

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560502

研究課題名（和文） 環境水中のレジオネラ属菌の生育環境調査と新しい分類方法の確立

研究課題名（英文） *Legionella* in environmental water and determination of *Legionella* by a Novel DNA Pattern Analysis Method

研究代表者

平山 けい子 (KATAYAMA-HIRAYAMA KEIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：40111778

研究成果の概要（和文）：河川水中のレジオネラ属菌の調査を行なった結果、リン酸イオンが検出されない地点では、レジオネラ属菌は測定されなかった。河川水中のレジオネラ属菌生育を防ぐにはリン酸イオンの制御が効果的であることが考えられる。生存率（培養法/RT-PCR法×100）は、0.1～0.5%であった。簡便で特異性が高い新しい分類法であるDNA解離波形解析法(Genopattern法)について検討を行った。*Legionella pneumophila*の既同定株15株について、DNA解離波形パターンを測定しマスターデータを作成し、環境分離株の同定を試みた。

研究成果の概要（英文）： A survey of water samples in Yamanashi Prefecture, Japan, was conducted in order to determine the relationship between the growth of colony-forming *Legionella* and water quality parameters. *Legionella* was also analyzed by real time PCR (RT-PCR). Colony-forming *Legionella* was not detected in water samples in which phosphate ions were not measured. To control phosphate ion may be effective to protect from *Legionella* growth. RT-PCR *Legionella* was measured in all of the samples that were negative for colony-forming *Legionella*. The survival rates (colony-forming *Legionella* / RT-PCR *Legionella* × 100) were 0.1% to 0.5%. DNA pattern analysis of 15 species in the genus *Legionella pneumophila* was carried out by a novel DNA pattern analysis method (Genopattern method). DNA pattern of 15 species exhibits a specific pattern, which is different from other's. The result suggests determination by Genopattern method may be applicable to distinguish species of *Legionella*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：衛生工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：土壌・水環境

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ属菌が生育しない河川水質の条件を明らかにする レジオネラ属菌は、自然界の土壌や水をはじめ、給湯設備、循環式浴槽、修景用水などの人工環境中に広く存在するため、免疫不全患者、高齢者や幼児など

の免疫力が低く感染しやすい人々がレジオネラ症を発症する危険性が考えられる常在菌で、現在、*Legionella pneumophila*（基準菌種）をはじめに58菌種が同定されている¹⁾。

レジオネラ感染は、レジオネラ属菌を含む

水がエアロゾルとなって空中に浮遊し、それを人が吸い込むことによって生じる。エアロゾルが発生する場所には空調用冷却塔水、温泉浴槽水など以外にも河川や滝、公園などの修景用水がある。温泉などの浴場は殺菌やかけ流しなど、また、公園などの修景用水は洗浄や消毒などによる水質管理が徹底されつつあり、感染の危険性は少なくなっている。しかし、川や滝は殺菌などの手段を取ることができず、また、研究代表者らが行っている河川水や修景用水の調査においても、レジオネラ属菌は約20%の検出率となっている。現状では、河川や滝での感染報告は無く、河川や滝を対象とした調査報告は少ない。しかし、上述のとおり、河川水や滝においてレジオネラ属菌と接触する可能性は高いと考えられる。したがって、河川水の水質とレジオネラ属菌の生育の有無との関係を明らかにすることと、分類・同定により菌種の分布を明らかにすることは、感染予防や、感染経路を推定するための基礎的かつ重要な知見となる。

操作が簡単で特異性の高いレジオネラ属菌の新しい分類法を確立する レジオネラ属菌は、一般の培地にはまったく生育せず、酵素活性が微弱なため一般的な生化学試験で種のレベルまで同定することが困難なため、レジオネラの同定法としては、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるものと、抗血清によるものが市販されている。しかし、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法では、種レベル26菌種の同定に限られ、レジオネラ免疫血清法では、レジオネラ属4種と *Legionella pneumophila* 血清群1～6計10種の同定に限られる。そこで、種レベルから血清群レベルの同定に加えて、株レベルの分類が可能な方法として、DNA解離波形解析法(ジェノパターン法)に着目した²⁾。

