト	NA	H	L	H	H	VH	H

L: 低い, M: 中程度, H: 高い, VH: 非常に高い, NA: 適用不可, ISD: 情報不足

表2 微生物指標の適用範囲とその価値(OECD報告書を改変)

指標生物	集水域の衛生調査	原水の水質評価	地下水の水質評価	除去効率の評価	消毒効果の評価	浄水の評価	配管系における混入	配管系のバイオフィルム	集団感染調査
大腸菌群	NR	NR	NR	NR	SA	S	SA*	S	S
ふん便性大腸菌群	SA	SA	SA	NR	SA	SA	SA*	S	S
大腸菌	S	S	S	S	S	SA	S*	NA	S
ふん便性連鎖球菌	SA	SA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S
全菌数(顕微鏡観察)	NA	NA	NA	SA	SA	NA	SA	S	S
生菌数(顕微鏡観察)	NA	NA	NA	SA	SA	NR	SA	S	S
従属栄養細菌	NA	NA	NA	S	S	NR	S	S	S
一般細菌	NA	NA	NA	S	S	NR	SA	NA	S
好気性芽胞菌	NA	NA	NA	S	S	NR	NA	NA	S
大腸菌体細胞ファージ	SA	SA	SA	NA	SA	NA	NA	NA	S
F-特異RNAファージ	SA	SA	SA	NA	SA	NA	NA	NA	S
ウエルシュ菌	SA	SA	SA	SA	NA	NA	NA	NA	S
<i>Aeromonas/Pseudomonas</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S	NA
クリプトスポリジウム・オーシスト	S	S	SA	S	NR	NA	NA	NA	S

S: 適当, SA: 適用可能, NR: 不適当, NA: 適用不可, ISD: 情報不足, *: 塩素消毒なしの場合

判定に使用することはできない。すなわち、ウイルスや原虫類を含む広範な病原微生物の“Indicator”としては適正を欠いている。

今日では生物、無生物を問わず多くのものが“Index”や“Indicator”として評価を得ている。無生物の利用も積極的に検討されている。一方、後述するように例外的ではあるが病原微生物そのものが“Indicator”として利用されているケースも知られている。また、水源から蛇口までの系

表3 物理・化学指標の例示とその特性(OECD報告書を改変)

指標物質	検査に要する時間	連続監視/自動測定	費用	難易度
降雨量	H	H	L	L
流速	H	H	L	L
色度	H	H	L	L
pH	H	H	L	L
浮遊物質(懸濁/溶解)	M	L	M	M
電気伝導度	H	H	L	L
濁度	H	H	L	L
粒径測定	H	H	H	H
粒子観察(顕微鏡)	H	L	H	H
残留塩素濃度	H	H	L	L
TOC	M	H	M	M
アンモニア	H	M	M	M

L:低い, M:中程度, H:高い

全体の監視には、場所や状況に応じて多用な指標を積極的に使い分ける努力がみられる⁷⁾。加えて、新興感染症の病原体に対しての新たな検査手法や改良法あるいは、新技術の導入が提案されていることから、検査方法の再評価や指標の正当性について不断の検討が必要となっている。

飲料水中に病原微生物が混入すれば、病気の発生につながる。そのため、安全を確認する方策が必要となる。きわめて多様な病原体(そのほとんどはふん便由来であるが)を監視する必要がある、そのために非病原性の細菌がふん便汚染の指標、“Index”として開発されてきた。本来の目的からすれば、ふん便汚染の“Index”は水質監視と製品管理すなわち、入口と出口に活用されるべきものである。原水の汚染実態を把握して初めて浄水場に必要な施設整備が可能となるわけで、後述するようにクリプトスポリジウム汚染以来この点が強調されている。また、最終産物のモニタリングは長期間の監視システムの評価に有用である。一方、“Indicator”はおもに浄水施設(中間)の工程監視に活用されるべきものと識別される。その役目上、“Indicator”にはとくに以下の諸性質が兼備されていることが望ましい。

- ・即時判定が可能なこと
- ・連続監視が可能なこと
- ・自動測定が可能なこと

表4 物理・化学指標の適用範囲とその価値(OECD報告書を改変)

