

VII-77

下水中のレジオネラ属細菌の検出方法に関する研究

共和化工

○木村陽平

東北学院大学工学部 梅沢裕美、加藤勇、遠藤銀朗

1. はじめに

水資源の有効利用と水辺環境の創造のために、都市下水や産業排水等の処理水の再利用が検討され、既に一部ではこのような利用が実施に移されつつある。その場合には従来とは違った観点から水の安全性を評価することが必要と考えられる。これまでの廃水処理に於いては、処理水は直接不特定多数の人間に触れることはなく環境の水域に放流され、一旦自然界を経由した後に人間社会に循環されることが殆どであった。しかし、下・廃水の処理・再利用では生活または環境創造のための用水として直接人間社会に戻されて利用されるため、不特定多数の人間がこのような水に直接接触する機会が増えることになる。

これまで用水や環境水の安全性は指定された病原体の存在の有無によって評価され、それによって人間に対する健康障害はほぼ完全に予防されてきた。しかし、修景や水辺アメニティー創造のための処理排水の再利用や生活雑用水としての再利用では、健康弱者に対する平素無害菌による発病の問題すなわち日和見感染の問題が無視できなくなることが考えられる。特に、今後高齢者人口比率の増大が見込まれるわが国においては、このことと水利用形態の変化との両面から日和見感染菌の問題が重要視されるようになって考えられる。

本研究では、このような日和見感染菌の例として*Legionella pneumophila*（在郷軍人病菌）を取り上げ、高感度な検出を可能とするPolymerase Chain Reaction法（PCR法）をさらに定量的方法にすることを可能にするPCR-MPN法による定量的検出の適用について検討した。また、下水中の*L.pneumophila*を検出するための有効な方法の開発を試み、さらに開発できた方法を用いて下水処理工程中においてこの日和見感染菌がどのような挙動を示すかについて調査し、予見的な結果を得たので報告する。

2. 研究方法

(1) *Legionella*の培養

スキムミルク添加によって凍結保存した供試細菌をチャコール寒天培地で2日培養しその1白金耳を*Legionella*培養用チャコール液体培地に植え細菌懸濁培養液を得た。培養時間4時間おきに*Legionella*懸濁液を採取し計数のための試料とした。

(2) 菌数計数方法

a) アクリジンオレンジ直接計数法：

0.2 μ mヌクレオポアフィルターで細菌を捕集し、定法にしたがって細菌細胞数のDirect Total Count (AODC)を求めた。

b) PCR-MPN法による定量：

*Legionella*培養液を10倍希釈法によって希釈し、その適当倍希釈液より染色体DNAを抽出して回収し、同染色体にコードされている*mip*遺伝子を標的として遺伝子特異的なPCR法を行った。また各PCRは同一希釈段階の試料について5本ずつ行い、アガロースゲル電気泳動の後、サザントランスファーによってナイロンメンブレンにプロットし、*mip*DNAをプローブとするハイブリダイゼーションによって検出した。このような操作を連続する3段階に希釈液について5本ずつ行い、5本法のPCR-MPN法によって計数値を求めた。

c) 酸処理および抗生物質添加選択培地による下水中の*Legionella*の検出：

常法にしたがって、塩酸酸性（pH2.2）30分処理後、vancomycin他の4種の構成物質を添加したBCYE- α 寒天平板で下水中の*Legionella*の生菌数を求めることを試みた。

d) PCR-スロットプロットハイブリダイゼーション法による下水中の*Legionella*の検出

PCR法およびハイブリダイゼーション法は基本的にはb)で用いたものと同じであるが、PCR後の反応液を変性させてスロットプロッターによってナイロンメンブレンにプロットしてプローブ（*mip*プローブ）とハイブリダイズさせて下水中の*Legionella*を検出することを試みた。

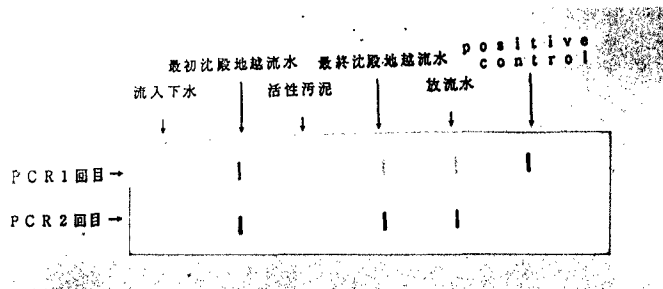
3. 結果

*Legionella pneumophila*のPCR法による検出感度は、サザンハイブリダイゼーションを用いて評価した際の結果より 10^2 cells/mL程度であることが知られた。しかし表—1に示したように、*L. pneumophila*の増殖過程におけるAODCの値を基準にしてPCR-MPN法による定量結果を評価したところ、十分な定量性を見いだすことができなかった。この理由として低密度の*L. pneumophila*の培養液からの染色体の抽出・回収法が完成されていないために、この過程の操作の熟練度によって回収効率が大きくばらついたためと考えられた。したがって、PCR法によって*Legionella*を定量的に検出するためには、環境水などからの定量性のある安定なDNA回収方法を確立することが重要であると考えられた。

下水についてPCR法による*Legionella*の検出を試みた結果の一例を図—1に示した。この結果より下水処理工程中で*Legionella*は生き残っている可能性が示唆され、最終放流水中にも残存する可能性があると考えられた。

表—1 PCR—MPN法によって得られた*L. Pneumophila*の定量結果

Time	各希釈段階におけるPCRの結果						MPN	cells/ml
	10	1	0.1	MPN	cells/ml			
6 h	10^{-2} 5/5	10^{-3} 5/5	10^{-4} 5/5	1600以上	1.6×10^4 以上			
12 h	10^{-2} 4/5	10^{-3} 4/5	10^{-4} 5/5	81	8.1×10^2			
18 h	10^{-2} 5/5	10^{-3} 5/5	10^{-4} 5/5	1600以上	1.6×10^4 以上			
24 h	10^{-2} 3/5	10^{-3} 2/5	10^{-4} 1/5	17	1.7×10^2			
30 h	10^{-2} 5/5	10^{-3} 5/5	10^{-4} 0/5	240	2.4×10^3			
36 h	10^{-4} 5/5	10^{-5} 5/5	10^{-6} 5/5	1600以上	1.6×10^6 以上			
42 h	10^{-4} 5/5	10^{-5} 5/5	10^{-6} 5/5	1600以上	1.6×10^6 以上			
48 h	10^{-8} 1/5	10^{-9} 5/5	10^{-10} 4/5	1600	1.6×10^{10}			



図—1 PCR—スロットプロットハイブリダイゼーションによる下水中の*L. pneumophila*の検出結果