

繊毛虫を用いた一般循環水中の*Legionella*等の 雑菌除去処理法の開発

研究代表者 理工学研究科 D3 杉井 学

研究の目的

グラム陰性短桿菌である*Legionella*属細菌は、自然界ではごくありふれた土壌細菌であるが、ビル屋上などに設置される空調用冷却塔（クーリングタワー）や公園の噴水、銭湯などの循環水に混入して増殖することがわかっている。人体へは、これらの循環水のエアロゾル化した飛沫の吸引で感染するが、特に老人や幼児、免疫力の低下した人体に感染した場合に、重篤な肺炎を引き起こす。*Legionella*は、熱処理や塩素系化学薬品処理などで死滅するにもかかわらず、この菌が原因の肺炎が多発しているのは、コストや手間の面から適切に洗浄処理が行われている施設が少ないことが原因である。大阪府立公衆衛生研修所が行った空調用冷却水水質検査の結果、わが国の97.7%の施設で*Legionella*が検出されるに至った。都市化の中で人工的に作り出された、水環境に適応してしまった*Legionella*は、薬品処理だけでは適切に除去することが困難であるといえる。

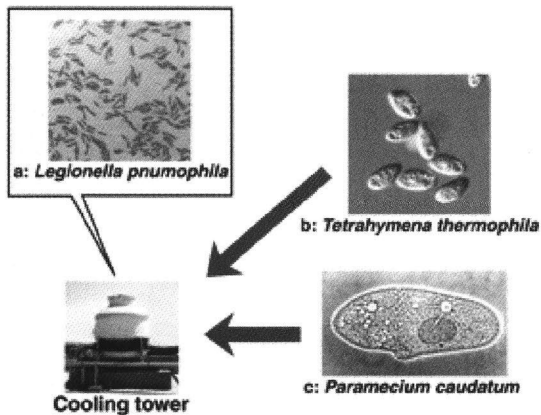


Fig.1 繊毛虫を用いた*Legionella* 除去処理

そこで、*Legionella*等の細菌処理において、化学薬品を使用せず、維持費を抑え、環境汚染問題を考慮した天敵生物を用いた処理法の開発を計画した。本プロジェクトでは、*Legionella*の天敵となり得る生物として繊毛虫に注目した。真核の単細胞生物である繊毛虫類の多くは、*Legionella*と

同様のグラム陰性短桿菌で肺炎の原因菌でもある*Klebsiella pneumoniae*を餌として増殖できる。前培養した繊毛虫をクーリングタワー等の循環水中に少量添加することで、*Legionella*および他雑菌を効率よく処理できる可能性が高い。また、現在*Legionella*対策として行われている化学薬品処理の問題点である、コスト、手間、地球環境破壊などの多くの問題点も解決できると考えられる。そこで、効果的に*Legionella*等を捕食できる繊毛虫をスクリーニングし、得られたデータから、捕食者を用いた高効率で安全な*Legionella*等の有害細菌の処理法を確立する。

研究成果

Legionella pneumophila (serogroup 1 SMUM 2051) を捕食処理することができる繊毛虫をスクリーニングするため、*L. pneumophila*と4種類の繊毛虫、*Tetrahymena thermophila* (CU427)、*Paramecium caudatum* (ORA4)、*Didinium nasutum*, *Blepharisma japonicum*を混合培養した。その結果、すべての繊毛虫が*L. pneumophila*を食胞内へ取り込んだが、*D. nasutum*は*P. caudatum*を選択的に捕食するという食性から、他の3種類よりも*L. pneumophila*の取り込み量は少なかった。次に、食胞内のpH変化に注目して、*L. pneumophila*を取り込んだ繊毛虫で、正常な消化過程が進行するかどうかを調べた。Acridine orangeを培養液に加えて混合培養を行った結果、*T. thermophila*および*P. caudatum*では、*L. pneumophila*を取り込んでから1時間経過しても、食胞内の酸性化は起こらず (Fig. 2 A, B)、48時間経過後、*L. pneumophila*は食胞内および細胞質に観察された。このことから、*T. thermophila*および*P. caudatum*では消化過程の初期段階であるアシドソームの融合が、*L. pneumophila*によって阻害され、*L. pneumophila*を正常に消化できないと考えられる。一方、*D. nasutum*と*B. japonicum*では、混合培養開始後20分で食胞内の酸性化が起こり (Fig. 2 C, D)、*L. pneumophila*の取り込み後48時間経過後は、食胞内や細胞質に*L. pneumophila*は観察されなかった。そこで、*Legionella*を特異的に認識する抗*Legionella*抗体をもちいて*B. japonicum*