指標物質	集水域の衛生調査	原水の 水質評価	地下水の 水質評価	除去効率 の評価	消毒効果 の評価	浄水の 評価	配管系 における 混入	配管系の バイオ フィルム	集団感染 調査
降雨量	S	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	S
流速	S	S	NA	NA	S	S	NA	S	S
色度	NA	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	S
pH	NA	NA	NA	NA	S	NA	NA	NA	S
浮遊物質(懸濁/溶解)	S	S	S	NA	NA	NA	NA	NA	S
電気伝導度	S	S	S	NA	NA	NA	NA	NA	S
濁度	S	S	S	S	NA	NA	NA	NA	S
粒径測定	NA	NA	NA	S	NA	NA	NA	NA	S
粒子観察(顕微鏡)	NA	NA	S	NA	NA	NA	NA	NA	S
残留塩素濃度	NA	NA	NA	NA	S	S	SA	NA	S
TOC	S	S	S	NA	NA	NA	NA	S	S
アンモニア	S	S	S	NA	NA	NA	ISD	NA	S

S:適当, SA:適用可能, NR:不適当, NA:適用不可, ISD:情報不足

上記の条件を勘案すると、特定の病原微生物は“Indicator”の概念に合致し難い。それぞれの病原体は消毒耐性や除去効率に違いがあり、いわば汎用性に欠けるからである。たとえば、クリプトスポリジウムが存在しないからといって赤痢菌がないとはいえないのは道理である。現在、病原体そのものを“Indicator”として用いている例は英国でのクリプトスポリジウムのみで、処理の効果判定に用いられている。

参考資料として、表1～4に各種の微生物指標および物理・化学的指標を例示し、その特性や適用範囲等をまとめた。

3. 新たな病原微生物対策

不特定の微生物に対する飲料水のリスク管理の原則は、複数の汚染防止策(複数のバリアー)の実行である。この概念は、単に浄水処理工程に限局するものでなく、水源から蛇口まですべてを包含する取組みでなくてはならない。流域での汚染源と原水水質に関する定量的な情報(原水の微生物学的品質とその変化量)、処理効率および配管系での汚染源とその種類など、すべてが飲料水の安全性を確保する判断材料となる。また、これらの情報は消費者保護のレベルや、設備の脆弱さを評価するうえで重要である。加えて、今日の水道における病原微生物対策は細菌類汚染にとどまらず、多様な病原体への対応に迫られており、より汎用性のある「指標」が求められよう。

具体的に、焦眉の問題としては耐塩素性微生物と配水系での微生物汚染で、前者はクリプトスポリジウムのオーシストやジアルジアのシストによる汚染、後者はレジオネラに代表されるような病原性をもった環境細菌による汚染問題である。これらの汚染微生物の監視体制として適正な“Index”や、“Indicator”としてなにが選択されているかの整理が重要である。

(1) 耐塩素性病原微生物

病原微生物対策の難しさは短期暴露により被害に至ることで、混入を未然に防ぐか消毒により無害化しないかぎり予防策とはならないことにある。ところが、現行の指標菌検査では、配水以前に結果が得られることは望めないし、病原体も配

水以前に検出することは技術的に難しい状況にある。そこで、重要となるのは水源域の汚染調査(水質監視)で、単に定性的な情報にとどまらず定量的な情報が必須である。とくに、取水域の汚染源の把握は原水の汚染レベルと、潜在的な危険(どんなときに危険が増すか)に関する情報が、きわめて重要となる。実態調査による定量的な情報に基づいて初めて浄水処理施設の設計が可能となる。さらに、流域調査を進めて流域管理につなげていく努力が必要で、設備整備か水源保護かの選択は科学的根拠に基づくオプションの提示と、地域住民を交えた判断が至当である。

