

琵琶湖・淀川水質保全機構
平成30年 水質保全研究助成 成果報告会

淀川水系に生息するレジオネラ属菌と 宿主となる自由生活性アメーバに関する研究

地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所*
衛生化学部 生活環境課
枝川 亜希子

* 旧) 大阪府立公衆衛生研究所

1

レジオネラとは

レジオネラ症※の原因となる細菌

※感染症法4類（全数把握）の呼吸器感染症

年	届出件数
1999年	56
2000年	154
2001年	86
2002年	167
2003年	146
2004年	161
2005年	281
2006年	519
2007年	668
2008年	893
2009年	717
2010年	751
2011年	818
2012年	899
2013年	1,124
2014年	1,248
2015年	1,592
2016年	1,602
2017年	1,733
2018年	2,130

2

レジオネラの感染経路

3

レジオネラ症の感染源

- 国内では、入浴施設などの浴槽水が多い
- 国外では、冷却塔水、給湯水、**水道水**など

↓

水道水系でのレジオネラ汚染が問題になっている

米国フリント市での事例¹⁾²⁾

水道水源をレジオネラが検出される河川に切りかえた年に
レジオネラ症が増加
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**

4

日本国内の水道原水のレジオネラ

生息状況に関する知見は非常に少なく、**分布実態は明らかになっていない**

平成29年度に、淀川水系を対象としたレジオネラやその宿主となるアメーバの分布実態調査を開始

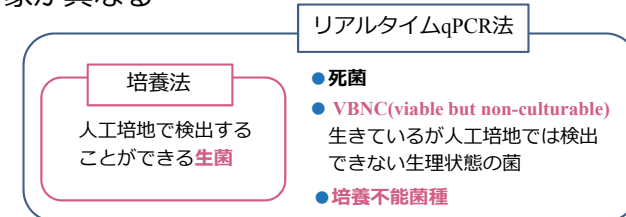
昨年度（H29年度）の調査結果

	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qPCR法	40 / 40	100

5

レジオネラ検出

培養法とリアルタイムqPCR法は、検出感度や検出対象が異なる



主に用いられている培養法だけでなく、複数の手法を合わせて行うことが重要

6

今年度の研究

昨年度（H29年度）、レジオネラと宿主アメーバの分布実態調査時に、並行して**アメーバ共培養法**を実施し試料を保存した

今年度（H30年度）は、この保存試料について詳細に解析し、昨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ことを目的とする

7

アメーバ共培養法とは？

レジオネラをアメーバの中で増殖させてから検出する方法



Acanthamoeba castellanii (栄養体) * *L. pneumophila* が寄生した *A. castellanii* *

本研究では、アメーバ共培養法とリアルタイムqPCR法を組み合わせた「**アメーバ共培養-qPCR法**」により、レジオネラの検出を行った

*第4版レジオネラ症防止指針 p.131

8

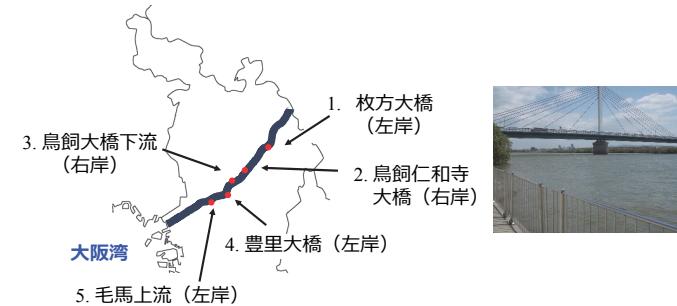
調査概要

- 試料：淀川河川水 40試料
- 検査項目：
 - ・レジオネラの検出 **アメーバ共培養-qPCR法**
 - ・レジオネラ菌種の同定
アメーバ共培養-qPCR法により、菌数が増加した試料
 - ・アメーバ種の同定
H29年度に分離した *Acanthamoeba* spp.