の *L. pneumophila* の取り込みと消化について調べた。*L. pneumophila* の取り込み後24時間経過した *B. japonicum* を抗 *Legionella* 抗体をもちいて間接蛍光抗体法で顕微鏡観察したところ、細胞肛門付近に断片化した *L. pneumophila* の蛍光が多数観察された (Fig. 4)。*L. pneumophila* の取り込み後48時間経過した *B. japonicum* では、食胞内および細胞質内に *L. pneumophila* の蛍光は観察されず (Fig. 5)、*L. pneumophila* が *B. japonicum* に寄生または殺害しないことがわかった。また、*B. japonicum* は、*L. pneumophila* を餌として継代培養を続けることができた。

Legionella は、マクロファージに寄生することで肺炎を発生させることが明らかになっており、クーリングタワーなどでは、主にアメーバに寄生して増殖すると考えられている。しかし、本研究により、原生動物の中には *Legionella* に耐性を持つものが存在することを発見し、*B. japonicum* は *Legionella* 処理に利用可能であることがわかった。また最近、野外から採集した *P. caudatum* (Yus12) は、*P. caudatum* (ORA4) とは異なり、混合培養によって、*L. pneumophila* を著しく減少させることを示す結果を得た。Fig. 6は *P. caudatum* (Yus12) と *L. pneumophila* を混合培養したときの培養液の濁度の変化を示している。*P. caudatum* (Yus12) を 8×10^2 cell、*L. pneumophila* を 3×10^9 となるように混合し (Fig. 6, 0 day, P+L) 25°C で培養した。培養開始時に *L. pneumophila* で白濁していた培養液は、5日後にはほぼ透明になった (Fig. 6, 5 day, P+L)。また、混合培養開始時と5日後の培養液 $100 \mu\text{l}$ を SDS-PAGE で展開し、抗 *Legionella* 抗体を用いてイムノブロット染色を行った結果、混合培養後の試料では、*L. pneumophila* の高分子タンパク質が顕著に減少しており、*P. caudatum* によって *L. pneumophila* が分解されていることを裏付ける結果であった。