この方法は、ゲノム上に複数出現する塩基配列を認識し、この領域から一本鎖DNAを同時に合成する、多領域・同時性を特徴とするプライマーを用いる。原理的には、1塩基の違いでも生成されるDNA断片は異なったものとなるので、波形パターンの変化に反映される。本法は、プライマーにより合成された多数の一本鎖DNAの相互干渉産物に蛍光物質を取り込ませ、加熱により解離変性させて得られる蛍光強度微分値(解離曲線)のパターンからDNA解離波形を解析し、分類を行う全く新しい方法であり、DNAの性状を広範囲に解析することが可能となる。また、測定自体が簡便で迅速、かつ、特異性が高いといった利点がある。DNA抽出後、約3時間で分類が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、河川水において、レジオネラ属菌が生育しない水質条件を明らかにすること、操作が簡単で特異性の高いレジオネラ属菌の新しい分類法を確立することの2点である。河川水の水質とレジオネラ属菌の生育の有無との関係を明らかにすることと、分類・同定により菌種の分布を明らかにすることは、感染予防や、感染経路を推定するための基礎的かつ重要な知見となる。

3. 研究の方法

(1) 河川水を採水し、水質調査を行なった。一般的な水質項目に加え、レジオネラ属菌の生育に必要な第一鉄イオン濃度を測定し、水質項目とレジオネラ属菌の生育との関係を調べた。

(2) 培養法によるレジオネラ属菌測定とRT-PCR法によるレジオネラ属菌測定を行い、生存率を算出した。

(3) ジェノパターン法によるレジオネラ属菌の分類を試みた。レジオネラ属菌の16SrRNA遺伝子をターゲットとし、複数回表れる約10程度の塩基配列に対するプライマーを設計、作成した。プライマーのGC含量と、Hit数(Hit;プライマー配列の中で連続した7mer以上がゲノム上に存在する数 vs. *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1*

(NC_002942) 3,397,754bp)を変えて、プライマーを作成した。プライマーによりDNA試料から合成された多種類の一本鎖DNAの相互干渉産物に蛍光物質を取り込ませ、加熱により解離変性させて得られる蛍光強度微分値(解離曲線)のパターンからDNA解離波形を解析し、DNA解離波形パターンを測定した。

(4) レジオネラ属菌の既同定株を、菌株保存機関(ATCC)より入手し、DNAを抽出し、血清群、株別のDNA解離波形パターンを測定後、マスターデータとした。浴槽水などから分離されたレジオネラ属菌株について本法による同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 河川水中のレジオネラ属菌の生育と水質項目の関係

山梨県内の河川で、2002～2009年にわたり、計62地点のべ95回採水を行った。レジオネラ属菌は全62調査地点中、14地点で検出された。検出率は、20%であった。検出された菌数は、4～112CFU/100mlで、過去において浴場などで報告されている菌数過去において浴場などで報告されている菌数の10～2×10⁴CFU/100mLよりかなり低かった。レジオネラ属菌の検出状況と水質の関係を図1～3に示した。

