

レプトスピラ菌の増殖要因および水中での挙動解析

東北学院大学 大学院 学生会員

○大沢 圭一郎

東北学院大学 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人々に広がりはいない。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。また、今後の気象変動により洪水や浸水はますます増加すると予測されるが、水系感染症と洪水をはじめとする水のかかわりを明確に示した知見はみられない。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、レプトスピラ症は 1970 年代前半までは年間 50 名以上の死亡例が報告されていたが、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、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、本研究は、レプトスピラ症を対象に、洪水に伴う水系感染症増加のメカニズムを環境工学と環境水理学の観点から明らかにし、国際保健に寄与することを目的としている。その一環として、ここでは、洪水時をモデルとした菌の流動特性解析、沈降・浸入実験および菌の増殖要因、生残性実験に関して示す。なお、レプトスピラ症を引き起こすレプトスピラ菌 (*Leptospira*) は、人畜共通の細菌であり、経皮または経口感染し、発症すると発熱や髄膜刺激症状を主徴とし、重篤な場合、黄疸、出血、タンパク尿を主要徴候を呈する。

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。非病原性レプトスピラ菌を使用することによって、実験室レベルでも十分対応できるようになった。レプトスピラ菌の培養には、EMJH 培地を用い、30℃で4~5日間静置培養した。

レプトスピラ菌はネズミ等のげっ歯類に保菌され、排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に移行し、感染させる。したがって、

土中、水中の菌が流動等によって、どのように変化するかの挙動解析は重要である。なお、以下 (2)~(4) の実験に先立ち、菌と土粒子の ζ -potential を測定した。

(1) 増殖要因および生残性に関する実験

・至適 pH

レプトスピラ菌が増殖しやすい pH 範囲を求めた。

・下水成分による増殖特性

レプトスピラ菌は炭素源をエネルギー源としており、下水中には多くの炭素源が含まれている。レプトスピラ菌の主要炭素源である Tween80 の代わりに、下水(流出・流入)、人工下水を用いて、菌の増殖の如何を探った。

・紫外線に対する生残性

レプトスピラ菌に紫外線照射し、レプトスピラ菌の不活化を検討した。

(1) におけるレプトスピラ菌のカウントは暗視野顕微鏡で行った。

(2) 流動特性実験

直径 50 cm、高さ 25 cm の円柱形の水槽の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、3 段階の回転させたときの巻き上げた状況を解析した。

(3) 沈降実験

レプトスピラ菌単独、菌と土粒子の混合状態での沈降特性を、自由単粒子沈降、干渉沈降を考慮して時間経過による変化を観察した。

(4) 浸入実験

高さ 35 cm、内径 4.0 cm の円柱形のカラムに砂質土壌と粘土質土壌の 2 種類の土を充填し、上部より菌を注入した。5.0 cm 間隔に層毎に土壌を採り、各層ごとのレプトスピラ菌の残存率を測定した。

(2)~(4)におけるレプトスピラ菌の検出は Real-Time PCR 法を用いて遺伝子工学的に解析した。

3. 実験結果および考察

(1) 増殖要因および生残性に関する結果

レプトスピラ菌はpH値が6.5～8.5の範囲で増殖可能であるが、7.5付近で最大の増殖を示した。

下水成分添加による増殖特性の結果を表-1に示す。流入・処理水で増殖が確認でき、途上国で生活排水等が放置された箇所での菌の増殖が懸念される。一方、グルコースを除いた人工下水では増殖がみられなかった。

表-1 下水および人工下水における増殖

コントロール (個/ml)	流入下水 (個/ml)	処理水 (個/ml)	人工下水 (個/ml)
6.36×10^7	2.96×10^6	3.55×10^6	/

紫外線による不活化結果を表-2以下に示す。レプトスピラ菌は他のグラム陰性菌と同様に10 mJ/cm²以下の照射量で不活化され、また光回復現象は認められなかった。

表-2 レプトスピラ菌の不活化に対する紫外線照射量

		照射量(mJ/cm ²)						
希釈倍率	コントロール	5	10	20	30	40	50	
10倍	4.9×10^7 個/ml	1.2×10^6	3.6×10^3	0	0	0	0	
100倍	4.8×10^7 個/ml	1.3×10^6	1.8×10^3	0	0	0	0	

(2) 流動実験等の挙動解析結果

流動実験において、菌の水中での濃度分布に一貫性はみられなかった。図-1は各回転数測定における水中の菌数の総和を示す。回転数増加と共に菌数は減少する傾向がみられる。要因として、密度が水に近い菌は水流に乗り、回転数が速くなるほど遠心力で壁面や壁面に近い水面に集まる結果と考えられる。水中と壁面では2オーダーほど菌数に違いがあった。

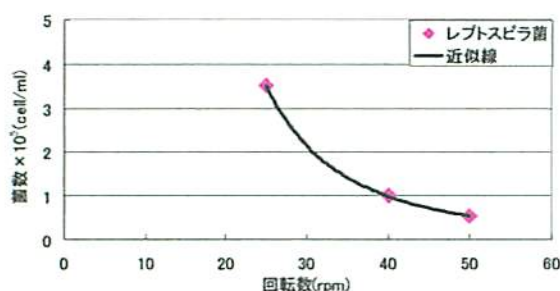


図-1 回転数毎の分散総和菌数

また、沈降実験の結果を図-2に示す。土粒子が時間経過とともに沈降するのに対して、レプトスピラ菌は浮遊し続け、沈降は生じなかった。さらにζ-potentialの測定値は、レプトスピラ菌が平均-36mV、土粒子は平均-35 mVで、菌と土粒子は反発し、それぞれ独自の異なった挙動をすることが示唆された。

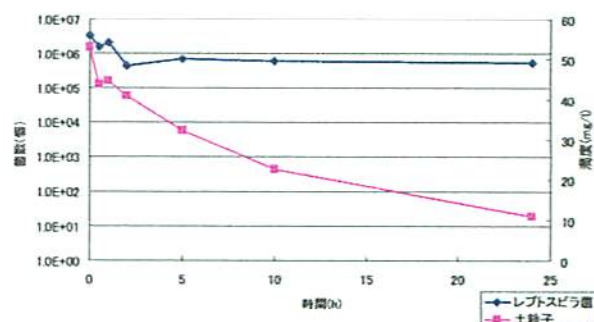


図-2 沈降実験の結果

表-3に浸入実験の結果を示す。砂質土壌、粘土質土壌ともに表面に近い層ほどレプトスピラ菌の残存率が高く、下層ほど残存率は低い。特に粘土においては土壌表面の浅い層に70%のレプトスピラ菌が集中して残存した。

表-3 浸入実験の結果

土の種類	サンプリング場所					単位: %
	1	2	3	4	5	
砂	33.60	32.06	21.57	8.29	4.92	
粘土	71.33	11.89	11.89	4.90	-	

4. まとめ

本研究で得られた知見を以下に示す。

- ① レプトスピラ菌の増殖にpHが関係することは、水質的な感染予防の指標になり得る。また、下水成分での増殖から、生活排水等の処理処分が徹底していない途上国での都市部で発生する可能性もある。レプトスピラ菌の不活化に紫外線消毒は有効であるが、UV-Cが遮光される自然光では期待できない。
- ② 流動実験から巻き上がったレプトスピラ菌は水の流れとともに拡散挙動することが判明し、水理学的に解析できる土粒子の挙動とは異なっている。また、レプトスピラ菌は沈降せず、いつまでも浮遊していることが把握できた。さらに、侵入試験からは、粘土質土壌の表層部に多く留まっていることがわかった。

今後は、水質指標の選択、リスク評価等を詳細に検討し、レプトスピラ症に感染しないための防御対策を検討していく予定である。

最後に、実験や解析を行うに当たり、ご教示を賜った東北大学大学院工学研究科、真野 明教授に感謝する。また、実験は当研究室学生、岩淵裕紀君、橋 優衣さん、本間健志君の労に負うところ多く、記して感謝する。