H29年度：レジオネラ（培養法、リアルタイムqPCR法）、アメーバ、
従属栄養細菌、ATP、濁度、色度、気温、水温、pH

9

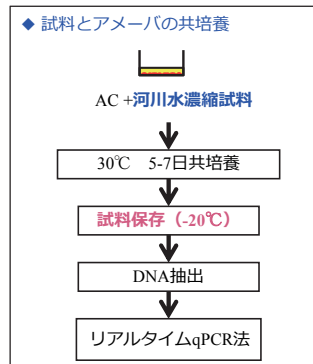
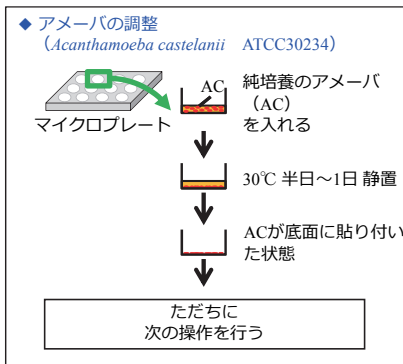
採水地点



浄水場の取水口の位置などを考慮し、地点を選定
各5地点から平成29年5月～12月に毎月1回採水

10

方法－アメーバ共培養法



11

リアルタイムqPCR法

- DNAの抽出：QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
- Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (Takara Bio Co.)

【反応液組成 (1test)】			【反応条件】		
2×Cycleave Reaction Mixture	12.5 μL	40 cycles	95℃	10sec	
Primer / Probe Mix	2.5 μL		95℃	5sec	
Sample DNA	5 μL		55℃	10sec	
total	25 μL		72℃	25sec	

測定：ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)
データ解析：SDS v2.4.1 software (Applied Biosystems)

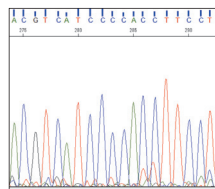
キットのプロトコール通りに行った

12

レジオネラ菌種の同定

アメーバ共培養法により菌数が増殖した試料について、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR法とそれに続くシーケンス法によりレジオネラ菌種の同定を行った

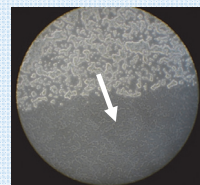
得られた塩基配列は、BLASTによってデータベースに登録されている遺伝子配列との相同性検索を行った



13

アメーバ種の特定

形態学的同定により分離した *Acanthamoeba* spp. 2株について18S rRNAを標的としたPCR法による*Acanthamoeba* 属の確認とシーケンス法によるアメーバ種の同定を行った



ブランク辺縁部の顕微鏡像

上部がブランクの中心側。上半分はアメーバ栄養体で埋め尽くされている。下半分は、寒天表面に塗抹された大腸菌が確認でき、大腸菌を捕食しながら矢印の方向に増殖する

14

結果

● アメーバ共培養-qPCR法

河川水40試料のうち、40試料すべてが陽性
検出したレジオネラ菌数は、
 1.2×10^2 (試料No.24) $\sim 2.3 \times 10^5$ (No.7) copy/test

昨年度の調査では、
培養法はすべて不検出、リアルタイムqPCR法はすべて陽性

15

アメーバ共培養法の有無によるqPCR法の結果

試料番号	リアルタイムqPCR法 (copy/test)				試料番号	リアルタイムqPCR法 (copy/test)			
	アメーバ共培養法	なし ¹⁾	アメーバ共培養法	あり ²⁾		アメーバ共培養法	なし ¹⁾	アメーバ共培養法	あり ²⁾
1	5.3 × 10 ²		6.6 × 10 ⁴		21	5.2 × 10 ³		3.2 × 10 ³	
2	3.1 × 10 ²		1.0 × 10 ⁴		22	2.1 × 10 ³		4.7 × 10 ²	
3	4.0 × 10 ²		7.1 × 10 ⁴		23	2.1 × 10 ³		1.3 × 10 ³	
4	2.0 × 10 ²		3.7 × 10 ⁴		24	1.5 × 10 ³		1.2 × 10 ²	
5	2.1 × 10 ²		5.2 × 10 ²		25	8.7 × 10 ²		1.3 × 10 ³	
6	1.7 × 10 ²		5.2 × 10 ²		26	4.1 × 10 ³		4.9 × 10 ³	
7	1.4 × 10 ²		2.3 × 10 ⁵ *		27	4.1 × 10 ³		5.5 × 10 ³	
8	1.3 × 10 ²		1.2 × 10 ³		28	3.6 × 10 ³		5.8 × 10 ³	
9	2.0 × 10 ²		8.3 × 10 ⁴		29	4.6 × 10 ³		6.0 × 10 ³	
10	2.3 × 10 ²		1.1 × 10 ⁴		30	5.5 × 10 ³		2.5 × 10 ³	
11	2.8 × 10 ²		5.8 × 10 ⁴		31	4.3 × 10 ³		2.6 × 10 ³	
12	3.1 × 10 ²		7.7 × 10 ⁴		32	6.1 × 10 ³		8.4 × 10 ²	
13	2.1 × 10 ²		5.4 × 10 ⁴		33	5.0 × 10 ³		9.4 × 10 ²	
14	2.8 × 10 ²		6.1 × 10 ⁴		34	4.6 × 10 ³		5.5 × 10 ²	
15	3.2 × 10 ²		4.5 × 10 ⁴		35	4.5 × 10 ³		5.1 × 10 ²	
16	2.0 × 10 ²		7.3 × 10 ⁴		36	1.0 × 10 ⁴		4.4 × 10 ³	
17	9.2 × 10 ²		1.2 × 10 ⁵ *		37	9.1 × 10 ³		2.1 × 10 ³	
18	9.0 × 10 ²		1.0 × 10 ⁴		38	8.6 × 10 ³		1.5 × 10 ³	
19	5.9 × 10 ²		2.3 × 10 ⁴		39	6.3 × 10 ³		2.4 × 10 ³	
20	8.7 × 10 ²		1.3 × 10 ⁴		40	5.6 × 10 ³		3.6 × 10 ³	

¹⁾リアルタイムqPCR法、²⁾アメーバ共培養-qPCR法

アメーバ共培養法を行うことにより、
レジオネラ菌数が10倍以上増加した試料は、**2試料**あった

16

レジオネラ菌種

PCR法を行った結果、1試料（No.17）が陽性となり、シーケンス法により遺伝子配列の解析を行った

Legionella-like amoebal pathogen 2（LLAP-2）と97%一致

※LLAPとは
人工培地では増殖しないがアメーバ内でのみ増殖生息することができる
レジオネラ培養不能菌種

淀川水系には培養法では検出できないが、アメーバ内で増殖することがきる**培養不能レジオネラ菌種が生息していた**

17

アメーバ種

形態学的同定により分離した*Acanthamoeba* spp. 2 株は、2 株ともPCR法陽性であった
シーケンス法による種の同定を行った結果、

2 株とも*Acanthamoeba lenticulata*と98～99%一致

※ *A. lenticulata* とは
河川水などの環境中に生息するアメーバ種であるが、*A. castellanii*などと共にアcantアメーバ角膜炎の原因となるアメーバ種

18

まとめ

- レジオネラをアメーバの中で増殖させてから検出するアメーバ共培養法を用いることにより、**培養法で不検出の試料にレジオネラ培養不能菌種が存在する**ことが明らかとなった
- 昨年度（H29 年度）に分離した*Acanthamoeba* spp. について、種の同定を行った結果、**ヒトに角膜潰瘍炎を引き起こす原因となる*A. lenticulata*であった**

19

謝辞

本研究は、
公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構
「平成30年度 水質保全研究助成」により行った。
記して、感謝を申し上げます。

ご清聴、ありがとうございました。

調査研究協力：大阪健康安全基盤研究所 生活環境課

20