



Detection of giardia cysts in sewage and estimations of giardiasis prevalence among inhabitants in Hyogo Prefecture, Japan

小田, 琢也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2813

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002813>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 4 6 】

氏 名・（本 籍） 小田 琢也 （山口県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1938号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月8日

【 学位論文題目 】

Detection of Giardia cysts in sewage and estimations
of giardiasis prevalence among inhabitants in Hyogo
Prefecture, Japan
(兵庫県下における下水中のジアルジア濃度と感染者数の推定)

審 査 委 員

主 査 教 授 新福 尚隆

教 授 堀田 博

教 授 西尾 久英

兵庫県下における下水中のジアルジア濃度と感染者数の推定

[緒言]

Giardia intestinalis は鞭毛虫類に属する原虫で、世界に広く分布している。本原虫の感染は患者から排泄されたシストを経口的に摂取することによって感染が成立するため、衛生状態の悪い熱帯や亜熱帯の開発途上国には数多く分布する。アジアやアフリカなどの開発途上国の住民のほぼ 20% から 30% に本原虫の感染が見つかったと報告されており、その分布は住民の健康に大きな影響を及ぼしている。先進国においては、旅行した人たちによって持ち込まれる輸入感染例や、不適切な上水処理によってジアルジアのシストで汚染された水道水を原因とする水系集団感染が数多く報告されている。

通常ジアルジア症の診断には糞便を用い、集卵法を行って本原虫のシストを検出する方法が用いられる。しかし、疫学的な調査では対象集団が偏っていたり、十分な感度を有する検査方法が用いられていないために、必ずしも地域全体の有病率を正確に反映していない場合がある。地域全体の有病率の推定には、下水中のシスト数からその地域の住民の有病率を推察するという試みが行われているが、その方法には検査精度の点で問題があった。そこで、最近発展してきた免疫磁気ビーズ法を利用し、この目的のために独自に開発した方法を用いて下水からのジアルジアのシストの検出を試みるとともに、得られたシスト数から住民の有病率の推定を行った。

[実験材料および方法]

調査は 2002 年 7 月から 2003 年 9 月までの間に日本国兵庫県下の 2 ケ所 (A と B) の下水処理場を対象として実施した。実験の対象とした A 処理場は兵庫県南部の人口 15,000 人の人工島に位置し、この島の住民のみを対象とした処理を行っている。一方、B 処理場は A 処理場の西 22km に位置し、205,000 人の住民の下水を処理している。

本実験に用いた下水は、2002 年 7 月から 2003 年 8 月までの間に、これら 2 箇所 の下水処理場から採取した。採水の頻度は特に断らない限り毎月 1 回、平日の午前 10—11 時としたが、ある実験では 2 時間毎の採水を 24 時間続ける場合、またゴールデンウィーク前後のシスト数の変化を調べる実験では毎日の採水を 5 日間続ける場合もあった。

持ち帰った下水はその一部の 200ml を目開き 32 μ m のステンレス製ふるいを用いてろ過した後、*Giardia intestinalis* 検査試料として実験に供した。すなわち、試料は、1,000 \times g、10min で遠心濃縮し、得られた沈渣の 4ml にそれぞれ 4ml のエチルアルコールおよびジエチルエーテルを加えて混合液とし (総量 12ml)、60 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。その後、この試料を遠心後 (1,000 \times g、10 分)、得られた沈渣に 15ml の 0.1% のゼラチン水を再度加え懸濁して遠心濃縮する操作を行った後、最終的には沈渣を精製水で 10ml にメスアップした。濃縮した試料は、免疫磁気

ビーズ法を用いて精製し、ウェルスライド上で直接抗体染色した。ウェルスライド上の試料は蛍光顕微鏡を用いて、470nm—490nm の励起光で蛍光を確認するとともにノマルスキー型微分干渉装置による観察も行った。400 倍および 600 倍で観察し FITC で染色されたものの中で、幅 7—10 μ m、長さ 12—15 μ m の卵型で内部形態的特徴 (2—4 個の核、軸索系) を持つものをジアルジアと判定した。

[結果]

本実験で用いたジアルジアの検出精度を調べる目的で行った 3 回の添加回収実験の平均回収率は 40% であった。そこで以後の調査では回収率で補正した検出数を算出することとした。

