

レプトスピラの皮膚への付着に関する検討

東北学院大学工学部環境建設工学科 学生会員 ○阿部優子

東北学院大学工学部 フェロー会員 石橋良信

1. はじめに

レプトスピラ症は人畜共通感染症であり、病原体はげっ歯類や家畜、ペットの腎臓に保菌されている。ヒトは、感染動物の排尿によってレプトスピラ菌に汚染された水や土壌から主に経皮感染する。血清型によって症状は軽症から重症まで異なるが、重篤なワイル病の場合は黄疸や出血を伴い、死にいたることもある。レプトスピラ菌は、スピロヘータ目レプトスピラ属のグラム陰性細菌であり、大きさは直径 $0.1 \mu\text{m}$ 、長さ $6 \sim 20 \mu\text{m}$ の螺旋状細菌で、一端または両端が鉤状に曲がっているのが特徴である。

レプトスピラ菌が皮膚に付着しやすいか否かを把握することは、感染への影響を図る上で重要である。ここで、皮膚を固相、レプトスピラ菌が浮遊する水を液相と想定した「固液界面」と考えた場合、レプトスピラの皮膚への付着のしやすさと付着のしにくさの度合いは自由エネルギーの概念で推測することができる。ここでは、自由エネルギー、表面張力を得るために静的液滴法を適用した実験、さらに実際に皮膚に付着する菌数の実証実験などを通して、レプトスピラ菌の皮膚への付着に対する潜在的な能力を判断した。

2. 自由エネルギーの概念および実験方法

付着に伴う単位面積当たりの自由エネルギーの変化(ΔG_{adh})は、新たに生じる界面のエネルギーから消失する界面のエネルギーを差し引いた(1)式で表わされる。

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{adh}} = & -2\gamma_L - 2\sqrt{\gamma_B^p \gamma_S^p} - 2\sqrt{\gamma_B^d \gamma_S^d} + 2\sqrt{\gamma_B^p \gamma_L^p} + 2\sqrt{\gamma_B^d \gamma_L^d} \\ & + 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} + \sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} \end{aligned} \quad (1)$$

(1)式より、自由エネルギーの変化 ΔG_{adh} が負であれば、付着する方がエネルギー的に安定であり、付着は進行する。反対に ΔG_{adh} が正であれば、外からの仕事が必要であれば付着は困難になる。さらに、 $\Delta G_{\text{adh}} = 0$ のときは平衡状態にあり、微生物は浮遊状態でも、付着でも平衡になりうる^{1,2)}。

菌株は、国立感染症研究所から譲与された非病原性の *Leptospira biflexa* Patoc 1 株であり、EMJH 培地を用い、 30°C で培養した。菌数は、微分干渉装置蛍光顕微鏡(ZEISS 社製 Axio skop 2)で暗視野法により測定した。

レプトスピラでの残渣($0.1 \mu\text{m}$ フィルター)の表面張力の非極性成分 γ_S^d と極性成分 γ_S^p は静的液滴法を適用し、(2)式と(3)式から求めた。

$$\gamma_S^d = \left\{ \gamma_L^d (1 + \cos \theta)^2 \right\} / 4 \quad (2)$$

$$\gamma_S^p = \left\{ (\gamma_L^{p''} + \gamma_L^{d''})(1 + \cos \theta'') - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^{d''}} \right\}^2 / 4\gamma_L^{p''} \quad (3)$$

静的液滴法での液滴は α -ブロモナフタレンと 0.1M NaCl 水溶液を用いた。ここで、 γ_L^d と θ は α -ブロモナフタレンの表面張力の値および接触角である。また $\gamma_L^{p''}, \gamma_L^{d''}$ は各々、 0.1M NaCl 水溶液 θ'' の表面張力の極性成分、非極性成分である。

3. 実験結果および考察

3-1 固液界面での表面張力

γ_S^d の値は、 $26.8 \sim 28.6 \text{ dyn/cm}$ の値を取った。通常の菌は $20 \sim 30 \text{ dyn/cm}$ に集中するといわれており、レプトスピラは通常の菌と同じ表面張力をもっていると判断された。

3-2 自由エネルギーの変化

レプトスピラの自由エネルギーの変化(ΔG_{adh})は -21 dyn/cm ほどの値であった。 $\gamma_L^p > \gamma_B^p$ であることを考慮すると、 ΔG_{adh} が負の値をとるほどエネルギー的に安定であり、付着が生じやすい方向に進む²⁾。実験では ΔG_{adh} は負であることよりレプトスピラは皮膚に付着しやすい傾向があることが示唆された。しかし、信憑性ある結論を得るためには、実際に付着するか否かを実証する必要がある。

3-3 ガラスとプラスチックの付着実証実験

ΔG_{adh} の信頼性を得るためガラスとプラスチックでの実証実験を試みた。カバーガラスの値はわずかに負であり、付着しにくく、一方皮膚の代用を想定したプラスチック・フィルムは皮膚と同様の ΔG_{adh} を示したが表面の形状から付着量は皮膚より少ない結果を得た。

3-4 皮膚の付着実証実験

実際の皮膚への付着を検討し、 ΔG_{adh} の実証の一助とした。表-1は、指への付着状況を示している。30分間指を浸した結果、総菌数の23~29%が指に付着すると推察され、上述3-2の ΔG_{adh} の理論結果を実証できる結果が得られた。

表-1 指への付着状況

	ビーカー内総菌数 a (n/mL)	指への付着後のビーカー内 菌数 b (n/mL)	b/a (%)	cm ² 当たりの付着菌数
Run 1	2.00×10^7	5.70×10^6	28.5	1.22×10^7
Run2	1.13×10^7	3.03×10^6	26.8	8.00×10^6
Run3	1.13×10^7	2.60×10^6	23.0	7.18×10^6

また、洗浄の効果をj知る実験として、菌懸濁液に30分間指を浸し、水で洗浄した後に付着している割合は95%ほどであり、一旦皮膚に付着したレプトスピラは容易に脱着しにくいことが判明した。

表-2 洗浄後付着している割合

総菌数から30分後に指を引き 抜いたビーカー内菌数の差の 平均(n/mL)	総菌数のうち指に付着し た割合の平均 (%)	洗浄後、指に付着している割合 の 平均 (%)
2.82×10^6	29.1	94.5

なお、実験はビーカーで行ったが、壁面への付着は極わずかであり、ガラスへの付着量は無視した。

4. おわりに

レプトスピラの皮膚への付着特性を検討した結果、皮膚はレプトスピラが付着しやすい状況にあることが指摘できた。したがって、感染予防上は、長靴や着衣など直接、菌に接することがないように留意する必要がある。また、プラスチックに比べて皮膚への付着が多いのは、レプトスピラ菌の両端または片端にある鉤が影響しているとも考えられる。最後に森崎久雄立命館大学教授の助言に感謝する。

参考文献

- 1) Busscher H. J., Weerkamp A. H. et al. : Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion, Applied and Environmental Microbiology, Vol.48, No.5, pp.980-983, 1984.
- 2) 2) 森崎久雄, 服部黎子: 界面と微生物, 学生出版センター, 1章, pp.13-61, 1986.