クリプトスポリジウム等の原虫類対策は、他の多くの病原菌と同様に患者(患者)のふん便中にオーシストやシストが排出されることから、基本的には水道原水のふん便汚染を判断して濁度管理の徹底が図られている。すなわち、原水のふん便汚染の“Index”に大腸菌が用いられるが、上流域に下水処理施設が存在すれば、大腸菌はもはや指標の役をなさない。下水処理には消毒処理が伴っており、消毒に敏感な大腸菌はその時点で指標性を失ってしまうからである。ところで、取水口の上流近傍に処理施設の排出口が存在する場合は、大腸菌の存在を目安にするまでもなく濁度管理が求められている。すなわち、ここでは下水処理場等の有無を汚染の判断基準としており、クリプトスポリジウム問題以来、われわれは流域情報を“Index”として使用している。また、濁度を工程管理の“Indicator”としてきたが、原水濁度はときとしてクリプトスポリジウムの“Index”としても用いられている³⁾。

これまでのクリプトスポリジウムの集団感染事例から学ぶところは、高濃度汚染が一過性、あるいは間欠的に発生している点である。このような異常事態への対処方法は事前と事後に分けられる。望むべくは、上述のように“Index”あるいは“Indicator”による情報から汚染を事前に察知して事故を未然に防ぐことへの努力である。しかしながら、異常事態が発生した場合には、当該事態への速やかな対応が求められる。そのさい、集団感染の汚染源の特定は被害を最小限にとどめるために採るべき最重要課題の一つである。その

ため、各浄水場においては配水の一部あるいはその沈渣を一定期間保存する制度(“Index”の保管)の導入を推進すべきものと考えている。

(2) 配管系内で増殖する病原微生物

今後、注目されるもう1つの微生物問題はレジオネラ等の配管系でバイオフィルムを形成する微生物であろう(Regrowth)。その名のとおり、この汚染は配管系内での微生物の増殖を原因とすることから汚染の進行は緩徐で、さまざまな点で従来のふん便由来の病原微生物と性質を異にしている。現状では、この汚染に対応する『指標』は確立されていないが、残留塩素濃度や一般細菌数、あるいはTOC(Total Organic Carbon; 従来の過マンガン酸カリウム消費量)などが“Indicator”となり得るものと考えられている。これらの“Indicator”を継続的・定期的に検査し、その変化量から配管系等の劣化を評価することが可能であるが、新たに信頼性の高い“Index”および“Indicator”の開発が求められている。

ちなみにこの問題では、同じ微生物でありながら大腸菌はレジオネラ属菌等の『指標』としての適正を欠く。

4. 許容感染リスクの考え方

欧米諸国においては、飲料水の安全性に関して積極的にリスク評価の観点から議論している。わが国においても、化学物質の汚染に関してはすでにリスクの概念を取り入れているところであるが、こと微生物に関しては水道法第4条の精神が尊重されている。とはいえ、現在、微生物学的な安全性は、実質的に水道法第4条の精神を全うできるものか疑問が残るのも確かである。たとえば、きわめて低濃度とはいえクリプトスポリジウム汚染の可能性を否定することはできないし、われわれの知らない(気が付いていない)病原体を、水道水が運んでいる可能性も否定できないであろう。

リスクを基にした管理では、汚染許容濃度すなわち患者発生数の許容範囲を定めて、その範囲内に汚染を抑えることを行なう。ここで問題にすべきは、水道における病原微生物の許容汚染濃度を設定するさいに、絶対値が存在しているわけでは

ないことである。もし、あるとすれば、わが国の水道法第4条に謳われているように、あくまで“Zero Risk”とするのが理想である。クリプトスポリジウムの年間許容感染リスク 3.7×10^{-4} 以下を当面の目途としている米国環境保護庁(EPA)も、この基本理念は捨てていない⁸⁾。

最もよく知られた病原体の監視体制は、英国におけるクリプトスポリジウムに関するもので、危険度の高い水域にある給水事業体は1,000l 当たり100個以上のオーシストが含まれる水道水を供給してはならないとされ、違反者は刑事罰の対象となっている。しかしながら、この基準値は住民の健康調査を基に算出されたものではなく、むしろ処理操作上の観点から決められたものである。したがって、具体的に基準値と公衆衛生上の危険度との間に相関関係を求めるのは難しい⁹⁾。ちなみに、米国EPAが提言するクリプトスポリジウムの年間許容感染リスクは、表5の条件から算出されたものである⁸⁾。

すなわち、英国の例と同様に、目標値は技術的に到達可能な除去効率から算出されたものといえる。実際的には、患者発生に伴う経済的損失と、患者発生を回避するために必要となる設備投資とを比較するという経済論が背景にあると理解している。理論的には、すべての浄水施設に膜処理を導入すればクリプトスポリジウム問題は解決するのも知れない。しかし、現実社会では経済問題を避けて通るわけにはいかない。ただ、無遠慮なリスク論を展開すれば、経済が優先するあまり不平等が生ずる事態を回避できなくなるおそれがある。また、弱者切り捨てにつながりかねない。ここでも、地域住民を交えた判断が必須となる要素がある。

表5 米国EPAのクリプトスポリジウムの年間許容感染リスクの算出条件⁸⁾

1人当たりの1日の飲水量	1.2l
1個のオーシストの接種による感染リスク	0.09(9%)
原水中の平均オーシスト数	0.1~0.01オーシスト/l
平均の除去率	$\approx 3 \log(99.9\%)$
年間感染リスク	3.7/10,000人

それでは公衆衛生的見地に立った許容感染リスクとはどのように設定すればよいのであろうか。

漠然とではあるが、筆者らは水道を介した感染が、「地域におけるその疾病の増加に寄与しない値」ではないかと想像している。感染症を論ずる場合には、個々の疾病の易伝染性(二次感染の確率)こそが重要な要素である。治癒することを前提にすれば、水系感染であろうが食品由来の感染症であろうが、あるいはその他の場合であっても、二次感染を防ぐことができれば流行は収束する。経済論からは離れて、このような感染症の特性を考慮しつつ許容感染リスクを設定していかなければならないものと考えている。

—参考文献—

- 1) Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P.: A Massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, *New England Journal of Medicine*, 331 (3) 161~167 (1994).
- 2) Hunter, P. R., Syed, Q.: Community surveys of self-reported diarrhea can dramatically overestimate the size of outbreaks of waterborne cryptosporidiosis, *Water Science and Technology*, 43, 27~30 (2001).
- 3) 金子光美編:水道のクリプトスポリジウム対策 [改訂版] —暫定対策指針の解説—, pp.160, ぎょうせい, 東京(1999).
- 4) Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCraig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V.: Food-Related Illness and Death in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, 5 (5) 607~625 (1999).
- 5) 上水試験方法・解説編 2001年版, p.805~866, 日本水道協会, 東京(2001).
- 6) Mossel, D. A. A.: Index and indicator organisms: a current assessment of their usefulness and significance, *Food Technology, Australia*, 30, 212~219 (1978).
- 7) Payment, P., Waite, M., Dufour, A.: Introducing parameters for the assessment of drinking water quality, In *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*, p.47~77, OECD /WHO (2003).
- 8) U. S. Federal Register, 68 (154) 47640~47674 (2003).
- 9) Hunter, P. R.: Advice on the response to reports from public and environmental health to the detection of cryptosporidial oocysts in treated drinking water, *Communicable Disease and Public Health*, 3, 24~27(2000).

話題の感染症

ジアルジア症

Giardiasis

えん どう たく ろう¹⁾ くろ き とし ろう²⁾ いづみ やま しん じ¹⁾
 遠 藤 卓 郎 : 黒 木 俊 郎 : 泉 山 信 司
 Takuro ENDO Toshiro KUROKI Shinji IZUMIYAMA

要 旨

ジアルジア症はランブル鞭毛虫の感染に起因する疾患で、水や食品を介して感染する代表的な原虫感染症である。ランブル鞭毛虫はヒトや動物の上部消化管の腸管腔に寄生し、患者や感染動物の糞便中には感染性を持ったシストが大量に排出される。本原虫の感染様式は典型的な糞一口感染で、シストを経口摂取することにより感染する。その際、水や食品を介して伝播し、しばしば集団感染が問題となる。発展途上国においては主要な下痢症の1つであり、工業先進国においても渡航者下痢症、性感染症あるいは水系感染症として注目されている。近年の分子疫学的解析により、ヒトへの感染は限られた遺伝子型の原虫によること、その遺伝子型の原虫はヒトと動物にまたがった宿主域を有することなどが明らかになっている。

はじめに

ジアルジア症は下痢を主徴とする原虫感染症で、ランブル鞭毛虫が原因病原体である。ランブル鞭毛虫の記載の歴史は古く、Antony van Leeuwenhoekは1681年に自身の便中にランブル鞭毛虫を観察したことを報告している。その後19～20世紀にかけて学名が与えられ、公衆衛生上あるいは臨床上の問題として認識されるようになった。

ランブル鞭毛虫は世界中に分布しているが、特に熱帯から亜熱帯にかけての衛生状態の悪い地域で多

くの患者がみられる。WHOの報告では、アジア、アフリカおよびラテンアメリカにおいて2億人が罹患しており、毎年50万人の患者が新たに発生しているとされている¹⁾。一方で、工業先進国においても水道水やレクリエーション施設を介した集団下痢症の発生あるいは、保育所(child-care center)における集団感染が報告されており、再興感染症のひとつに挙げられている。わが国でも毎年患者の発生がみられるがその大半は海外で感染したもので、渡航者下痢症としての意味合いが強い。

I. ランブル鞭毛虫の生物学

ランブル鞭毛虫の学名は統一されておらず、*Giardia lamblia*, *G. intestinalis*, *G. duodenalis* が用いられている。これらはいずれも synonym で、*G. intestinalis* に命名規約上の優先性があるとされる。一方、わが国と米国では医学分野を中心に相変わらず「ランブル鞭毛虫(*G. lamblia*)」が用いられており、小文ではこれを踏襲することとした。ランブル鞭毛虫は動物性鞭毛虫の1種で、ディプロモナス目に属する。*Giardia*(属)には *G. agilis*, *G. muris*, *G. lamblia* の3形態種が知られている。ヒトに寄生するものはそのうちのランブル鞭毛虫のみである。ディプロモナス目の原虫類は細胞核を2個持つという特徴がある。ランブル鞭毛虫を含め、このグループの原虫(トリコモナスやヘキサミタなど)は細胞小器官であるミトコンドリアを持たないという特徴を有している。ミトコンドリアは進化の過程において呼吸機能を持つ細菌が共生したものとされてい

1) 国立感染症研究所 寄生動物部

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

2) 神奈川県衛生研究所 微生物部

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1

1) National Institute of Infectious Diseases

(1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo)

2) Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

(1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa)

る。したがって、ミトコンドリアを持たない原虫は呼吸細菌が共生する以前の生物であると考えられていた。しかし、最近の研究によると、ミトコンドリアを獲得したものの進化の過程で再び失ったのではないかとする意見が評価を得つつある。

ランブル鞭毛虫の生活環は単純で、栄養体とシストの2形態からなる。栄養体は $6\sim 10\mu\text{m} \times 10\sim 15\mu\text{m}$ で左右対称の洋梨形をしている(図1)。常に2個の核と4対の鞭毛を持つ。腹部の体前方から中央にかけて大きな吸着円盤を持ち、これで消化管の管腔内壁に付着する。十二指腸から小腸上部、時には胆管や胆嚢の内壁にまで寄生部位を広げる。栄養体は増殖期であり、無性生殖(2分裂)により増殖する(図2)。有性生殖期は存在しない。シストは $5\sim 8\mu\text{m} \times 8\sim 12\mu\text{m}$ のラグビーボール形で、その内部には4個の核と鞭毛、曲刺、等々と呼ばれる細胞小器官が観察される(図3)。シスト壁に守られて外部環境に対して強い耐性を示す。シストは