日周変動の調査結果は、調査した 2 日共午前 10 時にピークを持つ類似のパターンを示した。1 日目の午前 10 時のピーク時には、7,700 個/L および 4,300 個/L のシストが検出された。日平均値は 1,700 個/L および 1,000 個/L で午前 10 時の検出数との比率は 0.22 および 0.24 であり、平均比率は 0.23 であった。月毎の調査は午前 10 時に行ったため、これを日平均値に補正する補正係数として用い以降の実験のジアルジアシスト数を算出した。

両処理場から検出された 1L あたりの検出シスト数の月別のシスト数の推移には季節的消長が認められ、それらは 5 月と 12 月をピークとする 2 峰性の分布を示していた。汚染の程度は B 処理場が A 処理場を常に上回っていた。B 処理場から検出されたシストの最大値は 3,900 個/L、平均では 2,000 個/L、一方 A 処理場のそれは同じく 5 月であり、最高 2,000 個/L、平均 880 個/L であった。

そこで A 処理場を対象としてさらに詳細な検討を行った。日本では、毎年 4 月末から 5 月の中旬まで、祝祭日が続くため、多くの国民はこの間に連続した休みゴールデンウィークを取るのが常である。調査を行った 2003 年は、4 月 29 日から 5 月 9 日までがこの期間に相当した。A 処理場で調査したゴールデンウィーク前の 5 日間 (4 月 14 日—18 日) とその後の 5 日間 (5 月 12 日—16 日) の検出シスト数の比較を行った。その結果、2 日目を除き、後に検出されたシスト数が前のそれを上回っていた。すなわち、ゴールデンウィーク前と後の 5 日間の検出シスト数の平均はそれぞれ、1,500 個/L と 2,500 個/L であり、この差は有意 ($p < 0.05$ student's t test) であった。

以上得られた結果を用いて A、B 両処理地区の有病率の推定を行った。

その為に用いた式は以下の如くである。

日平均シスト濃度 = 毎月調査のシスト濃度 / 回収率 \times 日変動補正係数

推定患者数 = 下水処理量 \times 日平均シスト濃度 / ヒト一人が 1 日に排出するジアルジア数 (1×10^8 — 2×10^8)

推定感染率 = 推定患者数 / 下水処理地域人口

その結果、A 処理場区域内での年間推定感染率は 0.1%—1.1%、B 処理場でのそれは 0.1%—1.3% であった。

[考察]

世界中に広く分布するこのジアルジア症は、その病原性や感染率の高さから開発途上国の住民の健康を守る上で特に注目されている。今回、環境水からジアルジアのシストを検出する方法として感度が高いとされている免疫磁気ビーズ法を改変して下水試料から高い回収率でシストを回収できる方法を考案した。その結果、添加回収実験による 200ml の下水からの平均回収率は 40%を得ることが出来、より正確なシスト濃度の推定が可能となった。

調査した A 処理場の対象地域は人工島であり、家畜は全く飼育されておらず、日周変動の結果から、朝夕に排便する習性とヒトの活動とシスト数には関連があることが明らかであり、これらはヒト由来の *G. intestinalis* のシストであることが強く示唆された。

下水から検出されるシストの数は、季節により差が認められ、シスト数のピークは 5 月と 12 月であった。5 月のピークは、ゴールデンウィークの後にシスト数が増加していることから、海外旅行中に感染し、帰国した人が関係している可能性が考えられる。出入国管理室の統計によるとこの間に海外旅行した日本人は 570000 人におよぶ。このうち開発途上国への旅行は 230000 人と概算され、この値を人工島に当てはめると島民の 290 人が開発途上国への海外旅行を経験したことになる。先進国においては、ジアルジア症は、旅行者が旅行先で感染し持ち込む例が報告されており、日本においてもインド・ネパールからの帰国者の下痢症患者の 9%でジアルジア感染が報告されている。

今回得られた結果をもとに、検査の精度、年間および採水時間のシスト数の変動を用いて推定患者数の算出を試みた。報告をもとにヒト一人がシストを排出しない期間を含む感染期間中に 1 日に排出するシスト数の平均値を 1 億とし、シストを排出した期間中の日平均排出数を 2 億個として計算を進めた。その結果、A 処理場区域内での年間推定感染率は 0.1%～1.1%、B 処理場でのそれは 0.1%～1.3%であった。日本においては、糞便検査を用いた疫学調査から有病率は 0.2%～0.6%と報告されているが、今回の試算した有病率は大きく異なるものではなかった。

今回の調査では、下水中のジアルジアシストを検出し定量することによって、地域の有病率の推定を試みた。その結果は、従来の糞便検査の結果と矛盾するものではなく、検査の簡便性や費用あるいは要する時間の点からも有用であると考えられた。今後、この方法は他の多くの地域でジアルジア症浸淫の実態調査に使用し得るものとする。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	乙 第 1941 号	氏 名	小田 琢也
論 文 題 目	Detection of <i>Giardia cysts</i> in sewage and estimations of giardiasis prevalence among inhabitants in Hyogo Prefecture, Japan 兵庫県下における下水中のジアルジア濃度と感染者数の推定		
審 査 委 員	主 査 新福 尚隆 副 査 堀田 博 副 査 西尾 久英		
審 査 終 了 日	平成 17 年 2 月 16 日		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

本研究で対象とした *Giardia intestinalis* は孢子虫類に属する原虫で、ジアルジア症の原因となる。ジアルジア原虫に感染すると、下痢、嘔吐などを繰り返し、特に幼少児や免疫不全患者においては症状が激しく、長期に及ぶ体重減少などの症状が顕れる。感染は、シストの摂取により成立し、国内における患者は海外からの帰国者に多い。近年の海外旅行者の増加、海外における水系感染による集団発生事例等から重要な再興感染症のひとつとして認識され、1999年4月から施行された感染症新法により4類感染症（全数把握疾患）に位置づけられている。ジアルジア症では有症例のほか、不顕性感染として便中に持続的にシストを排出しているシスト保有者が存在することが知られており、感染源としては重要である。これらの理由から地域の感染者数を推定することは水系感染予防に役立つと考えられている。

通常ジアルジア症の診断には、糞便検査が用いられてきたが、対象集団の偏りや検査精度、検査の煩雑さ等の問題点が指摘されている。本研究では兵庫県における住民のジアルジア感染者数と罹患率を推定する方法として、その地域の下水処理場の流入水に含まれるジアルジアのシスト数に着目し調査を進めた。ジアルジアの検出方法としては、これまで下水では適用困難であった検査の感度と特異性が高いとされる抗原抗体反応を応用した免疫磁気分離法を用いることとし、この目的のために下水への適切な処理方法を開発した。即ち、下水中の油脂類の除去のため、エチルアルコールおよびジエチルエーテルを加えて60℃で加温し、油脂類を除去する方法である。これにより、検出方法の簡便化および、検査精度の向上が図られた。

本研究では、人工島に位置する下水処理場と、処理区域にウシなどの畜舎が存在する郊外の下水処理場の2箇所での下水処理場を調査対象とした。資料採取においては、資料採取時間の違いによるシスト数の変動を考慮し、毎月1回午前10時から11時の決まった時間に行った。また、1日の中での下水処理場でのシスト数の変動を明らかにする目的で、1日12回2時間毎の資料採取および旅行感染者の増加を調べる目的でゴールデンウィーク前後においてそれぞれ5日間連続して試料採取しシスト数を比較した。

これらの調査の結果、1日の中でのシスト数の変動は大きく、最高値は午前10時に認められた。この結果は、シスト濃度はヒトの排便行動と比例して変動していることが示唆された。これまで、下水からのジアルジアのシスト数の報告はあるが、いずれの報告も資料採取時間が考慮されておらず、今回の調査により試料採取時間がシスト濃度に大きな影響を与えることが明らかとなった。本研究において、毎月の調査はシスト濃度のピーク時に行われており、季節変動および感染者の推定においては日平均値に補正して推計を行い、議論を進めた。一年を通じたシスト濃度の変動は、5月と12月をピークに持つ二峰性の分

布を示した。この結果は、海外において雨期と気温の低い時期に多いという結果と一致した。また、ゴールデンウィーク後にシスト数が増加することから旅行感染者の増加が示唆された。感染者数および感染率の推定においては、用いた検出方法の回収効率を求めて実際に検出したシスト数の補正を行ない、1日当たりの流入下水に含まれるシスト数を算出し、感染者1人が1日に排出するシスト数を 1×10^8 個または 2×10^8 として、計算を進めた。その結果、都市部での下水処理場区域内での年間推定感染率は0.1%–1.1%、郊外の下水処理場でのそれは0.1%–1.3%であるとしている。これらは、これまで糞便検査で報告された感染率0.2-0.9%とよく一致した。

本研究で用いられた方法は、これまで原虫類の疫学調査に用いられている糞便検査と比較し、検査の簡便性や費用あるいは要する時間の点からも有用であり、重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。