淀川水系に棲息する自由生活性アメーバを宿主とするレジオネラ属菌に関する研究

地独）大阪健康安全基盤研究所　生活環境課
枝川　亜希子

１．はじめに

レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）は、浴槽水、冷却塔水、河川水、土壌など環境中に広く生息している。本菌を原因とするレジオネラ症の患者数は年々増加しており、2017 年には過去最多の 1700 例を超えた（図 1)。感染源が特定された事例のうち、半数以上を浴槽水が占めるが、多くの事例では感染源不明となっている。成人市中肺炎のうち、米国では少なくとも 10%はレジオネラが関与していると推計されており、日本においても患者報告数以上の発症者が存在すると推測されている。レジオネラ感染は、環境中のエアロゾルや土埃などに含まれるレジオネラを肺に取り込むことにより発症する。ヒトからヒトへの感染はない。そのため、感染症を防止するためには、感染源となる環境中の生息状況を把握し、患者発生時には感染源を迅速に特定することが公衆衛生上重要である。

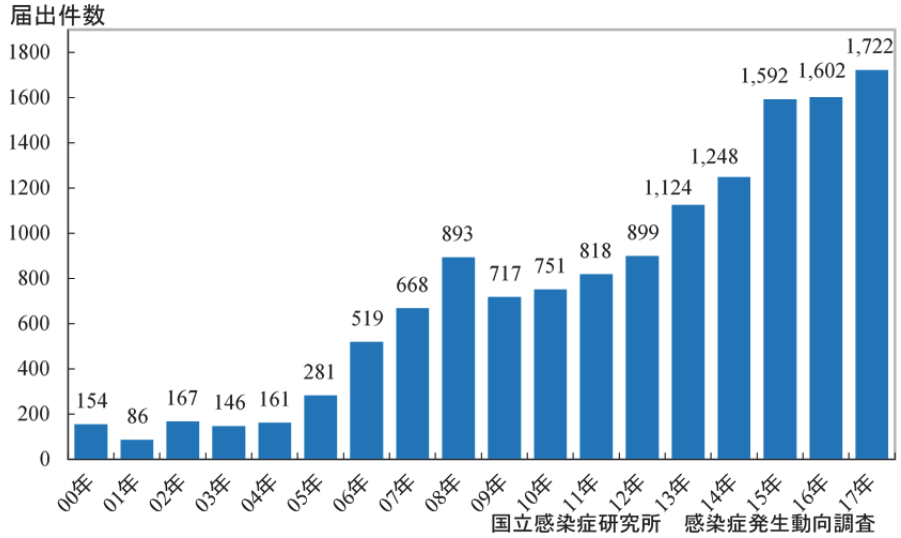

図 1.　レジオネラ症患者届出件数 [1)]

環境中でレジオネラは、自由生活性アメーバ（以下、アメーバ）に寄生して増殖する。アメーバは、河川水、浴槽水、土壌など環境中に広く生息している。これらの多くは非病原性であるが、環境中で病原細菌類の増殖の場となり、感染症の発生に関与していることが明らかになってきた。これらアメーバに寄生する細菌類は、Amoeba-Resistant Bacteria（ARB）と称され、ARB のうちヒトに病原性を有する細菌として公衆衛生上、最も問題となるのはレジオネラである。レジオネラ自体は通常の塩素消毒で死滅するが、アメーバ内に寄生したレジオネラは外界から守られた状態にあるため十分に殺菌されない。また、宿主となるアメーバ自体もシストを形成すると薬剤に対し非常に強い耐性を持つため死滅しない。

これまで日本国内でのレジオネラ生息状況調査は、主に人工的に造られた水環境（浴槽水、冷却塔水など）を対象として実施されてきた。一方、諸外国では主な感染源として水道水系が挙げられている。米国では、水道水源をレジオネラが検出される河川に切り替えたことで、配水地域のレジオネラ患者報告数が増加したという事例が起きており [2)]、水道水源のレジオネラ汚染が周辺地域のレジオネラ症発生に関連している可能性が指摘されている。このような背景から、日本国内でも水道水源として取水している河川水中のレジオネラやアメーバの生息状況を把握しておく必要があるが、日本国内での知見は非常に少なく、分布実態は明らかになっていない。

そこで本研究では、関西の重要な水道水源である淀川水系を対象にレジオネラや宿主アメーバの分布実態を明らかにすることを目的とする。

２．調査方法

2.1　採水地点

浄水場の取水口の位置などを考慮して、次の 5 地点を選定した。1. 枚方大橋（左岸）、2. 鳥飼仁和寺大橋（右岸）、3. 鳥飼大橋下流（右岸）、4. 豊里大橋（左岸）、5. 毛馬上流（左岸）。平成 29 年 5 月から 12 月まで 1 ヶ月に 1 回採水し、計 40 試料を採取した。

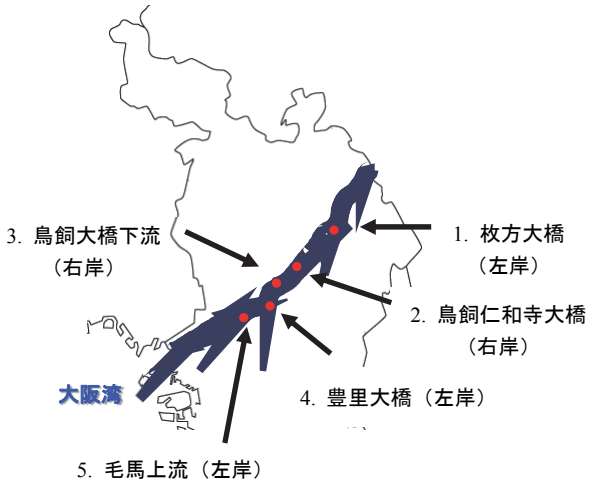

図 2.　採水地点

2.2　調査項目

レジオネラ、アメーバ、従属栄養細菌、ATP、濁度、色度、気温、水温、pH。

３．試験方法

3.1　レジオネラ

3.1.1　培養法

レジオネラ症防止指針 [3)]に記載のろ過濃縮法に準じて行った。採取した河川水 400 ml を孔径 0.2 µm、直径 45 mm の滅菌済ポリカーボネート製メンブランフィルター（アドバンテック）で吸引ろ過した。このフィルターを 4 ml の滅菌精製水が入った遠心管（50 ml）に入れ 1 分間ボルテックスミキサーで振盪した後、激しく上下に 50 回振盪し 100 倍濃縮試料を得た。このうち 1 ml は、リアルタイム PCR 法用濃縮試料として-20 °C で保存した。レジオネラ以外の夾雑菌を抑制するための前処理として、酸処理法及び熱処理法をそれぞれ行った。酸処理法は、濃縮試料 0.5 ml にレジオネラ酸処理液（0.2M HCl・KCl buffer pH2.2、関東化学）0.5 ml

を加えて 5 分静置後、WYO-α 寒天培地（栄研化学）に 0.2 ml を塗布した。熱処理法は、濃縮試料 1.0 ml を 50°C で 30 分間加熱処理を行った後、WYO-α 寒天培地（栄研化学）に 0.1 ml を塗布した。それぞれの培地は、37 °C で 5－7 日間培養後、レジオネラ様の灰白色の湿潤コロニーを計測し、L-システイン要求性を試験するため、コロニーをそれぞれ BCYE-α 寒天培地（栄研化学）と羊血液寒天培地（栄研化学）に植え継ぎ、37 ℃で 3－5 日間培養した。L-システイン含有の BCYE-α 寒天培地のみに発育し、羊血液寒天培地に発育しないコロニーをレジオネラと判定した。

3.1.2　リアルタイム PCR 法

ろ過濃縮により得た濃縮試料 1.0 ml から、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出した。リアルタイム PCR 法は、Cycleave PCR *Legionella*（16S rRNA）Detection Kit（Takara Bio Co.）を用い、反応条件等は添付文書のプロトコール通りに行った。ABI PRISM 7900HT（Applied Biosystems）を用いて測定し、SDS v2.4.1 software （Applied Biosystems）により解析を行い、レジオネラ数を計測した。

3.2　アメーバ

河川水 500 ml を孔径 1.2 μm、直径 25 mm のメンブレンフィルターで吸引濾過した後、フィルターを眼科用ハサミで 8 等分し、2 枚のアメーバ分離用寒天培地のそれぞれの四隅に濾過面を下にして貼付した [4)]。30℃、42℃でそれぞれ 2－7 日培養後、培地上に形成したプラークを倒立型位相差顕微鏡で観察してアメーバを確認した。形態学的同定は、検鏡プレート上で行った。形成したプラークの辺縁部に精製水 10μl 滴下し、数回ピペティング後、アメーバを含む精製水を検鏡プレートに入れ、パラフィンでシールした。微分干渉機能付顕微鏡により観察し、栄養体やシストなどの形態を観察し同定した。必要に応じて、PCR 法とそれに続くシークエンスにより塩基配列の解読を行い、種の同定を行った。

3.3　従属栄菌細菌

上水試験方法に記載されている R2A 寒天培地を用いた混釈法により行った [5)]。

3.4　ATP

ATP は、ルシパック Pen-AQUA（kikkoman Biochemifa）を用い、ルミテスター PD-30（kikkoman Biochemifa）により測定した。

3.5　その他試験項目

気温、水温は、採水時に測定した。濁度、色度、pH は、実験室にて上水試験方法 [5)] に記載の方法により測定した。

４．結果と考察

4.1　レジオネラとアメーバの検出

レジオネラとアメーバの検出結果および水質試験結果を表に示す（表 1、表 2）。河川水 40 試料のうち、レジオネラは培養法では検出しなかった。一方、リアルタイム PCR 法では 40 試料すべてが陽性であった。培養法は、人工培地で検出することができる生菌を検出するのに対し、リアルタイム PCR 法は遺伝子の存在により陽性となる。そのため、通常、培養法と比較してリアルタイム PCR 法の方が検出率は高くなる。今回の試料のレジオネラは、培養法では検出限界以下であったのか、リアルタイム PCR 法で陽性となったレジオネラは生菌であったのかなど、さらに詳細な検討が必要である。

アメーバは、25 試料（62.5 %）から検出した。これまでに我々が行った大阪府内の河川水中の病原性アメーバ生息調査では、68.7 %からアメーバを検出している[4)]。この結果と比較して、同等程度の検出率であった。アメーバは、*Naegleria* spp.、*Acanthamoeba* spp.、*Vannella* spp. などレジオネラの宿主となる種を検出した。

表１　レジオネラおよびアメーバの検出結果

		陽性試料数	陽性率（%）
レジオネラ	培養法	0 / 40	0
	リアルタイムPCR法	40※ / 40	100
アメーバ	培養法	25 / 40	62.5

※コピー数：5.9×10^{2}～5.3×10^{4}

表２　水質試験結果

	測定値	中央値
従属栄養細菌	1.4×10^{4} ～ 3.6×10^{5}	8.6×10^{4}
ATP	84 ～ 707	198
気温	12.2 ～ 38.6	25.6
水温	11.0 ～ 29.1	22.9
pH	6.4 ～ 7.5	7.0
濁度	1.5 ～ 12.2	5.0
色度	3.7 ～ 16.1	7.2

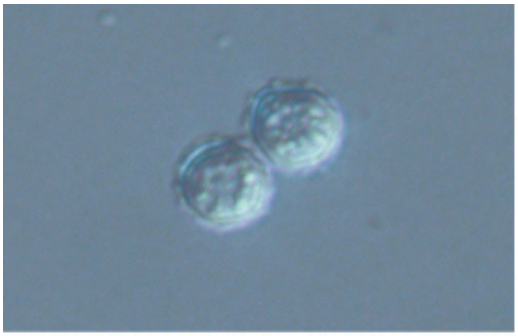

写真１　*Acanthamoeba* spp.　（cyst）

写真 2　*Naegleria* spp.　（trophozoite）

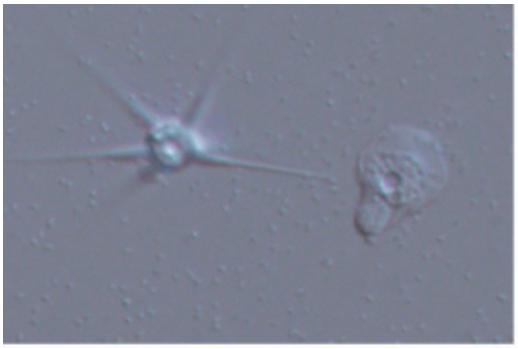

写真 3　*Vannella* spp.　（trophozoite）

4.2　レジオネラ数と水温

月別の各地点でのリアルタイム PCR 法のレジオネラ数と水温の関係を図 3 に示す。レジオネラは、培養法ではヒトの体温程度の 36℃で培養する。また、浴槽水や給湯水など水温 40℃以上の試料から検出される。そのため、水温が高い時期にレジオネラ数が多くなることを予測していたが、河川水試料は水温が高い 8 月が最も少ないレジオネラ数であった。

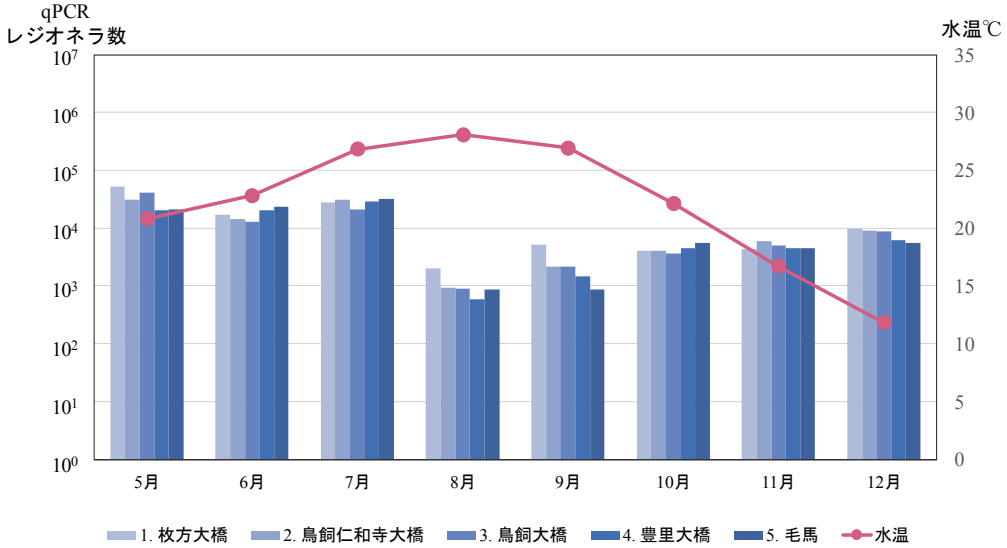

図 3.　各地点でのレジオネラ数と水温との関係

4.3　アメーバ検出とレジオネラ数

アメーバの検出とレジオネラ数の関係について、図 4 に示す。アメーバは、8 月は検出されなかったが、8 月以外は 5 地点のいずれかの地点で検出された。環境水試料において、レジオネラとアメーバの検出率には相関性が認められている [6)]。今回の試料について、アメーバ検出の有無とレジオネラ数との関係性について t 検定を用いて統計学的に解析を行った結果、有意差が認められた（$p<0.05$）。また、アメーバ検出の有無と従属栄養細菌数および ATP 値について同様に解析を行ったが、どちらも有意差は認められなかった（$p>0.05$）。

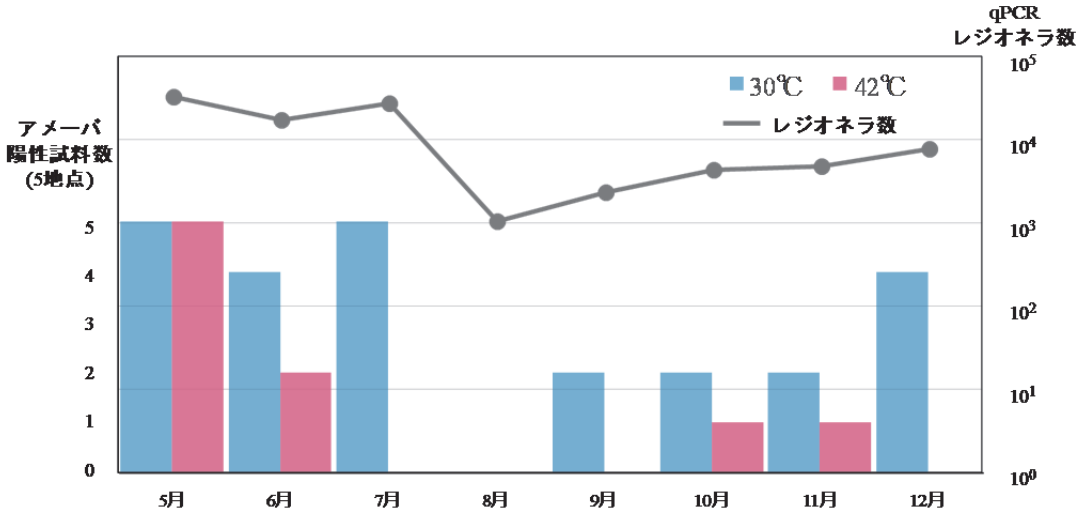

図 4.　アメーバの検出とレジオネラ数の関係

4.4　レジオネラ数と ATP 値・従属栄養細菌数との関係

浴槽水において、ATP 値が高くなるに従ってレジオネラ検出率や菌数が高くなる [7)]。また、給湯水では従属栄養細菌数の多い試料が、レジオネラ検出率が有意に高くなる [8)]。このような関係性を確認するために、河川水試料について ATP 値および従属栄養細菌数とレジオネラ数との関係について解析を行ったが、相関性は認められなかった（$r<0.2$）。

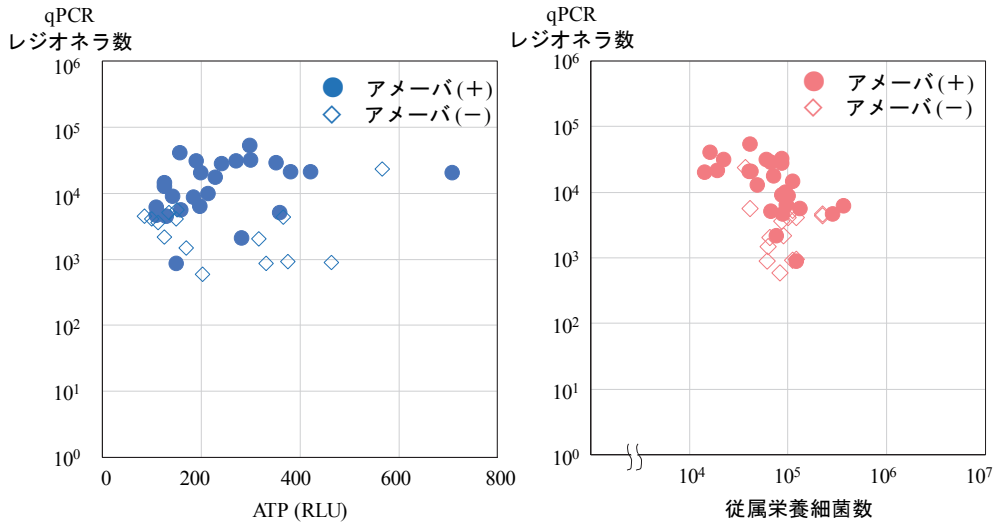

図 5　レジオネラ数と ATP 値・従属栄養細菌数との関係

５．まとめと今後の計画

今回の研究により、レジオネラは培養法では検出されなかったが、リアルタイム PCR 法ではすべての試料が陽性となり、淀川水系の河川水中にレジオネラ遺伝子が広く存在することが明らかになった。また、レジオネラの宿主となるアメーバは、淀川水系河川水試料の 62.5%に生息していることが明らかになった。

培養法とリアルタイム PCR 法では、検出対象が異なる（図 6）。培養法では、人工培地で検出することができる生菌を検出するのに対し、リアルタイム PCR 法は遺伝子の存在により陽性となる。レジオネラの場合、リアルタイム PCR 法では培養法で検出可能な生菌の他に、死菌、VBNC（viable but non-culturable：生きているが人工培地では検出できない生理状態の菌）、培養不能菌種の存在により陽性となる。そのため、レジオネラ検出においては、培養法とリアルタイム PCR 法の結果の解釈が非常に重要である。

図 7　培養法とリアルタイム PCR 法で検出可能なレジオネラ

本研究結果をふまえて、リアルタイム PCR 法で検出したレジオネラが生きている菌であったのかをアメーバ共培養法を用いて評価する。アメーバ共培養法は、レジオネラをアメーバの中で増殖させてから検出する手法であり、レジオネラ症患者臨床材料を対象に試みられ、培養法など一般的なレジオネラ症診断検査で陰性と診断された肺炎患者の喀痰から本手法を用いてレジオネラが検出されている [9)]。我々はこれまでに、この手法を水試料に適用するための培養条件を検討し、その確立した方法を用いて調査を行ってきた [10) 11)]。本研究での河川水試料についても、並行してアメーバ共培養法を実施し試料を保存している。この保存試料について詳細に解析し、今年度の結果との比較検討を行うことにより、淀川水系のレジオネラおよびアメーバの生息状況をさらに詳細に明らかにする。

６．謝辞

本研究は、公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「平成 29 年度 水質保全研究助成」の援助を受けて実施いたしました。ここに記して、お礼申し上げます。

７．　引用文献

1) 国立感染症研究所感染症情報センター, 感染症発生動向調査 IDWR (Infectious Diseases Weekly Report Japan)
2) State of Michigan, Flint Water Advisory Task Force FINAL REPORT (2016)
3) 日本建築衛生管理教育センター, 第 4 版レジオネラ症防止指針 (2017)
4) Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P, Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan., *Parasitology Research*, **105**: 1109-17 (2009)
5) 日本水道協会, 上水試験方法 (2001)

6) 八木田健司, 泉山信司, レジオネラ属菌とアメーバ, 日本防菌防黴学会誌, **38**: 167-179 (2010)
7) 黒木俊郎他 11 名, ATP 測定による入浴施設の衛生管理・レジオネラ汚染リスク評価, 国立感染症研究所 IASR (Infectious Agents Surveillance Report), **34**: 167-168 (2013)
8) Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, Nakajima C, Suzuki Y, Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan., *Journal of Applied Microbiology*, **105**: 2104-2114 (2008)
9) La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D, Isolation of *Legionella* anisa Using an Amoebic Coculture Procedure, *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 365-366 (2001)
10) Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Adachi S, Furuhata K, Miyamoto H：Investigation of Legionella Contamination in Bath Water Samples by Culture, Amoebic Co-Culture, and Real-Time Quantitative PCR Methods, *Int J Environ Res Public Health*, **12**: 13118-13130 (2015)
11) 枝川亜希子, 木村明生, 足立伸一, 松島加代, 宮本比呂志, アメーバ共培養－LAMP 法を用いた水景施設におけるレジオネラ属菌生息調査, 日本防菌防黴学会誌, **44**: 585-589 (2016)