以上の結果から、次のような *Legionella* 処理法が実現可能である。

1. *B. japonicum* による *Legionella* 処理

B. japonicum はシスト形成により長期保存が可能で、ゼラチンカプセルなどへの封入により、取り扱いを容易にできる。

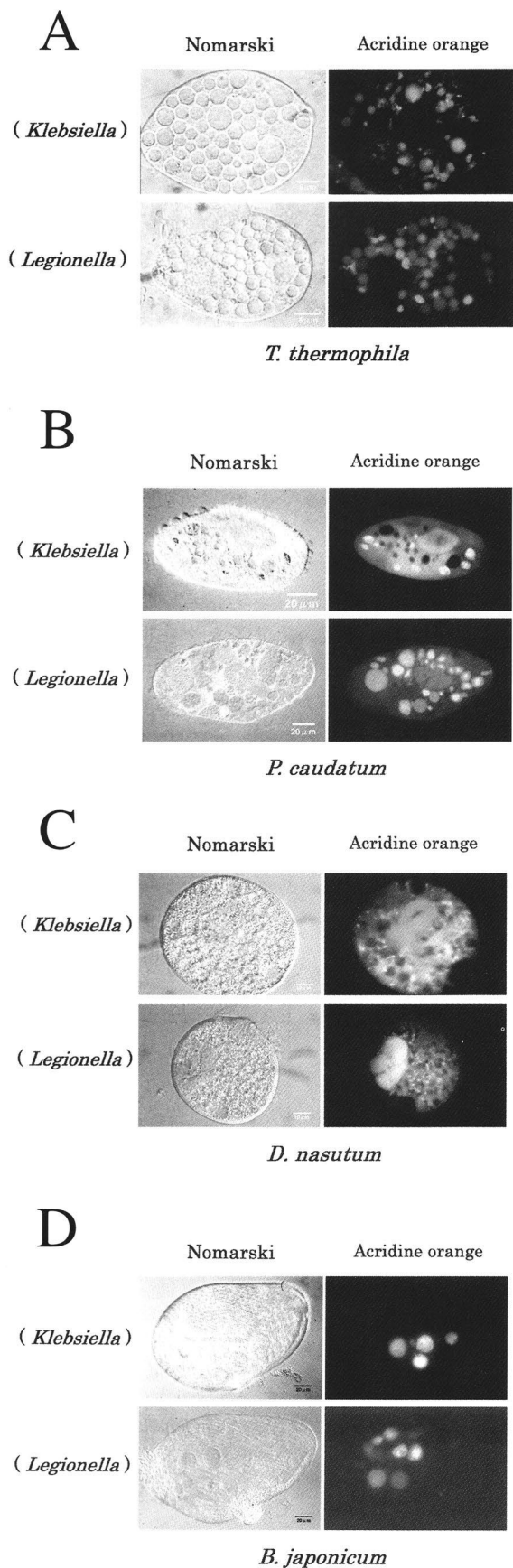


Fig. 2 *L. pneumophila* または *K. pneumoniae* を取こんだ繊毛虫の食胞内 pH 変化。黄緑色は中性、赤色は酸性を示す。

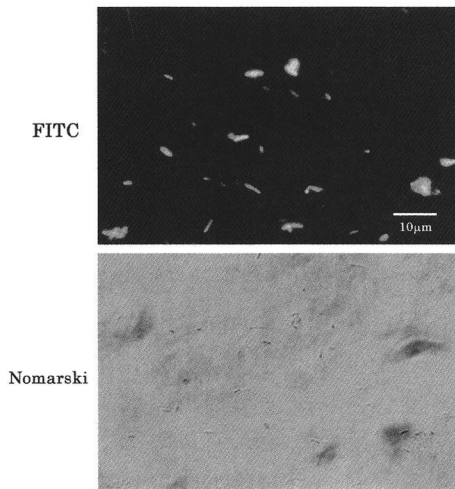


Fig. 3 抗 *Legionella* 抗体を用いて染色した *L. pneumophila* の間接蛍光抗体顕微鏡像

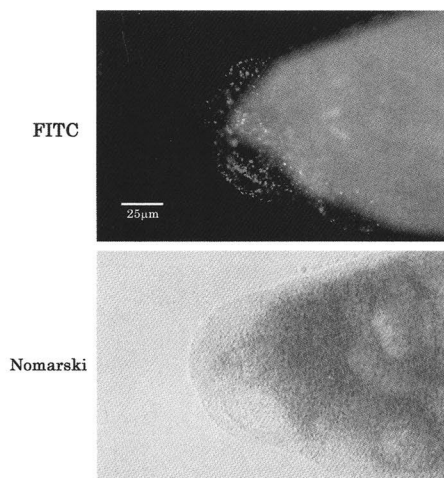


Fig4 *B. japonicum* 細胞内の断片化された *L. pneumophila* の間接蛍光抗体顕微鏡像

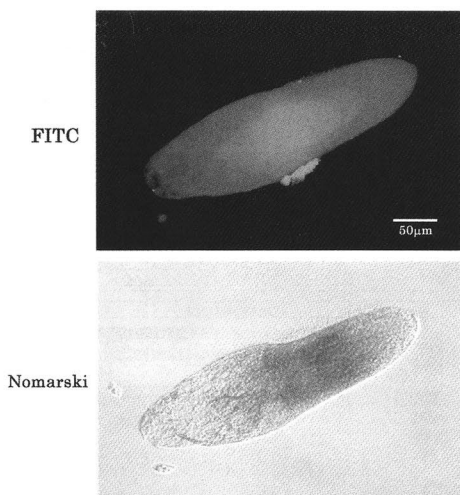


Fig.5 *B. japonicum* と *L. pneumophila* 混合培養後の48時間の間接蛍光抗体顕微鏡像

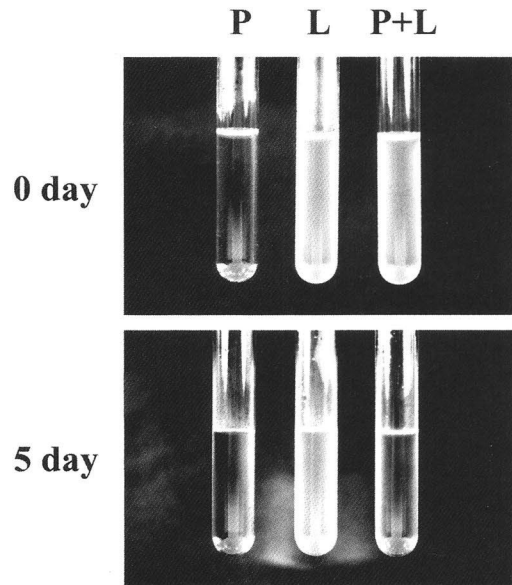


Fig.6 *P. caudatum*(Yus12)と *L. pneumophila* の混合培養。P, *P. caudatum*(Yus12)のみ。L+P, *P. caudatum*(Yus12)と *L. pneumophila* の混合培養。

2. *P. caudatum* (Yus12)と *D. nasutum*による *Legionella*処理

*P. caudatum*による *Legionella*の処理速度は、*B. japonicum*に比べて速いと考えられるが、シスト形成をしないため、カプセル封入保存などは困難である。必要であれば、*P. caudatum*による *Legionella*処理の後、*D. nasutum*によって *P. caudatum*の処理を行うこともできる。

産業技術への貢献

微生物はさまざまな産業に利用されているが、病原性細菌の処理に原生動物を用いた方法はこれまでにない。繊毛虫を用いた *Legionella*等の雑菌除去処理が実現すれば、クーリングタワー、雨水貯水タンク、人口噴水・池などで効果を発揮し、*Legionella*属細菌だけでなく、他の雑菌や小形原生動物の発生も抑えることができる。繊毛虫によるこの処理方法は、適切に行うことが困難な薬品処理に代わって、簡便で維持費がかからず、地球環境および人体に対して安全な処理方法となる。

連絡先

電話 083-933-5721 (藤島研究室)
FAX 083-933-5712 (藤島研究室)
E-mail: manabu@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp