

VII-19 水系感染症予防対策のための *Leptospira biflexa* の流動特性解析

東北学院大学 大学院 学生会員 ○大沢 圭一郎
東北学院大学 大学院 学生会員 佐々木 悠也
東北学院大学 工学部 フェロー会員 石橋 良信

1. はじめに

病気は原因なくしてヒトに広がりはない。有史以来、洪水の後に水系感染症が蔓延することはよく知られている。2005 年、ニューオーリンズやインド・バングラディシュを襲った洪水の後の疾病の蔓延は身近な例である。レプトスピラ菌 (*Leptospira*) は水系感染症を引き起こす人畜共通の細菌であり、飲料水または水浴び等によって経口、経皮感染し、発症すると発熱や髄膜刺激症状を主徴とするものが多く、重症ともなると黄疸、出血、タンパク尿を三主要徴候とする症状を呈する。

近年の UNISEF の報告によれば、途上国を中心に下痢症で 5 歳未満の幼児が毎年約 400 万人（4 秒に 1 人）死亡している。水系感染症あるいは水系関連感染症の増加は貧困と水質汚濁に起因するといわれるが、洪水の影響も大きく、直接的である。わが国においても、1970 年代前半までには年間 50 名以上の死亡例が報告されている。しかし、近年では衛生環境の向上などにより患者数および死亡者数は著しく減少した。しかしながら、今現在においても散発的な発生は途上国を中心に世界各地で認められ、また海外からのペットなどの動物輸入に伴う輸入感染例が報告されるようになっている。このような背景から、本研究では、感染症と洪水の関連性を明確にし、洪水に伴うレプトスピラ症感染の予防及び対策を提案することを目的として実験・調査を行なった。

現在までの一連の研究において、世界の感染状況および洪水と感染率の関係、また、培養への高級脂肪酸の必要性、タイ国を対象にした情報とリスク評価などの知見を得ている。ここでは、侵食・巻き上げ理論を基本式とした流動モデル実験およびその実験解析に用いるレプトスピラ菌の濃度を定量するための Real time PCR 法による検出実験の準備状況を示す。

2. 実験方法

非病原性のレプトスピラ菌 (*Leptospira biflexa* Patoc I 株) は国立感染症研究所から譲与された。非病原性のレプトスピラ菌を入手できたことから、基礎実験は実験室レベルで十分対処できるようになった。レプトスピラ菌の培養は、EMJH 培地を用いた。なお、培養は 30℃で行うが、増殖速度は遅く 4~5 日間を要した。レプトスピラ菌はネズミ等のげっ歯類に捕菌され、尿とともに土中に浸透し残留する。洪水等によってレプトスピラ菌は水中へと移行し、経皮・経口感染を引き起こす。したがって、土中、水中の濃度が流動によって、どのように変化するかのモデル式を適用した挙動解析は重要である。さらに、本研究を行うに当たり、菌を遺伝子工学的に検出するための PCR プライマーの開発と検出方法が必要となるため、非病原性レプトスピラ菌に有効なプライマーの開発を行い、検出方法には Real Time PCR 法を適用した。

流動に伴うレプトスピラ菌の挙動解析を実験的に求めるために Rouse の濃度式を適用し、侵食・巻き上げ理論を検討した。関連する濃度理論式を以下に示す。

$$\text{Rouse の式} \quad C/C_a = \{(h-z)/z \times a/(h-a)\}^{W_0/(\beta \kappa u^*)} \quad (1)$$

$$\text{河床濃度式} \quad C_a = 5.55 \Delta F(W_0) D^{1.61} \quad D^* = 1/2(u^*/W_0) \exp(-W_0/u^*) \quad (2)$$

$$\text{巻き上げ式} \quad \varepsilon = C_a \times W_0 \quad (3)$$

$$\text{土砂輸送量} \quad q = \int u(z) C(z) dz \quad (4)$$

ここで、 C は河床からの高さ z における濃度、 C_a は河床での濃度、 h は水位、 W_0 は水における沈降速度、 κ はカルマン定数 ($=0.4$)、 $\beta = 1.0$ 、 u^* は河床のせん断速度、 $\Delta F(W_0)$ は沈降速度 W_0 の砂粒子が河床中に占める含有率、 ε は巻き上げフラックス、 q は土砂輸送量である。

また、流動モデル実験のための装置を考案し、直径 50 cm、高さ 25 cm の円柱形の水槽を作製した。底部にはレプトスピラ菌と微細土粒子（粉碎した鹿沼土）を混合して敷き詰め、土中密度の測定とともに、水を高さ 20 cm まで入れ、水槽の中央に据え付けた幅 1.5 cm、長さ 25 cm の攪拌翼で、数段階の回転数で巻き上げた際の状況を観察した。

3. 実験結果および考察

〈レプトスピラ菌の検出方法〉 国立感染症研究所より譲与された菌株をユニバーサルプライマーより全塩基配列を決定し、相同性解析を行なった。相同性が 100% であることから、供試菌株は *Leptospira biflexa* Patoc I と判定した。また、全塩基配列から OLIGO プログラムを用いて特異的な部分を検索し、最適なプライマーを作製した。プライマーの塩基配列を表-1 に示す。

図-1 は作製した 3 組のプライマーを用いて種特異的 PCR による電気泳動結果である。計 3 種類のうち適当な組み合わせを検討するため、菌株およびレプトスピラ菌を含まない環境水で種特異的 PCR を行った。Lane 1, 2, 3, は本株を使用し、lane 4, 5, 6 は環境水を使用した。いずれの組み合わせでも PCR 増幅産物が確認されたが、lane. 6, 7 での F1-R1 および F2-R2 の組み合わせにおいて環境水でも確認されたことから除外し、F3-R3 の組み合わせを使用することとした。一方、作製したプライマーを用いて、レプトスピラ菌に適用した Real time PCR の反応条件を決定している。

表-1 各種プライマーの塩基配列

プライマー名	配列	塩基数	GC 含量率
Forward 1	TACCACTGGCGAACCAGGTGA	20	60.00%
Reverse 1	GAGTTGAGGCCGAGATTT	19	47.40%
Forward 2	GTAATCCAGCCCTAA	16	50.00%
Reverse 2	CTTTCGAGTGCCTACTGA	20	55.00%
Forward 3	TAGGCTTGACATGCACGTGA	20	50.00%
Reverse 3	TCTCCTTGCGTTAA	16	50.00%

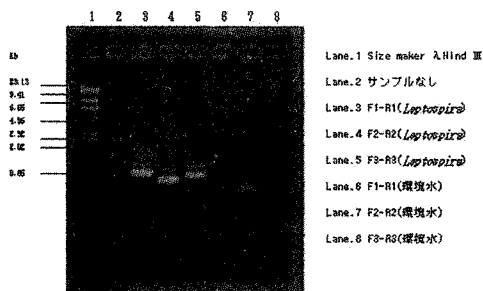


図-1 種特異的 PCR 電気泳動結果

〈土粒子の挙動解析〉 流動の理論式として上位の (1)、(2) 式を用いた。図-1 は h 方向の C/C_a の関係を示す一例である。その結果、回転数が速くなると実測値は理論式から求めた値と近似し、回転数が遅くなると回転軸付近で合致するが、回転軸から離れると壁面および回転翼の影響で理論値から外れる傾向が認められた。図-2 は、回転数の増加に伴う濃度変化を示している。理論値と実測値は一致する傾向がみられた。以上の結果より、巻き上げフラックスを示す (3) 式および土粒子輸送量を示す (4) 式の適応が可能になった。なお、巻き上げフラックスと輸送量の関係では、最大で $0.0916 \text{ kg/m}^2/\text{sec}$ の値が得られている。

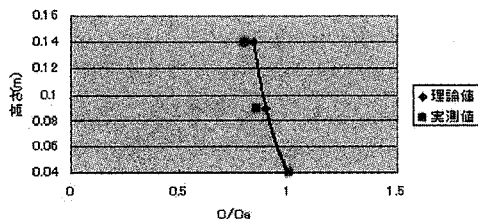


図-2 高さ方向の濃度分布(回転数 50 rpm の場合)

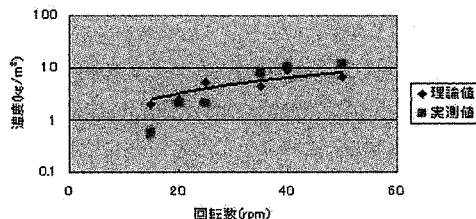


図-3 回転数別の濃度変化

4. まとめ

今後の研究の課題として、土壌および土粒子へのレプトスピラ菌との吸着・反発性の究明および土壌に菌を添加した状態における菌の挙動を検討していく必要がある。また、得られた知見を参考に、レプトスピラ症感染メカニズムを解明し、さらにはリスク評価等を明らかにしていく一方で、レプトスピラ症に感染しないための防御対策なども検討していく予定である。

最後に、実験、解析等の遂行に当たって、本学中村寛治教授、東北大学工学研究科真野明教授のご教示に感謝する。また、実験は当研究室及川栄作氏、大川真美さん、齋藤あさ美さんの労に負うところ多く、記して感謝する。