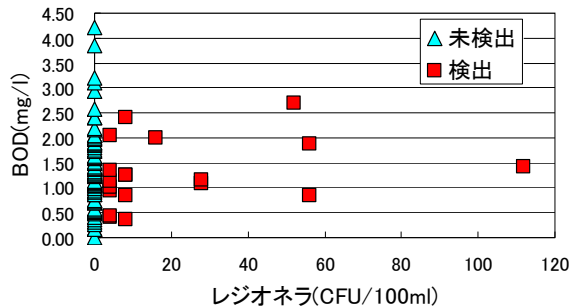


図1 レジオネラ属菌が検出された地点と検出されなかった地点のBOD濃度

図1より、レジオネラ属菌はBODが3mg/L以下の比較的きれいな地点で検出されている。レジオネラが検出された地点で最も低いBOD濃度は、0.36mg/Lであった。レジオネラ属菌は、通常細菌がエネルギー源として用いることができる糖を用いることができず、アミノ酸のL-アルギニン、L-システイン、L-ロイシンなどを炭素源として利用できることが報告されている³⁾。今回の調査では、BODを炭素源としての指標と位置づけて検討を行ったが、今後は、必須とされるL-システインの測定を試み、より正確な水質とレジオネラ属菌検出との関係を明らかにする必要がある。

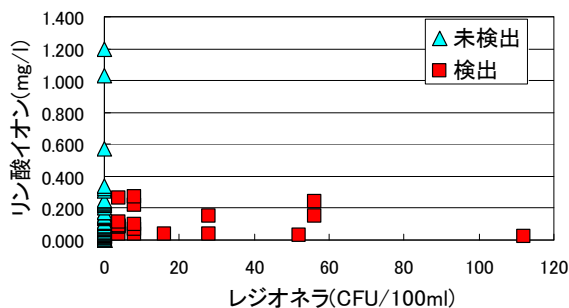


図2 レジオネラ属菌が検出された地点と検出されなかった地点のリン酸イオン濃度

図2に、レジオネラ属菌が検出された地点と検出されなかった地点におけるリン酸イオン濃度を示した。図2より、リン酸イオン濃度が0.02~0.27mg/Lと、比較的濃度が低い地点でレジオネラ属菌が検出されている。しかし、リン酸イオン濃度が0mg/Lであった22地点からは、レジオネラ属菌は検出されなかった。レジオネラ属菌が検出されなかった22地点中、18地点では大腸菌群が検出されており、BODは0.16~3.86mg/Lであった。リン酸イオン濃度が0mg/Lであっても、大腸菌群が検出され、BODが測定されていることは、ともに微生物活性があることを示し

ている。低濃度のリン酸イオンに対して競合する、つまり、リン酸イオンが制限因子となるような環境では、レジオネラは生育しない可能性が考えられることから、河川水中のレジオネラ属菌生育を防ぐにはリン酸イオンの制御が効果的であることが考えられる。

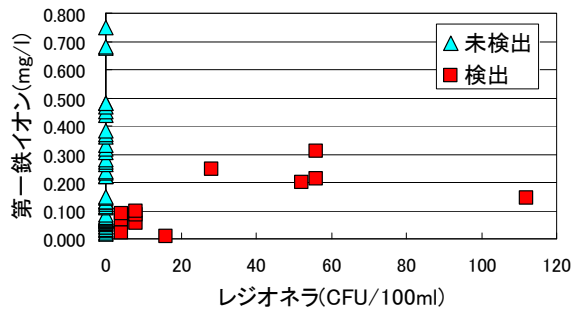


図3 レジオネラ属菌が検出された地点と検出されなかった地点の第一鉄イオン濃度

図3に、レジオネラ属菌が検出された地点と検出されなかった地点における第一鉄イオン濃度を示した。

第一鉄イオンはレジオネラの生育には不可欠な物質であるが、図3からは明確な関係性を見つけることはできない。レジオネラ属菌が検出された地点の第一鉄イオン濃度は、0.01~0.31mg/Lであった。検出されなかった地点における第一鉄イオン濃度は、0.02~0.75mg/Lの範囲であった。また、第一鉄イオン濃度が0mg/Lの地点はなかった。第一鉄イオンはレジオネラ属菌の生育に不可欠な物質とされるが、今回、レジオネラ属菌が検出された地点の中で最も第一鉄イオン濃度が低かった地点の値は0.01mg/Lであった。したがって、第一鉄イオンは、どの地点においても微生物の生育に必要な量は足りており、他の条件が満たされれば、環境水中にレジオネラ属菌が生育してくる可能性が考えられる。

(2) 培養法によるレジオネラ属菌数とRT-PCR法によるレジオネラ属菌数の比較

図4に、2009年に調査した20地点における、培養法でのレジオネラ属菌とRT-PCR法で測定したレジオネラ属菌数を示した。培養法でレジオネラ属菌が検出された地点では、4~8CFU/100mLであったのに対し、RT-PCR法で測定した値は $7.6 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^3$ CFU/100mLと、培養法での菌数より高く、生存率(培養法でのCFU/RT-PCR法でのCFU×100)は、0.1~0.5%であった。レジオネラ属菌が検出されなかった地点でも、RT-PCR法では $4.4 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^3$

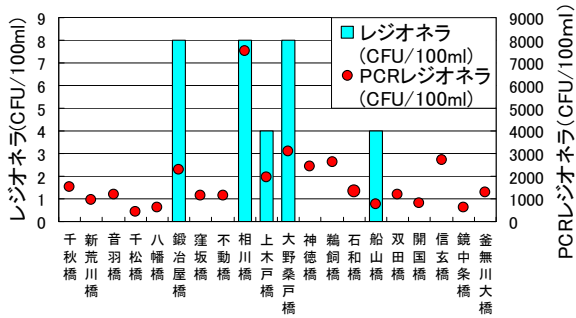


図4 培養法とRT-PCR法によるレジオネラ属菌の測定値の比較

CFU/100mLのレジオネラ属菌が検出された。RT-PCR法では、測定された菌の生死は判別できないため、培地上で生育できないレジオネラ属菌が含まれている可能性も考えられる。一方、生菌数の測定には、最低でも1週間を要するが、RT-PCR法では1日で測定結果が得られるものの、生菌が検出された試料での生存率は0.1~0.5%であり、RT-PCR法での測定結果のみを用いると、過大評価になる恐れがあるものと考えられる。

(3) DNA解離波形解析法(Genopattern法)によるレジオネラ属菌の同定

表1に実験に用いたレジオネラ属菌を示した。表2に実験に用いたプライマーを示した。

表1 実験に用いたレジオネラ属菌の種類

ATCC No.	菌株	血清群
33152	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	1
33153	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	1
43107	<i>Legionella pneumophila Brenner et al</i>	1
43106	<i>Legionella pneumophila Brenner et al</i>	1
43109	<i>Legionella pneumophila Brenner et al</i>	1
33154	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	2
33155	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	3
33156	<i>Legionella pneumophila subsp.fraseri Brenner et al</i>	4
33216	<i>Legionella pneumophila subsp.fraseri Brenner et al</i>	5
33215	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	6
33823	<i>Legionella pneumophila Brenner et al</i>	7
35096	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	8
35289	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	9
43283	<i>Legionella pneumophila subsp.pneumophila</i>	10
35251	<i>Legionella pneumophila subsp.fraseri Brenner et al</i>	15

表2に実験に用いたプライマー

プライマー名	GC含量 (%)	Hit数
PF00089	46.15	980
PF00099	61.54	1370
PF00102	38.46	875
PF00129	84.62	451
PF00143	46.15	1324
PY01344	84.62	768
PY01427	83.33	346
PY01436	83.33	630
PY02336	84.62	573

DNA解離波形パターンの例として、図5に、プライマーPF00129を用いて検出されたレジオネラ属菌のDNAの波形と菌株名(ATCC number, 血清群)を以下に示す。

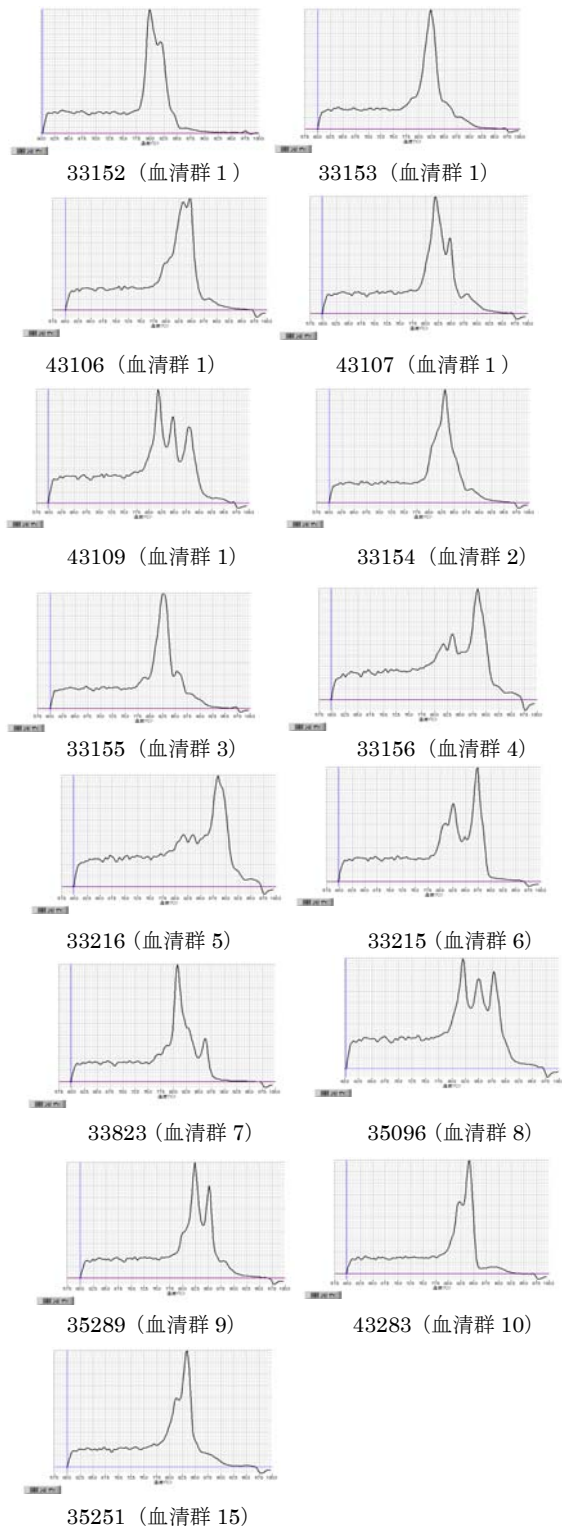


図5 プライマーPF00129を用いて検出されたレジオネラ属菌のDNAの波形

表3は、図5に示した、各DNA解離波形に基づいて、ピーク数、ピーク高さなどに重み付けを行いそれぞれの一致率を算出した結果をまとめたものである。

表3 プライマーPF00129により作成したDNA解離波形パターンの一一致率

比較されるデータ	基準となるデータ(マスターデータ)														
	血清群1														
	血清群1	血清群2	血清群3	血清群4	血清群5	血清群6	血清群7	血清群8	血清群9	血清群10	血清群15				
33152	33153	43106	43107	43109	33154	33155	33156	33216	33215	33223	35006	35289	43283	35251	
33152	100	48	13	30	18	7	28	7	1	20	63	15	25	33	
33153	65	100	62	67	38	45	68	22	15	50	60	32	57	60	
43106	41	66	100	68	83	72	42	18	49	45	38	72	63	73	
43107	47	74	70	100	58	70	68	42	13	56	47	50	88	46	
43109	45	61	60	74	100	49	48	68	30	59	44	83	61	49	
33154	35	76	89	77	37	100	80	54	14	57	43	26	75	64	
33155	41	76	67	68	41	83	100	36	21	47	55	31	77	45	
33156	40	51	74	54	70	63	55	100	27	49	41	69	55	54	
33216	35	51	35	42	49	39	47	31	100	45	54	40	42	28	
33215	56	71	48	59	57	54	57	31	37	100	51	48	58	35	
33823	69	66	28	46	33	21	47	14	16	30	100	26	40	12	
35096	51	58	62	69	83	36	49	64	32	53	45	100	68	45	
35289	58	79	73	87	47	69	72	29	19	57	50	48	100	49	
43283	35	68	38	58	22	55	45	32	10	46	18	23	50	100	
35251	31	83	82	71	25	90	72	32	16	51	60	24	70	61	

解離波形パターンは、それぞれの菌株で異なっており、解離波形パターンを目視で比較するとともに、解析ソフトウェアGenoMasterを用いて一致率を算出し、既同定株と80%以上の一致率が認められれば、分類可能であると考えられる。

山梨県内の温泉から検出された未分類のレジオネラ属菌について、実際にジェノパターン法を用いて分類を行った。あらかじめ、市販のDNA-DNAハイブリダイゼーション法キットを用いて、*Legionella pneumophila*であることを確認した後、ジェノパターン法による分類を試みた。プライマーPF00102により検出された波形と一致率、差の二乗のいずれからみても種類が一致したことから、Y4株、Y5株は33155(血清群3)である可能性が高いことが分かった。

以下に、プライマーPF00102により検出されたY4株、Y5株の波形パターンと一致率の例を示した。水色の波形がサンプル、黒色の波形がマスターデータである。

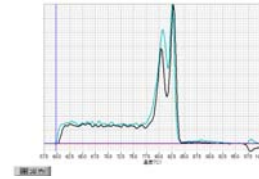


図6 Y4株と33155(血清群3)一致率84%

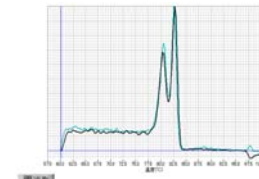


図7 Y5株と33155(血清群3)一致率85%

今後の改善点としては、プライマーの改良を試みるとともに、複数のプライマーを用いてクロスチェックを行なうことによりさらに信頼性の高い結果が得られるものと考えられる。

一方、プライマーのGC含量とHit数において、分類できるレジオネラ属菌の種類との関係性は良く分らなかったがHit数が高いことが、多くの株に対して異なるパターンを示すわけではなかった。また、生成されたDNA断片の塩基配列と波形の関係性を解明する必要がある。

参考文献

- 1) DSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=LEGIONELLA
- 2) Sugawara, I., et al. 'Recent advances on multidrug-resistant tuberculosis testing and identification among various *Mycobacteria*', "Research Advances in Microbiology". R.M. Mohan ed. Global Research Network, Kerala, India, 2004
- 3) 古畑勝則, 水環境におけるレジオネラ属菌の生育状況,防菌防黴, 25,369-377,1997

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 環境水域中のレジオネラ属菌の調査（解説），平山けい子，日本福祉工学会誌，11，（1），8-13，2009 査読有
〔学会発表〕（計 3 件）
- ① *Legionella* in river water, Keiko Katayana-Hirayama, Hidehiro Kaneko and Kimiaki Hirayama, 4th IWA-SAPIRE, 2011. 10. 2-6, (Tokyo), accepted
- ② 河川水中のレジオネラ属菌の測定，平山けい子，荒川，平山公明，日本福祉工学科意 第 1 4 回学術講演会論文集，11-12，2010.11.27，岩手大学(盛岡市)
- ③ 環境水域中のレジオネラ属菌の調査，高橋佑治，平山けい子，平山公明，土木学会関東支部第 3 6 回技術研究発表会，VII-45，2009. 3. 13. 日本大学（東京）

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 けい子 (KATAYAMA-HIRAYAMA KEIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：4 0 1 1 1 7 7 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

柳 亨 (YANAGI TOORU)

(株)G&G サイエンス基盤研究所所長