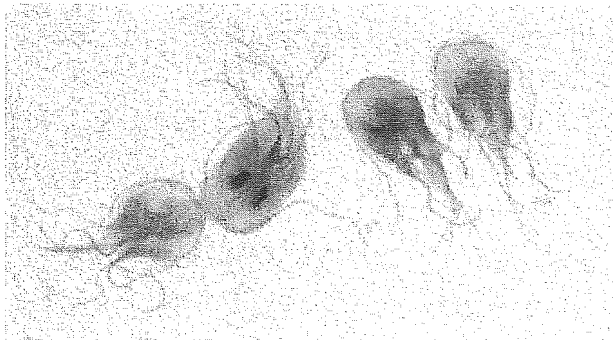


図1 ランブル鞭毛虫栄養体のギムザ染色標本
栄養体は $6\sim 10\mu\text{m} \times 10\sim 15\mu\text{m}$ で左右対称の洋梨形をしている。栄養体は常に2個の核を有し、後方に伸びる4対の鞭毛、中央小体等が観察される。

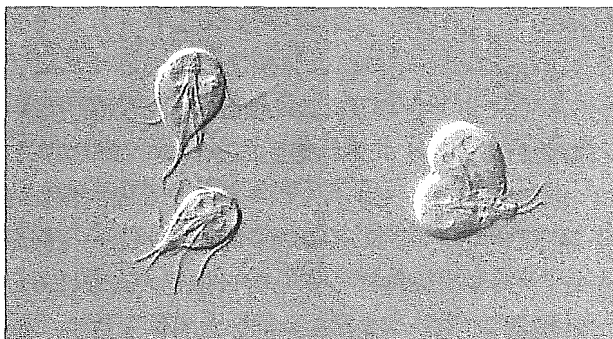


図2 ランブル鞭毛虫栄養体と分裂像(微分干渉顕微鏡像)

ランブル鞭毛虫には有性生殖期は存在せず2分裂により増殖する。右は分裂途中の栄養体。

2個の核、4対の鞭毛、中央小体等が観察される。

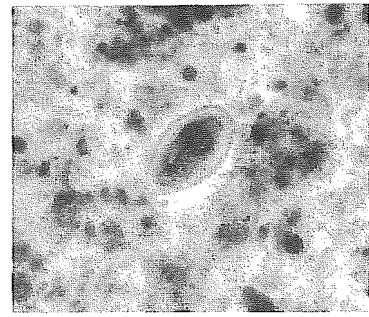


図3 ランブル鞭毛虫囊子のコーン染色標本
囊子内には核と鞭毛、曲刺などの微細構造が観察される。

休止期であって、シスト内で虫体が増殖したりシスト自体が分裂したりすることはない。シストは糞便とともに体外に排出され、新たな宿主に経口的に摂取される機会を待つ。

Ⅱ. ランブル鞭毛虫の宿主特異性

近年、抗原性、アイソエンザイム、カリオタイプあるいは、塩基配列といった生化学的手法や遺伝学的手法を取り入れて、異なる動物に寄生する株の相違(型別)が検討されている。これらの手法により種内に種々のタイプが存在することが明らかになり、宿主特異性と関連付けた情報も集まりつつある。

この間の経緯を見ると、ランブル鞭毛虫のタイプの解析には種々の手法が用いられて来た。アイソザイム解析(Multilocus enzyme electrophoresis: MLEE)では、glutamate dehydrogenaseなど二十数種の必須酵素が解析対象となっている。MLEEに限らず、抗原性解析やカリオタイプ解析といった方法はそれ自体が煩雑なうえに解析に先立って大量の虫体を得るという工程が必要なため、研究報告も限られていた。近年では、少量の虫体を用いて解析が可能となるという利点を生かして、PCR法に基づくDNAの解析法が多用されている。PCR法を応用した型別法では、triose phosphate isomerase (TPI) 遺伝子²⁾や glutamate dehydrogenase (GDH) 遺伝子³⁾などの酵素に関与する遺伝子や giardin 関連遺伝子が対象となっている⁴⁾。Giardinは約29-38kDaの α コイルドヘリックス構造を持つ構造蛋白質で、栄養体の吸着盤を形成するマイクロリボンに含まれている。複数の遺伝子が関連しているが、型別には β -

表1 *Giardia lamblia* の遺伝子型と宿主動物

遺伝子型	宿主動物
assemblage A I	ヒト, 家畜類, イヌ, ネコ, ビーバー, モルモット, スローロリス
assemblage A II	ヒト
assemblage B	ヒト, フクロテナガザル, イヌ, ラット, ビーバー, スローロリス, チンチラ
assemblage C	イヌ
assemblage D	イヌ
"Hoofed livestock"	有蹄類
"Cat"	ネコ
"Rat"	ラット (domestic rats)
"Wild rodents"	マスカラット ノネズミ (voles)

giardin がターゲットとされている。これらの遺伝子解析により、複数の遺伝子型が特定され(表1)⁵⁾、ヒトから分離される株はこのうちの2グループ、すなわち Assemblage A と Assemblage B に属していることが明らかになった。さらに、遺伝子型により宿主特異性が異なり、Assemblage A のサブグループ A I と Assemblage B に属する原虫は、ヒトやイヌ、ネコ、ウシやブタなどの家畜、げっ歯類などの広範囲の哺乳類に寄生することが分かった。これに対して、Assemblage A のサブグループ A II はヒトに限定されている。そのため、人獣共通感染症であれば、Assemblage A I と Assemblage B が圧倒的に重要となる。

ヒト以外の各種哺乳類から分離されたランブル鞭毛虫の中には、Assemblage A あるいは Assemblage B 以外の遺伝子型に属するタイプが報告されているが、現時点では研究者により名称が異なり、表1に示した表現あるいは Assemblage E, F および G が用いられている。いずれにしても、これらの遺伝子型に属する株の宿主域は限定的で、ヒトからは分離されていない。

Ⅲ. ジアルジア症の症状と病原性

ジアルジア症の症状は、無症状や軽度のものから重篤な状態まで広範囲にわたる。主な症状は、軽度であれば下痢や腹痛、食欲不振、悪心、腹部不快感、鼓腸等であり、重篤になると栄養不良に至る。下痢は泥状便や粘性便から水様便に至るが、基本的には非血性である。また、ジアルジア症特有の悪臭を放つ脂肪便も観察される。小児は成人よりも症状

が重くなる傾向がある。胆管や胆嚢にまで寄生が及ぶと、上腹部痛や発熱、肝腫大、肝機能障害、黄疸といった胆嚢炎様症状がみられることがある。

ジアルジア症の重篤度と遺伝子型との関連性に関する報告が散見され、遺伝子型により症状が異なるという報告もある。それによると、Assemblage A の感染では間歇的な下痢症状を示すが、Assemblage B では持続性となる傾向があるとしている⁶⁾。その一方で、関連性はないとする報告もあり、結論は得られていない。

ランブル鞭毛虫の病原因子は明らかにされていない。腸管への吸着による蠕動運動の阻害、栄養吸収の阻害、微絨毛への物理的圧迫、消化酵素の分泌障害などが原因として挙げられているが、明確な証拠は得られておらず、これらの要因が重なって下痢を起こすと考えられている。

Ⅳ. 治療法

ジアルジア症の治療には、ニトロイミダゾール誘導体(メトロニダゾール、チニダゾール等)が第一選択剤として使用されることが多い。治療法の1例としてメトロニダゾールでは750mg/日、分3、毎食後、5-7日間、ときに10日間内服が、チニダゾールでは400mg/日、分2、食後、7日間内服が行われる。両治療薬とも副作用として消化器障害、頭痛、めまいなどが報告されている。また、血液脳関門と胎盤を通過することおよび、発がん性と変異原性が実験的に報告されていることから、妊婦や血液疾患、器質的中枢神経疾患等への投与は禁忌である⁷⁾。

Ⅴ. ランブル鞭毛虫の疫学

便とともに排出されたシストを経口的に摂取すると感染する。シストは環境に対して強い耐性を示し、水道やプールに用いられる塩素消毒では死滅しない。乾燥には弱いですが、湿った状態あるいは水中では2カ月間程度は生存するとされる。

海外では、水道水を介した集団下痢症や食品(レストランにおいて原虫保有者が調理したサラダ)から感染した例などがある。また欧米では、水系感染のうち、野外活動による感染が報告されている。特に河川、湖、あるいはプールでの水泳により感染す

ることがあるとされ、水泳中に飲水しない、手洗いの励行などの徹底を呼びかけている。米国のスイミングプールでの調査では、いわゆるプール内での「おもらし事故」で回収された有形便の293検体のうち13検体(4.4%)からランブル鞭毛虫のシストが検出されている⁸⁾。米国ではハイカー下痢症とビーバーとの関係は有名で、その生息域のキャンプ場などでは河川での感染防止をよびかけている。

ランブル鞭毛虫は多くの動物に寄生することが報告されており、人獣共通感染症として注意が払われている。しかしながら、必ずしもその程度は明らかではない。分子疫学的には、ヒトに対して感受性のある遺伝子型(Assemblage AおよびB)に属するランブル鞭毛虫が家畜など他の動物においても少なからず検出される^{9,10)}。今後、わが国においてもヒトと動物の間を行き来する感染経路の存在、その寄与率等々について詳細な研究が必要である。

VI. 国内での患者の発生状況

平成11年から感染症法が施行され、ランブル鞭毛虫によるジアルジア症は4類感染症(全数把握)(平成15年の改正により5類感染症)に位置づけられ、患者を診察した医療機関は保健所への報告が義務付けられている。感染症法の施行以降の報告数は、平成11年は47例(1999年4月以降)、平成12年は93例、平成13年は135例、平成14年は115例、平成15年は99例(12月14日現在)であり、毎年100例前後の患者が報告されている。報告数に地域的な偏りがみられ、特定の医療機関からの報告だけが統計上に現れる傾向がある、換言すれば、多くの症例が見逃されていることが懸念される。都市部での人間ドックの受診者の0.3~0.5%がランブル鞭毛虫に感染していたという報告があり、潜在的な患者あるいは症状を伴わない病原体保有者が存在しているものと考えられる。

VII. 国内の河川等の汚染

ランブル鞭毛虫の飲料水を介した水系感染は、30年ほど前からすでに公衆衛生上の問題として取り上げられ、クリプトスポリジウムとともに世界中で解決に向けた取り組みがなされている。これまで、水

道水の微生物学的安全性は主に細菌に起因する感染症の防除を目的とした中心対策がとられて、ろ過と塩素消毒により保証されてきた。しかし、ランブル鞭毛虫のシストやクリプトスポリジウムのオーシストは塩素耐性が強く、水道で用いられる塩素消毒では不活化することが困難である。そのためろ過効率や濁度管理の強化が行われている。

平成8~9年度にクリプトスポリジウムおよびジアルジアの各種表流水における汚染実態の全国調査が実施された。調査地点の表流水を河川(233地点)、ダム・湖沼(37地点)および伏流水(7地点)の3種に分けると、クリプトスポリジウムは河川では8地点(3.4%)で検出され、ダム・湖沼および伏流水では検出されなかった。ジアルジアは河川では22地点(9.4%)、ダム・湖沼では2地点(5.4%)で検出され、伏流水では検出されなかった。検出された地点が特定の地域に偏る傾向はみられず、全国に分布していた。

水道水の汚染状況は、平成9年度から都道府県に報告が求められており、全国的に汚染事例が散見されている(表2)。小規模の水道施設における汚染が目立つが、その汚染源としては、下水と畜産排水が主であり、一部に野生動物の糞便の混入があると考えられる。先に述べた潜在的な患者や病原体保有者の便や牛などの家畜の便が下水や畜産排水に混入して河川を汚染している。微生物学的安全性を維持するためには、浄水処理の強化に加えて、安全な水源を確保することが重要である。しかし、現状では水道原水への下水や畜産排水の混入が避けられない状況にある。このような状況を踏まえて平成15年に水道法が改正され、いっそうの原虫対策が盛り込まれている。

VIII. 検査法

ランブル鞭毛虫の診断は便からの栄養体あるいはシストの検出による。栄養体は下痢便や胆汁から検出される。栄養体は浸透圧の変化に弱いために洗浄・希釈等は等張液を用いる必要がある。上述したように、ランブル鞭毛虫の形態は特有なことから顕微鏡下での観察は比較的容易である。分離された栄養体の染色はギムザ染色が用いられる。

一方、有形便中にはシストのみが観察される。便